神経芽細胞腫における癌遺伝子と MHC 抗原遺伝子間の発現調節機構に関する検討

マウス神経芽細胞腫を用いた H-2 Gene, N-myc, c-src 相互間制御の分子生物学的解析

山崎 俊樹・菊池 晴彦・山下 純宏*・Hans-Gustaf Ljunggren**・Klas Kärre**
George Klein**

Molecular Analysis of Relationship between Oncogene (N-myc and c-src) Expression and Major Histocompatibility Complex Antigen Gene Expression in Mouse Neuroblastoma Lines

Toshiki YAMASAKI, Haruhiko KIKUCHI, Junkoh YAMASHITA*,
Hans-Gustaf LJUNGGREN**, Klas KÄRRE** and George KLEIN**

Department of Neurosurgery, Kyoto University, Kyoto; *Department of Neurosurgery, Kanazawa University, Kanazawa; **Department of Tumor Biology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Abstract

The authors have investigated the relationship between oncogene (N-myc and c-src) expression and major histocompatibility complex (H-2 in the mouse) antigen gene expression at the molecular levels, by using mouse neuroblastoma sublines (NB-1 and NB-V). Fluorescence-activated cell sorter analysis showed that NB-1 cells exhibited positive expression to H-2 K^k, H-2 D^d, and beta-2-microglobulin, while NB-V cells were negative to all three antigens. It was found that dimethyl sulfoxide (DMSO) had a capacity to increase an H-2 class I antigen expression on NB-1 cells, whereas no change was observed on NB-V cells after DMSO treatment. Molecular analysis with deoxyribonucleic and ribonucleic acid (RNA) blot hybridization and immunoprecipitation revealed that the enhancement of H-2 antigen expression on NB-1 cells was modulated at the transcriptional control of the H-2 gene. In contrast, negative H-2 antigen expression on NB-V cells was caused by block at the level of glycosylation of the H-2 heavy chain, although an increase in messenger RNA of the H-2 gene was induced after DMSO treatment. There was neither amplification nor rearrangement of N-myc and c-src oncogenes in either neuroblastoma subline. Nuclear run-on transcription assay revealed that the N-myc gene was post-transcriptionally down-modulated by DMSO, whereas the c-src gene was transcriptionally up-regulated. It was thus suspected that N-myc and c-src might be directly associated with cellular proliferation and differentiation in neuronal tumors and that *in vivo* tumorigenicity could be regulated by the control mechanism of oncogene expression in relation to H-2 gene expression on tumor cells.

Key words: neuroblastoma, N-myc, c-src, molecular biology, major histocompatibility complex class I antigen gene

京都大学脳神経外科 *金沢大学脳神経外科 **カロリンスカ研究所腫瘍生物学部門

Address reprint requests to: T. Yamasaki, M.D., Department of Neurosurgery, Shimane Medical University, 89-1 Enya-cho, Izumo, Shimane 693.

受稿 1988年10月7日 受理 1989年2月10日

I はじめに

神経芽細胞腫は発生学的に神経堤由来の腫瘍であり、多くの場合に染色体異常を伴い、それに関連した癌遺伝子として N-myc の存在が明らかにされてきた。近年、N-myc と本腫瘍の悪性度との関係が注目されており、N-myc 増幅型は悪性であり、転移増殖性を呈し、予後の面からも N-myc の増幅度(遺伝子数)が高いほど宿主の生存期間は短いという報告がみられる^{6,8,11,17,20}。一方、c-src も神経系細胞の分化に必須の遺伝子と言われ、N-myc とともに数多くの研究がなされており、両遺伝子の分化における分子間制御機構もしだいに解明されつつある^{4,5,22}。

腫瘍の悪性度は主に腫瘍自体の生体内における増殖性と宿主側の腫瘍免疫応答能により決定されるものと思われる。この腫瘍増殖性は神経芽細胞腫の場合、癌遺伝子 N-myc あるいは c-src の発現性と密接に関係し、宿主の免疫反応性は腫瘍細胞の認識機構において重要な役割を果たしている主要組織適合複合体(major histocompatibility complex: MHC)抗原の発現性により相違がみられるものと考えられている^{1,23,26}。

