

ヌクレオリン発現と好銀性核小体形成部位の関連性に関する研究 抗ヒトヌクレオリン抗体の作製及びHL60細胞の分化誘導と非ホジキンリンパ腫細胞を用いての検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9237">http://hdl.handle.net/2297/9237</a>

## ヌクレオリン発現と好銀性核小体形成部位の関連性に関する研究

—抗ヒトヌクレオリン抗体の作製および HL60 細胞の分化誘導と  
非ホジキンリンパ腫細胞を用いての検討—

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

岡 部 洋 子

好銀性核小体形成部位 (argyrophilic nucleolar organizer regions, AgNORs) の大きさと数は、リボソーム DNA の転写活性、ひいては細胞増殖能を反映することが知られている。一方、ヌクレオリンは分子量100,000のリン酸化蛋白で、対数増殖期細胞の核小体蛋白の中で最も豊富に存在する蛋白であり、さらに AgNORs 染色法で染色される核小体形成部位 (nucleolar organizer regions, NORs) 関連蛋白の大部分を占める核小体蛋白である。そこで、本研究では、複数の蛋白の変化によりその大きさや数が増えたと考えられる AgNORs と同時に、単一の蛋白であるヌクレオリンの発現の有無を観察し、両者を比較することにより、細胞の増殖能をより詳細にとらえられないか検討を行った。まずヌクレオリンの観察のために新たに抗ヌクレオリンポリクローナル抗体を作製した。抗ヌクレオリン抗体は、大腸菌に発現させたヌクレオリン分子のカルボキシル末端の分子量24,000のペプチドを抗原とし、日本白色在来種ウサギに免疫して作製した。ジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) で HL60 細胞を処理し、細胞の分化にともなうヌクレオリンの発現の変化を観察するために、本抗体を用いてウェスタンブロット法と免疫組織化学的染色により検討した。また、臨床的検討として非ホジキンリンパ腫患者リンパ節細胞における、核内の AgNORs 数とヌクレオリン陽性細胞百分率を比較検討した。DMSO で処理した HL60 細胞は成熟顆粒球まで分化した。ウェスタンブロット法では、DMSO で未処理の HL60 細胞では分子量100,000付近にヌクレオリンの発現を認めたが、処理した細胞ではみられなかった。免疫組織化学的染色では、未処理の HL60 細胞では核内に塊状に陽性となったが、処理した細胞では小さな点として染色された。さらに、20例の非ホジキンリンパ腫患者のリンパ節細胞のヌクレオリン陽性細胞の百分率と AgNORs の数についての比較を行ったところ、この両者間に相関関係 ( $r=0.40$ ,  $p=0.07$ ) を認めた。また、AgNORs 数とヌクレオリン陽性細胞率のそれぞれの平均値 (AgNORs, 2.83; ヌクレオリン, 27.7%) で4つのグループに分けると、AgNORs 数とヌクレオリン陽性率がともに高値で最も増殖活性が高いと考えられるグループと、AgNORs 数とヌクレオリン陽性率がともに低値で最も増殖活性が低いと考えられるグループで、予後が良い傾向が認められた。これらの結果より、ヌクレオリンは分化によりその発現は減少し、AgNORs と同様に非ホジキンリンパ腫において、その増殖能を反映するよい指標であると考えられた。

---

**Key words** nucleolin, argyrophilic nucleolar organizer regions, non-Hodgkin's lymphoma

---

核小体形成部位 (nucleolar organizer regions, NORs) は、リボソーム RNA 遺伝子をコードする一連の DNA 配列である。いくつかの非ヒストンリン酸化蛋白がこの部位に結合することが知られているが、それらの蛋白が好銀性を有していることより、Goodpasture ら<sup>1)</sup>により開発され、さらに Howell ら<sup>2)</sup>により改良された銀染色法を用いて容易に観察できるようになり、好銀性核小体形成部位 (argyrophilic NORs, AgNORs) と称されている。これらの好銀性の非ヒストンリン酸化蛋白は NORs 関連蛋白と総称されるが、ヌマトリン (B23 蛋白) やヌクレオリン (C23 蛋白)、RNA ポリメラーゼ I および他の未知の蛋白により構成されている<sup>3)~8)</sup>。NORs はヒトでは13, 14, 15, 21および22

番の染色体の中心先端部に位置しており、活性化されたリボソーム RNA 遺伝子のみがこの銀染色で陽性となる<sup>9)~11)</sup>。このように AgNORs の大きさや数はリボソーム DNA の転写活性や、細胞増殖あるいは蛋白合成能を反映すると考えられている。様々な細胞生物学的、臨床医学的研究において、AgNORs が細胞の活動性の鋭敏な指標となることが次第に明らかになってきた<sup>12)~15)</sup>。さらに、非ホジキンリンパ腫 (Non-Hodgkin's lymphoma, NHL) での、低悪性度群よりも高悪性度群で核内の AgNORs の点 (dot) の数が多かったとの報告<sup>16)</sup>をはじめとして、様々な悪性腫瘍について良、悪性の判定のみならず、悪性度を推定する上での AgNORs 染色の有用性が検討さ

---

平成 8 年 9 月 19 日 受付, 平成 8 年 10 月 9 日 受理

Abbreviations: APAAP, alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase; AgNORs, argyrophilic nucleolar organizer regions; BSA, bovine serum albumin; DMSO, dimethyl sulfoxide; *E. coli*, *Escherichia coli*; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; NORs, nucleolar organizer regions; RT-PCR, reverse transcriptase PCR; TBS, Tris-buffered saline

れてきている。

ヌクレオリンは分子量100,000のリン酸化蛋白で、対数増殖期細胞の核小体中に最も豊富に存在する NORs 関連蛋白の一つである。ヌクレオリンの生物活性は完全には解明されていないが、細胞質と核の間を往復し、物質の輸送あるいは情報を伝達するシャトル蛋白の一つとして知られている<sup>17)</sup>。さらに、ヌクレオリンは特異的な蛋白分解を経て活性化され、また、リボソーム DNA の非転写スパーサーや核小体内の合成されて間もないリボソーム RNA に結合するという報告もある<sup>18)~20)</sup>。ヌクレオリンの細胞内の局在はさまざまな動物種の培養細胞で免疫蛍光法を用いて検討されているが<sup>21)</sup>、腫瘍組織と正常組織におけるヌクレオリンの発現の違いについての研究は未だなされていない。

AgNORs は複数の NORs 関連蛋白が好銀性を示すために染色されるもので、言い換えれば、複数の蛋白により影響を受けている。したがって、その数や大きさは複数の蛋白の変化に応じて変わるものであり、必ずしも一つの決まった変化を示しているものではない。本研究では、AgNORs とヌクレオリン発現を比較することにより、複数の要因によって左右される AgNORs の変化をより正確に解析でき、ひいては細胞の増殖能を推定することが可能ではないかと考え、新たに抗ヌクレオリン抗体を作製し検討した。先ず作製した抗ヌクレオリン抗体が正しくヌクレオリンの発現を反映しているのか否かを検証するとともに、AgNORs と相関を有しているのか否かを知るために、培養細胞を用いて基礎的に検討した。さらに、NHL 患者リンパ節細胞を用いて AgNORs とヌクレオリンの関係を臨床的に検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 抗体の作製

