

原著

ヒト白血病細胞 HL-60における p21^{waf1}の発現亢進 : 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate による分化およびアポトーシス誘導との関連

松元英理子 小木 友実 榎木 美佳 柴田 響子
谷 香里 前田 采音 坊垣美也子

Overexpression of p21^{waf1} in human leukemic HL-60 cells: correlation with differentiation and apoptosis using 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment

Eriko MATSUMOTO, Tomomi KOGI, Mika KAYAKI, Kyoko SHIBATA,
Kaori TANI, Ayane MAEDA, and Miyako BOHGAKI

Abstract

TPA (12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate) induces monocyte/macrophage differentiation and adhesion in the human leukemic HL-60 cell line, and cyclin D1 and p21^{waf1} (cell cycle control genes) are overexpressed in TPA-treated adherent HL-60. It is also known that TPA induces apoptosis of the cell line. In this study, to investigate the relationship between differentiation and/or apoptosis induction and cell cycle control genes, we analyzed the expressions of p21^{waf1} and cyclin D1 mRNA in adherent and floating cells separately. Using flow cytometry, there was an increase in the apoptosis of floating cells when TPA treatment was applied. Quantitative analysis using real-time polymerase chain reaction revealed that p21^{waf1} and cyclin D1 expression was increased in both the floating and adherent cells. There was an increase in apoptosis of floating cells 3 h post-TPA treatment, and by this time the expression of p21^{waf1} had already significantly increased. Adherent cells were observed 12 h after TPA treatment, and by this time the expression of p21^{waf1} had already increased. These observations suggest that the increased expression of p21^{waf1} may play a role in the induction of apoptosis by TPA in HL-60 cells.

キーワード 白血病、アポトーシス、分化、p21^{waf1}、cyclin D1

はじめに

ヒト前骨髄性白血病細胞株である HL-60 は TPA (12-o-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)、活性型ビタミン D、DMSO (Dimethyl sulfoxide) 等の誘導剤により、それぞれ異なる系統に分化することから、分化メカニズムの研究に広く利用されている。

TPA はトウダイグサ科の植物に含まれるホルボールエステルで発癌プロモーターとして知られるが、その生理作用は細胞により異なり、HL-60細胞に対しては単球/マクロファージ系への分化誘導剤として働く。また、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化させることにより、TPA 処理された HL-60細胞では MAPK/ERK (Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase) シグナル伝達経路を介して、cyclin D1 や p21^{Waf1} などの細胞周期関連遺伝子の発現が更新することが明らかになっている¹⁾²⁾。

cyclin D1 は Cdk (cyclin dependent kinase) と結合してこれらを活性化させ、癌抑制遺伝子として知られる Rb (retinoblastoma) 蛋白をリン酸化することにより細胞周期の G1 期から S 期への進行を促進する。一方 p21^{Waf1} は Cdk inhibitor の一つであり、cyclin D1/Cdk 複合体に結合してそのキナーゼ活性を阻害することにより、Rb のリン酸化を抑制して細胞分裂を停止させる役割を持つ。(図 1)

TPA により増殖を停止し単球/マクロファージ系に分化した HL-60細胞では cyclin D1 と p21^{Waf1} 遺伝子の発現が共に亢進するが、これは p21^{Waf1} が cyclin D1/Cdk 複合体を抑制して細胞周期を停止

させ、細胞を分化に導くのではないかと考えられる¹⁾。

一方、TPA 処理により分化し接着した HL-60細胞は、二次的にディッシュからはがれアポトーシスを起こすが、一部の細胞は TPA により接着を経ずに直接アポトーシスを起こすことも報告されている³⁾。すなわち、同一細胞を同一薬剤で処理したとき、分化して生存し続ける細胞と、アポトーシスを起こす細胞に分かれることになる。TPA による HL-60細胞のアポトーシス誘導メカニズムに関しては、PKC アイソタイプとの関連について検討した研究⁴⁾ やマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った研究⁵⁾ があるが、その詳細は明らかにはなっていない。

