

ラット胎仔甲状腺C細胞の初代培養系における神経様形態変化 — 細胞接着分子ならびに細胞骨格分子の発現 —

西山 一朗 大田 忠親*

*東京農業大学 アイソトープセンター

Expression of Cell Adhesion Molecules and Cytoskeletal Components in Fetal Rat Thyroid C-cells *in vitro*

Ichiro NISHIYAMA, Tadachika OOTA

Calcitonin-producing cells (C-cells) are endocrine derivatives of the neural crest. In a primary culture of fetal rat thyroid glands, a protein kinase inhibitor H-7 facilitated marked outgrowth of neurite-like processes from the C-cells. Whereas the C-cells *in vivo*, together with the follicular cells, displayed immunoreactivities for E-cadherin and catenins, immunocytochemical studies revealed that they lost the immunoreactivities for these proteins in the culture system. The results in the present study suggest the possibility that the perturbation of the cell adhesion machinery may allow cell surface movement and consequently allow process extrusion from the C-cells.

緒言

甲状腺C細胞(傍濾胞細胞、clear cell)は、ペプチドホルモンであるカルシトニンを分泌する内分泌細胞である。哺乳動物においてC細胞は、甲状腺濾胞細胞の基底層側に散在し、濾胞細胞とともに上皮組織を構成している。そのためC細胞は、一般に上皮細胞として分類されている。C細胞の上皮様形質としては、細胞接着分子としてE-カドヘリン¹⁾を、また細胞骨格分子として中間径フィラメントの一種であるサイトケラチン²⁾を発現することが示されている。

一方、C細胞の発生源は神経外胚葉であり、そのため上皮細胞でありながら、種々の神経様形質を

発現することが知られている。これまでに報告されているC細胞の神経様形質としては、タウ様タンパク質を発現する³⁾、神経細胞接着分子(Neural Cell Adhesion Molecule, N-CAM)を発現する^{1),4)}、L-5-ヒドロキシトリプトファンを取り込み、脱炭酸反応によりセロトニンを生成する⁵⁾、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)を発現する⁶⁻⁸⁾、神経突起様の突起を形成する能力をもつ⁹⁻¹³⁾、などが挙げられる。

先の報告でわれわれは、ラット胎仔甲状腺由来の初代培養系において、C細胞が神経様突起を伸長すること¹²⁾や、この突起伸長がプロテインキナーゼ阻害剤によって顕著に促進されること¹³⁾を報告した。本研究では、この甲状腺初代培養系を用いて、C細胞における細胞接着分子や細胞骨格分子の発現を、免疫組織化学的に調査した。

材料と方法

実験動物 妊娠20日目のウイスター/ST系ラットを、三協ラボサービスより購入し、その胎仔を使用した。

初代培養系 初代培養系は、Nishiyama *et al.*¹²⁾の方法に従って作製した。すなわち、20日齢ラット胎仔の甲状腺を、0.1%コラゲナーゼ(Worthington, CLS-2)および1,000 units/ml デイスパーゼ(合同酒精)により解離し、24穴マルチディッシュ(Falcon, プライマリア)中で培養した。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)、50 units/ml ペニシリン (GIBCO) および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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% CO_2 、37°C の条件下に 24 時間維持した後、突起伸長を促進するため、プロテインキナーゼ阻害剤 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7、生化学工業) を終濃度 70 $\mu\text{mol}/\text{l}$ となるよう添加した¹³⁾。同様の条件でさらに 48 時間培養した後、-20°C のアセトンで 5 分間、または 4% ホルムアルデヒドで 30 分間固定した。固定法としては、一般にアセトン固定よりもホルムアルデヒド固定の方が優れているが、E-カドヘリンや α -カテニンは、ホルムアルデヒド固定によりその抗原性を失う (西山、未発表)。そのため、E-カドヘリンおよび α -カテニンの染色時にはアセトン固定を、またそれ以外の場合にはホルムアルデヒド固定を行った。また、ホルムアルデヒド固定は、一般に 4°C 前後の低温で行われるが、低温処理はチューブリンの速やかな脱重合を惹起し、微小管構造を破壊するため、 α -チューブリンならびにタウタンパク質の染色を行うときには、ホルムアルデヒド固定を常温で行った。

