

## 全トランスレチノイン酸のヒト唾液腺腺癌細胞 (HSG-S 8) の増殖とレチノイン酸レセプターの発現に及ぼす効果

阿部 洋司, 畠山 節子

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 佐藤 方信 教授)

(受付: 2000年2月14日)

(受理: 2000年2月23日)

**Abstract** : Retinoic acid is a signaling molecule involved in the regulation of the growth and differentiation of various normal and transformed epithelial cells. Retinoids exert their action through two families of nuclear receptors : retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs). There are three types of RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  for all *trans*-retinoic acid (*at*-RA) in mammals. To better understand the effect of *at*-RA on proliferation and RAR-expression of a human salivary gland adenocarcinoma cells (HSG-S 8), growth, DNA histograms, Northern blot of *c-myc* mRNA, TUNEL-positive apoptotic cells, immunohistochemistry of keratins and the expression level of RAR by RT-PCR were analyzed in HSG-S 8 cells cultured with *at*-RA. *At*-RA decreased the expression of *c-myc* mRNA and induced G 1 arrest, resulting in a dose-dependent inhibition of cellular growth of HSG-S8.

However, HSG-S 8 did not undergo apoptosis, since the frequencies of TUNEL-positive cells in the group of the culture with *at*-RA and in those of the group of the culture without *at*-RA were almost the same. RAR $\alpha$ -selective agonist (Ro40-6055) inhibited the incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine into HSG-S 8 in a similar dose-dependent manner to that of *at*-RA. Immunoreaction of molecular keratin peptides with PKK-1 monoclonal antibody decreased in *at*-RA-treated cells. On the other hand immunoreaction with 68kD cytokeratin monoclonal antibody increased in HSG-S8. Namely, *at*-RA induced squamous metaplasia of HSG-S8. These results indicated that *at*-RA inhibited the growth of HSG-S 8 because of down-regulation of *c-myc* and subsequent G 1 arrest, but did not induce apoptosis of cells. These actions of *at*-RA on HSG-S 8 cells seemed to be mediated by RAR $\alpha$ .

**Key words** : retinoic acid, retinoic acid receptor, cell growth, salivary adenocarcinoma cell

### 緒 言

レチノイド (天然または人工のビタミン A の総称) は抗夜盲症因子として発見された脂溶性ビタミンで, 視覚作用, 細胞の増殖と分化, 生殖機能および胚発生における形態形成など,

様々な生物学的現象を制御している<sup>1)</sup>。

ビタミン A は $\beta$ カロチンで摂取され, 吸収後レチノールに転換されて血中を転送された後, 標的器官でレチナル, 次に活性主体である全トランスレチノイン酸 (all-*trans* retinoic acid, *at*-RA) と立体異性体の 9-*cis* レチノイン

Retinoic acid inhibits cell growth and enhances expression of retinoic acid receptor  $\alpha$  in human salivary gland adenocarcinoma cell's subclone (HSG-S 8)

Yōji ABE and Setsuko HATAKEYAMA

(Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University, 19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan)

岩手県盛岡市内丸19-1 (〒020-8505)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 25 : 97-106, 2000

酸(9c-RA)に変換される。ビタミンAの作用はこれらのレチノールと二つの誘導体, すなわちレチナールとレチノイン酸(RA)により担われる<sup>2)</sup>。レチノールとレチナールは視覚機能を担い, 一方, at-RAは細胞の増殖と分化を制御している<sup>3)</sup>。特に, at-RAは脊椎動物の皮膚や気管などの上皮組織の増殖と分化に必須である<sup>3)</sup>。最近, RAの白血病細胞に対する強力な分化誘導作用に基づく制癌効果が明らかにされている。すなわち, Huangら<sup>4)</sup>は23例の急性前骨髄球性白血病患者の96%がat-RAで完全寛解したことを報告した。完全寛解した急性前骨髄球性白血病患者のレチノイン酸レセプター(RAR) $\alpha$ の遺伝子座のある17番染色体と15番染色体との間に相互転座が見いだされ, RAのシグナル伝達が阻害されていることが明らかにされた<sup>5)</sup>。

RAの作用はRAが核内レセプターであるRARに結合することによって発揮される<sup>6,7)</sup>。RAのレセプター蛋白質にはat-RAに結合するRAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ と, at-RAには親和性を示さず, 9c-RAを認識するレチノイドXレセプター(RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )の二グループが存在する。これらのレセプター蛋白質はゲノム上の異なる遺伝子によってコードされており, それぞれ組織や細胞の種類, また発生途上の胚においても時期や部位に特異的な発現パターンを示す<sup>8)</sup>。このことから, これらのレセプターはRAの様々な活性にそれぞれ特異的に対応していると考えられる。

HSG-S8細胞はヒト顎下腺介在部導管由来の腺癌細胞HSG<sup>9)</sup>を親株として無血清合成培地で増殖可能な細胞として分離された<sup>10)</sup>。HSG-S8細胞は骨形成因子(BMP)を発現しており<sup>11)</sup>, このBMP-2発現がat-RA処理によって促進することが明らかにされている<sup>12)</sup>。HSG細胞は様々な因子で処理されることによって, 唾液腺組織の多彩な構成細胞に細胞分化する<sup>13-17)</sup>。このことから幹細胞の特性を持つとみなされ<sup>18,19)</sup>, 現在までに唾液腺腺癌細胞の増殖と分化の研究に広く用いられている。HSG-S8

