

ラット甲状腺髄様癌由来細胞株より分離したサブクローン細胞に対するジブチリルサイクリックAMPおよびプロテインキナーゼ阻害剤H-7の影響

西山 一朗¹、小木曾 学²、大田 忠親³

1 駒沢女子大学

2 東邦大学・医学部・第二生理学教室および新技団さきがけ研究21

3 東京農業大学・アイソトープセンター

Effects of dibutyryl cyclic AMP and a protein kinase inhibitor H-7 on suclonal cells derived from a rat medullary thyroid carcinoma cell line

Ichiro NISHIYAMA, Manabu OGISO, Tadachika OOTA

Thyroid C-cells are endocrine derivatives of the neural crest. To establish a useful model system for studying the molecular mechanism of neural phenotypic expression in the C-cells, we isolated a subclone by sequential dilution cloning from rMTC 6-23, a C-cell line established from a rat medullary thyroid carcinoma. The subclonal rMTC 6-23 B6 cells, which remained spherical in shape under cell culture, were revealed to preserve potential to extrude neurite-like processes in response to dibutyryl cyclic AMP (2mM) or a protein kinase inhibitor H-7 (50 μ M). In this issue, we have proposed a novel model system to study on the morphological stability and plasticity of the C-cells.

緒 言

有性生殖を行う動物の個体は、元をただせばただひとつの細胞、すなわち受精卵に由来する。言い換えると受精卵が発生過程で分裂を繰り返し、細胞数を増すと共に、各々の細胞が特殊化し、様々な機能と形態を発現することにより個体が形成される。

発生の一時期に神経管背側部に現れる神経冠細胞は、やがて胎児（あるいは胚）の様々な場所に移動すると共に、感覚および自律神経などの末梢神経細胞、副腎髄質クロマフィン細胞や甲状腺カルシトニン細胞（C細胞）などの内分泌細胞、黒色色素細胞、軟骨、その他の機能細胞へと特殊化、すなわち分化することが知られている¹⁾。そのため神経冠細胞は、細胞分化機構を調べるための格好のモデルとして広く用いられている。しかしながら、このモデルにつ

いてさえも、細胞分化や発現形質の安定性を保つ機構に関しては、未だ不明な点が多い。

甲状腺C細胞は、血中のCa²⁺濃度の上昇に反応して、血中Ca²⁺濃度低下作用をもつカルシトニンというペプチドホルモンを分泌する内分泌細胞である。このC細胞は先に記したとおり、神経冠に発生起源をもつ細胞であり、その中でも特に腸のセロトニン作動性神経細胞と共通の細胞系列から分化すると考えられている²⁾。我々はこれまでにラットC細胞の分化機構や、細胞培養条件下での神経様形質発現についての検討を続けてきた。その結果、ラット胎仔由来C細胞では培養系において、ラミニン基質³⁾やプロテインキナーゼ阻害剤⁴⁾などによって、神経突起様構造が形成されることを見出した。また、条件によってはC細胞が神経細胞接着分子（Neural cell adhesion molecule、以下NCAMと略記）を発現す

ることも明らかにした⁵⁾。さらに胎仔由来C細胞のこのような性質は、市販のC細胞株であるrMTC 6-23細胞にも同様に認められることを確認した⁶⁾。株細胞は初代培養系に比較し取り扱いが容易なうえ、また量を要する生化学的実験にも適するため、このrMTC 6-23細胞は内分泌細胞と神経細胞との分化機構を研究するうえで大変興味深い材料であると考えられる。しかしながらこの細胞株は、形態的にも、またNCAMの発現や各種薬剤への反応性においても不均一な細胞集団であることがわかったため、このままでは神経様形質発現機構の解析には不適切である。そこで、神経様形質発現能を保った均一な細胞集団を得ることを目的として、rMTC 6-23細胞のサブクロニングを行うとともに、得られた細胞株の性質の検討を行った。

材料と方法

(1) 細胞培養

実験には、1980年にZeytinogluらによってラット甲状腺髄様癌より樹立されたrMTC 6-23細胞⁷⁾を用いた。rMTC 6-23細胞は、アメリカンタイプカルチャーコレクションより、大日本製薬を介して購入した。培養容器は25mlの組織培養用フラスコ（プライマリア、ファルコン）を用い、また培地は10%の非働化馬血清（ギブコ）を添加したダルベコ改変イーグル培地（高グルコース型、ギブコ）を用いた。培養細胞は5%二酸化炭素を含む湿空气中、37°Cで維持し、培地交換は3日ごとに行った。

