

## ラット甲状腺における細胞外基質糖タンパク質 ならびに細胞接着分子の局在

西山 一朗<sup>1</sup>、太田 忠親<sup>2</sup>

1 駒沢女子大学・人文学部

2 東京農業大学・アイソトープセンター

Localization of extracellular matrix glycoproteins and cell adhesion molecules in neonatal rat thyroid gland.

Ichiro NISHIYAMA, Tadachika OOTA

Thyroid glands of mammals are composed of two embryologically different types of endocrine cells, follicular cells of endodermal origin and calcitonin-producing cells (C-cells) of ectodermal origin. To investigate the molecular mechanism of thyroid organogenesis, the expression of extracellular matrix glycoproteins and cell adhesion molecules was immunohistochemically examined in neonatal rat thyroid glands, with special reference to C-cells. In 3-day-old rat thyroid glands, follicles in various stages of development were present. The follicles were surrounded by a thin, continuous rim of immunoreactivities to extracellular matrix components, such as type IV collagen, laminin and cellular fibronectin, suggesting the presence of basement membrane. C-cells were scattered alone or in small groups between the epithelial walls of thyroid follicles. Some C-cells were surrounded together with the follicles by the basement membrane, and the others were found in the discontinuous parts of the basement membrane. These results suggest that C-cells are gradually separated each other by the basement membrane in the process of follicle formation.

Almost all the C-cells, but none of the surrounding follicular cells, were found to express highly polysialylated neural cell adhesion molecule on the cell surfaces. Since highly polysialylated neural cell adhesion molecule is known to prevent cell-to-cell adhesion, it is possible that the expression of this molecule on the C-cells allows them to disperse into the thyroid glands.

### 緒 言

哺乳動物の甲状腺は、発生起源の異なる二種類の内分泌細胞から構成されている。一方は内胚葉由来の濾胞細胞であり、また他方は外胚葉由来のC細胞（傍濾胞細胞とも呼ばれる）である。濾胞細胞は、チロキシンならびにトリヨードチロニンと呼ばれる甲状腺ホルモンを分泌し、またC細胞は、カルシトニンと呼ばれる血中カルシウム低下作用をもつホルモンを分泌する生理機能を果たしている。

哺乳動物以外の脊椎動物では、甲状腺とC細胞とは別個の独立した内分泌器官を形成しており、このC細胞の集合体は鰓後体と呼ばれている。一方哺乳動物では、胎仔期に一次的に鰓後体が形成されるが、その後の器官形成過程において、この鰓後体は甲状腺内に侵入・分散することが知られている<sup>1)</sup>。そのため哺乳動物

の成熟甲状腺では、濾胞間にC細胞が散在する組織構築が完成される。この細胞移動を伴う器官形成過程には、C細胞および濾胞細胞の同種ならびに異種細胞間での細胞接着性のダイナミックな変化が関与するものと考えられる。この器官成形に与る細胞間相互作用を考察するためには、まず細胞移動の足場となり得る基底膜の構成分子、ならびに直接細胞接着に関与する各種接着分子の甲状腺内における局在を調べることが必要である。

基底膜は上皮組織と結合組織との間を境する連続性の膜状構造であり、これを構成する分子としては、タイプIVコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの糖タンパク質が知られている。ヒト甲状腺内においては、これらの基底膜成分が濾胞構造の周囲に局在することが報告されている<sup>2,3)</sup>。しかしこれは、既に器官形成を完了した甲状腺を対象とした結果であり、またC細胞との位置関係についての知見も全く示されていない。我々は、甲状腺器官形成の分子機構を考えるために、未だ器官形成の過程にある生後3日のラット甲状腺を対象とし、上記基底膜成分や神経細胞接着分子 (Neural Cell Adhesion Molecule, 以後NCAMと略記する)、およびC細胞の細胞質マーカーであるカルシトニンの局在について、免疫組織化学的調査を行った。