ウサギ抗ヒトヌクレオリンポリクローナル抗体は下記の方法で作製した。ヒト白血病細胞の培養細胞である HL60 細胞より、チオシアン酸グアニジン法<sup>22)</sup>で調製した RNA とヒトヌクレオリン cDNA のエピトープ部分<sup>23)</sup>を含む 3'側の617塩基対をばさむプライマーを使用し(図1)、逆転写-ポリメラーゼ連鎖

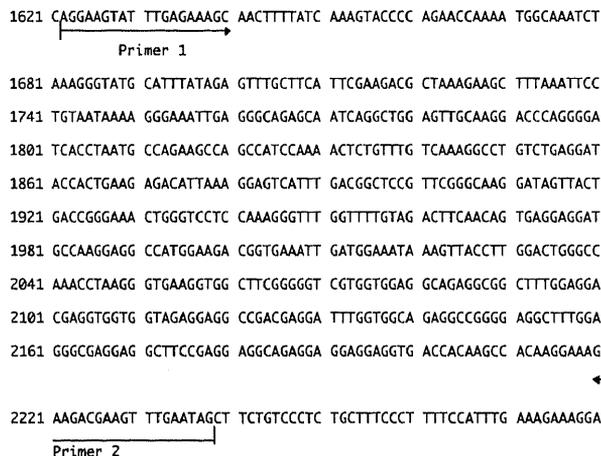


Fig. 1. Oligonucleotide primers for PCR amplification and their location in the human nucleolin cDNA. Arrows indicate their locations and directions of DNA synthesis from the 5' to 3' end.

反応 (reverse transcriptase PCR, RT-PCR) でヒトヌクレオリン cDNA の 3'側の617塩基対のオリゴヌクレオチドを得、さらに PCR で増幅した。さらに、このオリゴヌクレオチドを十分量得るために、pTZ19R [金沢大学薬学部生物薬品化学教室安田秀世元助教授より供与された] に挿入し増幅したのち、pET-3c ベクター [金沢大学薬学部生物薬品化学教室安田秀世元助教授より供与された] の *Bam*H1 (ニッポンジーン、富山) 切断点に挿入し、さらに大腸菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) の BL21 (DE3) 株 [金沢大学薬学部生物薬品化学教室安田秀世元助教授より供与された] に形質導入した(図2)。形質導入されたオリゴヌクレオチドが本当にヌクレオリンの 3'側の617塩基対であるかは、Sanger らによって開発されたダイデオキシ法<sup>24)</sup>による DNA シークエンスを行って確認した。cDNA は、あらかじめ pTZ19R 中で増幅したものを用い、T7DNA ポリメラーゼ (Sequenase Ver 2.0, United State Biochemical Corporation, Cleveland, USA) を使用した。シークエンスゲルは 6% のポリアクリルアミド/尿素ゲル (アクリルアミド/N, N'-メチレンビスアクリルアミド, 19:1) を使用した。ヌクレオリンの617塩基対の cDNA が挿入されたベクター pET3c1 を導入した *E. coli* BL21 (DE3) 株に、目的の蛋白を大量に発現させ

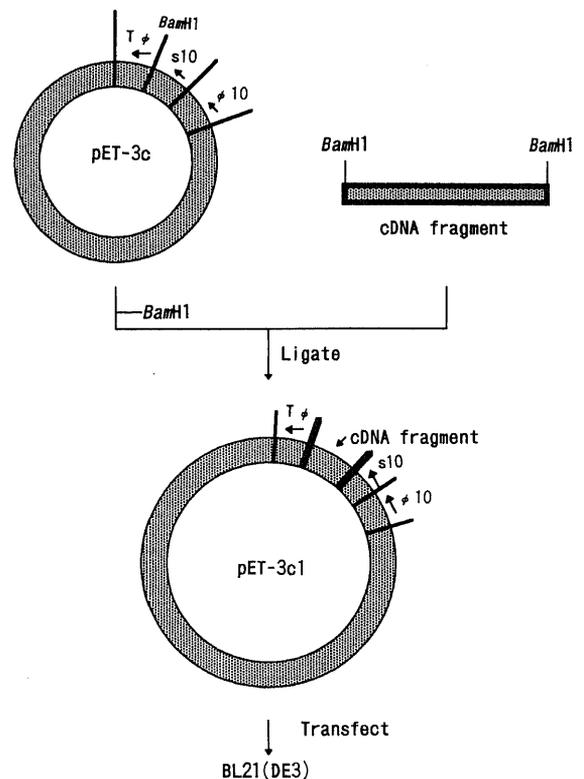


Fig. 2. Cloning of the cDNA fragment that codes for the epitope-containing region of nucleolin. Translation vector pET-3c contains the T7 promoter ( $\phi 10$ ), the gene 10 translation start (s10), and transcription terminator ( $T\phi$ ) which are inserted in the *Bam*H1 site of pBR322. A 617 base pair 3'-*Bam*H1 fragment of nucleolin cDNA from human leukemia cell line HL60 nucleolin coding for the epitope-containing region is subcloned at the *Bam*H1 site of the pET-3c vector. The resulting pET-3c1 clone is used to transfect *Escherichia coli* (*E. coli*) strain BL21 (DE3). All cloning methods are done according to the method of Maniatis et al.<sup>25)</sup>

るために、50 $\mu$ g/ml のアンピシリンを加えた LB 培地 [トリプトン (Difco laboratories, Detroit, USA) 10g/l, 酵母エキス (Difco laboratories) 5g/l, NaCl 10g/l] 中で37 $^{\circ}$ C で培養した。600nm における吸光度 (OD600) で 0.5–0.7 に達した時点で 1mM イソプロピルチオ- $\beta$ -D-ガラクトシッドを加えて蛋白合成を誘導し、さらに3時間培養を継続した。その後、*E. coli* を遠心分離し、溶解緩衝液<sup>25)</sup>で溶解した。*E. coli* の菌体内で合成された蛋白は封入体となっており不溶性であるために、遠心分離後 2M 尿素で可溶性にし<sup>26)</sup>さらに 0.2M Tris-HCl (pH8.2)/0.5M NaCl の緩衝液で、透析膜を用いて、尿素的濃度と透析時間をそれぞれ 6M で2時間、3M で16時間、さらに 1.5M で3時間と変えて、順に透析した。精製された蛋白はヌクレオリンのカルボキシル末端の分子量24,000のペプチドである。800 $\mu$ l の精製蛋白溶液と同量の完全フロイドアジュバント (complete Freund's adjuvant) (Difco Laboratories) を混合し、体重 2.5kg のオスの日本白色在来種ウサギ (北陸実験動物, 金沢) 4匹の背部に、第1日目と第15日目に一匹につき 400 $\mu$ l ずつ皮下注射した。その14日後に、抗原を接種したウサギの耳介部の静脈より注射針を用いて採血した。さらに *E. coli* で合成された蛋白溶液を 50mM Tris-HCl (pH7.4)/6M 尿素/10mM  $\beta$ -メルカプトエタノール/0.01% Brij 35/0.5M NaCl の緩衝液で満たしたモノ S (Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) カラムクロマトグラフィーにより精製した蛋白溶液を、同量の非完全フロイドアジュバント (Freund's incomplete adjuvant) (Difco Laboratories) に混合し、補助追加免疫として2回目の抗原接種より35日後に、一匹につき 300 $\mu$ l ずつ皮下注射した。その7日後より採血を開始し、血清分離後に最終濃度が 0.01% となるようにアジ化ナトリウムを加え保存した。このようにして得た血清について、*E. coli* が発現した蛋白をカラムクロマトグラフィーにより精製しウサギを免疫するのに使用した蛋白溶液を 12.5% ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、ウサギより得

