ヒト歯肉扁平上皮癌由来の培養細胞における

ケラチン polypeptide について

小池 正夫・金城 孝・小守 昭

Keratin polypeptides of cultured human squamous cell carcinoma of the gingiva

Masao KOIKE・Takashi KINJO・Akira KOMORI

緒 言

研究材料と方法

重層扁平上皮は、表皮、口腔や食道の上皮あるいは角膜上皮などに存在する。これら上皮での角化の様式は部位により異なり、皮膚のように角化するものや、口腔や食道のように主として錯角化するもの、あるいは角膜上皮のような角化しない上皮がある。これら角化現象の形態的表象として、tonofilament, desmosome, keratohyalin granule, keratinosome などが記載されている。また、角質細胞内の主成分はケラチンを主とする線維性蛋白質である。しかし、表皮細胞中に形態的にとらえられる tonofilament とケラチンとの関係はいまだ十分に解明されていない。また、表皮細胞の細胞質内のケラチンは多数の polypeptide の subunits (分子量 40,000~67,000) からなることが知られている¹⁾。ケラチンを構成している polypeptide は表皮の培養細胞²⁾、種類を異にする重層扁平上皮細胞³⁾、あるいは同一細胞でも細胞の増殖や分化の時期により異なる^{3,4)}ことが知られている。さらに、ヒトの正常表皮と乾癬などの病的角化部の表皮との間にも差がみられるといわれている⁵⁾。

本研究では、当教室で樹立したヒト歯肉の扁平上皮癌由来の細胞株^{6,7)}を用い、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動法でケラチンを分析した。さらに、ケラチンの分析結果と tonofilament の電顕的所見との関連を検索した。また、ケラチン構成 polypeptide は細胞の増殖時期や細胞をヌードマウスに移植することによりどのように変化するかも併せて検討した。

1. 培養細胞

細胞はヒト歯肉扁平上皮癌由来の細胞株 MK-1 を実験に用いた。培養液は Dulbecco's modified Eagle's medium に10%胎児牛血清を添加したもので、培養は5% CO₂, 95% 空気, 37°C の条件下で行った。

2. ケラチンの抽出

1) 培養細胞 (MK-1) からのケラチンの抽出

ケラチンの抽出は Sun and Green⁸⁾ の方法で行った。継代 63 代目の培養細胞は PBS で数回洗浄後、ラバーポリスマンで dish から剥離し、遠心後テフロンホモジナイザーに 10 mM Tris/HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA を加えホモジネートした。8,000×g で 10 分間遠心後、ペレットに 10 mM Tris/HCl (pH 7.6) を含む 2% SDS, 10 mM DTT (dithiothreitol) 溶液を加え、超音波細胞破碎器で 15 秒 × 4 回処理後 37°C で 15 分間加温した。次に 100°C で 2 分間加熱しケラチンを抽出した。不溶の細胞残渣は遠心機で除去後、試料は -30°C で凍結保存した。

2) ヌードマウス移植腫瘍からのケラチンの抽出

1.0×10⁶ 個の培養細胞 (継代 18 代目) をヌードマウス背部皮下に移植し、2 か月後に形成された腫瘍を切除した。メスにて 1 mm³ の小切片に細切後、1) に記した方法にてケラチンを抽出した。

3) ヒト表皮角質層からのケラチンの抽出

足底部の表皮角質層をメスで切除後、凍結乾燥し、ヤスリで粉碎したのち、10 mM Tris/HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA 溶液を加えてホモジネートし、8,000×g で 10 分間遠心した。ペレットに 8 M 尿素を加え、可溶性蛋白質を遠心で除去したのち、不溶性蛋白質を 2% SDS, 10 mM DTT 溶液で溶かし、さらに 100°C 2 分間加熱してケラチンを抽出した。

蛋白質の濃度決定は、Bradford⁹⁾ の色素結合法で行った。標準蛋白質はヒト γ-globulin を用いた。

徳島大学歯学部口腔病理学教室

(主任: 小守 昭教授)

Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Tokushima University (Chief: Prof. Akira Komori)

受付日: 昭和57年2月22日

図1 ケラチン polypeptide の SDS-polyacrylamide gel 電気泳動

A : 培養細胞, B : ノードマウス移植腫瘍, C ヒト表皮角質層

分子量マーカー蛋白質 : soybean trypsin inhibitor, 20 kd; carbonic anhydrase, 30 kd; ovalbumin, 43 kd; bovine serum albumin, 67 kd; phosphorylase b, 94 kd