HL-60以外の細胞を用いた研究で、p21^{Waf1} および cyclin D1 が細胞周期制御に働く以外にアポトーシス制御にも関わるとの報告がある。Gartel ら⁶⁾ は p21^{Waf1} が細胞の種類や細胞の置かれた条件によってアポトーシス抑制にも誘導にも働くと指摘している。一方、ラット褐色細胞腫由来の PC12細胞では cyclin D1/Cdk4 複合体がアポトーシスを誘導するとの報告⁷⁾ もあり、これらの遺伝子の発現がアポトーシス誘導とも何らかの関連を持つことが示唆されている。

本研究では、TPA 処理された HL-60 を、分化して接着した細胞とアポトーシス細胞を含む浮遊細胞に分離し、cyclin D1 および p21^{Waf1} 遺伝子の発現解析とアポトーシスの定量的解析を行い、これらの遺伝子と分化・アポトーシス誘導との関連について検討した。

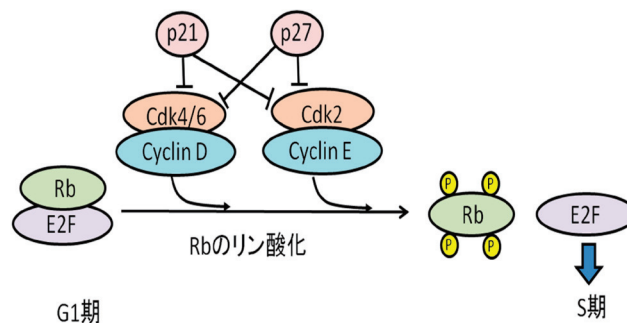


図1 cyclin D1 および p21^{Waf1} の細胞周期制御にはたす役割

材料と方法

1. 細胞培養、分化・アポトーシス誘導

HL-60細胞（ヒューマンサイエンズ振興財団研究資源バンク JCRB0085）は10% FBS（SIGMA）および1% ペニシリン-ストレプトマイシン（SIGMA）を含むRPMI1640培地（GIBCO）を用い、37℃、5% CO₂存在下で培養した。分化及びアポトーシス誘導にはTPA（和光純薬）をDMSO（和光純薬）で溶解したものをを用いた。HL-60の細胞数を1~5×10⁵/mLに調整後、終濃度20nMとなるようTPA溶液を添加した。コントロールとしては等量のDMSOを添加したものをを用いた。この時のDMSO終濃度は0.001%であり、HL-60細胞の顆粒球系への分化誘導活性は認められない濃度である。

2. 蛍光免疫染色

接着細胞はPBS+で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド（和光純薬）で固定した。浮遊細胞は塗抹標本を作製し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。ブロッキングには10%ウシ血清/PBS+を用いた。PE標識抗CD11b抗体（マウス）（Beckman Coulter）で染色後PBS+で洗浄し、励起波長540nm、蛍光波長560nmで観察した。陰性コントロールにはCell Lab Mouse IgG Isotype Control（Beckman Coulter）を使用した。

3. 接着細胞の定量

接着細胞の定量はDasらの方法⁸⁾に従った。1×10⁵/mLのHL-60にTPAを添加し、一定時間培養後培地を除き、PBSで2回洗浄して浮遊細胞を除いた。残った接着細胞を4% paraformaldehyde in PBSで室温10分固定、0.5% crystal violet in 20% methanolで30分間染色し、0.1M sodium citrate, pH4.2, in 50% ethanolで色素を溶出した。溶出液を550nmで吸光度測定した値を接着細胞の定量値とした。

4. cyclin D1、p21^{Waf1} mRNA 発現量の定量

TPA処理後のHL-60を浮遊細胞と接着細胞に分けて回収し、リアルタイムPCR法によるmRNAの定量を行った。RNA抽出にはRNAqueous-4PCR Kit（Applied Biosystems）を用い、High Capacity RNA-to-cDNA Kit（Applied Biosystems）を使用してtotal RNAからcDNAを合成した。リアルタイムPCRには試薬としてTaqMan Gene Expression Master Mix, TaqMan Gene Expression Assays Hs99999905 m1（GAPDH）、Hs00765553 m1（cyclin D1）、Hs00355782 m1（p21^{Waf1}）（何れもApplied Biosystems）を使用し、StepOneリアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems）により増幅を行った。発現量の定量解析は、Relative Standard法を用い、GAPDH（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）を内部標準遺伝子としてコントロール細胞に対する相対値を求めた。