細胞がHSG細胞から, その細胞学的特性をどのように引き継いでいるかについては, まだ充分には検討されていない。そこで, HSG-S8細胞の性状を明らかにする研究の一環として, 本研究でHSG-S8細胞の増殖に対するat-RAの作用を詳細に検討し, それらの作用がRAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ のどのタイプを介しているかについて検索した。

## 材料および方法

### 1. 増殖曲線

HSG-S8細胞は無血清合成培地(SFM101培地, 日水製薬)で37°C, 5%炭酸ガスの条件下で単層培養され, 約1週間毎に継代されている。増殖曲線を求めるために, 24-well plateに細胞( $0.5 \times 10^4$ 個/well)を蒔き, 2日後(48時間処理群)あるいは3日後(24時間処理群)に, at-RA(Sigma Chem. Co. St)を培地に添加した。4日目に0.08%トリプシン+0.1%EDTAを含むCa<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free PBS溶液で5分間処理(37°C)して細胞を集め, 1mlに懸濁した後, 血球計算板を用いて細胞数を数えた。at-RAはエタノールに溶解し最終濃度1.0%以下で培地に添加した。

### 2. フローサイトメトリー

対数増殖期のHSG-S8細胞を集め, PBSで洗浄後, 0.1% triton Xで裸核にし, 1mg/ml RNase(5,000 units/ml, Worthington Biochem. Co., USA)処理の後, 1mg/ml propidium iodide(Carbiochem. USA)を含む1.12%クエン酸ナトリウム溶液でDNA染色した後, 40 $\mu$ mナイロンメッシュを通し, FACScan Flow Cytometer(Becton Dickinson, Mountain View, Ca, U.S.A.)でDNAヒストグラムを作成した。

### 3. ノーザンブロット解析によるc-myc発現の検討

単層培養した細胞を集め, Quickprep Micro mRNA Purification kit(Pharmacia P-L Biochemicals, Sweden)を用いてポリ(A)<sup>+</sup>RNAを調製した。ポリ(A)<sup>+</sup>RNAをホルムアルデヒドを含む液(5x MOPS buffer 2.0 $\mu$ l,

formaldehyde 3.5  $\mu$ l, formamide 1.0  $\mu$ l および 2 ~ 5  $\mu$ g の RNA に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えて総量 20  $\mu$ l にした) で変性させた後, 1% アガロース中で電気泳動を行い, 次いでゲル中の RNA をメンブレンフィルターに転写した。メンブレンフィルターをハイブリダイゼーション液 (50% formamide, 5 x Denhard 液 (0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% Ficoll 400 溶液), 5 x SSPE (0.75M NaCl, 0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>), 0.3% SDS, 5 mg サケ精子 DNA, 200  $\mu$ g/ml 牛血清アルブミン) でプレインキュベートした後, <sup>32</sup>P でラベルした *c-myc* プローブ (宝酒造, 京都) を加えたハイブリダイゼーション液で 42°C, 20 時間インキュベートした。その後, 10x SSC (3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) で洗浄し, メンブレンフィルターに X 線フィルムをあて -80°C で数日間感光させた。脱プローブした後, elongation factor-1 $\alpha$ <sup>20)</sup> のプローブで再ハイブリダイゼーションを行った。

#### 4. TUNEL 法

カバーガラス上に培養した細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定 (4°C, 30 分) した。0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えたメタノールで処理後, 反応液 (100mM カコジル酸ナトリウム, 1 mM 塩化コバルト, 50  $\mu$ g/ml ゼラチン, 10  $\mu$ M ビオチン標識-dUTP, 100U/ml terminal deoxynucleotidyl transferase) でインキュベートした (60 分, 37°C)。次にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンでインキュベート (室温, 20 分) した後, 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 0.02% 3, 3'-ジアミノベンチジン液で発色させた。カバーガラス上で, 点計測法により 10 箇所を選んで写真撮影を行い, 写真上の一定面積内 (330 倍の拡大写真で 100  $\mu$ m<sup>2</sup>) に存在した全細胞数に対する TUNEL 陽性細胞数の割合をパーセントで算出した。

#### 5. 単層培養細胞の免疫組織化学的染色

At-RA 添加あるいは無添加培地で 48 時間処理した細胞を酢酸:アセトン (1:1) 混合液で 4°C, 10 分間, 固定した。免疫組織化学的染色はストレプトアビジン・ビオチン・コンプレックス (Pathostain ABC-POD kit, 和光純薬, 大

阪) 法で行った。0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えた純メタノールで処理 (室温, 10 分間) 後, 10% 正常ヤギ血清で処理して非特異的染色をブロックした。次に, 一次抗体の抗サイトケラチンモノクローナル抗体 (PKK-1, x50, Labsystems), あるいは抗 68kD サイトケラチンモノクローナル抗体 (34 $\beta$ B4, x10, Enzo Diagnostics, USA) で 1 時間 (37°C), または抗 RAR $\alpha$  および抗 RAR $\gamma$  ポリクローナル抗体 (x200, Santa Cruze, Biochem., USA) で 30 分間 (室温) 反応させた。洗浄後, 二次抗体のビオチン標識抗マウスまたは抗ウサギ IgG と反応 (室温, 1 h) させた後, パルオキシダーゼ標識アビジン・ビオチン・コンプレックス試薬で 10 分間 (室温) インキュベートし, 次いで 0.02% 3, 3'-ジアミノベンチジン (0.05 mM Tris-HCl) で発色させた。一次抗体の代わりに正常マウス, あるいはウサギ血清 (x500) を用いて陰性コントロールとした。

