

同一ヒト子宮頸部腺癌病巣より樹立した2種の細胞株の 細胞生物学的特性, 各種抗癌剤に対する感受性ならびに 増殖能に及ぼすホルモンの影響について

富山医科薬科大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 泉 陸一教授)

伏 木 弘

Characterization of Two Novel Cell Lines Established from a Single Human Uterine Cervical Adenocarcinoma, and their Chemosensitivities and Hormonal Effects on their Proliferation

Hiroshi FUSHIKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,

Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama

(Director: Prof. Rikuichi Izumi)

概要 子宮頸部腺癌に対する有効な抗癌化学療法の regimen の開発と根治手術後患者へのホルモン補充療法の可否を明らかにすることを目的として, 著者は新たに同一ヒト子宮頸部腺癌病巣より性格の異なる2種の培養細胞株を樹立し, それらを用いて各種抗癌剤感受性ならびにホルモンの細胞増殖能への影響について検討した。材料は, 子宮頸部腺癌 Ib 期の手術摘出腫瘍をヌードマウスに継代移植した腫瘍より採取されたものである。継代培養が可能となつた株は, 倍加時間が48時間と93時間の2株であり, 細胞形態, 染色体分析, 腫瘍マーカー産生能を異にし, それぞれ TCO-1, TCO-2 と命名した。現在まで46カ月を経過し TCO-1 は87代目, TCO-2 は74代目と安定した増殖をしている。これらはいずれも電子顕微鏡的に微絨毛, 分泌顆粒などより腺細胞由来であることが確認された。また両株をヌードマウスにもどし移植すると, 肉眼的に TCO-1 は充実部, TCO-2 は嚢胞部を主体とした腫瘍を形成するが, 組織形態学的に頸部原発腫瘍ならびにヌードマウス継代移植腫瘍と類似していた。この両株を用いて13種の抗癌剤について MTT assay による感受性試験を行つたところ, TCO-1 は mitomycin C (MMC), methotrexate に, TCO-2 は MMC, etoposide, carboquone に感受性を示した。この結果より諸種の点で腫瘍性格を異にする両株がともに MMC に対し感受性を示した。また増殖能への estradiol, progesterone など6種のホルモンの増殖能への影響について検討した結果, 両株はともに増殖能に明らかな変化を示さなかつた。以上より子宮頸部腺癌患者に対し MMC を含む抗癌化学療法が有効であり, 術後エストロゲン補充療法が禁忌ではないことが示唆された。

Synopsis Two new cell lines were established from a single human uterine cervical adenocarcinoma which had been successfully transplanted into nude mice. They were subcultivated more than 70 times over a period of 46 months and designated as TCO-1 and TCO-2, respectively. Growth characteristics, modes of chromosomes and specific tumor makers were different in TCO-1 and TCO-2. The plating efficiency of TCO-1 was greater and its doubling time was shorter than those of TCO-2. Modes of chromosomes were 77 in TCO-1 and 94 in TCO-2. Their chemosensitivities to 13 anticancer drugs were studied by MTT assay. Only the mitomycin C (MMC) was an effective agent for both TCO-1 and TCO-2 cell lines which were characteristically different from each other. The results suggest that MMC would be a promising agent for chemotherapy of human uterine cervical adenocarcinoma. The influences of 6 hormones (estradiol, progesterone, dihydrotestosterone, medroxyprogesterone acetate, human menopausal gonadotropin, human chorionic gonadotropin) on their proliferation were studied by MTT assay and dye exclusion assay. TCO-1 and TCO-2 showed no significant changes in proliferation in any of them. It is suggested that hormone replacement therapy could be indicated even for postoperative patients with cervical adenocarcinoma.

Key words: Cervical adenocarcinoma • Cell line • Chemosensitivity • Hormonal effect • Proliferation

緒 言

子宮頸癌における腺癌の頻度は扁平上皮癌に比し著しく低く、5%前後といわれているが、早期診断の困難性もあり臨床的に予後不良例が多く、有効な治療法の確立が求められている。また頸部腺癌は卵巣転移が多いといわれているため、閉経前でも両側付属器摘除を余儀なくされるが、術後ホルモン補充療法に関して検討した報告はない。したがって子宮頸部腺癌細胞株を樹立し、抗癌剤に対する感受性ならびに増殖能へのホルモンの影響を明らかにすることの意義はきわめて大きい。1952年に Gey et al. によつて報告された HeLa 細胞株⁹⁾以後、新たな子宮頸部腺癌細胞株の樹立は、著者の検索の限りでは OMC-4株¹³⁾、CAC-1株¹⁾、TMCC-1株⁴⁾の3株にすぎない。今回、著者は同一ヒト子宮頸部腺癌病巣より性格の異なる2種の細胞株を樹立し、それらを用いて各種抗癌剤に対する感受性を検討するとともに細胞増殖能へのホルモンの影響について検索を行つた。

