

ヒト卵巣類内膜癌由来細胞株 OVK 18 の樹立と性状

東北大学医学部産科学婦人科学教室

上原 茂樹 荘 漢一 星合 昊
矢嶋 聰 鈴木 雅洲

東北大学医学部第2解剖学教室

阿 部 寛

Establishment and Characterization of Human Ovarian Endometrioid Carcinoma Cell Line

Shigeki UEHARA, Kan-ichi SOH, Hiroshi HOSHIAI,

Akira YAJIMA and Masakuni SUZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

Hiroshi ABE

Department of the Second Anatomy, Tohoku University School of Medicine, Sendai

概要 ヒト卵巣類内膜癌由来の培養細胞株 OVK 18 を樹立し、その性状について検索した。細胞は49歳の患者の腹水より得られ、37℃、5% CO₂ 下で15%FCS添加 Eagle's MEM を培地として静置培養された。初代培養後約8週間で継代可能となり、以後順調に増殖している。

本細胞株の性状として以下のことがあげられる。

1) 細胞は類円形～多角形で敷石状に増殖し、重積傾向もみられる。継代培養初期には管腔様構造の形成があつた。細胞質内にPAS陽性物質が存在した。電子顕微鏡による観察では、著明な核小体が存在し、細胞内小器官の発達がよく、細胞間にはdesmosome様構造などの連結装置があり、細胞表面にはmicrovilliがみられた。

2) 染色体数は47にモードを有する pseudodiploid type で、狭い範囲に分布した。また1本の submetacentric な marker 染色体が認められ、Gバンドによつて11番の染色体と1番の染色体との転座によつて生じたものであることがわかつた。

3) ノードマウスへの細胞の移植によつて容易に移植腫瘍を形成したが、その組織像は原病巣とは異なつていた。

4) dexamethasone, h-LH, h-FSH 負荷では増殖性に変化はなかつたが、estradiol, promegestone 負荷で5 µg/ml以上の濃度により増殖は抑制された。

5) estrogen, progesterone receptor の存在は認められなかつた。

卵巣類内膜癌由来株は過去に一例しか報告されておらず、類内膜癌の起源やその本態を検索するのに意義あるばかりでなく、marker 染色体のもつ特性をいかした研究にも利用できると思われる。

Synopsis Ascitic fluid was obtained from the patient of ovarian endometrioid cancer. Collected cells were incubated with Eagle's MEM containing 15% fetal calf serum at 37°C under humidified 5% CO₂ and 95% air.

The epithelial colonies grew rapidly and were released without fibroblast cells. After the first passage, the cells are growing without interruption for over one year and 35 transfer generations.

This cell line has following characters:

1) The monolayer cultured cells appeared epithelial, pavement like arrangement and piling up, without contact inhibition.

2) In the cytoplasm PAS positive substance can be seen.

3) Desmosome-like structure, gap junction, microvilli and well developed cell organelles can be found by electron microscopy.

4) Chromosomal number shows pseudodiploidy which mode is 47. A submetacentric chromosome was present in all karyotype and identified by G-banding. It consists of No. 11 and a part of No. 1.

5) By heterotransplantation to the nude athymic mouse, the tumor easily develops.

- 6) By estradiol and promegestone its growth was inhibited.
 7) Estrogen and progesterone receptors were not detected in the cytosol.

Key words: Ovarian cancer • Endometrioid adenocarcinoma • Established cell line • Marker chromosome

緒 言

George Geyにより樹立された培養細胞株Helaが世界的に普及し、さまざまな分野での研究に利用されてきた。Hela以降も種々の臓器の腫瘍より培養細胞株が樹立されてきており、これらは癌に対する治療法の開発や改良に大きく貢献しているのみでなく、細胞生物学として細胞の生理的機能やその本態の解明に役立つなど種々の分野に利用されてきた。

