

子宮体部明細胞癌培養株 (TMCC-2) の樹立とその性状

東京医科大学産婦人科学教室

*東京医科大学血清学教室

**佐々木研究所付属杏雲堂病院婦人科

岩渕 浩之 永田 順子 作永 穂高** 坂本 優
岡部 一裕 奴田原裕一 佐藤 博己 根岸 能之
鈴田 達男* 杉田 道夫** 杉下 匡** 天神 美夫**

Establishment and Characterization of Endometrial Clear Cell Carcinoma Cell Line (TMCC-2)

Hiroshi IWABUCHI, Junko NAGATA, Hodaka SAKUNAGA**,

Masaru SAKAMOTO, Kazuhiro OKABE, Yuuichi NUTAHARA,

Hiromi SATOU, Yoshiyuki NEGISHI, Tatsuo SUZUTA*,

Michio SUGITA**, Tadashi SUGISHITA** and Yoshio TENJIN**

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College, Tokyo

**Department of Immunology and Serology, Tokyo Medical College, Tokyo*

***Department of Gynecology, Sasaki Inst., Kyoundo Hospital, Tokyo*

概要 子宮体癌における明細胞癌は頻度は低いが、臨床的に予後不良のことが多く、早期診断、治療の確立が望まれている。今回筆者らは、子宮体部明細胞癌培養細胞株の樹立に成功し、その細胞生物学的特性について検討した。

培養材料は子宮体部癌患者の手術標本を用い、細胞分散法による初代培養後、cloningすることなく株化に成功した。現在までに40回の継代に成功している。単層培養細胞は多稜形で細胞質内空胞を有し、2～3個の核小体を認め、容易にpile-upし、PAS染色、Diastase-PAS染色による観察で細胞質内にグリコーゲンの存在が示唆された。倍加時間は24時間、細胞密度は 1.8×10^5 個/cm²、コロニー形成率は23%であった。DNA indexは1.03で低2倍体領域にモードを示した。また、腫瘍マーカーについてはTPA, CA125, CA19-9の産生を認めた。更にヌードマウスへ移植可能であり、移植腫瘍は原腫瘍に極めて類似した組織像を呈した。

HLA typingにおいては、class I抗原の発現を認めたが、class II抗原については検出されずframeworkも検出されなかつた。MTT assayを用いた制癌剤感受性試験ではmethotrexate, vincristineに感受性を認めた。新樹立株TMCC-2は、子宮体部明細胞癌の細胞生物学的研究並びに治療法の基礎においても今後多剤併用、in vivoでの有用性を含めた検討を加えるうえで極めて有用であると考えられる。

Synopsis A new cell line, designated TMCC-2, has been established from operation material from a woman with endometrial clear cell carcinoma. TMCC-2 was successively subcultured 40 times in about 1 year. The monolayer culture cell showed a pavement-like arrangement of polygonal and short spindle-shaped cells, and had a tendency to pile-up without contact inhibition. Since PAS positive and Alcian-Blue negative substance could be seen in the cytoplasm, the cells were found to produce glycogen. The population doubling time, the saturation density and plating efficiency of the 25th passage cells were 24 hours, 1.8×10^5 and 23%, respectively. The nuclear DNA histogram obtained by flow cytometry showed two peaks at 2.1C and 4.1C. Therefore, the DNA index was 1.05. A tumor maker assay of the culture medium revealed significantly high values for TPA, CA125, CA19-9, and SLX compared with the control medium. The TMCC-2 cells produced the tumors in nude mice after subcutaneous transplation. In addition, the histological findings were similar to those in the original tumor. As mentioned above, the TMCC-2 cell line derived from endometrial clear cell carcinoma will be very valuable in basic research on clear cell carcinoma of the endometrium.