られた血清を一次抗体とし下記の要領でウエスタンブロットを行い <sup>125</sup>I-プロテインA (アマシャムジャパン, 東京) を用いてオートラジオグラフィーを行った (図3)。

## II. HL60 細胞の分化誘導およびヌクレオリンの発現と AgNORs 染色

### 1. HL60 細胞の分化誘導と核蛋白分離

HL60 細胞と 100IU/ml のペニシリン (Gibco BRL Laboratories, Grand Island, USA), 100 $\mu$ g/ml のストレプトマイシン (Gibco BRL Laboratories) を加えた、10% ウシ胎仔血清 (Gibco BRL Laboratories) 入の RPMI1640 培養液 (Gibco BRL Laboratories) 中で 5%CO<sub>2</sub> 下、37 $^{\circ}$ C で 1.25% (V/V) のジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (和光純薬, 大阪) の存在下と非存在下 (コントロール) で72時間培養し、分化を誘導した。次に培養液を1500回転/分で10分間遠心し、細胞を分離し、RPMI1640 培養液で細胞数を  $1 \times 10^7$  に調節した。細胞核を分離するために、HL60 細胞の細胞数を調節した培養液に 10mM Tris-HCl (pH7.4)/3mM MgCl<sub>2</sub>/1mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (Sigma Chemical Co., St. Louise, USA) の溶液を加え、4 $^{\circ}$ C で10分間細胞を溶解させ、さらに 10% のノニデット P40 (Sigma Chemical Co.) を最終濃度が 0.1% となるように加え、完全に溶解させた。混合液を1500回転/分で10分間遠心し、上清を捨て、沈殿物をその10倍量の 10mM Tris-HCl (pH7.4)/3mM MgCl<sub>2</sub>(緩衝液A) で溶解した。次に1500回転/分で10分間遠心し、沈殿物の10倍量の緩衝液Aで溶解したのち、溶液を超音波で60秒間、3回処理した。これに 0.0625M-Tris-HCl (pH6.8), 2%SDS, 10%グリセロール, 5% $\beta$ -メルカプトエタノールに染色用として 0.001% プロモフェノールブルーを加えた Laemmli 緩衝液を加え、100 $^{\circ}$ C で90秒間煮沸した。

### 2. 抗ヒトヌクレオリン抗体によるウエスタンブロット法

上記の試料を Laemmli の方法<sup>27)</sup>に従い 0.1%SDS 加 7.5% ポリアクリルアミドゲルにのせ、40mA で90分間電気泳動し、次に 100mA の一定電流下、20V で45分間、Immobilon PVDF 転写膜 (Millipore, Bedford, USA) へ転写した。蛋白が転写された膜を 5% のスキムミルクを含む 0.02M のトリス緩衝液 (Tris buffered saline, TBS) (pH 7.4) でブロックし、5% スキムミルク加 0.02M TBS (pH 7.4) で100倍に希釈したウサギ抗ヒトヌクレオリン抗体と室温で一晩反応させた。過剰な抗体は 1% スキムミルク加 0.02M TBS (pH 7.4) で5分間の洗浄を3回行うことで除去した。抗体の結合した膜を、ホースラディッシュペルオキシダーゼの結合したヤギ抗ウサギ IgG (Bio-Rad Lab., Richmond, USA) と室温で2時間反応させた。発色は 4-クロロ-1ナフトールと過酸化水素で行う発色キット (Bio-Rad Lab.) で行った。さらに、他の核蛋白の変化も観察するために、上記の方法で電気泳動したポリアクリルアミドゲルをクマシーブリリアントブルー-R250 (半井, 京都) で染色した。泳動させた蛋白の分子量は高分子量標準マーカー (Bio-Rad Lab.) と比較した。

### 3. AgNORs 染色およびヌクレオリンの免疫組織化学的染色

上記のウエスタンブロット法に使用したものと同一 DMSO 処理、未処理のそれぞれの細胞について、サイトスピン標本を3組作製した。1組目は DMSO による HL60 細胞の成熟顆粒球への分化を形態学的に確認するために、型の如くギムザ染色

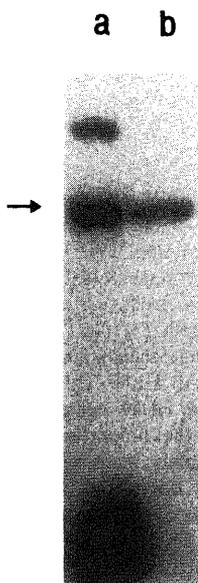


Fig. 3. Western blot analysis of the proteins produced by *E. coli* harbouring pET-3c1 (lane a) and nuclear protein of HL60 cells (lane b). The arrow shows nucleolin. The other positive bands are due to non-specific reaction.

を行った。2組目の標本は4℃の緩衝アセトンホルマリン液で30秒間固定したのち次の要領で AgNORs 染色を行った。AgNORs 染色液は、Howell らにより提唱された1段階法<sup>2)</sup>に従って調製した。1%ギ酸、2%ゼラチン水溶液および50%硝酸銀水溶液(それぞれ脱イオン水を用いて調製)を作製し、使用直前に前者1、後者2の割合で混ぜて染色液とした。標本を室温で30分間染色液に浸し、その後脱イオン水で洗浄し、キシレンで脱水したのち、マリノール(武藤化学、東京)で封入した。対染色は行わなかった。3組目の標本は-20℃の冷アセトンで20分間固定したのち、0.1%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA)加0.05M TBS (pH7.6) (0.1% BSA-TBS)に標本を5分間浸し、0.1% BSA-TBS で50倍に希釈したウサギ抗ヒトヌクレオリン抗体を一次抗体として、アルカリフォスファターゼ抗アルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase, APAAP)法<sup>20)</sup>で以下のように染色した。一次抗体を室温で1時間反応させた後、0.05M TBS で3回洗浄した。次に0.1% BSA-TBS に5分間浸し、さらに0.1% BSA-TBS で50倍に希釈したマウス抗ウサギ抗体(ダコジャパン、京都)を30分間反応させた後に、0.05M TBS で3回洗浄し、0.1% BSA-TBS で50倍に希釈したウサギ抗マウス抗体(ダコジャパン)をのせて30分反応させた。同様に洗浄後、0.1% BSA-TBS で10倍に希釈した APAAP マウス抗体複合体と、1時間反応させた。発色にはナフトール AS-MX リン酸(Sigma Chemical Co.)とファーストレッド TR 塩(Sigma Chemical Co.)を用いた。対染色はヘマトキシリン染色で行った。封入にはグリセロールゼラチン(Sigma Chemical Co.)を使用した。観察は油浸系対物レンズ100倍を用いて行った。

