

原著：秋田大学医学部保健学科紀要14(1)：27-30, 2006

WEHI7.1 細胞の増殖能とフルクトース1,6- ビスホスファターゼ活性に及ぼす酪酸塩の効果

水 沼 秀 夫

要 旨

本研究において、マウス胸腺リンパ腫株細胞 WEHI7.1 の高い増殖速度は、酪酸塩によって抑制され、それとともに異所性に発現しているフルクトース1,6-ビスホスファターゼ活性が抑制されることが明らかとなった。

WEHI7.1 細胞は、 10^4 cells/ml から培養した時、高い増殖能を示し、96~120時間後にはほぼ飽和に達して約 4×10^6 cells/ml に増加した。生細胞率は、培養96時間までは95%以上の高い値を保ったが、それ以上培養時間が長くなると、高い細胞密度のため、培地の栄養成分の供給が間に合わず、急速に生細胞率は低下した。1 mM の酪酸ナトリウムを培地に添加すると、細胞の増殖能は顕著に低下し、培養96時間では、細胞数は約 10^6 cells/ml であった。酪酸塩存在下では、飽和に達することなく培養168時間まで徐々に増殖を続けた。一方、生細胞率は、酪酸塩によって緩やかに低下し続けた。フルクトース1,6-ビスホスファターゼ活性も酪酸塩の存在によって低下し、培養48時間でおおよそ半分になった。

I. はじめに

WEHI7.1 株細胞は、BALB/c マウスに繰り返し X 線を照射して発生させた胸腺リンパ腫から樹立された細胞株である¹⁾。我々は、WEHI7.1 細胞に正常な胸腺には発現していないフルクトース1,6-ビスホスファターゼ (FBPase; EC 3.1.3.11) が発現していることを見出した²⁾。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。著者は、本細胞 FBPase が細胞死に至る濃度よりも低い濃度のグルココルチコイド存在下で著明に活性が低下することを観察した³⁾。WEHI7.1 FBPase は、既知の本酵素アイソザイムとは異なるアイソザイム²⁾であるので、その活性レベルの制御機構を知ることは興味深い。本稿においては、WEHI7.1 の FBPase 活性レベルに影響を与える、グルココルチコイド以外の物質の検索過程で、細胞が酪酸塩によって顕著に増殖が抑制されることを見出したので、その

解析結果を述べる。

II. 実験材料および実験方法

1. 試薬

酪酸ナトリウムは、nakalai tesque 社製を用い、その他の試薬は前報²⁾に記載したものと同一のものを用いた。

2. 細胞培養とサンプル調製

WEHI7.1 細胞は American Type Culture Collection から得た。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。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ベータ中で行った。培地は24時間毎に交換した。酪酸ナトリウムは、pH7.4 に調製した

phosphate-buffered saline (PBS) に溶解した。滅菌は、滅菌フィルターによるろ過滅菌で行った。細胞は遠心分離によって回収し、PBS で 2 度洗浄して、使用時まで -85°C で保存した。

3. 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によって染色された細胞を死細胞とした。

4. 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²⁾と同様に行った。酵素活性 1 単位は、毎分 $1 \mu\text{mol}$ のフルクトース1,6-ビスリン酸を加水分解する酵素量とする。タンパク質濃度は Bradford の方法⁴⁾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。

有意差の検定には、Student の t 検定を用いた。

III. 結 果

WEHI7.1 細胞は、極めて増殖速度が大きく、 10^4 cells/ml で培養を開始すると 48 時間ではほぼ 10 倍に増殖し、96~120 時間ではほぼ飽和に達した (図 1)。それよりも長時間の培養では、生細胞数はほとんど増加

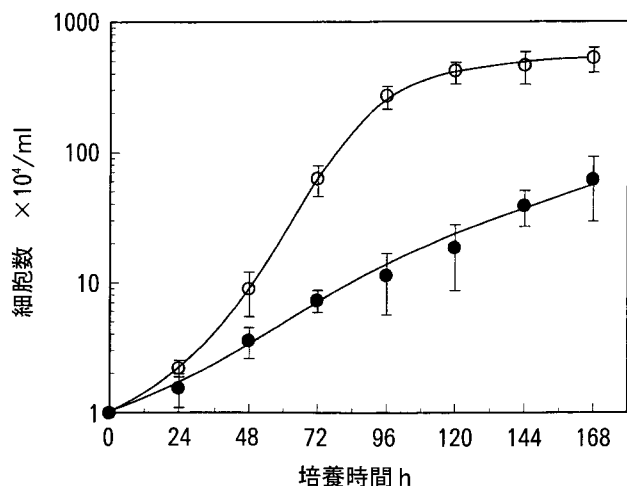


図 1 WEHI7.1 細胞の酪酸塩存在下、非存在下における培養での増殖

細胞培養は、細胞数 10^4 cells/ml から開始し、24 時間毎に培地交換を行った。○：対照，●：1 mM 酪酸ナトリウム添加。細胞数は平均値 ± SD で表した (対照，酪酸ナトリウム添加ともに培養 168 時間の時， $n = 5$ ，それ以外は $n = 6$)。酪酸塩存在下の細胞数の対照の細胞数に対する有意差は、培養 48 時間が $p < 0.05$ ，それ以外はすべて $p < 0.01$ であった。