今回、著者らはマウス神経芽細胞腫における N-myc と c-src の両遺伝子の発現性とマウス MHC (H-2)抗原遺伝子の発現性との間の制御機構を解析するために、H-2抗原が陽性、陰性という膜発現性の態様が異なるマウス神経芽細胞腫の subline (NB-1, NB-V)を用い、両株における N-myc と c-src の発現動態を比較し、さらに dimethyl sulfoxide (DMSO) による分化誘発系⁹)において両株に H-2 gene, N-myc, c-src の発現性に変動が生じるかを分子生物学的アプローチから検索した結果、それぞれの遺伝子間の調節機構に関する若干の知見を得たので報告する。

II 研究材料および方法

1. 実験腫瘍細胞

A/Sn (H-2^a, K^k, D^d)マウス由来の特発性神経芽細胞腫 C-1300 の subline, NB-1 と NB-V を用いた。腫瘍細胞株は10%非働化牛胎児血清添加 RPMI-1640(ストレプトマイシン100 µg/ml およびペニシリン G 200国際単位/l 添加)完全培地で継代維持している。

2. 抗体

H-2 クラス I 抗原の H 鎖に対するモノクローナル抗体は、American Type Culture Collection より供与されたハイブリドーマの培養上清液(H-2 K^k from 11-4.1, 15-3-1S, and 16-1-11N; H-2 D^d from 34-1-2S and 34-5-8S)を使用した。H-2 クラス I 抗原の β 2-microglobulin (β 2m)に対する抗体(rabbit anti-mouse β 2m antiserum)および分子生物

学的検索用の K218(マウス H-2 クラス I 抗原の H 鎖, β 2m に反応性の rabbit anti-mouse sera)抗体は Dr. Svante Pääbo (Bio Medical Center, Uppsala University, Uppsala) より供与されたものを用いた。

3. FACS による densitometric analysis

細胞膜上の H-2 クラス I 抗原(H 鎖, β 2m)発現量は FACS により測定した²⁵。細胞(10⁶ 個)を H 鎖, β 2m の一次抗体で処理(4°C, 30分間)したのち、二次抗体として fluorescein isothiocyanate で標識した rabbit anti-mouse immunoglobulin, swine anti-rabbit immunoglobulin (DAKO, Copenhagen, Denmark)を用いた。数回洗滌したのち、propidium iodide で染色し、赤染された死細胞を識別除外し、緑染した生細胞のみ10,000個をカウントし、細胞膜上の抗原量を算定した。

4. H-2 クラス I 抗原の細胞内制御の molecular analysis

免疫沈降法: ³⁵S-メチオニンで標識した細胞から抽出した H-2 クラス I 抗原(H 鎖, β 2m)に対する immune complex(蛋白試料)を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ニトロフィルタート上に移したのち、H 鎖, β 2m と特異的に反応するバンドをオートラジオグラム上にて検出した¹²。一部の実験には、H-2 クラス I 抗原の細胞質内における terminal glycosylation を検討するために enzyme endo- β -N-acetyl-glycosylase H (Endo H)(生化学工業株, 東京)処理を一段階加えた免疫沈降法を施行した。

northern and southern blot 法: アガロースゲル電気泳動で分離した RNA および DNA をニトロセルロースフィルタートに移し、³²P で標識した H-2 クラス I 抗原 (H 鎖, β 2m)の遺伝子 DNA をプローベとして northern hybridization および southern hybridization を行い、オートラジオグラフィーにより目的とする H-2 クラス I 抗原遺伝子の構成ならびに細胞内 messenger RNA (mRNA)量を分析した^{12,14,24}。

5. 癌遺伝子の RNA, DNA の調整と molecular analysis

前述の H-2 遺伝子解析の場合と同様に、アガロースゲル電気泳動で分離した RNA および DNA をニトロセルロースフィルタートに移し、³²P で標識した N-myc と c-src の DNA プローベを用い、northern hybridization ならびに southern hybridization を行い、オートラジオグラフィーにより N-myc と c-src の遺伝子構成と細胞内 mRNA 量を分析した^{7,19,21}。

6. nuclear run-on transcription assay

培養腫瘍細胞から分離した核成分を 70 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 0.4 mM ATP, 0.4 mM GTP, 0.4 mM CTP および 250 µCi ³²P で標識した

UTP (Amersham) を含んだ構成溶液 (2 ml) 内で 30 分, 26°C にて培養した. 前述のごとく, 種々の癌遺伝子 cDNA をプローベに用い, 分離精製した RNA の 4 日間にわたる hybridization を行い, N-myc と c-src の転写段階での遺伝子活性を経時的に分析した¹⁶⁾.

