

---

---

原 著

---

---

## ヒト組織と神経芽腫における GATA-2 の 発現に関する研究

林 和 直

新潟大学大学院医歯学総合研究科

消化器内科学分野・肝臓病学分野

(指導：青柳 豊教授)

**Study on the Expression of GATA-2 in Human Tissues and Neuroblastoma**

**Kazunao HAYASHI**

*Division of Gastroenterology and Hepatology,*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science*

*(Director: Prof. Yutaka AOYAGI)*

### 要 旨

Globin transcription factor 2 (GATA-2) は造血細胞, 神経細胞, 泌尿生殖器細胞, 血管内皮細胞などに発現する転写調節因子 GATA family の一員である. 本研究では新たに作成された抗ヒト GATA-2 抗体を用いて免疫組織学的染色を行い, ヒト成人において骨髄の前赤芽球, 骨髄芽球, 末梢血の肥満細胞, 血管内皮, 腎遠位尿管上皮に GATA-2 の発現を認めた. ヒト胎児では血管内皮, 副腎, 腎臓, 肝内造血細胞, 中枢神経細胞に GATA-2 の発現を認めた. 神経芽腫ではロゼット構造をなす円形細胞の核に GATA-2 の発現が高く, 分化が進んだ細線維型細胞では GATA-2 の発現は低下する傾向が強いことから, GATA-2 の発現は予後を予想する因子となる可能性が示唆された. また, 4 種の神経芽腫細胞株 (SH-SY5Y, GOTO, IMR-32, NB-1) の蛍光染色では核に GATA-2 の発現を認めたが, GATA-2 発現のもっとも強い SH-SY5Y はオールトランスレチノイン酸を用いた分化誘導によって, GATA-2 の蛋白と mRNA の発現は変化せず, 神経芽腫における分化度と GATA-2 の発現の関係を再現することはできなかった. 本抗体を用いた免疫染色は神経芽腫の診断及び神経細胞や血球の分化の解析に有用と思われる.

キーワード: GATA-2, 中枢神経, 神経芽腫, SH-SY5Y, 分化誘導

---

**Reprint requests to:** Kazunao HAYASHI  
Division of Gastroenterology and Hepatology  
Niigata University Graduate School of Medical  
and Dental Science  
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,  
Niigata 951-8510 Japan

**別刷請求先:** 〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分  
野・肝臓病学分野 林 和 直

## 緒 言

転写因子 GATA (globin transcription factor) は 2 個の亜鉛フィンガー DNA 結合領域を共通して持ち、ノンコーディング領域の「GATA」配列を認識して DNA に結合する転写調節因子である<sup>1)</sup>。GATA ファミリーは転写因子 GATA-1 から GATA-6 の 6 種からなり、GATA-1～3 は造血系細胞の発生に重要な役割を果たしている<sup>2)～4)</sup>。一方、GATA-4～6 は心臓・消化管発生に関係する<sup>5)</sup>。GATA-2 は造血のみならず泌尿生殖器<sup>6)</sup>、神経系の分化にも必須である。特にカテコールアミン系交感神経の分化に重要な分子である<sup>7)8)</sup>。GATA-2 のノックアウトマウスでは神経分化が高度に障害される<sup>9)</sup>。さらに神経分化にかかわる Phox2, dHAND などの遺伝子と GATA-2 との関係も解明されつつある<sup>10)11)</sup>。また、未分化の神経細胞から発生する神経芽腫と GATA-2 の関係も報告されている<sup>12)13)</sup>。しかし、これまでパラフィン切片に使用可能な抗体がほとんどないことから GATA-2 の組織発現を形態的に確認することが困難であった。

本研究では新たに作成された抗ヒト GATA-2 抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、ヒト成人、ヒト胎児の臓器における GATA-2 の発現を観察した。また、神経芽腫の免疫染色を行い、GATA-2 の発現を評価した。さらに 4 種の神経芽腫細胞株を用いて GATA-2 の蛋白と mRNA の発現の差を評価するとともに、オールトランスレチノイン酸を用いた分化誘導実験による神経分化段階での GATA-2 の発現の変化と細胞形態変化について検討した。

## 材料と方法

### 1. ヒト組織

死後 5 時間以内にヒト成人剖検例から採取した胃、小腸、大腸、肝臓、大脳、心臓、大動脈、肺、膵臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣、子宮、骨髄と健康ヒト成人より採取した末梢血、ヒト胎児 6 例 (胎齢 8 週×2 例, 9 週×2 例, 10 週, 12 週), 1988 年か

ら 2003 年に新潟大学医歯学総合病院で手術を受け、新潟大学細胞病理学教室で神経芽腫 (男 7 例, 女 9 例) と診断された 16 例、および 1994 年から 2008 年に神経節細胞種と診断された 10 例を検討した。なお、ヒト組織の本研究への使用については新潟大学倫理委員会の承認を得ている。検体は、ホルマリン固定、パラフィン包埋した後、薄切して hematoxylin eosin 染色と下記の免疫染色を行った。