研究材料ならびに方法

1. 培養材料および培養方法

1) 培養材料

34歳の子宮頸部内頸部型腺癌 Ib 期の患者より

1985年1月、広汎性子宮全摘術にて摘出した頸部原発病巣(図1a)をヌードマウス(BALB/c nu/nu)に継代移植した腫瘍(図1b)を材料とした。患者は術後全骨盤照射50.4Gy, cisplatin 200mg投与され、術後79カ月経過するが再発徴候なく健在である。

2) 培養方法と樹立

1987年10月、ヌードマウス継代移植11代目の腫瘍を細切し、トリプシン分散法により60mm径 plastic dish 6枚に分けて初代培養を開始した。培養条件は10%FCS加MEM中で、37°C、5%CO₂培養器で培養を行つた。

2. 細胞生物学的検索

1) 増殖曲線

生細胞を35mm径 plastic dish に各々 1×10^5 個/2ml を入れ、2日ごとに培地を交換し、経日的に各2枚ずつ dish の細胞数を算定した。

2) コロニー形成率

生細胞200個/4ml を、60mm径 plastic dish に入れ、2週間培養しギムザ染色後、肉眼でみえるコロニー数を求め算出した。

3) 形態学的検索

光学顕微鏡的には培養細胞を位相差顕微鏡で観

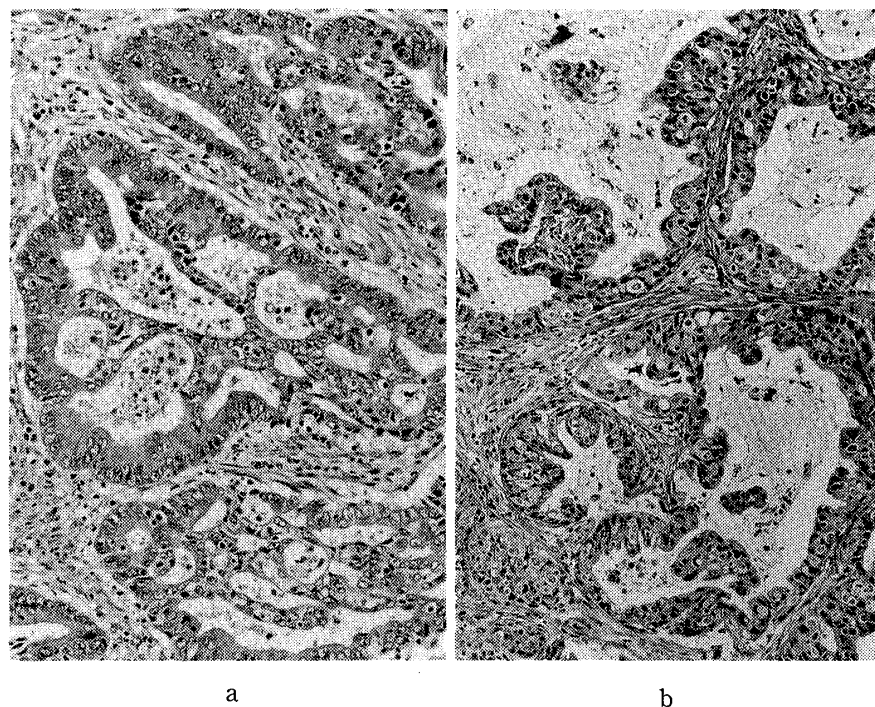


図1a 原腫瘍組織 (HE 染色) (×200)

図1b ヌードマウス継代移植腫瘍組織 (HE 染色) (×200)

察するとともにパパニコロー、PAS、アルシアンブルー染色を行つた。

電子顕微鏡的には培養細胞を対数増殖期に2%グルタルアルデヒドで前固定、2%四酸化オスミウムで後固定し、ゼラチンカプセルを用いてQuetal 812W包埋し透過型電顕にて観察した。

4) 染色体分析

TCO-1, TCO-2の細胞を対数増殖期に入つたところで、コルセミドを最終濃度0.1 μ g/ml加え、37 $^{\circ}$ C、4時間処理し、その後Gバンド染色を行つた。

5) フローサイトメトリー分析

Coulter Epicsを用い、TCO-1(28代目)、TCO-2(29代目)についてPI染色法による分析を行つた。

6) 異種移植腫瘍の検索

TCO-1, TCO-2の生細胞1 $\times 10^7$ 個を、ヌードマウスの皮下に移植し形成した腫瘍体積{長径 $\times$ (短径) $^2/2$ }を週1回測定して増殖能を検討した。またそれらを病理組織学的に、原腫瘍ならびにヌードマウス継代移植腫瘍と比較した。

7) 培養上清中の腫瘍マーカーの測定

TCO-1(28代目)、TCO-2(21代目)の細胞1 $\times 10^5$ 個/2mlを35mm径 plastic dishに入れ、定常期で5種の腫瘍マーカーを検討した。細胞培養前の培養液をコントロールとした。

8) ホルモンレセプターの検討

ヌードマウス継代移植腫瘍、TCO-1(79代目)、TCO-2(67代目)のestrogen receptor(ER)およびprogesterone receptor(PR)をEIA法により検討した。

