

博士論文

ヒト骨髄性白血病細胞株のフォルボールエステルによる分化誘導機構

平成5年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科
生物機能科学専攻
小田 司

目次	i
略号	iv
1. 序言	
1. 1 骨髄性白血病細胞とその分化誘導、及び本研究の目的	1
1. 2 分化誘導の分子機構に関する研究の歴史と現状	3
1. 3 骨髄性白血病細胞のフォルボールエステルによる分化誘導、 増殖停止の可逆-非可逆性	6
1. 4 フォルボールエステル処理による骨髄性白血病細胞の増殖停止 と分化形質発現の相関	7
1. 5 本研究の経緯、及び得られた結果の概要	8
2. 細胞に強い親和性を示すフォルボールエステルPMA	
2. 1 はじめに	12
2. 2 材料と方法	
2.2.1 細胞培養	12
2.2.2 PMA とPDBの構造と特性	13
2.2.3 蛍光抗体法	13
2.2.4 FACScanによる解析	15
2. 3 結果と考察	
2.3.1 PMA短時間処理で生じるHL-60細胞の分化	16
2.3.2 血清依存的にあらわれる培養上清中の分化誘導活性	20
2.3.3 [³ H]-PMAを用いたトレーサー実験	25
2.3.4 HL-60細胞に結合したPMAとPDBの除去	28

3.	HL-60細胞のフォルボールエステルによる分化誘導	
	I. 分化状態の可逆性	
3. 1	はじめに	34
3. 2	材料と方法	
3.2.1	細胞培養	34
3.2.2	分化形質の測定	
	a 表面抗原 (Mac-1, ICAM-1)	34
	b 形態変化 (接着、伸展)	35
	c 貪食能	35
3.2.3	[³ H]-TdR の取込みによる細胞増殖の測定	36
3.2.4	二重染色 ([³ H]-TdR取り込みとMac-1)	36
3. 3	結果と考察	
3.3.1	フォルボールエステルによるHL-60細胞の分化の可逆性	
	a フォルボールエステル除去に伴う分化形質の消失	37
	b Mac-1、ICAM-1陽性細胞および貪食能をもつ細胞のS期への移行	41
	c 分化誘導の可逆性に関する付加的考察	51
4.	HL-60細胞のフォルボールエステルによる分化誘導	
	II 細胞増殖停止と分化形質 発現の因果関係	
4. 1	はじめに	58
4. 2	材料と方法	
4.2.1	アフィジコリン処理による細胞周期の同調	59
4.2.2	分化形質発現の測定	59
4.2.3	転写阻害剤アクチノマイシンD処理	60
4.2.4	二重染色法 (ICAM-1 とPI)	60
4. 3	結果と考察	
4.3.1	アフィジコリンによる細胞周期の同調、および増殖停止に	

伴う分化形質の発現	60
4.3.2 アフィジコリンで細胞周期を同調したHL-60細胞の PDB処理に伴う完全なG1停止	64
4.3.3 G1停止に先立つ分化形質の発現と細胞周期に依存しない 分化形質発現の経時変化	66
4.3.4 フォルボールエステル処理による分化形質発現に及ぼす 転写阻害剤の効果	74
5. THP-1細胞のフォルボールエステルによる分化誘導	
5. 1 はじめに	80
5. 2 材料と方法	
5.2.1 細胞培養	80
5.2.2 分化誘導による分化形質発現とDNA合成の測定	81
5.2.3 細胞周期の同調法	81
5.2.4 種々の阻害剤による処理	81
5. 3 結果と考察	
5.3.1 フォルボールエステル処理による分化形質発現の発現	82
5.3.2 フォルボールエステル処理による細胞周期のG1停止	90
5.3.3 G1停止の原因物質のPDBによる生成はG1期以前におこる	90
5.3.4 G1停止に対する種々の阻害剤の効果	93
6. 本研究の結論および今後の展望	98
参考文献	101
謝辞	107

略号	
Act. D	actinomycin D
α -Ama	α -amanitin
AO	acridine orange
Ara A	adenine arabinoside
Ara C	cytosine arabinoside
ATCC	American Type Culture Collection
b-HLH	basic-helix-loop-helix
BSA	bovine serum albumin
CD 14	cluster of differentiation 14
CD 11a	cluster of differentiation 11a
CD 11b	cluster of differentiation 11b
CD 18	cluster of differentiation 18
CHX	cycloheximide
DMSO	dimethyl sulfoxide
D ₂ W	double distilled water
EP チューブ	エッペンドルフチューブ
FACS	fluorescence activated cell sorter
FcR 1	Fc receptor type 1
FcR 2	Fc receptor type 2
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward light scatter
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
[³ H]-TdR	tritium-labeled deoxythymidine
HLH	helix-loop-helix
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IgG	immunoglobulin G

IL-1	interleukin-1
JCRB	Japanese Cancer Research Resources Bank
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen, $\alpha_L \beta_2$ インテグリン
LPS	lipopolysaccharide
Mac-1	$\alpha_M \beta_2$ インテグリン
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
NGF	nerve growth factor
PBS (-)	Dulbecco's phosphate buffered saline (Ca^{2+} , Mg^{2+} free)
PBS (-)*	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ デキストランサルフェイト、0.2% NaN_3 、0.1% BSA をふくむ PBS (-)
PDB	phorbol 12, 13-dibutyrate
PE	phycoerythrin
PI	propidium iodide
PKC	Ca^{2+} -dependent protein kinase
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
Rb 遺伝子	retinoblastoma gene
RI	radioisotope
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	side light scatter
TCA	trichloroacetic acid
6-TG	6-thioguanine
TNF	tumor necrosis factor

1. 序言

1. 1 骨髄性白血病細胞とその分化誘導、及び本研究の目的

ヒトの血液中には多くの異なる機能を有する細胞が存在し、生体の恒常性維持に於て重要な役割を担っている(1)。特に白血球は生体防御の中心に位置し、外部からの微生物の侵入を防ぐことにより個体の内部環境の安定性を保っている。白血球はリンパ系細胞と骨髄系細胞とに大別できる。リンパ系細胞は抗体産生を行うB細胞と、B細胞に働きかけて抗体産生を制御したり、あるいは直接自己と異なる細胞を破壊する機能を持つT細胞とからなる。骨髄系細胞のうち単球-マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球は外界から侵入してきた微生物を貪食などにより直接破壊する。巨核球はその細胞の一部がちぎれて血小板となり、その中に含まれているタンパク質因子を介して、血液凝固や血管、組織の修復を行っている。また、酸素運搬を行う赤血球も骨髄系細胞に含まれる。

このように血液中には様々な機能を持つ異なる細胞が存在するが、元をたどればすべて骨髄に存在する単一の多能性幹細胞に由来するものである。この多能性幹細胞はコロニー形成法などの実験により、その存在が明らかにされていたが、近年、多能性幹細胞特異的な表面抗原を指標にし、その純化に成功している(2、3)。多能性幹細胞は自己再生をする一方、一部は細胞増殖を繰返しながらやがて、多能性分化能や増殖能を消失し、最終的に特定の細胞系譜の成熟細胞へと分化する。これに伴い各々の細胞系譜に特異的な分化形質が発現してくる。

この多能性幹細胞から成熟細胞までの分化過程は骨髄中でおこり、ストロマ細胞との相互作用や種々のサイトカインの作用により複雑かつ厳密に制御されている(4)。このように細胞外刺激を常に受け、細胞増殖や分化が順次おきている状況下では、遺伝子の変異が蓄積しやすく、その結果として、ごく稀に分化の進行を停止し不死性を獲得して無限に増殖を繰り返す細胞が生じる場合が考えられる。我々は白血病をこのようにとらえている。この見地から、多能性幹細胞から成熟血液細胞に至る分化の道筋にそって、分化の程度の低いものから高いものまで多くの異なる分化段階に対応する白血病細胞が生じる(5)。また、その原因となる遺伝子変異の種類も相当数発見

されている(6)。これらの白血病細胞の基本的な共通点は分化の程度に関係なく細胞増殖を決して停止せず不死化している点である。

これまで血液細胞の分化過程の流れにそって多くの白血病細胞株が患者から樹立されている。これらの白血病細胞株の特徴の一つは、フォルボールエステル、活性型ビタミンD₃、レチノイン酸、DMSOをはじめ種々の薬剤を培地に加えて処理することにより、分化形質が発現したり、細胞増殖が停止したりする点である(7、35)。本研究で用いているHL-60細胞は1977年、米国NIH(NCI)のRobert C. Gallo教授の研究室で36才の女性の前骨髄性白血病患者から樹立されたものである(8)。この細胞は代表的な発ガンプロモーターであるフォルボールエステルで処理するとマクロファージ様の分化形質を発現し、細胞増殖を停止する(9)。また、活性型ビタミンD₃で単球様細胞へ(10)、レチノイン酸(11)、DMSO(12)で顆粒球様細胞へ、弱アルカリ性培地での培養で好酸球様細胞へと分化する(13)。このようにin vitroで容易に多くの細胞系譜へ分化誘導ができること、また均一な細胞が大量に扱えることから血液細胞分化のモデル系として使用されてきた。しかし、近年は白血病の治療へ研究の目標がしばられつつある。

一般にガンの発生は単一の遺伝子の変異によって生じるものではなく、ガン原遺伝子とガン抑制遺伝子を含む複数の遺伝子の変異が必要である(14)。HL-60細胞にも細胞の増殖・分化の制御において重要な役割を持つ遺伝子に多数の変異が認められる。例えば、代表的なガン原遺伝子である*c-myc*の増幅(15)や*N-ras*遺伝子の点突然変異(16)、これもまた代表的なガン抑制遺伝子である*p53*遺伝子の欠失(17)などである。これらの変異が直接白血病の原因となっている証拠は現在の所ないが、恐らく相乗的に作用することにより、最終的に分化の阻害、無限増殖という形質を細胞が獲得しているものと考えられる。

HL-60細胞と共に本研究で使用しているTHP-1細胞は1980年、東北大の土屋らにより一才の男児の急性単球性白血病患者から樹立されたものである(18)。この細胞はHL-60細胞より分化段階が進んでおり、既に貪食能、Mac-1、ICAM-1などの形質を発現している点に特徴がある。しかし、ディッシュへの接着、伸展という単球・マクロファージ系としての重要な分化形質は認められず、浮遊状態で増殖し、HL-60細胞

と同様にフォルボールエステル処理で初めてそのような分化形質が発現し、同時に細胞増殖も停止する(19)。

前述の如く、多くの白血病細胞株は種々の薬剤の添加により細胞増殖の停止や分化形質の発現を誘導できる。このことは、分化の停止・無限増殖という白血病の性質は固定化されたものではなく、種々の薬剤処理により成熟様細胞へ変化させうることを示している。骨髄性白血病細胞では、多くの増殖や分化に重要な遺伝子の変異が知られていることを考えると、恐らく正常な分化過程の経路と異なる遺伝子発現の経路が存在し、種々の薬剤はこれを活性化することにより増殖停止や分化形質の発現を誘導しているものと考えられる。この経路を特異的に活性化する薬剤を開発すれば骨髄性白血病の分化誘導療法が可能となり、あるいは外来性遺伝子により活性化できれば将来遺伝子治療が可能となるわけである。

骨髄性白血病細胞の分化誘導剤の中で最も注目すべき薬剤はフォルボールエステルである。何故なら、フォルボールエステルはHL-60細胞、THP-1細胞だけでなく、株化されていない患者由来の白血病細胞までほとんどすべての骨髄性白血病細胞に作用し、増殖を停止させマクロファージ様細胞への分化を誘導するからである(20)。この様な薬剤は他に知られていない。このことは各々の骨髄性白血病細胞の原因となる遺伝子変異の差異に関わらず、フォルボールエステルによる分化誘導の機構が共通に存在する可能性を示している。従って、骨髄性白血病の治療法にしても、フォルボールエステルによる分化誘導の機構を利用した治療法の確立が可能となるはずである。従って、本研究の最終的な目的はHL-60細胞とTHP-1細胞を用いてフォルボールエステルによる増殖停止と分化形質発現の機構を分子レベルで解明することである。

1. 2 分化誘導の分子機構に関する研究の歴史と現状

HL-60細胞のフォルボールエステルによる増殖停止と分化形質発現の分子機構に関しては転写レベルやタンパク質レベルで多くの研究報告がある。

転写レベルでの代表的な研究は*c-myc*に関するものであり、以下に簡単に説明する。*c-myc*は、ニワトリ骨髄細胞腫ウイルスの持つガン遺伝子*v-myc*に対応するガン原遺伝子として単離された。その遺伝子産物はDNA結合能を持つ核タンパク質で種々の実験

により細胞の増殖と分化に深い関わりを持っている (21)。例えば、バーキットリンパ腫では*c-myc* 遺伝子と免疫グロブリン遺伝子との間で組み換えがおこっており (22)、また多くのガン細胞でも *c-myc* 遺伝子の増幅が報告されている (23)。HL-60細胞でも *c-myc* 遺伝子は16~32倍も増幅しており強い発現を示している (24)。*c-myc* 遺伝子は未処理のHL-60細胞中では強い発現を示すが、フォルボールエステル処理による分化誘導に伴いその発現は抑制される (25)。一方、アンチセンスオリゴヌクレオチドの培地中への添加 (26) やアンチセンスRNAの構成的な発現 (27) によりその発現を強制的に抑制すると細胞増殖能が低下し分化形質が発現する。HL-60細胞は他の薬剤処理により細胞増殖を停止させると、ある程度の分化形質を発現してくる (28) ことを考えると、この場合は *c-myc* 遺伝子産物の喪失の結果生じた増殖停止に伴う分化形質の発現と考えられる。注意しておくが、フォルボールエステル処理の場合と違うのは、フォルボールエステル処理では他の多くの遺伝子発現の変化が同時に生じることである。

転写レベルの他の重要な研究は、早期応答遺伝子の一過性発現である。早期応答遺伝子群にはマウス骨肉腫ウイルスのガン遺伝子*v-fos* に対応するガン原遺伝子*c-fos*、我々の研究室でクローニングされたETR101、ETR103などが含まれる。これら早期応答遺伝子群はHL-60細胞をフォルボールエステルで処理すると直ちに発現が誘導され、その後元のレベルまで減少するという一過性の発現を示す (29、30、31)。これらの遺伝子の一過性発現は、血清飢餓状態の線維芽細胞に血清を加えた場合 (32) や副腎髄質クロム親和性細胞様の細胞株PC12をNGFで処理した場合 (33) にも認められる。早期応答遺伝子の一過性の発現がフォルボールエステルによるHL-60細胞の分化誘導に重要な役割を担っているか否かは今のところ断定できない。しかしながら、本研究の結果から判断すると早期応答遺伝子の一過性の発現はフォルボールエステルによるHL-60細胞の分化誘導に関与してない可能性が高い。フォルボールエステルは線維芽細胞やリンパ球などの他の細胞に対しては細胞増殖を促進させるように働く (34)。そのような細胞ではフォルボールエステル刺激を細胞増殖へ導くシグナル伝達機構が存在しているはずである。HL-60細胞でもその様な機構は存在するであろうが、フォルボールエステルの刺激を増殖促進よりも分化形質発現へと転換させるシグナル伝達

機構の方が優勢なのであろう。その結果、細胞増殖はおきないが、それに関係する初期過程の早期応答遺伝子群は発現することになる。分化誘導に有効な濃度より低い濃度のフォルボールエステルでHL-60細胞を処理すると寒天中でのコロニー形成率が増加するという報告(35)は上記の仮説を支持するものである。

一方、タンパク質レベルの代表的な研究としてはPKCの活性化とRb遺伝子産物の脱リン酸化が挙げられる。PKCは生理的にはジアシルグリセロールで活性化されるキナーゼ(36)で多くの分子種が存在し、種々の細胞において分化・増殖に重要な役割を果たしている(37)。また、PKCはフォルボールエステルの細胞内レセプターとして働き(38)、フォルボールエステルと結合することにより活性化する(39)。フォルボールエステル耐性のHL-60細胞では、PKC活性が感受性細胞より低下していることや(40)、分化形質発現には持続的なPKCの活性化が必要なこと(41)から、HL-60細胞のフォルボールエステルによる分化誘導の初期過程にPKCの活性化が含まれていることは間違いない。しかし、PKCの活性化に引き続いて起きるその後の過程は全く明らかにされていない。

Rb遺伝子は遺伝性のガンであるレチノブラストーマの研究から同定されたガン抑制遺伝子である(42)。レチノブラストーマの患者では両アレルにおいてRb遺伝子の転座や欠失などの変異が生じており、そのため細胞増殖の制御ができず腫瘍が形成されると考えられている(43)。機能的に考えるとRb遺伝子はハウスキーピング遺伝子で(44)、その発現はほとんど全ての細胞で認められる。その遺伝子産物は核に局在し、G1/G0期では脱リン酸化により活性化し、細胞増殖を停止させる働きを持つ(45)。しかし、Rbキナーゼでリン酸化されると増殖停止機構は不活性化し、細胞はS期へ進行し増殖を行う。増殖中のHL-60細胞ではリン酸化型と脱リン酸化型のRb遺伝子産物が混在しているが、フォルボールエステル処理による細胞増殖の停止に伴い脱リン酸化型のものだけが増加してくる(46)。しかし、脱リン酸化型のRb遺伝子産物の増加と細胞増殖の停止との因果関係は未だ完全には明らかにされていない。

この他にも細胞の増殖や分化に関わっていると考えられている遺伝子やタンパク質を中心に、その発現やリン酸化がHL-60細胞の分化誘導に伴いどのように変化しているかを調べた研究が数多く報告されている(47)。しかし、いずれもHL-60細胞の分

化誘導の分子機構に直接関与しているか否かは全く明らかではない（注）。

フォルボールエステルによるHL-60細胞の分化過程を調べるにあたって、最初に明らかにすべき二つの疑問があると考えた。一つはフォルボールエステルによる分化誘導が可逆的か非可逆的かという問題である。もう一つはフォルボールエステル処理による細胞増殖の停止と分化形質発現の因果関係である。

1. 3 骨髓性白血病細胞のフォルボールエステルによる分化誘導、増殖停止の可逆-非可逆性

フォルボールエステルによるHL-60細胞の分化誘導は、現在、非可逆的に進むと結論されている（9、35、48）。換言すると、“細胞をフォルボールエステルで一定時間以上処理すると、非可逆的に細胞が一定の変化を起し、たとえ細胞内、細胞外にある一切のフォルボールエステルが除去されても、細胞はフォルボールエステルが存在し続ける場合と同様にマクロファージ様細胞の分化形質の発現と増殖の停止を示す”ことになる。その様なことを主張する論文では、非可逆過程に入ることはcommitment、非可逆過程に入った以後の状態はcommitted stateと表現されている

（48、49、80）。これらの表現は、しかしながら一般の細胞生物学者には極めて強い違和感を抱かせる様なので、本論文では、それらの代りにトリガー（trigger）あるいはT状態（triggered state）という表現を使うことにする。但し、注意しておかねばならないのは、T状態が存在するからといっても、フォルボールエステルにより増殖を停止した白血病細胞が再び増殖することは無いと言っている訳ではない。フォルボールエステル以外の何らかの刺激により増殖する可能性は残されている。

フォルボールエステルによる白血病細胞の分化誘導が非可逆過程であれば、トリガーの分子機構を集中的に調べるのが最も重要であることは自明のことである。非可逆的に進む一つの可能性としてトリガーの遺伝子発現の結果が自己触媒的に働く遺伝子発現のカスケード系の引き金を引く場合が考えられる（50）が、トリガーの遺伝子発現そのものは一過性の場合もT状態で継続的に発現し続ける場合もあり得る。

ここで、血液細胞の正常な発生過程においてトリガーあるいはT状態と関連する事項を整理しておく。成熟したリンパ球群は限定されたT状態を経由した細胞である。

何故なら、これらは特定の抗原に関係した増殖刺激に限定された増殖を示し、骨髄における成熟過程で受けた増殖刺激に対してはもはや応答しないからである(51)。他方、骨髄系細胞の中で顆粒球は極めて寿命が短く、骨髄から血流に放出された以後は決して増殖しない(52、54)。従ってより厳密な意味でT状態を経由した細胞である。単球/マクロファージでも同様に考えられてきたが、最近のトランスジェニックマウスを用いた研究では腹腔においてGM-CSFに対し増殖応答を示すようである(53)。骨髄にある未成熟細胞に対する増殖因子であるGM-CSF、G-CSF、M-CSFなどは、骨髄外では一般に成熟細胞の機能の活性化のみを刺激する(54)。

いずれにしても発生過程における血液細胞のトリガーの分子機構は全く明らかにされていない。骨髄中において一定の成熟過程にある均一細胞を大量に扱うことは不可能に近いから、正常細胞を使う実験の困難さは十分に予想されることである。骨髄性白血病細胞とフォルボールエステルの系は血液細胞の発生過程を直接反映するものではないが、そのトリガーの分子機構があきらかにされれば最初に得られる実験事実として有用であることは間違いない。

1. 4 フォルボールエステル処理による骨髄性白血病細胞の増殖停止と分化形質発現の相関

HL-60細胞をフォルボールエステルで処理すると、分化形質の発現と増殖停止が起る。このとき、細胞内の代謝系、あるいは細胞を構成する分子の質、量は大きく変化する。この変化には当然発現している遺伝子群の大幅な変換が伴う。古典的には、分化に伴う遺伝子発現の大幅な変換には染色体構造の変化が必須であるとする考え方があった(55)。この考えに従えば、分化誘導シグナルに応答するにはDNAの複製の過程が必要となる(55)。しかし、転写因子とそれが結合するDNA制御配列の研究の発展により、染色体の構造変化ではなく必要な転写因子の活性化の方が重要であることが明らかになった(55)。骨髄性白血病細胞のフォルボールエステル処理による分化誘導の場合も、S期を通過することが増殖停止の必要条件ではない(56)。

骨髄性白血病細胞のフォルボールエステル処理の場合の様に分化形質の発現と増殖停止の両方が生じるとき、両者の時間的相関関係の有無の問題を次に考える。

骨髓性白血病細胞のフォルボールエステル処理の場合、G.Roveraのグループが示したように細胞周期のG1後期のR点以降で処理された細胞は次のG1期で必ず増殖停止する(56)。従って、細胞周期を同調した細胞試料を使えば、分化形質の発現と増殖停止の時間的な前後関係を明らかにすることができる。時間的相関関係を明らかにすることは現象の因果関係の有無を明らかにする上で最も重要である。即ち、G1停止が分化形質の発現の原因であるのか、逆に分化形質の発現がG1停止の原因ではないのか、あるいは両者の間には何の因果関係も無いのか、という三つの可能性に対する明確な解答を与えることができる。

ここで注意しておきたいのは、我々はあくまでもフォルボールエステルによる骨髓性白血病細胞の分化誘導に議論を限定していることである。HL-60細胞でも、活性型ビタミンD₃(57)やレチノイン酸処理(11)では、分化形質は発現しても数日間は増殖を続ける。従って、この場合は分化形質の発現と増殖停止の間には何らの因果関係は無く、独立な現象であると言える。また、正常な細胞でも同様の場合はある(1)。但し、分化形質として取り扱われている変化が分化マーカーとしては不完全である可能性はある。さらに増殖停止と分化形質の発現が独立であると、増殖停止だけが生じ分化形質を全く発現しない可能性も考えられるが、このようなことは全く観察されていない。

1. 5 本研究の経緯、及び得られた結果の概要

我々の究極的目標は、フォルボールエステルによるヒト骨髓性白血病細胞分化の分子機構の解明であり、それには分化のトリガーを指令する遺伝子のクローニングが最も重要である。そのために、我々はまず白血病細胞がトリガーを受ける時間を決定することから始めた。その時点の細胞内では非可逆的な分化を進行させる遺伝子の発現がおきているはずであり、cDNAライブラリーを適当な方法でスクリーニングすることでその遺伝子のクローニングが可能となるからである。

白血病細胞株としてHL-60細胞を、フォルボールエステルとしてPMAを用いてトリガーが成立する時間が既に報告されている(9, 48)ので本研究ではまずそれを追試してみた。その結果PMA30分処理で細胞のT状態が成立することが確認された。更に

このT状態が成立した細胞の分化過程を詳細に調べたところ、その培養上清中に分化誘導作用をもつ因子が含まれることが明らかになった。このことは、フォルボールエステルによるHL-60細胞の非可逆的分化がオートクライン型に進行していることを示唆しているので、次にこの分化誘導因子の同定を試みた。

その結果、細胞からこの分化誘導因子が放出されるには培養液中の血清の存在が不可欠であり、その中で必要な成分はアルブミンであることも明らかになった。血清アルブミンの機能の一つに疎水性物質の運搬がある。また、PMAも疎水性の強い物質である。このことから我々は培養上清中に存在する分化誘導活性は、従来の洗浄操作では細胞から除去されていなかったPMAがアルブミンと結合することにより細胞外へでていった結果ではないかと考え、ラジオアイソトープラベルされたPMAを用いてトレーサー実験を行った。その結果、培養上清中に出現する分化誘導活性はPMAそのものであることが明らかになった。以上の実験結果より、これまで主張されていたトリガーは細胞からのPMAの不完全な除去が原因のartifactであることが明らかになった。

そこでPMAと同様の分化誘導活性をもち、しかも容易に細胞から除去できるフォルボールエステルであるPDBを用いて再び細胞のT状態が成立する時間を調べた。その結果、たとえば長時間PDBで処理をし、十分に分化形質を発現させ増殖を停止させても、PDBを除去すると細胞は必ず元の未分化な状態に戻ることが分かった。さらに、PMAで分化誘導した細胞を用いても洗浄を繰り返すことによりPMAを十分に除去すると同様の結果が得られた。従って、フォルボールエステルによるHL-60細胞の分化誘導過程にトリガーは存在しないことが明らかになった。また、フォルボールエステル処理で増殖を停止する他の骨髄性白血病細胞もフォルボールエステルを除去すると増殖を再開した。従って、骨髄性白血病細胞のフォルボールエステルによる分化は可逆的であり、フォルボールエステル存在下でのみ細胞増殖の停止と分化形質の発現がおきる、つまり細胞増殖の停止や分化形質発現を支配する分子はフォルボールエステル存在下でのみ活性化され機能している訳である。

本研究では次にフォルボールエステルで誘導される増殖停止と分化形質発現の時間的前後関係について調べた。

使用するHL-60細胞は、まずアフィジコリン処理を2回繰返し、細胞周期をG1/S境

界に十分に同調した状態で停止させた。次いでアフィジコリンを除去して細胞周期の進行を再開させる一方、S期およびG1期において別個にTPA処理を開始し、単球/マクロファージでの代表的な形質であるディッシュへの接着、接着細胞の伸展、細胞表面の代表的分化マーカーであるMac-1やICAM-1の発現などが細胞周期のどの時点で発現するかを調べた。その結果、これらの分化形質は全て、細胞が次のG1期で増殖を停止する以前に発現している事が明らかになった。これらの分化形質の発現の経時変化が、どの細胞周期で細胞がフォルボールエステル刺激を受けても全く同じであったことも極めて興味深い。HL-60細胞の単球・マクロファージへの代表的な分化形質の発現が細胞の増殖停止以前に起っている事実は、”分化形質の発現が増殖停止の原因となり得る”という全く新しい、しかも重要な可能性を示唆している。

我々は、増殖停止の原因となる分化形質の候補として第一にMac-1を選んだ。しかし、Mac-1を発現していても増殖を停止しない骨髄性白血病細胞も存在する。THP-1細胞はフォルボールエステルの作用によりHL-60細胞と同じ細胞系譜の成熟細胞に分化が誘導されるが、HL-60細胞より分化段階が進んでおりMac-1やICAM-1を既に大量に発現している。しかし、接着や伸展は示さず、HL-60細胞と同様に無限に増殖を繰り返している白血病細胞である。そこで、THP-1細胞についてフォルボールエステルの作用を詳細に調べた。

THP-1細胞をアフィジコリン処理によりG1/S境界から同調的に細胞周期を進行させ、同時にPDBで処理すると、HL-60細胞の場合と同様、接着や伸展は次のG1期における増殖停止に先だって起る。HL-60細胞と異なる重要な結果は、接着の形質発現に誘導期が全く存在しないことである。このことは、対数増殖期の細胞をフォルボールエステルで処理して増殖停止を調べると、HL-60細胞では長い誘導期があるのにTHP-1細胞では直ちに増殖停止に入ることとも対応している。さらに、PDBパルス処理の実験から、短時間の増殖停止にはPKCによるリン酸化が必要であるがmRNA合成は必要でないことが明らかになった。従って、Mac-1発現は増殖停止の十分条件ではなく、フォルボールエステルによって活性化を受けたPKCがタンパク質リン酸化を行う過程も必要であることが示唆される。

以上の結果を総合的に判断し、Mac-1の発現が白血病細胞の増殖停止の引き金とな

る可能性が最も高いと考えた。

1.1 はじめに

ヒト骨髄造骨幹細胞は、40は発ガンプロモーターであるフォスホーノールアステル-1の過剰発現による細胞増殖を停止してクローニング様や細胞へと分化する。この分化を導く細胞内変化は30分のPMA処理で充分である。つまり、この細胞に骨髄分化への誘導が促されるという結果が観察されていた。1997年、本研究室で検討した結果、確かに発ガン用のPMA処理で骨髄分化への促進が成立していた。この過程を詳細に調べてみるとPMAの短期処理された細胞は成体骨髄、新しい細胞に置き換えられ、分化誘導因子を分泌する細胞としての働きが分化誘導の阻害と細胞増殖の停止を誘発していることがわかった。この分化誘導因子が造血系物質の増殖作用を持つ成長因子であることにより、骨髄から抽出される点とPMAが成体骨髄の物質である点から、細胞をPMAの短期処理した後の成体骨髄で、細胞内からPMAが充分に除去できていなかった可能性を考慮して、以下に検討を行った。その結果、成体骨髄中に抽出された分化誘導因子は下流因子細胞に依存してPMAそのものである。発ガン用のPMA処理で細胞増殖を抑制するという上記の結果は、in vivoであることが明らかになった。

1.2 材料と方法

2.2.1 細胞培養

本研究室で、細胞培養はF127+CO₂インキュベーター (Model 430NAPOC) 内で10% CO₂ 環境で、36.5°Cの条件で実施した。培養細胞は遠心、細胞培養用アッセイ用プレート (NUNC) に、また、PMA (Wako) を用いた。培養液はRPMI1640 細胞培養液を添加して調製し、その濃度 (10⁶ cells/ml) の場合、あるいは10⁵ cells/ml の場合、インキュベーターの温度を用いた場合、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、24時間、36時間、48時間、72時間、96時間、120時間の培養を行った。培養液は14日で回収し、使用時には予冷したインキュベーターに入れて速凍してから使用した。

2. 細胞に強い親和性を示すフォルボールエステルPMA

2. 1 はじめに

ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60は発ガンプロモーターであるフォルボールエステル
の一種PMA処理により細胞増殖を停止しマクロファージ様の細胞へと分化する。この
分化を導く細胞内変化は20分のPMA処理で充分である。つまり、この間に終末分化へ
のT状態が成立するという結果が報告されていた(9)。本研究で追試した結果、確か
に短時間のPMA処理で終末分化へのT状態が成立していた。この過程を詳細に調べて
みるとPMA短時間処理された細胞は洗浄後、新しい培地に移された後、分化誘導因子
を上清中に放出しこの因子が分化形質の発現と細胞増殖の停止を誘導していることが
わかった。この分化誘導因子が疎水性物質の運搬作用を持つ血清アルブミンにより細
胞から放出される点とPMAが疎水性の強い物質である点から、細胞をPMA短時間処
理した後の洗浄操作で、細胞内からPMAが十分に除去できていなかった可能性を考え、
RIを用いたトレーサー実験を行った。その結果、培養上清中に検出された分化誘導因
子は予想通り細胞に残存していたPMAそのものであり、短時間のPMA処理でT状態が
成立するという上記の結果は artifactであることが明らかになった。

2. 2 材料と方法

2.2.1 細胞培養

本研究では、細胞培養はすべてCO₂インキュベーター (Model 4300, NAPCO) 内で
行い、CO₂濃度5%、36-37°Cの条件に設定した。培養容器は通常、組織培養用プラス
チック製ディッシュ (FALCON、またはSUMILON) を用いた。培養液はRPMI1640
粉末培地を溶解して調製し、ろ過滅菌 (Flow lab.の製品を用いる場合) あるいはオー
トクレーブ滅菌 (ニッスイの製品を用いる場合) したものに非動化 (56°C、30分) 処
理した牛胎児血清 (HyClone、または Irvine Scientific) を10%、硫酸カナマイシン (明
治製薬) を100µg/mlになるよう加えたものを使用した。培養液は4°Cで保存し、使用
時には予めディッシュに分注しCO₂インキュベーターに入れて温めてから使用した。

HL-60細胞は東北大医学部の逸見仁道博士より提供された米国NCI Gallo研究室由来のパスセージ18の細胞、およびATCCから入手した細胞(ATCC CCL240)を使用した。継代は初期細胞濃度を 2.5×10^5 cells/mlとし、一週間おきに行った。実験にはパスセージ35までの、継代後2~5日目の対数増殖期にある細胞を使用した。HL-60細胞の世代時間は46時間である。

