

神経芽腫の自然退縮に関わるプログラム細胞死の解析

北 中 千 史

目次

1. 研究の目的 p. 3-6
2. 研究の方法 p. 7-17
 - (1) 神経芽腫腫瘍検体を用いた解析
 - (2) プラスミド構築
 - (3) 細胞培養
 - (4) トランスフェクション
 - (5) コロニーフォーメーションアッセイ
 - (6) テトラサイクリン除去により遺伝子発現誘導可能な安定的遺伝子導入神経芽腫細胞株（ステーブルトランスフェクタント）の樹立
 - (7) In vitro 実験系における細胞死関連アッセイ
 - (8) ウェスタンブロッティング
 - (9) 培養細胞に対する免疫染色
3. 実験の結果 p. 18-50
 - (1) 神経芽腫腫瘍組織における Ras 蛋白質の発現と non-apoptotic な細胞変性

(2) Ras の発現を介した神経芽腫細胞死の誘導

(3) Ras により神経芽腫細胞に誘導される細胞死の non-apoptotic な
特性

(4) Ras により神経芽腫細胞に誘導される細胞死のカスパーゼ非依
存性ならびに Bcl-2 ファミリー蛋白質による細胞死抑制に対する非感
受性

(5) TrkA による Ras 依存的神経芽腫細胞死の増強

(図 1 - 8 p. 32-50)

4. 考察 p. 51-56

5. まとめ p. 57

6. 文献 p. 58-65

7. 謝辞 p. 66

1. 研究の目的

自然退縮（積極的な治療を受けることなく腫瘍が自発的に縮小・消失すること）はがんで稀に見られる非常に興味深い生物学的現象である(Papac, 1998)。しかしながら多くの場合、がんの自然退縮現象がどのようなメカニズムでおきているかについてはよくわかっていない。神経芽腫は小児の腹部に好発する神経堤由来の腫瘍であり代表的な小児固形がんとして知られるが、様々ながんの中で自然退縮が最も高頻度にみられる腫瘍としてもよく知られている(Pritchard & Hickman, 1994; Papac, 1998; Yamamoto et al., 1998)。従って神経芽腫は古くからがんの自然退縮に関わるメカニズムを解明するための格好の研究対象となってきた。これまでの知見によれば、神経芽腫の自然退縮では免疫系によるがん細胞の排除を積極的に示す所見に乏しく、また神経芽腫細胞はしばしば成熟した神経節細胞への分化を示すがこれだけでは腫瘍細胞の「消失」を説明できないことから、自然退縮のプロセスにはがん細胞の自殺（プログラム細胞死）が関与しているものと考えられてきた(Pritchard & Hickman, 1994)。一方、細胞の自殺（プログラム細胞死）に関する研究はこれまでのところ専らアポトーシスと呼ばれ顕著な核の濃縮を特徴とする細胞死(Kerr et al., 1972)について行われてきたため、「プログラム細胞死すなわちアポトーシス」という考え方が広く受け入れられている。従って神経芽腫の自然退縮に関与するプログラム細胞死も当然アポトーシスであるものと期待され、このような仮説に基づいた研究が一時期盛んに行われた。しかしながら予想外なことに、一連の研究の結果はアポト

ーシスの関与を積極的に示すものではなかった。すなわち、自然退縮を起ししやすい神経芽腫のサブグループと起しにくいサブグループで比較した場合、多くの場合両者でアポトーシスの頻度に有意な差が検出されず(Ikeda et al., 1995; Koizumi et al., 1995; Tonini et al., 1997)、また仮に有意な差が認められてもその差はわずかなものであり(Oue et al., 1996; Hoehner et al., 1997)、自然退縮の起こりやすさの違いを説明するには十分なものとは言えなかった。このような結果を裏付けるかのように、最近報告された神経芽腫の電子顕微鏡的検討の結果、神経芽腫腫瘍内ではしばしば変性所見が認められるがその変性像は myelin body, lamellated lysosome といったリソソーム構造の増大や自喰小胞の出現を特徴としていることが明らかとなった(Kodet, 1998)。これらの変性所見はアポトーシスとは異なるプログラム細胞死である「autophagic degeneration」の特徴とされるものであることから (Kitanaka & Kuchino, 1999)、上記の電子顕微鏡的観察の結果は神経芽腫腫瘍内で autophagic degeneration が起きていることを示している。

Autophagic degeneration は 1973 年に Schweichel & Merker によって最初に報告された生理的細胞死の一型である。Schweichel & Merker は発生過程にあるマウス・ラットの組織を電子顕微鏡により詳細に観察し、一定の時期・部位で再現性よく細胞死がおきていること、そしてそれらの細胞死が形態学的に 3 つのタイプに分類されることを見出した(Schweichel & Merker, 1973)。「タイプ 1 生理的細胞死」は早期からの核の顕著な濃縮像を主徴とする細胞死でアポトーシス (Kerr et al., 1972) と同一のものである。これに対して「タイプ 2 生理的細胞死

(autophagic degeneration)」は細胞質の変化が主体で、初期には細胞質におけるリソソーム構造の増大を特徴とし後に自喰小胞の出現を伴う細胞死であり、核の変化に乏しい(Schweichel & Merker, 1973)。この autophagic degeneration がアポトーシスと同様に遺伝子レベルで制御されるプログラム細胞死であるのか、あるいは制御されない受動的な細胞死（ネクローシス）の一形態に過ぎないのかは長らく不明であったが、最近 autophagic degeneration がシグナル伝達因子 Ras によって制御されることが明らかとなり(Chi & Kitanaka et al., 1999; Kitanaka & Kuchino, 1999)、アポトーシスと同様に「遺伝子レベルで制御される細胞死」すなわちプログラム細胞死の一型であると考えられるようになってきた。

興味深いことに、神経芽腫では H-Ras, TrkA そして N-Myc などの分子マーカーの発現レベルが予後とよく相関することが知られており、N-myc 遺伝子の増幅や過剰発現が予後不良のマーカーであるのに対して(Brodeur et al., 1984)、H-Ras や TrkA の高発現が見られる症例は予後がよい(Matsunaga et al., 1991; Tanaka et al., 1991, 1998; Nakada et al., 1993; Nakagawara et al., 1993)。このことは H-Ras や TrkA の過剰発現が何らかの未知のメカニズムを介して腫瘍細胞の排除に貢献している可能性を示唆するものであるが、上述の如く神経芽腫では autophagic degeneration が起きていることが示されており(Kodet, 1998)、加えて autophagic degeneration が Ras によって誘導されることも明らかとなっている (Chi & Kitanaka et al., 1999; Kitanaka & Kuchino, 1999)。そこで本研究では、神経芽腫において Ras の発現が亢進するとアポトーシスとは異なった自殺プログラム (autophagic degeneration)の活性化を介して腫瘍の退縮・治癒傾向が促進される

という仮説を立て、神経芽腫腫瘍サンプルを用いた *in vivo* の解析ならびに培養神経芽腫細胞を用いた *in vitro* の解析を通じてこのような仮説の検証を行った。

2. 研究の方法

(1) 神経芽腫腫瘍検体を用いた解析

対象 本研究の in vivo (腫瘍組織) の解析には 1972 年から 1999 年の間に神奈川県立こども医療センターにおいて初回手術により摘出された神経芽腫の腫瘍検体を用いた。対象とした症例は、マス・スクリーニング(Ijiri et al., 2000; Nishihira et al., 2000)により腫瘍の存在が判明した症例(mass-screening cases)、ならびに臨床症状をもって発症し International Neuroblastoma Staging System (INSS) (Brodeur et al., 1993)の stage 3 あるいは 4 と診断された 1 歳以上の症例(clinically-detected cases)である。また、以下のいずれかに該当する症例は除外した。1) 手術に先立って放射線療法あるいは化学療法を受けた症例、2) 径 1 cm に満たない小腫瘍片しか得られなかった症例、3) 抗ニューロフィラメント抗体による免疫染色にて明瞭な染色像が得られず、保存・固定状態が不良であったと判断される検体しか得られなかった症例。このような基準による除外の結果、最終的に今回の研究の対象となった症例は mass-screening cases が 87 例、clinically-detected cases が 24 例であった。

免疫染色 ホルマリン固定・パラフィン包埋された腫瘍検体から厚さ~4 ミクロンの切片を切り出し、キシレンによる脱パラフィン処理ならびにエタノールシリーズによる親水化を行った後、過酸化水素 (メタノール中 0.3%) 処理によって内因性ペルオキシダーゼを不活化した。また 10 mM クエン酸バッファー(pH 6.0)中でマイクロウェーブ処理 (1500 W、10 分 x 2 回) をすることにより抗原

賦活を行った。抗原賦活後の切片は 5%ブタ血清中で 10 分間インキュベートしブロッキングを行った。

H-Ras 蛋白質の検出には抗 H-Ras マウスモノクローナル抗体 (Calbiochem 社、Ab-1) を用い、100 倍希釈液中セ氏 4 度でのインキュベーションをオーバーナイトで行った。二次抗体にはペルオキシダーゼ標識されたラット抗マウス IgG 抗体を用い、50 倍希釈液中で室温 1 時間のインキュベーションを行った。発色はジアミノベンジジンを用いて行い、ヘマトキシリンによる対比染色を行った。H-Ras 免疫染色の特異性は一次抗体の省略や抗原吸収法によって陽性像が消失することにより確認した。また、副腎の実質細胞は Ras を発現し間質細胞は発現していないことから(Furth et al., 1987)、副腎実質細胞、間質細胞をそれぞれ免疫染色における陽性ならびに陰性コントロールとして用いた。H-Ras 免疫染色の結果の判定は以下のように行った。すなわち細胞レベルでは明らかにバックグラウンドより高いシグナルを示す細胞のみを陽性と判定し、それ以外のは陰性とした。また、各症例の代表切片とその連続切片に対してそれぞれヘマトキシリン・エオジン(H & E)による染色と抗 H-Ras 抗体による免疫染色を行い、20 個以上の Ras 陽性細胞 (細胞断片を含む) からなる変性腫瘍細胞の集落で変性腫瘍細胞の間に Ras 陰性の非変性腫瘍細胞を含まないものを「Ras 陽性変性領域(focal area of degeneration associated with Ras expression)」と定義した。さらに、Ras 陽性変性領域を全く認めない症例を陰性症例、1 個以上認める症例を陽性症例と判定し、全症例に占める陽性症例の割合を算出することにより Ras 陽性変性領域の出現頻度を半定量的に算出した。

抗活性型カスパーゼ3断片 (p20/p17) 特異抗体(Kouroku et al., 1998) (国立精神・神経センター桃井隆先生より供与) による免疫染色は抗 H-Ras 抗体による免疫染色と同様の方法で行った。