3. 抗癌剤感受性試験の検討

感受性試験として酵素活性法の一つであるMTT assay⁵⁾¹⁰⁾すなわち、生細胞中のミトコンドリアにより活性化されたsuccinate-MTT reductaseが、黄色の塩である3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)を開裂させて、生じた紫色のMTT formazanを比色定量する原理を利用した方法を用いた。96穴平底マイクロプレートに1wellあたり1.0 $\times 10^4$ 個/135 μ lの細胞を入れ、下記の抗癌剤を目的濃度が得られるよう加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で96時間連続接触培養した。培養終了4時

間前に0.5%MTT溶液を、各wellに10 μ lずつ加えた。培養終了時上清を100 μ lずつ吸引排除しDimethylsulfoxideを150 μ lずつ加え、生成されたMTT formazanを溶解させ、scanning multiwell spectrophotometerを用いて540nmで吸光度を測定した。使用した薬剤はmitomycin C(MMC), actinomycin-D(ACT-D), bleomycin(BLM), adriamycin(ADM), thio-TEPA(TESPA), carboquone(CQ), ranimustine(MCNU), methotrexate(MTX), 5-fluorouracil(5-FU), etoposide(VP-16), vincristine(VCR), cisplatin(CDDP), (Glycolato-O,O') diammineplatinum(II)(254-S)の13種であつた。抗癌剤の濃度は臨床常用量経静脈投与時の最高血漿濃度(Peak Plasma Concentration: PPC)を1.0として0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0の6段階濃度とし、希釈に用いた生食のみのものをコントロールとした。以上のassayをTCO-1(46代目、77代目)とTCO-2(40代目、65代目)を用い、同一薬剤同一濃度につき3wellずつ行い、用量反応曲線を作成しIC₅₀値(コントロールの50%増殖抑制を示す薬剤濃度)を求めて判定した。

4. 増殖能へのホルモンの影響についての検討

5%dextran-coated charcoal(DCC)処理³⁾FCS加MEMによる培養下で、前記のMTT assayを用いてestradiol(E₂), progesterone(P), dihydrotestosterone(DHT), medroxyprogesterone acetate(MPA), human menopausal gonadotropin(HMG), human chorionic gonadotropin(HCG)添加による増殖能への影響を検討した。各種ホルモン濃度はE₂は10, 50, 100, 500, 1,000pg/ml, P, MPAは10, 50, 100, 500, 1,000ng/ml, DHTは1, 5, 10, 50, 100ng/ml, HMG, HCGは10, 50, 100, 500, 1,000mIU/mlとした。また35mm径 plastic dishに細胞を各々1 $\times 10^5$ 個/2ml入れ、2段階濃度で上記ホルモン添加後4, 8, 12日目の生細胞数をニグロシン色素排除法により算定し、ホルモンを添加しないコントロールと比較した。

成 績

1. 細胞株樹立

クローニングせずに継代したが、4カ月後から増殖速度が速い株と遅い株になりTCO-1, TCO-2

と命名した。その後それぞれ限界希釈法によるクローニングを行つたが、これら以外の亜株は分離できなかった。現在46カ月を経過し TCO-1は87代目、TCO-2は74代目である。

2. 細胞生物学的特性

1) 増殖曲線

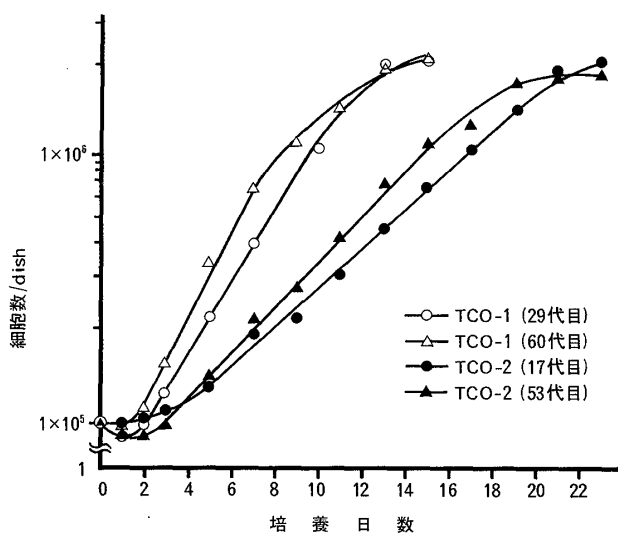


図2 細胞増殖曲線

図2に TCO-1, TCO-2の増殖曲線を示す。倍加時間は、それぞれ48時間、93時間であつた。

2) コロニー形成率

TCO-1 (29代目) が61.0%, TCO-2 (21代目) が9.3%であつた。

3) 形態学的検索

光学顕微鏡所見より TCO-1は紡錘形でシート状に増殖し、TCO-2は多角形で重積性に増殖し、コロニー形成する傾向が強い(図3)。ともにパパニコロー染色で細胞質は淡染し、細胞縁は不明瞭である。核は大小不同で一部に多核あるいは巨大核を呈し、明瞭な核小体を認めた。粘液染色は両株とも染まつた。