2.2.2 PMAとPDBの構造と特性

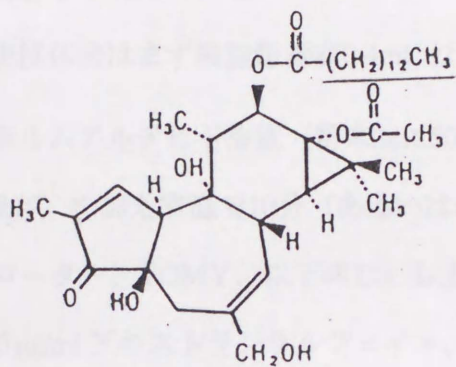
図2.1 (p.14)にPMAとPDBの構造を示す。PMAは長いアシル基を持つため疎水性が強く細胞内部まで入っていく(58)。一方PDBの疎水性は弱く細胞表面にとどまり作用する(59)。PMA (Pharmacia)とPDB (Sigma)の原液はエタノールで 2×10^{-4} Mになるように調製し、 -20°C で保存した。使用時には培養液でまず 10^{-5} Mの希釈液をつくり、PMAは1/200量、PDBは1/100量を 5×10^5 cells/mlの細胞培養液に加え、それぞれ 5×10^{-8} M、 10^{-7} Mで処理した。

RIトレーサー実験は12.7Ci/mmolの $[^3\text{H}]$ -PMA (NEN)を上記のPMAで2.54Ci/mmolに調製したものと19.1Ci/mmolの $[^3\text{H}]$ -PDB (NEN)を上記のPDBで1.91Ci/mmolに調製したものを使用した。放射能の測定は非イオン界面活性剤を含む乳化シンチレーターのシンチゾールEX-H (和光) 5mlに0.45mlの細胞懸濁液あるいは培養上清を直接加え完全に混合し、シンチレーションカウンター (アロカ)で行った。

トリガーの実験では、 5×10^5 cells/mlのHL-60細胞にPMAを 5×10^{-8} Mになるように加え一定時間培養後洗浄した。細胞の洗浄は、まず遠心チューブに細胞を回収して遠心(1200rpm、5分; TS-7ローター、TOMY)し上清を除き、更に10mlのRPMI1640培地で2回洗浄し、最初と同じ量の新しい培養液を加えるという方法で行った。PMA添加48時間後、蛍光抗体法を用いて細胞を処理しフローサイトメーターFACScan (Becton Dickinson)により細胞表面のMac-1発現を測定した。

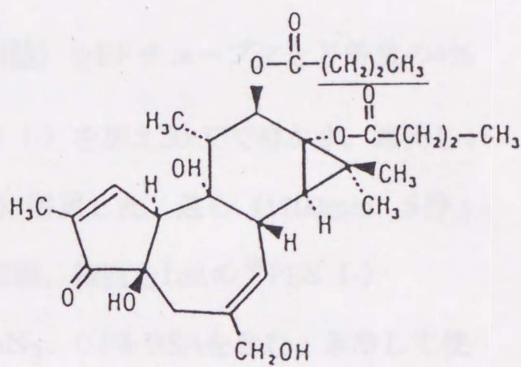
2.2.3 蛍光抗体法

分化の指標として補体レセプターtype3 (CR3)であるMac-1の発現を調べた。Mac-



PMA

(Phorbol 12-myristate 13-acetate)



PDB

(Phorbol 12,13-dibutyrate)

図 2.1 PMAとPDBの構造

1は α_M サブユニット (CD11b) と β_2 サブユニット (CD18) から成るヘテロダイマーでインテグリンファミリーに属する (60)。またMac-1は補体C3biだけでなくICAM-1やフィブリノーゲンなどのタンパク質もリガンドとして結合することができる (60)。Mac-1は単球・マクロファージや顆粒球などの成熟骨髄系細胞で発現しており、HL-60細胞でもフォルボールエステル処理による分化誘導に伴い発現してくる (61) ので分化形質として有用である。

蛍光抗体法はまず細胞懸濁液0.4ml ($2 \sim 4 \times 10^5$ 細胞) をEPチューブにとり等量の4%パラホルムアルデヒド溶液 (粉末2gに50mlのPBS (-) を加え50°Cで溶かす。遮光し4°Cで保存) を加え室温で10分 (あるいは水中30分) 固定した。遠心 (1200rpm、5分; TS-7ローター、TOMY、以下同じ) し上清を除去後、細胞を1mlの*PBS (-) (0.25 μ g/ml デキストランサルフェイト、0.2% NaN_3 、0.1% BSAを含む; 氷冷して使用) で2回洗浄後、細胞を50 μ lの*PBS (-) に懸濁しOKM-1抗体 (マウス抗ヒトMac-1抗体) を20 μ l加え10分おきに指で軽く混ぜながら4°Cで30分反応させた。なおOKM-1抗体はATCCから入手したハイブリドーマ (ATCC CRL8026) を当研究室で培養しプロテインGカラムで精製したものを希釈して使用した。一次抗体処理後、1mlの*PBS (-) で3回洗浄し、二次抗体としてFITCラベルしたヤギ抗マウスIgG抗体 (F(ab)'_2 、カッペル社) を20 μ l加え一次抗体の時と同様に反応させた。*PBS (-) で2回洗浄後、0.5mlの*PBS (-) に懸濁しプラスチックチューブ (FALCON 2052) に移した。

2.2.4 FACSscanによる解析

1970年代初めよりスタンフォード大学のHerzenbergを中心に開発が進められたフローサイトメーターは、ノズルから流出してくる細胞浮遊液中の細胞にレーザー光を照射し、個々の細胞から放出される散乱光や蛍光の強度を検出、記憶し、コンピューターで解析するというものである (62)。FACSscanの構造は流体 (フロー) 系、光学 (レーザー、フィルター) 系、電気信号系の3系統で構成されている。

流体（フロー）系は細胞を1個ずつ分離し、常に安定した流れを実現する系である。秒速10m以上の高速流速で細胞が流れても細胞がノズルに付着したり、大きな細胞や細胞の塊が詰まったりすることはない。ラミナー・シース・フロー原理により細胞浮遊液をシース液で円筒状に包み込むようにして流す方法をとっているため、常に一個一個の細胞が分離して安定な流れが得られる。

光学（レーザー・フィルター）系には非常に安定した空冷式15mWアルゴンレーザーを用いている。発振波長の一つである488nm付近に最大励起波長を持つ蛍光物質は、FITC、PE、PI、AOなど多数存在し、これらで標識された細胞がレーザーに照射され励起されて発する蛍光が検知器で検出される。この時、各種のフィルターにより特定波長域の蛍光が選択されるので2色あるいは3色の蛍光を分離して検出することができる。また、散乱光としてレーザー入射光と同一の方向で検出される前方散乱光（FSC）と、垂直方向で検出される側方散乱光（SSC）が測定できる。FSCは細胞の大きさ、SSCは細胞の形態や核、顆粒などの細胞内構造に関する情報を与える。FACSscanの使用に当たって用いた設定条件は、流速HI、信号の増幅率はE00（FSC）、150（SSC）、500（FL-1）、430（FL-2）、150（FL-3）である（数字の意味についてはマニュアル参照のこと）。また、個々のサンプルについて8000～10000個の細胞を解析した。

2. 3 結果と考察

2.3.1 PMA短時間処理で生じるHL-60細胞の分化

まずPMA処理されたHL-60細胞のMac-1発現の経時変化を調べた。その結果を図2.2（p.17）に示す。Mac-1の発現はPMA処理後12時間から始まり時間と共に増加していった。死細胞が増加し始める2日目以降では大きな変化はなく、48時間のPMA処理でHL-60細胞は十分に分化していると考えてよい。またPMA処理によりHL-60細胞はMac-1発現だけでなく、ディッシュへの接着や伸展などの形態変化を示し、増殖も停止してマクロファージ様の細胞へ分化していた（図2.3, p.18）。

次にトリガーの実験を行った。その結果を図2.4（p.19）に示す。HL-60細胞はPMAと30分接触するだけで48時間後にはPMA連続処理と同様にMac-1を強く発現し分化していた。この結果はG. Roveraらの報告と一致していた（9）。一方、J. A.

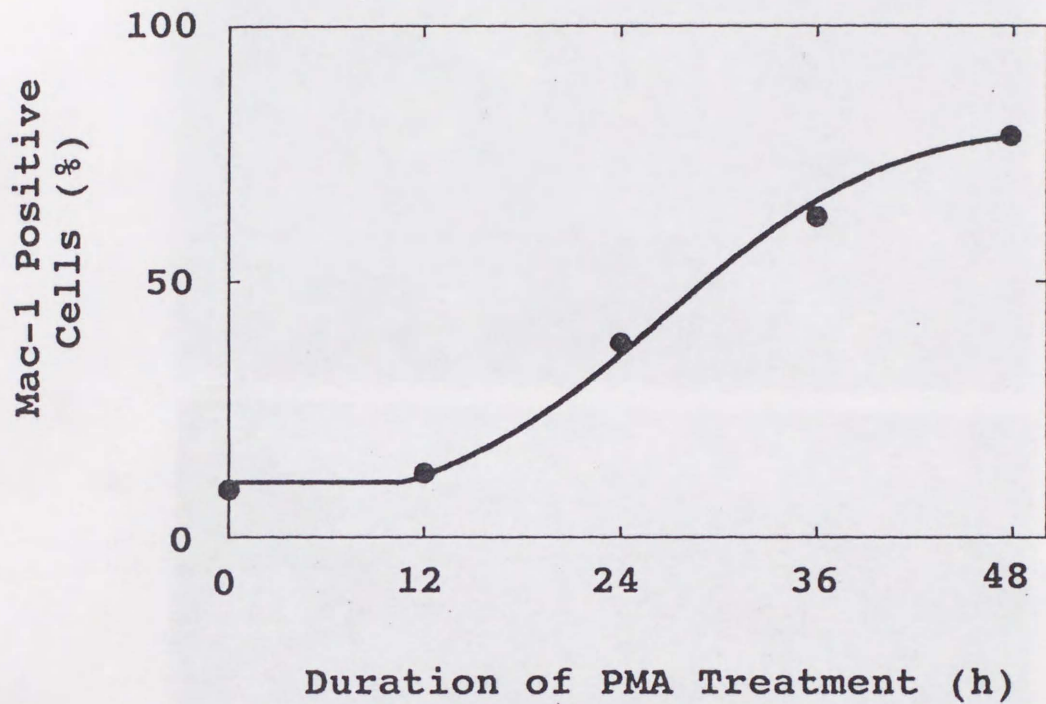
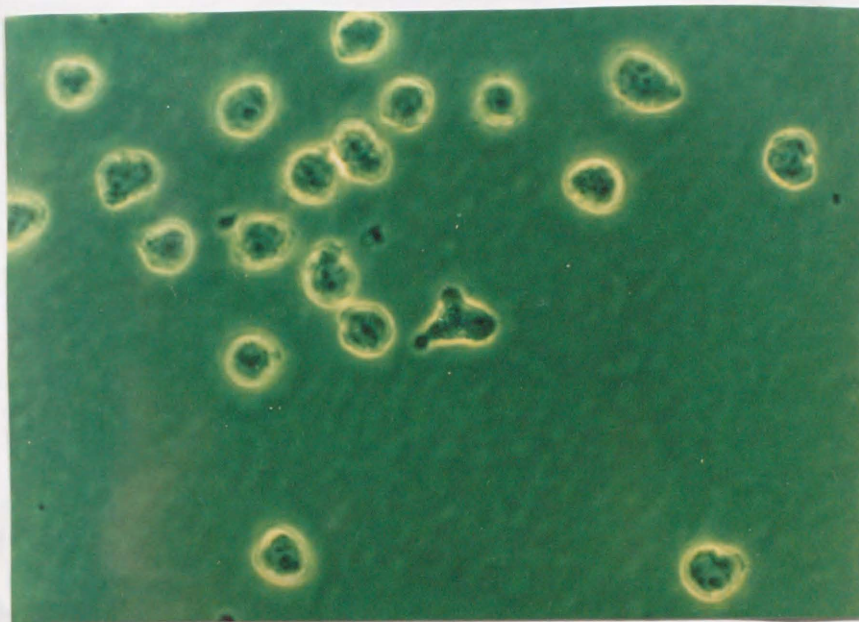


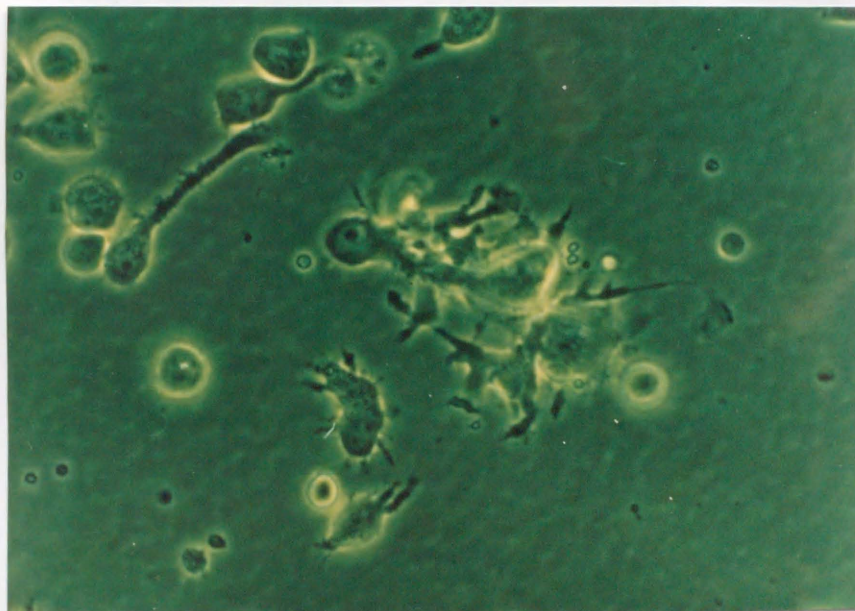
図 2.2 PMA処理によるMac-1発現の経時変化

HL-60細胞 (5×10^5 cells/ml) を PMA (5×10^{-8} M) で処理し、各時間後のMac-1発現を調べた。

(A)



(B)



10μm

図 2.3 HL-60細胞とフォルボールエステルによる分化誘導

(A) は未処理のHL-60細胞 (B) は 5×10^{-8} M のPMAで2日間処理したHL-60細胞

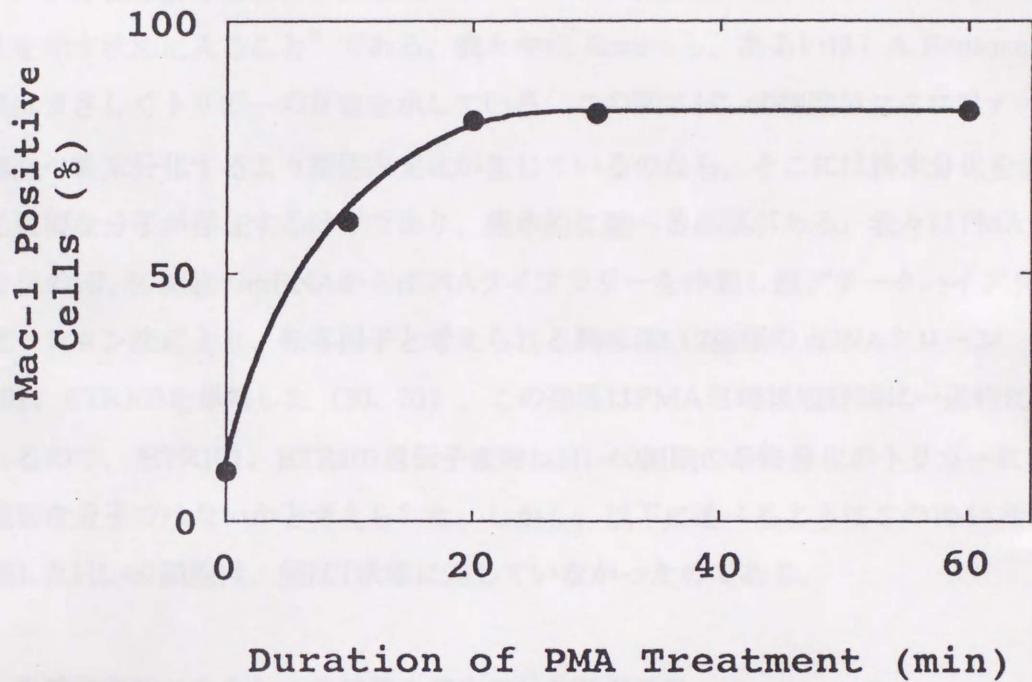


図 2.4 PMA短時間処理によるHL-60細胞の分化

HL-60細胞 (5×10^5 cells/ml) をPMA (5×10^{-8} M) で各時間処理し洗浄した。新しい培養液で培養し、48時間後のMac-1発現率を調べた。

Fontonaらは、6時間のPMA処理で24時間後にHL-60細胞は十分に分化すると報告している(48)。繰返し述べるが、ここでいうトリガーという概念は”細胞をフォルボールエステルで一定時間以上処理すると、非可逆的に細胞が一定の変化を起し、たとえ細胞内、細胞外の一切のフォルボールエステルが除去されても、細胞はフォルボールエステルが存在し続ける場合と同様にマクロファージ様細胞の分化形質の発現と増殖の停止を示す状態に入ること”である。我々やG. Roveraら、あるいはJ. A. Fontonaらの結果はまさしくトリガーの存在を示している。この間にHL-60細胞がマクロファージ様細胞へ終末分化するよう細胞内変化が生じているのなら、そこには終末分化を決定する重要な分子が存在するはずであり、集中的に調べる必要がある。我々はPMA処理30分後のHL-60細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製し差プラークハイブリダイゼーション法により、転写因子と考えられる興味深い2種類のcDNAクローンETR101、ETR103を単離した(30、31)。この発現はPMA処理後短時間に一過的に増強されるので、ETR101、ETR103遺伝子産物はHL-60細胞の最終分化のトリガーに関わる重要な分子ではないかと考えられた。しかし、以下に述べるようにこのPMA短時間処理したHL-60細胞は、実はT状態に達していなかったのである。

2.3.2 血清依存的にあらわれる培養上清中の分化誘導活性

PMA短時間処理したHL-60細胞がT状態に達していないのではないかという疑問が生じたきっかけは、この細胞をしばらく培養して上清を除去しもう一度洗浄を行うとMac-1の発現率が洗浄を行わなかった元のPMA短時間処理の細胞に比べて低下するという実験結果が得られたからである。もし、PMA短時間処理したHL-60細胞が終末分化へのT状態に達しているのなら、たとえ上清を除去し洗浄を繰り返しても分化率が低下するはずはない。洗浄した細胞に元の上清を加えると分化率が回復したので洗浄の操作により分化率が低下したのではなく、PMA短時間処理した細胞の培養上清中に分化を誘導する因子が存在し、これがオートクライン的にHL-60細胞に作用し分化を誘導したと考えた。図2.5(p.21)はPMA短時間処理したHL-60細胞の培養上清中に分化誘導活性が出現してくることを示す実験結果である。30分PMA処理した細胞を洗浄して新しい培地に移し、一定時間後に培養上清と細胞とを分離し、培養上清は未処

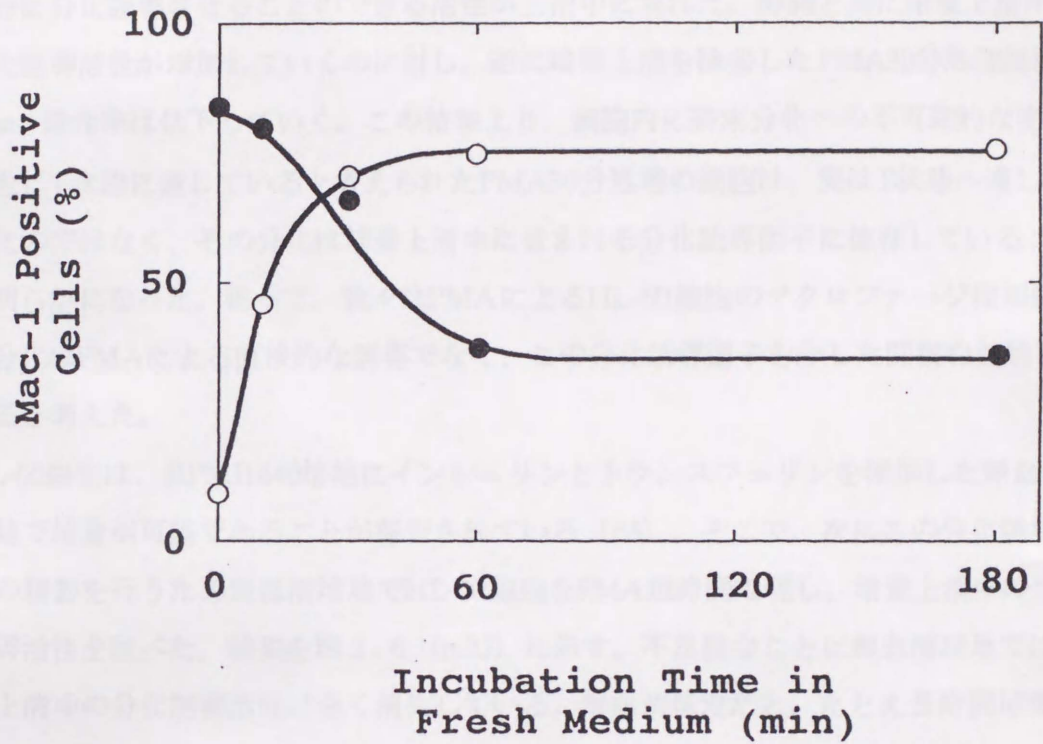


図 2.5 培養上清中の分化誘導活性の増加とPMA短時間細胞の培地交換に伴う分化率の減少

PMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) で30分処理したHL-60細胞を洗浄し新しい培養液に移した。各時点において培養上清と細胞とに分離し、培養上清は未処理のHL-60細胞に加え48時間後のMac-1発現率 (○) を、細胞は洗浄し新しい培養液で培養しPMA処理から48時間後のMac-1発現率 (●) を調べた。

理のHL-60細胞に加え48時間後のMac-1発現を測定することにより、その分化誘導活性を調べた。一方、上清を除去した細胞には新たな培養液を加え48時間後のMac-1発現を測定した。

PMAで30分処理した細胞を新しい培地で培養すると30分後には未処理のHL-60細胞を十分に分化誘導させることのできる活性が上清中に現れた。時間と共に培養上清中の分化誘導活性が増加していくのに対し、逆に培養上清を除去したPMA30分処理細胞のMac-1陽性率は低下していく。この結果より、細胞内に終末分化への不可逆的な変化が生じT状態に達していると考えられたPMA30分処理の細胞は、実はT状態へ達していたのではなく、その分化は培養上清中に含まれる分化誘導因子に依存していることが明らかになった。従って、我々はPMAによるHL-60細胞のマクロファージ様細胞への分化はPMAによる直接的な誘導でなく、この分化誘導因子を介した間接的な誘導であると考えた。

HL-60細胞は、RPMI1640培地にインシュリンとトランスフェリンを添加した無血清培地で培養が可能であることが報告されている(63)。そこで、次にこの分化誘導因子の精製を行うため無血清培地でHL-60細胞をPMA短時間処理し、培養上清中の分化誘導活性を調べた。結果を図2.6(p.23)に示す。不思議なことに無血清培地では培養上清中の分化誘導活性は全く消失している。無血清培地だと、たとえ長時間培養しても培養上清中に分化誘導活性は現れてこなかった。一方、培養上清を除去し新しい培養液を加えたPMA短時間処理細胞のMac-1発現率は低下せず元のままである。そこで、この分化誘導因子は細胞から分泌されてオートクライン的に作用するだけでなく、細胞内、あるいは細胞表面に存在していても分化誘導活性をもち、それが血清により培養上清中へ放出されると我々は考えた。

そこで分化誘導因子の放出が血清依存的であることを確かめるために以下の実験を行った。まず無血清培地で30分PMA処理した細胞をそのまま無血清培地で培養する。PMA除去後30秒、30分、5時間の各時点において血清を加え、各々5分、15分、35分、65分後の培養上清を回収し、未処理のHL-60細胞に加え48時間後のMac-1発現率を調べた。その結果、この分化誘導因子の放出が血清依存的であることが明瞭に示された(図2.7,p.24)。血清が存在しないと培養上清中に分化誘導活性は現れなかったが、

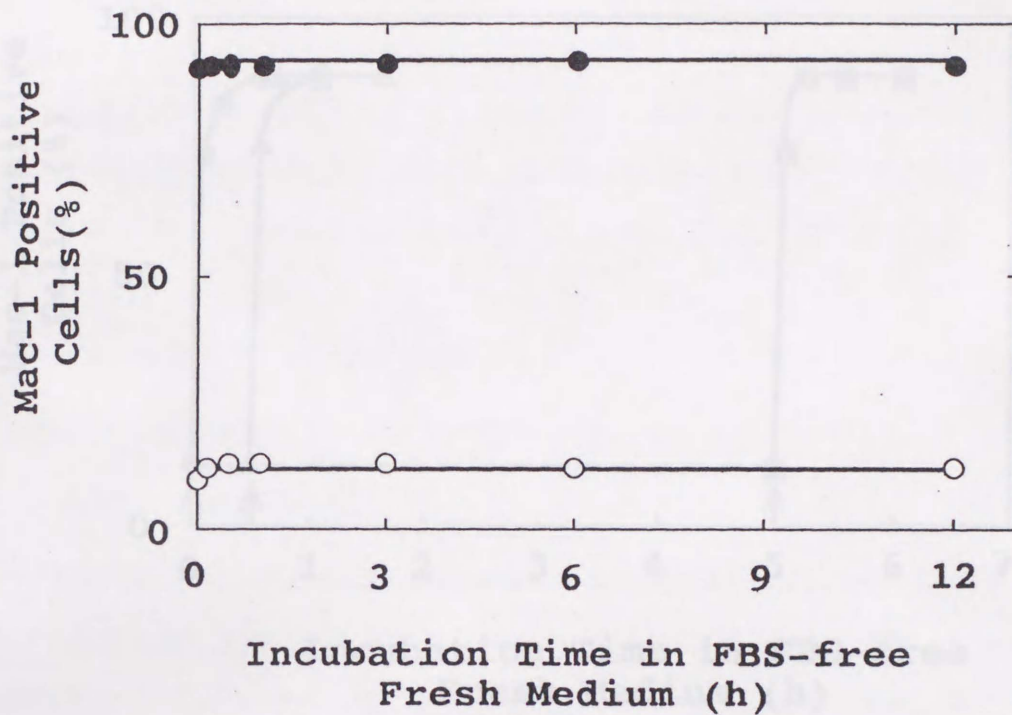


図 2.6 培養上清中に現れてこない分化誘導活性

無血清培地中で30分間 PMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) 処理した HL-60 細胞を洗浄し、新しい無血清培地に移した。各時点において培養上清と細胞とに分離し、培養上清には10%血清を添加して未処理の HL-60 細胞に加え48時間後の Mac-1 発現 (○) を調べた。一方、細胞は洗浄し新しい培養液で培養し PMA 処理から48時間後の Mac-1 発現率 (●) を調べた。

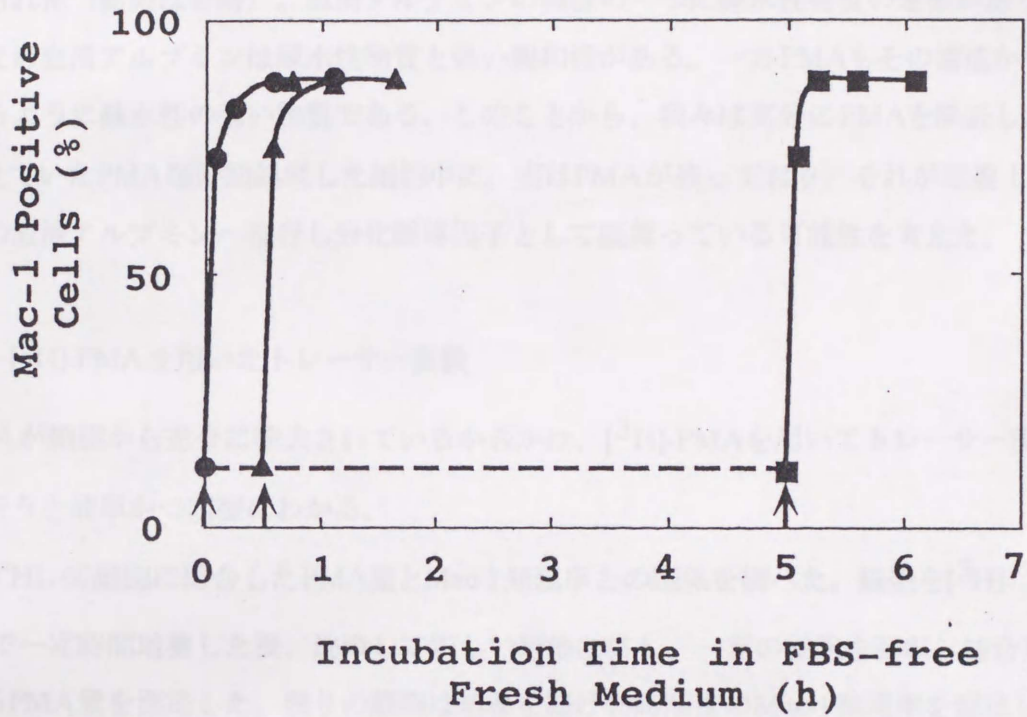


図 2.7 血清添加で培養上清中に現れる分化誘導活性

無血清培地中で30分間 PMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) 処理した細胞を洗浄し、新しい無血清培地に移した。矢印の時点で血清を加え、5、15、35、65分後の培養上清を未処理のHL-60細胞に加え48時間後のMac-1発現率を調べた。

30秒、30分、5時間の各時点で血清を加えると、いずれもすみやかに現れている。

次にPMA短時間処理したHL-60細胞中から分化誘導因子を放出させるのに必要な血清中の成分の同定を考えた。まず血清中に最も多く含まれている血清アルブミンを血清の代りにくわえてみると、血清の場合と同様の分化誘導因子の放出が培養上清中に認められた（結果は省略）。血清アルブミンの機能の一つに疎水性物質の運搬があり、そのため血清アルブミンは疎水性物質と強い親和性がある。一方PMAもその構造からわかるように疎水性の強い物質である。このことから、我々は十分にPMAを除去したと考えていたPMA短時間処理した細胞中に、実はPMAが残っており、それが培養上清中の血清アルブミンへ移行し分化誘導因子として振舞っている可能性を考えた。

2.3.3 [³H]-PMAを用いたトレーサー実験

PMAが細胞から十分に除去されているか否かは、[³H]-PMAを用いてトレーサー実験を行うと簡単かつ明瞭にわかる。

まずHL-60細胞に結合したPMA量とMac-1発現率との関係を調べた。細胞を[³H]-PMAで一定時間培養した後、洗浄して新しい培地に移し、一部の細胞を回収し結合しているPMA量を測定した。残りの細胞は培養を続け48時間後のMac-1発現率を測定した。その結果を図2.8 (p.26)に示す。PMAの細胞への結合は1時間以内に大抵飽和し、またこの時点まではPMAの結合量と共に48時間後のHL-60細胞のMac-1の発現率も増加していた。この結果は培地に加えたPMAが短時間内に細胞への結合を完了し、しかも洗浄によりPMAが除去されていないことを示している。

次に、洗浄後の細胞に結合して残存するPMAが、新しい培養液を加えたとき、未処理の細胞を分化誘導させるのに十分な量だけ培養上清中に移行することを図2.9

(p.27)に示す。この図は、PMAで4時間処理したHL-60細胞を洗浄後、新しい培養液に移した後、細胞から培養上清へ移行するPMA量と培養上清中の分化誘導活性の関係を表している。PMAで短時間処理した細胞を新しい培養液に移すと、PMAは細胞から培養上清へすみやかに移行していき、培養上清中のPMA量と分化誘導活性との間に相関があることが明確に示された。更にこの培養上清中の分化誘導活性がすべてPMA

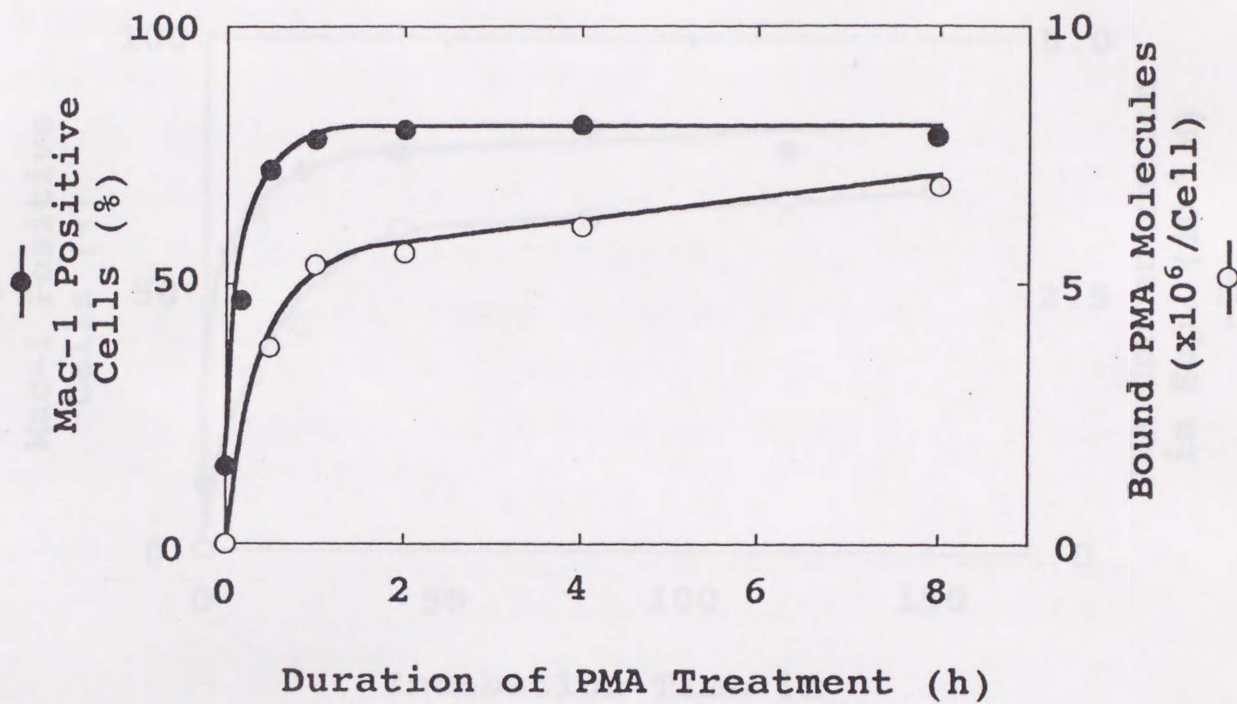


図 2.8 PMA短時間処理した細胞の分化と結合しているPMA分子数

HL-60細胞 (5×10^5 cells/ml) を [^3H]-PMA (5×10^{-8} M) で各時間培養した。培養後洗浄し、細胞あたりに結合しているPMA量 (○) とPMA処理から48時間後のMac-1発現率 (●) を調べた。

