原 著

ヒト胃印環細胞癌由来 KATO-III 細胞の
粘液産生に及ぼすヒト線維芽細胞の影響大阪府立成人病センター, 研究所第2部¹⁾, 研究所第4部²⁾実験病理研究室³⁾, 微細形態研究室⁴⁾, 箕面市立病院内科⁵⁾山本 玲子¹⁾ 飯石 浩康¹⁾ 竜田 正晴¹⁾ 中村 博行²⁾寺田 信行³⁾ 松坂 利彦⁴⁾ 田村 宏⁵⁾

スキルス胃癌細胞に及ぼす間質線維芽細胞の影響を明らかにするために, ヒト胃印環細胞癌由来細胞 (KATO-III 細胞) とヒト胎児肺由来線維芽細胞 (WI-38 細胞) を混合培養し, KATO-III 細胞の変化を形態学的に検討した。線維芽細胞と混合培養した KATO-III 細胞では, 単独培養時に比べ細胞径が増加し, 糖蛋白, 酸性ムコ多糖類を含む空胞をもつ細胞が著しく増加した。このような KATO-III 細胞の形態学的変化は, 線維芽細胞の conditioned medium で KATO-III 細胞を培養した時にも認められた。また, 混合培養で生じた KATO-III 細胞の形態学的変化は単独培養を行うと著減し, KATO-III 細胞に認められた形態学的変化は可逆的であることが明らかとなった。以上の結果は, 線維芽細胞の分泌する液性因子が³⁾, スキルス胃癌細胞に可逆的影響を及ぼす可能性を示唆している。

Key Words : Signet-ring cell carcinoma—KATO-III cells—Fibroblasts—Co-culture

I. 緒 言

スキルス胃癌は, 胃壁内で癌細胞がびまん性に浸潤し, 癌細胞周囲の線維性結合組織が著明に増加することの特徴とする胃癌である。スキルス胃癌では, 癌細胞は

腺管形成の傾向が弱く, しばしば粘液を多量に含む印環細胞となる。

スキルス胃癌での線維性組織増生の機序に関しては, 胃印環細胞癌由来細胞である KATO-III 細胞を用いていくつかの研究がなされており, 癌細胞の線維芽細胞に対する作用が重要な役割を果たしていることが報告されている^{1,7,9,10,17,20)}。赤尾ら¹⁾は, KATO-III 細胞の形成する細胞外基質は, 線維芽細胞の接着, 伸展, 増殖を促すことを報告している。また Naito ら¹⁰⁾, 辻¹⁷⁾は, KATO-III 細胞の分泌する液性因子は, 線維芽細胞の増殖およびコラーゲン合成を促進することを報告している。このようにスキルス胃癌細胞は, 自ら分泌した細胞外基質または液性因子を介して, 線維芽細胞に影響を与えると考えられる^{1,7,9,10,17,20)}。一方, 線維芽細胞や間質細胞外基質は, スキルス胃癌細胞自体に影響を与えることも考えられる。しかし, このことに関する研究は少ない。

われわれは, これまでに間質細胞外基質の一つである I 型コラーゲンのゲル上またはゲル内で KATO-III 細胞を培養した時, KATO-III 細胞の形態に著明な変化が起

Morphological changes of scirrhous carcinoma cell line of human stomach (KATO-III) induced by co-cultivation with human fibroblasts (WI-38)

Reiko YAMAMOTO¹⁾, C.T., I.A.C., Hiroyasu IISHI¹⁾, M.D., Masaharu TATSUTA¹⁾, M.D., Hiroyuki NAKAMURA²⁾, M.D., Nobuyuki TERADA³⁾, M.D., Toshihiko NATSUSAKA⁴⁾, M.D., and Hiroshi TAMURA⁵⁾, M.D.