#### 6. RT-PCR

抽出した 0.1  $\mu$ g ポリ (A)<sup>+</sup> RNA を 5  $\mu$ mol の oligo (dT)<sub>12-18</sub> primer とともに変性させた (70°C, 10 分) 後, 100 units の Molony murine leukemia virus 由来逆転写酵素 (Reverscript I, 和光純薬) を含む反応液 (50mM Tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol, 75 mM KCl) で反応させ (37°C, 1 時間), cDNA を合成した。合成した cDNA の 1  $\mu$ l を 0.4  $\mu$ M プライマー, 0.129mM dNTPs, 0.025 units/ $\mu$ l Taq DNA polymerase を含む緩衝液 (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)) で PCR 反応させて増幅させた。プライマーと PCR のための条件は RAR $\alpha$ ,  $\beta$ , および  $\gamma$  については Billoni ら<sup>21)</sup> の方法に基づき, G 3 PDH については Ercolani ら<sup>22)</sup> に基づいて作成した。増幅された PCR 産物は 1  $\mu$ l/ml エチジウムブロマイドを含む 1.8% アガロースゲルで電気泳動 (100V 定電圧, 約 30 分) した後, 紫外線照射下で写真撮影した。

#### 7. RAR $\alpha$ と RAR $\gamma$ に対する選択的アゴニスによる細胞増殖におよぼす作用

細胞 (1 x 10<sup>4</sup>/well) を 24 well dish plate に

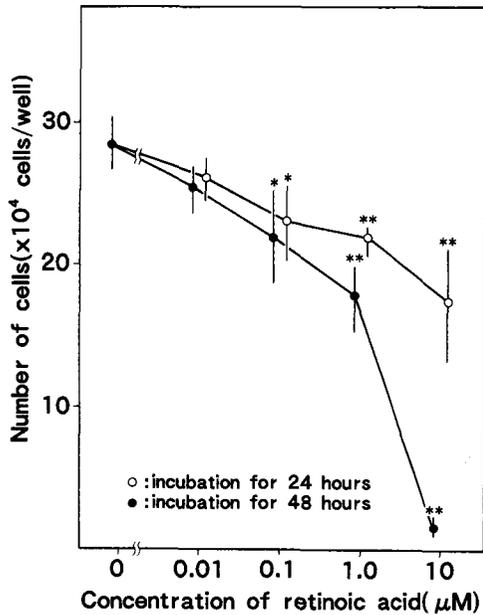


Fig. 1. Effect of *at*-RA on the growth of HSG-S 8 cells. Cells ( $0.5 \times 10^4$ /well) were seeded in a 24-well dish plate and cultured for two or three days. *At*-RA (0.01-10  $\mu$ M) was added and continuously cultured for 48 hrs or 24 hrs. Statistical analysis was done by Student's *t*-test. Significant differences between control and *at*-RA cultures are marked with single asterisk ( $P < 0.05$ ) and double asterisks ( $P < 0.01$ ).

蒔き4日間培養後、 $10^{-12} \sim 10^{-7}$  MのRo40-6055 (RAR $\alpha$ のアゴニスト)とRo44-4753 (RAR $\gamma$ のアゴニスト) (F. Hoffmann-La Roche Ltdより提供)を培地に添加して2日後に、 $[^3\text{H}]$ -thymidine (Amersham, specific activity: 20  $\mu$ Ci/mmol)を18.5Bq/wellの量で培地に加えた。4時間のパルスラベルの後に培地を捨て、200  $\mu$ lの0.1N NaOHで細胞を溶解し、1 mlの10%トリクロロ酢酸 (TCA)を加えて4°Cで30分放置後、TCA不溶性画分を濾紙に吸着させた。液体シンチレーションカウンターで濾紙に吸着したTCA不溶性画分中の放射活性を測定した。

## 結 果

### 1. 細胞増殖に対する作用

*At*-RA (0.01 ~ 10  $\mu$ M)は用量依存性に

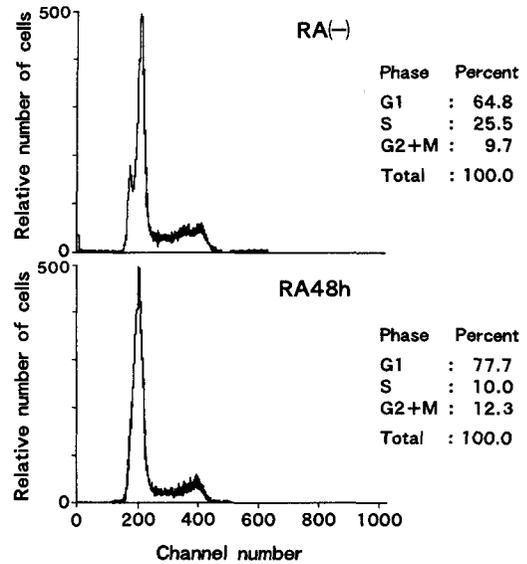


Fig. 2. The representative DNA histograms of HSG-S 8 cells cultured in the absence (RA(-)) or presence (RA48h) of *at*-RA (1  $\mu$ M) for 48hrs. The excitation and emission wavelengths were 488 nm and 630 nm, respectively. About 10,000 cells were measured by flow cytometry. The proportion of G0/G1, S, and G2/M phase cells of each DNA histogram was determined by CellFit Cell Cycle analysis software.