### 2. 細胞株

神経芽腫由来の SH-SY5Y は新潟大学脳研究所付属生命科学リソース研究センターから供与して頂いた。SH-SY5Y の培養には 60mm/tissue culture dish (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) に  $7.5 \times 10^5$  個ずつ播種し、5% CO<sub>2</sub>, 37℃ で 10% 非動化胎仔ウシ血清 (JRH Bioscience Inc, Lexington, KS), ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100mg/ml) 含有 DMEM, high glucose (Gibco by Invitrogen, California, USA) 培養液を使用した。GOTO, IMR-32 は Health Science Research Resources Bank (大阪, 日本) から購入した。同様に IMR-32 の培養には 10% 非動化胎仔ウシ血清 (JRH Bioscience Inc), ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100mg/ml), NEAA 含有 MEME (Sigma-Aldrich, Irvine, UK), GOTO の培養には 10% 非動化胎仔ウシ血清 (JRH Bioscience Inc), ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100mg/ml) 含有 RPMI (Sigma-Aldrich) と MEME (Sigma-Aldrich) を 1:1 で混合した培養液を使用した。NB-1 は新潟大学病理学教室所有の細胞株を使用した。NB-1 の培養には 10% 非動化胎仔ウシ血清 (JRH Bioscience Inc) ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100mg/ml) 含有 RPMI (Sigma-Aldrich) を使用した。培養液は 1～2 日おきに交換した。

### 3. 1 次抗体

マウス抗ヒト GATA-2 モノクローナル抗体 (以下 GATA-2 抗体) (clone, B9922A, Perseus

Proteomics, 東京, 日本) は 10mg/dl を 1000 倍希釈して使用した. 本抗体は GATA-2 (480aa) の中の 192-245aa を epitope として作成された.

兔抗ヒト MAP2 ポリクローナル抗体 (以下 MAP2 抗体) (clone C3D-1, MILIPORE, Denmark) は 50 倍希釈して使用した.

#### 4. 免疫組織化学染色

ホルマリン固定, パラフィン包埋した組織を薄切し, オートクレーブ処理 (121 °C, 15 分) によって抗原を賦活化して免疫染色を行った. 0.3 % 過酸化水素加メタノールで 30 分間, 内因性ペルオキシダーゼを阻害した. 10 % 羊血清 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) でブロッキングしたのち一次抗体として GATA-2 抗体を 60 分間反応させた. 二次抗体としてヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイ, 東京, 日本) を使用して酵素標識ポリマー法 (間接法) にて染色し, 発色には 3.3'-diaminobenzidine · 4HCl) (ニチレイ) を用いた.

#### 5. ウェスタンブロット法

培養細胞に 1 % TritonX, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 1mM PMSF の混合液を加え, 氷上に 30 分間静置後に 14,000rpm 15 分間遠心して蛋白を抽出した. 蛋白は 8 % SDS-PAGE で分離し, PVDF メンブレン (Asherman, Aylesbury, UK) に転写した. メンブレンは 5 % スキムミルクで一晩ブロッキングした後一次抗体 1 時間, 二次抗体 anti-mice Ig-horseradish peroxidase-like F (ab)<sub>2</sub> fragment (Asherman) を 30 分間反応させ, ECL detection system (Asherman) で可視化した. 陽性対照として GATA-2 を強制発現させた COS-1 細胞株から抽出した蛋白を使用した.

#### 6. 蛍光染色

4 well チャンバースライドに 4 種の神経芽腫細胞株を 2 日間培養し, 4 % Paraformaldehyde/PBS で固定した. 蛍光染色の一次抗体として GATA-

2 抗体を用いた. 二次抗体としては Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG, F (ab)<sub>2</sub> (Invitrogen, California, USA) を用いた. Hoechst 33342 (Invitrogen) で核染色を行い, ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) で封入した. 観察には共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META (Carl Zeiss Co., Ltd., Heiligenhaus, Germany) を用いた.

#### 7. RNA の抽出と RT-PCR 法

培養細胞から acid guanidinium-phenol-chloroform 法を用いて total RNA を抽出した. 1 µg の total RNA を RT Buffer (Invitrogen), 0.01M の dithiothreitol (Invitrogen), 20U の RNase inhibitor (Promega, Southampton, UK), 500 µM の deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; Pharmacia, Uppsala, Sweden), 1 µg の random primer (Promega), 100U の reverse transcriptase (Invitrogen) と混和し, 蒸留水で総量 20 µl とした. 反応液を 42 °C で 60 分間インキュベート後, 95 °C, 3 分加熱して cDNA を作成した. 今回用いたプライマー GATA-2: upstream, 5'-CCC TAA GCA GCG CAG CAA GAC-3' downstream, 5'-GAT GAG TGG TCG GTT CTG GCC-3' は Greiner Japan Corporation (東京, 日本) より購入した. PCR 反応液は 1U の Taq polymerase, 1X PCR reaction buffer, 1mM の MgCl<sub>2</sub> (それぞれ Promega), 0.2mM の dNTP mixture (Takara, 大津, 日本) にそれぞれ 0.5pmol のプライマーと滅菌蒸留水で 19 µl とし, cDNA を 1 µl 加えて 20 µl とした. PCR は 95 °C 10 分, (95 °C 1 分 61 °C 1 分) 25 サイクル, 72 °C 10 分の条件で行った. サーマルサイクラーは PC-700 および PC-816 の 2 台 (ASTEC, 福岡, 日本) を使用した. 陰性コントロールは template DNA の代わりに滅菌蒸留水を加えたものを使用した. PCR 産物 5 µl を 15 % ポリアクリルアミドゲルで 100V, 50 分泳動後に紫外線イルミネーターで検出した.