7. DMSO 処理

DMSO の至適濃度は腫瘍細胞の DNA 合成能あるいは増殖能に影響を及ぼさない 1.5% (v/v) とし, 培養期間は最高 4 週間とした.

III 結 果

1. マウス神経芽細胞腫における癌遺伝子発現性と DMSO 処理の影響

NB-1, NB-V のいずれにおいても明らかな N-myc の増幅あるいは再構成はみられなかった (Fig. 1) が, mRNA の発現量は NB-V により豊富にみられた (Fig. 2A). 次に, DMSO 処理の N-myc および c-src 発現性に及ぼす影響を mRNA レベルで経時的に比較した. N-myc に関しては両者とも DMSO 処理の時間的経過とともに減少した (Fig. 2B, C). 一方, c-src についてはその発現性は逆に増加した (Fig. 3). この N-myc と c-src の mRNA 量の変動が transcriptional regulation によるものかを nuclear run-on transcription assay で検索した. N-myc では hybridization の時間の長短にかかわらず mRNA 量は不変であったのに対し, c-src では時間的経過とともに mRNA 量は増加しているのが確認された (Fig. 4). したがって, DMSO 処理による N-myc と c-src の変動はそれぞれ post-transcriptional down regulation と transcriptional up regulation により調節されていることが示唆された.

Fig. 1 Southern blot analysis of N-myc in genomic deoxyribonucleic acid isolated from NB-1 (*upper*) and NB-V (*lower*) cells. Ten (A), 5 (B), 2.5 (C), and 1.25 (D) μ g of each was digested. A single copy of N-myc gene per haploid genome is verified to be present in both cell lines.

Fig. 2 Steady-state level of N-myc messenger ribonucleic acid (mRNA) isolated from NB-1 (*upper*) and NB-V (*lower*) cells, either untreated (A) or treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 weeks (B) and for 3 days (C).

Fig. 3 Steady-state level of c-src mRNA in NB-1 cells, either untreated (A) or treated with DMSO for 2 weeks (B).

2. 腫瘍細胞膜表面の H-2 抗原発現性

H-2 クラス I 抗原 (H 鎖, β 2m) に対する種々の抗体を用い, FACS により NB-1, NB-V の細胞表面上の H-2 クラス I 抗原発現量を比較した. NB-1 では H-2 クラス I

Fig. 4 Transcriptional rate analysis of N-myc and c-src in NB-1 cells, either untreated (A) or treated with DMSO for 3 days (B) and for 6 days (C).

Fig. 5 Fluorescence-activated cell sorter analysis of H-2 K^k, H-2 D^d, and beta-2-microglobulin (beta-2-m) expression on NB-1 (left) and NB-V (right) cells. Abscissa, fluorescence intensity (logarithmic scale); ordinate, numbers of cells (linear scale). For background staining, fluorescein-conjugated rabbit anti-mouse or swine anti-rabbit immunoglobulins were used alone.

抗原(H-2 K^k, D^d および β 2m)は陽性であるのに対し、NB-V では陰性であった(Fig. 5).

3. H-2 抗原の発現過程における細胞内制御

H-2 クラス I 抗原(H 鎖, β 2m)遺伝子の cDNA をプローベとした southern and northern blot 法により NB-1, NB-V の両株で H 鎖, β 2m の遺伝子発現ならびに転写段

Fig. 6 Immunoprecipitations of H-2 heavy chain (H-2 class I) and beta-2-microglobulin (beta-2-m) from NB-1 (A, B) and NB-V (C, D) cells. Detergent solubilized lysates of ³⁵S-methionine-labeled cells were immunoprecipitated with antibodies and protein A-sepharose, and analyzed on 12.5% NaDod SO₄/polyacrylamide gel electrophoresis. NB-1 and NB-V cells are immunoprecipitated with either K218 (rabbit anti-mouse H-2 sera detecting both heavy chain and beta-2-m) or with rabbit anti-mouse beta-2-m sera.