(2) サブクロン細胞の分離

rMTC 6-23細胞からのサブクロン細胞の作成には限界希釈法を用いた。すなわち、コンフラントになったrMTC 6-23細胞をトリプシン処理により剥離し、これを96穴マルチウエルプレート（プライマリア、ファルコン）に、1ウエル当たり1細胞となるように播種した。3週間培養した後、均一なコロニーを生じた細胞群を選択し、さらにもう一度上記の方法によりサブクロニングを繰り返した。この結果得られた細胞株を、rMTC 6-23 B6細胞と名付けた。

(3) サブクロン細胞に対する薬剤の影響

サブクロンrMTC 6-23 B6細胞（以下B6細胞と略記する）の培養は、4穴マルチウエルプレート（メンク）中に敷いたカバーガラス（丸型、直径 14mm）にポリ-L-リジン（シグマ）と牛ファイブロネクチン（新田ゼラチン）を二重コートした基質上で行った。培地は上記の血清含有培地を用い、また細胞密度は 2×10^5 細胞/cm²とした。培養24時間後にそれぞれにつき2mM ジブチリルサイクリック AMP（dbcAMP、ベーリンガー）あるいは50 μ M H-7 [1-(5-Isoquinoline-sulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride、生化学工業]を添加した。各々を48時間培養し、位相差顕微鏡で細胞形態を観察した後、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝溶液により室温で30分間固定し、以下に記す免疫細胞染色に供した。

(4) NCAMの免疫細胞化学的検出

実験には二種類の抗NCAM抗体を用いた。一方は、ウサギ抗ラットNCAMポリクローナル抗体NA1206（アフィニティリサーチプロダクツ）であり、これはNCAM-120、-140、-180に共通のポリペプチド部分を認識する抗体である。また他方は、マウス抗ラットNCAMモノクローナル抗体、12E3であり、これは胎仔型NCAMのポリシアロ糖鎖を認識するIgM抗体である⁸⁾。

固定した細胞をリン酸緩衝溶液でよく洗浄した後、牛血清アルブミン（フラクシオンV、シグマ）を含むリン酸緩衝溶液で30分間処理した。次に二種類のNCAM抗体、すなわちNA1206 (1:200) および12E3 (1:5,000) を含むリン酸緩衝溶液中で1時間インキュベートした。リン酸緩衝溶液で過剰な一次抗体を洗い流した後、二次抗体として、RITCラベルしたヤギ抗ウサギIgG抗体 (1:100、カッペル) ならびにFITCラベルしたヤギ抗マウスIgM抗体 (1:100、カッペル) を含むリン酸緩衝溶液中で、30分間インキュベートした。再びリン酸緩衝溶液で洗浄した後、グリセリン-リン酸緩衝溶液 (1:4) に封入し、蛍光顕微鏡にて観察した。以上の操作はすべて室温で行った。