5. アポトーシス解析

アポトーシスの解析はAnnexin V/PI二重染色法で行なった。Annexin V-FITC Reagent（PromoKine）とAnnexin V-FITC Kit System for Detection of Apoptosis（Beckman Coulter）のPI（Propidium Iodide）およびbinding bufferを用いて二重染色を行なった後、フローサイトメーター（BD FACSCalibur HG, Becton, Dickinson）を用いて解析した。

結果

1. TPA処理によるHL-60細胞の形態変化と分化の確認

位相差顕微鏡による観察では、TPA処理後6時間から細胞のディッシュへの接着が観察され、その後接着細胞は増加した（図2-A）。TPA処理後24時間では接着して分化した細胞と、浮遊している生細胞、浮遊しているアポトーシス様細胞が混在している（図2-B）

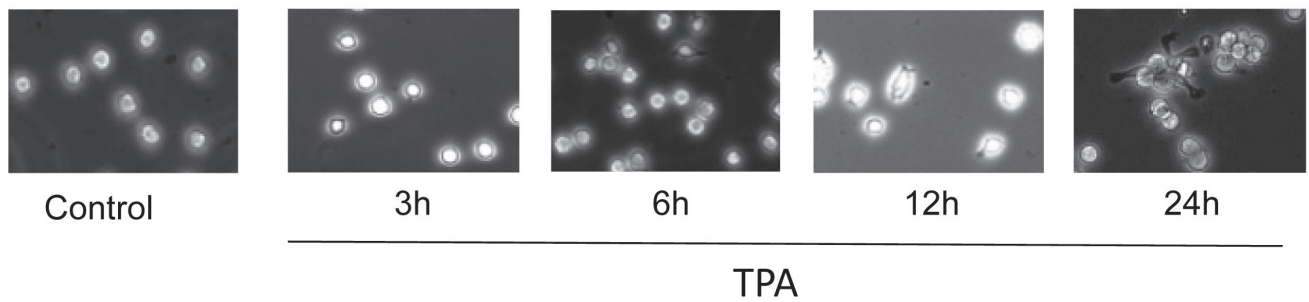


図2-A

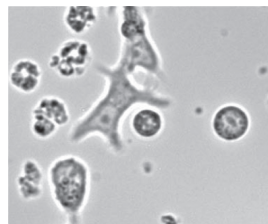


図2-B

図2 TPA 処理された HL-60細胞の形態①
位相差顕微鏡像、A：TPA (20nM) 処理後の経時変化 B：TPA (20nM) 処理24時間後

ギムザ染色及び蛍光免疫染色の結果を図3に示す。TPA 処理後の接着細胞は偽足を伸ばした状態で接着していた (図3-B)。TPA 処理後の浮遊細胞の一部では、核が断片化したアポトーシス様の細胞が観察された (図3-C)。

また、免疫染色により接着細胞の CD11b が陽性となり、単球系への分化が確認された。(図3-D)。

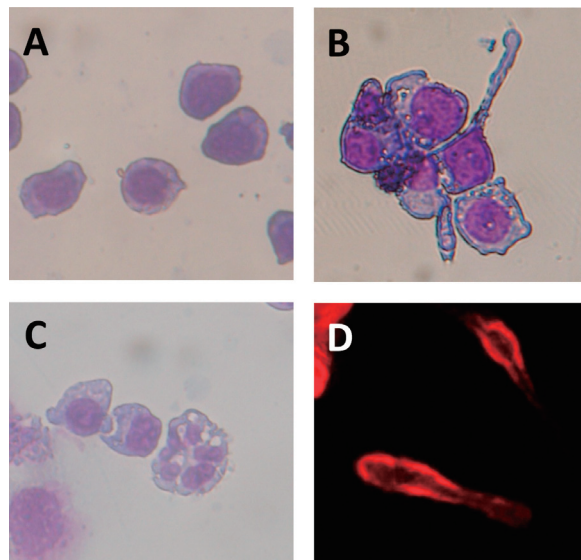


図3 TPA 処理された HL-60細胞の形態②

A, B, C：ギムザ染色像、A：コントロール、B：TPA (20nM) 処理24時間後の接着細胞、C：TPA (20nM) 処理24時間後の浮遊細胞、D：CD11b 蛍光免疫染色による TPA (20nM) 処理24時間後の接着細胞

