

## 網膜芽細胞腫の分子生物学的研究

非腫瘍細胞との細胞融合実験 第2報 (図5, 表1)

戸塚 清一\*・George Inana\*\* (\*信州大学医学部眼科  
\*\*米国立眼研究所)Growth Characteristics of  
Hybrids between Retinoblastoma and Non-malignant Cell

Seiichi Totsuka and George Inana\*

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Shinshu University

\*National Eye Institute, National Institutes of Health, U.S.A.

## 要 約

網膜芽細胞腫(RB)Y79と非腫瘍細胞マウス線維芽細胞 NIH3T3間の hybrid につき、増殖速度、飽和密度、soft agar 中での増殖能につき検討した。各 hybrid の増殖速度は、ダブリングタイムにして32~57時間であり、RB, 3T3と同様であった。また、飽和密度は、RB, 3T3の中間の値である $0.42\sim 0.81 \times 10^5/\text{cm}^2$ を示した。soft agar 中での増殖能は、腫瘍細胞 RB のみが有し、3T3および各 hybrid では、soft agar 中のコロニー形成は認められなかった。この結果は、前報の形態学的特徴と共に、各 hybrid が非腫瘍細胞3T3に極めてよく類似していることを示す。したがって、RBは recessive cancer であると考えられた。(日眼 92: 870—875, 1988)

キーワード：網膜芽細胞腫，細胞融合，Hybrid，Recessive cancer，Soft agar

## Abstract

To know whether retinoblastoma (RB) is a dominant or a recessive cancer, the RB Y79 cells were fused with "non-malignant" NIH 3T3 mouse cells. Totally 60 hybrids were isolated and their morphological characteristics were reported previously. In this paper, their growth characteristics were evaluated. In terms of doubling time, RB, 3T3 and the hybrids had no specific pattern, and in saturation density, the hybrids showed intermediate values between RB and 3T3. The hybrid cells were anchorage-dependent like 3T3 cells, but unlike anchorage-independent RB cells. The growth of the cells in soft agar revealed that all of the hybrids are similar to 3T3 cells, because 3T3 and the hybrid cells showed no growth, while RB formed many colonies in soft agar. These results appear to confirm that RB is a recessive cancer. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 870—875, 1988)

Key words: Retinoblastoma, Cell fusion, Hybrid, Recessive cancer, Soft agar

## I 緒 言

網膜芽細胞腫 (Retinoblastoma 以下 RB と略す) は、代表的な小児眼内悪性腫瘍であるが、両眼性、片

眼性の症例があり、遺伝性、非遺伝性の別があるなど、腫瘍発生学の方面からも注目されている。近年、染色体分析ならびにエステラーゼ D や Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) といったマ

別刷請求先：390 松本市旭 3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 戸塚 清一 (昭和63年1月11日受付)

Reprint requests to: Seiichi Totsuka, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Shinshu Univ.

3-1-1 Asahi, Matsumoto 390, Japan

(Accepted January 11, 1988)

カーDNAによる検索が行われ、染色体13番q14域に、本腫瘍の発現に関する遺伝子が存在し、RB腫瘍自体ではその遺伝子が2本の染色体の双方で欠損しているのではないかと考えられるようになってきた。こうして、Knudson, Comingが提唱した“two-hit”説が支持される一方、この遺伝子が追求されている<sup>1)</sup>。

我々は、本腫瘍が遺伝子欠損により生ずる腫瘍——これを recessive cancer という——であるか否かを、細胞融合を用い生物学的な面から検討している。先にRB Y79と非腫瘍細胞 NIH3T3間に細胞融合を行い、hybridの獲得に成功し、その形態が全て非腫瘍細胞3T3に極めて類似したものであったこと、したがって、本腫瘍は recessive cancer であると考えられる旨報告した<sup>2)</sup>。

本論文では、更に、これら hybrid の増殖速度、飽和密度、soft agar 中での増殖能力につき検討し報告する。

## II 実験方法

前報<sup>2)</sup>の如く、RB Y79<sup>3)</sup>と非腫瘍細胞マウス線維芽細胞 NIH3T3<sup>4)</sup>間に細胞融合を行い、合計60個の hybrid を分離した。両者間の hybrid である確認は以下の如く行った。まず前者に pSV2 neo<sup>5)</sup>、後者には pSV GPT<sup>6)</sup>を各々transfectionし、RB4, 3T3#4を得た。次に両者間に細胞融合を行い、各マーカー遺伝子に対応した neomycin および aminopterin, mycophenolic acid による二重選択培養下に hybrid を分離し、さらに DNA blot hybridization により、各 hybrid が両マーカー遺伝子を有することを確認した。