## 材料と方法

実験には3日齢のウィスター系雄性ラット (チャールズリバー・ジャパン) を用いた。甲状腺・副甲状腺複合体は、摘出後直ちに氷冷した4%パラホルムアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) に浸漬し、4℃にて一晚固定した。この試料より常法に従って、5  $\mu$ m厚の凍結切片を作成し、卵白コートスライドグラス上にマウントした。この切片に対し、表1に示す抗体類を用いた間接蛍光抗体法を行った後、バノックス蛍光顕微鏡 (オリンパス) にて、各々の抗原分子の局在を観察した。顕微鏡像は、Tマックスフィルム (コダック、ISO 400) を用いて撮影・記録した。なお間接蛍光抗体法の詳細は、我々の既報に記載した通りである<sup>4,5)</sup>。

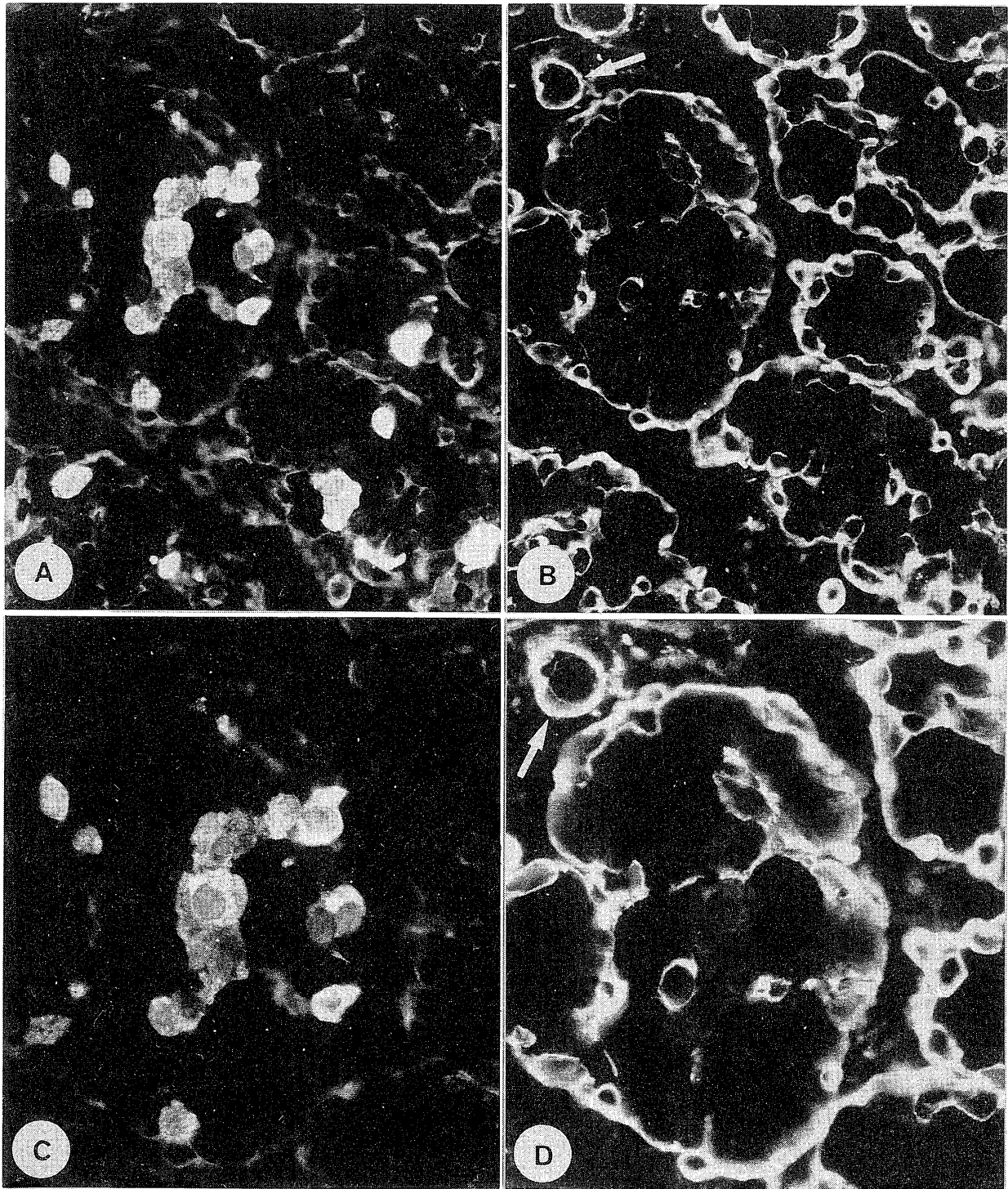
表1 本研究に用いた特異抗体の種類とその最適希釈率

一次抗体	二次抗体
ウサギ抗ヒトカルシトニン* (1:1,000、アイ・シー・エヌ社)	RITC標識ヤギ抗ウサギIgG (カッペル社、1:100)
