

理
275 函
1-1

学位申請論文

天野重豊

マウス奇形腫の分化に関する研究

天野 重豊

緒言

奇形腫とは、その腫瘍内に三胚葉に由来する種々の組織を含んでいる腫瘍である(20)。ヒトを含めて多くの脊椎動物に発生する奇形腫の起源がいかなる細胞なのかについては、古くから議論されている(24)。129系マウスの奇形腫の場合には、11~12日胚の細精管内で始源生殖細胞が悪性化し、自律的増殖をすることが明らかにされた(19、21)。

この悪性化した細胞、すなわち奇形がん腫細胞(Teratocarcinoma)が分化多能であることは実験的に証明され(17)、発生現象の新しい実験材料として注目されている。又、マウス奇形腫は、悪性細胞が良性化する現象を研究する実験材料としても有効であり(17)、実験的に奇形がん腫細胞と正常マウス胚から作られたモザイクマウスで、良性化が証明された(16)。

奇形がん腫細胞は正常な胚細胞に比べて、

in vivo あるいは *in vitro* における取扱いが容易である。従って、この分化多能な細胞の分化をコントロールできれば、正常な胚発生とは異なった方法で、細胞分化を研究することを可能にすると考えられる。

材料と方法

マウス奇形ガン腫

マウス奇形ガン腫 OTT6050 株と、129/SV-SL 系（以後単に 129 系と書く）マウスは、1971 年 12 月に Jackson 研究所の STEVENS 博士から贈られた。この株は、精巢に移植された 129 系マウスの 6 日胚に由来する (22)。その後、腹水型化され、多数の胚様体 (embryonic body) を含む腹水をマウス腹腔中に移植することによって、継代されている。

組織培養

マウス腹腔から胚様体を集め、緩衝生理食塩水で数回洗い、培養液に浮遊させて、その一部をそれぞれ 60 mm の Falcon プラスチック培養皿に移して初代培養を開始した。培養液は、Eagles Minimum Essential Medium (DAIGO) に 0.2 mM のグルタミンと 10% の牛胎児血清を加えたものである。継代培養は通常、穏やかにピペティングで胚様体を浮

遊させ、その一部を新しい培養皿に移して行
った。

培養皿のコラーゲン処理

コラーゲン処理は Konigsberg (12) の方法
を一部変更して行なった。簡単に述べると、
1% 酢酸液に溶かしたコラーゲン溶液と、6
% 食塩水とを5:1の割合で混ぜた液 0.5 ml
を、それぞれ培養皿一枚の底面に広げ 37°C
に一晩放置した。こうしてコラーゲン処理し
た培養皿は、リン酸緩衝液で洗ってから細胞
を移す前に、血清を含んだ培養液を入れて置
かれた。コラーゲンに吸着した血清中の物
質が胚様体の接着を促進した(10)。

腹腔中での一時的培養

少量の培養液に浮遊した SEB Ⅲ株のの胚様
体を129系マウス一匹当たり、 $3 \sim 5 \times 10^3$ 個の
割合で腹腔に注入した。腹腔から回収した胚
様体を、コラーゲン処理した Falcon プラス
チック培養皿一枚当たり、数千個培養した。そ
の後、決まった日毎に、律動する筋細胞の集

団を探すために、位相差倒立顕微鏡を用いて培養皿全面を調べた。見つけた筋細胞をそれぞれ培養皿の外側にマークし、自発的律動の開始した日及び止まる日とを記録した。律動する筋細胞の分化の頻度としては、培養皿に植えた胚様体の数当り、いくつの律動する集団が分化したかによつて計算した。

染色体分析

胚様体の培養を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のコルヒチンで5時間処理した。それから0.25%のトリプシンで処理した胚様体を、注射針を通して穏やかに出し入れ(5回)することによつて、単一細胞に分離した。10分間の1%クエン酸ソーダ処理で膨張した細胞を、メタノールと酢酸の混合液(3:1)で固定してからその液を冷たいスライドガラス上で燃やすことによつて広げた。染色体はギムザ液で染色した。

電子顕微鏡による観察

律動する筋細胞の集団を培養皿の外側からマークし、その場所で固定と処理をした。緩

平衡生理食塩水で洗ってから、順に2.5%グル
タールアルデヒドで固定、1%オスミウムで
後固定、アルコール系列で脱水した後、エポ
ン樹脂に包埋した。超薄切片はクエン酸鉛と
ウラン酢酸で染色した。

結 果

1 *in vivo* における増殖と分化

形態と分化能

OTT 6050 株の胚様体の外形は、ほぼ球形あるいは立方体であった(図 1A)。その内部構造は、奇形がん腫細胞の集団を、しばしば大きな空胞を持つ、一層の卵囊細胞が被っていた(図 1B)。しかし、小さな胚様体では奇形がん腫細胞を欠いていることがあった。胚様体の大きさは直径が 30 ミクロンから 500 ミクロンであったが、50 から 100 ミクロンのものが最も多かった(図 2)。腹腔中で胚様体は急速に増殖し 3.0 日毎にその数が倍加した。一部の腹腔中の胚様体は、種々の内臓の表面に接着して増殖し大きな腫瘍となった。この腫瘍中には、三つの胚葉に由来する種々の組織が分化していた(図 3)。

脂肪体の表面での増殖と分化

腹腔中の胚様体が最も頻繁に接着したのは

脾臓と膵臓に沿って存在する小さな脂肪体(図4A)であった。接着するのが見られたのは、胚様体を腹腔に注入して数日後であり、それが、必ず多数の間充織様の細胞に包まれていたのが観察された(図4B)。図5にこのようにしてできた15日目の腫瘍を示した。間充織の細胞に埋まった中心部の胚様体は大きく、周辺部のものは小さかった。より早く接着した胚様体は、増殖してより大きくなり、その表面にさらに他の胚様体が接着したものと考えられる。従って、図3に示した種々の組織が分化している大きな腫瘍は、多数の胚様体に由来したものである。

肺での増殖と分化

尾静脈から胚様体を注入すると、そのほとんどすべてが肺の毛細血管に留まった。そのため、数週間後には、それぞれの胚様体が肺コロニーを形成した(図6)。従って、注入する胚様体の数を少なくすれば、一個の胚様体がそれぞれどんな組織に分化するのか調

