口蓋原発悪性黒色腫由来の初代培養細胞の性状について

吉川 文弘・墨 哲郎・大西 徹郎
岩井 聡一・作田 正義Character of primary culture cells derived from
oral malignant melanomaFumihiro YOSHIKAWA・Tetsurou SUMI・Tetsuo OHNISHI
Souichi IWAI・Masayoshi SAKUDA

Abstract: Establishment of human cultured cell line derived from metastatic lymph node of malignant melanoma originating in the hard palate is reported. It's cell line was named HM 162 and was nearly spindle shaped. The cells were melanotic in the early stage but became amelanotic in the late stage of the culture. But the cell produced melanin along with 0.1% of L-DOPA for several hours.

HM 162 cells secreted a factor into the culture medium which stimulated their own growth.

Such a factor may be contributed, to some extent to the high malignancy of malignant melanoma.

Key words: malignant melanoma (悪性黒色腫), primary culture cell (初代培養細胞), growth factor (増殖因子)

緒 言

悪性黒色腫は、メラノサイトに由来する悪性腫瘍である。周囲組織への強い浸潤性増殖能と他臓器への高い転移巣形成能を有しているために、最も悪性度の高い腫瘍の1つとされている^{1,2)}。特にその高転移能は、臨床の場において治療を困難にしている大きな因子である。

今回、筆者らはヒト悪性黒色腫細胞を頸部リンパ節転移巣より分離し、株細胞化することに成功したので(以下 HM 162 細胞と記す)、若干の知見とともに報告する。

実験材料および方法

1. 患 者

大阪大学歯学部口腔外科学第2講座

(主任: 作田正義教授)

Second Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Osaka University (Chief: Prof. Masayoshi Sakuda)

受付日: 平成3年6月24日

56歳 男性。

右側硬口蓋部の刺激痛を主訴として昭和63年7月■日に当科に来院した。原発巣は右側硬口蓋部(6~3|部)であった。7月■日に原発腫瘍切除術(上顎骨部分切除術)、および右側全頸部郭清術を施行した。病理組織診断の結果は悪性黒色腫であり、右側頸部リンパ節(レベルI, II)に転移が認められた。術後に化学療法(DAV療法)を2クール行い、以後継続的にOK-432を投与しつつ経過観察を行った。

平成元年5月■日の定期観察の際に左側顎下リンパ節に転移と思われる腫瘤を認めたため、6月■日に左側全頸部郭清術を施行した。術後に化学療法(DAV療法)を2クール行った。その後も経過観察を継続しつつ3~4か月おきに化学療法(DAV療法)を施行していたところ、上顎および頸部には再発を認めなかったが、全身に広範囲に転移をきたし、平成2年4月■日に死亡した。

2. 腫瘍材料

初回時および2度目の手術の際の頸部リンパ節で転移巣と考えられるもの、すなわち黒い着色の認められるリンパ節を初代培養の材料として用いたが、2度目の手術の際のリンパ節において初代培養に成功したので、株細胞化を試みた。

写真1 転移リンパ節の組織像 (H-E 染色, 200倍).

なお、残余の組織片より悪性黒色腫の転移巣であることを確認している (写真1)。

3. 培養方法

1) 培養液

Dulbecco MEM 培地 (DMEM・Sigma 社) に牛胎児血清 (FCS・GIBCO 社) を10%添加したものを用いた。

2) 培養方法

Explant-outgrowth 法³⁾を用いて腫瘍細胞を遊出させた。すなわち、得られた転移リンパ節をリン酸緩衝液 (PBS(-)) 中で洗浄後に 3~4 mm 角の大きさに細切りし、90 mm プラスチックディッシュ (Corning 社) の底面に静置し、上記培養液を1滴滴下した後に 5% CO₂・37°C のインキュベーター内に静置した。24時間後に 12 ml の上記培養液を加え、さらに3週間静置培養し、腫瘍細胞が十分に遊出した後に継代培養に移行した。すなわち 0.05% トリプシン (阪大微生物研究所) + 0.02% EDTA (石津製薬) を含む PBS (-) を用いて細胞をプラスチックディッシュの底面より遊離させた後に、DMEM+10% FCS を用いて継代培養を行った。

3) 培養細胞の単離

継代培養に移行してから約7か月後、培養15代目の細胞に対して2層軟寒天培養法⁴⁾を用いてクローニングを行った。すなわち、35 mm プラスチックディッシュに 0.6% の寒天を含む DMEM 2 ml を加え、固まった後に 0.3% の寒天を含む DMEM 1 ml 中に 10³ 個の腫瘍細胞を懸濁させたものを重層させて培養した。2~3週後に形成されたコロニーをパスツールピペットを用いて分離し、プラスチックディッシュ上で培養し増殖させた。