TUNEL アッセイ 神経芽腫腫瘍検体を用いた TUNEL アッセイは Boehringer Mannheim 社の in situ 細胞死検出キット POD を用いて添付の使用説明書に従って行った。実験法の概略としては、免疫染色の場合と同様にホルマリン固定・パラフィン包埋切片を脱パラフィン・親水化した後、浸透化液にて浸透化させ、TUNEL 反応溶液 (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) およびフルオレセイン標識 dUTP を含む) 中でインキュベーションを行った。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗フルオレセイン抗体と反応させ、未反応の標識抗体を洗浄除去後、ジアミノベンジジンを加えて発色させた。

電子顕微鏡解析 腫瘍検体を 2.5%グルタルアルデヒドにて固定、2%四酸化オスミウムにて後固定を行い、エタノールシリーズによる脱水後エポン樹脂に包埋した。厚さ 1 ミクロンの薄切切片に対して PAS 染色 (1%過ヨウ素酸水溶液中で 10 分、次いで Schiff 反応液中で 10 分反応させた後、硫酸にて洗浄を行い発色) を行い、PAS 陽性の変性細胞を光学顕微鏡下に同定した。この PAS 陽性変性細胞を含む切片に連続する腫瘍検体を、変性細胞が存在する部位を中心に残すようにトリミングし、PAS 陽性変性細胞を包含する「連続超薄切片 (0.04 ミクロン)」を切り出した。このようにして作成された超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛にて染色し透過電子顕微鏡を用いて観察を行った。

(2) プラスミド構築

pcDNA3wtRas、 pcDNA3RasV12 については、それぞれ野性型 H-ras、 変異恒常活性型 H-ras の cDNA 断片を含む pBR322wtRas, pBR322RasV12 (理化学研究所横山茂之先生より供与) から ClaI, SalI を用いて H-ras のコーディング領域を含む cDNA 断片を切り出し、一旦 pGEM7 ベクター (Promega 社より購入) の ClaI, XhoI サイトに挿入し pGEM7wtRas, pGEM7RasV12 を作成した。さらに pGEM7wtRas, pGEM7RasV12 から BamHI, XbaI により ras cDNA 断片を再度切り出し、哺乳動物細胞発現用ベクターである pcDNA3 (サイトメガロウイルスプロモーターにより遺伝子発現を制御、ネオマイシン耐性遺伝子を含む。Invitrogen 社より購入) の BamHI, XbaI サイトにサブクローニングすることにより得た。

pcDNA3p35 は pcDL-SRalpha-p35 (住友化学村上裕子先生より供与) より BamHI, EcoRI にてバキュロウイルス p35 遺伝子断片を切り出し、pcDNA3 の BamHI, EcoRI サイトにサブクローニングして作成した。

pcDNA3mbclxL は pSK(-)mbclxL (大阪大学辻本賀英先生より供与) より EcoRI にてマウス bcl-xL の cDNA 断片を切り出し、pcDNA3 の EcoRI サイトにサブクローニングすることにより作成した。

Enhanced Green Fluorescent Protein を発現する pcDNA3EGFP ベクターは国立がんセンター研究所生物物理部、野口耕司先生より供与を受けた。

pTA-Hyg はテトラサイクリン結合性転写活性化因子 tTA(Gossen & Bujard, 1992)を発現するベクターでハイグロマイシン耐性遺伝子を含む。pT2-GN は tTA

反応性エレメントを含むサイトメガロウイルスプロモーターにより lacZ 遺伝子（ベータガラクトシダーゼをコードする）の発現を制御する発現ベクターで、ネオマイシン耐性遺伝子を含む(Adachi et al., 1996; Chi & Kitanaka et al., 1999)。これらのベクターは国立がんセンター研究所生物学部横田淳先生より供与を受けた。pT2-wtRas は pT2-GN より Sall, BamHI を用いて lacZ 遺伝子断片を切断・除去し T4 ポリメラーゼにより末端平滑化したのち、pcDNA3wtRas から KpnI, ApaI を用いて切り出した野性型 H-ras の cDNA 断片を T4 ポリメラーゼによる末端平滑化後サブクローニングすることにより得た。pT2-RasV12 は同様の方法で pT2-GN の lacZ 遺伝子断片を pcDNA3RasV12 の H-ras cDNA 断片と置き換えることにより作成した。

pTrkA は pLTRSVneoTrkA（千葉県がんセンター中川原章先生より供与）より EcoRI にて trkA cDNA 断片を切り出し、pFLAG CMV2 ベクター（コダック社より購入）の EcoRI サイトに挿入して得た。pFLAG CMV2 ベクターは N 末端に FLAG タグを付加できるベクターであり、trkA cDNA 断片は FLAG タグに対して in-frame に挿入されていることを確認した。

（3）細胞培養

ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y, GAMB, IMR32, LA-N-5, SMS-KCN, TGW, RTBM1 は千葉県がんセンター中川原章先生より供与を受けた。これらの細胞は 10%ウシ胎児血清を添加した RPMI1640 培地を用いて、5%炭酸ガス存在下、セ氏 37 度の条件にて湿式インキュベーター内で培養を行った。また、培養用のデッ

シュにはコラーゲン・コート製品 (Biocoat Collagen-I, Becton Dickinson 社) を用いた。

(4) トランスフェクション

ヒト培養神経芽腫細胞を用いたトランスフェクションは Effectene Transfection Reagent (Qiagen 社) を用い、原則として添付のプロトコールに従って行った。具体的には以下の如く行った。トランスフェクションの 2 日前に細胞を 2×10^5 /dish の密度でまきこんだ。トランスフェクションに用いるプラスミド DNA 総量は特に指示のないかぎり 1 マイクログラムを用い、これに Buffer EC 150 マイクロリットル、Enhancer 4 マイクロリットルを加え攪拌、4 分間室温静置、次いで Effectene 12.5 マイクロリットルを加え激しく攪拌し 10 分間室温静置した。この間細胞は PBS にて洗浄後新鮮な RPMI1640 培地を 4 ミリリットル加えた。10 分間静置した DNA 溶液をこのように準備した細胞培地に滴下し丁寧に攪拌しインキュベーターに戻した。約 6 時間後培地を吸引除去し、PBS にて一度洗浄後 RPMI1640 培地を加え再度インキュベーターに戻し培養、後の解析に供した。

(5) コロニーフォーメーションアッセイ

pcDNA3 (コントロールベクター)、pcDNA3wtRas、pcDNA3RasV12 のプラスミドベクターを各 1 マイクログラム用いて、前記の方法に従ってトランスフェクションを行った。SH-SY5Y 細胞に対してはトランスフェクション翌日から選択

薬剤として Geneticin を 800 マイクログラム/ミリリットルとなるように培地中に加えた。GAMB 細胞の場合はトランスフェクション翌日に細胞を 10 分の 1 の密度になるようにまき直し、その翌日から培地中に Geneticin を 800 マイクログラム/ミリリットルとなるように加え培養を行った。約 2 週間後に形成されたコロニーの数を顕微鏡下で計数した。コロニー形成率は pcDNA3 ベクターのトランスフェクションにより形成されたコロニー数を 100%として、これに対する百分率にて表示した。

(6) テトラサイクリン除去により遺伝子発現誘導可能な安定的遺伝子導入神経芽腫細胞株 (ステーブルトランスフェクタント) の樹立

前記の方法に従って、SH-SY5Y 細胞に対して pTA-Hyg + pT2-GN、pTA-Hyg + pT2-wtRas、pTA-Hyg + pT2-RasV12 の組み合わせでトランスフェクションを行った。トランスフェクション 6 時間後に行う培地交換以降、細胞の維持は 0.5 マイクログラム/マイクロリットルのテトラサイクリン存在下で行った。トランスフェクション翌日に細胞をコロニー形成可能な低密度にまき直し、さらにその翌日から Hygromycin B (800 単位/ミリリットル)ならびに Geneticin (400 マイクログラム/ミリリットル)の添加により薬剤選択を開始した。約 3 週間後に形成された個々のコロニーを単離したうえで培養、これ以降は選択薬剤の濃度は Hygromycin B (400 単位/ミリリットル)ならびに Geneticin (200 マイクログラム/ミリリットル)で培養を行った。各クローンを十分に増殖させた後、それぞれのクローンをテトラサイクリン存在下・非存在下で 3 日間培養し細胞ライセート

を調整、後述のウエスタンブロッティング法によって遺伝子産物の発現誘導効率を判定し、以降の実験に用いるクローンを選定した。クローン差による判定の誤りを避けるため、ステーブルトランスフェクタントを用いた実験ではそれぞれの遺伝子型につき複数のクローンをを用いて実験を行い、結果の一貫性を確認した。結果の項にはそれぞれの代表的なクローンをを用いて得られた結果を表示した。

(7) In vitro 実験系における細胞死関連アッセイ

一過性発現系における細胞変性の形態学的評価 SH-SY5Y 細胞、GAMB 細胞に対して各種ベクタープラスミドを pcDNA3EGFP プラスミドとともにトランスフェクションし、トランスフェクション後 24 あるいは 48 時間の時点で蛍光顕微鏡を用いて GFP 陽性細胞を観察した。GFP 陽性細胞のうち断片化あるいは円形化したものを degenerating cell と判定し（細胞断片が集簇して見られる場合は 1 個の変性細胞に由来するものと判定した）、GFP 陽性細胞の総数に対する割合を百分率で算出した。

細胞死の判定 接着細胞（トリプシンにより遊離）ならびに浮遊細胞の両者を回収・遠心し、沈殿した細胞のペレットを PBS にて再浮遊した。この浮遊液に等量の 0.4%トリパンプルー染色液を加えて染色した後、位相差顕微鏡下で判定を行った。トリパンプルーを排出できない細胞を死細胞と判定したが、生細胞と比較して直径が明らかにその半分に満たない小さな細胞片は計数しなかった。細胞死の割合は $100 \times (\text{死細胞の総数}) / (\text{死細胞の総数} + \text{生細胞の総数})$ と

して百分率で算出した。

TUNEL アッセイならびにヨウ化プロピジウム染色 コラーゲン・コートされたカバースリップを敷いた 60-mm dish に細胞をまき込み、図の説明の記載のとおり処理を行った後 PBS にて細胞を軽く洗浄し 4%ホルムアルデヒドを含む PBS 中で室温約 30 分間固定を行った。以降は In Situ Apoptosis Detection Kit (Wako 社) を用いて添付のプロトコールに従って実験を行った。すなわち 0.1% Triton X-100 を含む 0.1% クエン酸ナトリウム液による浸透化の後 TdT 存在下にフルオレセイン標識 dUTP と反応させ、次いでペルオキシダーゼ標識抗フルオレセイン抗体と反応させた。陽性シグナルはジアミノベンジジンを加えることにより可視化した。ヨウ化プロピジウムによる染色は、浸透化処理までは TUNEL アッセイと同様の操作を行い、その後ヨウ化プロピジウム水溶液 (25 マイクログラム/ミリリットル) と反応させ蛍光顕微鏡下で観察を行った。