#### 8. SH-SY5Y 細胞株のオールレチノイン酸を用いた分化誘導

SH-SY5Y を 60mm/tissue culture dish (Greiner

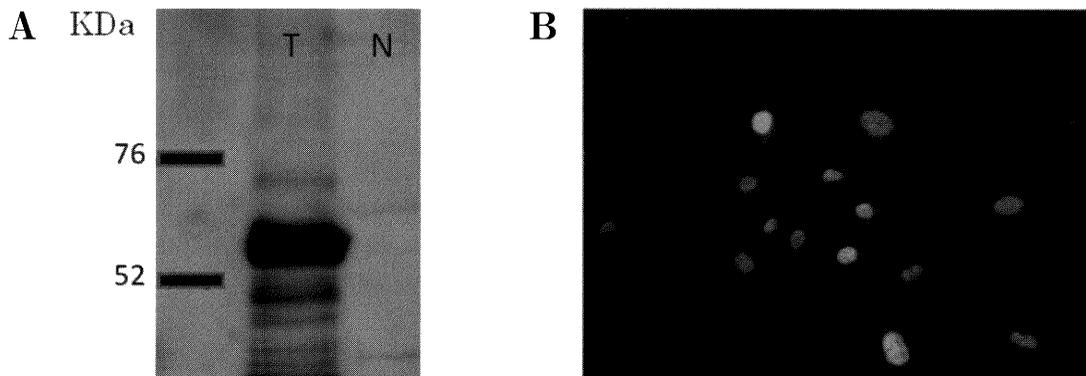


図 1

A GATA-2 強制発現細胞のウエスタンブロット

negative control (293T) には反応せずに, GATA2 transfection cell (COS-1) で 55kDa にバンドが検出される. T: GATA2 transfection cell (COS-1) N: negative control (293T)

B ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の GATA-2 の蛍光染色

抗ヒト GATA-2 抗体はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の蛍光染色で核を主体とした染色性を認める.

Bio-One GmbH) に  $7.5 \times 10^5$  個ずつ播種し, 5%  $\text{CO}_2$ , 37°C で DMEM, high glucose (GIBCO) で培養した. 培養開始 48 時間後に培養液を交換し, オールレチノイン酸 (Sigma-Aldrich) を加えて  $10 \mu\text{M}$  に調整した. 培養液は 48 時間毎に交換し, オールレチノイン酸も  $10 \mu\text{M}$  に調整した. オールレチノイン酸添加前, 添加後 1 日, 2 日, 4 日の形態変化を観察し, 同時に RNA と蛋白を抽出し RT-PCR, ウエスタンブロットで評価した. 形態変化解析には倒立顕微鏡 (Nikon Eclipse Ti-S, 東京, 日本) を使用した.

## 9. 統計解析

同一実験を 3 回繰り返し検討して, 平均値と標準偏差を算出した. 統計比較は Mann-Whitney U-test を行い, 有意差は  $P < 0.05$  とした.

## 結 果

### 1. 抗ヒト GATA-2 抗体のヒト組織に対する反応の特異性

GATA-2 強制発現 COS-1 細胞から得られた

蛋白を GATA-2 抗体を用いてウエスタンブロット解析すると, GATA-2 の予想される分子量の 55kDa に明瞭なバンドが検出された (図 1A). GATA-2 の内因性コントロールとして使用されるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の蛍光染色では核を主体とした染色性を認めた (図 1B). 以上の成績から, この GATA-2 抗体は GATA-2 蛋白を特異的に検出していると判断された.

### 2. ヒト組織における GATA-2 の発現

ヒト成人では骨髄の前赤芽球, 骨髄芽球, 末梢血の肥満細胞, 血管内皮, 腎遠位尿管上皮のいずれも核に GATA-2 の発現を認めた. ヒト胎児では血管内皮, 副腎, 腎尿管, 肝内造血細胞, 中枢神経細胞の核に GATA-2 の発現を認めた. ヒト胎児の中枢神経では GATA-2 の発現は間脳, 中脳, 橋, 髄脳の腹側部位の神経細胞の核内に観察された (図 2).

