

フォルボールエステルを用いたヒト 単球白血病細胞株への分化誘導

今 野 多 助
土 屋 滋
(東北大学医学部小児科)

緒 言

われわれは、急性単球白血病患児末梢血より、単球の性状を有する白血病細胞株 (THP-1) を樹立し、昨年度はその細胞株の性状について報告した¹⁾。この THP-1 細胞は、1) α -naphthyl butyrate esterase 活性、2) リゾチーム産生能、3) 感作羊赤血球およびラテックス粒子貪食能、が認められることにより単球としての性状を保有する細胞株であることが確認されている。一方株化されたマウスおよびヒト白血病細胞のあるものは、dimethylsulfoxide, 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA), 酪酸を含む種々の化学物質により、より成熟した段階の細胞へと分化を誘導し得ることが知られている^{2)~4)}。今回われわれは、THP-1 細胞培養系にこれら種々の化学物質のなかの一つ、TPA を添加した時に、THP-1 細胞がより成熟した単球もしくはマクロファージ様の性状を獲得するに至ることを見出した。このことはヒト成熟単球の免疫生物学的、生化学的研究に好適な素材を提供するものと思われたのでここに報告する。

材 料 と 方 法

細胞株：ヒト急性単球白血病細胞株 (THP-1) の性状については昨年度の報告書に記した。本実験で用いた THP-1-O 細胞は、THP-1 樹立当初に -80°C にストックしてあったものを再融解し使用したものである。THP-1-R 細胞は、THP-1 細胞が試験管内で増殖を開始してから一度もストックすることなく継代維持し使用したものである。この継代培養期間は2年余にわたる。その他に THP-1 細胞と比較する上で5株のリンパ芽球様細胞株 (LCL), THP-2-B (当教室で非アフリカ型パーキットリンパ腫患児より樹立したB細胞株), および HL-60 を用いた。これら培養系に添加する TPA の濃度は、各実験に応じて $0.16 \sim 160 \text{ nM}$ の種々の濃度のものを用いた。

透過型および走査型電子顕微鏡写真：常法に則って行った。

THP-1 細胞の表面マーカー：Fc リセプター保有細胞, C3b・C3d リセプター保有細胞および羊赤血球とのロゼット形成細胞の比率は、橘らの微量ロゼット形成法により求めた。

表1 Adherence of THP-1 cells after treatment with TPA

Incubation time, hr	TPA nM	Number of adherent cells ^a	
		THP-1-O	THP-1-R
1	160	6.8×10^5	1.0×10^5
	16	7.2×10^5	1.6×10^5
3	160	8.0×10^5	1.4×10^5
	16	8.4×10^5	1.3×10^5
24	160	N.D. ^b	6.5×10^5
	16	7.8×10^5	2.0×10^5
48	160	N.D.	8.0×10^5
	16	5.9×10^5	3.0×10^5
	1.6	5.1×10^5	$< 1.0 \times 10^5$
	0.16	3.5×10^5	$< 1.0 \times 10^5$

^a Cells were treated with TPA at the concentration indicated. The number of adherent cells at various incubation times were measured by subtracting the number of suspended cells from 1×10^6 cells. Results shown are averages for duplicate cultures.

^b Not done.

THP-1 細胞の貪食能：種々の濃度の TPA で THP-1 細胞 (1×10^6) を処理後、ただちにイースト (2.5×10^8)、2% 羊赤血球 0.1 ml あるいは 2% IgG 感作羊赤血球 0.1 ml を添加し、20% 牛胎児血清加 RPMI-1640 培地中で 37°C 、4 時間貪食を行なわせた。イースト添加 THP-1 細胞の場合は直接、羊赤血球添加 THP-1 細胞の場合はトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.65) にて貪食されなかった羊赤血球を除去した後、カバーガラス上に塗沫標本を作製し、Wright-Giemsa 染色を行った後検鏡し、貪食細胞の比率を求めた。

THP-1 細胞による $[1-^{14}\text{C}]$ - および $[6-^{14}\text{C}]$ グルコースの酸化：THP-1 細胞によるグルコースの酸化は Stossel らの方法に準じて測定した⁵⁾。すなわち 1 vial あたり 1×10^6 に調製した細胞浮遊液にグルコース ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) および $0.25 \mu\text{Ci}$ $[1-^{14}\text{C}]$ グルコースあるいは $[6-^{14}\text{C}]$ グルコースを混じ、160 nM TPA あるいはラテックス粒子添加、非添加のそれぞれの系について、30分 incubate し放出される $^{14}\text{CO}_2$ 放射活性を測定することによった。

