

温度変化がマウス副腎皮質腫瘍由来細胞 (Y-1 クローン) のステロイドホルモン分泌能に 与える影響に関する研究

岡山大学医学部癌源研究施設病理部門 (主任: 佐藤二郎教授)

市 川 淑 子

(昭和63年10月25日)

Key words : Y-1, ステロイドホルモン, ACTH, cyclic AMP, 温度感受性

緒 言

in vivo において, 脳下垂体から分泌される adrenocorticotrophic hormone (ACTH) の刺激によって, 副腎皮質はステロイドホルモンを生成し分泌する. in vitro でも, 副腎皮質あるいは副腎皮質腫瘍由来の培養細胞において ACTH の添加によってステロイドホルモンの分泌が促進されることは広く一般に認められている. さらに, ACTH による副腎皮質細胞でのステロイド生産に adenosine 3'-5' monophosphate (cyclic-AMP) が関与していることも明らかにされている¹⁾²⁾. ホルモン産生能を持つ副腎皮質の培養細胞を樹立することは非常に困難であるが, マウスの副腎皮質腫瘍由来の Y-1 細胞はステロイド産生能を持っており, in vitro でのホルモン産生及び分泌の研究によく用いられている³⁾⁴⁾⁵⁾.

現在のところ, 一般に動物細胞は37°Cで培養されることが多いが, 1970年代の後半からヒトの子宮癌や悪性黒色腫等の腫瘍細胞が正常細胞に比べて高温に対する感受性の高いことなどが報告され始めた. たとえば, ヒト子宮体内膜腺癌株細胞では39.5°C以上の高温で細胞増殖能の低下の他に, 形態学的変化や細胞障害が観察されている⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾. このように, 37°C以外の温度条件で細胞を培養した場合に, 細胞の増殖能や生理活性, 機能などがどのような影響を受けるかを検討することは, 非常に興味深いことである.

そこで, Y-1 細胞を用いて培養の温度条件を変化させたときに ACTH によるステロイド生産がどのような影響を受けるかについて実験を行った. さらに ACTH の作用機序に深く関連している cyclic AMP を用いたときに温度による影響が ACTH とではどのように違うかについても興味ある事実を認めたと報告する.

材 料 と 方 法

1. 細胞: 実験には1966年に樹立されたマウス副腎皮質腫瘍由来の Y-1 細胞株を用いた¹⁰⁾. 細胞の継代培養には, 合成培地 Ham's F-12に10%の新生牛血清 (三菱化成, 中標津, 北海道) を添加したものを継代用培地として用い, pH 7.2, 37°Cの条件下で単層培養を行なった.
2. 実験方法: Y-1 細胞を0.25%のトリプシン溶液でボトルよりはがし, 継代用培地を加えて 2×10^5 個/mlの濃度の細胞浮遊液をつくり, 35mmのプラスチック・ディッシュに計2mlを植え込み, 37°C, 5%CO₂を含む培養装置内で培養した. 4~5日間に容器底面に充満した状態 (confluent) に増殖した細胞を実験に用いた. まず, 顕微鏡下で細胞がほぼ confluent になったことを確認した後, 新しい継代用培地と交換し, 32~43°Cの各温度に調整した開放系温度勾配培養装置 (temperature gradient incubator; TGI, アドバンテック東洋, 東京) に移した. TGI は温度精度が非常に高く (温度誤差 $\pm 0.1^\circ\text{C}$), 一つの装置で同時に12種類の温度条件が得られる多温

度培養装置である。各温度条件で48時間の preincubation をした後、細胞を PBS (-) で2回洗浄し、 10^{-2} U/ml ACTH (Armour, Phoenix, ARIZ) または 1 mM cyclic AMP (cyclic AMP, ヤマサ醤油, 東京) を含む培地と交換した後、さらに2時間各温度に調整した TGI で培養した。ACTH などの inducer を添加した場合2時間で十分なステロイドの分泌が得られる (unpublished data)。2時間後にそれぞれのディッシュの培地を集め、遠心分離 (500g, 10分間) した後、その上清をステロイドホルモン測定用のサンプルとした。