### 3. 神経芽腫・神経節細胞種における GATA-2 の免疫染色

神経芽腫の免疫染色ではロゼット構造をなす円

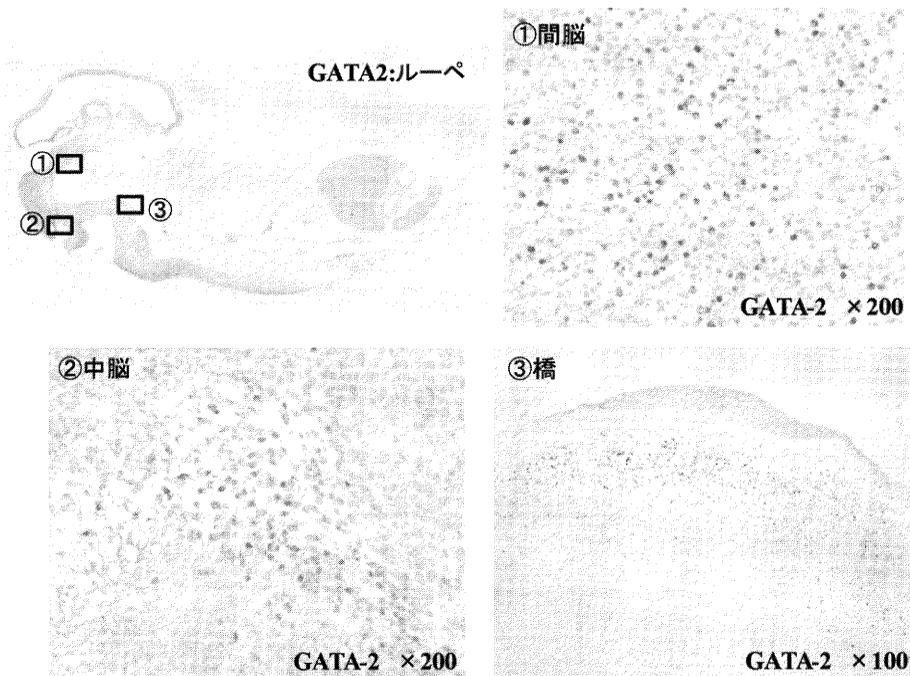


図2 ヒト胎児中枢神経の GATA-2 の免疫染色。

ヒト胎児組織の間脳, 中脳, 橋, 髄脳の腹側部位の神経細胞の核に GATA-2 の発現を認める。

形細胞に核を主体とした GATA-2 の発現を認めた (図 3)。ロゼットを形成しない部位でも円形細胞は GATA-2 陽性を示した。分化が進んだ細胞維型細胞では GATA-2 陽性細胞は減少した。また, 神経節細胞種では GATA-2 陽性細胞は見られなかった。

#### 4. 神経芽腫細胞株における GATA-2 の蛍光染色

蛍光染色で神経芽腫細胞株 4 種 (SH-SY5Y, GOTO, IMR-32, NB-1) 全てに GATA-2 の発現を認めた。しかし, 細胞株によって GATA-2 発現の強度に差があり, SH-SY5Y > GOTO = IMR-32 >> NB-1 の順であった (図 4A)。SH-SY5Y, GOTO は核内にびまん性の発現を呈し, IMR-32, NB-1 は核小体パターンでの発現を示した。

#### 5. 神経芽腫細胞株における蛋白と mRNA の発現

ウェスタンブロットでは神経芽腫細胞株 4 種 (SH-SY5Y, GOTO, IMR-32, NB-1) 全ての細胞株で GATA-2 蛋白の発現を認めた。細胞株によって GATA-2 の発現強度に差があり, SH-SY5Y > GOTO = IMR-32 >> NB-1 の順であった (図 5A)。RT-PCR でも神経芽腫細胞株 4 種 (SH-SY5Y, GOTO, IMR-32, NB-1) すべてに GATA-2 の mRNA 発現が見られた。しかし, 細胞株ごとに GATA-2 の mRNA 発現の強度に差があり, SH-SY5Y > GOTO = IMR-32 >> NB-1 の順であった (図 5B)。

#### 6. SH-SY5Y のオールトランスレチノイン酸による分化誘導による変化

神経突起が細胞の 1 倍以上伸びた細胞を分化し

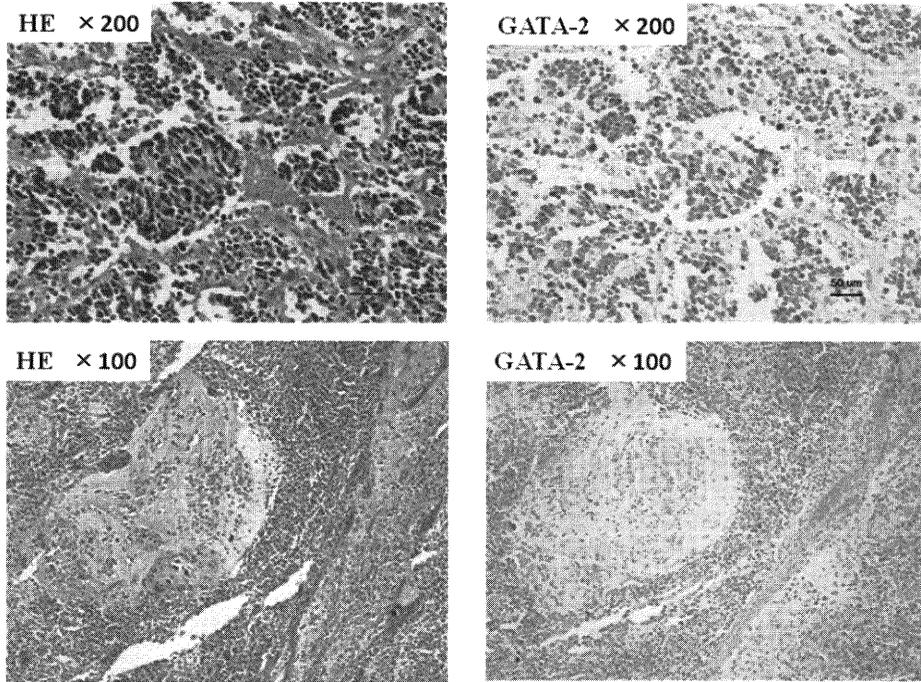


図3 神経芽腫の GATA-2 の免疫染色.

