

老齡ラット甲状腺C細胞の細胞培養系における カルシトニン分泌能

西山 一朗 大田 忠親
(東京農業大学 アイソトープセンター)

Comparison of Calcium Effect on *in Vitro* Calcitonin Secretion from Young and Aged Rat Thyroid C-Cells

Ichiro NISHIYAMA and Tadachika OOTA

緒言

哺乳動物の甲状腺C細胞(傍ろ胞細胞)から分泌されるカルシトニンは、32個のアミノ酸からなるポリペプチドホルモンである。カルシトニンは、カルシウム刺激やガストリン刺激によりその分泌が促進され、主たる標的器官である骨に作用し、骨吸収を抑制する^{1,2)}。このため、血中のカルシウムが骨に沈着されると共に、血中カルシウム濃度の低下がもたらされる。この作用により、サケやウナギのカルシトニンおよびその誘導體は、高カルシウム血症や骨粗鬆症の治療薬として使用されている。

カルシトニンの生理的役割に関しては、未だ不明な点も残されているが、その主なものは、副甲状腺ホルモン(PTH)やビタミンDと協調して、カルシウム代謝調節に与ることと考えられている。哺乳動物の血中カルシウム濃度は、10mg/dl程度であるが、この濃度は厳密に制御されており、もしもこの制御に乱れが生ずると、情緒不安定、吐き気、テタニーなど様々な症状が発現する。このことは、生体内で起こる生命現象の多くにカルシウムが密接に関与していることの反映ともいえる。また慢性的な高カルシウム血症は、心臓・血管系の疾患、腎臓や膵臓などの障害をももたらす。ラットを用いた実験でも、血中カルシウム濃度は一生を通じてほぼ一定の値に保たれていることが確認されている^{3,4)}。しかし、そのカルシウム濃度を制御するホルモンの血中濃度は、加齢に伴って著しく変化することが報告されている⁵⁻⁹⁾。

ラットを用いたこれまでの研究によれば、血中のカルシトニン濃度は加齢に伴って上昇し、24-27ヶ月齢では8-12週齢の10倍以上にもなることが報告され

ている⁴⁾。血中のカルシトニン濃度が上昇する原因としては、1)甲状腺内におけるC細胞の増加、2)C細胞におけるカルシトニン分泌の亢進、3)血中カルシトニンの分解抑制などの可能性が考えられる。Wong-surawatとArmbrechtは、甲状腺副甲状腺複合体を用いた器官培養系においてカルシウム刺激を与えたときに、老齡ラットの方が8~12週齢ラットよりもカルシトニン分泌量が多いことを示している⁴⁾。しかしこの実験系では、甲状腺全体としての分泌を測定しているため、甲状腺1個当たりのC細胞数の違いが結果に大きく反映される点に問題がある。言い換えれば、この実験系では個々のC細胞の分泌能を正しく評価することができない。さらに器官培養系であるため、たとえ培地中のカルシウム濃度を高めたとしても、その高カルシウム刺激が実際にどの程度のC細胞まで有効に到達しているのかという疑問が残る。これらの問題を解決し、老齡ラットにおけるC細胞のカルシトニン分泌能を正しく評価するために、我々は甲状腺の初代培養系を作成し、C細胞数を等しくした条件の下で、カルシウム刺激に対するカルシトニンの分泌量を測定した。

材料と方法

実験動物 老齡ラットとしては24ヶ月齢のウィスター/ST系雄性ラットを、また対照群としては9週齢の同ラットを、三協ラボサービスより購入し使用した。

免疫組織化学 ラットをジエチルエーテル麻酔下に屠殺した後、甲状腺を摘出し、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1mol/lリン酸緩衝液(4℃)にて一晚固定した。試料をリン酸緩衝塩溶液(Phosphate-

buffered saline、P B S) にて洗浄し、10%、15%、20%のスクロースを含むP B S中に順次浸漬した後、O C Tコンパウンド (Miles) に包埋した。クリオスタットにて6 μ m厚の切片を作成し、卵白アルブミン被覆を施したスライドガラス上に乗せ、30分間風乾した。抗カルシトニン抗体を用いた免疫染色は、既報^{10,11)}の方法に従って行った。すなわち、切片を1%牛血清アルブミン (Sigma、フラクションV) を含むP B Sでブロックした後、抗カルシトニン抗体 (ICN、1:400) で1時間処理し、次いでFITC標識ヤギ抗ウサギIgG (ICN-Cappel、1:200) で30分間処理した。標本は、蛍光顕微鏡 (オリンパス、VANOX) にて、40倍の対物レンズを用いて観察した。

