
原 著

チロシンリン酸化酵素阻害剤による神経系腫瘍細胞の分化誘導

京都大学医学部脳神経外科教室（指導：菊池晴彦教授）

松 本 眞 人

〔原稿受付：平成3年1月7日〕

Inhibitors for Protein Tyrosine Kinases, Erbstatin, Genistein and Herbimycin A, Induce Differentiation of Human Neural Tumor Cell Lines

MASATO MATSUMOTO

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. Haruhiko KIKUCHI)

Recent reports suggest that protein phosphorylation is involved in neural differentiation. We have found that specific inhibitors of protein phosphorylation at tyrosine residues, Erbstatin, Genistein, Herbimycin A, effectively induce neural differentiation in a human neuroblastoma cell line SK-N-DZ and a human medulloblastoma cell line Med-3, as indicated by the marked increase in the number of neurites/cell and in the expression of neurofilaments (160 k) detected by immunohistochemical studies. Possible involvement of protein phosphorylation at tyrosine residues in the differentiation of neural tumor cells was stressed.

はじめに

癌遺伝子 (oncogene), すなわち細胞の癌化をひきおこす遺伝子の実態が明らかとなることにより, 細胞癌化の機構に関する研究は飛躍的に進歩した³⁾. その中でもチロシン特異的プロテインキナーゼ活性をもつ v-src 遺伝子の研究はとりわけ進んでいる. この v-src 遺伝子がラットの褐色細胞腫由来株 (PC12) を分化させたという報告や²⁾, この遺伝子の proto-oncogene である c-src の遺伝子産物 pp60^{c-src} が神経系組織に強く発現していることより^{4,12)}, 神経系細胞の分化と細胞

内タンパクのチロシンリン酸化との関連が示唆され, 最近特に注目されている^{13,15)}. 今回ヒトの神経芽細胞腫由来株 SK-N-DZ 細胞にチロシンリン酸化酵素阻害剤として開発された Genistein を作用させると, 経時的に形態学的変化を示し, 分化誘導の可能性をうかがわせた. そこでチロシンリン酸化酵素阻害剤による神経系腫瘍細胞の分化誘導を形態学的変化 (神経様突起の伸長) と神経細胞系の分化抗原 neurofilament の発現増大を指標にして, ヒト神経芽細胞腫, ヒト膠芽腫, ヒト髄芽腫の由来株を用いて調べた. また Genistein とは構造の異なるチロシンリン酸化酵素阻害剤 Her-

Key words: Differentiation, Medulloblastoma, Neuroblastoma, Neurofilaments, Tyrosine kinase inhibitors.

索引語: 分化, 髄芽腫, 神経芽細胞腫, ニューロフィラメント, チロシンリン酸化酵素阻害剤.

Present address: Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

Table 1 Morphological changes in human neuroblastoma cell lines GOTO, SK-N-DZ and a human glioblastoma cell line T98G and a human medulloblastoma cell line Med-3 induced by additions of Erbstatin (3 μ g/ml), Genistein (3 μ g/ml), Vanadate (10 μ M) and Herbimycin A (0.5 μ M).

	Erbstatin	Genistein	Vanadate	Herbimycin A
GOTO	+ $\uparrow$	+ $\uparrow$	+ $\rightarrow$	
SK-N-DZ	++ $\uparrow\uparrow$	++ $\uparrow\uparrow$	+ $\rightarrow$	
T98G	- $\rightarrow$	- $\rightarrow$	- $\rightarrow$	
Med-3	+ $\uparrow$	+ $\uparrow$		+ $\uparrow$