3. ステロイドホルモンの測定: Y-1 細胞が培地中に分泌するステロイドの主な成分である $\Delta^4, 3$ -Keto-steroids の測定は, Silber らの Fluorometry 法を一部変更して行なった¹¹⁾。変更した点は次の3点である。①メチレンクロライドでステロイドを培地から抽出した後のアルカリ溶液による洗浄の省略。②メチレンクロライドの抽出液に30Nの H_2SO_4 を加え Vortex ミキサーで、20~30秒間攪拌した。③最後に、 H_2SO_4 層の fluorescence は exciting wave 470 nm, emitting wave 535nm で測定した。プラスチック・ディッシュに残った細胞は0.5Nの NaOH で溶解し、そのタンパク質量を Lowry 法によって測定した¹²⁾。ステロイドの量は $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ として表わした。

結 果

1. 各温度での細胞の生存率

細胞のステロイド分泌能に与える温度の影響を検討する前に、各温度条件で一定期間培養したときの細胞の生存率の変化を経時的に調べた (図1)。37°C の条件で4日間培養して confluent に達した細胞を培地に交換した後、32°C, 37°C, 40°C, 43°C の各温度に移して、それぞれ 14, 48, 68時間培養した後、細胞をトリプシンでディッシュからはずして集め、0.2%のニグロシン色素液を用いて染色し、生細胞数だけをビュルケル・チュルク型血球計算盤で測定した。図1に示すように、37°C では生細胞数は時間とともにわずかに増加するが大きな変化は見られない。また、各温度とも48時間後までは生細胞数

はほとんど減少していないが68時間後では32°C で90%、43°C ではほぼ80%までに生細胞数が減少している。従って、ステロイドホルモンの誘導実験において、各温度での preincubation time は48時間以内とした。

2. 各温度でのステロイド分泌量

1) まず最初に、Y-1 細胞を32~43°C の各温度で一定期間培養したときにどの程度のステロイドが培地中に分泌されるかを検討した。37°C で培養し confluent に達した細胞を ACTH などの inducer を含まない各種の F-12 培地で交換し、32°C から40°C まで1度間隔で9段階の温度条件で24時間培養し、培地中に分泌されたステロイドを定量した (図2)。血清の代わりに10mg/ml bovine serum albumin (BSA) を加えた F-12 培地で培養した場合には、温度の上昇にともなってステロイドの培地への分泌量はほぼ直線的に増加した。一方、10%の血清を加えた培地で

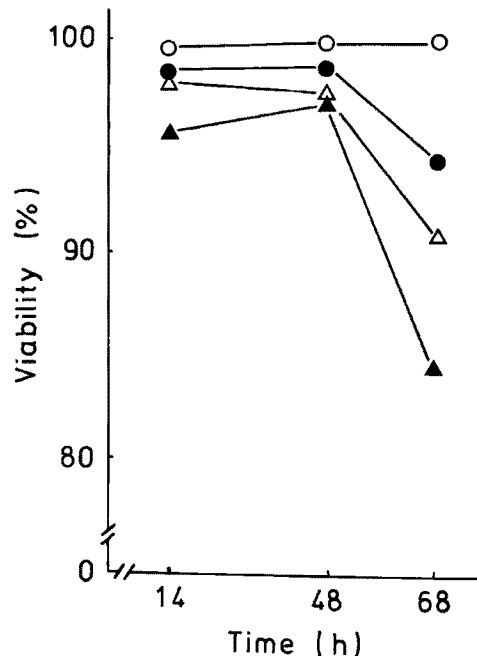


図1 32°C, 37°C, 40°C, 43°Cでの細胞の生存率。各温度で一定時間培養した後の生細胞数を測定し、各温度に移したときの生細胞数に対する百分率で表わした。△——32°C, ○——37°C, ●——40°C, ▲——43°C。

