森本 道雄*

索引用語： 培養肝細胞 細胞骨格 デスモソーム コルヒチン
 サイトカラシン D

体重約200gのWistar系雄性ラット5匹を用い、

蛍光抗体法による観察は、タイプ I コラーゲン (Cellmatrix type I-A: 新田ゼラチン) をコートしたカバーガラス上で培養した。37℃の PBS で数回洗浄の後、サイトケラチン (CK)、デスモソーム構成蛋白であるデスモブラキン (DP)^{1,2)} の染色には、-20℃冷

＜受付日1991年7月12日＞

アセトンで10分間固定した。チューブリン (Tu) の染色には、37℃の条件下に、4%緩衝ホルマリン(30分間)と0.07%グルタルアルデヒド(10分間)で固定し、冷アセトンに10分間浸漬した。4℃のPBSで数回洗浄の後、一次抗体としてマウスIgG抗CKモノクローナル抗体(mAb) (PKK1: Labsystems, Helsinki, Finland), 抗DP mAb(DP1 & 2, Boehringer Mannheim Biochemica)あるいは、抗 α -Tu mAb (Amersham, Buckinghamshire, England)と1時間反応させ、PBSで洗浄後、FITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体(Cappel, West Chester)と1時間インキュベートした。また、F-アクチン(Act)との二重染色には、ローダミンファロイジン (Molecular Probe Co. New England) (終濃度20倍希釈)を二次抗体に混合して反応させた。

(2) 免疫電顕による観察

免疫電顕法は、コラーゲンコートしたフォルムバールを張った金グリッド上で培養し、Fey & Penmanの

方法³⁾を改良した Katsuma らの方法⁴⁾に従い、Triton X-100, DNase, RNase 含有液で処理し、抗DP mAbあるいは抗Act mAb (Amersham)と1時間反応させた。PBSで洗浄後、直径10nmの金粒子標識二次抗体Auro Probe EM GAM IgG G10 (Janssen Life Science Products, Olen, Belgium)と室温で1時間反応させ、PBSで洗浄後、2.5%グルタルアルデヒドで30分間固定した。エタノール系列で脱水し、臨界点乾燥後カーボン蒸着し、日立H-500H透過型電顕で観察した。

結 果

培養26時間後、コントロール群、細胞骨格阻害剤添加群の全ての群で、コラーゲンに伸展した細胞のviabilityはトリパンブルー排出試験でほぼ100%であった。

(1) 蛍光抗体法での観察所見

コントロール群では、肝細胞はコラーゲン上に伸展

Fig. 1 Immunofluorescence of hepatocytes stained with (a) rhodamin-phalloidin, (b) anti-cytokeratin monoclonal antibody (mAb), (c) anti-tubulin mAb, (d) anti-desmoplakin mAb after post-seeding 26hrs in the control group. (a) and (b) were double label immunofluorescence micrographs. (d) Hepatocytes were treated with detergents before staining. (arrow: bile canaliculus) $\times 360$.

し、隣接する細胞間で広い範囲で接着していた。Act の染色は細胞周囲に密に、また細胞質内に微細な線維状に観察された。CK の染色は細胞質内に網目状に存在し、細胞間接着部そして毛細胆管周囲に密であった。Tu の染色は核周囲から細胞周囲に向けて放射状に認められた。DP の染色は細胞間と毛細胆管周囲に点状に存在していた (Fig. 1)。

Co 処理群では Tu は細胞質内に無構造・均一に染色されたが、Act, CK, DP には明らかな変化は認めなかった (Fig. 2)。CD 処理群では、Act 線維は断裂し、細胞境界部や細胞質内に凝集しており、CK は Act の凝集部位でやや不整となっていた (Fig. 3)。DP の分布も軽度乱れ、細胞間の解離傾向も見られた。そして、

Act の凝集部位に一致して、DP を示す蛍光がしばしば観察された (Fig. 4)。

Co, CD 同時処理群では、それぞれの単独処理群の所見に加え、細胞間の解離が強く、CK の分布は極めて不均一であった (Fig. 5)。また、デスモソームを残してほとんど解離している部分もあり、同部には Act の凝集が明らかであった (Fig. 6)。

(2) 免疫電顕での観察所見

コントロール群では、IF は細胞質内に均一に網目状構造を呈して存在し、細胞境界部ではより密で、毛細胆管周囲では pericanalicular sheath を形成していた⁵⁾。CD 処理群では、低倍率の観察で細胞周囲、細胞質内に電子密度の高い凝集物が散見され、その周囲で

Fig. 2 Double label immunofluorescence micrographs of hepatocytes treated with colchicine. (a) The staining using anti-tubulin mAb was homogeneous in the cytoplasm and microtubules were not seen. (b) The staining of F-actin using rhodamin-phalloidin was similar to the control. $\times 380$.