Elongation of neurites: -, none; +, slight (10%-30%); ++, moderate (30%-50%); +++, marked (50%-80%)
Neurofilament (160 kDa) stained by immunohistochemical staining: $\rightarrow$, none; $\uparrow$, slight; $\uparrow\uparrow$, moderate

bimycin A や Erbstatin で同様の効果を調べ、細胞の分化誘導におけるチロシンリン酸化の関わりを調べることを目的とした。

研究材料および方法

1) 培養細胞及び培養条件

ヒト神経芽細胞腫由来株として SK-N-DZ²⁰⁾, GOTO¹⁹⁾ の2種を用いた。ヒト膠芽腫由来株として T98G を、ヒト髄芽腫由来株として Med-3 を用いた。SK-N-DZ 細胞及び GOTO 細胞の培養には、10% 非働化牛胎児血清 (FCS) 及び硫酸カナマイシン 100 mg/l を添加した RPMI 1640 (日水製薬) を用いた。また、T98G 細胞と Med-3 細胞の培養には同様の FCS と抗生物質を含む Dulbecco's modified MEM (日水製薬) を用いた。細胞は 3.5 cm シャーレに 3×10^5 /ml で培養し、培養条件は 37°C, 95% air/5% CO₂ とした。

2) チロシンリン酸化酵素阻害剤

Genistein¹⁷⁾: Rous sarcoma virus (RSV) の癌遺伝子産物 pp60^{v-src} および Epidermal growth factor receptor

(EGF-R) のチロシンキナーゼ活性を阻害する物質として *Pseudomonas* より単離・精製されたもの。cAMP 依存性プロテインキナーゼやプロテインキナーゼ C などのセリン、スレオニンキナーゼ活性は阻害しない¹⁾。

Erbstatin²⁴⁾: Streptomyces 由来。EGF-R のチロシンキナーゼ活性は阻害するが、cAMP 依存プロテイン活性は阻害しない。

Herbimycin A²³⁾: benzenoid ansamycin 抗生物質で Streptomyces 由来。RSV にトランスフォームされた細胞内での pp60^{v-src} のリン酸化を阻害する。

Vanadate (チロシン脱リン酸化酵素阻害剤): チロシン残基の脱リン酸化阻害。Vanadium 由来。

なお薬剤の使用濃度 (至適濃度) は基礎実験に基づき以下の様に決定。

Erbstatin, Genistein: 3 μ g/ml

Herbimycin A: 0.5 μ g/ml

Vanadate: 10 μ M (Fig. 1)

3) 分化誘導の指標

tyrosine kinase inhibitor

Erbstatin $\leftarrow$ Streptomyces

Genistein $\leftarrow$ Pseudomonas

Herbimycin A $\leftarrow$ Streptomyces

tyrosine phosphatase inhibitor

Vanadate $\leftarrow$ Vanadium

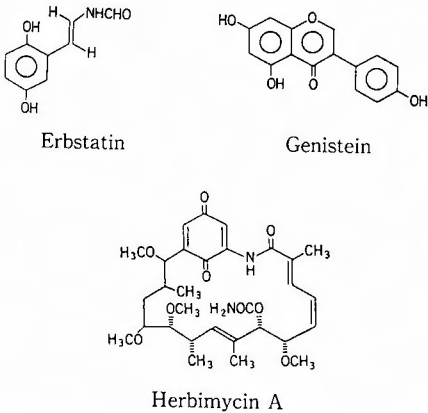


Fig. 1 Tyrosine kinase inhibitors/origins and structures. Tyrosine phosphatase inhibitor/origin

Table 2 Induction of *in vitro* differentiation.

erythroleukemia [hemoglobin] (mouse MEL)	DMSO, HMBA;	Genistein, Herbimycin A	
embryonal carcinoma [plasminogen activator, laminin, SSEA-1] (mouse F9)	RA, (+) Bt ₂ c-AMP;	Herbimycin A	
neuroblastoma [neurofilament] (human SK-N-DZ)	RA, Bt ₂ c-AMP;	Genistein, Herbimycin A Erbstatin	
medulloblastoma [neurofilament, GFAP] (human Med-3)		Genistein, Herbimycin A Erbstatin	
cell lines	[markers]	inducers	(tyrosine kinase inhibitors)

DMSO: Dimethyl sulfoxide

HMBA: Hexamethylenedisacetamide

SSEA-1: stage-specific embryonic antigen-1

RA: retinoic acid

Bt₂c-AMP: dibutyryl cyclic AMP

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

1. 形態学的変化

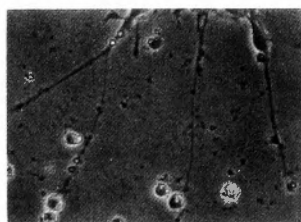
薬剤添加培養後6日目まで経時的に観察し、神経様突起の伸長が細胞長径の2倍以上となったものを細胞