電子顕微鏡所見より TCO-1, TCO-2はともに楕円形や不整形の核をもち、核のクロマチンは辺縁に凝集し、著明な核小体が認められた。また細胞質内には豊富な粗面小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ装置がみられ、分泌顆粒も認められた。さらに細胞辺縁には多数の微絨毛がみられた(図4)。

4) 染色体分析

TCO-1, TCO-2はいずれも異数倍体領域に分布

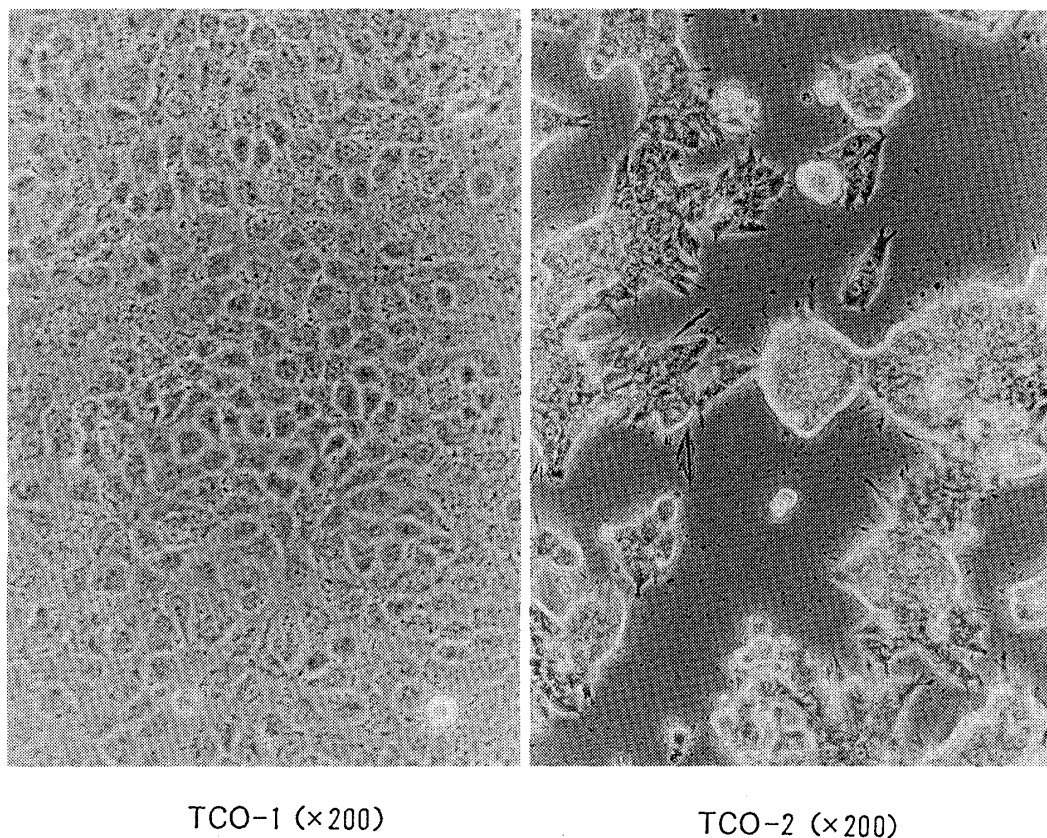
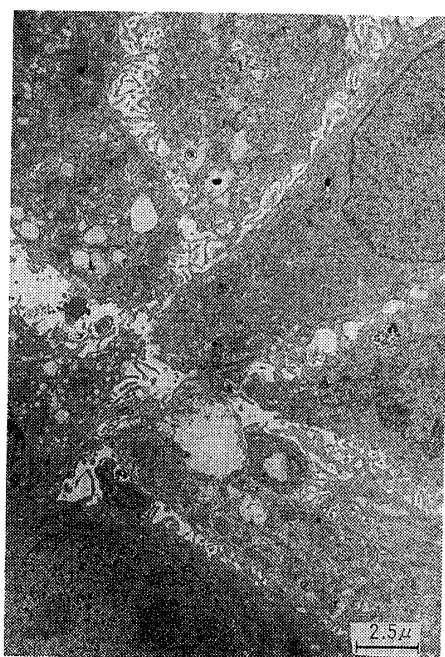


図3 単層培養細胞の位相差顕微鏡像



(×5,000)

図4 単層培養細胞の透過型電子顕微鏡像
TCO-2 (21代目)

しモードは TCO-1が77, TCO-2が94であつた, またともに複数のマーカー染色体が存在した (図5).

5) フローサイトメトリー分析

TCO-1の DNA Index は1.8で $G_0 \sim G_1$ 期は51.4%, S 期は29.6%, $G_2 \sim M$ 期は19.0%であり, TCO-2のそれらは2.0, 58.0%, 23.0%, 19.0%であつた.

6) 異種移植腫瘍所見

皮下移植された TCO-1, TCO-2の増殖曲線を示す (図6). 移植腫瘍の倍加時間はそれぞれ29日, 7日であり, 肉眼的に TCO-1は充実部, TCO-2は囊胞部主体の腫瘍を形成した. それらの組織所見は原発腫瘍組織と類似の内頸部型腺癌の像を示した.

