

癌遺伝子によるマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の トランスフォーメーション

齊藤 要一

札幌医科大学整形外科科学講座 (主任 石井清一 教授)

吉田 幸一 山下 利春

札幌医科大学癌研分子生物学講座 (主任 藤永 蕙 教授)

Transformation of Osteoblastic Cell Line MC3T3-E1 with Oncogenes

Yoichi SAITO

Department of Orthopaedic Surgery, Sapporo Medical College, Sapporo 060, Hokkaido
(Chief: Prof. S. ISHII)

Koichi YOSHIDA and Toshiharu YAMASHITA

Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College, Sapporo 060, Hokkaido
(Chief: Prof. K. FUJINAGA)

ABSTRACT Several oncogenes were introduced into a normal mouse osteoblastic cell line, MC3T3-E1, by calcium phosphate-mediated DNA transfection.

Transformed foci were formed by cotransfection with adenovirus type 12 E1A (Ad12E1A) and activated c-Ha-ras (EJras) oncogenes, and with c-myc and EJras oncogenes. Transfection with c-myc, Ad12E1A or EJras induced no obvious foci. Transformed cell lines established from each transformed focus had high saturation densities in culture and were tumorigenic when injected into athymic mice with low-differentiated sarcoma. The transfected oncogene DNA sequences were detected in the cellular DNA of all the transformants. Alkaline phosphatase activity decreased in transformants compared to their parental MC3T3-E1 cells.

(Received January 9, 1991 and accepted January 18, 1991)

Key words: Osteoblast, Oncogene, Transformation, Alkaline phosphatase

1 緒 言

各種悪性腫瘍における細胞性癌遺伝子(c-onc)の研究, すなわち種々の悪性腫瘍組織や癌細胞株におけるc-oncの増幅や再編成などの構造異常^{1,2,3)}, c-onc mRNA レベルを解析した研究が数多く報告されている^{4,5)}. 整形外科領域においても, ヒト骨肉腫や軟部腫瘍におけるc-oncの構造と発現に関する研究が近年盛んになされてきている^{6,7)}. 我々は, 骨芽細胞の癌化と癌遺伝子の関連を知る目的で, リン酸カルシウムを用いたDNAトランスフェクション法で骨芽細胞培養株に代表的な癌遺伝子を導入した. 癌遺伝子としてc-myc,

アデノウイルス12型E1A(Ad12E1A), 活性型c-Ha-ras(EJras)遺伝子を用いた. これらの癌遺伝子を, 骨芽細胞としての形質がよく温存されているマウス由来のMC3T3-E1細胞株に導入し, 細胞のトランスフォーメーションの有無について検索した. またトランスフォーメーション前後における細胞の性質を比較検討した.

2 実験材料と方法

1) 細胞培養: 骨芽細胞としてその形質がよく解析されているMC3T3-E1細胞^{8,9)}を使用した. MC3T3-E1細胞株は, 東北歯科大学, 小玉博明博士より贈与さ

れた。細胞培養には10%牛胎児血清(Flow社製), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペニシリンG(万有製薬), 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸ストレプトマイシン(富山科学製薬)を含む, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Flow社製)を用いた。

2) DNAトランスフェクション: Grahamらの方法¹⁵⁾に従った。トランスフェクション実験前日にMC3T3-E1細胞を6 cm dish当たり 2×10^5 個プレATINGした。Na₂HPO₄を含むHEPES緩衝液(pH 7.05)にプラスミドDNAを混合し, CaCl₂溶液を最終濃度125 mMになるように静かに加えた後, dish当たり5 μg DNAを培養液上に滴下した。4時間後, 15%グリセロールショックを1分間行ない, 培地で2回洗浄した後, 細胞培養を継続した。フォーカス出現の有無は, トランスフェクションの4週後に観察した。癌遺伝子含有プラスミドDNAとして, EJrasプラスミド¹¹⁾(ヒト膀胱癌細胞由来の6.6 kilo base pairs [kb]の断片を含む), c-mycプラスミド¹²⁾(5.5 kbのマウスc-mycの第2および第3エクソンの上流にモロニー株マウス白血病ウイルスLTRを結合したDNA断片を含む), Ad12E1Aプラスミド¹³⁾(1.3 kbのAd12E1A遺伝子の上流にモロニー株マウス白血病ウイルスLTRを結合したDNA断片を含む)を使用した。プラスミドDNAは大腸菌HB101株中で増殖させ, CsCl平衡密度勾配遠心法によって精製した。またDNAトランスフェクション実験には, 上記のプラスミドDNAの外にsalmon sperm DNA (Sigma社製)をコントロールとして用いた。