2. TPA による HL-60細胞の接着定量解析

TPA 処理後24時間までの接着細胞の定量結果を図4に示す。TPA 処理12時間以降で接着細胞が未

処理の細胞と比較して有意 ($P < 0.05$, Dunnett 法による多重比較) に増加しており、12時間後から24時間後にかけて急激に増加がみられた。

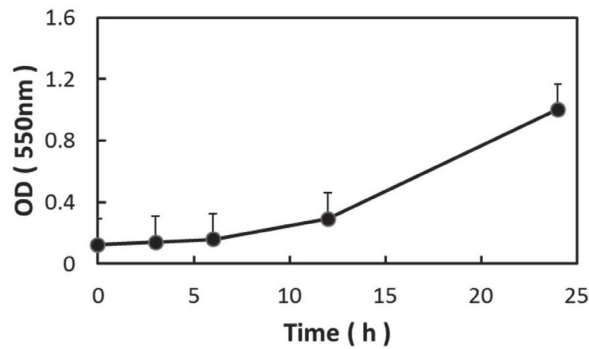


図4 TPA 処理による接着細胞の経時変化
TPA (20nM) 処理。バーは標準偏差を示す。

3. 浮遊細胞中のアポトーシス細胞の解析

アポトーシス解析では、TPA 処理後の浮遊細胞で前期アポトーシス及び後期アポトーシスの誘導が見られた (図5)。経時変化をみると、TPA 処理3

時間から浮遊細胞中に前期アポトーシス細胞の割合が増加し、12時間から24時間の間には後期アポトーシス細胞の割合が急激に増加した (図6)。

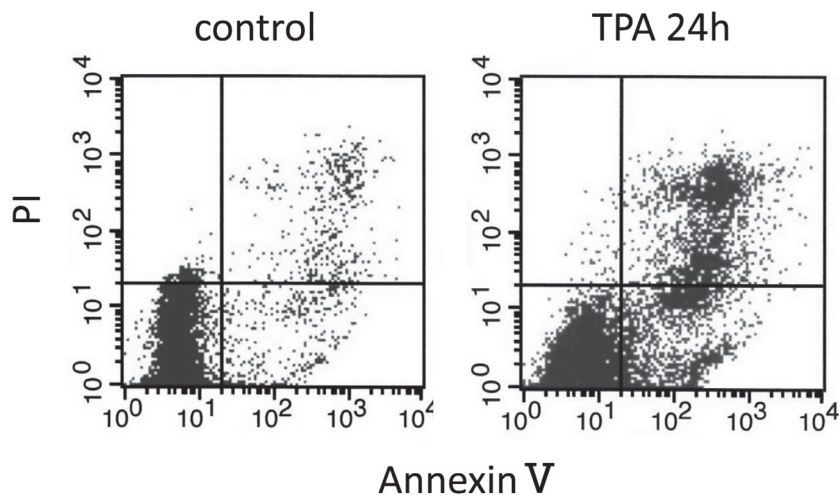


図5 TPA 処理による浮遊細胞中のアポトーシス解析
TPA (20nM)、24時間処理。Annexin V/PI 二重染色後フローサイトメーターで解析した。

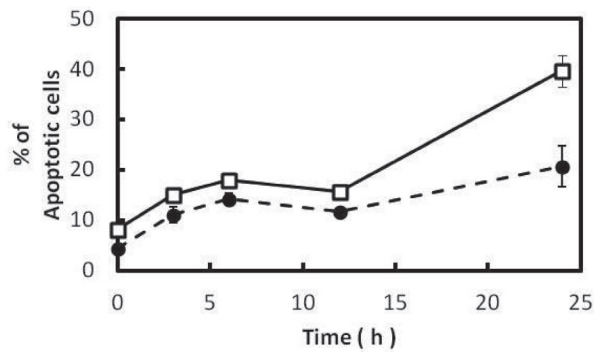


図6 TPA 処理による浮遊細胞中のアポトーシス細胞の経時変化
Annexin V/PI 二重染色法。●-----●：浮遊細胞中の前期アポトーシス細胞の割合 (%)、
□-----□：浮遊細胞中の前期+後期アポトーシス細胞の割合 (%)
独立した2回の実験を行い、プロットは平均値、バーは最高値と最低値を示す。

4. cyclin D1および p21^{Waf1} mRNA の発現量の変化