婦人科領域に限ってみても、従来より各種臓器の癌からの培養細胞株の樹立が試みられ、Hela細胞はじめ、いくつかの細胞株がつくられている。しかし卵巣癌では、組織型が多種にわたっており、しかもそれぞれの組織型で腫瘍としての性状が異なっていることは、臨床診療上周知のところである。いわば「同一組織より多種多様な癌が発生する」とも言える卵巣であることから、卵巣癌由来の細胞株を個々の組織型別にみると、未だ十分な樹立をみているとは言い難い。とくに卵巣類内膜癌由来の培養細胞株は、Freedman et al.により一例報告されているのみで、その発生母組織を知る上で、また子宮内膜癌との関係を見る上で意義ある材料と言える。

今回我々は、新しくヒト卵巣類内膜癌由来培養細胞株OVK18を樹立し、その性状についていくつかの検討を加えたので、樹立経過とあわせて報告する。

研究方法

1. 材料

患者は49歳で、1980年10月31日下腹部腫瘍の診断のもとに開腹術をうけた。左卵巣は小児頭大で、病巣の一部は被膜を破つて腹腔内に露出し、すでに癌性腹膜炎の様相を呈していた。子宮には筋腫核が存在し、全体として手拳大に腫大していた。従つてもはや病巣の完全摘出は不可能ではあつたが、病巣の縮小を計る意味で、単純子宮全摘除術及び両側付属器摘除術を行つて閉腹した。摘出した臓器の病理組織学的診断は、左卵巣の類内膜癌

及び子宮体筋層への転移であつた。写真1に卵巣原病巣の病理組織像を示した。病巣の大部分を占める悪性部分は乳頭形成を示し、また squamous metaplasia もみられた。さらに悪性部分の周辺には良性と考えられる部分があり、その部より悪性への移行像と思われる所見が得られた。写真2に転移巣である子宮筋層の病理組織像を示した。ここでは播種された転移細胞が管腔内にみられるほか、管腔を中心とした発育がみられ、しかも卵巣の病巣に比べて極めて強い間質反応と、分化型から未分化型までの多彩な腫瘍組織像を呈していた。

患者は手術に引き続き化学療法、放射線療法をうけたが、腹水の貯留をみるようになった。1981年3月5日、患者より腹水が採取され、遠心して

写真1 卵巣原病巣の病理組織像 (H.E. ×200)

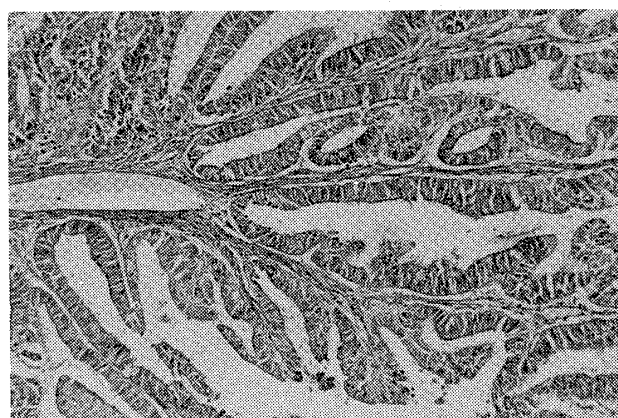
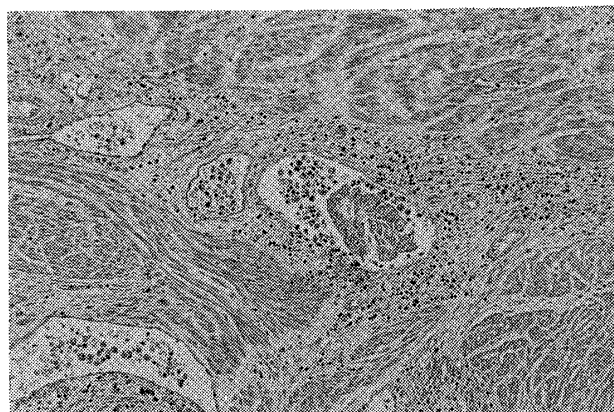


写真2 子宮筋層(転移巣)の病理組織像(H.E. ×200)



得られた細胞を初代培養に供した。培養液は15% FCS 添加 Eagle's MEM (Gibco)で、重曹、Hepes を適宜加え³⁾、抗生物質は、AB-PCを10mg/100ml の濃度で使用した。培養条件は37℃、5%CO₂下でプラスチック製 dish (Falcon) 上での静置培養であつた。