べることが可能であつた。

尾静脈に注入して3日後の胚様体の大きさの平均値は、 $3.3 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ であつたが、20日目には $2.0 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$ であつた(図7)。この期間、体積は2.9日毎に倍加した。図8Aは肺に留まり、7日目の胚様体を示している。それらの胚様体中には、約2週間後、ほぼ500ミクロンの大きさになり、 F 時に組織分化が起つてゐるのが観察された(図8B)。これらはさらに増殖と分化をし続け、約1ヵ月後には、多くの場合種々の組織を分化した(図9A)。

しかし、一つあるいはごく少数の組織しか分化しない場合も観察された。図9B、9C、9Dにそれぞれ分泌上皮、ケラチン上皮、未熟な上皮に分化した腫瘍を示した。これらの一種類の組織に分化した腫瘍は、種々の組織を分化した腫瘍よりもはるかに小さかつた。

2. *in vitro* における増殖と分化

SEB III株の樹立

in vitro で細胞分化を研究するために、*in vitro* 条件に適合した株を樹立することにした。OTT6050株の胚様体をFalconプラスチック培養皿中で培養すると、ほぼ10%の胚様体が接着し、他のものは培養液中に浮いていた。最初の2週間、増殖は速かったが、その後次第に低下した。しかし、数カ月後、増殖の速いものはいくつか現われた。*in vitro* 株を分離するために、増殖して大きくなった1個の胚様体をピペッティングで多数の小さな胚様体に分離した。そしてそのうちの1個を培養して再び大きくした。この過程を5回以上繰り返して株を樹立した。

図10Aにこのようにして樹立した株の1つであるSEBⅢ株の*in vitro*胚様体を示した。*in vitro*胚様体は、奇形がん腫細胞の集団とそれを包む一層の卵嚢細胞から成っていた(図10B)。図11にSEBⅢ株の染色体数を示した。ほとんどの細胞はほぼ2倍体に近い染色体を持っていた。SEBⅢ株を129系マ

ウスの皮下に注入すると、大きな腫瘍を形成し、その中に三つの胚葉に由来する種々の組織が観察された(図12)。

分化の誘導

SEBⅢ株は、マウス腹腔内に注入され、1週間後回収された。図13Aに示したように回収された直後胚様体の外見は、すでに変化していた。しかし内部構造はもっと変化していて、もとのSEBⅢ株の胚様体(図10)にはなかった上皮細胞や間充織が観察された(図13B)。回収された胚様体は、コラーゲン処理した培養皿中で培養した。その多くはコラーゲン基質に接着した。培養して2週間の間に、律動する筋細胞、神経細胞、上皮細胞、ケラチン細胞等が分化しているのが観察された。

表1に示したように、SEBⅢを1週間マウス腹腔内で培養すると、律動する筋細胞は誘導された。しかし腹腔内培養をしないで直接コラーゲン処理した培養皿で培養した場合に

は、筋細胞は分化しなかつた。SEB III は OTT 6050 よりも 50 倍の高い頻度で筋細胞を分化した。

腹腔内のどんな要素が SEB III の分化を引き起こすのかを調べるために以下の実験を行った。 (i) 培養液に腹水を 10% 加える、あるいは (ii) 腹腔内の遊離細胞と混合培養した後コラーゲン処理した培養皿で培養したが細胞分化は起こらなかった。そこで (iii) SEB III を diffusion chamber に入れて、腹腔内で培養したが、同様に分化は誘導されなかった。

心筋の分化

図 14 に示したように、律動する筋細胞集団の外見には変異があつた。しかし、その基本的構造は筋細胞の集団が間充織中に島状に存在し、表面を一層の卵囊細胞が被覆していた (図 15)。電子顕微鏡で観察するとどのタイプのものにも、Z 帯を持つ筋繊維を持つ筋細胞と、それらの細胞間の介在板が見られた

(図16)。

SEBⅢ株の胚様体を各々3日、7日及び14日間腹腔中で培養した後回収して、コラーゲン処理した培養皿中で培養した場合の律動する筋細胞が分化する頻度を図17に示した。腹腔中で3日間培養するだけで、頻度は低いが律動する筋細胞が誘導された。7日と14日の場合では、頻度はあまり変わらなかった。しかしいずれの場合も、律動はコラーゲン処理した培養皿中で培養してから、数日後でないとほとんど開始しなかった。つまり腹腔内で1週間以内に十分な頻度で分化は誘導されていた。しかし分化はある段階から進行せず、律動が開始するまでの分化の過程は、培養に移されてから開始された。

考 察

マウス奇形腫の分化を、*in vivo* 及び *in vitro* で調べた。どちらの場合も奇形がん腫細胞を誘導して分化させ、その過程を研究することが可能であった。

これまで、胚様体の *in vivo* での分化を系統的に研究した報告はほとんどなかった。そのためには観察に適した場所で分化させなくてはならなかった。その場所として、小さな脂肪体と肺を選んだ。この小さな脂肪体には必ず胚様体が接着して、腫瘍を形成した。又、肺は、一個の胚様体がどんな組織に分化するかを観察するのに適していた。その結果からまず、組織分化を行なうには宿主の細胞に包み込まれることが必要であった。さらに、その分化が多種の組織に分化するか、一種の組織のみに分化するかは、腫瘍の大きさと強い関係があった。一種の組織に分化するのは、ほぼ500ミクロン以下の小さな腫瘍に

限られていた。

*in vitro*でのマウス奇形腫の研究は多く報告されているが、*in vitro*での分化をコントロールできた例は少ない(2, 15)。又、*in vitro*で樹立したマウス奇形がん腫の株は常に、単層培養法で行なわれてきた(5, 7~9, 13, 18)。そこで、胚様体の構造を保ったままの*in vitro*株を樹立することにした。こうして言えば*in vitro*胚様体株、SEBⅢを樹立した。この株は通常、浮遊状態で急速に増殖したが、この条件下では組織分化は起こらなかった。しかし一時的に腹腔中で培養してから再び*in vitro*で培養すると種々の組織に分化した。そのうち最も高頻度に分化したのは、自発的に律動する心筋細胞であった。

マウス奇形腫から分化した心筋細胞は、正常な胚からの心筋細胞と同様に(4, 6)、*in vitro*培養条件下で自発的に律動した。心筋が律動するには、筋繊維が構成されなくてはならないが(3)、律動する筋細胞集団中

