

多分化能を有するヒト Embryonal Carcinoma (EC) 細胞の Hexamethylene Bisacetamide (HMBA) による 分化誘導前後における形質発現の変化

千葉大学医学部産科婦人科学教室

木村 博昭 関谷 宗英 河田 誠 高見澤裕吉

Changes in Various Differentiation-related Markers after Differentiation Induction of a Pluripotent Human Embryonal Carcinoma (EC) Cell Line by Hexamethylene Bisacetamide

Hiroaki KIMURA, Souei SEKIYA, Makoto KAWATA
and Hiroyoshi TAKAMIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Chiba University School of Medicine, Chiba

概要 多分化能を有するヒト EC 培養細胞株 NEC14 は, *in vitro* で分化誘導物質 HMBA 10^{-2} M 3 日間処理にて, 形態的に分化し, 細胞分裂が著しく低下するが生存している. 分化誘導前後における各種分化関連マーカー (細胞表面抗原, レクチン結合基, 中間径フィラメント, 分泌蛋白, 細胞外マトリックス蛋白) の形質発現を調べ, 以下の結果を得た.

1) 細胞表面抗原については, 分化誘導後ヒト主要組織適合抗原 HLA-A, B, C の顕著な発現がみられた. また stage specific embryonic antigens (SSEA) は分化誘導前後において SSEA-1⁻/SSEA-3⁺ → SSEA-1⁺/SSEA-3⁻ の変化が認められた.

2) 種々のレクチン結合基のうち peanut agglutinin (PNA) 結合基が分化誘導後減少した.

3) 中間径フィラメントの分化誘導前後における変化の特徴は, 誘導後のみ vimentin が明らかに検出された.

4) 細胞外マトリックス蛋白である tenascin は分化誘導後顕著に検出された.

以上の結果から, NEC14 細胞は, HMBA 処理にて形態的に分化し, 主として胎児性成分である中胚葉由来間葉系成分の形質を発現することが判明した.

Synopsis A pluripotent human EC cell line (NEC14) could be induced to morphologically differentiate by treatment with 10^{-2} M HMBA for 3 days *in vitro*. The changes in various differentiation-related markers (cell surface antigens, lectin binding sites, intermediate filaments, secreted products and extracellular matrix proteins) after induction of differentiation were examined in order to clarify the differentiation lineage. The results were as follows:

1) The most conspicuous changes in cell surface antigens after differentiation were the expression of major human histocompatibility antigens (HLA-A,B,C) and the changes in stage specific embryonic antigens (SSEA-1⁻/SSEA-3⁺ → SSEA-1⁺/SSEA-3⁻).

2) Vimentin, mesenchymal intermediate filament, was only detected after the differentiation.

3) Tenascin, an extracellular matrix protein produced in mesenchymal cells, was produced after the differentiation.

These results indicate that HMBA can induce NEC14 cells to differentiate into mesenchymal elements of embryonal mesoderm.

Key words: Human EC cells • Pluripotent • Hexamethylene bisacetamide • Differentiation markers • Mesodermal mesenchyme

緒 言

マウスの Embryonal carcinoma (EC) 細胞は,

胚細胞腫瘍の幹細胞 (stem cell) で悪性細胞であるが, 初期胚に類似した多分化能を有する¹²⁾. ヒト

の胚細胞腫瘍にもマウスの EC 細胞と類似のヒト EC 細胞が確認され⁷⁾, 近年多数のヒト EC 培養細胞株が樹立されている⁷⁾.

著者らは各種ヒト EC 培養細胞株の性格をマウスと比較検討し¹⁹⁾²⁰⁾, その中の NEC14細胞が多分化能を有し²⁾¹⁸⁾, 分化誘導物質 HMBA 処理で分化が誘導されることを報告してきた⁹⁾²⁰⁾.

一方, ヒト EC 細胞の分化系列(differentiation lineage)を明らかにするため, 形態的な検索とともに分化関連マーカー(細胞表面抗原, レクチン結合基, 中間径フィラメント, 分泌蛋白, 細胞外マトリックス蛋白など)の形質発現を総合的に検索することが有用である⁶⁾. 今回多分化能を有するヒト EC 細胞培養細胞株 NEC14を HMBA 処理により in vitro で分化誘導し, 分化前後における種々の分化関連マーカーを調べ, その形質発現による分化系列の同定を試みた.