結 果

TPA 処理による THP-1 細胞のガラス壁付着能：THP-1-O 細胞は通常の培養条件下では、ほぼ単一細胞よりなる細胞集団として増殖する。しかしこの培養系に 16~160 nM の TPA を添加すると、添加後 1 時間ですでに 70% 前後の THP-1-O 細胞はガラス壁に付着することが観察された (表 1)。ガラス壁に付着した細胞はその後増殖することなく、時間経過とともに死細胞としてガラス壁より剥離して来た。この付着細胞は EDTA、トリプシン処理にてもガラス壁より剥離しなかった。一方 THP-1-R 細胞の場合には、160 nM TPA で 24 時間処理したときにはじめて 65% の細胞がガラス壁に付着したが、この付着細胞は凝集塊を形成しつつその

表2 Morphological comparison of THP-1 cells before and after treatment with TPA

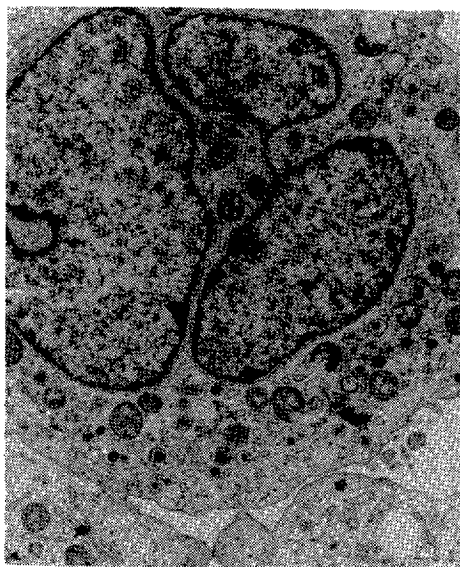
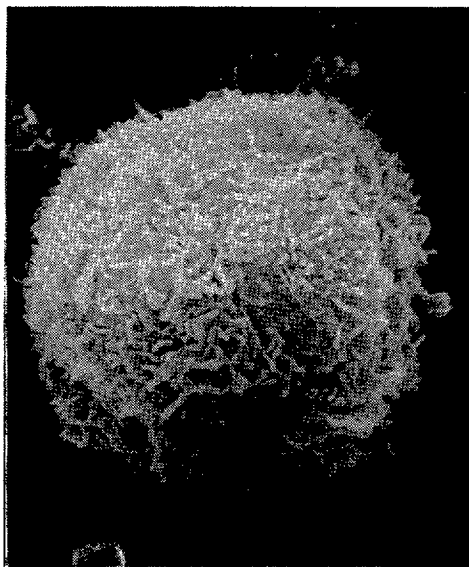
Characteristics	Untreated THP-1-O	TPA treated THP-1-R	TPA treated THP-1-O
Cell diameter (μ)	7-12	6-10	15-25
Cell shape	Round-ovoid	Round-ovoid	Flat and amoeboid
	No clumps	Aggregated	Aggregated
Cell surface	Many microvilli and flaps	A few microvilli and flaps	Few microvilli and flaps
Nucleus	Irregular and strikingly lobated	Slightly lobated	Slightly lobated
	Large nucleolus	Large nucleolus	Heterochromatin is evident, Large nucleolus
Cytoplasm			
Rough ER	Sparse	Well developed	Moderately developed
Vesicles	Many	A few	Few
Cored vesicles	Present (0.3-0.4 μ)	Absent	Absent
Mitochondria	Normally present	Normally present	Normally present
Golgi apparatus	Poor	Poor	Well developed
Lipid droplets	Present	Present	Present
Free ribosomes	A few	Abundant	Abundant

後も増殖することが観察された。同様の処理を行った5株のLCLでもガラス壁に付着する細胞は認められたが、これらはEDTA処理により容易にガラス壁より剥離することができた。