Key words: Cell line • Endometrial clear cell carcinoma • MTT assay • HLA class II antigen

緒 言

1973年 Silverberg et al.¹⁰⁾により定義された子宮体部明細胞癌の頻度は極めて低いが、臨床的に予後不良のことが多く⁷⁾、早期診断・治療の確立が望まれている。そこで子宮体部明細胞癌の基礎的並びに臨床的研究を推進させるために、同培養株の樹立が望まれているが、文献的にその報告は少ない¹⁾。今回筆者らは、TPA, CA125産生能を有する子宮体部明細胞癌由来の培養細胞株を新たに樹立したので、その経過と種々の細胞生化学的並びに免疫学的特性について報告する。

研究方法

1. 培養材料及び培養方法

1) 培養材料

子宮体癌 Ib の診断のもとに、広汎子宮全摘術を行った42歳の既婚婦人（0回経妊・0回経産）の手術標本より無菌的に採取し、dispace処理後、重層比重遠心法にて腫瘍細胞を分離し、1989年3月23日初代培養を行い、現在40代目を継代している。

2) 培養方法

分離した腫瘍細胞を10%FCS 加 RPMI1640培養液中に再浮遊させ、25cm²の plastic flask に移し、37℃、5%CO₂ incubator 内で静置培養した。継代は全量の培養液を除去した後、0.05% trypsin, 0.02%EDTA 溶液で細胞を剥離させ、1:32又は1:64split で7~14日ごとに行つた。

2. 培養細胞の形態学的観察

1) 光学顕微鏡による検索

位相差顕微鏡で観察するとともに Papanicolaou, PAS 及び Diastase-PAS 染色（以下 D-PAS と記す）を行つた。

2) 透過型電子顕微鏡による検索

単層培養細胞を、0.1M pH 7.4PBS にて洗浄後 2.5%glutar aldehyde にて1時間固定し、更に前述の PBS にて再度洗浄し、1%osmium を用いて、二重固定し epon 包埋し硬化させた後 plastic dish から剥離し、dish 底面に平行な培養細胞の超薄切片を作成し観察を行つた。

3. 培養細胞の細胞生物学的検索

1) 増殖曲線 (Growth Curve; 以下 G.C. と略す)、倍加時間 (Doubling Time; 以下 D.T. と略す)、細胞密度 (Saturation Density; 以下 S.D. と略す)

継代25代目の細胞を使用し、直径3.5cmの plastic dish に 1.0×10^5 個/2ml の細胞を植え込み、37℃、5%CO₂ incubator 内で培養し、経日的に triplicate で算定して、G.C. を作成し、これより D.T. 及び S.D. を算出した。

2) colony 形成率 (Plating Efficiency)

1)と同じ継代数の細胞を使用し、500個の単個細胞を6cm plastic dish 20枚に植え込み、培養7日目に固定して Giemsa 染色を行い肉眼的に確認しうるコロニー数を平均し、植え込み細胞数との比で示した。

3) 染色体分析

継代29代目の細胞を使用し、培養細胞に最終濃度 $0.04 \mu\text{g/ml}$ の colcemid を5時間作用させ、 0.075M KCl 溶液で15分間低張処理を行い、3:1 メタノール・酢酸で固定後 Giemsa 染色して、20細胞のカウントにより染色体分布を作成した。karyotyping は、尿素法の G-banding により行つた。

4) 核 DNA 量の測定

継代14代目の細胞を使用し、dispace 処理で得られた浮遊単個細胞をエタノールで固定し、 1mg/ml の RNase 及び $50 \mu\text{g/ml}$ の Propidium Iodide にて室温下で20分間処理し、flow cytometry により測定した。なお正常ヒトリンパ球を diploid control として比較測定した。

4. 培養細胞の異種移植能の検索

1.0×10^8 個の培養細胞をヌードマウス (BALB/c (nu/nu)) の背部皮下に接種した。形成された腫瘤を6週後に摘出し、光学顕微鏡による形態学的検索を行つた。

5. 培養上清中の腫瘍マーカーの検索

継代6代目及び14代目の細胞を使用した。 1.0×10^6 個の細胞を37℃、5%CO₂ incubator で24時間培養後の培養上清を採取し CA125, CA19-9,

CEA, AFP, SLX の測定は RIA ビーズ固相法で行い, TPA, Ferritin, β_2 -microglobulin, hCG- β , SP₁ は RIA 2 抗体法で測定した。

6. HLA typing

継代33代目の細胞を使用し HLA typing を行った。

1) HLA typing は, HLA-A, -B, -C 及び-DR に対して米国 NIH の定めた microcytotoxicity test により行った。