材料と方法

1. ヒト EC 培養細胞株

多分化能が証明された精巣胚細胞腫瘍由来の NEC14細胞株を用いた¹⁴⁾¹⁹⁾. 培養液は RPMI1640 に10%FBS (fetal bovine serum) 及び抗生物質を添加したものを用い, 5%CO₂, 95%空気を流し, 湿潤条件下温度は37°Cに調節した. 継代は25 cm²培養フラスコに細胞10⁶個前後接種し, 1週間

前後の間隔で行った. 細胞の回収は通常 pipetting で行った.

2. HMBA

N,N'-hexamethylene bisacetamide は Sigma Chem. Co. から購入し血清無添加の培養液で10⁻¹ M のストック溶液を作製し, -20°Cで保存した.

3. 分化誘導

細胞10⁶個を25cm²培養フラスコに接種し, 48時間培養後から HMBA 10⁻²M を添加72時間処理した.

4. モノクローナル抗体及びレクチン

今回用いた細胞表面抗原及び中間径フィラメントに対する各種モノクローナル抗体とレクチンの特異性, 抗原決定基, 入手先は表1に示すごとくである.

5. 直接及び間接蛍光抗体法

単個細胞を0.05%trypsin-2mM EDTA 溶液, 37°C処理で回収し, 10⁶個の細胞と表1に示す各種1次抗体あるいは FITC 標識レクチンと4°C, 30分間反応させた. PBS 溶液に浮遊し, 遠沈を3回繰り返し洗浄を行なった. 間接法は更に FITC 標識2次抗体(抗マウス IgG あるいは IgM, 抗ラット IgM)と4°C, 30分間反応させた. PBS 溶液で3回洗浄後, fluorescence-activated cell sorter (FACS tar, Becton Dickinson) を用いて分析し

表1 各種細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体とレクチンの特質及び入手先

MoAbs/Lectin	抗原, 特質	入手先
MoAbs		
W6/32	HLA-A, B, C antigen	Biosys. S.A.
SSEA-1	mouse EC cells	D. Solter
SSEA-3	human EC cells	D. Solter
ヒト Thy-1	human brain, thymus and human EC cells	Serotec Lt
K-21	human EC cells and yolk sac tumors	Cambrige Res. Lab.
R-24	melanoma	Cambrige Res. Lab.
NC-1	neuroectodermal cells	Immunotech
Leu-7	NK and neuroectodermal cells	Becton Dickinson
Lectin		
PNA	D-Gal-β-(1→3)-GalNAc	E/Y Lab.
MPA	α-D-Gal	E/Y Lab.
ConA	α-D-Glc, α-D-Man	E/Y Lab.
RCA-1	β-D-Gal	E/Y Lab.
DSA	(β(1→4)-D-GlcNAc) ²	E/Y Lab.
DBA	α-D-GalNAc, D-Gal	E/Y Lab.
GS-1	α-D-Gal	E/Y Lab.

た、

6. 免疫組織化学

静置単層培養細胞を rubber policeman で採取し、1,000回転5分間遠沈後、細胞ペレットを回収した。ペレットを96%エタノール/酢酸(99ml:1ml)混合液で固定し、DAKOPATTSより購入した中間径フィラメントキット(cytokeratin, vimentin, desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP))のモノクローナル抗体を用いて、peroxidase anti-peroxidase (PAP)法により染色した。

7. Western blotting

ポリクローナル抗体抗マウス laminin, 抗ヒト type IV collagen は Advance Corp., 抗 tenascin は Chemicon Int. Inc. より購入した。細胞抽出液を2-mercaptoethanol存在下で電気泳動後、PVDF フィルター(Millipore)に転写し、Towbin et al. の方法²³⁾に従って PAP 染色した。