結 果

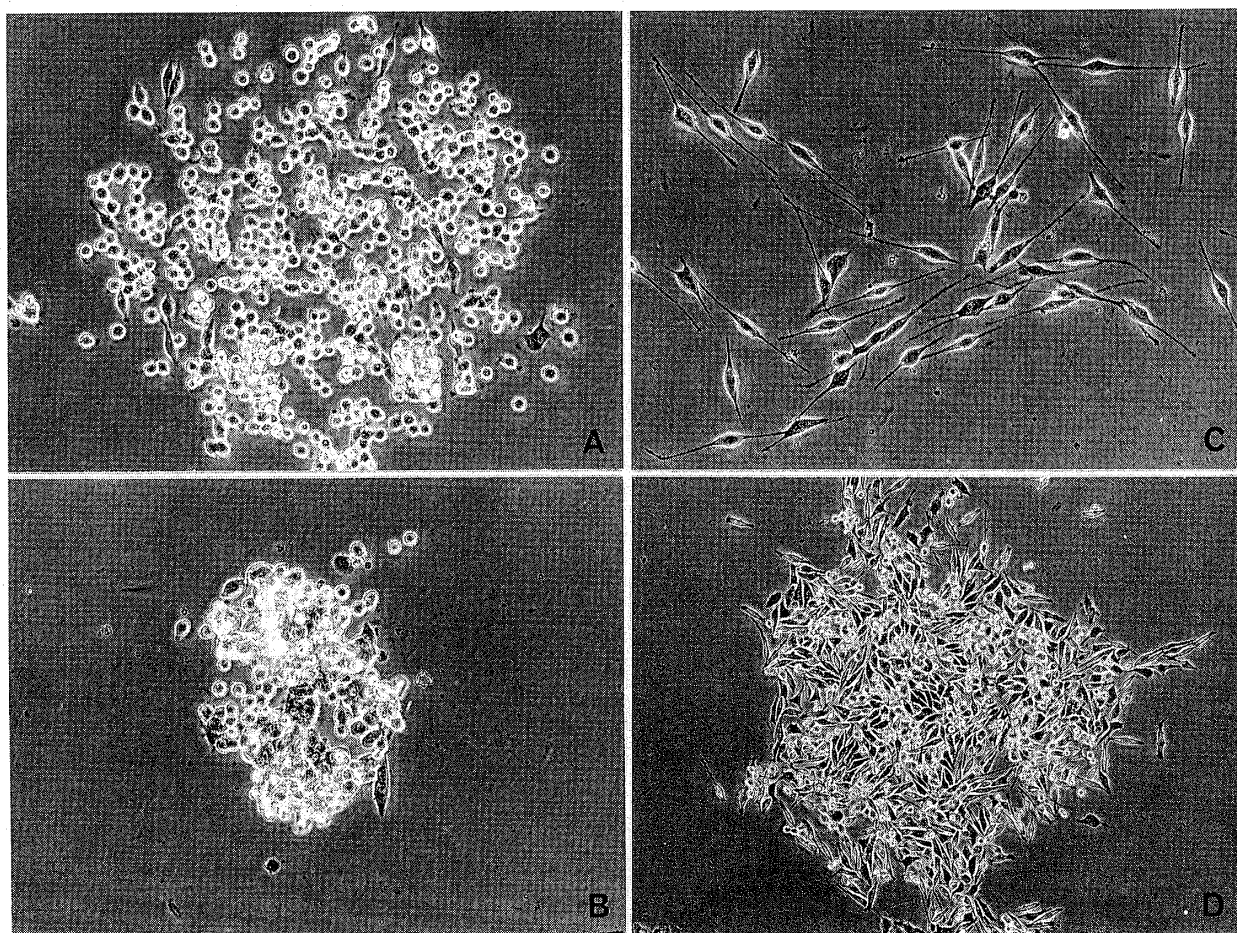
(1) サブクロニング

限界希釈法にて播種し、3週間培養した後生じた

コロニーの位相差顕微鏡像を図1に示す。種々の形態を示すコロニーが観察されたが、代表的には、1) ほとんどが球形を呈し、基質接着性が比較的強いもの(図1A)、2) ほとんどが球形を呈し、基質への接着性よりも細胞間の接着性が強いもの(図1B)、3) 紡錘形の細胞体と、主として二極性の長い突起をも

