

研究ノート

培養細胞を用いたgap-junctionを介する 細胞間情報伝達に関する研究

- 蛍光色素の細胞内直接注入による検討 -

伊波香 今井昭一

昨年度の本誌に、scrape-loadingによって蛍光色素を細胞内に取り込ませ、周囲細胞への移行の様子で、gap-junctionを介する細胞間の情報交換について検討するEl-Foulyらの手法について紹介すると共に、この方法を用い、腎上皮由来の細胞と言われるNRK-52E細胞で得られた結果の幾つかについて報告したが、今回は、1つの細胞に、直接選択的に、蛍光色素を注入する事のできる微量注入装置を用いて、蛍光色素を直接細胞内に注入する方法で行った実験の結果について報告する。細胞は、昨年同様、NRK-52E細胞であり、細胞間情報交換の指標とした蛍光色素も同じくlucifer yellow(LY)である。色素が注入された細胞を明らかにする為、LYと共にethidium bromide(EB)を細胞内に注入した。微量注入装置の自動注入機能を利用し、保持圧を150ヘクトパスカル、注入圧を800-1100ヘクトパスカル、注入時間を0.8秒に設定して注入を行った。その結果、NRK-52E細胞群では、1つの細胞に注入された色素は、ほぼ均等に周囲の細胞に拡がること、10-15分で、色素の拡がりはピークに達する事、代表的な腫瘍プロモーターであるTPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)(10-100 ng/ml)、10-20分処置によって、色素の拡がりが完全に抑制されることがわかった。

I 緒言

前報¹⁾では、培養細胞を用いてgap-junctionを介する細胞間情報伝達について研究する為の簡便な実験法であるscrape-loading法²⁾について紹介すると共に、得られた結果の2、3について報告したが、本報では選択した1つの細胞に蛍光色素を確実に注入する事のできる細胞内微量注入装置を用いて検討した結果について報告する。

II 実験方法

前報同様、実験にはラット腎由来の上皮性細胞と言われるNRK-52E細胞(以下NRK細胞)を用いた。細胞培養液も前報同様で、10% FBS加Dulbecco's MEM [Low](旭テクノグラスIWAKI)(ペニシリンGナトリウムを100 u/ ml含む)である。

Gap junctionを介する細胞間の情報交換の観察には、前報同様、Lucifer yellow CH(以下LY)の蛍光を利用したが、LYの細胞内への導入にはscrape loading法ではなく、ガラス毛細管(Eppendorf Femtotips 5242 952.008)とマイクロインジェクター(Eppendorf microinjector FemtoJet)を使用する直接微量注入法を採用した。

LYが注入された細胞を同定するため、もう1つの蛍光色素ethidium bromide(以下EB)を含むLY、EB混合液(LY[Sigma]を10%、EB[Sigma]を0.05%含む0.33M LiCl液)を作製し、沈殿物を除去するため使用直前冷却遠心機(久保田マイクロミニ3615)で15,000 r.p.m.で15分遠沈

した上で、マイクロローダー(Eppendorf microloader 5242 956.003)を用いてガラス毛細管に充填した。

マイクロインジェクターの自動注入機能を利用し、保持圧を150ヘクトパスカル、注入圧を800-1000ヘクトパスカル、注入時間を0.8 secに設定した。

細胞の位相差像、LY、EBの発する蛍光の観察には、倒立蛍光顕微鏡(Leitz DMIRB[SLR]、蛍光フィルターブロックL5, N3を装備)、一眼レフカメラ(Nikon FM3A)を用いた。