RB4, 3T3#4, そして、総計60個の hybrid の内11個につき、以下の如く増殖速度、飽和密度、soft agar 中での増殖能力につき検討した。

### 1. 増殖速度

直径35mmの培養皿を用い、RB4, 3T3#4, 各 hybrid を各々 $2 \times 10^4$ 個ずつ播種し、週2回培養液を交換しつつ培養し、定期的にトリプシン-EDTA液(Gibco社)にて細胞を遊離させ、血算板を用いて細胞数を求めた。尚、RB4は通常の培養皿に生着せず浮遊するため、ファイブロネクチン, poly-D-lysine にて表面処理した培養皿を用いた<sup>7)</sup>。3T3#4, そして各 hybrid については、通常の培養皿を用いた。培養液は、RB4は neomycin 選択培養液、3T3#4は aminopterin, mycophenolic acid 選択培養液、各 hybrid は二重選択培養液を用いた。そして、横軸に日数、縦軸に細胞数をとりプロットし、

増殖曲線を描き、その傾きよりダブリングタイム(doubling time)を求めた。

### 2. 飽和密度

前項、増殖速度計測と同一の培養皿につき増殖曲線が平坦化した時点で、細胞密度を求めた。

### 3. soft agar 中での増殖能力

Macphersonらの方法<sup>8)</sup>に準じて計測した。つまり、直径100mm培養皿に、まず0.5%agarを含む培養液を入れ、冷却し下層を形成する。次に $10^4 \sim 10^6$ 個の細胞を、0.3%agarを含む培養液とよく攪拌した後注ぎ、冷却と共に上層を形成させた(図1)。その後、週1回適当量の0.3%agarを含む培養液を静かに上に加えつつ観察した。そして、3週後に肉眼で確認しうるコロニーを数え、多数の場合には、光学顕微鏡弱拡大下にコロニー数を数え、plating 効率を計算した。尚、培養液は前項、増殖速度を求める場合と同様であった。

## III 結果 (表1)

### 1. 増殖速度

RB4, 3T3#4共にダブリングタイムは48時間であった。hybridでは、32~57時間であり、RB4, 3T3#4の値を中心にその上下に分布している。

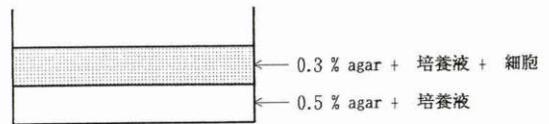


図 1

表1 RB4, 3T3#4 および各 hybrid の増殖の特徴

細胞	ダブリング タイム (時間)	飽和密度 ( $10^5/cm^2$ )	soft agar 中での増殖能 コロニー数/ 播種細胞数 $\times 100$ (%)
RB 4	48	0.36	17.4
3T3#4	48	1.6	0
Hybrid	B	53	0
	D	57	0.79
	F	39	0.71
	G	33	0.48
	H	42	0.50
	J	32	0.57
	K	33	0.42
	O	42	0.57
	P	36	0.61
	R	38	0.68
T	32	0.80	