分化と規定した¹⁶⁾。なおその程度は神経様突起を有する細胞の全細胞数に対する割合で示した。

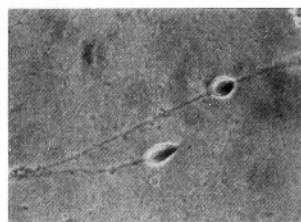
2. 分化抗原の発現



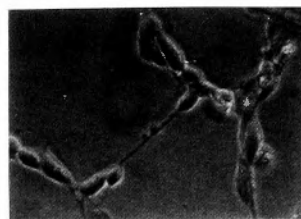
SK-N-DZ



E



G



V

Fig. 2 Morphological alteration of a neuroblastoma cell line SK-N-DZ treated with several drugs for 3 days.
E: Erbstatin (3 μg/ml), G: Genistein (3 μg/ml), V: Vanadate (10 μM)

基礎実験の結果より、薬剤添加培養後3日目に、形態学的変化が最も著明であったのでこの day3 に、ニューロン系の分化抗原 neurofilament (160 kDa) の発現量の変化を、anti-human 160 k neurofilament antibody (Immunotech 社) をもちいて、免疫組織化学染色²²⁾ と Western blotting assay にて調べた。またニューロン系とグリア系への bipotential な分化能を有するとされる髄芽腫の由来株 Med-3 細胞には、グリア系の分化抗原 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現²⁵⁾ を併せて調べた。

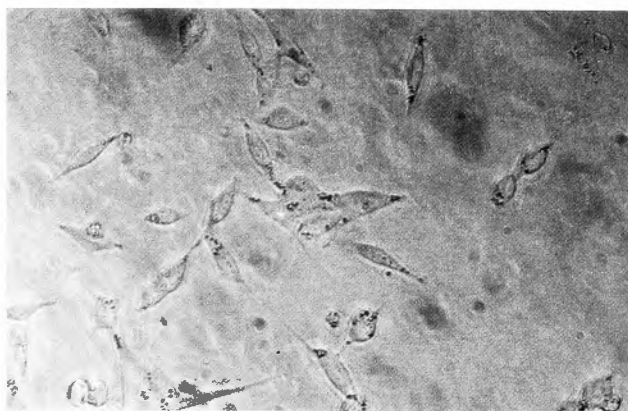
3. N-myc タンパクの発現

N-myc の増幅はヒト神経芽細胞腫で高頻度に起こっており、その悪性度との相関や細胞分化との関わり

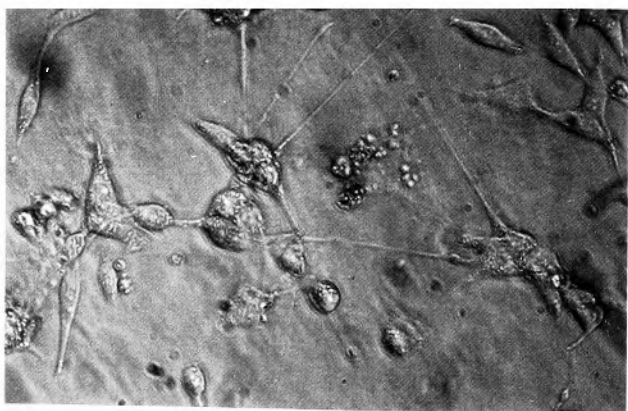
が注目されている^{18,21,27)}。ヒト髄芽腫由来株 Med-3 細胞の、上記薬剤の分化誘導における N-myc タンパクの発現変化を薬剤添加培養後 day3 に、anti-human N-myc polyclonal antibody (ニチレイ社) をもちいて Western blotting assay にて調べた。

4) チロシンリン酸化タンパクの発現

チロシンリン酸化酵素阻害剤が細胞内で正しくその機能を働かせている事を確認する目的で、SK-N-DZ 細胞と Med-3 細胞ともに薬剤添加培養後 day3 に、anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (Boehringer 社) をもちいて、チロシンリン酸化タンパクの発現変化を免疫沈降法にて調べた^{8,14)}。



Med-3



+ Herb.A

Fig. 3 Morphological alteration of a medulloblastoma cell line Med-3 treated with 0.5 µg/ml Herbimycin A for 3 days.