にはすでに、ミ帯を伴った筋繊維と介在板を持つた心筋が分化していた。形態学的観察によると、奇形ガン腫細胞から心筋細胞への分化の過程(1)は、正常な胚発生の場合(14, 23)とよく似ている。

腹腔内で胚様体の分化を誘導する要素は、腹水中に溶けている物質でも、腹腔中の遊離細胞でもないと考えられる。あるいは腹腔内臓器との直接の接触が原因かも知れない。しかし例えばこうして心筋細胞に誘導された胚様体は、腹腔内に留まっている限り、律動を開始する段階までに分化は進行したかった。従って一つの可能性は、腹腔中には心筋細胞の分化を阻害する物質が存在するか、それとももう一つの可能性として、分化を促進する物質が腹腔中にはなく、培養液中に存在すると考えられる。どちらが事実であるかは、さらに生化学的、細胞生物学的実験結果を待たなくてはならない。

引用文献

1. Bustan, H. and A. Herz, 1977. Dev. Biol., 59, 1-11.
2. Chung, A. E., L. E. Estes, H. Shinozuka, J. Braginski, C. Lorz, and C. A. Chung, 1977. Cancer Res., 37, 2072-2081.
3. DeHaan, R. L., 1965. Morphogenesis of the vertebrate heart. In Organogenesis, 377-419.
4. DeHaan, R. L. and R. Hirakow, 1972. Exptl. Cell Res., 70, 214-220.
5. Evans, M. J., 1972. J. Embryol. Exp. Morph., 28, 163-176.
6. Goshima, K. and Y. Tonomura, 1969. Exptl. Cell Res., 56, 387-392.
7. Jacob, H., T. Boon, J. Gaillard, J. F. Nicolas and F. Jacob, 1973. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 124B, 269-282.
8. Jami, J. and E. Ritz, 1974. J. Nat. Cancer Inst., 52, 1547-1552.
9. Kahan, B. W. and B. Ephrussi, 1970. J. Nat. Cancer Inst., 44, 1015-1029.
10. Klebe, R. J., 1974. Nature, 250, 248-251.
11. Kleinsmith, L. J. and G. B. Pierce, 1964. Cancer Res., 24, 1544-1548.
12. Konigsberg, I. R., 1971. Dev. Biol., 26, 133-152.
13. Lehman, J. M., W. C. Speers, D. E. Swartzendruber and G. B. Pierce, 1973. J. Cell. Physiol., 84, 13-28.

14. Manasek, F. J., 1968. J. Morphol. 125, 329-366.
15. Martin, G. R. and M. J. Evans, 1975. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 72, 1441-1445.
16. Mintz, B. and K. Illmensee, 1975. Proc Nat. Acad. Sci. U. S., 72, 3585-3589.
17. Pierce, G. B., 1967. Current Topics in Developmental Biology, 2, 223-246, Academic Press.
18. Rosenthal, M. D., R. M. Wishnow and G. H. Sato, 1970. J. Nat. Cancer Inst., 44, 1001-1041.
19. Stevens, L. C., 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 52, 654-661.
20. Stevens, L. C., 1967. Advances in Morphogenesis, 1-31, Academic Press.
21. Stevens, L. C., 1967. J. Nat. Cancer Inst. 38, 549-552.
22. Stevens, L. C., 1970. Dev. Biol., 21, 364-382.
23. Virach, S. and C. E. Challice, 1973. J. Ultrastruct. Res. 42, 1-24.
24. Willis, R. A., 1958. The embryonic tumors and teratomas. In The Borderland of Embryology and Pathology. London, Butterworth & Co., Ltd..

図1 A, マウス腹腔から採取した生のOTT
6050株の胚様体。
B, 胚様体の切片像。中心部に奇形か
ン腫細胞があり、それを包んでいる一
層の卵囊細胞はしばしば大きな空胞を
持っている。以後、図に挿入した横線
はすべて100ミクロンを示している。

図2 胚様体の増殖と大きさの分布。

図3 腹腔内にできた、OTT6050株の大きな
腫瘍の切片像。神経組織、横紋筋、軟
骨、骨、ケラチン上皮、分泌上皮、結
合組織等が分化している。

図4 A, 脾臓と膵臓に沿って存在する小ま
な脂肪体。
B, 胚様体が、たくさんの間充織細胞
に埋もれて脂肪体に接着している。腹
腔に注入後3日目。

図5 胚様体を腹腔に注入して15日目の腫瘍。

図6 尾静脈から胚様体を注入して29日目のマウスの肺。

図7 尾静脈から胚様体を注入して3日目(A)と15日目(B)のマウスの肺の切片像。

図8 肺における奇形ガン腫の増殖。

図9 肺で生長した4つの腫瘍。尾静脈に胚様体を注入後30日目(A, B, C)と45日目(D)。

図10 A、大きく生長したSEBⅢ株の胚様体の外見。小さな胚様体が出芽して増殖する。

B、SEBⅢ株の胚様体の切片像。

図 11 SEB III 株胚様体の細胞の染色体数。

図 12 SEB III 株をマウス皮下に注入してできた腫瘍の切片像。未分化な神経組織、横紋筋、軟骨、骨髓を伴、骨、分泌上皮、奇形ガン腫細胞が見られる。

図 13 SEB III 株を一週間マウス腹腔内で培養してから回収した胚様体の生 (A) と切片像 (B)。

図 14 律動する心筋細胞集団の三つのタイプ。
A、最も普通に見られるタイプで、心筋細胞集団の外側を一層の細胞が包んでいる。

B、外面を包む細胞を欠き、心筋細胞が培養液に露出している。

C、薄い一層の上皮細胞が周囲に存在するタイプ。

図15 心筋細胞に分化した胚様体の切片像。
二つの心筋細胞の集団が島状に存在し、
周囲を間充織細胞が埋め、外面は一層
の卵囊細胞が被っている。

図16 SEBⅢ株の胚様体から分化した心筋細胞の電顕像。細胞質中に、Z帯(Z)を持つ筋繊維(M)が見られる。心筋細胞が接している部位に、筋繊維と連続して介在板(D)が観察される。

図17 マウス腹腔内で各々、3日、7日、14日間培養してから *in vitro* 培養した時、SEBⅢ株から心筋細胞が分化する頻度と動態。

表 1

Table 1. Differentiation of BMC from SEBIII EB induced by intraperitoneal passage