3) 細胞DNAの精製: 培養細胞を速やかにゴム製ポリスマンではがし, DNA抽出buffer (10 mM Tris·HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl)に懸濁した後, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のproteinaseK (Sigma社製)と0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS)を加えて37°Cで約12時間消化した。その後Cooperらの方法¹⁴⁾に従い, フェノール法により高分子量の細胞DNAを抽出した。細胞DNAをRNaseA (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で処理し, エタノール沈殿後TE buffer (10 mM Tris·HCl pH 7.5, 1 mM EDTA)に溶解した。

4) プローブDNAの標識: Feinbergらのoligolabeling法¹⁵⁾に従って, DNAを α -³²P-dCTP (Amersham社製)を用いて標識した。比放射活性は 2×10^8 cpm/ μg DNA以上であった。

5) サザンブロットハイブリダイゼーション: 抽出精製した細胞DNAを制限酵素BamHI(宝酒造株式会社)を用いて消化し, 1%アガロースゲル電気泳動にて分離した。Southernの方法¹⁶⁾に従って, ゲル内の

DNAをナイロンメンブレン(S&S社製)に吸着し³²Pで標識したプローブDNAと68°Cで約20時間ハンブリダイゼーション反応を行なった。ハイブリダイゼーションには, 6×SSC (1×SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate), 0.1% SDS, 5×Denhardt's solution (0.1% Ficoll, 0.1% polyvinyl-pyrrolidone, 0.1% bovine serum albumine), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のdenatured salmon sperm DNA (Sigma社製)を用いた。ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は, 2×SSC, 0.1% SDS溶液中で室温で30分ずつ2回行なった後, 0.1×SSC, 0.1% SDS溶液中で, 55°C 30分間行なった。サイズマーカーとして, λ ファージDNAを制限酵素Hind IIIで切断したものを使用した。

6) アルカリフォスファターゼ活性: 単層になった培養細胞を, ポリスマンではがしPBSで洗浄した。0.5% NP40を含む緩衝液に懸濁して, 凍結融解後15,000 rpmで10分間遠沈した。その上清をAlkaline phosphatase assay kit (Sigma社製)を用いて測定した。プロテイン測定にはprotein assay kit (BIORAD製)を使用した¹⁷⁾。

7) 細胞のヌードマウス皮下接種: 細胞を0.3 mlのPBSに懸濁して, 1匹当たり 5×10^6 細胞をマウス皮下に接種し, 4週間観察を続けた。同時にそのマウスの肺組織を10%ホルマリン固定して転移の有無を光顕的に検索した。

3 結 果

1) 癌遺伝子によるMC3T3-E1細胞のトランスフォーメーション: MC3T3-E1細胞は接触阻止現象を示し, 単層状態で細胞の増殖が停止する細胞である⁸⁾。Table 1に示すごとく, c-myc, EJras, Ad12E1Aの各癌遺伝子単独のトランスフェクションにおいてはコントロールのsalmon sperm DNAのトランスフェクションと同様にいずれもフォーカスの形成を認めなかった。c-mycとEJrasおよびAd12E1AとEJrasの2つの癌遺伝子を組み合わせて導入することによって, トランスフォーム細胞から成るフォーカスが形成された(Table 1)。フォーカスの数を比較すると, 1枚のディッシュ当たりc-mycとEJrasで平均23個, Ad12E1AとEJrasで平均4.8個のフォーカス形成が認められた。各フォーカスの形態は, Fig. 1 (A, B)の位相差顕微鏡像に示すごとく, 周辺のシート状のMC3T3-E1細胞と区別され, 細胞が島状に重層して増殖した。矢印の部分がフォーカス部分とMC3T3-E1細胞の境界近傍である。

Table 1 Transformation frequency of MC3T3-E1 cells after transfection of *c-myc*, *EJras* and *Ad12E1A* DNA.