結 果

1. 細胞表面抗原

表2及び図1に示すごとく、ヒト主要組織適合抗原 HLA-A, B, Cは未分化 NEC14細胞では10%

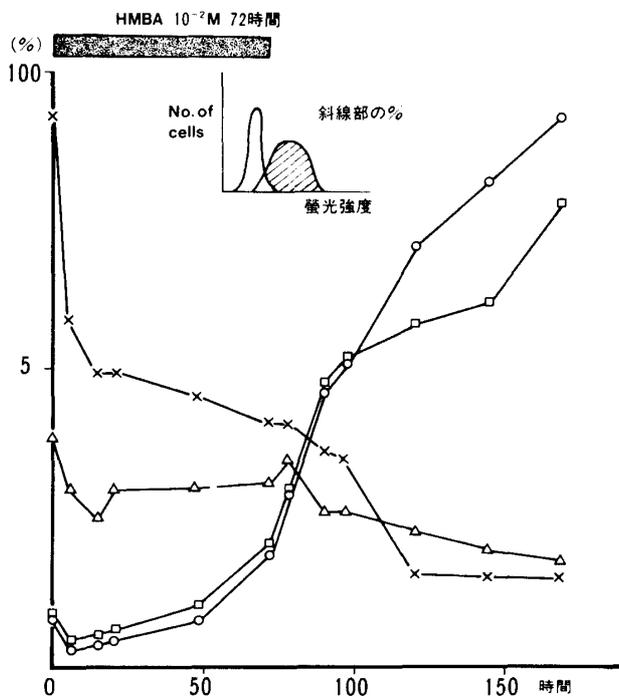


図1 NEC14細胞の分化誘導における各種細胞表面抗原の推移

□—□ : W6/32, ○—○ : SSEA-1,
△—△ : SSEA-3, ×—× : ヒト Thy-1

表2 分化誘導前後における各種細胞表面抗原及びレクチンレセプターの発現

MoAbs/Lectin	分化誘導前	分化誘導後
MoAbs		
W6/32	-	+
SSEA-1	-	+
SSEA-3	+	-
ヒト Thy-1	+	-
K-21	+	-
R-24	-	-
NC-1	-	-
Leu-7	-	-
Lectin		
PNA	++	+
MPA	+	+
ConA	+	+
RCA-1	++	++
DSA	+	+
DBA	-	-
GS-1	-	-