Fig. 3 Double label immunofluorescence micrographs of hepatocytes treated with cytochalasin D. (a) The staining using anti-cytokeratin mAb showed slightly irregular pattern. (b) F-actin bundles were disrupted and aggregated at the cell borders and in the cytoplasm. The networks of cytokeratin bundles were changed around the aggregates of F-actin. $\times 350$.

Fig. 4 Double label immunofluorescence micrographs of hepatocytes treated with cytochalasin D. (a) The fluorescence of desmoplakin was slightly irregular. (b) The aggregates of F-actin often coexisted with the desmoplakin showing spotty pattern. $\times 440$.

Fig. 5 Double label immunofluorescence micrographs of hepatocytes treated with colchicine and cytochalasin D. (a) The framework of cytokeratin bundles was more remarkably disrupted compared with the cytochalasin D treated group. (b) The actin containing bundles were disrupted and aggregated forming many points. $\times 370$.

Fig. 6 Double label immunofluorescence micrographs of hepatocytes treated with colchicine and cytochalasin D. (a) The contacts of hepatocytes were loose and they often connected with desmoplakin only showing spots. (b) The aggregates of F-actin were frequently recognized at the same points which contained desmoplakin fluorescence. $\times 370$.

Fig. 7 Transmission electron micrograph of the whole mount unembedded extracted hepatocytes treated with cytochalasin D. The aggregates were seen in the cytoplasm and cell borders. The network of IFs was ununiform at the region of the aggregates. Bar measures $2\mu\text{m}$.

Fig. 8 Immunoelectron micrograph using anti-actin mAb of hepatocytes treated with cytochalasin D. The gold particles labeling actin were diffusely seen on the aggregates. Bar measures $0.5\mu\text{m}$.

Fig. 9 Immunoelectron micrograph using anti-desmoplakin mAb of hepatocytes treated with cytochalasin D. The gold particles labeling desmoplakin were often seen in the aggregates composed of actin. Bar measures $0.5\mu\text{m}$.

の細胞骨格の役割とその相互の関連性を初代培養肝細胞を用いて明らかにした。

肝細胞、消化管上皮などの上皮細胞の特徴は、細胞に極性が存在することである。肝細胞においては、類洞側、毛細胆管側という極性が存在し、それぞれに細胞膜の性状は異なり、細胞質ではゴルジ体や粗面小胞体が毛細胆管側に近く存在し、毛細胆管はさらに隣接する肝細胞との協調のもとに形成されている。では、何がこの極性を決定しているのだろうか。細胞骨格は、細胞内に網の目のように張り巡らされた線維状蛋白であり、その形態の特徴からも極性の形成に大きな役割を果たしているものと推察されている⁶⁾。そして、極性の形成には、その周囲の細胞との協調作用、すなわち、細胞間情報伝達機構の存在も重要と考えられる。デスモソームという細胞間接着装置は上皮細胞に広く分布し、デスモソームにはIFが付着、IFは細胞内に網目状に存在し^{6,7)}、細胞内小器官の空間配置に関与していると考えられている。したがって、細胞骨格とデスモソームあるいは、3種の細胞骨格の相互関係を検討することは極性形成機構、細胞の機能を明らかにする上で重要である。

また、癌化した上皮細胞は増殖能は旺盛であるが本来の機能は低下あるいは消失しており、その原因の一つとして極性の変化ないし消失が考えられる。細胞の極性形成の機構解明は、細胞の癌化の機序の解明という点も含めて興味ある問題である。細胞骨格や極性形成の研究では、cell lineを利用する場合もあるが、こ

IFの分布が不均一になっていた (Fig. 7)。抗 Act-mAb を使用した免疫電顕において、Act をラベルする金粒子が多数この凝集物上に観察された (Fig. 8)。この現象は CD 処理により断裂した Act 線維が集合していることを意味するものと思われた。また、抗 DP mAb による免疫電顕で、DP をラベルする金粒子を Act の凝集部位に一致してしばしば観察した。そして、その周囲では IF の分布は不整となっていた (Fig. 9)。

考 察

今回著者は、デスモソーム形成と形成における 3 種

れは機能的にかなり限定され、極性が変化していると考えられ、cell lineの研究だけでなく高度に分化した初代培養細胞を使用した研究が重要と考えられる。以前、著者らは初代培養肝細胞を用いた研究で、毛細胆管形成におけるデスモソームの重要性と *in vivo* と同様の IF の構築が再形成されることを報告している⁵⁾。大腸癌の培養細胞を使った実験ではあるが、腺管構造の形成にデスモソームが密接に関連しているという報告もある⁸⁾。

