

氏 名 (本籍)                    <sup>いま</sup>今            <sup>いずみ</sup>泉            <sup>ます</sup>益            <sup>え</sup>栄

学 位 の 種 類                    医      学            博      士

学 位 記 番 号                    医      第      1 9 5 7      号

学 位 授 与 年 月 日                昭 和 63 年 2 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件                学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                        昭 和 54 年 3 月  
                                          東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目                    A rapid decrease of c-myc and an increase  
                                          of c-fms in retinoic acid-induced monocytic  
                                          differentiation of HL60/MRI.  
                                          (Retinoic acidにより誘導されたHL60/MRI  
                                          の単球性分化成熟におけるc-myc速やかな減少と  
                                          c-fmsの増加)

(主 査)

論 文 審 査 委 員                    教 授 多 田 啓 也            教 授 今 野 多 助

                                          教 授 菅 村 和 夫

# 論 文 内 容 要 旨

## < 初 め に >

正常骨髄における Hematopoiesis の本態が血液幹細胞から多様な成熟血液細胞への多岐に渡る分化成熟である事が詳細に理解されるにつれ、白血病細胞の特性はクローン性増殖のみならず分化成熟障害として位置づけられる。又、最近の細胞遺伝学並びに分子生物学の知見は、血液細胞の癌化あるいは分化成熟に細胞癌遺伝子が深く関連している事を示している。従って、ヒト白血病細胞株の *in vitro* 分化誘導における細胞癌遺伝子発現に関する研究は血液細胞の分化成熟機構の解明に有用であるのみならず、従来の化学療法とは異った原理の治療法（分化誘導療法）確立に寄与する可能性を有する。

## < 目 的 >

ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL 60 は成熟好中球あるいは単球・マクロファージに分化する能力を有する細胞であり、Retinoic acid（以下 RA）刺激により好中球へ分化し、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate（以下 TPA）刺激により単球・マクロファージに分化する事が知られている。我々は、HL 60 を Nude mouse 腹腔内に移植する事で得られた細胞株 HL 60 / MRI が TPA 刺激に対しては HL 60 と同様に単球・マクロファージに分化するが、RA 刺激に対しては HL 60 とは異なる分化成熟を示す事を報告した（Cancer Research, vol 47, 1434 - 1440, 1987）。即ち、RA により分化誘導された HL 60 / MRI は、① 成熟単球・マクロファージ特異的表面抗原と酵素活性を有し、付着能を獲得する。② RA に対する感受性が HL 60 に比し極めて高い。③ 3 倍体のヒト染色体を有し、HL 60 とは異なる新たな染色体異常を認める。以上の事実と刺激前 HL 60 / MRI 細胞が単球特異的マーカーを発現していない事より、単球分化成熟に必要な変化（特に遺伝子レベルにおいて）の一部が HL 60 / MRI 細胞内において既に準備されており RA 刺激に対して速やかな単球分化を起こすのではないかと推論した。そこで我々は、HL 60 において強い発現を示す癌遺伝子 *c-myc* と *N-ras*、並びに単球分化と関連しているとされる *c-fms* の継時的発現の変化を RA 刺激 HL 60 / MRI において検討した。

## < 方 法 >

① 細胞培養並びに分化誘導：HL 60 並びに HL 60 / MRI は共に 10% FBS 添加 RPMI 1640 において継代培養した。分化誘導は細胞を無血清培養液（Insulin・Transferrin 添加 RPMI-1640）に再浮遊し RA あるいは TPA を加える事で開始した。RA と TPA の最終濃度は各々 300

