魚類培養細胞に対する細胞外マトリックスの影響^{*1}内 田 直 行^{*2}

日本大学生物資源科学部

細胞外マトリックス (ECM) 成分は直接あるいは間接的に細胞表面のレセプターに結合し、レセプターを介して細胞内の細胞骨格に影響を与え、細胞の増殖、分化、移動など多様な現象をコントロールしている。¹⁾ これらのことから、生体になるべく近い状態を保持した細胞の培養を考えると ECM の存在を無視することはできない。そこで、細胞の増殖²⁾、DNA 合成³⁾などを行うための第一義的現象である細胞の培養基質への接着と伸展に着目し、ECM の代表的成分であり、魚類においてもその性質が比較的解明されている真皮 Type I コラーゲン⁴⁾および血漿 FN (pFN)^{5,6)}が肝および線維芽細胞に及ぼす影響についてここ数年間検討してきた著者らの結果を紹介する。

1. 肝細胞

肝細胞の無血清培地による初代培養には FN およびコラーゲンなどのコーティングベトリディッシュ (コートディッシュ) を用いることが有効とされている。⁷⁾ 林は、ウナギ、コイおよびテラピアの肝細胞をウマ pFN およびウシ Type I コラーゲンのコートディッシュで培養したところ、ウナギはウマ pFN のみで、コイはウシ Type I コラーゲンのみで培養でき、テラピアは両コートディッシュ共に効果がないことを報告している。⁸⁾ そこで、著者らは 2 種のコイ pFN (CpFN-I⁵⁾および II⁶⁾)、ウシ pFN (BpFN)⁵⁾およびコイ真皮 Type I コラーゲン (CSC)⁴⁾のコートディッシュ上で 10 魚種の肝細胞を培養し、無コートディッシュと比較した。その結果、ウナギ、フナ、オオクチバスおよびブルーギルの肝細胞は 3 種 FN でのみ接着・伸展を示した。ニジマスおよびサクラマスは 3 種 FN および CSC のみで、アユは 3 種 FN で強く、コラーゲンおよび無コーティングで弱く接着・伸展を示した。一方、コイは CSC のみで、ナマズは 2 種 CpFN でのみ接着・伸展を示した。また、テラピアはいずれにおいても接着・伸展を示さず、オオクチバス肝細胞は 3 種 FN で接着・伸展を示すものの速やかに形態変化した。4 種タンパク質のコートディッシュ上で接着・伸展しなかったテラピア肝細胞はテラピア

pFN (TpFN) で接着・伸展した。また、オオクチバス肝細胞の形態変化はオオクチバス pFN (LpFN) により抑制される傾向を示したが十分でなく、ナマズ肝細胞の弱い伸展状態はナマズ pFN (JcPFN) によっても改良されなかった。3 種 FN でのみ接着・伸展を示すウナギおよび CSC でのみ接着・伸展を示すコイ肝細胞の接着・伸展にたいする CpFNs (CpFN-I + II) および CSC 濃度の影響を検討した結果、いずれも濃度に依存せず両細胞は結合する ECM 成分を選択するものと判断できた。また、テラピア肝細胞は広範囲の濃度の CpFNs コートディッシュに対しても接着・伸展を示さず、テラピア肝細胞は結合する FN に対して著しい種特異性を持つことが確認できた。一方、ウナギ肝細胞は、TpFN, LpFN および JcPFN のコートディッシュ上で CpFNs と同等の接着・伸展を示した。このことから、テラピア、オオクチバスおよびナマズ肝細胞の特異的な性質の発現要因は主に肝細胞の性質に起因するものと推測された。

2. 線維芽細胞

一般に線維芽細胞をプラスチックベトリディッシュに播種し、ウシ胎児血清 (FBS) を含む培地で培養すると、線維芽細胞は数時間で接着・伸展を完了する。しかし、コイのヒレより組織片遊出培養法により得た線維芽細胞を FBS を含む培地により継代培養すると、細胞のベトリディッシュ面に接着する速度は非常に遅く、また、増殖する速度も遅かった。そこで、ベトリディッシュを CSC あるいは CpFNs でコートしたところ、接着・伸展は著しく促進された。このことは、肝細胞で見られたように魚類の線維芽細胞もベトリディッシュへの接着・伸展に ECM 成分の助けが必要であり、しかも種による ECM 成分の選択性あるいは特異性が存在すると予測された。そこで、CpFNs, CSC および熱変性 CSC (CSG) コートディッシュ上に、コイ、フナおよびテラピアのヒレ由来線維芽細胞を播種し、2 時間後の接着細胞数をウシ血清アルブミン (BSA) コートディッシュと比較した。その結果、表 1 に示すようにコイ線維芽

^{*1} Effects of Extracellular Matrix on the Cultured Cells of Fishes.^{*2} Naoyuki Uchida (Department of Marine Science and Resources, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252, Japan).