### Ⅲ. NHL リンパ節の抗ヌクレオリン抗体による免疫組織化学的染色と AgNORs 染色

#### 1. 対象患者

1985年1月から1992年1月までの間に金沢大学でリンパ節生検により NHL と診断され、かつ十分量の凍結組織が保存されていた20例の未治療 NHL 患者(女性例13, 男性7例)からのリンパ節組織につき検討を行った。確定診断時の患者の年齢は24才から75才までで、中央値は65才であった。病理診断は HE 染色標本によりワーキングフォーミュレーション(Working Formulation)の分類<sup>20)</sup>に基づいてなされた。なお、臨床病期は Ann Arbor の分類<sup>30)</sup>に従った。

#### 2. AgNORs 染色とその観察方法

病理診断に使用したものと同一生検検体の一部分を、凍結切片用として速やかに凍結し、-70℃で保存した。凍結切片は5μmの厚さで作製し、4℃の緩衝アセトンホルマリン溶液で30秒間固定し、前述の方法で AgNORs 染色を行った。HE 染色で腫瘍細胞を確認したのち、AgNORs 染色標本では200個のリンパ腫細胞について、油浸系対物レンズ100倍を用いて順に観察した。AgNORs の点の算定については、Crocker らの提唱したように<sup>31)</sup>、核小体の内外の両者について点の数を算定し、一つの核当たりの平均の AgNORs の数を計算した。

#### 3. 抗ヌクレオリン抗体を用いた免疫組織化学的染色とその観察方法

同じ標本より作製した凍結切片を-20℃の冷アセトンで20分間固定し、抗ヌクレオリン抗体を用いて前述の APAAP 法により、免疫組織学的染色を行った。抗ヌクレオリン抗体染色標本については、HE 染色で腫瘍細胞を確認した後、500個のリン

パ腫細胞について油浸系対物レンズ100倍を用いて、順に観察した。抗ヌクレオリン抗体染色標本では、核内が赤色に染まる細胞全てを陽性とし、500個の細胞における陽性率を算定した。

### Ⅳ. 統計学的処理

1個の核当たりの平均の AgNORs 数とヌクレオリン陽性率を各々の症例について比較し、その相関関係をピアソンの相関係数を用いて求めた。また相関係数の有意性についてはフィッシャーの  $r$  の  $z$  変換を用いて検定した。

## 成 績

### 1. HL60 細胞の分化ともなうヌクレオリンの発現の変化および AgNORs の変化

#### 1. HL60 細胞の分化

DMSO を加えて72時間培養した HL60 細胞は成熟顆粒球に分化し、このために後骨髄球や桿状核球の割合が増加した。一方、DMSO を添加せずに72時間培養した細胞では、芽球様の細胞形態を呈し、明瞭な核小体が1ないし2個認められた(図4-A, D)。

#### 2. ヌクレオリン発現の変化

DMSO により分化の誘導された HL60 細胞では、ヌクレオリンは図4-B に示すように桿状核球内に小さな点として認めら

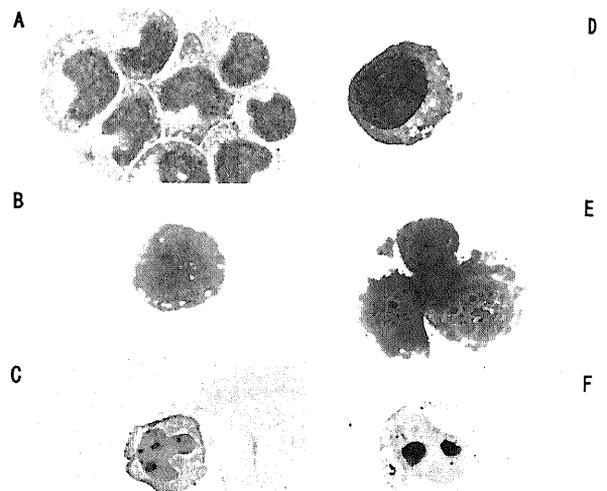


Fig. 4. AgNORs staining and anti-nucleolin staining of DMSO-treated and untreated HL60 cells. (A) Giemsa staining, (B) anti-nucleolin staining, (C) AgNORs staining of DMSO-treated cells ( $\times 1000$  magnification). (D) Giemsa staining, (E) anti-nucleolin staining, (F) AgNORs staining of DMSO-untreated HL60 cells ( $\times 1000$  magnification). The DMSO-treated HL60 cells differentiate into mature granulocytes, and the proportions of metamyelocytes and band form neutrophils increase. Nucleolin expression is observed as small dots, mostly in nucleus, with a few small dots being observed in the cytoplasm. AgNORs is observed as small brownish dots in the nucleus. DMSO-untreated HL60 cells show a blast-like feature. Coarse staining in their nuclei and sometimes homogeneous staining in their cytoplasm with anti-nucleolin antibody are observed. The AgNORs of the untreated HL60 cells are observed as several small brownish dots in large nucleolus.

れ、ほとんどが核内に認められた。DMSO を添加せずに培養した HL60 細胞では、72時間後も大型で円形の核を有し、ヌクレオリンは核小体に一致して粗い塊状の点として認められた (図 4-E)。さらに核小体に一致しない小さな点も認められた。蛋白電気泳動では、最下部に最も多い核蛋白である H1 ヒストンのバンドが濃く認められた (図 5-A)。ウエスタンブロット法では、DMSO を加えないで72時間培養した HL60 細胞では、ヌクレオリンが検出されたが、一方 DMSO を加えて72時間培養したもものでは検出されなかった (図 5-B)。

3. AgNORs の変化

分化した HL60 細胞では、AgNORs は核内の小さな茶褐色の点として認められた。一方、DMSO を加えずに培養した細胞では、AgNORs は大きな核小体内に、多数の小さな点として観察された (図 4-C, F)。