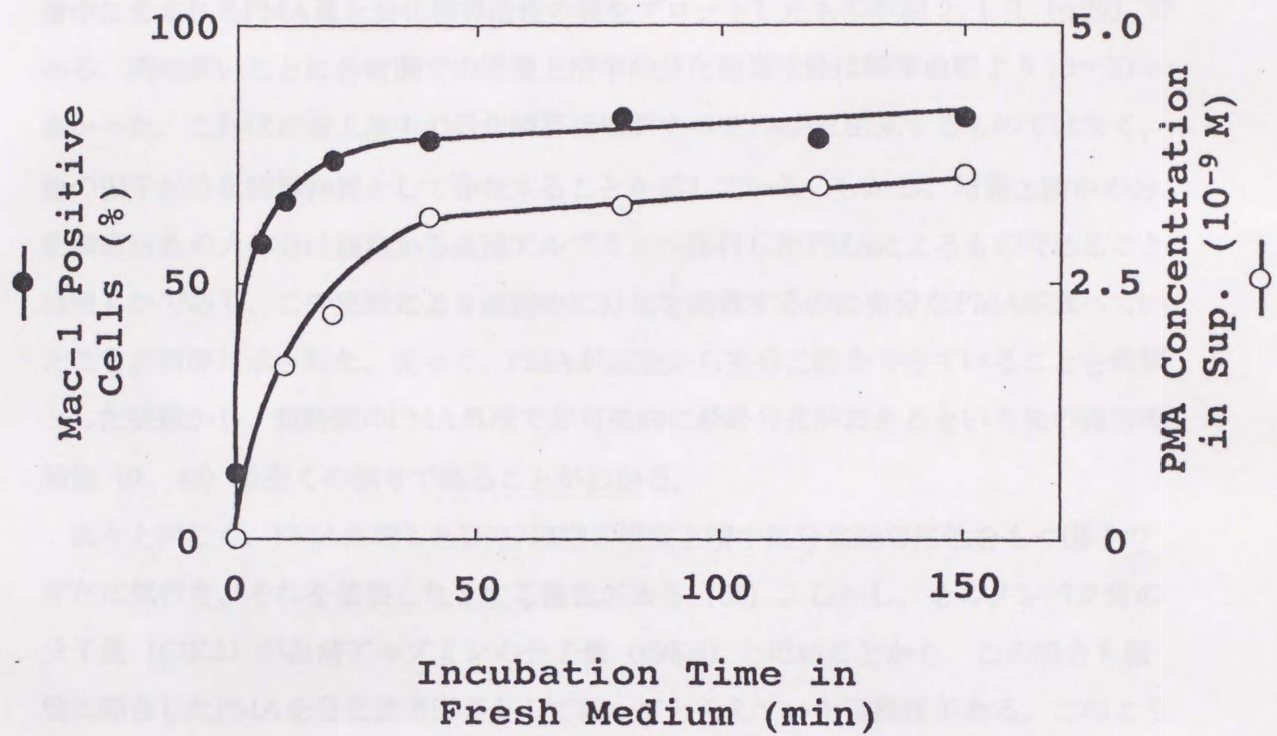


図 2.9 培養上清中の分化誘導活性とPMA濃度

HL-60細胞 (5×10^5 cells/ml) を $[^3\text{H}]$ -PMA (5×10^{-8} M) で4時間処理し洗浄した。新しい培養液で各時間培養し、培養上清中に含まれるPMA濃度 (○) を調べた。その培養上清を未処理のHL-60細胞に加え48時間後のMac-1発現率 (●) を調べた。

によるものか否かを調べた。何故なら、HL-60細胞はPMA処理により自分自身の分化を誘導するTNFやIL-1などのサイトカインを放出することが報告されていたからである(64)。まず $[^3\text{H}]$ -PMAを任意に希釈しその放射活性と未処理のHL-60細胞に加えた時の分化誘導活性とを測定し標準曲線を作成した。その上に図2.9(p.27)の培養上清中に含まれるPMA量と分化誘導活性の値をプロットしたものが図2.10(p.29)である。興味深いことに各時間での培養上清中の分化誘導活性は標準曲線より10~20%高かった。これは培養上清中の分化誘導活性がすべてPMAに由来するものではなく、他の因子が分化誘導物質として存在することを示している。しかし、培養上清中の分化誘導活性の大部分は細胞から血清アルブミンへ移行したPMAによるものであることは明らかであり、この実験により細胞中に分化を誘導するのに十分なPMAが残っていたことが明瞭に示された。従って、PMAが細胞から十分に除去できていることを前提とした実験から、短時間のPMA処理で非可逆的に最終分化がおきるという先の報告の結論(9、48)は全くの誤りであることがわかる。

我々と同じく、PMA処理したU937細胞の培養上清中に分化誘導活性をもつ因子の存在に気づき、それを精製したとする報告がある(65)。しかし、そのタンパク質の分子量(67Kd)が血清アルブミンの分子量(69Kd)と近いことから、この場合も細胞に結合したPMAを分化誘導因子として誤ってとらえていた可能性がある。このような誤りを防ぐため疎水性の強い物質や細胞と親和性のある物質を分化誘導剤としてトリガーの実験を行う場合、本当に細胞から分化誘導剤が除去できているのか否か、RIで標識した化合物を用いて慎重に検討する必要がある。

2.3.4 HL-60細胞に結合したPMAとPDBの除去

正確なトリガーの実験を行うには、分化誘導に影響を与えない程度まで細胞からPMAを除去する方法を確立しなければならない。PMAは血清アルブミンと結合しやすいのでBSAを含むRPMI1640培地で洗浄を行うと効率良く細胞から除去できるのではないかと、この可能性を検討した。その結果を図2.11(p.30)に示す。PMAで30分処理した細胞をRPMI1640培地だけで洗浄すると細胞あたり 3.80×10^6 分子のPMAが結合している。0.25%BSAを含むRPMI1640培地で洗浄すると細胞あたりに結合してい

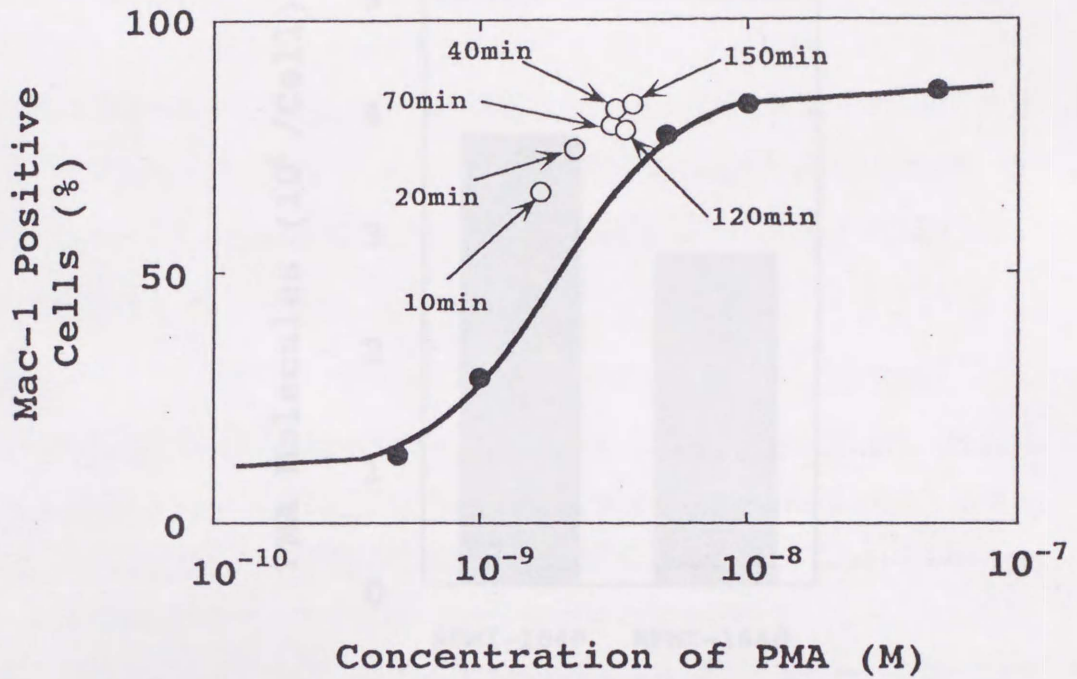


図 2.10 培養上清中に含まれるPMA以外の分化誘導活性

$[^3\text{H}]$ -PMAの希釈系列を調製し、それを未処理のHL-60細胞に加え48時間後のMac-1発現を測定した。それをもとにして、PMA濃度とMac-1発現の相関を示す標準曲線を作成し図 2.9の各時点における培養上清(10、20、40、70、120、150分後)中のPMA量と分化誘導活性の値をプロットした。

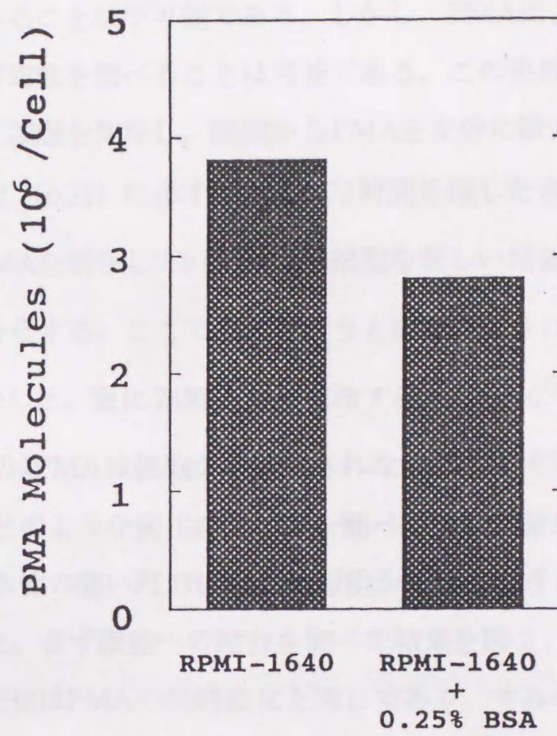


図 2.11 BSAを含むRPMI1640培地を用いた洗浄によるPMAの除去

RPMI1640培地単独、あるいは0.25% BSAを含むRPMI1640培地で、PMA ($5 \times 10^{-8} M$) 30分処理した細胞を洗浄し、細胞に結合しているPMA量を測定した。

るPMAは 2.80×10^6 分子と減少したが、著しい効果は認められなかった。結論的にはPMAを十分に除去するには、新しい培地で長時間細胞を培養し、細胞から血清アルブミンへPMAが十分に移行するのを待って洗浄を行う操作を繰り返す方法しかない。しかし、この方法だとHL-60細胞からPMAを除去する操作の間に細胞が分化してしまうのでトリガーの過程を調べることは不可能である。しかし、PMAによるHL-60細胞の分化の可逆性あるいは非可逆性を調べることは可能である。この実験を行うため、かなり長時間の間隔をおいて細胞を洗浄し、細胞からPMAを十分に除去できる条件を調べた。その結果を図 2.1 2 (p.32) に示す。PMAで2時間処理した直後の細胞は、細胞あたり 5.82×10^6 分子のPMAを結合していた。この細胞を新しい培養液で培養していくと48時間後には十分に分化する。ここで洗浄を行うと細胞あたりに結合しているPMAは 3.31×10^6 分子に減少した。更に24時間後に洗浄すると 1.32×10^6 分子へ減少した。しかし、これ以上の洗浄ではPMAは細胞から除去されなかった。実際に分化した細胞からPMAを除去した時、どのような変化を示すかを調べた実験の結果は次章で述べる。

最後に、PMAよりも疎水性の弱いPDBは容易に細胞から除去できるという報告がある(66)ので検討してみた。まず細胞への結合を調べた結果を図 2.1 3 (p.33) に示す。細胞への結合の経時変化はPMAの経時変化と同じであり、すみやかに細胞へ結合する。この細胞を通常の方法で洗浄した時、細胞に結合していたPDBはたとえ長時間処理していても簡単な洗浄だけで細胞から除去され、細胞あたりに結合しているPDB分子数はPMAの場合の1/20である。このPDB量ではHL-60細胞を分化させることはできない。そこで、PDBを用いてトリガーの実験を改めて行った(3章参照)。

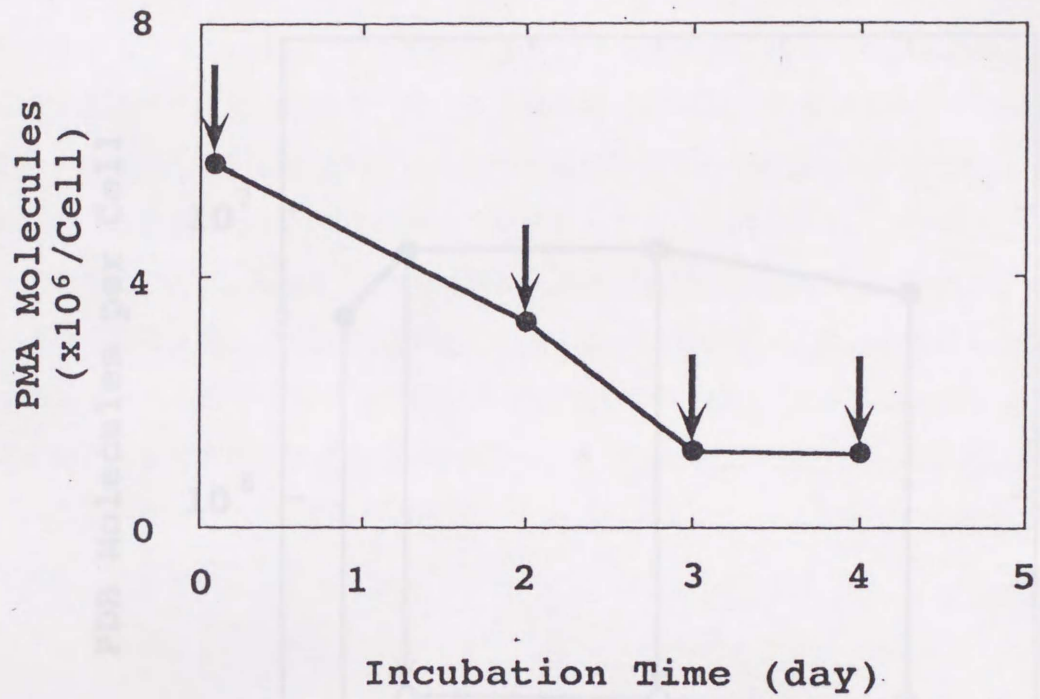


図 2.1 2 結合したPMAのHL-60細胞からの除去

HL-60細胞を $[^3\text{H}]$ -PMA ($5 \times 10^{-8}\text{M}$) で2時間処理し、矢印の時点で繰り返し洗浄した。洗浄後の細胞に結合しているPMA量を測定した。

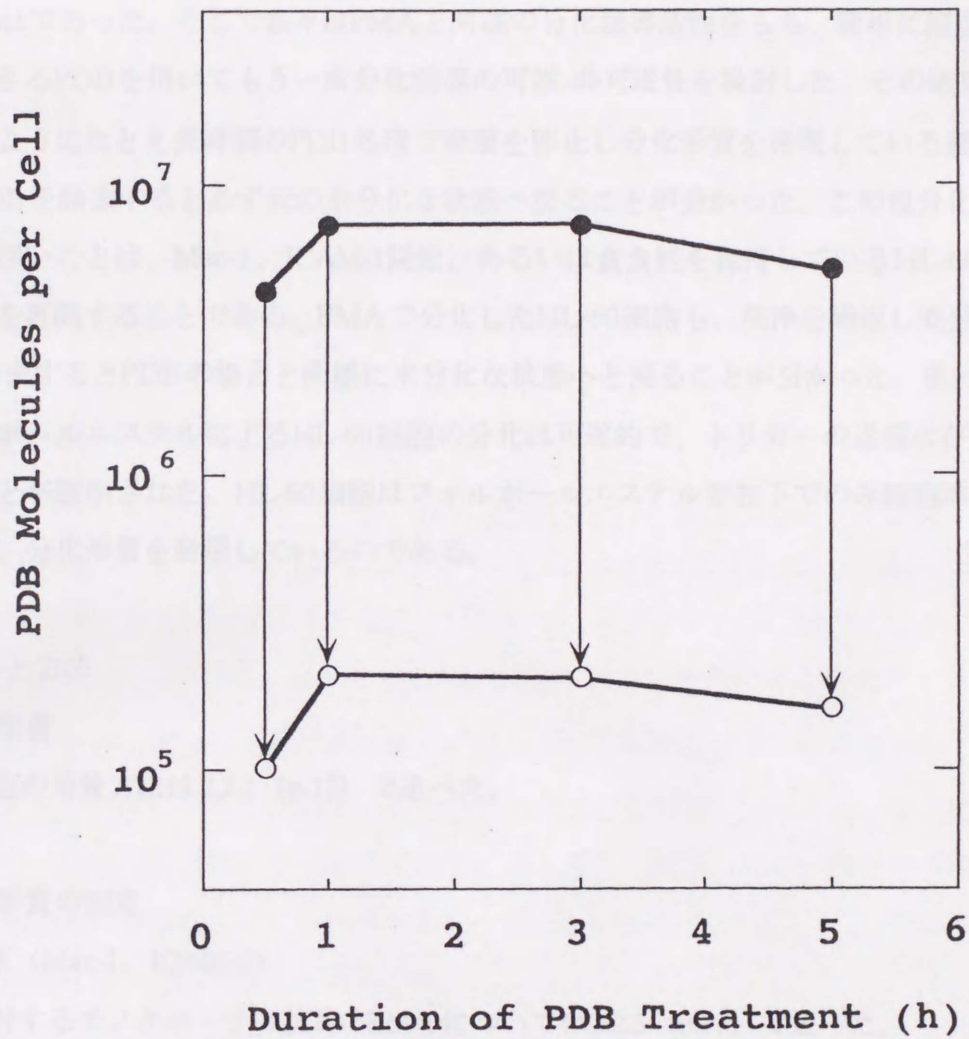


図 2.13 HL-60細胞から簡単に除去できるPDB

HL-60細胞を³H-PDB (10⁻⁷M)で各時間培養した。培養後、細胞に結合しているPDB量 (●) と洗浄後の細胞に結合しているPDB量 (○) とを測定した。

3. HL-60細胞のフォルボールエステルによる分化誘導 I. 分化状態の可逆性

3. 1 はじめに

2.で証明したように、短時間のPMA処理でHL-60細胞がT状態に達するという従来の報告(9, 48)は、簡単な洗浄操作で細胞から除去できず残存していたPMAの作用によるartifactであった。そこで我々はPMAと同様の分化誘導活性をもち、簡単に細胞から除去できるPDBを用いてもう一度分化誘導の可逆-非可逆性を検討した。その結果、以下に示すようにたとえ長時間のPDB処理で増殖を停止し分化形質を発現している細胞でも、PDBを除去すると必ず元の未分化な状態へ戻ることが分かった。この脱分化過程で興味深いことは、Mac-1、ICAM-1陽性、あるいは貪食能を保持しているHL-60細胞も増殖を再開することである。PMAで分化したHL-60細胞も、洗浄を繰返し十分にPMAを除去するとPDBの場合と同様に未分化な状態へと戻ることが分かった。従って、フォルボールエステルによるHL-60細胞の分化は可逆的で、トリガーの過程は存在しないことが証明された。HL-60細胞はフォルボールエステル存在下でのみ細胞増殖を停止し、分化形質を発現しているのである。

3. 2 材料と方法

3.2.1 細胞培養

HL-60細胞の培養方法は2.2.1 (p.12) で述べた。

3.2.2 分化形質の測定

a 表面抗原 (Mac-1、ICAM-1)

Mac-1に対するモノクローナル抗体OKM-1については2.2.3 (p.13) で述べた。ICAM-1はMac-1の β 鎖を共有する β_2 インテグリンLFA-1のリガンドとして同定された免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質である(67)。また、ICAM-1はLFA-1だけでなくMac-1とも結合することができる(64)。ICAM-1は、構造的に発現している白血球以外の細胞でもTNFなどのサイトカインで処理することにより発現誘導され(68, 69)、細胞間接着を介したリンパ球の活性化(70)や好中球・

単球の組織への移行 (71) などで重要な役割を果たしている。

本研究で使用したヒトICAM-1に対するマウスモノクローナル抗体RR1/1は米国・ハーバード大学のT. A. Springer博士より供与されたものである (72)。Mac-1とICAM-1の検出には細胞を蛍光抗体法で処理し、FACScanで解析した。蛍光抗体法は、一次抗体反応までは2.2.3 (p.13) と同じである。本章の実験では二次抗体としてビオチン化ヤギ抗マウスIgG (F(ab')₂、ジャクソン社) を20 μ l加え4°Cで30分反応させた。PBS (-) で2回洗浄後、FITC結合ストレプトアビジン (バイオメダ社) を50 μ l加え4°Cで10分反応させた。洗浄用* PBS (-) 1mlで2回洗浄後、0.5mlの* PBS (-) に懸濁しプラスチックチューブに移した。なお、実験に使用した抗体やFITC結合ストレプトアビジンの至適濃度は予備実験で決定した。FACScanの測定条件の設定は2.2.3 (p.13) で述べた。

b 形態変化 (接着、伸展)

形態変化の観察には位相差顕微鏡 (オリンパス; モデルCK) を用いた。接眼レンズ、対物レンズの倍率は共に10倍である。細胞を培養しているディッシュ (SUMILON; 35mm) をCO₂インキュベーターからとりだし、細胞が均一に散らばるようにディッシュを水平にゆすり、細胞が完全に底に沈んだ後カウントを開始した。顕微鏡を軽くたたいてもディッシュに接着し動かないものを接着細胞としてカウントした。また接着細胞のうち、浮遊細胞と異なり屈折率が小さく暗く見える細胞、あるいは偽足を伸ばしている細胞を伸展細胞としてカウントした。200以上の細胞を観察し、その中の接着細胞、伸展細胞の占める割合を決定した。

c 貪食能

96ウェルプレート (NUNC) で培養していた5x10⁴細胞 (100 μ l) にラテックスビーズ (Dow chemical) を10⁸ beads/mlになるように加え37°Cで16時間培養した。EPチュ

ープに細胞を回収しPBS (-) で3回洗浄した後、50 μ lのPBS (-) に懸濁しスライドガラス上へのせ、細胞が完全に底に沈むのを待ち位相差顕微鏡（オリンパス；モデルIMT-2）下で観察した。接眼レンズの倍率は10倍、対物レンズの倍率は40倍である。400以上の細胞を観察しビーズを貪食している細胞の割合を決定した。ビーズを貪食している細胞としていない細胞は位相差顕微鏡下で明瞭に区別することができた。

3.2.3 [3 H]-TdRの取り込みによる細胞増殖の測定

96ウェルプレート中で培養した 5×10^4 細胞（100 μ l）に0.5 μ Ci/mlになるように[3 H]-TdR（ICN；55Ci/mmol）を加え37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。EPチューブに細胞を回収し、1mlのPBS (-) で3回洗浄後約50 μ lの懸濁液にし、スライドガラス上へのせ風乾した。メタノール：酢酸（3：1、体積比）中で30分間固定し風乾後、乳剤（NR-M2、ユニカ）で処理し通常4 $^{\circ}$ Cで5日間露出し現像した。後染色に使用した1%ギムザ染色液は、ギムザ染色溶液（武藤化学薬品）を1/150 Mリン酸バッファー（武藤化学薬品）に体積比1：99で希釈して調製した。銀粒子がわかるよう薄く後染色（HL-60細胞では通常1分）後、封入し、顕微鏡（オリンパス；IMT-2）下で計測した。400以上の細胞を観察し銀粒子をもつ細胞の割合を決定し細胞増殖の指標とした。

3.2.4 二重染色（[3 H]-TdR取り込みとMac-1）

ディッシュ（35mm；SUMILON）で培養したHL-60細胞に1 μ Ci/mlになるように[3 H]-TdRを加え37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。EPチューブに細胞を回収し等量の4%パラホルムアルデヒド溶液を加え室温で10分間固定した後、遠心により上清を除去し、更に1mlのPBS (-) で2回洗浄した。50 μ lの細胞懸濁液に20 μ lのOKM-1抗体を加え室温で30分反応（10分おきに軽く混ぜる）後、1mlのPBS (-) で2回洗浄し、ビオチン化ウサギ抗マウス抗体（生化学工業）を20 μ l加え一次抗体と同様に反応させた。1mlのPBS (-) で2回洗浄後、20 μ lの β -ガラクトシダーゼ結合ストレプトアビジン（ベセダス・リサーチ社）も同様に反応させ、1mlのPBS (-) で2回洗浄後、50 μ lのPBS (-) に懸濁した。

この細胞懸濁液を0.1%ポリ-D-リジン（ベーリンガー・マンハイム山之内）溶液でコーティングしたスライドガラス上へのせ、細胞がスライドガラスに接着した後、上清をキムワイプで除き、細胞が乾かないうちに基質溶液（A soln. : 5-プロモ-4クロロ-3-インドール-β-D-ガラクトシダーゼ（X-gal、ナカライ）を4%になるようにジメチルホルムアルデヒドに溶かしたもの、B soln. : 3.1mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 、3.1mM $K_4[Fe(CN)_6]$ 、1mM $MgCl_2$ になるようにPBS（-）に溶かしたもの；A soln. とB soln. とを1 : 50の体積比で混合する）を加え、37°Cで2時間発色させた。PBS（-）、続いてD₂Wで洗浄後、乾燥し3.2.3（p.36）と同様にオートラジオグラフィを行った後、90%グリセロール（PBS（-）で希釈）で封入し写真撮影を行った。

3. 3 結果と考察

3.3.1 フォルボールエステルによるHL-60細胞の分化の可逆性

a フォルボールエステル除去に伴う分化形質の消失

まずPDB連続処理によるMac-1発現の経時変化を調べた（図3.1, p.38）。HL-60細胞はPDB処理するとPMA処理の場合と同じく12時間後よりMac-1を発現し始める。その後、時間と共に陽性細胞は増え48時間後にはMac-1陽性細胞の割合は60%近くに達する。この60%のMac-1陽性細胞が48時間までのどこかの時点でT状態に達しているものとすれば、その時点でPDBを除去しても48時間後には連続処理と同じ60%の細胞が陽性となるはずである。そこでPDB処理後12、24、36、48時間でPDBを除去しPDBを含まない新しい培養液を加え、PDB処理開始から48時間後にHL-60細胞のMac-1発現率を調べた。その結果を図3.2（p.39）に示す。明らかにMac-1陽性細胞の割合はPDBを除去した時点での値と一致していることが分かる。つまり、HL-60細胞はPDB存在下ではMac-1を発現するが、PDBを除去すると新たな発現を示さないので、HL-60細胞はPDB処理48時間以内にT状態に入らないと結論される。より長時間のPDB処理でトリガーが起る可能性があるが、3日以上処理では死細胞が生じる。従って、PDBによるHL-60細胞のトリガーの可能性を3日以上処理について議論することは無意味である。

HL-60細胞をPDBで3日間処理した後PDBを除去すると、まず伸展細胞が、次いで

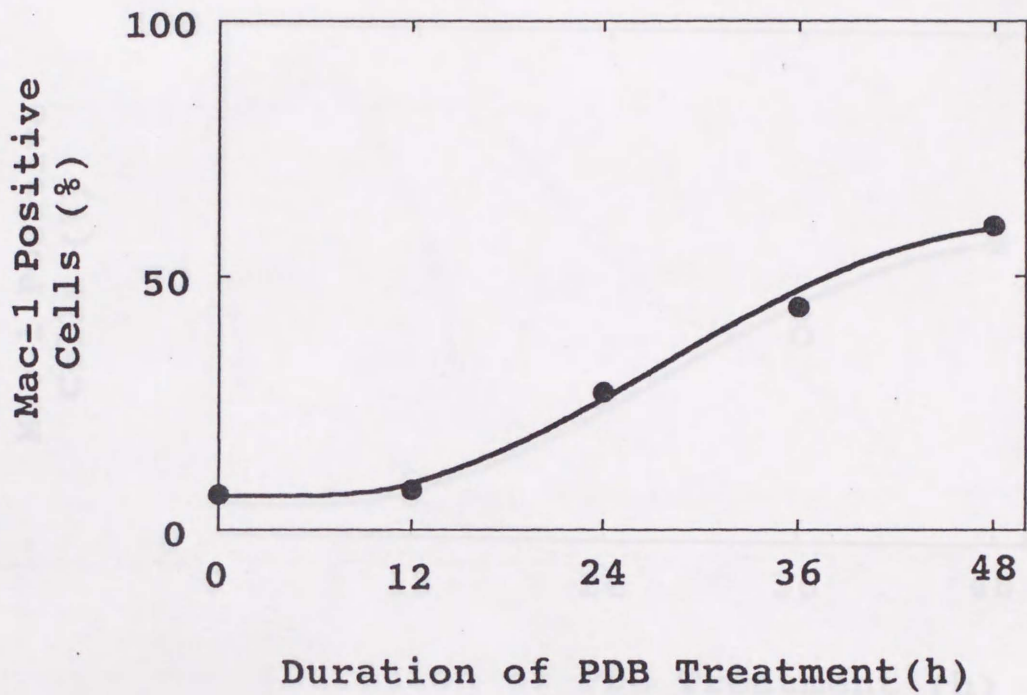


図 3.1 PDB処理に伴うMac-1発現の経時変化

HL-60細胞 (5×10^5 cells/ml) をPDB (10^{-7} M)で処理し、各時間後のMac-1発現を調べた。

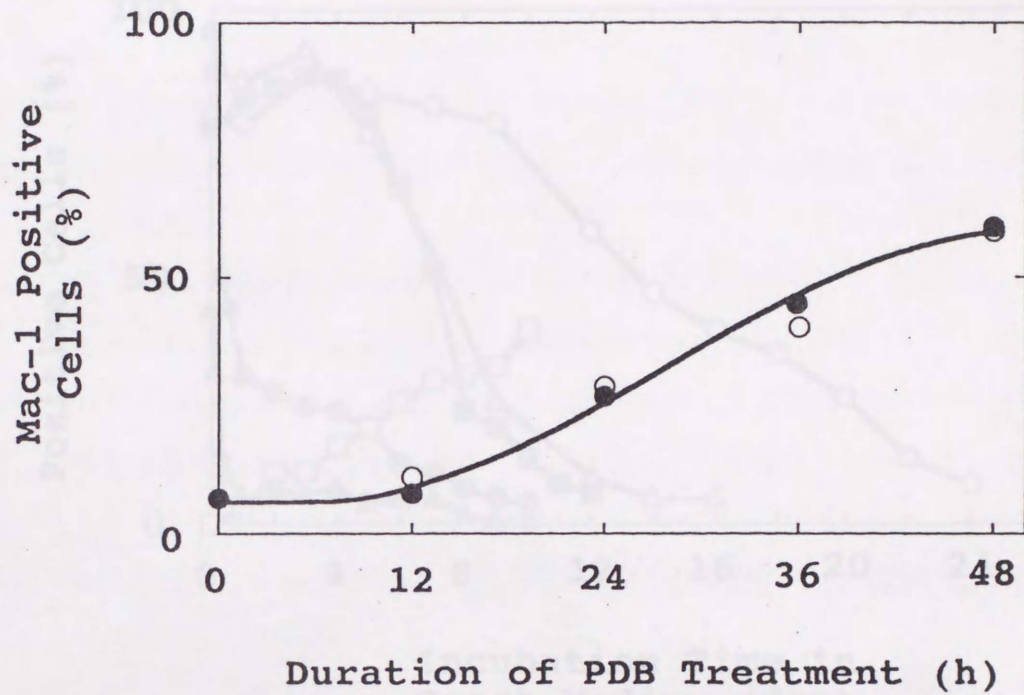


図 3.2 PDB除去に伴うMac-1発現の停止

HL-60細胞をPDB (10^{-7} M)で各時間処理し、洗浄後新しい培地に移した。PDB処理から48時間後のMac-1発現 (○) を調べた。(●) はPDB連続処理の各時点におけるMac-1発現率を示す。