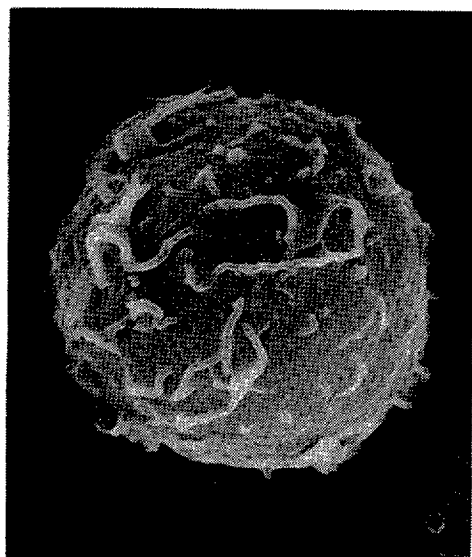
TPA処理によるTHP-1細胞の形態変化：THP-1細胞を160 nM TPAで処理した時の形態変化の特徴を表2に記した。最も大きな変化はTPA処理THP-1-O細胞に認められ、形態の扁平化、microvilliおよびflapsの消失、粗面小胞体の発達、遊離リボゾームの増加、cored vesiclesの消失といった変化を示し、あたかもマクロファージの如き形態学的所見を呈した。未処理THP-1-O、TPA処理THP-1-O、TPA処理THP-1-Rの各細胞の透過型および走査型電顕像を図1～図3に示した。

TPA処理によるTHP-1細胞の表面マーカーおよびリゾチーム産生に対する影響：TPA未処理THP-1-OおよびTHP-1-R細胞はFcリセプターとC3bリセプターを保有しているが、この発現率はTPA処理によりTHP-1-O細胞ではほとんど変化しなかった。しかしTHP-1-R細胞ではそれらを発現する細胞の比率が、TPAの処理濃度を高くするにつれて減少して行く傾向が認められた(表3)。培養上清中へのリゾチーム産生能はTHP-1-OおよびTHP-1-R細胞ともに、TPA処理前後で有意の変化を認めなかった。

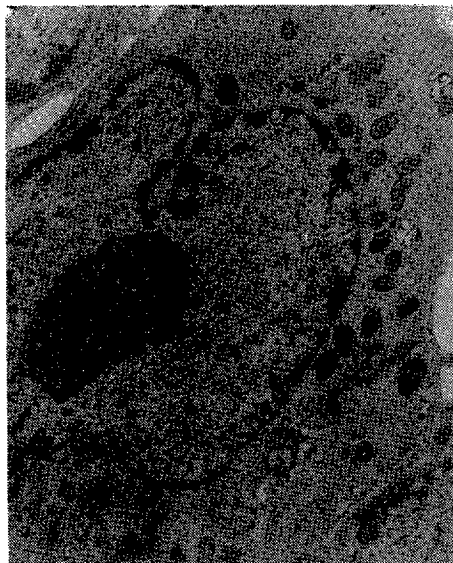
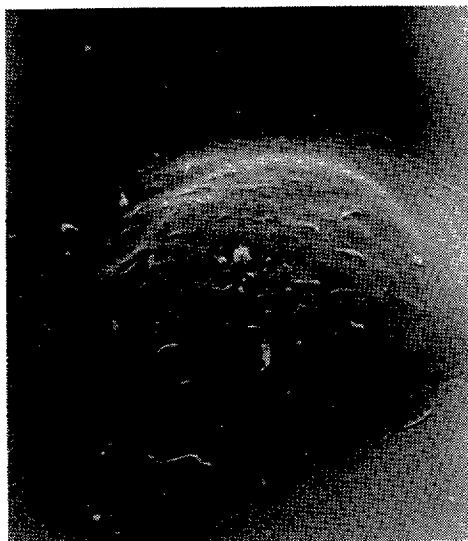
TPA処理に伴うTHP-1細胞の貪食能の亢進：TPA未処理および処理THP-1細胞のイースト、羊赤血球、IgG感作羊赤血球に対する貪食能を表4に示した。TPA未処理THP-1-OおよびTHP-1-R細胞ともにこれら異物に対する貪食能がわずかではあるが認められる。一方THP-1細胞を0.16～160 nMまでの種々の濃度のTPAで処理すると、TPAの濃度が高くなるにつれて貪食能が亢進して来て、160 nM TPA処理にてTHP-1-OおよびTHP-1-R細胞の70%前後にイーストあるいはIgG感作羊赤血球の貪食が認められた。対照として用い



- 1 A Untreated THP-1-O cell. Many microvilli and flaps were seen. $\times 11,000$.
 1 B Untreated THP-1-O cell. Lobated nucleus and many vesicles in the cytoplasm were seen. $\times 9,500$.



