

綜 説

組織培養による分化とエイジングの最近の知見*

名 和 橙 黄 雄*

信州大学医学部第一解剖学教室

RECENT INFORMATION ON CELL DIFFERENTIATION
AND AGING IN TISSUE CULTURE

Tokio NAWA

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shinshu University

Key words: 組織培養, 発生と分化, aging

動物組織の体外培養の歴史のなかで、最初の大きな足跡を残したのは Harrison¹⁾で、彼はカエルの神経をカエリリンパ内で成長させ、神経細胞が神経線維をつくることを人々の前で実証してみせた。その後、Carrel²⁾, Fischer³⁾等の創意が加わって組織培養の基礎固めができ、第2次世界大戦後の Enders⁴⁾のポリオウイルスに関する研究、Salk⁵⁾, Sabin⁶⁾によるポリオワクチンの成果は培養された細胞を培地として利用した一つの組織培養の成果といえる。このような組織培養の研究の中で最大のものは Earle et al.⁷⁾によるマウス皮下組織からのL細胞の樹立、Gey et al.⁸⁾によるヒト子宮癌組織からの HeLa 細胞の樹立、Puck⁹⁾らによる単一細胞からのコロニー、クローン形成等であり、これらの細胞系の出現によって組織培養は定量的な細胞培養へと移行することになる。

近年の化学の発達はいずれも細胞のおかれた環境(培地)をも、性状の不確定な生物由来の培地(血漿、血清等)から組成の明確な合成培地へとかえた。かくて今日では組織学、細胞学、発生学、ウイルス学、免疫学、腫瘍学、遺伝学等への組織培養の応用には著しいものがある。今回はすべての範囲についてのべることは不可能なので、特に細胞の分化と細胞レベルでのエイジングについてまとめてみた。

細胞分化の研究における応用

高等多細胞生物の体を構成している細胞は、もとは1個の受精卵細胞から由来したもので、すべて同一の遺伝的組成をもつものがどうして発生の過程とともに種々の組織や器官に分化するのか、このことは発生遺伝学の分野における最も重要な課題である。このような細胞分化の要因をさぐるためには、生物の組織や器官を構成している細胞を単離し細胞レベルでの研究が必要となってくる。

以前は組織や器官を体の胚の中に移植するという方法であったが、Moscona¹⁰⁾¹¹⁾がニワトリやマウスの胚から種々の組織や原基を取り出しこれをトリプシン処理して単一細胞に分離し、適当な条件におくと、これが再び集合してそれぞれもとの組織や器官と同じ構造をもったものに再形成されることが見出されて以来、1個の細胞レベルでも分化の特異性を保持していることが確かめられた。

図1, 2に示すように種類の異なった細胞を混合した場合におこる細胞の選別現象がどのような機構によって起こるのであろうか、現在のところ不明であるが、細胞の種類によって異なった種類の細胞結合性(差次粘着性 differential adhesiveness)を持つという仮説が考えられている¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。それでは、このよ

* 本文は第2回信州大学医学部基礎助手会研究発表会(昭和48年2月28日)の口演をまとめたものである。

* 現住所: 旭川医科大学解剖学第一講座(旭川市金星町一丁目 市立旭川病院内)

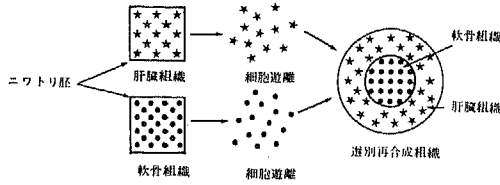


図 1. 2種の異なった組織由来の遊離細胞から組織再合成をおこなったばあいの細胞選別を示す模式図 (黒田 1966, 改変)

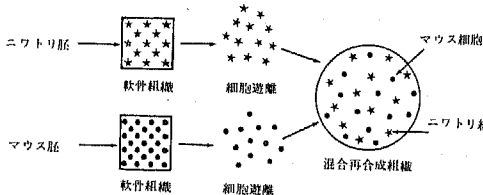


図 2. 2種の異なった動物の同じ組織由来の遊離細胞から組織再合成をおこなったばあいのモザイク組織の形成を示す模式図 (黒田 1966, 改変)

うな細胞と細胞とを結合させる選別現象を支配するものは一体なんであろうか。Moscona¹⁵⁾¹⁶⁾は遊離細胞が再合成組織を形成する場合にその遊離細胞から、細胞結合に関与する物質が分泌されこの細胞結合物質によって組織再合成が行なわれ、この物質には組織特異性があること、さらにこの物質が分化した核内遺伝子DNAの支配のもと、RNAを経て、タンパク合成にもなって形成されるとした。これに対して Steinberg¹⁷⁾は Moscona のいうところの「細胞間物質」は細胞の合成したものではなく、トリプシン処理等の人為的なもので、彼は差次粘着性の仮説をとらえている。

