

(22)

原著：秋田大学医学部保健学科紀要14(1)：22-26, 2006

グルココルチコイドによるマウス胸腺腫株細胞 フルクトース1,6-ビスホスファターゼ活性の減少

水 沼 秀 夫

要 旨

グルココルチコイドによって増殖が阻害され、最終的に細胞死に至る胸腺リンパ腫株細胞 WEHI7.1 は、異所性にフルクトース1,6-ビスホスファターゼを発現している。この酵素活性に対するグルココルチコイドの影響を調べたところ、活性は 10^{-8} Mより高濃度のデキサメサゾンとともに48時間培養した時、対照値のおよそ50%に減少した。コルチコステロンやアルドステロンも酵素活性を減少させたが、それらの濃度はデキサメサゾンよりも1桁大きかった。 10^{-6} Mにおいてデキサメサゾンの効果は、72-96時間培養後に最大に達した。 10^{-6} Mデキサメサゾンで24時間、または48時間予備培養後に、デキサメサゾン除去して引き続き培養を行ったところ、細胞増殖速度は48時間以内に対照レベルまで回復したのに対して、酵素活性は少なくとも96時間までは回復しなかった。

WEHI7.1細胞フルクトース1,6-ビスホスファターゼに対するグルココルチコイドの作用は、細胞増殖抑制による2次的な結果ではなく、それとは別の作用によるものである。

I. はじめに

グルココルチコイドは、主にタンパク質の合成を増大させることによって身体のほとんどの組織の成長、分化、機能に影響を与える¹⁾。しかし、極めて少数の例ではあるが、例えば、プロラクチン²⁾やプロオピオメラノコルチン³⁾やACTH⁴⁾の生成、Friend赤芽球性白血病細胞 β -グロビン⁵⁾、肝 α -フェトプロテイン⁶⁾、ニワトリ線維芽細胞プロコラーゲン⁷⁾などが、グルココルチコイドによって遺伝子の転写を抑制されることが報告されている。また、グルココルチコイドは、S49マウスリンパ腫細胞のプロトオンコジーン⁸⁾の発現を劇的に、急速に阻害する⁹⁾。

我々は、以前の観察において、培養マウス胎児肝のフルクトース1,6-ビスホスファターゼ (FBPase; EC 3.1.3.11) をジブチリルサイクリックAMPが誘導する^{9, 10)}のに対して、グルココルチコイドは抑制することを示した¹¹⁾。一方、培養ラット成体肝細胞において

は、グルココルチコイドの一種であるデキサメサゾンが、FBPase活性に影響を与えなかった¹²⁾。

従って、グルココルチコイドのフルクトース1,6-ビスホスファターゼに対する影響は、胎児細胞と成体細胞で異なっている。

我々は、マウスの胸腺リンパ腫株細胞 WEHI7.1 にFBPaseが存在することを見いだした¹³⁾。この株細胞は、グルココルチコイドに感受性をもっており、グルココルチコイドの存在下では細胞死に至る¹⁴⁾。正常の胸腺細胞には存在しないFBPaseが、WEHI7.1細胞において異所性に発現している¹⁵⁾。

この正常細胞には存在しないFBPase活性に、グルココルチコイドがどのような影響を与えるかを知ることには興味深い。

本報告においては、WEHI7.1細胞のFBPase活性レベルに対するグルココルチコイドの効果を調べた。その結果、WEHI7.1FBPase活性は、デキサメサゾンに持続的に暴露されることによって減少し、デキサメ

サゾン除去後少なくとも96時間までは、その減少した活性が回復することはなかった。

II. 実験材料および実験方法

1. 細胞培養とサンプル調製

WEHI7.1 細胞は、American Type Culture Collection から入手した。培養は10%加熱不活化した牛胎児血清と10mM Hepes (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジン-エタンスルホン酸) を添加したダルベッコのMEM 培地により懸濁状態で行った。実験によっては、“Bovine Fine Serum” (STARRATE pty ltd., Melbourne, Australia) を牛胎児血清の代わりに使用した。WEHI7.1 細胞の増殖速度も本細胞中のFBPase 活性レベルもこの牛胎児血清の代替物によって影響を受けなかった。培養は、5%CO₂-95%air の下で、37°Cに保ち、加湿した炭酸ガスインキューベ