HSG-S 8細胞の増殖を抑制した (Fig. 1)。細胞数は0.1  $\mu$ M濃度48時間処理群で、無添加群の77.2%、1  $\mu$ M濃度で62.8%に増殖が抑制された。24時間処理と48時間処理の両群について無添加群との間に0.1  $\mu$ M以上の濃度において有意差が認められた (Student *t*-test)。この時、無添加群での倍加時間は38.4時間であり、48時間処理では0.1  $\mu$ M濃度添加で54.9時間、10  $\mu$ M濃度添加で83.0時間となり、それぞれ約1.4倍と2.2倍に延長した。

### 2. 細胞周期に与える作用

*At*-RA (1  $\mu$ M)で48時間処理したHSG-S 8細胞を集めDNAヒストグラムを求めた。その結果、*At*-RA処理によって、S期の細胞が減少しG1期の細胞の割合が増加した (Fig. 2)。このことから *at*-RAは細胞周期のG1期からS期への移行を抑制し、HSG-S 8細胞をG1期に停止させたことが明らかになった。

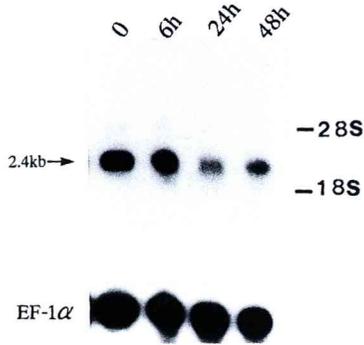


Fig. 3. Northern blot of *c-myc* mRNA. Poly(A)<sup>+</sup> RNA fraction was isolated from HSG-S 8 cells cultured in the absence or presence of *at*-RA for 6, 24, and 48 hrs. Three  $\mu$ g of poly(A)<sup>+</sup>RNA were electrophoresed in agarose gels and then blotted onto nitrocellulose filters, which were sequentially hybridized with <sup>32</sup>P-labeled cDNA for *c-myc*.

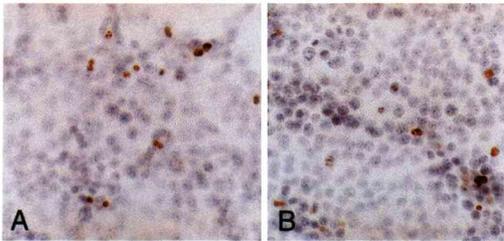


Fig. 4. TUNEL staining of HSG-S 8 cells. Cells were cultured in the absence (A) or presence (B) of 1  $\mu$ M *at*-RA for 24 hrs. Small brown fragmented nuclei are positive for TUNEL stain.

### 3. *c-myc* mRNA 発現に与える効果

*At*-RA 添加あるいは無添加培地で培養した細胞からポリ(A)<sup>+</sup>RNA を調製し、ノーザンブロットを行った。*at*-RA 無添加群の HSG-S 8 細胞は *c-myc* mRNA を強く発現していたが、RA 処理によってその発現は抑制された (Fig. 3)。その効果は *at*-RA 添加後 6 時間で見られ、24 時間で最大となり 48 時間で抑制効果は減少した。

### 4. TUNEL 染色

TUNEL 陽性細胞の出現頻度は *at*-RA (1  $\mu$ M, 24 h) 処理細胞群で  $1.43 \pm 0.54$ 、無処理群で  $1.34 \pm 0.85\%$  であり、TUNEL 陽性細胞の出現頻度に *at*-RA 処理による差はみられなかつ

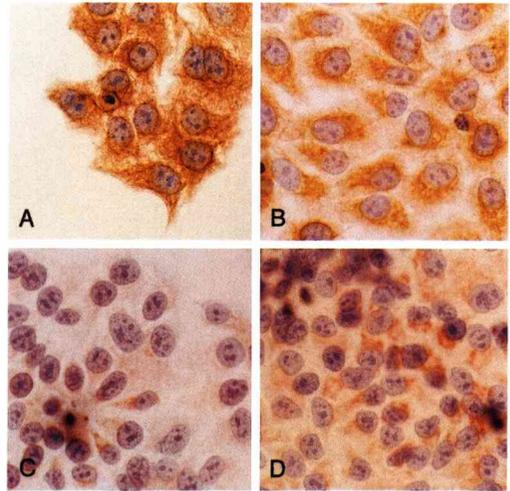


Fig. 5. Immunohistochemistry of keratin peptides with PKK-1 (A, B) and anti-68 kD keratin monoclonal antibodies (C, D) in HSG-S 8 cells. Cells were cultured in the absence (A, C) or presence (B, D) of 1  $\mu$ M *at*-RA for 48 hrs. Cells fixed with acetic acid : acetone (1 : 1) were immunostained by a streptavidin-biotin-complex method.

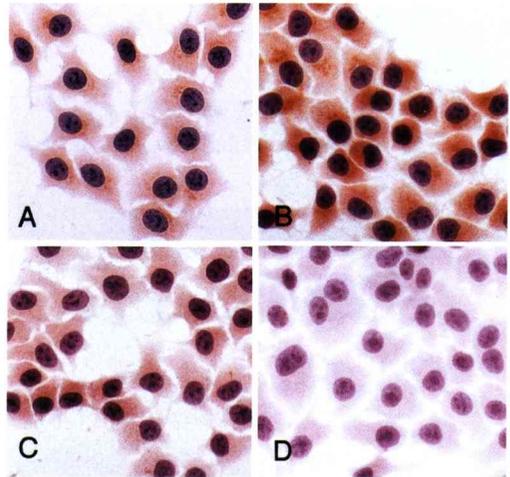


Fig. 6. Immunohistochemistry of RAR $\alpha$  (A, B) and  $\gamma$  (C, D) in HSG-S 8 cells. Cells were cultured in the absence (A, C) or presence (B, D) of 1  $\mu$ M *at*-RA for 48 hrs, fixed with acetic acid : acetone (1 : 1), and immunostained with anti-RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$  antibodies by a streptavidin-biotin-complex method.