EB	Days of intraperitoneal stay	Number of plated EB	Frequency of BMC (%)
SEBIII	7	$6.2 \times 10^3 - 1.4 \times 10^4$	0.12 - 0.47
SEBIII	None	7.1×10^3	0
OTT6050	7	3.4×10^4	0.006

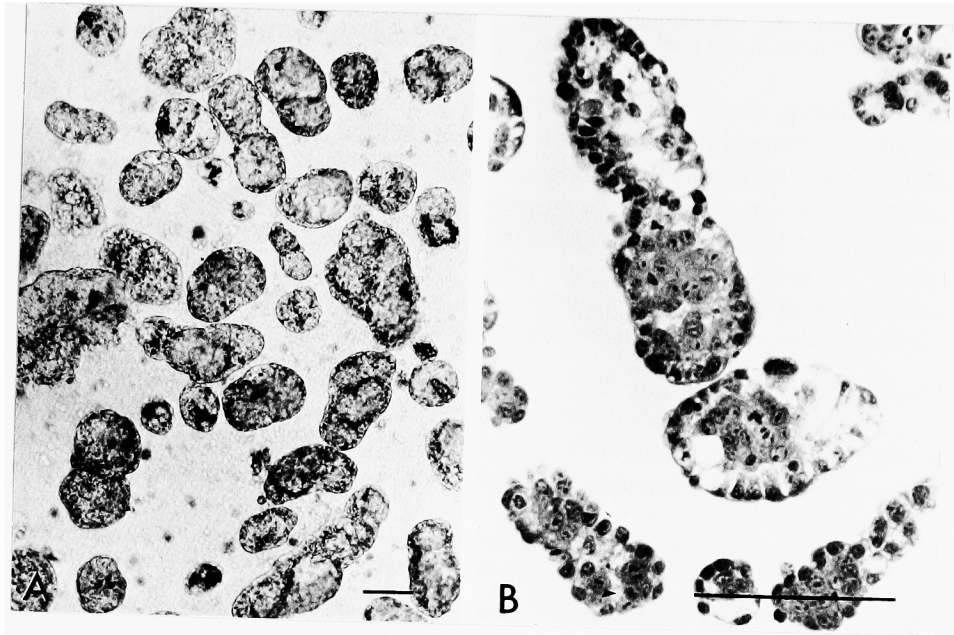


图 1

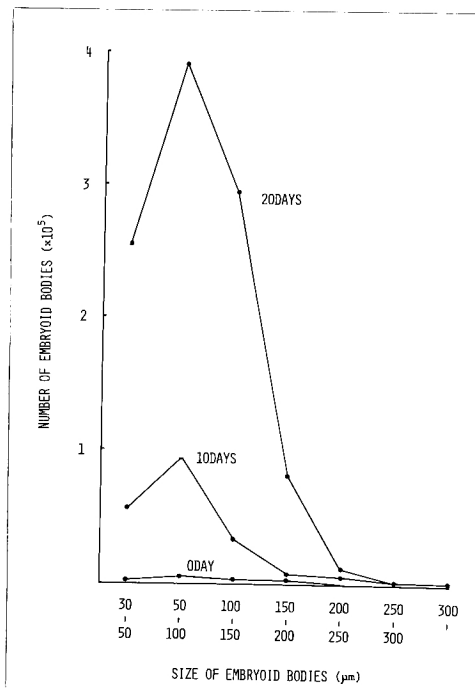


图 2

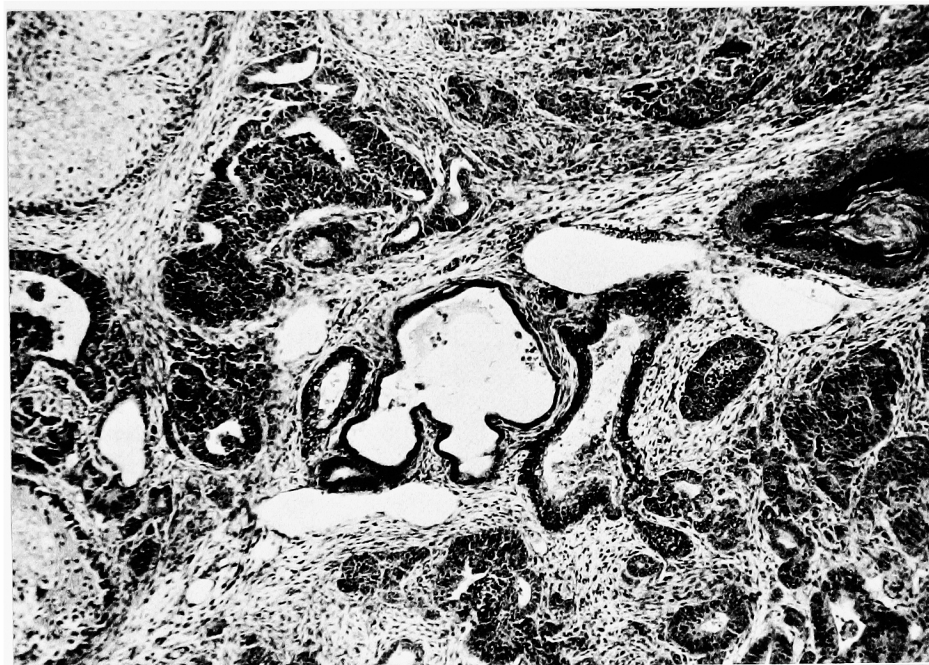


图 3

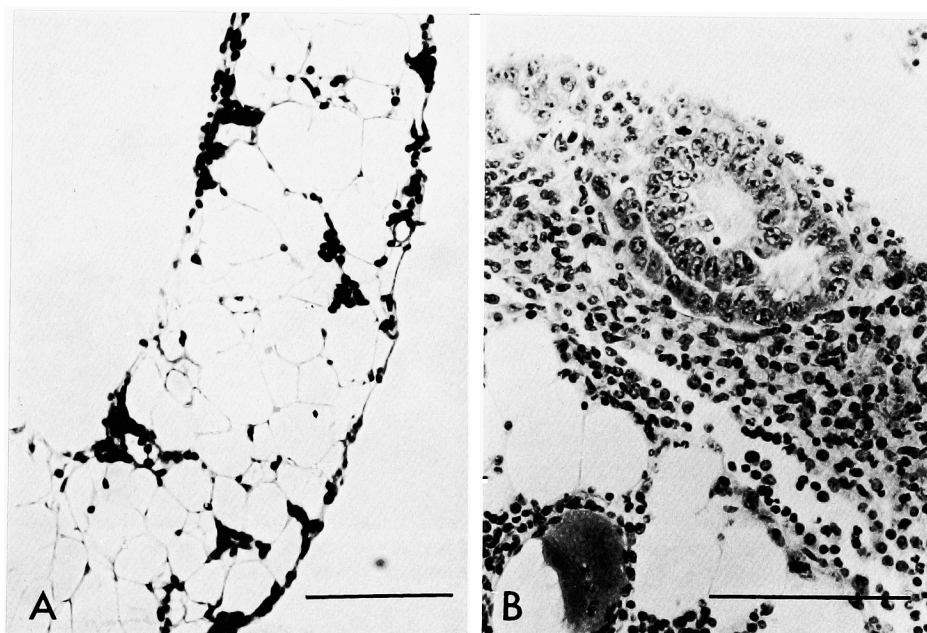