Transfected DNA*	Number of foci/total number of dishes	average number of foci
Salmon sperm	0/5	0
<i>c-myc</i>	0/5	0
<i>EJras</i>	0/5	0
<i>Ad12E1A</i>	0/5	0
<i>c-myc</i> + <i>EJras</i>	115/5	23
<i>Ad12E1A</i> + <i>EJras</i>	24/5	4.8

* Salmon sperm DNA (5 μ g) or plasmid DNA carrying each oncogenes (5 μ g) was transfected and cultured for 28 days as described in materials and methods.

これらのフォーカスから4種の細胞株を樹立した。すなわち *c-myc*+*EJras* のトランスフェクションで得られたフォーカスから樹立した細胞株は MRT: clone 1, 2 であり, *Ad12E1A*+*EJras* のトランスフェクションから得られた細胞株は ART: clone 1, 2 と命名した。

2) 各トランスフォーム細胞の形態および増殖能: MRT 細胞株 (clone 1) と ART 細胞株 (clone 1) の

ギムザ染色像を Fig. 2 に示した。MC3T3-E1 細胞 (Fig. 2-A) は, 比較的丸みを帯びた細胞質の豊富な細胞である。一方, MRT 細胞および ART 細胞とも細胞核は親細胞株の MC3T3-E1 細胞よりやや小さいが, 細胞全体に対する核の大きさはむしろ増大している。細胞は紡錘形であり, MC3T3-E1 細胞とは異なり交差して増殖する。MC3T3-E1 細胞と, 各トランスフォーム細胞の

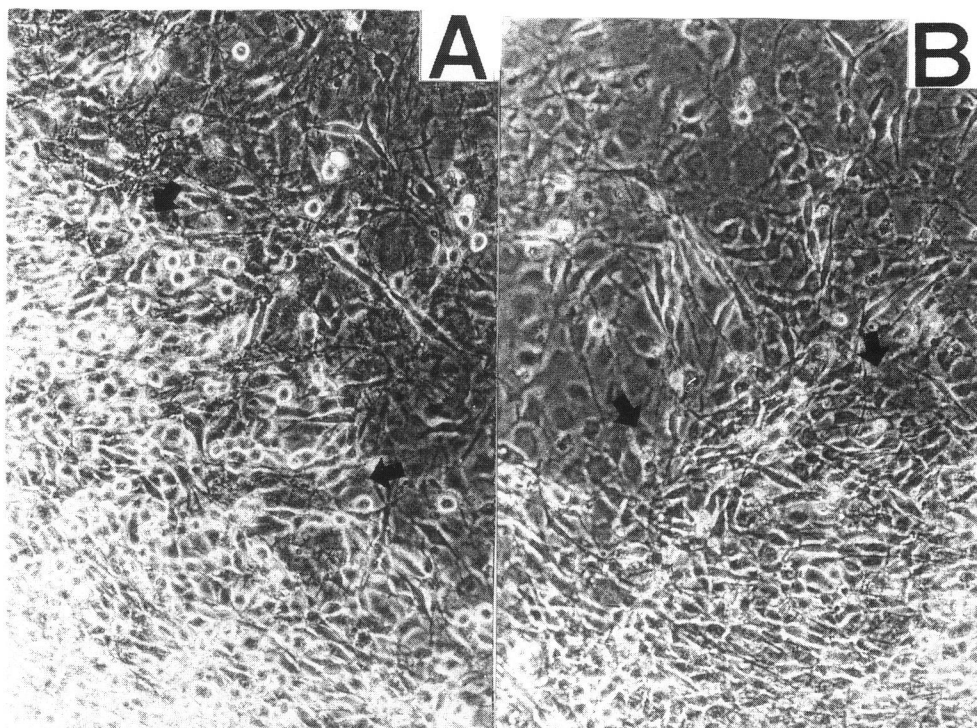


Fig. 1 Transformed foci on the MC3T3-E1 cells transfected with *c-myc*+*EJras*(A) and with *Ad12E1A*+*EJras*(B).