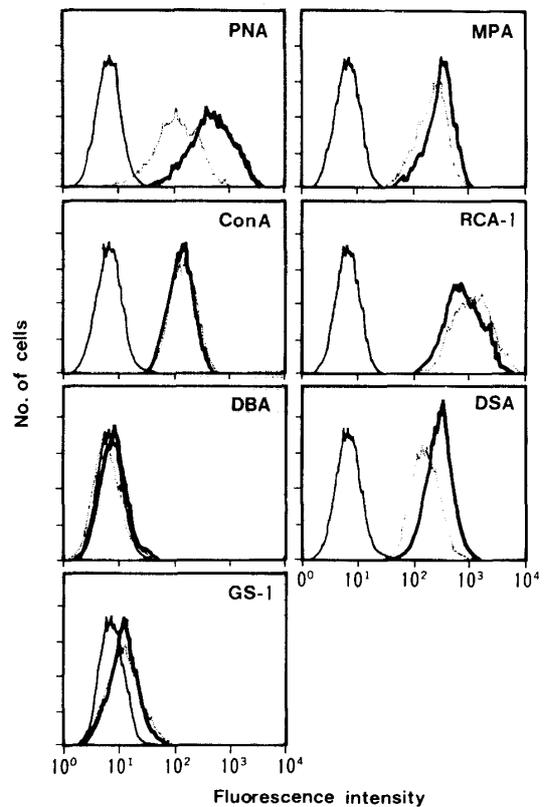


図2 NEC14細胞の分化誘導前後における各種レクチンレセプターの変化

— : コントロール, — : 未分化 NEC14細胞,
- - - : 分化誘導後7日目の NEC14細胞

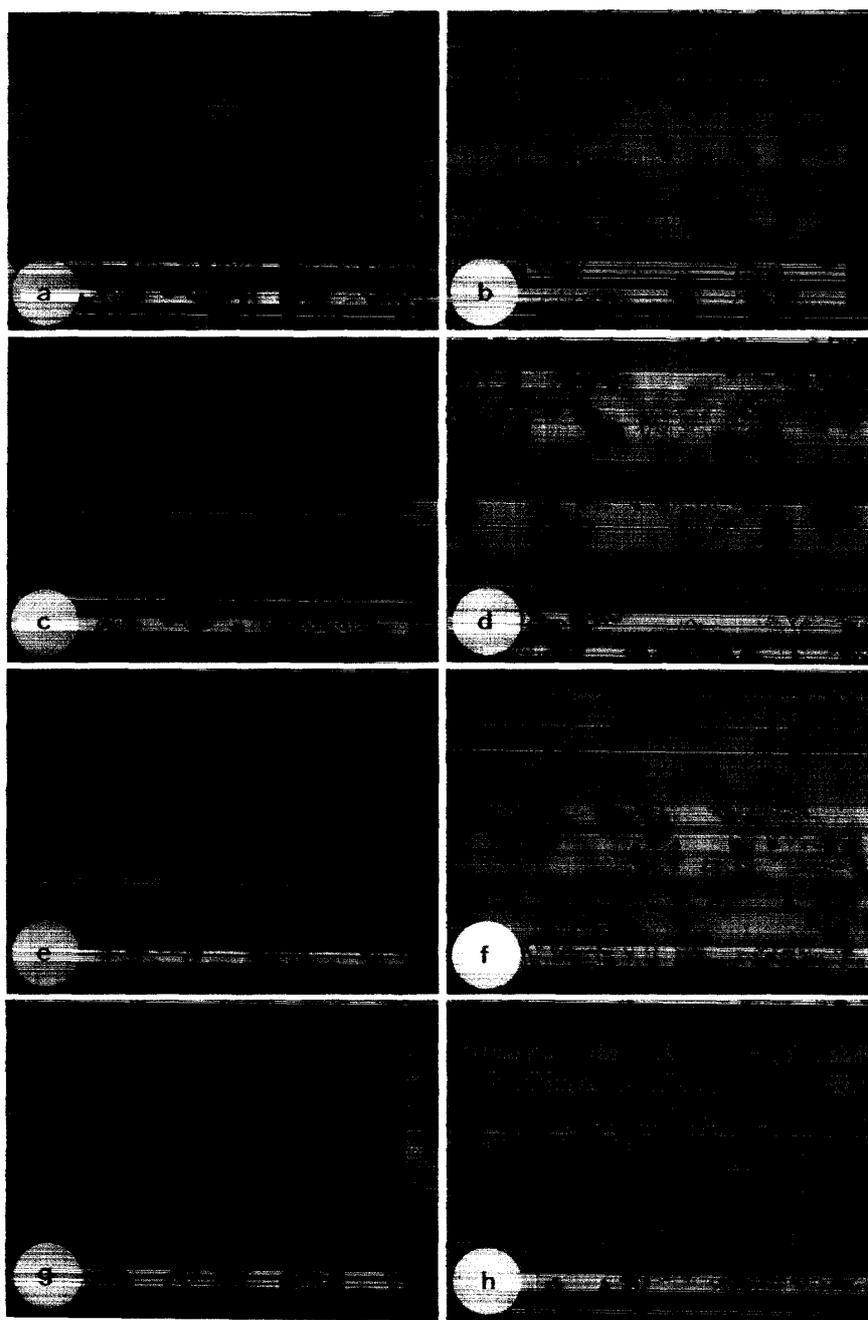


図3 分化誘導前後における細胞ペレットを用いた免疫組織染色 (PAP 法)
 左(a, c, e, g) : 分化前, 右(b, d, f, h) : 分化後. (a, b) : cyokeratin, (c, d) : vimentin,
 (e, f) : desmin, (g, h) : GFAP

前後の細胞にしか発現していなかったが, HMBA 処理による分化誘導後経時的に発現細胞が増加し, 処理170時間後には約80%の細胞に発現が認められた. SSEA-1もほぼ同様の発現パターンを示したが, 逆にヒト Thy-1は未分化 NEC14細胞では90%以上の細胞に発現していたが, 分化誘導開始後経時的に発現細胞が減少し, 処理170時間後には

15%前後の細胞のみにしか発現していなかった. SSEA-3は未分化細胞の40%に発現していたが, 分化誘導後漸減し, ヒト Thy-1と類似のパターンを示した. また R-24, NC-1, Leu-7は分化誘導前後とも発現は認められず, K-21では分化後発現は減少した.