しなかった。一方、1 mM の酪酸塩が存在すると、その増殖速度は大幅に抑制され、細胞数が 10 倍に増加するまでの時間は、培養開始後 72~96 時間であった。酪酸塩が存在すると、168 時間後でもまだ細胞数の増加は続いた。

培養中の生細胞率の推移を調べると、図 2 のようなパターンを示した。すなわち、酪酸塩非存在下では、WEHI7.1 細胞は培養 96 時間頃までほぼ 95% 以上の生存率を示した。それ以上培養時間が長くなると、生細胞率は急激に低下した。培養が 120 時間を超えると、培地に含まれているフェノールレッドが黄変し、培地が酸性に大きく傾いていることを示した。従って、培養時間が 120 時間を超えたときの生細胞率の低下の原因は、次の 2 つが大きな要因と考えられる；1) 細胞密度が大きくなったことにより、乳酸など代謝産物の生成量が多くなり、緩衝力を超えたため、培地が酸性になり細胞が死にやすくなったこと、2) 24 時間毎の培地交換では、培地中の栄養成分の消費が供給を上回って、栄養成分が枯渇してしまったこと。より短い間隔で培地交換を行えば、細胞密度は、もっと大きくなり、生細胞率も高くすることができるであろう。

それに対して、酪酸塩の存在下では、生細胞率は徐々に低下した。培養 120 時間までは、48 時間および 96 時間で $p < 0.05$ ，72 時間で $p < 0.01$ で有意に、酪酸塩を含まない培養に比べて、低い生細胞率を示した。培養 144 時間、168 時間では、有意差はなかったが、生細胞

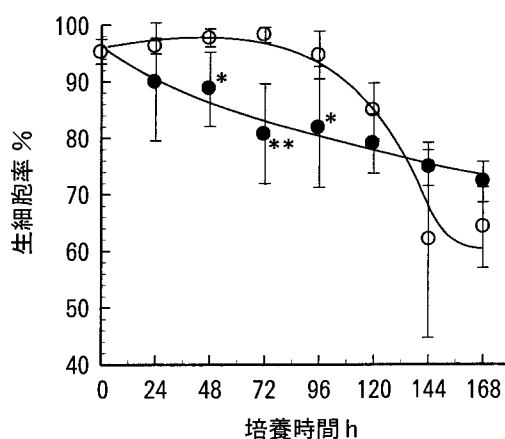


図 2 WEHI7.1 細胞の酪酸塩存在下、非存在下における培養での生細胞率

細胞培養は、細胞数 10^4 cells/ml から開始し、24 時間毎に培地交換を行った。○：対照，●：1 mM 酪酸ナトリウム添加。生細胞率は平均値 ± SD で表した (対照，酪酸ナトリウム添加ともに培養 168 時間の時， $n = 5$ ，それ以外は $n = 6$)。酪酸塩存在下の細胞数の対照の細胞数に対する有意差は、* が $p < 0.05$ ，** が $p < 0.01$ であることを示す。

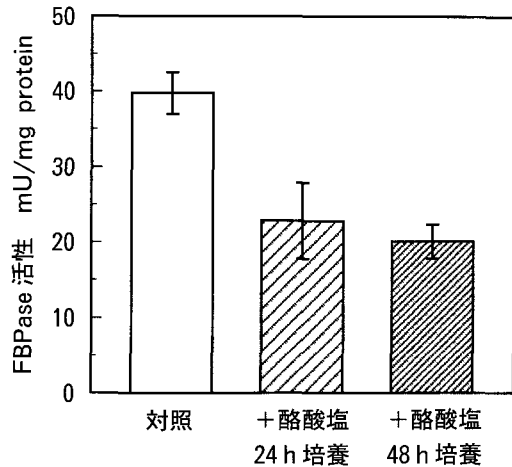


図3 酪酸塩存在下での培養によるWEHI7.1細胞フルクトース1,6-ビスホスファターゼ活性の低下
酵素活性は、4例の平均値±SDで表した。対照に対する酪酸塩存在下でのFBPase活性は、培養24時間、48時間ともに $p < 0.01$ で有意に低かった。

率は、酪酸非存在下よりも、幾分高い傾向が見られた。また、対照とは異なり、全培養期間を通じて、培地中のフェノールレッドが黄変することはなかった。これらのことは、酪酸塩が存在すると、細胞増殖速度が小さくなるため、細胞密度が過剰にならず、24時間毎の培地交換で乳酸量が培地の緩衝能を超えることがなかったことによる。