ロゼット構造をなす円形細胞に GATA-2 の発現を認める。ロゼットを形成しない部位でも円形細胞で GATA-2 陽性を示した。細胞分化が進んだ細線維型細胞では GATA-2 陽性細胞は少ない。

た細胞として扱い、250 個以上細胞をカウントして分化した細胞の割合を計算したところ、オールトランスレチノイン酸非投与と比較してオールトランスレチノイン酸投与群の方が分化した細胞の割合が有意に高かった (図 6A)。ウエスタンブロットでは神経分化誘導マーカーの MAP2 がオールトランスレチノイン酸投与群で時間経過とともに増加した (図 6B)。しかし、RT-PCR、ウエスタンブロットともに GATA-2 の mRNA と蛋白の発現に分化誘導による明らかな差を認めなかった (図 6C)。

### 考 察

新規に作成された抗マウス GATA-2 抗体を用いたウエスタンブロットでは COS-1 細胞に強制

発現させた GATA-2 蛋白が認識された。GATA-2 の発現が知られているヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の蛍光染色で核を主体とした染色性を認め、ホルマリン固定パラフィン包埋切片の免疫組織化学染色でも血管内皮細胞の染色性を認めた。以上の結果から本抗体は蛋白レベルで内因性のヒト GATA-2 を検出できる抗体であることが示された。

#### 1. ヒト成人とヒト胎児組織での GATA-2 の発現

GATA-2 欠損マウスは胎生 11.5 日までに全て致死となり、この時期に見られる全系統の血液細胞が著明に減少すると報告されている<sup>13)</sup>。また、造血幹細胞の維持と肥満細胞の形成に GATA-2 が必要であるとされている<sup>14)</sup>。本研究でも免疫染色で、ヒト成人骨髓の前赤芽球、骨髓芽球、末

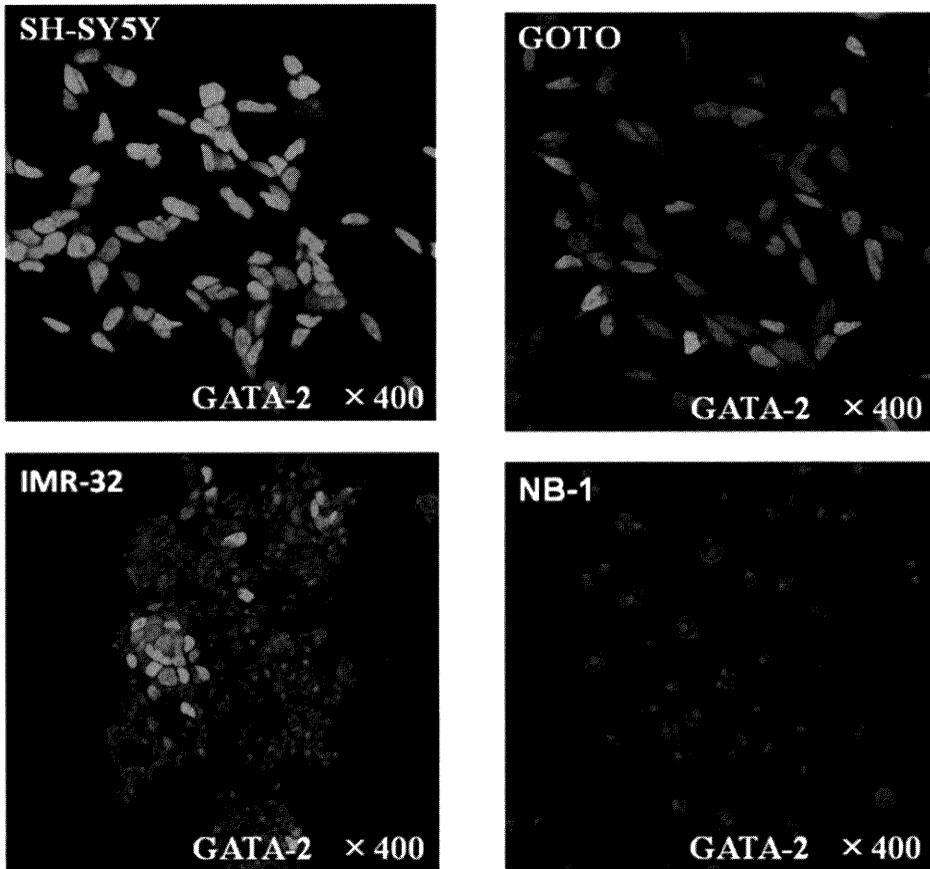


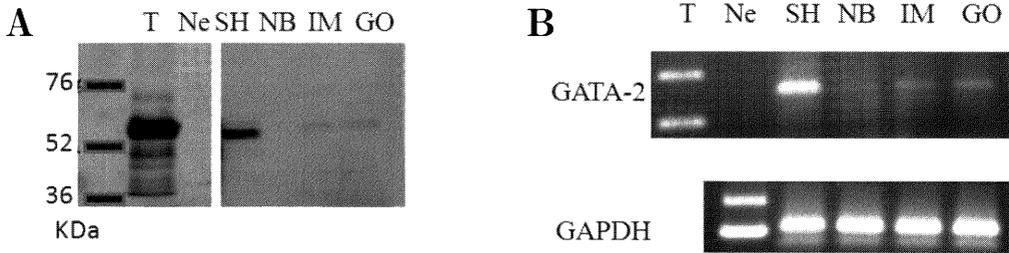
図4 神経芽腫細胞株4種のGATA-2の蛍光染色  
GATA-2発現の強度に差があり、SH-SY5Y>GOTO = IMR-32>>NB-1の順であった。