ータ中でデキサメサゾンまたは他のステロイドの存在下および非存在下で行った。培地は24時間毎に交換した。ステロイドはエタノールに溶解した。エタノールの培地中における最終濃度は、0.1%以下になるようにした。この濃度のエタノールは、単独では細胞の増殖にもFBPase 活性にも影響を与えなかった。細胞は、遠心分離によって回収し、phosphate-buffered saline (pH7.4) で2度洗浄した。

2. 細胞数計測と生存度

細胞数は血算盤によって計測し、細胞の生死の判定はトリパンブルー染色の有無によって行った。

3. FBPase 活性の測定

抽出液の調製とFBPase 活性の測定は以前に述べた方法¹³⁾と同様に行った。酵素活性1単位は、毎分1 μ molのフルクトース1,6-ビスリン酸を加水分解す

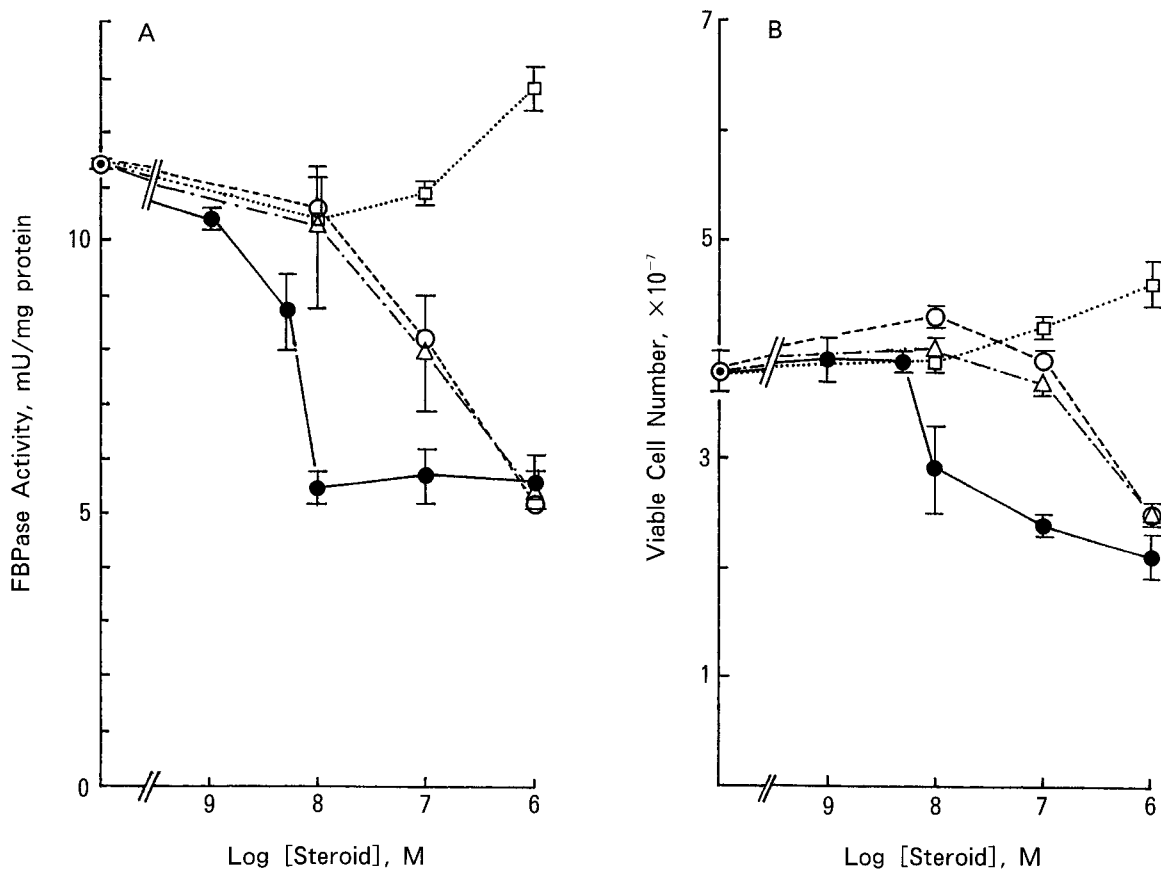


図1 WEHI7.1 細胞のFBPase 活性 (A) および生細胞数 (B) の異なるステロイドによる濃度依存性の変化

WEHI7.1 細胞は、異なるステロイドの種々濃度で48時間培養した。培養後、細胞数は血算盤で計数し、細胞の生存度はトリパンブルーの非染色性によって判定した。細胞の処理と酵素活性測定は、「実験材料と実験方法」に記載された通りに行った。データは、3~6例の異なる実験の平均値 \pm SDで示している。●, デキサメサゾン; ○, コルチコステロン; △, アルドステロン; □, プロゲステロン