Department of ¹⁾Gastrointestinal Oncology, ²⁾Tumor Biochemistry, ³⁾Experimental Pathology, and ⁴⁾Ultrastructural Research Laboratory, The Center for Adult Diseases, Osaka, 3-3, Nakamichi 1-chome, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan and ⁵⁾Minoo City Hospital, Osaka 562, Japan

論文別刷請求先 ☎537 大阪市東成区中道 1 の 3 の 3 大阪府立成人病センター研究所第2部 山本玲子

昭和 63 年 7 月 25 日受付

昭和 63 年 10 月 14 日受理

こることを報告し、間質細胞外基質が、スキルス胃癌細胞の形態に著しい影響を与える可能性を示した^{18,19)}。今回、われわれは、スキルス胃癌細胞に対する線維芽細胞の影響を線維芽細胞と KATO-III 細胞の混合培養の系を用い、形態学的手法で検討した。

II. 材料および方法

ヒト胃印環細胞癌由来細胞である KATO-III 細胞とヒト胎児肺由来の線維芽細胞である WI-38 細胞を用い、1) 混合培養、2) WI-38 細胞単独培養時の conditioned medium (細胞培養上清液)、3) KATO-III・WI-38 細胞混合培養時の conditioned medium が KATO-III 細胞の増殖および形態に及ぼす影響を光顕的および電顕的手法で検討した。

培養細胞：実験に用いた KATO-III 細胞および WI-38 細胞は、がん研究振興財団細胞バンク（東京）より分与された。KATO-III 細胞は、ヒト胃印環細胞癌に由来する細胞であり¹²⁾、WI-38 細胞は、ヒト胎児肺に由来する正常 2 倍体線維芽細胞である²⁾。

培養液：10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む Eagle's Minimum Essential Medium (Eagle's MEM, 日本製薬, 東京) および 10% FCS を含む MEM・Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Flow Lab., McLean, Virginia, U.S.A.) の等量混合培養液を用いた。

培養法：1) KATO-III 細胞と WI-38 細胞の混合培養：35 mm プラスチック皿上で WI-38 細胞と 10% FCS を含む MEM を用いて培養した。subconfluent (準飽和細胞密度) になった時 (細胞数 1.5×10^5 /培養皿) 培養液を除き、10% FCS を含む MEM・RPMI 1640 等量混合培養液で WI-38 細胞表面を 2 回洗浄した。その後 KATO-III 細胞 (細胞数 1.0×10^5 /培養皿) および 10% FCS を含む MEM・RPMI 1640 等量混合培養液を 3 ml 加え、37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で 4 日間培養した。

2) WI-38 細胞の conditioned medium を用いた KATO-III 細胞の培養：35 mm プラスチック皿上で WI-38 細胞を 10% FCS を含む MEM を用いて subconfluent の状態で培養し培養液を除去した。その後、10% FCS を含む MEM・RPMI 1640 等量混合培養液を 3 ml 加え、37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で 4 日間培養した。この培養液を 1,500 g, 20 分遠沈し、浮遊細胞成分を除き、conditioned medium を得た。KATO-III 細胞の培養には、この conditioned medium と 10% FCS を含む新鮮 MEM・RPMI 1640 等量混合培養液を等量に混合したものを用いた。培養液 3 ml を加えた 35 mm プラスチック皿上で KATO-III 細胞 (1.0×10^5 /培養皿) を 37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で 4 日間培養した。

ラスチック皿上で KATO-III 細胞 (1.0×10^5 /培養皿) を 37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で 4 日間培養した。

3) KATO-III 細胞と WI-38 細胞の混合培養時の conditioned medium を用いた KATO-III 細胞の培養：KATO-III 細胞と WI-38 細胞の混合培養は、混合培養の項で示したごとく行った。4 日間混合培養後、培養液を 1,500 g, 20 分遠沈し、浮遊細胞成分を除き、KATO-III 細胞と WI-38 細胞混合培養の conditioned medium を得た。35 mm プラスチック皿上で KATO-III 細胞 (1.0×10^5 /培養皿) を、上述の conditioned medium と 10% FCS を含む新鮮 MEM・RPMI 1640 等量混合液を等量に混合した培養液 3 ml 中で、37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で 4 日間培養した。

