

網膜芽細胞腫培養細胞(Y79細胞)の dibutyryl cyclic AMP 処理による分化誘導時における遺伝子発現への影響

村上 忠正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

ヒト網膜芽細胞腫由来の培養細胞である Y 79 細胞を代表的な分化誘導剤である dibutyryl cyclic AMP (Bt₂cAMP) で処理し, 分化の形態的变化である細胞突起の伸長を確認し, その時の遺伝子レベルの影響について検討した. 1 mM の Bt₂cAMP で Y 79 細胞を処理し, 処理後 3 日目には細胞突起が著明に出現した. この Y 79 細胞の RNA を経時的に抽出し, 癌遺伝子である N-myc, 癌抑制遺伝子で網膜芽細胞腫の発症に関する Rb 遺伝子, さらに核小体蛋白質でリボソーム生合成に関連した nucleolin のそれぞれの messenger RNA (mRNA) レベルを測定した. その結果, これらの遺伝子は Bt₂cAMP 処理後 3 日まで mRNA レベルは全て減少傾向を示した. Bt₂cAMP 処理により, N-myc の発現と核小体のリボソーム生合成が抑制されたことは, 悪性増殖の抑制と分化誘導に有利な条件を誘導した可能性が考えられる. Y 79 細胞の Rb 遺伝子は部分欠損しているが, 分化誘導により遺伝子発現の抑制を受けている可能性も示唆された. (日眼会誌: 97: 703-707, 1993)

キーワード: 網膜芽細胞腫, Y 79 細胞, 分化, N-myc, Rb 遺伝子

Effects of dibutyryl cyclic AMP on the Gene Expression during the Differentiation of Retinoblastoma Cells (Y 79) in Culture

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

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

Abstract

Cultured human retinoblastoma cells (Y79) were induced to differentiate by dibutyryl cyclic AMP (Bt₂cAMP). We examined the effects on the mRNA levels of several cellular genes when the induction of differentiation was monitored by observation of the cellular processes. Bt₂cAMP (1mM) treatment produced significant extension of cellular process after 3 days. We examined the mRNA levels of N-myc gene (oncogene), Rb (anti-oncogene, retinoblastoma gene) and nucleolin (nucleolar protein) being linked with ribosome biosynthesis. The mRNA levels of all these genes decreased for 3 days after Bt₂cAMP treatment. These results suggested the possibility that Y 79 cells were induced to differentiate by down-modulation of both N-myc gene expression and ribosome biosynthesis in the

別刷請求先: 807 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1 産業医科大学眼科学教室 村上 忠正
(平成4年11月18日受付, 平成5年2月2日改訂受理)

Reprint request to: Tadamasa Murakami, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807, Japan
(Received November 18, 1992 and accepted in revised form February 2, 1993)

nucleolus following treatment of Bt_2cAMP . Furthermore, the gene expression of the retinoblastoma gene is likely to be downregulated by this condition even if the product of mRNA is not functional. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 703-707, 1993)

Key words: Retinoblastoma, Y79 cells, Differentiation, N-myc, Rb gene

I 緒 言

ヒト網膜芽細胞腫培養細胞である Y 79 細胞は未分化な癌細胞¹⁾で、分化誘導剤である dibutyryl cyclic AMP (Bt_2cAMP)、レチノイン酸、インターフェロンなどで分化誘導され、神経細胞様またはグリア様の形態的变化を示し、さらに、その時には細胞増殖が抑制されていることが報告されている^{2)~4)}。また、分化誘導に伴う遺伝子レベルでの変化として、神経芽細胞腫の分化誘導の際、癌遺伝子である N-myc の遺伝子発現の減少することがよく知られている⁵⁾。しかし、N-myc は癌での悪性増殖に関連していると考えられている⁶⁾が、N-myc の本来の機能についてはほとんど解明されていない。網膜芽細胞腫でもインターフェロン γ による Y 79 細胞の分化誘導によって癌遺伝子である N-myc の遺伝子の減少が報告⁷⁾されているが、この分化誘導での N-myc の遺伝子発現の減少と連動する遺伝子を調べることは N-myc 遺伝子産物の機能を知る手がかりになると我々は考えた。我々は今回、代表的な分化誘導剤である Bt_2cAMP を用いて Y 79 細胞を処理し、分化の形態的变化である細胞突起の伸長が生じるのを確認し、処理後 3 日目までの間に、N-myc の mRNA のレベルの減少に連動する遺伝子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（理研細胞バンク）を 10% の牛胎児血清、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% CO_2 濃度で培養した。