2. 培養経過

培養開始後約5週間でfibroblast上にcolonyの形成がみられるようになり、次第に増大する傾向を示した。colonyが適当な大きさになり、さらに一部浮遊細胞もみられるようになった時点で、pipetを用い培地でcolonyを洗い落すようにして細胞を剥離した。この操作によつてfibroblastの混在はほとんどなくなり、腫瘍細胞のみと言える状態となつた。colonyがconfluentになつた1981年5月2日、第1回の継代操作を行つた。継代培養に移つてからは、プラスチック製 flask (Corning) を用いた閉鎖系での静置培養とし、1982年3月末までで35代の継代が行われてきた。継代の操作は、0.01% pronase-P (科研化学)、0.02% EDTA (同仁薬化学) を含む Dulbecco の PBS (以下 PBS) を用い、1つの flask より3つに分配する方法で行っている。

3. 増殖曲線・倍加時間

継代9、15代の細胞を用いて増殖曲線を作成した。pronase-P, EDTA を含む PBS で細胞を dish より剥離し、径3.5cm の dish (Falcon) に細胞数10⁵個を播種し、培地 (MEM+15% FCS) 1ml 中で培養した。細胞数算定は、pronase-P, EDTA を含む PBS で細胞を剥離し、単一細胞にしてから microcell counter (東亜) で行つた。

4. 異種移植

樹立した細胞の造腫瘍性をみるために継続して in vitro で継代されてきた10代めの細胞約10⁷個を週齢15週の BALB/c nu/nu ノードマウス背部皮下に移植した。

5. 染色体検索

継続して in vitro で継代培養されている細胞に培地交換の翌日0.3μg/ml の Colcemid (Gibco) を添加し、さらに37℃で5時間 incubation した。その後0.075M KCl 液で低張処理をし、Carnoy 固

定液で固定、乾燥、その後 Giemsa 染色をした。染色体数の算定は、継代3代及び20代で施行し、50個の細胞でその染色体数を調べた。またバンド染色は、Gバンド染色とし、slide glass 上に塗抹した細胞を trypsin 処理し、0.2% EDTA 処理、水洗後 Giemsa 染色した。

6. 電子顕微鏡による細胞の観察

単層培養されている細胞をヘラで剥離し、遠心して得られた pellet を0.1M Na-cacodylate buffer に溶いた2.5% glutaraldehyde で固定し、1% OsO₄による後固定、ethanol による脱水、propyleneoxide による置換、Epon 812による包埋の手順でブロックをつくり、超薄切片を作成し Uranylacetate, lead citrate による染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。

7. ホルモン反応性

径3.5cm の dish に細胞を10⁵個/ml 含む培地 1ml を加え、3日間培養後培地交換し、同時に種々の濃度で estradiol (SIGMA), promegestone (NEN), dexamethasone (Schering), h-LH (NIAMDD), h-FSH (NIAMDD) を培地中に添加した。細胞数は培地交換後1~2日毎に算定し、得られた増殖曲線によつてホルモンに対する反応性を調べた。

8. estrogen receptor progesterone receptor の検索

In vitro 培養系で継代されてきた細胞をヘラで剥離し、遠心して得られた pellet を Potter ホモジナイザーを用い、TED buffer (Tris-HCl, EDTA, sucrose, DTT) 中で homogenize した。これをさらに105,000×g で超遠心し cytosol 分画を得た。cytosol を³H-labeled estradiol 又は³H-labeled promegestone と混合し、0℃下で数時間 incubate した。その後5~30%の sucrose gradient 上にのせ、200,000×g で超遠心した後、fraction collector (ISCO) を用い fraction を採取した。count は液体シンチレーション法で行つた。

結 果

1. OVK18株の樹立

初代培養開始後 fibroblast の発育が旺盛となつたが、腫瘍細胞も fibroblast を feeder layer とし

て colony を形成してきた。colony は数石状に配列する類円形の細胞によつて形成され、重積傾向もみられた。初代継代以後も細胞は順調に増殖を続け、現在に至っている。