初代培養系 上記の方法にて摘出した甲状腺をステンレス製のハサミで細切した後、0.1%コラゲナーゼ (Worthington、CLS-2) および1,000units/ml デイスペーゼ (合同酒精) 処理を行い、細胞を解離した (酵素処理の詳細については、既報¹²⁾を参照)。解離細胞は、24穴マルチディッシュ (Falcon、プライマリア) 中で、1,000C細胞/ウェルとなるような密度で培養した (結果の項目参照)。培養液は、Dulbecco改変Eagle培地 (DME培地、Sigma) に5%非働化牛胎仔血清 (GIBCO)、50units/ml ペニシリン (GIBCO) および50 μ g/ml ストレプトマイシン (GIBCO) を添加したものをを用いた。培養細胞は、5%CO₂、37°Cの条件下に48時間維持した後、以下に記すカルシトニン分泌実験に供した。なお、一部の細胞は4%パラホルムアルデヒドで固定した後、既報¹³⁾の方法に従って、カルシトニン免疫染色を施した。

カルシトニン分泌実験 48時間培養した細胞を、血清不含DME培地で2度洗った後、各ウェル当たり0.5mlの血清不含培地を加えた。37°Cで1時間インキュベートした後、一部のウェルは1mmol/l CaCl₂を含む無血清培地 (0.5ml) に、また他のウェルは3mmol/l CaCl₂を含む無血清培地 (0.5ml) に置き換え、37°Cで15、30、45および60分間インキュベートした。その後各ウェルの培地を回収し、遠心分離 (500 \times g、10分間、4°C) により上清を得た。上清は、カルシトニン濃度測定に供するまで、-30°Cで凍結保存した。

カルシトニン濃度の測定 各々の上清のカルシトニン濃度は、¹²⁵I 標識カルシトニンを用いたラジオイムノアッセイにより測定した。試料0.1mlを用い、市販のラジオイムノアッセイキット (栄研化学) を

用い、使用説明書に従って測定した。各々の試料につき2回の測定を行い、その平均値を求めた。なお、この方法の検出限界は、20pg/mlであった。

カルシトニン分泌能の評価 一定時間内に培地中に放出されたカルシトニン量を、各ウェル中のC細胞の数で割ることにより、C細胞1個当たりのカルシトニン分泌量を算出した。結果は、独立した4回以上の実験より得られた値の平均値 \pm 標準偏差として表した。

結 果

免疫組織化学 老齢ラット (24ヶ月齢) および対照ラット (9週齢) の甲状腺に対し、カルシトニン免疫染色を施した結果を図1に示す。両者の間で基本的な組織構築や、ろ胞の大きさなどに大きな違いは見られなかったが、甲状腺内におけるC細胞の頻度とそのカルシトニン免疫反応性の強度には大きな差異が認められた。すなわち老齢ラットでは、9週齢のものに比べ、C細胞の頻度が明らかに高く、一方カルシトニン免疫反応性は、かなり弱いことが示された。このことから、C細胞1個当たりのカルシトニン含量は、老齢ラットの方が9週齢よりも少ないことが示唆された。

初代培養系 予備実験の結果より、48時間培養時に1,000C細胞/ウェルとするためには、甲状腺1個分の解離細胞を、9週齢ラットでは11.9個のウェルに、また24ヶ月齢では56.7個のウェルに均等に播種するとよいことがわかった。

