正常マウス顎下腺上皮細胞の無血清培養下における株化

藪本正文・岡本哲治・尾崎輝彦・明見能成
高田和彰

Establishment of normal epithelial cell lines from mouse submandibular gland in serum-free cell culture

Masafumi YABUMOTO・Tetsuji OKAMOTO・Teruhiko OSAKI
Yoshinari MYOKEN・Kazuaki TAKADA

Abstract: Normal epithelial cell line (M-SG α) has been established from mouse submandibular gland in serum-free cell culture. Although the mode of chromosome numbers of the cells shifted from diploid to triploid with increasing passage level, the cells had no tumorigenicity in athymic nude mice. M-SG α expressed some of the functional proteins which were characteristic of mouse submandibular gland ductal cells by indirect immunofluorescence antibody technique and also expressed EGF, FGF and TGF β receptors. Proliferation of the cells was stimulated by either EGF or acidic-fibroblast growth factor (a-FGF). Furthermore, it was revealed that EGF and FGF were essential factors for the growth. Growth of the cells was inhibited by calf serum or transforming growth factor β (TGF β). But the inhibitory activities in calf serum were destroyed by heat treatment. Therefore, it was speculated that some unknown growth inhibitor for epithelial cells which was different from TGF β existed in calf serum.

Taken together, this cell line which was established in serum-free culture would be useful to study the growth and differentiation of normal epithelial cells.

Key words: Growth and differentiation of epithelial cells (上皮細胞の増殖と分化), epidermal growth factor (上皮成長因子), fibroblast growth factor (線維芽細胞成長因子)

緒 言

正常細胞から悪性細胞への形質転換の過程に, growth factor あるいはその受容体の異常発現が関与していることがあきらかにされつつある¹⁻⁶⁾。これらを *in vitro* で解明するためには, 悪性細胞はもとより, その由来する正常細胞の培養系を確立することが必要である。一方, 人の癌腫の92%が上皮性の腫瘍である⁷⁾ことから, 正常上皮細胞の培養は不可欠であると考えられる。しかし, 従来, 線維芽細胞などの間葉系細胞が正常細胞として研究

されてきた^{8,9)}。これは, 正常上皮細胞の培養が非常に困難であるということに起因すると考えられる。その原因として培養液中に添加された牛血清中に多く含まれる, 線維芽細胞の増殖を促進する血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor, PDGF)^{10,11)}, あるいは transforming growth factor β (TGF β)^{12,13)} などの上皮細胞増殖抑制因子が考えられる。

近年, G.H. Sato ら^{14,15)}は血清の働きは細胞にとって重要なホルモンや growth factor などを供給することであるという仮説をもとに, 血清の代わりに既知の growth factor やホルモンを合成基礎培地中に加えることにより, 細胞の増殖のみならずその機能をも維持することも可能であることをあきらかにし, 無血清培養法を確立した。さらに Tsao ら¹⁶⁾が, 低カルシウム培地を用いて無血清下で正常上皮細胞の初代培養を可能とした。

一方, 1962年, S. Cohen ら¹⁷⁾により雄性マウス顎下腺中に歯牙萌出, 眼瞼開裂促進因子として多量の上皮成

広島大学歯学部口腔外科学第1講座

(主任: 高田和彰教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery I,
Hiroshima University, School of Dentistry (Chief:
Prof. Kazuaki Takada)

受付日: 平成元年9月28日

長因子 (epidermal growth factor, EGF) が存在することが発見されて以来、同組織中に神経成長因子 (nerve growth factor, NGF)¹⁵⁾、コロニー刺激因子 (colony stimulating factor, CSF)¹⁹⁾、エリスロポイエチン²⁰⁾などの growth factor 活性が存在することが報告されている。これらの事実は、唾液腺が従来考えられていた外分泌器官として以外に内分泌器官としても重要な機能を持っている可能性を示唆している^{21,22)}。また、顎下腺中に存在するこれら growth factor は顎下腺の発生、増殖、分化にとっても重要な役割を担っていると考えられる。

そこで本研究では、無血清下で正常マウス顎下腺上皮細胞の継代培養可能な単層培養系の確立を試みた。また長期継代培養を行い、その増殖能、分化能、growth factor の要求性について解析を行った。