結 果

1) 形態学的変化

神経芽細胞腫由来株のうち SK-N-DZ 細胞は Erbstatin 及び Genistein に強く反応し、添加培養後 3 日に著明な神経様突起伸長が認められたが、Vanadate では軽度の変化しか示さなかった (Fig. 2). また GOTO 細胞の反応は中等度であった。膠芽腫由来株である T98G 細胞は Erbstatin, Genistein, Vanadate のいずれにも反応しなかった。一方髄芽腫由来株の Med-3 細胞は Erbstatin, Genistein 及び Her-bimycin A に反応し、day3 に中等度の突起伸長を示した。 (Fig. 3) 以上の結果をまとめて Table 1 に示した。

2) 分化抗原の発現

神経芽細胞腫由来株の SK-N-DZ 細胞と GOTO 細胞では元来 neurofilament (160 kDa) が発現しているが、Erbstatin 及び Genistein を添加培養後、形態学的変化の強かった day3 に免疫組織化学染色を行うと SK-N-DZ 細胞では発現増大が観察され (Fig. 4), また

Western blotting assay においても neurofilament の発現増大が確認された (Fig. 5)。しかし GOTO 細胞では発現の変化は見られなかった。中等度の形態学的変化を示した髄芽腫由来株の Med-3 細胞では neurofilament (160 kDa) の発現増大は免疫組織化学的にも中等度で

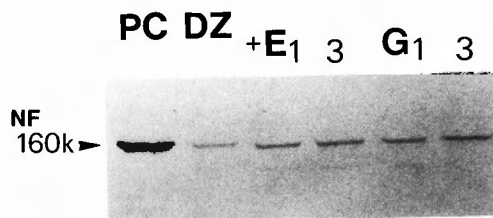


Fig. 5 Expression of neurofilament (160 kDa) in Erbstatin, Genistein-treated or untreated SK-N-DZ cells and untreated rat Pheochromocytoma cells by Western blot analysis. Immunoprecipitates were electrophoresed on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose membranes, and analyzed with anti-neurofilaments monoclonal antibody.

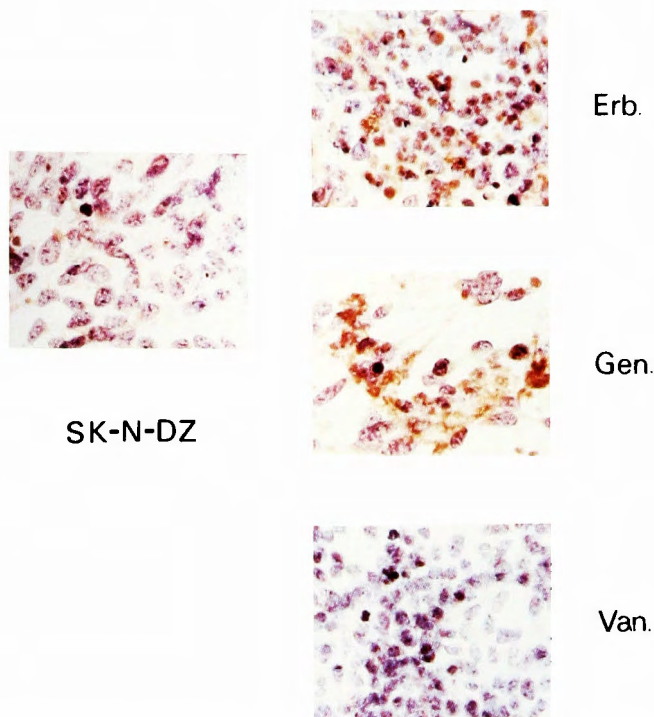


Fig. 4 Immunohistochemical staining of SK-N-DZ (anti-human neurofilaments antibody, ABC methods) treated with drugs for 3 days.