対照および老齢ラット甲状腺より作成した初代培養系の位相差顕微鏡像を図2に示す。この培養条件では、9週齢のものでは48時間培養することによって、ほぼコンフラントな細胞シートを形成した (図2A)。一方老齢ラットでは、もともと播種した細胞数が少ないことに加え、細胞増殖率が低いため、48時間の培養ではコンフラントな状態にはならず、所々細胞シートを形成するにとどまった (図2B)。ただし、老齢ラット由来の培養系では、比較的上皮細胞が多く、線維芽細胞の混入が少ないのに対し、9週齢のものでは、かなりの数の線維芽細胞が増殖していることが、図2より示唆された。

図3に示す通り、初代培養系におけるC細胞の形態には、使用したラットの日齢による差異は認められなかった。いずれの培養系においても、C細胞は

卵形あるいは多角形の形態を呈し、しばしば太く短い($<20\mu\text{m}$)突起を形成した。老齢ラット甲状腺由来のC細胞のカルシトニン免疫反応性は、9週齢ラット由来のものに比べて明らかに弱かった。このことから、生体内におけるカルシトニン含量の差(図1

参照)は、培養条件下に48時間おいた場合でも保たれることが示唆された。

カルシトニン分泌実験 対照および老齢ラット甲状腺の初代培養系を、 1mmol/l あるいは 3mmol/l CaCl_2 を含む培地中に15~60分間保持したときのカルシト

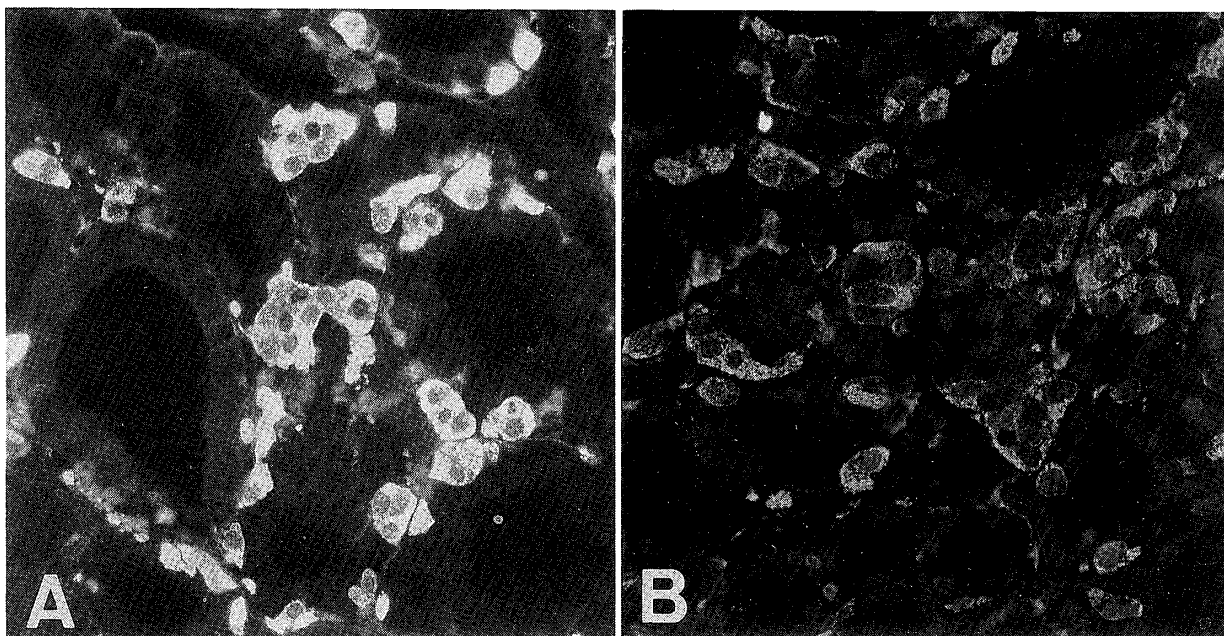


図1 甲状腺内のC細胞

9週齢(A)および24カ月齢(B)ラット甲状腺切片に対し、抗カルシトニン抗体を用いた間接蛍光抗体法による免疫染色を行い、C細胞を検出した。 $\times 300$