る酵素量とする。タンパク質濃度は、Bradfordの方法¹⁵⁾によって、牛血清アルブミンを標準タンパクとして定量した。

4. 試薬

デキサメサゾン、アルドステロン、コルチコステロンは、Sigma社製を用いた。プロゲステロンは、Merck社製品を購入した。その他の試薬は、前報¹³⁾で記載したものと同一のものを用いた。

III. 結果

WEHI7.1細胞を種々の濃度のデキサメサゾン存在下で48時間培養すると、FBPase活性は、 10^{-8} Mから 10^{-6} Mの範囲でコントロール値のおよそ50%にまで減少した(図1A)。 10^{-9} Mではデキサメサゾンは、FBPase活性に影響を与えなかった。デキサメサゾンの最大効果の半分の効果は、およそ 5×10^{-9} Mで観察された。このデキサメサゾンの濃度-効果曲線は、著

しいグモイド状の形状を示した。これは、FBPaseの抑制において、デキサメサゾンの作用に閾値があることを示している。このデキサメサゾンの効果は、FBPase活性のレベルに関して、デキサメサゾン存在下と非存在下とで細胞に二つの異なった状態が存在することを示唆する。コルチコステロンとアルドステロンもFBPase活性を減少させたが、最大効果の半分の効果を示す濃度は、およそ 10^{-7} Mであった。この2つのホルモンの間にFBPase活性に対する差異は観察されなかった。プロゲステロンは、 10^{-6} Mまでの濃度でWEHI7.1細胞のFBPase活性を減少させなかった。

FBPaseに対するデキサメサゾンの閾値効果とは対照的に、WEHI7.1の生細胞数は、デキサメサゾン、コルチコステロン、アルドステロンすべてにおいて、濃度が高くなるにつれて徐々に減少した(図1B)。最大効果の半分の効果を示すのに必要なデキサメサゾン濃度は、 10^{-8} Mより高かった。プロゲステロンは、濃度の上昇につれて、WEHI7.1細胞数を幾分か増加させた。