電子顕微鏡解析 培養神経芽腫細胞をセルスクレーパーにて dish より剥離・回収し遠心した。PBS による洗浄後再度遠心し細胞のペレットを 1.0%グルタルアルアルデヒドにて固定、1.0%四酸化オスミウムにて後固定を行った。エタノールシリーズによる脱水後、サンプルを epoxy resin に包埋し超薄切片を切り出した。超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛にて染色し、透過電子顕微鏡を用いて観察を行った。

(8) ウエスタンブロッティング

セルスクレーパーにより接着細胞を剥離し、浮遊細胞とともに回収して遠心を

行った。PBS による洗浄の後再度遠心し、細胞のペレットを細胞溶解用バッファ（25 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS)）に懸濁した。懸濁液を遠心し不溶性画分を除いた上清を細胞ライセートとして回収した。細胞ライセート中の蛋白質濃度は BCA プロテインアッセイキット（Pierce 社）を用いて測定し、各レーンとも泳動する蛋白質量は等量になるようにした。各サンプル（細胞ライセート）に等量の 2x SDS サンプルバッファを加え煮沸した後に SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。泳動・分離した蛋白質はセミドライ型蛋白質転写装置を用いてニトロセルロースメンブレンに転写した。転写後のニトロセルロースメンブレンは 5% スキムミルクを含む PBS に浸しブロッキングを行った。一次抗体（anti-c-Ha-Ras rabbit polyclonal antibody, C-20, Santa Cruz; anti-poly(ADP-ribose) polymerase rabbit polyclonal antibody, Boehringer Mannheim）は 5% スキムミルク、0.1% Tween20 を含む PBS（抗体希釈バッファ）に希釈し、室温 2 時間メンブレンと反応させた。抗体希釈バッファによる洗浄の後ペルオキシダーゼ標識二次抗体（ヤギ抗ウサギ IgG 抗体）を抗体希釈バッファにより 1,000 倍希釈し室温 1 時間メンブレンと反応させた。二次抗体反応後メンブレンを 0.1% Tween20 を含む PBS にて洗浄し、ECL™ Western Blotting Detection Reagents（Amersham-Pharmacia 社）を用いてメンブレン上の抗原抗体複合体を化学発光させ、X 線フィルムに露出することにより可視化した。

（9）培養細胞に対する免疫染色

コラーゲン・コートされたカバースリップを敷いた 60-mm dish に細胞をまきこみ、図の説明の記載のとおり処理を行った。その後 PBS にて細胞を軽く洗浄し 4%パラホルムアルデヒド、0.3% Triton X-100 を含む PBS にて固定を行った。固定後ブロッキングを 2%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.3% Triton X-100 を含む PBS 中で行った。一次抗体は抗 cytochrome c 抗体 (mouse monoclonal antibody, No. 556432, Pharmingen 社) をトリス緩衝生理食塩水で 200 倍に希釈し室温にて 2 時間反応させた。PBS による洗浄後 2% BSA、0.3% Triton X-100 を含む PBS にて二次抗体 (ローダミン標識ヤギ抗マウス IgG 抗体) を 1,000 倍に希釈し、室温・遮光状態にて 1 時間反応させた。PBS 洗浄、蒸留水による洗浄後カバースリップを乾燥させ、マウント液を用いてスライドグラスに固定し蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

3. 実験の結果

(1) 神経芽腫腫瘍組織における Ras 蛋白質の発現と non-apoptotic な細胞変性

Ras 蛋白質の発現が神経芽腫における腫瘍細胞死の誘導に関与しているという仮説を検証するため、まず最初に神経芽腫患者より得られた腫瘍検体を用いて免疫組織化学的解析を行い、Ras 蛋白質を発現する腫瘍細胞がどのような形態変化を示しているかについて調べた。これまでの報告によれば、マス・スクリーニングによって見出された自然退縮の可能性が高い症例(Yamamoto et al., 1998; Nishihira et al., 2000)を含め予後良好とされる神経芽腫では H-Ras 蛋白質が高発現していることが明らかとなっている(Tanaka et al., 1991, 1998; Nakada et al., 1993; Hiyama et al., 1997)。この点を確認するための予備的実験として mass-screening cases に由来するいくつかの腫瘍検体に対して抗 H-Ras 抗体による免疫染色を行ったところ、従来報告に一致して明瞭な陽性像を確認することができた。そこで次に腫瘍の連続切片に対してヘマトキシリン・エオジン染色と H-Ras 免疫染色とを行い、両者を比較することによって Ras 陽性反応を示す細胞の形態的特徴について検討を行った。その結果、抗 H-Ras 抗体に対して強く染まる領域がヘマトキシリン・エオジン染色において明らかに細胞変性領域と思われる部位と一致することが明らかとなった(Fig. 1、A-a と A-b、B-a と B-b、C-a と C-b、D-a と D-b を比較)。強拡大の条件下でさらに詳細な検討を行ったところ、変性過程にある細胞の核はアポトーシスに見られるような濃縮像を示

しておらず顕著な断片化を伴っていることが明らかとなった(Fig. 1D-e。矢印は断片化を起こしていない変性細胞核を指し、二重矢印は断片化した核の集まりを指している)。核のみならず細胞自体も断片化していることは小さくなった細胞残骸からも明らかであり(Fig. 1D-e)、また H-Ras 染色の陽性像が小さく不規則な大きさを示していることから間接的に推測できる(Fig. 1、A-b、B-b、C-b、D-b、E)。このような Ras 陽性の変性細胞の分布パターンに関しては、Fig. 1E に示すように正常腫瘍細胞の間に散在性に見られるパターンと、まとまった細胞変性領域として出現するパターン(Fig. 1、A - D)とが認められた。また、神経芽腫ではしばしば fibrovascular stroma により隔てられた分葉構造が存在し、分葉内では間質からの距離に応じて増殖因子等の濃度勾配が形成され間質から離れるほど細胞死がおきやすいという考え方がある(Hoehner et al., 1995)。しかしながら Ras 陽性の変性細胞の分布と fibrovascular stroma との間には一定の関係は認められなかった。同様の所見は clinically-detected cases (臨床症状をもって発症し INSS の stage 3 あるいは 4 と診断された 1 歳以上の症例で、一般的に予後不良群とされる(Brodeur, 1995)) でも観察されたものの、mass-screening cases に比較して明らかに出現頻度が低かった。すなわち Ras 陽性の細胞変性領域の認められる症例の割合は mass-screening cases で 87 例中 53 例(60.9%)であったのに対し clinically-detected cases では 24 例中 7 例(29.2%)と有意に($P = 0.006$)低かった。

前述のごとく Ras 陽性の変性細胞は核の濃縮像を示さないことから、神経芽腫腫瘍細胞は核の濃縮を最も重要な形態学的特徴とするアポトーシスとは異なる

った細胞死を起こしている可能性が示唆された。そこでこの点について検討を行うために、アポトーシスの制御・実行因子であるカスパーゼの活性化の有無やアポトーシスに特徴的とされる 3'-OH 末端をもった DNA 断片の出現の有無について調べた。カスパーゼ 3 はカスパーゼ・カスケードの活性化の終末段階で機能する実行カスパーゼであり、その活性化はカスケードの上流で機能するカスパーゼによる限定分解を受けることでおきることが知られている (Thornberry and Lazebnik, 1998; Nicholson, 1999)。そこでこの限定分解により活性型となったカスパーゼ 3 断片(p20/p17)を特異的に認識する抗体(Kouroku et al., 1998)を用いて神経芽腫腫瘍組織に対する免疫染色を行ったところ、組織内に散在するアポトーシス細胞では陽性像が確認されたのに対し、(対応する連続切片を用いた H-Ras 免疫染色の結果から推定される) Ras 陽性の変性領域内の細胞には陽性像を認めなかった(Fig. 1、C-b と C-d を比較。C-d 内の矢印は代表的な活性型カスパーゼ 3 陽性のアポトーシス細胞を指す)。同様にアポトーシスに特徴的な DNA 断片の出現を TUNEL 法によって調べたところ、やはりアポトーシス細胞には陽性像を認めたのに対し、Ras 陽性の変性細胞には明らかな陽性像を認めなかった(Fig. 1C-c)。これらの結果は形態学的な所見とともに、Ras を高発現する神経芽腫腫瘍細胞がカスパーゼの活性化を伴わない non-apoptotic な細胞死を起こしていることを強く示唆するものである。

これまでの研究から Ras の高発現は細胞の種類によってはアポトーシスとは異なったプログラム細胞死 autophagic degeneration を誘導できることが明らかとなっている (Chi & Kitanaka et al., 1999; Kitanaka & Kuchino, 1999)。そこで神経芽

腫瘍組織でみられるこの non-apoptotic な細胞死が autophagic degeneration の特徴を有しているかについて検討を行った。最近自喰リソソームが PAS 染色陽性となることが報告されたことから(Geddes et al., 1996)、まず腫瘍組織の連続切片に対して PAS 染色ならびに抗 H-Ras 抗体による免疫染色を行い両者を比較検討したところ、Ras 陽性の細胞変性領域に強い PAS 陽性反応が認められた (Fig. 1、D-b と D-d を比較)。また、電子顕微鏡解析用に固定した腫瘍検体の薄切標本を PAS 染色し、PAS 陽性の変性細胞の存在部位を確認したうえでその部位に連続する検体部分を超薄切片として切り出し、透過電子顕微鏡による観察を行った。その結果 PAS 陽性領域に見られた変性細胞（細胞としての構造を保っているもの）は核の変化に乏しく、細胞質に多数の一次リソソームの出現を伴っていた (Fig. 2)。また、おそらく自喰リソソームと思われる二次リソソームの出現も確認された (Fig. 2、矢印)。これらの所見は autophagic degeneration に特徴的とされる形態学的変化である (Schweichel & Merker, 1973; Clarke, 1990; Zakeri et al., 1995; Kitanaka & Kuchino, 1999)。また、このように細胞としての形態を保っている変性細胞の周辺には多数の細胞断片が認められたが、断片中にもリソソーム構造が認められたことから (Fig. 2、二重矢印)、変性細胞は autophagic な変化を起こし始めた後に断片化していることが推察された。

(2) Ras の発現を介した神経芽腫細胞死の誘導

腫瘍検体を用いた in vivo の解析結果は腫瘍細胞における Ras 蛋白質の高発現とカスパーゼ・カスケードの活性化を伴わない non-apoptotic な細胞死の間に非常

に密接な関係があることを示しているが、それらの間の因果関係を示すものではない。そこで次に神経芽腫細胞における Ras の発現が腫瘍組織で見られたような non-apoptotic な細胞死の原因となっているかどうかについて調べるため、培養神経芽腫細胞を用いて in vitro での検討を行った。今回の in vitro アッセイでは野性型の H-ras 遺伝子に加えて恒常活性型の H-rasV12 遺伝子も用いたが、これは Ras シグナル伝達経路を効率的に活性化する目的で用いたものであり、実際のヒト神経芽腫では他の多くのヒト腫瘍とは異なって ras 遺伝子に変異は見られない(Ballas et al., 1988; Moley et al., 1991)。