II. NHL 患者リンパ節細胞の分析

1. ヌクレオリンの発現

図 6 に示すように、ヌクレオリンの発現は核と細胞質の両者に認められた。ヌクレオリン陽性細胞の百分率の平均値とその標準偏差は  $27.7 \pm 22.5\%$  であった (表 1)。症例数が少ないために、各組織型間のヌクレオリン陽性率の差については統計学的

比較はできなかったが、びまん性大細胞型の NHL で陽性率が高く、びまん性小型くびれ細胞型の NHL で陽性率が低い傾向にあった。

2. AgNORs

AgNORs は茶褐色の点として明瞭に認められた。多くは小さな点を核小体内に認め、時に核小体そのものに相当する大きさの点あるいは塊として認められた。20例全例の一個の核当た

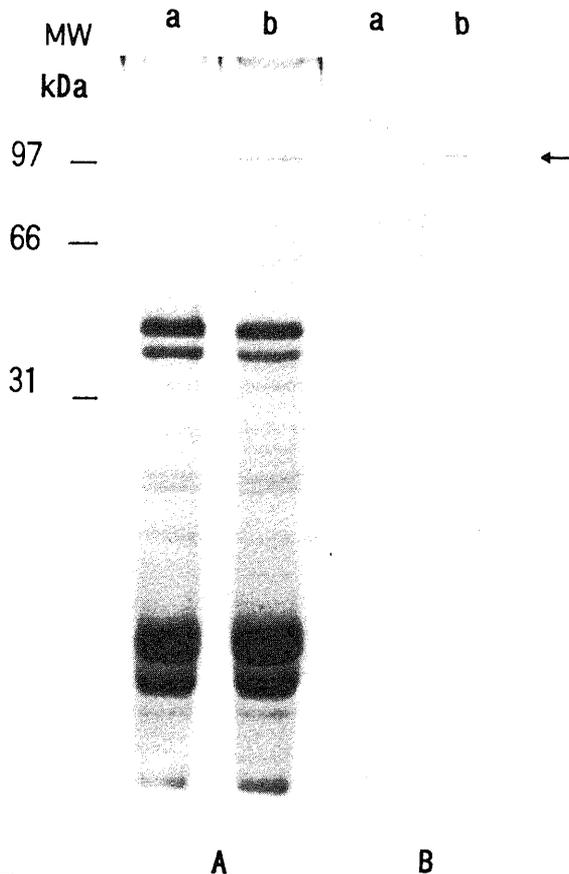


Fig. 5. Nucleolin expression of DMSO-treated and untreated HL60 cells. (A) Nuclear protein of HL60 cells electrophoresed on 7.5% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue R250. H1 histone band is observed at the bottom. (B) Western blot analysis for detecting nucleolin expression in DMSO-treated (lane a) and untreated (lane b) HL60 cells. The arrow shows nucleolin band. The nucleolin band is invisible on lane a.

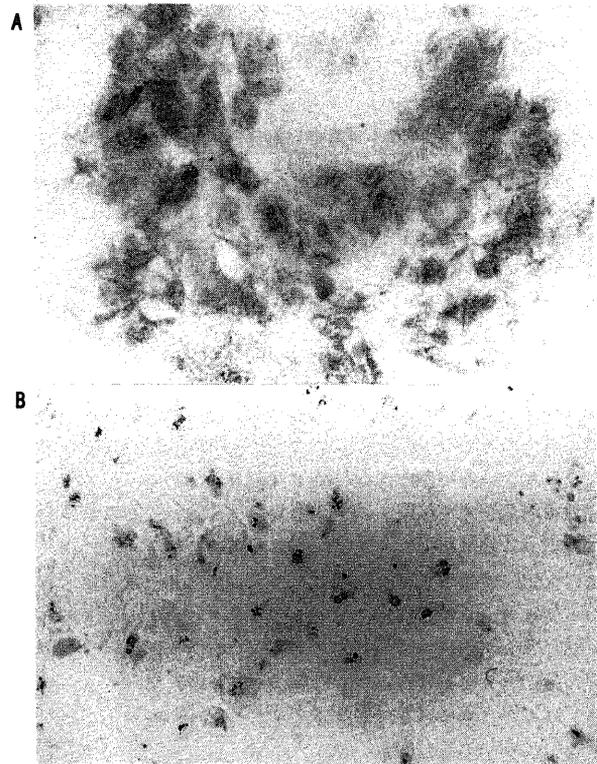
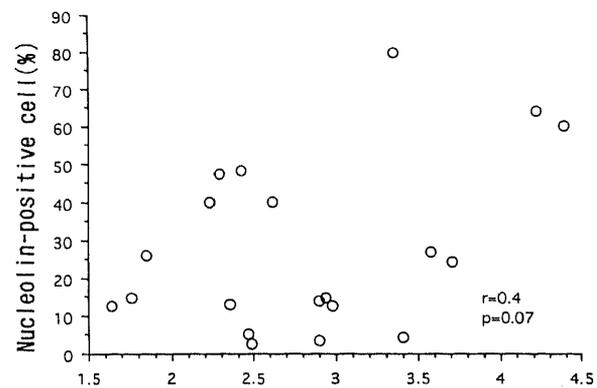


Fig. 6. Immunohistochemical detection of nucleolin (A) and AgNORs staining (B) in the NHL patient No.11. AgNORs are observed clearly as brownish dots. Many small dots are found within the nucleoli, and sometimes large dots corresponding to an entire nucleolus are observed. Nucleolin expression is observed both in the nucleus and the cytoplasm.



The mean number of AgNORs per nucleus  
Fig. 7. A scattered plot of the percentage of nucleolin-positive cell versus the mean number of AgNORs per nucleus in 20 cases of NHL. A linear correlation between these two factors is seen.

りの平均 AgNORs 数の平均値とその標準偏差は  $2.83 \pm 0.77$  であった (表 1). AgNORs 数の大小の傾向については、ヌクレオリンと同様であるが、20例の組織型ではワーキングフォーミュレーション分類の中悪性度群が多かったため顕著な差は認めなかった。

### 3. ヌクレオリン陽性率と AgNORs の数の比較検討

AgNORs の数の平均値とヌクレオリン陽性率には直線の正の相関関係を認めたが、統計学的有意性はなかった (図 7). さらに、AgNORs の数の平均値とヌクレオリンの陽性率の各々の平均値 (AgNORs, 2.83; ヌクレオリン, 27.7%) で各グループ

を分けて検討した (表 2). 第 1 のグループは AgNORs の数の平均値が平均値より低値でかつヌクレオリン陽性率も平均値より低い群 (6 例) で、死亡例が 1 例あり、その組織型はびまん性大細胞型であった。第 2 のグループは AgNORs の数の平均値が平均値より高値でヌクレオリン陽性率が平均値より低い群 (7 例) で無病生存例が 2 例であった。第 3 のグループは AgNORs の数の平均値が平均値より低値でヌクレオリン陽性率が平均値より高値の群 (4 例) で、無病生存例が 2 例、死亡例が 2 例であった。第 4 のグループは AgNORs の数の平均値もヌクレオリン陽性率もともに平均値より高値の群 (3 例) で、全