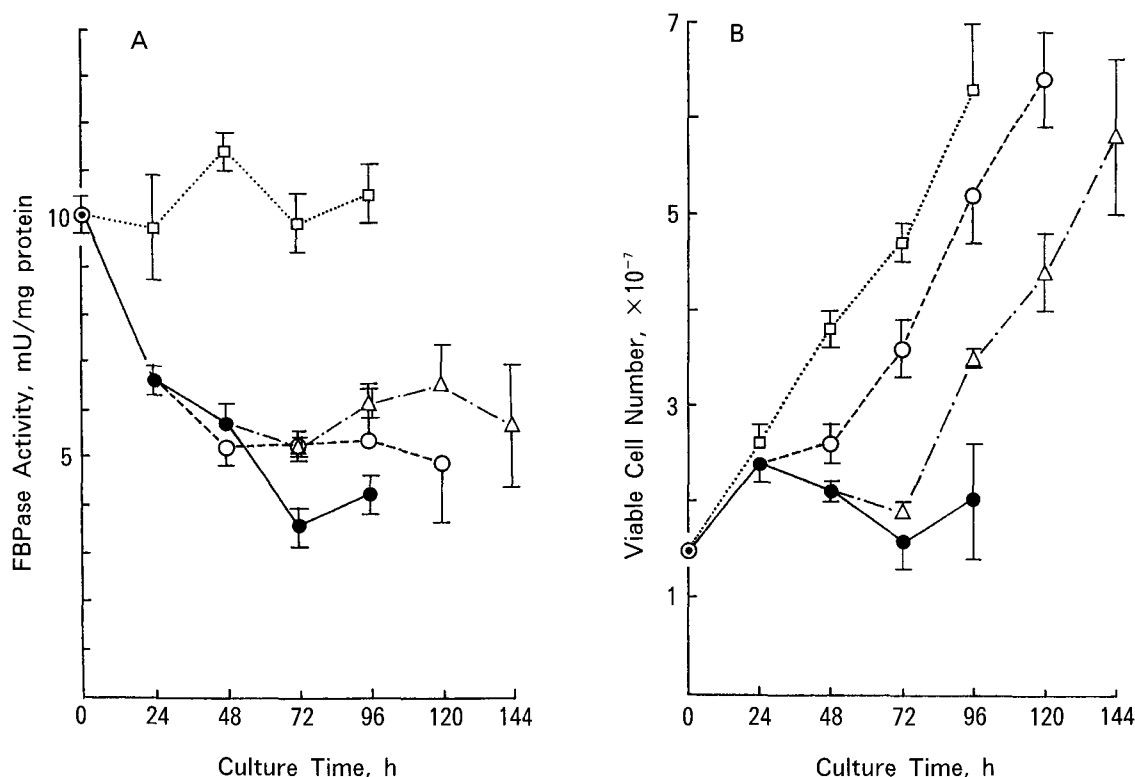


図2 WEHI7.1細胞のFBPase (A) および生細胞数 (B) に対するデキサメサゾンによる効果の時間経過

WEHI7.1細胞は、 10^{-6} Mデキサメサゾン存在下および非存在下で種々の時間、培養した。培養後、細胞数は血算盤で計数し、細胞の生存度はトリパンブルーの非染色性によって判定した。細胞の処理と酵素活性測定は、「実験材料と実験方法」に記載された通りに行った。データは、3～6例の異なる実験の平均値±SDで示している。●, デキサメサゾン; ○, 24時間デキサメサゾン存在下で培養した後、デキサメサゾン非存在下で培養; △, 48時間デキサメサゾン存在下で培養した後、デキサメサゾン非存在下で培養; □, 対照

つぎに、二つのパラメーター、FBPase 活性と細胞増殖に対するデキサメサゾンの効果について、さらに互いに比較を行った。10⁻⁶M デキサメサゾンの FBPase 活性に対する抑制効果は、24時間後には明瞭に現れ、3日後には最大に達した(図2A)。一方、細胞増殖に対する効果は、24時間以内には出現せず、48時間後に明瞭になった。細胞数の減少は、培養48時間と72時間の間で著しかった。72時間以降ではそれ以上の細胞数減少は見られなかった。以上のことより、24時間以内に見られる FBPase 活性の早期の減少は、細胞増殖の阻害によるものではないことがわかる。

図2に示すように、デキサメサゾンの効果には細胞増殖に対して、可逆性が観察された。デキサメサゾン存在下で24時間または48時間培養後にデキサメサゾンを培地から取り除き、デキサメサゾンを含まない培地で細胞を2度洗浄した後、さらに4日間培養を続けた。FBPase 活性の減少は、デキサメサゾン除去によって止まったが、活性量は、除去後4日の間減少したレベルのままで、回復しなかった。FBPase に対するデキサメサゾンの、この不可逆的な効果とは対照的に、生細胞数は1日の潜伏期の後、コントロール細胞とはほぼ同じ速度で増殖した。増殖速度の可逆性は、24時間と48時間のデキサメサゾン存在下で培養した両グループ共に観察された。

IV. 考 察

グルココルチコイドは、1日の潜伏期間の後、ヒト白血病性T細胞株 CEM C7 細胞を細胞周期を G₁ 期に引きとどめる作用をもつ¹⁶⁾。もし、WEHI7.1細胞が CEM C7 細胞と同様にグルココルチコイドによって G₁ 期に引きとどめられるならば、このステロイドによる FBPase 活性の減少は、細胞周期の G₁ 期における拘束に関係しているのかもしれない。細胞周期の制御は、細胞増殖に密接に関連している。

FBPase のグルココルチコイドによる活性の減少は、細胞増殖の抑制に先立って生じた。また、WEHI7.1細胞の増殖に対する効果は可逆的であるのに対して、FBPase 活性に対する効果は不可逆的であった。従って、FBPase 活性の減少は、グルココルチコイドによる WEHI7.1 細胞の増殖抑制の結果、2次的に生じたものではなく、その経路は不明であるが、FBPase の発現または代謝回転にグルココルチコイドが直接影響を及ぼしたものと考えられる。FBPase 活性の減少は、細胞増殖に関わる遺伝子、例えば、がん原遺伝子など、に直接関係していないものと思われる。

効果のあるデキサメサゾンの濃度は、培養したマ

ウス胎児肝中の FBPase に対する抑制効果を示す濃度と同様の値であった¹¹⁾。マウス胎児肝、あるいは WEHI7.1FBPase とは異なって、ラット成体肝細胞の FBPase は、デキサメサゾンによって影響されなかった¹²⁾。従って、胎児肝と成体肝とでは、FBPase の調節機構が異なっているものと考えられ、この胸腺腫株細胞におけるグルココルチコイドによる FBPase 活性レベルの調節機構は、見かけの上では胎児肝細胞のグルココルチコイドによる酵素活性レベルの調節機構と類似している。