ウサギ抗ヒトコラーゲンタイプIV* (1:500、エル・エス・エル社)	
ウサギ抗マウスラミニン* (1:100、サンバイオ社)	
ウサギ抗ラットNCAMペプチド (1:250、アフィニティリサーチプロダクツ社)	
マウス抗ヒトカルシトニン* (1:500、コスモバイオ社)	
マウス抗ヒト細胞性フィブロネクチン* (1:300、バイオヒット社)	FITC標識ヤギ抗マウスIgG (カッペル社、1:200)

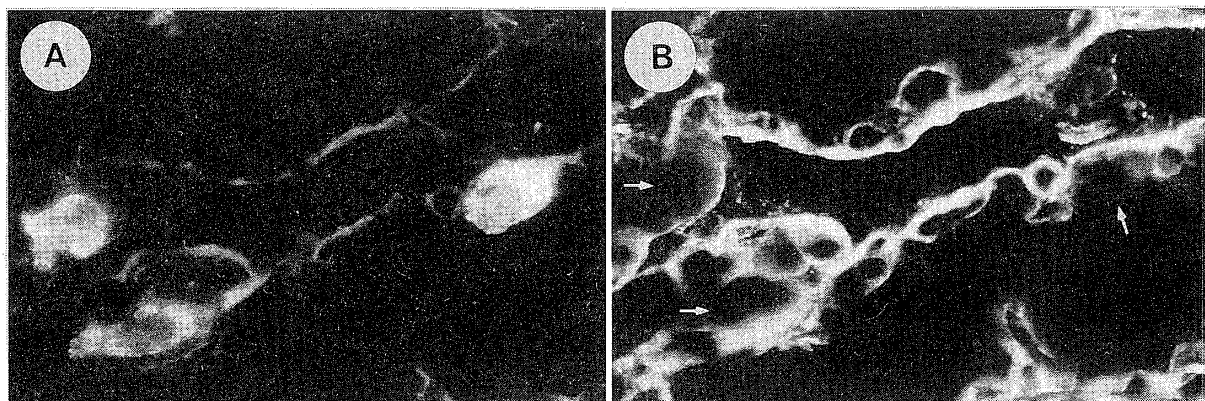
\* ラット抗原に対する免疫反応性は、各製造会社のデータシートにより確認済である。

## 結果

3日齢ラット甲状腺切片を、カルシトニン抗体およびタイプIVコラーゲン抗体により二重染色した像を図1に示す。この時期にはまだ甲状腺濾胞は未熟で、外径が60 $\mu$ m程度と、成熟ラットのおよそ5分の1であった。しかし、濾胞の基本構造は確立しており、濾胞内腔もはっきりと認められた。また、C細胞はすでに濾胞間に分散していることが確認された。すなわちC細胞は濾胞間に単独で、あるいは2~5個の集合体として認められた。C細胞の細胞質はカルシトニン抗体に対し、強い免疫反応性を示した (図1A、C)。