3. SDS-Polyacrylamide gel 電気泳動

電気泳動は Laemmli¹⁰⁾ 法の SDS を含む不連続緩衝スラブゲル装置 (アトー社, 東京) を用いた。濃縮ゲルは 5% acrylamide gel (acrylamide: bisacrylamide

30 : 0.8 重量比) を, 分離ゲルは 10% acrylamide gel を用いた。40 mA の定電流で 3~4 時間泳動したのち, 0.05% Coomassie Brilliant Blue R, 50% メタノール, 15% 酢酸で固定および染色し, 7.5% メタノール, 5%

酢酸溶液で脱色した。

また、培養細胞のケラチンを O'Farrell⁽¹¹⁾ 法で二次元電気泳動を行った。すなわち、一次元のゲルディスク等電点電気泳動を行ったゲルを SDS を含む緩衝液に浸し平衡化したのち、Laemmli 法で二次元の SDS-slab gel 電気泳動を行った。

4. 透過型電子顕微鏡による観察

Falcon petri dish (35×10 mm) に培養した細胞を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 2.5% グルタルアルデヒドで前固定した (4°C, 1 時間)。同緩衝液で数回洗浄後、1% オスミウム酸溶液で後固定した (4°C, 1 時間)。エタノール系列で脱水後、Brinkley and Chang⁽¹²⁾ の方法により Epon 812 で包埋した。重合終了後、Epon を dish から剝離し、LKB 2088 Ultramicrotome で切片を作製し、酢酸ウラル、クエン酸鉛で二重染色を行い、日立 500H で観察した。

結 果

1. ケラチン構成 polypeptide

培養細胞 (継代 63 代目, 培養 8 日目), ノードマウス移植腫瘍と表皮角質層から抽出したケラチンの SDS-polyacrylamide gel 電気泳動による分析結果は図 1 のごとくである。培養細胞のケラチンでは、分子量 40,000 (40 kilodalton: 以下 40 kd と記す), 46,000 (46 kd), 50,000 (50 kd), 52,000 (52 kd), 56,000 (56 kd), 58,000 (58 kd) と 67,000 (67 kd) の 7 種の polypeptide が認められた (図 1-A)。

一方、ノードマウス移植腫瘍では、46 kd, 50 kd, 52~58 kd, 63 kd, 67 kd の 5 種の polypeptide が認められた。しかし、52~58 kd polypeptide は太く濃染し、細かく分離されなかった。また、67 kd も培養細胞の分析結果に比して、太く濃染していた。さらに、このケラチンには培養細胞でみられた 40 kd は明確には認められなかった。

表皮角質層のケラチンでは、40 kd, 46 kd, 50 kd, 56 kd, 60 kd, 63 kd の 6 種類の polypeptide が認められた。これは培養細胞でのものに比べ、52 kd と 58 kd がみられず、56 kd は太く濃染し、新たに 60 kd と 63 kd が認められた。

培養細胞 (培養 8 日目) におけるケラチンの二次元電気泳動では、図 2 のごとく、少なくとも 13 個の蛋白質のスポットが認められ、これらは pH 5.0 から pH 6.1 の範囲内に存在していた。おのおのの polypeptide では、40 kd は pH 5.3 に 1 個のスポットを、46 kd は pH 5.3 に 1 個のスポットを、50 kd は pH 5.4 に 1 個のスポットを、52 kd は pH 5.0 に 1 個のスポットを、56 kd は pH 5.4~5.6 に 3 個のスポットを、58 kd は pH 5.4~6.4 に 3 個のスポットを、67 kd は pH 5.8~

