ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌の特性とレクチン染色性

鹿児島大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大井好忠教授)

白 浜 勉 大 井 好 忠

CHARACTERISTICS OF AN ESTABLISHED HUMAN RENAL CELL CARCINOMA HETEROTRANSPLANTED TO NUDE MICE AND LECTIN BINDING STUDIES

Tsutomu Shirahama and Yoshitada Ohi

Department of Urology, Faculty of Medicine Kagoshima University
(Director: Prof. Y. Ohi)

A primary human renal cell carcinoma has been developed as a xenograft (KDR-1). Passage 5 of KDR-1 strain has histopathologically sustained granular cell type, grade 2 and alveolar type tumor. Electron microscopy revealed the epithelial characteristics of renal cell carcinoma. The doubling time was 6.5 days. The essential histologic characteristics of KDR-1 derived from original tumor has never changed after serial transplantation to nude mice.

Lectin binding affinity of BPA, PNA, DBA UEA-1 and LTA-Ft was investigated using a highly sensitive avidin-biotin peroxidase method. The original and the initial transplant specimens showed strongly positive staining to PNA, but the passage 7 specimen poorly to PNA.

The results indicated that the specific binding site of PNA changed after serial transplantation to nude mice, although the pathological features maintained the characteristics of the original tumor.

要旨: ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株 (KDR-1) を樹立した。5 継代目における組織像は grade 2 の顆粒細胞型, 胞巣型であり, 電顕上も腎細胞癌としての特徴を有していた。doubling time は 6.5 日であった。KDR-1 株の基本的構造は原腫瘍に類似しており, 継代によっても変化しなかった。

ABC 法を用いて, BPA, PNA, DBA, UEA-1 および LTA-Ft の各レクチンの染色性を検索した。原腫瘍および初代移植の腫瘍組織は PNA に陽性染色を示したが, 染色性は継代とともに減弱し, 7 継代目では痕跡程度の陽性となった。

ヌードマウスに移植継代された腫瘍組織は組織学的には原腫瘍の性質を維持していても, PNA 染色結果から細胞膜表面の末端糖鎖は変化することが明らかになった。

緒 言

Rygaard と Povlsen¹⁾²⁾ が報告したヒト癌 ヌードマウス移植系は今日, 癌研究に欠かせない実験系である。その主な根拠は, ヒト癌をヌードマウスに移植・継代しても元の腫瘍の性質がほぼ保たれていることにある。これは, 一部のホルモン産生腫瘍³⁾⁴⁾を除き, 形態学的特徴にもとづく検討の結果である。

今回, ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株⁵⁾を樹立し, その一般的諸性状ならびに ABC 法を用いて移植・継代に伴うレクチン染色性の変化を検討した。

その結果, 形態学的所見のみでは, ヌードマウスに移植されたヒト癌が元の腫瘍の性質を維持していると

は断定できないと考えられたので報告する。

実験材料および実験方法

1. ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株の樹立
移植原腫瘍には剖検時に得られた 54 歳男性の胸壁に浸潤した腫瘍組織を用いた。

臨床経過の概略: 昭和 58 年 5 月 24 日左腎細胞癌の診断にて左腎摘除術ならびに横隔膜の合併切除術を施行した。術後, 左腎部～横隔膜部に ⁶⁰Co 6,000rad を照射した。

左下肺野に肺転移巣が出現したために同年 9 月 25 日左肺部分切除術ならびに横隔膜の部分切除を施行した。しかし, 胸膜から左背部皮下に及ぶ腫瘍の再発を

みとめ昭和60年12月4日癌性悪液質にて死亡した。

実験動物には5～9週齢のBalb/c nu/nu マウス (日本クレア(株))の雄を用い、飼育は準 specific pathogen free (S.P.F) 条件下で行った。

無菌的に採取した腫瘍をRPMI-1640溶液中で2～3 mm³大の腫瘍片に細切しトロッカー針を用いてヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍移植後、週2～3回の割合で腫瘍の長径・短径および高さを測定し、腫瘍の推定重量 (長径×短径×高さ÷2) を求めた。

