肺転移能を有するヒト上顎癌細胞株の樹立と性状

五十嵐丈人¹⁾・宮田 守¹⁾・森田 守¹⁾
中村 良博²⁾・園田 哲史³⁾

Establishment and Characterization of Human Maxillary Cancer Cell Line (MMSI-1)

Masahito Igarashi, Mamoru Miyata and Mamoru Morita
(Jichi Medical School)

Yoshihiro Nakamura
(Teikyo University)

Tetsushi Sonoda
(Sonoda ENT Clinic)

The human maxillary cancer cell line, MMSI-1, was established from the xenograft which was implanted in nude mice and had been maintained for more than five years. Its characteristics were examined, MMSI-1 showed stable growth and the population doubling time was 1.9 days. Intravenous injection of MMSI-1 tumor cells produced lung metastases in nude mice. Southern blot hybridization showed seven-fold c-myc amplification; there was no overexpression of N-myc, erb B and erb B2. The lysate of MMSI-1 cells shortened the plasma recalcification time, but no thromboplastic activity was found in this lysate.

There has been no previous report on human head and neck cell lines which can metastasize to the lung by intravenous inoculation of cancer cells. Therefore, the most conspicuous property of MMSI-1 seemed to be its metastasizing ability.

Key words: human cell line, maxillary cancer, lung metastasis, c-myc-gene

はじめに

近年ヒトの癌細胞の培養株化は各科領域で盛んに行われ、その生物学的特性に関する検討や、化学療法の効果判定などについて多くの研究がなされている。また、原発巣の治療成績の向上に伴い、遠隔転移の制御が問題となりつつある現在、培養細胞株と実験動物を用いた転移モデ

ルについての報告もなされるようになった。頭頸部領域においても細胞株樹立についての報告は散見され、上顎癌についても本邦でもいくつかの報告がある^{1)~5)}。

今回我々は、ヒト上顎扁平上皮癌を培養株化し、その特性の検討を行った。この細胞株(MMSI-1)の注目すべき特徴は、ヌードマウス

1) 自治医科大学耳鼻咽喉科学教室
2) 帝京大学医学部耳鼻咽喉科学教室
3) 園田耳鼻咽喉科(東京都)

への静注により肺に転移巣を形成することである。頭頸部領域においては培養細胞を用いた転移に関する報告は、検索し得た範囲では認められず、MMSI-1 はマウス-人癌系の人工転移モデルとして有用と思われる。

材料および方法

①細胞株の樹立：1985年10月、52歳の女性の上顎腫瘍（低分化型扁平上皮癌）の生検標本（図1）の一部を BALB/c nu/nu マウス（ヌードマウス）の背部皮下に移植した。以後腫瘍の増大に応じてヌードマウスでの継代を繰り返し、4代目になった腫瘍を用いて初代培養を試みた。初代培養は、10 cm の plastic dish に約 1 mm 角に切った腫瘍塊を静置し、15%FCS 加 RPMI1640 を培養液として加え、5%CO₂, 37°C の条件下で行った。継代は dish に付着性に増殖した細胞を、0.1%EDTA Na 加トリプシンで浮遊させて行った。

なお患者は、手術、放射線療法、化学療法にても原発巣を制御できず死亡した。臨床的には遠隔転移は認めなかった（剖検は施行せず）。

②増殖能： 2×10^5 個の細胞を 3.5 cm plastic dish に植え込み、24時間ごとに4日間まで dish の細胞数を計測して増殖曲線を作成し、倍加時間を算出した。

