転移口腔小細胞癌より樹立した細胞株 (KM-4) の性状

— 扁平上皮癌への変化 —

伊田 正道・葛山 司・井上 敬・辻 龍雄

篠崎 文彦・木村 由香*・村上 知之*

Characterization of a new cell line (KM-4) established from metastatic small cell carcinoma of the oral region

— Transformation to squamous cell carcinoma —

Masamichi IDA・Tsukasa KUZUYAMA・Takashi INOUE・Tatsuo TSUJI

Fumihiko SHINOZAKI・Yuka KIMURA*・Tomoyuki MURAKAMI*

Abstract: We have established a new cell line derived from a small cell carcinoma of the gingiva which supposedly metastasized from lung cancer. We examined its biological characteristics by flow cytometry (FCM), fluorescence in situ hybridization (FISH) using DNA specific probes, and immunohistochemical staining of neuron specific enolase (NSE). The original tumor cells consisted of middle-sized cells and showed NSE positive immunostaining. The DNA indexes (DI) measured by FCM, showed peaks at 1.1 and 1.6, both of which indicated DNA aneuploidy. After being transplanted to nude mice, the tumor cells became larger and showed intercellular bridges and less keratinization similar to squamous cell carcinoma cells. Although the transplanted tumor cells underwent morphological changes to squamous cell carcinoma-like cells, they maintained their original characteristics as indicated by NSE positive immunostaining. DI of the cell line was about 1.3 and chromosomal analysis revealed that the modal chromosomal number was 48. Numerical chromosome aberrations were detected by FISH methods using centromere-specific DNA probes against chromosomes 1, 4, 11, 17, and trisomy of chromosome 17 tended to be higher than other chromosomes in this cell line.

Key words: established cell line (樹立細胞株), small cell carcinoma (小細胞癌), squamous cell carcinoma (扁平上皮癌)

緒 言

小細胞癌は肺に発生することが多く、肺癌は組織学的に扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、大細胞癌に分けられるが、小細胞癌の占める割合はおおよそ約15~20%と比較的少ない。また口腔原発ないし口腔へ転移した小細胞癌

は非常にまれであり、われわれは肺に原発した小細胞癌が口腔へ転移したと思われる症例を経験したのですでに報告している¹⁾。現在ヒト癌の *in vitro* の実験系で培養細胞株を使用することが多く、多数の細胞株が作製、応用されているが肺癌の樹立細胞株については1955年のFrischら²⁾の腺癌細胞株に始まり、その後各組織型の細胞株が樹立されている。今回われわれは前述の症例の口

山口大学医学部歯科口腔外科学講座
(主任：篠崎文彦教授)

* 山口大学医学部第2病理学講座
(主任：高橋 学教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Yamaguchi University School of Medicine.,

(Chief: Prof. Fumihiko Shinozaki)

* Second Department of Pathology, Yamaguchi
University School of Medicine., (Chief: Prof.
Manabu Takahashi)

受付日：平成5年5月6日

腔転移腫瘍部より採取した小細胞癌細胞を継代培養し、扁平上皮癌の組織像を呈する細胞株 (KM-4) を樹立したのでその細胞株の性状について報告する。

実験材料および方法

1. 材料

標本は50歳男性の下顎歯肉有茎性腫瘍より採取した。生検標本の H-E 染色では円形ないし紡錘形で均一なクロマチンを有する中型の細胞が充実性の胞巣を形成して増殖し (写真1), 小細胞癌ないし未分化扁平上皮癌の所見を呈していたが, 最終的に小細胞癌の腫瘍マーカーで

写真1 口腔腫瘍の組織像 (H-E 染色)

ある neuron specific enolase (NSE) 免疫組織染色が陽性であることから小細胞癌と診断された (写真2)。

2. 培養方法

採取した腫瘍をハサミにて細切し, 24穴マルチプレートにて初代培養した。培養は5%牛胎児血清を加えたハム F-12 とダルベッコ変法イーグル MEM の等量混合培地 (日本製薬) を使用し, 37°C, 5%CO₂ 下に培養した。細胞はプレートの底面に付着して増殖し, その1穴を 0.05%トリプシン-EDTA にて分散し継代培養した。また3代目以降はティッシュカルチャーフラスコ (ファルコン3013) に変更した。