つもの(図1C)、4) 細胞体は紡錘形を呈し、比較的短い突起を伸展するもの(図1D)、の四種が生じた。比較のための親株の細胞形態は図2Aに示す。

図1Aに示した細胞につき、再度サブクロニングを行い、得られたほぼ均質な細胞集団をB6細胞と名付けた。

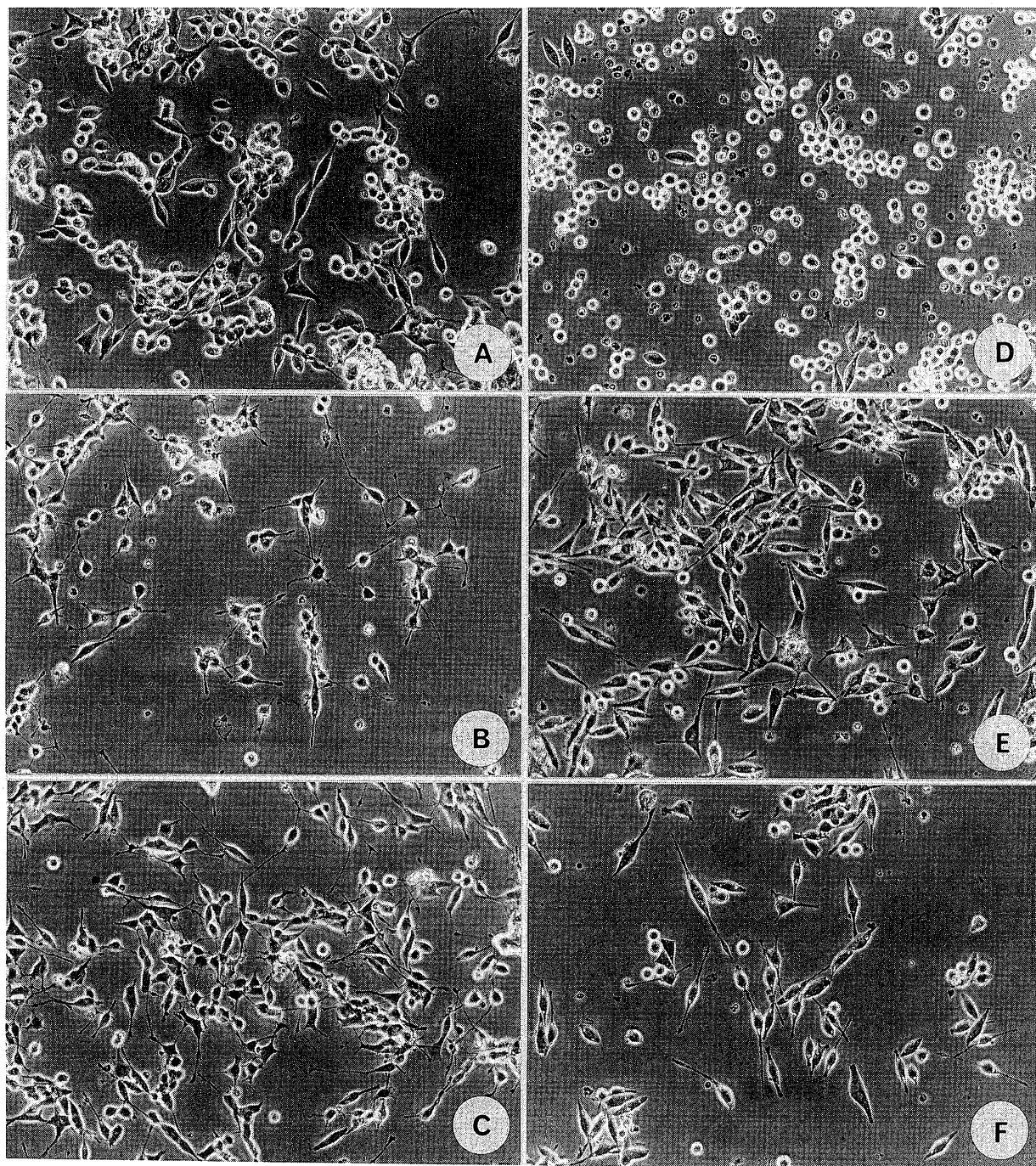


第1図 rMTC 6-23細胞より分離したサブクローン細胞の位相差顕微鏡像
× 120 (A-C)、× 60 (D)

(2) 細胞形態に対する薬剤の影響

上述のB6細胞ならびにその親株であるrMTC6-23細胞、それぞれにdbcAMP (2mM) およびH-7 (50 μ M) を与えたときの細胞形態を図2に示す。まず親株についてであるが、対照群では球形や紡錘形の細胞、様々な長さの突起を伸ばした細胞などが観察され、この細胞株が不均一な細胞集団であることがわかる(図2A)。またdbcAMP添加群では、半数以上の細胞が主として20から80 μ m程度の突起を伸展している像が観察された(図2B)。H-7添加群では、多く

胞、様々な長さの突起を伸ばした細胞などが観察され、この細胞株が不均一な細胞集団であることがわかる(図2A)。またdbcAMP添加群では、半数以上の細胞が主として20から80 μ m程度の突起を伸展している像が観察された(図2B)。H-7添加群では、多く