免疫組織化学 上記のとおり固定した細胞を、リン酸緩衝塩溶液 (Phosphate-buffered saline、PBS) にて洗浄し、ホルムアルデヒド固定試料の場合には、0.25% Triton X-100 (WAKO) を含む PBS にて 5 分間の処理を行った。一方アセトン固定試料の場合には、固定処理により細胞膜が抗体透過性となるため、Triton X-100 処理を省略した。次に、抗体の非特異的結合を抑えるために、1% 牛血清アルブミン (Sigma、フラクション V) を含む PBS で 30 分間処理した。再度 PBS で洗浄した後、表 1 に示す一次抗体で 1 時間処理し、次いで FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (Cappel、1:200) および

表 1 免疫染色に用いた一次抗体

抗原	免疫動物	製造会社	希釈率
カルシトニン	ウサギ	ICN	1:500
カルシトニン	マウス	COSMOBIO	1:500
E-カドヘリン	マウス	Transduction Lab.	1:75
α -カテニン	ウサギ	Sigma	1:400
α -チューブリン	マウス	Sigma	1:500
タウタンパク質	ウサギ	Sigma	1:250
サイトケラチン	マウス	Sigma	1:100

RITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Cappel、1:100) により 30 分間処理した。非結合抗体を PBS で除去した後、無蛍光グリセロール・PBS (9:1) に封入し、蛍光顕微鏡 (オリンパス、VANOX) にて観察を行った。なお、陰性対照実験としては、それぞれの一次抗体に替えて、正常ウサギあるいは正常マウス血清を用い、同様に染色操作を行った。

結 果

細胞接着分子 カルシトニンおよび E-カドヘリンの二重染色の結果を図 1 a、b に示す。単層細胞シートを形成している濾胞細胞と線維芽細胞のほとんどすべてにおいて、E-カドヘリン免疫反応性が認められた。特に細胞間の接着面において、強い免疫反応性が見られた (図 1 b)。一方、カルシトニン免疫反応性により識別される C 細胞 (図 1 a) では、E-カドヘリンの発現が認められなかった (図 1 a、b)。

図 1 c、d に、カルシトニンおよび α -カテニンの二重染色像を示す。濾胞細胞と線維芽細胞においては、 α -カテニンの局在は E-カドヘリンの局在とよく一致することがわかった。すなわち α -カテニンは、これら細胞間の接着面に豊富に存在することが示された。これに対し、C 細胞の細胞表面における α -カテニンの発現は、ごくわずかであった。図 1 c に見られるように、C 細胞の多くは細胞体から細長い突起を伸長していたが、その細胞表面にも、ほとんど α -カテニン免疫反応性が認められなかった (図 1 c、d)。

なお、いずれの実験においても、一次抗体を正常血清に替えた陰性対照実験では非特異的染色は認められなかった。

細胞骨格分子 図 2 a、b に、カルシトニンおよび α -チューブリンの二重染色像を示す。 α -チューブリンの免疫反応性は、C 細胞や濾胞細胞を含むすべての細胞において認められた (図 2 b)。C 細胞においては、細胞体および突起部分のいずれにおいても免疫反応性が認められたが、特に突起部分において、太い束状の α -チューブリン免疫反応性物質の存在が示唆された (図 2 a、b 矢印)。