③形態学的観察：培養細胞は位相差倒立顕微鏡で観察した。また、 6×10^5 個の細胞をヌードマウスの皮下に移植して腫瘍を形成させ、

図1 上顎からの生検標本（HE 染色 ×400）

HE 染色標本にて患者から得た生検標本と比較した。

④血液凝固能：MMSI-1 の細胞浮遊液を作成し、これを凍結、融解して超音波処理を行い、遠沈、濾過することにより腫瘍抽出液を得た。抽出液の作成法は、Kinjo⁶⁾ らの方法によった。この抽出液を用いて血小板凝集能とカルシウム再加時間を測定した。血小板凝集能は Payton lumiaggregation model を用いて測定した。血漿カルシウム再加時間は、正常者血清 0.1 ml に腫瘍抽出液 0.1 ml (対照では生食 0.1 ml) を加え 37°C で 5 分放置した後 25 mM CaCl₂ を加えて測定した。

⑤癌遺伝子の増幅：N-myc, c-myc, erb B, erb B2 について増幅の有無を検討した。癌遺伝子の測定は、Southern blot 法により SRL 遺伝子検査ラボラトリーで行われた。

⑥肺転移形成能： 1×10^6 個/0.2 ml の細胞浮遊液を作製し、これをマウスの尾静脈より静注した。1 カ月後に動物を屠殺して肺を摘出し、転移巣の形成の有無を HE 染色標本で観察した。マウスは BALB/c nu/nu (ヌードマウス) (57 匹), C57 BL/6 (30 匹), C57 BL/6 beige (5 匹) の 3 種を用いた。

結 果

①細胞株の樹立：静置した腫瘍片の周辺より

図2 growth curve

腫瘍細胞の増殖がみられた. fibroblast の混入はほとんどなかった. 安定した継代が可能で, 現在までの継代数は201代 (5年6ヵ月) である.

②増殖能: growth curve は図2に示したと

図3 倒立顕微鏡像 (×100)

図4 ノードマウス皮下の腫瘍 (HE 染色 ×400)

図5 肺転移像 (HE 染色 ×400)

おりである. 倍加時間は1.9日であった.

③形態学的観察: 位相差倒立顕微鏡による観察では, 細胞は plastic dish に付着性に敷石状に増殖し, 大小不同の核と明瞭な核小体を有する多角形の細胞であった (図3). ノードマウスに移植して形成された腫瘍は低分化型扁平上皮癌の像を示し, 原発腫瘍の形態を維持していた (図4).

④血液凝固能: 腫瘍抽出液による血小板の凝集は認められなかった. カルシウム再加時間は対照群147.2秒に対し腫瘍抽出液を加えると24.0秒となり, 内因系凝固因子の活性化が認められた.

⑤癌遺伝子の増幅: c-myc で対照群に対し7倍の増幅が認められた. N-myc, erb B, erb B2 では遺伝子の増幅はみられなかった.

⑥肺転移形成能: C57 BL/6 および C57 BL/6 beige マウスでは肺に転移巣はみられなかった. BALB/c nu/nu ノードマウスでは56匹中9匹に転移が認められた. 図5に肺転移巣のHE染色像を示す.

考 察

現在マウスを用いた遠隔転移の実験モデルとしては, 癌細胞を皮下に移植してその後の転移をみる方法, 癌細胞の脾臓内注入により門脈を経由した血行性肝転移を観察する方法, 癌細胞を直接静脈内へ注入して各臓器に転移を形成させる方法などが知られている. 皮下腫瘍からの転移は自然転移モデルであり, 後2者は人工転移モデルである. 用いられるマウスは細胞がヒト由来の場合はノードマウスが多く, また C57 BL/6 とその同系の腫瘍を用いた報告も多い.