著者の用いた方法は、Knapp ら⁹⁾が報告している MT と MF の特異的阻害剤であるコルヒチンやサイトカラシンを使用し、ある種の細胞骨格を破壊したときの他の細胞骨格の変化を観察するという方法である。そして、著者はデスモソームの観察も同時に行った。

IF に対しては、これまでの報告を見ると、IF の 1 つであるビメンチンフィラメントは、微小管阻害剤であるコルセミド処理で核近傍にリング状に集合し¹⁰⁾、サイトケラチンフィラメントは、培養肝細胞においてニッケル添加で細胞膜との結合が解離し核近傍に凝集する¹¹⁾。また、代謝阻害剤であるコルジセピンはビメンチンフィラメントとケラチンフィラメントの両者を凝集させると述べられている¹²⁾。阻害剤ではないが、IF に対するモノクローナル抗体を細胞内に直接注入する阻害実験も行われている¹³⁾。このように IF の特異的阻害剤は現在まで見つかっていない。

今回われわれの実験結果では、サイトカラシン D 単独処理群に比べ、サイトカラシン D とコルヒチン同時処理群で IF の分布がより不均一になった。このことは、IF の空間分布には、デスモソームによる細胞周囲への固定のみならず微小管の存在も重要であることを意味している。そして、サイトカラシン D 処理により MF がデスモソーム周囲に凝集することより、デスモソームには IF のみならず MF も結合し、両者がデスモソームの形成に関与していることが推察された。

この結果はアクチンフィラメントは微小管関連蛋白 (MAP) を介して微小管と関連性を有しているとする生化学的研究¹⁴⁾や、微小管と IF との関連性を示唆する免疫組織化学的研究成績¹⁵⁾と合致する。また、デスモソームに関しては、ケラチンフィラメントの出現におけるデスモソームの重要性は細胞の種類や報告者によって異なっておりまだ十分に解明されていない^{16,17)}。培養表皮細胞を使った研究では、アクチンフィラメントは、デスモソーム形成過程において、デスモ

ブラキンを運ぶレールの役割を果たしていると考えられている¹⁸⁾。われわれも、初代培養肝細胞の培養20時間後の観察から、肝細胞間の接着面に伸びたアクチンフィラメントの上に一致してデスモブラキンは並んで存在している像を観察している(未発表データ)。したがって、アクチンフィラメントはデスモソームの形成に重要であり、さらに、形成後もデスモソームと関連性を有しているものと考えられる。IF と MF に関しては、Pankov ら¹⁹⁾が、IF と MF を結合させる蛋白 (45 kD 蛋白) が存在すると報告しているが、その詳細な細胞内分布については検討していない。今回の研究より、それはデスモソームを介して結合していることが推察された。また、最近、デスモソームとアクチンフィラメントの結合を示唆する報告として、Cowin ら²⁰⁾は、デスモソームの裏打ち蛋白が adherence junction の裏打ち構造にも局在すると述べている。

近い将来、IF と MT を結合している蛋白や IF と MF を結合している蛋白が、デスモソーム分画あるいは肝細胞の毛細胆管分画から同定されるものと期待される。

細胞極性の形成機序やその破壊の機序の解明は、細胞の癌化や種々の肝病態を解明する上にもきわめて重要であり、今後、さらに細胞骨格や細胞接着の面からの検討が必要と思われる。

結 語

初代培養肝細胞を用いて、細胞骨格相互関係や細胞骨格とデスモソームの関係を検討した。その結果、中間径フィラメントとマイクロフィラメントはデスモソームを介して相互に重要な関連性を有している。そして、中間径フィラメントは細胞質内では微小管との関連性の元に細胞の極性形成や立体構築形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。この成績は、細胞の極性形成や肝疾患の細胞骨格病理を研究する上で重要と思われた。

謝辞：稿を終えるにあたり、研究の機会を与えて下さいました京都府立医科大学第3内科学教室故瀧野辰郎教授、御指導、御校閲賜りました加嶋 敬教授に深謝致します。また、終始直接御指導をいただき、御校閲を賜りました岡上武助教授に心から感謝致しますとともに、研究遂行にあたりご協力戴いた研究室の諸兄にお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第26回日本肝臓学会総会および1990年度国際肝臓学会 (IASL) (ゴールドコースト、オーストラリア) において発表した。また本研究の一部は、文部省