また、カルシトニンとタウタンパク質との二重染色の結果 (図 2 c、d) から、タウタンパク質はす

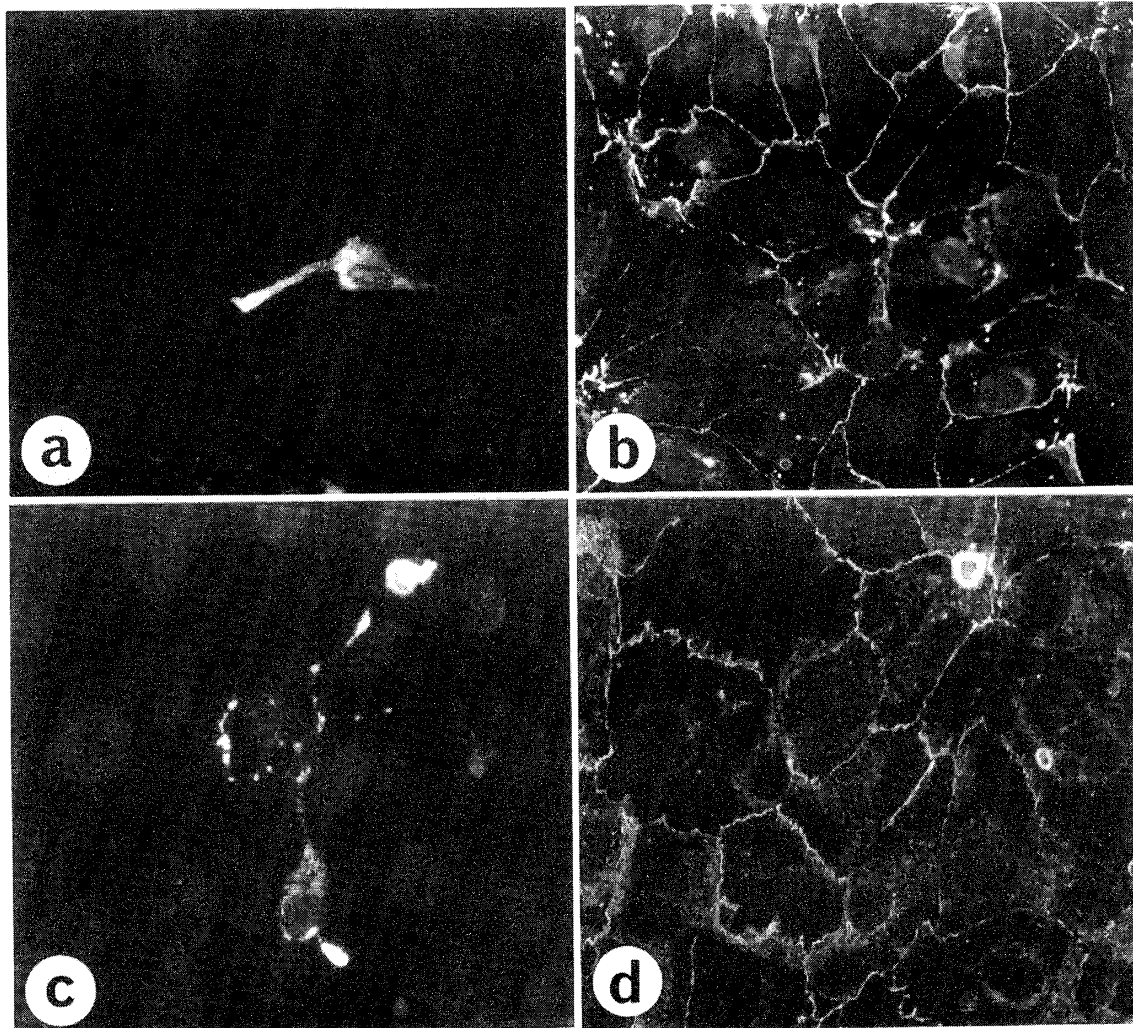


図1 胎齢20日ラット甲状腺初代培養系における E-カドヘリンと α -カテニンの局在

カルシトニン (a, c) および E-カドヘリン (b) あるいは α -カテニン (d) の局在を、二重免疫染色法により調査した。a と b, c と d は、それぞれ同一視野を示す。×300

すべての C 細胞において発現されているが、濾胞細胞や線維芽細胞では発現されていないことが示唆された。C 細胞におけるタウタンパク質の発現は、核では陰性であったが、細い突起部分 (図 2 c, d 矢印) を含むすべての細胞質において認められた。

中間径フィラメントの一種であるサイトケラチンの免疫反応性は、C 細胞と濾胞細胞の両方において認められた (図 3)。濾胞細胞では、基質上に細胞がよく伸展しているが、その細胞質中に網状のサイトケラチンネットワークが認められた。一方 C 細胞では、細胞体と突起のいずれの部分にもサイトケラチン免疫反応性が認められたが、濾胞細胞に見られるような網状の構造は認められなかった。

考 察

われわれは以前の報告で、16日齢ラット胎仔由来

の甲状腺 C 細胞は、初代培養系においてプロテインキナーゼ阻害剤処理することにより、顕著な突起形成を来とし、神経様形態を呈することを報告した¹³⁾。本実験の結果より、出生直前の20日齢胎仔由来の C 細胞においても、突起を伸長する潜在能力が保持されていることが判明した。また、この突起伸長には、何らかのタンパク質の脱リン酸化が関与していることが示唆された。

一般に上皮細胞が上皮組織を形成しているとき、相互の細胞表面には E-カドヘリンに代表される細胞接着分子が発現され、安定な組織構築を保っている。E-カドヘリンは、他の細胞表面の E-カドヘリンと、 Ca^{2+} 依存性のホモフィリックな結合を形成する^{14),15)}。このカドヘリンの細胞内ドメインは、 α -、 β -および γ -カテニンと呼ばれるタンパク質を介して細胞骨格タンパク質と連絡するため、カドヘ