WEHI7.1のFBPase活性も1mM酪酸塩の存在下では、対照に比べて低下が観察された(図3)。酪酸塩添加後24時間では、活性は、対照の約60%、48時間後には約50%になった。酪酸塩濃度0.5mMでは低下が見られず、FBPase活性の低下には1mM以上の濃度が必要であった。

IV. 考 察

酪酸は、大腸のバクテリアによって食物繊維からミリモル濃度で生成し⁵⁾、大腸粘膜細胞の主なエネルギー源となっている⁶⁾生理的物質である。それに加えて、酪酸塩は、大腸や小腸由来のものを中心に、様々な種類の悪性腫瘍由来の培養細胞において、ミリモル濃度で成長を抑制し、分化やアポトーシスを誘導する⁷⁻¹²⁾。本研究で観察された酪酸の効果も同じ濃度レベルであった。

また、酪酸塩は、細胞分裂サイクルのG₁期に細胞を拘束することが報告されており¹³⁻¹⁵⁾、WEHI7.1細胞においても、増殖速度が顕著に抑制され、また生細胞率も徐々に低下したことは、この細胞も酪酸塩によっ

てG₁期に留められ、アポトーシスが誘導されていることを示唆するもので、これらの報告と一致するものである。

さらに、正常な胸腺には、FBPaseは発現していない²⁾。したがって、WEHI7.1FBPaseは異所的に発現している²⁾ので、酪酸塩によって、本酵素が減少したことは、WEHI7.1細胞が正常な胸腺細胞に近い遺伝子発現パターンを示すようになったことを示唆している。

これらのことから、酪酸塩によって成長抑制、分化、アポトーシスが誘導された、他の悪性腫瘍細胞由来の株細胞と同様の効果をWEHI7.1細胞も酪酸塩によって受けているものと思われる。

文 献

- 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
- 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
- 水沼秀夫: 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. 秋田大学医学部保健学科紀要14: 22-26, 2006
- 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
- Perrin P, Pierre F, et al.: Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant cryptic foci in rats. *Gut* 48: 53-61, 2001
- Scheppach W, Bartram P, et al.: Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *J Parenter Enteral Nutr* 16: 43-48, 1992
- Milovic V, Teller IC, et al.: Effect of structural analogues of propionate and butyrate on colon cancer cell growth. *Int J Colorect Dis* 15: 264-270, 2000
- Wachtershauser A and Stein J: Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells occurs independently from p27. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 295-299, 2001

(30) 水沼秀夫／WEHI7.1細胞の増殖能とフルクトース1,6-ビスホスファターゼ活性に及ぼす酪酸塩の効果

- 9) Boyd A, Metcalf D, et al.: Induction of differentiation in HL-60 leukemia cells: A cell cycle dependent all-or-none event. *Leuk Res* 8:27-43, 1984
- 10) Rozental R, Faharani R, et al.: Sodium butyrate induces apoptosis in MSN neuroblastoma cells in a calcium independent pathway. *Neurochem Res* 29:2125-2134, 2004
- 11) Reese DH, Gratzner HG, et al.: Control of growth, morphology, and alkaline phosphatase activity by butyrate and related short-chain fatty acids in the retinoid-responsive 9-1C rat prostatic adenocarcinoma cell. *Cancer Res* 45:2308-2313, 1985
- 12) Emanuele S, D'Anneo A, et al.: Sodium butyrate induces apoptosis in human hepatoma cells by a mitochondria/caspase pathway, associated with degradation of beta-catenin, pRb and Bcl-XL. *Eur J Cancer* 40:1441-1452, 2004
- 13) Hague A, Diaz GD, et al.: Bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. *Int J Cancer* 72:898-905, 1997
- 14) Ding QM, Ko TC, et al.: Caco-2 intestinal cell differentiation is associated with G1 arrest and suppression of CDK2 and CDK4. *Am J Physiol* 275:C1193-C1200, 1998
- 15) Kamitani H, Geller M, et al.: Expression of 15-lipoxygenase-1 by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation. *J Biol Chem* 273:21569-21577, 1998

The effects of butyrate on the proliferation of WEHI7.1 and on fructose 1,6-bisphosphatase activity in the cell line

Hideo MIZUNUMA

Course of Nursing, School of Health Sciences, Akita University

The present report shows that the growth rate of mouse thymoma cell line WEHI7.1 cells and the fructose 1,6-bisphosphatase activity in the cells were both repressed by butyrate. WEHI7.1 cells proliferate at a high growth rate. They increased to approximately 4×10^6 cells/ml and plateaued after 96 to 120 h when started culturing at 10^4 cells/ml. The rate of viable cells in the culture was kept above 95% until the culture time had been reached at 96 h, after which the rate decreased rapidly. When the cells were cultured in the presence of 1 mM butyrate, the cell proliferation was markedly repressed. The number of cells was approximately 10^6 cells/ml in the 96h-culture. The rate of viable cells was slowly reduced throughout the culture period. Fructose 1,6-bisphosphatase activity in WEHI7.1 cells was also reduced to approximately 50% of the control level when 1mM butyrate was present in the culture.