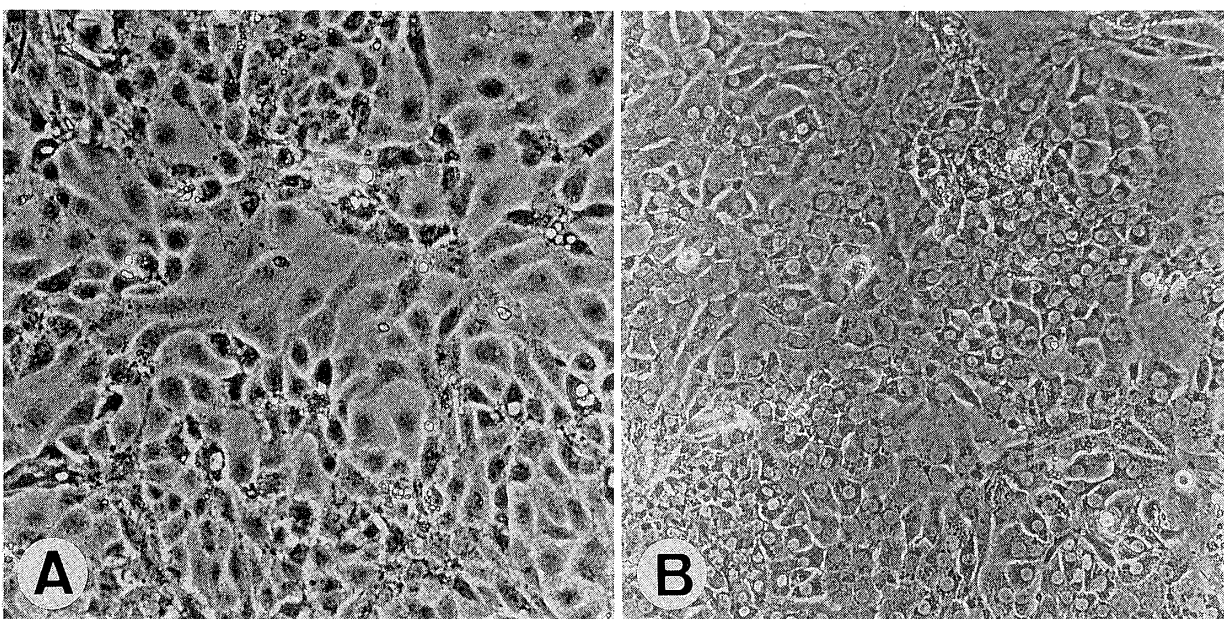


図2 甲状腺初代培養系の位相差顕微鏡像

9週齢(A)および24カ月齢(B)ラット甲状腺を酵素的に解離し、48時間培養した。 $\times 170$

ニン分泌を図4に示す。いずれの培養系においても分泌されるカルシトニン量は、時間にほぼ比例して

増加した。9週齢ラット由来C細胞におけるカルシトニン分泌速度は、1mmol/l CaCl₂を含む培地中において

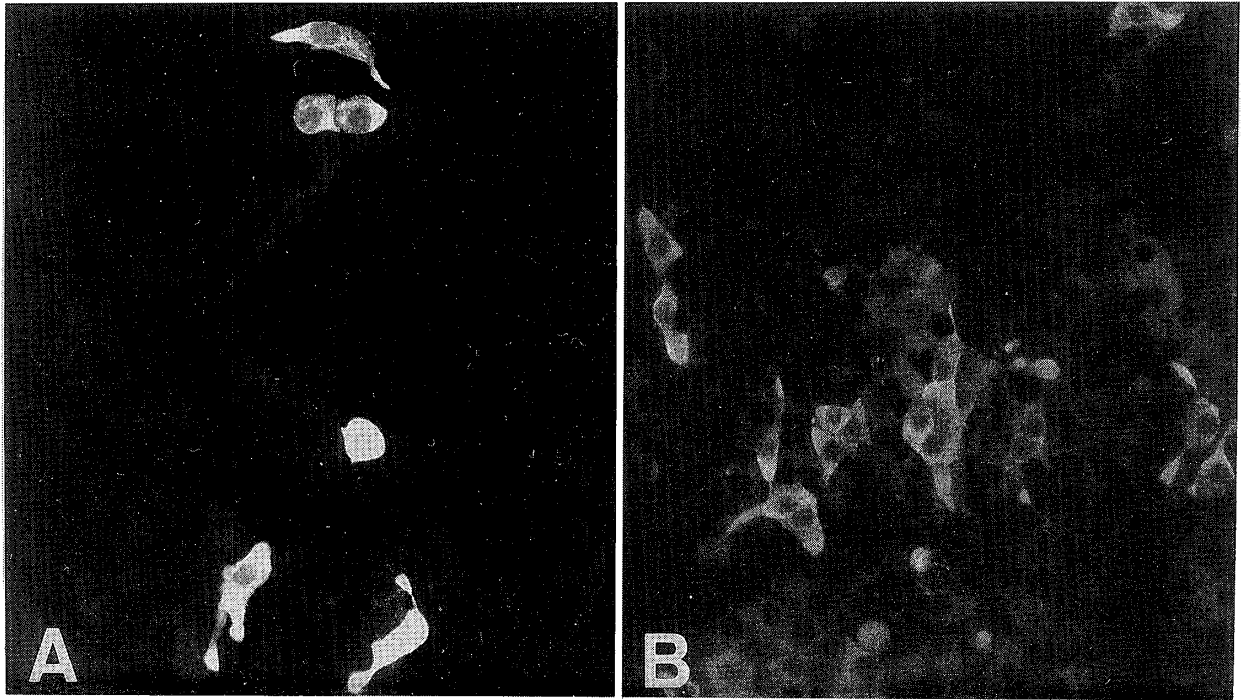


図3 甲状腺初代培養系におけるC細胞

9週齢(A)および24カ月齢(B)ラット甲状腺の初代培養系を作成し、48時間培養した後、抗カルシトニン抗体を用いた間接蛍光抗体法による免疫染色を行い、C細胞を検出した。×300