材 料 と 方 法

1. 培養材料

7週齢の BALB/c 系雌性マウスより、可及的に周囲の結合組織を除去した顎下腺を採取して用いた。

2. 培養液

脱イオン化および逆浸透により純化した水 (Milli-Q; Millipore) を用いて、MCDB 152¹⁶⁾あるいは RPMI 1640 と DMEM (以上極東製薬) を 1 : 1 に配合した培地 (RD)^{23,24)}に HEPES 25 mM (片山化学), NaHCO₃ 1.2 g/l, sodium pyruvate 110 mg/l (以上和光純薬), kanamycin sulfate 90 mg/l, aminobenzylpenicillin 90 mg/l (以上明治製薬) を加え、pH 7.4 に調整し 0.2 μ m フィルター (Acrocap; Gelman Science Inc.) により濾過滅菌したものを基礎培地として使用した。さらに、crystalline bovine insulin 10 μ g/ml, human transferrin 5 μ g/ml, 2-amino-ethanol 10 μ M, 2-mercaptoethanol 10 μ M (以上 Sigma Chemical Co., USA), sodium selenite 10 nM (半井化学), oleic acid 4 μ g/ml (Sigma Chemical Co.) (oleic acid と fatty acid-free bovine serum albumin (Miles Laboratories, Inc, USA) をモル比 2 : 1 で結合させたもの (BSA-OL. A と略す)), growth factor として mouse EGF 10 ng/ml (Receptor Grade, Collaborative Research Inc, USA), fibroblast growth factor (FGF) 1 ng/ml を適宜添加した。FGF は Crabb ら²⁵⁾の方法に従い、牛脳抽出液をヘパリンアフィニティークロマトグラフィー、それに続いて逆相系高速液体クロマトグラフィーを用いて精製した。培地中のカルシウム濃度は、MCDB 152 が 0.03 mM, RD が 1.12 mM であった。

3. 培養方法

無菌的に採取した顎下腺をメスで 1 mm³ 大以下に細切後、60 mm 径プラスチックシャーレ (Falcon, USA) に植え込み、TE-HER 型インキュベーター (平沢製作

所) 中、5% CO₂, 37°C の条件下で静置培養を行った。また、細切した顎下腺をインキュベーター中で 0.05% トリプシン (Difco laboratories, USA) および 0.02% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA, 片山化学, 大阪) にてゆっくり攪拌しながら、30分, 60分, 90分, 120分間消化後、トリプシンを 0.2% トリプシンインヒビター (Type II -S, Sigma Chemical Co, USA) で中和遠心後、初代培養を開始した。

初代培養は、MCDB 152 あるいは RD に insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite を添加した培地 (MCDB5F, RD5F) を基礎培地とし、さらに EGF あるいは FGF, あるいは EGF と FGF を添加した培養条件で行った。また calf serum (CS) 5% 添加の条件下でも培養を行った。

4. マウス顎下腺上皮細胞の growth factor 要求性の検索および M-SG α 細胞株の樹立

3の条件で継代培養を行い、継代5代の細胞の growth factor, ホルモンなどの要求性を検索した。MCDB 152 を基礎培地として 48 well プラスチックプレート (Costar, USA) に 5,000 個/well の細胞密度で植え込み、種々の条件で6日間培養を行い、生細胞数を Coulter Counter (Coulter Electronics, England) で算出した。その結果、MCDB5F に EGF と FGF を添加した条件で最大の増殖を得た。以後、同条件で継代培養を行い、正常マウス顎下腺上皮細胞株 M-SG α を樹立した。

5. M-SG α 細胞における唾液腺マーカー、上皮マーカーの検索

24 well プラスチックプレート (Falcon, USA) に植えた 7代目、48代目の M-SG α 細胞を 1% パラホルムアルデヒド (片山化学, 大阪) で 30分間固定した後検索を行った。培養条件は MCDB5F + EGF + FGF で行った。

1次抗体として、ウサギ由来抗 secretory component (SC), 抗 lactoferrin (LF), 抗 S-100 protein, 抗 myosin, 抗 keratin, 抗 amylase, 抗 vimentin 抗体 (以上 Dako, USA), 抗マウス EGF 抗体 (Collaborative Research Inc) を、対照として正常ウサギ血清を用いた。これらを室温にて2時間インキュベート後、2次抗体として tetramethyl rhodamine isothiocyanate (RITC) ラベルのヤギ抗ウサギ血清 (Dako, USA) を加え、さらに室温にて2時間インキュベートしたのち、蛍光位相差顕微鏡 (Nikon, DIAPHOT-TMD-EF2A 落射蛍光装置付倒立顕微鏡) にて観察を行った。

また、48代目の M-SG α 細胞を MCDB5F + EGF, MCDB5F + FGF, RD5F + EGF, RD5F + FGF, RD5F + EGF + 5% CS, RD5F + FGF + 5% CS の条件で培養した。7日後に位相差像にて形態変化の観察、各種唾液腺マーカーの検索を行った。

写真 1 初代培養時の M-SG α 細胞の位相差像A : 培養10日目 ($\times 100$) B : 培養10日目 ($\times 200$)

6. 染色体数の検索

継代13代, 49代に対数増殖期にある細胞を $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のデメコルシン (Sigma Chemical Co, USA) 存在下で8時間培養した後, EDTA-トリプシンにて細胞を分散した。次に 0.075 M KCl で30分間低張処理を行った後, カルノア固定液にて固定した。固定後, 風乾しギムザ染色を施し光学顕微鏡観察および写真撮影を行い染色体数を算定した。