Table 1. Patient characteristics

Pt. No.	Sex	Age (Years)	AgNORs <sup>a)</sup>	Nucleolin (%) <sup>b)</sup>	Histology	CS
1	F	59	3.36	79.4	DL	IV
2	F	56	4.23	63.8	DL	III
3	M	64	4.40	59.8	DL	III
4	M	72	2.43	48.2	DM	IV
5	F	71	2.30	47.2	DL	IV
6	F	75	2.62	40.2	DSC	II
7	F	43	2.24	39.8	Unclassified	I
8	F	65	3.58	27.0	DL	IV
9	F	69	1.85	26.2	DL	IV
10	F	54	3.71	24.2	DSC	IV
11	M	64	1.76	14.6	DL	II
12	F	70	2.94	14.6	DL	IV
13	M	16	2.90	14.0	DL	IV
14	M	60	2.36	13.2	FM	II
15	F	72	2.98	12.8	DSC	IV
16	M	67	1.64	12.8	Unclassified	III
17	F	69	2.47	5.2	DSC	IV
18	F	71	3.41	4.4	DM	IV
19	M	61	2.90	3.6	DL	IV
20	F	24	2.49	2.4	DSC	IV

Pt. No., patient number; F, female; M, male; CS, clinical stage; DL, diffuse large cell; DM, diffuse mixed cell; DSC, diffuse small cleaved cell; FM, follicular mixed cell.

<sup>a)</sup> The mean numbers of AgNORs per nucleus.

<sup>b)</sup> The percentages of nucleolin-positive cells.

Table 2. Patient characteristics divided by the mean values of the mean numbers of AgNORs and the percentages of nucleolin-positive cell (%)

Rate (%) of nucleolin-positive cells	AgNORs < 2.83				AgNORs $\geq$ 2.83			
	Pt. No.	Histology	CS	Outcome	Pt. No.	Histology	CS	Outcome
< 27.7	9	DL	IV	Alive	8	DL	IV	Alive
	11	DL	II	Dead	10	DSC	IV	Dead
	14	FM	II	Alive	12	DL	IV	Dead
	16	Unclass.	III	Alive	13	DL	IV	Dead
	17	DSC	IV	Alive	15	DSC	IV	Dead
	20	DSC	IV	Alive	18	DM	IV	Alive
$\geq$ 27.7					19	DL	IV	Dead
	4	DM	IV	Dead	1	DL	IV	Alive
	5	DL	IV	Dead	2	DL	III	Alive
	6	DSC	II	Alive	3	DL	III	Alive
	7	Unclass.	I	Alive				

Pt. No., patient number; CS, clinical stage; DL, diffuse large cell; DM, diffuse mixed cell; DSC, diffuse small cleaved cell; FM, follicular mixed cell; Unclass., unclassified.

例が無病生存例であった。

## 考 察

AgNORs 蛋白は、活動性のリボソーム RNA 遺伝子に関与しており、その局在と量は細胞回転と深く関係している<sup>14,32)</sup>。したがって、AgNORs 蛋白の状態を把握することは、細胞の生物学的活性を推定する上できわめて有用である。AgNORs の主な構成蛋白としては、蛋白電気泳動ゲルの AgNORs 染色で検出されたバンドの分子量より、ヌクレオリン (C23 蛋白, 分子量 100,000) とヌマトリン (B23 蛋白, 分子量 37,000) が考えられている<sup>3)</sup>。これまで NHL をはじめ、乳癌<sup>33)</sup>、神経芽細胞腫<sup>34)</sup>、急性リンパ性白血病<sup>35)</sup>、多発性骨髄腫<sup>36)</sup> などの様々な悪性腫瘍で AgNORs の検討がなされており、正常細胞と腫瘍細胞とを比較すると、腫瘍細胞において明らかに AgNORs の数が増加し、核に占める面積も大きいことが報告されている。また、Ki67 などの増殖期にある細胞のマーカーの陽性率とも良く相関することが報告されている<sup>33)</sup>。このように、AgNORs に関する臨床的研究は数多くなされているが、その重要な構成要素であるヌクレオリンに関する臨床的検討は未だなされていない。そこで、本研究では AgNORs とヌクレオリンとの関係を HL60 細胞を用いて基礎的に検討するとともに、臨床的には NHL リンパ節細胞を用いて検討した。

ヌクレオリンの発現量を半定量的に知るために先ずウサギ抗ヒトヌクレオリンポリクローナル抗体を作製した。基礎的な検討の結果、本研究で作製した抗体が間違いなく抗ヌクレオリン抗体であることが確かめられた。そこで、AgNORs とヌクレオリンが相関するか否かを検討するために HL60 細胞の分化誘導時の両者の変化を観察した。その結果、分化した HL60 細胞のヌクレオリンの発現が減少することが明らかとなり、この成績は HL60 細胞を DMSO 添加培養することにより AgNORs の大きさや数が減少したとする Reeves ら<sup>37)</sup> の成績を裏付けるものといえる。またこれらの成績は、HL60 細胞の分化成熟にもなってリボソーム RNA 遺伝子の活動性が低下することを示唆している。ヌクレオリンは分裂期の cdc2 キナーゼの基質であり、増殖期にある細胞より分離された場合にはリン酸化の程度は高いと考えられている<sup>38)</sup>。cdc2 キナーゼは、細胞が G2 期から M 期に移行する際に必須な酵素で、細胞回転を制御している重要な酵素の一つである。ヌクレオリン以外の cdc2 キナーゼの基質としては RB 蛋白<sup>39)</sup>、p53<sup>40)</sup>、チロシンキナーゼ (c-src<sup>41)</sup>) 等が知られており、いずれも発がんとの係わりでよく検討されている。Roussel ら<sup>7)</sup> は、カゼインキナーゼ II によりリン酸化されたヌクレオリンと、カゼインキナーゼ II と cdc2 キナーゼの両者によりリン酸化されたヌクレオリン、および脱リン酸化されたヌクレオリンの間には AgNORs の染色パターンに違いがなく、AgNORs の染色性はヌクレオリン分子のアミノ末端の繰り返し配列部分にあり、この部分が自己分解活性により分解されると染色性がなくなると報告した。さらに Fang ら<sup>42)</sup> はヌクレオリンの最初の分解はアミノ末端の繰り返し配列の部分で起こることを示唆した。本研究でウサギ抗ヒトヌクレオリンポリクローナル抗体を作製するのに使用した蛋白は、ヌクレオリンのカルボキシル末端部分の分子量 24,000 のペプチドである。したがって、本抗体は分解されたヌクレオリンを認識できない AgNORs 染色とは異なり、アミノ末端の分解したヌクレオリンと未分解のヌクレオリンの両者を認識することがで