TPA 処理後の HL-60細胞を接着細胞と浮遊細胞に分離し、各々の cyclin D1および p21^{Waf1} mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。なお3および6時間後では充分量の接着細胞が得られず、定量を行なうことが出来なかった。

p21^{Waf1} mRNA の発現量の経時変化を図7-Aに示す。浮遊細胞では3時間後からコントロール細胞に対する相対値が114と大きく発現亢進し、時間と共に増加して24時間後には458となった。接着細胞

については測定できた12時間後には576と大きな発現亢進がみられ、24時間後には678となった。浮遊細胞と接着細胞の比較ができた12時間以降では何れも接着細胞の方が浮遊細胞より p21^{Waf1} の発現量が多かった。

cyclin D1 mRNA の発現量の経時変化を図7-Bに示す。浮遊細胞では12時間後まではコントロールに対し2前後と大きな変化はなかったが、24時間後には4.1とやや発現亢進が見られた。接着細胞では12時間後には4.3と発現が亢進しており、その後24時間後には6.4まで増加した。

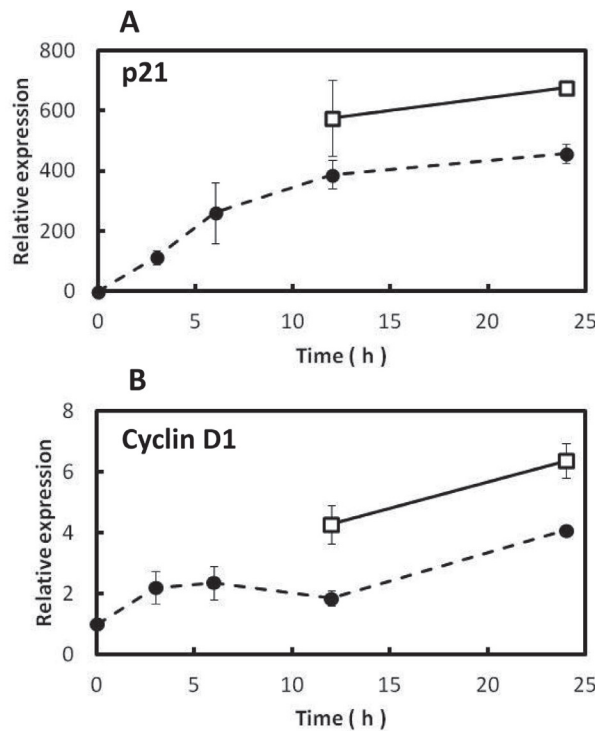


図7 TPA 処理による p21^{waf1} および cyclin D1 mRNA 発現量の経時変化
 A : p21waf1、B : cyclin D1、●-----● : 浮遊細胞、□——□ : 接着細胞、
 GAPDH を内部標準としたコントロール細胞に対する相対的発現量を示す。
 独立した2回の実験を行い、プロットは平均値、バーは最高値と最低値を示す。

考察

TPA 処理された HL-60において、浮遊細胞中のアポトーシス細胞は TPA 処理3時間後から、接着細胞は12時間後から増加したことより、アポトーシス誘導の方が分化誘導より早くおこることがわかる。このことより、今回研究対象とした浮遊細胞中のアポトーシス細胞は、接着細胞がアポトーシス