細胞増殖に関する検討：1) KATO-III 細胞の増殖に及ぼす線維芽細胞の影響：35 mm プラスチック皿上で subconfluent に達した WI-38 細胞上 (細胞数 1.5×10^5 /培養皿) に KATO-III 細胞 (2.0×10^4 /培養皿) と 10% FCS を含む MEM・RPMI 1640 等量混合培養液を 3 ml 加えた培養皿を 28 個用意した。対照として、プラスチック皿上に KATO-III 細胞と培養液を加えた培養皿を 28 個用意した。培養は 37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で行った。24 時間毎に連続 7 日間、各々 4 個ずつの培養皿の細胞数を算定した。細胞数の算定には、Bürker 血球計算板を用いた。

2) 空胞様構造形成細胞の増殖：KATO-III 細胞と WI-38 細胞を 4 日間培養した。その後、KATO-III 細胞を遠沈 (1,500 g, 20 分) によって回収した。プラスチック皿上にこの KATO-III 細胞を 2.0×10^4 /培養皿含む培養皿と、対照として、単独培養しておいた KATO-III 細胞を 2.0×10^4 /培養皿を含む培養皿各々 28 個作製した。56 個の培養皿に、10% FCS を含む新鮮 MEM・RPMI 1640 等量混合培養液を 3 ml ずつ加え 37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で培養を行った。24 時間毎に連続 7 日間、各々のグループ 4 個ずつの細胞数を Bürker 血球計算板を用い算定した。

光顕を用いた形態学的検討：1) 細胞の生存率：KATO-III 細胞浮遊液に等量の 0.1% Trypanblue (Merck 社製) を加え、Bürker 血球計算板を用い、500 個以上の細胞を観察した。不染細胞数と染色細胞数を算出し、不染細胞数の割合 (%) を求め、それをもって生存率とした。

2) 空胞様構造形成細胞数および PAS 染色陽性、コロイド鉄染色陽性細胞数：KATO-III 細胞を遠沈 (1,500 g, 20 分) し、細胞層をスライドガラス上に塗抹した。Karnovsky 液⁴⁾で固定後、PAS 染色、コロイド鉄染色を

施した, 1,000 個以上の細胞を調べ, 空胞様構造をもつ細胞数およびその空胞が PAS 染色, コロイド鉄染色陽性を示す細胞数を算出した。

3) 細胞の分裂指数: KATO-III 細胞を遠沈 (1,500 g, 20 分) し, 塗抹標本作製後, Karnovsky 液で固定し, PAS 染色を施した標本を用いた。空胞様構造形成細胞, 空胞様構造非形成細胞の各々, 500 個以上の細胞を調べ, 各々の核分裂指数を算出した。

4) 細胞径: 単独培養した KATO-III 細胞と KATO-III 細胞と WI-38 細胞との混合培養中の KATO-III 細胞の 3 日, 5 日, 7 日目の細胞を遠沈 (1,500 g, 20 分) し, スライドガラス上に塗抹した。Karnovsky 液で固定後, PAS 染色標本を作製した。これを写真撮影し, 100 個以上の細胞について長径, 短径を計測し, その平均値をもって細胞径とした。

電顕を用いた形態学的検討: KATO-III 細胞を遠沈 (1,500 g, 20 分) し, 培養液を除き, Karnovsky 液で 4°C , 60 分, 前固定した。0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) および 8% 蔗糖液で繰り返し洗浄した後, コロイド鉄染色液中に室温で 24 時間浸漬染色した。次いで 3% 酢酸水と 8% 蔗糖液で洗浄し, 1% 四酸化オスミウムで 4°C , 60 分間, 後固定した。型のごとく, 脱水, Epon 812 で包埋した後, 薄切し, JEM-100 CX 型電子顕微鏡 (日本電子, 東京) でコロイド鉄粒子の沈着を観察した。