梢血の肥満細胞，ヒト胎児の肝臓内造血細胞の核にGATA-2の発現を認め，GATA-2が血球分化に重要な因子であることが裏付けられた。血管内皮にもGATA-2が発現することが報告されている<sup>15)</sup>。本研究でもヒト成人，ヒト胎児の血管内皮の核にGATA-2の発現を認め，GATA-2が血管内皮の分化や機能に重要であることが示唆された。GATA-2ノックダウンマウスでは様々な水腎症などの泌尿生殖器発生異常が発生する<sup>6)</sup>。本研究でヒト成人の腎遠位尿管上皮，ヒト胎児尿管にGATA-2の発現を認めたことからGATA-2は泌尿生殖器発生に必須であると考え

られる。

## 2. マウスとヒト胎児中枢神経におけるGATA-2の発現

Tsarovinaらはトリ，マウスにおいてGATA-2が自律神経発達において不可欠な役割を果たすことを報告した<sup>9)</sup>。Nardelliらは胎生9日のマウス後脳の腹側r2, r4領域にGATA-2が発現し，胎生9.5日ではr2領域は消え，r4領域は発現を維持し，中脳腹側にも発現していることを報告している<sup>7)</sup>。本研究では，GATA-2の免疫染色で胎生9週ヒト胎児の中脳，橋，髄脳の腹側にGATA-2



T: GATA2 transfection cell (COS-1)  
 Ne: negative control (293T)  
 SH: SH-SY5Y NB: NB-1 IM: IMR-32  
 GO: GOTO

図5 Transfection cell と神経芽腫細胞株4種の GATA-2 のウエスタンブロット (図5A) と RT-PCR (図5B). 蛋白と mRNA の発現強度はともに SH-SY5Y > GOTO = IMR-32 >> NB-1 であった.

の発現を認め、胎生期マウスの発現部位とほぼ一致し、神経の分化発達に必要な転写因子であることがうかがわれた。

### 3. 神経芽腫, 神経節細胞種における GATA-2 の発現の差

次に未分化な神経細胞から発生する神経芽腫, 神経節細胞種における GATA-2 の発現を免疫組織学的に検討したところ, ロゼット構造をなす円形細胞からなる部分で, 核を中心とした GATA-2 の発現を認め, ロゼットを形成しない部位でも円形細胞が GATA-2 陽性を示した. しかし, 分化が進んだ細線維型細胞では GATA-2 陽性細胞は減少した. 一方, 神経節細胞種では GATA-2 陽性細胞を認めなかった. Bourdeaut らは GATA-2 の mRNA 発現レベルと分化との関連を評価し, pre-adrenergic phenotype から adrenergic phenotype, dual phenotype への分化が進む段階までは GATA-2 の発現が上昇するが, chlinergic phenotype にまで分化が進むと GATA-2 の発現が低下することを報告している<sup>16)</sup>. 本研究の免疫染色における検討では GATA-2 の発現の変化は細胞の分化度を反映している可能性が考えられた. また, V Hoene らは GATA-2 の発現は予

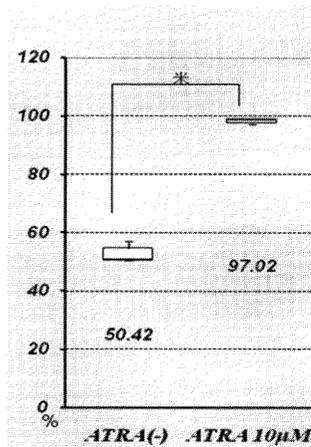
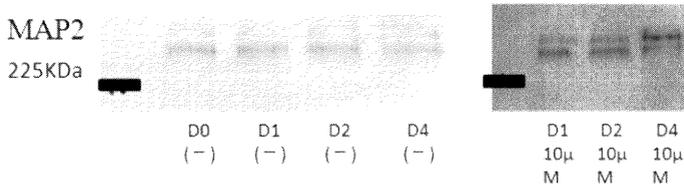


図6A SH-SY5Y におけるオールトランスレチノイン酸 (ATRA) 投与による細胞分化

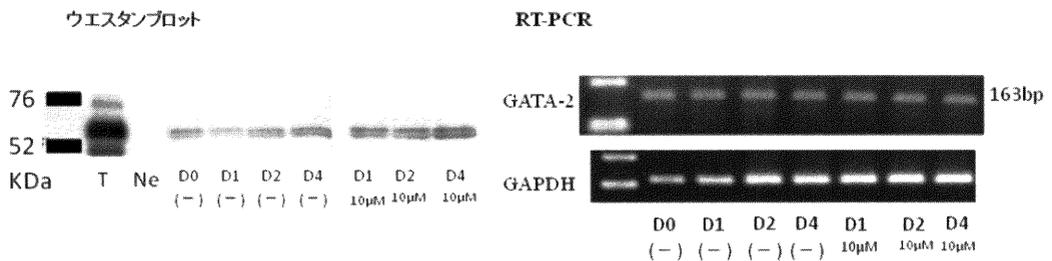
オールトランスレチノイン酸非投与群と比較してオールトランスレチノイン酸 10  $\mu$ M 投与群の方が分化した細胞の割合が有意 ( $P < 0.05$ ) に高い.