き、本抗体を用いることによりより正確に細胞の活動性を知られる可能性が示唆される。

AgNORs とヌクレオリンとの関連性を臨床例で検討するために、NHL のリンパ節細胞における一個の核当たりの AgNORs の数とヌクレオリン陽性細胞の百分率とを比較した。その結果、両者間には正の相関がみられたが、統計学的に有意ではなかった。これは、ヌクレオリンがきわめて不安定な蛋白であり、免疫組織染色標本を作製する過程でプロテアーゼの影響により変性したか、あるいはアミノ末端の分解を受けたヌクレオリンでは、抗ヌクレオリン染色の陽性率が高いが、AgNORs の数は低値となるためではないかと推定される。

本研究で得られた AgNORs とヌクレオリンの関係より、ヌクレオリンは NHL の増殖活性を良く反映することが明らかとなった。また、NHL においては AgNORs とヌクレオリンの染色性により、リンパ腫細胞の増殖活性の型を次の 4 つに分けることができると考えられる。第 1 型は、ヌクレオリンの陽性率が低く、AgNORs の数も少ないもので、この型はヌクレオリンそのものが少なく細胞の増殖活性は低いと考えられる。第 2 型は、ヌクレオリンの陽性率は低い、AgNORs の数は多いもので、分解される前の段階のヌクレオリンの量が多いと考えられ、増殖準備状態と推定される。第 3 型は、ヌクレオリンの陽性率が高く、AgNORs の数の少ないもので、分解されたヌクレオリンが多く存在する状態で、少し前に増殖が盛んであったことを示すと考えられる。第 4 型は、ヌクレオリンの陽性率は高く、AgNORs の数も多いもので、連続して増殖が盛んな状態であると推定される。本研究で検討した NHL の症例では、第 1 型と第 4 型、すなわち最も増殖活性が低いと考えられるグループと最も増殖活性が高いと考えられる型で死亡例が少なかった。このことは、増殖活性の低い NHL は予後が良好であり、さらに、増殖活性が高い NHL も予後が良好であり得ることを示唆している。これは、現在の NHL に対する化学療法が主として増殖期にある腫瘍細胞に取り込まれ易い薬剤の組み合わせにより行われており、増殖活性の高い NHL では強い効果を発揮することによるものと考えられる。このように AgNORs 数とヌクレオリン陽性細胞率を組み合わせることで予後の推定が可能となると考えられる。

以上のように、AgNORs のみならず、ヌクレオリンを観察することによってより一層詳細に細胞の増殖動態を推測することが可能である。また、腫瘍細胞の増殖能の把握は直接治療法の選択に結びつくものであり、AgNORs およびヌクレオリンの解析は臨床にも有用なものと考えられる。

## 結 論

複数の蛋白の変化を表わす AgNORs 染色法を単一の蛋白の変化として把握するために、AgNORs の最も豊富な構成成分であるヌクレオリンについて、ウサギ抗ヒトヌクレオリンポリクローナル抗体を作製して検討した。作製した抗ヌクレオリン抗体による染色が、ヌクレオリン発現の変化を表わしていることを確認するために、ヒト白血病細胞株 HL60 細胞を DMSO で分化誘導し、発現の変化を観察した。同時に AgNORs 染色を行い、数的変化を観察し、両者の関係を検討した。さらに臨床検体における検討を行うために、未治療の NHL 患者リンパ節細胞における、ヌクレオリンの発現と AgNORs の数の関係を比較し、以下の結果を得た。

1. DMSO 添加培養により、分化を誘導した HL60 細胞では増殖能は低下し、ヌクレオリンの発現量は減少し、また、AgNORs の数も大きさも減少し、小型になった。

2. NHL 患者リンパ節細胞のヌクレオリン陽性率は様々で、陽性率は 2.4%—79.4% で平均値とその標準偏差は 27.7%±22.5 とばらつきがあった。

3. NHL 患者リンパ節細胞の一個の核当たりの平均 AgNORs 数の 20 例全例の平均値とその標準偏差は 2.83±0.77 で 1.64 から 4.40 までの値であった。

4. NHL 患者リンパ節細胞においてヌクレオリン陽性率と AgNORs の数は正の相関関係が認められた。

5. AgNORs の数とヌクレオリンの陽性率により、増殖活性が低い型、増殖準備状態の型、盛んな増殖があった後の状態の型、連続して増殖が盛んな型の 4 つに分類できた。

6. 連続して増殖の盛んな型と増殖活性の低い型で治療後の無病生存例が多く、予後が良好であった。

7. 以上の結果から、AgNORs と同時にヌクレオリンの発現を観察することは、細胞の増殖能を解析する上できわめて有用と考えられた。

#### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました松田保教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導と御助言を頂きました中村 忍内科学第三講座助教授ならびに内科学第三講座の諸先生方に深謝いたします。さらに、本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助力をいただきました金沢大学薬学部生物薬品化学教室大場義樹教授、安田秀世元助教授（現東京薬科大学生命科学部教授）ならびに、本多玲子、上條政幸、中田泰介諸氏および、金沢大学附属病院病理部久富元治氏に感謝いたします。

なお、本論文の一部は、第54回日本血液学会総会、第36回日本臨床細胞学会総会において発表した。

#### 文 献

- 1) Goodpasture C, Bloom SE. Visualization on nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50, 1975
- 2) Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015, 1980
- 3) Lischwe MA, Smetana K, Olson MOJ, Busch H. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Life Sci* 25: 701-708, 1979
- 4) Lischwe MA, Richards RL, Busch RK, Busch H. Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions. *Exp Cell Res* 136: 101-109, 1981
- 5) Ochs RL, Busch H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110kD/PI 5.1) is the nucleolar silver staining protein. *Exp Cell Res* 152: 260-265, 1984
- 6) Hubbell HR, Rothblum LI, Hsu TC. Identification of a silver binding protein associated with the cytological silverstaining of actively transcribing nucleolar regions. *Cell Biol Int Rep* 3: 615-622, 1979
- 7) Roussel P, Belenguer P, Amalric F, Hernandez-Verdun D. Nucleolin is an Ag-NOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its