継代移植は腫瘍が一定の大きさ (長径20mm 以上) に達した時期に無菌的に腫瘍を摘出し初代移植と同様にヌードマウスへ移植した。

2. 肉眼的・病理組織学的検索

担癌ヌードマウスは剖検し、腫瘍の肉眼的性状、周囲組織への浸潤および遠隔転移の有無を観察した。移植腫瘍片に隣接する腫瘍組織、肺、肝、心臓、腎、脾、およびリンパ節はH.E染色、必要に応じてPAS染色、Alcian-Blue染色、Sudan III染色を施行した。

3. 電顕的検索

5継代目の移植腫瘍の一部をグルタルアルデヒドとオスmium酸で二重固定し、型の如くエポン包埋・薄切後、酢酸ウラニールとクエン酸鉛で二重染色を施し日本電子JEM 100-Bにて観察した。

4. レクチン染色法

移植原腫瘍および初代、4継代目の各1匹7継代目の5匹から採取した腫瘍組織の10%ホルマリン固定パラフィンブロックから得た切片をavidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法⁶⁾を用いてレクチン染色を施行した。使用したレクチンは、Bauhinia Purpurea Agglutinin (BPA), Peanut Agglutinin (PNA), Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA), Ulex Europaeus Agglutinin (UEA-1), Lotus Tetragonolobus Agglutinin-Ft (LTA-Ft)である。BPA, PNA, DBA, UEA-1およびそれらの抗レクチンはE-Y Laboratories社製、LTA-Ftおよび抗LTA-Ft抗体は当大学第二生化学教室から供与されたものを使用した。

また、各レクチン濃度はpH 7.2, 0.01M PBS・1% bovine serum albuminを用いて、BPA, PNA, DBAおよびUEA-1は0.004mg/ml, LTA-Ftは0.008mg/mlに調整した。

各切片はFig. 1のごとく、キシレンで脱パラフィン後98%エチルアルコールで脱し、次に0.03% H₂O₂メチルアルコールで室温にて30分反応させ、内因性ペルオキシダーゼ反応を阻害した。pH 7.2, 0.01M PBSで

Fig. 1 Staining procedure

	Deparaffinization
	Blocking endogenous peroxidase 0.3% H ₂ O ₂ in absolute methanol (30 min. room temp.)
washing with PBS	
	Lectin 0.004 mg/ml lectin in PBS with 1 % BSA (1 hr. room temp.)
"	
	Rabbit antilectin antibody 1: 1000 in PBS with 1 % BSA (1 hr. room temp.)
"	
	Biotin-labeled goat antirabbit IgG antibody, 1: 200 in PBS with 1 % BSA. (30 min. room temp.)
"	
	ABC avidin, biotin-peroxidase; 1: 100 in PBS (30 min. room temp.)
"	
	Coloration, AEC solution with 0.03 % H ₂ O ₂
"	
running water	Couter staining, hematoxylin
	Mounting, glycerol gelatin
PBS: 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.2	
BSA: bovine serum albumin	
AEC: 3-amino-9 ethylcarbazole	
ABC: avidin-biotin-peroxidase complex	

よく洗浄後、各レクチンと室温で1時間反応させた。PBS洗浄後、各ウサギ抗レクチン抗体と室温にて1時間反応させた。

次にPBS洗浄後、pH 7.2, 0.01M PBS・1%BSAで1:200に稀釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (original concentration 1.5mg/ml, Dako immunoglobulins Ltd., Copenhagen, Denmark)と室温で30分反応させた。

PBS洗浄後、avidin (original concentration 5mg/ml, Dako immunoglobulins Ltd., Copenhagen, Denmark), biotin (original concentration 2.5mg/ml, Dako-immunoglobulins Ltd., Copenhagen, Denmark)の各10μgをPBS 1mlに溶解したavidin-biotin peroxidase complex (ABC)を室温にて30分反応させた。

PBS洗浄後、3-amino-ethylcarbazol液で発色、蒸留水で洗浄した後hematoxylinで核染色を行いglycerol gelatinで封入し鏡検した。阻害反応は次の通りである。BPAは0.2M N-acetyl galactosamineと0.2M D-galactose, PNAは0.2M D-galactose, DBAは0.2M acetylgalactosamine, UEA-1およびLTA-Ftは

Fig. 2 Growth curve of KDR-1 strain is demonstrated. The doubling time is 6.5 days.