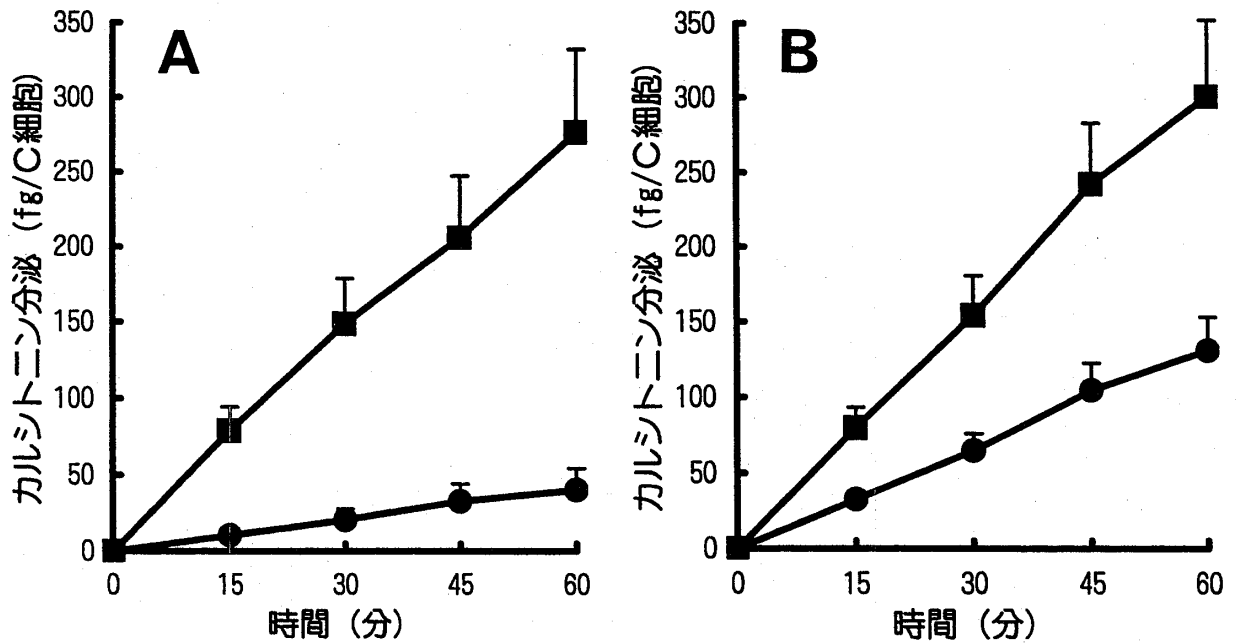


図4 甲状腺初代培養系におけるカルシウム刺激によるカルシトニン分泌

9週齢(A)および24カ月齢(B)ラット甲状腺の初代培養系を、1mmol/l (●)あるいは3mmol/l (■)のCaCl₂を含む培地中で15~60分間インキュベートした。培地中に分泌されたカルシトニン量を測定し、C細胞数で割ることにより、C細胞1個当たりのカルシトニン分泌量を求めた。

て、細胞1個当たり約40fg/hであった(図4A)。培地のCaCl₂濃度を3倍に高めると、カルシトニン分泌速度は約6.9倍に上昇し、277fg/hとなった(図4A)。一方、24カ月齢ラット由来のC細胞におけるカルシトニン分泌速度は、1mmol/l CaCl₂を含む培地中において、約130fg/hであった(図4B)。培地中のCaCl₂濃度を3mmol/lに高めると、カルシトニン分泌速度は約2.3倍の301fg/hまで上昇した。この24カ月齢ラットC細胞におけるカルシトニン分泌速度は、9週齢ラットC細胞での値の約3.3倍(1mmol/l CaCl₂)および1.1倍(3mmol/l CaCl₂)であった。

考 察

これまでの報告により、ラットでは加齢に伴ってC細胞数が増加することが示唆されてきた^{10,14)}。本実験でも、抗カルシトニン抗体を用いた免疫染色の結果(図1)ならびに、初代培養系作成の予備実験の結果より、加齢に伴うC細胞数の増加が確認された。このことから、加齢に伴う血中カルシトニン濃度上昇の一因は、C細胞数の増加にあることが推察された。一方、個々のC細胞に含まれるカルシトニンの量は、老齢ラットの方が対照群に比べて少ないものと考えられた(図1および図3)。細胞中のホルモン含量が少なくなる原因としては、その合成速度が小さくなることや、その分泌速度が大きくなることなどが考えられる。