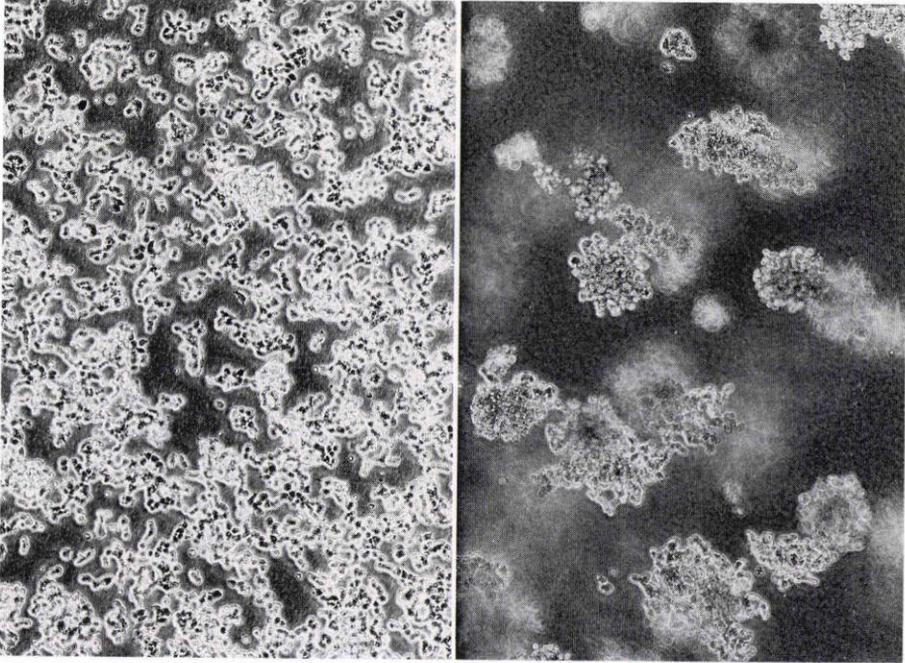


図2 RB4の位相差顕微鏡写真 ×60. 左) 培養皿上の形態, 右) soft agar 中の形態

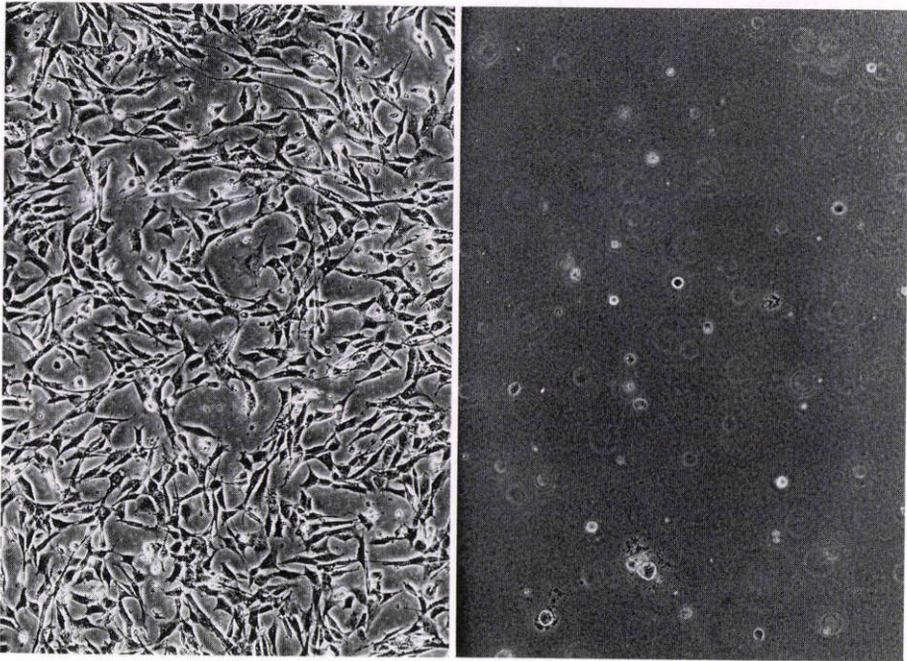


図3 3T3#4の位相差顕微鏡写真 ×60. 左) 培養皿上の形態, 右) soft agar 中の形態

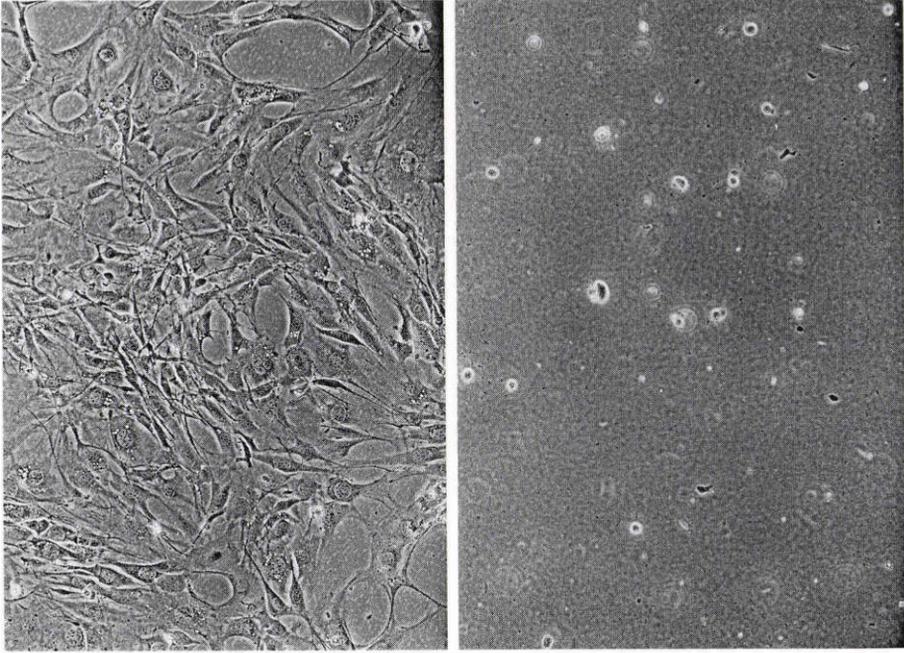


図4 Hybrid K の位相差顕微鏡写真 ×60, 左) 培養皿上の形態, 右) soft agar 中の形態

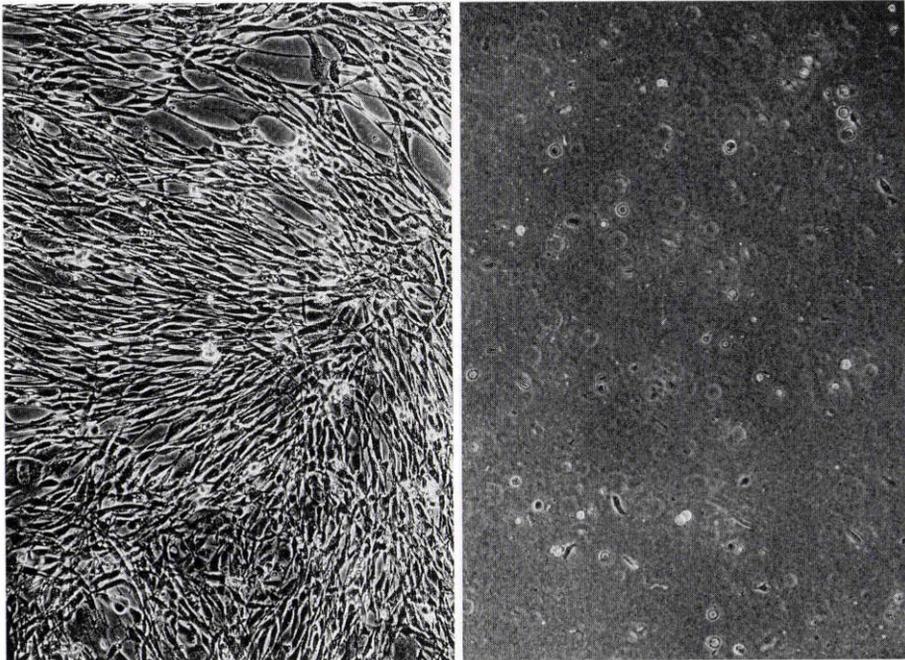


図5 Hybrid P の位相差顕微鏡写真 ×60, 左) 培養皿上の形態, 右) soft agar 中の形態

## 2. 飽和密度

RB4は $0.36 \times 10^5/\text{cm}^2$ と低値を示し、3T3#4は $1.6 \times 10^5/\text{cm}^2$ と高値を示した。各 hybrid の値は $0.42 \sim 0.81 \times 10^5/\text{cm}^2$ 間に分布し、RB4、3T3#4の値の中間に位置している。