2. 細胞の RNA の抽出

1×10^5 /ml の Y 79 細胞を径 140 mm の培養皿（Falcon, CA）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 1 mM になるように Bt_2cAMP （N⁶, O^{2'}-dibutyryl adenosine 3': 5'-monophosphate）をそれぞれに加えた。その時点

0 日（対照）として、1 日、2 日、3 日後に、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 ^{32}P でラベルされた probe を用いて hybridize した。Probe として、N-myc（ヒト、*Bam*HI-*Eco*RI で切断された 1.0 kb の DNA fragment¹⁰⁾、Rb（ヒト、*Eco*RI で切断された 3.8 kb の DNA fragment¹¹⁾、nucleolin（マウス、*Pst*I で切断された 0.42 kb の DNA fragment¹²⁾）と β -actin（ニワトリ、*Pst*I で切断された 1.8 kb の DNA fragment¹³⁾）を用いた。Hybridization は、4 $\times$ SSC（クエン酸生理食塩水）、50% formamide の条件下で 42°C で約 18 時間行った。その後、filter は 1 $\times$ SSC と 0.1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を含んだ溶液で 42°C で約 30 分間 2 回洗った。Filter を 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。

III 結 果

1. Bt_2cAMP 処理による分化誘導時の Y 79 細胞の形態変化

Y 79 細胞に 1 mM Bt_2cAMP を処理すると、処理後 3 日で図 1 B に見られるように細胞から細胞突起が伸長しているのがわかる。図 1 A は Bt_2cAMP 処理をせずに通常の培養液で 3 日間培養した Y 79 細胞であり、突起の伸長は見られなかった。

2. Bt_2cAMP 処理後の N-myc, Rb 遺伝子, nucleolin の mRNA レベルの変化

Y 79 細胞を 1 mM Bt_2cAMP で処理したときの処理後 0 日である対照と処理後 1, 2, 3 日目の N-myc, Rb 遺伝子そして nucleolin の mRNA レベルの変化を図 2 に示した。これらの mRNA レベルの変化を

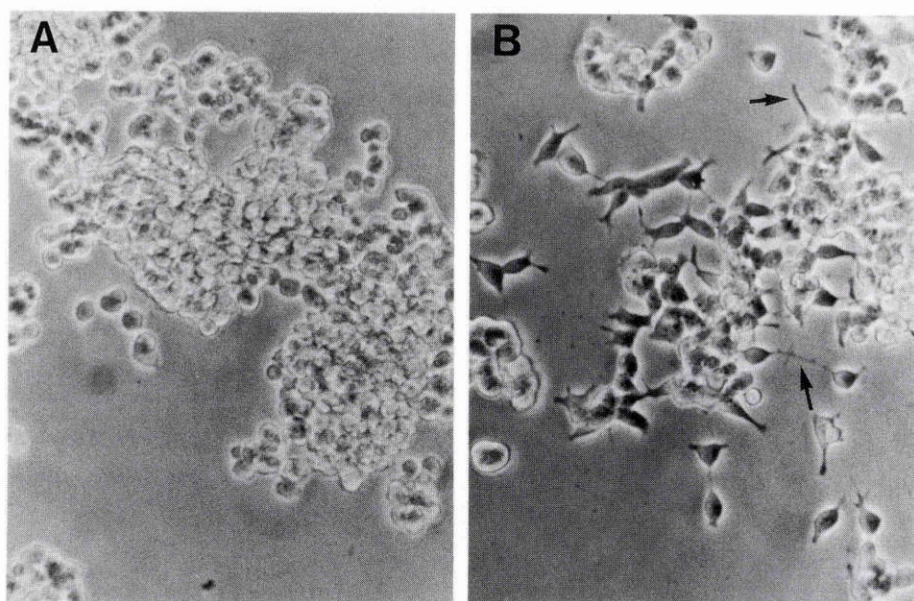


図 1 Bt₂cAMP 処理後と対照の Y 79 細胞.