2. OVK18細胞の形態

写真3に第1回継代以後継代を行わず flask 中で重積培養させた像を示した。個々の細胞は類円形～多角形の中型の細胞で、特徴として細胞によつて囲まれながら細胞の増殖をみない腺腔様構造の存在が認められた。また一部の細胞は浮遊傾向を示している。

また培養細胞の papanicolaou 染色によつて腺細胞様構築を認め、PAS 染色によつて細胞内に PAS 陽性物質を認めた。

電子顕微鏡による観察では、核はほぼ細胞の中央にみられ、いくつかの核小体を有していた。また細胞膜には microvilli も認められた。細胞質には endoplasmic reticulum, mitochondria, lysosome, ribosome, lipid droplet, glycogen 顆粒もみられ、細胞間にはしばしば desmosome ないし intermediate junction に似た連結や gap junction の存在がみられた (写真4, 5)。

3. 異種移植

ヌードマウス移植腫瘍の hematoxylin-eosin 染色標本を写真6に示した。細胞接種後約1カ月で肉眼的に確認できる移植腫瘍が得られ、約2カ月後には径1.5cm ほどに発達し、同時にヌードマウスは衰弱してきた。組織像では、未分化型腺癌と思われる像を呈しており、原病巣とは異なつたも

写真3 初回継代後継代せず重積増殖させた培養細胞像 (×100)

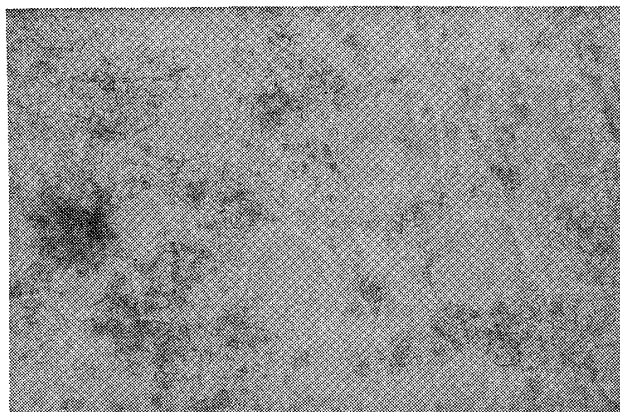


写真4 (上), 5 (下) 培養細胞の電子顕微鏡像

M; mitochondria G; Golgi apparatus Ly; lysosome Li; lipid granule ER; endoplasmic reticulum *; gap junction →; desmosome like structure

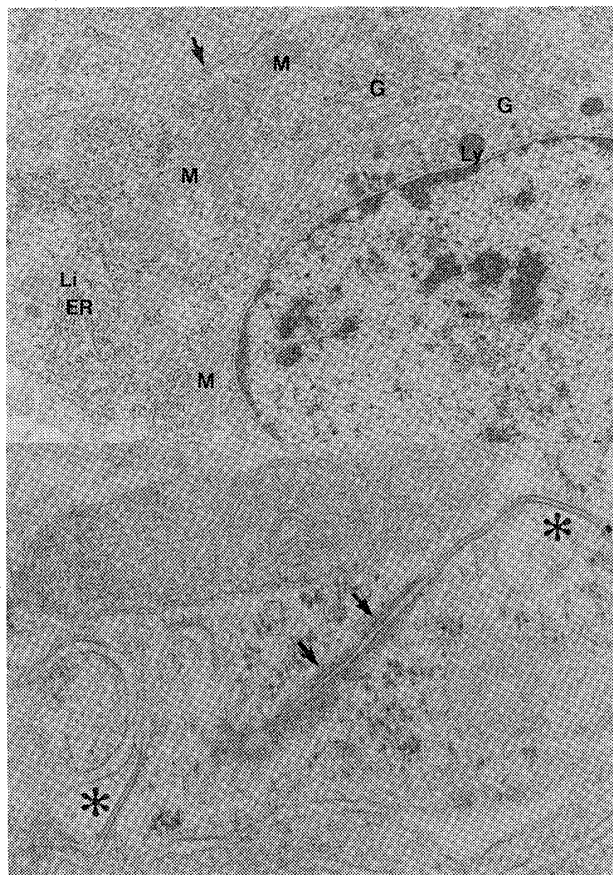
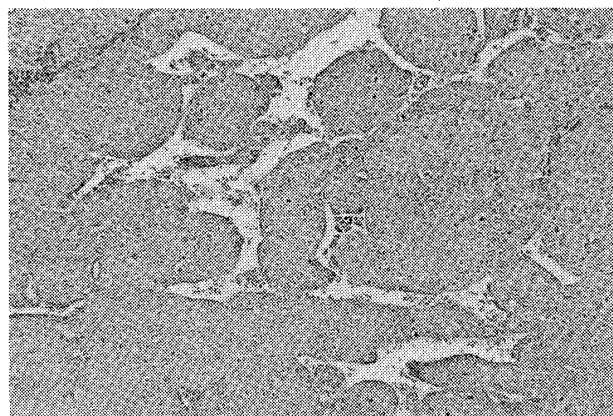