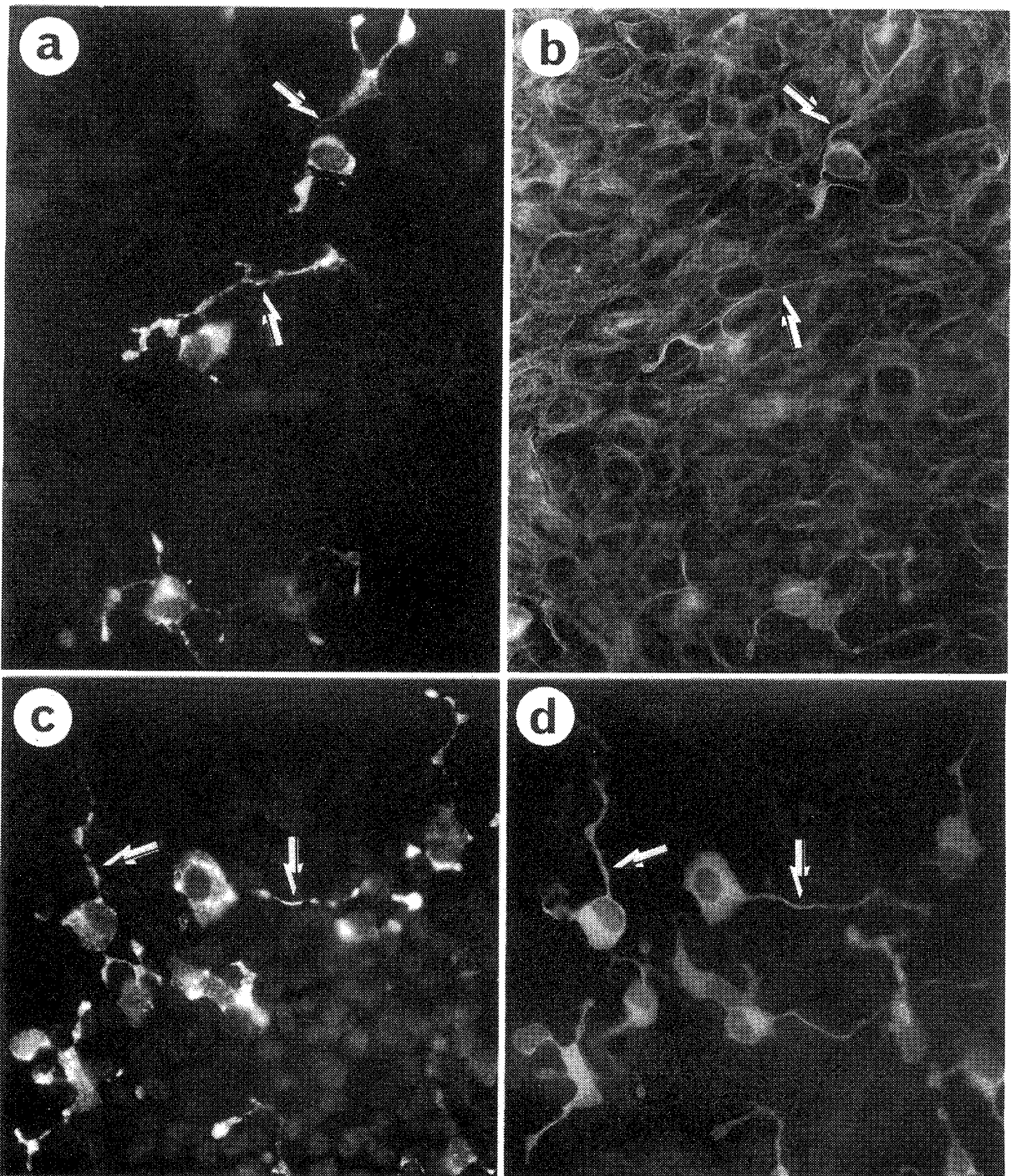


図2 胎齢20日ラット甲状腺初代培養系における α -チューブリンとタウタンパク質の局在

カルシトニン (a, c) と α -チューブリン (b) あるいはタウタンパク質 (d) の局在を、二重免疫染色法により調査した。a と b, c と d は、それぞれ同一視野を示す。C細胞の突起部分は、 α -チューブリンおよびタウタンパク質の免疫反応性を示した (矢印)。×300