統計処理: 統計学的有意差の検定は, Student-t 検定, χ^2 検定および一元配置分散分析の 3 方法を用いて行い, $P < 0.05$ をもって有意と判定した。なお, 数値はいずれも平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。

III. 成 績

1) 単独培養時および線維芽細胞との混合培養時の KATO-III 細胞の形態について: KATO-III 細胞を単独培養した時, 細胞の多くは浮遊したが, 一部の細胞はプラスチック皿上に付着し, 伸展した (図 1a)。これに対し, WI-38 細胞上で培養したすべての KATO-III 細胞は浮遊して増殖し, WI-38 細胞に付着する KATO-III 細胞は全く認められなかった (図 1b)。KATO-III 細胞は WI-38 細胞との混合培養により, 著しく大型化し, 混合培養 7 日目の KATO-III 細胞の平均細胞径は, $18.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$ に達し, 同期間単独培養した KATO-III 細胞の平均細胞径 $12.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ の約 1.5 倍であった (図 2a, b, 表 1)。図 3 に単独培養時と WI-38 細胞との混合培養時の KATO-III 細胞の増殖曲線を示している。混合培養時の KATO-III 細胞の増殖は, 5 日以降にわずかに減少した。

図 1 単独培養した KATO-III 細胞 (a) および WI-38 細胞と混合培養した KATO-III 細胞 (b)。単独培養では一部の細胞が培養皿上に接着しているが, 混合培養では, すべての KATO-III 細胞が浮遊している。培養 7 日目の位相差像, $\times 100$

2) KATO-III 細胞の空胞様構造形成および粘液産生に及ぼす線維芽細胞の影響について: KATO-III 細胞と WI-38 細胞との混合培養により KATO-III 細胞は細胞径の増加とともに細胞内に粘液を含む空胞が著しく増加した。単独培養時に比べ, 空胞をもつ細胞は約 5 倍となった。空胞をもつ細胞の中で PAS 染色陽性の細胞およびコロイド鉄染色陽性の細胞は, 単独培養時に比べ, それぞれ約 7 倍, 9 倍に有意に増加した (表 2)。図 4 は, PAS 染色陽性空胞をもつ細胞を, 図 5 は, コロイド鉄粒子の沈着する空胞をもつ細胞の電顕像を示す。

3) KATO-III 細胞の生存率および核分裂指数に及ぼす線維芽細胞の影響について: KATO-III 細胞の空胞様構造は, 混合培養により単独培養時の約 5 倍に増加した。しかし, 両培養時の KATO-III 細胞の生存率を比較すると, 各々 $89.7 \pm 0.7\%$ と $87.5 \pm 0.7\%$ で両者間に有意の差は認められなかった。一方, 核分裂指数は, 単独培養では空胞様構造形成細胞, 非形成細胞の間には有意差は認められなかったが, 混合培養時の KATO-III 細胞

図2 単独培養した KATO-III 細胞 (a) と WI-38 細胞と混合培養した KATO-III 細胞 (b). 混合培養した細胞は、単独培養時に比べ細胞径が著明に増加しており、また、空胞様構造をもつ細胞が増加している。培養7日目、 $\times 220$

表1 KATO-III 細胞と WI-38 細胞を混合培養し、3, 5, 7 日後に KATO-III 細胞の細胞径を計測した。a 平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=4$)。b $P<0.05$, 単独培養時の細胞径と比較 (一元配置分散分析)。

培養条件	細胞径 (μm) ^a		
	3日	5日	7日
KATO-III細胞 単独培養	11.2 $\pm$ 0.3	12.6 $\pm$ 0.6	12.3 $\pm$ 0.2
KATO-III細胞 WI-38細胞 混合培養	14.1 $\pm$ 0.6 ^b	15.5 $\pm$ 0.8 ^b	18.4 $\pm$ 0.6 ^b