7) 培養液上清中の腫瘍マーカー濃度

表1に定常期の TCO-1, TCO-2の細胞 10^6 個あたりの各種腫瘍マーカー濃度を示す. TCO-1ではCA125, TPA, SCC, CEA, TCO-2ではCA125,

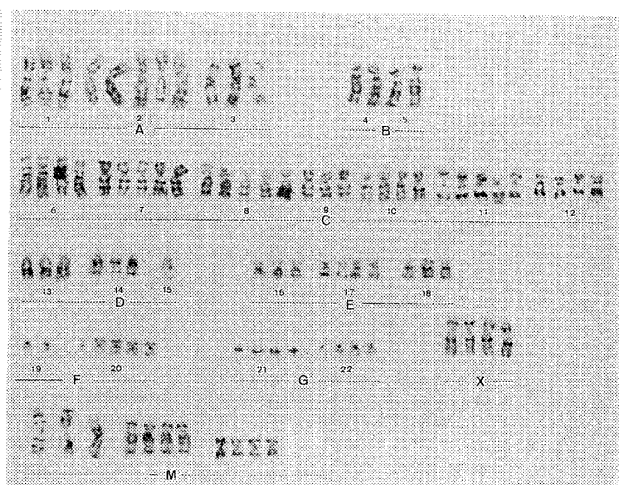
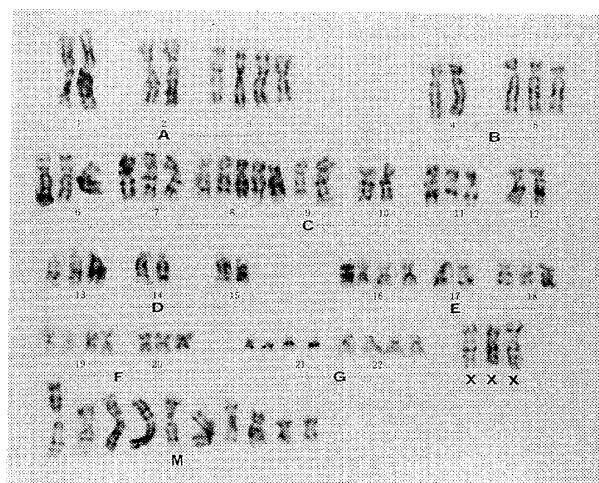
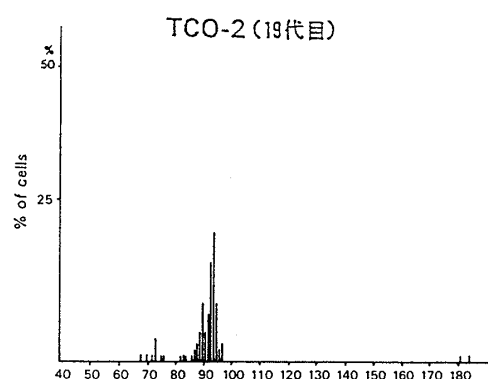
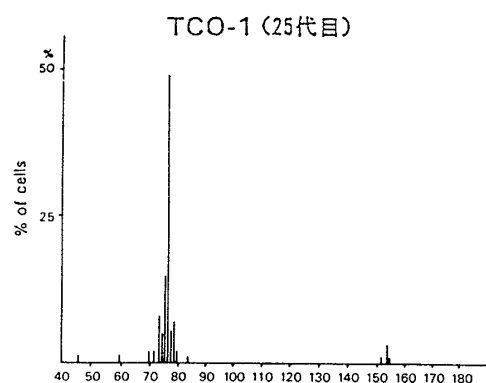


図5 染色体分析

表1 培養上清中の腫瘍マーカー濃度

腫瘍マーカー	TCO-1 (10 ⁶ Cells)	TCO-2 (10 ⁶ Cells)	コントロール	患者血清
CA125 (U/ml)	3,230.0	1,830.0	< 6.0	42.0
TPA (U/l)	2,300.0	21,110.0	<25.0	25.0
SCC (ng/ml)	240.0	0.9	0.3	1.9
CEA (ng/ml)	7.0	93.0	1.0	1.5
CA19-9 (U/ml)	10.0	10.0	<10.0	18.0

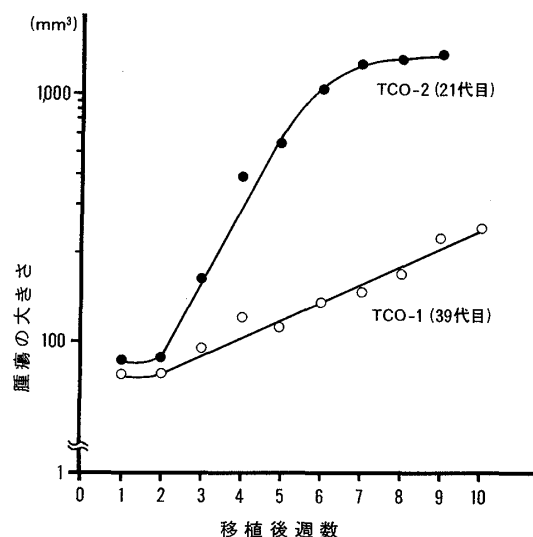


図6 ノードマウス皮下もどし移植腫瘍の増殖曲線

TPA, CEA がコントロールより著しく高値に検出された。

8) ホルモンレセプター

ヌードマウス継代移植腫瘍のER量は7.9 fmol/mgpであり, PR量は10.0fmol/mgp以下, TCO-1, TCO-2のER, PR量は2.0fmol/mgp以下であった。