图 4

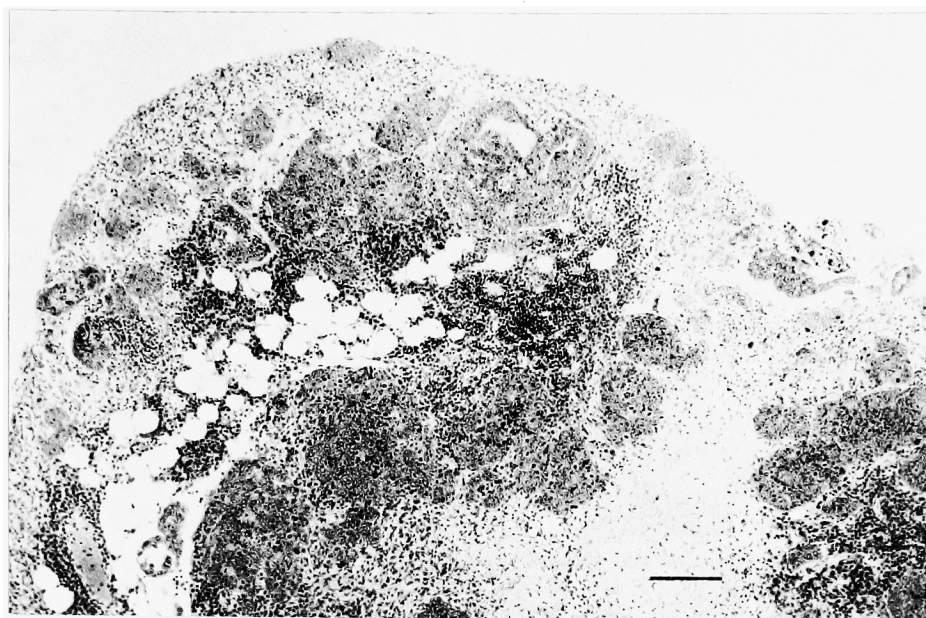


图 5

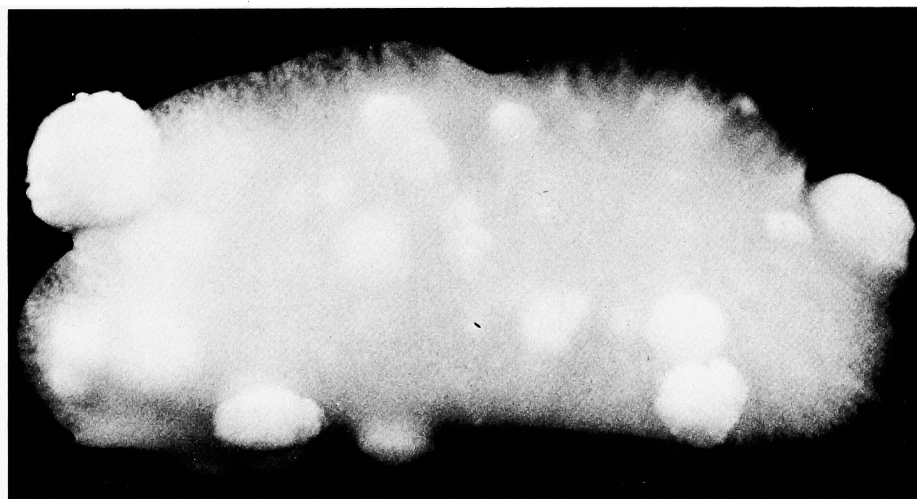


图 6

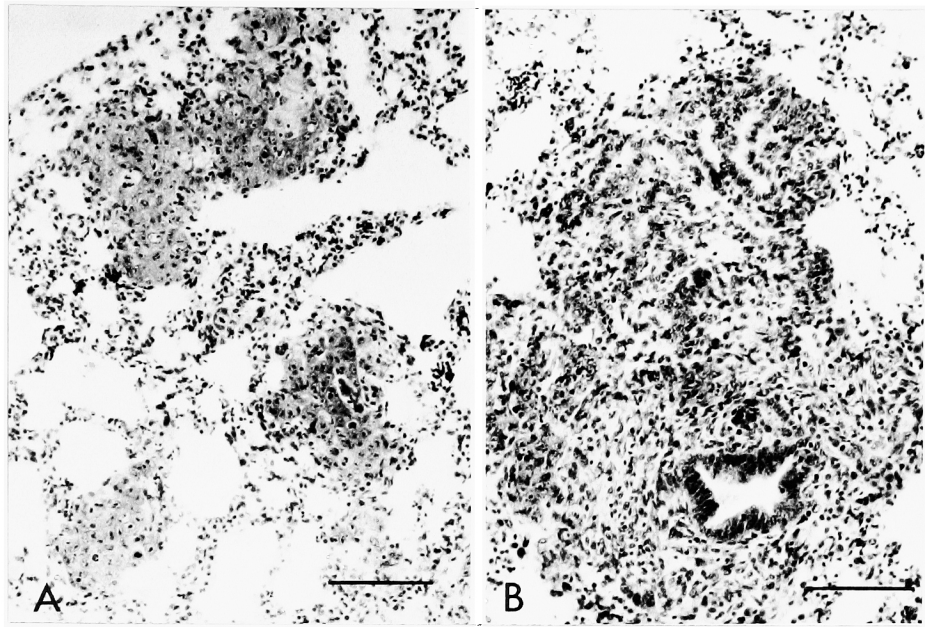


图 7