た (Fig. 4)。

### 5. サイトケラチンの免疫組織化学的染色

低分子量のサイトケラチン 19 (40kD)、サイ

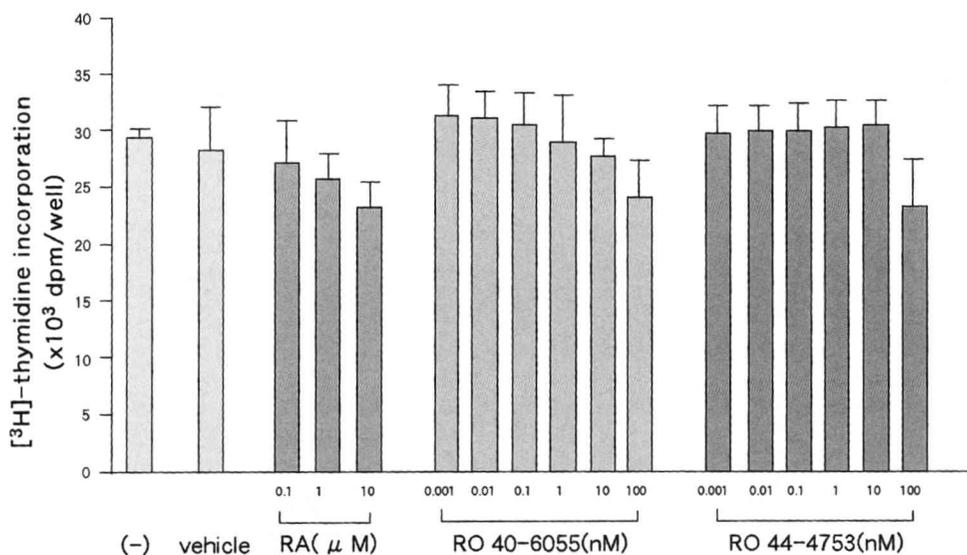


Fig. 8. Effects of selective agonists of RAR $\alpha$  (Ro40-6055) and RAR $\gamma$  (Ro44-4753) on [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation into the nuclei of HSG-S 8 cells. Cells were cultured in the absence or presence of either vehicle, *at*-RA, Ro40-6055, or Ro44-4753 for 48 hrs, and [<sup>3</sup>H]-thymidine (18.5 Bq/ml) was added. Thereafter, cells were continuously cultured for 3 hrs, and the radioactivity incorporated into TCA-insoluble materials of cells was measured.

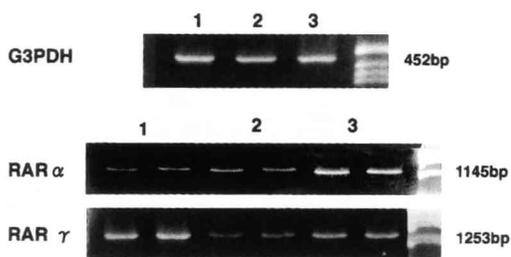


Fig. 7. RT-PCR of RAR $\alpha$  and RAR $\gamma$  in HSG-S 8 cells cultured with or without *at*-RA of 1  $\mu$ M. cDNA was synthesized by using poly (A)<sup>+</sup>RNA (0.1 $\mu$ g) as template and amplified by a method of PCR. PCR product was separated by electrophoresis in agarose gel. Lane 1: absence of *at*-RA, lane 2: *at*-RA-treatment for 3 hrs, lane 3: *at*-RA-treatment for 24 hrs.

トケラチン18 (45kD) およびサイトケラチン 8 (52.5kD) の三種類に免疫反応するPKK-1抗体は、HSG-S 8細胞を辺縁まで網目状に染め出した (Fig. 5 A)。1 $\mu$ M濃度の *at*-RA で48時間処理した細胞では網目状の線維の局在が変化し核周囲に収束していた (Fig. 5 B)。高分子量の

68kD サイトケラチンに免疫反応する抗体は対照培地で培養した細胞とごくわずかに反応したが (Fig. 5 C), *at*-RA 添加培地で培養した細胞の核周囲の細胞質を明瞭に陽性に染め出した (Fig. 5 D)。

#### 6. RAR の発現

抗 RAR $\alpha$  抗体はほとんどの HSG-S 8細胞の細胞質を陽性に染出し、*at*-RA 処理によって細胞質と一部の核の染色性が増加した (Fig. 6 A, B)。一方、非処理の HSG-S 8細胞の細胞質は抗 RAR $\gamma$  抗体に弱陽性に染まったが、*at*-RA 処理細胞ではその染色性は消失した (Fig. 6 C, D)。

#### 7. RT-PCR による RAR $\alpha$ と $\gamma$ の発現

RAR $\alpha$  は *at*-RA 処理24時間後の HSG-S 8細胞に非処理細胞に比べて強いバンドがみられた (Fig. 7)。RAR $\gamma$  mRNA 発現は *at*-RA 処理3時間後で減少し24時間後には少し回復したが非処理細胞のレベルには至らなかった。HSG-S 8細胞の RAR $\beta$  の発現はみられなかった (data not shown)。