4. 培養上清 (Conditioned Medium・CM) の採取

培養増殖させた HM 162 細胞 (90 mm ディッシュ) が飽和状態になった時点で培養液を除去し、PBS (-) にて洗浄した後に血清無添加の DMEM を 12 ml 加

え、96時間培養した培養上清を CM として用いた。

5. DNA 合成の測定

³H-サイミジンの取り込みを指標として DNA 合成を測定した⁵⁾。2×10⁴ 個/ml の HM 162 細胞を 17 mm ディッシュ (24穴) に接種し、48時間培養した。その後、種々の濃度の CM を含んだ血清無添加の DMEM に培地を交換し、同時に 1 μCi の ³H-サイミジンを加え8時間培養した。培地を除去した後に 4°C の PBS (-) およびトリクロ酢酸で洗浄し、4°C のメタノールで脱水した後に 1 N NaOH を 1 ml 加えて溶解した。そのうちの 0.4 ml にシンチレーション液を加え、液体シンチレーションスペクトロメーター (LBK) により放射活性を測定した。さらに Bradford の方法に準じて各ディッシュのタンパク量を測定し⁶⁾、各ディッシュについて 1 ml あたりの ³H-サイミジンの取り込みを算定して DNA 合成の指標とした。なお1グループは6ディッシュの平均とした。

結 果

1. 初代細胞の増殖状態

初代培養を開始して14日目ごろから、組織片の周囲への細胞の遊出が認められた。

2. 継代培養への移行

初代培養後27日目に1回目の継代培養を行った。細胞形態はほぼ紡錘形であったが、かなり不整であった。以後約2週間おきに継代培養を行った。

3. クローニング

12代目の継代培養細胞に対して2層軟寒天培養法を用いてクローニングを行ったところ、4週間後に約30%の細胞がコロニーを形成した。コロニーは白色で周囲に細胞の浸潤が認められた (写真2)。コロニーをパスツールピペットで分離してさらに継代培養を行ったが、クローニング後の細胞は紡錘形であり、ほぼ均一な形態を示していた (写真3)。

4.メラニン産生態

転移リンパ節より摘出した培養材料は黒色を呈し、メラニンの存在を示していた。また、組織片から遊出した初代細胞もメラニンを含有し著明な黒色を呈していた。しかしながら継代培養をくり返すうちにメラニンを含まない無色の細胞が出現し、しだいにその比率が増加していった。軟寒天中で形成されたコロニーはすべて白色であり、以後の継代培養細胞はメラニンを全く含んでいなかった。

初代細胞からクローニング後の継代培養細胞にいたるまで培養液中には、メラニンの放出は全く認められなかった。しかしながらクローニング後の継代培養細胞の培養液中に 0.1% の L-DOPA を添加すると数時間内にメラニンを旺盛に産生した。

写真 2 2層軟寒天培養法により形成された HM 162 細胞のコロニー (40倍).

写真 3 HM 162 細胞の位相差顕微鏡像 (400倍).

図 1 CM 中の増殖促進因子による DNA 合成促進効果 (Mean ± S.E., n=6).

5. HM 162 細胞の培養上清中に存在する DNA 合成促進因子について

CM 中に HM 162 細胞に対する DNA 合成促進因子が存在するか否かについて検討した。すなわち、飽和状態になる直前の HM 162 細胞の培養液を除去し、0～50%の各段階の CM を含む血清無添加の DMEM を加え、HM 162 細胞自身の DNA 合成の状態を検討したところ、50% CM の添加によって明確な DNA 合成促進効果が認められた。すなわち HM 162 細胞は自己分泌性に自己の細胞の増殖を促進させるような因子を放出していることがあきらかとなった (図1)。

考 察

口腔領域に発生する悪性腫瘍のなかで、悪性黒色腫は周囲組織への強い浸潤性増殖能と他の臓器への高い転移巢形成能を有しているために最も悪性度の高い腫瘍の1つとされており、扁平上皮癌などに比して予後はかなり不良である。

その高い悪性度に関与している因子を解明するために多大な努力がなされてきたが、いまだに多くの不明な点が残されている。

このようなメカニズムを解明する1つの方法として腫瘍細胞を *in vitro* において培養細胞化し、その有している特性を調べる方法がある。実際、悪性黒色腫細胞を培養細胞化した報告はいくつかあるが、形態面での検査が中心に行われていた⁷⁾。しかしながら、培養細胞化された細胞は生化学的因子の検索においても有効である。特に腫瘍細胞の放出している因子などを検索する手法として有力である。そこで筆者らは培養細胞化した悪性黒色腫 (HM 162 細胞) を用いて生化学的検索を行うことを目的として悪性黒色腫細胞の培養細胞化を試みた。