写真6 ヌードマウス移植腫瘍の病理組織像 (H.E. × 100)



のとなつている。

4. 染色体検索

5代めに施行した染色体検索では、染色体数は47にモードを有し、かなり狭い範囲に分布する

pseudodiploid type で、20代めの検索でもやはり同様に47にモードを有していた(図1)。写真7に染色体数47の核型を示したが、1本の分類不能の submetacentric な染色体が存在し、これは他の核型にも共通してみられることから、marker 染色体と考えられた。その起源は、バンド染色によつて11番と1番の染色体の転座で、その構造は、t(1:11)(11qter-11q24::1g11-lqter)であることがわかった(写真8)。

5. 増殖曲線, 倍加時間

継代9, 15代で増殖曲線を検討した。flask 中の閉鎖系におかれていた細胞を dish 上の開放系に移したため増殖は多少遅いと思われたが、その倍加時間はともに約48時間であつた(図2)。

6. ホルモン反応性

負荷した hormone のなかで、estradiol 及び promegestone がともに 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で軽度、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では著明に増殖抑制作用を示した(図3, 4)。dexamethasone, h-LH, h-

図1 継代5代及び20代の染色体数分布

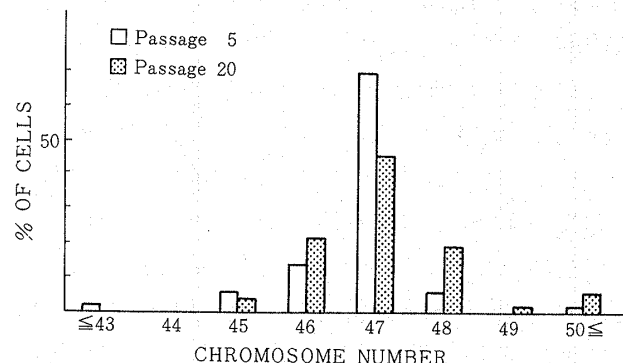


写真7 継代20代における核型分析(染色体数 47)

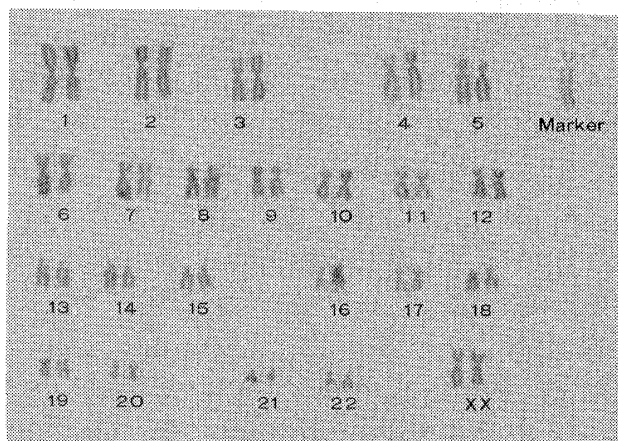
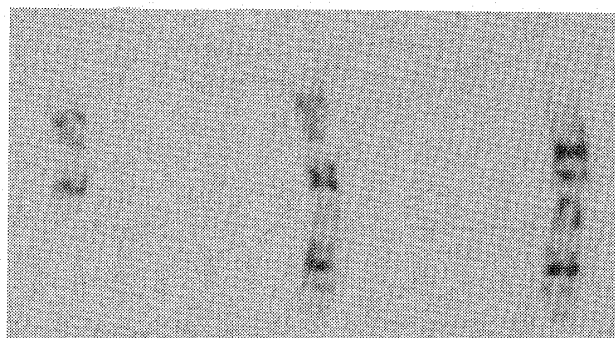
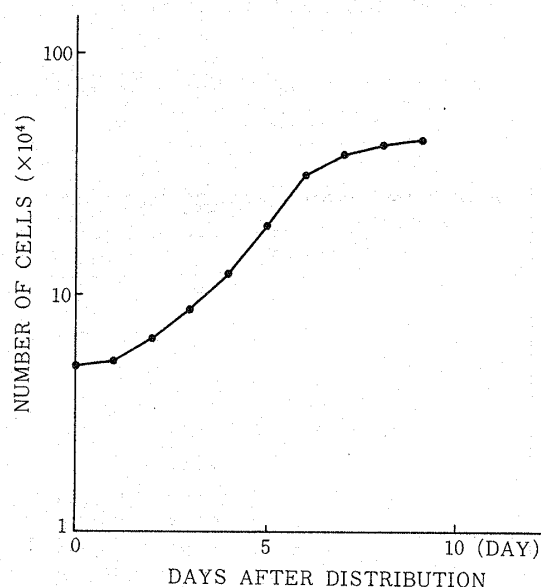