では、空胞様構造形成細胞の核分裂指数は非形成細胞に比べ有意に増加していた (表3)。

4) KATO-III 細胞の空胞様構造形成および粘液産生に及ぼす線維芽細胞培養液の影響について: KATO-III 細胞の空胞様構造形成, PAS およびコロイド鉄染色陽性空胞の増加に及ぼす WI-38 細胞の conditioned medium の影響について検討した。WI-38 細胞単独培養時の

図3 WI-38 細胞の KATO-III 細胞の増殖に及ぼす影響。培養皿当たり、 2×10^4 個の KATO-III 細胞をプラスチック皿上 (●) で、また、WI-38 細胞上 (○) で培養した。培養開始後24時間毎に細胞数を算定した。* $p<0.05$, 単独培養時と比較 (χ^2 検定)

表2 KATO-III 細胞を単独に、また WI-38 細胞とともに7日間培養した。培養後空胞様構造をもつ細胞および PAS 染色陽性、コロイド鉄染色陽性空胞をもつ細胞数を算定した。a 平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=4$)。b $p<0.05$, 単独培養時の値と比較 (t-検定)

培養条件	空胞形成 細胞数 (%) ^a	PAS 染色 陽性細胞数 (%) ^a	コロイド鉄 染色陽性細胞 数 (%) ^a
KATO-III細胞 単独培養	5.6 $\pm$ 2.1	1.5 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1
KATO-III細胞 WI-38細胞 混合培養	25.6 $\pm$ 0.6 ^b	24.9 $\pm$ 0.8 ^b	8.7 $\pm$ 0.5 ^b

図4 PAS 陽性空胞をもつ KATO-III 細胞、矢印は PAS 陽性空胞を示す。 $\times 1430$

conditioned medium で培養した KATO-III 細胞では、空胞様構造形成細胞数, PAS およびコロイド鉄染色陽性細胞数が有意に増加した。さらに、WI-38 細胞と KATO-

図5 コロイド鉄染色を行った KATO-III 細胞の電顕像。細胞質内および microvilli 様突起の表面にコロイド鉄粒子の沈着がみられる

表3 KATO-III 細胞を単独で, また WI-38 細胞とともに7日間培養した。^a 平均値 ± 標準誤差 (n=4), ^b p<0.05, 単独培養時の値と比較 (t-検定), ^c p<0.05, 空胞様構造非形成細胞の分裂指数と比較 (t-検定)

培養条件	空胞形成細胞数 (%) ^a	生存率 (%) ^a	分裂指数 (%) ^a	
			空胞形成細胞	空胞非形成細胞
KATO-III細胞 単独培養	5.6±2.1	89.7±0.7	6.1±0.9	4.7±0.2
KATO-III細胞 WI-38細胞 混合培養	25.6±0.6 ^b	87.5±0.7	3.9±0.1 ^c	1.7±0.2

表4 KATO-III 細胞を WI-38 細胞を単独培養した時の conditioned medium を 50% 含む培養液および conditioned medium を含まない培養液で7日間培養した。培養後, 空胞様構造形成細胞数および PAS 染色陽性, コロイド鉄染色陽性空胞をもつ細胞数を算定した。^a 平均値 ± 標準誤差 (n=4), ^b p<0.05, conditioned medium を含まない培養液で培養した時の値と比較 (t-検定), ^c p<0.05, conditioned medium を含まない培養液および WI-38 細胞の conditioned medium を含む培養液で培養した時の値と比較 (t-検定)

Conditioned medium	空胞形成細胞数 (%) ^a	PAS 染色陽性細胞数 (%) ^a	コロイド鉄染色陽性細胞数 (%) ^a
なし	5.6±2.1	1.5±0.1	1.0±0.1
WI-38細胞培養液	19.9±0.5 ^b	9.2±0.3 ^b	5.6±0.5 ^b
KATO-III細胞 WI-38細胞 混合培養液	30.8±0.9 ^c	26.2±1.9 ^c	17.0±1.7 ^c

