

氏 名 (本籍) 阿 部 祐 也

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2 1 7 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 年 2 月 2 8 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 56 年 3 月
 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Expression of *c-myc* Protein During Growth
 and Differentiation of HL60
 (HL60の増殖及び分化過程における*c-myc*蛋白
 の発現)

 (主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 矢 嶋 聰 教 授 今 野 多 助

 教 授 帶 刀 益 夫

論文内容要旨

【目 的】

細胞分化の機構については、多くの解明されていない面があるが、個体発生や癌分化療法を考えると非常に興味もたれる分野である。HL60は前骨髄球性白血病の細胞株であるが、phorbol myristate acetate, 1,25(OH)₂ vitamin D₃, butyric acid, interferon- γ により単球マクロファージ系へ分化し、retinoic acid (RA) やdimethyl sulfoxide (DMSO) により顆粒球へ分化するので、細胞増殖や分化の良いモデルとなる。一方c-mycはDNA合成、細胞増殖、腫瘍発生、細胞分化に関与するといわれているが、その作用については未だ議論のあるところである。HL60は16~32コピーのc-myc DNAを持ち、それに伴って通常の10倍量のc-myc mRNAを発現しているため、c-mycの研究でも注目されている。HL60の分化過程におけるc-myc mRNAの減少に関しては、これまでも多くの報告があるが、その減少量と経時的変化については大きな差がみられる。c-mycが実際にその作用を発揮しているのは蛋白としてであるが、蛋白レベルでc-mycの変化を報告したものはほとんどない。今回、flow cytometry (FCM) で細胞内の抗原量を測定できる方法を開発したので、これを用いてHL60の分化過程におけるc-mycの変化を蛋白レベルで解析した。

【方 法】

HL60は200mM, 60mM DMSOまたは300nM, 10nM RAにて5日間分化誘導した。細胞はbuffered picric acid -paraformaldehyde fixativeにて0℃70分間固定した。洗浄後50 μ g/mlのlyssolecithinにて0℃5分間処理して原形質膜に透過性をもたせた。その後は通常の間接蛍光抗体法と同様に染色を行い、1 mg/dlのRNase A処理後、70 μ g/ml propidium iodide (PI) にてDNA染色を行った。抗体はc-mycのアミノ酸配列171~188に対する単クローン抗体 (LA006, Microbiological Associates Inc.) を用いた。染色した細胞は蛍光顕微鏡にて形態を観察すると共に、Becton-Dickinson社製のFCM FACS 440を用いて解析を行った。同時に、nitroblue tetrazorium (NBT) 還元能を測定して細胞分化の程度を調べると共に、electric particle counterにて細胞数を算定して細胞増殖の指標とした。さらに、western blottingでは6 \times 10⁶個の生存HL60を1.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) を含むlysis bufferで溶解し、sonication後、遠沈上清を10%polyacrylamide-SDS gelで電気泳動し、polyvinylidene difluoride membraneに転写して、抗c-myc蛋白抗体を用いたimmunogold silver staining法にて発色させた。