リンは細胞の形態制御にも関与すると考えられている¹⁶⁾。

甲状腺内においてC細胞は、濾胞細胞とともに上皮組織を形成している。このことから予測されるところ、C細胞は濾胞細胞とともに、その細胞表面にE-カドヘリンを発現している。また、ごく最

近行った実験によれば、これらの細胞はいずれも α -および β -カテニン免疫反応陽性であることが示された (西山等、発表準備中)。しかし、本実験の結果から示されたように、初代培養系においてC細胞は、E-カドヘリンと α -カテニンのいずれの免疫反応についても陰性であった (図1)。このことは、

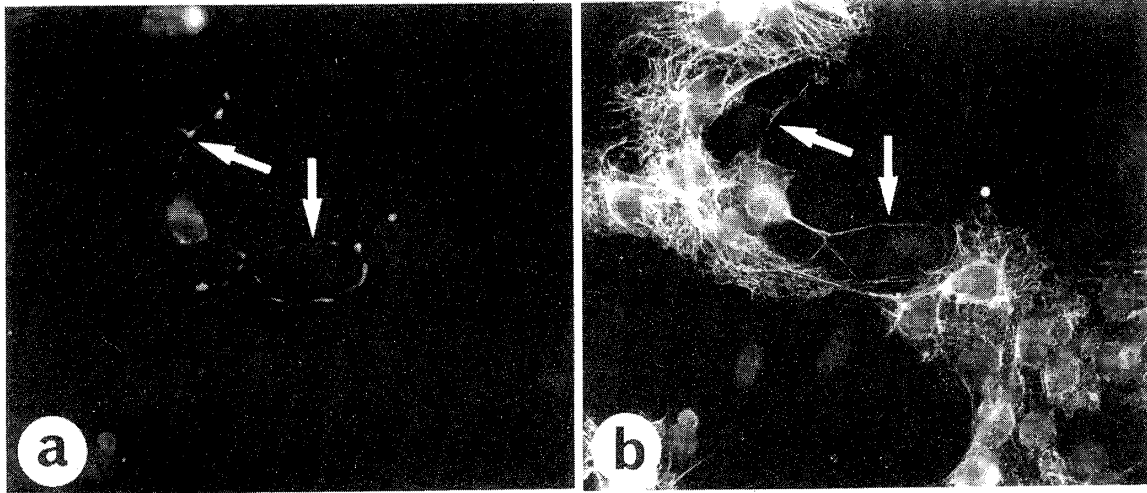


図3 胎齢20日ラット甲状腺初代培養系におけるサイトケラチンの局在

カルシトニン (a) とサイトケラチン (b) の局在を、二重免疫染色法により調査した。a と b は同一視野を示す。C細胞の突起部分は、サイトケラチンの免疫反応性を示した (矢印)。

酵素処理によって甲状腺組織を解離することにより、C細胞表面のE-カドヘリンおよび α -カテニンが消失 (あるいは分散) し、また新たな合成が抑えられていることを示唆する。

上記のように、細胞の形態が細胞接着分子の制御を受けていることを考え合わせると、C細胞は甲状腺組織内ではE-カドヘリンやカテニンによる細胞接着装置のため、その上皮様形態が維持されているが、培養時に細胞が解離されることにより、その制御から解放されるため、神経外胚葉本来の神経様形態が現れてくるのかもしれない。先の報告^{4),13)}では、胎仔由来のC細胞は胎仔型N-CAMを発現しており、そのポリシアル酸の立体障害のため細胞間の結合が緩やかになっている可能性を示した。本研究の結果を合わせて考えると、C細胞表面に胎仔型N-CAMが発現されることに加え、さらにカドヘリン・カテニン系の接着装置が外れることにより、C細胞の上皮様形態維持機構が解除されるものと推測される。Teitelman¹⁷⁾は、膵臓のランゲルハンス島の培養系において、細胞を解離して培養したときに限り、インスリン分泌細胞 (B細胞) が突起を伸長することを報告している。この結果もまた、細胞接着を解除することが細胞形態変化の引き金となることを示している。

この推論が正しいとして、ではなぜ突起が形成されるのだろうか。神経細胞の突起は、微小管骨格とニューロフィラメントによって支えられていることが知られている。また、この微小管の構造は、