後良好の因子である可能性を示唆している<sup>12)</sup>. 予後良好の神経芽腫では神経芽腫腫瘍細胞の GATA-2 の発現の低い pre-adrenergic pheno-



D0(-): ATRAなし D1(-): ATRAなし1日後 D2(-): ATRAなし2日後 D4(-): ATRAなし4日後  
 D1 10 $\mu$ M: ATRA 10 $\mu$ M 1日後 D2 10 $\mu$ M: ATRA 10 $\mu$ M 2日後 D4 10 $\mu$ M: ATRA 10 $\mu$ M 4日後

図6B SH-SY5Yにおけるオールトランスレチノイン酸 (ATRA) による分化誘導  
 オールトランスレチノイン酸非投与群では MAP2 は変化を認めなかったが、オ  
 ールトランスレチノイン酸投与群では MAP2 の蛋白発現の増加を認める。



T: GATA2 transfection cell (COS-1) Ne: negative control (293T)  
 D0(-): ATRAなし D1(-): ATRAなし1日後 D2(-): ATRAなし2日後 D4(-): ATRAなし4日後  
 D1 10 $\mu$ M: ATRA 10 $\mu$ M 1日後 D2 10 $\mu$ M: ATRA 10 $\mu$ M 2日後 D4 10 $\mu$ M: ATRA 10 $\mu$ M 4日後

図6C SH-SY5Yにおけるオールトランスレチノイン酸 (ATRA) による分化誘導  
 GATA-2 蛋白, mRNA の発現はオールトランスレチノイン酸による分化誘導に  
 より明らかな変化を認めない。

type から adrenergic phenotype や dual phenotype への分化が進んでいることに関連している可能性が考えられた。神経芽腫における GATA-2 の発現を知ることは予後推定に有用と思われる。

#### 4. 神経芽腫細胞株の GATA-2 の発現とオールトランスレチノイン酸による分化誘導

神経芽腫細胞株 4 種 (SH-SY5Y, GOTO, IMR-32, NB-1) は蛍光染色, ウェスタンブロットのいずれにおいても GATA-2 蛋白を発現していた。GATA-2 発現の強度に差があり, SH-

SY5Y が最も強く発現していた。また, mRNA レベルでも同様の結果が得られた。SH-SY5Y は神経芽腫細胞株の SK-N-SH から株分けされたもので, 比較的 neuroblast-like な細胞に均一化された細胞株であり, SH-SY5Y は GATA-2 の発現が高いことが報告されている<sup>17)</sup>。SH-SY5Y はオールトランスレチノイン酸によって分化誘導されることも知られている<sup>18)19)</sup>。オールトランスレチノイン酸は SH-SY5Y に核内受容体の RAR と RXR を介して作用する<sup>20)</sup>。またオールトランスレチノイン酸は neutrophin 受容体遺伝子の転写

制御<sup>21)</sup>や Wnt シグナル経路<sup>22)</sup>、II 型蛋白キナーゼ A を含んだ経路<sup>23)</sup>を介して分化を誘導する。一方 GATA-2 は神経分化過程で Mash1, Phox2b, Hand2, Phox2a の後に発現し、Noradrenergic maker の Th と Dbh の発現の前に発現することが報告されている<sup>7)</sup>。本研究ではオールトランスレチノイン酸を用いて、SH-SY5Y の分化を誘導したが、GATA-2 の mRNA と蛋白の発現は RT-PCR、ウエスタンブロットでは分化誘導による明らかな差を認めなかった。オールトランスレチノイン酸による分化誘導では GATA-2 の発現に影響を与えないことから、腫瘍における形態分化は細胞株とは異なった機序で誘導されるものと考えられる。

## 結 論

免疫染色でヒト成人の骨髄中の前赤芽球、骨髄芽球、末梢血の肥満細胞、血管内皮、腎遠位尿管上皮に GATA-2 の発現を認め、ヒト胎児の血管内皮、副腎、腎臓、肝内造血細胞、中枢神経細胞にも GATA-2 の発現を認めた。ヒト胎児中枢神経では間脳、中脳、橋、髄脳の腹側部位の神経細胞に GATA-2 が発現することを示した。また神経芽腫のロゼットを形成する円形細胞に GATA-2 が高発現し、分化が進んだ細線維型になった細胞では GATA-2 の発現は低下する傾向が強いことから GATA-2 の発現状況は予後を予想する因子となる可能性が示唆された。GATA-2 発現のもっとも強い神経芽腫細胞株 SH-SY5Y はオールトランスレチノイン酸によって形態的な分化は誘導されたが、GATA-2 の蛋白と mRNA の発現は変化せず、神経芽腫の分化度と GATA-2 の発現の関係を再現することはできなかった。しかし、本研究で用いた抗ヒト GATA-2 抗体はウエスタンブロットおよびパラフィン切片の免疫染色、細胞株の蛍光染色に使用可能であり、神経芽腫の診断や細胞の分化と機能解析に役立つものと考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・肝臓病学分野 青柳豊教授、同分子細胞病理学分野 内藤真教授に深謝致します。また、本研究に関して助言・協力頂きました Alexander S. Savchenko 先生、大橋瑠子先生、姜淑英先生、長谷川剛先生、技術指導を頂きました青山崇技官、斎藤祐子技官をはじめ教室の皆様へ深謝致します。