Y 79 細胞を培養皿に移して 2 日間は通常の培養液で培養し、その後、通常の培養液で培養 3 日目 (A) と、1 mM Bt₂cAMP で処理後 3 日目 (B) の Y 79 細胞である。Bt₂cAMP で処理した Y 79 細胞では分化誘導に伴って細胞突起の伸長 (矢印) が著明である。

Bio-image analyzer で測定し、さらに β -actin で補正し、Bt₂cAMP 処理後 0 日である対照の mRNA レベルをそれぞれ 100% とした時の mRNA レベルの変化を図 3 で示したところ、3 日目までこれらの遺伝子すべてが減少傾向であるのがわかった。

IV 考 按

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、この細胞の N-myc 遺伝子に遺伝子増幅ならびに過剰発現がみられる¹⁴⁾。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⁶⁾。Bt₂cAMP 処理により未分化な癌細胞は直接に微小管系 (microtubule や microfilament) に作用し分化した形質を発現させたり、さらにこれらの細胞は細胞内 Bt₂cAMP 濃度が低いために細胞増殖が促進され、細胞内濃度を高めることで細胞増殖が抑制されると言われている¹⁵⁾。そして、神経芽細胞腫の培養細胞である GOTO 細胞、LA-N-5 細胞や SMS-KCNR 細胞を分化誘導剤処理によって分化誘導すると⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、処理後分化

の指標である細胞突起の伸長が顕著にみられ、それと同調するように N-myc の mRNA レベルは経時的に減少しつづけた。今回の我々の結果でも、Y 79 細胞の分化誘導によって細胞突起の伸長と N-myc の mRNA レベルの減少がみられた (図 1, 3)。このことは分化誘導による網膜芽細胞腫である Y 79 細胞と神経芽細胞腫の培養細胞の遺伝子レベルの変化が類似している可能性を示唆しており、その遺伝子として N-myc が重要と考えられる。一方、この Y 79 細胞には細胞増殖の調節機構に関与する 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¹⁸⁾。最近、細胞分裂の周期と Rb 蛋白およびそのリン酸化が密接な関係にあることが報告されており¹⁹⁾、Y 79 細胞でも Rb 遺伝子の異常により Rb 蛋白が欠損し、細胞周期をコントロールできず細胞分裂が無制限に生じることになると考えられている。今回の結果では、分化誘導によってこの異常な Rb 遺伝子の mRNA レベルは N-myc のそれと同様に減少した (図 3)。癌細胞である Y 79 細胞が異常な Rb 遺伝子によって細胞周期をコントロールできず、また N-myc の恒常的

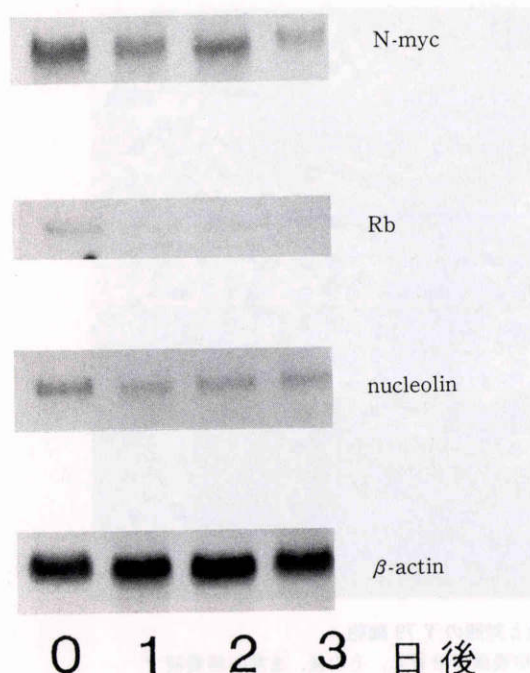


図2 Bt₂cAMP処理後のN-myc, Rb遺伝子, nucleolinのNorthern blotによる解析.