ヒト EC 細胞の分化誘導前後における SSEA-

表3 培養細胞ペレットを用いた PAP 法による中間径フィラメント及び分泌蛋白の検出

中間径フィラメント/分泌蛋白	分化誘導前	分化誘導後	
		7日目	70日目
中間径フィラメント			
cytokeratin	+	+	++
vimentin	-	-	++
desmin	-	-	(+)
GFAP	-	-	(+)
分泌蛋白			
hCG	-	-	-
AFP	-	-	-

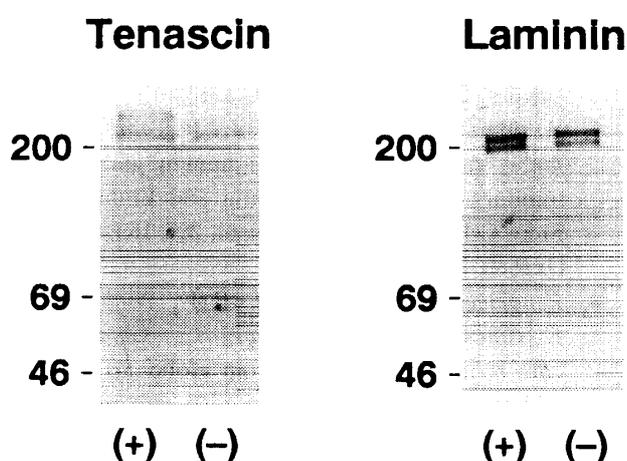


図4 Western blotting 法における分化誘導前後での tenascin 及び laminin
(+) : 分化誘導後, (-) : 分化誘導前

1⁻/SSEA-3⁺ → SSEA-1⁺/SSEA-3⁻ の変化は、マウス EC 細胞における SSEA-1⁺/SSEA-3⁻ → SSEA-1⁻/SSEA-3⁺ の変化と対称的で、ヒト EC 細胞はマウス EC 細胞に比べやや未分化な形質を発現していると考えられる。

分化誘導前の未分化 NEC14 細胞では、ほぼ 100% の細胞に PNA, ConA, MPA, RCA-1, DSA など 5 種のレクチン結合基が検出され、分化誘導後には、PNA がやや減少した以外はほとんど変化しなかつた。DBA, GS-1 のレクチン結合基は分化誘導前後とも検出できなかつた (図 2)。

表 3 に示すごとく、4 種の中間径フィラメントと 2 種の分泌蛋白 (hCG, AFP) の合成を、細胞ペレットを用いて免疫組織化学的に検索を行うと、分化誘導前の未分化 NEC14 細胞では、cyto-

keratin のみが検出された (図 3)。分化誘導直後 (7 日目) はいずれの中間径フィラメント、分泌蛋白ともに合成の誘導はみられなかつたが、長期間 (70 日間) 培養を続けた分化細胞では、vimentin が顕著に発現し、一部の分化細胞では desmin の発現もみられた (表 3, 図 3)。

細胞外マトリックス蛋白の合成を、Western blotting 法で調べると、laminin の合成がみられたが、分化誘導前後で変化がみられなかつた。一方、tenascin では分化誘導後発現が顕著に増加した (図 4)。

考 案

多分化能を有するヒト EC 培養細胞は、培養条件により自然に分化⁵⁾⁷⁾¹⁶⁾¹⁸⁾、また各種の分化誘導物質処理にて確実に分化を誘導できる²¹⁾。分化細胞は形態的な変化に伴い増殖が停止し、種々の形質が発現する⁴⁾。形質マーカーとしては、ヒト主要組織適合抗原 (HLA)、分化関連細胞表面抗原 (SSEA)、レクチン結合基、酵素 (alkaline phosphatase など)、プロテアーゼ (plasminogen activator など)、中間径フィラメント、分泌蛋白 (hCG, AFP)、細胞外マトリックス蛋白などが調べられている⁴⁾。