Fig. 3 Some part of the original tumor reveals histologically granular cell type, grade 2 and alveolar type. (H.E. stain, $\times 200$)

0.2M L-Fucose ですべて陰性染色を示した。

実験結果

1. ノードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株の一般的特性

腎細胞癌株 (KDR-1) の 5 継代目における腫瘍増殖曲線を Fig. 2 に示す。doubling time は 6.5 日であった。現在 11 継代目に至り、可継代率は 97% である。移植原腫瘍の細胞型は混合型、紡錘型、細胞の悪性度は Grade 2、組織構築は胞巣型、腺管型、乳頭型および囊腫型と多彩であったが、Fig. 3 に顆粒細胞型 Grade 2 および胞巣型を示す組織像を提示した。KDR-1 株の組織像は顆粒細胞型、Grade 2 および胞巣型⁷⁾であった。原腫瘍に比べ細胞間質が広く、細胞質の空胞変性が目

Fig. 4 Histological features of KDR-1 are similar to the original tumor. However, vacuolization of the cytoplasm increases and the interstitial connective tissue proliferates comparing to the original tumor. (H.E. stain, $\times 200$)

Fig. 5 The plasma membrane forms a brush border like structure (BB). The cytoplasm contains abundant mitochondria (M), glycogen particles (GL) and lipid (L). ($\times 13000$)

立つ傾向を認めた (Fig. 4)。間質結合組織は Alcian-Blue 染色にて陽性であり、酸性粘液多糖体を含んでいると考えられた。細胞質の PAS 染色陽性物質はジアスターゼで消化されることから、グリコーゲンであることが判明した。細胞質は Sudan III 染色陽性であった。電顕上は、細胞膜は microvilli に富み、細胞質内に多数のグリコーゲン顆粒、脂肪球およびミトコンドリアを認めた (Fig. 5)。尚、周囲組織への浸潤性発育や他臓器への転移は認めなかった。

2. レクチン染色

BPA, PNA, DBA, UEA-1 および LTA-Ft のなか

Table 1 Lectin staining in the original tumor and KDR-1 strain

	Original Tumor	Initial Transplant	4th Passage	7th Passage
BPA	—	—	—	—
PNA	+	+	+	+~±
UEA-1	—	—	—	—
LOT-Ft	—	—	—	—
DBA	—	+	—	—

Staining is graded from + to —

Fig. 6 Binding of PNA to the original tumor is shown. (×200) Positive staining on the cytoplasm membrane is prominently observed.

で陽性染色を示したのはPNAとDBAであった。PNAは原腫瘍組織の顆粒細胞・胞巣型ではTable 1, Fig. 6のように陽性染色部と陰性染色部が同一切片内に混在したが、細胞膜に強度～中等度の陽性所見を認めた。

また、管腔形成を示す細胞集団の内腔面も陽性の染色像を示した。

初代移植の腫瘍組織では染色性の程度は原腫瘍と同じであったが、陽性細胞数はわずかに減少した (Fig. 7)。

4 継代目では染色性の程度は減弱し、陽性細胞数も明らかに減少した。また、管腔内面の細胞膜の陽性染色像が顕著であった (Fig. 8)。

7 継代目の5 匹中1 匹ではFig. 9のように中等度に染色される細胞を部分的に認めたが、他は痕跡程度の陽性染色像を認めたにすぎなかった。

DBAは移植原腫瘍では、正常の集合管・遠位尿細管が陽性に染色されたが、腫瘍部は陰性であった (Fig.

Fig. 7 Binding of PNA to the initial transplant tumor shows the similar pattern to the original tumor. (×200)

Fig. 8 Binding of PNA to the 4th passage of KDR-1 is shown. (×200) Cytoplasm faced to the lumen is weakly stained. However, positive stained cells decrease in number.

Fig. 9 Figure shows binding of PNA to the 7th passage of KDR-1. (×200) The positive staining cells are seen in the localized area.

Fig. 10 Binding of DBA to the original tumor is demonstrated. ($\times 200$) Positive staining is observed in the normal nephron, but no staining is seen in the tumor area.

Fig. 11 Binding of DBA to the initial transplant is shown. ($\times 200$) Some cells show positive staining.

10).