悪性腫瘍の遠隔転移は, 癌細胞の増殖および血管の新生 → 母腫瘍塊からの血管やリンパ管への腫瘍細胞の遊離 → 脈管内移動 → 転移臓器の毛細血管床への定着 → 血管内皮細胞への付着 → 血管外への遊出 → 増殖の開始と栄養血管の新生という一連の過程を経て完成されるものであり⁷⁾, 自然転移モデルはこのすべての転移形成の過程を含んでおり理想的である. ノード

マウスは種々のヒト由来の癌細胞が高率に生着して腫瘤を形成するため、一見容易に自然転移モデルとして利用できそうに思われる。しかしヌードマウスでの移植腫瘍の自然転移形成率は非常に低いとされている。Sharkey ら⁸⁾の報告では、106種のヒトの癌細胞株を1045匹のヌードマウスの皮下に移植したところ、転移をきたしたのはわずか11株14匹(1.3%)であり、頭頸部癌は3株52匹すべてで転移を認めなかった。in vitro での培養細胞を用いると転移率は高くなるといわれる⁹⁾がそれほど高率ではなく、その上頭頸部癌では in vitro での株化そのものがむずかしいという問題もある。自然転移をおこす細胞株の樹立についての報告は散見されるようになったが、その数は少なく、頭頸部領域での報告はないようである。一方、腫瘍細胞の静注による転移形成は、母腫瘍塊から腫瘍細胞が脈管内に移行した後の経過をみることになる。しかし短期間で結果が得られ、細胞が体内に散布される時期や腫瘍細胞の量、質などの条件を容易に一定にすることができ、この方法を利用しての多くの研究報告がなされている。本法もマウス-人癌系の一つの転移モデルとして確立された方法となっている。

MMSI-1の転移形成率は高いとはいえないが、我々は、実際にこの細胞株を用いて転移形成率が抗癌剤の投与により変化する傾向があるなどの実験結果を得ており¹⁰⁾¹¹⁾、転移に対する化学療法の効果などを検討していく上で有益なモデルと思われる。

ヌードマウスに転移がおきにくい理由はいまだ明確にされていない。NK 細胞活性が高いことが要因の一つと考えられている^{12)~15)}が、腫瘍の進展状態、個々の腫瘍細胞の持つ固有の転移能、腫瘍がヒト由来で recipient がマウスであることなど NK 活性以外にも種々の要因があるとされている⁸⁾⁹⁾。我々は NK 活性の異なる3種類のマウス、すなわち、NK 活性の正常対照として C57 BL/6 マウスを用い、これより NK 活性の高い BALB/c nu/nu ヌードマウス、

さらに、NK 活性の低い C57 BL/6 beige マウスを用いて肺転移の形成率を検討した。この結果ヌードマウスにのみ転移巣がみられたことから、NK 活性以外にも転移に関わる重要な要因が存在することが類推された。

転移に関連する因子として血小板凝集能をはじめとする血液凝固能も重要である。腫瘍細胞は血小板と凝集塊をつくることにより局所への定着が容易になり、さらに血小板から放出される増殖因子が転移巣の発育を助けることが予想される。MMSI-1の腫瘍抽出液を用いた実験では血小板凝集能は認められなかったが、癌細胞の血小板凝集能は主に細胞膜にあるとされており¹⁶⁾¹⁷⁾、腫瘍抽出液では膜成分の多くが除去されていることが原因と思われた。しかし腫瘍抽出液を用いたカルシウム再加時間の検討では著明な短縮が認められ、内因系凝固因子の活性化が示唆された。これは MMSI-1の静注直後の肺の組織所見で肺内の毛細血管内に著明な血栓の形成が認められた所見と一致し¹⁰⁾¹¹⁾、凝固系への影響が転移巣形成に大きく関係していることが推測される。

癌遺伝子は腫瘍の増殖や転移に関係する重要な要因として近年研究が進んできている。転移能との関係が報告されている癌遺伝子には N-myc, c-myc, erb B, ras, fos などがあるが、MMSI-1では c-myc の増幅がみられた。myc 遺伝子は神経細胞由来の悪性腫瘍での増幅が多いとされ、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、肺の小細胞癌などでの増幅が報告されている。扁平上皮癌についても、子宮頸癌において、c-myc の増幅が遠隔転移の重要な危険因子であるとの報告が最近なされており¹⁸⁾興味深い。

まとめ

1) 静注により肺転移をきたすヒト上顎扁平上皮癌細胞株 MMSI-1の樹立とその性状について報告した。本腫瘍は人工転移のモデルとして有用と思われた。

2) 肺転移は C57 BL/6 および C57 BL/6 beige マウスではみられず、ヌードマウスのみ

に認められた.

