

氏名	堀ノ内 眞弓
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位記授与番号	博甲第 4537 号
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科創薬生命科学専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文の題目	化学物質の光毒性・光遺伝毒性試験における培養ヒトケラチノサイトの有用性
論文審査委員	教授 宮地 弘幸 教授 三好 伸一 准教授 有元 佐賀恵

学位論文内容の要旨

この研究の主な目的は、ヒトへの外挿性が高いと考えられる培養ヒト細胞であり、通常光にさらされており光に対する機能が発現していると思われるケラチノサイト由来の培養細胞である NCTC2544 細胞が光遺伝毒性評価に使用可能であるかどうかを検討することである。また、物性から光毒性や光遺伝毒性を誘発しないと考えられるにもかかわらずほ乳類培養細胞において光遺伝毒性を誘発する化学物質を NCTC2544 細胞で評価し、物性から予測される結果を得ることができるかどうかとも検討した。

細胞を光遺伝毒性物質、光毒性物質、光線力学療法治療薬あるいは光染色体異常偽陽性物質で前処理し、太陽光照射装置で照射量が 5 J/cm^2 となるよう 50 分間光照射するか、同じ時間暗所に静置した。細胞を洗浄した後、新鮮培地で 1.5-2 細胞周期の間細胞を培養した。培養終了時、スライド標本作製し、小核形成の有無を顕微鏡で観察した。

既知の光遺伝毒性物質である 8-methoxypsoralen は光照射条件下で小核を有する細胞を誘発したが、非照射条件下では小核を有する細胞を誘発しなかった。従って、NCTC2544 細胞は光遺伝毒性評価に利用可能な細胞であると考え、他の化学物質の光遺伝毒性誘発性を評価するために用いた。

既知の光毒性物質である 6-methylcoumarin、3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide 及び protoporphyrin IX 2 sodium salt は照射条件下で小核を有する細胞を誘発したが、非照射条件下では小核を有する細胞を誘発しなかったことから、これらの光毒性物質は光遺伝毒性誘発性を有することが確認された。光毒性及び光遺伝毒性に関するメカニズムは同様であると予測されているため、今回の結果は予測されたものであった。

光線力学療法治療薬として用いられる tetrabenzoporphine 及び 5-aminolevulinic acid は光毒性を示した。しかし、これらの物質は照射条件下及び非照射条件下のいずれにおいても小核を有する細胞を誘発しなかった。このことから、これらの物質は光遺伝毒性誘発性を持たないことが示され、化学物質によっては光毒性と光遺伝毒性の作用機序に違いがある可能性が考えられた。

290-700 nm に光吸収をもたない光染色体異常偽陽性物質の中で cycloheximide と disulfoton は照射条件下及び非照射条件下のいずれにおいても小核を有する細胞を誘発しなかった。残り一つの酸化亜鉛は照射条件下で小核を有する細胞を誘発し、非照射条件下でも程度は軽いものの小核を有する細胞を誘発した。

これらの 9 化学物質の光遺伝毒性試験の結果から、NCTC2544 細胞は化学物質の光遺伝毒性誘発性を評価する適切な試験系であると考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は、培養ヒトケラチノサイト由来培養細胞 NCTC2544 細胞が、光遺伝毒性評価に使用可能であるかどうかを検討したものである。従来光毒性試験および光遺伝毒性試験にはげっ歯類由来培養細胞が用いられており、結果の外挿には課題があった。実際従来法では物性から光毒性や光遺伝毒性を誘発しないと考えられるにもかかわらず、ほ乳類培養細胞において光遺伝毒性を誘発する化学物質が存在する。NCTC2544 細胞で評価し、物性から予測される結果を得ることができるかどうかを研究したものである。

細胞を光遺伝毒性物質、光毒性物質、光線力学療法治療薬、光染色体異常偽陽性物質で前処理し、太陽光照射装置で照射量 5 J/cm^2 となるよう一定時間光照射し、細胞を洗浄後新鮮培地で 1.5-2 細胞周期間細胞を培養した。培養終了時スライド標本を作製し、小核形成の有無を顕微鏡で観察した。その結果、既知光毒性物質で光遺伝毒性物質である 8-MOP は光毒性を示し、さらに光照射条件下で小核を有する細胞を誘発したが、非照射条件下では小核を有する細胞を誘発しないことから、NCTC2544 細胞が光遺伝毒性評価に利用可能な細胞であることをまず明らかにした。次に 3 種類の既知光毒性物質が NCTC2544 細胞でも光毒性を誘発することを確認した。さらにこれらの物質は照射条件下で小核を有する細胞を誘発したが、非照射条件下では小核を有する細胞を誘発しなかったことから、これらの光毒性物質は光遺伝毒性誘発性を有することを NCTC2544 細胞で確認できた。これらの結果を踏まえ、化学物質によっては光毒性と光遺伝毒性の作用機序に違いがある可能性を提示した。一方これまで、光染色体異常偽陽性物質と認識された化合物の内 cycloheximide と disulfoton は NCTC2544 細胞においても光毒性を示さず、さらに光照射条件下及び非照射条件下のいずれにおいても小核を有する細胞を誘発しないことを明らかにした。他の光染色体異常偽陽性物質である酸化亜鉛も光毒性は示さなかったが、照射条件下で小核を有する細胞を誘発し非照射条件下でも程度は軽いものの小核を有する細胞を誘発したことから弱い光遺伝毒性が認められることを明らかにした。これらの 9 化学物質を用いた光遺伝毒性実験の結果から、NCTC2544 細胞は化学物質の光遺伝毒性誘発性を評価する適切な試験系であることを結論付けている。

口頭試問は主査・副査の三人で実施した。前回（昨年 10 月時点）の口頭試問では補うべき内容として、1)何故ヒト由来ケラチノサイトは動物細胞と異なる結果を示したのかの考察。2)光刺激でヒト細胞とげっ歯類細胞で、どんな遺伝子発現プロファイルに変化を来すか？3)そのメカニズム？等エビデンスに基づいた NCTC2544 細胞の、光遺伝毒性試験系への提案という本来当該研究で目指すゴールを設定した。今回の口頭試問では、実験的エビデンスの追加はなされていないが前回以上に基礎的考察ならびに先行技術に対する記述を加え、また基礎実験での容量設定に至った予備的な実験結果の開示を追加している。また今後の展望として、NCTC2544 細胞の有用性をより明確に示すための指針に関しても新たに記述されている。博士論文としての完成度は決して十分ではないが、最低限の質および量を今回の改定追加にて確保するに至ったと、審査委員会では判断するに至った。本審査委員会として、堀ノ内眞弓提出の論文を、博士論文として合と判定した。