表5 WI-38 細胞と7日間混合培養した後の KATO-III 細胞を 10% FCS を含む MEM・RPMI 1640 等量混合培養液で培養した。培養開始時 (0日), 5日後, 7日後に空胞様構造形成細胞数, PAS 染色およびコロイド鉄染色陽性空胞をもつ細胞数を算定した。^a 平均値 ± 標準誤差 (n=4), ^b p<0.05, 0日の値と比較 (t-検定), ^c p<0.05, 5日後の値と比較 (t-検定)

細胞	細胞数 (%) ^a		
	0日	5日	7日
空胞形成細胞	25.6±0.6	13.7±0.7 ^b	6.0±0.4 ^c
PAS 染色陽性細胞	24.9±0.8	8.6±0.6 ^b	3.9±1.1 ^c
コロイド鉄染色陽性細胞	8.7±0.5	8.0±0.9 ^b	2.0±0.4 ^c

図6 WI-38細胞と混合培養した後のKATO-III細胞の増殖。WI-38細胞と7日間混合培養した後のKATO-III細胞(○)と単独培養した後のKATO-III細胞(●)を培養皿当たり、 2×10^4 個培養した。培養開始から24時間毎に細胞数を算定した

III細胞の混合培養時の conditioned medium を用いた場合には、KATO-III細胞の空胞様構造形成細胞、PAS およびコロイド鉄染色陽性細胞数はさらに増加した(表4)。

5) KATO-III細胞に及ぼす線維芽細胞の作用の可逆性について：WI-38細胞と混合培養したKATO-III細胞を、次にプラスチック皿上で単独培養し、KATO-III細胞の増殖および空胞様構造形成細胞数、PAS およびコロイド鉄染色陽性細胞数の変化を検討した。KATO-III細胞の空胞様構造形成、PAS およびコロイド鉄染色陽性細胞の数は経目的に減少し、培養7日目には単独培養時とほとんど同様の所見を呈するのみとなった(表5)。図6は、その時の細胞増殖曲線を示すが、対照KATO-III細胞との間に有意な増殖速度の差は認められなかった。

IV. 考 察

KATO-III細胞と線維芽細胞との混合培養により、単独培養時に比べKATO-III細胞の細胞径は著明に増加し、空胞様構造形成細胞が増加した。単独培養時と混合培養時の細胞生存率には差異は認められず、同程度でしかも単独培養・混合培養時ともに空胞様構造形成細胞の分裂指数は、非空胞様構造形成細胞のそれよりも減少していなかった。したがって、KATO-III細胞の空胞様構造形成は、細胞の変性過程を示すものではないと考えられる。事実、空胞様構造の多くは、PAS染色またはコロイド鉄染色で陽性を示した。PAS染色、コロイド鉄染色は、各々糖蛋白、酸性ムコ多糖類の特異染色法であるの

で、KATO-III細胞の空胞様構造形成は、粘性産生、貯溜の結果と推測される^{5,6,8)}。

線維芽細胞との混合培養によって生じたKATO-III細胞の形態学的変化は、線維芽細胞の conditioned medium を用いた場合にも認められた。このことは、線維芽細胞の分泌する液性因子によりKATO-III細胞に形態学的変化が起こることを示唆している。この液性因子の作用機序として、1) KATO-III細胞には空胞様構造をもつクローンと空胞様構造をもたないクローンが存在する。液性因子が空胞様構造をもつKATO-III細胞のクローンの増殖を促進するため空胞様構造をもつ細胞が増殖する、2) 空胞をもたないKATO-III細胞の空胞様構造の形成を液性因子が促進する、などの2つの可能性が考えられる。KATO-III細胞を単独培養した時、空胞様構造形成細胞の分裂指数は、非形成細胞と同程度であった。KATO-III細胞に空胞様構造をもつクローンと空胞様構造をもたないクローンが存在すると仮定すると、このことは、空胞様構造形成および非形成KATO-III細胞の増殖速度は変わらないことを示唆する。したがって、KATO-III細胞と線維芽細胞との混合培養後のKATO-III細胞を単独培養しても、空胞様構造形成細胞と非形成細胞の割合は変わらないと予測される。しかし、混合培養後のKATO-III細胞を単独培養すると、空胞様構造をもつ細胞は減少した。この事実は、2)の可能性を示唆している。したがって、線維芽細胞の分泌する液性因子は、空胞様構造非形成KATO-III細胞の空胞様構造形成を促進すると考えられる。このことをさらに明らかにするため、現在われわれはクローニングしたKATO-III細胞を用いて、線維芽細胞のKATO-III細胞に及ぼす作用を検討している。