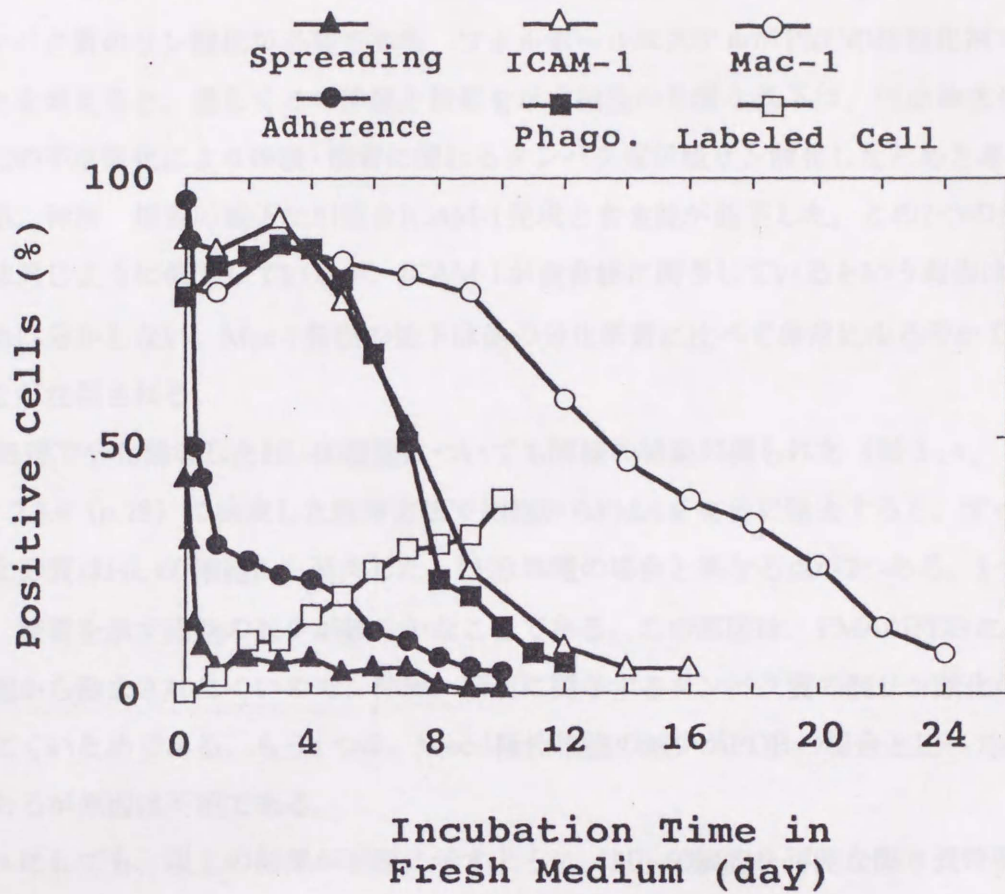


図 3.3 PDB除去に伴う分化形質の消失と細胞増殖の再開

PDB (10^{-7} M)で3日間処理したHL-60細胞を洗浄し(0日)経時的に分化形質(▲:伸展、●:接着、△:ICAM-1、■:貪食能、○:Mac-1)と $[^3\text{H}]$ -TdRラベルされた細胞(□)を測定した。

接着細胞が急激に減少し、浮遊する細胞が増える（図 3.3, p.40）。5.3.1 (p.82) で述べるようにフォルボールエステル処理による骨髄性白血病細胞のディッシュへの接着にはタンパク質のリン酸化が必要である。フォルボールエステルがPKCの活性化剤であることを考えると、恐らくこの伸展と接着を示す細胞の急激な低下は、PDB除去に伴うPKCの不活性化により伸展・接着に関わるタンパク質が脱リン酸化したためと考えられる。伸展、接着の低下に引続きICAM-1発現と貪食能が低下した。この2つの分化形質は同じように低下しているが、ICAM-1が貪食能に関与しているという報告はなく理由は分からない。Mac-1発現の低下は他の分化形質に比べて非常にゆるやかであることが注目される。

PMA処理で分化誘導したHL-60細胞についても同様の結果が得られた（図 3.4, p.42）。2.3.4 (p.28) で決定した洗浄方法で細胞からPMAを十分に除去すると、すべての分化形質はHL-60細胞から消失した。PDB処理の場合と異なる点が2つある。1つは伸展、接着を示す細胞の減少が緩やかなことである。この原因は、PMAがPDBに比べて細胞から除去されにくいので、伸展、接着に関与するタンパク質の脱リン酸化がおこりにくいからである。もう1つは、Mac-1陽性細胞の減少がPDBの場合と比べて早い点であるが原因は不明である。

いずれにしても、以上の結果が明瞭に示すように、HL-60細胞を可能な限り長時間フォルボールエステルで処理しても非可逆的な分化は起らず、従って、トリガーも生じない。分化は可逆的で、フォルボールエステルを除去すると必ず脱分化が生じる訳である。

b Mac-1、ICAM-1陽性細胞および貪食能をもつ細胞のS期への移行

細胞周期のG1期停止は、HL-60細胞のフォルボールエステルによる分化誘導において、分化形質の発現と並ぶ重要な側面である。そこで、分化の可逆性をG1期停止について調べた。まず、通常行われているTCA不溶画分に取り込まれる ^3H -TdRを測定する方法でS期の細胞の割合を決定することを試みた。しかし、図 3.5 (p.43) に示すように、HL-60細胞をPDBで処理後 ^3H -TdRの取り込みには一過的な上昇がみられた。この原因は、フォルボールエステル処理により一過的に細胞増殖が刺激されDNA合成

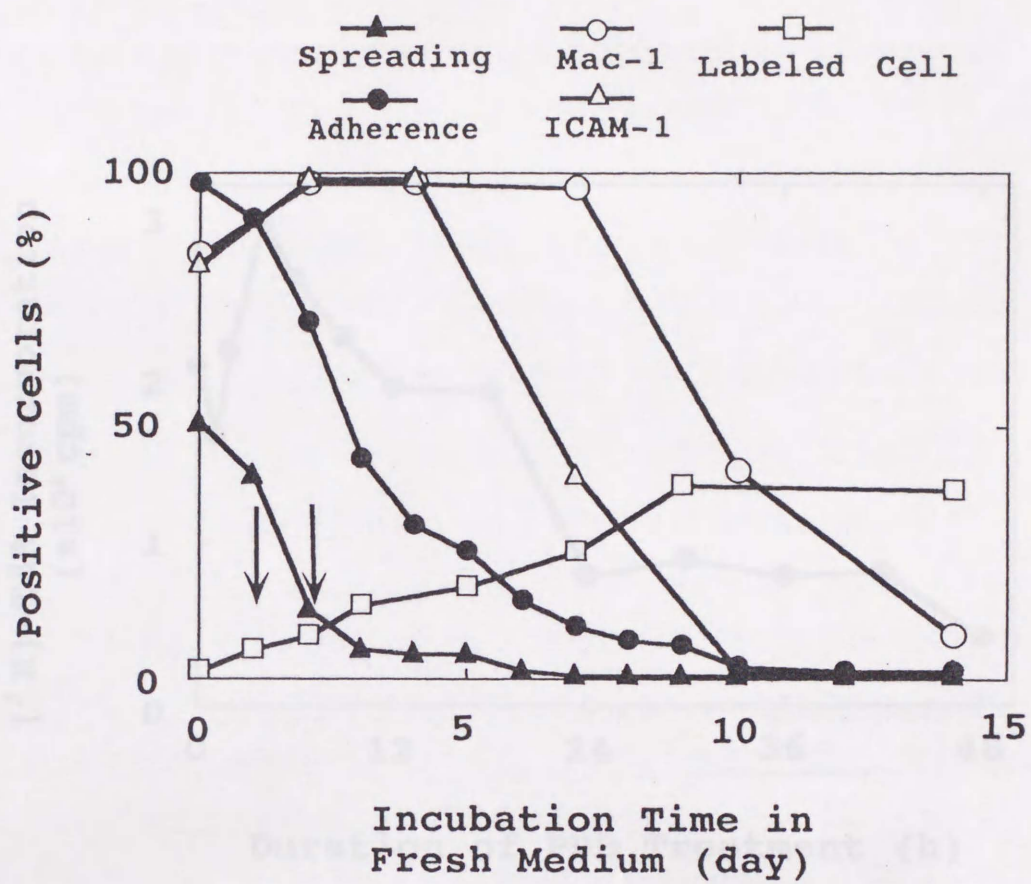


図 3.4 PMA除去に伴う分化形質の消失と細胞増殖の再開

PMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$)で2時間処理した細胞を48時間培養し洗浄した(0日)。更に2回洗浄し(矢印)、経時的に分化形質(▲: 伸展、●: 接着、△: ICAM-1、○: Mac-1)と ^3H -TdRラベルされた細胞(□)を測定した。

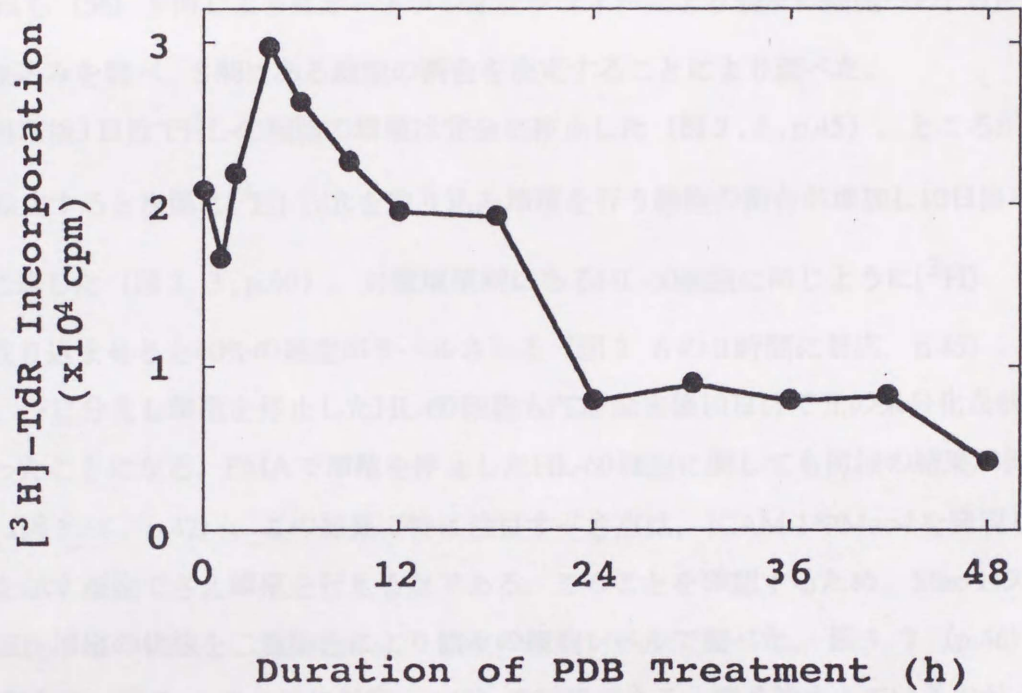


図 3.5 PDB処理後の一過的な[³H]-TdR取り込みの上昇

HL-60細胞 (5×10^5 cells/ml) をPDB (10^{-7} M)で処理し、各時点において[³H]-TdR ($5 \mu\text{Ci/ml}$) を1時間取り込ませた。その後、0.2% SDSで細胞を壊しTCA不溶画分に取り込まれた[³H]-TdR量を測定した。

が促進したのではなく、フォルボールエステル処理により一過的にチミジンキナーゼの活性が高まり、TCA不溶画分に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -TdR量が増加したからだと考えられる。このようなチミジンキナーゼの活性化はHL-60細胞をTNFで分化誘導させた場合にもおこることが報告されている(73)。従って、HL-60細胞の増殖状態はG.Roveraら(56)と同じようにオートラジオグラフィにより個々の細胞への $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みを調べ、S期にある細胞の割合を決定することにより調べた。

PDB処理後3日目でHL-60細胞の増殖は完全に停止した(図3.6, p.45)。ところが、PDBを除去すると次第に $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込み増殖を行う細胞の割合が増加し10日目には40%に達した(図3.3, p.40)。対数増殖期にあるHL-60細胞と同じように $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込ませると40%の細胞がラベルされる(図3.6の0時間に対応、p.45)。従って、一旦分化し増殖を停止したHL-60細胞もPDB除去後10日目で元の未分化な状態に戻ったことになる。PMAで増殖を停止したHL-60細胞についても同様の結果が得られた(図3.4, p.42)。この結果で特に注目すべき点は、ICAM-1やMac-1を発現し貪食能を示す細胞でさえ増殖を行える点である。このことを確認するため、Mac-1の発現と細胞増殖の状態を二重染色により個々の細胞レベルで調べた。図3.7(p.46)はPMA存在下(図3.4の0日に対応、p.42)の結果である。青く染まっているのがMac-1陽性細胞であり、ほとんど全ての細胞がMac-1を発現し分化している。しかし、 $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込んだ細胞は見あたらず細胞増殖は停止したままである。図3.8

(p.47)は洗浄後3日目(図3.4の3日に対応、p.42)の結果である。矢印で示すようにMac-1陽性細胞が $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込んで増殖を再開しているのが明瞭に分かる。図3.9(p.48)は洗浄後7日目(図3.4の7日に対応、p.42)の結果である。Mac-1を消失している細胞が出現し始め、 $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込んでいる細胞は更に増加している。このまま培養を続けていくとMac-1陽性細胞は更に減少し(図3.10, p.49)最終的には元の未分化な状態と区別がつかなくなった(図3.11, p.50)。

この実験で明らかにされたように、フォルボールエステル除去後、Mac-1、ICAM-1や貪食能などの分化形質を未だ失っていない細胞がS期に移行する結果は一般に驚き

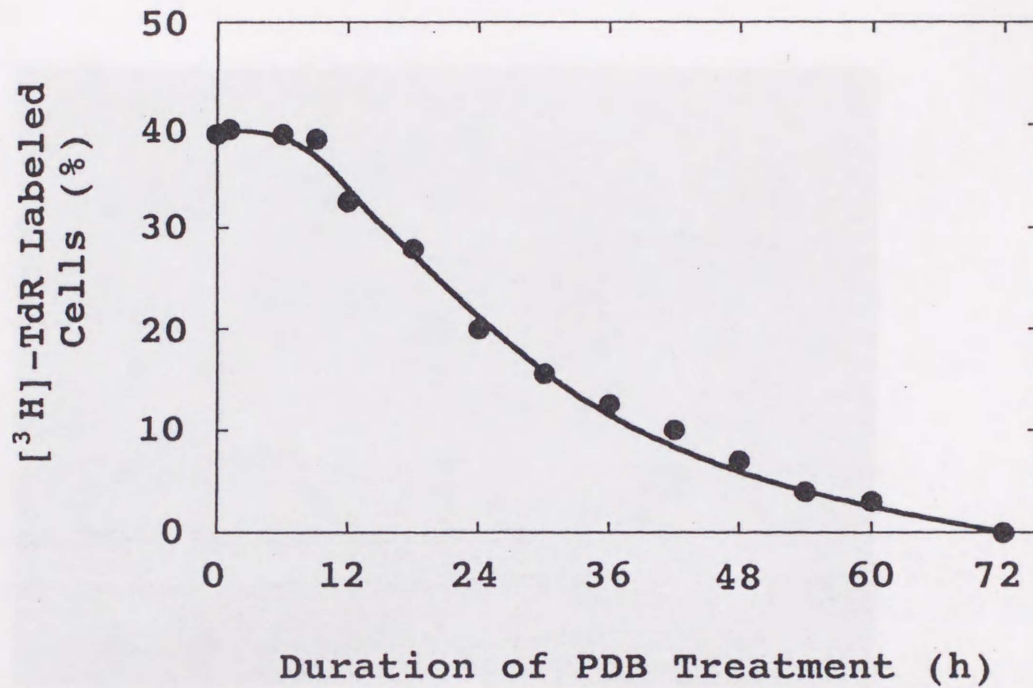


図 3.6 PDB処理に伴うHL-60細胞の増殖停止

HL-60細胞 (5×10^5 cells/ml) をPDB (10^{-7} M) で処理し、各時点において $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ ($0.5 \mu\text{Ci/ml}$) を1時間取り込ませた。オートラジオグラフィ後、銀粒子をもつ細胞の割合を測定した。

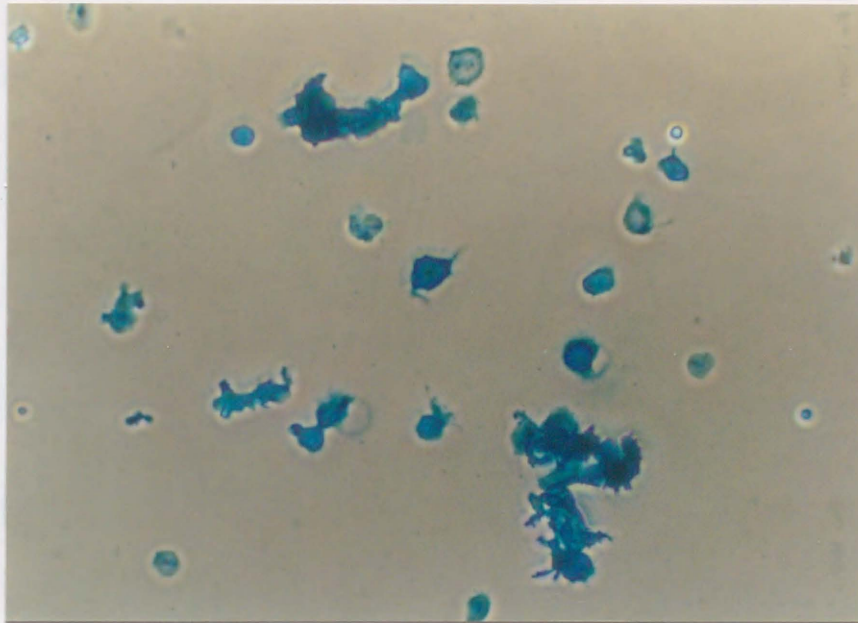


図 3.7 Mac-1発現と $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みの二重染色 (1)

PMA存在下 (図 3.4 のday 0) の細胞を用いて酵素抗体法と $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みによるオートラジオグラフィーを行った。ほとんどの細胞がMac-1陽性であった。しかし、 $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込んでいる細胞はなかった。

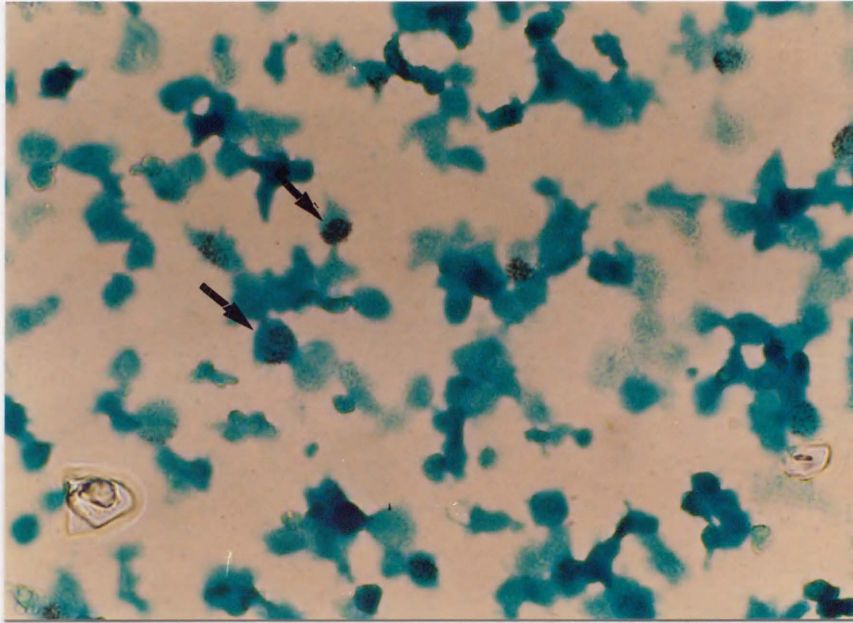


図 3.8 Mac-1発現と $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みの二重染色 (2)

PMA洗浄後3日目 (図 3.4 のday 3) の細胞を用いて酵素抗体法と $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みによるオートラジオグラフィを行った。Mac-1陽性細胞が同時に $[^3\text{H}]$ -TdRラベルされ (矢印)、増殖を再開している様子が明瞭に示された。

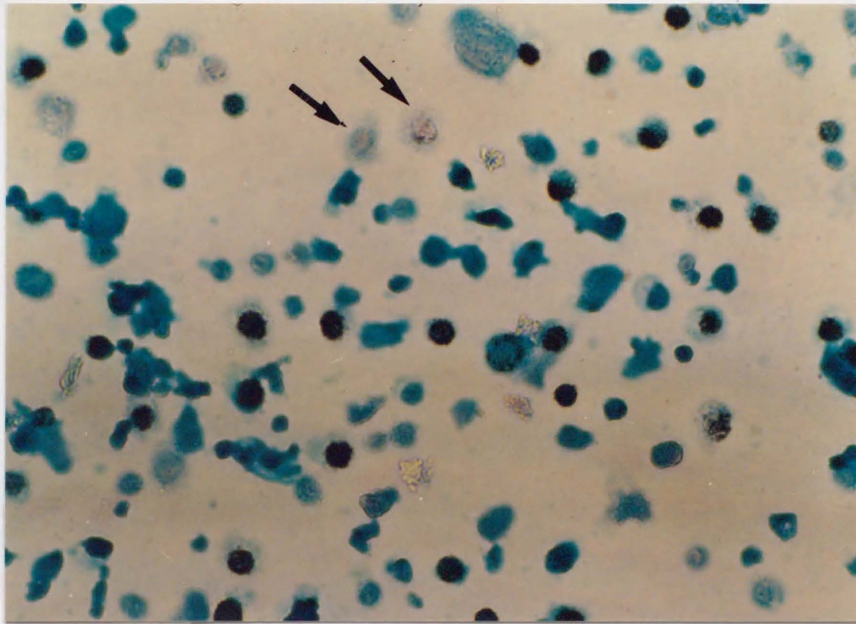


図 3.9 Mac-1発現と $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みの二重染色 (3)

PMA洗浄後7日目 (図 3.4 のday 7) の細胞を用いて酵素抗体法と $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みによるオートラジオグラフィを行った。Mac-1を消失した細胞 (矢印) が現れ始めた。

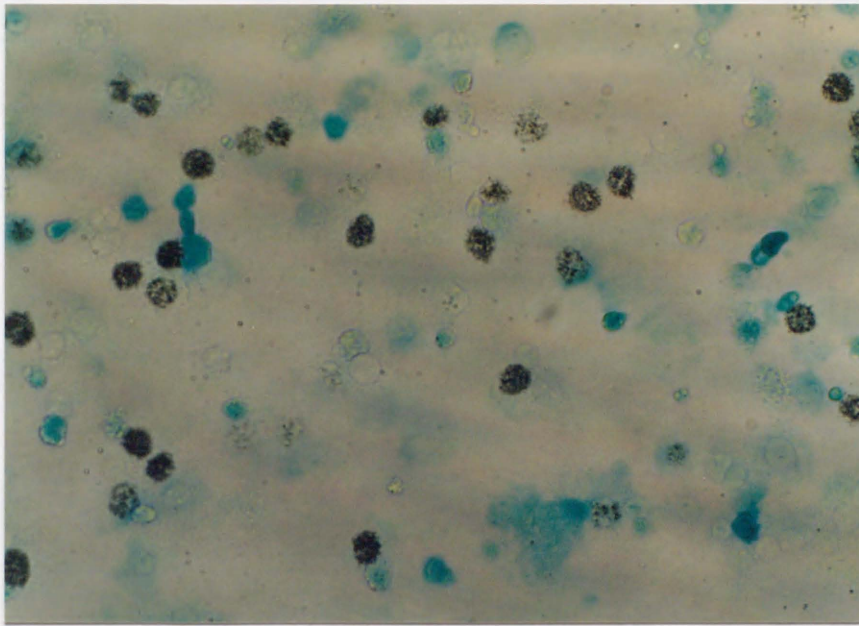


図 3.10 Mac-1発現と $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 取り込みの二重染色 (4)

PMA洗浄後13日目(図3.4のday 13)の細胞を用いて酵素抗体法と $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 取り込みによるオートラジオグラフィーを行った。Mac-1を消失している細胞は更に増加した。 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を取り込んでいる細胞の割合は対数増殖期の細胞と同じ値にまで回復していた。

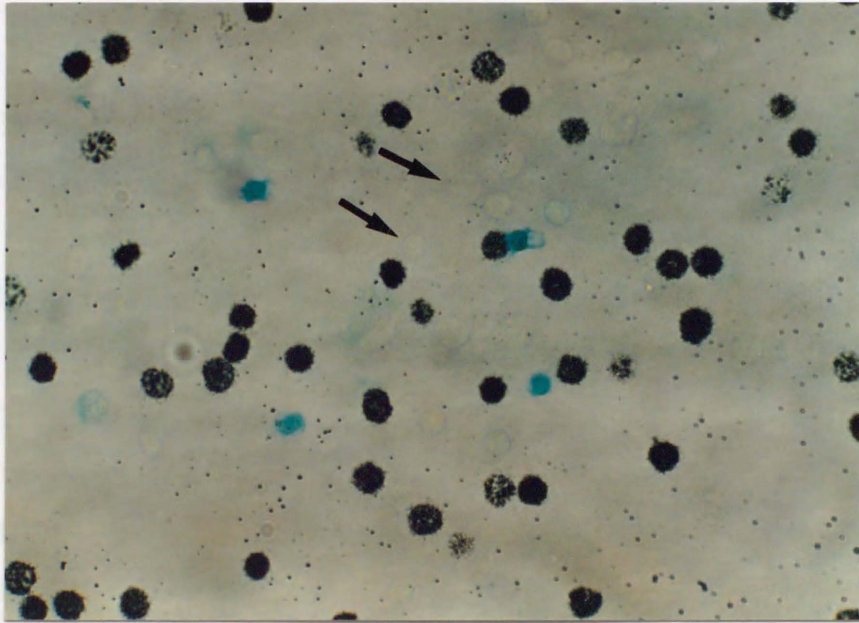


図 3.11 Mac-1発現と $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 取り込みの二重染色 (5)

対数増殖期にあるHL-60細胞を用いて酵素抗体法と $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 取り込みによるオートラジオグラフィーを行った。 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を取り込んでいない細胞(矢印)は見えにくい、全体の40%が $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を取り込んでいる。青く染まっている細胞は自然分化し、Mac-1を発現している細胞である。

をもって受けとられた。何故なら、フォルボールエステル処理による骨髄性白血病細胞の分化においては、まず分化形質が消失し、それから増殖が再開していくものと考えていたからである。このことは、我々が分化形質発現と細胞増殖停止との因果関係ないしは相互作用を詳細に考えるきっかけを与えたのである。

フォルボールエステル処理で一旦完全に増殖を停止した細胞がフォルボールエステル除去により細胞増殖を再開した今回の結果は、分化形質発現だけでなく細胞増殖の停止もまた可逆的で、フォルボールエステル存在下でのみおこる現象であり、増殖停止を支配する分子がフォルボールエステル存在下でのみ活性化し作用することが明らかになった。

c. 分化誘導の可逆性に関する付加的考察

まず、いくつかの他の骨髄性白血病細胞株について、フォルボールエステル処理による分化の可逆-非可逆性を、細胞増殖を指標にして検討した。急性骨髄芽球性白血病細胞株KG-1 (74) はPDB処理で増殖を停止しなかった (図 3.1 2, p.52)。一方、PDB処理で増殖を停止した慢性骨髄性白血病細胞株K562 (75) (図 3.1 3, p.53)、組織球性リンパ腫細胞株U937 (76) (図 3.1 4, p.54)、急性単球性白血病細胞株THP-1 (18) (図 3.1 5, p.55) はPDBを除去すると増殖を再開した。従って、フォルボールエステル処理による分化誘導においてトリガーは存在せず、フォルボールエステル存在下でのみ分化形質を発現し細胞増殖を停止をするという現象はHL-60細胞に限られたことではなく、フォルボールエステル処理で分化形質を発現し、細胞増殖を停止するすべての骨髄性白血病細胞で一般的に言えるようである。

最近、分化誘導が可能な細胞株を用いて分化形質の可逆性を調べた研究が幾つか報告されている。R. Hassらは我々と同じようにPMAを用いU937細胞をマクロファージ様細胞へ分化誘導する系で (77)、M. Oshimaらは分化誘導剤としてNGFを用い副腎髄質クロム親和性細胞株PC12を交感神経節様細胞へ分化誘導する系で (78)、M. Kosakaらはブチル酸ナトリウムを分化誘導剤として用いマウステラトカルシノーマ細胞株F9を遠位内胚葉性細胞へ分化誘導する系 (79) で、いずれも分化形質の発現が可逆的であり分化誘導剤を除去すると分化形質が消失することを報告している。

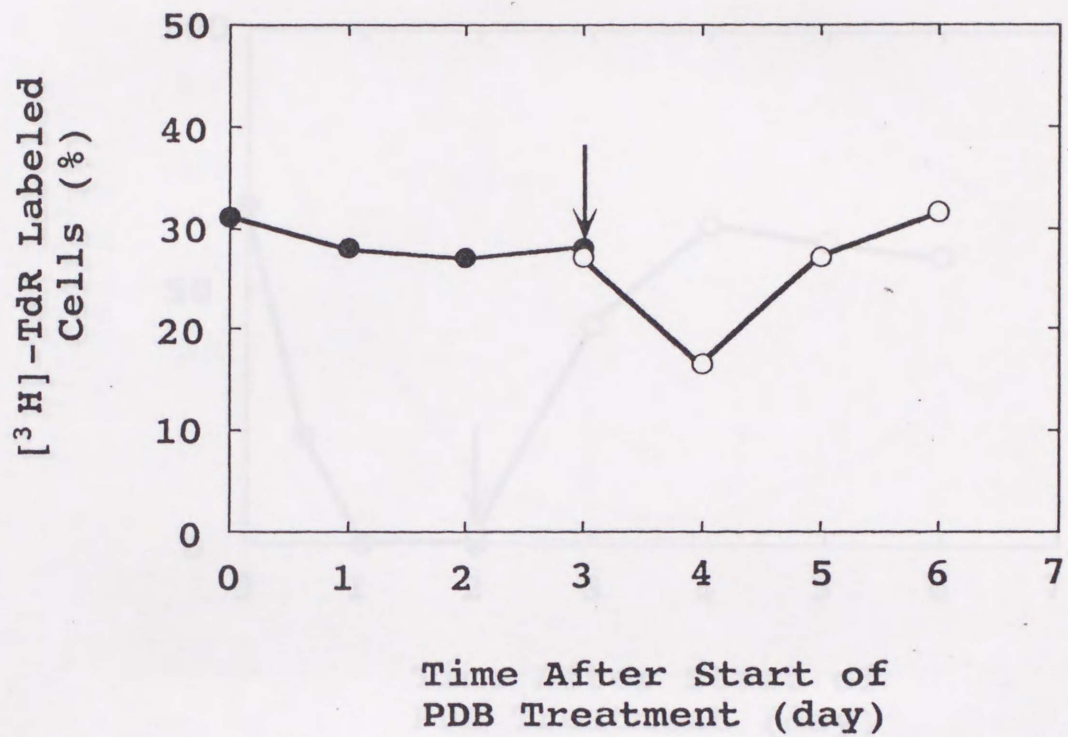


図 3.1 2 PDB処理と除去に伴う細胞増殖の変化 (KG-1細胞)

細胞をPDB ($10^{-7}M$) で処理し、 $[^3H]$ -TdRを取り込んだ細胞 (●) とPDB除去 (矢印) 後の、 $[^3H]$ -TdRを取り込んだ細胞 (○) の割合を測定した。

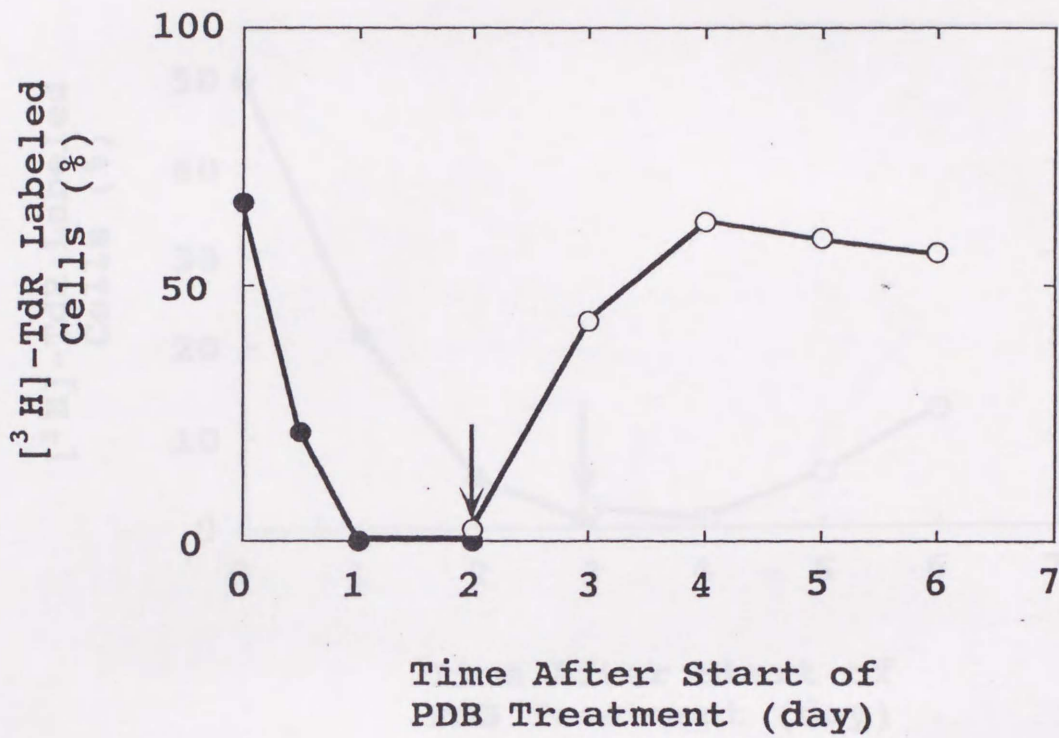


図 3.13 PDB処理と除去に伴う細胞増殖の変化 (K562細胞)

細胞をPDB (10^{-7} M) で処理し、 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を取り込んだ細胞 (●) とPDB除去 (矢印) 後の、 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を取り込んだ細胞 (○) の割合を測定した。

