

研究ノート

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 —

宇根 桐子¹⁾ 今井 昭一¹⁾

細胞の正常な成長と分化を左右する重要なファクターである「gap-junction(ギャップ結合)を介する細胞間の情報交換(Gap junction intercellular communication, GJIC)」の研究にはelectrocoupling、microinjectionした後の色素の移動、放射性代謝産物の移動、ある代謝系の酵素に欠陥のある細胞同士の代謝協調、FRAP解析(fluorescence recovery after photobleaching)など、様々な手法が用いられており、それぞれ利点をもっているが、方法が複雑だったり、高価な機器が必要だったり、実験の遂行に時間がかかったりといった欠点もあって、広く行われるに至っていない。

我々は、“Scrape loading”によって、膜不通過性の分子を細胞内に導入することができるというMcNeilら(1984)の観察をもとに、El-Fouly, Trosko and Chang(1987)によって考案されたscrape loadingによって細胞内に導入した蛍光色素lucifer yellowの隣接細胞への拡散を利用してGJICについて研究する方法の有用性について、腎由来の上皮様細胞であるNRK-52E細胞を用いて検討を行った。Scrapeによって傷ついた細胞に直接入った色素とscrapeによって細胞に入った後、隣接した細胞にgap junctionを介して拡散した色素との鑑別は、同時に適用したethidium bromideによる蛍光を観察することによって行った。その結果、NRK-52E細胞でも、GJICが活発に行われていることが明らかとなったが、腫瘍プロモーターとして知られているTPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)は、この細胞ではGJICを抑制しなかった。

キーワード: NRK-52E, Lucifer Yellow, Ethidium bromide, TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), Gap-junction, Scrape-loading法

I. 緒言

哺乳類の隣接した細胞の間で、栄養素、イオンおよび分子量およそ<1500 Daの調節物質の交換を可能にしている(Loewenstein, 1981¹⁾)、gap-junction(ギャップ結合)を介する細胞間の情報交換(Gap junction intercellular communication, GJIC)は、細胞の正常な成長と分化を左右する重要なファクターである(Loewenstein, 1979²⁾; Bennett and Goodenough, 1978³⁾; Hertzberg, Lawrence and Gilula, 1981⁴⁾)。GJICが、生理状態や化学物質によって変化する事は、多くの研究の示す通りであり(Gilula, Reeves and Steinbach, 1972⁵⁾; Lawrence, Beers and Gilula, 1978⁶⁾; Trosko and Chang, 1984⁷⁾; Schultz, 1985⁸⁾)、その化学物質による抑制は、癌発生のプロモーター相(Yotti, Chang and Trosko, 1979⁹⁾; Murray and Fitzgerald, 1979¹⁰⁾)、奇形発生(Trosko, Chang and Netzloff, 1982¹¹⁾; Warner, Guthrie and Gilula, 1984¹²⁾; Welsch and Stedman, 1984¹³⁾; Loch-Carusio and Trosko, 1985¹⁴⁾)、神経毒性(Trosko, Jones, and Chang, 1987¹⁵⁾)、生殖機能不全やその他の化学物質によって引き起こされる疾患(Trosko

and Chang, 1984⁷⁾)の一つの要因をなしていると考えられている。

GJICの測定にはelectrocoupling(Loewenstein, 1979²⁾)、microinjectionした後の色素の移動(Enomoto and Yamasaki, 1985¹⁶⁾; Fitzgerald and Murray, 1980¹⁷⁾; Friedman and Steinberg, 1982¹⁸⁾)、放射性代謝産物の移動(Hooper, 1982¹⁹⁾)、ある代謝系の酵素に欠陥のある細胞同士の代謝協調(Subak-Sharpe, Burk and Pitts, 1966²⁰⁾; Davidson, Baumgarten and Harley, 1985²¹⁾; Gupta, Singh and Stetsko, 1985²²⁾)、FRAP解析(fluorescence recovery after photobleaching)[Wade, Trosko and Schindler, 1986²³⁾]などが用いられており、それぞれ利点をもっているが、方法が複雑だったり、高価な機器が必要だったり、実験の遂行に時間がかかるといった欠点もあり、広く行われるには至っていない。