図 2 培養細胞のケラチンの二次元電気泳動

6.1 に 3 個のスポットを示した。

2. ケラチン polypeptide の経時的変化

培養細胞の培養 3 日目 (指数増殖期), 培養 5 日目 (定常期前半), 培養 8 日目 (定常期後半) におけるケラチン構成 polypeptide の変化を一次元電気泳動で検索した (図 3)。培養 3 日目ではケラチンは 40 kd, 46 kd, 50 kd, 52 kd, 56 kd と 58 kd の polypeptide に分けられた。しかし、67 kd は認められなかった。培養 5 日目では、40 kd, 46 kd, 50 kd, 52 kd, 56 kd と 58 kd の polypeptide が認められ、ケラチン構成 polypeptide は培養 3 日目のものと同じであったが、各 polypeptide のバンドは培養 3 日目のものに比べ太く、濃染していた。また、この時期には微弱ではあるが、67 kd の polypeptide が検出された。培養 8 日目では、培養 5 日目のケラチン構成 polypeptide の結果と同一であった。すなわち、培養 8 日目では、3 日目、5 日目のものに比して 56 kd と 58 kd のバンドは太く、濃染し、67 kd の polypeptide も明確に認められた。

3. Tonofilament の経時的形態変化

培養細胞で、培養 3 日目、5 日目、8 日目における tonofilament の形成状態を透過型電子顕微鏡で観察した。培養 3 日目では、tonofilament は数が少なく、細胞質内に種々の方向に分布しており、ところどころ集束するのみみられた (写真 1)。Desmosome の発達は不十分で小さく、それに付着する tonofilament の密度も低かった。培養 5 日目では、tonofilament は核の周囲に多数集合しており、集束をなす filament の数も増加していた (写真 2)。Desmosome は培養 3 日目より発達して太く、その数も多い。培養 8 日目では、tonofilament は集

図3 培養細胞のケラチン polypeptide の経時的変化

A: 培養3日目, B: 培養5日目, C: 培養8日目

束し太い大きな tonofibril を形成していた(写真3)。また, desmosome は良く発達しており, それに付着する tonofilament も明らかであった。

考 察

ヒトの表皮細胞あるいは角質層のケラチンは分子量 40,000 から 67,000 dalton の polypeptide からなっているといわれており¹⁾, 各 polypeptide の分子量や種類は検索部位により多少異なっている²⁾。一方, 口腔粘膜上皮では動物での報告¹³⁾がみられるのみである。

ヒト扁平上皮癌細胞のケラチン構成 polypeptide に関

しては, Wu and Rheinwald¹⁴⁾ はヒト扁平上皮癌9例の培養細胞(舌癌5例, 下咽頭癌2例, 皮膚癌2例)についてケラチン構成 polypeptide を検索し, 正常の表皮ケラチノサイトに存在する5種のケラチン polypeptide (46 kg, 50 kd, 56 kd, 58 kd) と 52 kd の小さなバンドが認められたと述べている。さらに, 3種(舌癌2例, 皮膚癌1例)の細胞には 40 kd の polypeptide も認められたという。本研究での培養細胞には Wu and Rheinwald¹⁴⁾ の報告にみられた 40 kd, 46 kd, 50 kd, 52 kd, 56 kd, 58 kd の6種の polypeptide 以外に 67 kd の計7種の polypeptide が認められた。67 kd の polypeptide はヒト正常皮膚の角質層のケラチンに認められてい

写真 1 培養 3 日目の透過電顕像 (×21,000)

写真 2 培養 5 日目の透過電顕像 (×18,000)

写真 3 培養8日目の透過電顕像 (×18,000)

TF: tonofilament, D: desmosome, (→): hemidesmosome

る⁴⁾。本研究での培養細胞の経時的検索結果でも、67 kd は培養3日目と5日目の細胞にはみられず、培養8日目の細胞において認められている。したがって 67 kd の polypeptide は角化の成熟に関連して出現してくるものと考えられる。本研究でのヌードマウスの移植腫瘍では、67 kd は濃染してみられたが、40 kd は明確に判別できなかった。Doran ら³⁾ は正常表皮由来のケラチノサイトは数週間培養しても典型的な角質層は作らないがヌードマウスの皮下に移植すると角質層の形成がみられ、さらに 63 kd と 64 kd のケラチン polypeptide の合成がみられたことを報告している。また、Wu and Rheinwald¹⁴⁾ は、舌癌由来の培養細胞のケラチンは 40 kd, 46 kd, 50 kd, 56 kd と 58 kd の polypeptide を有するが、ヌードマウスに移植すると 40 kd は消失し、67 kd の polypeptide が出現することをみている。以上の所見は、ヌードマウスに移植することにより、上皮細胞は角化への過程が進行したことを意味しているものと考ええる。

