

骨髄性白血病細胞における外来性遺伝子の発現*

大 黒 一 哉

広島大学生物圏科学研究科

Expression of External Genes in Promyelocytic Leukemia Cells:

Kazuya OGURO

Graduate School of Biosphere Sciences
Hiroshima University

白血病患者からは、造血系の分化や増殖のいろいろな段階で正常な制御系を逸脱して不死性を獲得した細胞が多数単離されており、細胞の分化や増殖の機構、あるいは白血病細胞の正常化の研究に多用されている。特に、HL-60 細胞は、種々の薬剤による処理により顆粒球、単球-マクロファージ、好酸球、好塩基球の4種類もの成熟細胞の分化が誘導されるので、1977年に前骨髄性白血病患者から樹立されて以来、世界各国の多数の研究室において盛んに研究されてきた。しかし、分化誘導の機構は未だ全く解明されていない。その最大の原因は、過去10年以上の長期に亘ってさまざまな試みが行なわれてきたにもかかわらず、HL-60 細胞において外来性遺伝子を発現させる方法が開発されていないことにある。

本研究の目的は、HL-60 細胞に対する外来性遺伝子の導入および発現の実験法を確立することである。HL-60 細胞に対する外来性遺伝子の発現を困難にしている最大の理由は、遺伝子発現が全く検知されておらず、細胞への遺伝子導入の方法が不適當で導入される遺伝子のコピー数が十分でないことが原因なのか、コピー数は十分であるが使用しているプロモーターが不適當で、プロモーターに結合し転写を促進するタンパク質因子がHL-60 細胞中に十分存在しないことが原因なのか、あるいは発現したタンパク質の検出法が不適當であるのか、といった基本的な問題を分離して論ずることができないことである。そこで、第一のステップとして大量の遺伝子が確実に核に導入できるマイクロインジェクションの方法を試みた。この場合、他の方法と異なり、導入された遺伝子が核内に到達するまでに分解を受けることがなく、うまくいけば一過性発現効率を最大にすることができる。まず、実験法の確立しているマウス繊維芽細胞を用いて実験し、従来得られている結果を再現することができることを確認した後、HL-60 細胞の実験に移った。HL-60 細胞は浮遊細胞であるため、細胞を培養ディッシュの底面に固定するための新しい方法を開発した。また、繊維芽細胞に比べて注入の許容量が少ないので、注入の仕方にも新しい工夫を加えた。さらに、実際に試料溶液が核内に注入されていることを蛍光物質を用いて確認した。このように注入法そのものは完成したが、最終的に遺伝子発現を確認するには至らなかった。従って、可能性のある多数の原因の中から問題とすべき原

因をつきとめ、方法を改善する手掛かりは全く得られなかった。

そこで、外来性遺伝子を確実に HL-60 細胞の DNA に組み込んだ状態で発現を解析するため、レトロウイルスベクターを用いる方法を次に試みた。この方法は、既に HL-60 細胞にも応用されており、安定なトランスフォーマントを得たという報告がある。レトロウイルスベクターには、薬剤によるトランスフォーマントの選択を行なうため、ネオマイシン耐性遺伝子 neo が組み込まれたものを使用した。レトロウイルス産生量は文献値と比べて低かったが、HL-60 細胞のトランスフォーマントを得ることに成功した。しかし、ベクターに外来性遺伝子を組み込んだ場合は、ウイルス産生量が更に低下し、トランスフォーマントの形成効率が非常に低くなることが予想されたので、HL-60 細胞へ導入することは断念した。とはいえ、選択培地で安定なトランスフォーマントが得られたことは、少なくとも発現はポジティブであることが確認された訳で、発現量の増加には、より強いプロモーターの開発が重要であることが示唆される。レポーター遺伝子の発現が検出されなかったことはこのことを裏付けるものである。

以上の結果より、より強いプロモーターの探索および遺伝子発現産物のアッセイ法の高感度化が次の目標となった。遺伝子導入法としては DEAE-デキストラン法を用いた。この方法は、浮遊細胞に対する一過性発現を解析する方法として最適であることが最近、見出され注目されている。レポーターには、大腸菌のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (cat) を使用した。しかし、当初は HL-60 細胞で全く発現を検出できなかった。一方、細胞の遺伝子発現の活性は分化と共に増大することを示唆する実験結果が最近報告されている。そこで、HL-60 細胞より分化段階の進んだヒト骨髄性白血病細胞株 THP-1 において、発現量が増大することを期待して実験したところ、予想通りわずかながら確実に発現を検出することができた。そこで、この THP-1 細胞を用いて遺伝子導入の実験条件の最適化、および遺伝子産物発現の検出法の高感度化、をあらゆる側面から検討し、感度を 10-30 倍にあげることに成功した。この実験条件を HL-60 細胞に適用したところ、十分量の発現を検出することができたので、最終的に種々のプロモーターを使用して発現量の比較を行い、有用なプロモーターの探索を行うことができた。

HL-60 細胞では、ヒトのメタロチオネイン遺伝子 (hMT-IIA) のプロモーターを Zn^{2+} イオンで誘導した場合、最高の発現が得られた。また、ラウス肉腫ウイルス (RSV) の LTR もかなり高いプロモーター活性を示した。しかし、THP-1 細胞における活性と比較すると発現量は 1/20 にすぎなかった。このように、類似の細胞の間でも、分化段階の進行に伴い細胞内転写因子の種類や量は大幅に変化することを示している。

以上、本研究により HL-60 細胞に対する一過性遺伝子発現のための遺伝子導入法を確立することができた。発現量の点では必ずしも十分であるとはいえないが、より強力なプロモーターを構築する道は拓かれた訳であり、誘導発現プロモーターをもつ安定なトランスフォーマントを作製する見通しも得られた。