我々は、この度、“Scrape loading”によって、膜不通過性の分子を細胞内に導入することができるというMcNeilら(1984)²⁴⁾の観察をもとに、El-Fouly, Trosko and Chang(1987)²⁵⁾が考案したscrape loading法のGJIC研究における有用性について、NRK-52E細胞を用いて検討したので報告する。この方法により、形質膜に一時的に切れ目をつけることによって、細胞のviability

1) 沖縄県立看護大学

やコロニー形成能に影響を与えることなく大きな分子を細胞内に導入することができる。

II. 実験方法

細胞の培養・継代と保存

実験には、新潟大学医学部腎研究施設から分与して頂いた、ラット腎由来の上皮性細胞と言われるNRK-52E細胞を用いた。この細胞にはconnexin43が含まれている(Paulson A.F, Johnson R.G, Atkinson M.M, 1994²⁰)といわれる。

1) 使用した試薬、器具、機器類

① 試薬

- ・ FBS; Fetal Bovine Serum(ウイタッカー)
- ・ Dulbecco's MEM[Low]無血清培地(旭テクノグラス IWAKI)
- ・ PBS(+)[Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline with Ca & Mg (和光純薬)]
- ・ PBS(-)[Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline without Ca & Mg (和光純薬)]
- ・ 10倍濃度PBS(-)[Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline without Ca & Mg (和光純薬)]
- ・ EDTA・2Na(和光純薬)
- ・ トリプシン(和光純薬)
- ・ PET: トリプシン調製液(精製水450ml、10倍濃度PBS(-) 50ml、EDTA・2Na 23mg、トリプシン500mg)
- ・ 細胞凍結保存液: セルバンカー(ダイヤトロン)

② 器具(全て滅菌して使用)

25cm² 培養フラスコ、蓋付きプラスチックチューブ(15ml, 50ml用、ファルコン)、セラムチューブ(2ml用)、駒込ピペット(5ml用)、パストゥールピペット

③ 機器類

- ・ CO₂ インキュベーター(池本理科学10-0212)
- ・ 安全キャビネット(HITACHI SCV-1303EC IIA)
- ・ 遠心機(KUBOTA KN-70)
- ・ 倒立顕微鏡(Nikon ECLIPSE TE300)

2) 凍結保存した細胞の培養

- ① ドライアイス冷却下に持ち帰り、到着後ただちにクライオボックスに入れて液体窒素中で凍結保存したNRK-52E細胞の入った2mlのセラムチューブを取り出し、チューブの蓋口が温水につからないように注意しながら、37度Cの温水で解冻させた。
- ② 蓋口を、アルコール綿で拭い、安全キャビネット内でバーナーの火で軽くあぶった後、チューブの蓋を開

け、パストゥールピペットで細胞を吸い上げ、予め50mlのファルコンチューブに入れておいた培養液(10% FBS・Dulbecco's MEM、以下同様)10ml中に注入した。