In vitro の遺伝子導入実験に適した神経芽腫細胞株を選定するためのパイロット実験として、まず最初にヒト神経芽腫細胞株のパネルに対して Ras 発現ベクター(pcDNA3wtRas)を一過性に導入し Ras 蛋白質の発現レベルをウエスタンブロッティングにて確認した。その結果、検討を行った 7 つの細胞株(SH-SY5Y, GAMB, IMR32, LA-N-5, SMS-KCN, TGW, RTBM1)のうち IMR32、LA-N-5、SMS-KCN、TGW、RTBM1 では遺伝子導入効率が著しく低くほとんど Ras 蛋白質の発現を確認することができなかった。一方、SH-SY5Y、GAMB 細胞では神経芽腫腫瘍における発現レベルに遜色ない程度の Ras 蛋白質の発現を確認することができたため(data not shown)、以降はこれら二つの神経芽腫細胞株を用いて遺伝子導入実験を行った。

Ras の発現が神経芽腫細胞に対して in vivo (腫瘍組織内)で見られたような不規則な大きさへの断片化を伴った細胞変性を誘導するかどうかを調べるため野性型 Ras (RasWt)、活性型 Ras (RasV12)の発現ベクターを GFP を発現するベ

クターとともに SH-SY5Y 細胞、GAMB 細胞に遺伝子導入し、GFP 陽性細胞の形態学的変化を観察した(Fig. 3A)。その結果、いずれの神経芽腫細胞株においても GFP 陽性細胞の多くが細胞の円形化や不規則な大きさへの断片化など細胞変性を示唆する形態変化を呈することが明らかとなった。また、グリオーマ細胞内で活性型 Ras (RasV12)を発現させた場合は細胞質の空胞化が顕著に見られたが(Chi & Kitanaka et al., 1999; Kitanaka & Kuchino, 1999)、神経芽腫細胞の場合はこれとは異なってほとんど空胞は見られず、この点でも腫瘍組織における所見と一致していた。さらに、Ras の発現により誘導されるこのような形態学的変化はアポトーシスのそれとも異なっているように思われた。すなわち、スタウロsporinや血清除去により誘導されたアポトーシス細胞は円形化は示すものの細胞の断片化は軽度であり、また細胞断片の大きさも比較的均一であった (Fig. 3A, and not shown)。Fig. 3B に示すように Ras により誘導される細胞変性の割合はいずれの細胞株でも野性型 Ras より活性型 Ras で高かったが、Ras 蛋白質の発現レベル自体は活性型よりも野性型の方が高い傾向が見られた(Fig. 3C)。このことは活性型 Ras の方が細胞変性誘導効率が高い、すなわち細胞変性の誘導効率は Ras のシグナル伝達因子としての活性と相関していることを示している。

つぎにこのような Ras の発現により誘導される形態学的な変化が実際に細胞死を反映したものであるかについて異なったアッセイ法により検討した。すなわち発現ベクターを細胞に導入し選択薬剤存在下に培養することにより遺伝子導入された細胞が形成するコロニーの数を計測するコロニーフォーメーション

アッセイを行った(Kitanaka et al., 1995; Chi & Kitanaka et al., 1999)。その結果 Ras 発現ベクターを導入した場合にはコントロールベクターを導入した場合に比べてコロニー形成に至るまで生存・増殖する細胞が有意に減少することが確認され、Ras の発現が細胞死を誘導していることが示唆された(Fig. 3D)。またコロニーフォーメーションアッセイにおいても野性型より活性型 Ras がより強くコロニー形成を抑制したことから、Ras の細胞死誘導能はその活性に依存していると考えられる。このような考え方をさらに支持する所見として活性型 Ras の effector loop region に点変異を導入することによりそのシグナル伝達活性を失わせた変異体 RasV12/D38N (Abdellatif & Schneider, 1997)が形態学的なアッセイ、コロニーフォーメーションアッセイのいずれにおいても神経芽腫細胞に対する細胞死誘導能を失っていることが確認された(data not shown)。

(3) Ras により神経芽腫細胞に誘導される細胞死の non-apoptotic な特性

つぎに、Ras により誘導される神経芽腫細胞の細胞死をトランスフェクションの影響が無い状態で解析する目的で、Ras の発現レベルを培地中のテトラサイクリン濃度の変化により調節できる SH-SY5Y 細胞のステーブルトランスフェクタントを作成した。用いた実験系は Tet-Off システムと呼ばれ、テトラサイクリン存在下では目的とする遺伝子の発現が抑制され、培地中のテトラサイクリン濃度を下げることにより遺伝子発現が誘導されるシステムである(Gossen & Bujard, 1992)。Fig. 4A は樹立したステーブルトランスフェクタントである SH-

SY5Y-TA-GN(Control)、SH-SY5Y-TA-RasWt(Ras Wt)、SH-SY5Y-TA-RasV12(Ras V12)各細胞の培地からテトラサイクリンを除去し経時的に Ras 蛋白質の発現変化を調べた結果である。コントロール細胞(SH-SY5Y-TA-GN)では Ras 蛋白質の発現は一貫して認められないのに対し Ras 発現細胞(SH-SY5Y-TA-RasWt, SH-SY5Y-TA-RasV12)ではテトラサイクリン除去後 2, 3 日目から検出可能なレベルの Ras 蛋白質の発現が誘導されてくる。このようなステーブルトランスフェクタントを用いて、まず Ras の発現が細胞の生死に及ぼす影響について調べた。Fig. 4B に示すようにコントロール細胞ではテトラサイクリンの除去自体は死細胞の割合には影響を与えないが、野性型 Ras、活性型 Ras を発現する細胞では Ras 蛋白質の発現誘導に平行して死細胞の割合が増加した。Ras の発現により誘導された死細胞を位相差顕微鏡下に観察すると、神経芽腫腫瘍組織や一過性の遺伝子導入実験において認められたのと同様に細胞が不規則かつ著しい断片化を起こしていることが確認された(Fig. 4C)。つぎにこのステーブルトランスフェクタントを用いた実験系において Ras により誘導される細胞死がアポトーシスで特徴的に見られる核クロマチンの濃縮を伴っているかどうかを DNA 親和性物質ヨウ化プロピジウムによる染色にて検討した(Fig. 5A)。従来の報告どおり(Nath et al., 1996; Posmantur et al., 1997)、本実験でも SH-SY5Y 細胞をスタウロスポリンで処理するとヨウ化プロピジウムに濃染する核をもったアポトーシス細胞の出現が確認された。これに対して Ras の発現により誘導される細胞死では細胞とともに核も断片化していることが確認されたが、断片化した核を含めて明らかな核クロマチンの濃縮像は認められなかった。このように核クロマ

チンの濃縮を伴わず断片化しながら細胞が死滅している像は神経芽腫腫瘍組織において Ras 蛋白質高発現部位でみられた細胞変性像(Fig. 1D-e)を再現するものである。さらに TUNEL アッセイを行ったところ(Fig. 5B)、スタウロsporin 処理により生じたアポトーシス細胞は TUNEL 陽性となるのに対して、Ras の発現により細胞死をきたした細胞には陽性像を認めなかった。また、透過電子顕微鏡による観察を行ったところ(Fig. 5C)、腫瘍組織の電子顕微鏡所見(Fig. 2)と同様に、Ras を発現し変性を起こしつつある細胞（細胞としての形態を保っているもの）は核の変化に乏しく細胞質にリソソーム構造の増大を認めた。以上の一連の結果は神経芽腫細胞における Ras 蛋白質の発現が autophagic degeneration の特徴を有する non-apoptotic なプログラム細胞死を誘導していることを示している。

(4) Ras により神経芽腫細胞に誘導される細胞死のカスパーゼ非依存性 ならびに Bcl-2 ファミリー蛋白質による細胞死抑制に対する非感受性

Ras により誘導される神経芽腫細胞の細胞死が形態・生化学的性質のみならずその制御機構においてもアポトーシスと全く異なるものであるかどうかを明らかにするため、アポトーシス制御において中心的な役割を果たしているカスパーゼや Bcl-2 ファミリー蛋白質 (Thornberry and Lazebnik, 1998; Adams and Cory, 1998)が Ras による神経芽腫細胞死の制御に関与しているか否かを検討した。まず細胞死のカスパーゼ依存性を検討するため合成(z-VAD-fmk, Boc-Asp-fmk)ならびにウイルス由来(baculovirus p35)の汎カスパーゼ阻害物質(Ekert et al., 1999)

を用いて実験を行った。これらの汎カスパーゼ阻害物質は SH-SY5Y、GAMB のいずれの細胞株においてもスタウロスポリンにより誘導されるアポトーシスを有意に抑制しており、使用した実験条件下でこれらの阻害物質が機能していることが確認された(Fig. 6, B and D)。同様の実験条件で Ras の一過性発現により誘導される細胞変性に対する汎カスパーゼ阻害物質の効果を調べたところ、いずれの阻害物質も有意な抑制効果を示さなかった(Fig. 6, A and C)。また、ステブルトランスフェクタントを用いた Ras 発現誘導実験系においても z-VAD-fmk は Ras による細胞死誘導を抑制しなかった(Fig. 6E)。これらの結果は Ras による神経芽腫の細胞死誘導にはカスパーゼの活性化を必要としないことを示している。次に神経芽腫細胞における Ras の発現がカスパーゼの活性化を惹起するか否かについて検討を行った。Fig. 6F ではカスパーゼ・カスケードの活性化状態をモニターするため、カスパーゼ・カスケードの下流で機能する実行カスパーゼ（カスパーゼ 3、7）の基質 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)の切断状態をウエスタンブロッティング法によって調べた (Nicholson, 1999)。スタウロスポリン処理によりアポトーシスを誘導した細胞内ではカスパーゼによる限定分解の結果生じる PARP の切断断片（約 85 kDa）が出現しこの PARP 断片の出現は汎カスパーゼ阻害剤によって抑制されるが、このような PARP 断片は Ras の発現による細胞死誘導の過程では認められなかった(Fig. 6F)。この結果は Ras の発現による神経芽腫の細胞死誘導の過程でカスパーゼ・カスケードの活性化が起きていないことを示すものであり、腫瘍組織において Ras 蛋白質を高発現する変性腫瘍細胞においてカスパーゼ 3 の活性化が検出されなかった

