

網膜芽細胞腫培養細胞(Y79細胞)のカドミウム処理による 遺伝子レベルでの影響

村上 忠正¹⁾, 矢野 統¹⁾, 高橋 広¹⁾, 秋谷 忍¹⁾, 東 監²⁾

¹⁾ 産業医科大学眼科学教室, ²⁾ 産業医科大学学生化学教室

要 約

カドミウムの急性暴露によって、網膜芽細胞腫由来の培養株である Y 79 細胞が遺伝子レベルでどのような影響を受けるのかを検討した。15 μ M の CdCl₂ で Y 79 細胞を処理し、経時的にその RNA を抽出して、癌遺伝子である N-myc, ストレス蛋白質であり細胞の防御作用として発現をみる heat-shock 蛋白質 (hsp 70) と metallothionein (MT), さらに網膜芽細胞腫の発症に関連する Rb 遺伝子のそれぞれの messenger RNA (mRNA) レベルを測定した。その結果、N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルは共にカドミウム処理前に比べて、処理後でそれぞれ減少し、hsp 70 の mRNA レベルは逆に増加し、6 時間で最も高くなり、その後減少した。一方、MT の mRNA レベルは 12 時間目まで経時的に上昇し続けた。これらの結果、カドミウム処理により Y 79 細胞は正常細胞と同様な防御反応を示すが、N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルが減少するという遺伝子レベルでの影響があることが認められた。(日眼会誌 96:737-741, 1992)

キーワード: 網膜芽細胞腫, Y 79 細胞, カドミウム, N-myc, Rb 遺伝子

Effects of Cadmium on the Gene Expression of Retinoblastoma (Y79) Cells in Culture

Tadamasa Murakami¹⁾, Osamu Yano¹⁾, Hiroshi Takahashi¹⁾
Shinobu Akiya¹⁾ and Ken Higashi²⁾

¹⁾ Department of Ophthalmology, ²⁾ Department of Biochemistry,
School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

Abstract

We examined the effects of cadmium on the mRNA levels of several genes in cultured retinoblastoma (Y79) cells. After Y79 cells were treated with 15 μ M CdCl₂, RNA was extracted at a given time. The levels of retinoblastoma gene (Rb) mRNA decreased after cadmium treatment, although it was unlikely that the Rb gene product is functional in this cell line. The N-myc gene (oncogene) is constitutively expressed in untreated Y79 cells but its mRNA levels also decreased following cadmium treatment. On the other hand, the mRNA levels of both heat-shock protein (hsp 70) and metallothionein gene, both having physiological protective effects, increased under these conditions. These results indicate that Y79 cells have physiological protective responses to such a heavy metal as cadmium and that both Rb and N-myc gene expressions are down-modulated in the presence of cadmium. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 737-741, 1992)

Key words: Retinoblastoma, Y79 cell, Cadmium, N-myc, Rb gene

別刷請求先: 807 北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号 産業医科大学眼科学教室 村上 忠正
(平成3年8月19日受付, 平成4年1月20日改訂受理)

Reprint requests to: Tadamasa Murakami, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine,
University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyusyu 807, Japan
(Received August 19, 1991 and accepted in revised form January 20, 1992)

I 緒 言

カドミウムは、イタイイタイ病などの神経系病変の誘因となる一方、発癌性のある重金属としても知られている。カドミウム処理により細胞内で遊離カルシウムやpHを上昇させるなど、静止期の細胞が増殖因子で刺激された時と似た現象をひきおこすことも知られている¹⁾。また、カドミウム投与により原癌遺伝子(proto-oncogene)であるc-mycの発現が促進されることも細胞が増殖期に入る時に類似した現象である²⁾。このように、細胞増殖を促進させる作用もあるカドミウムが、細胞増殖の抑制能力を持つと注目されているRb遺伝子の機能的欠損のある網膜芽細胞腫³⁾においてどのような遺伝子レベルでの影響をもつかについては興味深いはまだそのような研究は行われていない。また、父親が溶接工などの金属暴露が多い職種に従事していた場合に、その子供に網膜芽細胞腫の発症率が高いという報告⁴⁾もあり、癌化への機構としてカドミウム等の金属が関与している可能性もあり、興味をもたれる。ヒト網膜芽細胞腫由来の培養細胞であるY 79細胞は神経芽細胞腫と同じく神経外胚葉由来の細胞であり、癌遺伝子で悪性増殖に関係するN-mycの恒常的発現もみられる。一方、カドミウムは正常のヒト培養細胞で防御作用としてheat-shock蛋白質やmetallothioneinの遺伝子を誘導発現することも知られている^{5,6)}。カドミウム暴露による発癌機構の解明の一助として、今回、このY 79細胞でのカドミウム処理後のheat-shock蛋白質(hsp 70)とmetallothioneinが誘導される時間経過の間に、細胞増殖促進に関連すると考えられるN-mycと増殖抑制に関連したRb遺伝子の発現が、どのような影響を受けるかを経時的に調べたので報告する。