- ③ パストゥールピペットで軽く攪拌した後、血球計算盤にて細胞数を数え、全細胞数を算出した。
- ④ 1,500rpm、15minで遠沈し、上清をアスピレーターで吸い上げて除去した。
- ⑤ 細胞数が 5×10^5 個/4mlになる様に、培養液を加え、ピペットで攪拌した後、4mlずつ25cm²の培養フラスコに分注、37度Cに設定されたCO₂ インキュベーターで、2日に1回培地替えを行いながら、コンフルエントになるまで、約1週間培養した。
- ⑥ コンフルエントの状態になった所で、培養液を棄て、PBS(+)*で2~3回洗浄してから、2mlのPETを加え、位相差顕微鏡で、細胞が壁から剥がれ丸くなっていく様子を監視しながら、約4~5min反応させた上で(反応時間が長すぎると細胞が死ぬので注意)、パストゥールピペットで回収し、15mlファルコンプラスチックチューブに入れておいた培養液(4ml)に加えて(Total 6mlになる)、トリプシンの作用を停止させた。
*細胞の組織培養ディッシュへの付着には、2価の陽イオン(Ca²⁺、Mg²⁺)が必須であるので、細胞mono-layerの洗浄には、PBS(+))を用いた)
- ⑧ 1,500rpm、15minで遠沈し、上清をアスピレーターで吸い上げ除去した。
- ⑨ 培養液を2ml加え、ピペットでよく攪拌してから、少量をパストゥールピペットで吸い上げ血球計算盤にのせ、細胞数を数え、全細胞数を算出した上で、細胞を更に培養する必要がある場合は、もう一度、⑤以下の操作を、細胞を凍結保存する場合は、⑩以下の操作を行った。
- ⑩ 細胞数が約 1×10^6 個/1.8mlになるように培養液を加え、パストゥールピペットで攪拌した後、セラムチューブに1.8mlずつ分注し、クライオボックスに収めて、液体窒素タンクに保存した。

III. "Scrape-loading" 法の検討

1) 使用する器具および試薬

外科用メス*、60mm培養dish(ファルコン)、PBS(+), 0.05% Lucifer Yellow CH(シグマ)** in PBS(-)**、Ethidium bromide(シグマ)*** in PBS(-)、10%FBS・D MEM培養液

*Scrape-loading法で、細胞を傷つけるのには、爪楊枝(wooden probe、EL-Fouly, Trosko and Chang, 1987)¹⁹、外科用メス(Opsahl and Rivedal, 2000)²⁰か

宇根他：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

らRubber Policeman(McNeil, Murphy, Lanni and Taylor, 1984²⁴; EL-Fouly, Trosko and Chang, 1987²⁵)まで、様々な器具が用いられているが、我々は、外科用の替え刃メスを用いた。

**この蛍光色素についてはStewart(1978)²⁶を参照のこと。

***Ca²⁺、Mg²⁺が存在すると、蛍光色素の移動が悪くなる細胞があると言われているので(Opsahl and Rivedal, 2000²⁷)、蛍光色素は、PBS(-)に溶解した。

****この蛍光色素については分子生物学辞典(1997)²⁸を参照のこと。

2) 実験

①60mmの培養dishに1×10⁵個の細胞をまき、コンフルエントになるまで、約1週間培養*した。

② 培養液を除去し、PBS(+)で数回洗ってから、0.05% Lucifer Yellow CH in PBS(-)**[Stewart, 1978²⁶, 1981³⁰] 2 ml, 0.002 % Ethidium bromide in PBS(-)*** 2 mlを加えた。

*この細胞で色素の伝播を見るのに最も適しているのは、培養5~6日目であると思われる。

**EL-Fouly, Trosko and Chang(1987)²⁵に従って0.05%を選んだ。

***Lucifer Yellowと同じ0.05%では、蛍光が強すぎる事が、予備実験でわかったので濃度は0.002%とした。

③ 外科用ナイフで数カ所にすばやく傷を入れ、3 min 静置して、色素を取り込ませた。

④ 色素液を除去し、PBS(+)で5~6回洗浄した後、倒立蛍光顕微鏡で、日本光学B-2フィルター(励起波長450-490nm)によりLucifer Yellowの蛍光を(最大吸収428 nm; 最大蛍光536 nm, B Herman, 1998³¹)、日本光学G-2Aフィルター(励起波長510-560nm)によりEthidium bromideの蛍光を観察、撮影した。色素の褪色を避けるため、撮影は20min以内に行った。