しかし、初代移植では細胞膜は陽性染色像を示し強度～中等度に染色される細胞をびまん性に認めた (Fig. 11)。4 継代および 7 継代目では、いずれも陰性染色であった。

考 察

移植原腫瘍は細胞型および組織構築上からも多彩な形態学的特徴を示したが、KDR-1株は顆粒細胞型、Grade 2および胞巢型であった。原腫瘍とやや異なる点は細胞質の空胞化がより目立ち、間質が広いことであった。

11継代に至るまで、この基本的構造に変化は認めなかった。また、特殊染色では細胞質はグリコーゲンおよび脂質に富み、電顕上は豊富な刷子縁様構造、グリコーゲン、脂質およびミトコンドリアを認めるなど腎

細胞癌としての特徴⁹⁾を有していた。doubling time は6.5日であった。

ヌードマウス・ヒト癌株は形態学的、機能的特徴(抗原性、染色体、酵素³⁾あるいはホルモン産生能⁴⁾および制癌剤に対する感受性の面からも、元の腫瘍の性質を維持していることから、癌研究にとってすぐれた実験系である。

しかしながら、継代中に未分化な細胞が優位になったり、ホルモン産生能の消失すなわちクローンの選択・脱落¹⁰⁾がおこることも事実である。このクローンの選択・脱落については、ホルモン産生腫瘍を除けば、組織学的検討のみでは確証が得られないことが多い。

また、ヌードマウス・ヒト癌系は癌特異的免疫・化学療法および診断学においても有用な *in vivo* 実験系として期待されるが、そのためには腫瘍組織をヌードマウスに移植・継代しても、癌細胞のもつ抗原性が失われないという前提が必要になる。

文献上、PNA あるいはヒト腎細胞癌由来マウスモノクローナル抗体がヌードマウスヒト癌株でも維持されるという報告¹¹⁾¹²⁾はあるが、継代に伴う変化は系統的に検討されてはいない。

そこで、PAP 法よりもさらに鋭敏である ABC 法を用いて、移植継代に伴うレクチン染色性の変化を免疫組織化学的に検討した。尚、凍結切片とホルマリン固定ではレクチン染色性に差は認められないので¹³⁾、今回はホルマリン固定切片を用いた。

BPA, PNA, DBA, UEA-1および LTA-Ft の諸種レクチンのなかで陽性染色像が認められたのは PNA と DBA であった。

D-galactose と特異的に結合する PNA¹⁴⁾は、継代に伴い陽性に染色される細胞数は減少し、7 継代目ではいずれも部分的に陽性であるか痕跡程度の陽性となった。

これは、初代移植では中等度～強度に陽性染色を示す細胞をびまん性に認めたことから、単に移植に伴う技術的要因のためとは考えにくい。末端糖鎖のシアル酸化、PNA が反応する糖蛋白の産生能の消失あるいは細胞自体の淘汰などが可能性として考えられる。

いずれにしても、継代を繰り返すことによって、組織学的には変化を認めなくても PNA に結合する細胞膜表面の末端糖鎖は維持されなくなっていくことが判明した。

一方、PNA が腎癌細胞の分化度を示す指標となり得るか否かの結論は得られていない。従来、T

(Thomsen-Friedenreich) 抗原¹⁵⁾に特異的に結合する PNA は未分化な癌細胞に反応すると考えられてきた。腎細胞癌においても、同様な報告¹¹⁾¹⁶⁾もあるが十分に検討されたものではない。

Newman ら¹⁷⁾は蛍光染色法を用いて、ラットの乳腺上皮細胞は乳腺が成熟するにつれて PNA が陽性になることを明らかにした。また、ヒト乳癌組織においても未分化な癌よりも分化した癌の方が PNA は陽性であったことから、PNA は乳腺上皮細胞の分化度を示す良い指標であると結論した。

教室の陳¹³⁾は PAP 法を用いて 52 例の腎細胞癌組織を染色した結果、淡明細胞癌では胞巣型よりも分化した組織構築である腺管型、乳頭型および嚢腫型の方が PNA の陽性染色率は高いことを明らかにした。また今回、提示したように胞巣型の構造の中にも小腺管様構造が認められ、しかも管腔内面の細胞膜は陽性染色像を示した。

腺管構造は物質輸送をするための機能的表現³⁾と考えられる。

以上の結果から、腎細胞癌においても PNA は癌細胞の分化度を示す指標になり得ることが示唆された。

DBA が初代移植の腫瘍組織のみに陽性染色像を示したことの説明は困難であるが、ヌードマウス・ヒト癌株においてレクチンを用いた系統的解析の報告はないことから、今後さらに検討していきたい。