Erb.: Erbstatin (3 μ g/ml), Gen.: Genistein (3 μ g/ml), Van.: Vanadate (10 μ M)

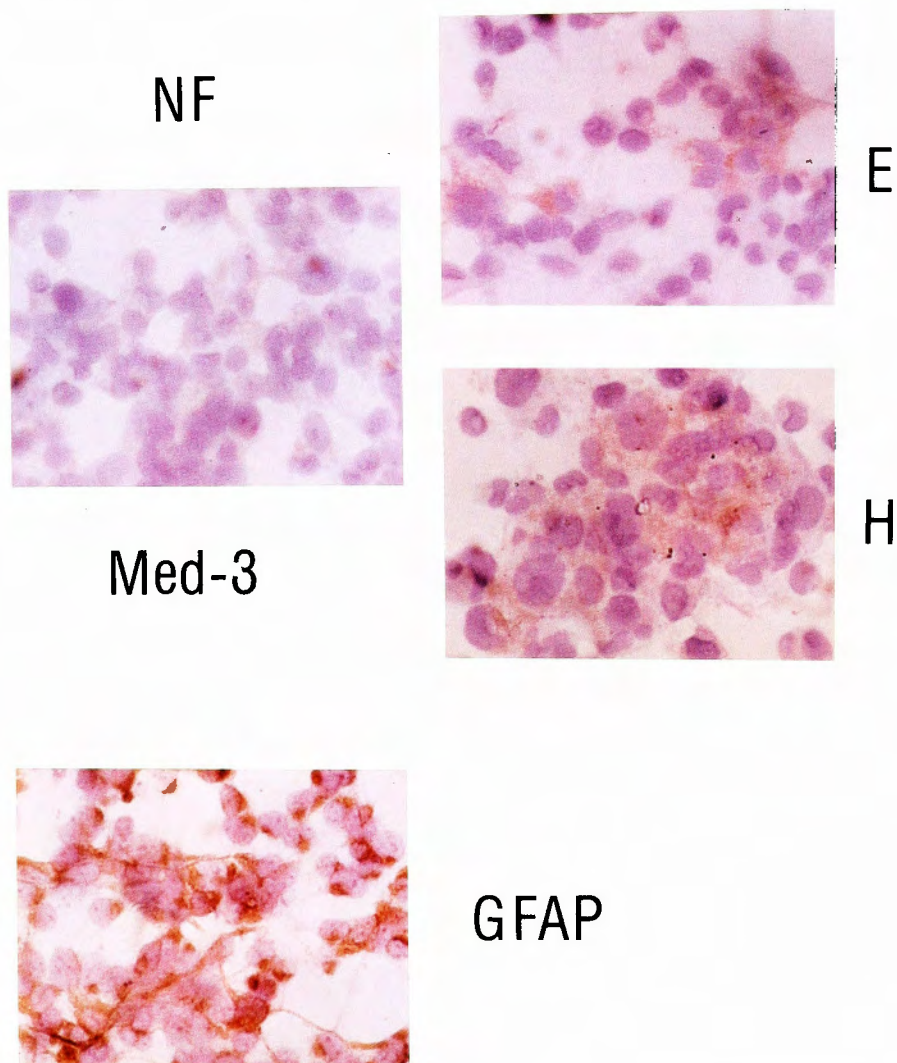


Fig. 6 Immunohistochemical staining of Med-3 (anti-human neurofilaments antibody and anti-human GFAP antibody, ABC methods) untreated or treated with drugs for 3 days.