表1 各種線維芽細胞の接着におよぼす細胞外マトリックス成分の影響

細胞	接 着 細 胞 数 比 ^{*1}						
	コ ー テ ィ ン グ 基 質						
	BSA(細胞数×10 ⁴)	CsC	CsG	CpFNs	TsC	TsG	TpFNs
コイ	1(4.5)	8.6	8.0	9.9	— ^{*2}	—	—
フナ	1(1.1)	3.6	3.5	4.8	—	—	—
テラピア	1(0.1)	3.9	4.1	6.1	—	—	—
	1(0.04)	—	—	—	23.5	30.6	44.0

*1 BSA に対する接着細胞数を1としたときの比率で表す。

*2 未測定。

細胞はCpFNs, CSCおよびCSGにBSAの場合の約8~10倍の速度で接着した。フナおよびテラピア線維芽細胞も同様に約4~6倍の速度で接着した。また、肝細胞において著しい種特異性を示したテラピアは線維芽細胞でも種特異性を示し、テラピア線維芽細胞をTpFN, テラピア真皮Type Iコラーゲン(TSC)および熱変性TSC(TSG)コートディッシュ上に播種した場合、コイECMコートに比べ、接着促進の度合いはそれぞれの約6~7倍高かった。次に、培地中の血清の影響を検討するため、コイヒレ線維芽細胞をCpFNsおよび無コートディッシュに播種し、FBSあるいはコイ血清を含むL-15培地で培養したときの接着細胞数の変化を図1に示す。無コートの場合、いずれの血清培地においても細胞の増加は少なかった。コートディッシュ上でコイ血清培地を用いて培養した場合、培養時間の経過に従い細胞数は増加し、増殖速度が低下した9日目に培地交換することにより再び高い増殖速度が得られた。一方、FBS培地では、2日目より接着伸展細胞数は減少し、細胞の死滅が観察されたが、9日目(矢印)にコイ血清培地と交換することにより、細胞増殖速度は急激に増加した。また、著者は、FBS培地がオオクチバスおよびテラピア線維芽細胞の組織からの遊出を阻害するが、この阻害は同種血清を含む培地を用いることにより解消することを確認している。

以上、魚類の肝細胞および線維芽細胞の培養にFNおよびコラーゲンをコート基質として使用することは非常に有効であるといえる。また、魚類線維芽細胞の培養には、汎用されているFBSよりもむしろ魚類血清の方が適していると思われる。しかし、魚類の細胞とこれらとの相互作用には著しい種特異性が認められることから、可能な限り同種由来のECM成分および血清を適用することを提唱したい。

文 献

- 1) 大池康照, 二宮善文, 村垣泰光: 細胞外マトリックス分子

図1 コイヒレ線維芽細胞の増殖におよぼす血清の影響。

の構造と機能, 「細胞外マトリックスの動的機能」(板倉照子編), 秀潤社, 東京, 1990, pp. 9-30.

- 2) L. E. Dike and S. R. Farmer: Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6792-6796 (1988).
- 3) C. O'Neill, P. Jordan, and G. Ireland: Evidence for two distinct mechanisms of anchorage stimulation in freshly explanted and 3T3 swiss mouse fibroblasts. *Cell*, 44, 489-496 (1986).
- 4) S. Kimura, Y. Ohno, Y. Miyauchi, and N. Uchida: Fish skin type I collagen: wide distribution of an $\alpha 3$ subunit in teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88B, 27-34 (1987).
- 5) 内田直行, 渡辺正治, 垣内麻由美, 安齊 寛, 西出英一: コイ血漿フィブロネクチンの精製と性質. 日本誌, 56, 315-322 (1990).
- 6) N. Uchida, M. Watanabe, M. Kakiuchi, H. Anzai, and E. Nishide: Isolation and characterization of a novel fibronectin from the plasma of carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1107-1113 (1992).
- 7) 市原 明: 肝細胞(ラット), 「機能細胞の分離と培養」(三井洋司 他編), 丸善, 東京, 1988, pp. 175-191.
- 8) 林 征一: 魚類の組織培養—ウナギ・コイ肝細胞の培養, 「マリンバイオテクノロジー」(嵯峨直恒 他編), 裳華房, 東京, 1991, pp. 44-57.