

HL-60 細胞の培養あるいは分化誘導に伴う *c-myc* 遺伝子の増幅部位の変化と移動

モハメッド マスドル ハク

広島大学大学院生物圏科学研究科

Changes and Movements of the Locus of Amplified *c-myc* Genes in HL-60 Cells during Culture or Differentiation Induction

Md. Masudul HAQUE

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan

要 旨

ヒト骨髄性白血病細胞HL-60は、1977年に株化されて以来、癌細胞の分化誘導や増殖停止の研究のモデル系として注目され、多数の研究が世界中で行われてきた。その主な理由は、1) 最も典型的なガン遺伝子*c-myc*の増幅と大量発現、2) 最も典型的なガン抑制遺伝子*p53*のヌル変異、3) 自然に分化し増殖停止する細胞の存在、4) 薬剤処理による種々の細胞系譜への分化誘導と増殖の停止、などである。

しかしながら、本質的に重要な多くの問題が今なお未解決のまま残されている。HL-60に関する古くからの疑問として“*in vitro* の培養において継代とともに細胞の性質が変化するが、その分子機構は何か?”ということがある。例えば、1) 増殖速度が大きくなる、2) 自然に分化する細胞の割合が減少する、3) 細胞あたりのdouble minute(Dmin)の数が減少する、などである。Dminとは、*c-myc*遺伝子が増幅している染色体外構造である。また、内山研究室における最近の研究から生じた新たな疑問として、1) “薬剤による分化や増殖停止の誘導は本当に非可逆過程か?” (薬剤を除去しても元にもどらないか?) 2) “増幅した*c-myc*遺伝子、あるいは*c-myc*が存在するDminが微小核に取り込まれ、細胞外に排出されることが、本当に細胞の分化の引き金になっているのか?” などがある。

本研究では、HL-60細胞の中に存在する*c-myc*遺伝子の全ての存在部位を明らかにした。その結果、細胞核内に存在する新しい染色体外構造や、細胞質におけるDminの存在を発見するとともに、上記の一見たがいに全く関係がないように見える全ての疑問を、統一かつ合理的に説明することに成功した。

本研究の主な実験結果と結論 (その1) は、HL-60細胞の核にある、通常の染色体やDminとは別のAbnormally Staining Tiny Chromosome (ASTCと略)と命名した新しい構造体の発見に関する

ことである。ASTCには次のような特徴がある。

1) 継代数の低い細胞には、200個に1個ぐらいの割合でしか存在しない。一方、全ての細胞はDminをもち、細胞あたりの平均の数は約8個である。2) ASTCはDminとちがって対になっていない。3) Dminには動原体がなく、微小核の形成を介して細胞外に排出される。4) ASTCにも動原体は検出されない。しかし、微小核を通じて排出されることもない。5) 継代を続けるとASTCを持つ細胞が増え、細胞あたりのDminの数が減っていく。継代数100では全ての細胞にはASTCがあり、Dminはあってもその数はごくわずかである。ASTCのモード数は2であり5をこえることはない。6) Dminだけを持ち、ASTCをもたない細胞は自然に分化する。したがって、自然分化する細胞の割合は継代とともに減少するわけである。7) Dminだけを持つ細胞の薬剤処理による分化は非可逆である。しかし、ASTCが一つでもあると、細胞はもはや自然分化しないし、薬剤処理による分化も可逆である。8) 全ての細胞がASTCを持つ継代数の高い細胞の増殖速度は大きい。継代を続けると、ASTCを持つ細胞の割合が増えるので増殖速度も大きくなるのである。

おもな実験結果と結論(その2)として、ASTCがなく、Dminのみを持つHL-60細胞では、「自然分化や薬剤処理による非可逆的な分化誘導は、*c-myc*遺伝子の細胞外への排出によるものではない」ことを実験で明確に証明した。大要はつぎの通りである。