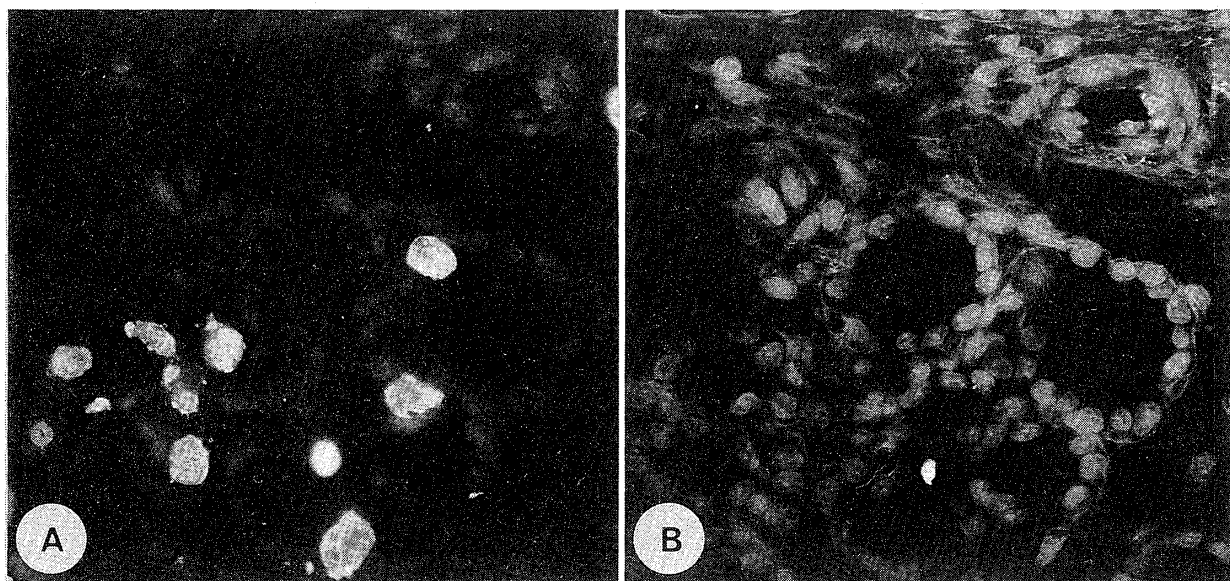
第1図 3日齢ラット甲状腺におけるC細胞とタイプⅣコラーゲンの局在  
 甲状腺切片に対し、カルシトニン（A、C）およびタイプⅣコラーゲン（B、D）に対する抗体を用いた二重免疫染色を行った。（C）および（D）は、（A）および（B）それぞれの一部を強拡大した像を示す。（B）と（D）の矢印は血管の基底膜を示す。  
 A、B：×350. C、D：×500.



第2図 3日齢ラット甲状腺におけるC細胞とタイプIVコラーゲンの局在  
甲状腺切片に対し、カルシトニン（A）およびタイプIVコラーゲン（B）に対する抗体を用いた二重免疫染色を行った。（B）の矢印はC細胞の位置を示す。×500。