3. ノードマウス移植

60代の継代細胞を分散後, トリパンブルー染色を行い血球計算板にて生細胞を算定し, ノードマウス (BALB/C, nu/nu) の背部皮下に 3×10^6 個の細胞を移植して, その移植性を検討した。

4. NSE 染色

培養細胞はスライドグラス上で培養し70%エタノール固定, ノードマウス移植腫瘍はホルマリン固定後 4 μm で薄切し, 染色を行った。まず 0.03% H₂O₂ 加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ阻害処理を行った後, PBS 洗浄し, 10%正常ヤギ血清によるブロッキングを室温で10分間行った。そして抗 NSE 抗体 (Dako 社希釈抗体) を60分間反応させ, PBS 洗浄し, 抗マウス IgG 抗体 (Dako 社希釈抗体) を30分間反応させた。PBS 洗浄し Avidin Biotin Complex (ABC, Vector Elite ABC Kit) 反応を30分間行った後, DAB 発色を行い, 対比染色はマイヤーのヘマトキシリンを使用した。

写真2 口腔腫瘍の NSE 染色陽性像 (左側はネガティブコントロール)

写真 3 50代継代培養細胞の位相差顕微鏡像

図 1 増殖曲線

5. 倍加時間の測定

継代50代の細胞を用い、 10^5 個の細胞をティッシュカルチャーフラスコ (ファルコン3013) にて培養し、トリパンブルー染色で生細胞数を24時間ごとに8日間トーマの血球計算板で測定した。

6. フローサイトメトリー (FCM) による核 DNA 量の測定

生検標本はハサミにて細切後、0.2% トライトンXにて裸核化。培養細胞は分散後70%エタノールで固定。50 μ m ナイロンメッシュで濾過し RNase で処理しプロピディウムアイオダイド (20 μ l) で核染色後、フローサイトメーター (FACSscan Becton Dickinson 社) にて DNA 量を測定した。また検体にヒト正常リンパ球をコントロールとして加え、検体の2倍体のチャンネル数とコントロールの2倍体のチャンネル数の比で DNA Index (DI) を算出した。

写真 4 スードマウス移植腫瘍

写真 5 扁平上皮癌所見を呈する移植腫瘍 (H-E 染色)

7. 染色体分析

細胞をスライドガラス上で培養し、0.02 μ g/ml のコルヒチンを加え2時間培養した後、低張液 (0.075M 塩化カリウム: 0.8% クエン酸ナトリウム=1:2) で処理し、酢酸メタノール液 (メタノール: 氷酢酸=3:1) で固定後ギムザ染色を行った。染色体数は100個の細胞について算定した。

8. fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による染色体分析

1, 4, 11, 17番染色体について検索した。まず前述の染色体分析の方法で標本を作製し、37°C、0.01% アクチナーゼ2000で蛋白を分解後、Pinkelの方法³⁾に従い FISH 染色した。すなわち、Denaturing solution (70% Formamide/2×SSC, pH 7.0) で2分間単鎖化処理し、エタノール固定 (0°Cで70%, 85%, 100%に各3分) を行い、乾燥。その後のホット 37°C プレート上で各染色体のプロブを単鎖化した hybridization mixture 10 μ l を滴下し、37°C の湿屋中に一晩ハイブリダイズした。翌日 PN buffer で洗浄し、FITC アビジンとビオチン化アビジンで可視化した後、蛍光顕微鏡でシグナル数を計数した。

写真 6 培養細胞のNSE染色（左側はネガティブコントロール）

写真 7 移植腫瘍のNSE染色（左側はネガティブコントロール）

結 果

1. 培養状態

初代培養では24穴中数個に線維芽細胞の増殖がみられたが、数個のウェルは線維芽細胞はなくプレート底面に付着して敷石状に増殖する細胞を認めた。これを分散し

継代培養したが、当初細胞の増殖は遅く、継代をかさねていくに従い増殖速度は速くなり、5代を継代するころには安定した増殖を示すようになった。現在100代以上を継代しているが単層敷石状形態を呈し、安定した増殖をしている（写真3）。