7. *in vivo* における M-SG α 細胞の造腫瘍性の検索

Laminar Flow Iso Rack (三基科学工業 K.K.) 内で飼育中のヌードマウス (BALB/cA-Jcl-nu/nu, 6週齢 日本クレア K.K.) の背部皮下に 1×10^7 個の M-SG α 細胞 (9代および25代) を接種した。接種後約2か月間観察し腫瘍形成の有無を肉眼的に判定した。

8. 細胞増殖能の検索および増殖に及ぼす EGF, acidic FGF, TGF β_1 , CS の影響

48 well プラスチックプレートに対数増殖期の細胞を, 5,000個/well の細胞密度で植え込んだ。MCDB5F を基礎培地として各濃度の EGF, acidic FGF (a-FGF), TGF β_1 (R & D, USA), CS を加えて培養を行い, 6日後に Coulter Counter にて細胞数を算出した。TGF β_1 は, EGF 1 nM 存在下ならびに非存在下で検索を行った。CS は未処理および 56°C , 30分加熱処理したものを用いて検索を行った。

さらに, EGF ならびに FGF の最大活性を示す濃度を用いて MCDB5F+EGF, MCDB5F+FGF, MCDB5F+EGF+FGF の条件で細胞増殖能を検索した。

9. EGF, TGF β_1 , FGF 受容体の解析

48 well プラスチックプレートに植え込んだ継代10代の M-SG α 細胞を Dulbecco の Ca, Mg 不含 phosphate buffered saline (PBS (-)) で2回洗浄した後, BSA $5 \text{ mg}/\text{ml}$, HEPES 15 mM を含む MCDB 152 緩衝液 (MCDB/HEPES/BSA buffer, pH 7.4) 中に, 一定量の [^{125}I] 標識された上記 growth factor と異なる濃度の標

図 1 継代5代の M-SG α 細胞の増殖における, 5F, EGF, FGF, oleic acid の要求性

A : MCDB+EGF+FGF, B : MCDB5F, C : MCDB5F+EGF+FGF, D : MCDB5F+EGF, E : MCDB5F+FGF, F : MCDB+Insulin (INS)+EGF+FGF, G : MCDB+Transferrin (TRANS)+EGF+FGF, H : MCDB+INS+TRANS+EGF+FGF, I : MCDB5F+EGF+FGF-INS-TRANS, J : MCDB5F+EGF+FGF+BSA. OL.A A~J の培地にて 24 well プレートに 1 well あたり 5,000個の細胞を植え込み, 6日間培養を行った後, 細胞数を算出した。

識されていない growth factor を加え, 4°C にて2時間インキュベートした。MCDB/HEPES/BSA buffer で3回洗浄後, 細胞を 0.1 N NaOH $150 \mu\text{l}$ で溶解しオートウェルガンマシステム (Aloka, ARC-600) で放射活性を測定した。得られた結果を Scatchard 解析²⁶⁾しそれぞれの growth factor の受容体数ならびに親和性を求めた。

写真 2 継代後の M-SGα 細胞の位相差像 (×100)
A : 継代10代の M-SGα 細胞 B : 継代71代の M-SGα 細胞

表 1 継代 7 代および48代の M-SGα 細胞
の各種唾液腺マーカー解析
(MCDB5F+EGF+FGF の条件で行った)

特異抗原	7代	48代
SC	+	+
LF	+	+
S-100 Protein	—	—
Myosin	—	—
Amylase	+	+
EGF	+	+
Keratin	+	+
Vimentin	—	—

+, 陽性; ±, 弱陽性; —, 陰性
1%パラホルムアルデヒド固定後, 蛍光抗体間接法により検索した。
* RD5F+EGF の条件で, Fr. 2 の細胞に強陽性であった。

結 果

1. 培養経過

Explant 法では培養開始 3~10 日目頃より, EGF あるいは FGF を添加した培養条件で上皮細胞の遊走がみられた (写真 1)。その後, 原則として 7 日に 1 回継代培養を行った。MCDB 152 では, 多角形小型で明瞭な細胞間隙を有し単層で増殖する細胞群が得られ, 線維芽細胞の増殖はほとんど認めなかった。RD 培地を用いても同様な細胞群が得られたが, 高カルシウム培地であるため線維芽細胞の増殖を認めた。この傾向は継代とともに著明となり, 上皮細胞の継代培養は困難となった。さらに血清添加培地でも線維芽細胞の過増殖, 上皮細胞の

増殖能の低下により継代困難となった。以上の結果から上皮細胞の増殖能の最も高い条件は, MCDB5F+EGF+FGF であった。

また酵素消化法でも, 60分, 90分消化した群において初代培養開始翌日より良好な細胞増殖を認め, Explant 法とはほぼ同様な結果が得られた。

2. マウス顎下腺上皮細胞の growth factor 要求性の検索および M-SGα 株の樹立

継代 5 代の M-SG 細胞の増殖における 5F, EGF, FGF, oleic acid の要求性を検索した結果, 増殖のために insulin 存在下で EGF あるいは FGF を必須因子としていた。EGF, FGF の非存在下では増殖を認めなかった。さらに transferrin, 2-aminoethanol 2-mercaptoethanol, sodium selenite 添加により増殖は相加的に促進され, MCDB5F+EGF+FGF で最大の増殖が得られた。しかし, oleic acid は増殖に著明な影響を示さなかった (図 1)。