また Curtis¹⁸⁾¹⁹⁾は細胞間物質は細胞の合成能力にあるのではなく、培養実験に使用する培養液中の血清側にあるとしている。本来血清中には細胞の再集合を阻止するタンパク質が含まれていて、37°Cで培養すると細胞はこの“再集合阻止タンパク質”を消化し不活化するという。彼はタイミング仮説というものを考え、トリプシンなどによる遊離細胞の表面変化の回復に要する時間は組織のタイプによって異なり、速やかに回復したものがまず集合するというのである。たしかに、トリプシン処理による表面構造の変化とそれにもなる集合力の低下は名和²⁰⁾の走査電子顕微鏡による研究でもはっきりとしているが、しかしタイミング仮説だけですべてを説明することは不可能で、生体内における分化の過程を考える時、差次粘着性の仮説

が可能性としてうかび上がってくる。

一般に培養日数が長くなると同時に組織再形成能は減少し、同時に細胞がもっている種々の特性、たとえば酵素活性、ウイルス感受性、種々の抗原性、染色体構成などがしだいに変化することが知られている²¹⁾²²⁾。この特性変化は Sato et al.²³⁾の脱分化 (dedifferentiation) 説によると、細胞は体外条件に反応して新しい特性を獲得する。

しかし、Hayflick²⁴⁾は突然変異細胞が体外条件によりよく適して、急速な増殖をおこなうために細胞集団に変化が生じたとのべている。

いずれにしても、組織再形成能は発生の進んだ材料ではしだいに減少していくことから細胞の分化と密接な関係のあることが推察されるが、分化の調節機構の本態は目下のところ不明といわざるを得ない。

近年、癌研究において癌細胞の発現機構の問題が大きき課題となってきた。癌細胞の特性である、異常な増殖や、電顕等でみられる無構造性は生物の発生初期における未分化な細胞の性質に類似しており、細胞分化の面から癌の問題を研究することが試みられている。

細胞レベルでのエイジング

個体を構成する細胞には特有の寿命があり、個体の成熟、老化のなかでそれぞれ固有の細胞回転 (cell turnover) を行なっていることが知られている。このように細胞周期を理解することなしに、細胞増殖を理解することはできず、また細胞の成熟化、老化、強いては個体の老化も理解できない。そのためには、個体を構成している細胞の周期をそのまま調べるよりも、単純な増殖システムである細胞培養で細胞周期を観察することが、もっとも簡単な方法である。この場合、個体の制御から切りはなされた細胞固有の増殖態度が観察できる。しかしながらいままでの細胞周期の研究は主として試験管内で植継がれてきた培養細胞系について行なわれてきたものが多く、これらの細胞系は培養環境で増殖するに適した変異細胞で、それぞれ一定の寿命がある生体内の母細胞との関係が希薄になっていることは否めない。例えば動物の正常組織細胞を長い間培養を続けると、癌化してもとの動物に移植できることが Earle and Nettleship²⁵⁾の報告以後多くの研究者によって確認されている。

さらに、このような細胞の染色体をしらべてみると一般に本来の染色体とは異なって異数性染色体構成を

示している。また癌化したことが確かめられていない場合でも長い間培養していると異数性染色体構成を示すのが普通である。そこで染色体をマーカーとして、生体内の二倍体細胞をそのまま培養して、出来るだけ正常に近い状態で研究を行ないたいというのが我々の長年の願望であった。しかしながら、多くの場合、正常二倍体構成を保つことは困難で、培養を続けると急に増殖度が落ちて死滅してしまうか、あるいは染色体数が変化して異数性の培養細胞系ができる結果となる。

Hayflick and Moorhead²⁰⁾は正常二倍体細胞の培養の困難さは、技術的な不完全によるものではなくむしろ正常細胞に一定の寿命があるためにおこる現象と考えた。すなわち、彼らはヒト胎児組織をトリプシン処理によって培養し、週2回の割で継代操作を行なっていくと約半年間50代は継代できる。

彼らは継代培養の経過を図3のように3期に分け初代培養を第Ⅰ期、一定の速度で増殖する時期を第Ⅱ期、増殖度が次第に衰えてやがて死滅する時期を第Ⅲ期とした。第Ⅲ期を経過してなお増殖できる細胞は樹立細胞系に移行していく。正常の生体内と同じ2倍体の染色体を保持している細胞は、体外培養に移した場合、およそ40~50回の分裂をして死ぬがその途中で冷凍保存するとその期間だけ寿命がのび、37°Cに戻すと残された分裂回数の寿命を終わって死ぬ。

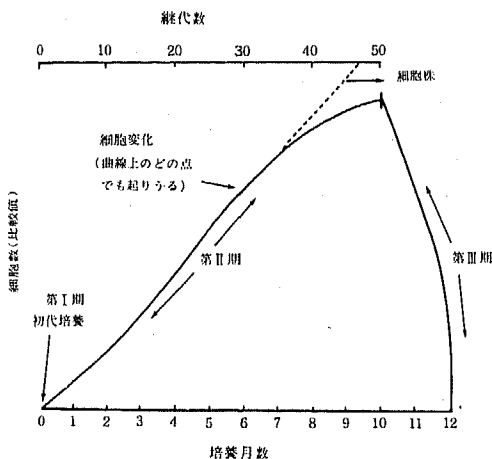


図3. 二倍体細胞株の継代経過と細胞系樹立の模式図 (Hayflick and Moorhead, 1961 による)