## 3. soft agar 中での増殖能力

RB4は、soft agar 中で良好な増殖を示し、球状のコロニーを多数形成した(図2)。播種細胞数に対するコロニー数の百分率は、17.4%であった。これに対し3T3#4では、播種された細胞は生存しているが、増殖が抑制され、3週を経ても、コロニー形成は全く認められなかった(図3)。hybridは、表1の如く、計測した9個全例で、3週を経てもコロニー形成は認められず、3T3#4とよく一致した性質を示した(図4, 5)。

## IV 考 按

悪性腫瘍には、遺伝子 oncogene が加わるために生ずる dominant cancer と、regulatorあるいは suppressor 遺伝子が欠損するために生ずる recessive cancer とがある。

ある腫瘍が、dominant cancer であるか、それとも recessive cancer であるかを検討する生物学的手段として、細胞融合がある。悪性腫瘍と非腫瘍細胞を細胞融合し hybrid を形成した時、悪性腫瘍が dominant cancer である場合には、oncogene は細胞融合により hybrid 中にも存在することとなり、hybrid は悪性を示す<sup>9)</sup>。一方、悪性腫瘍が recessive cancer である場合には、悪性腫瘍が欠損していた遺伝子が、細胞融合により非腫瘍細胞より補われ、hybrid は非腫瘍細胞の性質を示すことになる<sup>10)</sup>。