Arrows: boundaries between MC3T3-E1 and its transformed cells.

Magnification: $\times 200$

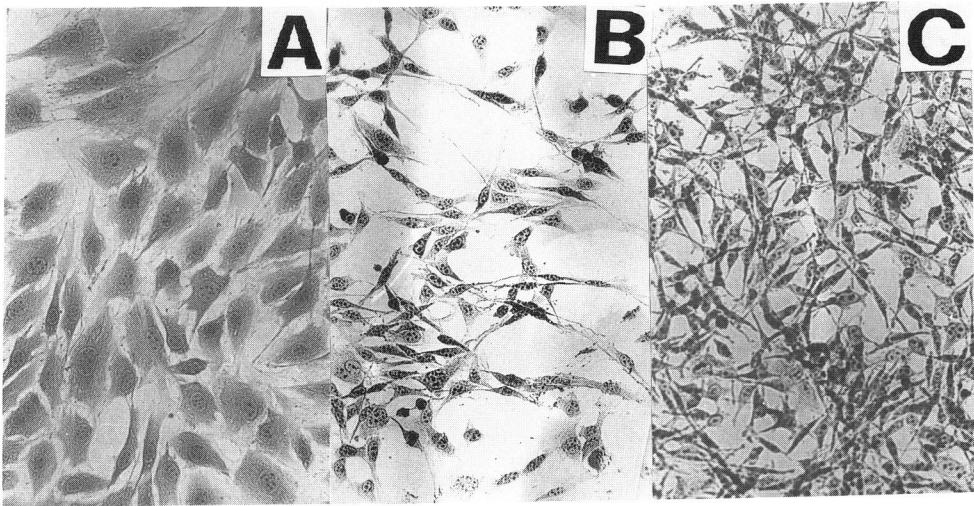


Fig. 2 Morphology of MC3T3-E1 cells and transformed derivatives.

A : MC3T3-E1

B : c-myc+EJras(MRT) : clone 1

C : Ad12E1A+EJras(ART) : clone 1

Magnification : $\times 200$ (Giemsa stain)

増殖曲線を Fig. 3 に示した。MC3T3-E1 細胞の増殖速度との違いは、5~6 日後より著明になり、10 日以降の飽和に達した時点ではトランスフォーム細胞の細胞数は MC3T3-E1 細胞の 2.0~2.5 倍となる。

3) 各トランスフォーム細胞のアルカリフォスファターゼ活性：Sigma 社製のアルカリフォスファターゼ活性アッセイキットを使用して、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。測定は各細胞が飽和に達した 3 日後（プレーティング 13 日後）に行なった。Table 2 に各トランスフォーム細胞の総蛋白 1 mg 当たりのアルカリフォスファターゼ活性値を示した。トランスフォーム細胞のアルカリフォスファターゼ活性は、MRT 細胞の 1 株 (clone 2) は約 15 U/mg protein, その他の 3 株は約 50 U/mg protein であり、MC3T3-E1 に比べて低下していた。

4) トランスフォーム細胞の造腫瘍性：各トランス

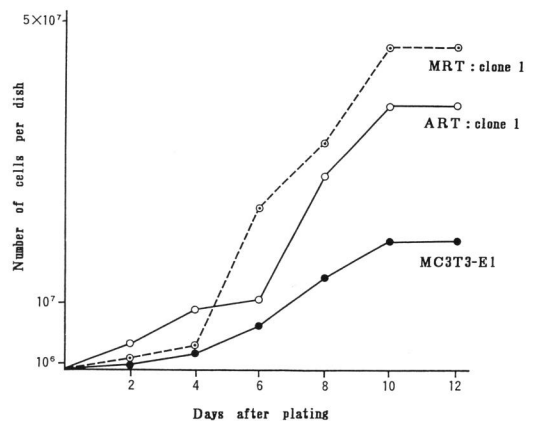


Fig. 3 Growth curves of MC3T3-E1 and its transformed derivatives.