2. 倍加時間

細胞の増殖曲線は遅延期の後、7日目までは対数増殖

図 2 染色体分布

図 4 FISH による染色体分布

図 3 FCM による核 DNA 量

左：口腔腫瘍 中：継代60代 右：継代70代
(矢印は DNA aneuploidy とその DI)

本中に 2 個の DNA aneuploidy すなわち multiploidy がみられ、その DI は 1.10 と 1.60 であった。継代培養中の DI の変化をみるために培養 60 代と 70 代の DI を測定したがそれぞれ 1.32 と 1.29 で、ほとんど変化は認められず安定していた (図 3)。

7. FISH による染色体分析

4 種の染色体を検索した結果、1, 4, 11 番染色体は正常の 2 個のシグナルが約半数を占め、次いで 1 個の順であったが、17 番では他の染色体と異なり 2 個は 35.2% と低く、1 個 (monosomy) が逆に 42% と高値であり、特に 3 個 (trisomy) が 13% と他の染色体に比べ多い傾向にあるのが特徴的であった (図 4)。

考 察

肺癌の培養細胞株の樹立は Frisch ら²⁾ による腺癌細胞株に始まり、大星ら⁴⁾ による 1978 年の国内における細胞株の集計ではヒト癌細胞株 149 例中肺癌由来のものは 27 株で、小細胞癌細胞株は 4 例であったが、現在はかなり増えているものと思われる。小細胞癌培養細胞の増殖形態は一般的に細胞集塊あるいは単離細胞として浮遊増殖することが多いようである⁵⁻¹⁰⁾。Carney¹⁰⁾ は肺小細胞癌には heterogeneity が存在し、生物学的に非小細胞癌と重複した性格を有すると報告しているが、小細胞癌は培養系でも多様性を有しており、岸本ら⁵⁾ は中間細胞型の細胞株は浮遊増殖、燕麦細胞型はフラスコ底面に付着して重層性に増殖する 2 種類の細胞株を樹立し、また斎藤ら⁷⁾ は中間型細胞より樹立した細胞株で血清培地で培養したものはシート状に、無血清培地では単層と浮遊性に増殖する 2 種の細胞株を得ている。このように一般に静置培養では単層増殖する扁平上皮癌細胞とは増殖形態が異なっており、本細胞株が扁平上皮に化生したことは、前述のごとく小細胞癌は生物学的特性として多様性を有

を示し、それ以後コンフルエントな状態になるにつれて増殖は低下した。またその倍加時間は 25.3 時間であった (図 1)。

3. ノードマウス移植腫瘍の組織像

移植性は良好で (写真 4) 移植腫瘍の H-E 染色は充実性で結合組織はみられず、角化はあまり目立たないものの、原腫瘍と異なり胞体は大きくまた細胞間橋が認められ、組織学的に中等度ないしは低分化型扁平上皮癌の形態を呈していた (写真 5)。

4. NSE 免疫組織染色

培養細胞およびノードマウス移植腫瘍の両方を染色した結果、双方ともネガティブコントロールと比較して DAB 発色はあきらかに強く陽性と判断された。また NSE 産生能は継代培養中も失われることなく保持されていた (写真 6, 7)。

5. 染色体分析

染色体数は 37 本から 54 本の間広く分布しており正常の 2 倍体と比較的多い傾向にあった。もっとも多いものは 48 本の 19 個であり、次いで 46 本の 13 個、47, 49 本が同数の 10 個であった (図 2)。

6. FCM による DI の変動

原腫瘍の FCM による DNA ヒストグラムでは 1 標

し、他組織型への分化が起こりうることを示していた。

DNA aneuploidy は早期癌よりも進行癌にみられることが多く¹¹⁾、今回の FCM で原腫瘍標本内に DI が 1.10 と 1.60 の 2 個の DNA aneuploidy を認め、少なくともこの標本内には 2 個の stem cell すなわち DNA ploidy heterogeneity が存在することが示唆された。heterogeneity について佐々木ら¹²⁾は食道癌進行症例 23 例の摘出腫瘍の 5 か所を FCM にて分析し、その 87% に DNA aneuploidy を認めた。また 43.5% に腫瘍内 heterogeneity がみられたと報告しており、本症例が大きな転移口腔腫瘍であることから、腫瘍内に多数の stem cell が存在していたのではないかと考えられた。