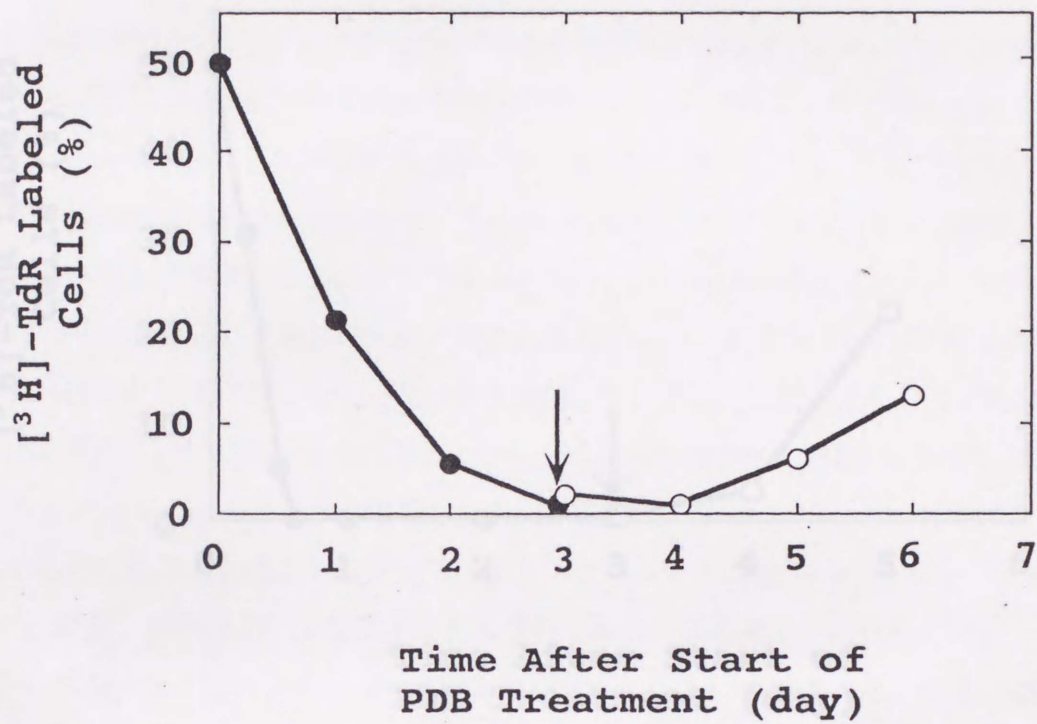


図 3.14 PDB処理と除去に伴う細胞増殖の変化 (U937細胞)

細胞をPDB ($10^{-7}M$) で処理し、 $[^3H]$ -TdRを取り込んだ細胞 (●) とPDB除去 (矢印) 後の、 $[^3H]$ -TdRを取り込んだ細胞 (○) の割合を測定した。

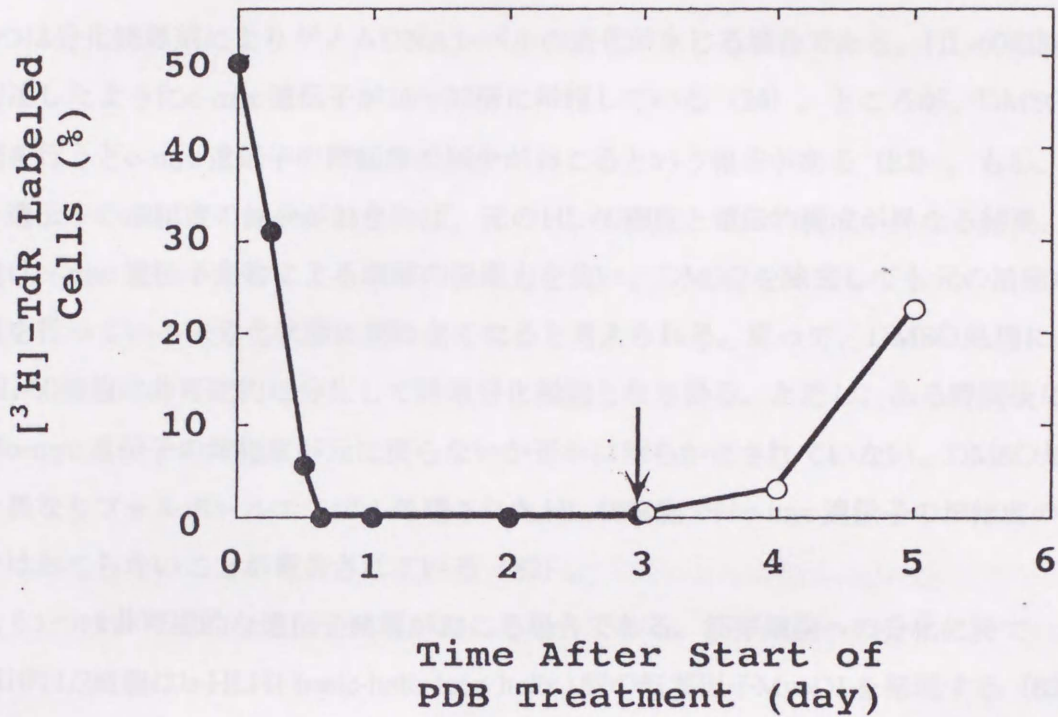


図 3.15 PDB処理と除去に伴う細胞増殖の変化 (THP-1細胞)

細胞をPDB (10^{-7} M) で処理し、 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を取り込んだ細胞 (●) とPDB除去 (矢印) 後の、 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を取り込んだ細胞 (○) の割合を測定した。

一方、T状態を経由し終末分化した細胞へと非可逆的に誘導が起ったとする報告もある。たとえば、HL-60細胞がDMSO処理により顆粒球様細胞へ分化する場合(80)や、マウス線維芽細胞C3H10T1/2が5-アザシチジンにより筋細胞へ分化する場合(81)である。このようにT状態へ達することのできる場合、非可逆性の機構として次の2つが考えられる。

1つは分化誘導剤によりゲノムDNAレベルの変化が生じる場合である。HL-60細胞は前述したように*c-myc*遺伝子が16~32倍に増幅している(24)。ところが、DMSO処理を行うと*c-myc*遺伝子の増幅度の減少がおこるという報告がある(82)。もし、*c-myc*遺伝子の増幅度の減少がおきれば、元のHL-60細胞と遺伝的構成が異なる結果、細胞は*c-myc*遺伝子産物による増殖の促進力を失い、DMSOを除去しても元の活発な増殖を行っている未分化状態に戻れなくなると考えられる。従って、DMSO処理によりHL-60細胞は非可逆的に分化して終末分化細胞となり得る。ただし、ある時間後に再び*c-myc*遺伝子の増幅度が元に戻らないか否かは明らかにされていない。DMSO処理と異なりフォルボールエステル処理されたHL-60細胞では*c-myc*遺伝子の増幅度の減少はおこらないことが報告されている(82)。

もう1つは非可逆的な遺伝子発現がおこる場合である。筋芽細胞への分化に於てC3H10T1/2細胞はb-HLH(basic-helix loop helix)型の転写因子MyoD1を発現する(83)。MyoD1は同じb-HLH型の転写因子であるE2AとHLHを介したヘテロダイマーを形成し、MCK(骨格筋型クレアチンキナーゼ)やMLC(ミオシンL1鎖)、AchR(アセチルコリンレセプター)などの筋特異的な遺伝子の転写調節部位に結合して発現を増強する(84)。興味深いことにMyoD1は筋特異的な遺伝子だけではなく自分自身の発現もオートクライン的に増強する(50)。そのため分化誘導剤処理で一旦MyoD1が発現、活性化すると、たとえ分化誘導剤を除去しても常にMyoD1が供給され続けるため、C3H10T1/2細胞は分化状態を維持することが可能となりトリガーが存在することになる。

骨髄性白血病細胞のフォルボールエステル処理による分化と異なり、末梢血中の顆粒球は非可逆的に終末分化した細胞であると考えられる。つまり終末分化へのT状態を経由した細胞である。顆粒球は骨髄中で終末分化へのトリガーがおき増殖を停止し、

分化形質を発現して末梢血中に放出される。従って、顆粒球の幹細胞の増殖を刺激する増殖因子で顆粒球を処理しても分化細胞の機能の活性化はおこるが、細胞増殖を再開することはない(54)。一方、顆粒球と同様に細胞増殖を停止している末梢のBリンパ球は、ヘルパーT細胞の作用により抗原特異的クローンが選択的に脱分化(幼若化)し、細胞増殖を再開する。この時、顆粒球では1.で述べたRb遺伝子産物は脱リン酸化した活性型で存在しておりG1/G0期に細胞を留めている(85)。また、細胞周期の進行に必要なcdc2遺伝子(86)の発現も認められない(87)。しかし、末梢リンパ球ではRb遺伝子産物が脱リン酸化型からリン酸化型になり不活性化してS期への移行がおこる。cdc2遺伝子の発現もおこる。恐らく、Rb遺伝子産物やcdc2遺伝子産物などの細胞増殖を制御する分子が増殖を抑制する方向に働く機構を、顆粒球は終末分化の過程で非可逆的に獲得しているのであろう。これがトリガーの過程の一例である。それ故、たとえ増殖因子で刺激しても獲得した増殖抑制機構の方が増殖促進機構よりも優位であるため細胞増殖はおこらない。顆粒球と末梢リンパ球における、非可逆的と可逆的という2つの異なる増殖停止機構の生理的意義として次のことが考えられる。顆粒球は敏速でかつ非特異的な生体防御を受け持っており呼吸器官や消化器官などの組織へ流出し、侵入する微生物と常に戦っている。その過程で細胞自身は著しい傷害を受け言わば使い捨てで常に新しい細胞を供給する必要がある。一方、末梢リンパ球では個々の細胞が抗原特異的な生体防御を受けもっており必要な時に必要な細胞が必要なだけ再増殖しなければならない。そのために可逆的で長期間G1/G0期で停止する機構が必要となるのである。

本研究で明らかになったように骨髓系白血病細胞はフォルボールエステル処理で分化しても、それは可逆的な分化である。フォルボールエステル存在下では見かけ上は細胞増殖を停止し分化形質を発現しているが、本質的には脱癌化してはいないのである。

4. HL-60細胞のフォルボールエステルによる分化誘導 II. 細胞増殖停止と分化形質発現の因果関係

4. 1 はじめに

HL-60細胞をフォルボールエステルで処理すると、細胞は増殖停止と分化形質の発現を行う。しかし、増殖停止と分化形質発現の因果関係、つまり増殖停止が分化形質発現を誘導するのか、または逆に分化形質の発現が増殖停止を誘導するのか、あるいは両者の間には何の関係も無く独立に起るのか、という基本的に重要な疑問に対する解答は全く不明のままである。本章では、この因果関係を明らかにするため、細胞増殖の停止と分化形質発現の時間的な前後関係を調べた。

まず、本研究で採用した実験法の原理を要約しておく。HL-60細胞をPMAで処理すると、G1後期のある点（R点と呼ぶ）以降の細胞周期にある細胞は次のG1期で停止し、再びS期に入ることはない（56）。この現象をG1停止と呼ぶ。一方、HL-60細胞をアフィジコリンで処理すると、細胞周期をG1/S境界に同調することができることを本研究で示した。アフィジコリンは簡単な洗浄操作で細胞から除去することができるので、細胞を同調してS期に入らせることが可能である。従って、まずHL-60細胞をアフィジコリン処理でG1/S境界に同調し、次いでアフィジコリンを除去すると同時にフォルボールエステルを加え、分化形質が発現する細胞周期を調べればよいのである。また、フォルボールエステルを加える時期を遅らせてG2/M期から処理を開始するとか種々の細胞周期でPDBによるパルス処理を行えば、フォルボールエステルの作用の細胞周期依存性を明らかにすることが可能である。

アフィジコリンで細胞周期を同調したHL-60細胞をS期から直ちにフォルボールエステルで処理すると、全ての分化形質はS期やG2/M期といったG1期に入る前の細胞周期で既に発現した。つまり、分化形質の発現にはG1停止が必要でないことがわかった。また、アフィジコリンで細胞周期を同調したHL-60細胞をS期またはG1期から別個にPDB処理を開始したところ、全ての分化形質の発現の経時変化は両者に全く差が無いことがわかった。つまり、分化形質の発現は細胞周期に全く依存しないことが明らかになった。さらに、フォルボールエステルによる分化形質の発現誘導に対する転写阻

害剤の効果を調べることにより、個々の分化形質の特徴の一端を明らかにした。

4. 2 材料と方法

4.2.1 アフィジコリン処理による細胞周期の同調

アフィジコリン (シグマ) は0.5mg/mlになるようエタノールで溶解し -20°Cで遮光保存した。

アフィジコリンによるHL-60細胞の細胞周期の同調は次のように行った。

まず、増殖期にある細胞を 5×10^5 cells/mlに調製し、0.5 μ g/mlになるようアフィジコリンを加え37°Cで30時間培養した。その後、遠心チューブに細胞を回収し遠心 (1200rpm、7分; TS-7ローター、TOMY) により上清を除去した。更に10mlのRPMI1640培地で2回細胞を洗浄し、新しい培養液で20時間培養した。次に2回目のアフィジコリン処理を0.5 μ g/mlで28時間行った。G1/S境界からの細胞の同調培養は、1回目と同様の操作でアフィジコリンを除去し、 5×10^5 cells/mlになるよう新しい培地を加えた。細胞周期の同調の程度は、S期にある細胞の割合を経時的に $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ でラベルしオートラジオグラフィを行うことにより調べた。

4.2.2 分化形質発現の測定

細胞周期を同調させたHL-60細胞をS期、あるいはG1期よりPDB処理し、ディッシュへの接着、伸展やMac-1、ICAM-1発現の経時変化を調べた。測定方法は3.2.2 (p.34)で述べた。Mac-1の細胞内プールの測定法は以下のようにして行った。細胞懸濁液に等量の固定液 (4%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸化ナトリウム水溶液) を加え、4°Cで15分間固定し遠心 (1200rpm、5分; TS-7ローター、TOMY) により上清を除去し、更に1mlのPBS (-) で2回洗浄した。使用直前に調製した0.1%NaBH₄を含む1mlのPBS (-) に細胞を懸濁し、20°Cで10分放置し、遠心して上清を除去した。細胞を0.1% TritonX-100を含む1mlのPBS (-) に懸濁し4°Cで30分処理した後、上清を除去し、PBS (-) で2回洗浄し、2.2.3 (p.13) と同様に蛍光抗

体法をおこないFACScanで解析した。

4.2.3 転写阻害剤アクチノマイシンD処理

アクチノマイシンD (ベーリンガー・マンハイム山之内) は0.5mg/mlになるようエタノールで調製し -20°Cで遮光保存した。本研究では、フォルボールエステル処理した細胞に5 μ g/mlになるようアクチノマイシンDを加え、分化形質発現に及ぼす効果を調べた。

4.2.4 二重染色法 (ICAM-1とPI)

まず培養したHL-60細胞をEPチューブに回収し遠心 (1200rpm、5分) して上清を除去後、1mlの50%メタノール (メタノール : PBS (-) =1 : 1、体積比) を加え室温で10分間固定した。固定後、遠心 (1700rpm、5分 ; メタノール固定だと操作の過程で細胞を失いやすいのでより強く遠心する。以下は同じ条件で遠心) し、上清を除去後 *PBS (-) (0.25 μ g/mlデキストランサルフェイト、0.2% NNaN₃、0.1%BSAを含む。氷冷して使用) で2回洗浄後、3.2.2 (p.34) と同様に蛍光抗体法を行った。最後に0.05mg/mlのPIを含むPBS (-) に細胞を懸濁し、FACScanで解析した。FACScanの設定は流速LOW、E00 (FSC) 、150 (SSC) 、500 (FL-1) 、450 (FL-2) 、150 (FL-3) 、0.08 (FL-1-%FL-2) である。

4. 3 結果と考察

4.3.1 アフィジコリンによる細胞周期の同調、および増殖停止に伴う分化形質の発現

HL-60細胞はフォルボールエステルで処理するとS期にあるものはDNA合成を終え次のG1期で、R点以前のG1期にあるものは次のS期に入らずそののままG1期で細胞増殖を停止することが報告されている (56) 。それ故もし、G1期での増殖停止が分化形質発現に必須なら、DNA合成過程があるためG1期での増殖停止までに時間のかかるS期処理の細胞に比べてG1期でフォルボールエステル処理された細胞の方が、より早い時点で分化形質を発現してくるはずである。このことを実験で明らかにするには十分に細胞周期の同調された細胞試料を用いる必要がある。代表的な細胞周期の同調法と

して血清飢餓法 (88) があるが、HL-60細胞は低血清下では死にやすく、また増殖を停止しない細胞もあり十分に細胞周期を同調した細胞試料は得られなかった。もう一つの方法は、薬剤処理により細胞を特定の細胞周期上に強制的に止める方法である (88)。多くの薬剤がこの目的に使用されているが、本研究では以下の理由によりアフィジコリンを選んだ。

アフィジコリンはDNAポリメラーゼ α の特異的な阻害剤であり、カビの一種である *Cephalosporium aphidicola* から単離された (89)。アフィジコリンはDNA合成を阻害し細胞をS期で停止させるが細胞毒性は無い (90)。また細胞からの除去も簡単に培養液で数回洗浄するだけでよく、除去後、細胞は直ちにDNA合成を開始する。

アフィジコリンで細胞を処理すると、S期にある細胞はその時点で、またG2/M期やG1期にある細胞はS期の直前まで進み細胞周期を停止する。HL-60細胞の場合、S期は世代時間の40%を占めるので、停止している細胞はS期の初期から終期まで非常に広い範囲に分布している筈である。本研究で行う実験では細胞をもっと狭い範囲内に停止させる必要があるので以下の操作を行った。1回目のアフィジコリン処理でS期上に停止させた細胞を洗浄し、一旦細胞周期を進行させ、最も遅く進む細胞がS期を完了し、かつ先頭の細胞が次のS期に入る前の時刻において2回目のアフィジコリン処理を行った。そして最も遅く進む細胞がS期直前に達するまで充分培養を続けた。

G1/S境界に停止させた細胞からアフィジコリンを除去し同調培養を行った結果を図 4.1 (p.62) に示す。培養を開始した直後に90%近い細胞が $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ でラベルされS期に入っていることは同調が成功したことを示している。30時間後には $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ ラベルされた細胞の2回目のピークが現れ50%以上の細胞がDNA合成をおこなっており、少なくとも最初の周期は十分に同調されていると判断される。S期の2回目のピークが30時間後に現れたことはアフィジコリン処理された細胞の世代時間が非常に短くなったことを意味している。未処理の対数増殖期にあるHL-60細胞の倍加時間は増殖曲線より46時間であった。同様の現象はHeLa細胞の場合にも報告されている (90)。アフィジコリンはDNAポリメラーゼ α の特異的な阻害剤であるが、細胞内の他の代謝に影響を与えないため細胞周期の進行に必要な代謝物は合成、蓄積されており、アフィ

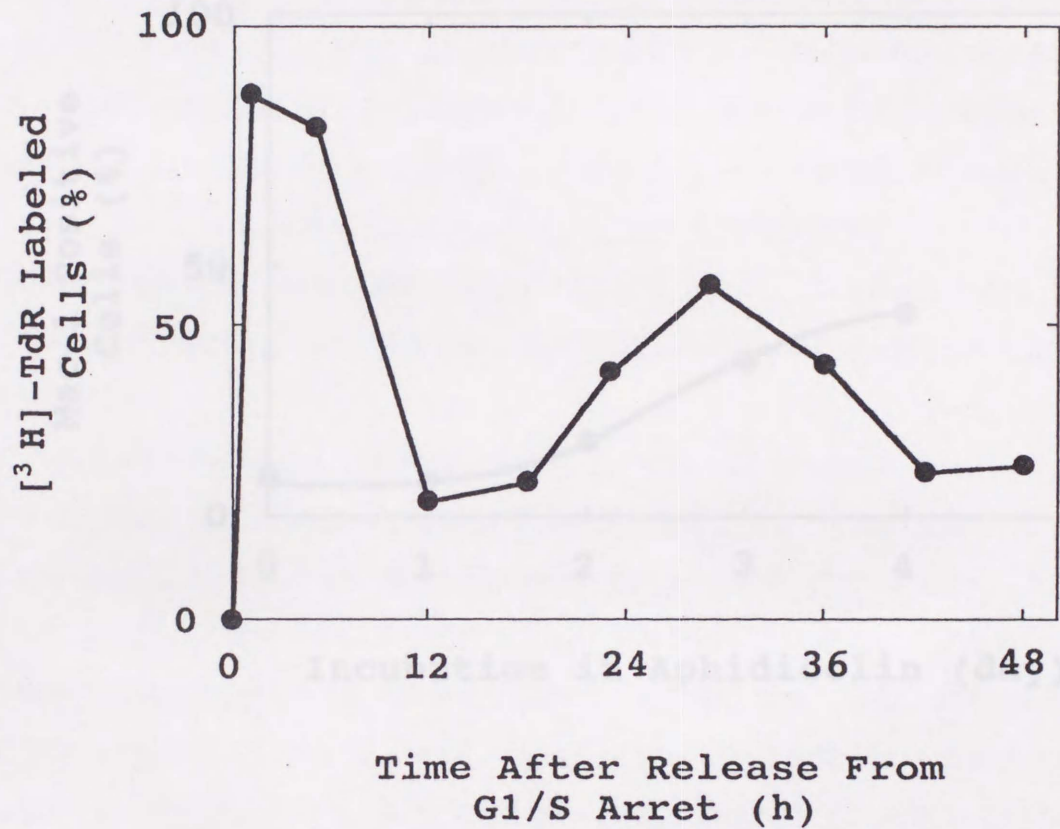


図 4.1 アフィジコリン処理によるHL-60細胞の同調培養

アフィジコリンで2回処理したHL-60細胞を新しい培養液に移し同調培養を行った。各時点において³H]-TdRを取り込んでいる細胞の割合を測定した。

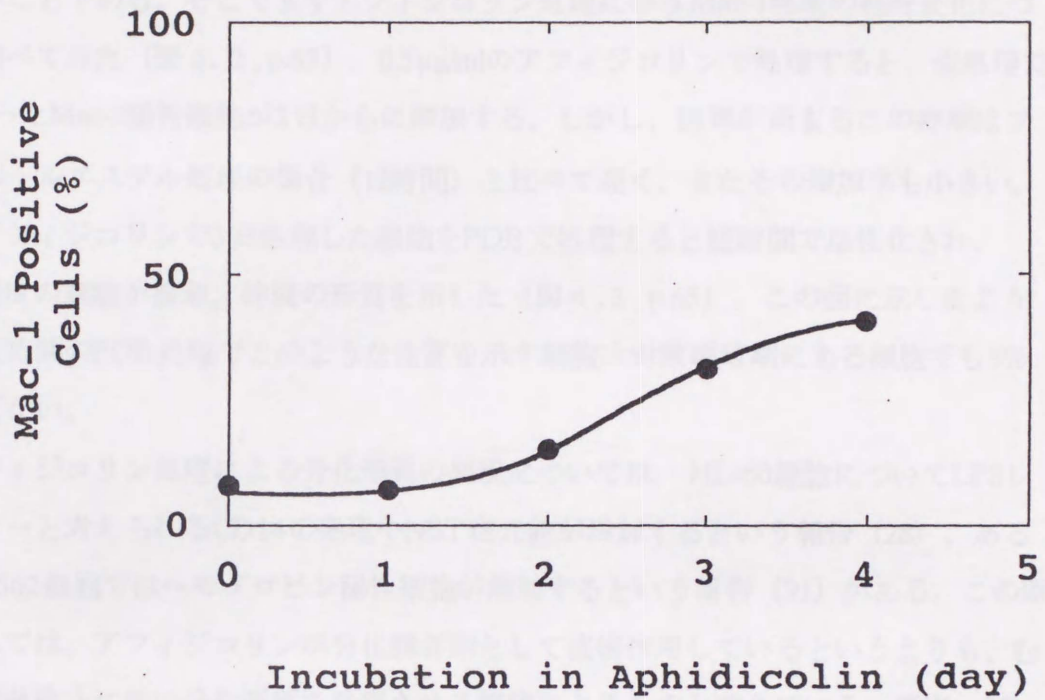


図4.2 アフィジコリン処理に伴うMac-1の発現

対数増殖期にあるHL-60細胞をアフィジコリン (0.5 μ g/ml) で処理し、各時点においてMac-1を発現している細胞の割合を測定した。

ジコリンを除去することにより一挙に細胞周期が進んでしまうという可能性が考えられている (90)。

アフィジコリン処理で同調した細胞が対数増殖期にある細胞と異なっている他の注目すべき点は、フォルボールエステル誘導以前に分化形質を発現している細胞の割合が高いことである。そこでまずアフィジコリン処理に伴う Mac-1 発現の経時変化について調べてみた (図 4.2, p.63)。0.5 $\mu\text{g/ml}$ のアフィジコリンで処理すると、未処理で 5% だった Mac-1 陽性細胞が 2 日から増加する。しかし、誘導が始まるこの時期はフォルボールエステル処理の場合 (12 時間) と比べて遅く、またその増加率も小さい。またアフィジコリンで 3 日処理した細胞を PDB で処理すると短時間で活性化され、30% 程度の細胞が接着、伸展の形質を示した (図 4.3, p.65)。この図に示したように、短時間の PDB 処理でこのような性質を示す細胞は対数増殖期にある細胞でも 5% にすぎない。

アフィジコリン処理による分化形質の発現については、HL-60 細胞について LPS レセプターと考えられる CD14 の発現や NBT 還元能が増加するという報告 (28)、あるいは K562 細胞ではヘモグロビン陽性細胞が増加するという報告 (91) がある。この原因としては、アフィジコリンが分化誘導剤として直接作用しているというよりも、むしろ増殖停止に伴い分化形質を発現させる機構によるものと考えている。事実、HL-60 細胞の分化誘導剤として AraA、AraC、6-TG などの細胞増殖を抑制する物質が多く知られている (7, 35)。また、細胞増殖に関与し HL-60 細胞中で強く発現している *c-myc* 遺伝子の発現を強制的に抑制すると細胞増殖の停止に伴い分化形質が発現してくる (26, 27)。従って、一般的に細胞増殖の停止に伴い分化形質発現を抑制する分子が減少する、あるいは逆に分化形質を促進する分子が増加していくという可能性がむしろ強く示唆される (4.3.3, p.66 参照)。

4.3.2 アフィジコリンで細胞終期を同調した HL-60 細胞の PDB 処理に伴う完全な G1 停止

アフィジコリン処理で細胞周期を同調した HL-60 細胞で最も興味深い現象は、対数増殖期の細胞と異なり PDB 処理すると最初の G1 期で完全に停止した点である (図 4.

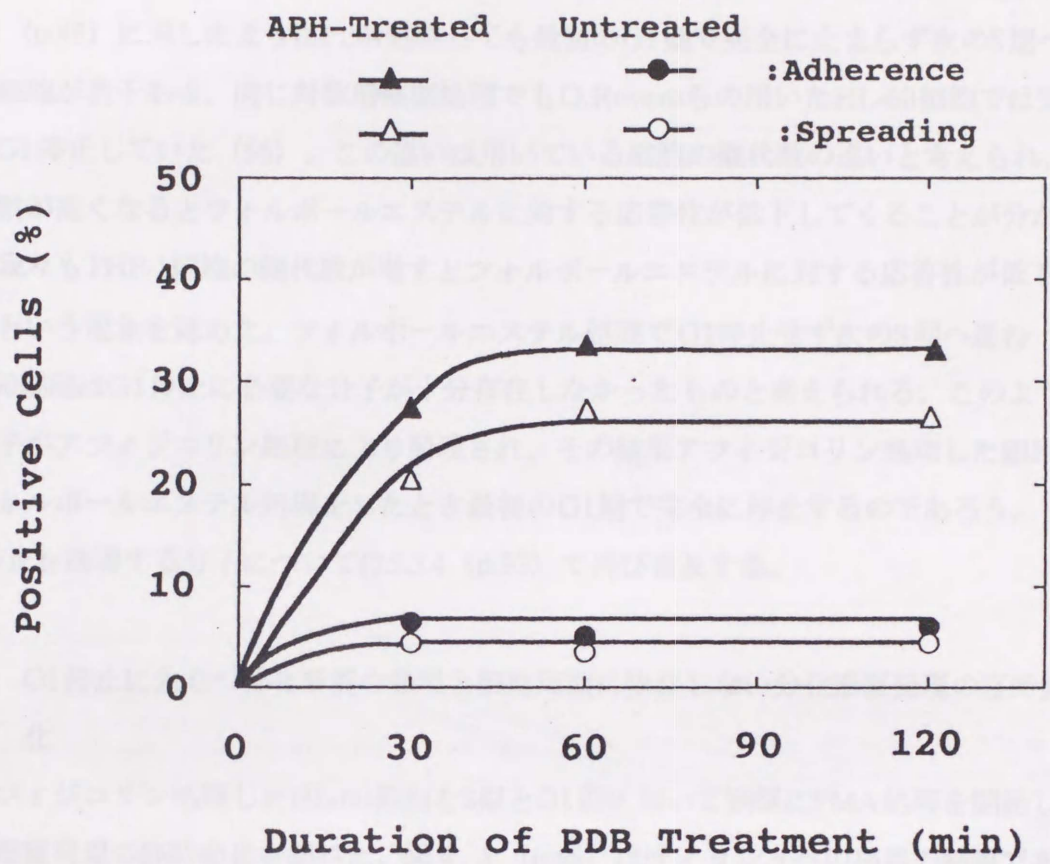


図 4.3 アフィジコリンで前処理した細胞のPDB短時間処理による急速な形態変化の誘導

アフィジコリン (0.5 μ g/ml) 3日処理した細胞にPDB (10^{-7} M) を加え、各時間後の接着 (▲)、伸展 (△) している細胞の割合を調べた。(●)、(○) は対数増殖期にあるHL-60細胞をPDB処理した時の接着、伸展している細胞の割合を示す。

4, p.67)。S期でPDB処理を開始した細胞は未処理の細胞と同様にDNA合成を行うが、次のS期に入らず23時間後には完全にG1停止している。対数増殖期にある細胞では図3.6 (p.45) に示したようにPDB処理しても最初のG1期で完全に止まらず次のS期へ進む細胞が若干ある。同じ対数増殖期処理でもG.Roveraらの用いたHL-60細胞では完全にG1停止していた(56)。この違いは用いている細胞の継代数の違いと考えられ、継代数が高くなるとフォルボールエステルに対する応答性が低下してくることが分かる。我々もTHP-1細胞の継代数が増すとフォルボールエステルに対する応答性が低下するという現象を認めた。フォルボールエステル処理でG1停止せず次のS期へ進むHL-60細胞はG1停止に必要な分子が十分存在しなかったものと考えられる。このような分子がアフィジコリン処理により発現され、その結果アフィジコリン処理した細胞をフォルボールエステル処理をしたとき最初のG1期で完全に停止するのであろう。G1停止を誘導する分子については5.3.4 (p.93) で再び言及する。

4.3.3 G1停止に先立つ分化形質の発現と細胞周期に依存しない分化形質発現の経時変化

アフィジコリン処理したHL-60細胞をS期とG1期において別個にPMA処理を開始し、分化形質発現の経時変化を調べた。図4.5 (p.68) はディッシュへの接着の結果である。S期で処理を開始すると対数増殖期にある細胞に比べて、直ちに接着する細胞は12%、伸展する細胞は5%増加した。これは前述したようにアフィジコリン処理による影響である。その後PMA処理により接着する細胞は4時間以降に急激に増加し12時間でほぼプラトーに達した。この細胞のS期は約12時間であるから、S期内に接着を完了している。一方、G1期でPMA処理を開始した細胞の経時変化は興味深いことにS期から処理を始めた細胞と全く一致していることが分かる。どちらの場合もディッシュへ接着する細胞の割合はPMA処理時間のみに依存していた。

図4.6 (p.69) は伸展の経時変化を調べた結果である。接着の場合と同じでS期から処理を始めた細胞とG1期から処理を始めた細胞の結果は完全に一致している。

同様のことはICAM-1の発現についても言える(図4.7, p.70)。basal levelはアフィジコリン処理により約45%と著しく増加している。PMAによる発現誘導は処理後3