マウスの EC 細胞表面には主要組織適合抗原 (H-2) が発現しておらず、分化後発現する。ヒトの EC 細胞表面では、極少量ではあるが、主要組織適合抗原 (HLA) が発現しており³⁾、今回分化誘導後著しく HLA-A, B, C の発現が増加した。

SSEA-1 はマウス EC 細胞株 F9 を免疫して得られたモノクローナル抗体で、SSEA-3 は 4 ~ 8 細胞期のマウス胚を免疫して得られたモノクローナル抗体であり、マウスの EC 細胞では、SSEA-1⁺/SSEA-3⁻、分化後 SSEA-1⁻/SSEA-3⁺ へと変化する。逆にヒトの EC 細胞は未分化で SSEA-1⁻/SSEA-3⁺、分化後 SSEA-1⁺/SSEA-3⁻ へと変換することが判明した。すなわち分化誘導により細胞表面糖脂質が globo 系から lacto 及び ganglio 系へスイッチする⁸⁾。この分化関連細胞表面抗原の変化を、マウス初期胚と対応させると、胚盤胞より未熟な卵割期の抗原様式と一致する⁸⁾。

細胞分化の過程で、糖質複合体の糖鎖が変化する

ることが、レクチンを用いた実験から明らかにされている¹⁾。マウスの未分化EC幹細胞はPNA, LotusA, DBAなどのレクチンに対する結合基を発現しているが、分化細胞はこれらの結合基が減少する¹⁾。今回検討したヒトの未分化EC幹細胞では、マウスと同様分化誘導後PNAの発現が減少したが、分化誘導前後でDBAはほとんど発現していなかった。

中間径フィラメントは組織特異性が高く、その発現は細胞分化機能のマーカーとして有用である¹¹⁾。マウスのEC幹細胞ではvimentinのみ発現しているが、今回の結果のように通常ヒトのEC幹細胞ではcytokeratinの発現がみられる²²⁾。分化誘導後cytokeratinとともにvimentinが顕著に発現し、一部の分化細胞ではdesminの発現もみられた。今回の結果から、分化細胞ではcytokeratinとvimentinがcoexpressionしている所見が得られ、胎児組織ではよくみられる所見と一致した²⁴⁾。

胎児外成分への分化マーカーであるhCGは未分化ヒト幹細胞で極少量合成されているが、AFPは通常検出できない¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。分化誘導後においてもhCG, AFPともに合成はみられなかつた点より、胎児外成分へ誘導はなかつたものと思われる。

ヒトEC幹細胞では通常laminin以外の細胞外マトリックス蛋白を合成していない¹⁶⁾。分化誘導後fibronectinの合成がみられる¹³⁾¹⁶⁾。分化誘導前後のtenascinの発現に関する報告はいまだみられないが、今回分化細胞にtenascinの顕著な発現がみられた。

以上検討してきた分化誘導前後の形質発現の変化を総合すると、多分化能を有するヒトEC細胞株NEC14の幹細胞を、分化誘導物質HMBA処理により分化誘導すると、主として間葉系細胞の形質が発現することが判明した。