悪性腫瘍と DI の関連は小賀ら¹³⁾が各種良性、悪性腫瘍の DNA aneuploidy を検索し、非癌病変では 75% が 1.24 付近にあるが、癌病変ではこれよりも高い傾向にあることを報告している。われわれの経験では特に 1.6 以上の腫瘍はほとんどが悪性腫瘍であった。また村上ら¹⁴⁾は DNA ヒストグラムを 5 型に分けてその V 型はほとんどが悪性腫瘍であると述べており、FCM 上この V 型の DNA ヒストグラムパターンを呈し、かつ DI が 1.6 以上であれば悪性腫瘍とほぼ断定してよいものと思われる。また本腫瘍の DI は 1.10 および 1.60 であったが、FCM における 60 代、70 代の培養細胞の DI は約 1.3 で DNA 量は安定しており、またこれは当教室で樹立した 3 種の扁平上皮癌細胞株の DI とほぼ一致していた。細胞株では約 1.3 に変化していたことは培養用の標本内に DI が 1.3 前後の stem cell が存在していた可能性は否定できないが、HeLa 細胞では 1.6 前後であることから、扁平上皮癌細胞株の DI は特異的に 1.3 付近で安定するものと推察される。

また今回の小細胞癌の確定診断に NSE 免疫染色が応用された。NSE は解糖系酵素であるエノラーゼのうち γ サブユニットを有するものをいい、神経組織の神経細胞と軸索突起に存在するが、それ以外にも下垂体、甲状腺、膵臓、副腎髄質などにも存在する。腫瘍マーカーとしては神経内分泌系腫瘍、筋原性腫瘍、一部の腺癌、髄膜腫、肝癌、リンパ腫などで陽性を示し、肺癌では腺癌、扁平上皮癌での陽性率はおおむね 10% 以下であるが、肺小細胞癌では NSE に 77% の陽性率を示す¹⁵⁾。本症例はこの NSE 染色陽性により確定診断を得たが、採取組織中に扁平上皮癌が部分的に混在していた可能性があることも完全には否定できない。しかし下里¹⁶⁾は小細胞癌培養株を脱脂血清培地で培養すると扁平上皮化を起こしケラチン蛋白が増量し、ビタミン A を添加すると消失して小細胞癌にもどり、またその際 NSE に対しては変化はみられず、培養条件の変化により形態変化を呈することを述べている。このことから本培養細胞も NSE に対しヌードマウス移植腫瘍も含めて陽性であることは、培養過程で NSE 産生能を保持したまま扁平上皮化した

ものと考えられる。

本培養細胞の染色体モードは 48 本が最も多く認められたが、Terasaki ら¹⁷⁾は肺小細胞癌培養細胞において血清培地と無血清培地における染色体の変化を検索し、血清培地で培養中の細胞を無血清培地で、また逆に無血清培地で培養中の細胞を血清培地に交えて培養するとその染色体モードが変化することを報告しており、培養細胞の染色体数は培養環境特に培養液により変化するようである。肺小細胞癌の染色体異常は 3 番染色体短腕、13 番染色体長腕、17 番染色体短腕の部分的欠損がみられるが、特に 17 番染色体には癌抑制遺伝子が存在しており注目されている。一般に染色体分析には分裂期細胞を必要とし、染色体数の変化や転座、欠失などの異常を検出するが、今回用いた FISH ではヒト染色体に対する特異的プローブを使用するため従来より使われているラジオアイソトープで標識したプローブを必要とせず、実験手技が簡便となり、また従来は観察できなかった間期細胞も対象となるようになった³⁾。本実験では 4 種の染色体数のみを検索したが 17 番染色体は他と異なり 1 個 (monosomy) と 3 個 (trisomy) の割合が多い傾向にあった。HeLa 細胞でも 17 番染色体のシグナルは多い傾向にあるが^{18,19)}、これは染色体の数を単に検出したものであり、その構造異常を表したものではないが、17 番染色体に発癌プロモーションの過程でなんらかの変化が起こっていることは十分考えられた。