8. RAR $\alpha$  と RAR $\gamma$  の選択的アゴニストが HSG-S 8 細胞の [ $^3$ H]-thymidine の取り込みに及ぼす作用

RAR $\alpha$  の選択的アゴニスト Ro40-6055 ( $10^{-9}$ M ~  $10^{-7}$ M) は HSG-S 8 細胞の [ $^3$ H]-thymidine の取り込みを用量依存的に阻害した。その活性は at-RA のおよそ 100 倍であった (Fig. 8)。RAR $\gamma$  の選択的アゴニスト Ro44-4753 ( $10^{-9}$ M ~  $10^{-8}$ M) は [ $^3$ H]-thymidine 取り込みに全く影響を与えなかったが、 $10^{-7}$ M の高濃度では Ro40-6055 と同程度の阻害作用を示した。

## 考 察

今回の検索の結果、at-RA は HSG-S 8 細胞の *c-myc* 発現を減少させた。*c-myc* は *v-myc* 癌遺伝子に対応する細胞性の相同遺伝子で、*c-myc* の発現上昇は細胞の増殖開始に不可欠である<sup>3)</sup>。ほとんどの場合、腫瘍細胞では G 0 期がないか、あってもきわめて短い、その原因は腫瘍細胞では *c-myc* の発現が異常に高いことによると考えられている<sup>3)</sup>。HSG-S 8 細胞は、ヒトの白血病細胞 HL-60<sup>23)</sup> やマウスのテラトカルチノーマ F 9<sup>24)</sup> と同様に、通常の状態では *c-myc* の発現が高く、常に細胞周期が回転している状態にあるとみなされた。また、*myc* 遺伝子の発現が高い細胞では、RA 処理による細胞分化や増殖停止に先立って *c-myc* の発現が抑制されると報告されている<sup>3)</sup>。HSG-S 8 細胞でも、同様の現象が起こり、フローサイトメトリーの結果にみられたように G 1 期に増殖停止が起こり、S 期への移行が妨げられたと考えられた。

最近、RA は *in vitro* で増殖抑制作用を示すだけでなく、発生期における肢芽形成に関与する一群の細胞や<sup>25)</sup>、正常培養細胞<sup>26)</sup>、あるいは腫瘍細胞<sup>27-28)</sup> にアポトーシスを起こすことが観察されている。急性前骨髄球性白血病患者の白血病細胞は投与された at-RA によって成熟した好中球に分化誘導され、さらに好中球に分化成熟した細胞はアポトーシスにより死滅し<sup>21, 23)</sup>、その後正常造血細胞が回復して患者は完全寛解

に至ると考えられている。一方、同じ急性前骨髄球性白血病細胞の HL-60 は、at-RA により分化成熟したが、アポトーシスを起さないと報告されている<sup>30)</sup>。TUNEL 法で at-RA 処理した HSG-S 8 細胞を検討した著者らの結果では、at-RA 処理と非処理群との間に TUNEL 陽性細胞の出現頻度に有意差がみられなかった。これらの結果は、RA 処理によって分化誘導された細胞が終局的にアポトーシスに至るかどうかは細胞の種類によって、あるいは細胞の培養環境によって異なることを示唆している。

RA はヒト皮膚の正常ケラチノサイトの終末分化に伴うケラチン 1 (k 1) の発現増加を阻害する<sup>31)</sup>。一方、同じヒトケラチノサイトに対して、RA は粘膜上皮に特異的に存在する k 13 や単層上皮や重層扁平上皮の基底細胞に特異的に存在する低分子量の k 19 の発現も増加させると報告されている<sup>31)</sup>。HSG 細胞を RA 処理した場合<sup>32)</sup> や、HSG を 5-アザシジンで処理して得られたサブクローンである HSG-AZA 3 をジブチリル cAMP で処理した場合<sup>33)</sup> に、細胞内に 68kD サイトケラチンやインボルクリンがみられ、扁平上皮細胞としての性状があらわれた。HSG-S 8 細胞に対する RA の効果は HSG 細胞に対すると同様に 68kD サイトケラチンの発現が増加し非角化性上皮のマーカーとなる低分子量のサイトケラチンが減少するものであった。すなわち、RA は単層上皮性の唾液腺上皮細胞に対して、高分子量のケラチンの発現を誘導し、扁平上皮化生をもたらしたと推察された。

本研究で HSG-S 8 細胞は RAR $\alpha$  と  $\gamma$  を発現していることが明らかになった。親株である HSG 細胞は RAR $\alpha$  と  $\gamma$ <sup>34)</sup>、RXR $\alpha$  と  $\beta$ <sup>35)</sup> を発現し、RAR は RXR とヘテロ二量体形成を行い DNA のレチノイン酸レスポンスエレメントと結合し、RA の転写を制御していることが明らかにされている<sup>36)</sup>。RA の様々な生物学的活性は RAR の局在性<sup>7)</sup> から、それぞれ特異的なレセプターを介して行われていると推察されるが、各レセプターが RA のどのような活性に関与するかについての報告は著者らが渉猟する限

り少ない<sup>37)</sup>。そこで本研究では RAR $\alpha$  と RAR $\gamma$  のアゴニストを用いた実験を行った。その結果, *at*-RA の増殖阻害作用は RAR $\alpha$  を介していることが示唆された。また, ヒトの神経芽細胞株で, RA 処理による細胞増殖阻害に伴い, RAR $\alpha$  と RAR $\beta$  が up-regulation されるという報告がある<sup>37)</sup>。HSG-S 8 細胞においても, RA によって細胞増殖が阻害され, 一方で RAR $\alpha$  の発現増加がみられた。RA による増殖阻害作用は一般的に RAR $\alpha$  を介している可能性がある。