3. 抗癌剤感受性試験

MTT assay より得られた TCO-1, TCO-2に対する各種抗癌剤の用量反応曲線を図7に示す。縦軸はコントロールの吸光度を100としたときの百分率を示し、横軸は抗癌剤濃度をPPC比で示したものである。抗癌剤感受性の判定はIC₅₀がPPCの1/10濃度以下を示すものを感受性ありとした。これよりTCO-1はMMC, MTXに、TCO-2はMMC, CQ, VP-16に感受性を示した(表2)。

4. 増殖能へのホルモンの影響

各種ホルモン添加によるMTT assayの成績を図8に示す。いずれの濃度においても明らかな増

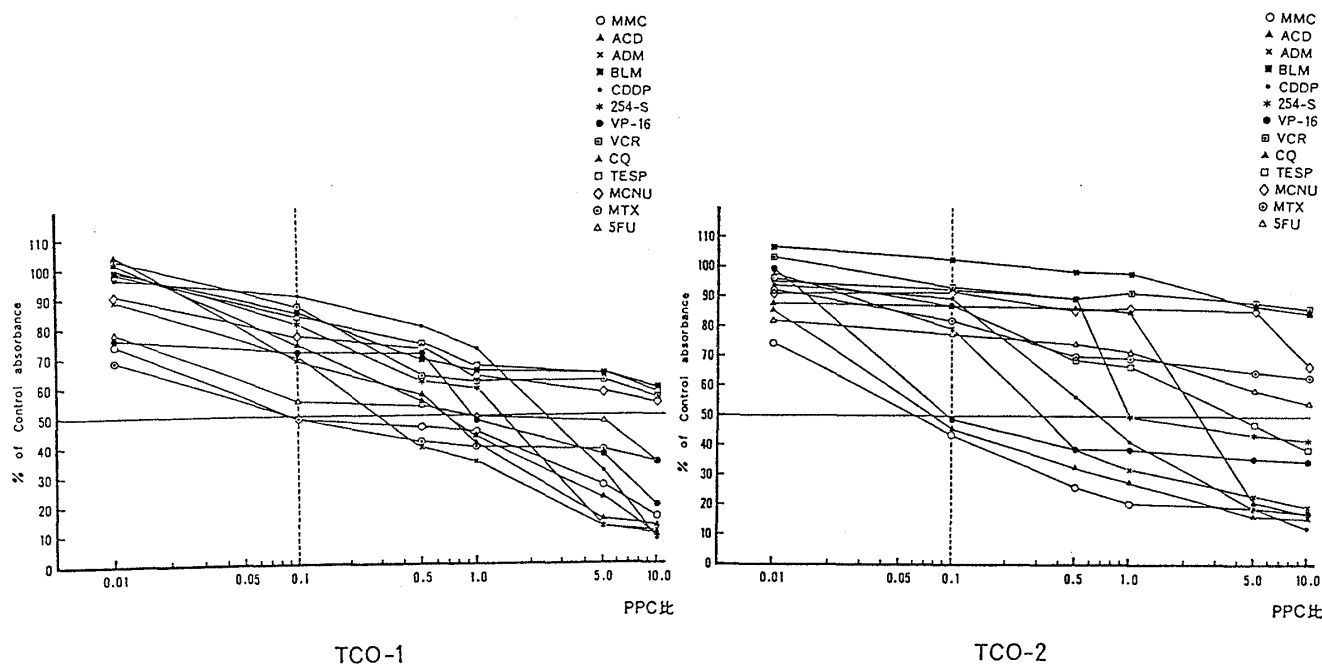
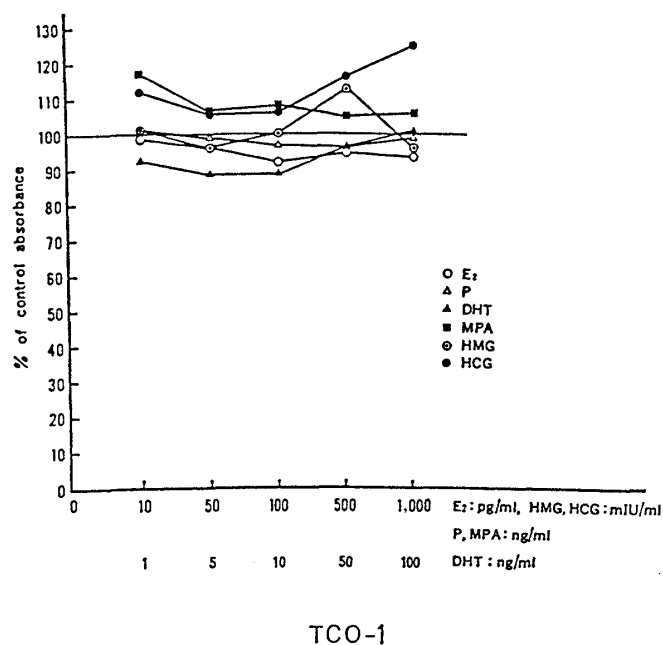
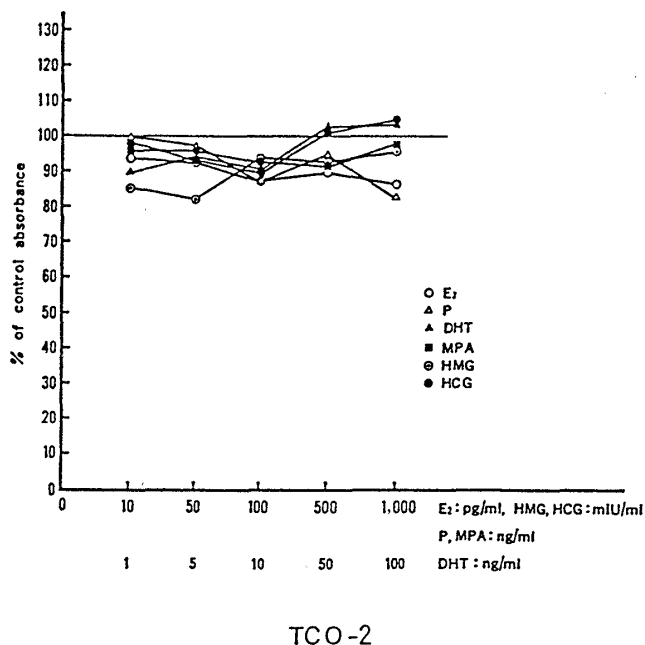