一般に悪性黒色腫由来の細胞においては、メラノソームの数と細胞増殖との間には反比例の傾向がある⁸⁾とされており、口腔悪性黒色腫の頸部転移巣由来の継代培養細胞においても同様の報告がなされている⁹⁾。HM 162 細胞の場合も、培養開始直後には色素性であったが、増殖が活発化すると同時に黒化の程度が減少し、クローン化の後には無色素性となった。しかしながら、クローン化の後の無色素性になった HM 162 細胞に対し、0.1% の L-DOPA を培養液中に添加すると数時間内にメラニン色素を旺盛に産生した。すなわち HM 162 細胞が無色素性となっても DOPA オキシダーゼは有しているものと思われる。

悪性腫瘍細胞は自己分泌能により自己の増殖に必要な因子を産出していることが知られており¹⁰⁾、そのため培養時に血清が存在しなくても増殖することが可能であるとされている。著者の1人である吉川もウサギ VX₂ 癌細胞の放出する自己増殖因子について報告している⁹⁾。

悪性黒色腫は非常に強い浸潤性増殖能と旺盛な転移巣形成能を有している。したがって、悪性黒色腫由来の HM 162 細胞にもそれらの形質を支える何らかの生化学的要因を有している可能性が考えられたので、その可能性について検討を加えた。その結果、先に示した結果のごとく、50% CM の添加によってあきらかな DNA 合成促進効果が認められた。すなわち HM 162 細胞は自己分泌性に自己増殖促進因子を放出していることがあきらかとなった。腫瘍細胞自身が自己増殖促進因子を放出していることによって、悪性腫瘍の原発巣における周囲への浸潤性増殖がより効果的になされるということは十分に可能性があると思われる。また原発巣から離脱した腫瘍細胞が標的臓器に着床した後、転移巣を形成する過程においても自己増殖促進因子は有効に働くものと考えられる。以上のような点より、HM 162 細胞の放出している自己増殖促進因子は、悪性黒色腫が生体内において発現する強い浸潤性増殖能と高い転移形成能を形成する1つの要因である可能性が考えられた。それに加えて、その他にも運動能促進因子や宿主免疫能阻害因子などの形質発現促進因子の存在の可能性が考えられる。今後、これらの因子の検索を行い、その性状をあきらかにすることによって悪性黒色腫の有している高い悪性度を

成立せしめているメカニズムの解明の可能性も考えられる。

結 語

今回われわれは口蓋原発悪性黒色腫の頸部リンパ節転移巣より腫瘍細胞を分離し、培養細胞化することに成功した。細胞の形態はほぼ紡錘形であり、培養初期には細胞内にメラニン含有していたがクローニング後には細胞内のメラニンは消失した。同細胞は培養上清中に自らの DNA 合成を促進する因子を放出していた。そのような因子は自らの増殖に対して効果的に作用することが想像され、悪性黒色腫の有する高い悪性度に貢献している可能性が考えられる。

本論文の要旨は、第35回日本口腔外科学会総会(岡山)において発表した。

引 用 文 献

- 1) Ronald, P.R., Loren, E.G., et al.: Primary malignant melanoma of the oral cavity. *Cancer* 55: 1543-1551 1985.
- 2) Shafer, W.G., Hine, M.K., et al.: A textbook of oral pathology. 4th Ed, W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1983, p 133-137.
- 3) Jensen, F.C., Gwatkin, R.B.L., et al.: A simple method which allows simultaneous isolation of specific types of cells. *Exp Cell Res* 34: 440-447 1964.
- 4) Shirasuna, K., Watatani, K., et al.: Isolation and characterization of different clones including myoepithelial-like variants from a clonal neoplastic epithelial duct cell line of human salivary gland origin. *Cancer Res* 46: 1418-1426 1986.
- 5) 吉川文弘: VX₂ 癌細胞の運動性に関する細胞生物学的および生化学的研究. *阪大歯誌* 30: 87-109 1985.
- 6) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254 1976.
- 7) 田中信幸, 結城勝彦, 他: 口腔悪性黒色腫由来初代培養細胞の微細構造. *日口外誌* 40: 1-10 1991.
- 8) Hu, F., Mah, K., et al.: Electron microscopic and cytochemical observation of the theopyllin and melanocyte-stimulating hormone effects on melanoma cells in culture. *Cancer Res* 42: 2786-2791 1982.
- 9) 乾 真澄可, 田川俊郎, 他: 口蓋悪性黒色腫原

- 発巢・転移巣より分離された細胞株の樹立と性状, 口科誌 38: 121-130 1989.
- 10) 米田俊之, 北村昌也, 他: 腫瘍増殖の調節機

構, I. プロスタグランディンによる VN₂ 腫瘍細胞の増殖促進作用, 日口外誌 28: 1425-1432 1982.