所見(Fig. 1C-d)とよく一致している。次に Ras により誘導される神経芽腫細胞死の制御への Bcl-2 ファミリー蛋白質の関与について検討した。アポトーシスに特異的に関与するカスパーゼとは異なり、Bcl-2 ファミリー蛋白質はカスパーゼ非依存的なネクローシス様細胞死の制御にも関与していることが知られている(Green & Reed, 1998)。ここでは一般的に Bcl-2 に比してより強い細胞死抑制能を持つとされる Bcl-xL (Gottschalk et al., 1996; Kitanaka et al., 1997; Shinoura et al., 1999)を用いて、これによる細胞死抑制の有無を見ることにより Bcl-2 ファミリーの関与の可能性について調べた。Fig. 6D に示すように Bcl-xL はスタウロスポリンにより誘導される神経芽腫細胞のアポトーシスを効率よく抑制したのに対し、Ras により誘導される細胞変性に対しては有意な抑制効果を示さなかった(Fig. 6C)。近年アポトーシスならびに一部のカスパーゼ非依存的なネクローシス様細胞死の制御において細胞内小器官であるミトコンドリアが中心的な役割を果たしていることが明らかになりつつある(Green & Reed, 1998)。ミトコンドリアは細胞死のシグナルを受け取るとミトコンドリア膜の透過性の亢進を介してミトコンドリア膜間腔に存在する cytochrome c (Liu et al., 1996)、Smac/DIABLO (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000)、AIF (Susin et al., 1999)などの細胞死シグナル伝達分子を細胞質に放出することが知られている。そこで Ras により誘導される神経芽腫の細胞死においてもこのようなミトコンドリアの変化が起きているか否かを cytochrome c に対する免疫染色により検討した(Fig. 7)。未処理状態では cytochrome c はミトコンドリア局在パターンを示しているが、SH-SY5Y 細胞をスタウロスポリンで処理することによりアポトーシスを誘導す

ると、予想通りに cytochrome c はサイトゾルに瀰漫性に局在するようになり、ミトコンドリア膜の透過性の変化が検出された。これに対して Ras の発現により変性をおこしつつある細胞では cytochrome c のサイトゾル流出を示す瀰漫性の染色パターンは認められなかった。この結果は必ずしも Ras による細胞死の制御にミトコンドリアが全く関与していないことを意味するものではないが、アポトーシスで一般的に認められるミトコンドリア膜の透過性亢進は Ras により誘導される神経芽腫の細胞死には関与していないことを示している。Bcl-xL を含む Bcl-2 ファミリー蛋白質はミトコンドリア膜の透過性の制御を介して細胞死を制御していると考えられていることから(Adams and Cory, 1998)、このような結果は Bcl-xL が Ras による神経芽腫の細胞死誘導を抑制しないという上述の結果とよく一致するものである。以上の結果は総じて Ras により誘導される神経芽腫の細胞死がその制御機構を含めてアポトーシスとは本質的に異なるものであることを示している。

(5) TrkA による Ras 依存的神経芽腫細胞死の増強

過去の神経芽腫に対する臨床免疫病理学的解析の結果は Ras を単独で高発現する神経芽腫の症例よりも Ras に加えて TrkA (神経栄養因子(NGF) 高親和性受容体) を同時に高発現する症例のほうが予後がよい傾向にあることを示している(Tanaka et al., 1998)。TrkA の活性化は Ras を活性化しうることが明らかにされていることから(Li et al., 1992; Burchill et al., 1995; Segal et al., 1996)、上記の報告は TrkA の高発現が TrkA シグナル伝達経路の活性化を介して Ras の細胞死誘

導活性をさらに上昇させ、神経芽腫腫瘍細胞の退縮傾向を促進することによりさらに良好な予後をもたらしている可能性を示唆するものである。そこで培養神経芽腫細胞 SH-SY5Y を用いた遺伝子導入実験によりこのような可能性について検討を行った。SH-SY5Y は機能的な TrkA を発現していない細胞で、NGF の添加によっても神経分化が誘導されないこと、遺伝子導入した TrkA の高発現のみ（リガンドである NGF の添加のない状態）で神経分化が誘導されること、ならびに TrkA の遺伝子導入により NGF 反応性が回復することなどが明らかにされている (Lavenius et al., 1995)。これらの点は実際に実験に用いた SH-SY5Y 細胞において再現され(Fig. 8A)、TrkA は高発現単独によって活性化され、さらに NGF の添加によりその活性が増強されることが確認された。つぎに導入する Ras 発現ベクターの量を変化させ、TrkA の高発現の有無、NGF 添加の有無の条件下で変性細胞の割合を計測し、Ras により誘導される細胞死に対する TrkA の効果を調べた(Fig. 8B)。Ras を発現させない状態では TrkA の高発現や NGF 添加の有無は変性細胞の割合に有意な影響を与えなかったのに対して、Ras を発現させた状態では TrkA の高発現により明らかに変性細胞の割合が増加し、そこにさらに NGF を添加することにより細胞死誘導が増強された。しかしながら TrkA を遺伝子導入しない状態では NGF の添加は Ras による細胞死誘導を増強しないことから、NGF による細胞死増強は TrkA 依存的事であることが示された。また、TrkA の高発現や NGF 添加の有無は Ras 蛋白質の発現レベルには影響を及ぼしていないことから(Fig. 8C)、TrkA による Ras の細胞死誘導能の増強は発現レベルの変化によるものでなく、活性レベルの変化によるもので

あると考えられる。以上の結果は TrkA の高発現が Ras のもつ神経芽腫細胞死誘導能を増強しうることを示しており、TrkA と Ras が相乗的に機能して神経芽腫細胞の自殺・腫瘍の退縮傾向を誘導することによってより良好な予後をもたらされるという考え方を支持するものである。

Fig. 1A

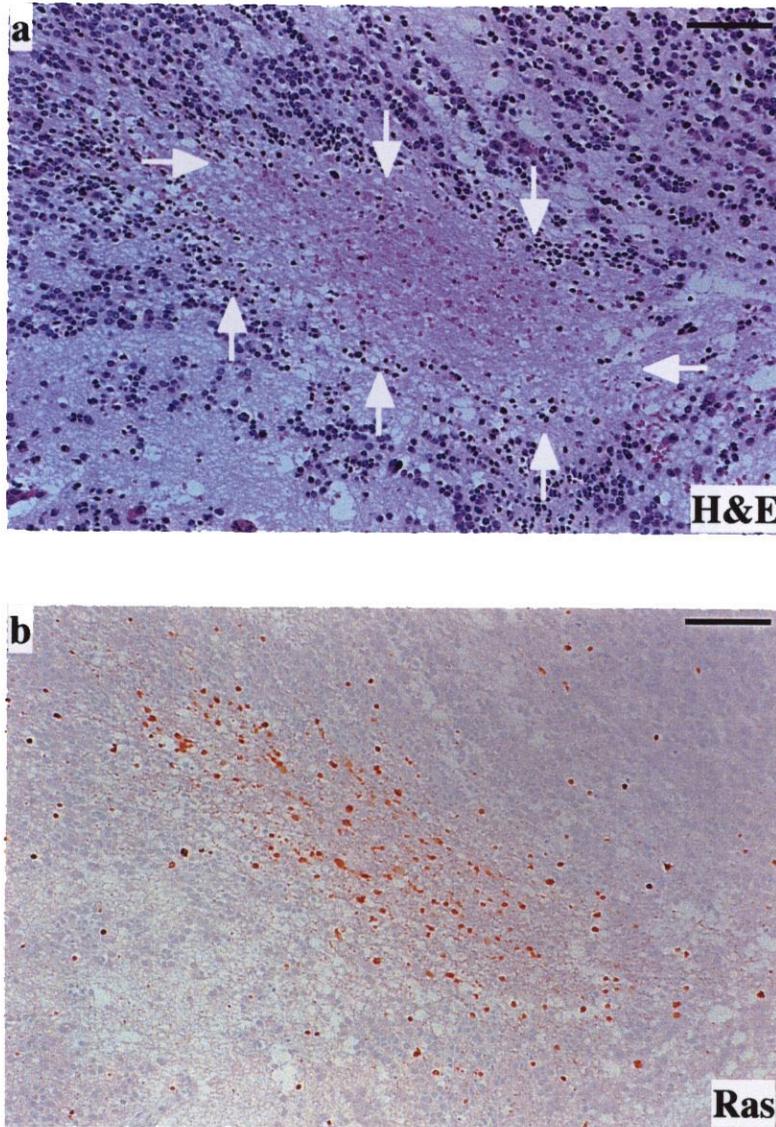


Fig. 1. Ras overexpression and non-apoptotic degeneration of tumor cells in neuroblastoma tissues. Serial tumor sections (**A-a, b**) were stained either with hematoxylin-eosin (H & E) or with anti-H-Ras (Ras) as indicated in each panel. In the H & E-stained section, the margin of the degenerating area is marked by white arrows. Positive signals for immunostaining appear brown. Scale bars, 100 μm .

Fig. 1B

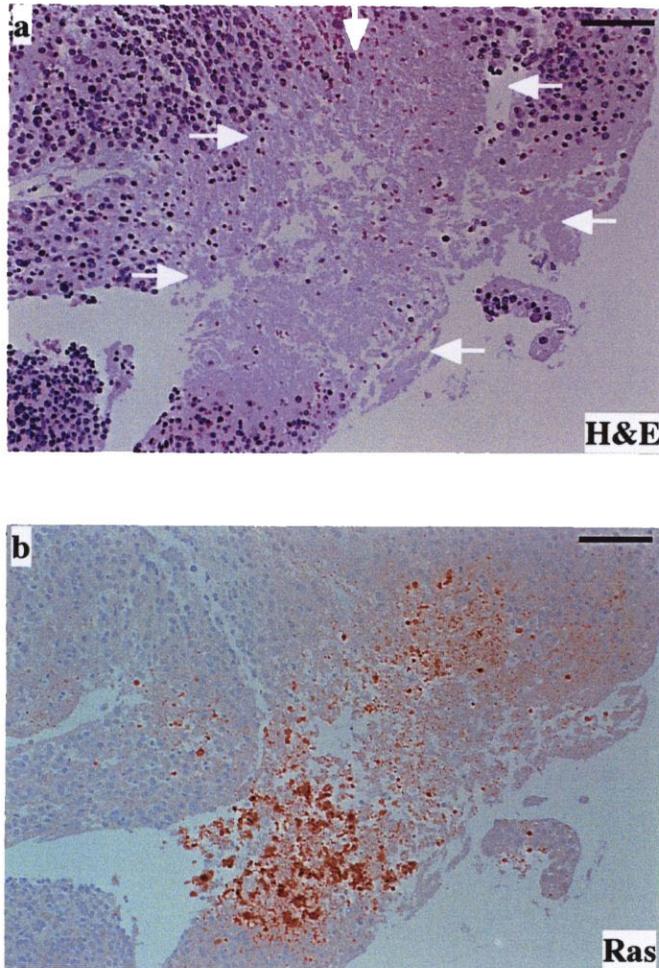


Fig. 1. Ras overexpression and non-apoptotic degeneration of tumor cells in neuroblastoma tissues. Serial tumor sections (**B-a, b**) were stained either with hematoxylin-eosin (H & E) or with anti-H-Ras (Ras) as indicated in each panel. In the H & E-stained section, the margin of the degenerating area is marked by white arrows. Positive signals for immunostaining appear brown. Scale bars, 100 μ m.