10^5 cells per 60 mm dish were plated and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

Table 2 Alkaline phosphatase (ALP) activity in MC3T3-E1 and its transformed derivatives.

Cells	ALP activity (units/mg protein)
MC3T3-E1	78.4 \pm 3.46
MRT : clone 1	58.4 \pm 2.02*
MRT : clone 2	15.1 \pm 0.81
ART : clone 1	53.0 \pm 1.25
ART : clone 2	46.7 \pm 1.73

* 0.01 < p < 0.1

Table 3 Tumorigenicity of MC3T3-E1 cells and its transformed derivatives in nude mice.

Inoculated cells	Number of tumor-bearing animals/number of animals injected ^{*)}	Number of lung metastasis
MC3T3-E1	0/2	0
MRT : clone 1	7/7	0
MRT : clone 2	7/7	0
ART : clone 1	7/7	0
ART : clone 2	7/7	0

^{*)} 5×10^6 cells were injected subcutaneously.

フォーム細胞 5×10^6 を生後 3 週目のヌードマウス皮下に移植して、4 週間後の造腫瘍性と 4 週間後の肺転移の有無を観察した (Table 3)。MC3T3-E1 細胞はヌードマウス皮下移植で造腫瘍性は認められなかった。一方、MRT 細胞と ART 細胞はいずれの細胞株においても造腫瘍性が認められた。両者における実験開始 4 週間後の腫瘍のサイズには大きな差は認めなかった。接種後 4 週における肺組織切片中には腫瘍細胞の microembolism や転移のコロニー像は認められなかった。移植腫瘍の細胞像を Fig. 4 に示す。MRT 細胞の腫瘍では、細胞は紡錘形で一定の方向性をもって走行し、核は紡錘形で大小不同があり、肉腫様であった。ART 細胞の腫瘍の組織像は、大形でいびつな核を持った細胞が不規則に配列し、MRT 細胞と異なっていた。核小体も著明なものが多く悪性度の高いことを予想させた。両腫瘍細胞には osteoid 形成像は認められなかった。

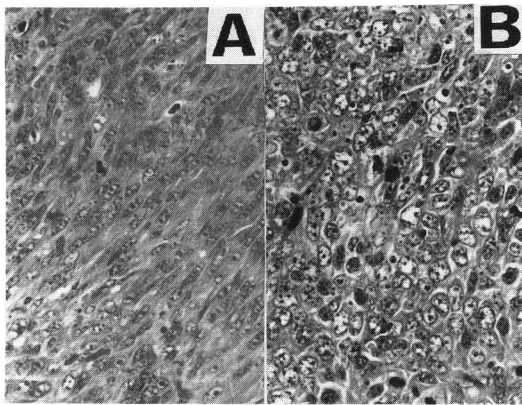


Fig. 4 Tumor tissue formed in the back of the athymic mice (21 days after inoculation).

A : MRT : clone 1

B : ART : clone 1.

Magnification: $\times 400$ (H&E stain)

