

薬剤処理によるヒト白血病細胞の増幅遺伝子の排出、細胞接着、 増殖停止、及びアポトーシスの総合的研究*

中村 仁

広島大学大学院生物圏科学研究科

Exclusion of Amplified Genes, Cell Adhesion, Proliferation Arrest, and Apoptosis in Drug-treated Human Leukemia Cells

Hitoshi NAKAMURA

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739, Japan

要 旨

本論文は、ヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 のフォルボールエステル (phorbol 12,13-dibutyrate, PDB) によるマクロファージ様細胞への分化、増殖停止、及びアポトーシスによる細胞死の調節を詳しく検討し、処理を受けた細胞の運命の全体像を明らかにして従来から問題となっていた矛盾を解決した。また、細胞表面に現れる代表的な分化マーカーであるインテグリン受容体 Mac-1 (CD11b/CD18) を介する細胞接着がアポトーシスを回避するサバイバルシグナルであることを新たに発見したものである。

論文は、序論、実験方法、実験結果、考察、参考文献の5章からなる。

序論では、HL-60細胞株の特徴、およびフォルボールエステル処理をうけたHL-60細胞の形質の変化について報告されている従来の結果の間の矛盾など、本研究の背景を述べたあと、本研究の目的、および得られた結果の概要を述べている。第2章では、増幅遺伝子の存在部位(染色体外因子である double minute, dmin, あるいは染色体上の homogeneously staining region, HSR) の異なる亜株細胞(それぞれ HL-60DM, HL-60HSR と命名)の取扱い、あるいは細胞の分化、増殖、アポトーシス、微小核形成率などの測定法、さらに接着細胞の脱着法、定量的ゲノム PCR、RT-PCR など、本研究で用いた実験法について説明している。

第3章では、本研究で得られた新しい結果について述べている。その概略は以下の通りである。1) 他の分化誘導剤と異なり、HL-60DM細胞のPDB処理では、細胞核にあるdminの排出、従ってdmin上で増幅しているc-mycガン遺伝子の細胞外への排出は起こらない。その原因は、PDBによる微小核形成の阻害である。2) HL-60DM細胞のPDB処理では、非接着細胞はアポトーシスをおこすが、分化耐性であるHL-60HSR細胞は非接着性であるのにアポトーシスをおこさない。3) PDB処理によりディッシュに接着したHL-60DM細胞を機械的に脱着(強制脱着)させると

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第23巻(1997)

*広島大学審査学位論文

口頭発表日:1997年2月10日、学位取得日 1997年3月25日

アポトーシスによる細胞死をおこす。4) PDB 処理によりディッシュに接着した HL-60DM 細胞を接着状態を維持したまま、まず PDB を除去して細胞の活性化状態を解除したのち脱着(自然脱着)させると、細胞は PDB で誘導された分化形質を消失し、再び増殖をはじめ。このとき *c-myc* mRNA も再発現する。5) HL-60DM 細胞の PDB 処理における非接着細胞、あるいは強制脱着された接着細胞はすべてアポトーシスで死ぬわけではなく、PDB 除去後に再増殖する細胞もある。なお、アポトーシスによる細胞死は、ゲノム DNA のヌクレオチドレベルの断片化および顕微鏡によるアポトーシス小体の観察で証明されている。

第4章では、以上の結果をもとに PDB 処理を受けた HL-60DM 細胞の運命を次に述べるモデルで統一的に説明し、これまで発表されている結果のあいだの矛盾を解決した。1) PDB 処理によりマクロファージ様細胞の形質を獲得した HL-60DM 細胞が、PDB の除去によりその形質を喪失する、いわゆる可逆的分化は、接着状態を維持したまま活性化状態を解除することで生じる。2) 分化して活性化状態にある細胞では、接着がサバイバルシグナルとなり、細胞は生存状態を維持することができる。3) 分化して活性化された細胞において細胞接着がサバイバルシグナルとなっていることは、体内の炎症部位で活性化されたマクロファージが、その部位を離れ他の場所でネクロシスを起こし組織を損傷する危険を防止する機構であると考えられ、細胞の合理的挙動として説得性がある。

HL-60DM 細胞のフォルボールエステル処理によるマクロファージ様細胞への分化と増殖停止が可逆であるか、あるいは非可逆であるか、については従来意見が分かれていた。本研究は、細胞核の染色体外に存在する増幅がん遺伝子が排出されないこと、接着によるサバイバルシグナルを維持したまま活性化状態を解除すればアポトーシスはおこらないことを実験により証明し、可逆性の根拠を明確に示すことに成功した。