【結 果】

buffered picric acid-paraformaldehyde fixativeで固定し、lysocithinで原形質膜に透過性をもたせた細胞は、蛍光抗体染色に耐え得る形態保持能と抗体浸透性を合わせ持ち、細胞内抗原を良く染色することができた。蛍光顕微鏡による観察ではc-myc蛋白は核小体を除く核内に斑点状に分布していた。これはRNase A処理では染色性に変化がみられないが、DNase I処理では染色性を失い、c-myc蛋白がDNAと密に関係していることが示唆された。c-myc蛋白とPIによるDNA量及び細胞容積の関係をFCMで解析すると、増殖中のHL60では細胞当りのc-myc蛋白量は細胞周期の進行に伴い増加し、G₂/M期の細胞はG₀/G₁期の約1.8倍のc-myc蛋白を持つが、細胞容積も細胞周期に伴って増加するので、c-myc蛋白/細胞容積の比（細胞内c-myc蛋白濃度）は細胞周期を通じて一定であった。HL60を200mM DMSOで分化誘導を行うと、2日目よりc-myc蛋白は減少をはじめ、5日目には末梢リンパ球と同程度まで減少した。この変化はG₀/G₁期の細胞のみを解析しても同じ結果が得られ、western blottingでも64KDのc-myc蛋白は同様に減少した。分化誘導2日目のHL60には少ないc-myc蛋白量を持つ一群の細胞がみられ、DNA量をみるとこれらはG₀/G₁期にあることがわかり、HL60の分化過程においてc-myc蛋白はG₀/G₁期に一致して減少を始めていた。300nM RAを用いてHL60の分化誘導を行うと、c-myc蛋白は同様に2日目から減少するが、その減少量は200mM DMSOに比べてやや少なかった。一方60mM DMSOや10nM RAではc-myc蛋白は僅かに減少するのみであった。NBT還元能よりみたHL60の分化度とc-myc蛋白の減少とを比べてみると、前者の上昇は後者の減少に1日遅れており、その程度には相関があるように思われ、c-myc蛋白の減少はHL60の分化に関与していると推定された。分化誘導中の細胞数をみると、200mM DMSOでは2日目まで一過性の増殖が、また60mM DMSOでは持続性の増殖がみられた。RAではこのような増加はみられなかった。これらよりc-myc蛋白は細胞増殖に関与するにしても、それは直接的な関与ではないと推定された。

審査結果の要旨

細胞分化の機構については解明されていない面が数多くあるが、固体発生や発癌や癌分化療法を考えると非常に興味深い分野である。癌遺伝子のひとつであるc-mycはDNA合成細胞増殖、腫瘍発生のみならず細胞分化にも関与するといわれており、その作用について究明が急がれている。前骨髄球性白血病の細胞株であるHL60は16~32コピーのc-myc DNAを持ち、それに伴ってc-myc RNAも通常の10倍量を発現している。またHL60は様々な物質により顆粒球系や単球マクロファージ系へ分化誘導されるので、c-mycと細胞増殖や分化との関係を知る良いモデルである。これまでもHL60の分化過程におけるc-myc mRNAの減少に関しては多くの報告がなされているが、その減少量や経時的变化については研究者間で大きな差がみられた。c-mycが実際にその作用を発揮しているのは蛋白としてであるので、蛋白レベルの変化がmRNAの変化より重要であると思われるが、c-myc蛋白の変化を報告したものはほとんどなかった。

著者はflow cytometry (FCM) を用いてHL60の分化過程におけるc-mycの変化を細胞1個1個ごとに蛋白レベルで解析し、その減少がnitroblue tetrazorium還元能でみた分化度の上昇に1日先立ち、かつその程度に相関があることを見出した。一方、dimethyl sulfoxideによりHL60は一過性の増殖をみたのち分化と共にその増殖は抑えられていくが、その際c-myc蛋白に有意の増加はなく、c-mycは細胞増殖に関するにしてもそれは直接的な関与ではないと推定されることも示した。また分化過程においてc-myc蛋白はG₀/G₁期に一致して減少し始めていること、増殖中では細胞内のc-myc蛋白濃度はほぼ一定であること、c-myc蛋白は核小体を除く核内に斑点状に分布しているが、これはDNase処理で消失することを示した。

実験手技面において、FCMはこれまで主に細胞表面抗原の測定に用いられており、DNA量など小数を除いて、細胞内抗原の測定は限られていた。これは抗体などの大きな分子が通過できる程の穴を原形質膜に開けてやると、細胞が脆弱となり、蛍光抗体染色過程で何度も必要となる遠沈操作に細胞が耐えられず、破壊されてしまうからであった。著者は、buffered picric acid-paraformaldehyde fixativeで細胞を固定し、lyssolecithinで原形質膜に透過性をもたせた。この手法を用いて蛍光抗体染色を行えば、c-mycに限らず細胞形態を良く保ったまま細胞内の抗原を染めてFCMで解析できるようになり、基礎的な研究のみならず、癌の細胞診への応用など臨床的な研究にとっても有用であろう。

以上、FCMのための細胞内抗原の染色法の確立と、それを用いてのc-myc蛋白のHL60分化過程における変化を検討した本研究は医学博士論文に充分値するものと思われる。