RAR $\gamma$  については発生期の肢芽形成において軟骨形成に関与すると報告されている<sup>38)</sup>。また, RAR $\gamma$  ノックアウトマウスでは高頻度に骨格形成異常がみられている<sup>39)</sup>。今回の実験結果では, RAR $\gamma$  のアゴニスト (Ro44-4753) には 10 nM 濃度以下では HSG-S 8 細胞の増殖に対する作用が全くみられなかったため, *at*-RA の増殖阻害に RAR $\gamma$  の関与はないと思われた。しかし, 一方で RT-PCR の結果は RA 処理後 3 時間で RAR $\gamma$  mRNA の発現減少を示しており, RA は RAR $\gamma$  を介して増殖阻害以外の何らかの作用を細胞に及ぼしている可能性が推察された。それがどのような作用なのかについては今後の検索で明らかにする必要がある。RA の多彩な作用とそれぞれに関与する RAR に関する研究は, さらにデータを蓄積することによって, RA の多様な作用の機序の解明に役立つと考えられる。

## 結 論

All-*trans* レチノイン酸 (*at*-RA) は HSG-S 8 細胞の *c-myc* mRNA の発現を減少させ, G1 期から S 期への移行を阻害することで増殖を抑制した。TUNEL 染色による検討の結果, アポトーシスに基づく増殖阻害ではなかった。HSG-S 8 細胞は RAR $\alpha$  と  $\gamma$  を発現し, RAR $\beta$  を発現していなかった。レチノイン酸レセプター (RAR) のアゴニストを用いて検討した結果, *at*-RA の増殖阻害作用には少なくとも RAR $\alpha$  が関与していることが示唆された。

*At*-RA は HSG-S 8 細胞に 68kD サイトケラチンの発現を増強させ扁平上皮化を促した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, ご指導とご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔病理学講座佐藤方信教授に謹んで感謝の意を表します。また, 本研究の遂行にあたってご協力いただきました歯学部口腔病理学講座の教室員各位に感謝申し上げます。

本研究の一部は日本私立学校振興・共済事業団大学院重点特別経費 (平成10・11年度, 代表佐藤方信) による。

本論文の要旨は岩手医科大学歯学会第25回総会 (平成11年12月, 盛岡) において発表した。

## 文 献

- 1) Blander, W. S. and Olson, J. A.: The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine. 2nd ed., Raven Press, New York, PP229-256, 1994.
- 2) 清水孝雄: 脂溶性ビタミンの構造と機能 上代淑人監訳, ハーパー・生化学, 第23版, 丸善, 東京, 644-655ページ, 1993: Harper's Biochemistry; 23th ed., Lange Medical Publications, Connecticut, 1988.
- 3) 橋本祐一, 影近弘之, 河内恵美子, 首藤絏一: レチノイドによる細胞成長の制御と遺伝子発現, 癌と化学療法, 13: 3392-3400, 1986.
- 4) Huang, M., Yu-chen, Y., Shu-rong, C., Jin-ren, C., Jia-Xiang, L., Lin, Z., Long-jun, G., and Zhen-yi, W.: Use of all-*trans* retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567-572, 1988.
- 5) Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., and Berger, R.: NB4, a maturation inducible cell line with t(15; 17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77: 1080-1086, 1991.
- 6) 加藤茂明: 脂溶性ビタミン A, D の分子作用メカニズム—ビタミン欠乏動物からレセプターノックアウトマウスへ—, 蛋・核・酵 43: 1321-1335, 1998.
- 7) 加藤茂明: 核内レセプターと情報伝達, 羊土社, 東京, 45-67ページ, 1994.
- 8) Ruberte, E., Dolle, P., Krust, A., Zelent, A., Morris-Kay, G., and Chambon, N.P.: Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development* 108: 213-222, 1990.