注入操作の詳細は以下の通りである

- 1) 色素を充填したガラス毛細管をマイクロマニプレーター(Eppendorf micromanipulator 5171)に装着し、マニプレーターを操作して毛細管の先端を培養液中に進入させたら、顕微鏡のフォーカスを細胞の表面に合わせ、培養細胞の位相差像を観察して色素の注入を行う細胞を決定し、位相差像の撮影を行う。
- 2) マニプレーターを操作して、毛細管の先端を細胞表面に近い位置まで送り込んだ上で、顕微鏡を操作してフォーカスを毛細管の先端に合わせる。
- 3) 毛細管の先端を更に細胞表面に近づけ、顕微鏡を動かして再びフォーカスを毛細管の先端に合わせる。
- 4) 3)の操作を繰り返し毛細管の先端を充分細胞表面に近づけてから、自動注入機能を利用して毛細管を細胞内に刺入させ、色素を注入させる。

注入に成功したら顕微鏡を蛍光モードに切り替え、先ずEBの蛍光観察と写真撮影を、次いでLYの蛍光観察と写真撮影を行う。以後、LY蛍光の広がりを適宜観察し、写真撮影を行う。

1) 沖縄県立看護大学 人体構造機能研究部門

Gap-junctionを介する細胞間情報伝達を阻害する可能性のある物質として、前報同様phorbol estersの1つである、TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate、Sigma)を用いた。

TPAは、DMSO(Sigma)に1 mg/mlの濃度に溶解させてstock solutionを作り10 μ l 1づつ分注して-80 $^{\circ}$ Cに保存した。実験に先立ちこのstock solution 10 μ lに、PBS(+)(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Ca^{2+} and Mg^{2+} [和光純薬]) 990 μ lを加えて10 μ g/mlのPBS溶液に変えた。実験には、このPBS溶液100 μ lにPBS(+) 2400 μ lを加えて作った、400 ng/mlのworking solutionを使用した。

実験に使用した細胞は、以下のような手順で培養した。

- 1) 液体窒素タンク内に凍結保存されていたNRK細胞を37 $^{\circ}$ Cの恒温水槽で解凍し、予め50 mlのファルコンチューブに入れておいた6 mlの培養液に加え、1,500rpmで15分間遠沈させる(久保田卓上多本架遠心機KN-70)。パスツールピペットを使って上清を吸引除去した上で培養液1 mlを沈渣に速やかに加えよく攪拌する。
- 2) 得られた細胞浮遊液を、血球計算盤に注入して、0.1mm³中の細胞数を数え、浮遊液1 ml中の細胞数に換算、径60mmの培養ディッシュにそれぞれ10万細胞づつ分注した上で、総培養液量が4 mlになるよう培養液を追加する。8の字を描くようにディッシュを動かして細胞を均等に分布させ、CO₂インキュベーター(温度37.0 $^{\circ}$ C、CO₂濃度5.0%) (池本理化学10-0212)に移して、約1週間、コンフルエントになるまで培養する。

III 実験結果

図1aは実験に供されたNRK細胞の位相差像、図1b、cは1つの細胞に注入されたLYの隣接細胞への移行を示す蛍光像である。図1bは、注入直後、図1cは、注入後10分の像である。図1dはEBの蛍光像で、注入がどの細胞に行われたかを示す。図1b~1dから、NRK-52E細胞群では、1つの細胞に注入されたLYが時間の経過と共に周囲の細胞へ均等に拡がっていく事、周囲の細胞への拡がりは10-15分でピークに達する事がわかる。

図2は、LYの隣接細胞への移行に対する腫瘍プロモーターTPA(10-100 ng/ml)の作用を示すLY蛍光像の1例である。

TPAは培養液に10 ng/ml添加し10-15分作用させてからLYを注入した。

TPAにより、LYの隣接細胞への移行は完全に抑制された。

IV 考察

前報で報じたscrape-loading法による実験¹⁾では、腫瘍プロモーターTPAの濃度、作用時間などをいろいろに

変えてもLYの周囲細胞への移行は殆ど抑制されなかったが、今回の微量注入実験では10-100 ng/ml、10-20分という条件で、LYの周囲細胞への移行は完全に抑制された。これは同様の微量注入法で、BALB/c 3T3細胞、マウスの表皮細胞などで行われた実験の結果³⁻⁵⁾と一致している。