MAP2 (Microtubule-associated protein 2) やタウタンパク質によって安定化されている。本実験において、C細胞の突起には微小管の構成タンパク質である α -チューブリンとタウタンパク質の免疫反応性が認められた。このことから、C細胞の突起はタウタンパク質によって安定化された微小管骨格を有するものと考えられる。タウタンパク質のチューブリン重合促進作用は、リン酸化により大きく減少することが知られている¹⁸⁾ため、おそらくC細胞内のリン酸化されたタウタンパク質がH-7によって脱リン酸化されることにより、チューブリンの重合による微小管の形成が起こり、突起が形成されるものと考えられる。タウタンパク質が突起形成に大きく関与しているという推論は、アンチセンスオリゴDNAによってタウタンパク質の発現を抑制したとき、C細胞の突起形成が阻害されるという、われわれの既報¹⁹⁾の結果からも支持される。

また、発生生物学的に興味深いこととしては、C細胞がサイトケラチンとタウタンパク質とを同時に発現していることが挙げられる。一般に細胞はその種類によって、中間径フィラメント (10 nm フィラメント) の種類が決まっている。神経細胞ではニューロフィラメントタンパク質、筋細胞ではデスミン、間葉系細胞ではビメンチン、グリア細胞ではGFAP (glial fibrillary acidic protein)、そして上皮細胞ではサイトケラチンが発現されており、細胞の種類を同定するためのよいマーカーとなっている。初代培養系においてもC細胞は、サイトケラ

チンをその細胞質中に発現しており、上皮細胞としての形質を維持している。しかしその一方、タウタンパク質という神経組織に特異的に発現されるタンパク質をもC細胞が発現している。このように、サイトケラチンやE-カドヘリンなどの上皮組織特異的なタンパク質と、神経組織特異的なタウタンパク質の両者を発現している細胞種については、これまでに報告がない。この点において、C細胞は他に類をみない特異的な細胞であり、細胞分化と形質発現を研究するためのモデル系として、興味深いものと考えられる。

要約

甲状腺内においてC細胞は、E-カドヘリン・カテニン系の細胞接着装置を介して、濾胞細胞とともに上皮組織を形成している。ラット胎仔甲状腺組織から初代培養系を作製し、プロテインキナーゼ阻害剤であるH-7によって処理すると、C細胞の多くは微小管およびサイトケラチンを骨格とする突起を伸長し、神経様形態を呈する。このときC細胞は、その細胞表面のE-カドヘリンやカテニンの免疫反応性を失うことが示された。以上の結果から、カドヘリン・カテニン系の細胞接着装置による細胞形態の制御が解除されることが、C細胞による突起伸長の一因である可能性が示された。

参考文献

- 1) NISHIYAMA, I. *et al.*: *Anat. Embryol.*, **194**, 419 (1996)
- 2) NISHIYAMA, I.: *Zool. Sci.*, **15**(S), 24 (1998)
- 3) NISHIYAMA, I. *et al.*: *Biomed. Res.*, **16**, 59 (1995)
- 4) NISHIYAMA, I. *et al.*: *Neuroscience*, **56**, 777 (1993)
- 5) PEARSE, A.G.E.: *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 303 (1969)
- 6) KAMEDA, Y.: *Anat. Rec.*, **219**, 204 (1987)
- 7) NISHIYAMA, I. and FUJII, T.: *Biomed. Res.*, **9**, 413 (1988)
- 8) NITTA *et al.*: *Histochemistry*, **84**, 139 (1986)
- 9) BARASCH, J.M. *et al.*: *J. Neurosci.*, **7**, 2874 (1987)
- 10) CLARK, M.S. *et al.*: *J. Neurosci.*, **15**, 6167 (1995)
- 11) NISHIYAMA, I. and FUJII, T.: *Exp. Cell Res.*, **198**, 214 (1992)
- 12) NISHIYAMA, I. *et al.*: *Zool. Sci.*, **11**, 441 (1994)
- 13) NISHIYAMA, I. *et al.*: *Zool. Sci.*, **14**, 809 (1997)
- 14) EDELMAN, G.M.: *SCIENCE*, **219**, 450 (1983)
- 15) RUTISHAUSER, U. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 685 (1982)
- 16) 小澤政之: 細胞工学別冊 接着分子ハンドブック、(秀潤社) p. 269 (1994)
- 17) TEITELMAN, G.: *Develop. Biol.*, **142**, 368 (1990)
- 18) LINDWALL, G. and COLE, R.D.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 12241 (1984)
- 19) NISHIYAMA, I. and OOTA, T.: *Biomed. Res.*, **18**, 325 (1997)