写真8 MARKER 染色体のGバンド像 No.1とNo.11の転座であることを示す



No. 11 MARKER No. 1

図2 継代15代に求めた増殖曲線(片対数グラフ)



FSH は増殖性に変化をあたえなかつた。

7. estrogen receptor, progesterone receptor の検索

蔗糖密度勾配遠心法によるこれらの receptor の検索では、その存在を示す peak は認められなかつた。

考 察

OVK 18株が上皮性の悪性腫瘍由来であることは以下のことから了解される：1) 培養細胞に重積傾向のあること、2) 細胞間結合のあること、3) 大きい核、著明な核小体のみられること、4) 長期間にわたり継代培養され増殖は安定していること、5) 異常な染色体数を示すこと、6) ノードマウスに容易に移植腫瘍を形成すること、さらにそ

図3 estradiol 負荷時の増殖率（対照を100%として示した）

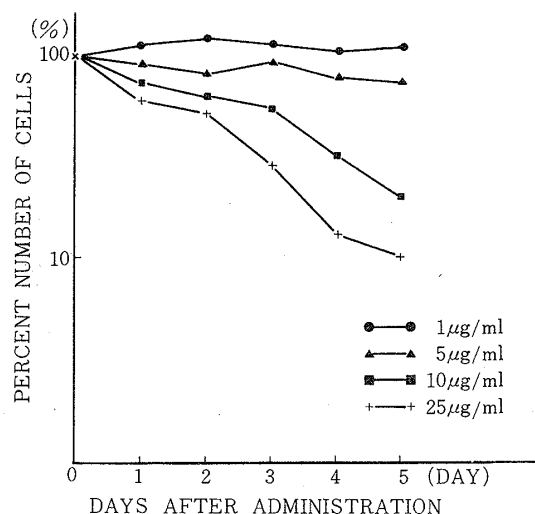
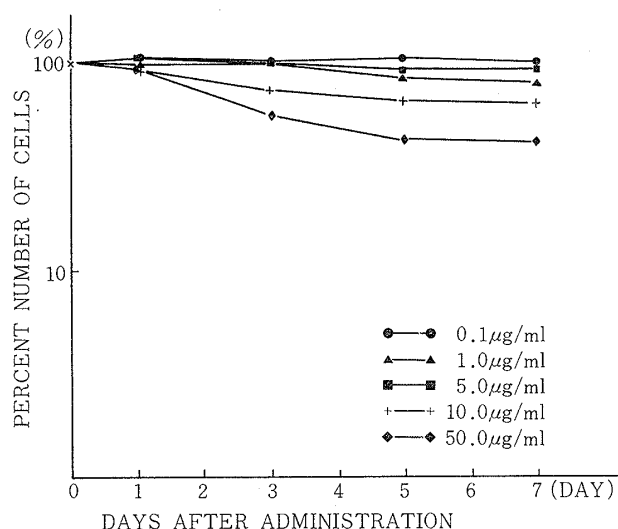