また、KATO-III細胞と線維芽細胞の混合培養時の conditioned medium は、線維芽細胞単独培養時の conditioned medium より有意に空胞様構造形成細胞を増加させた。この効果は、1) KATO-III細胞の conditioned medium 中の因子が線維芽細胞の液性因子の分泌を促進させる、またはその活性を増強させる、2) KATO-III細胞の conditioned medium は、線維芽細胞の液性因子に対するKATO-III細胞の感受性を増加させるなどの可能性が考えられる。現在、われわれはこの液性因子の性質および上述の可能性について検討中である。

宿主間質細胞が癌細胞の形態、機能に影響を与えることについてはいくつかの報告がある^{11,14-16)}。Sobueら¹⁴⁾は、高分化胃腺癌由来細胞MKN-28細胞は、線維芽細胞上で培養すると形態学的変化およびグリコサミノグリカン合成の著増が起こることを報告している。Shirasuna

ら¹³⁾は、人顎下腺由来細胞株である HSGc-C5 細胞は、線維芽細胞の分泌する液性因子により、増殖の抑制、形態の変化、グリコサミノグリカン合成の増加および分化形質の発現が起こることを報告している。さらに、Tanaka ら¹⁵⁾は、線維芽細胞の分泌する液性因子が低転移株の B16 メラノーマ細胞の転移能を著増させることを報告している。本研究でわれわれは、線維芽細胞の分泌する因子が、スキルス胃癌細胞の形態的变化を生じさせることを示した。われわれの研究は、Sobue ら¹⁴⁾、Shirasuna¹³⁾ ら Tanaka¹⁵⁾ らの報告とともに、*in vivo* においても間質細胞が腫瘍細胞の増殖、形態、機能に何らかの影響を与えている可能性を示唆する。

多くの研究者により、スキルス胃癌細胞は、間質線維芽細胞に影響を与えることが示されている^{7,9,10,17,20)}。われわれは逆に、線維芽細胞がスキルス胃癌細胞の形態に著明な変化を与えることを明らかにした。ヒトスキルス胃癌にしばしばみられる印環細胞は粘液を多く含む^{3,20)}。したがって、本研究でみられた線維芽細胞の作用は、胃スキルス印環細胞の成り立ちを十分説明し得るものと考えられる。

癌の細胞診において、癌の中心部と浸潤部あるいは転移巣などの異なった部位より採取された癌細胞には形態に著しい差が認められることが多い。異なった部位では、これら癌細胞を取り囲む宿主細胞は異なる。本研究では宿主細胞が癌細胞の形態に影響を与え得ることを示したが、採取部位により癌細胞の形態が著しく異なるのは、癌細胞が各部位で異なった宿主細胞から影響を受けることが一因かも知れない。

Summary

The effects of human embryonic fibroblasts (WI-38) on the morphology of a human scirrhous carcinoma cell line from a stomach cancer (KATO-III) were examined by light and electron microscopy. When co-cultured with fibroblasts, KATO-III cells significantly increased in cell size and had vacuoles containing glycoproteins and acid polysaccharides. These characteristic changes in KATO-III cells were also observed when they were cultured with culture medium conditioned with fibroblasts. However, when KATO-III cells were cultured for another 7 days without fibroblasts, these characteristic changes gradually disappeared. These results suggest that humoral factor(s) secreted by fibroblasts had a reversible effect on the morphology of scirrhous carcinoma cells.