Scrape-loading法での我々の実験結果が、今回の我々の実験も含め微量注入法で行われた実験の結果と矛盾している理由は明らかでないが、蛍光色素のload時に Ca^{2+} 、 Mg^{2+} が存在すると蛍光色素の拡がり(spreading)が悪くなる細胞があるというOpsahl and Rivedal⁶⁾の記述に配慮して前報のscrape-loading実験では、LYの取り込みを Ca^{2+} (-)の条件下に行っていた事に原因があったのかも知れない。文献⁵⁾で使われた培養液は低 Ca^{2+} (0.08 mM)であるが Ca^{2+} (-)ではない。一方、NIH/3T3細胞、V79細胞、仔ウシ大動脈平滑筋のprimary cultureで、それぞれ、5 ng/ml、15分、5 ng/ml、1時間、10 ng/ml、30分のTPA処理でscrape-loading法で細胞に取り込ませたLYの移行が抑制されるという結果を報告しているEl-Fouly²⁾の論文にはLYを、PBSに溶かしたという記述しかなくPBSに Ca^{2+} 、 Mg^{2+} が入っていた可能性がある。付け加えると、微量注入法による今回の我々の実験ではLYの注入は Ca^{2+} (+)、 Mg^{2+} (+)の培養液の中で行われている。今後、 Ca^{2+} の濃度をいろいろに変えて検討を試みてみたい。

Scrape-loading法は、簡便であるがMcKarns and Doolittle⁷⁾も報じているようにLYのloadingが均一でない欠点があるし、1つのディッシュで1回の実験しか出来ない。これに対し、細胞内微量注入装置を用いれば、LYを選択した1つの細胞に確実に注入させる事ができるので、ディッシュのある部分の細胞群で、コントロールデータをとった後何らかの処置を加え、その効果について同じディッシュの他の部位の細胞群で検討する事ができるという利点がある。今後は、gap-junctionを介する細胞間の情報交換について腫瘍細胞も含めたNKR以外の細胞で検討すると共に、様々な薬物の作用についても検討を加えて行きたい。

Scrape-loading法の場合に比し色素の入る細胞数が少ないためであろうか、今回の実験では、scrape-loading法での実験に比べ、蛍光写真の撮影にかなりの長時間を要した。フィルムの感度を上げることに限度があるので、今後はCCDカメラを利用して、パソコンにデータを取り込むことなども試み、時間分解能の向上を図りたい。

文献

1. 宇根桐子、今井昭一：培養細胞を用いたgap-junctionを介する細胞間情報交換に関する研究---Scrape-loading法による検討--- 沖縄県立大学紀要 3, 121-127, 2002
2. El-Fouly M.H., Trosko J.E. and Chang C-C.: Scrape-

- loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp. Cell Res.* 168, 422-430, 1987
3. Enomoto T., Martel N., Kanno Y. and Yamasaki H. : Inhibition of cell-cell communication between BALB/c 3T3 cells by tumor promoters and protection by cAMP. *J. Cell Physiol.* 121, 323-333, 1984
4. Enomoto T. and Yamasaki H. : Phorbol ester-mediated inhibition of intercellular communication in BALB/c 3T3 cells: Relationship to enhancement of cell transformation. *Cancer Res.* 45, 2681-2688, 1985,
5. Enomoto T. and Kanno Y. : Effect of tumor promoter, TPA on cell communication and differentiation of mouse epidermal cells *Biomedical Res.* 7, Suppl. 2, 147-152, 1986
6. Opsahl H. and Rivedal E. : Quantitative determination of gap junction intercellular communication by scrape loading and image analysis. *Cell Adhes. Commun.* 7, 367-375, 2000
7. McKarns S.C. and Doolittle D.J. : Limitation of the scrape-loading/dye transfer technique to quantify inhibition of gap junctional intercellular communication. *Cell Biol. Toxicol.* 8, 89-103, 1992