- 2 A TPA treated THP-1-R cell (160 nM, 24 hr). Microvilli and flaps were decreased from the surface membrane, but the shape was still round. $\times 18,000$.
 2 B TPA treated THP-1-R cell (160 nM, 24 hr). Well developed rough ER and abundant free ribosomes were seen. $\times 13,500$.



- 図3 A TPA treated THP-1-O cell (160 nM, 24 hr). The cell spread onto the substrate becoming irregular and flattened in shape with almost complete loss of microvilli and flaps. $\times 9,200$.
- 図3 B TPA treated THP-1-O cell (160 nM, 24 hr). Well developed structures of rough ER, Golgi apparatus and abundant free ribosomes in the cytoplasm were seen. $\times 12,500$.

表3 Surface markers of THP-1 cells after treatment with TPA

Cells	Rosette-formation with	TPA, nM			
		160	16	1.6	—
THP-1-O	EA	96.3 ^a	95.6	97.0	97.2
	EAC ^b	47.4	45.4	47.9	35.1
	EAC ^m	0.9	1.0	0.9	7.5
	EN	0	0	0	0
THP-1-R	EA	78.5	82.3	90.6	92.6
	EAC ^b	1.0	9.5	15.1	13.1
	EAC ^m	0.5	1.0	2.0	2.8
	EN	0	0	0	0

^a Percentage of rosette-forming cells. Values represent averages of duplicate experiments.

た5株の LCL では、TPA 処理を行っても1%以下の細胞にしか異物の貪食能は認められなかった。

THP-1 細胞の〔1-¹⁴C〕- および〔6-¹⁴C〕 グルコースからの ¹⁴CO₂ 産生能：正常好中球および単球が外来よりの異物に接触した時におこる広く知られた生化学的変化の一つに、五炭糖リン酸化回路の活性化がある^{6)~7)}。同様の生化学的変化が THP-1 細胞にても引き起こされてい

表4 Phagocytosis of THP-1 cells after treatment with TPA

Cells	Phagocytosis of	TPA, nM				
		160	16	1.6	0.16	—
THP-1-O	Yeast	74.1 ^a	68.7	37.2	16.2	9.8
	SRBC	34.5	22.3	6.9	0.6	0.6
	IgG-SRBC	64.2	38.4	14.1	1.4	1.2
THP-1-R	Yeast	68.5	64.0	53.4	20.2	21.2
	SRBC	36.1	31.6	20.9	6.3	2.6
	IgG-SRBC	60.2	57.9	29.3	7.3	6.3

^a Percentage of phagocytic cells. The figures shown are a representative experiment repeated four times.

^b Not done.

表5 The effect of latex ingestion and TPA treatment of leukemic cell lines and leukocytes from control subjects on ¹⁴CO₂ production from [1-¹⁴C] glucose and [6-¹⁴C] glucose

Cells	¹⁴ CO ₂ production from [1- ¹⁴ C] glucose (nmol glucose/hr/10 ⁶ cells) ^a			¹⁴ CO ₂ production from [6- ¹⁴ C] glucose (nmol glucose/hr/10 ⁶ cells) ^a		
	Cells treated with			Cells treated with		
	Nothing	Latex	TPA	Nothing	Latex	TPA
THP-1-O	0.34	4.77	11.5	0.07	0.19	0.21
THP-1-R	1.72	3.15	3.27	0.17	0.20	0.23
HL-60	1.01	1.07	1.75	0.24	0.25	0.35
THP-2-B	0.18	0.29	0.16	0.14	0.05	0.04
Control subjects ^b	5.2±0.7	23.1±2.6	93.4±8.5	0.32±0.08	0.72±0.17	2.3±0.4

^a Results shown are averages for duplicate experiments.

^b These data were calculated as ¹⁴CO₂ production from 1×10⁶ monocytes.

