

岩手医科大学
学位審査報告



氏 名 品川 拓 人 (昭和33年2月25日)
 本 籍 地 北 海 道
 学 位 の 種 類 博士 (歯学)
 学 位 授 与 番 号 岩医大歯博第104号
 学 位 授 与 の 日 付 平成16年6月17日
 学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当者 (博士の学位論文提出者)
 学 位 論 文 題 目 Characterization of apoptotic cells induced *in vitro* in Meckel's chondrocytes by anticancer agents (抗癌剤によって培養メッケル軟骨に誘導されるアポトーシス細胞の特徴)

論文内容の要旨

I. 研究目的

本来アポトーシスは胎生期の形態形成をはじめとする器官の発生と分化に伴う生理的条件下でのプログラム細胞死とされている。しかしながら最近の研究では、ウイルスや細菌感染、紫外線照射および抗癌剤のような物理的、化学的要因によって生じる偶発的な細胞死でもアポトーシスの生じることが報告されている。本研究では、抗癌剤のエトポシドとカンプトセシンによって正常なメッケル軟骨細胞に誘導される細胞死がアポトーシスか否かという観点から検討を加えた。

II. 研究方法

細胞死は胎生16日のマウスから分離、培養したメッケル軟骨細胞にエトポシド (200 μ g/ml) とカンプトセシン (50 μ g/ml) を用いて誘導した。アポトーシス細胞は TUNEL 法と光顕 (トリパンフルー染色, トルイジンブルー染色, ヘキスト染色) および電顕的観察に加え, p53と bcl-2 抗体による免疫染色によって解析した。両抗癌剤処理後のアポトーシス細胞数は TUNEL 陽性細胞から統計的に算定した。

III. 研究成績

1. エトポシドで12時間処理後の軟骨細胞はトリパンフルー陽性で、トルイジンブルー染色で濃染した核は、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞と一致した。ヘキスト染色では濃縮したクロマチンやアポトーシス小体に強い蛍光反応がみられた。
2. カンプトセシンで12時間処理後の軟骨細胞はトリパンフルー染色、トルイジンブルー染色とヘキスト染色の何れでも陽性に染色された。これらの陽性細胞は TUNEL 染色でも一致していた。
3. エトポシドによるアポトーシス形成過程を電顕的に観察すると、最初核膜の陥入と細胞質の出芽を形成したが、細胞小器官の変化は認められなかった。次いで細胞の収縮に伴って核クロマチンが濃縮し、次第に真正クロマチンと異質クロマチンとに分離した。濃縮クロマチンの細胞内集積後、最終的にアポトーシス小体が形成された。
4. アポトーシス細胞を統計的に解析すると、エトポシドでは2時間から6時間までは少数だったが、その後両抗癌剤とも時間依存的に増加し、12時間から24時間にかけて著しく増加した。カンプトセシンではエトポシドに比べてより容易にアポトーシスが誘導された。
5. P53に対する免疫染色では、正常軟骨細胞は陰性であったが、エトポシドとカンプトセシン処理群では、核に陽性反応が認められ、特にエトポシドで強い反応がみられた。一方、bcl-2の反応は無処理の軟骨細胞で陽性であったが、抗癌剤処理群では陰性であった。

IV. 考察および結論

1. エトポシドとカンプトセシンはDNA断片化を示すTUNEL陽性細胞の増加を促進した。
2. 電顕的にエトポシド処理によるアポトーシスは、細胞性出芽、核クロマチンの濃縮とアポトーシス小体の形成順で進展した。
3. 両抗癌剤ともアポトーシス細胞は時間依存的に増加し、特に処理後12時間から24時間後にかけて著しく増加することが判明した。
4. P53の発現は両抗癌剤によって促進されたが、bcl-2ではその発現は減弱した。

以上の結果からエトポシドとカンプトセシンによってメッケル軟骨に誘導される細胞死は典型的なアポトーシス様の細胞死で、これらの抗癌剤は腫瘍細胞のみならず、正常な軟骨細胞にもアポトーシスを誘導することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

- 主査 教授 名 和 橙黄雄 (口腔解剖学第二講座)
副査 教授 野 坂 洋一郎 (口腔解剖学第一講座)
副査 教授 佐 藤 方 信 (口腔病理学講座)

哺乳類の胎生期に出現するメッケル軟骨は下顎骨の支持体として形成されるが、直接骨形成に関与することなく大部分は消滅することが知られている。その消失のメカニズムについては不明の点が多く、軟骨細胞の線維芽細胞への形質転換などが示唆されている。本研究ではアポトーシス誘導体として知られているエトポシドとカンプトセシンの2種の抗癌剤を用いて、培養メッケル軟骨細胞におけるアポトーシスの関与について検討した。

光顕・電顕による形態学的な観察の他に、TUNEL法によるアポトーシスの検出、アポトーシス抑制因子 (bcl-2)、アポトーシス促進因子 (p53) の発現を免疫組織化学的に検討した。

その結果、2種の抗癌剤によるメッケル軟骨細胞のアポトーシス誘導効果が確認され、いずれも形態学的には濃縮クロマチンのアポトーシス小体の形成が認められた。アポトーシス促進因子のp53の免疫染色では2種の抗癌剤処理群で陽性反応が認められ、特にエトポシドで強い反応が認められた。アポトーシス抑制因子のbcl-2は無処理群では陽性であったが、抗癌剤処理群ではともに陰性であった。

以上の結果から、エトポシドとカンプトセシンはともにメッケル軟骨のアポトーシスを誘導することが明らかになった。このことは、2種の抗癌剤は腫瘍細胞のみならず、正常な培養軟骨細胞にもアポトーシスを誘導することが明らかになり、抗癌剤の使用について1つの示唆を付与するものである。

試験・試問の結果の要旨

本論文の要旨について明解な説明がなされ、関連項目に関する試問に適切な解答が得られ、十分に学識と研究能力を有すると認めた。英語の試験を実施した結果、合格と判定した。