MRT と ART の両細胞とも clone 間 (clone 1 と 2) での組織像は類似していた。

5) 各トランスフォーム細胞中における導入癌遺伝子 DNA の存在 : Southern blot analysis (Fig. 5) によって、トランスフォーム細胞における、導入した癌遺伝子 DNA の存続の有無を解析した。MRT 細胞 2 株は c-myc プローブにおいて 5.5 kb のサイズに c-myc DNA が検出された。MC3T3-E1 細胞にも内在性の c-myc DNA が検出されるが (Fig. 5, lane 1), トランスフォーム細胞では導入 c-myc DNA の存続によってバンドが濃染している (Fig. 5, lanes 2, 3)。EJras 遺伝子プローブを用いた場合、MC3T3-E1 細胞 DNA 中に EJras DNA が検出されず (Fig. 5, lane 4), 各トランスフォーム細胞の DNA 中に EJras DNA の存在を示す異なった各種のサイズのバンドが検出された (Fig. 5, lanes 5, 6, 7, 8)。Clone 間におけるバンドパターンが異なることから、各トランスフォーム細胞間で、また clone 間においても EJras DNA の組み込み部位は異なるものと考えられる。また、Ad12E1A 遺伝子についても MC3T3-E1 細胞 DNA 中には検出されない (Fig. 5, lane 9)。ART : clone 1 では大小多くのバンドが認められたが、ART : clone 2 では 2 本のバンドが異なる位置に検出されるなど組み込み部位は異なっていた (Fig. 5, lanes 10, 11)。これらの結果により、導入した癌遺伝子 DNA はトランスフォーム細胞の染色体に組み込まれていること、および組み込まれた導入がん遺伝子の量や組み込み状態が各トランスフォーム細胞間で異なっていることが示唆される。

4 考 察

最近、細胞の癌化には少なくとも 2 つ以上の複数のステップが存在し、複数の癌遺伝子機能が関与している (multi-step carcinogenesis, 細胞癌化の多段階説)

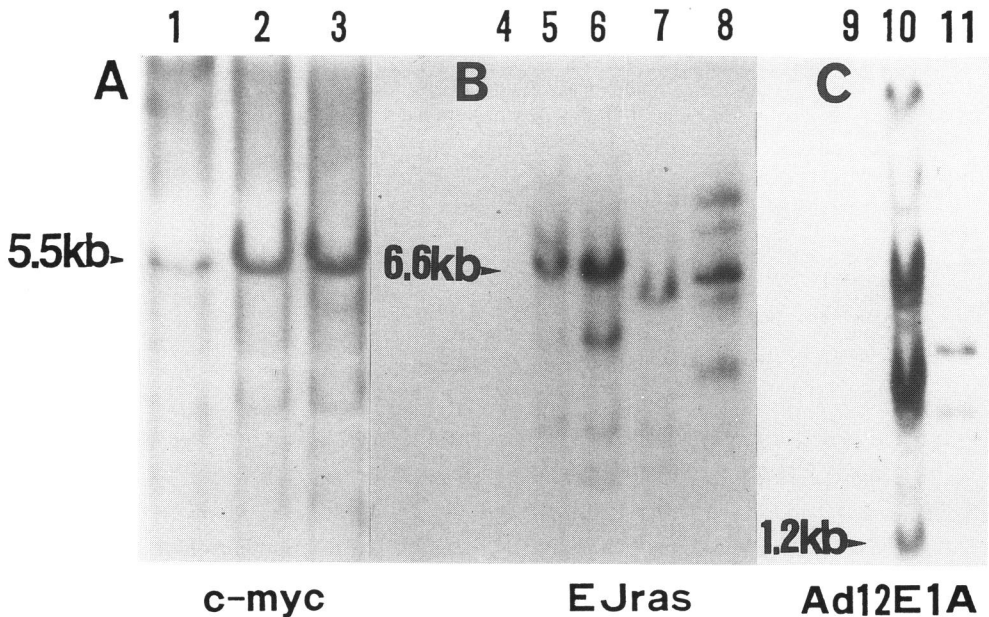


Fig. 5 Southern blot analysis of the transfected gene in each transformant. High molecular weight cellular DNAs (20 μ g) were cleaved with *Bam*HI. Filters were probed with 32 P-labeled DNA containing c-myc (panel A, lanes 1-3), EJras (panel B, lanes 4-8) and Ad12E1A (panel C, lanes 9-11).
 MC3T3-E1 (lanes 1, 4, 9), MRT: clone 1 (lanes 2, 5),
 MRT: clone 2 (lanes 3, 6), ART: clone 1 (lanes 7, 10),
 ART: clone 2 (lanes 8, 11).