階が確認された。さらに、H 鎖と β 2m の mRNA の翻訳段階を解析するために免疫沈降法を行うと、両株ともに H 鎖と β 2m に一致したバンドがみられた(Fig. 6)。すなわち、NB-1, NB-V とともに H-2 gene の増幅や再構成はなく、遺伝子からの転写段階および mRNA の翻訳段階に障害はみられなかった。しかしながら、両株を Endo H で処理したのちに免疫沈降法を行うと、NB-1 では前述の免疫沈降法の結果と比較して変化はみられず、すなわち Endo H に抵抗性を示したが、NB-V では H 鎖に関して Endo H に感受性を呈し、ゴルジ装置における glycosylation の段階における障害が示唆された。以上より、NB-V では NB-1 でみられたような H 鎖, β 2m 遺伝子の転写・翻訳段階に引き続く細胞質内における両鎖の heterodimer 結合、H-2 クラス I 抗原として細胞膜挿入、そして最終的な膜表面への発現など、一連の調節機構の過程において H 鎖の glycosylation の段階に障害があり、それ以降での制御が働かず、究極的に細胞膜表面の H-2 クラス I 抗原の発現性が陰性を示したものと考えられた。

4. H-2 抗原発現性に及ぼす DMSO の影響

DMSO の H-2 クラス I 抗原発現性に及ぼす影響を両株

の腫瘍細胞膜表面ならびに細胞内のレベルで検討した。DMSO 処理により NB-1 では細胞膜表面の H-2 クラス I 抗原発現性は Table 1 のごとく経時的増加を示した。すなわち、抗原発現量がプラトーレベルに達するまでに 3~7 日間を要し、培養期間 4 週間まではほぼ同程度の発現性を呈した。一方、NB-V では有意な変化はみられなかった。続いて、H 鎖、 $\beta 2m$ 遺伝子の発現制御に及ぼす DMSO の影響を southern and northern blot 法で解析した。DMSO 処理後に両鎖遺伝子の再構成や増幅などはみられなかったが、両鎖遺伝子の転写段階はいずれの腫瘍株においても亢進していた (Fig. 7)。故に、NB-1 では両鎖が膜表面で H-2 抗原として発現するまでの過程に障害がないので、DMSO 処理による両鎖の mRNA 促進に起因して膜表面の H-2 抗原は直列的に増強するものと考えられる。一方、NB-V では H 鎖の glycosylation の障害のため、DMSO 処

Table 1 NB-1 cell surface responses to H-2 K^k, H-2 D^d, and beta-2-microglobulin (beta-2-m) after dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment

Duration of treatment (day)	Response index*		
	H-2 K ^k	H-2 D ^d	beta-2-m
1-2	1.2±0.3	1.0±0.2	1.1±0.2
3-7	3.2±1.1	2.9±0.9	2.6±0.5
8-28	3.4±1.3	3.2±1.2	2.8±0.9

*The response index is defined as the increase in fluorescence, measured by fluorescence-activated cell sorter, following DMSO treatment. Values are expressed relative to untreated NB-1, whose index is taken as 1. The data represent the means and SD of three experiments.

Fig. 7 Northern blot autoradiograms after hybridization with ³²S-probes against H-2 heavy chain mRNA (H-2 class I) and beta-2-microglobulin mRNA (beta-2-m) in NB-1 (A, B) and NB-V (C, D) cells, either untreated (A, C) or treated with DMSO for 2 weeks (B, D).

理による両鎖の mRNA 促進がみられるものの、究極的な細胞膜抗原としての H-2 抗原は発現されないものと思われる。

IV 考 察

本研究の目的は、宿主の腫瘍免疫系を制御する MHC 抗原遺伝子と造腫瘍性あるいは分化を制御する癌遺伝子との間になんらかの関連を有した調節機構があるかを検討することにある。MHC 抗原は抗原認識機構と関係して腫瘍の生物学的悪性度や宿主の免疫応答能における重要な因子の一つであるので、MHC 抗原遺伝子がいかに腫瘍細胞内の DNA-RNA レベルで制御され、かつその遺伝子産物が細胞膜表面にどのように発現されているかは癌遺伝子の発現調節機序との関連性を追求する上で興味ある課題である。MHC クラス I 抗原遺伝子の DNA からの転写、mRNA からの翻訳、細胞膜上への分子輸送等、制御機構を解明するためには、発現の欠如あるいは低下している腫瘍細胞内での再発現を試みるアプローチは有効であり、かつ臨床的な観点からも有意義である。したがって、著者らはマウス神経芽細胞腫の H-2 抗原陽性株 (NB-1) および陰性株 (NB-V) を用い、おのおのの細胞において H 鎖、 $\beta 2m$ 遺伝子の制御機構を検索し、その発現性の相違と N-myc あるいは c-src との相互間の関連性を分析した。さらには、solar solvent で分化誘導剤でもある DMSO で NB-1 および NB-V を処理したのちにおのおのの細胞株に生じる H-2 抗原遺伝子あるいは癌遺伝子の発現性の変動を経時的に観察することにより、分化における H-2 抗原および癌遺伝子間の調節機構を解析することが可能であった。