Sun and Green¹⁵⁾ は、表皮の培養細胞についてケラチンの細胞質内の局在性を免疫組織化学的に検索し、tonofilament 様の filament が抗ケラチン抗体で陽性に

染色されたと述べている。しかし、培養細胞で形態的にとらえられた tonofilament とケラチン polypeptide との関連はまだまだ十分解明されていない。本研究において、培養3日目、5日目、8日目での細胞における tonofilament を比較すると、tonofilament の量、太さは経時的に明らかに増加しており、また desmosome も発達していた。Polypeptide では、培養8日目とヌードマウス移植腫瘍で 67 kd の出現がみられた。したがって、67 kd polypeptide の出現と tonofilament の増加との間に密接な関係が予測されるが、両者間のより詳しい関連性は種々な方法で詳細に検索し、論ずべきものと考ええる。

結 語

ヒト歯肉扁平上皮癌由来の培養細胞 (MK-1) のケラチン polypeptide を SDS-polyacrylamide gel 電気泳動で分析した。さらに、ヌードマウスへの移植腫瘍と培養細胞の経時的差異によるケラチン polypeptide の変化を検索した。併せて、培養細胞における tonofilament の経時的形態変化を検索した。

1) 培養細胞のケラチンには7種の polypeptide (40 kd, 46 kd, 50 kd, 52 kd, 56 kd, 58 kd と 67 kd) が認められた。二次元電気泳動では、pH 5.0~6.1 の範囲にケラチンが少なくとも13個の蛋白質スポットを検出し得た。

2) ノードマウス移植腫瘍のケラチンでは、46 kd, 50 kd, 52~58 kd, 63 kd, 67 kd の5種の polypeptide が認められたが、培養細胞でみられた 40 kd は明確には認められなかった。

3) ケラチン構成 polypeptide は、細胞の増殖時期で異なっていた。培養3日目では、ケラチンは 40 kd, 46 kd, 50 kd, 52 kd, 56 kd と 58 kd の polypeptide で構成され、67 kd は認められなかったが、培養8日目では、3日目の polypeptide 以外に 67 kd の polypeptide が明確に認められた。

4) 培養細胞の tonofilament は、量、太さとも経時的に増加していた。したがって 67 kd polypeptide の出現と tonofilament の増加との間に密接な関係が予測された。

稿を終えるにあたり、本研究にご協力いただいた、三橋由利子嬢と橋本真由美嬢に感謝致します

本論文の要旨の一部は、第70回日本病理学会総会および第40回日本癌学会総会において発表した。なお本研究の一部は文部省科学研究費の援助を受けた。

引用文献

- 1) Lazarides, E.: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249 1980.
- 2) Fuchs, E. and Green, H.: The expression of keratin genes in epidermis and cultured cells. *Cell* 15: 887 1978.
- 3) Doran, J.I., et al.: Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelium cells. *Cell* 22: 17 1980.
- 4) Fuchs, E. and Green, H.: Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocytes. *Cell* 19: 1033 1980.
- 5) Skerrow, D., et al.: Protein modifications during the keratinization of normal and psoriatic human epidermis. *Biochem Biophys Acta* 537: 474 1978.
- 6) 小池正夫, 五木田利明: ヒト歯肉癌由来の細胞株 (MK-1) の樹立とその性状. *日口外誌* 26: 1481 1980.
- 7) Koike, M. and Komori, A.: Establishment of a human cancer cell line from carcinoma of the gingiva. *J Oral Path* 11: 151 1982.
- 8) Sun, T.-T. and Green, H.: Keratin filaments of cultured human epidermal cells. *J Biol Chem* 253: 2053 1978.
- 9) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analy Biochem* 72: 248 1976.
- 10) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680 1970.
- 11) O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007 1975.
- 12) Kruse, P.E. and Patterson, M.K.: *Tissue Culture. Methods and Applications.* ed 1, Academic Press, New York and London, 1973, p 438.
- 13) Dale, B.A., et al.: Initial characterization of the proteins of keratinized epithelium of rat oral mucosa. *Archs Oral Biol* 22: 75 1977.
- 14) Wu, Y.-J. and Rheinwald, J.G.: A new small (40 kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinoma. *Cell* 25: 627 1981.
- 15) Sun, T.-T. and Green, H.: Immunofluorescent staining of keratin fibers in cultured cells. *Cell* 14: 469 1978.