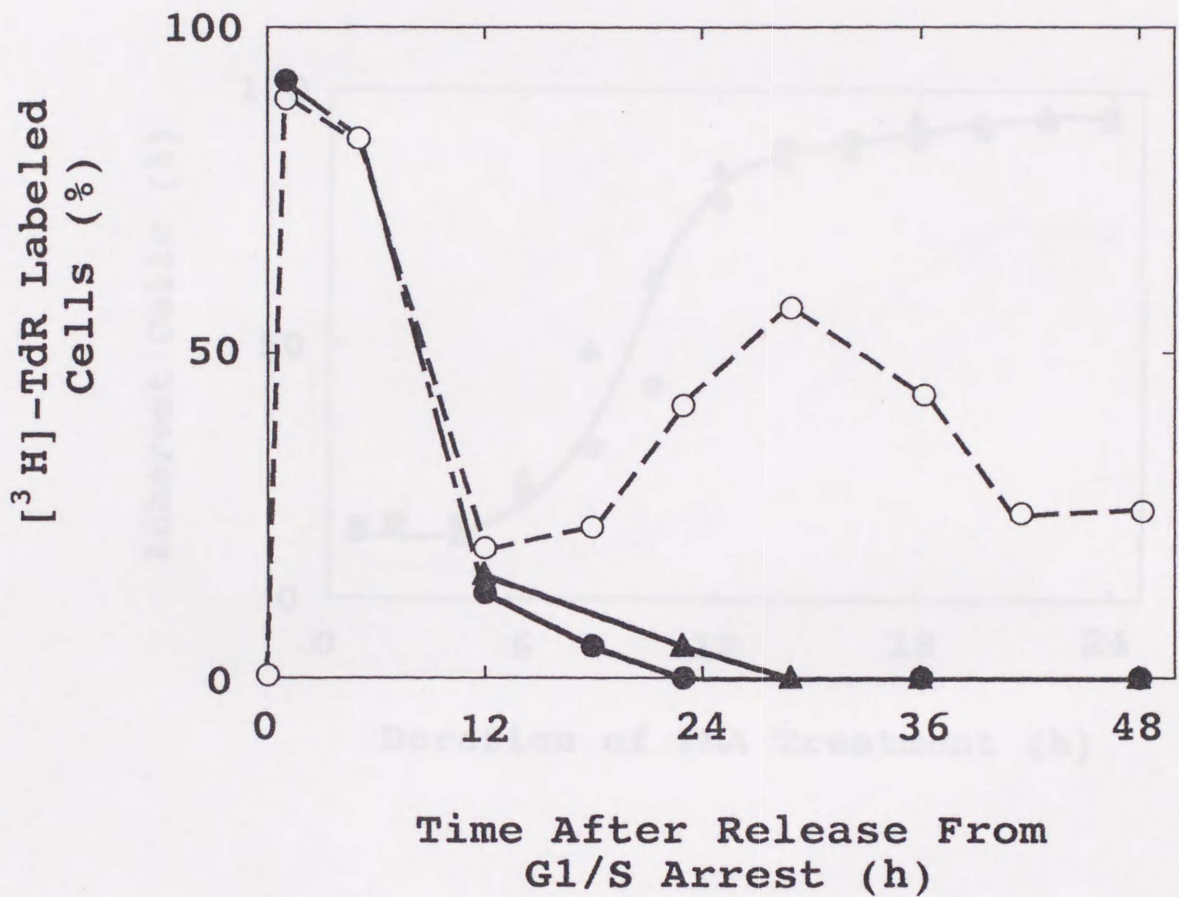


図 4.4 アフィジコリン処理で細胞周期を同調した細胞のPDB処理による完全な増殖停止

アフィジコリン2回処理で同調したHL-60細胞（未処理：○）を同調培養開始直後（S期処理：●）と12時間後（G1期処理：▲）とからPDB（ 10^{-7} M）で処理し、各時点において $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ を取り込んでいる細胞の割合を測定した。

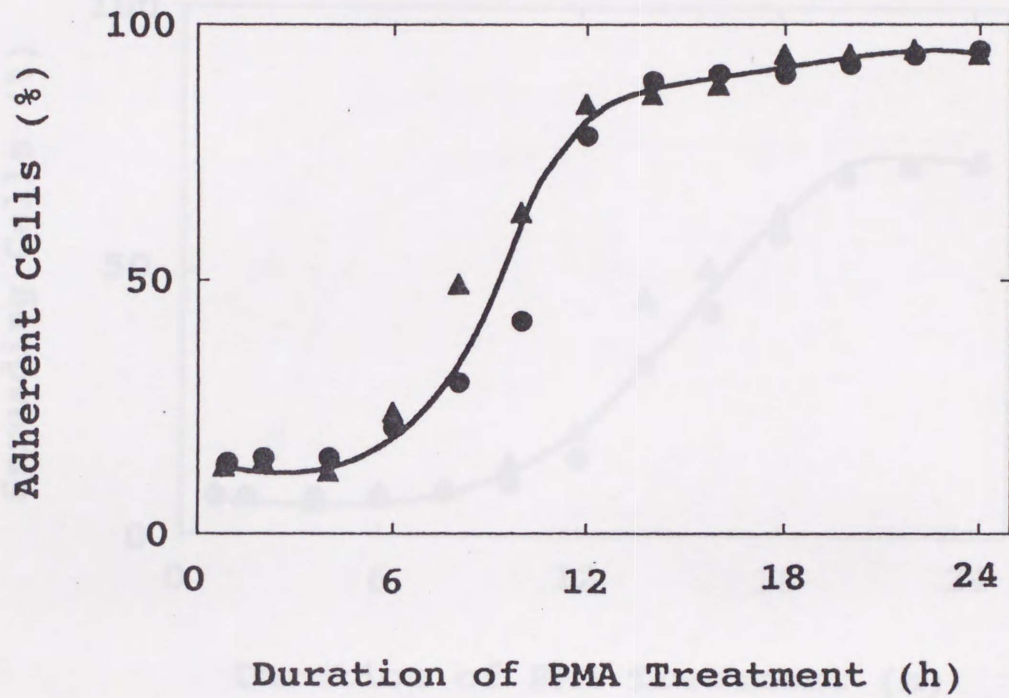


図 4.5 PMA処理による接着細胞の経時変化

細胞周期を同調したHL-60細胞をS期 (●) より、あるいはG1期 (▲) よりPMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) 処理し、各時点において接着している細胞の割合を測定した。

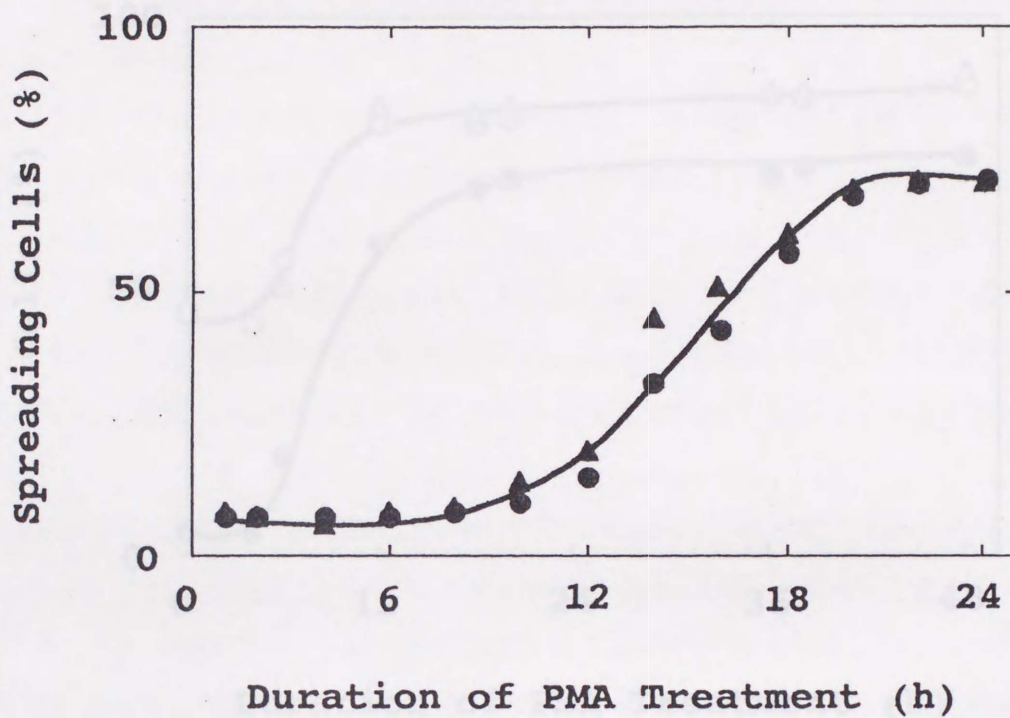


図 4.6 PMA処理による伸展細胞の経時変化

細胞周期を同調したHL-60細胞をS期 (●) より、あるいはG1期 (▲) よりPMA (5×10^{-8} M) 処理し、各時点において伸展している細胞の割合を測定した。

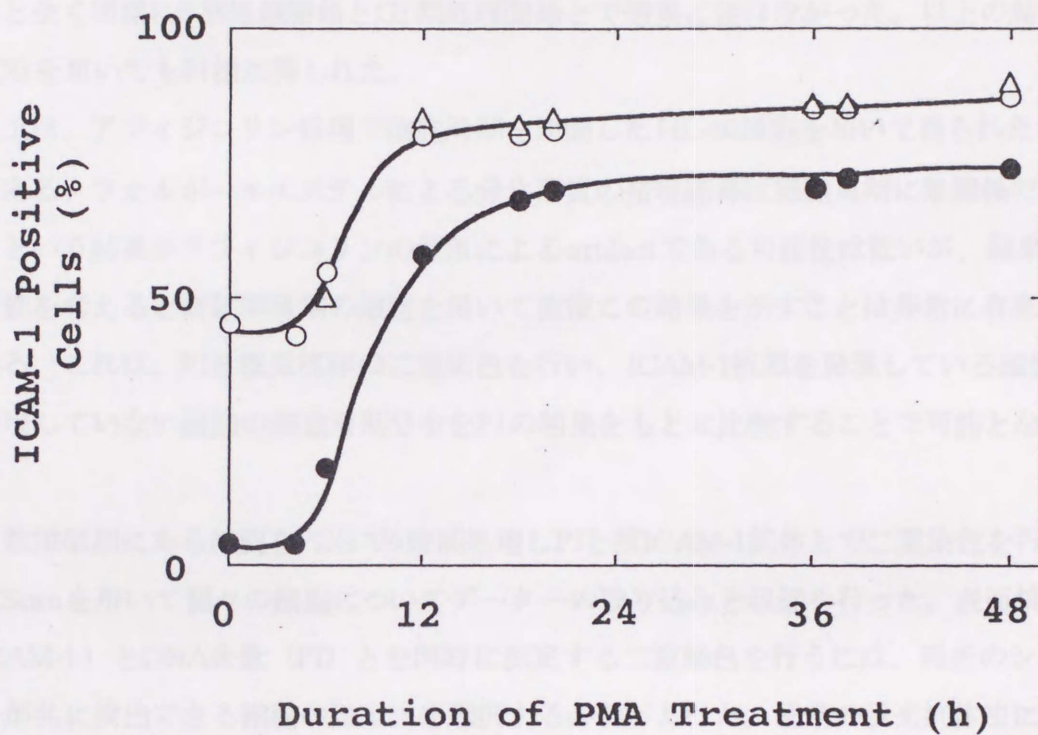


図4.7 PMA処理によるICAM-1発現の経時変化

対数増殖期にあるHL-60細胞 (●) と、細胞周期を同調したHL-60細胞をS期 (○) より、あるいはG1期 (△) よりPMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) 処理し、各時点においてICAM-1を発現している細胞の割合を測定した。

時間から始まり12時間後には最大に達した。ICAM-1の発現も細胞周期と無関係である。また対数増殖期の細胞では同調した細胞に比べてbasal levelは低いが、PMAでICAM-1が誘導される時期やその後の変化は同調した細胞と一致していた。

図4.8 (p.72)にMac-1発現の経時変化を示す。以上に述べてきた他の分化形質の場合と全く同様にS期処理開始とG1期処理開始とで結果に差はなかった。以上の結果はPDBを用いても同様に得られた。

以上は、アフィジコリン処理で細胞周期を同調したHL-60細胞を用いて得られた結果である。フォルボールエステルによる分化形質の発現誘導は細胞周期に無関係である、という結果がアフィジコリンの使用によるartifactである可能性は低い、結果の重要性を考えると対数増殖期の細胞を用いて直接この結果を示すことは非常に有意義である。これは、PIと蛍光抗体の二重染色を行い、ICAM-1抗原を発現している細胞と発現していない細胞の細胞周期分布をPIの結果をもとに比較することで可能となった。

対数増殖期にある細胞をPDBで6時間処理しPIと抗ICAM-1抗体とで二重染色を行いFACScanを用いて個々の細胞についてデータの取り込みと収録を行った。表面抗原(ICAM-1)とDNA含量(PI)とを同時に測定する二重染色を行うには、両者のシグナルが共に検出できる細胞の固定法を選択する必要がある。通常の蛍光抗体法に用いた4%パラホルムアルデヒド固定ではPIによるDNA含量のシグナル検出が不十分であった。また、エタノール固定だと表面抗原の検出ができなかった。実験条件の検討をしたところ50%メタノール固定が最適で、両方のシグナルが十分に検出できた。図4.9 (A) (p.73)にICAM-1を発現していない細胞集団に関する分布を、図4.9 (B)にICAM-1を発現している細胞集団の分布を示す。両者はほぼ完全に一致していることが分かる。また、6時間のPDB処理では細胞周期上の分布は未処理のものと変わらず、G1停止は全く生じていないことも同様に示されている。

以上の結果より、フォルボールエステルで処理されたHL-60細胞は、1) G1停止の前に全ての分化形質を発現する、2) 分化形質の発現は細胞周期に依存せず、どの細胞周期においても同じ経時変化を示す、ことが明らかになった。

終末分化において細胞が分化形質を発現するには細胞増殖の停止が必要であるよう

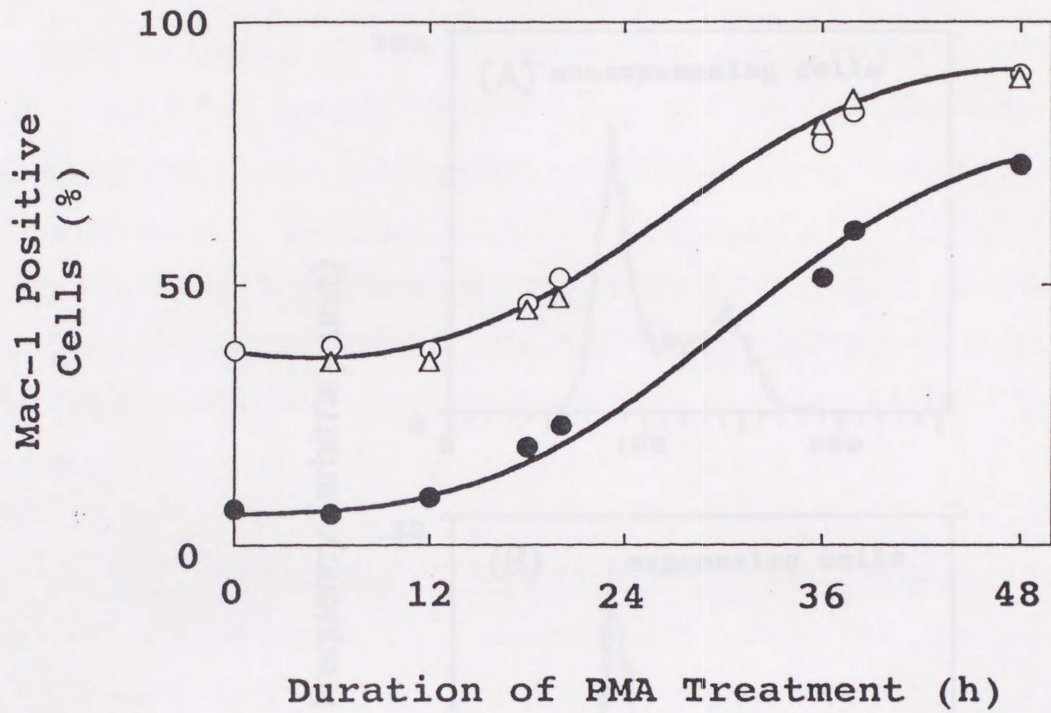


図4.8 PMA処理によるMac-1発現の経時変化

対数増殖期にあるHL-60細胞 (●) と、細胞周期を同調したHL-60細胞をS期 (○) より、あるいはG1期 (△) よりPMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) 処理し、各時点においてMac-1を発現している細胞の割合を測定した。

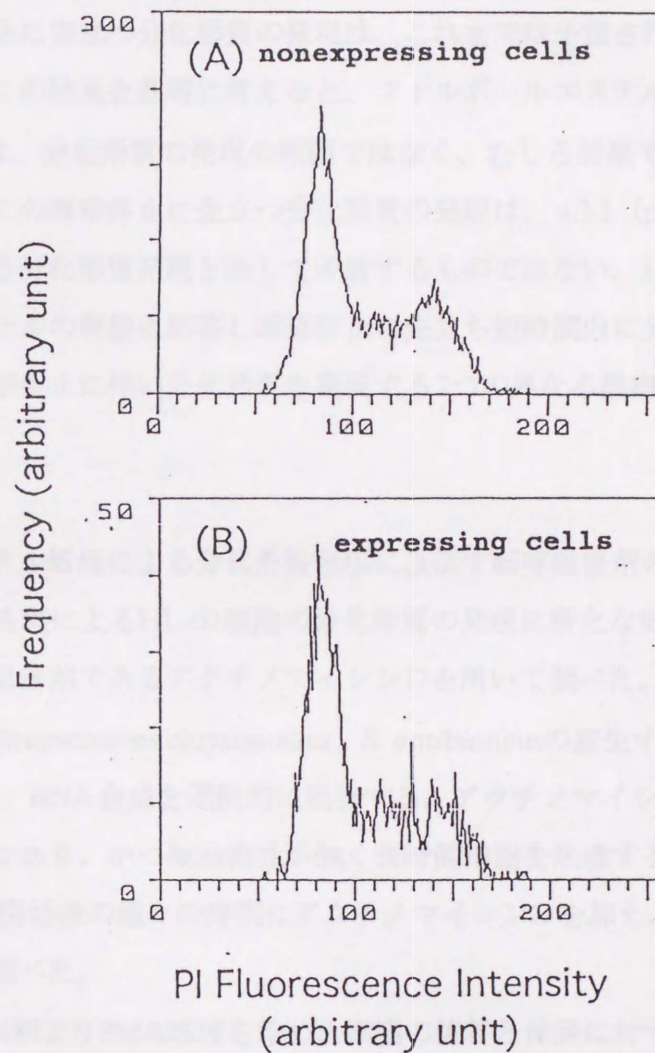


図4.9 細胞周期に無関係なICAM-1の発現

HL-60細胞をPDB (10^{-7} M) で6時間処理し、抗ICAM-1抗体とPIを用いて二重染色を行った。FACSscanで解析し、ICAM-1を発現していない細胞 (A) と発現している細胞(B) とに分け、細胞周期の分布を調べた。

に見える。例えば筋細胞の終末分化の場合、MyoD1の発現だけでは不十分であり、細胞増殖の停止に伴うIdの減少が必要である(92)。Idは増殖している筋芽細胞中に存在し、分化形質の発現を支配するMyoD1やE2Aなどの転写因子とHLHを介して結合し、その活性を抑制しているからである。Idは筋芽細胞だけでなく他の多くの細胞にも分布しており(93)、分化形質の発現に深く関わっていると考えられる。

本研究で示した増殖停止に先立つ分化形質の発現は、これまでは予想されていなかった新しい知見である。この結果を基礎に考えると、フォルボールエステル処理によるHL-60細胞の増殖停止は、分化形質の発現の原因ではなく、むしろ結果である可能性が示唆される。なお、この増殖停止に先立つ分化形質の発現は、4.3.1 (p.60) で述べた細胞周期の停止に伴う分化形質発現と決して矛盾するものではない。HL-60細胞には、フォルボールエステルの刺激にตอบสนองし増殖停止に先立ち短時間内に分化形質を発現する機構と、細胞周期停止に伴い分化形質を発現する2つの異なる機構が存在するのである。

4.3.4 フォルボールエステル処理による分化形質発現に及ぼす転写阻害剤の効果

フォルボールエステル処理によるHL-60細胞の分化形質の発現に新たな転写を必要としているか否かを転写阻害剤であるアクチノマイシンDを用いて調べた。

アクチノマイシンDは*Streptomyces chrysomallus*、*S. antibioticus*の産生する抗生物質で二重鎖DNAに結合し、RNA合成を選択的に阻害する。アクチノマイシンDは細胞から除去することが困難であり、かつ細胞毒性が強く長時間細胞を処理することはできない。そこでPMA処理開始後の種々の時間にアクチノマイシンDを加え、2時間後の分化形質発現の変化を調べた。

図4.10 (p.75)は、S期よりPMA処理を始めた細胞の接着と伸展に対するアクチノマイシンDの効果を調べた結果である。矢印の先端は2時間後の値を示している。PMA処理で誘導される接着と伸展はアクチノマイシンDにより抑制されていることが分かる。阻害の効果は陽性細胞が急増する転移領域で顕著であった。G1期よりPMA処理した細胞も、同様にアクチノマイシンD処理により接着と伸展が抑制された(図4.11, p.77)。従って、PMA処理による細胞の接着と伸展の誘導には、PMAで誘導

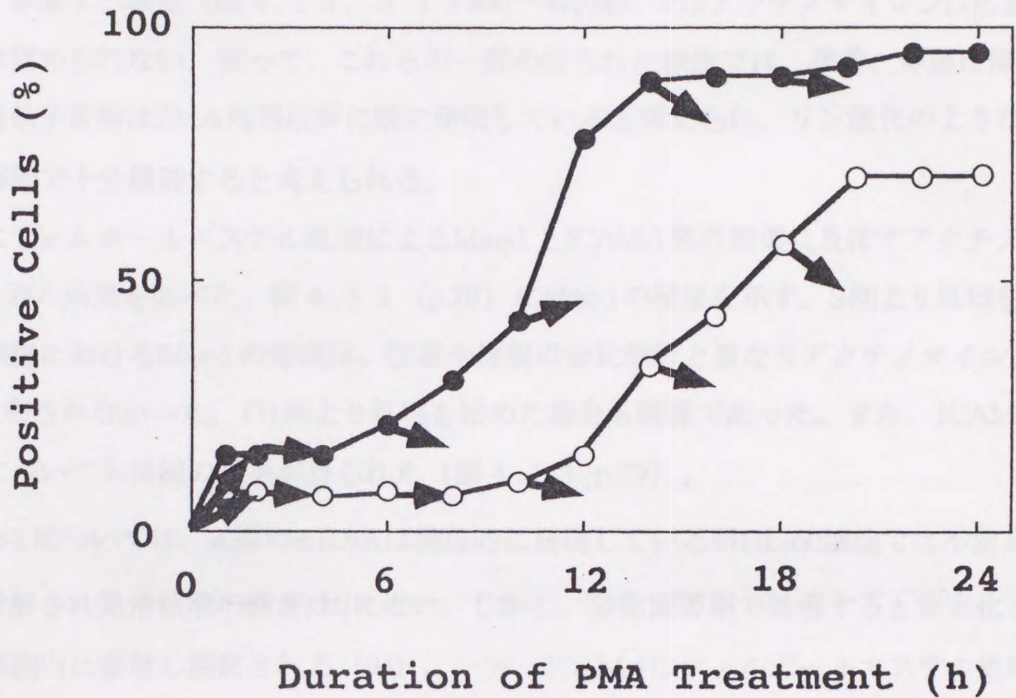


図 4.10 Act. Dで阻害される接着と伸展の形質 (1)

細胞周期を同調したHL-60細胞をS期よりPMA ($5 \times 10^{-8} M$) 処理を開始し、接着 (●)、伸展 (○) している細胞の経時変化を測定した。一方、各時間にAct. D ($5 \mu g/ml$) を加え2時間後に接着、伸展している細胞を測定した (矢印)。

される新たな転写が必要であることが明らかである。接着、伸展という形質は高次で複雑な細胞機能であり、それに関与する遺伝子産物も多数存在すると考えられる。図 4.1 0 (p.75)、図 4.1 1 (p.77) に見られる比較的長い誘導期間は、これらの遺伝子の発現に関わる複雑なカスケードの存在を示唆している。一方、PMA処理で直ちに接着、伸展する細胞(図 4.1 0、4.1 1の0~4時間)ではアクチノマイシンDによる阻害は認められない。従って、これらの一部の限られた細胞では、接着、伸展に関与する遺伝子産物はPMA処理以前に既に発現していると考えられ、リン酸化のような簡単な修飾で十分機能すると考えられる。

次にフォルボールエステル処理によるMac-1とICAM-1発現誘導に及ぼすアクチノマイシンDの効果を調べた。図 4.1 2 (p.78)にMac-1の結果を示す。S期より処理を始めた細胞におけるMac-1の発現は、接着や伸展の分化形質と異なりアクチノマイシンDで阻害されなかった。G1期より処理を始めた場合も同様であった。また、ICAM-1発現についても同様の結果が得られた(図 4.1 3, p.79)。

Mac-1については、 α 鎖のmRNAは構成的に発現しているがHL-60細胞では不安定ですぐ分解され定常状態の濃度は0に近い。しかし、分化誘導剤で処理すると安定化されて細胞内に蓄積し翻訳される(94)。一方、ICAM-1はフォルボールエステル処理、あるいはTNF処理により多くの細胞で発現する。この時、TNF処理では転写速度が増してmRNA量が増加するのに対し、フォルボールエステル処理ではMac-1 α 鎖と同様に転写後の安定化によりmRNA量が増加することが内皮細胞を用いて報告されている(68)。フォルボールエステル処理によるMac-1やICAM-1の発現がアクチノマイシンDにより阻害されなかったのは、たとえアクチノマイシンDで新たな転写が阻害されても、PMA処理による安定化効果で翻訳を行うに十分なmRNAが既に細胞内に蓄積しているからだと考えられる。

アクチノマイシンDでMac-1、ICAM-1の発現が阻害されなかった他の原因として、成熟骨髄系細胞と同じように細胞内プール(95)があり、フォルボールエステル処理により細胞表面に移行した可能性が考えられる。しかし、実験の結果HL-60細胞内にMac-1のプールは存在していなかった(結果は省略)。

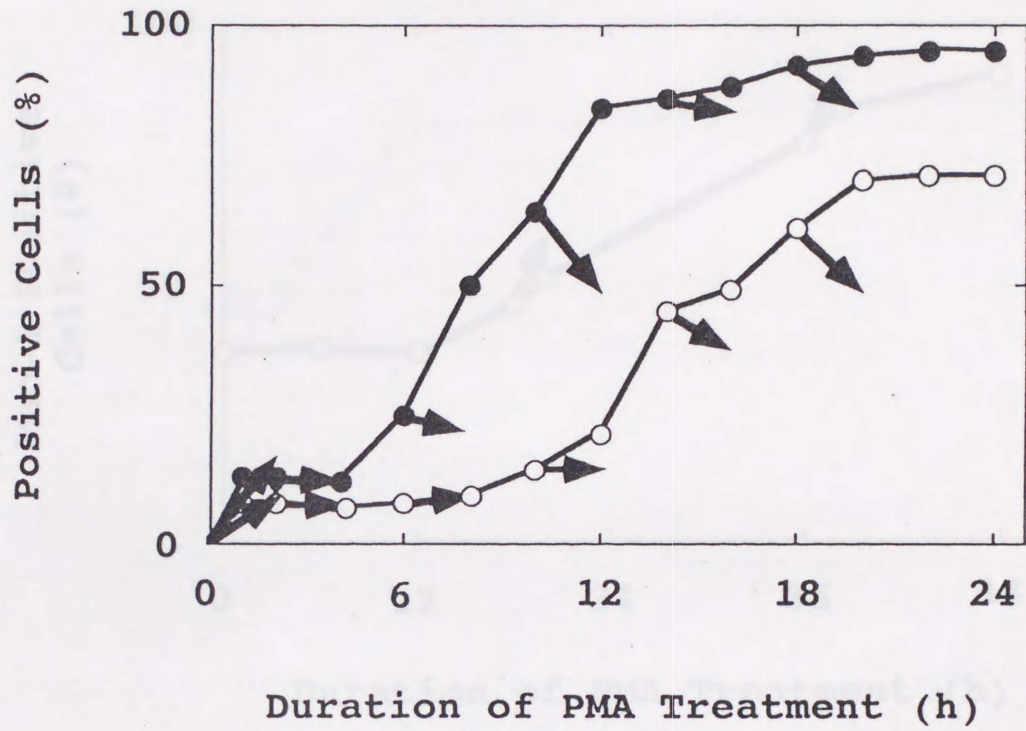


図 4.1.1 Act. Dで阻害される接着と伸展の形質 (2)

細胞周期を同調したHL-60細胞をG1期よりPMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) 処理を開始し、接着 (●)、伸展 (○) している細胞の経時変化を測定した。一方、各時間にAct. D ($5 \mu\text{g/ml}$) を加え2時間後に接着、伸展している細胞を測定した (矢印)。

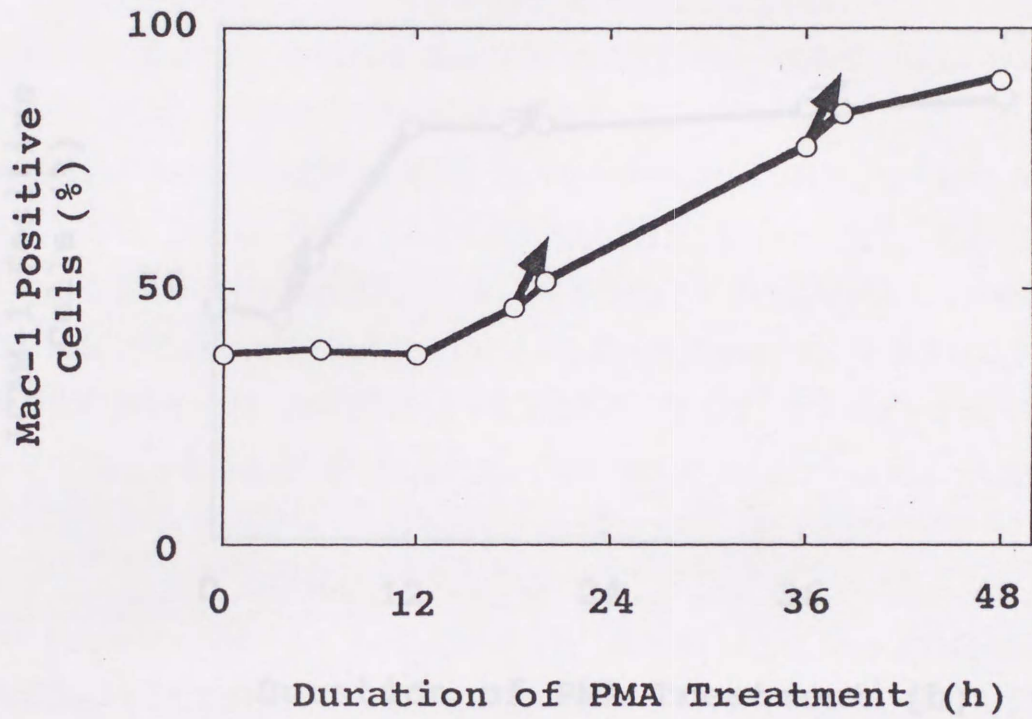


図 4.1 2 Act. D で阻害されない Mac-1 発現

細胞周期を同調した HL-60 細胞を S 期 (○) より PMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) 処理を開始し、Mac-1 の発現を測定した。一方、各時間に Act. D ($5 \mu\text{g/ml}$) を加え、2 時間後の Mac-1 発現を測定した (矢印)。

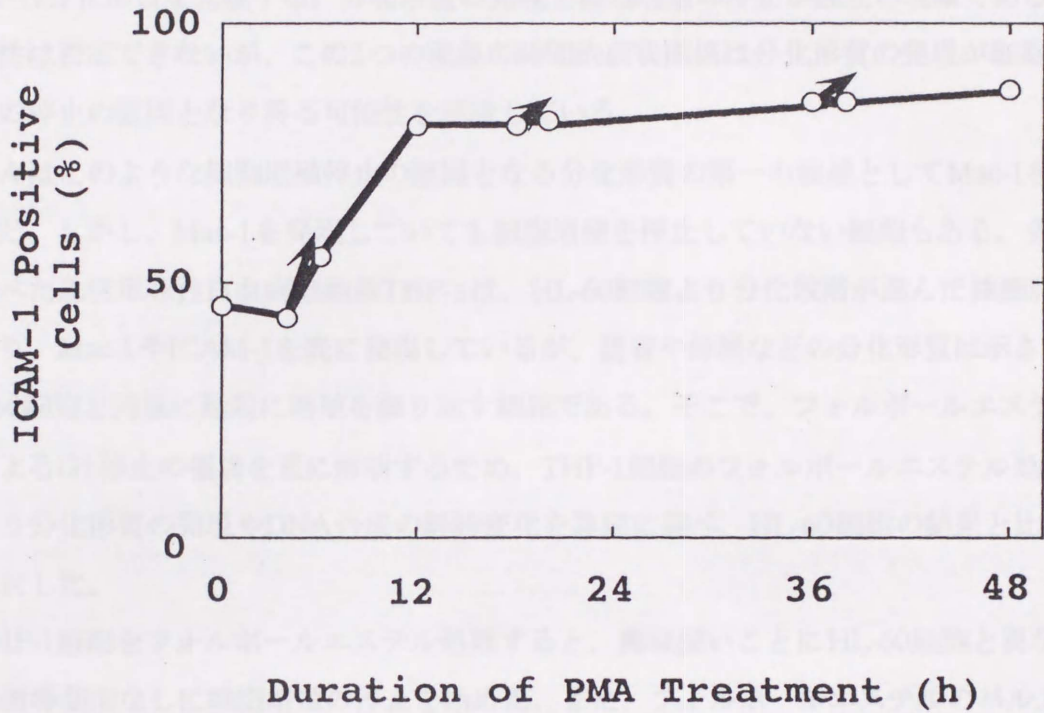


図 4.13 Act. D で阻害されない ICAM-1 発現

細胞周期を同調した HL-60 細胞を S 期 (○) より PMA ($5 \times 10^{-8} M$) 処理を開始し、ICAM-1 の発現を測定した。一方、各時間に Act. D ($5 \mu g/ml$) を加え、2 時間後の ICAM-1 発現を測定した (矢印)。

5. THP-1細胞のフォルボールエステルによる分化誘導

5. 1 はじめに

4.で述べたようにHL-60細胞をフォルボールエステル処理すると、G1停止に先立ってS期から分化形質を発現する。分化形質の発現と細胞増殖の停止が独立の現象である可能性は否定できないが、この2つの現象の時間的前後関係は分化形質の発現が細胞増殖の停止の原因となり得る可能性を示唆している。