NF: neurofilament, GFAP: glial fibrillary acidic protein, E: Erbstatin, H: Herbimycin A

あった。(Fig. 6)

3) N-myc タンパクの発現

Western blotting assay による N-myc タンパクの発現は double band (64 kDa & 62 kDa) が明確に認められた Med-3 細胞のみで薬剤添加後の変化 (Erbstatin, Genistein, Herbimycin A) を調べたが、形態学的変化の強い day3 でも発現量の変化をほとんど認めなかった。(Fig. 7)

4) チロシンリン酸化タンパクの発現

薬剤添加培養後 day3 にチロシンリン酸化タンパクの発現を免疫沈降法にて調べた。神経芽細胞腫由来株 SK-N-DZ 細胞では Erbstatin, Genistein で (Fig. 8), 髄芽腫由来株 Med-3 細胞では Herbimycin A でもタンパクの発現が低下していた。(Fig. 9)

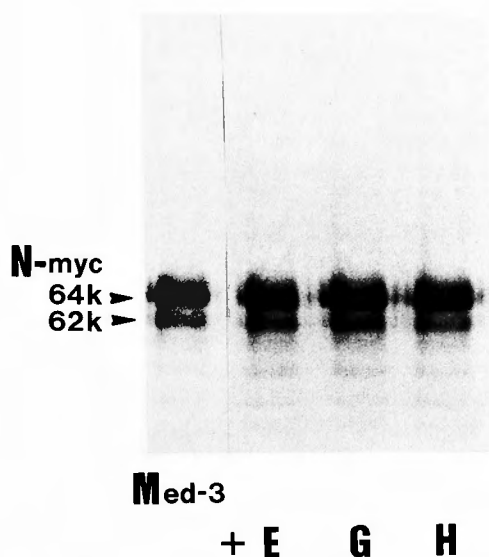


Fig. 7 Expression of N-myc gene product in tyrosine kinase inhibitors-treated or untreated Med-3 cells by Western blot analysis. E: Erbstatin, G: Genistein, H: Herbimycin A

a-p-y

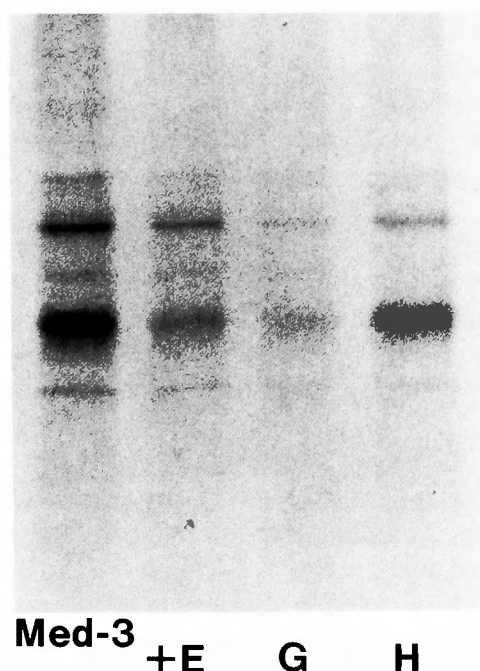


Fig. 9 Expression of tyrosine-phosphorylated proteins in Erbstatin, Genistein-treated or untreated Med-3 cells by immunoprecipitation. DZ: untreated SK-N-DZ cells, SR: Rous sarcoma virus-transformed rat 3Y1 cells, E: Erbstatin, G: Genistein

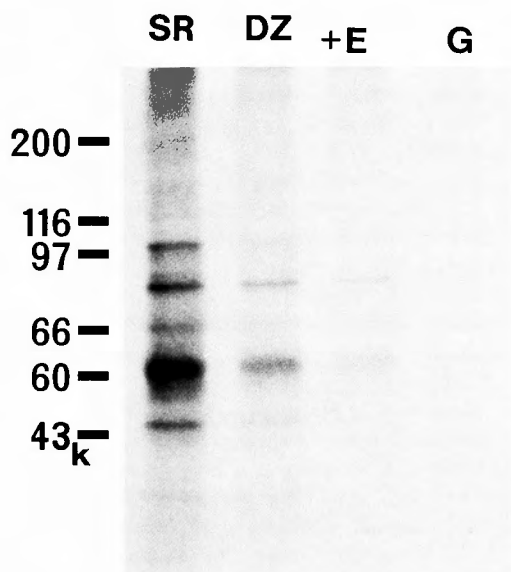


Fig. 8 Expression of tyrosine-phosphorylated proteins in Erbstatin, Genistein-treated or untreated SK-N-DZ cells by immunoprecipitation. DZ: untreated SK-N-DZ cells, SR: Rous sarcoma virus-transformed rat 3Y1 cells, E: Erbstatin, G: Genistein