は37°C付近までステロイドの分泌量はほとんど変化しないが、39°C、40°Cで急激に増加した。40°Cにおけるステロイド量は37°Cでそれぞれ培養したときに比べて、血清を添加した場合で5倍、BSAを添加した場合で2倍増加していた。しかし、F-12のみの培地では40°Cでもステロイドの値は低く、血清やBSAを加えた場合の1/4程度であった。

2) 次に、ACTHなどのinducerを加えた場合の培地へのステロイド分泌量の温度による影響を検討した。32°Cから43°Cまでの各温度に調整されたTGIで48時間preincubationをした後、血清10%を含むF-12に 10^{-2} U/ml ACTHまたは1 mM cyclic AMPを加えた培地に交換し、再び各温度で2時間培養した時の培地中のステロイドを定量した(図3)。図3に示すように、32°CではACTH、cyclic AMPいずれもステロイドの分泌はほとんど認められなかった。しかし、

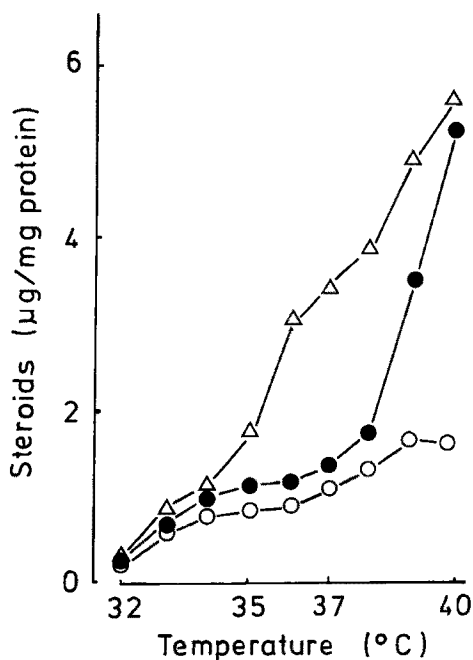


図2 Y-1細胞を各温度において24時間培養した後の培地中のステロイド量。○—○F-12のみの培地、●—●10%新生牛血清を含むF-12培地、△—△10mg/ml BSAを含むF-12培地。

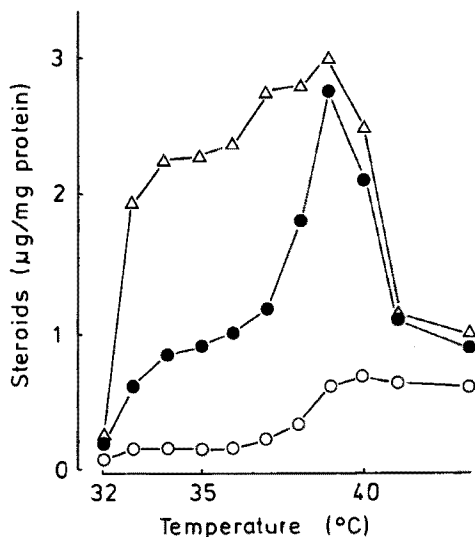


図3 各温度条件で48時間preincubationした後、10%新生牛血清を含むF-12培地に 10^{-2} U/ml ACTHまたは1mM cyclic AMPを加えてさらに2時間培養した後の培地中のステロイド量。○—○control, △—△ 10^{-2} U/ml ACTH, ●—●1mM cyclic AMP。