Fig. 1C

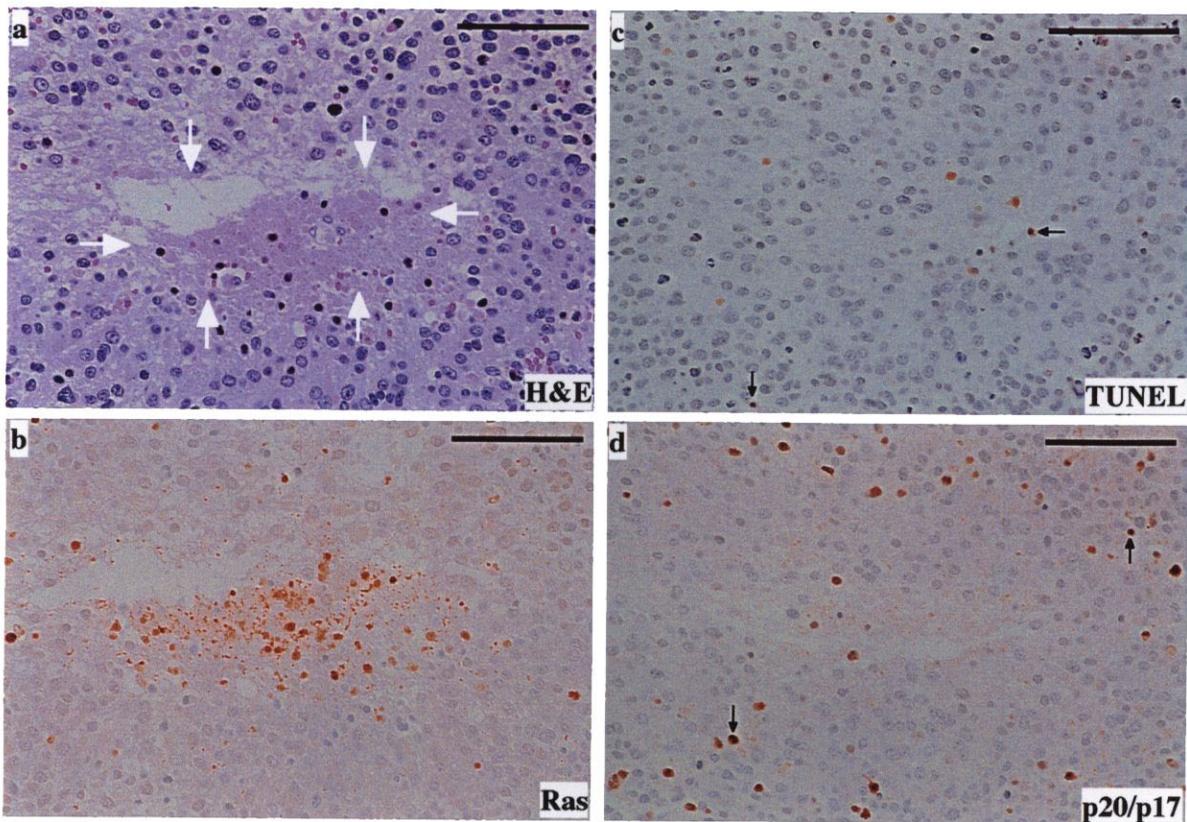


Fig. 1. Ras overexpression and non-apoptotic degeneration of tumor cells in neuroblastoma tissues. Serial tumor sections (**C-a, b, c, d**) were stained either with hematoxylin-eosin (H & E), with anti-H-Ras (Ras), with anti-p20/p17 active caspase-3 fragments (p20/p17), or by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method, as indicated in each panel. Positive signals for immunostaining and TUNEL assay appear brown. In the H & E-stained section, the margin of the degenerating area is marked by white arrows. The presence of a “gap” within the degenerating area may reflect active retraction (shrinkage) of the tissue following degeneration. Samples of typical apoptotic cells with positive staining for active caspase-3 (**C-d**) or TUNEL (**C-c**) are indicated by black arrows. Scale bars, 100 μ m.

Fig. 1D

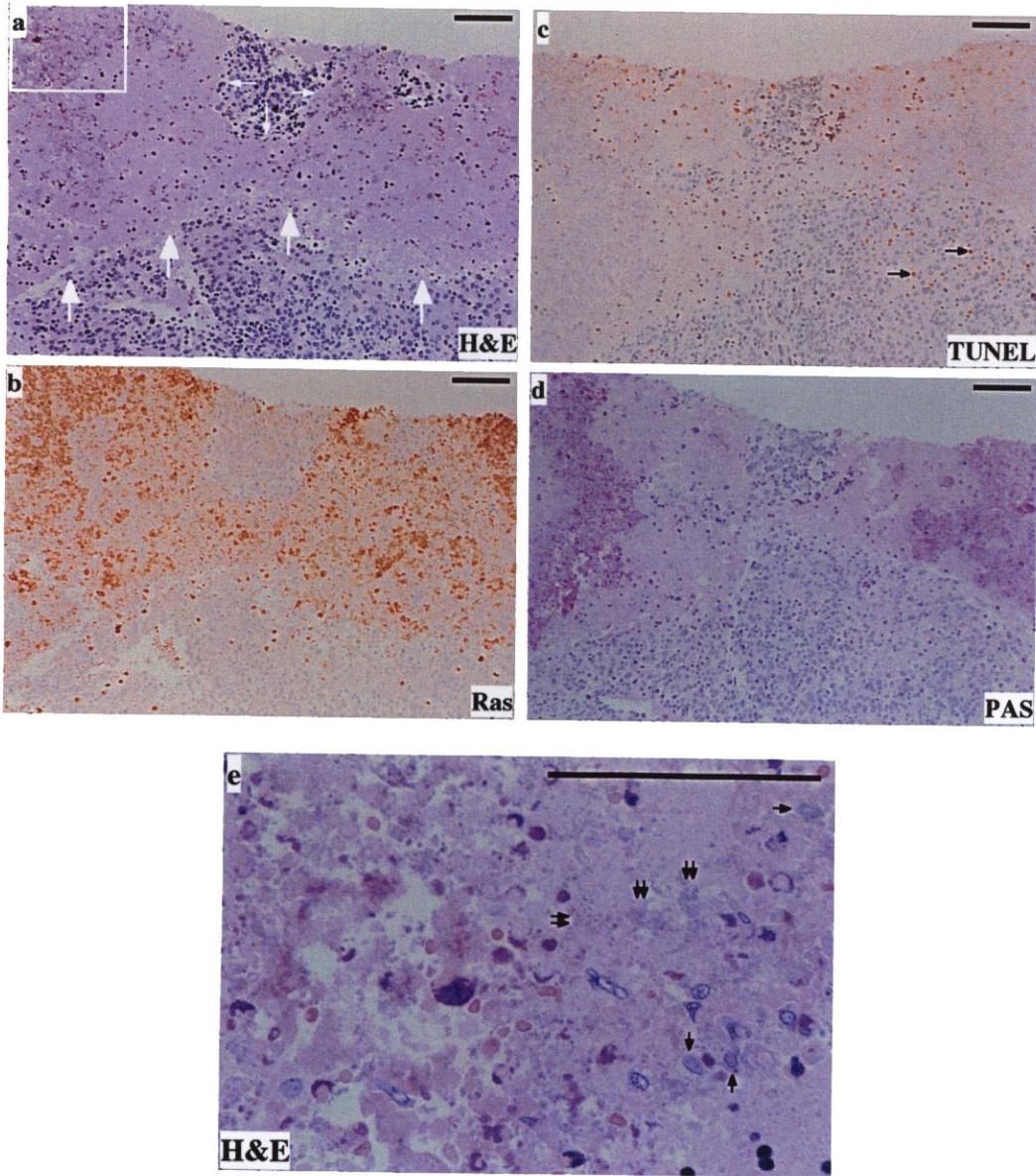


Fig. 1. Ras overexpression and non-apoptotic degeneration of tumor cells in neuroblastoma tissues. Serial tumor sections (**D-a, b, c, d**) were stained either with hematoxylin-eosin (H & E), with anti-H-Ras (Ras), by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method, or by the periodic acid-Schiff (PAS) method, as indicated in each panel. Positive signals for immunostaining and TUNEL assay appear brown, and positive PAS staining appears red-purple. In the H & E-stained section (**D-a**), the margin of the degenerating area is marked by white arrows. Samples of typical apoptotic cells with positive staining for TUNEL (**D-c**) are indicated by black arrows. (**D-e**) is a magnified view of the boxed area in (**D-a**). Samples of unfragmented degenerating nuclei and clusters of fragmented nuclei are indicated by single and double arrows, respectively, in (**D-e**). Scale bars, 100 μ m.

Fig. 1E

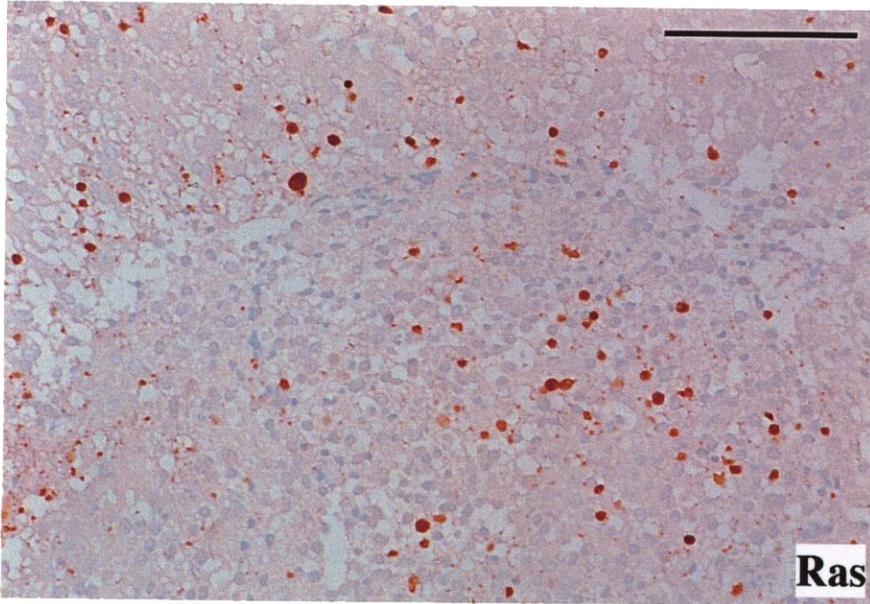


Fig. 1. Ras overexpression and non-apoptotic degeneration of tumor cells in neuroblastoma tissues. A single neuroblastoma section was stained with anti-H-Ras antibody and shown in panel (E). Positive signals for immunostaining appear brown. Scale bar, 100 μm .

Fig. 2.