図に、蛍光写真の代表例を示す。Ethidium bromide(最大吸収518nm; 最大蛍光605nm, B Herman, 1998³¹)の蛍光(図1-3, 図2-3)は、メスによる切れ目に沿った細胞でのみ認められたが、Lucifer Yellowの蛍光(図1-2, 図2-2)は、Ethidium bromide蛍光の認められる細胞のみでなく、蛍光の認められない他の多くの細胞でも認められ、NRK-52E細胞でもLucifer Yellowが、gapjunctionを介して隣接した細胞に伝えられることがわかった。

そこで、gap-junctionを介する細胞間の情報交換(GJIC)を抑制すると言われる、腫瘍プロモーター、12-O-tetradecanoyl-phorbol-12-acetate (TPA)の、Lucifer Yellow移動に対する作用について検討した*。

*悪性化した細胞同士はGJICを行っているが、悪性化した細胞と周囲の正常細胞との間ではGJICが行われない(Enomoto and Yamazaki, 1985³⁰)。腫瘍プロモーターは、悪性化した細胞と周囲の正常細胞との間のGJICを阻害して、悪性化した細胞を、正常細胞の成長制御的影響から解放するのだという。

IV. TPAによる実験

1) 方法

- ① 60mmの培養dishに1×10⁵個の細胞をまき、コンフルエントになるまで約1週間培養した。
- ② コンフルエントになった所で、培養液を捨て、PBS(+)約2mlで2~3度、洗浄した後PBS(+)4mlを加えた。
- ③ PBS(+)で400ng/mlと4μg/mlになるように調製したTPA液を10~100μl添加し、常温で反応させた。
- ④ 反応液を除去し、PBS(+)で5~6回洗浄した後、0.05% Lucifer Yellow CH in PBS(-)を2ml加え、外科用ナイフで数カ所に傷を入れ、2~3分静置した。
- ⑤ 色素液を除去し、PBS(+)約2mlで5~6回洗浄した後、励起波長450-490nmで蛍光の観察を行った。
- ⑥ TPAを加えずに同様な操作を行った細胞を対照とした。

2) 結果および考察

まず、TPAの最終濃度を20ng/ml、反応時間を10, 20, 30, 60minに設定して実験を行ったが、TPAで処理した細胞での色素の拡散と処理しなかった細胞での色素の拡散との間には、殆ど差が認められなかった。

そこで、TPAの最終濃度を10倍の200ng/mlに設定し、反応時間30および60minで実験を行ったが、TPAを30min作用させた細胞で色素の移動が多少抑制される傾向が認められたが、TPAを60min作用させた細胞では、対照と殆ど差が認められなかった。

以上2つのシリーズの実験では、TPAを室温で作用させたので、次に最終濃度を20ng/mlおよび200ng/mlとし、37度Cに設定したホットプレート上でTPAを作用させた実験も行ったが、色素移動の抑制は殆ど認められなかった。

そこで、最終濃度10ngのTPAについては、作用時間を4および7hrに、100ng/mlについては4.7および16hrに延長して実験を行ったが、(反応時間が長時間にわたるので、TPAは培養液に添加し、CO₂インキュベーターの中で作用させた)、100ng/ml、7hrで、色素の拡散がやや少なかったのを除き、対照と殆ど差が見られなかった。

El-Foulyら(1987)²⁵は、Scrape loading 法による実



図1-1. コントロール(偏光, X20)



図2-1. TPA 100ng/ml, 20 min反応(偏光, X20)

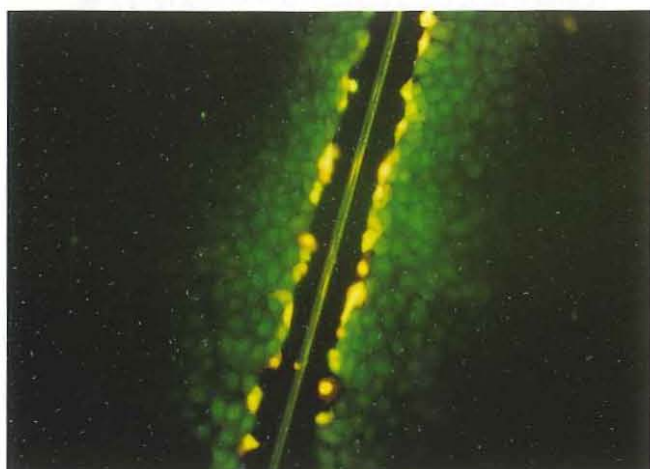


図1-2. コントロール, Lucifer Yellow 染色
(B励起, X20)