文 献

1. 村松 喬：細胞分化と糖蛋白質。医学のあゆみ，121：467，1982。
2. 山沢功二，関谷宗英，木村博昭，河田 誠，高見澤裕吉：ヒトEmbryonal carcinoma培養細胞株の細胞生物学的特徴。日産婦誌，42：53，1990。
3. Andrews, P.W., Bronson, D.L., Wiles, M.V. and Goodfellow, P.N.: The expression of MHC antigens by human teratocarcinoma derived cell lines. *Tissue Antigens*, 17: 493, 1981.
4. Andrews, P.W. and Damjanov, I.: Immunocytochemistry of human teratocarcinoma stem cells. In *Monoclonal Antibodies in Cancer* (eds. S. Sell and R.A. Reisfeld), 339. The Human Press, New Jersey, 1985.
5. Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C. and Fogh, J.: Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2: Differentiation in vivo and in vitro. *Lab. Invest.*, 50: 147, 1984.
6. Andrews, P.W., Goodfellow, P.N. and Damjanov, I.: Human teratocarcinoma cells in culture. *Cancer Surv.*, 2: 41, 1983.
7. Andrews, P.W., Oosterhuis, J.W. and Damjanov, I.: Cell lines from human germ cell tumours. In *Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells* (ed. E.J. Robertson), 207. IRL Press, Oxford, 1987.
8. Fenderson, B.A., Andrews, P.W., Nudelman, E., Clausen, H. and Hakomori, S.: Glycolipid core structure switching from globo- to lacto- and ganglioseries during retinoic acid-induced differentiation of TERA-2-derived human embryonal carcinoma cells. *Develop. Biol.*, 122: 21, 1987.
9. Hasegawa, T., Nakada, S., Nakajima, T., Oda, K., Kawata, M., Kimura, H. and Sekiya, S.: Expression of various viral and cellular enhancer-promoters during differentiation of human embryonal carcinoma cells. *Differentiation*, 42: 191, 1990.
10. Izhar, M., Siebert, P.D., Oshima, R.G., DeWolf, W.C. and Fukuda, M.N.: Trophoblastic differentiation of human teratocarcinoma cell line HT-H. *Develop. Biol.*, 116: 510, 1986.
11. Lazarides, E.: Intermediate filament: A chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 51: 219, 1982.
12. Martin, G.R.: Teratocarcinoma and mammalian embryogenesis. *Science*, 209: 768, 1980.
13. McIlhinney, R.A.J. and Patel, S.: Characterization of the fibronectin synthesized by human germ cell tumors. *Cancer Res.*, 43: 1282, 1983.
14. Motoyama, T., Watanabe, H., Yamamoto, T. and Sekiguchi, M.: Human testicular germ cell tumors in vitro and nude mice. *Acta Path.*

- Jpn., 37 : 431, 1987.
15. *Motoyama, T., Watanabe, H., Yamamoto, T. and Sekiguchi, M.* : Production of β -human chorionic gonadotropin by germ cell tumors in vivo and in vitro. *Acta Path. Jpn.*, 38 : 577, 1988.
 16. *Pera, M.F., Cooper, S., Mills, J. and Parrington, J.M.* : Isolation and Characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells. *Differentiation*, 42 : 10, 1989.
 17. *Pierce, G.B. and Abell, M.R.* : Embryonal carcinoma of the testis. *Path. Ann.*, 5 : 27, 1970.
 18. *Sekiya, S., Ishige, H., Yamazawa, K., Kawata, M., Inaba, N., Nagao, K. and Takamizawa, H.* : The capacity for differentiation and production of human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in human embryonal carcinoma cell lines. *Int. J. Gynecol. Path.*, 7 : 373, 1988.
 19. *Sekiya, S., Kawata, M., Iwasawa, H., Inaba, N., Sugita, M., Suzuki, N., Motoyama, T., Yamamoto, T. and Takamizawa, H.* : Characterization of human embryonal carcinoma cell lines derived from testicular germ cell tumors. *Differentiation*, 29 : 259, 1985.
 20. *Sekiya, S., Kimura, H., Yamazawa, K., Kera, K., Kawata, M., Takamizawa, H. and Oda, K.* : Induction of human embryonal carcinoma cell differentiation using N,N'-hexamethylene bisacetamide in vitro. *Gynecol. Oncol.*, 36 : 69, 1990.
 21. *Sekiya, S., Tomita, Y., Chen, H.-Y., Kawata, M., Oosaki, T., Kuwata, T. and Takamizawa, H.* : Sensitivity of human germ cell tumor cell lines to human interferons. *Differentiation*, 33 : 266, 1987.
 22. *Teshima, S., Shimosato, Y., Hirohashi, S., Tome, Y., Hatashi, I., Kanazawa, H. and Kakizoe, T.* : Four new human germ cell tumor cell lines. *Lab. Invest.*, 59 : 328, 1988.
 23. *Towbin, H., Staehelin, T. and Godron, J.* : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76 : 4350, 1979.
 24. *Van Muijen, G.N.P., Ruiter, D.J. and Warnaar, S.O.* : Coexpression of intermediate filament polypeptide in human fetal and adult tissues. *Lab. Invest.*, 57 : 359, 1987.

(No. 7009 平3・7・16受付)