- 9) Shirasuna, K., Sato, M., and Miyazaki, T. : A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 48 : 745-752, 1981.
- 10) Hatakeyama, S. and Suzuki, A. : Isolation of salivary adenocarcinoma cell's subclone with *in vivo* activity of bone and cartilage formation in serum-free culture. *Jpn. J. Oral Biol.* 34 : 164-168, 1992.
- 11) Hatakeyama, S., Ohara-Nemoto, Y., Kyakumoto, S., and Satoh, M. : Expression of bone morphogenetic protein in human adenocarcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 : 695-701, 1993.
- 12) Hatakeyama, S., Ohara-Nemoto, Y., Kyakumoto, S., and Satoh, M. : Retinoic acid enhances expression of bone morphogenetic protein-2 in human adenocarcinoma cell line (HSG-S 8). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38 : 1235-1243, 1996.
- 13) 綿谷和也 : ヒト唾液腺導管上皮腫瘍細胞株からの単一細胞クローニングとそれらの細胞の生物学的性状の差異. 阪大歯学誌 30 : 133-153, 1985.
- 14) Azuma, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T., Yura, Y., Ueno, A., and Sato, M. : Emergence of differentiated subclones from a human salivary adenocarcinoma cell clone in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* 46 : 770-777, 1986.
- 15) Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T., and Yura, Y. : 5-azacytidine induction of stable myoepithelial and acinar cells from a human salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Res.* 47 : 4453-4459, 1987.
- 16) Hatakeyama, S., Sashima, M., Shirasuna, K., Satoh, M., and Suzuki, A. : Glucocorticoid-induced growth inhibition with enhanced expression of ductal epithelium of human salivary gland adenocarcinoma cells transplanted into athymic nude mice. *Cancer* 62 : 716-722, 1988.
- 17) 星野正行 : ヒト顎下腺由来腺癌細胞株の増殖と分化に及ぼすジブチリル cAMP の効果. 歯基礎誌 35 : 505-519, 1993.
- 18) Shirasuna, K., Watatani, K., Sugiyama, M., Morioka, S., and Miyazaki, T. : Isolation and characterization of different clones including myoepithelial-like variants from a clonal neoplastic epithelial duct cell line of human salivary gland origin. *Cancer Res.* 46 : 1418-1426, 1986.
- 19) 佐藤光信 : 唾液腺癌と扁平上皮癌, 穂積本男, 斉藤政樹, 佐藤光信 編著 : 癌細胞の分化誘導と آپトーシス, 共立出版, 東京, 188-208 ページ, 1995.
- 20) Uetsuki, T., Naito, A., Nagata, S., and Kaziro, Y. : Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 264 : 5791-5798, 1989.
- 21) Billoni, N., Gautier, B., Mahe, Y. F., and Bernard, B.A. : Expression of retinoid nuclear receptor superfamily members in human hair follicles and its implication in hair growth. *Acta Derm. Venereol.* 77 : 350-355, 1997.
- 22) Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M., and Alexander, M. : Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* 263 : 15335-15341, 1988.
- 23) Westin, E.H., Wong-Staal, F., Gelmann, E. P., Favera, R. D., Papas, T. S., Lautenberger, J. A., Eva, A., Reddy, E. P., Tronick, S. R., Aaronson, S. T., and Gallo, R. C. : Expression of cellular homologues of retroviral *onc* genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 2490-2494, 1982.
- 24) Campisi, J., Gray, H. E., Pardee, A. B., Dean, M., and Sonenshein, G. E. : Cell-cycle control of *c-myc* but not *c-ras* expression is lost following chemical transformation. *Cell* 36 : 241-247, 1984.
- 25) Kochhar, D. M., Jiang, H., Harnish, D. C., and Soprano, D.R. : Limb development and regulation, Wiley-Liss, Inc., New York, pp815-825, 1993.
- 26) Okazawa, H., Shimizu, J., Kamei, M., Imafuku, I., Hamada, H. : Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. *J. Cell Biol.* 132 : 955-968, 1996.
- 27) 大野竜三 : 急性前骨髄球性白血病の分化誘導療法, 癌と化学療法, 20 : 189-193, 1993.
- 28) Su, I.-J., Lay, Z.-D., Cheng, A.-L., and Chang, Y.-C. : Modulation of retinoic acid receptor  $\alpha$ , growth factors and proto-oncogenes in retinoic acid-induced apoptosis of Ki-1 lymphoma cell line. *Int. J. Oncol.* 4 : 1089-1095, 1994.
- 29) 垣塚 彰 : 急性前骨髄球性白血病とレチノイドレセプター, 実験医学 16 : 2459-2464, 1998.
- 30) Dipietrantonio, A., Hsieh, T., and Wu, J. M. : Differential effects of retinoic acid (RA) and *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) on cell growth, induction of differentiation, and changes in p34<sup>cdc2</sup>, bcl-2, and actin expression in the human promyelocytic HL-60 leukemic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 : 837-842, 1996.
- 31) Gudas, L. J., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. : The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine. New York, Raven Press, pp443-520, 1994.
- 32) Azuma, M., Kawamata, H., Kasai, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yanagawa, T., and Sato, M. : Effects of retinoic acid on morphological features and biological markers of a neoplastic human salivary intercalated duct cell line in culture. *Cancer Res.* 48 : 7219-7225, 1988.

- 33) Kawamata, H., Azuma, M., Kasai, Y., Hariki, K., Yanagawa, T., Yura, Y., Yoshida, H., Furumoto, N., and Sato, M. : Induction of cells with a keratinizing squamous cell phenotype by treatment with dibutyryl cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate in a human salivary acinar cell line. *Cancer J.* 3 : 274-282, 1990.
- 34) Kurokawa, R., Kyakumoto, S., and Ota, M. : Retinoic acid receptor in subclone of human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG and effect of retinoic acid on cellular growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1095 : 63-74, 1991.
- 35) 客本斉子, 根本孝幸, 星野正行, 太田 稔 : ヒト顎下腺腺癌細胞株 (HSG) における RXR ファミリーの発現, 口腔組織培養研究会誌 4 : 55-65, 1995.
- 36) 客本斉子, 佐藤詔子, 太田 稔 : ヒト顎下腺腺癌細胞株 (HSG) におけるレチノイン酸レセプターによる転写活性化, 口腔組織培養研究会誌 4 : 37-48, 1995.
- 37) Wuarin, L., Chang, B., Wada, R., and Sidell, N. : Retinoic acid up-regulates nuclear retinoic acid receptor- $\alpha$  expression in human neuroblastoma cells. *Int. J. Cancer* 56 : 840-845, 1994.
- 38) Cash, D. E., Bock, C. B., Schughart, K., Linney, E., and Underhill, T. M. : Retinoic acid receptor  $\alpha$  function in vertebrate limb skeletogenesis : a modulator of chondrogenesis. *J. Cell Biol.* 136 : 445-457, 1997.
- 39) Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M., and Chambon, N. P. : Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* 73 : 643-658, 1993.