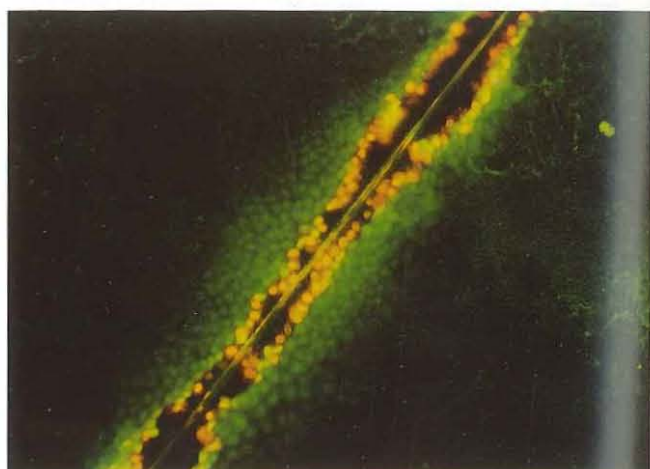


図2-2. TPA 100ng/ml, 20min反応, Lucifer
Yellow 染色 (B励起, X20)

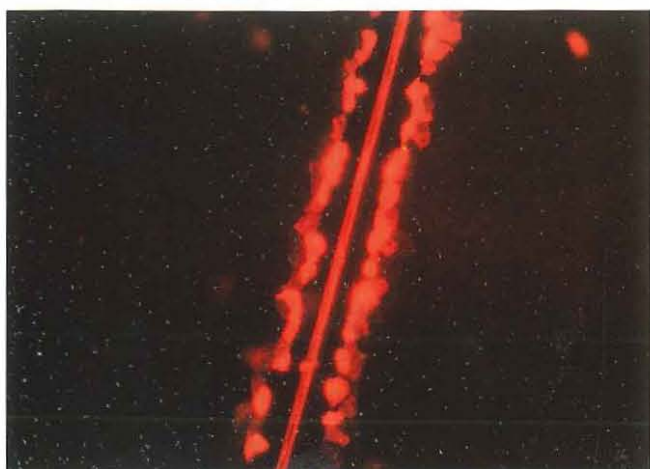


図1-3. コントロール, Ethidium bromide 染色
(G励起, X20)

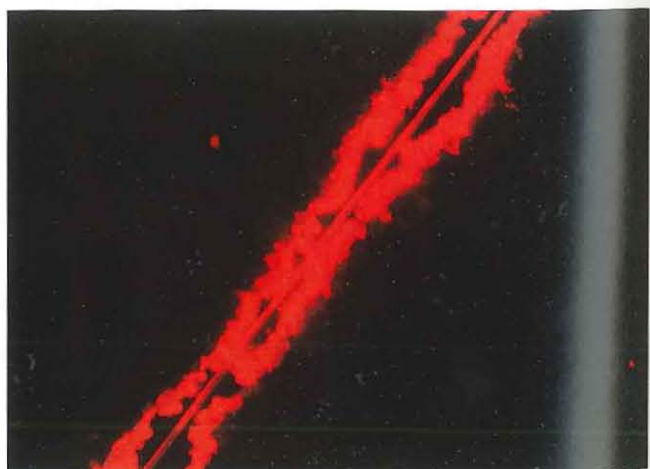


図2-3. TPA 100ng/ml, 20min反応, Ethidium
bromide 染色 (G励起, X20)