文 献

- 1) Baxter JD and Forsham PH: The tissue effects of mineralocorticoids. *Am J Med* 53: 573-589, 1972
- 2) Jefferson DM, Reid DM, et al.: Effects of dexamethasone on albumin and collagen gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Hepatology* 5: 14-20, 1985
- 3) Weiner FR, Czaja MJ, et al.: Transcriptional and posttranscriptional effects of dexamethasone on albumin and procollagen messenger RNAs in murine schistosomiasis. *Biochemistry* 26: 1557-1562, 1987
- 4) Nakanishi S, Kita T. et al.: Glucocorticoid effect on the level of corticotropin messenger RNA activity in rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3283-3286, 1977
- 5) Gorman CM, Moffat LF, et al.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2: 1044-1051, 1982
- 6) Roberts JL, Budarf ML, et al.: Selective reduction of proadrenocorticotropin/endorphin proteins and messenger ribonucleic acid activity in mouse pituitary tumor cells by glucocorticoids. *Biochemistry* 18: 4907-4919, 1979
- 7) Enat R, Jefferson DM, et al.: Hepatocyte proliferation in vitro: Its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrate of extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1411-1415, 1984
- 8) Eastman-Reks SB and Vedeckis WV: Glucocorticoid inhibition of c-myc, c-myb, and c-Ki-ras expression in a mouse lymphoma cell line. *Cancer Res* 46: 2457-2462, 1986

- 9) Tashima Y, Mizunuma H, et al.: Induction of fructose 1,6-bisphosphatase and glucose 6-phosphatase by dibutyryl cyclic adenosine monophosphate in fetal mouse liver. *J Biochem* 96: 805-813, 1984
- 10) Tashima Y, Mizunuma H, et al.: Induction of fructose 1,6-bisphosphatase and glucose 6-phosphatase in fetal mouse liver. *Arch Biochem Biophys* 220: 379-385, 1983
- 11) Tashima Y, Mizunuma H, et al.: Effect of glucocorticoids on induction of fructose bisphosphatase and glucose-6-phosphatase in fetal mouse liver. *J Biochem* 96: 1619-1624, 1984
- 12) Fleig WE, Noether-Fleig G, et al.: Hormonal regulation of key gluconeogenic enzymes and glucose release in cultured hepatocytes: Effects of dexamethasone and gastrointestinal hormones on glucagons action. *Arch Biochem Biophys* 229: 368-378, 1984
- 13) Mizunuma H and Tashima Y: Mouse thymoma cell line expresses a gluconeogenic enzyme, fructose 1,6-bisphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 929-935, 1989
- 14) Harris AW, Bankhurst AD, et al.: Differentiated functions expressed by cultured mouse lymphoma cells. II. Theta antigen, surface immunoglobulin and a receptor for antibody on cells of a thymoma cell line. *J Immunol* 110: 431-438, 1973
- 15) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- 16) Harman JM, Norman MR, et al.: Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line. *J Cell Physiol* 98: 267-278, 1979

Reduction of Fructose 1,6-bisphosphatase Activity in Mouse Thymoma Cell Line by Glucocorticoids

Hideo MIZUNUMA

Course of Nursing, School of Health Sciences, Akita University

Fructose 1,6-bisphosphatase is expressed ectopically in the thymic lymphoma cell line, WEHI7.1. The growth rate of the WEHI7.1 cells is strongly repressed by glucocorticoids. In the present report, it was studied whether the fructose 1,6-bisphosphatase activity in the cell line is influenced by glucocorticoids or not.

Fructose 1,6-bisphosphatase activity in the cell line decreased to approximately 50% of the control value when the cells were incubated for 48 h with dexamethasone at concentrations higher than 10^{-8} M. Corticosterone and aldosterone also decreased the enzyme activity, but their effective concentrations were one order higher than that of dexamethasone. Maximal effects of dexamethasone were attained after 72 to 96 h incubation with 10^{-6} M dexamethasone. After preincubation with 10^{-6} M dexamethasone for 24 or 48 h, successive incubation without the steroid did not restore the enzyme activity for at least 96 h while the rate of cell growth was restored to the control level within 48 h.

The repression of the fructose 1,6-bisphosphatase activity in the WEHI7.1 cells by glucocorticoids was not secondary to the repressive effects of the steroids on the growth of the WEHI7.1 cells, but specific to the level of the enzyme activity.