図7 各種抗癌剤の感受性 (MTT assay)



TCO-1



TCO-2

図8 増殖能に及ぼすホルモンの影響 (MTT assay)

表2 各種抗癌剤に対する IC₅₀

抗癌剤	PPC ($\mu\text{g/ml}$)	TCO-1	TCO-2
		IC ₅₀ (PPC比)	IC ₅₀ (PPC比)
MMC	1.0	0.09	0.06
ACD	0.5	0.58	1.14
ADM	0.4	0.28	0.34
BLM	2.0	>10.00	>10.00
CDDP	1.0	1.14	0.67
254-S	4.0	1.04	0.98
VP-16	4.0	0.98	0.09
VCR	0.01	>10.00	>10.00
CQ	0.1	0.58	0.08
TESP	0.5	>10.00	1.27
MCNU	2.0	>10.00	>10.00
MTX	3.0	0.09	>10.00
5-FU	10.0	0.96	>10.00

殖促進や抑制が認められなかつた。また色素排除法でも添加群とコントロールとの間に有意な差はなかつた。

考 案

今回樹立した子宮頸部内頸部型腺癌株 (TCO-1, TCO-2) は、いずれの細胞株も3年経過し70代以上継代してなお安定した増殖を保っている。TCO-1はTCO-2に比し培養細胞の増殖速度は速く、倍加時間が48時間とCAC-1¹⁾, TMCC-1⁴⁾に近く、TCO-2は93時間とOMC-4¹³⁾に近かつた。しか

しヌードマウスにもどし移植した腫瘍の増殖速度はTCO-1でむしろ遅くTCO-2で速かつた。これは移植後形成された腫瘍が肉眼的にTCO-1は充実部、TCO-2は嚢胞部主体でありTCO-2において粘液産生が著明であることによると考えられた。また染色体分析で、モードがTCO-1は77、TCO-2は94と異なっていた。さらに培養液中の腫瘍マーカー産生能については、CA125, TPAはともに高濃度を示したが、TCO-1ではSCCが、TCO-2ではCEAが高濃度に検出された。これよりTCO-1は形態学的には扁平上皮癌の像を示さないが、機能的にその性質を有していることが推測される。このように同じ個体の同じ腫瘍より樹立されたにもかかわらず、性状に明らかな差異が認められた。すなわち、これらの樹立株の母腫瘍である子宮頸部腺癌は、性質的には均一ではないと考えられる。同一腫瘍における異質性に関する研究は白血病に関して詳細に研究されており⁸⁾、腫瘍の進展過程で複数の異なる性質を持ったクローンが生じてくるとされている。固形腫瘍においても、腫瘍が増殖するに伴い異質ないくつかの細胞集団が出現してくる可能性が子宮体癌、直腸癌などで報告されている²⁾¹²⁾。そこで著者は、頸部腺癌由来の本細胞株を異質性に関してのモデルとして用い、臨床的に確立されていない抗癌化学療法やホルモン補充