宇根他：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

験で、5-10ng/mlのTPAを15min- 1hr作用させたV79細胞(5ng/ml 15min)、NIH/3T3細胞(5ng/ml 1hr)、仔ウシ大動脈筋細胞のprimary culture(10 ng/ml 30min)、ヒト包皮線維芽細胞(MSU-2)(5 ng/ml 1 hr)では、周辺細胞へのLucifer Yellowの伝搬の完全な抑制が認められると報告している。又、scrape loading 法ではなく、microinjection法による実験ではあるが、Enomoto and Kanno(1986)³⁰⁾も、マウス表皮細胞のprimary cultureで、100ng/mlのTPA 4hrで、Lucifer Yellow拡散の完全な抑制を報告している。問題は、濃度や作用時間ではなく、腫瘍プロモーターに何をを使うかにあるのかも知れない。NRK-52E細胞を用いた今回の実験で、何故TPAが作用を発揮しなかったのか、その理由は不明であるが、我々と同じNRK-52E細胞を用いたKonishi, Donovan and Ward(1990)³³⁾のmicroinjection 実験の結果を見ると、腎のcarcinogenであるstreptozotocinおよび腎特異的な腫瘍プロモーターであるsodium barbitalは、NRK-52E細胞のGJICを抑制するが、肝特異的な腫瘍プロモーターで、腎ではプロモーターでないsodium phenobarbitalでは抑制は認められないということであり、腫瘍プロモーターの臓器特異性を考える必要があるのかも知れない。今後は腎特異的と言われる腫瘍プロモーターを使った実験も試みてみたい。

IV 文 献

- 1) Loewenstein W.R: Junctional intercellular communication; the cell-to-cell membrane channel. *Physiol.Rev.* 61, 829-913, 1981.
- 2) Loewenstein W.R: Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem.Biophys.Acta*, 560, 1-65, 1979
- 3) Bennett M.V and Goodenough D.A: Gap junctions, electronic coupling, and intercellular communication. *Neurosci.Res.Program Bull*, 16, 1-486, 1978
- 4) Hertzberg E.L, Lawrence T.S and Gilula N.B: Gap junctional communication. *Annu. Rev. Physiol*, 43, 479-491, 1981
- 5) Gilula N.B, Reeves O.R and Steinbach A: Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature*, 235, 262-265, 1972
- 6) Lawrence T.S, Beers W.H and Gilula N.B: Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature*, 272, 501-506, 1978
- 7) Trosko J.E. and Chang C.C.: Adaptive and nonadaptive consequences of chemical inhibition of intercellular communication. *Pharmacol.Rev.* 36, 137S-144S, 1984
- 8) Schultz R.M.: Roles of cell-to-cell communication in development. *Biol.Reprod.* 32, 27-42, 1985
- 9) Yotti L.P., Chang C.C. and Trosko J.E.: Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promotor. *Science*, 206, 1089-1091, 1979
- 10) Murray A.W. and Fitzgerald D.J.: Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 91, 395-401, 1979
- 11) Trosko J.E., Chang C.C. and Netzloff M.: The role of inhibited cell-to-cell communication in teratogenesis. *Teratog.Carcinog.Mutagen.*, 2, 31-45, 1982
- 12) Warner A.E., Guthrie S.C. and Gilula N.B.: Antibodies to gap-junctional protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo. *Nature*, 311, 127-131, 1984
- 13) Welsch F. and Stedman D.B.: Inhibition of metabolic cooperation between Chinese hamster V79 cells structurally diverse teratogens. *Teratog.Carcinog.Mutagen.*, 4, 285-301, 1984
- 14) Loch-Caruso R. and trosko J.E.: Inhibited intercellular communications as a mechanistic link between teratogenesis and carcinogenesis. *Crt.Rev.Toxicol.*, 16, 157-183, 1985
- 15) Trosko J.E., Jone C. and Chang C.C.: Inhibition of gap-junctional-mediated intercellular communication in vitro by aldrin, dieldrin, and texaphene; a possible cellular mechanism for the tumor-promoting and neurotoxic effects. *Mol.Toxicol.*, 1, 83-93, 1987
- 16) 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
- 17) Fitzgerald D.J. and Murray A.W.: Inhibition of intercellular communication by tumor-promoting phorbol esters. *Cancer Res.*, 40, 2935-2937, 1980
- 18) Friedman E.A. and Steinberg M.: Disrupted communication between late-stage premalignant human colo epithelial cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Rev.*, 42,