2) class I・class II 抗原の framework は, それぞれ抗 HLA-A, -B, -C (W/6/32) 並びに抗 HLA-DR, 抗 HLA-DQ, 抗 HLA-DP モノクローナル抗体を用いて, 間接モノクローナル抗体ロゼット法 (IMAR) により検索した。

7. 抗癌剤感受性試験

継代29代目の細胞を用い TMCC-2における撒き込み細胞数と吸光度の相関, 4 日間培養における至適撒き込み細胞数の検討を行った後, PEP, CDDP, MMC, DOX, VCR, VP-16, 5-FU, CPA, MTX の 9 種について, MTT assay 法⁵⁾⁸⁾により感受性の検討を行った。最高血中濃度 (以下 PPC と記す) の 1/10 濃度が抗癌剤の細胞内濃度に近いとの報告から⁴⁾, 我々は PPC の 1/10 濃度において, drug free control と比較し 50% 以上の吸光度減少 (増殖抑制) を示すものを感受性ありと判断した。

成 績

1. 原腫瘍の組織像

摘出子宮の体部腫瘍の組織像 (写真 1a) は, 明細胞様の円柱細胞の管状・乳頭状の増殖を示す中等度分化型の腺癌であり, 胞体が明るく核の多形性の著しい明細胞巣は全腫瘍の 30% を占めている。また, PAS 及び D-PAS 染色 (写真 1b, 1c) により細胞質内にグリコーゲン産生能を認めた。

2. 培養経過

1989年 3 月初代培養を行い, 上皮性細胞の増殖が観察され, 1 カ月後に初めて継代した。この時点で fibroblast はほとんど脱落し, cloning を行うことなく株化に成功し, 本株を TMCC-2 と命名し, 1990年 3 月現在 40 代目を継代している。

3. 培養細胞の形態

1) 位相差顕微鏡による観察では, 多稜形で細胞質内空胞を有する細胞が敷石状に配列し, contact inhibition を起こさず, 容易に pile-up する傾向を示した。Papanicolaou 染色では (写真 2a), 細胞質は light green を呈し, 核の多形性が強く 3 ~ 4 個の著明な核小体が認められた。PAS 染色では, 細胞質内に陽性顆粒を認め, diastase で消化されることから細胞質内にグリコーゲンを有している可能性が示唆された (写真 2b, 2c)。

2) 透過型電子顕微鏡による観察では, デスモゾーム結合を有し上皮起源であることが示唆された。また, 一部細胞間隙が拡大した部分をみることのできる。細胞質は豊富で粗面小胞体, ミトコ