Bt₂cAMP処理後0日, 1日, 2日, 3日のそれぞれの遺伝子のmRNA量を示している. β -actinはそれぞれのmRNA量の標準として示している.

発現は悪性増殖をさらに促進する方向に働いていると考えられる. 我々²⁰⁾は, Y 79細胞をカドミウムで処理することにより細胞増殖を抑制させた結果, N-mycとRb遺伝子のmRNAレベルは, Bt₂cAMP処理と同様に経時的に減少したことを既に報告し, N-mycとRbとの関連性を示唆した. Y 79細胞では正常のRbとは異なる配列をもつと考えられるmRNAが存在している. したがって, 分化誘導によりN-mycの発現も減少するような条件下ではRb遺伝子のプロモーター部分も転写の抑制を受けていることが推測される.

Nucleolinは核小体に存在する蛋白質で, 癌細胞やラット再生肝のように増殖が盛んな細胞では核小体蛋白質の5%にも達しており, リボソームの生合成のコントロールに関与していると考えられている. Nucleolinのかなりの部分は核小体に存在するリボ核蛋白質顆粒に付随しており, 再生肝の核小体での増量およびリン酸化することが確かめられたことから, この蛋白質はリボソームの前駆体のプロセッシングや核から細胞質への輸送に関するものと推測されており, さらに, 核小体そのものの形成, あるいはクロマチンの再

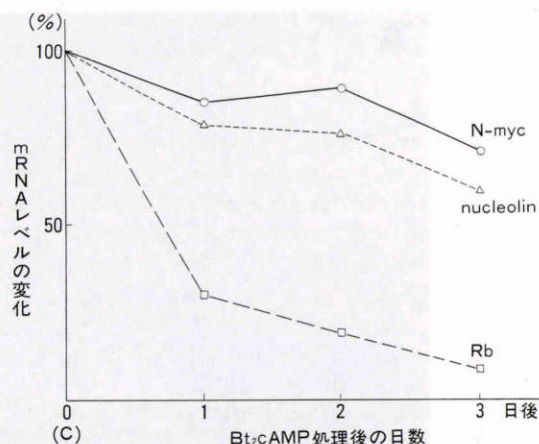


図3 Bt₂cAMP処理後のN-myc, Rb遺伝子, nucleolinのmRNAレベルの変化.

図2のmRNA量を測定し, さらに β -actinで補正し, 処理後0日である対照(C)のmRNAレベルをそれぞれ100%とした時のmRNAレベルの変化を示している. 3種類の遺伝子とも減少しているのがわかる.

編成にも関与することが示唆されている²¹⁾. 神経芽細胞腫であるGOTO細胞の分化誘導での結果では, nucleolinのmRNAレベルは経時的に減少し, さらに細胞増殖も抑制された⁵⁾. また, 細胞増殖の著しい再生肝ではnucleolinのmRNAレベルは増加していた²²⁾. 今回のY 79細胞も分化誘導でnucleolinのmRNAレベルは減少しており, これらの未分化な癌細胞は核小体でのリボソーム生合成が盛んな状態であることが示唆され, 分化することでリボソームの生合成が抑えられて細胞増殖も抑制されたと推測される.

このように, 癌細胞による分化誘導での遺伝子レベルの変化を調べることで癌細胞の悪性形質の発現機構を知る手がかりを得ることができる. しかし, 今までの報告では細胞の種類, 分化誘導での手段によっても遺伝子発現に違い⁵⁾²³⁾があり, 今回の結果がすべての癌細胞に共通するものとは考えられないが, 悪性増殖を解明するのに手助けになるものと思われる.