以上の結果から, MCDB5F+EGF+FGF で継代を重ね, 細胞株 M-SGα を得た。M-SGα は平成元年 11 月 25 日現在で継代 88 代目, 細胞集団倍加数 (population doubling level, PDL) 530 で初代培養より約 26 か月経過している。継代 10 代, 71 代の M-SGα 細胞を位相差顕微鏡にて観察した (写真 2)。形態的には両者とも多角形小型の細胞群 (Fr. 1) と, ほとんど増殖能を持たない巨大な細胞 (Fr. 2) で構成され, 継代が進行しても変化しなかった。

3. M-SGα 細胞における唾液腺マーカーの検索

M-SGα 細胞は 7 代, 48 代いずれの継代数においても, 多角形小型の細胞に特異的に SC, LF, amylase, keratin が陽性, S-100 protein, myosin, vimentin は陰性であり, ほとんどの細胞にマウス EGF が陽性であった (表 1)。

さらに, RD 培地では Fr. 2 の細胞に特異的に amylase 強陽性所見が得られた。

写真 3 継代48代の M-SG α 細胞の位相差像 (×100)

MCDB5F+EGF+FGF で培養した M-SG α 細胞を、以下A)～F) の培地に変更して培養を行い、6 日後に位相差像を観察した。

A : MCDB5F+FGF B : RD5F+FGF C : RD5F+FGF + 5 % CS
D : MCDB5F+EGF E : RD5F+EGF F : RD5F+EGF + 5 % CS

4. M-SG α の細胞形態におよぼすカルシウム濃度、血清の影響

MCDB5F+EGF+FGF で培養した M-SG α 細胞と比較して、MCDB5F+EGF で培養した細胞は全細胞における Fr. 2 の割合が増加した。しかし、MCDB5F+FGF で培養した細胞はほとんど Fr. 1 のほぼ均一な細胞群であった。また RD5F+EGF+FGF, RD5F+EGF, RD5F+FGF で培養した細胞の Fr. 1 の細胞は細胞質が

縮小し packing され細胞間隙は不明瞭となり、confluent になると重層化する傾向がみられ、扁平上皮細胞に近い性格を有していると考えられた。Fr. 2 の細胞はより細胞質が膨大する傾向がみられた。また 5 % CS 存在下では、Fr. 2 の細胞群の膨大化が著明であった(写真3)。

5. 染色体数検索

M-SG α 細胞の染色体数の分布は、13代では約 70～80 % の細胞が40本の 2 倍体にモードを示したが、49代では

図2 M-SG α 細胞の染色体数分析

約55%が2倍体にモードを示し、約40%が3倍体にモードを示した(図2)。

6. *in vivo* における M-SG α 細胞の造腫瘍性の検索

継代9代、25代の M-SG α 細胞をヌードマウスに接種し約2か月間観察した。いずれの群においても肉眼的に腫瘍形成は認められず、M-SG α 細胞は造腫瘍性を持たないことがあきらかとなった。

7. 細胞増殖能ならびに細胞増殖に及ぼす growth factor, 血清の影響

EGF, a-FGF は濃度依存的に増殖を促進した。継代数が増加してもその増殖促進濃度は一定であった(図3-a, 図3-b)。EGF の最大活性は1 nM で得られ、FGF の最大活性は100 pM で得られた。さらに、EGF による最大増殖細胞数と FGF による細胞数は同一であった。また TGF β_1 は EGF 1 nM 存在下で濃度依存的に著しく増殖を抑制し、最大活性は4 pM で得られた(図3-c)。

CS は継代7代、48代の M-SG α 細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、10%ではほぼ植え込んだ細胞数まで抑制した(図4)。しかし56°C、30分熱処理したCSは増殖抑制活性を認めなかった。

継代56代の M-SG α 細胞を用いて細胞増殖能を検索した結果、MCDB5F+EGF, MCDB5F+FGF, MCDB5F+EGF+FGF いずれの条件でも細胞倍加時間は25.8時間であり、増殖率に差を認めなかった(図5)。

8. EGF, TGF β , FGF 受容体の解析

M-SG α 細胞における EGF, TGF β , FGF 受容体解析の結果、親和性の異なる2種類の EGF 受容体、高親和性の TGF β 受容体および FGF 受容体を有していることがあきらかとなった(表2)。

考 察

マウス顎下腺上皮細胞の培養系を確立することは、正常上皮細胞の性格および機能の解明のみならず、ヒト唾液腺癌発生機構を研究するためにも必要性は高いと考えられる。しかし、従来より行われてきた血清添加培地を用いた培養系では上皮細胞の培養はきわめて困難であった²⁷⁻³⁰⁾。その理由としては、血清中に存在する PDGF による線維芽細胞の過増殖あるいは TGF β などの上皮細胞に対する増殖抑制因子などが考えられる。