我々はこのような細胞増殖停止の原因となる分化形質の第一の候補としてMac-1を選んだ。しかし、Mac-1を発現していても細胞増殖を停止していない細胞もある。先に述べた急性単球性白血病細胞株THP-1は、HL-60細胞より分化段階が進んだ株細胞であり、Mac-1やICAM-1を既に発現しているが、接着や伸展などの分化形質は示さず、HL-60細胞と同様に無限に増殖を繰り返す細胞である。そこで、フォルボールエステルによるG1停止の機構を更に解明するため、THP-1細胞のフォルボールエステル処理に伴う分化形質の発現やDNA合成の経時変化を詳細に調べ、HL-60細胞の結果と比較し検討した。

THP-1細胞をフォルボールエステル処理すると、興味深いことにHL-60細胞と異なり、誘導期間なしに細胞増殖の停止を始めた。また、フォルボールエステルのパルス処理による刺激をTHP-1細胞は細胞周期に関係なく受けG1期で停止した。このフォルボールエステル処理によるG1停止は転写阻害剤では阻害されなかったが、翻訳阻害剤、タンパク質リン酸化阻害剤の処理により明瞭に阻害された。

5. 2 材料と方法

5.2.1 細胞培養

THP-1細胞(JCRB 0112)はJCRBから入手した。培養液はHL-60細胞と同様にRPMI1640培地に非動化牛胎児血清を10%、硫酸カナマイシンを100 μ g/mlになるように添加して使用した。細胞は 2.5×10^5 cells/mlの細胞濃度で培養を始め、3~4日に一度継代を行った。実験には対数増殖期にある細胞を 5×10^5 cells/mlに調製して使用した。THP-1細胞の世代時間は36時間である。

5.2.2 分化誘導による分化形質発現とDNA合成の測定

フォルボールエステルによる分化誘導はHL-60細胞の場合と同様に行い、PMAは $5 \times 10^{-8} \text{M}$ で、PDBは 10^{-7}M で処理した。

分化形質としてはMac-1、ICAM-1、FcR1、FcR2、CD14の発現を測定した。実験法は3.2.2 (p.34) に述べた。また、ディッシュへの接着と伸展も3.2.2 (p.34) と同様に測定した。

DNA合成は $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みによるオートラジオグラフィーを用いて調べた。実験方法は3.2.3 (p.36) に述べた。

5.2.3 細胞周期の同調法

THP-1細胞もHL-60細胞と同様にアフィジコリンで2回処理することにより同調した(4.2.1参照, p.59)。ただし、HL-60細胞と異なりアフィジコリンの濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$ だと死細胞が多少増加したので、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ に濃度を下げて処理した。また増殖速度の差(世代時間、46時間と36時間)を考慮して1回目のアフィジコリン処理時間を24時間、2回目を20時間、その間の培養時間を18時間にして培養した。細胞周期の同調の程度は、 $[^3\text{H}]$ -TdRのパルス処理による取り込みをオートラジオグラフィーで決定し、その経時的変化から調べた。

5.2.4 種々の阻害剤による処理

アフィジコリン処理で細胞周期を同調した細胞($4 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$)を用い、種々の阻害剤存在下でPDB処理(10^{-7}M)を2時間S期において行った。細胞を遠心チューブに回収し、10mlのRPMI1640培地で3回洗浄して、PDBと阻害剤を除去した後、新しい培養液に懸濁した。これを96ウェルプレートで $100 \mu\text{l}$ ずつ培養し、PDB処理開始後36時間目のDNA合成細胞を $[^3\text{H}]$ -TdRの取り込みにより調べた。使用した阻害剤とその濃度は、タンパク質合成阻害剤CHX、 $10 \mu\text{g/ml}$ (シグマ、原液は 10mg/ml の濃度のものをエタノールで調製し、 -20°C で保存した)、タンパク質リン酸化阻害剤H-7、 $40 \mu\text{M}$ (生

化学工業、原液は10mMの濃度のものをD₂Oで調製し、4°Cで保存した)、転写阻害剤 α -アマニチン、1 μ g/ml (シグマ、原液は5mg/mlの濃度のものをエタノールで調製し、-20°Cで保存した) である。いずれもPDB処理開始5分前に細胞に加えた。

5. 3 結果と考察

5.3.1 フォルボールエステル処理による分化形質の発現

前述した (1.1, p.1 参照) ようにTHP-1細胞は分化段階の進んだ単球様細胞であり、成熟骨髄系細胞が持つ分化形質の多くのものを既に発現している。図 5.1 (p.83) にフローサイトメトリーの結果を示す。Mac-1、ICAM-1、FcR1、FcR2は未処理のTHP-1細胞で検出された。Mac-1はフォルボールエステルの2日間処理で68%から87%へとわずかに増加した。一方、CD14はフォルボールエステル処理で初めて発現誘導された。また、ディッシュへの接着、伸展もフォルボールエステル処理により初めて誘導された (図 5.2, p.84)。興味深いことにTHP-1細胞の伸展の誘導はHL-60細胞と同様に長い誘導期間が必要であるのに対し、接着はHL-60細胞の場合と異なり誘導期間がなく処理後直ちに始まっている (図 5.3, p.85と図 5.4, p.86)。

G1/S期境界から同調培養を開始したTHP-1細胞のPDB処理による接着は、対数増殖期処理の場合と同様に直ちに始まった (図 5.5, p.87)。一方伸展については、対数増殖期処理の細胞と異なり、同調した細胞の15%程度は直ちに伸展し、6時間の誘導期間をおいて更に増加している。いずれにしても、フォルボールエステル処理による新たな分化形質発現も、HL-60細胞の場合と同じく細胞周期がG1期で停止する以前におこることが分かる。

次にフォルボールエステル処理で誘導されるTHP-1細胞の接着と伸展がアクチノマイシンDで阻害されるか否かを調べた結果を図 5.6 (p.88) に示す。同調したTHP-1細胞のPDB処理の種々の時点においてアクチノマイシンDを2時間加えても、HL-60細胞の場合と異なり接着は全く阻害されなかった。一方、伸展はHL-60細胞の場合と同様に著しく阻害された。ところが、接着はタンパク質リン酸化剤H-7では著しく阻害される (図 5.7, p.89)。また、タンパク質合成阻害剤CHXでは添加後1時間では阻害されなかったが、2時間後には27%阻害された。以上の結果から、フォルボールエステ

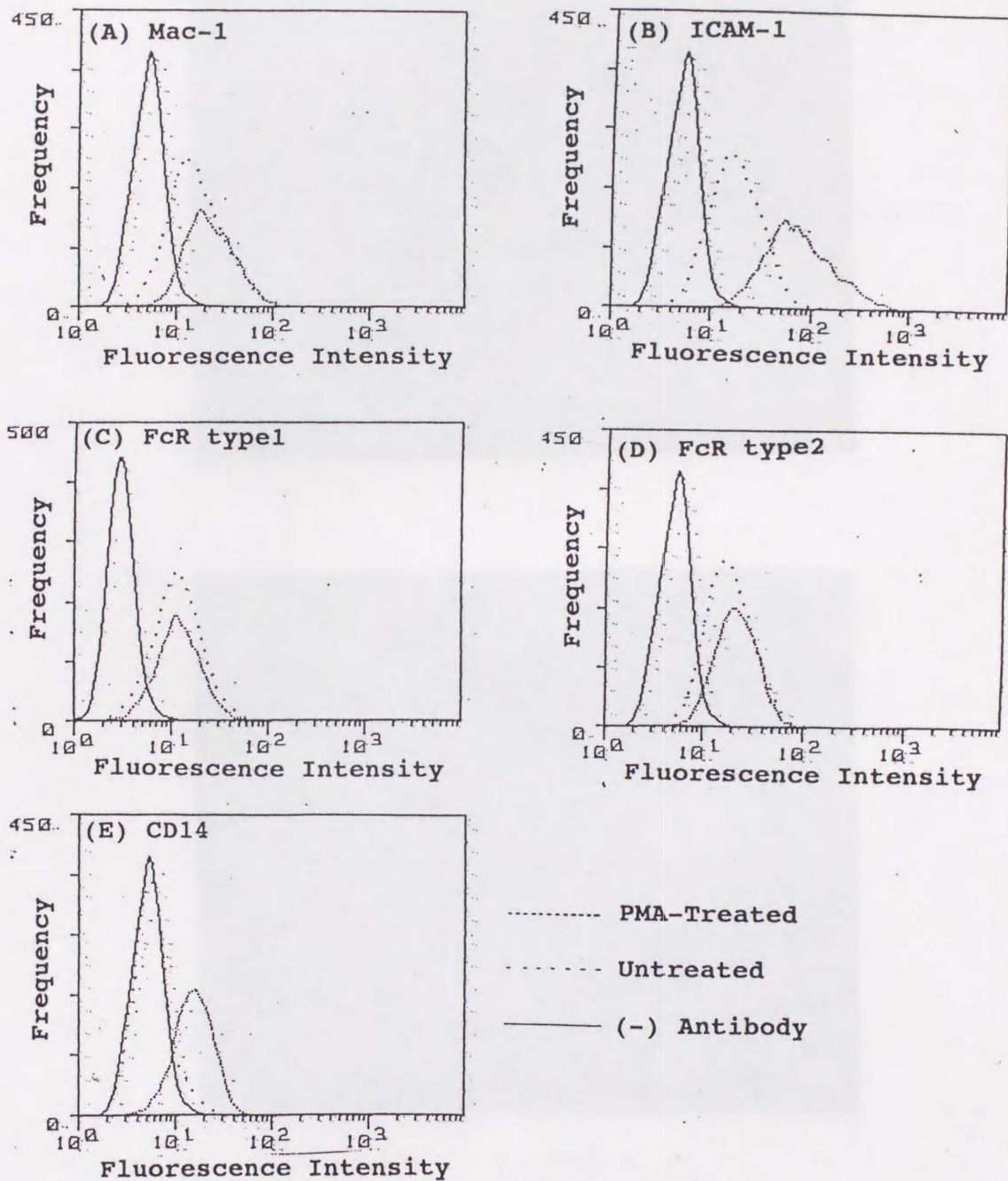
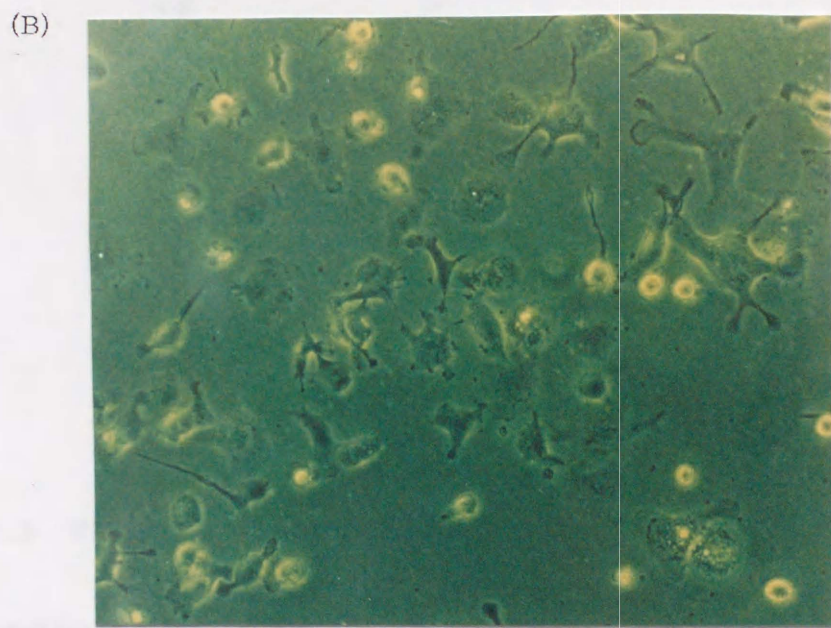
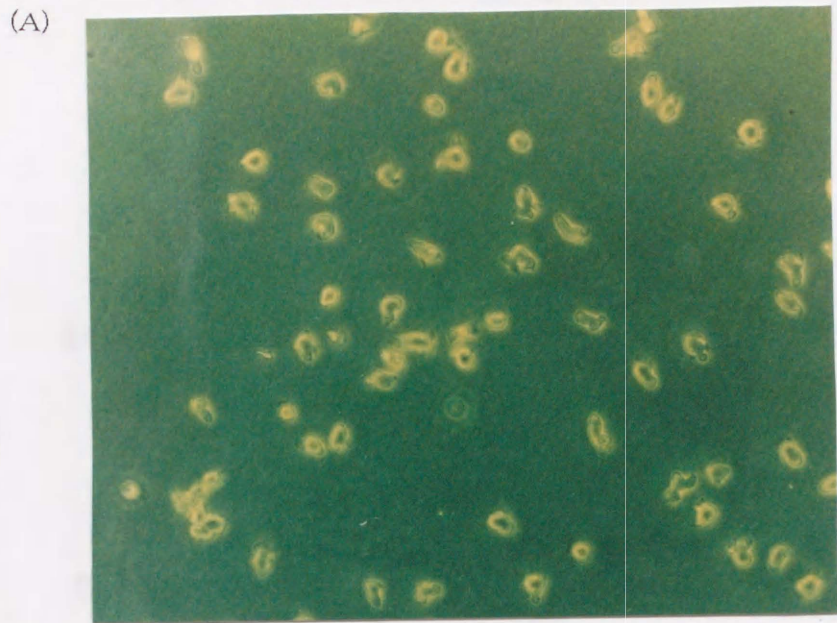


図 5.1 THP-1細胞における分化形質の発現

THP-1細胞 (.....) およびPMA ($5 \times 10^{-8}M$) で48時間処理したTHP-1細胞 (.....) をそれぞれの抗原に対する抗体を用いて蛍光抗体法を行い、FACSscanで解析した。抗原としてはMac-1 (A)、ICAM-1 (B)、FcR1 (C)、FcR2 (D)、CD14 (E) を選んだ。

(——) は一次抗体なしで蛍光抗体法を行ったコントロールである。



20μm

図 5.2 THP-1細胞とフォルボールエステルによる分化誘導

(A) は未処理のTHP-1細胞 (B) は 10^{-7} MのPDBで2日間処理したTHP-1細胞

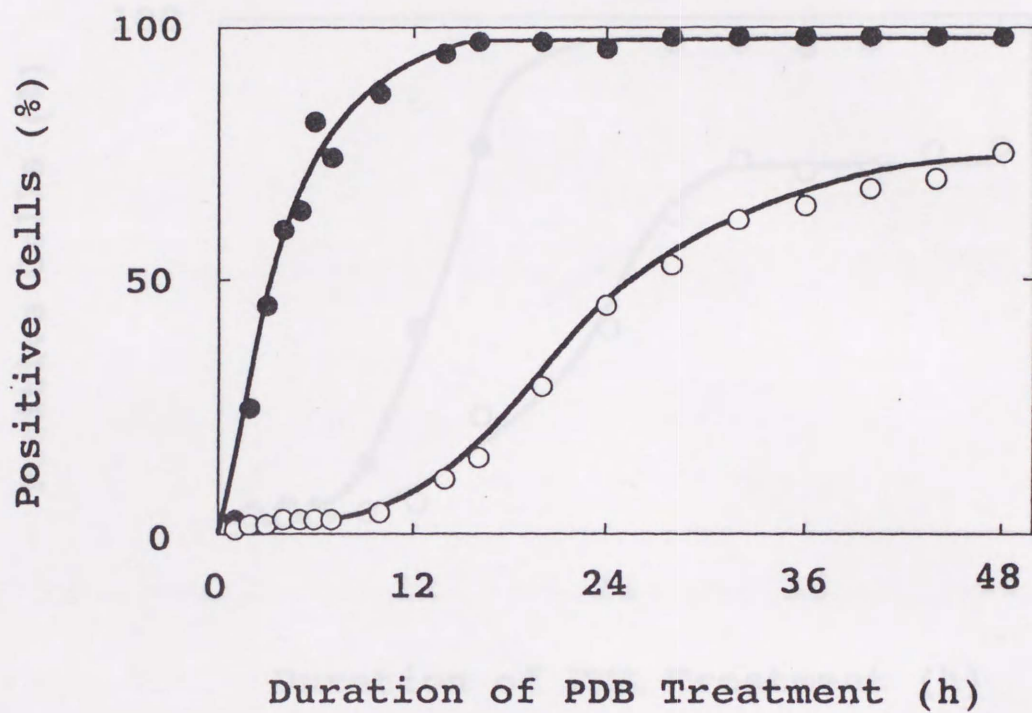


図 5.3 PDB処理によるTHP-1細胞の形態変化

対数増殖期にあるTHP-1細胞をPDB ($10^{-7}M$) で処理し、各時間において接着している細胞 (●) と、伸展している細胞 (○) の割合を測定した。

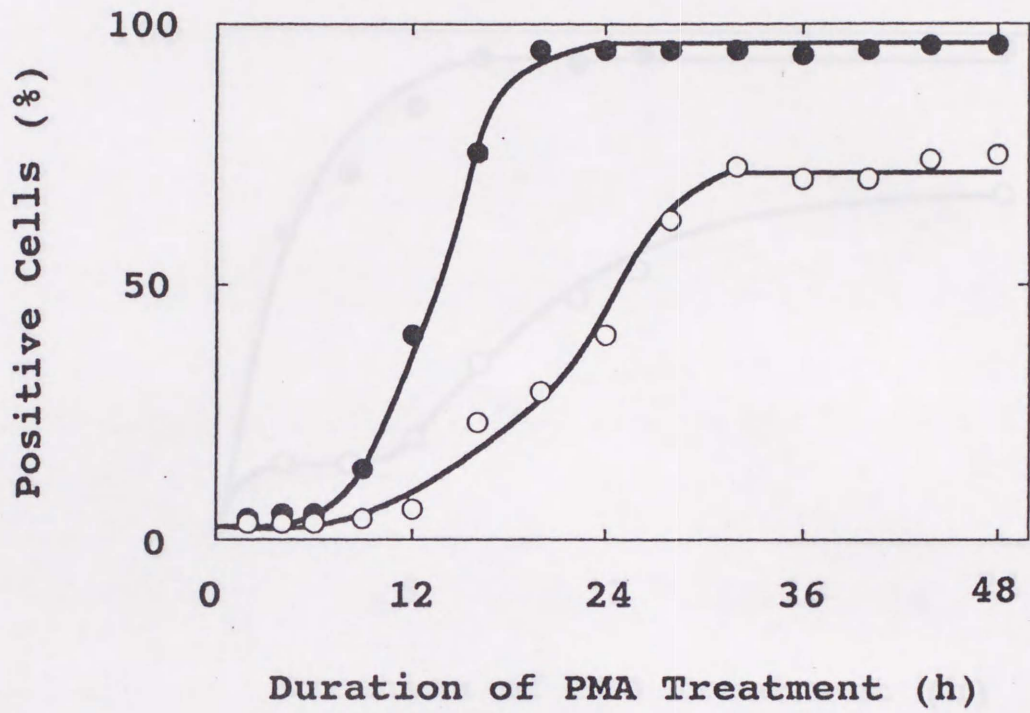


図 5.4 PMA処理によるHL-60細胞の形態変化

対数増殖期にあるHL-60細胞をPMA ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) 処理し、各時間において接着 (●)、伸展 (○) している細胞の割合を測定した。

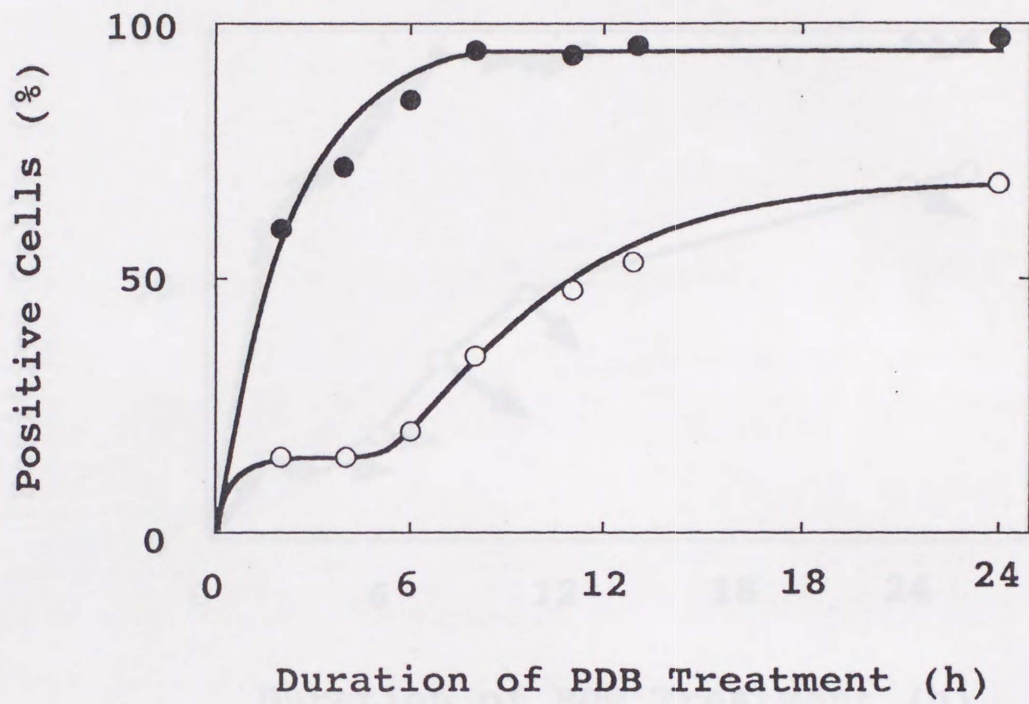


図 5.5 細胞周期を同調したTHP-1細胞のPDB処理による形態変化

2回のアフィジコリン処理で細胞周期を同調したTHP-1細胞をS期よりPDB (10^{-7} M) 処理を開始し、各時間において接着 (●)、伸展 (○) している細胞の割合を測定した。

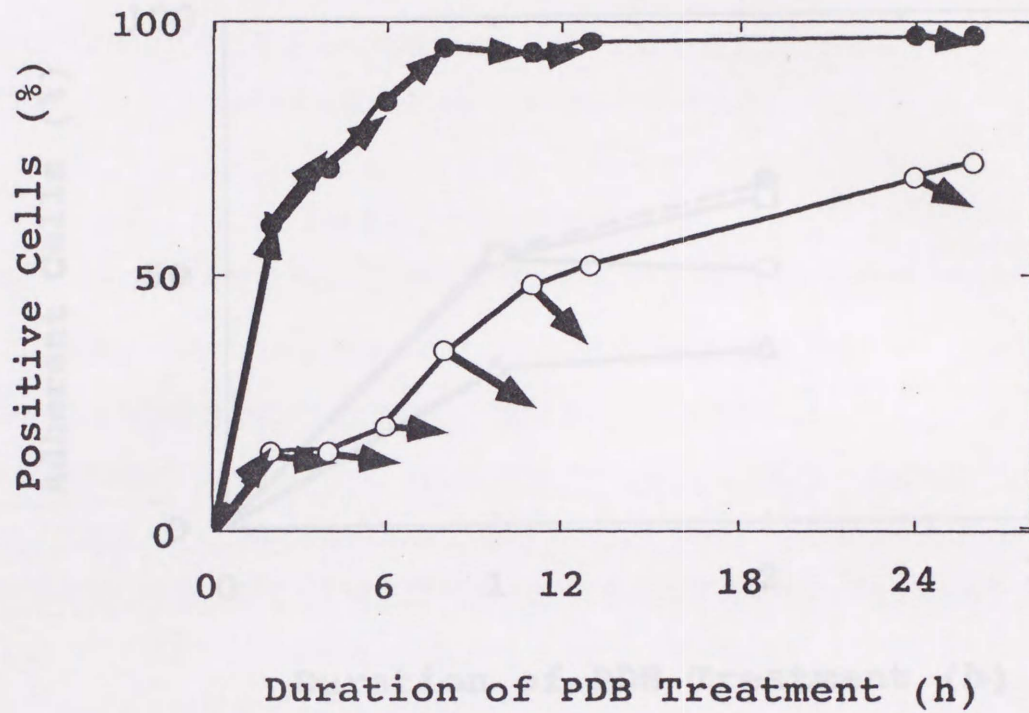


図 5.6 PDB処理によるTHP-1細胞の形態変化に対するAct. Dの効果

2回のアフィジコリン処理で細胞周期を同調したTHP-1細胞をS期よりPDB ($10^{-7}M$) で処理を開始し、接着 (●)、伸展 (○) している細胞を測定した。一方、各時間にAct D ($5\mu g/ml$) を加え、2時間後に接着、伸展している細胞の割合を測定した (矢印)。

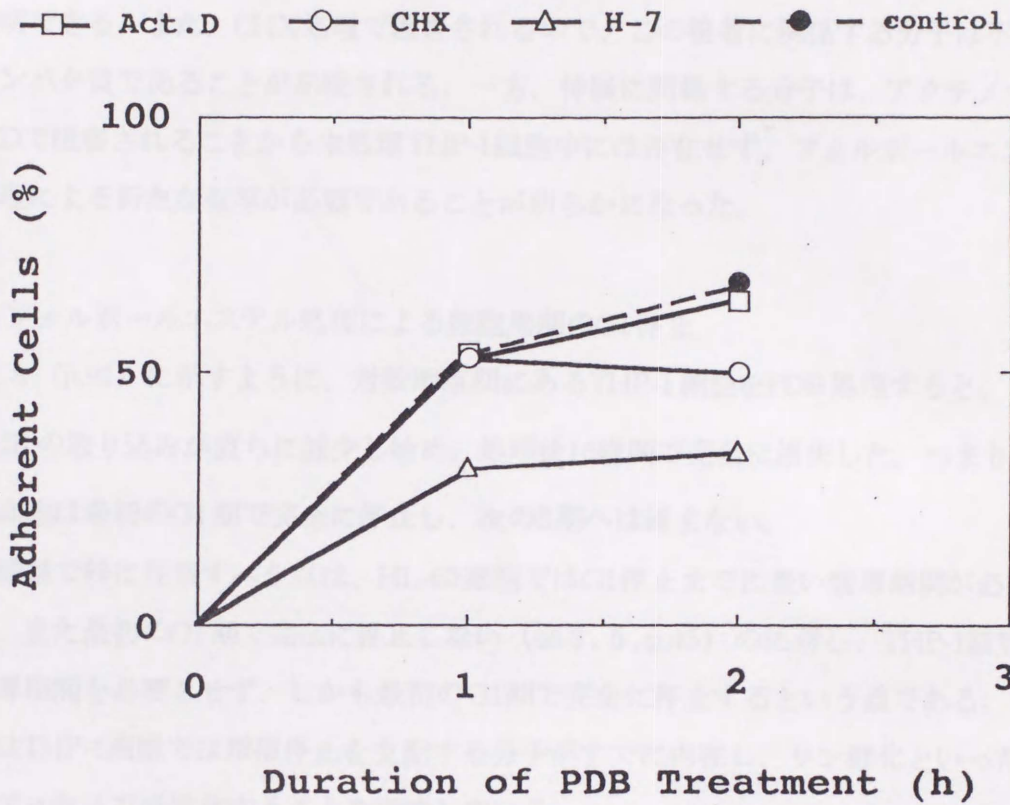


図 5.7 PDB処理による伸展に対する種々の阻害剤の効果

2回のアフィジコリン処理で同調したTHP-1細胞をS期よりPDB (10^{-7} M) 処理し、同時にH-7 ($40\mu\text{M}$: Δ)、CHX ($10\mu\text{g/ml}$: \circ)、Act.D ($5\mu\text{g/ml}$: \square) を同時に加え、各時間に接着している細胞の割合を調べた。(●)はPDB単独処理の結果を示す。

ル処理による接着の誘導に関係する分子は、未処理のTHP-1細胞中でタンパク質として既に発現しており、フォルボールエステル処理で活性化されるPKCでリン酸化され機能的になると考えられる。従って、処理後、誘導期間なしに直ちに接着が始まることが説明できる。また、CHX処理で阻害されるので、この接着に関係する分子は不安定なタンパク質であることが示唆される。一方、伸展に関係する分子は、アクチノマイシンDで阻害されることから未処理THP-1細胞中には存在せず、フォルボールエステル処理による新たな転写が必要であることが明らかになった。

5.3.2 フォルボールエステル処理による細胞周期のG1停止

図5.8 (p.91) に示すように、対数増殖期にあるTHP-1細胞をPDB処理すると、 $[^3\text{H}]$ -TdRの取り込みが直ちに減少し始め、処理後16時間で完全に消失した。つまり、全ての細胞は最初のG1期で完全に停止し、次のS期へは進まない。

この結果で特に注目すべき点は、HL-60細胞ではG1停止までに長い誘導期間が必要であり、また最初のG1期で完全に停止しない(図3.6, p.45)のに対し、THP-1細胞では誘導期間を必要とせず、しかも最初のG1期で完全に停止するという点である。このことはTHP-1細胞では増殖停止を支配する分子がすでに内在し、リン酸化といった簡単なプロセスで活性化することを示唆している。

フォルボールエステルによるTHP-1細胞の分化誘導の可逆性については3.3.1.c(p.51)で既に述べたが、ここでは処理時間を変えて脱分化の重要な側面であるG1/S転移の過程を詳細に調べた。結果を図5.9 (p.92)に示す。興味深いことに $[^3\text{H}]$ -TdRの取り込みの速度過程は明瞭に2段階に分かれており、最初の段階の取り込みは処理時間が長くなると消失し、単に誘導期間として残っている。このような変化の詳細は不明だが、HL-60細胞のフォルボールエステル処理において、G1/S転移に必要なcdc2のmRNA合成は抑制され(北島ら、未発表データ)、Rbは脱リン酸化される(46)ことを指摘しておく。

5.3.3 G1停止の原因物質のPDBによる生成はG1期以前に起る

我々は4.において、細胞周期をG1/S境界に同調したHL-60細胞をフォルボールエス

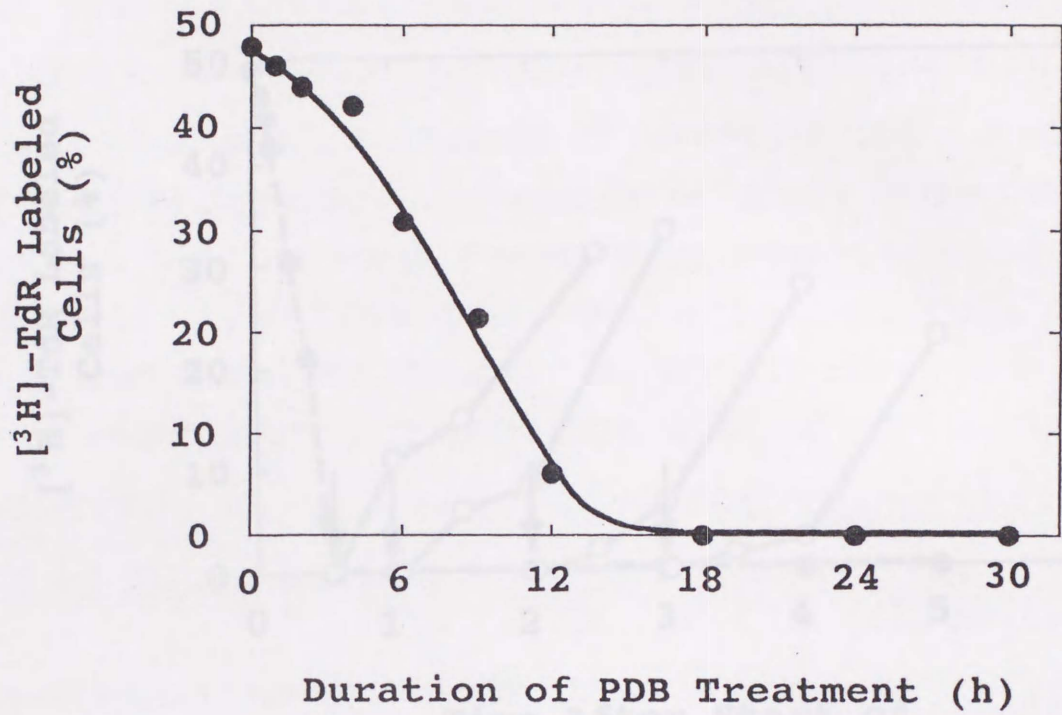


図 5.8 PDB処理によるTHP-1細胞の完全な増殖停止

対数増殖期にあるTHP-1細胞をPDB (10^{-7} M) 処理し、各時間に ^{3}H -TdRでパルスラベルされる細胞の割合を測定した。

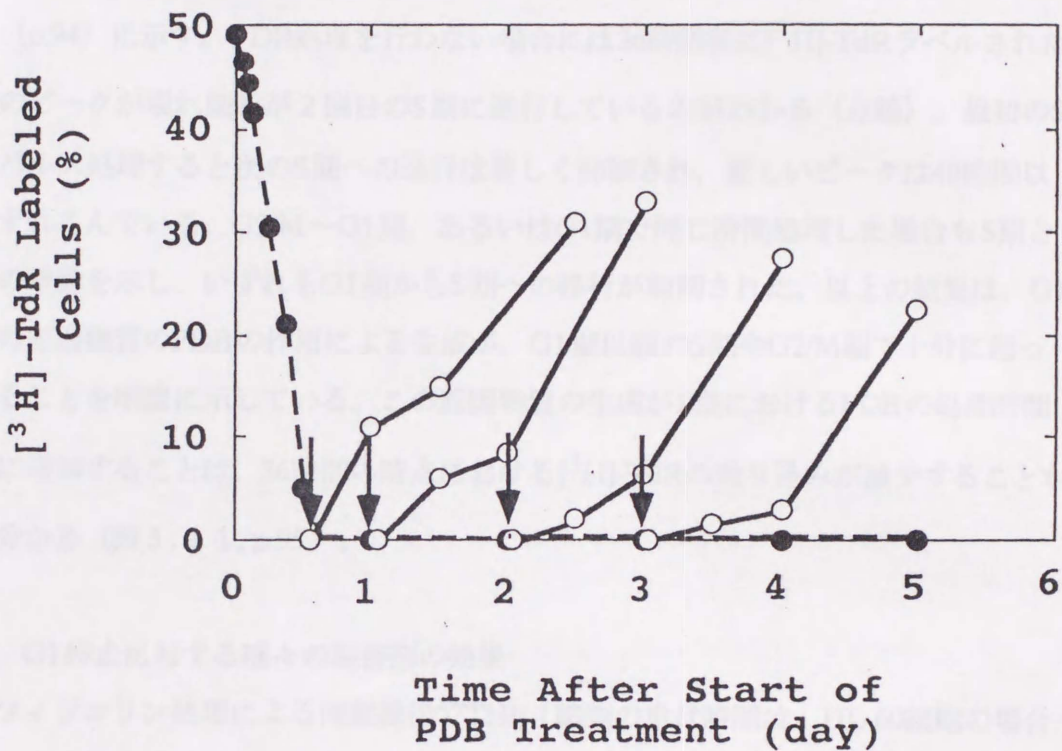


図 5.9 PDB除去に伴うTHP-1細胞の再増殖

対数増殖期にあるTHP-1細胞をPDB ($10^{-7}M$) 処理し、各時点において洗浄した(矢印)。

その後、0、12、24、48時間後に $[^3H]$ -TdRラベルされた細胞の割合を測定した。

テルで処理すると、次のG1期でG1停止が起る前に、S期やG2/M期で既に分化形質が発現していることを示した。図5.8 (p.91) に示したように、THP-1細胞のG1停止は完全に起るので、G1/S境界に同調した細胞を使用すればS期やG2/M期のPDBパルス処理で次のG1期での停止が起るか否かを示すことができる。