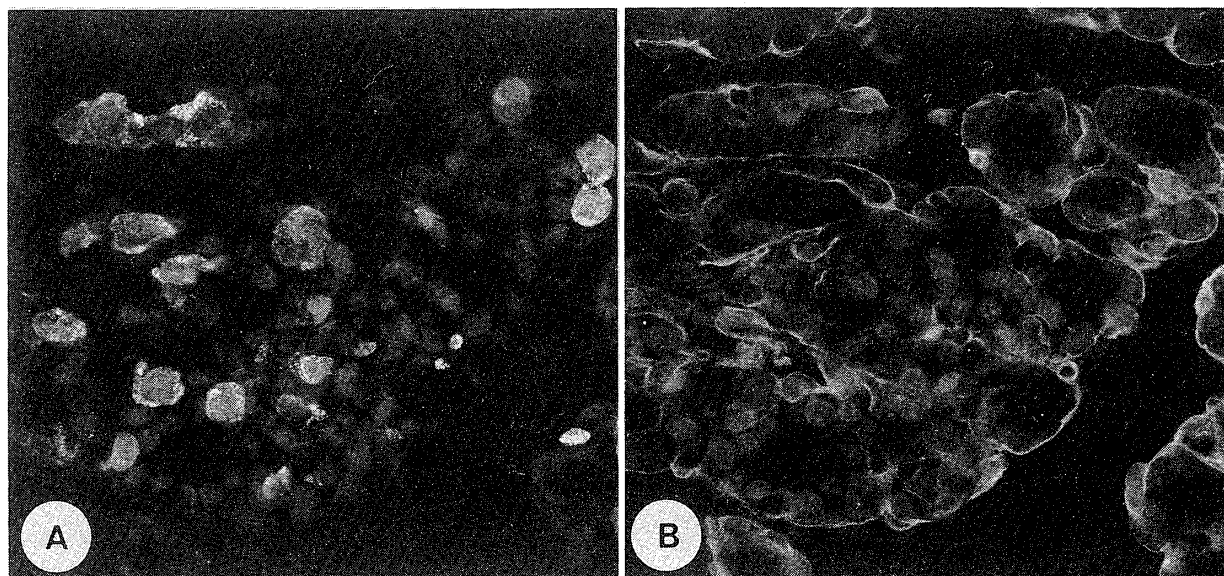
この甲状腺におけるタイプIVコラーゲン免疫反応性は、濾胞構造の周囲に連続性の膜状構造として認められた。これは基底膜と一致するものと考えられる。なお、このタイプIVコラーゲン免疫反応性は、必ずしも単一の濾胞のみを取り巻いているとは限らず、複数の濾胞を取り巻いている像も観察された（図1 B、D）。C細胞が存在する部分では、このタイプIVコラーゲン免疫反応性はしばしば認められず、基底膜の不連続部を形成する場合が観察された（図1 C、D）。またある場合にはC細胞は隣接するいずれかの濾胞と共に、タイプIVコラーゲン層に取り巻かれていた。すなわちC細胞は、その細胞表面の一部でタイプIVコラーゲンと接し、また他の細胞表面はタイプIVコラーゲン（あるいは基底膜）を介さずに濾胞細胞と接していることが示唆された（図2）。甲状腺内には、この濾胞を取り巻く基底膜の他に血管周囲の基底膜も存在するが、この部分もタイプIVコラーゲン陽性を示した（図1 B、D矢印）。

図3にカルシトニンと細胞性フィブロネクチンの、また、図4にカルシトニンとラミニンの、3日齢ラット甲状腺内での局在を示す。フィブロネクチンもラミニンも、基本的には上述のタイプIVコラーゲンとほぼ



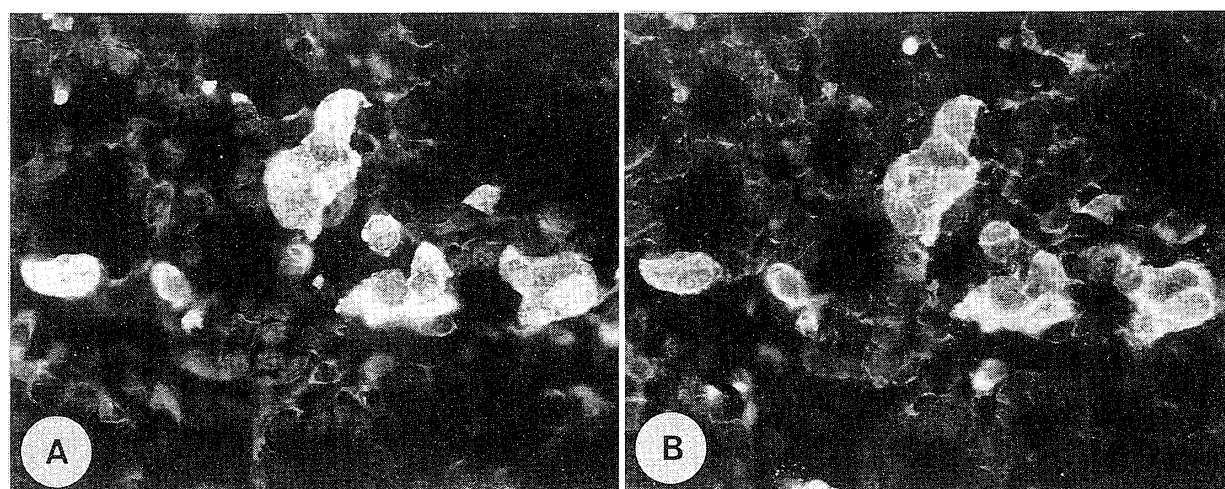
第3図 3日齢ラット甲状腺におけるC細胞とフィブロネクチンの局在  
甲状腺切片に対し、カルシトニン（A）およびフィブロネクチン（B）に対する抗体を用いた二重免疫染色を行った。×350。