と考えられている。Weinberg¹¹⁾やRuley²⁰⁾らによると癌遺伝子には、myc, ポリオーマウイルス大型 T 抗原遺伝子やアデノウイルス E1A など細胞に永久増殖性 (immortalization, 不死化) を与えるものと、ヒト活性型 ras やポリオーマウイルス中型 T 抗原遺伝子など永久増殖能を持つ株化細胞を悪性化するものの 2 つの群が存在する。前者の癌遺伝子産物は主に細胞核に存在し、細胞遺伝子の発現を介して機能することが考えられる。後者の癌遺伝子産物は主として細胞膜などの細胞核以外の場所に存在する。細胞のシグナル伝達系、細胞の骨格や細胞の形態、細胞間の接触阻止の解除との関連が推察されている¹⁸⁾。

本実験に用いた骨芽細胞株 MC3T3-E1 は長期継代が可能な株化細胞であるにもかかわらず⁸⁾, EJras 単独ではトランスフォーメーションが難しく、Ad12E1A や c-myc の共存によって効率良くトランスフォーメーションを誘発した。このことは、MC3T3-E1 細胞が永久増殖性を獲得している株化細胞であっても、NIH3T3 などの線維芽細胞とは異なる性質をもっていることを示唆している。また、少なくとも 2 つ以上の癌遺伝子の機能が、MC3T3-E1 細胞の効率良いトランスフォーメーション

には必要であると考えられる。

本実験で骨芽細胞株 MC3T3-E1 は、c-myc+EJras あるいは Ad12E1A+EJras の組み合わせによって、トランスフォーメーションが誘発された。トランスフォーム細胞は細胞の形態と飽和密度が親株の骨芽細胞とは明らかに異なっており、悪性度の高いことが推定された。このことは、トランスフォーム細胞がヌードマウス皮下において 100% の造腫瘍性を示したことから明らかである。

MC3T3-E1 細胞は、細胞増殖飽和の状態に至った後 osteoblastic phenotype のマーカーとされているアルカリフォスファターゼ活性が上昇し^{8,9)}, 徐々に骨芽細胞として分化機能してくると報告されている。今回分離した MC3T3-E1 細胞のトランスフォーム細胞株 (MRT: clone 1, 2; ART: clone 1, 2) は、やや低いながら親細胞である MC3T3-E1 細胞に近いアルカリフォスファターゼ活性 (MC3T3-E1 細胞の約 70%, ただし MRT: clone 2 は 20%) を示した。Cogliano ら¹⁹⁾ は、chick の骨芽細胞に Fujinami sarcoma virus を感染させることによりトランスフォームさせて、3 週間の培養を継続することによってアルカリフォスファターゼ活

性が上昇したと報告している^{6,9)}。今回使用した、癌遺伝子の *c-myc*, *Ad12E1A*, *EJras* などはその機能や細胞内局在性などの点で Fujinami sarcoma virus の癌遺伝子 (*fps*) と異なる。導入癌遺伝子の種類によりアルカリフォスファターゼ活性の挙動や細胞の悪性度、つまり脱分化の程度が異なる可能性が考えられる。

5 結 語

マウス MC3T3-E1 骨芽細胞に、癌遺伝子 DNA (*c-myc*, *Ad12E1A*, *EJras*) をトランスフェクション法により導入しトランスフォーム細胞を樹立した。分離トランスフォーム細胞と MC3T3-E1 骨芽細胞の性質を比較検討した。

1) トランスフォーム細胞のフォーカスは *c-myc* + *EJras*, *Ad12E1A* + *EJras* の組合せで細胞内に導入した場合に出現した。単独の細胞内導入では認められなかった。

2) 各トランスフォーム細胞株は、MC3T3-E1 細胞に比べて、核/細胞質比は高く、飽和密度の上昇を示した。各トランスフォーム細胞株の DNA 中には導入した癌遺伝子が検出された。

3) 各トランスフォーム細胞株は、ヌードマウス皮下移植で、100%の造腫瘍性を示し肉腫様の組織像を示した。しかし組織像はトランスフォーム細胞株によって異なっていた。