S期、G2/M～G1期、G1期において4時間PDBでパルス処理を行った時の結果を図5.10 (p.94) に示す。PDB処理を行わない場合には36時間後に ^3H -TdRラベルされた細胞のピークが現れ細胞が2回目のS期に進行しているのがわかる(点線)。最初のS期でパルス処理すると次のS期への進行は著しく抑制され、新しいピークは48時間以後にずれこんでいる。G2/M～G1期、あるいはG1期で同じ時間処理した場合もS期と同様の挙動を示し、いずれもG1期からS期への移行が抑制された。以上の結果は、G1停止の原因物質のPDBの作用による生成が、G1期以前のS期やG2/M期で十分に起っていることを明瞭に示している。この原因物質の生成がS期におけるPDBの処理時間と共に増加することは、36時間の時点における ^3H -TdRの取り込みが減少することからも分かる(図5.11, p.95)。

5.3.4 G1停止に対する種々の阻害剤の効果

アフジコリン処理による同調操作でTHP-1細胞の世代時間は、HL-60細胞の場合と異なり短くならなかった。

図5.10 (p.94) から分かるように、アフジコリンによりG1/S境界に同調した細胞を使用しS期で4時間PDB処理すると、36時間後のS期への移行が顕著に阻害される。従って、36時間後の ^3H -TdRの取り込みを指標にすると、G1停止に対する阻害剤の効果調べることができ、ひいてはG1停止の原因物質の性質をより明瞭に理解できるであろう。その結果を図5.12 (p.96) に示す。PDB単独でS期において2時間パルス処理を行うと、2回目のS期で ^3H -TdRを取り込む細胞は未処理の場合の46%から23%までに減少した。減少率は50%である。ところがタンパク質合成阻害剤CHXを同時に加えると ^3H -TdRを取り込む細胞は36%となり、CHX単独の場合の51%と比較すると減少率は71%となる。阻害効果は42% (21/50) である。一方、タンパク質リン酸化阻

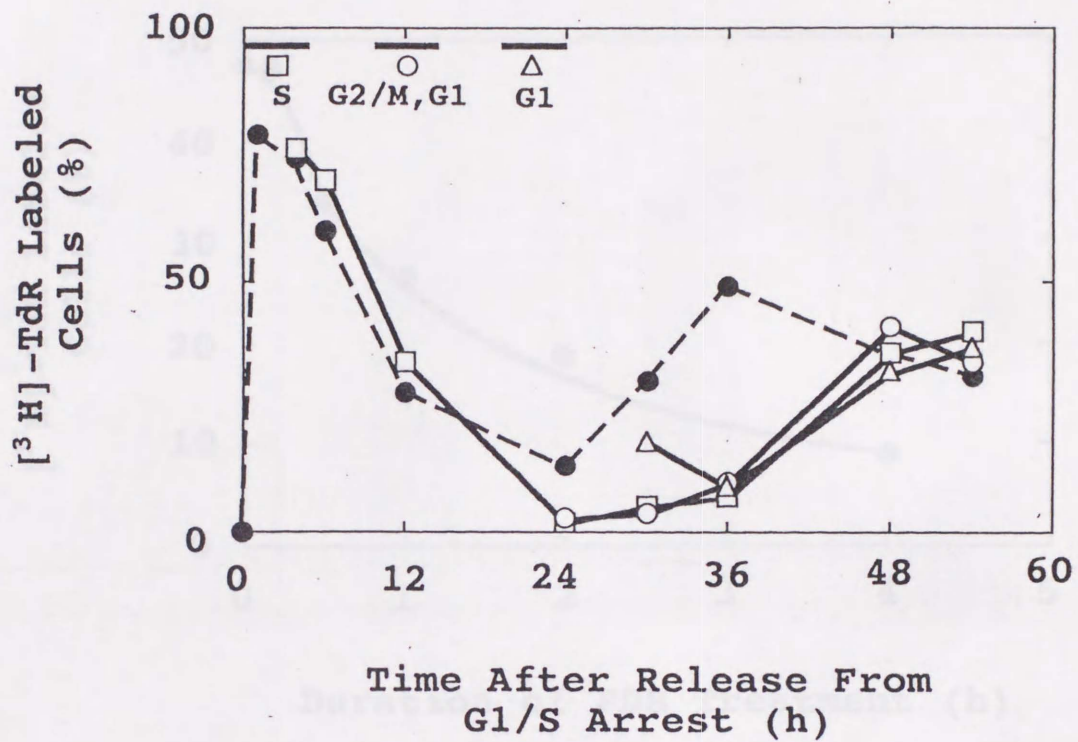


図 5.10 細胞周期に無関係なPDB処理によるG1期停止

アフィジコリン 2 回処理で同調培養を開始したTHP-1をS期 (0~4時間: □)、G2/M期~G1期 (10~14時間: ○)、G1期 (20~24時間: △) において、PDB (10^{-7} M) で4時間パルス処理し、その後の $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込む細胞の割合を測定した。(●)はPDB未処理のコントロールである。

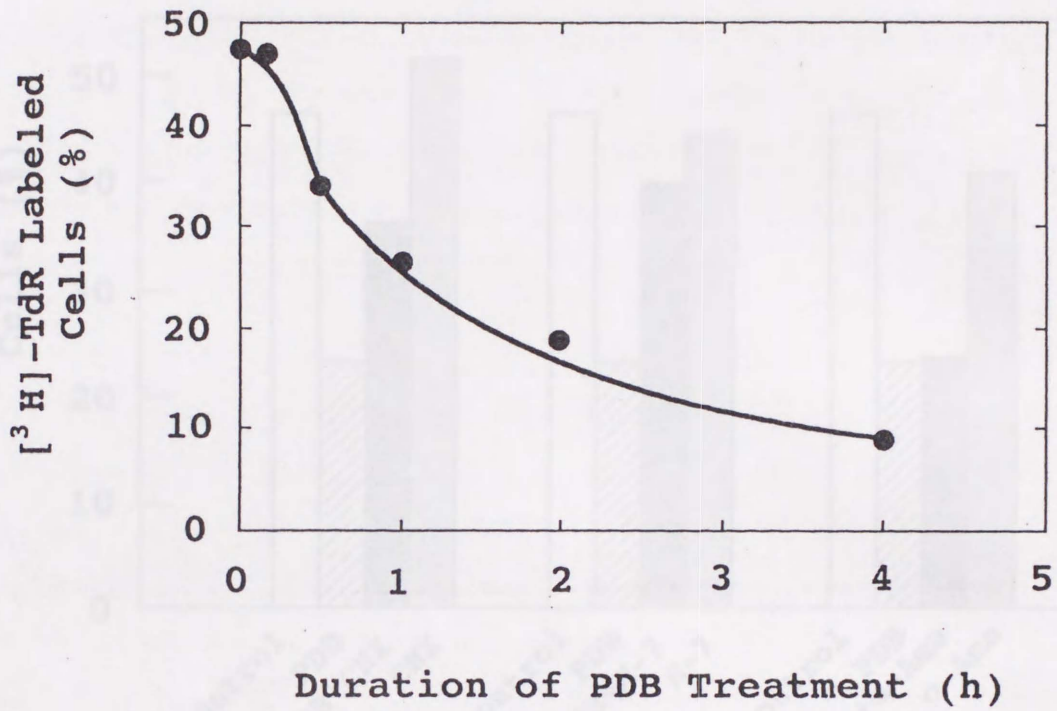


図 5.1 1 PDB処理時間に依存するG1期停止時間

アフジコリン2回処理で細胞周期を同調したTHP-1細胞をS期よりPDB (10^{-7} M) で各時間パルス処理し、36時間後の $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込む細胞の割合を測定した。

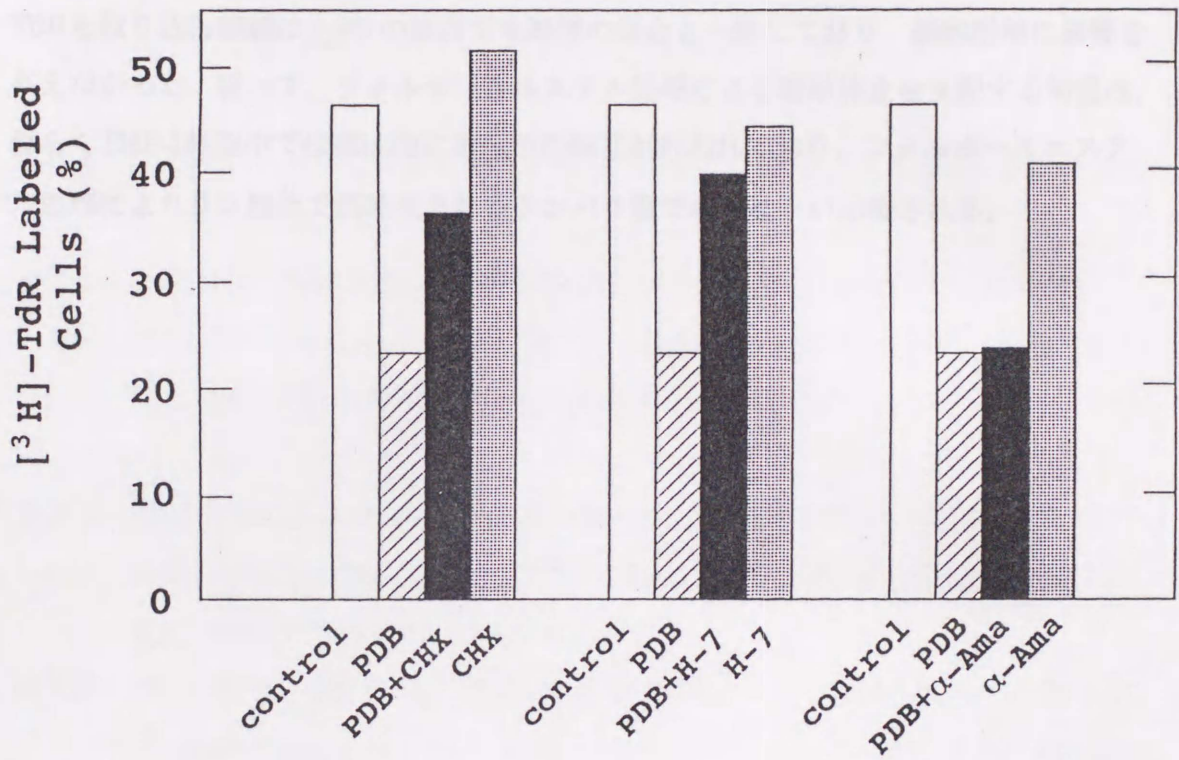


図 5.12 PDB処理によるG1期停止に対する種々の阻害剤の効果

アフィジコリン 2 回処理で細胞周期を同調したTHP-1細胞をS期より、PDB (10^{-7} M) 単独、阻害剤単独、PDB+阻害剤のいずれかで 2 時間パルス処理し、36時間後の $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込む細胞の割合を測定した。使用した阻害剤はCHX ($10\mu\text{g/ml}$)、H-7 ($40\mu\text{M}$)、 α -Ama ($1\mu\text{g/ml}$) である。

害剤H-7を同時に加えると39%となる。H-7単独の場合の44%と比較すると減少率は89%である。従って阻害効果は78% (39/50) となり強く阻害されている。転写阻害剤である α -アマニチンを同時に加えても $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込む細胞は24%で、減少率59%、阻害効果18%となり殆ど阻害されなかった。また、各々の阻害剤単独の処理では $[^3\text{H}]$ -TdRを取り込む細胞は $\pm 5\%$ の誤差で未処理の場合と一致しており、細胞増殖に影響を与えなかった。従って、フォルボールエステル処理による増殖停止を支配する物質は、恐らくTHP-1細胞中では構成的に遺伝子の転写が行われており、フォルボールエステル処理によりリン酸化で活性化されるタンパク質であることが示唆される。

6. 本研究の結論および今後の展望

HL-60細胞やTHP-1細胞を用いた本研究の結果は、発現した分化形質がヒト骨髄性白血病細胞のG1停止を誘導することを強く示唆している。原因となる分化形質の候補として我々はMac-1を考えている。以下にG1停止の原因物質（以後Xと呼ぶ）が満たすべき条件のすべてを、Mac-1が満足していることを証明しよう。

条件1 Xは細胞のG1停止の結果発現するのではなく、G1停止以前の時期から発現しG1停止を誘導する。

検証1 細胞周期を同調したHL-60細胞をフォルボールエステル処理すると、Mac-1はG1停止の前に発現する（本研究）。細胞周期を同調したTHP-1細胞ではS期におけるパルス処理でG1停止が起る（本研究）。

条件2 対数増殖期のHL-60細胞をフォルボールエステル処理するとG1停止までに12時間の誘導期間を必要とするので、HL-60細胞におけるXの生成には高分子合成の過程が介在していると考えられる。

検証2 HL-60細胞をフォルボールエステルで処理すると、mRNA量の増加、タンパク質合成の過程を経てMac-1が発現される（94、96）。また、Mac-1の発現には12時間を要する（本研究）。

条件3 アフィジコリン処理で同調したHL-60細胞には十分量のXが蓄積している。

検証3 同調のためにアフィジコリン処理したHL-60細胞にはMac-1が発現しており、PMAで処理すると最初のG1期で完全に停止する（本研究）。

条件4 対数増殖期にあるTHP-1細胞をフォルボールエステル処理すると誘導期間なしにG1停止が始まり、最初のG1期で完全に停止するので、Xはタンパク質として既に発現している筈である。

検証 4 THP-1細胞ではMac-1が構成的に強く発現している（本研究）。

条件 5 XによるG1停止の誘導にはXのPKCによるリン酸化が必要である。

検証 5 Mac-1の α 鎖は構成的にリン酸化されているが β 鎖はフォルボールエステル処理で初めてリン酸化される（97）。THP-1細胞のPDBによるG1停止はPKCの阻害剤で阻害される（本研究）。

条件 6 KG-1細胞はフォルボールエステル処理でG1停止しない（本研究）。

検証 6 KG-1細胞のMac-1はリガンドである補体C3biを結合できない（98）。

以上のようにXの満たすべき全ての条件をMac-1が矛盾なく満足していることが分かる。現在のところ例外はない。しかし、このように精微な一致も単なる偶然にすぎない可能性は勿論ある。従って、最終的な結論を得るためには、Mac-1を発現していない細胞にMac-1遺伝子を導入し発現させ、リン酸化させた時に実際にG1停止が誘導されるか否かを直接証明しなければならない。

我々の研究室で単離されたHL-60細胞の亜株R53はフォルボールエステルに対して分化耐性を示し、G1停止はしない。しかし、親株と同様にレチノイン酸、活性型ビタミンD₃には応答し、Mac-1を発現することが分かっている。Mac-1を発現した細胞をフォルボールエステルで処理すると直ちに接着、伸展し、G1停止する。つまり、フォルボールエステルはMac-1の転写・翻訳を誘導する機能と発現したMac-1タンパク質のPKCによるリン酸化を活性化する機能を併せ持つが、R53では前者のみが欠損しているのである。従って、この細胞を用いれば上記の実験は可能となる。

外来性遺伝子を発現させる場合、一過的に発現させた細胞を用いる方法と安定な形質転換細胞を用いる方法がある。遺伝子産物の機能が細胞増殖停止である場合は前者のほうが実験は容易である。HL-60細胞に外来性遺伝子を一過的に発現させる方法として、HIV/CMVキメラプロモーターをもつ π H3Mベクターを用いエレクトロポレーション法により導入する方法を我々は既に確立している。この方法によりICAM-1に対

するcDNAを導入すると、20%以上の細胞がICAM-1を発現した。しかし、Mac-1の発現を検出できる導入条件は今のところ確立していない。この条件を確立すればよい。一方、安定な形質転換細胞を用いる場合、使用する発現ベクターはベーサルレベルが低く、誘導可能なプロモーターを持つ必要がある。このようなプロモーターとして、改変したヒトメタロチオネインIIA遺伝子プロモーターやヒートショックプロテイン遺伝子プロモーターを挙げることができる。安定な形質転換細胞を得る過程において、何らかのストレスにより内在性Mac-1遺伝子が発現することが分かっているので注意を要する。このような困難はあるものの、形質転換細胞を用いる実験がより完全な結果を与えることも事実である。

Mac-1の発現とリン酸化が骨髄性白血病細胞のG1停止と分化を誘導することが証明されれば、骨髄性白血病の新しい治療法の開発が可能となる。つまりMac-1を発現させ、リン酸化するという単純明解なストラテジーに沿って必要な薬剤の開発と投与を行えばよいからである。

参考文献

1. Alberts, B. , Bray, D. , Lewis, J. , Raff, M. , Roberts, K. , Watson, J. M. (1989) *Molecular Biology of the Cell* 17章, 2nd ed. , Garland, New York
2. Spangrude, G. J. , Heimfeld, S. , Weissman, I. L. (1988) *Science* **241**, 58-62.
3. Givin, C. I. , Stauss, L. C. , Brovall, C. , Fackler, M. J. , Schwartz, J. F. , Shaper, J. H. (1984) *J. Immunol.* **133**, 157-165.
4. Lee, F. D. (1989) *実験医学* **7**, 1705-1713.
5. Westin, E. H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 2194-2198.
6. 平井久丸 (1991) *実験医学* **9**, 1851-1854.
7. 斎藤政樹 (1987) *実験医学* **5**, 839-846.
8. Collins, S. J. , Gallo, R. C. , Gallagher, R. E. (1977) *Nature* **270**, 347-349.
9. Rovera, G. , Santoli, D. , and Damsky, C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 2779-2783.
10. Bar-Shavit, Z. , Teitelbaum, S. L. , Reitsma, P. , Hall, A. , Pegg, L. E. , Trial, J. , and Kahn, A. J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 5907-5911.
11. Breitman, T. R. , Selonick, S. E. , and Collins, S. J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 2936-2940.
12. Collins, S. J. , Ruscetti, F. W. , Gallagher, R. E. , and Gallo, R. C. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2458-2462.
13. Fischkoff, S. A. , Pollak, A. , Gleich, G. J. , Testa, J. R. , Misawa, S. , and Reber, T. J. (1984) *J. Exp. Med.* **160**, 179-196.
14. Fearon, E. R. , and Vogelstein, B. (1990) *Cell* **61**, 759-767.
15. Collins, S. , Groudine, M. (1982) *Nature* **298**, 679-681.
16. Bos, J. , Verlaan-de Vries, M. , Jansen, A. , Veeneman, G. , van Boom, J. , van der Eb, A. J. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 9155-9163.
17. Wolf, D. , and Rotter, V. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 790-794.
18. Tsuchiya, S. , Yamabe, M. , Yamaguchi, Y. , Kobayashi, Y. , Konno, T. , Tada, K. (1980) *Int. J. Cancer* **26**, 171-176.

19. Tsuchiya, S. , Kobayashi, Y. , Goto, Y. , Okumura, H. , Nakae, S. , Konno, T. , and Tada, K. (1982) *Cancer Res.* **42**, 1530-1536.
20. Ohta, M. , Takaku, F. , Miura, Y. , Kitagawa, S. , and Saito, M. (1988) *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79**, 350-358.
21. Cole, M. D. (1991) *Cell* **65**, 715-716.
22. Alberts, B. , Bray, D. , Lewis, J. , Raff, M. , Roberts, K. , Watson, J. M. (1989) *Molecular Biology of the Cell* 21章, 2nd ed. , Garland, New York
23. Kinzler, K. W. , Zehnbaauer, B. A. , Brodeur, G. M. , Seeger, R. C. , Trent, J. M. , Meltzer, P. S. , and Vogelstein, B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 1031-1035.
24. Favera, R. D. , Wong-Staal, F. , and Gallo, R. C. (1982) *Nature* **299**, 61-63.
25. Salehi, Z. , Taylor, J. D. , and Niedel, J. E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1898-1903.
26. Holt, J. T. , Redner, R. L. , and Nienhuis, A. W. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 963-973.
27. Yokoyama, K. , and Imamoto, F. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7363-7367.
28. Griffin, J. , Munroe, D. , Major, P. , and Kufe, D. (1982) *Exp. Hematol.* **9**, 774-781.
29. Muller, R. , Curran, T. , Muller, D. , and Guilbert, L. (1985) *Nature* **314**, 546-548.
30. Shimizu, N. , Ohta, M. , Fujiwara, C. , Sagara, J. , Mochizuki, N. , Oda, T. , and Utiyama, H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12157-12161.
31. Shimizu, N. , Ohta, M. , Fujiwara, C. , Sagara, J. , Mochizuki, N. , Oda, T. , and Utiyama, H. (1992) *J. Biochem.* **111**, 272-277.
32. Sukhatme, V. P. , Cao, X. , Chang, L. C. , Tsai-Morris, C.-H. , Stamenkovich, D. , Ferreira, P. C. , Cohen, D. R. , Edwards, S. A. , Shows, T. B. , Curran, T. , Le Beau, M. M. , and Adamson, E. D. (1988) *Cell* **53**, 37-43.
33. Milbrandt, J. (1987) *Science* **238**, 797-799.
34. Rozengurt, E. (1986) *Science* **234**, 161-166.
35. Collins, S. J. (1987) *Blood* **70**, 1233-1244.
36. Kaibuchi, K. , Takai, Y. , Nishizuka, Y. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7146-7149.
37. Nishizuka, Y. (1986) *Science* **233**, 305-312.

38. Kikkawa, U. , Takai, Y. , Tanaka, Y. , Miyake, R. , Nishizuka, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11442-11445.
39. Yamanishi, J., Takai, Y. , Kaibuchi, K. , Sano, K. , Castagna, M. , and Nishizuka, Y.(1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 778-786.
40. Nishikawa, M. , Komada, F. , Uemura, Y. , Hidaka, H. , and Shirakawa, S. (1990) *Cancer Res.* **50**, 621-626.
41. Aihara, H. , Asaoka, Y. , Yoshida, K. , and Nishizuka, Y. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 11062-11066.
42. Lee, W.-H. , Bookstein, R. , Hong, F. , Young, L.-J. , Shew, J.-Y. , Lee, E. Y.-H. P. (1987) *Science* **235**, 1394-1399.
43. Weinberg, R. A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 199-201.
44. Hong, F. D. , Huang, H.-J. S. , To, H. , Young, L.-J. S. , Oro, A. , Bookstein, R. , Lee, E. Y.-H. P. , and Lee, W.-H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5502-5506.
45. Goodrich, D. W. , Wang, N. P. , Qian, Y.-W. , Lee, E. Y.-H. P. , and Lee, W.-H. (1991) *Cell* **67**, 293-302.
46. Chen, P.-L. , Scully, P. , Shew, J.-Y. , Wang, J. Y. J. , and Lee, W.-H. (1989) *Cell* **58**, 1193-1198.
47. 山田道之、橋中一也 (1991) *蛋白質・核酸・酵素* **36**, 41-53.
48. Fontana, J. A. , Colbert, D. A. , and Deisseroth, A. B. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 3863-3866.
49. Yen, A. , Forbes, M. , DeGala, G. , and Fishbaugh, J. (1987) *Cancer Res.* **47**, 129-134.
50. Thayer, M. J. , Tapscott, S. J. , Davis, R. L. , Wright, W. E. , Lassar A. B. and Weintraub, H. (1989) *Cell* **58**, 241-248.
51. 柏木登、大谷文男 (1985) *図説免疫—免疫応答のしくみ—* 日経サイエンス社
52. Hammond IV, W. P. , Price, T. H. , Souza, L. M. , Dale, D. C. (1989) *New England J. Med.* **320**, 1306-1311.
53. Metcalf, D. , Elliott, M. J. , and Nicola, N. A. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 877-884.

54. Cannistra, S. A. , and Griffin, J. D. (1988) *Semi. in Hematol.* 25, 173-188.
55. Blau, H. M. (1989) *Trends in Genetics* 5, 268-272.
56. Rovera, G. , Olashaw, N. , and Meo, P. (1980) *Nature* 284, 69-70.
57. Daniel, C. P. , Parreira, A. , Goldman, J. M. , and McCarthy, D. M. (1987) *Leukemia Res.* 11, 191-196.
58. Lee, L.-S. , and Weinstein, I. B. (1978) *J. Enviroment. Pathol. and Toxicol.* 1, 627-639.
59. Cooper, R. A. , Braunwald, A. D. , and Kuo, A. L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2865-2869.
60. Hynes, R. O. (1992) *Cell* 69, 11-25.
61. Miyaura, C. , Abe, E. , Kuribayashi, T. , Tanaka, H. , Konno, K. , Nishii, Y. , and Suda, T. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 937-943.
62. 松田浩則、八木田秀雄 (1988) *実験医学* 6, 943-952.
63. Breitman, T. R. , Collins, S. J. , and Keene, B. R. (1980) *Exp. Cell Res.* 126, 494-498.
64. Hensel, G. , Mannel, D. N. , Pfizenmaier, K. , and Kronke, M. (1987) *Lymphokine Res.* 6, 119-125.
65. Kurata, N. , Sawada, M. , Ito, Y. , and Marunouchi, T. (1987) *Jpn. J. Cancer. Res. (Gann)* 78, 219-222.
66. Griffin, G. E. , Leung, K. , Folks, T. M. , Kunkel, S. , and Nabel, G. J. (1989) *Nature* 339, 70-73.
67. Simmons, D. , Makgoba, M. W. , and Seed, B. (1988) *Nature* 331, 624-627.
68. Wertheimer, S. J. , Myers, C. L. , Wallace, R. W. , and Parks, T. P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 12030-12035.
69. Dustin, M. L. , Rothlein, R. , Bhan, A. K. , Dinarello, C. A. , and Springer, T. A. (1986) *J. Immunol.* 137, 245-254.
70. 喜多靖夫、堀内正 (1992) *実験医学* 10、1414-1419.
71. Butcher, E. C. (1991) *Cell* 67, 1033-1036.
72. Rothlein, R. , Dustin, M. L. , Marlin, S. D. , and Springer, T. A. (1986) *J. Immunol.* 137, 1270-

- 1274.
73. Elias, L. (1988) *J. Cell. Physiol.* **136**, 95-102.
 74. Koeffler, H. P. , and Golde, D. W. (1978) *Science* **200**, 1153-1154.
 75. Lozzio, C. B. , and Lozzio, B. B. (1975) *Blood* **45**, 321-333.
 76. Sundstrom, C. , and Nilsson, K. (1976) *Int. J. Cancer* **17**, 565-577.
 77. Hass, R. , Giese, G. , Meyer, G. , Hartmann, A. , Dork, T. , Kohler, L. , Resch, K. , Traub, P. , Goppelt-Strube, M. (1990) *Eur. J. Cell Biol.* **51**, 265-271.
 78. Oshima, M. , Koizumi, S. , Fujita, K. , and Guroff, G. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20811-20816.
 79. Kosaka, M. , Nishina, Y. , Takeda, M. , Matsumoto, K. , and Nishimune, Y. (1991) *Exp. Cell Res.* **192**, 46-51.
 80. Tarella, C. , Ferrero, D. , Gallo, E. , Pagliaridi, G. L. , and Ruscetti, F. W. (1982) *Cancer Res.* **42**, 445-449.
 81. Konieczny, S. F. , and Emerson, Jr. C. P. (1984) *Cell* **38**, 791-800.
 82. Shima, H. , Nakayasu, M. , Aonuma, S. , Sugimura, T. , and Nagao, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 7442-7445.
 83. Davis, R. L. , Weintraub, H. , and Lassar, A. B. (1987) *Cell* **51**, 987-1000.
 84. Lassar, A. B. , Buskin, J. N. , Lockshon, D. , Davis, R. L. , Apone, S. , Hauschka, S. D. , and Weintraub, H. (1989) *Cell* **58**, 823-831.
 85. Furukawa, Y. , DeCaprio, J. A. , Freedman, A. , Kanakura, Y. , Nakamura, M. , Ernst, T. J. , Livingston, D. M. , and Griffin, J. D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2770-2774.
 86. 為本浩至 (1990) *実験医学* **8**, 1333-1339.
 87. 古川雄祐、大田雅嗣 (1992) *実験医学* **10**, 881-887.
 88. *体細胞遺伝学実験法 蛋白質・核酸・酵素 別冊* (1984) 共立出版
 89. Pedrali-Noy, G. , and Spadari, S. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**, 1194-1202.
 90. Heintz, N. , Sive, H. L. , and Roeder, R. G. (1983) *Mol. Cell. Biol.* **3**, 539-550.
 91. Murate, T. , Kagami, Y. , Hotta, T. , Yoshida, T. , Saito, H. , and Yoshida, S. (1990) *Exp. Cell Res.* **191**, 45-50.

92. Benezra, R. , Davis, R. L. , Lockshon, D. , Turner, D. L. , and Weintraub, H. (1990) *Cell* **61**, 49-59.
93. Kreider, B. , Benezra, R. , Rovera, G. , Kadesch, T. (1992) *Science* **255**, 1700-1702.
94. Hickstein, D. D. , Back, A. L. , and Collins, S. J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 21812-21817.
95. Miller, L. J. , Bainton, D. F. , Borreguard, N. , and Springer, T. A. (1987) *J. Clin. Invest.* **80**, 535-544.
96. Hickstein, D. D. , Smith, A. , Fisher, W. , Beatty, P. G. , Schwartz, B. R. , Harlan, J. M. , Root, R. K. , and Locksley R. M. (1987) *J. Immunol.* **138**, 513-519.
97. Chatila, T. A. , Geha, R. S. , and Arnaout, M. A. (1989) *J. Cell. Biol.* **109**, 3435-3444.
98. Dana, N. , Todd III, R. F. , Colten, H. R. , and Arnaout, M. A. (1987) *J. Immunol.* **138**, 3549-3554.

(注) 即ち、実際の生理的機能と異なる観点でクローニングされた遺伝子からその生理的機能を解明するというアプローチは非常に難しいのである。例えばガン原遺伝子はガンウイルスの持つガン遺伝子と相同性を持つものとしてクローニングされたのだが、既に多くのグループによって長い年月研究されているにもかかわらず、その生理的機能は未だ十分解明されたとはいえない。そこで新しいアプローチとして、遺伝子の生理的機能を指標にしてスクリーニングを行う expression cloning が必要となる。この方法により、HL-60細胞の分化を支配する遺伝子のクローニングに成功するためにはフォルボールエステル処理によるHL-60細胞の分化過程を詳細に調べ、目的の遺伝子のmRNA (転写) が介在している過程を同定することが必要である。しかし、HL-60細胞に関しては、現在このような研究は全く行われていない。繊維芽細胞から筋芽細胞への分化を詳細に調べ、分化を支配する遺伝子のクローニングに成功した例として MyoD1の研究があげられる (83)。

謝辞

本研究は、1987年から1992年の間に広島大学総合科学部内山研究室で行われてきたものであります。この間、研究生活全てにわたっての御指導、御激励とともに学問研究の感興とそれに携わる者の姿勢を身をもって御教示賜りました広島大学総合科学部教授 内山敬康先生に深く感謝いたします。また、天野 實先生、蔵本 淳先生、上領達之先生、清水典明先生には本論文作成に際して貴重な御意見と温かい励ましの御言葉を賜りましたことを心より感謝いたします。河原 明先生、平野哲男先生、相良 淳二博士、大黒一哉博士、Mirian H. Honda Federico 博士には種々の実験技術を御指導していただくとともに貴重な御助言と御意見を賜りましたことを篤く御礼申し上げます。また、抗ICAM-1抗体を供与していただきました米国・ハーバード大学の Timothy A. Springer 博士に御礼申し上げます。

常に励ましの言葉をかけてくださるとともに気持ちのよい研究環境を整えてくださいました大田素子さん、古谷まゆみさん、化学系および生物系の皆様方に感謝いたします。

最後に内山研究室の太田光栄さん、坂本和也さん、米本健治さん、藤原千絵さん、Md. Masudul Haqueさん、北島健二さん、吉田真嗣さん、由見里恵さん、吉棟尚美さん、門田卓美さんには、研究に御協力いただき、また素晴らしい日々を共に過ごさせていただいたことに感謝いたします。