同様の局在パターンを示した。すなわち基底膜に一致した局在が観察され、C細胞は濾胞と共に基底膜に取り巻かれている場合と、C細胞のある部分で基底膜がとぎれている場合とが観察された。また、フィブロネクチンでは基底膜以外に結合組織中にも線維状の免疫反応性が認められた。



第4図 3日齢ラット甲状腺におけるC細胞とラミニンの局在  
甲状腺切片に対し、カルシトニン（A）およびラミニン（B）に対する抗体を用いた二重免疫染色を行った。×350.

コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの分子に対するリガンドとなる細胞接着分子としては、種々のサブタイプのインテグリンが知られている。そこで、インテグリン  $\alpha_1$ 、 $\alpha_3$ ならびに  $\alpha_5$  に対する抗体を用いた染色を行ったが、3日齢ラット甲状腺内には、これらに対する特異的な免疫反応性は認められなかった。また、E-カドヘリンやN-カドヘリンなどのホモフィリックな細胞接着分子に対する抗体を用いた結果も、同様に陰性であった（写真は示していない）。



第5図 3日齢ラット甲状腺におけるC細胞と神経細胞接着分子（NCAM）の局在  
甲状腺切片に対し、カルシトニン（A）およびNCAM（B）に対する抗体を用いた二重免疫染色を行った。×350.

一方、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するNCAMの局在を調べた結果を図5に示す。ほとんどすべてのC細胞がNCAM免疫反応陽性であることが示された。NCAM免疫反応性は、主として細胞表面に強く認められた。

## 考 察

本実験の結果より、3日齢ラット甲状腺ではタイプIVコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンは主として甲状腺濾胞の周囲に局在していることが示された。この結果は、MiettinenとVirtanen(1984)<sup>2)</sup>やKatohら(1993)<sup>3)</sup>が、ヒト甲状腺について報告した結果と一致する。これらの分子は基底膜を構成する主成分であることから、生後3日において既に濾胞周囲に基底膜が形成され、これにより各々の濾胞が分離されていることが示唆された。図1に示すように、複数の濾胞構造の周囲が一連の基底膜に覆われている像も観察されたが、これは恐らく基底膜により各々の濾胞へと分断される途段階にある組織像だと考えられる。

この時期既にC細胞は、濾胞間に単独で、あるいは複数の細胞集団として散在していたが、濾胞と共に基底膜に覆われている場合(図2)と、基底膜の不連続部分を形成する場合(図1)とが認められた。なお、C細胞が複数の細胞集団として存在する場合には基底膜に囲まれておらず、単独で存在する場合には基底膜に囲まれている傾向が認められた。このことより、各々の濾胞の周囲に基底膜が形成され、濾胞構造が完成されていく過程で、C細胞がいずれかの濾胞に取り込まれ、その結果として、既にある程度分散していたC細胞が、さらに細かく分散される可能性が考えられる。

このような器官形成を考えるためには、基底膜がどのように形成されるかを考える必要がある。Garbiら(1988)<sup>6)</sup>は、甲状腺濾胞細胞由来の株細胞であるFRTL-5細胞を用い、これがタイプIVコラーゲン、フィブロネクチンならびにラミニンを合成し、細胞表面へと分泌することを示した。この結果と甲状腺内における基底膜の位置を考え合わせると、濾胞細胞がその基底側に基底膜成分を分泌することによって基底膜が形成されることが示唆される。一方C細胞に関しては、これらの基底膜構成成分の合成能についての報告は皆無である。従って図2に示すようなC細胞の一部を覆っている基底膜の成分が、C細胞自身によって合成・分泌されたものか、あるいは濾胞細胞や結合組織に由来するものかは不明である。C細胞が濾胞と共に基底膜に覆われる過程で、C細胞自身に極性が生じ、一方のみに基底膜成分を分泌するのか、あるいは濾胞細胞などにより形成される基底膜に、ただ受動的に包み込まれるのかは、器官形成と細胞間相互作用を考える上で、大変興味深い問題であり、今後の検討を要する。