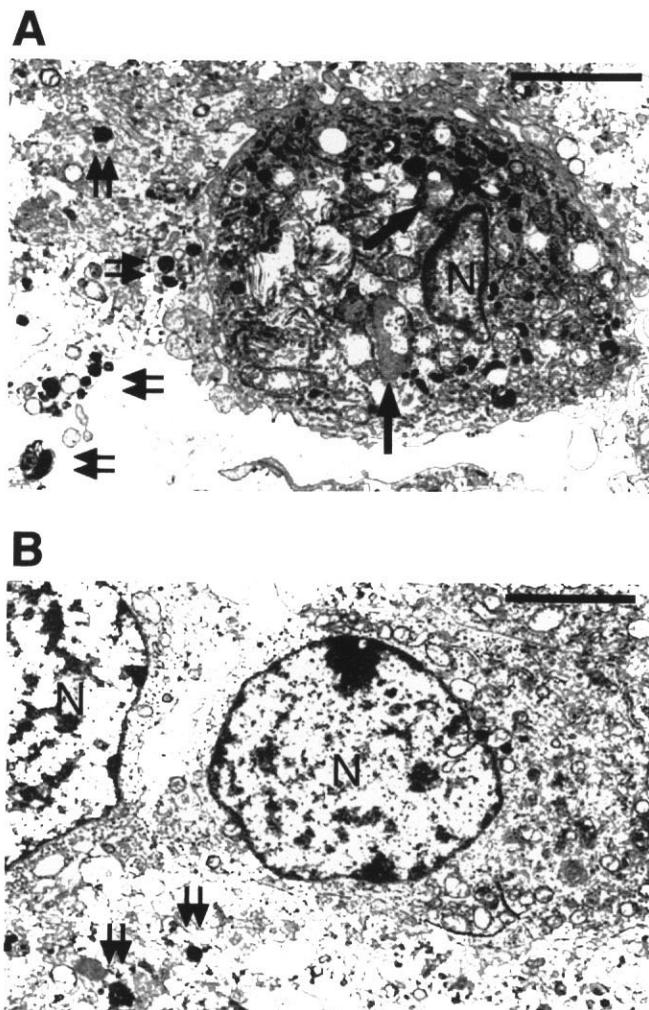


Fig. 2. Transmission electron microscopic analysis of neuroblastoma samples. Degenerating (A) and non-degenerating (B) tumor cells found in a neighboring area. The degenerating cell has more electron-dense primary lysosomes as well as secondary lysosomes (single arrows), which are possibly autolysosomes. Degenerating cell is surrounded by cell fragments containing lysosomal structures (double arrows). N, nucleus. Scale bars, 5 μ m.

Fig. 3.

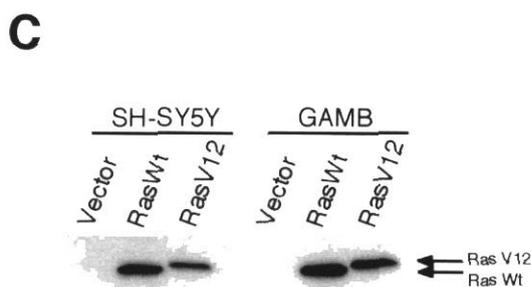
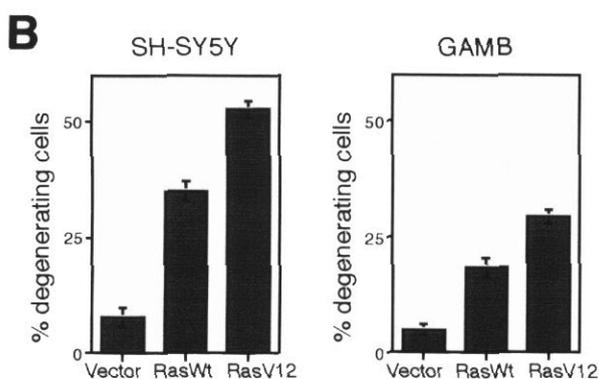
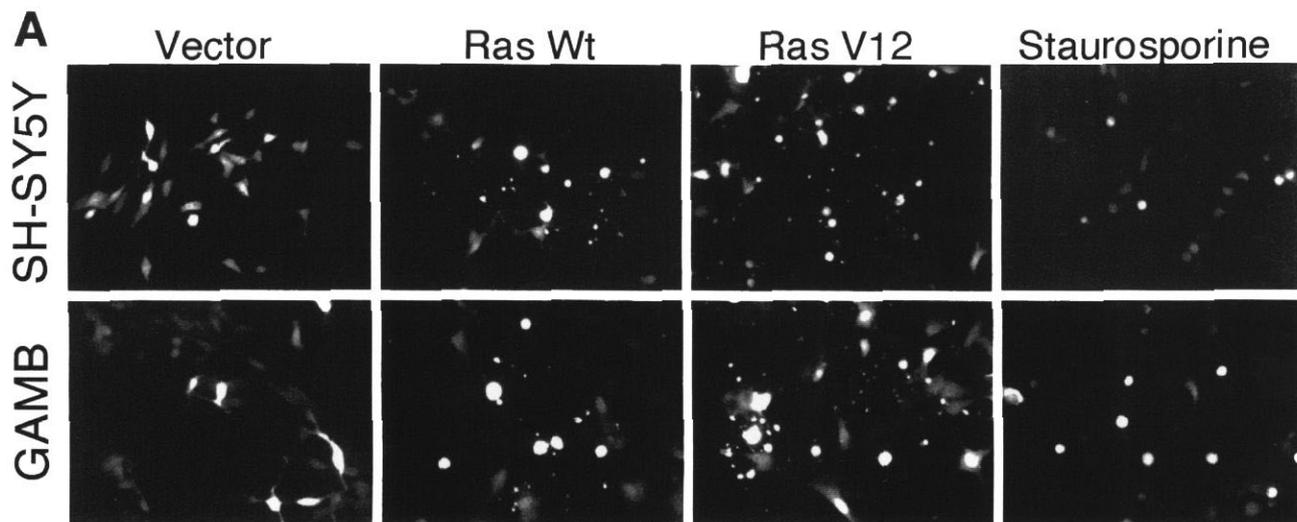


Fig. 3. Induction of neuroblastoma cell death by Ras expression *in vitro*. (A-C) Human neuroblastoma cell lines SH-SY5Y and GAMB were co-transfected with 0.5 μ g of the indicated pcDNA3 expression plasmids (Vector, Ras Wt, Ras V12) together with the green fluorescent protein (GFP)-expressing plasmid (0.5 μ g). As a control for apoptosis, neuroblastoma cells were transfected with the GFP plasmid alone and treated with staurosporine 24 h after transfection (Staurosporine). GFP-positive cells were photographed 2 days after transfection or staurosporine treatment (A), and GFP-positive cells showing morphological degeneration were scored 2 days after transfection. The results (mean \pm standard deviation) are from three separate transfection experiments and are shown in panel (B). Transfected cells were also analyzed for Ras protein expression levels by immunoblotting with anti-H-Ras antibody (C).

Fig. 3D

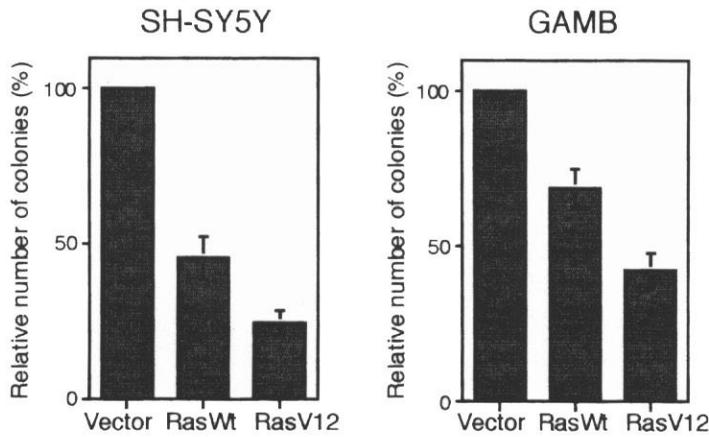


Fig. 3. Induction of neuroblastoma cell death by Ras expression *in vitro*. **(D)** SH-SY5Y and GAMB cells were transfected with the indicated pcDNA3 expression plasmids (1 μ g), and colony formation assay was done. The results (mean \pm standard deviation) are from three separate transfection experiments. The graph indicates the number of colonies relative to the number of colonies formed by control vector transfection, which was set to 100.

Fig. 4A

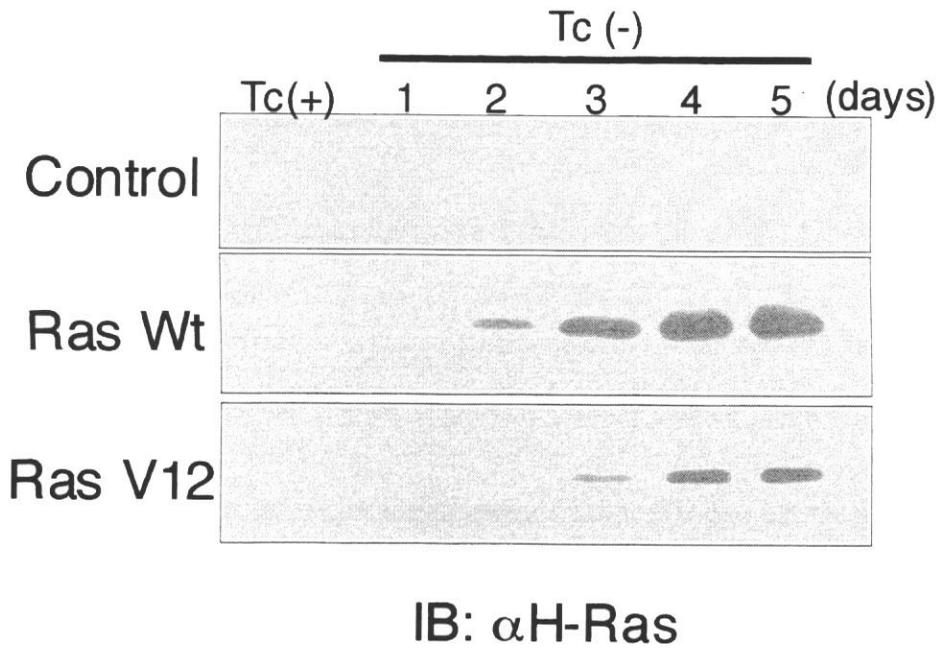
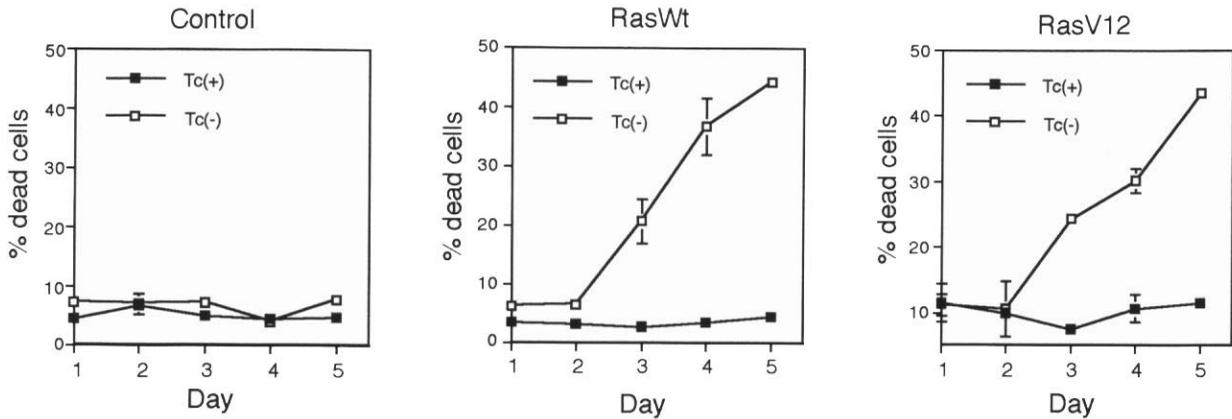


Fig. 4. Induction of neuroblastoma cell death *in vitro* by inducible expression of Ras in stable transfectants. (A) SH-SY5Y-TA-GN (Control), SH-SY5Y-TA-wtRas (Ras Wt), and SH-SY5Y-TA-Ras V12 (Ras V12) cells cultured in the presence of tetracycline or in its absence for the indicated periods were subjected to immunoblot analysis using anti-H-Ras antibody.