るか否かを検討するために、THP-1 細胞培養系にラテックス粒子あるいは TPA を添加し、五炭糖リン酸化回路の活性化を、[1-¹⁴C] グルコースよりの脱炭酸反応をマーカーとして調べた (表5)。THP-1-O 細胞はラテックス粒子あるいは TPA と接触すると、[1-¹⁴C] グルコースよりの ¹⁴CO₂ の産生が、処理前に比較しそれぞれ14倍および34倍に上昇することが明らかになった。[6-¹⁴C] グルコースからの ¹⁴CO₂ の産生はほとんど認められないことから、THP-1-O 細胞には五炭糖リン酸化回路に特異的な活性化の刺激が与えられたことが推測される。THP-1-R 細胞にもわずかではあるが同様の ¹⁴CO₂ の産生が認められた。対照として用いた HL-60, THP-2-B 細胞ではこのような変化は認められなかった。

考 按

TPA 処理 THP-1-O 細胞は、ガラス壁付着能を獲得し著しく扁平な細胞へと変化し、以後増殖能を失う。しかしこの細胞は、1) α-naphthyl butyrate 染色陽性であり、これは NaF によ

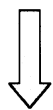
り阻害される, 2) リゾチーム活性は存続して認められる, 3) 細胞表面に IgG-Fc リセプターが存在する, 4) イーストおよび IgG 感作羊赤血球に対し著明な貪食能を示す, といった TPA 未処理 THP-1-O 細胞の性状を保持し, かえってより強くその機能を発現するようになる。われわれは現在のところ, TPA 処理 THP-1-O 細胞は活性化マクロファージ様の性状を獲得したものと考えている。しかし透過型電顕像では, かならずしも THP-1-O 細胞が TPA 処理により, より成熟した細胞へと分化しているという所見ばかりが得られているわけではなく, 特に遊離リボゾムの著明な増加は, むしろその細胞の悪性度の指標のように解釈する見方も存在し⁸⁾, このような細胞の分化および悪性化に関する矛盾がどのように理解されるかは現在のところ不明である。

TPA 処理に対する THP-1-O および THP-1-R 細胞の反応性の差異が, 形態学上あるいは機能上いくつか認められた。しかし THP-1-O 細胞は, THP-1 細胞が試験管内で増殖を開始した時期にストックされた細胞であり, TPA に対する THP-1 細胞の反応性の真の姿は THP-1-O 細胞に反映されていると考えるのが妥当である。おそらく THP-1-R 細胞は長期にわたる継代培養の過程で, TPA により引き起こされる反応のうちのある部分を欠落して来たものと思われる。

今回の研究において, THP-1-O 細胞は, TPA 処理により形態学的にも機能的にも, 活性化マクロファージ様の細胞へと分化をとげることが示された。従って THP-1-O 細胞は, 単球からマクロファージへの分化の機構を検索する上で, また単球による貪食の生化学的機構を研究する上で貴重な実験系を提供するものと思われた。このことは単球機能不全を呈する疾患の病態を理解する上で, 重要なことであろうと思われた。

文 献

- 1) Tsuchiya, S., Yamabe, M. et al. : Int. J. Cancer, **26** : 171~176, 1980.
- 2) Andersson, L.C., Jokinen, M. et al. : Nature, **278** : 364~365, 1979.
- 3) Rovera, G., Olashaw, N. et al. : Nature, **284** : 69~70, 1980.
- 4) Tötterman, T.H., Nilsson, K. et al. : Nature, **288** : 176~178, 1980.
- 5) Stossel, T.P., Murad, F. et al. : J. Biol. Chem., **245** : 6228~6234, 1970.
- 6) Holmes, B., Page, A.R. et al. : J. Clin. Invest., **46** : 1422~1432, 1967.
- 7) Kakinuma, K. : Biochim. Biophys. Acta, **348** : 76~85, 1974.
- 8) Ghadially, F.N. : Ultrastructural pathology of the cells. London, Butterworths Inc., pp. 238~239, 1975.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



緒言

われわれは,急性単球白血病患児末梢血より,単球の性状を有する白血病細胞株(THP-1)を樹立し,昨年度はその細胞株の性状について報告した。この THP-1 細胞は,1) α -naphthylbutyrate esterase 活性,2) リゾチーム産生能,3) 感作羊赤血球およびラテックス粒子貪食能,が認められることにより単球としての性状を保有する細胞株であることが確認されている。一方株化されたマウスおよびヒト白血病細胞のあるものは,dimethylsulfoxide,12-O-te-tradecanoyl phorbol 13-acetate(TPA),酪酸を含む種々の化学物質により,より成熟した段階の細胞へと分化を誘導し得ることが知られている。今回われわれは,THP-1 細胞培養系にこれら種々の化学物質のなかの一つ,TPA を添加した時に,THP-1 細胞がより成熟した単球もしくはマクロファージ様の性状を獲得するに至ることを見出した。このことはヒト成熟単球の免疫生物学的,生化学的研究に好適な素材を提供するものと思われたのでここに報告する。