図1 周囲細胞への蛍光色素 Lucifer yellow の移動を指標とした、gap-junction を介する細胞間情報交換の検討。

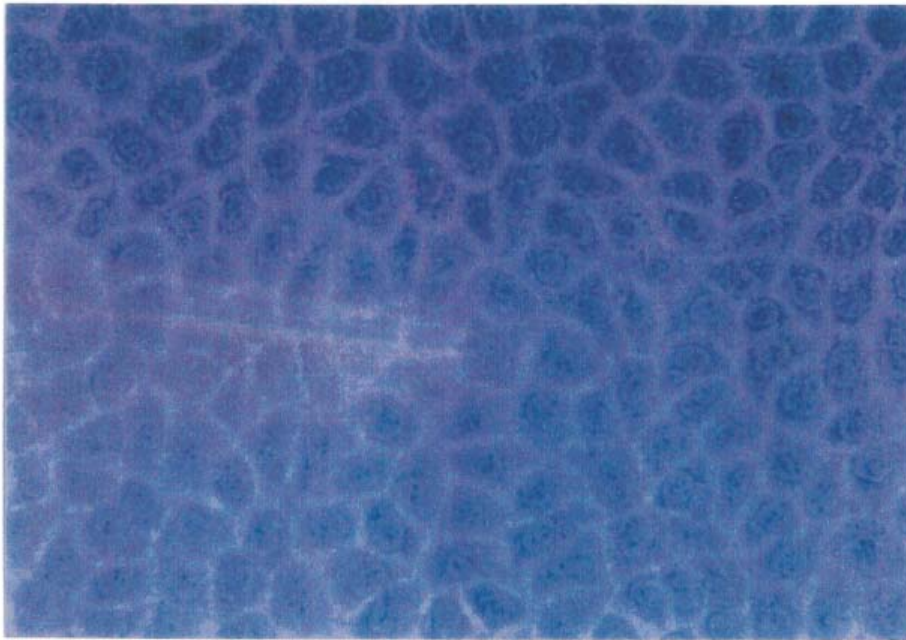


図 1a 位相差像 (× 400)。NRK-52E 細胞の左側中央に、色素の細胞内注入に使ったガラス毛細管の先端部分が映っている。

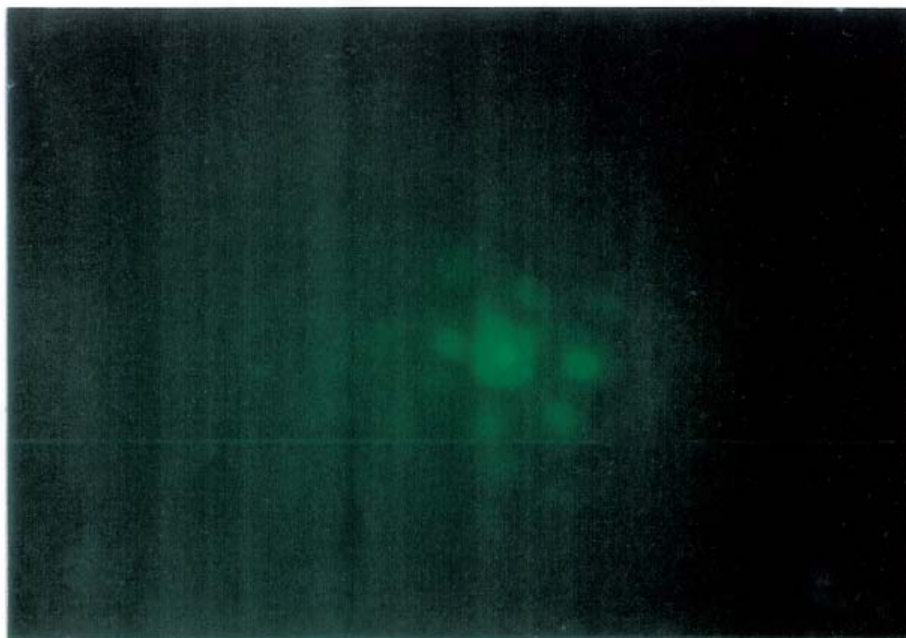


図 1b 図 1a と同じ部位で撮影した Lucifer yellow (LY) 蛍光像
LY の微量注入直後 (× 400)