文 献

- 1) Reid TW, Albert DM, Rabson AS, Russell P, Craft J, Chu EW, et al: Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. J Natl Cancer Inst 53: 347-360, 1974.
- 2) Kyritsis A, Tsokos M, Chader G: Attachment culture of human retinoblastoma cells: Long-term culture conditions and effects of dibutyl

- cyclic AMP. *Exp Eye Res* 38: 411—421, 1984.
- 3) **Bogenmann E**: Retinoblastoma cell differentiation in culture. *Int J Cancer* 38: 883—887, 1986.
 - 4) **Kyritsis AP, Tsokos M, Triche TJ, Chader GJ**: Retinoblastoma: A primitive tumor with multipotential characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1760—1764, 1986.
 - 5) **Muramaki T, Ohmori H, Gotoh S, Tsuda T, Ohya R, Akiya 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.
 - 6) **Tsuda T, Obara M, Hirano H, Gotoh S, Kubomura S, Higashi K, et al**: Analysis of N-myc amplification in relation to disease stage and histologic types in human neuroblastomas. *Cancer* 60: 820—826, 1987.
 - 7) 青木繁明, 糸井素一, 堀井由博, 雨貝 孝, 田中淳夫, 今西二郎: インターフェロン γ による網膜芽細胞腫の形態変化とN-myc遺伝子発現. *眼紀* 39: 1376—1380, 1988.
 - 8) **Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ**: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294—5299, 1979.
 - 9) **Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H**: 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, Nisen PD, Smith RK, Gee CE**: Human N-myc is closely related in organization and nucleotide sequence to c-myc. *Nature* 319: 73—77, 1986.
 - 11) **Lee W-H, Bookstein R, Hong F, Young L-J, Shew J-Y, Lee EY-H**: Human retinoblastoma gene: Cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394—1399, 1987.
 - 12) **Bourbon H-M, Prudhomme RA, Amalric F**: Sequence and structure of the nucleolin promoter in rodents: Characterization of a strikingly conserved CpG island. *Gene* 68: 73—84, 1988.
 - 13) **Kost TA, Theodorakis N, Hegers SH**: The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic β -actin gene. *Nucleic Acids Res* 11: 8287—8301, 1983.
 - 14) **Lee W-H, Murphree AL, Benedict WF**: Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309: 458—460, 1984.
 - 15) **Prasad KN, Sahn SK, Sinha PK**: Cyclic nucleotides in the regulation of expression of differentiated functions in neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 57: 619—631, 1976.
 - 16) **Amatsuda TT, Sidell N, Ranyard J, Koeffler HP**: Retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells is associated with decreased N-myc expression. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 1189—1195, 1985.
 - 17) **Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA**: Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313: 404—406, 1985.
 - 18) **Lee EY-H, Bookstein R, Young L-J, Lin C-J, Rosenfeld MG, Lee W-H**: Molecular mechanism of retinoblastoma gene inactivation in retinoblastoma cell line Y79. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6017—6021, 1988.
 - 19) 戸塚清一: 網膜芽細胞腫の遺伝. *あたらしい眼科* 9: 545—553, 1992.
 - 20) 村上忠正, 矢野 統, 高橋 広, 秋谷 忍, 東 監: 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. *日眼会誌* 96: 737—741, 1992.
 - 21) 東 監: マクレオリンによるリボソーム生合成の調節機構. *生化学* 62: 1366—1370, 1990.
 - 22) **Ohmori H, Murakami T, Furutani A, Higashi K, Hirano H, Gotoh S, et al**: Simultaneous activation of heat shock protein (hsp 70) and nucleolin genes during in vivo and in vitro prereplicative stages of rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 189: 227—232, 1990.
 - 23) **Berman SA, Bursztajn S, Kinnard R, Cashman N, Arnason BGW**: Increased N-myc mRNA expression associated with dibutyl cyclic AMP induced neuroblastoma differentiation. *J Neurogenetics* 6: 75—86, 1989.