3) 癌遺伝子 c-myc の増幅が認められた.

4) MMSI-1 の腫瘍抽出液は血小板凝集能を欠いていたが, カルシウム再加時間の短縮から内因系凝固因子の活性化が示唆された.

文 献

- 1) 石田 稔 : 人癌細胞の培養 — 上顎癌由来の細胞株について —. 日耳鼻 **81** : 588~603, 1978.
- 2) Nakashima T, Makishima K and Hiroto I : Establishment of a new cell line from maxillary sinus carcinoma. Ann Otol Rhinol Laryngol **89** : 24~28, 1980.
- 3) 猪川 勉 : 頭頸部扁平上皮癌細胞に対する自己リンパ球の細胞障害性の研究 — 1 頭頸部扁平上皮癌細胞の培養 —. 日耳鼻 **84** : 1571~1578, 1981.
- 4) 高橋光明, 熊井恵美, 金井直樹, 他 : ヒト上顎癌培養細胞の細胞特性. 日耳鼻 **90** : 21~27, 1987.
- 5) 久保田彰 : 上顎癌初代培養株による制癌剤感受性試験の基礎的研究. 耳鼻 **34** : 309~321, 1988.
- 6) Kinjo M, Oka K, Kohga S, et al : Thromboplastic and fibrinolytic activities of cultured human cancer cell lines. Br J Cancer **39** : 15~23, 1979.
- 7) Poste G and Fidler IJ : The pathogenesis of cancer metastasis. Nature **283** : 139~146, 1980.
- 8) Sharkey FE and Fogh J : Metastasis of human tumors in athymic nude mice. Int J Cancer **24** : 733~738, 1979.
- 9) Kozlowski JM, Fidler IJ, Campbell D, et al : Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. Cancer Res **44** : 3522~3529, 1984.
- 10) 宮田 守, 西野 宏, 五十嵐丈人, 他 : 頭頸部癌培養細胞株を用いた肺転移に関する実験的研究. 頭頸部腫瘍 **17** : 30~36, 1991.
- 11) Igarashi M, Miyata M, Morita M, et al : Fate of human maxillary cancer cells injected intravenously and trapped in the lung of mice. 日癌治 **26** : 243, 1991.
- 12) Hanna N and Schneider M : Enhancement of tumor metastasis and suppression of natural killer cell activity by β -estradiol treatment. J Immunol **130** : 974~980, 1983.
- 13) Hanna N and Fidler IJ : Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. JNCI **65** : 801~809, 1980.
- 14) Talmadge JE, Meyers KM, Prieur DJ, et al : Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis ; C57 BL/6 normal and beige mice. JNCI **65** : 929~935, 1980.
- 15) Hanna N and Fidler IJ : Expression of metastatic potential allogenic and xenogeneic neoplasms in young nude mice. Cancer Res **41** : 438~444, 1981.
- 16) Honn KV, Onoda JM, Menter PG, et al : Platelet-tumor cell interactions as a target for antimetastatic therapy. Mechanisms of cancer metastasis (ed by Honn KV, Powers WE and Sloane BF). pp 117~144, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 1986.
- 17) 新津洋司郎, 茂木良弘, 坂内 清, 他 : ヒト癌細胞培養株による血小板凝集に関する研究. 癌と化学療法 **11** : 480~486, 1984.
- 18) Bourhis J, L MG, Gerbaulet D, et al : Prognostic value of c-myc protooncogene overexpression in early invasive carcinoma of the cervix. J Clin Oncol **8** : 1789~1796, 1990.

(別刷請求先 : 五十嵐丈人
〒329-04 栃木県河内郡南河内町
薬師寺3311-1
自治医科大学耳鼻咽喉科学教室)