近年、完全合成無血清培地を用いて正常上皮細胞の初代培養を行った報告がみられる。しかし長期継代培養に成功した例はほとんどなく、唯一 Kaighn ら³¹⁾の報告をみるのみである。彼らは初代より無血清培地を用いてマウス表皮角化細胞の長期継代培養を行った。唾液腺上皮細胞の無血清培養は Yang ら³²⁾が上皮細胞のみを分離して培養を試み、コラーゲンゲル内に包埋した状態で約1か月間その増殖能、分化能を維持することが可能であったと報告している。しかし、現在までわれわれの報告以

図 3-a M-SG α 細胞の増殖に及ぼす EGF の影響 図 3-c M-SG α 細胞の増殖に及ぼす TGF- β_1 の影響

継代48代の M-SG α 細胞に対して、EGF 1 nM 存在下および非存在下で検索した。

図 3-b M-SG α 細胞の増殖に及ぼす acidic-FGF の影響

継代7代および48代の M-SG α 細胞に対して検索した

図 4 M-SG α 細胞の増殖に及ぼす子牛血清の影響

継代7代および48代の M-SG α 細胞に対して検索を行った。7代の細胞には未処理血清のみ検索を行い、48代の細胞に対しては未処理血清および 56°C 30分熱処理血清について検索を行った。

外に単層培養で唾液腺上皮細胞を長期継代培養した報告はない

顎下腺には種々の growth factor が存在し、さまざまな細胞の増殖、分化に影響を与えていることが知られている。特に EGF は、1962年に Cohen ら¹⁷⁾によりマウスの眼瞼開裂および歯牙萌出促進因子として発見されて以来最もよく研究されており、Rall ら³³⁾は、他の臓器と比較して、雄マウス顎下腺中に EGF 前駆体の mRNA レベルが非常に高いことを見出している。さらに、最

近われわれはマウス顎下腺中に高い FGF 様因子活性が存在することをあきらかにした³⁴⁾。FGF は当初 3T3 細胞の増殖促進因子として発見されこのように命名された³⁵⁻³⁷⁾が、血管内皮細胞増殖因子とまったく同一であることが明らかとなり³⁵⁾、最近では表皮角化細胞、肝細胞

図 5 継代56代の M-SG α 細胞の増殖曲線

表 2 継代10代の M-SG α 細胞における増殖因子受容体解析

	EGF-R		FGF-R	TGF β -R
	High Affinity	Low Affinity		
Receptor Number /Cell	1.1×10^4	7.8×10^4	1.1×10^4	3.3×10^3
Kd (M)	9.5×10^{-10}	6.5×10^{-8}	3.0×10^{-10}	1.6×10^{-10}

* おのおの, scatchard plot により算出した.

などの上皮系細胞の増殖にも強く関与していることが報告されている³⁹⁻⁴¹⁾. *in vivo* で EGF, FGF が顎下腺に多量に存在しているにもかかわらず、顎下腺上皮細胞の増殖や分化に対してそれらがどのような役割を果たしているのかこれまでほとんど解明されていない. そこで無血清下でマウス顎下腺上皮細胞 (M-SG) の初代培養を試み、EGF, FGF が M-SG 細胞の増殖、分化に及ぼす影響を検討した. その結果、EGF 単独でも FGF 単独でも良好な上皮性細胞の増殖が得られた. 最も上皮性細胞の増殖能の高い培地である MCDB 152+5F+EGF+FGF を用いて継代培養を行い、M-SG α 株を樹立した. このように無血清培地を用いてマウス顎下腺上皮細胞の長期継代培養可能な培養系を確立することに成功した. M-SG α 細胞はヌードマウスにおいて造腫瘍性を持たなかった. またその核型は20代までは70~80%が2倍体にモードを示したが、49代では50%が2倍体に、40%が3倍体にモードを示した. Loo ら⁴²⁾ は初代より無血清下でマウス胎児線維芽細胞の継代培養を行い、PDL 200