nMと32 nMであり、分化誘導時間は結果に示す通りであった。②分化誘導細胞のNBT還元能並びに単球特異的表面抗原の発現：RAにより分化誘導したHL60/MRIの分化成熟度を評価する為に細胞のNBT還元能と成熟単球特異的表面抗原の発現を検討した。NBT還元能はTPA刺激下にNBTを還元出来る細胞のpercentageを示した。単球特異的表面抗原発現の解析はOKM5 monoclonal Abを用いFACSにより行った。③癌遺伝子probeの調整：培養したE. coliをalkali lysis法で処理しplasmidを分離回収した後制限酵素処理並びに電気泳動にて以下の癌遺伝子を分離した。c-myc：9 kb EcoRI-Hind III fragment；v-fms：1.3 kb PstI-PstI fragment；N-ras：1.5 kb EcoRI-EcoRI fragment。又、細胞内RNAの $\beta$ -actin RNAを対照として検出する為にトリ $\beta$ -actin cDNA (1.5 kb PstI-PstI fragment)を調整した。各癌遺伝子並びに $\beta$ -actin probeはNick translationにより [ $\alpha^{32}$ P]-dCTPを標識した。④細胞RNAとDNAの抽出と解析：Guanidinium/CsCl法によりRNAを抽出し1% agarose formaldehyde gelに電気泳動後Northern blot transferを行い $^{32}$ P標識癌遺伝子probeとHybridizationを施行した。細胞高分子DNAはBlinらの方法に従い分離抽出した後制限酵素で消化し0.8% agarose gelに電気泳動後Southern blot transferを行い $^{32}$ P標識癌遺伝子probeとHybridizationを施行した。

## ＜ 結 果 ＞

① HL60/MRI Genomic DNAにおいてc-mycの増幅があり、その程度はHL60におけるc-myc増幅の約50%であり新たなrearrangementは認められなかった。② c-myc mRNAはRA刺激により速やかに減少し、その減少速度はHL60/MRI subclone (28B, 4)では極めて速やかであった。③ c-fmsはRA刺激後に検出可能となり徐々にmRNA量の増加を認めた。④ N-rasはRA刺激前後で約50%のmRNA減少を認めたが、刺激後もN-ras mRNAの消失は認めなかった。

## ＜ 考 案 ＞

① RAにより単球に分化誘導されたHL/MRIにおいてc-myc RNAは減少し、RA刺激HL60 (好中球分化)と同様であった。しかし、c-myc RNAの減少速度の極めて速やかであるHL60/MRI cloneを得て分化成熟の速さと相関している事が示唆されたが今後の検討が必要と思われる。② c-fmsはRA刺激HL60に比較しRA刺激HL60/MRI (単球分化)にて有意に増加し単球分化に関連した遺伝子である可能性が示された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

正常骨髄におけるHematopoiesisの本態が血液幹細胞から多様な成熟血液細胞への多岐にわたる分化成熟であることが詳細に理解されるにつれ、白血病細胞の特性はクローン性増殖のみならず分化成熟障害として位置づけられる。又、最近の細胞遺伝学並びに分子生物学の知見は、血液細胞の癌化あるいは分化成熟に細胞癌遺伝子が深く関連していることを示している。したがって、ヒト白血病細胞株の *in vitro* 分化誘導における細胞癌遺伝子発現に関する研究は血液細胞の分化成熟機構の解明に有用であるのみならず、従来の化学療法とは異なった原理の治療法（分化誘導療法）の確立に寄与する可能性を有する。

本論文はヒト前骨髄性白血病細胞株HL60において強い発現を示す癌遺伝子 *c-myc* と *N-ras* 並びに単球分化と関連しているとされる *c-fms* の継時的発現の変化を retinoic acid 刺戟HL60/MRI を用いて検討したものである。

HL60/MRI genomic DNAにおいて *c-myc* の増幅が認められ、その程度はHL60における *c-myc* 増幅の約50%であった。*c-myc* mRNA は retinoic acid (RA) 刺戟により速やかに減少し、その減少速度はHL60/MRI subclone では極めて速やかであった。*c-fms* はRA刺戟後に検出可能となり、徐々にmRNA量の増加を認めた。*N-ras* はRA刺戟前後で約50%のmRNA減少を認めたが、刺戟後も *N-ras* mRNA の消失は認めなかった。

以上の研究成果は白血病細胞の分化誘導に関し有意義な知見を提供したものであり、医学博士の授与に値するものと判定された。