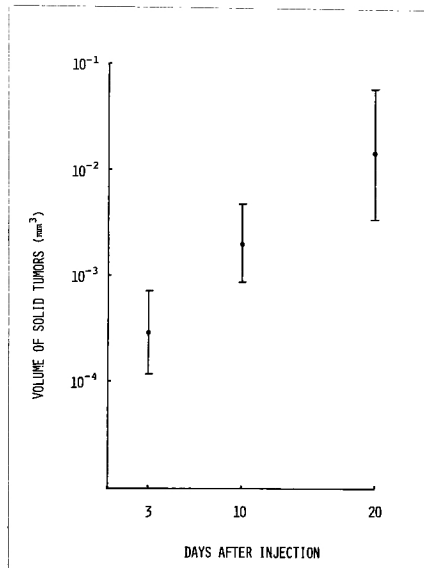


图 8

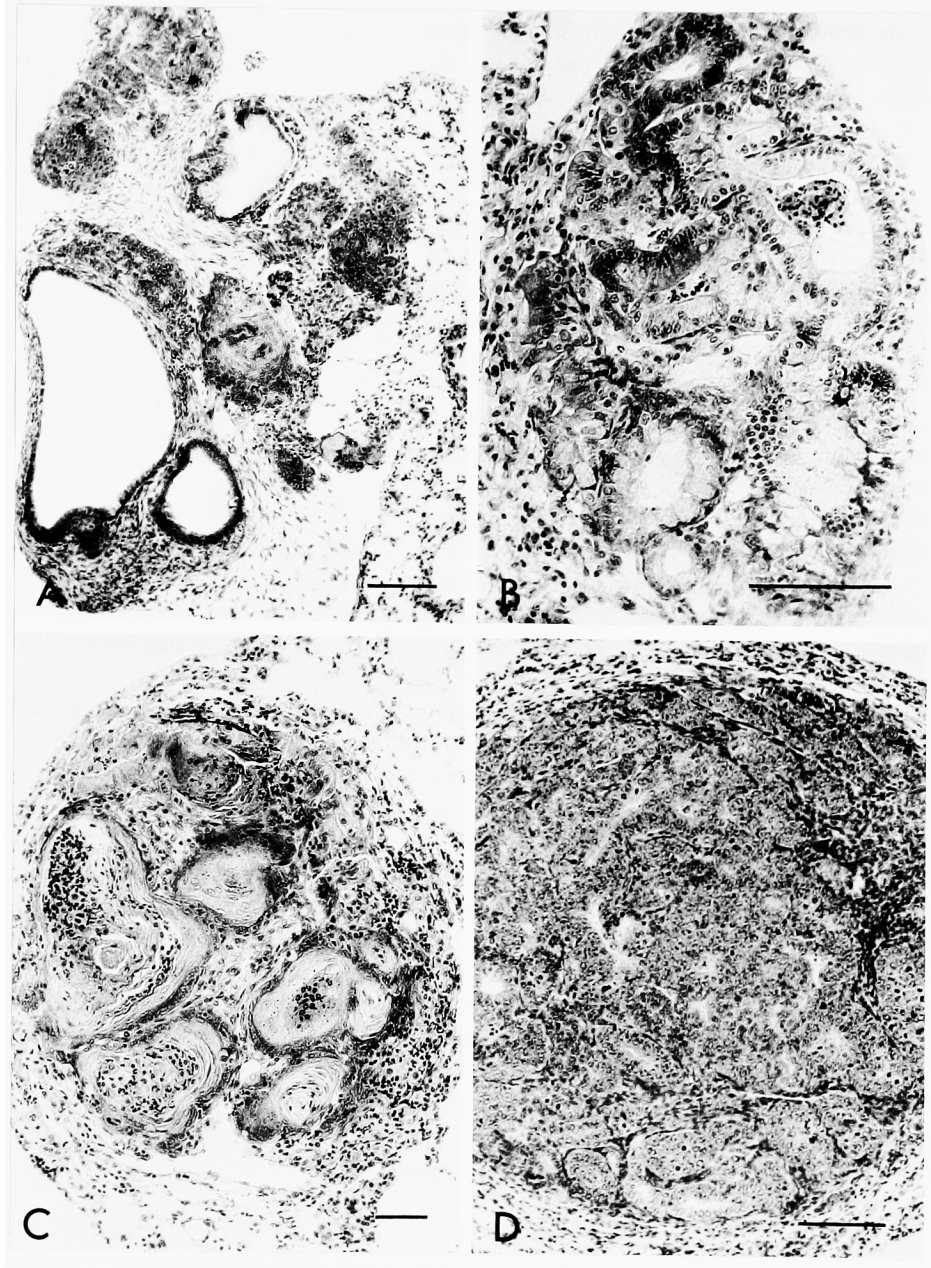


图 9

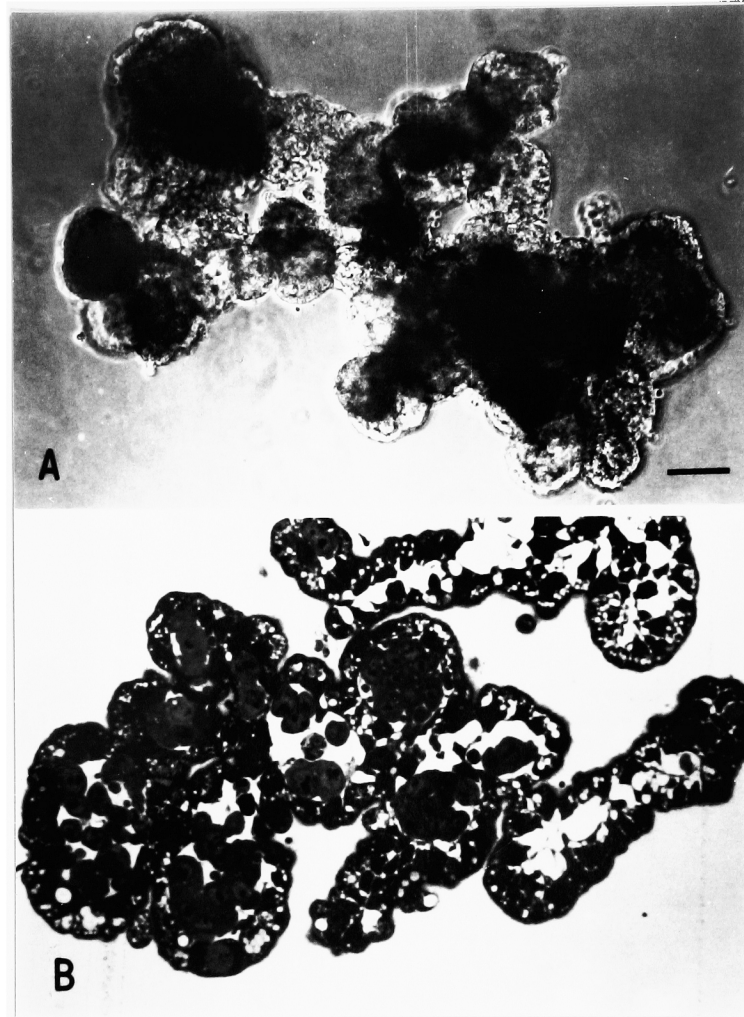
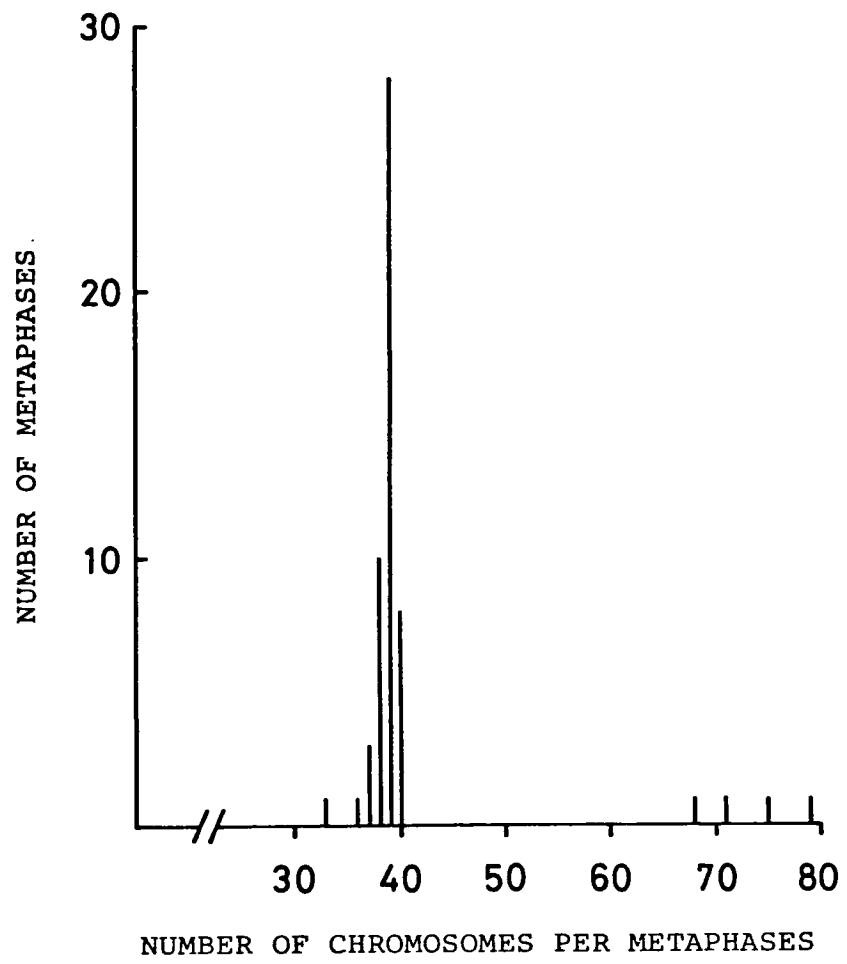