## 文 献

- 1) Yamamoto M, Ko ML, Leonard MW, Beug H, Orkin SH and Engel JD: Activity and tissue-specific expression of the transcription factor. *Genes Dev* 4: 1650 - 1662, 1990.
- 2) Pevny L, Simon MC, Robertson E, Keln WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH and Costantini F: Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor Gata-1. *Nature* 349: 257 - 260, 1991.
- 3) Tsai SF, Martin DIK, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG and Orkin SH: Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339: 446 - 451, 1989.
- 4) Maeno M, Mead PE, Kelley C, Xu RH, Kung HF, Suzuki A, Ueno N and Zon LI: The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in *Xenopus laevis*. *Blood* 88: 1965 - 1972, 1996.
- 5) Lavemiere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JBE and Evans T: GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269: 23177 - 23184, 1994.
- 6) Zhou Y, Lim KC, Onodera K, Takahashi S, Ohta J, Minegishi N, Tsai FY, Orkin SH, Yamamoto M and Engel JD: Rescue of the embryonic lethal hematopoietic defect reveals a critical role for Gata2 in urogenital development. *EMBO J* 17: 6689 - 6700, 1998.
- 7) Tsarovina K, Pattyn A, Stubbusch J, Muller F, Wees JVD, Schneider C, Brunet JF and Rohrer H:

- Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development* 131: 4775 - 4784, 2004.
- 8) Bilodeau ML, Boulineau T, Greulich JDM, Hullinger RL and Andrisani OM: Differential expression of sympathoadrenal lineage - determining genes and phenotypic markers in cultured primary neural crest cells. *In Vitro Dev Biol Anim* 37: 185 - 192, 2001.
  - 9) Nardelli J, Thiesson D, Fujiwara Y, Tsai FY and Orkin SH: Expression and genetic interaction of transcription factors *Gata2* and *Gata3* during development of the mouse central nervous system. *Dev. Biol* 210: 305 - 321, 1999.
  - 10) Rychlik JL, Hsieh M, Eiden LE and Lewis EJ: *Phox2* and *dHAND* transcription factors select shared and unique target genes in the noradrenergic cell type. *J Mol neurosci* 27: 281 - 292, 2005.
  - 11) Wakil AE, Francius C, Wolff A, Pleau - Varet J and Nardelli J: The *GATA2* transcription factor negatively regulates the proliferation of neuronal progenitors. *Development* 133: 2155 - 2165, 2006.
  - 12) Hoene V, Fischer M, Ivanova A, Wallach T, Berthold F and Dame C: *GATA* factors in human neuroblastoma: distinctive expression patterns in clinical subtypes. *Br J Cancer* 101: 1481 - 1489, 2009.
  - 13) Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW and Orkin SH: An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor *GATA - 2*. *Nature* 371: 221 - 226, 1994.
  - 14) Tsai FY and Orkin SH: Transcription factor *GATA - 2* is required for proliferation/ survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, But not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89: 3636 - 3643, 1997.
  - 15) Umetani M, Mataka C, Minegishi N, Yamamoto M, Hamakubo T and Kodama T: Function of *GATA* transcription factors in induction of endothelial vascular cell adhesion molecule - 1 by tumor necrosis factor -  $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 917 - 922, 2001.
  - 16) Bourdeaut F, Janoueix - Lerosey I, Lucchesi C, Paris R, Ribeiro A, Pontual LD, Amiel J, Lyonnet S, Pierron G, Michon J, Peuchmaur M and Delattre O: Cholinergic switch associated with morphological differentiation in neuroblastoma. *J Pathol* 219: 463 - 472, 2009.
  - 17) Scherzer CR, Grass JA, Liao Z, Pepivani I, Zheng B, Eklund AC, Ney PA, Ng J, McGoldrik M, Mollenhauer B, Bresnick EH and Schlossmacher MG: *GATA* transcription factors directly regulate the Parkinson's disease - linked gene  $\alpha$ -synuclein. *PNAS* 105: 10907 - 10912, 2008.
  - 18) Zhao F, Wu T, Lau A, Jiang T, Huang Z, Wang XJ, Chen W, Wong PK and Zhang DD: *Nrf2* promotes neural cell differentiation. *Free Radic Biol Med* 47: 867 - 879, 2009.
  - 19) Raghunath M, Patti R, Bannerman P, Lee CM, Baker S, Sutton LN, Phillips PC and Reddy CD: A novel kinase, *AATYK* induces and promotes neuronal differentiation in a human neuroblastoma (SH - SY5Y) cell line. *Molecular Brain Research* 77: 151 - 162, 2000.
  - 20) Joshi S, Guleria R, Pan J, DiPette D and Singh US: Retinoic acid receptors and tissue - transglutaminase mediate short - term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH - SY5Y cells. *Oncogene* 25: 240 - 247, 2006.
  - 21) Clagett - Dame M, McNeill EM and Muley PD: Role of all - trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J Neurobiol* 66: 739 - 756, 2006.
  - 22) Uemura K, Kitagawa N, Kohno R, Kuzuya A, Kageyama T, Shibasaki H and Shimohara S: Presenilin 1 mediates retinoic acid - induced differentiation of SH - SY5Y cells through facilitation of Wnt signaling. *J Neurosci Res* 73: 166 - 175, 2003.
  - 23) Kim SN, Kim SG, Park SD, Cho - Chung YS and Hong SH: Participation of type II protein kinase A in the retinoic acid - induced growth inhibition of SH - SY5Y human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 182: 421 - 428, 2000.

(平成22年12月17日受付)