「悪性」の判定には、膜蛋白の変化、レクチンの集積度の上昇、血清依存性の低下、agar 中での anchorage independent な増殖、density dependent inhibition の消失などが挙げられているが、その中で soft agar 中での増殖の仕方が最も「悪性」と関係が深く、in vivo における腫瘍形成能(tumorigenicity)と一致すると考えられている<sup>11)</sup>。

本実験では、RB4は soft agar 中で anchorage independent な増殖を示し多数のコロニーが確認されたのに対し、3T3#4そして各 hybrid では、増殖はみられずコロニーは形成されなかった。この結果は、RB が recessive cancer であることを示している。

本実験で細胞融合に用いたのは、ヒト Y79とマウス NIH3T3細胞であり、両者間にはヒトとマウスという

種の違いがある。Lee らはRB 遺伝子検索の中で、RB 遺伝子の如く生体にとり重要な遺伝子は、種の違いを越えて存在するものと考えた。そして彼らは、RB 遺伝子に極めて近い遺伝子 RB-5 を probe とし、ヒト以外の子牛、ネコ、そして本実験と同じマウス NIH3T3、さらにニワトリの細胞についても DNA blot hybridization を行った。その結果、種の相違に応じ hybridization band に濃淡がみられるものの、その全てに band の存在が確認され、子牛、ネコ、マウス、ニワトリの DNA に、ヒトの遺伝子 RB-5 と同じ塩基配列が存在することが明らかにされた<sup>12)</sup>。RB-5がRB 遺伝子そのものであるかは、今後の研究を待たねばならぬが、以上より、本実験においても、RB4で欠損していたRB 遺伝子が、細胞融合により3T3#4から補われた、と考えることは充分可能と思われる。

hybrid の実験においては、segregation という現象に留意せねばならぬ。これは時間の経過と共に一方の種の染色体が部分的に排出される現象である。本実験では細胞融合直後より頻回に観察しているにもかかわらず、hybrid の性質が変化しておらず、また、3種類の hybrid につき行なった染色体分析においても、ヒト、マウス双方の染色体が確認されている。

また、RB が recessive cancer であるならば、RB 遺伝子が regulate あるいは suppress する相手の遺伝子が何か問題になる。この相手の遺伝子としては N-myc の可能性が考えられているが、否定的な見方もあり、定まっていない<sup>13)</sup>。今後、RB 遺伝子が同定され、そして、このようなRB 発現のメカニズムが次第に明らかにされていくものと期待される。

尚、本論文の要旨は、第41回日本臨床眼科学会にて発表した。

## 文 献

- 1) 戸塚清一：網膜芽細胞腫と遺伝子。眼科 29：1225—1232, 1987.
- 2) 戸塚清一, Matsumura P, Inana G：網膜芽細胞腫の分子生物学的研究。非腫瘍細胞との細胞融合実験。第1報。日眼 92：828—836, 1988.
- 3) Reid TW, Albert DM, Rabson AS, et al：Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. J Nat Cancer Inst 53：347—360, 1974.
- 4) Todaro GJ, Green H：Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J Cell Biol 17：299—313, 1963.
- 5) Mulligan RC, Berg P：Expression of a bacte-

- rial gene in mammalian cells. *Science* 209: 1422—1427, 1980.
- 6) **Mulligan RC, Berg P**: Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine guanine phosphoribosyl transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2072—2076, 1981.
- 7) **Kyritsis A, Tsokos M, Chader G**: Attachment culture of human retinoblastoma cells: Long-term culture conditions and effects of dibutyryl cyclic AMP. *Exp Eye Res* 38: 411—421, 1984.
- 8) **Macpherson IA, Montagnier L**: Agar suspension culture for selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* 23: 291—294, 1964.
- 9) **Scaletta LJ, Ephrussi B**: Hybridization of normal and neoplastic cells in vivo. *Nature* 205: 1169—1171, 1965.
- 10) **Harris H, Miller OJ, Klein G, et al**: Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223: 363—368, 1969.
- 11) **Marshall CJ, Dave H**: Suppression of the transformed phenotype in somatic cell hybrids. *J Cell Sci* 33: 171—190, 1978.
- 12) **Lee WH, Bookstein R, Hong F, et al**: Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394—1399, 1987.
- 13) **Squire J, Goddard AD, Canton M, et al**: Tumor induction by the retinoblastoma mutation is independent of N-myc expression. *Science* 222: 555—557, 1984.
-