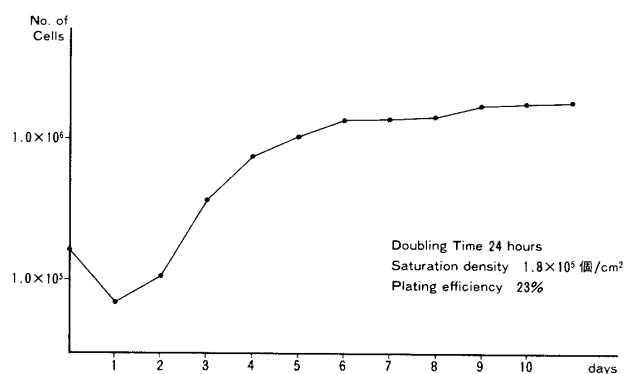


図1 TMCC-2 (継代25代目) の増殖曲線。培養 2 日目より対数増殖を示し, 約 7 日間ではほぼ定常期に至った。

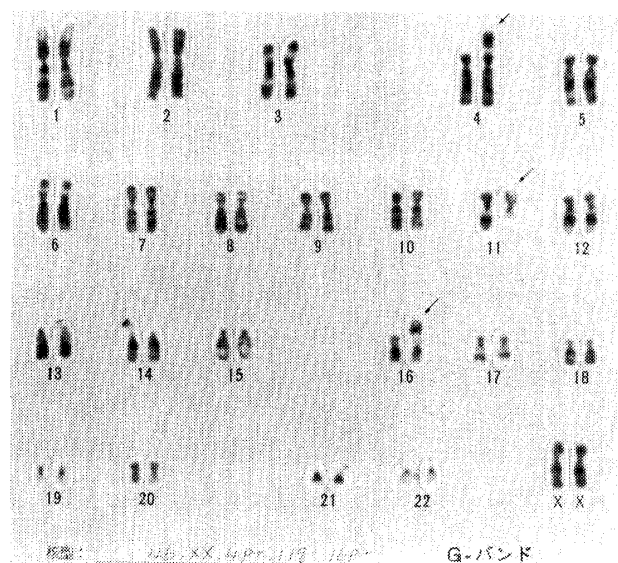


図2 G-banding による染色体分析

ンドリア等細胞内小器官が発達しており、豊富な細胞質内にはグリコーゲン顆粒が確認され、核内には数個の著明な核小体を認めた（写真3）。

4. 培養細胞の細胞生物学的特性

1) 増殖曲線 (G.C.), 倍加時間 (D.T.), 細胞密

度 (S.D.) (図1)

細胞数は、2日目より対数的増殖を示し8日目定常期に移行した。このG.C.よりD.T.を算出すると25代目で24時間、S.D.は 1.8×10^5 個/cm²、コロニー形成率は23%であった。

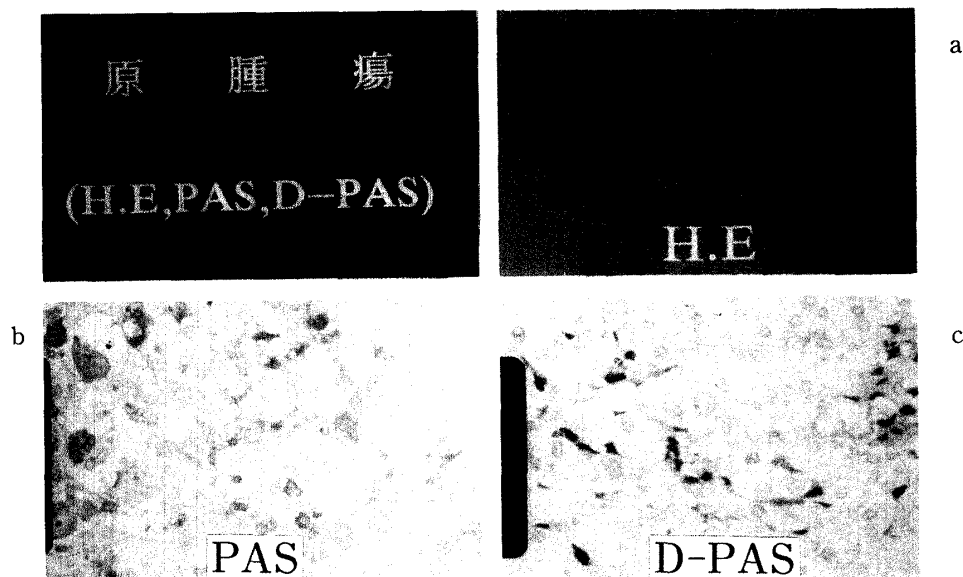


写真1 原腫瘍組織所見 (H.E, PAS, D-PAS 染色×400)。H.E 染色では (a), 胞体が明るく核の多形性に富む明細胞巢の管状、乳頭状の増殖を認める。また、細胞質内に PAS 陽性顆粒を認め (b), diastase により容易に消化されることから (c) グリコーゲンの存在が示唆される。