图 10



18 11

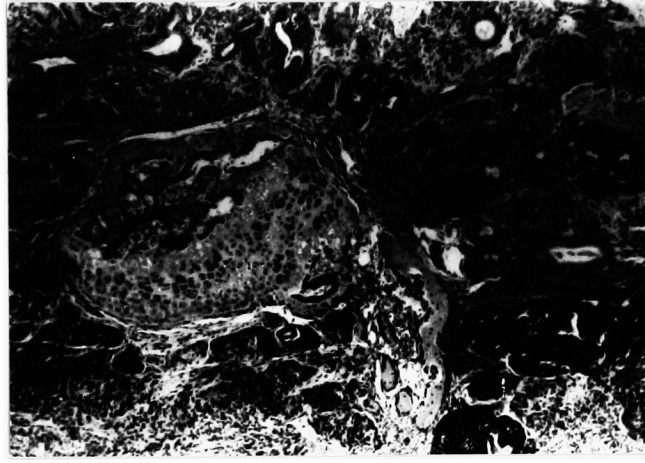


图 12

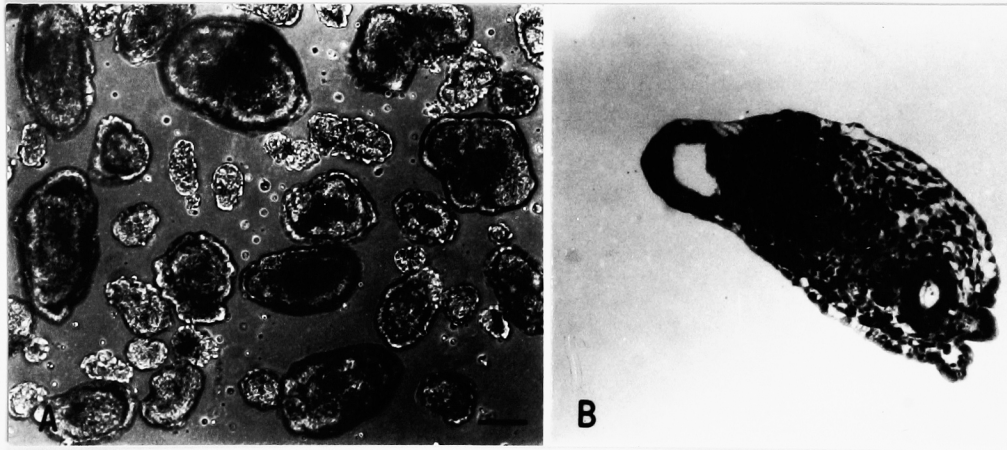


图 13

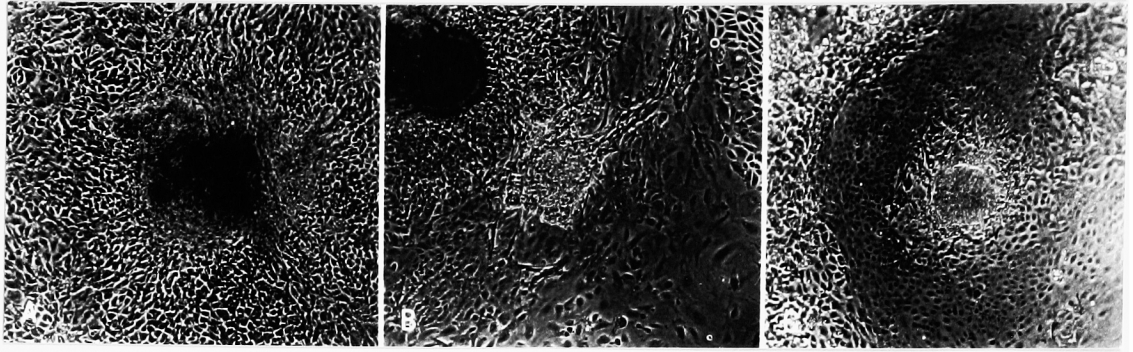


图 14

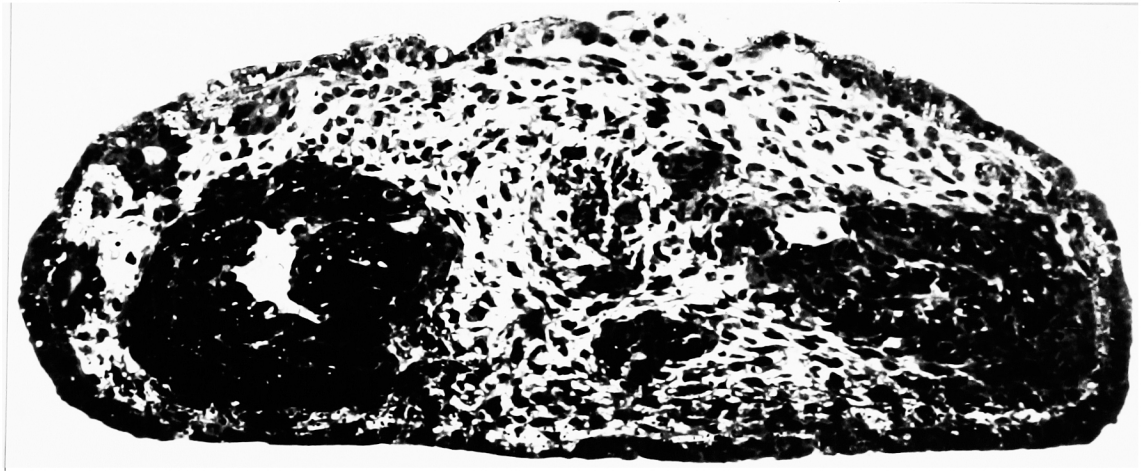


图 15



图 16

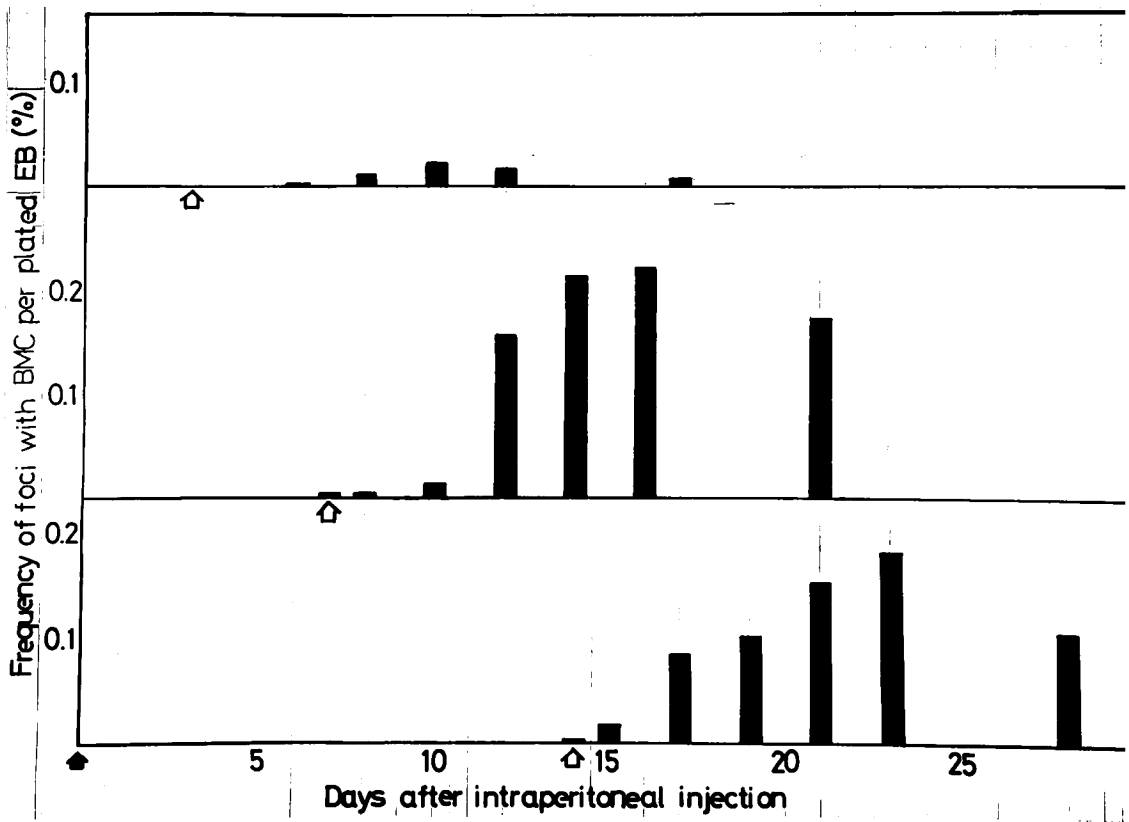


图 17