NB-V は H 鎖の glycosylation に障害がある腫瘍であり、DMSO 処理を施した場合、H-2 抗原遺伝子の mRNA の亢進が誘導されるものの、最終的な腫瘍細胞膜表面の H-2 抗原発現性に増強現象はみられなかった。したがって、NB-V が生体内で増殖している場合と比較して、DMSO で処理したのちに NB-V を移植しても H-2 抗原が関与する宿主内の免疫反応には有意な変動は誘導されず、宿主に対する生物学的悪性度にも有意な変化はみられないものと考えられる。一方、NB-1 は H-2 抗原の遺伝子発現 (転写-翻訳) 過程から膜表面での発現までに障害のみられない腫瘍であり、DMSO 処理後にみられた H-2 抗原遺伝子の転写段階の促進に起因して DMSO 処理腫瘍細胞の膜表面上には H-2 抗原発現性の増強現象がみられ、腫瘍の免疫原性あるいは造腫瘍性に影響を与えるものと考えられる。このように、すべての腫瘍細胞において MHC クラス I 抗原の変化は観察されるものではないが、腫瘍の増殖と関連した MHC クラス I 抗原の変動が宿主に誘導され

る免疫応答のみならず宿主の予後にも影響を及ぼすものと思われる。

最近、神経芽細胞腫において、発癌遺伝子の一つである N-myc の発現性と造腫瘍性との間に密接な関連性が存在するということが指摘されている^{9,10,13,18}。しかしながら、N-myc と MHC 抗原遺伝子間の関係を検索した報告は少なく、そのなかでは Bernards ら²⁾のラットを用いた実験が注目される。すなわち、N-myc の増幅により MHC 抗原クラス I 抗原遺伝子の down regulation がみられるという現象を分子レベルで解析し、それら両遺伝子間の inverse relationship を示している。一方、c-src は神経系細胞における分化、増殖の過程で重要な役割を担っている遺伝子であることが示唆されている^{4,5,22}。神経系腫瘍におけるこれら両遺伝子の発現性と宿主の免疫応答に密接な関係を有する MHC 抗原遺伝子の発現性との間の制御機構を解析するために、著者らは H-2 抗原が陽性、陰性という膜発現性の態様が異なる NB-1 と NB-V における N-myc と c-src の発現動態の相違を検討した。両株ともに N-myc と c-src の増幅あるいは再構成はなく、DMSO 処理による分化誘発系において N-myc の mRNA は post-transcriptional down regulation の調節により低下し、c-src の mRNA は transcriptional up regulation の調節により増加していることが判明した。これらのことより、神経芽細胞腫の増殖と分化には N-myc と c-src の調節機構が直接関与しているが、生体での造腫瘍性あるいは免疫原性には MHC 抗原遺伝子の調節機構も関連して、癌遺伝子との間には宿主免疫系を介する間接的な相互作用が存在しているものと考えられる。

V 結 語

造腫瘍性を制御する癌遺伝子と腫瘍免疫系を制御する MHC 抗原遺伝子間の調節機構を解析する目的で、マウス神経芽細胞腫 C 1300 株から樹立したマウス MHC (H-2) 抗原発現性の異なる 6 種類の subline のうち、H 鎖と β_2m 陽性株(NB-1)・陰性株(NB-V)を用い、H-2 抗原遺伝子の細胞膜発現性と N-myc、c-src の相互間制御を分子レベルでのアプローチから検討した。その結果、神経芽細胞腫の増殖と分化には N-myc と c-src の制御機構が直接関与しているが、生体での造腫瘍性には H-2 gene の調節機構も関連しており、癌遺伝子との間には宿主免疫系を介する間接的な相互作用が存在するものと考えられた。