考 察

神経芽細胞腫は末梢神経系にしばしば見られる小児の代表的な悪性腫瘍である⁹⁾。一方、髄芽腫は小児の小脳虫部に好発し、神経細胞系およびグリア系の両方向へ潜在的分化能をもつ未分化型脳腫瘍としてよく知られている⁹⁾。今回の実験で、チロシンリン酸化酵素阻害剤の Erbstatin 及び Genistein がヒト神経芽細胞腫由来株の SK-N-DZ 細胞を分化誘導し (in vitro), また Erbstatin, Genistein 及び Herbimycin A がヒト髄芽腫由来株の Med-3 細胞を分化誘導することが示されたが、ともに神経細胞系への分化という点で共通している。Erbstatin, Genistein 及び Herbimycin A は構造が互いに大きく異なるものの (Fig. 1), 有する阻害作用はチロシンリン酸化酵素に特異的であり^{17,1,24,29)}, セリンやスレオニン残基のリン酸化には何の影響も与えないことより、チロシン残基という特殊な部位における

タンパクのリン酸化を阻害することが細胞分化、特に神経細胞系への分化の誘導に決定的な意味をもつと示唆される。さらにまた、これらのチロシンリン酸化酵素阻害剤が神経系細胞以外の細胞の分化誘導にもかかわっているという報告が近年相次いでいる。その中で注目すべきものとしてマウスの赤白血病や胎児性癌由来培養細胞あるいはヒト白血病細胞を Herbimycin A や Genistein にて分化誘導したというものがある^{23,24,10)} (Table 2)。このうち F9 細胞 (マウス胎児性癌由来株細胞) や SK-N-DZ 細胞は retinoic acid や dibutyryl cyclic AMP でも分化誘導されたという報告がある^{25,14)}。またプロテインキナーゼ C が神経系細胞の分化誘導に預かっているという説^{9,11)} と同時にプロテインキナーゼ C 阻害剤の役割を強調する説⁷⁾ もある。しかしながら、今回の実験結果及び一連の内外の報告をあわせて考えると、分化の指標も異なり、系も組織も異なる腫瘍細胞がチロシンリン酸化酵素阻害剤で分化誘導される事より、タンパク質リン酸化、とりわけチロシン残基でのリン酸化阻害が細胞の分化に深くかかわっていると考えられる。しかし細胞内での、その mechanism は未だ不明であり、今後他のプロテインキナーゼとの関わりも含めての総合的かつ根源的な研究が必要である。

結 語

ヒト神経芽細胞腫由来株 SK-N-DZ 細胞とヒト髄芽腫由来株 Med-3 細胞に対し、チロシン特異的プロテインキナーゼ活性を阻害する 3 種のチロシンリン酸化酵素阻害剤 Erbstatin, Genistein, Herbimycin A を作用させると経時的変化として神経様突起伸長が観察され、さらに神経細胞系の分化抗原 neurofilament (160 k) の発現増大が認められた。チロシンリン酸化タンパクの発現はそれぞれで低下しており、3 種の薬剤のもつチロシンキナーゼ阻害作用、すなわち細胞内タンパク質のチロシン残基でのリン酸化阻害が神経系の細胞分化誘導の中心的役割を果たしているとし唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました京都大学脳神経外科菊池晴彦教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始御指導頂きました現大阪大学微生物病研究所発癌遺伝子部門秋山徹助教授、京都大学ウイルス研究所病理部門難波雄二郎助教授、京都大学脳神経外科織田祥史助教授、及び宮武伸一博士に感謝いたします