を起こしてディッシュからはがれたものではなく、TPA 処理により直接アポトーシスを起こしたものであるといえる。

TPA 処理12時間から24時間後にかけて、浮遊細胞中のアポトーシス細胞（前期+後期）が急激に増加しているが、同時に接着細胞も増加していることから、アポトーシスを起こしていない浮遊細胞が12時間以降ディッシュに接着したことによって、浮遊

細胞中のアポトーシス細胞の割合が相対的に増加した可能性がある。今後、時間毎に浮遊および接着細胞数を測定することによって、細胞全体の動態を定量的にとらえる必要がある。

今回の研究により、TPAによって誘導された cyclin D1及び p21^{Waf1} 遺伝子の発現亢進は、接着細胞のみならず浮遊細胞でもみられる現象であることが明らかになった。両者を比較すると、その発現量はいずれも接着細胞の方が浮遊細胞より多かったが、浮遊細胞中には TPA に反応していない細胞が含まれている可能性もあり、結果の解釈は慎重に行なう必要がある。

接着細胞における遺伝子発現の変化を経時的にみると、接着を開始した段階からすでに p21^{Waf1} が大きく発現亢進しており、p21^{Waf1} のはたらきで細胞周期が停止した後ディッシュに接着するものと考えられる。一方 cyclin D1 は、接着開始時点では発現量に大きな変化は見られなかったが、その後増加しており、cyclin D1 の発現は細胞接着の誘因にはなっていないと考えられる。

一方、浮遊細胞における遺伝子発現の変化を経時的に見ると、p21^{Waf1} では TPA 処理 3 時間後からコントロールの 100 倍以上の大きな発現亢進がみられた。これは浮遊細胞でのアポトーシス誘導が観察される時間と同じであるが、接着細胞が増加する時間よりは早い。また、浮遊細胞中の cyclin D1 の発現量は、TPA 処理 12 時間後まではコントロールの約 2 倍と大きな変化は示さなかったが、24 時間では 4 倍となり、わずかであるが発現亢進がみられた。ただしこの cyclin D1 の発現亢進は浮遊細胞中のアポトーシス誘導より遅れて観察された。

これらのことから、p21^{Waf1} の発現亢進は HL-60 細胞の TPA によるアポトーシス誘導に何らかの役割を果たしている可能性があるが、cyclin D1 については遅れて発現亢進がみられることから、アポトーシス誘導には直接関わっていないものと考えられる。

更に接着細胞、浮遊細胞の何れでも、cyclin D1 の発現亢進がみられた時点では、既に p21^{Waf1} の発

現が大きく亢進しており、cyclin D1 の持つ細胞周期進行のはたらきは、既に存在する p21^{Waf1} により速やかに抑えられ、細胞周期の進行には働かないものと考えられる。

TPA 処理した HL-60 細胞を接着細胞と浮遊細胞に分離して対比させ、TPA による分化とアポトーシス誘導のメカニズムに言及した報告は少ないが、Cho ら⁹⁾ は TPA 処理した HL-60 を接着細胞と浮遊細胞に分け、p21^{Waf1} のタンパク量が浮遊細胞の方が接着細胞より少ないことと、DNA ラダーの観察により浮遊細胞でアポトーシスが誘導されていることを示している。今回我々は、リアルタイム PCR とフローサイトメーターを用いた詳細な解析で、Cho らの報告を定量的に確認し、更に経時的な変化も加えてアポトーシスとの関連を検討することが出来た。

種々の細胞における p21^{Waf1} とアポトーシスとの関連について Gartel ら⁶⁾ は、p21^{Waf1} はアポトーシス抑制または誘導の双方と関わり、対象とする細胞や細胞の置かれた状態によってさまざまな役割を持つと報告している。

HL-60 細胞のアポトーシス誘導と p21^{Waf1} の関連についても、植物から抽出されたアルカロイドである Lycoline は HL-60 細胞のアポトーシスを誘導するが、このとき p21^{Waf1} の発現が更新するとの報告¹⁰⁾、や ATRA (all-trans retinoic acid) でアポトーシス誘導された HL-60 で、p21^{Waf1}、cyclin D1 の発現が減少する¹¹⁾ との報告があり、一定の見解は得られていない。