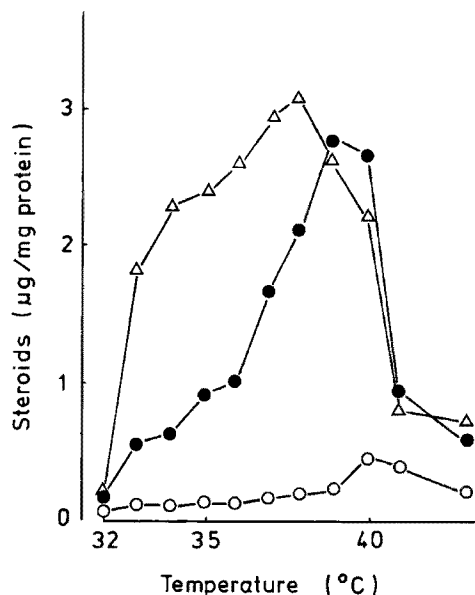


図4 各温度条件で48時間preincubationした後、10mg/ml BSAを含むF-12培地に 10^{-2} U/ml ACTHまたは1mM cyclic AMPを加えてさらに2時間培養した後の培地中のステロイド量。○—○control, △—△ 10^{-2} U/ml ACTH, ●—●1mM cyclic AMP。

33℃においては ACTH を添加した場合は急激にステロイドの分泌量が増加し、その後ゆるやかに増え続け、39℃で最高値を示した。それに比べて、cyclic AMP を添加した場合は37℃ぐらいまで、ほとんどステロイド量はゆるやかな増加を示し、39℃、40℃で急激に増加したことを示している。

次に血清の代わりに10mg/ml BSA を加えた培地を用いて同様の実験を行なった(図4)。ここでも同様に、ACTH を添加した場合は33℃から急激なステロイドの増加が観察されたが、cyclic AMP 添加では36℃まで徐々に増加しているが、39℃と40℃で大きく増加した。この結果は図3で示した結果とよく符号している。

考 察

マウスの副腎皮質腫瘍由来の培養株細胞である Y-1 は脳下垂体から分泌される ACTH を培地中に添加することによって、ステロイドホルモンの生産が誘導され、ただちに培地中に分泌されることが一般に知れている。さらに ACTH の作用機序についてもすでに数多くの知見がえられており、とくに cyclic AMP が second messenger として関与していることは多くの研究者によって報告されている¹⁾²⁾。それによれば、ACTH は細胞内に入ることなく、細胞膜の上に存在する adenylyl cyclase に特異的に結合してこの酵素を活性化すると考えられている。活性化された adenylyl cyclase は ATP から cyclic AMP を生産し、その細胞内濃度が高まることによって protein kinase などの酵素が活性化され、その結果ステロイドの生産が増強させることが知られている。cyclic AMP を直接培地に加えても ACTH と同様にステロイドの分泌が促進されるが、ACTH と cyclic AMP とでは、細胞における作用点が明らかに異なっている。しかし、37℃で細胞を培養し実験しただけではこれらが細胞に与える作用の違いを見いだすことは困難である。そこで、12段階の温度条件を同時に得られる特殊な多温度培養装置 TGI を用いて、37℃以外の温度で ACTH や cyclic AMP を作用させると37℃で実験していたのでは見いだせなかった反応の差異をとらえることが可能ではないかと

考えられる。

一方、Y-1 細胞の高温に対する感受性を調べたところ、図1に示すように43℃でも48時間までは37℃の場合とほとんど同程度の生細胞数が認められた。これはヒトの正常2倍体性細胞などと同様に高温に対する抵抗性が強いことを示しており、Y-1 細胞を使用すれば低温域から高温域(32~43℃)までのかなり広い範囲にわたって細胞が持っている機能が温度変化によってどのように影響を受けるか検討することが可能であると考えられる。

そこで、Y-1 細胞を用いて32~43℃までの各温度条件で ACTH と cyclic AMP を添加したときに培地中に分泌されるステロイド量の変化を測定して得られた成績に考察を試みた。