療法についての基礎実験を行つた。その結果、抗癌剤感受性試験では TCO-1が MMC, MTX に、TCO-2が MMC, CQ, VP-16に感受性を示し、異質性が認められるにもかかわらず両株は MMC にともに感受性を示した。この成績は子宮頸部腺癌株で *in vitro* 感受性試験を行い MMC が有効であつたとの報告¹⁴⁾⁵⁾に一致している。だがこれらの研究では異質性についての検討はなされていない。なお両株の起源であるヌードマウス継代移植腫瘍を用いた *in vivo* での感受性試験でも MMC を含んだ regimen が有効であつたと報告されている⁹⁾。また増殖能に及ぼすホルモンの影響については、正常の子宮頸管腺細胞数の増減は E_2 の濃度の高低に相関すると報告されており⁷⁾、さらに頸癌や子宮体癌細胞において ER, PR の有無が、ホルモンの感受性に関与しなかつたと報告されている³⁾¹¹⁾ため、ER が低量であつても頸部腺癌患者の術後ホルモン補充療法は、遺残腫瘍細胞の増殖に影響を及ぼす危険性が充分にあると考えられる。しかし今回の基礎実験結果より、樹立した頸部腺癌細胞は用いたホルモンすなわち E_2 , P などによつても増殖能に有意な変化を示さなかつた。

以上のことより子宮頸部腺癌患者の治療に MMC を含む抗癌化学療法が有効であり、術後エストロゲン補充療法が禁忌ではないことが示唆された。しかしながらこの基礎的検討成績を臨床に適用するには、今後より多くの子宮頸部腺癌株の樹立とそれらを用いた検討が必要である。このような治験の集積が頸部腺癌の治療成績を大きく向上させるものと考えられる。

稿を終えるに臨み、御懇切なる御指導、御校閲を戴きました泉 陸一教授に深甚なる謝意を表するとともに、当学第一解剖学教室故松田健史教授、中谷壽男先生、同愛記念病院川端正清先生、富山県衛生研究所本田幸子氏、当産科婦人科学教室安川礼子氏他諸兄姉に心から感謝いたします。なお、本論文の要旨の一部は第37回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会学術講演会（1989年、福島）および第42回日本産科婦人科学会学術講演会（1990年、東京）にて発表した。

文 献

1. 早川 修, 工藤隆一, 小泉基生, 山内 修, 山本

- 裕之, 竹原正輝: ヒト子宮頸部腺癌培養細胞株 (CAC-1) の樹立とその性状および各種抗癌剤に対する感受性の検討. 札幌医誌, 57: 603, 1988.
2. 三沢芳夫: 同一患者より樹立した子宮内膜癌細胞株3種の細胞生物学的性状とその Heterogeneity に関する解析. 日産婦誌, 40: 1439, 1988.
3. 西田正人, 笠原国武, 金子 實, 岩崎寛和, 林 一雄: エストロゲン, プログステロンレセプターを持つヒト分化型子宮体内膜腺癌細胞株 (Ishikawa 株) の樹立. 日産婦誌, 37: 1103, 1985.
4. 坂本 優: ヒト子宮頸部腺癌培養細胞株 (TMCC-1) の樹立とその細胞生物学的ならびに免疫学的特性に関する研究. 東医大誌, 46: 925, 1988.
5. 作永穂高, 坂本 優, 原 譲, 佐藤博己, 島 峰尾, 根岸能之, 秋谷 清: MTT assay による制癌剤感受性試験. 婦人科悪性腫瘍化学療法研究会会誌, 4: 456, 1988.
6. 山岸雅司: ヌードマウス移植腫瘍を用いたヒト子宮頸部腺癌の化学療法に関する基礎的研究. 日産婦誌, 43: 165, 1991.
7. Faccioli, G.: Numerical and morphological analysis of human endocervical cells in relation to peripheral estrogen levels. Acta Eur. Fert., 17: 333, 1986.
8. Ferraris, A.M., Raskind, W.H., Bjornson, B.H., Jacobson, R.J., Singer, J.W. and Fialkow, P.J.: Heterogeneity of B cell involvement in acute nonlymphocytic leukemia. Blood, 66: 342, 1985.
9. 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, 1952.
10. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 65: 55, 1983.
11. Scambia, G., Panici, P.B., Baiocchi, G., Battaglia, F., Ferrandina, G., Greggi, S. and Mancuso, S.: Steroid hormone receptors in carcinoma of the cervix: Lack of response to an antiestrogen. Gynec. Oncol., 37: 323, 1990.
12. Verstijnen, C.P.H.J., Arends, J.W., Moerkerk, P.T.M., Geraedts, J.P.M., Sekikawa, K., Uiten-daal, M.P. and Bosman, F.T.: The establishment and characterization of two new cell lines derived from a single human colonic adenocarcinoma. Virchows Arch. B, 53: 191, 1987.
13. Yamada, T., Ueda, M., Maeda, T., Miyawaki, Y., Misaki, O., Ueki, M. and Sugimoto, O.: Establishment and characterization of a cell line (OMC-4) originating from a human adenocarcinoma of the uterine cervix. Acta Obst. Gynaec. Jpn., 39: 859, 1987.

(No. 7120 平3・11・5 受付)