図4 promegestone 負荷時の増殖率（対照を100%として示した）



れを死に至らしめること、などがあげられる。大星によれば、In vitro における癌細胞の特性として最も高い価値をうけているのは、細胞を動物に移植してこれが進行性に増大して宿主を殺した場合とし、この場合その細胞を癌細胞とみなすのが今は一般的常識となつているという²⁾。OVK 18株はこの点を満足しているといえる。

樹立された OVK 18 の由来は、腹水中の悪性細胞であるが、この症例では術後の検索によつて、卵巣の類内膜癌及び子宮体筋層における腺癌が確認されている。Marrow によれば類内膜腫瘍の 15~30% には子宮内膜癌の合併があるという¹³⁾。

従つて原発巣に関する検索は、この腹水悪性細胞の起源を論ずる上で不可欠のことと思われる。卵巣類内膜癌病巣は、子宮の病巣に比して圧倒的に大きく、また組織学的には病巣中に良性上皮から類内膜癌への移行像が随所でみられた。これに対して子宮の病巣は、子宮筋層内に局限しており、内膜には病巣が存在しなかつた。また管腔内に転移細胞をみることもでき、組織管腔を中心とした発育が主であり、しかも極めて強い間質反応と多彩な腫瘍組織像を呈することなどが特徴的であつた。このような組織学的特徴は、この腫瘍の原発巣が卵巣類内膜であり、これが子宮筋層へ転移したものであることを強く示唆している。ただし子宮内膜癌あるいは内性子宮内膜症の癌化などが原発巣であること、または卵巣類内膜癌と子宮筋層内膜癌の重複癌である可能性も完全に否定し得ないが、少なくとも上述した組織学的所見から、これらのことを推測するのは無理と言えよう。

以上の点をふまえ OVK 18 株の起源についてさらに考えると、卵巣の病巣は腹腔内に露出し、大網などの周囲組織への浸潤があること、子宮筋層内病変が漿膜とかなり隔つた部位に局限していたことなどから、腹水中の細胞は原発巣と考えられる卵巣類内膜癌に由来するといえることができる。

ヌードマウスに形成された移植腫瘍は組織学的に卵巣の原病巣と類似性は認められなかつた。この点については、いくつかの要因が考えられる：

1) 原病巣摘出後に施行された化学療法、放射線療法により細胞に変化が生じた可能性、2) 転移巣である子宮の病巣には未分化な部分もみられることから、原発巣より播種された細胞は未分化なものであつた可能性、3) 継代初期は腺腔様構造などが認められることから、分化した細胞・未分化な細胞が混在する polyclonal な状態にあつたのが、継代を重ねるに従つて増殖力の旺盛な未分化な細胞が卓越し、monoclonal に近い状態になつた可能性などが考えられる。Freedman et al. が樹立した類内膜癌由来株もヌードマウス移植腫瘍と原発巣が異なつていたという⁸⁾。また Lieberman et al. によれば、培養された細胞の酵素活性は臓器特異性がなくなり、旺盛な増殖によつて dediffe-

rentiationがおこるとも報告している¹¹⁾。これらのことより OVK 18株の移植腫瘍組織像が原発巣と異なることが、その由来を否定する根拠とはならないと考える。

染色体検索の結果より OVK 18株では、47の染色体数にモードを認め、狭い範囲に分布する pseudodiploid であること、核型分析より submetacentric な marker 染色体が存在し、これは 11番の染色体に 1 番が転座したものであることが特徴としてあげられる。gene map よりこの marker 染色体上には、乳酸脱水素酵素、酸性 phosphatase, esterase, lethal antigen の各遺伝子座が存在する⁹⁾。卵巣癌より樹立された細胞株の染色体数は、Disaia et al. が報告した cystadenocarcinoma の 2 つの株が 65 を中心に広い範囲にわたっており⁵⁾、また Freedman et al. の類内膜癌由来株は 66~68 にモードがあるという⁸⁾。OVK 18株はこれらと染色体数が異なるが、染色体数の臓器特異性はないと考えられ、大多数の癌細胞で観察される染色体数の異常は、癌の発生とは関係なく、細胞の増殖に伴う二次的な変化であるという¹⁰⁾¹⁴⁾。biopsy で得た卵巣癌組織を用いて調べた Makino et al.¹²⁾、Fischer et al.⁷⁾、Fracarro et al.⁶⁾、Vaartaja et al.¹⁵⁾の結果の相違からもそのことは肯定される。また marker 染色体の存在は、OVK 18株を特徴づける有用な指標であるといえ⁴⁾、この存在により他細胞株の混入を否定できる。