結 語

肺小細胞癌の口腔転移が疑われた腫瘍細胞より細胞株を樹立した。

1. 培養細胞はフラスコ底面に付着してシート状に増殖し、ヌードマウス移植腫瘍は扁平上皮癌の形態を呈していた。
2. 培養細胞は扁平上皮癌へと分化していたが NSE 免疫組織染色は陽性であり、小細胞癌の特異性は維持されていた。
3. 染色体モードは 48 本が最も多く、FISH では 17 番染色体において 3 個のシグナルが多い傾向にあった。
4. FCM にて原腫瘍に DI が 1.1 と 1.6 の DNA aneuploidy がみられたことから DNA ploidy heterogeneity の存在が示唆され、また継代培養細胞の DI は 1.3 前後で安定していた。

引 用 文 献

- 1) 伊田正道、篠崎文彦、他：肺から転移したと思われる下顎歯肉小細胞癌の 1 例。日口外誌 39: 599-601 1993.
- 2) Frisch, W., Jentoft, V., et al.: A human epithelium-like cell (Maben) derived from an

- adenocarcinoma of lung. *Am J Clin Pathol* 25: 1107-1112 1955.
- 3) Pinkel, D., Straum, T., et al: Cyto-genetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938 1986.
- 4) 大星昇一, 関口守正: 付表 日本で維持されているヒト癌細胞培養株, 蛋白質 核酸 酵素 23: 291-305 1978.
- 5) 岸本信康, 大熨泰亮, 他: ヒト肺小細胞癌 5 株の培養樹立とそれらの性状について, 肺癌 24: 644 1984.
- 6) 平木俊吉, 宮井正博, 他: ヒト肺癌 (扁平上皮癌, 腺癌, 小細胞癌) 細胞株の樹立と異種移植, 肺癌 22: 53-58 1982.
- 7) 斎藤博明, 木村秀樹, 他: 無血培地における肺小細胞癌細胞の培養, 肺癌 26: 157-164 1986.
- 8) 藤吉康明: ヒト肺小細胞癌培養株 (KFS-1) の樹立, 久留米医学会雑誌 49: 1554-1571 1986.
- 9) Oboshi, S., Tsugawa, S., et al.: A new floating cell line derived from human pulmonary carcinoma of oat cell type. *Gann* 62: 505-514 1971.
- 10) Carney, D.N.: Biology of small-cell lung cancer. *Lancet* 339: 843-846 1992.
- 11) Hattori, T., Sugihara, H., et al.: DNA ploidy patterns of minute carcinomas in stomach. *Jpn J Cancer Res* 77: 276-281 1986.
- 12) Sasaki, K., Murakami, T., et al.: Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 68: 2403-2406 1991.
- 13) 小賀厚徳, 村上知之, 他: 良性腫瘍, 非腫瘍性病変にみられた DNA aneuploidy の検討および組織悪性診断への応用, *Cytometry Research* 1: 72-76 1991.
- 14) 村上知之, 佐々木功典, 他: DNA ヒストグラムのパターン分類を用いた悪性腫瘍の判定の試み, *FCM-CELL BIOLOGY* 2: 45-51 1990.
- 15) 飯島宗一, 石川栄世, 他: 現代病理学大系 9A, 中山書店, 東京, 1985, 210-216頁.
- 16) 下里幸雄: 肺小細胞癌の病理・生物学に関する最近の知見, 癌と化学療法 16: 2513-2521 1989.
- 17) Terasaki, T., Kameya, T., et al.: Interconversion of biological characteristics of small cell lung cancer depending on culture conditions. *Gann* 75: 1089-1099 1984.
- 18) 木村由香, 村上知之, 他: 染色体特異 DNA プロブを用いた fluorescence in situ hybridization (FISH) の染色法に関する研究—FCM による測定を試み—, *Cytometry Research* 2: 43-48 1992.
- 19) 山口広之, 田川 泰, 他: Fluorescent in situ hybridization を応用した 染色異数性異常の検出に関する検討, フローサイトメトリー 10: 43-47 1990.