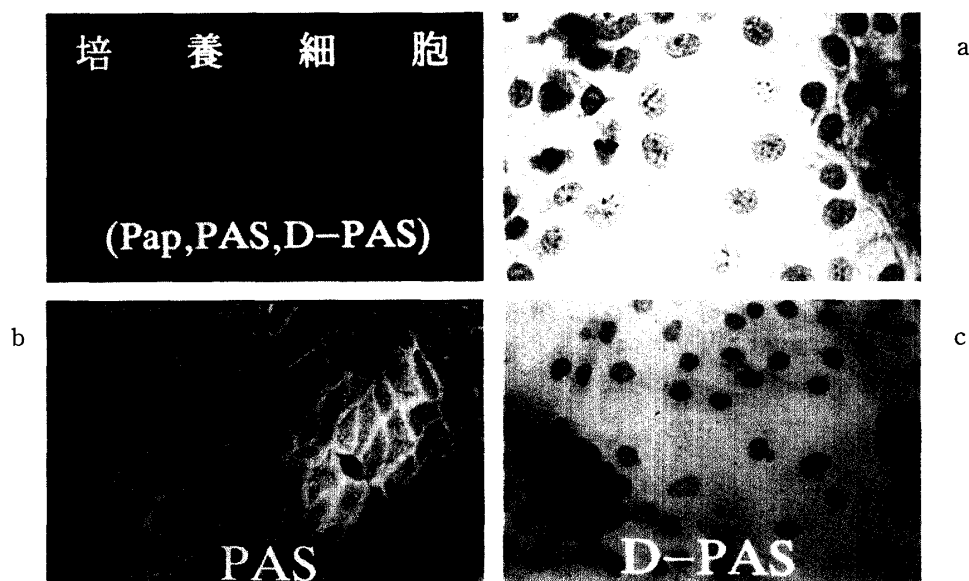


写真2 培養細胞所見 (Pap, PAS, D-PAS 染色, ×400)。培養細胞は (a) 多稜形で細胞質内空胞を有し、敷石状に配列し、容易に pile-up する傾向を示す。細胞質内に PAS 陽性顆粒を認め (b), diastase により容易に消化されることから (c) グリコーゲンの存在が示唆される。

2) 染色体分析

染色体数は2倍体にモードを示し、頻度は低いが4倍体の細胞を認めた。karyotypingの結果、すべての細胞に異常が認められ、核型は一致しないが共通の異常として4p+を認め、11q-, 16p+も多く認められた(図2)。

3) 核DNA量の定量

DNA ヒストグラムは対照ヒト末梢リンパ球では単峰性の2C ピーク (CV 値3.75%) を示したのに対し、本細胞は2.1C と4.1C にピークを有する二峰性ヒストグラム(図3)が得られ、前者の CV 値は5.47%であつた。したがって、DNA index は1.03であつた。DNA 解析の結果はG₀~G₁期51.40%, S 期24.51%, G₂~M 期24.09%であつ

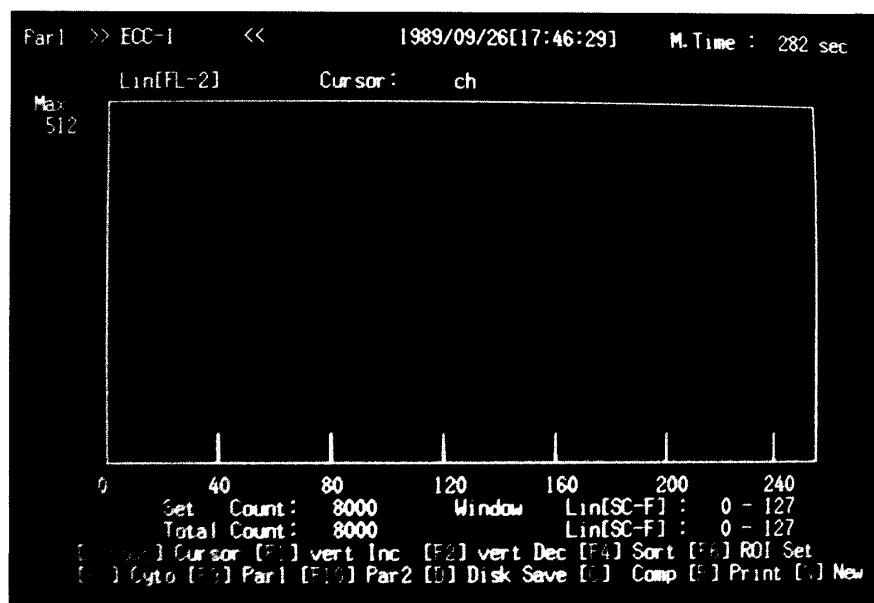


図3 TMCC-2(継代14代目)のDNA ヒストグラム。2.1C と4.1C にピークを示す二峰性のヒストグラムを示した。DNA index は1.03を示した。