性ステロイド負荷で増殖が抑制されたこと、さらに estrogen, progesterone の両 receptor が見い出せなかつたことの 2 点より、性ステロイドによる増殖抑制は receptor も介さない非特異的な作用であることが示唆された。石渡も子宮体癌株を用いて同様な報告をしているが¹¹⁾、性ステロイドは生理的濃度よりかなりな高濃度となると cytotoxicity を示すと考えられる。

総 括

我々が樹立したヒト卵巣類内膜癌由来の OVK 18株の樹立経過及びその性状について報告した。とくに本細胞株は 11番染色体に 1 番の染色体が転座した marker 染色体を有し、その点でも利用価

値は高いと言える。

文 献

1. 石渡 勇：ヒト子宮体内膜腺癌細胞株の樹立とその性状—増殖と形態学的変化に及ぼす性ステロイドホルモンの影響について—。日産婦誌，29：1002，1977。
2. 難波正義，木本哲夫：ヒト正常細胞（線維芽細胞および上皮細胞）の培養法，免疫実験操作法 V，1151，日本免疫学会，金沢，1975。
3. 大星章一：培養人癌細胞の同定，人癌細胞の培養（大星章一ら編），98，朝倉書店，東京，1975。
4. Atkin, N.B. and Baker, M.C.: Chromosome abnormalities as primary events in human malignant disease: Evidence from marker chromosomes. J. Nat. Cancer Inst., 36: 539, 1966.
5. Disaia, J.P., Morrow, M., Kanabus, J., Piechal, W. and Townsend, D.E.: Two new tissue culture lines from ovarian cancer. Gynecol. Oncol., 3: 215, 1975.
6. Fracarro, M., Mannini, A., Tiepolo, L. and Zara, Z.: High frequencies of spontaneous recurrent chromosome breakage in an untreated human tumor. Mutation Res., 2: 554, 1965.
7. Fischer, P., Golob, E. and Holzner, J.H.: Chromosomenzahl und DNS-Wert bei malignen Tumoren des weiblichen Genitaltraktes. Z. Krebsforsch., 68: 200, 1966.
8. Freedman, R.S., Pihl, E., Kusyk, C., Gallager, H.S. and Rutledge, F.: Characterization of an ovarian carcinoma cell line. Cancer, 42: 2352, 1978.
9. Grouchy, J. and Turleau, C.: Chromosome 11, In clinical atlas of human chromosomes, 108. Wiley Medical, New York, 1977.
10. Koller, P.C.: The role of chromosomes in cancer biology. In recent results in cancer research, 38. Springer-Verlag, Berlin, 1972.
11. Lieberman, I. and Ove, P.: Enzyme activity levels in mammalian cell cultures. J. Biol. Chem., 233: 634, 1958.
12. Makino, S., Sasaki, M.S. and Tonomura, A.: Cytological studies of tumors. XL. Chromosome studies in fifty-two human tumors. J. Nat. Cancer Inst., 32: 741, 1964.
13. Morrow, P.C.: Tumors of the ovary, In Synopsis of gynecologic oncology, 2nd ed., 210. Wiley Medical, New York, 1981.
14. Sandberg, A.A. and Hossefeld, D.K.: Chromosomal abnormalities in human neoplasia. Ann. Rev. Med., 21: 379, 1970.
15. Wakoning-Vaartaja, R. and Hughes, D.T.:

Chromosome studies in 36 gynaecological
tumours: of the cervix, corpus uteri, ovary,

vagina and vulva. Europ. J. Cancer, 3: 263,
1967.

(No. 5105 昭57・6・9 受付)