- 5096-5105, 1982
- 19) Hooper M.L.: Metabolic co-operation between mammalian cells in culture. *Biochem. Biophys. Acta.*, 651, 85-103, 1982
- 20) Subak-Sharpe H., Burk R.R. and Pitts J.D.: Metabolic co-operation by cell to cell transfer between genetically different mammalian cells in tissue culture. *Heredity*, 21, 342-343, 1966
- 21) Davison J.S., Baumgarten I. and Harley E.H.: Use of a new citrulline incorporation assay to investigate inhibition of intercellular communication by 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane in human fibroblasts. *Cancer Res.*, 45, 515-519, 1985
- 22) Gupta R.S., Singh B. and Stetsko D.K.: Inhibition of metabolic cooperation by phorbol esters in a cell culture system based on adenosine kinase deficient mutants of V79 cells. *Carcinogenesis*, 6, 1359-1366, 1985
- 23) Wade M.H., Trosko J.E. and Schindler M.: A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. *Science*, 232, 525-528, 1986
- 24) McNeil P.L., Murphy R.F., Lanni F. and Taylor D.L.: A method for incorporating macromolecules into adherent cells. *J.Cell Biol.*, 98, 1556-1564, 1984
- 25) 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
- 26) Paulson A.F., Johnson R.G., Atkinson M.M.: Intercellular communication is reduced by TPA and Ki-ras p21 in quiescent, but not proliferating, NRK cells. *Exp Cell Res.*, 213(1),64-70, 1994
- 27) 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
- 28) Stewart W.W.: Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell*, 14, 741-759, 1978
- 29) 分子細胞生物学辞典(第1版), p393, 東京化学同人, 1997
- 30) Stewart W.W.: Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature*, 292, 17-21, 1981
- 31) Herman B.: *Fluorescence microscopy(2nd); Appendixe Absorption and emission maxima for common fluorophores*, 117-122, Bios Scientific Publishers, 1998
- 32) 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
- 33) Konishi N., Donovan P.J. and Ward J.M.: Differential effects of renal carcinogens and tumor promoters on growth promotion and inhibition of gap junctional communication in two rat renal epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, 11, 903-908, 1990

A study on gap junction intercellular communication of NRK-52E cells in culture with a scrape loading method

Une Kiriko, B.S.A.¹⁾ Imai Shoichi, M.D., Ph.D.¹⁾

Using NRK-52E cells (an epithelial cell line derived from rat kidney) in culture, usefulness of "scrape-loading method" as developed by EL-Fouly, Trosko and Chang (1987) for studying the intercellular communication through gap junction(GJIC) was assessed. Lucifer yellow and ethidium bromide were used as fluorescent probes and were allowed to be taken up by the cells through the scratch made on the cells by a surgical scissor. Ethidium bromide was bound to the nucleus of the scratched cells and was retained within the cells, while lucifer yellow diffused widely to adjacent cells through gap junction. Thus, the extent of GJIC could be determined by counting the numbers of cells which were stained not only by ethidium bromide but also by lucifer yellow. A representative tumor promoter, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), failed to inhibit the GJIC in NRK-52E cells. The use of the tumor promoters that are specific to kidney cells such as sodium barbital (Konishi, Donovan and Ward, 1990) seems to be necessary.

Key word: NRK-52E, Lucifer Yellow, Ethidium bromide, TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), Gap-junction, Scrape-loading

1) Okinawa Prefectural College of Nursing