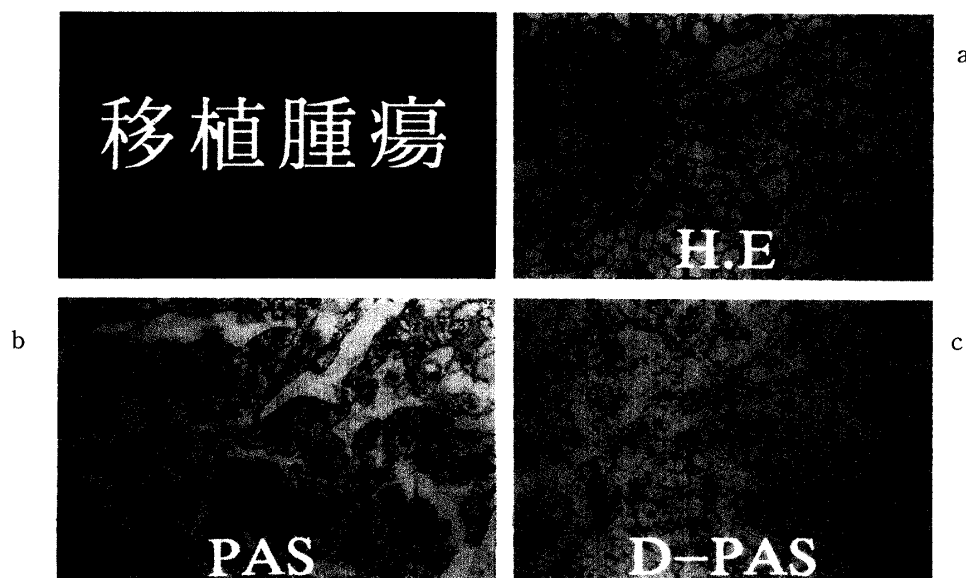


写真3 異種移植腫瘍組織像 (H.E, PAS, D-PAS 染色, $\times 400$)。原腫瘍に極めて類似した組織像を示し (a), PAS, D-PAS 染色においても同様にグリコーゲンの産生が示唆された (b, c)。



写真4 透過型電子顕微鏡像(×1,800)。豊富な細胞質内にグリコーゲン顆粒の存在を認める。

た。

5. 培養細胞の異種移植能の検索

ヌードマウスに移植可能で、形成された腫瘍組織のH.E染色では(写真4a)、原腫瘍の明細胞巣に極めて類似した明細胞癌の像を呈した。PAS染色、D-PAS染色(写真4b, 4c)によっても原腫瘍同様細胞質内のグリコーゲン陽性像を認めた。原腫瘍と移植腫瘍の組織学的類似性より当培養細胞株を子宮体部明細胞癌培養株と同定し、TMCC-2と命名した。

6. 培養上清中の腫瘍マーカーの検索

表1は培養上清中の腫瘍マーカー産生能をみたものである。対照培地と比較して、継代6及び14代目の上清は、ともにTPA, CA125が高値を示した。継代経過においてCA19-9の産生を認めるようになり、継代14代目の検索ではSLXの産生を確認できたが、AFP, Ferritin, CEA, β_2 -microglobulin, hCG- β , SP₁は検出されなかった。

7. HLA typing

HLA typingはA33, B5, B7, B35, B44が陽性で、class I抗原のframeworkも検出された。class II(DR)抗原は検索した限りでは同定不能で、そのframeworkもDR, DP, DQすべて陰性を示した。

8. 制癌剤感受性試験

9種の制癌剤の96時間のcontinuous exposureによるIC₅₀(薬剤非投与時のコントロールの50%以上の吸光度減少、すなわち増殖抑制を示す薬剤

表1 培養上清中の腫瘍マーカー産生能

tumor maker	unit	cont. medium	TMCC-2#6	TMCC-2#14
AFP	ng/ml	<1.0	<1.0	N.T.
CEA	ng/ml	<0.5	<0.5	N.T.
SLX	U/ml	7.7	N.T.	56.2
hCG- β	ng/ml	<0.10	<0.10	N.T.
SP ₁	ng/ml	<4.0	<4.0	N.T.
CA125	U/ml	<8.0	78	500
CA19-9	U/ml	<6.0	<6.0	83
β -MG	μ g/ml	<0.2	<0.2	N.T.
Ferritin	ng/ml	<2.0	4.0	N.T.
TPA	U/l	<25	1,400	1,602