科学研究費補助金 (一般研究 (B) 62480198) により行われた。

文 献

- 1) Franke WW, Schmid E, Grund C, et al: Antibodies to high molecular weight polypeptides of desmosomes: Specific localization of a class of junctional proteins in cells and tissues. *Differentiation* 20: 217—241, 1981
- 2) Cowin P, Garrod DR: Antibodies to epithelial desmosomes show wide tissue and species cross-reactivity. *Nature* 302: 148—150, 1983
- 3) Fey EG, Wan KM, Penman S: Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: Three-dimensional organization and protein composition. *J Cell Biol* 98: 1973—1984, 1984
- 4) Katsuma Y, Marceau N, Ohta M, et al: Cytokeratin intermediate filaments of rat hepatocytes: Different cytoskeletal domains and their three-dimensional structure. *Hepatology* 8: 559—568, 1988
- 5) 森本道雄, 岡上 武, 伊藤義人, 他: 肝細胞の極性形成におけるデスモソームと中間径フィラメントの役割. *肝臓* 31: 1249—1253, 1990
- 6) Okanoue T, Ohta M, Fushiki S, et al: Scanning electron microscopy of the liver cell cytoskeleton. *Hepatology* 5: 1—6, 1985
- 7) Lazarides E: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249—256, 1980
- 8) Fukamachi H, Kim YS: Importance of desmosome formation for glandular organization of LS174T human colon cancer cells in organ culture. *Devel Growth & Differ* 31: 307—313, 1989
- 9) Knapp LW, O'guin WM, Sawyer RH: Rearrangement of the keratin cytoskeleton after combined treatment with microtubule and microfilament inhibitors. *J Cell Biol* 97: 1788—1794, 1983
- 10) Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H: Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* 38: 538—555, 1968
- 11) Kawahara H, Cadrin M, Perry G, et al: Role of cytokeratin intermediate filaments in trans-hepatic transport and canalicular secretion. *Hepatology* 11: 435—448, 1990
- 12) Zieve GW, Roemer EJ: Cordycepin rapidly collapses the intermediate filament networks into juxtanuclear caps in fibroblasts and epidermal cells. *Exp Cell Res* 177: 19—26, 1988
- 13) Klymkowsky MW, Miller RH, Lane EB: Morphology, behavior, and interaction of cultured epithelial cells after the antibody-induced disruption of keratin filament organization. *J Cell Biol* 96: 494—509, 1983
- 14) Griffith LM, Pollard TD: The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 257: 9143—9151, 1982
- 15) Geiger B, Singer SJ: Association of microtubules and intermediate filaments in chicken gizzard cells as detected by double immunofluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4769—4773, 1980
- 16) Bologna M, Allen R, Dulbecco R: Organization of cytokeratin bundles by desmosomes in rat mammary cells. *J Cell Biol* 102: 560—567, 1986
- 17) Jones JCR, Goldman RD: Intermediate filaments and the initiation of desmosome assembly. *J Cell Biol* 101: 506—517, 1985
- 18) Green KJ, Geiger B, Jones JCR, et al: The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosomes and adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes. *J Cell Biol* 104: 1389—1402, 1987
- 19) Pankov RG, Uschewa AA, Tasheva BT, et al: Actin participates in the structure of liver intermediate filaments. *Cell Biol Int Rep* 9: 1003—1011, 1985
- 20) Cowin P, Kapprell HP, Franke WW, et al: Plakoglobin: A protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 46: 1063—1073, 1986

Relationship between cytoskeleton and desmosome in the primary cultured hepatocytes

Michio MORIMOTO*

We evaluated interrelationship of cytoskeleton (CS) and desmosome (DS) in primary cultured hepatocytes using CS disrupting agents.

After 24 hrs incubation of rat hepatocytes, the mediums were exchanged to the medium containing colchicine (Co) and/or cytochalasin D (CD). The fluorescence microscopy was performed for cytokeratin (CK), desmoplakin (DP), tubulin (Tu) and F-actin. Immunoelectron microscopy was done to observe intermediate filaments (IFs) and DSs.

In the Co treated cells, microtubules disappeared and Tu was diffusely stained but other CSs and DP were not changed. In the CD treated cells, the disrupted actin bundles formed aggregates, where fluorescence labeling DP often coexisted and the distribution of CK was slightly altered. In the cells treated with Co and CD, the attachment of hepatocytes became loose, in which the distribution of CK in their cytoplasm appeared heterogeneous. Ultrastructural study revealed that the aggregation of actin might result in the concentration of IFs and gold particles labeling DP often coexisted in the aggregates.

Our results indicate that IFs are connected with microfilaments with the aid of DSs in the cell periphery and microtubules contribute to the distribution of IFs in the cytoplasm.

* Third Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine (Kyoto)