1) 分化した細胞では、増幅している*c-myc*遺伝子の一部(約2/3)が細胞外に排出されるが、1/3は残っている。残っている*c-myc*遺伝子の存在部位は、染色体上では8番染色体にある正常遺伝子座だけであり、染色体外ではDminだけである。2) 細胞核内のDminを正確に定量するために、本研究では新しい実験法を開発して使用している。3) 分化した細胞および未分化の細胞のそれぞれについて、*c-myc*プローブを用いて各細胞あたりのDminの数の分布を調べた。その結果、Dminの数が大幅に減少しているにもかかわらず分化していない細胞があることがわかった。逆に、分化しているにもかかわらずいぜんとして多くのDminを含む細胞があることもわかった。4) つまり、これまでの研究で中村らが予想していたように、*c-myc*遺伝子の数の減少と分化の間には相関がないことが示された。

以上の実験結果、および分化した細胞の再増殖の実験結果をもとに、HL-60細胞株に関する古くからの疑問、および最近の研究の結果から生じた新たな疑問を統一的に説明できる簡単なモデルを提出している。(その1)は「パッセージの低いHL-60で、ASTCを含まない細胞の分化誘導」に関することである。1) 染色体外遺伝子として*c-myc*があるが、これとは別に、分化(インテグリンMac-1の活性化による細胞接着の潜在的能力の獲得)を阻害する遺伝子が存在する。本研究では、これをActivated Adherence Inhibitor(AAIと略)と呼んでいる。2) AAIは、染色体外の独立した構造体の中にある。これは、増幅している*c-myc*遺伝子が存在するDminとは別のものである。3) AAIは転写されているはずである。また、*c-myc*とちがって薬剤処理により転写は抑制されないと考えられる。AAI遺伝子が微小核により核から除かれた細胞は、自然分化であれ薬剤処理による分化誘導であれ、非可逆的に増殖を停止する。4) このとき、*c-myc*を含むDminも一緒に除かれるが、分化誘導とは無関係である。ただし、*c-myc*を含むDminの数はAAIの存在する構造体の数よりも多いと考えられるので、*c-myc*を含むDminの排除も大規模に起こる。5) AAIの除去による細胞の分化は、非可逆的であり、その結果、細胞に残っている*c-myc*遺伝子のプロモーターのクロマチン構造も非可逆的に不活性化される。6) 薬剤処理をすると、「まず薬剤により*c-myc*遺伝子の転写が抑制され、それによって細胞の増殖が阻害される。その結果、S期における核の出芽による微小核形成が誘導され、AAI遺伝子の排出がおこる。」このことが分化誘導の直接の原因である。7) アンチセンス*c-myc*オリゴヌクレオチドを用いた分化誘導は、「分化の原因は*c-myc*遺伝子の転写抑

制である」というこれまでの誤った考え方を直接支持する最も有力な実験的証拠となっていた。しかし、本当の原因は、6)と同様に、アンチセンス*c-myc*オリゴヌクレオチドによる*c-myc*遺伝子の発現抑制、および、その結果起こる増殖阻害による微小核形成の促進とAAI遺伝子の排出である。8) AAI遺伝子を含む構造体は、適当なプローブがないので光学顕微鏡では見えないわけである。プローブが手に入ってもサイズが小さくて見えない可能性もある。いずれにしても、はだかのエピソードではなくタンパク質と複合体を形成しているものと考えられる。

さらに、「ASTCの生成機構、およびHSRへの変化」に対して簡単なモデル(その2)を提出している。1) ASTCは、*c-myc*を含むDminDNAの配列と、AAIを含む構造体DNAの配列との間のrecombinationにより形成される。Dminを構成する2つの要素が一緒に組み込まれる可能性、あるいは、直接関係のない第三の配列が組み込まれる可能性もある。この結果、Dminで見られる対の形成がなくなり、微小核への取り込みもなくなると考えられる。これらの分子機構の解明は今後の重要な研究課題である。2) ASTCに組み込まれたAAI遺伝子の転写は、*c-myc*遺伝子のプロモーターと同様の制御を受け、薬剤により可逆的に転写抑制されるものと考えられる。その分子機構も今後の研究課題である。3) 長期にわたる培養により、ASTCは最終的に染色体の中に組み込まれ、homogeneously staining region (HSR) となる。直接関係のない第三の配列が組み込まれる可能性もある。HSRをもつ細胞はASTCをもつ細胞と全く同じ性質を示し区別できないことが、本研究で既に明らかになっている。

最後に、分化誘導や増殖制御の実験において株細胞を使用することが多いわけであるが、その際に慎重に考慮すべき事項がまとめられている。