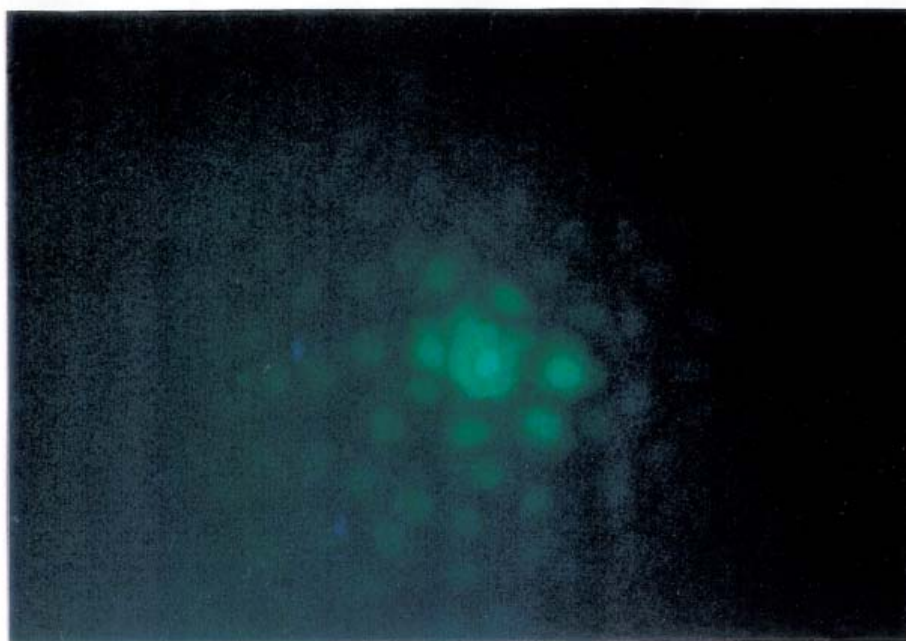


図 1c LYの微量注入後6分(×400)