N.T.; Not Tested

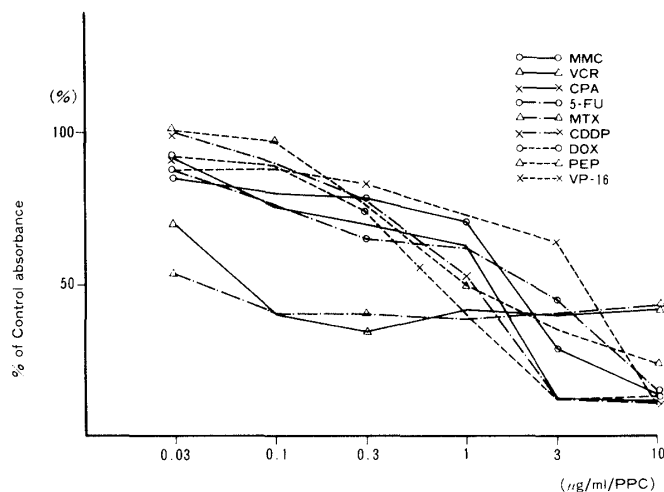


図4 MTT assayによる9種制癌剤のTMCC-2に対する効果

濃度)並びにIC₅₀/PPC(最高血中濃度)比⁵⁾を求め(図4), IC₅₀/PPCが0.1以下を示すVCR, MTXについて感受性ありと判断した。

考 案

1. 培養細胞の同定と由来

子宮体部明細胞癌患者の手術標本より樹立した培養細胞株TMCC-2が、子宮体部明細胞癌由来であるとする根拠は次の通りである。まず、本細胞が腫瘍細胞であることの証明として以下の点が挙げられる。1) 本細胞の形態は、大小不同性があり、核の多形性に富み、2～3個の著明な核小体が認められた。2) 本株化細胞が1年以上にわたり、contact inhibitionをおこすことなく増殖し、しかも容易にpile-upする。3) 本細胞の染色体数は異数性に分布し、低2倍体領域にモードを有した。

核 DNA ヒストグラムでも、G₁ピーク (CV 値 5.47%) の位置より DNA index は 1.03 を示し、染色体分析の結果と一致した。4) ノードマウスへの異種移植能を有している。

更に、体部明細胞癌由来であるとする根拠として以下の点が挙げられる。1) 原腫瘍は腺癌と明細胞巢の混在を示したが、明細胞巢は胞体が明るく 2~3 個の核小体を有し、核の多形性に富み、PAS 染色、D-PAS 染色にて細胞質内にグリコーゲンの存在が示唆された体部明細胞癌であつた。2) 本株化細胞と原腫瘍の明細胞巢との観察においてその核型に類似性を示し、細胞質内にグリコーゲンの存在を示唆することも類似していた。3) 本株化細胞をノードマウスに移植して得られた腫瘍組織はその組織学的構築が原腫瘍の明細胞巢に極めて類似しており、細胞質内に同様のグリコーゲン産生を示唆する所見を認めた。

2. 制癌剤感受性試験の検討

仲沢ら³⁾は卵巣の明細胞癌培養株を用いた MTT assay において ADR 誘導体、5-FU に感受性を認めたと報告している。また、北山ら²⁾は子宮体部明細胞癌再発症例 (癌性腹膜炎) に対して CDDP の腹腔内投与を併用した多剤併用療法 (CAP 療法) が臨床的に有効であつたと報告しているが、一般的に子宮体部明細胞癌は治療抵抗性であり有効薬剤、至適投与法の選択は困難である。MTX は葉酸代謝阻害により抗腫瘍活性を示し細胞周期において合成期にある細胞に作用し S-phase block を呈する。更に MTX が時間依存性の抗腫瘍効果を示すことから、96 時間の continuous exposure が抗腫瘍効果を修飾している可能性もあり、この点を考慮せずに in vitro の結果をもつて MTX が子宮体部明細胞癌治療に有効な薬剤と判断することは困難であるため、今後ノードマウス移植腫瘍を用いた in vivo における有効性を検討したい。VCR についても有糸分裂の中期に作用し中期以後の分類を停止させるが、この場合紡錘糸の前駆体と結合して分裂阻止作用を示すとともに、DNA 依存性の RNA ポリメラーゼに作用して RNA 合成を阻害するといわれている。また、VCR も時間依存性の制癌剤であり、MTX