文 献

- 1) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S: J. Biol. Chem. 262: 5592-5595, 1987.
- 2) Alema S, Casalbere P, Agostini E, et al: Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by v-src oncogene. Nature. 316: 557-559, 1985.
- 3) Bishop JM: Science 235: 305-311, 1987.
- 4) Brugge JS, Cotton PC, Queral AE, et al: Neurons express high levels of a structurally modified, activated form of pp60^{c-src}. Nature 316: 554-557, 1985.
- 5) Cruz-Sanchez FF, Rossi ML, Hughes JT: Medulloblastoma Acta Neuropathol 79: 205-210, 1989.
- 6) Evans AE, Baum E, Chord R: Do infants with stage IV-S neuroblastoma need treatment? Arch. Dis. Child. 56: 271-274, 1981.
- 7) Felipe V, Mimama MD, Grisoria S: A specific inhibitor of protein kinase C induces differentiation of neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. 265: 9599-9601, 1990.
- 8) Frackelton Jr AR, Ross AH, Herman NE: Mol. Cell. Biol. 3: 1343, 1983.
- 9) Hall FL, Felnyhough P, Ishii DN: J. Biol. Chem. 263: 4460-4466, 1988.
- 10) Honma Y, Okabe J, Hozumi M: Induction of erythroid differentiation of K562 human leukemic cells by Herbimycin A, an inhibitor of tyrosine kinase activity. Cancer Res. 49: 331-334, 1989.
- 11) Hsu L, Natzyak D, Laskin JD: Cancer Res. 44: 4607-4614, 1984.
- 12) Levy JB, Dorai T, Wang LH, et al: The structurally distinct form of pp60^{c-src} detected in neuronal cells is encoded by a unique c-src mRNA. Mol. Cell. Biol. 7: 4142-4145, 1987.
- 13) Lynch SA, Brugge JS, Levine JM: Induction of altered c-src product during neural differentiation of embryonal carcinoma cells. Science 234: 873-876, 1986.
- 14) Matsumoto M, Akiyama T, Miyatake S, et al: Expression of proto-oncogene products during drug-induced differentiation of a neuroblastoma cell line SK-N-DZ. Acta Neuropathol 79: 217-221, 1989.
- 15) Mellstroem K, Bjelfman C, Hammerling U, et al: Expression of c-src in cultured human neuroblastoma and small cell lung carcinoma cell lines correlates with neuroendocrine differentiation. Mol. Cell. Biol. 7: 4178-4184, 1987.
- 16) Morioka H, Ishihara, Shibai H: Staurosporine-induced differentiation in a human neuroblastoma cell line, NB-1. Agrilc. Biol. Chem. 49: 1959-1963,

- 1985.
- 17) Ogawara H, Akiyama T, Ishida J: Antibiotics 39: 606-608, 1986.
- 18) Schwab M, Ellison J, Busch M, et al: Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4940-4944, 1984.
- 19) Sekiguchi M, Oota T, Sakakibara K: Establishment and characterization of a human neuroblastoma cell line in tissue culture. J. Exp. Med. 49: 67-83, 1979.
- 20) Sugimoto T, Tatsumi E, Kemshed JT, et al: Determination of cell surface membrane antigens common to both human neuroblastoma and leukemia-lymphoma cell lines by a panel of 38 monoclonal antibodies. JNCI. 73: 51-57, 1984.
- 21) Thiele CJ, Reynolds J, Israel MA: Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. Nature 313: 404-406, 1987.
- 22) Trajanowski JQ, Hickey WF: Human teratomas express differentiated neural antigens. Am. J. Pathol 115: 383-389, 1984.
- 23) Uehara Y, Hori M, Takeuchi T, et al: Mol. Cell, Biol. 6: 2198-2206, 1986.
- 24) Umezawa H, Imoto M, Sawa T: J. Antibiotics 39: 170-173, 1986.
- 25) Velasco ME, Dahl D, Roessmann U: Immunohistochemical localization of GFAP in human glial neoplasms. Cancer 45: 484-494, 1980.
- 26) Watanabe T, Shiraishi T, Sasaki S: Inhibitors for protein-tyrosine kinases, ST638 and Genistein, induce differentiation of mouse erythroleukemia cells in a synergistic manner. Exp. Cell. Research (in press)
- 27) Zimmerman KA, Yancopoulos GD, Colum RG, et al: Differential expression of myc family genes during murine development. Nature. 319: 780-783, 1986.