老齢ラットと対照群とで、カルシトニン分泌パターンの大きな違いは、まず1mmol/l CaCl₂を含む培地中のカルシトニン分泌(基礎分泌)が、老齢ラットでは対照の約3.3倍にも達することである。この培地中のカルシウム濃度は、血中のカルシウム濃度にほぼ対応するものと考えられるので、生体中でもこの程度の分泌が起こっているものと考えられる。このように基礎分泌が多いことは、先に記した甲状腺1個当たりのC細胞数の増加と合わせて、老齢ラットで血中カルシトニン濃度が高いことの大きな原因であると考えられる。また先に記したように、老齢ラットのC細胞でカルシトニン含量が少ないのは、カルシトニンが継続的に多量に分泌されることが一因になっている可能性がある。

また、老齢ラットと対照群とのカルシトニン分泌パターンの違いの2番目としては、カルシウム刺激

によって惹起されるカルシトニン分泌速度の増加率の差が挙げられる。培地中のCaCl₂濃度を1mmol/lから3mmol/lに高めたとき、カルシトニン分泌速度は、対照群で約6.9倍にも上昇するのに対し、老齢ラットでは約2.3倍の上昇にとどまった(図4)。WongsurawatとArmbrechtは、甲状腺器官培養系にカルシウム刺激を与えることにより、8-12週齢ラットではカルシトニン分泌が約2.5倍、24-27ヶ月齢では約1.4倍に亢進することを報告している⁴⁾。本実験で得られた値は、これらの結果と比較すると高値を示してはいるが、若いラットの方が老齢ラットよりもカルシウム刺激時のカルシトニン分泌の増大率が大きいという点では一致している。器官培養系においては、カルシウム刺激が必ずしも甲状腺内のすべてのC細胞まで到達しなかったために、カルシトニン分泌の増加率が全般に低値を示したのではないかと考えられる。