1. inducer によらない Y-1 細胞のステロイド分泌への温度の影響

32℃から40℃までの各温度条件で ACTH などの inducer を含まない培地を用いて24時間培養したとき、培地中に分泌されるステロイド量は図2に示したように温度の上昇とともに増加している。血清中には未知の生理活性を持つ物質が多く含まれているので、その代わりに BSA を加えた培地を用いて同様の実験を行なった。その場合でも、ステロイドの分泌量は温度の上昇にしたがってほぼ直線的に増加している。これは温度の上昇に伴ってステロイド合成やその誘導に関与している酵素などの活性が高められたためではないかと考えられる。しかし、合成培地 F-12 のみの場合は高温域(39℃、40℃)でもステロイドの分泌はわずかしき増加せず、約1/5のステロイド量である。このことは F-12 のみの培地では、高温による細胞傷害が強いためステロイド合成能が低下したためか、血清や BSA などの高分子を含まない培地ではステロイドの培地への分泌が阻害されているかのどちらか、あるいは両方の原因が同時に作用していることも考えられる。これに関しては細胞内のステロイド濃度を測定するなど今後さらに詳しく検討する必要がある。また、32℃ではステロイドの分泌はほとんど認められなかった。

2. inducer を加えたときの Y-1 細胞のステロイド分泌への温度の影響

血清10%を含む F-12培地と, 10mg/ml BSA を含む F-12培地を用いて ACTH と cyclic AMP を別々に加えたときの温度による影響を検討した(図 3, 4). 2つの実験結果はよく一致している. 32°Cでは ACTH や cyclic AMP を加えてもステロイドの分泌は認められなかった. これは前の図 2 の結果ともよく一致しており, 32°Cでは induction をかけてもかけなくてもステロイドが合成されにくい可能性がある.

次に注目されることとしては ACTH では培地の条件に関係なく 33°Cで急激なステロイド分泌の増加が観察されたが, cyclic AMP の方は少なくとも 37°C以上でなければ十分な誘導が認められなかったことがあげられる. これは ACTH が細胞膜の表面に存在する adenylyl cyclase に特異的に結合しこれを活性化することによって一連の反応を引き起こしステロイドの分泌を誘導するため細胞の中まではいる必要がないのに比べて, cyclic AMP は細胞膜を透過して細胞内に入り, 細胞内濃度がある程度以上高くなればステロイドの誘導が起こらないためではないかと考えられる.

32~36°Cでは細胞膜の透過性が低いいため cyclic AMP の十分な細胞内濃度が得られないが, 37°C以上では細胞膜の透過性がかなり大きく変化して, cyclic AMP の細胞内への移行が容易になるのではないと思われる. さらに高温域(41°C以上)になると ACTH でも cyclic AMP でもステロイドの分泌量が急激に低下している. ヒトの正常 2 倍体性細胞や子宮内膜腺癌株細胞などでも低温域 (32°C以下) や高温域 (40°C以上) で培養すると細胞の明かな形態学的変化が観察されているが⁷⁾⁸⁾⁹⁾, 形態だけでなく細胞膜の生化学的変化や透過性の変化なども起きていることが考えられる. これは高温のため細胞がなんらかの損傷を受けたためと推定される.

結 論

マウス副腎皮質腫瘍由来株細胞 Y-1 を用いて, 培養の温度条件を変えたときに, ACTH や cyclic AMP の刺激によって分泌されるステロイドホルモン量がどのような影響を受けるかについて検討した結果次のような結論を得た.

1) 定常期 (stationary phase) の状態にある Y-1 細胞は 32~43°Cの範囲で培養温度を変化させても, 48時間後までは生細胞数の減少はほとんど見られず, 高温に対する抵抗性が強いことが示唆された.

2) Y-1 細胞は ACTH や cyclic AMP によってステロイドの合成を誘導しなくてもわずかずステロイドを培地中に分泌しており, 32~40°Cの温度条件で24時間培養した後の培地中のステロイド量は温度の上昇に伴って増加した. 32°Cでは培地中にステロイドはほとんど分泌されなかった.

3) ACTH, cyclic AMP とともに温度の上昇に伴ってステロイドの分泌量は増加した. 32°Cでステロイドはわずかし測定されず, 38°C, 39°Cで最高値を示し, 41°Cからステロイド量は急激に低下した.

4) ACTH と cyclic AMP の違いは 33°Cから 39°Cの間で観察された. ACTH では 33°Cで急激なステロイド量の増加がみられたが, cyclic AMP ではステロイド量は徐々に増加し, 39°Cで ACTH の値とほぼ等しくなった. この傾向は 10%の血清を加えた培地でも 10mg/ml BSA を加えた培地でも同様であった.