II 実験方法

1. 培養細胞

ヒト網膜芽細胞腫培養細胞であるY 79細胞⁷⁾(理研細胞バンク)を10%のfetal calf serum, ペニシリン(50 units/ml)とストレプトマイシン(50 μ g/ml)を含むRPMI 1640培養液(Gibco Lab, NY)で37°C, 10% CO₂濃度で培養した。

2. 細胞のRNAの抽出

2~4 \times 10⁵/mlのY 79細胞を径150 mmの培養皿に30 ml加えて、通常の培養状態で2日間培養したものに、終濃度が15 μ MになるようにCdCl₂をそれぞれ

の培養液に加えた。その時点(0時間(対照))として、3時間、6時間、9時間、12時間後に、細胞を遠心操作で集め、guanidinium thiocyanate法⁸⁾によってRNAを抽出した。

3. Northern blot 解析

抽出したRNAはそれぞれ20 μ gずつ電気泳動し、Northern blotting法⁹⁾に基づいてnylon filter (Hybond N, Amersham, UK)にblottingした。これらのfilterを以下に述べる³²Pでラベルしたprobeを用いてhybridizeした。Probeとして、N-myc(ヒト, BamHI-EcoRIで切断された1.0 kbのDNA fragment)¹⁰⁾, hsp 70(ヒト, BamHI-EcoRIで切断された0.8 kbのDNA fragment)¹¹⁾, Rb(ヒト, EcoRIで切断された3.8 kbのDNA fragment)¹²⁾, metallothionein(ヒト, Hind IIIで切断された3.0 kbのDNA fragment)¹³⁾と β -actin(ニワトリ, Pst Iで切断された1.8 kbのDNA fragment)¹⁴⁾を用いた。Hybridizationは、4 \times SSC, 50% formamideの条件下で42°Cで約18時間おこなった。その後、filterは1 \times SSCと0.1% SDSを含んだ溶液で42°Cで約30分間2回洗った。Filterはautoradiographyを行った後、mRNAレベルをBio-image analyzer(Fujix, BAS 2000)によって定量し、mRNA量の標準となる β -actinによってmRNAレベルを補正した。

4. CycloheximideによるN-mycとRb遺伝子のmRNAレベルの変化

蛋白質合成阻害剤であるcycloheximideを用いて、N-mycとRb遺伝子の転写に対する効果をみた。実験方法の1から3と同様にカドミウムの代わりに、10 μ g/mlのcycloheximideを加えて、2時間と4時間後のY 79細胞のRNAを抽出し、N-mycとRb遺伝子のmRNAレベルを測定した。また、カドミウムを6時間処理させた後にさらにcycloheximideを加えて4時間後に同様にN-mycとRb遺伝子のmRNAレベルを測定した。

III 結 果

1. カドミウム処理後のhsp 70とmetallothioneinのmRNAレベルの変化

Y 79細胞に15 μ MのCdCl₂を処理すると、ストレス蛋白質であるhsp 70のmRNAレベルは、処理後3時間でわずかに上昇し始め、6時間目でさらに上昇しピークとなり、その後減少した(図1)。MetallothioneinのmRNAレベルはカドミウム処理後3時間よ