でも2倍体クロモゾームを維持することに成功し細胞の老化を認めなかったことを報告している. しかし、Kaighn ら³¹⁾ はマウス表皮角化細胞を無血清下で長期継代培養した結果、早期に2倍体細胞は消失したことから、immortalization の過程に染色体数の増加が必要であろうと報告している. 今回、M-SG α 細胞でも長期継代により3倍体細胞の増加がみられ、Kaighn らと同様の結果を得た. M-SG α 細胞は、形態的に多角型小型の細胞群 (Fr. 1) と多核で細胞質の膨化した細胞およびやや大型の細胞群 (Fr. 2) の2種類の細胞群で構成されていた. それらは、顎下腺の増殖の幹細胞となりうるごく一部の未分化な細胞群である可能性が考えられる. さらに、EGF と α -FGF は濃度依存的に M-SG α 細胞の増殖を促進した. また、それぞれの最大増殖促進濃度を用いて MCDB5F に EGF あるいは FGF あるいは EGF と FGF を添加したいいずれの条件でも、M-SG α 細胞は同一の細胞倍加時間を示したことから、EGF と FGF は M-SG α 細胞の増殖に対してまったく同じ作用があることが考えられた. 次に EGF, FGF が M-SG α 細胞の増殖、分化に及ぼす影響を検討した. 位相差顕微鏡による形態学的検索では、MCDB5F, RD5F を基礎培地として EGF を添加すると Fr. 2 の細胞の割合が増加した. しかし FGF のみではほとんど Fr. 1 の均一な細胞群が得られた. 培養条件のカルシウム濃度を増加することにより、その細胞コンポーネントの比率は変化しないが、Fr. 2 の細胞はより細胞質が膨大する傾向がみられた. 表皮角化細胞の分化は低カルシウム培地では抑制されるが、高カルシウム培地では促進され重層化することが報告されている^{43, 44)}. MCDB 152 のカルシウム濃度は 0.03 mM, RD は 1.12 mM であり、Fr. 2 の細胞の細胞質の膨化も分化が促進された結果と考えられる. また各種唾液腺マーカー、上皮マーカーの検索により増殖能の高い Fr. 1 の細胞では、SC, LF, keratin, amylase が陽性、S-100 protein, myosin は陰性であり同細胞は唾液腺細胞および上皮細胞の性格を持ち、しかも導管細胞の性質を持っていることが示唆された. さらにほぼすべての細胞の細胞質にマウス EGF が強陽性であったことから、M-SG α 細胞は EGF を産生していると考えられた. *in vivo* での免疫組織化学的検索により、雄性マウス顎下腺の顆粒膨大部細胞に EGF が存在することが報告されている^{45, 46)} ことから、M-SG α 細胞は同部由来である可能性が示唆された. Fr. 1 は低カルシウム培地では未分化だが、高カルシウム培地でも分化能をもつ増殖性の高い細胞群であることが考えられた. また、RD 培地中では、EGF 存在下で Fr. 2 の細胞に特異的に amylase の強陽性所見が得られたことから、高カルシウム培地中では EGF により M-SG α 細胞の分化が誘導された可能性が考えられた.

このように、EGF は M-SG 細胞の増殖のみならず、その分化に関与していることが示唆された。一方 FGF は単独で M-SG α 細胞の増殖を著しく促進するが、FGF により増殖する M-SG 細胞は低カルシウム、高カルシウムのいずれの培地においても多角形小型の均一な細胞群であり、FGF は多分化能をもつと考えられる未分化な細胞の増殖のみを促進すると考えられた。

M-SG α 細胞の増殖は TGF β および CS により濃度依存的に抑制された。形態的には TGF β , CS により辺縁不規則な細胞質の膨化した細胞の比率が増加し、分化傾向を示している可能性が考えられた。しかし、56°C、30 分間熱処理することにより CS の増殖抑制活性は消失した。TGF β は熱に安定であることから、TGF β と異なる CS 中の熱に不安定な未知の因子が上皮細胞の増殖抑制に関与していると考えられた。従来、血清添加培地では上皮細胞の継代培養が非常に困難であったのは、血清中にこの上皮細胞増殖抑制因子が存在することによると考えられた。一方、ヒト扁平上皮癌細胞、腺癌細胞あるいはマウス扁平上皮癌細胞を用いた無血清培養系では、血清によって増殖抑制はみられない（未発表データ）ことから、この因子は正常上皮細胞の癌化に密接に関与している可能性が考えられる。現在までのところ、同因子は 40% 硫酸アンモニウムで沈澱し、熱に不安定、酸に安定であり、DEAE イオン交換樹脂に吸着する高分子量の物質であることが明らかとなっている（未発表データ）。

未処理血清中の EGF 濃度は [125 I] EGF を用いた radio receptor competition assay により検索した結果 1 ng/ml であった。CS を 10% の濃度で培地中に添加しても EGF 濃度は 100 pg/ml であり、EGF の M-SG α に対する増殖促進濃度と比較してはるかに低いことが明らかになった。また、血管内皮細胞は培地に 10% CS, EGF 10 ng/ml を添加しても増殖することはできないが、FGF を添加すると増殖できる⁴⁷⁾ことから、FGF は血清中にほとんど存在しないと考えられる。これらの事実からマウス唾液腺上皮細胞を培養するためには、EGF あるいは FGF を添加し、培地中から血清を除去することが必要不可欠であることがあきらかとなりわれわれの用いた無血清培地がきわめて有用であると考えられた。また、その他の正常上皮細胞も同様の原因により長期継代培養が困難であったと考えられる。事実、われわれは今回用いた無血清培養系を正常ヒト表皮角化細胞、ヒト口腔粘膜上皮細胞、ヒト顎下腺上皮細胞などに応用し、長期継代培養可能であることを確認し、すでに報告した⁴⁸⁾。