第2図 rMTC 6-23細胞およびB6細胞の形態に対するdbcAMPならびにH-7の影響

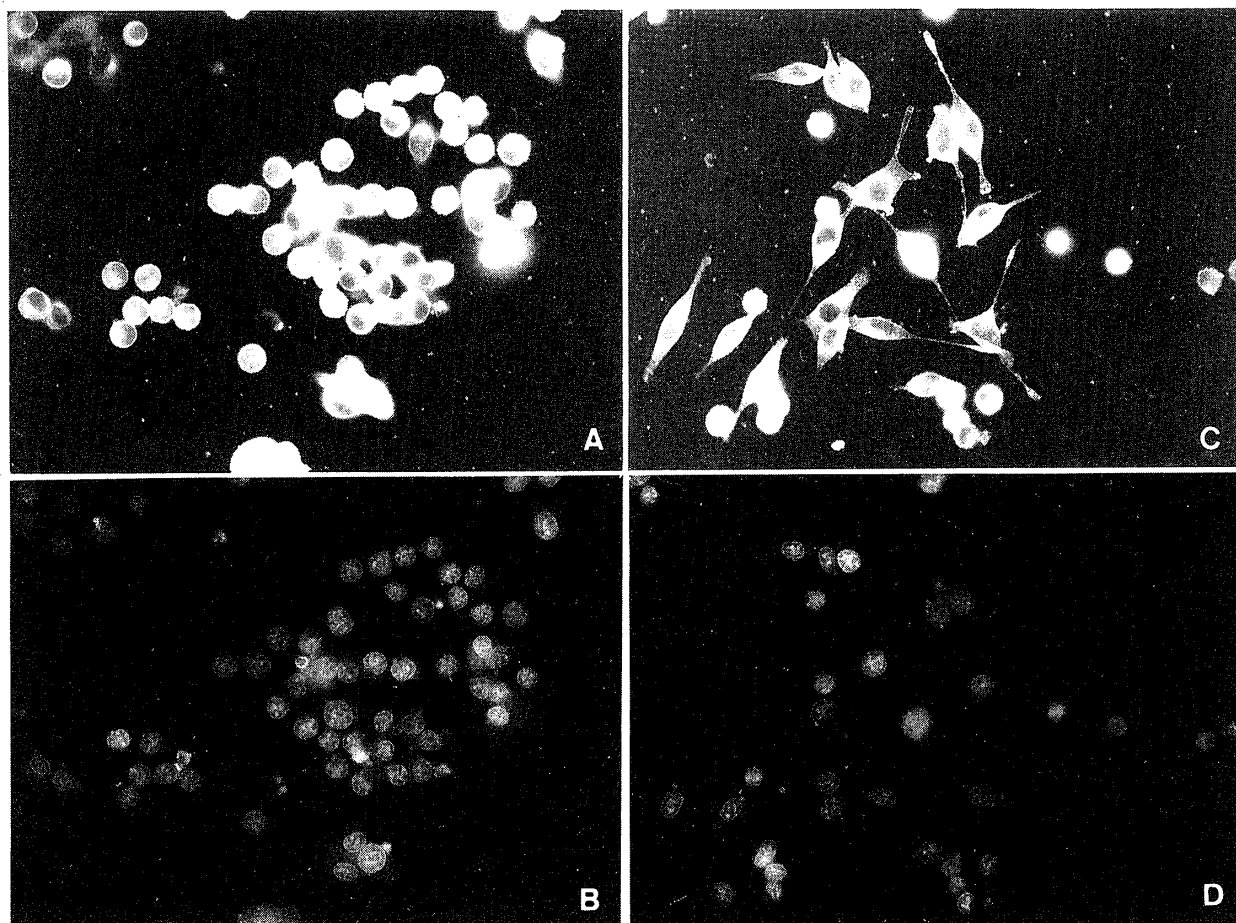
rMTC 6-23細胞 (A-C) およびそのサブクローンであるB6細胞 (D-F) を、通常の培養条件下 (A、D)、2mM dbcAMP存在下 (B、E)、あるいは50 μ M H-7存在下 (C、F) で、48時間培養したときの位相差顕微鏡像を示す。 $\times 120$