4) トランスフォーム細胞は、MC3T3-E1 細胞に比べて 20~70%のアルカリフォスファターゼ活性を保持していた。

本稿を終えるに当たり、御指導、御校閲をいただいた札幌医科大学癌研分子生物学教室、藤永蕙教授と、同整形外科教室、石井清一教授に深謝いたします。また、細胞を寄与していただいた小玉博明博士（東北歯科大学）、アルカリフォスファターゼ活性測定の御教示をいただいた札幌医科大学癌研病理学、望月洋一教授、古川一典助教授に深甚なる謝意を評します。

(本論文の要旨は第3回日本整形外科基礎学術集會にて発表した。)

文 献

1. Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R., Rapaport, J., Albert, D. and Dryja, T.: A human DNA segment with properties of the gene that predispose to retinoblastoma and osteosarcoma. **Nature** **323**, 643-650 (1986).

2. Hansen, M. F., Koufos, A., Gallie, B., Phillips, R., Fodstad, O., Brogger, A., Gedde-Dahl, T. and Caeneë, W.: Osteoblastoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 6216-6220 (1985).

3. Toguchida, J., Ishizaki, K., Sasaki, S., Ikenage, M., Sugimoto, M., Kutuura, Y. and Yamamuro, T.: Chromosomal reorganization for expression of recessive mutation of retinoblastoma susceptibility gene in the development of osteoblastoma. **Cancer Res.** **48**, 3939-3943 (1988).

4. 浅野 奨, 山下利春: ヒト骨肉腫ヌードマウス移植株における細胞性癌遺伝子 (*c-onc*) の解析. **日整会誌** **62**, 231-242 (1988).

5. Schön, A., Michiels, L., Janowski, M., Merregaert, J. and Erfle, V.: Expression of protooncogenes in murine osteosarcomas. **Int. J. Cancer** **38**, 67-74 (1986).

6. Birek, C.: Neoplastic transformation of osteogenic cells: quantitative morphometric analysis of an *in vitro* model for osteosarcoma. **Carcinogenesis** **9**, 1785-1791 (1988).

7. Henrik, C. F., Preigberg, A., Silfversward, C. and Tribukait, B.: DNA analysis in the differential diagnosis of osteosarcoma. **Cancer** **61**, 1430-1436 (1988).

8. Kodama, H., Sudo, H. and Yamamoto, S.: Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. **Jap. J. Oral Biol.** **23**, 899-901 (1981).

9. Kurihara, N., Ishizuka, S., Kiyoki, M., Hakata, Y., Ikeda, K. and Kumogawa, M.: Effects of 1, 25-dihydroxyvitamine D₃ on osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Endocrinology** **118**, 940-947 (1986).

10. Graham, F. L., Harrison, T. and Williams, J.: Defective transforming capacity of adenovirus type 5 host-range mutants. **Virology** **86**, 10-21 (1977).

11. Land, H., Parada, L. and Weinberg, R.: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. **Nature** **304**, 596-602 (1983).

12. Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lnoir, G., Swan, D., Trnick, S., Aronson, S. and Leder, P.: Translocation of the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**, 7837-7841 (1982).

13. Yamashita, T. and Fujinaga, K.: Establishment of a rat cell line carrying hormone inducible

- human Adenovirus type 12 E1A gene. **Tumor Res.** **22**, 103-115 (1987).
14. Cooper, G. M.: Infectious Rous sarcoma virus and reticuloendotheliosis virus DNAs. **J. Virol.** **14**, 1132-1141 (1974).
 15. Feinberg, A. P. and Vogelstein, D.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.** **132**, 6-13 (1983).
 16. Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **98**, 503-517 (1975).
 17. Bowers, G. and McComb, R. B.: A continuous spectrometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. **Clin. Chem.** **12**, 70-89 (1966).
 18. 藤永 蕙: がん遺伝子の分子生物学, 講談社サイエンスフィック, 講談社 (1987).
 19. Cogliano, A.: In vitro transformation of osteoblasts: putative formation of osteosarcoma *in vitro*. **Bone** **8**, 299-304 (1987).
 20. Ruley, H. E.: Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. **Nature** **304**, 602-606 (1983).
-
- 別刷請求先:
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学付属病院整形外科学教室 齊藤要一