また、白血病細胞株である U937 ではビタミン D による単球系への分化過程で、p21^{Waf1} が細胞質に局在しアポトーシスを抑えるとの報告¹²⁾ もあり、p21^{Waf1} の発現量のみではなく、その細胞内局在の違いも機能と大きく関連していることが指摘されている。

今後は、アポトーシスを起こした細胞と分化し接着した細胞の p21^{Waf1} の細胞内局在を明らかにし、p21^{Waf1} と HL-60 の分化・アポトーシス誘導に果たす役割を詳細に明らかにする予定である。

謝辞

本研究は、平成23年度神戸常盤大学テーマ別研究「白血病細胞の分化およびアポトーシス誘導のメカニズムに関する研究」として研究助成を受けました。

参考文献

- 1) Matsumoto, E., Hatanaka, M., Bohgaki, M., Maeda, S.: PKC pathway and ERK/MAPK pathway are required for induction of cyclin D1 and p21Waf1 during 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced differentiation of myeloleukemia cells., *Kobe J. Med. Sci.*, 52(6), 181-194, 2006.
- 2) Zhang, W., Grasso, L., McClain, C.D., Gambel, A.M., Cha, Y., Travali, S., Deisseroth, A.B. and Mercer, W.E.: p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation., *Cancer Research*, 55, 668-674, 1995.
- 3) Solary, E., Bertrand, R., Pommier, Y.: Apoptosis of human leukemic HL-60 cells induced to differentiate by phorbol ester treatment., *Leukemia*, 8(5), 792-797, 1994.
- 4) Mizuno, K., Noda, K., Araki, T., Imaoka, T., Kobayashi, Y., Akita, Y., Shimonaka, M., Kishi, W. and Ohno, S.: The proteolytic cleavage of protein kinase C isotypes, which generates kinase and regulatory fragments, correlates with Fas-mediated and 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis., *Eur. J. Biochem.*, 250, 7-18, 1997.
- 5) Sato, H., Ishida, S., Toda, K., Matsuda R., Hayashi, Y., Shigetaka, M., Fukuda, M., Wakamatsu, Y. and Itai, A. : New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet, *Current Drug Discovery Technologies*, 2(2), 89-98, 2005.
- 6) Gartel, A.L., Tyner, A.L.: The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis., *Molecular Cancer Therapeutics*, 1,639-649, 2002.
- 7) Katayama, K., Dobashi, Y., Kitagawa, M., Kamekura, S., Kawai, M., Kadoya, Y. and Kameya, T.: Overexpression of cdk4/cyclin D1 induced apoptosis in PC12 cells in the presence of trophic support., *FEBS Lett.* 509 (3), 382-388, 2001.
- 8) Das, D., Pintucci, G., Stem, A.: MAPK-dependent expression of p21WAF1 and p27kip1 in PMA-induced differentiation of HL60 cells., *FEBS Lett.*, 472(1), 50-52, 2000.
- 9) Cho, J.W., Jeong, Y.W., Kim, K.S., Ho, J.Y., Park, J.C., Lee, J.C., Baek, W.K., Suh, S.I. and Suh, M.H.: p21Waf1 is associated with CDK2 and CDK4 protein during HL-60 cell differentiation by TPA treatment., *Cell Prolif.*, 34, 267-274, 2001.
- 10) Liu, J., Hu, J.I., Shi, B.W., Hu, W.X.: Up-regulation of p21 and TNF- α is mediated in lycorine-induced death of HL-60 cells., *Cancer Cell International*, 10, 25-33, 2010.
- 11) Ozeki, M., Shively, J.E.: Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia cells., *J Leukoc Biol.*, 84(3), 769-779, 2008.
- 12) Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delica, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. and Mizutani, S.: Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/Waf1 in monocytic differentiation., *EMBO J.*, 18(5), 1223-1234, 1999.