上記の「カルシウム刺激によるカルシトニン分泌速度の上昇率が老齢ラットでは低い」という結果を単純に解釈すると、老齢ラットではC細胞のカルシウム感受性が低下しているとも考えられる。しかしカルシウム刺激を与える前の基礎分泌が老齢ラットの方が高いこと、およびカルシウム刺激を与えたときのカルシトニン分泌速度が老齢ラットと対照ラットとで、ほぼ同程度であることなどを考慮に入れると、老齢ラットC細胞では、本来カルシウム刺激によって活性化される情報伝達経路の一部が、常に活性化されている可能性が示唆される。そのため老齢ラットC細胞では、常にカルシトニンが分泌される、いわば“leaky”な状態になっているのかもしれない。C細胞からのカルシトニン分泌には、少なくとも2つの情報伝達経路が関与していることが知られている。ひとつは細胞内cAMP濃度の上昇が関わる経路であり、他方は細胞内Ca²⁺濃度の上昇が関わる経路である¹⁵⁾。事実C細胞からのカルシトニン分泌は、細胞内cAMP濃度を上昇させるジブチリルcAMP^{16,17)}および、カルシウムチャネルアゴニストであるBAY K8644¹⁷⁻¹⁹⁾やマイトキシシン²⁰⁾によって促進されることが報告されている。老齢ラットC細胞におけるカルシトニン分泌の特性をさらに詳しく調査するために、これらのツールを用いた検討を行うことが、今後の課題であると考えられる。

要約

老齢 (24ヶ月齢) および対照 (9週齢) ラット甲状腺の初代培養系を作成し、カルシウム刺激に対するカルシトニン分泌能を比較した。老齢ラットC細胞1個当たりのカルシトニン分泌速度は、1mmol/l CaCl₂を含む培地中では、対照群の約3.3倍にも達した。一方、培地中のCaCl₂濃度を3mmol/lに高めたときには、老齢ラットと対照群とで、ほぼ同程度のカルシトニン分泌速度が得られた。老齢ラットにおいて基礎分泌速度が大きいことは、その血中カルシトニン濃度が高値を示す原因のひとつであると考えられた。また老齢ラットC細胞では、カルシトニン分泌に関わる情報伝達経路の一部が、常に活性化されている可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Friedman, J. and Raisz, L.C.: *Science*, **150**, 1465 (1965)
- 2) Copp, D.H. *et al.*: *Endocrinology*, **70**, 638 (1962)
- 3) Kalu, D.N. *et al.*: *Endocrinology*, **113**, 2010 (1983)
- 4) Wongsurawat, N. and Armbrecht: *Exp. Gerontol.*, **22**, 263 (1987)
- 5) Hillyard, C.J. *et al.*: *Lancet*, **1**, 961 (1978)
- 6) Kalu, D.N. *et al.*: *Endocrinology*, **115**, 1239 (1984)
- 7) Queener, S.F. *et al.*: *J. Endocrinol.*, **87**, 73 (1980)
- 8) Shamonki, I.M. *et al.*: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **50**, 437 (1980)
- 9) Wiske, P.S. *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, **300**, 1419 (1979)
- 10) Nishiyama, I. *et al.*: *Neuroscience*, **56**, 777 (1993)
- 11) Nishiyama, I. *et al.*: *Anat. Embryol.*, **194**, 419 (1996)
- 12) Nishiyama, I. and FUJII, T.: *Biomed. Res.*, **9**, 413 (1988)
- 13) Nishiyama, I. and FUJII, T.: *Exp. Cell Res.*, **198**, 214 (1992)
- 14) Boorman, G.A. *et al.*: *Arch. Pathol.*, **94**, 35 (1972)
- 15) Haller-Brem, S. *et al.*: *J. Endocrinol.*, **119**, 147

(1988)

- 16) Debustros, A. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **261**, 8036 (1986)
- 17) Nishiyama, I. and Fujii, T.: *Biomed. Res.*, **13**, 81 (1992)
- 18) Cooper, C.W. *et al.*: *Endocrinology*, **118**, 545 (1986)
- 19) Hishikawa, R. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 454 (1985)
- 20) Nishiyama, I. *et al.*: *Horm. Metab. Res.*, **22**, 258 (1990)