の場合と同様抗腫瘍活性と細胞周期、暴露時間についての検討が必要である。

3. HLA 抗原の発現について

Siamak et al.⁹⁾は正常子宮内膜には HLA-DR 抗原の発現を認めるが、HLA-DP、-DQ 抗原の発現が乏しいことを報告し、interferon を用いた in vitro における発現誘導の結果からその差は各抗原の発現様式における cytokine の関わりの差に由来するのではないかと考察している。一方悪性腫瘍については melanoma、白血病、膀胱癌の一部に HLA-DR の発現を認めるものの、多くの細胞株では消失していることが多い。田中ら⁶⁾は、正常子宮内膜及び高分化型子宮内膜腺癌に HLA-DR の発現を認め、低分化型子宮内膜腺癌には認めなかつたことから組織分化度と class II 抗原発現との関連性を指摘しており、我々の得た成績もこれに一致している。しかし、今回の結果が G-banding による染色体分析のみでは確認しえない HLA 抗原の遺伝子座の部分欠損や、点変異に由来するののか、遺伝情報の転写、発現レベルでの抑制であるのかについては、今後 blotting, PCR を用いた DNA, RNA、遺伝子産物の検討及び cytokine による分化誘導による検討が必要と考えられる。

結 語

子宮体部明細胞癌患者の手術標本より重層比重遠心法で分離した腫瘍細胞を培養し cloning することなくヒト子宮体部明細胞癌培養株 (TMCC-2) を樹立した。本細胞は初代培養後 1 年を経過した現在でも安定した増殖力を示している。以上、TPA, CA125, CA19-9 の産生能を有する子宮体部明細胞培養癌株 (TMCC-2) の樹立について報告した。当細胞株は子宮体部腫瘍において稀な明細胞癌株であるとともに、制癌剤感受性試験についても今後多剤併用, in vivo での有用性を含めた検討を加え、子宮体部明細胞癌のモデルとなると考えられる。

文 献

1. 片岡明生, 薬師寺道明, 神代正道: 子宮体部腺癌培養細胞株 (KCC-1a, 1b) の樹立と性状. 第 6 回ヒト細胞研究会抄録集, 33, 1988.

2. 北山俊也, 岩橋 都, 岩橋正明, 矢本希夫, 仲野良介: CDDP を含む多剤併用療法が著効を示した子宮体癌 (Clear Cell Adeno carcinoma) 再発例. 癌と化療, 16: 2099, 1989.
3. 仲沢経夫, 楊箒岳人, 平原史樹, 五来逸雄, 水口弘司: ヒト卵巣 clear cell carcinoma 細胞株の樹立とその性状. 日産婦誌, 42: S-432, 1990.
4. 西条長宏, 星昭夫: Human Tumor clonogenic-cell assay (HTCA) を中心とした抗癌剤感受性テストの理論および臨床効果との相関. Med. Postgraduates, 22: 19, 1984.
5. 作永穂高, 坂本 優, 原 譲, 佐藤博己, 島 峰雄, 根岸能之, 秋谷 清: MTT assay による抗癌剤感受性試験. Oncol. Chemotherapy, 4: 456, 1988.
6. 田中耕平, 樋口正臣, 半藤 保, 吉谷徳夫, 安達茂実, 田中邦男, 本間 滋, 藻谷直樹, 金沢浩二, 本多達雄, 竹内正七: 分化度の異なる子宮内膜癌細胞株の樹立—HLA 抗原と組織分化度—. 日産婦誌, 38: 1975, 1986.
7. Gilbert, A.W. and Michel, D.L.: Clear cell carcinoma of the endometrium. Am. J. Obstet. Gynecol., 156: 1486, 1987.
8. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods, 65: 55, 1983.
9. Siamak, S.T. and Pondichery, G.S.: Differential expression of HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ antigenic determination of the major histocompatibility complex in human endometrium. Am. J. Reprod. Immunol. Microb., 18: 124, 1988.
10. Silverberg, S.G. and DeGiogi, L.S.: Clear cell carcinoma of the endometrium. Cancer, 29: 1127, 1973.

(No. 6981 平3・4・22受付)