稿を終るにあたり, 終始御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜った佐藤二郎教授に深甚の謝意を表します. 併せて直接実験の御指導をいただいた国立予防衛生研究所の奥村秀夫博士, 山田堅一郎博士に深謝致します.

文 献

- 1) Haynes RCJ, Koritz SB and Peron FG: Influence of adenosine 3' 5' monophosphate on corticoid production by rat adrenal glands. J Biol Chem (1959) 234, 1421-1423.

- 2) Beall JR and Sayer G : Isolated adrenal cells : Steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in response to ACTH. *Arch Biochem Biophys* (1972) **148**, 70—76.
- 3) Schimmer BP : Phenotypically variant adrenal tumor cell cultures with biochemical lesions in the ACTH-stimulated steroidogenic pathway. *J Cell Physiol* (1969) **74**, 115—122.
- 4) Schimmer BP : Adenylate cyclase activity in adrenocorticotrophic hormone-sensitive and mutant adrenocortical tumor cell lines. *J Biol Chem* (1972) **247**, 3134—3138.
- 5) Wolff J and Cook H : Activation of steroidogenesis and adenylate cyclase by adenosine in adrenal and leydig tumor cells. *J Biol Chem* (1977) **252**, 687—693.
- 6) Okumura H, Udagawa Y, Yamada K, Tsukasaki K, Azuma Y and Nozawa S : Effect of temperature on the proliferation and viability of normal and malignant human cells in culture. *Proc Japan Acad* (1979) **55**, 135—140.
- 7) 宇田川康博 : ヒト子宮体内膜腺癌株細胞の温度感受性に関する研究. *日本産婦人科学会誌* (1981) **33**, 1235—1244.
- 8) 下田隆夫 : 高温条件下における絨毛癌細胞の増殖能および Human chorionic gonadotropin 分泌能に関する研究. *北里医* (1982) **12**, 672—679.
- 9) 山田堅一郎, 奥村秀夫, 田村昭蔵 : 温度感受性からみた細胞の形態と増殖能. *組織培養研* (1985) **4**, 65—69.
- 10) Yasumura Y, Buonassisi V and Sato G : Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures : 1. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res* (1966) **26**, 529—535.
- 11) Silber RH, Busch RD and Oslapas R : Practical procedure for estimation of corticosterone or hydrocortisone. *Clin Chem* (1958) **4**, 278—285.
- 12) Lowry OH, Roseborough NF, Farr AL and Randall NJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951) **193**, 265—275.

**Effect of temperature on the stimulation of steroid secretion in
murine adrenal tumor cells (Y-1 clone)**

Yoshiko ICHIKAWA (AZUMA)

Tissue Culture Laboratory, Division of Pathology

Cancer Institute, Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. J. Sato)

The stimulation of steroidogenesis by adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and adenosine 3'-5' monophosphate (cyclic-AMP) was investigated in *in vitro* systems. Temperature is one of the most important elements for cell culture and affects various biological cell functions. In this study, the effects of various temperatures (32-43°C) on the stimulation of steroidogenesis by ACTH and cyclic AMP in the murine adrenal tumor cell (Y-1) were investigated. After Y-1 cells were cultured at 32-43°C for 48 hours, most of the population survived. Y-1 was insensitive to high temperature during 48 hours. When cells were incubated at 32°C, steroids in the medium could not be detected, but at 33-39°C, steroid amounts increased linearly with increasing temperature. At 41°C or higher, steroid secretion decreased drastically. Although the stimulation of steroidogenesis by ACTH was accelerated sharply at 33°C, stimulation by cyclic AMP may be gradually increased until 39°C. These data suggest that this may be caused by different action sites of ACTH and cyclic AMP. More studies indicated that ACTH binds to the plasma membrane and activated adenyl cyclase, but cyclic AMP function required binding to the specific cytosol receptor.