り上昇し、12時間目になってもなおレベルは高いままであった(図1)。

2. カドミウム処理後の Rb 遺伝子の mRNA レベルの変化

Rb 遺伝子の転写産物としての mRNA は Y 79 細胞では検出され(0時間)、カドミウム処理とともに減少し、9時間以降での mRNA レベルは処理前の mRNA レベルを100%とすると5%以下まで減少した(図1)。

3. カドミウム処理後の N-myc の mRNA レベルの変化

通常培地で産生されていた N-myc の mRNA はカドミウム処理で減少し、12時間後の mRNA レベルは処理前の mRNA レベルを100%とすると53%まで減少した(図1)。

4. Cycloheximide 処理による N-myc と Rb 遺伝子の mRNA への影響

Cycloheximide のみの処理では N-myc および Rb

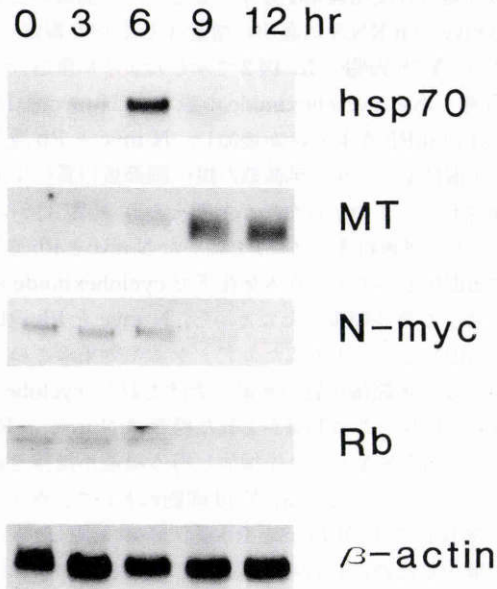


図1 Y 79 細胞のカドミウム処理後の hsp 70, metallothionein(MT), N-myc, Rb 遺伝子と β -actin の mRNA の変化。

上段にカドミウム処理後の時間を示し、それぞれの mRNA 量を Northern blot 解析によって示している。hsp 70 の mRNA レベルは処理後上昇し、6時間で最高になった。MT の mRNA レベルは処理後上昇しつづけた。N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルは処理後減少傾向を示した。 β -actin はそれぞれの mRNA 量の標準として示している。

遺伝子の mRNA レベルはむしろ増加し、2時間後より4時間後のほうがさらに高い mRNA レベルを示した(図2)。一方、カドミウムを6時間処理した後、さらに cycloheximide (10 μ g/ml) を投与しても、両者の mRNA レベルは増加した(図3)。

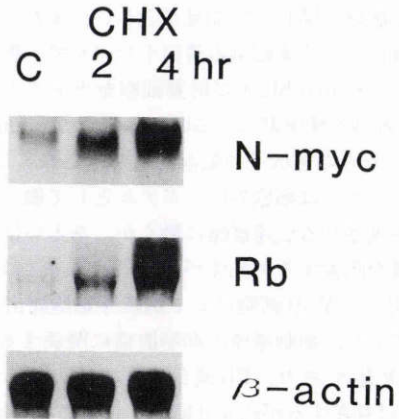


図2 Cycloheximide (CHX) による mRNA の変化。Y 79 細胞に CHX を投与後、2時間と4時間後の N-myc と Rb 遺伝子の mRNA 量を Northern blot 解析によって示している。C(対照)は何の処理もしていない時の Y 79 細胞の mRNA 量を示している。蛋白合成阻害剤である CHX によって、N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルが上昇したことを示している。

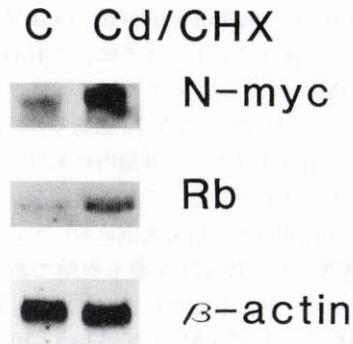


図3 カドミウム処理6時間後、さらに、cycloheximide を投与した(Cd/CHX)4時間後の Y 79 細胞の N-myc と Rb 遺伝子の mRNA の変化。C(対照)は何の処理もしていない時の Y 79 細胞の mRNA 量を示している。図1でカドミウム処理では N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルは減少したが、さらに CHX で処理すると、それぞれの mRNA レベルが上昇した。