この培養細胞の寿命は細胞を取り出した時の生体の

寿命と関係があり、成人の場合は約20回くらいの分裂しかできず、平均寿命の短い動物ほどその細胞の分裂回数(少ない²⁷⁾)。このように細胞自体に固有の寿命があることが、細胞の分化とまた密接な関係があり、これらの細胞によって構成される生物体の寿命に関連していることが推察される。しかしながら、細胞の分化、あるいは老化というものを考える時に必然的に細胞増殖という問題が関連してくるわけで、このように *in vitro* における培養細胞をモデルにして研究される増殖(制御)の問題は腫瘍増殖(制御)の問題と表裏一体をなすように思われ、今後の重要な課題を提起するものである。

文 献

- 1) Harrison, R. G.: Observations of the living developing nerve fibers, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 4: 140-143, 1907
- 2) Carrel, A.: Artificial activation of the growth *in vitro* of connective tissues, J. Exp. Med., 17: 14, 1913
- 3) Fischer, A.: Beitrage zur Biologie der Gewebezellen. Eine vergleichend-biologische Studie der normalen und malignen Gewebezellen *in vitro*, Arch. f. mikr. Anat. u. Entwicklungsmechn., 104: 210, 1925
- 4) Enders, J. F., Weller, T. H. and Robbins, F. C.: Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues, Science, 109: 85-87, 1949
- 5) Salk, J. E.: Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress. J. Amer. Med. Ass., 151: 1081-1098, 1953
- 6) Sabin, A. B.: Noncytopathogenic variants of poliomyelitis viruses and resistance to superinfection in tissue culture, Science, 120: 357, 1954
- 7) Earle, W. R., Schilling, E. L., Bryant, J. C. and Evans, V. J.: The growth of pure strain L cells in fluid-suspension culture, J. Nat. Cancer Inst., 14: 1159-1171, 1954
- 8) Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative

- capacity of cervical carcinoma and normal epithelium, *Cancer Res.*, 12 : 264-265, 1952
- 9) Puck, T. T. and Marcus, P. I. : A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 41 : 432-437, 1955
- 10) Moscona, A. A. and Moscona, H. : The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo, *J. Anat.*, 186 : 287-301, 1952
- 11) Moscona, A. A. : Rotation mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable to cell interactions in vitro, *Exp. Cell Res.*, 22 : 495-475, 1961
- 12) Steinberg, M. S. : On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. I. Population kinetics, differential adhesiveness, and the absence of directed migration, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48 : 1577-1582, 1962
- 13) Steinberg, M. S. : On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. III. Free energy relations and the reorganization of fused, heteronomic tissue fragments, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48 : 1769-1776, 1962
- 14) 黒田行昭 : 動物細胞の選別, *化学と生物*, 4 : 394-400, 1966
- 15) Moscona, A. A. : Analysis of cell recombinations in experimental synthesis of tissues in vitro, *J. Cell Compt. Physiol.*, 60 suppl. 1 : 65-80, 1962
- 16) Moscona, M. H. and Moscona, A. A. : Inhibition of adhesiveness and aggregation of dissociated cells by inhibitors of protein and RNA synthesis, *Science*, 142 : 1070-1071, 1965
- 17) Steinberg, M. S. : Reconstruction of tissues by dissociated cells, *Science*, 141 : 401-408, 1963
- 18) Curtis, A. S. G. and Greaves, M. F. : The inhibition of cell aggregation by a pure serum protein, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 13 : 309-326, 1965
- 19) Curtis, A. S. G. : Timing mechanisms in the specific adhesion of cells, *Exp. Cell Res. suppl.*, 8 : 107-122, 1961
- 20) 名和橙黄雄 : 培養細胞の走査電子顕微鏡像, 第Ⅱ報, 微細細胞質突起について, *解剖学雑誌*, 48 : 81, 1973
- 21) Holtzer, H., Abbott, J., Lash, J. and Holtzer, S. : The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. I. Dedifferentiation of cartilage cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 46 : 1533-1542, 1960
- 22) 黒田行昭 : 体外培養細胞の遺伝的特性と分化能の変化, *細胞化学シンポジウム*, 14 : 149-162, 1964
- 23) Sato, G., Zaroff, L. and Mills, S. E. : Tissue culture populations and their relation to the tissue of origin, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 46 : 963-972, 1960
- 24) Hayflick, L. : The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation, *Exp. Cell Res.*, 23 : 14-20, 1961
- 25) Earle, W. R. and Nettleship, A. : Production of malignancy in vitro. V. Results of injections of cultures into mice, *J. Nat. Cancer Inst.*, 4 : 213-227, 1943
- 26) Hayflick, L. and Moorhead, P. S. : The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, 25 : 585-621, 1961
- 27) Hayflick, L. : The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, 37 : 614-636, 1965
- 28) 日本発生物学会編 : エイジングの生物学, 岩波書店, 東京, 1972

(1973. 6. 19 受稿)