文 献

- 1) 赤尾清剛, 祖父江三津子, 丹羽真理・他: 線維芽細胞の接着・増殖に対する培養胃癌細胞基質の影響, 結合組織, 19: 13~23, 1987.
- 2) Hayflick, L. and Moorhead, P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, 25: 585~621, 1961.
- 3) 胃癌細胞取扱い規約(胃癌研究会編) 49, 金原出版, 東京.
- 4) Karnovsky, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixation of high osmolarity for use in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, 27: 137 a~138 a, 1965.
- 5) Katsuyama, T. and Spicer, S.S.: Ionic components of secretory cell surface in relation to secretory function. *Histochemistry of secretory process* (Garrett, J.R., et al. eds.) 261, Chapman and Hall, London, 1977.
- 6) McManus, J.F.A.: *Histological and Histochemical of periodic acid*, *Stain Technol.*, 23: 99~108, 1948.
- 7) 水谷 均: 培養細胞によるスキルス胃癌成因に関する研究, 大阪医大誌, 46: 11~24, 1987.
- 8) Mowry, R.W.: The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue 8 GX and their combination with the periodic acid-Schiff reaction, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 106: 402~423, 1963.
- 9) 永井 裕, 砂田泰伸, 佐野順次郎・他: 胃スキルスの病態生化学的研究, 結合組織, 16: 40~44, 1985.
- 10) Naito, Y., Kino, I., Horiuchi, K., et al.: Promotion of collagen production by human fibroblasts with gastric cancer cells in vitro, *Virchows Arch. B*, 46: 145~154, 1984.
- 11) Picard, O., Rolland, Y., and Poupon, M.F.: Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in mice: implication for implication of metastases, *Cancer Res.*, 46: 3290~3294, 1986.
- 12) Sekiguchi, M., Sakakibara, K. and Fujii, G.: Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma, *Jpn. J. Exp. Med.*, 48: 61~68, 1978.
- 13) Shirasuna, K., Morioka, S., Watatani, K., et al.: Growth inhibition and differentiation of human salivary adenocarcinoma cells by medium conditioned with normal human fibroblasts, *Cancer Res.*, 48: 2819~2824, 1988.
- 14) Sobue, M., Takeuchi, J., Tsukidate, K., et al.: Influence of fixed fibroblasts on glycosaminoglycan synthesis of human gastric carcinoma cells in vitro, *Exp. Cell Res.*, 149: 527~534, 1983.

- 15) Tanaka, H., Mori, Y., Ishii, H., et al. : Enhancement of metastatic capacity of fibroblast-tumor cell interaction in mice, *Cancer Res.*, 48 : 1456~1459, 1988.
 - 16) 築館一男, 祖父江三津子, 赤尾清剛・他 : 線維芽細胞との Co-culture による胃癌培養細胞 MKN-28 の形態学的変化について, *日病会誌*, 71 : 165, 1982.
 - 17) 辻 克人 : 胃硬性癌の線維化機序の研究 : in vitro におけるヒト胃癌細胞の線維芽細胞に対する影響, *日消誌*, 79 : 931~939, 1982.
 - 18) 山本玲子, 竜田正晴, 中村博行・他 : ヒト胃印環細胞癌由来 KATO-III 株の三次元的培養法における形態学的特性について, *日臨電顕誌*, 20 : 63~69, 1987.
 - 19) Yamamoto, R., Tatsuta, M., Nakamura, H., et al. : Morphological changes of scirrhous carcinoma cell line of human stomach (KATO-III) when cultured collagen-coated dishes, *Virchows Arch. B*, 55 : 247~253, 1988.
 - 20) 吉井隆博 : スキルスの概念と組織発生, *胃と腸*, 10 : 1297~1305, 1976.
-