

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*

小田 司**

広島大学大学院生物圏科学研究科

The Mechanism of Phorbol Ester-Induced Differentiation of Human
Myelocytic Leukemia Cells

Tsukasa ODA

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University
Hiroshima 730, Japan

要 旨

ヒト骨髄性白血病細胞は、発ガンプロモーターであるフォルボールエステル処理により増殖を停止し、マクロファージ様の細胞へと分化する。この事実は多くの研究者の注目するところとなり、血液細胞分化の分子機構の解明、あるいは骨髄性白血病の治療法の開発のモデル系として多くの研究が行われてきた。しかし、これらの課題は未だ殆んど解決されていない。実際、この分化誘導に伴う転写レベルの変化（例えば *c-fos* や *ETR101* などの早期応答遺伝子の発現の増強やガン遺伝子 *c-myc* の発現の抑制など）やタンパク質レベルの変化（例えば、フォルボールエステルの細胞内レセプターであるプロテインキナーゼCの活性化やガン抑制遺伝子である *Rb* 遺伝子産物の脱リン酸化など）に関する多数の報告があるが、これらの変化が分化形質の発現や増殖停止と具体的にどのように関連しているかは全く明らかにされていない。しかし、これらの問題を議論する前に、まず研究せねばならない基本的で重要な疑問が残されている。

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。一般に細胞はG1期で増殖を停止し、分化形質を発現するといわれている。フォルボールエステルによるヒト骨髄性白血病細胞の分化においても、G1期での増殖停止が分化形質の発現を誘導しているのだろうか。あるいは逆に分化形質の発現が細胞増殖の停止を誘導することはないのだろうか。

もう一つは、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。もし、非可逆的な分化であれば、コミットメント（運命づけ）という過程が存在するはずである。そうすれば、その時期に焦点を当てて調べていくことにより、分化を決定している分子の同定が可能となる。もし可逆的な分化であればコミットメントという過程を云々することは無意味であり、細

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第19巻（1993）

* 広島大学審査学位論文

口頭発表日 1993年2月17日、学位取得日 1993年3月25日

** 現在の所属：Harvard University, Dana-Farber Cancer Institute, 博士研究員,
44 Binney Street, Boston, MA 02115, U. S. A.

胞増殖の停止や分化形質の発現を支配している分子は、フォルボールエステル存在下でのみ発現、あるいは活性化しているだけである。

本研究では2種の分化段階の異なる細胞を用いて上記の疑問を解決した。以下にその研究成果の概要を説明する。

1. 細胞増殖の停止は分化形質発現の必要条件ではない。

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 はフォルボールエステル的一种である TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 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、G1期にあるものは次のS期に入らずそのままG1期で細胞増殖を停止することが報告されている。それゆえ、もし、G1期での増殖停止が分化形質の発現に必須なら、G1期にはいつからTPA処理された細胞のほうが、DNA合成の過程があるため増殖停止までに時間のかかるS期処理の細胞に比べて、分化形質をいち早く発現してくるはずである。この真偽を確かめる実験を行うには、充分に同調された細胞が必要であるが、DNA合成阻害剤であるアフィジコリンで2回処理することによりG1/S境界に同調することができた。この同調したHL-60細胞をS期、あるいはG1期において別個にTPA処理を開始し、4つの分化形質 (ICAM-1 (細胞間接着分子)、Mac-1 (補体レセプター-type3)、dish底面への接着、伸展) の発現の経時変化を調べた。その結果は、意外にもS期処理、G1期処理の細胞の間で各々の分化形質発現の時間変化に全く違いは無かった。つまり、HL-60細胞は細胞増殖が停止しているか否かに関係なく、TPA処理後、一定時間を経て各々の分化形質を同じように発現してきたのである。以上の結果より、フォルボールエステルによる分化形質の発現には細胞増殖の停止が必ずしも必要ではなく、どの細胞周期にある細胞でも差の無いことが明らかになった。

2. コミットメントの過程は存在しない。

コミットメントの過程があれば細胞を分化誘導剤で一定時間処理すると、たとえ培地から分化誘導剤を除去しても細胞は非可逆的に分化するように運命づけられる。従って、HL-60細胞をフォルボールエステルで一定時間処理した後、細胞からフォルボールエステルを除去しても細胞は分化形質を発現したままで留まり、再び増殖を示さないはずである。細胞から容易に除去できるフォルボールエステルPDB (phorbol-12, 13-dibutyrate) を用いて実験を行った結果、たとえ長時間HL-60細胞をPDB処理しても、一旦、PDBを除くとHL-60細胞は必ず増殖を再開し、あらゆる分化形質 (ICAM-1、Mac-1、接着、伸展、貪食能) を消失し、最終的には元の未分化のHL-60細胞と同じ状態に戻った。特に注目には値するのは、ICAM-1やMac-1を発現し、貪食能を示す細胞でさえDNA合成を開始することである。PDBの代りにTPAを用いても同様の結果が得られた。更にHL-60細胞より分化段階の進んだヒト単球性白血病細胞THP-1を用いて実験を行っても、HL-60細胞と同様の結果が得られた。以上の結果より、フォルボールエステルによるヒト骨髄性白血病細胞の分化誘導には、コミットメントという過程は存在しないことが明らかになった。ヒト骨髄性白血病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り、脱癌化は起こっていないのである。このことは、*cdc* 2キナーゼmRNAの発現がフォルボールエステル処理では完全に停止しないことから支持される。

3. 分化形質の発現が細胞増殖停止の原因である可能性が高い。

ヒト骨髄性白血病細胞はフォルボールエステル処理で非可逆的な増殖停止は示さないが、その存在下では増殖を停止したままである。増殖停止を支配する分子はフォルボールエステル存在下で発現、あるいは活性化しているものと考えられるが、特定の細胞周期上でのみ生じている現象なのだろうか。アフィジコリンで2回同調したTHP-1細胞をS期でPDBパルス処理した結果、細胞は次

のG1期で一時的に増殖を停止した。G2/M・G1期、あるいはG1期でPDBパルス処理したTHP-1細胞も同様にG1期で一時的に増殖を停止した。また、このG1期での増殖停止時間はPDB処理時間に依存していた。つまり、フォルボールエステルによる細胞増殖の停止は細胞周期に関係なく、その処理時間のみ依存しているのである。次に種々の阻害剤を用いて、PDB処理によるG1期での増殖停止の阻害を調べた。その結果、転写阻害剤である α -アマニチンでは阻害されなかったが、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド、プロテインキナーゼCによるタンパク質リン酸化阻害剤H-7では阻害された。フォルボールエステルによる増殖停止を支配する分子はフォルボールエステルにより誘導発現する不安定なタンパク質で、それがリン酸化されることによって活性化し、G1期での増殖停止を誘導しているものと考えられる。従って、G1期での増殖停止が分化形質の発現を誘導しているのではなく、逆に分化形質の発現がG1期での増殖停止の原因であることが明瞭に結論される。このことは、1. で述べた結果によっても支持される。