本研究は、米国 NIH 科学研究費 PHS Grant No. 5 ROI CA 25250-06 およびスウェーデン癌学会研究計画助成金によるものである。

文 献

- 1) Bernards R: Suppression of MHC gene expression in cancer cells. *Trends Genet* 3: 298-301, 1987
- 2) Bernards R, Dessain SK, Weinberg RA: N-myc amplification causes down-modulation of MHC class I antigen expression in neuroblastoma. *Cell* 47: 667-674, 1986
- 3) Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224: 1121-1124, 1984
- 4) Brugge JS, Cotton PC, Queral AE, Barrett JN, Nonner D, Keane RW: Neurons express high levels of a structurally modified, activated form of pp60^{c-src}. *Nature* 316: 554-557, 1985
- 5) Cotton PC, Brugge JS: Neural tissues express high levels of the cellular src gene product pp60^{c-src}. *Mol Cell Biol* 3: 1157-1162, 1983
- 6) Cowell JK: Double minutes and homogeneously staining regions: Gene amplification in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 16: 21-59, 1982
- 7) deLorbe WJ, Luciv PA, Godman HM, Varmus HE, Bishop JM: Molecular cloning and characterization of avian sarcoma virus circular DNA molecules. *J Virol* 36: 50-61, 1980
- 8) Grady-Leopardi EF, Schwab M, Albin AR, Rosenau W: Detection of N-myc oncogene expression in human neuroblastoma by in situ hybridization and blot analysis: Relationship to clinical outcome. *Cancer Res* 46: 3196-3199, 1986
- 9) Kimhi Y, Palfrey C, Spector I: Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 462-466, 1976
- 10) Kohl NE, Gee CE, Alt FW: Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors. *Science* 226: 1335-1337, 1984
- 11) Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, Alt FW: Transposition and amplification of oncogene related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35: 359-367, 1983
- 12) Ljunggren H-G, Pääbo S, Cochet M, Kling G, Kourilsky P, Kärre K: Molecular analysis of H-2-deficient lymphoma lines. Distinct defects in biosynthesis and association of MHC class I heavy chains and β_2 -microglobulin observed in cells with increased sensitivity to NK cell lysis. *J Immunol* 142: 2911-2917, 1989
- 13) Petterson MGE, Kärre K, Cochet M: An active T cell independent mechanism enhances MHC class I transcription and expression on a mouse T cell lymphoma in vivo. *Cell Immunol* 108: 460-472, 1987
- 14) Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhode SC, Berg P: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-251, 1977
- 15) Rosen N, Reynolds CP, Thiele CJ, Biedler JL, Israel MA: Increased N-myc expression following progressive growth of human neuroblastoma. *Cancer Res* 46: 4139-4142, 1986

- 16) Schibler U, Hagenbuchle O, Wellaier PK, Pittet AC: Two promoters of different strengths control the transcription of the mouse alpha-amylase gene Amy-1^a in the parotid gland and the liver. *Cell* 33: 501-508, 1983
- 17) Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J: Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. *Nature* 305: 245-248, 1983
- 18) Schwab M, Ellison J, Busch M, Rosenau W, Varmus HE, Bishop JM: Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to a malignant progression of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4940-4944, 1984
- 19) Schwab M, Varmus HE, Bishop JM: Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature* 316: 160-162, 1985
- 20) Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siefel SE, Wong KY, Hammond D: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastoma. *N Engl J Med* 313: 1111-1116, 1985
- 21) Sejersen T, Sumegi J, Ringertz NR: Expression of cellular oncogenes in teratoma derived cell lines. *Exp Cell Res* 160: 19-30, 1985
- 22) Sorge LK, Levy BT, Maness PF: pp60^{c-src} is developmentally regulated in the neural retina. *Cell* 36: 249-257, 1984
- 23) Tanaka K, Isselbacher KJ, Khoury G, Gilbert J: Reversal of oncogenesis by the expression of a major histocompatibility complex class I gene. *Science* 228: 26-30, 1985
- 24) Thomas PS: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5201-5205, 1980
- 25) Yamasaki T, Klein G, Ljunggren HG, Höglund P, Öhlén C, Petterson MGE, Kärre K: Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment on H-2 expression and susceptibility to NK- and CTL-mediated lysis of the YAC-1 lymphoma and its β 2-microglobulin deficient variant. *JNCI* 80: 263-269, 1988
- 26) Zinkernagel RM, Doherty PC: MHC-restricted cytotoxic T-cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 27: 51-77, 1979

[別刷請求先：〒693 島根県出雲市塩冶町89-1, 島根医科大学脳神経外科, 山崎俊樹]