EGF, FGF, TGF β の受容体解析の結果、2 種類の異なる親和性の EGF 受容体 (EGF-R) と単一の高親和性の FGF, TGF β 受容体をそれぞれ有していた。EGF-R は $K_d=9.5 \times 10^{-10}$ M の高親和性、 $K_d=6.5 \times 10^{-8}$ M の低親和性 EGF-R が存在し受容体数は約 80,000 個で

あった。EGF の M-SG α 細胞に対する最大増殖促進濃度は高親和性 EGF-R の K_d とほぼ一致していた。FGF 受容体は $K_d=3.3 \times 10^{-10}$ M で受容体数 10,000 個、TGF β 受容体は $K_d=1.6 \times 10^{-10}$ M で受容体数 3,000 個であった。

以上の結果から、M-SG α 細胞株は造腫瘍性を持たず、*in vitro* において正常マウス顎下腺上皮細胞の性質を維持していることがあきらかとなった。さらに、EGF および FGF は、positive regulator として、TGF β_1 は negative regulator として M-SG α に働いていることが示唆された。同細胞は正常上皮細胞の増殖、分化の研究に非常に有用性が高く、また血清中の未知の上皮細胞増殖抑制因子の精製のための標的細胞、さらに新しいヒトオンコジンを検索するために NIH3T3^{49,50)} などに変わる標的細胞としても非常に有用性が高いと考えられる。

結 語

本研究により、次の結論を得た。

1. 初代より無血清培地を用いることにより、正常マウス顎下腺由来上皮細胞株 M-SG α を樹立した。同細胞は平成元年11月25日現在で継代 88 回目、PDL 530 で初代培養より約 26 か月経過している。継代数が進行しても細胞倍加時間はほぼ 24 時間と安定した増殖を示した。

2. 各種唾液腺マーカーの検索により M-SG α は導管細胞の性格を有しており、高カルシウム培地で EGF を添加することにより大型の細胞に特異的にアミラーゼ陽性所見が得られた。また大部分の細胞がマウス EGF を発現しており、*in vivo* における顆粒膨大部導管細胞の性質をもっていることが示唆された。

3. 染色体数は、培養初期ではほぼ 2 倍体にモードを示していたが、継代の進行に伴い 2 倍体細胞は約 50% に減少し 3 倍体細胞の増加を認めた。しかし、ヌードマウスにおいて造腫瘍性を認めなかった。

4. M-SG α 細胞には 2 種類の親和性の異なる EGF 受容体と単一の親和性の高い FGF, TGF β 受容体が存在していた。

5. EGF あるいは FGF は濃度依存的に著明に M-SG α の増殖を促進し、これらの効果は継代数が増加しても変化しなかった。また、唾液腺上皮細胞の増殖のために EGF ならびに FGF が必須因子であることがあきらかとなった。さらに EGF は増殖と分化、FGF は増殖のみを促進していた。

6. 血清および TGF β は濃度依存的に著明に M-SG α の増殖を抑制した。しかし 56°C、30 分熱処理した血清の増殖抑制活性は消失したことから、血清中に TGF β と異なる熱に不安定な未知の上皮細胞増殖抑制因子が存在することが示唆された。