IV 考 按

職業的にカドミウムに暴露されると、腎、肺や前立腺の癌になることが報告¹⁵⁾されており、培養細胞レベルでもカドミウム処理による transformation やウイルスによる培養細胞の transformation を促進することなどが知られている¹⁶⁾。しかしながら、カドミウムによる発癌機構に関しては知見が乏しい。また、カドミウム処理による培養細胞の遺伝子レベルでの影響として、ラットの myoblast の培養細胞をカドミウム処理すると、細胞が増殖期に入る時にみられる c-jun, c-fos や c-myc などの遺伝子の転写促進がみられること²⁾より、カドミウムは細胞外のシグナルとして働き、細胞増殖を促進させる伝達経路に働くか、あるいは、その抑制機構を阻害する可能性が考えられる。

今回用いた Y 79 細胞はヒト網膜芽細胞腫由来の培養細胞であり、細胞増殖の抑制機構に関係する Rb 遺伝子の欠落があり、Rb 遺伝子の転写産物である mRNA は存在するが約 4.0 kb で、正常の 4.7 kb と比べると短くなっている³⁾。一方、Y 79 細胞では N-myc 遺伝子も遺伝子増殖並びに過剰発現がみられる¹⁷⁾が、発生学的に同じ神経外胚葉由来の神経芽細胞腫では、N-myc の増幅がみられる症例では極めて予後が悪く、N-myc 遺伝子産物が悪性増殖に関与していると考えられている¹⁸⁾。

今回の実験では、カドミウムの細胞毒性による遺伝子転写への影響をみるパラメーターとして、すでに報告のある hsp 70 と metallothionein の mRNA を平行して調べたが、図 1 で示したように、これらの遺伝子発現は 15 μ M のカドミウムによって従来の報告¹⁹⁾と同じパターンを示したので、Y 79 細胞では今回用いたカドミウムの濃度条件下では細胞内における生理的な制御機構は保持されているものと考えて良い。尚、Ringertz ら²⁰⁾は myoblast の培養細胞においてはカドミウム暴露の濃度が 5 ~ 10 μ M が最も有効であると報告したが、今回データとして示していないが、Y 79 細胞では 10 μ M よりも 15 μ M の方が hsp 70 と metallothionein の遺伝子発現でより大きな効果が認められたので今回のカドミウムの濃度を 15 μ M で行った。また、図 1 では 12 時間までのデータを示したが、今回示してはいないが、15 ~ 24 時間まで同様に調べた結果、N-myc や MT の mRNA は 12 時間でのレベルとほとんど差が見られなかった。このような細胞毒性を無視できる条件下で、カドミウムによって起こると予想さ

れる細胞増殖機構の活性化により、これと反対の増殖抑制側に働くと考えられており、そのプロモーター領域は Y 79 細胞でもおそらく正常の Rb 遺伝子の場合と同じく転写調節を受けていると考えられる Rb 遺伝子の mRNA レベルの減少は説明し得る。一方、悪性増殖に加担すると考えられる N-myc の mRNA もカドミウム処理により減少した(図 1)。しかし、N-myc 遺伝子も細胞の種類、あるいは、その処理によって細胞増殖がみられても N-myc の mRNA レベルが低下することを我々²⁰⁾は報告しており、細胞の増殖と N-myc の mRNA レベルとは相関関係にないことも考えられた。N-myc 産物は神経芽細胞腫で悪性増殖に加担すると考えられて来たが、宿主の免疫監視機構を抑制すること²¹⁾、あるいは、転移し易い悪性形質を獲得させることなど、単に細胞増殖を促進すること以外の機構による可能性も考えられる。N-myc と同じ myc ファミリーの c-myc の mRNA のレベルは半減期の短い調節蛋白質により調節されており、もし、cycloheximide の様な蛋白合成阻害剤を投与すると、その制御がとれて c-myc の mRNA は著明に増量するという報告²²⁾があり、Y 79 細胞でも、図 2 で示したように蛋白合成阻害剤である cycloheximide の投与で N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルが増加し、N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルも半減期の短い調節蛋白質により制御されているのではないかと考えられる。図 3 では、カドミウム単純処理では減少していた N-myc と Rb 遺伝子の mRNA がカドミウム存在下で cycloheximide の投与により再び増量したことから、N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルでみたカドミウムの効果はこの半減期の短い調節蛋白質の制御を受けており、cycloheximide の投与でこの制御がとれた場合は N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルを増加し得る機能が維持されていることを示している。Y 79 細胞において、カドミウム処理により N-myc と Rb 遺伝子の mRNA レベルが減少したのはこれらの遺伝子の転写機構が単に障害されたものではないことが示唆された。