phosphorylation state. *Exp Cell Res* 203: 259-269, 1992

- 8) Williams MA, Kleinschmidt JA, Krohne G, Frank WW. Argrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 137: 341-351, 1982
- 9) Howell MA. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosome. *Chromosoma* 62: 361-367, 1977
- 10) Hubbell HR, Lau YF, Brown RL, Hsu TC. Cell cycle analysis and drug inhibitions studies of silver staining in synchronous HeLa cells. *Exp Cell Res* 129: 139-147, 1980
- 11) Hernandez-Verdun D, Derenzini M, Bouteille M. Relationship between the Ag-NOR proteins and ribosomal chromatin in situ during drug-induced RNA synthesis inhibition. *J Ultrastruct Res* 88: 55-65, 1984
- 12) Hubbell HR, Hsu TC. Identification of nucleolus organizer regions (NORs) in normal and neoplastic human cells by the silver-staining technique. *Cytogenet Cell Genet* 19: 185-196, 1977
- 13) Busch H, Daskal Y, Gyorkey F, Smetana K. Silver staining of nucleolar granules in tumor cells. *Cancer Res* 39: 857-863, 1979
- 14) Field DH, Fitzgerald PH, Sin FYT. Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocyte. *Cytobios* 41: 23-33, 1984
- 15) Delozier-Blanchet CD, Walt H, Engel E. Ectopic nucleolus organizer regions (NORs) in human testicular tumors. *Cytogenet Cell Genet* 41: 107-113, 1986
- 16) Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 151: 111-118, 1987
- 17) Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56: 379-390, 1989
- 18) Herrera AH, Olson MOJ. Association of protein C23 with rapidly labeled nucleolar RNA. *Biochemistry* 25: 6258-6264, 1986
- 19) Lapeyre B, Bourbon H, Amalric F. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: An unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1472-1476, 1987
- 20) Ghisolfi L, Kharrat A, Joseph G, Amalric F, Erard M. Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur J Biochem* 209: 541-548, 1992
- 21) Pfeifle J, Anderer FA. Localization of phosphoprotein pp105 in cell lines of various species. *Biochem Biophys Res Commun* 116: 106-112, 1983
- 22) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, p1.53-1.73, p7.19-7.22, p17.14-17.16, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989
- 23) Srivastava M, Fleming PJ, Pollard HB, Burns AL.

- Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. FEBS Lett 250: 99-105, 1989
- 24) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 74: 5463-5467, 1977
- 25) Marson FAO. The purification of eukaryotic polypeptide expressed in *Escherichia coli*. In DM Glover (eds), DNA Cloning: A Practical Approach, vol. 3, 1st ed, p59-88, IRA Press, Oxford, 1987
- 26) Schoner RG, Ellis LF, Schoner GE. Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells over producing bovine growth hormone. Bio/Technology 3: 151-154, 1985
- 27) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970
- 28) Cordell JL, Galini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem 32: 219-229, 1984
- 29) The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. National Cancer Institute sponsored study of classification of non Hodgkin's lymphomas. Cancer 49: 2112-2135, 1982
- 30) Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. Cancer Res 31: 1860-1861, 1971
- 31) Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. J Pathol 158: 185-188, 1989
- 32) Goessens G, Thiry M, Lepoint A. Relations between nucleoli and nucleolus organizing regions during the cell cycle. In A Stahl, JM Lucini, AM Vegner Capodano (eds), Chromosomes Today, 1st ed, p261-271, Allen and Unwin, London, 1987
- 33) Stefano DD, Mingazzini PL, Scucchi L, Donnetti M, Marinozzi V. A comparative study of histopathology hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining, and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer. Cancer 67: 463-471, 1991
- 34) Raafat MF, Crocker J, Williams D. Comparative study of the degree of differentiation of neuroblastoma and mean numbers of nucleolar organiser regions. J Clin Pathol 41: 527-531, 1988
- 35) Arden KC, Bucana CD, Johnston DA, Pathak S. Computer-assisted image analysis of silver staining in normal and leukemic bone marrow. Int J Cancer 43: 395-398, 1989
- 36) Pich A, Marmont F, Chiusa L, Cappello N, Resegotti L, Navone R. Argyrophilic nucleolar organizer region counts and prognosis in multiple myeloma. Brit J Haematol 82: 681-688, 1992
- 37) Reeves BR, Casey G, Honeycombe JR, Smith S. Correlation of differentiation state and silver staining of nucleolar organizers in the promyelocytic leukemia cell line HL-60. Cancer Genet Cytogenet 13: 159-166, 1984
- 38) Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC, Nigg EA. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. Cell 60: 791-801, 1990
- 39) Taya Y, Yasuda H, Kamijo M, Nakaya K, Nakamura Y, Ohba Y, Nishimura S. *In vitro* phosphorylation of the tumor suppressor gene RB protein by mitosis-specific histone H1 kinase. Biochem Biophys Res Commun 164: 580-586, 1989
- 40) Bischoff JR, Friedman PN, Marshak DR, Prives C, Beach D. Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2. Proc Natl Acad Sci USA 87: 4766-4770, 1990
- 41) Morgan DO, Kaplan JM, Bishop JM, Varmus HE. Mitosis-specific phosphorylation of p60<sup>cdc2</sup> by p34<sup>cdc2</sup>-associated protein kinase. Cell 57: 775-786, 1989
- 42) Fang SH, Yeh NH. The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation. Exp Cell Res 208: 48-53, 1993

**The Relationship between Nucleolin Expression and Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions — Production of Anti-Human Nucleolin Polyclonal Antibody and Observation of the Differentiation of HL60 Cells and Non-Hodgkin's Lymphoma Cells** Yoko Okabe, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., 105, 617—626 (1996)

**Key words** nucleolin, argyrophilic nucleolar organizer regions, non-Hodgkin's lymphoma

#### Abstract

It is well known that the size and the numbers of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) reflect a transcriptional activity of rDNA and cell proliferation activity. Nucleolin, a MW 100,000 phosphoprotein, is a most abundant nucleolar protein in exponentially growing cells and a main nucleolar protein of nucleolar organizer region-associated proteins. Since AgNORs-associated proteins consist of several different proteins, the size and the number of AgNORs are affected by those proteins. In the present study, in order to analyze the cell proliferation activity precisely, the relationship between the change in number and size of AgNORs and the expression of nucleolin was observed. First, a rabbit polyclonal anti-human nucleolin antibody was produced using the *Escherichia coli*-expressed MW 24,000 peptide of the carboxyl-terminal domain of nucleolin as the antigen. To know the change in expression of nucleolin according to cell differentiation, HL60 cells were treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) and observed by Western blot analysis and immunohistochemical staining. Furthermore, for clinical study, AgNORs and nucleolin expression of the lymph node cells obtained from patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) were analyzed. DMSO-treated HL60 cells differentiated into mature granulocytes. The nucleolin expression was observed by Western blot analysis in the DMSO-untreated HL60 cells, but not in the treated ones. In immunohistochemical staining, the nucleolin expression of the DMSO-untreated HL60 cells was observed as large dots in the nucleus, but, conversely, as small ones in the nucleus of the treated cells. In the lymph node sections obtained from 20 patients with NHL, a linear relationship between the mean numbers of AgNORs per nucleus and the percentages of nucleolin-positive cells was observed ( $r=0.40$ ,  $p=0.07$ ). Dividing into four groups by the mean values (AgNORs, 2.83; nucleolin, 27.7%) of the mean numbers of AgNORs and the percentages of nucleolin-positive cells, the group having higher values in both, those considered to have high proliferation activity, and the group having lower ones in both, considered to have low proliferation activity, show the better prognosis than the other two groups. Based on these findings, it is concluded that the nucleolin expression is reduced by cellular differentiation, and, clinically, not only AgNORs but also nucleolin are the reliable markers for presuming the proliferation potential of NHL cells.