引用文献

- 1) Heldin, C.-H., Westermark, B., et al.: Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* 37: 9-20 1984.
- 2) Sporn, M.B. and Todaro, G.J.: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 303: 878-880 1980.
- 3) Sporn, M.B. and Roberts, A.B.: Autocrine growth factors and cancers. *Nature* 313: 745-747 1985.
- 4) Todaro, G.J., De Larco, J.E., et al.: Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. *Nature* 264: 26-31 1976.
- 5) Hendler, F.J. and Ozanne, B.W.: Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest.*: 647-651 1984.
- 6) Salomon, D.S., Perroteau, I., et al.: Loss of growth responsiveness to epidermal growth factor and enhanced production of alpha-transforming growth factors in ras-transformed mouse mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 130: 397-409 1987.
- 7) Cairns, J.: Mutation, selection and natural history of cancer. *Nature* 225: 197-200 1975.
- 8) Holley, R.W. and Kierman, J.A.: Contract inhibition of cell division in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 60: 300-304 1968.
- 9) Armelin, H.A.: Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2702-2706 1973.
- 10) Heldin, C.-H., Westesson, A., et al.: Interaction of platelet-derived growth factor with its fibroblast receptor. *J Biol Chem* 257: 4216-4221 1982.
- 11) Ross, R., Glomset, J., et al.: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 1207-1210 1974.
- 12) De Larco, J.E. and Todaro, G.J.: Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4001-4005 1978.
- 13) Roberts, A.B., Anzano, M.A., et al.: Purification and properties of a type β transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 22: 5692-5698 1983.
- 14) Barnes, D. and Sato, G.: Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22: 649-655 1980.
- 15) Barnes, D. and Sato, G.: Methods for growth of culture cells in serum-free medium. *Anal Biochem* 102: 255-270 1980.
- 16) Tsao, M.C., Walthall, B.J., et al.: Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J Cell Physiol* 110: 219-229 1982.
- 17) Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562 1962.
- 18) Levi-Montalcini, R.: The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162 1987.
- 19) Bartocci, A., Pollard, J.W., et al.: Regulation of colony-stimulating factor 1 during pregnancy. *J Exp Med* 164: 956-961 1986.
- 20) Clemons, G.K., De Manincor, D., et al.: Immunoreactive erythropoietin studies in hypoxic rats and the role of the salivary glands. *Exp Hematol* 15: 18-23 1987.
- 21) Byyny, R.L., Orth, D.N., et al.: Epidermal growth factor: effects of androgen and adrenergic agents. *Endocrinology* 95: 776-782 1974.
- 22) Murphy, R.A., Watson, A.Y., et al.: The mouse submandibular gland: an exocrine organ for growth factors. *J Histochem Cytochem* 28: 890-902 1980.
- 23) Sato, J.D., Kawamoto, T., et al.: Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8. 653 mouse myeloma cells for growth *in vitro*. *J Exp Med* 165: 1761-1766 1987.
- 24) Myoken, Y., Okamoto, T., et al.: An alternative method for the isolation of NS-1 hybridomas using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 477-480 1989.
- 25) Crabb, J.W., Armes, L.G., et al.: Characterization of multiple forms of prostatropin from bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 1155-1161 1986.
- 26) Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N.Y. Acad Sci* 51: 660-672 1949.
- 27) Marcante, M.L.: On the *in vitro* behavior of mouse submaxillary gland cells. *J Cell Sci* 13: 441-445 1973.
- 28) Kanamura, S. and Barka, T.: Short term culture of dissociate rat submandibular gland cells. *Lab Invest* 32: 336-372 1975.
- 29) Oliver, C.: Isolation and maintenance of differentiated exocrine gland acinar cells *in vitro*. *In Vitro* 16: 297-305 1980.
- 30) 井上秀夫, 小西洋太郎, 他: 培養ラット耳下腺ホルモン応答性に関する研究. *歯基礎誌* 24: 370-378 1982.
- 31) Kaighn, M.E., Camalier, R.F., et al.: Spon-

- taneous establishment and characterization of mouse keratinocyte cell lines in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 845-854 1988.
- 32) Yang, J., Flynn, D., et al.: Growth in primary culture of mouse submandibular epithelial cells embedded in collagen gels. *In Vitro* 23: 435-442 1982.
 - 33) Rall, L.B., Scott, J., et al.: Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313: 228-231 1985.
 - 34) Okamoto, T., Myoken, Y., et al.: Purification and characterization of heparin binding growth factor from mouse submandibular glands. (in preparation)
 - 35) Gospodarowicz, D.: Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-127 1974.
 - 36) Gospodarowicz, D.: Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* 250: 2515-2520 1975.
 - 37) Gospodarowicz, D.: Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem* 253: 3736-3743 1978.
 - 38) Maciag, T., Hoover, G.A., et al.: High and low molecular weight forms of endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* 257: 5333-5336 1982.
 - 39) Maciag, T., Nemore, R.E., et al.: An endocrine approach to the control of epidermal growth: serum-free cultivation of human keratinocyte. *Science* 211: 1452-1454 1981.
 - 40) Halaban, R., Langdon, R., et al.: Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol* 107: 1611-1619 1988.
 - 41) O'Keefe, E.J., Chiu, M.L., et al.: Stimulation of growth of keratinocytes by basic fibroblast growth factor. *J Invest Dermatol* 90: 767-769 1988.
 - 42) Loo, D.T., Fuquay, J.L., et al.: Extended culture of mouse embryo cells without senescence: Inhibition by serum. *Science* 236: 200-202 1987.
 - 43) Hennings, H., Michael, D., et al.: Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19: 245-254 1980.
 - 44) McGrath, C.H. and Soule, H.D.: Calcium regulation of normal human mammary epithelial cell growth in culture. *In Vitro* 20: 652-662 1984.
 - 45) Gresik, E.W. and Barka, T.: Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. *J Histochem Cytochem* 25: 1027-1035 1977.
 - 46) Gresik, E.W.: Postnatal developmental changes in submandibular glands of rat and mice. *J Histochem Cytochem* 28: 860-870 1980.
 - 47) Hoshi, H. and McKeethan, W.L.: Isolation growth requirements, cloning, prostacyclin production and life-span of human adult endothelial cells in low serum culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 22: 51-56 1986.
 - 48) 尾崎輝彦, 藪本正文, 他: ヒト正常唾液腺上皮細胞の無血清培養 (抄). *日口外誌* 34: 2793 1988.
 - 49) Owen, R.D. and Ostrowski, M.C.: Rapid and selective alterations in the expression of cellular genes accompany conditional transcription of Ha-v-ras in NIH3T3 cells. *Mol Cell Biol* 7: 2512-2520 1987.
 - 50) Egan, S.E., McClarty, G.A., et al.: Expression of H-ras correlates with metastatic potential: evidence for direct regulation of the metastatic phenotype in 10T1/2 and NIH3T3 cells. *Mol Cell Biol* 7: 830-837 1987.