次に細胞接着分子についてであるが、本研究では、基底膜成分と細胞との接着に関与すると考えられるインテグリンファミリーならびに、細胞-細胞間の接着に関与すると考えられるカドヘリンファミリーおよびNCAMに対する抗体を用いた免疫染色を試みた。その結果、インテグリン $\alpha_1$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_5$ の各サブユニットならびにN-およびE-カドヘリンの免疫反応性は、甲状腺内には検出されなかった。ただしこの結果は、これらの分子が甲状腺内に存在しないことを示すものではない。特にカドヘリンは、組織の固定方法によりその免疫反応性が大きく異なる場合があることが知られているため、今後固定方法を改変したり、未固定試料を用いるなどの試行を要するものと思われる。

一方NCAMに関しては、図5に示すように、ほぼすべてのC細胞の表面に免疫反応性が認められた。NCAMは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖タンパク質であり、その細胞外タンパクドメインによりホモフィリックな結合活性を発揮する細胞接着分子である<sup>7)</sup>。このNCAMが、C細胞の表面には存在し、周囲の他の細胞には存在しないことから、この分子はC細胞同志を結合させる働きを担っている可能性が考えられる。しかしこの時期にC細胞表面にNCAMが発現していることは、甲状腺器官形成過程でC細胞が分散することと矛盾するようにも思われる。ごく最近になって我々は、このC細胞表面に発現するNCAMは、高度にポリシアル化された、いわゆる「胎仔型NCAM」であることを発見した(西山ら、投稿準備中)。胎仔型NCAMのポリシアロ糖鎖は、その多量の負の電荷ならびに立体障害により、NCAM-



NCAMのホモフィリックな結合および他の接着分子による接着機能を阻害することが知られている<sup>8)</sup>。すなわちNCAMが細胞接着分子として働くのに対し、胎仔型NCAMは逆に細胞非接着分子として機能するものと考えられる。この胎仔型NCAMの細胞接着阻害作用は、神経細胞における軸索の進路決定や分枝形成などに寄与するとの実験結果が報告されている<sup>9)</sup>。甲状腺においてもこの胎仔型NCAMの作用により、C細胞-C細胞間の結合が弱められ、その結果C細胞が分散し各々の濾胞とともに基底膜に包み込まれることを可能にしているのかもしれない。この仮定を確かめるためには、基底膜構成成分や胎仔型NCAM、その他の各種機能分子の発現を、胎仔期を含む他の発生段階の甲状腺において調べることが必要であり、現在この方針で検討を進めている。

## 謝 辞

本研究を行うにあたって、実験器具・機械などの使用に多大な御援助を賜りました、本学園短期大学生生活科の教職員の皆様に深く感謝致します。なお、本研究の一部は、文部省科学研究助成 (No. 06780620、西山) ならびに笹川科学研究助成 (No. 7-147、西山) により行われた。

## 文 献

- 1) Fujita, T., Kanno, T. and Kobayashi, S.: The Paraneuron, (Springer), p.145 (1988)
- 2) Miettinen, M. and Virtanen, I.: Int. J. Cancer, 34, 27 (1984)
- 3) Katoh, R., Muramatsu, A., Kawaoi, A., Komiyama, A., Suzuki, K., Hemmi, A. and Katayama, S.: Virchows Arch. [A], 423, 417 (1993)
- 4) Nishiyama, I. and Fujii T.: Exp. Cell Res., 198, 214 (1992)
- 5) Nishiyama, I., Seki, T., Oota, T., Ohta, M. and Ogiso M.: Neuroscience, 56, 777 (1993)
- 6) Garbi, C., Zurzolo, C., Bifulco, M. and Nitsch L.: J. Cell. Physiol., 135, 39 (1988)
- 7) 石龍徳：細胞工学別冊 接着分子ハンドブック、(秀潤社)、P.168 (1994)
- 8) Seki, T. and Arai, Y.: Neurosci. Res., 17, 265 (1993)
- 9) Rutishauser, U. and Landmesser, L.: Trends Neurosci., 14, 528 (1991)