の細胞が細く長い突起を伸展した。その突起は最大 $300\mu\text{m}$ にも達した (図2C)。一方B6細胞では、通常の培養条件下ではほとんどの細胞が球形のほぼ均一な形態を呈していた (図2D) が、dbcAMPやH-7を添加した場合には、約50%の細胞において突起の形成が認められた (図2E、2F)。H-7添加群では、この突起を伸展した細胞の多くは紡錘形の細胞体と二極性の突起を有した細胞であった (図2F) が、dbcAMP添加群では二極性のみならず多極性の細胞も多く観察された (図2E)。いずれの場合にも突起の長さは20から $100\mu\text{m}$ 程度であった。

(3) NCAMの発現

B6細胞におけるNCAMの発現を免疫細胞化学的

手法により調べた結果を図3に示した。B6細胞の表面は、NA1206抗体により強く染色された (図3A) が、12E3抗体によってはほとんど染色されなかった (図3B)。このことからB6細胞は、12E3抗体によって認識されるポリシアロ糖鎖のエピトープを欠くNCAM (すなわち胎仔型ではないNCAM) を、その細胞表面全体に発現していることが示された。dbcAMPによって突起伸展を誘起した場合にも同様の結果が得られた (図3C、3D)。なお写真は示していないが、H-7添加群においてもやはり同様の結果が得られた。



第3図 B6細胞におけるNCAMの発現

B6細胞を通常の培養条件下 (A、B) あるいは2mM dbcAMP存在下 (C、D) で、48時間培養した後、二種の抗NCAM抗体による二重免疫染色をほどこした。AとCはNA1206抗体を、またBとDは12E3モノクローナル抗体を用いた結果を示す。 $\times 240$

考 察

本研究では、ラットC細胞株であるrMTC6-23細胞を材料として、サブクローニングを2回繰り返すことによって、形態的にはほぼ均質な細胞集団“B6”を得ることに成功した。このB6細胞は通常の細胞培養条件下ではほとんど突起を形成しない。そのため、薬剤による神経様形態変化を研究する上で、親株であるrMTC 6-23細胞よりも有利であると考えられる。またNCAMの発現については、親株では多量のポリシアロ糖鎖をもつ胎仔型NCAM⁹⁾を発現する細胞と、非胎仔型NCAMを発現する細胞とが約1対1の割合で混在していた⁹⁾が、B6細胞ではすべてが非胎仔型NCAMのみを発現しており、この点でも均質な集団であることが確認された。さらにB6細胞は、球形を呈する細胞としては比較的強い基質接着性を示した。すなわち図1Bに示すような三次元的な細胞塊を形成することが少なく、培地交換の手間、実験の定量性、個々の細胞形態の観察、のいずれの点でも優れた細胞群であることが示唆された。

このB6細胞は、図2D-Fに示すようにdbcAMPやH-7に反応して突起を伸展する性質を示した。これらの突起は長くても100 μ m程度であり、親株の一部の細胞に見られたような300 μ mもの長い突起は全く認められなかった。このように長い突起を形成する細胞は、たとえば図1Cに示す細胞群のように、通常の培養条件下でもある程度の長さの突起を伸展しているのかもしれない。この推測を支持する結果として、図1Cに示す細胞にH-7を与えた場合には、その突起が極めて長く伸展することを確認した（写真は示していない）。これらの二種の細胞群を比較したとき、形成される突起の長さは短いものの、B6細胞の方が突起形成開始の分子機構を研究するうえではすぐれたモデル系であると考えられる。

今回用いたH-7は、一般にはプロテインキナーゼCの阻害剤であると言われているが、実際にはその阻害選択性は乏しく、むしろ非選択的プロテインキナーゼ阻害剤と考えるほうが妥当である¹⁰⁾。従って本研究の結果だけからではC細胞の突起形成に関与するプロテインキナーゼのサブタイプを決定することはできない。ただしH-7の構造類似体であるHA1004はB6細胞において突起形成を誘起しなかった。HA1004はH-7と比較し、プロテインキナーゼC