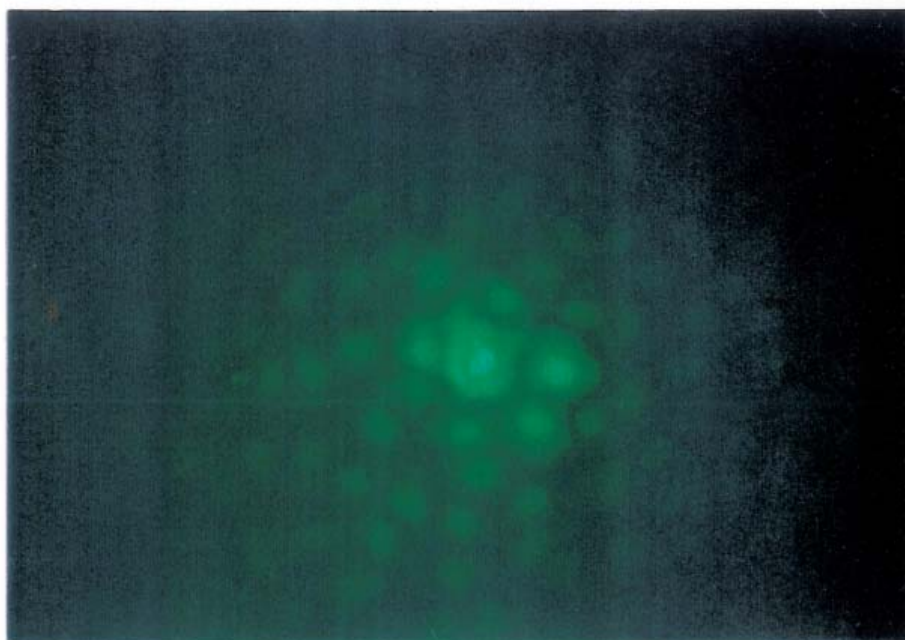


図 1d LYの微量注入後9分(×400)



図 1e 図 1a~図 1d と同じ部位の Ethidium Bromide (EB) 蛍光像。
EB の微量注入後 3 分 (× 400)

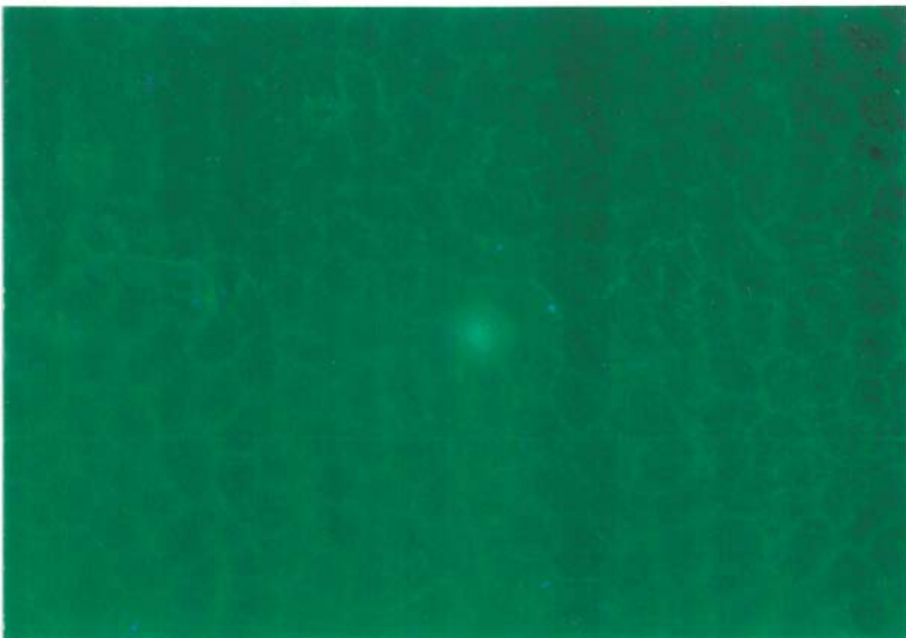


図 2 図 1 と同じディッシュの別の部位。
TPA10ng/ml で 25 分処理した後の LY の蛍光像 (× 400)

Intercellular communication through gap-junction in NRK-52E cells as studied with a microinjection method

Iha Kaori, M.S. and Imai Shoichi, M.D., Ph.D.

Intercellular communication through gap junction was studied in NRK-52E cells in culture using the transfer of a fluorescent dye, lucifer yellow, as a measure. Instead of a scrape loading method used in our previous work(Une K. and Imai S.), a direct microinjection method was used. The dye was injected with a microinjector(Eppendorf FemtoJet) via a glass capillary (Eppendorf Femtotips) impaled into the cell. The microinjector was operated with a micromanipulator(Eppendorf 5171). Another dye, ethidium bromide, was injected together with LY to identify the cell into which the dye was injected. Fluorescence of the dyes was monitored with an inverted fluorescent microscope (Leitz DMIRB). Contrary to our previous findings obtained with a scrape-loading method, cell-cell communication was found to be inhibited completely by a representative tumor promotor, TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate).

Key word:NRK-52E cells, Lucifer yellow, Ethidium bromide, TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), Gap-junction, Microinjection