Fig. 4

B



C

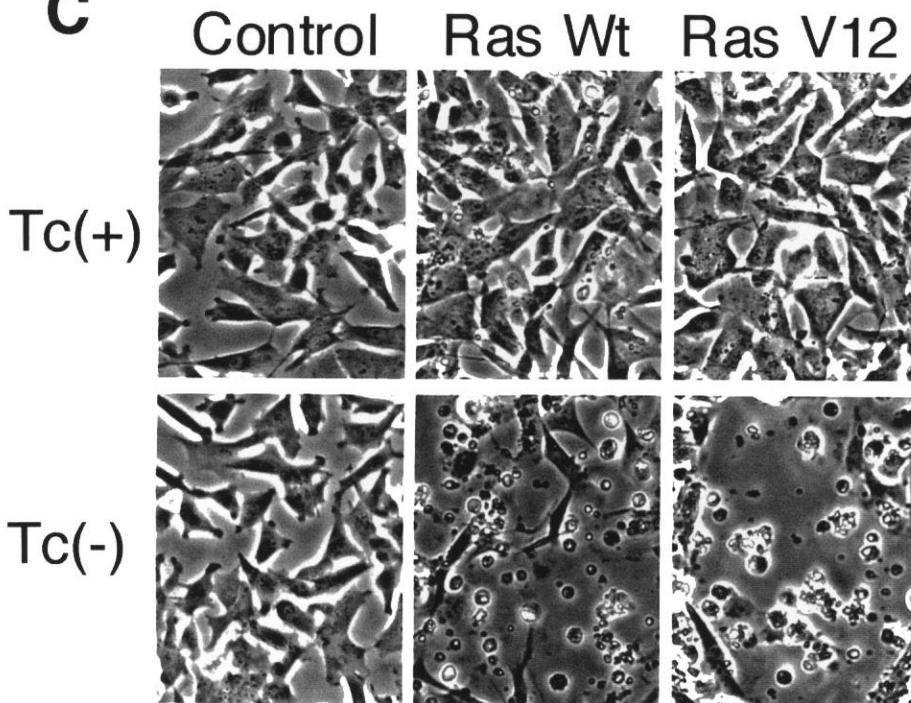


Fig. 4. Induction of neuroblastoma cell death *in vitro* by inducible expression of Ras in stable transfectants. **(B)** SH-SY5Y-TA-GN (Control), SH-SY5Y-TA-wtRas (Ras Wt), and SH-SY5Y-TA-Ras V12 (Ras V12) cells were cultured in the presence and absence of tetracycline, and the percentage of dead cells was determined by the dye exclusion method. The results (expressed as the mean \pm standard deviation) are from three separate experiments. **(C)** Phase-contrast micrographs of the indicated cells cultured in the presence and absence of tetracycline (Tc[+] and Tc[-], respectively) for 5 days.

Fig. 5A

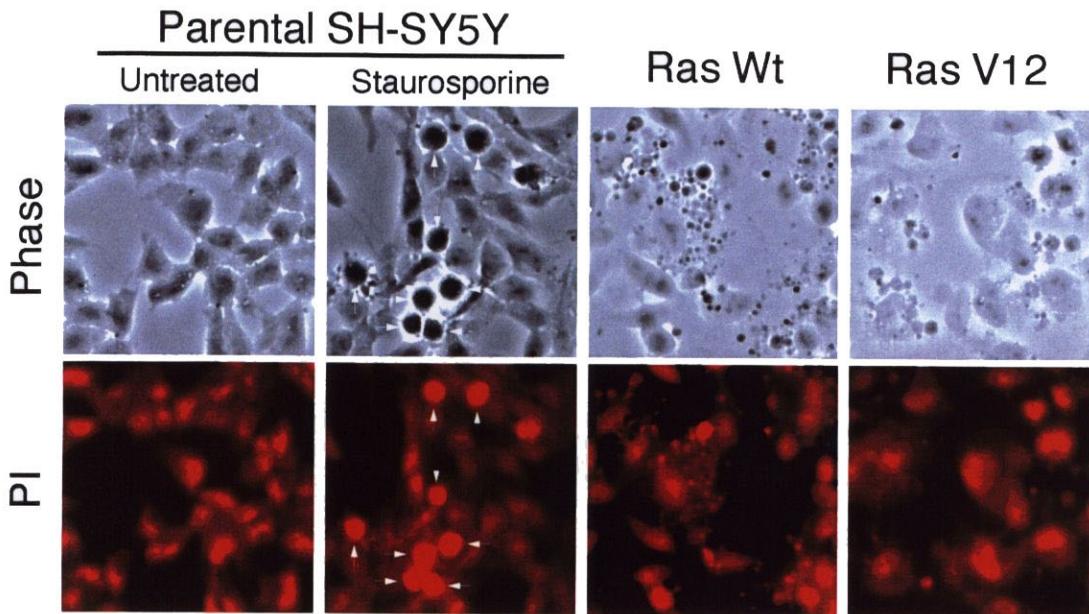


Fig. 5. Characterization of neuroblastoma cell death induced by Ras *in vitro*. (A) Lack of nuclear condensation in Ras-induced neuroblastoma cell death. SH-SY5Y-TA-wtRas (Ras Wt) and -TA-RasV12 (Ras V12) cells cultured in the absence of tetracycline for 5 days as well as parental SH-SY5Y cells either treated with staurosporine or left untreated for 2 days were subjected to propidium iodide staining. Phase-contrast micrographs of the corresponding areas are presented in the upper panels. In (A), apoptotic cells are indicated by white arrows.

Fig. 5B

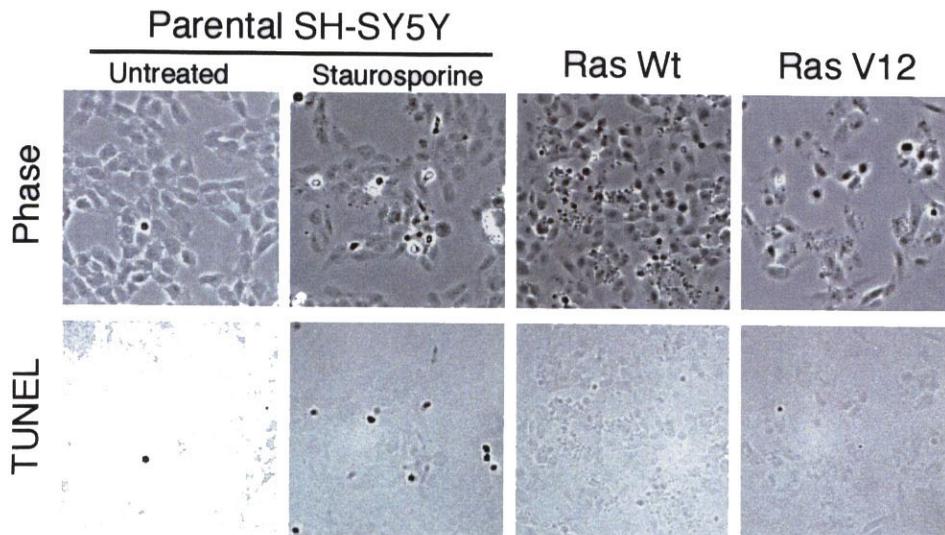


Fig. 5. Characterization of neuroblastoma cell death induced by Ras *in vitro*. **(B)** Lack of DNA fragmentation in Ras-induced neuroblastoma cell death. SH-SY5Y-TA-wtRas (Ras Wt) and -TA-RasV12 (Ras V12) cells cultured in the absence of tetracycline for 5 days as well as parental SH-SY5Y cells either treated with staurosporine or left untreated for 2 days were subjected to terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling analysis. Phase-contrast micrographs of the corresponding areas are presented in the upper panels.

Fig. 5C

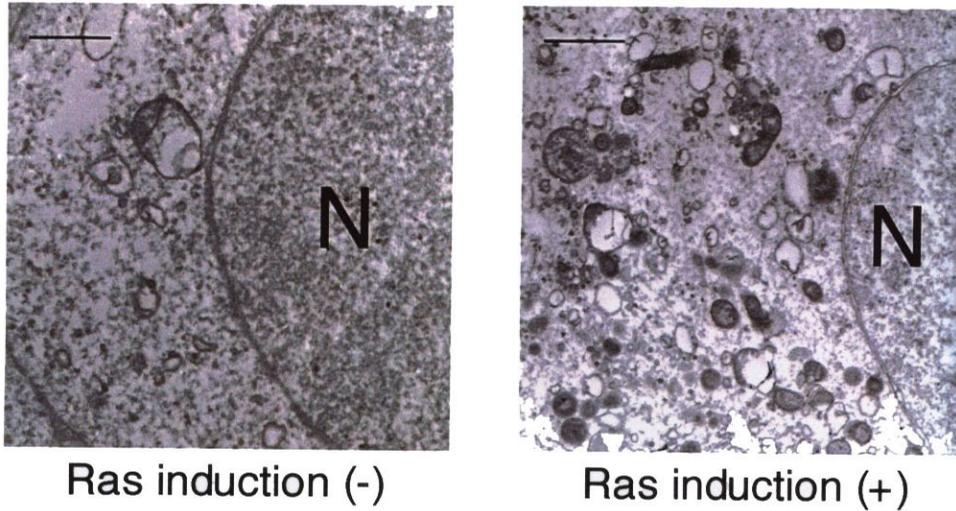


Fig. 5. Characterization of neuroblastoma cell death induced by Ras *in vitro*. (C) Electron micrographs of SH-SY5Y-TA-wtRas cells cultured in the absence (Ras induction (+)) and presence (Ras induction (-)) of tetracycline for 5 days. N, nucleus. Scale bars, 1 μ m.