に対する阻害作用が弱く、他のキナーゼに対しては同等の阻害作用を示す薬剤である。そのため、この形態変化はプロテインキナーゼCの阻害に起因することが示唆された。また、H-7によるこの突起形成促進作用は、プロテインホスファターゼの強力な阻害剤であるオカダ酸^{11,12)} (30nM) によって完全に阻害された（データは示していない）。このことは確かに何らかのタンパク質の脱リン酸化が、B6細胞の突起形成に関与していることを示している。さらにこのH-7の効果は、アクチノマイシンD、シクロヘキシミド、コルディセピンなどのタンパク質合成阻害剤の存在下においても、全く影響を受けなかった（データは示していない）。従ってこの形態変化には新たなタンパク質合成系は関与しておらず、既存のタンパク質の脱リン酸化が突起形成に関与していることが推測された。ここに生ずる次の問題は、「この突起形成に関連して脱リン酸化を受けるタンパク質の本体は何であるか」ということである。

さて球形の細胞が新たに突起を生み出すためには、どのような装置が必要であろうか。神経突起を例に挙げると、その突起の中には微小管ならびにニューロフィラメントの各細胞骨格成分が、その長軸方向に一致して配向しており、特に微小管においては微小管関連ペプチドであるMAP-2やタウなどの分子が、その重合状態を安定化していることが知られている¹³⁾。我々はすでにrMTC 6-23細胞の突起は微小管骨格を有することを報告した⁶⁾。また最近になってrMTC 6-23細胞は、タウ抗体に反応する分子量約11万のタンパク質を保有していることが明らかになった（西山ら、投稿準備中）。このタンパク質は、末梢神経細胞¹⁴⁾や、PC-12細胞¹⁴⁾、ニューロblastoma細胞¹⁵⁾などに認められる高分子量タウと類似した、あるいは同一の物質と考えられる。興味深いことに、タウタンパク質は種々のプロテインキナーゼによってリン酸化を受ける部位を豊富にもち、またリン酸化によってその重合微小管安定化能が低下することが知られている¹⁶⁾。以上のことを考慮すると、先に記したB6細胞の突起形成に関連して脱リン酸化を受けるタンパク質の候補のひとつとして、この高分子量タウを挙げることができる。無論その他の分子の関与を否定することはできないが、まずはこの分子に着目し、今回報告した新規細胞亜株B6の突起形成と、高分子量タウタンパク質のリン酸化状態との相

互関係につき、今後検討を加える予定である。この研究成果がC細胞の発現形質の安定性と可塑性を考えるうえで、重要な知見を与えることが期待される。

NCAM抗体12E3を御供与下さいました順天堂大学医学部解剖学第二教室の石龍徳先生に感謝致します。また、実験器具・機器などの使用に多大なる御援助を賜りました、本学園短期大学生活科の教職員の皆様に深く感謝致します。

文 献

- 1) Le Douarin, N.: The Neural Crest, (Cambridge Univ. Press) (1982)
- 2) Bernd, P., Gershon, M.D., Nunez, E.A. and Tamir, H.: Anat. Rec., 193, 257 (1979)
- 3) Nishiyama, I. and Fujii, T.: Exp. Cell Res., 198, 214 (1992)
- 4) Nishiyama, I., Seki, T., Oota, T., Ohta, M. and Ogiso M.: Zool. Sci., 9, 1183 (1992)
- 5) Nishiyama, I., Seki, T., Oota, T., Ohta, M. and Ogiso M.: Neuroscience, 56, 777 (1993)
- 6) 西山一朗：細胞、24, 410 (1992)
- 7) Zeytinoglu, F.N., DeLellis, R.A., Gagel, R.F., Wolfe, H.J. and Tashjian, A.H.Jr: Endocrinology, 107, 509 (1980)
- 8) Seki, T. and Arai, Y.: Anat. Embryol., 184, 395 (1991)
- 9) Rougon, G., Deagostini-Bazin, H., Hirn, M. and Goridis, C.: EMBO J., 1, 1239 (1982)
- 10) 萩原正敏、日高弘義：生体の科学、40, 361 (1989)
- 11) Bialojan, C. and Takai, A.: Biochem. J., 256, 283 (1988)
- 12) Cohen, P., Klumpp, S. and Schelling, D.L.: FEBS Lett., 250, 596 (1989)
- 13) Tucker, R.P.: Brain Res. Rev., 15, 101 (1990)
- 14) Goedert, M., Spillantini, M.G. and Crowther R.A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1983 (1992)
- 15) Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R.K.H., Shelanski, M.L. and Nunez, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4378 (1992)
- 16) 室伏擴：生体の科学、43, 281 (1992)