文 献

- 1) Smith JB, Dwyer SD, Smith L: Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. *J Biol Chem* 264: 7115-7118, 1989.
- 2) Jin P, Ringertz NR: Cadmium induces transcription of proto-oncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts. *J Biol Chem* 265: 14061-14064, 1990.

- 3) **Lee EY-H, Bookstein R, Young L-J, et al:** Molecular mechanism of retinoblastoma gene inactivation in retinoblastoma cell line Y79. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6017-6021, 1988.
- 4) **Bunin GR, Petrakova A, Meadows AT, et al:** Occupations of parents of children with retinoblastoma: A report from the Children's Cancer Study Group. *Cancer Res* 50: 7129-7133, 1990.
- 5) **Leung TKC, Rajendran MY, Monfries C, et al:** The human heat shock protein family. *Biochem J* 267: 125-132, 1990.
- 6) **Karin M:** Metallothionein: Proteins in search of function. *Cell* 41: 9-10, 1985.
- 7) **Reid TW, Albert DM, Rabson AS, et al:** Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 53: 347-360, 1974.
- 8) **Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, et al:** Isolation of biological active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299, 1979.
- 9) **Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, et al:** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743-4751, 1977.
- 10) **Kohl NE, Legouy E, Depinho RA, et al:** Human N-myc is closely related in organization and nucleotide sequence to c-myc. *Nature* 319: 73-77, 1986.
- 11) **Kao HT, Nevns JR:** Transcriptional activation and subsequent control of the human heat shock gene during adenovirus infection. *Mol Cell Biol* 3: 2058-2065, 1983.
- 12) **Lee W-H, Bookstein R, Hong F, et al:** Human retinoblastoma gene: Cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394-1399, 1987.
- 13) **Karin M, Cathala G, Nguyen-Huu MC:** Expression and regulation of a human metallothionein gene carried on an autonomously replicating shuttle vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4040-4044, 1983.
- 14) **Kost TA, Theodorakis N, Hughes SH:** The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic β -actin gene. *Nucleic Acids Res* 11: 8287-8301, 1983.
- 15) **Hallenbeck WH:** Human health effects of exposure to cadmium. *Experientia* 40: 136-142, 1984.
- 16) **Terracio L, Nachtigal M:** Transformation of prostatic epithelial cells and fibroblasts with cadmium chloride in vitro. *Arch Toxicol* 58: 141-151, 1986.
- 17) **Lee W-H, Murphree AL, Benedict WF:** Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309: 458-460, 1984.
- 18) **Tsuda T, Obara M, Hirano H, et al:** Analysis of N-myc amplification in relation to disease stage and histologic types in human neuroblastomas. *Cancer* 60: 820-826, 1987.
- 19) **Misra S, Zafarullah M, Price-Haughey J, et al:** Analysis of stress-induced gene expression in fish cell lines exposed to heavy metals and heat shock. *BBA* 1007: 325-333, 1989.
- 20) **Murakami T, Ohmori H, Gotoh S, et al:** Down modulation of N-myc, heat-shock protein 70, and nucleolin during the differentiation of human neuroblastoma cells. *J Biochem* 110: 146-150, 1991.
- 21) **Bernards R, Dessain SK, Weinberg RA:** N-myc amplification causes down-modulation of MHC class I antigen expression in neuroblastoma. *Cell* 47: 667-674, 1986.
- 22) **Makino R, Hayashi K, Sugimura T:** c-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by cycloheximide treatment. *Nature* 310: 697-698, 1984.