ま と め

1. ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株 (KDR-1) を樹立した。組織学的には grade 2 の顆粒細胞型、胞巣型であり電顕上も腎細胞癌としての特徴を有していた。doubling time は 6.5 日であった。

2. KDR-1 株の基本的構造は原腫瘍に類似しており継代によっても変化しなかった。

3. 原腫瘍および初代・継代移植の腫瘍組織のレクチン染色性を ABC 法を用いて検索した。

4. PNA は原腫瘍および初代移植では陽性染色像を示したが、染色性は継代とともに減弱して 7 継代目では痕跡程度の陽性になった。

5. DBA は初代移植のみ陽性であった。

6. ヌードマウスに移植継代された腫瘍組織は組織学的には原腫瘍の性質を維持していても、PNA 染色結果から細胞膜表面の末端糖鎖は変化することが明らかになった。

文 献

1) Rygaard, J. and Povlsen, C.O.: Heterotrans-

plantation of a human malignant tumors to "Nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 77, 758—760, 1969.

- 2) Povlsen, C.D., Rygaard, J. and Jacobsen, G.K.: Chemotherapy of human malignant melanoma transplanted in the nude mice. *Cancer Res.*, 35, 2790—2796, 1975.
- 3) Hagiwara, M., Chen, I., McGonigle, R., Beckman, B., Kasen, F.H. and Fisher, J.W.: Erythropoietin production in a primary culture of human renal carcinoma cell maintained in the nude mice. *Blood*, 63, 828—835, 1984.
- 4) Kameya, T., Shimosato, Y., Hayashi, H. and Tsumura, M.: Growth and differentiation of hormon producing human tumors in nude mice. *proceedings of the second international workshop on nude mice*. University of Tokyo Press, Tokyo, 405—416, 1977.
- 5) 白浜 勉, 高尾尊身, 前之原茂穂, 島津久明, 大井好忠: ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌に対するインターフェロンの抗腫瘍効果。医学の歩み, 140, 471—472, 1987.
- 6) Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 577—580, 1981.
- 7) 日本泌尿器科学会・日本病理学会・日本医学放射線学会編: 腎癌取扱い規約。第一版。68—85, 金原出版株式会社, 東京, 1983.
- 8) Seljelid, R. and Ericsson, J.L.E.: Electron microscopic observations on specializations of the cell surface in renal clear cell carcinoma. *Laboratory Investigation*, 14, 435—447, 1965.
- 9) Obering, C., Riviere, M. and Haguénau, F.: Ultrastructure of the clear cells in renal carcinomas and its importance for the demonstration of their renal origin. *Nature*, 186, 402—403, 1960.
- 10) 岡田謙一郎, 吉田 修: 尿路悪性腫瘍のヌードマウス異種移植の研究。泌尿紀要, 30, 1749—1767, 1984.
- 11) Radeler, A., Boehle, A., Otto, U. and Raedler, E.: Differences of glycoconjugates exposed on hypernephroma and normal kidney cells. *J. Urol.*, 128, 1109—1113, 1982.
- 12) Fleishmann, J., Heston, W.D.W., Bander, N.H., Bauer, W.C., Janney, C., Ratliff, T.L. and Fair, W.R.: Human renal cell carcinoma xenograft: Morphology, growth and chemosensitivity. *J. Urol.*, 134, 570—574, 1985.

- 13) 陳 英輝：腎癌のレクチンによる糖組織化学的研究。日泌尿会誌, 77, 1405—1415, 1986.
- 14) Kaifu, R. and Osawa, T.: Synthesis of O- β -D-galactopyranosyl
- (1-3) - O - (2- acetamido - 2 - deoxy - α
(and β)-D-galactopyranosyl)-N-tosyl-L-serine
and their interaction with D-galactose binding
lectins. Carbohydrate. Res., 69, 78—88, 1979.
- 15) Klein, P.J., Newman, R.A., Müller, P., Uhlen-
bruck, G., Citoler, P., Schaefer, H.E., Lennartz,
K.J. and Fisher, R.: The presence and
significance of the thomsen-friedenreich antigen
in mammary gland. J. Cancer Res. Clin. oncol.,
93, 205—214, 1979.
- 16) 飯泉達夫, 矢崎恒忠, 加納勝利, 小磯謙吉, 小山哲
夫, 東条克夫：腎細胞癌の免疫組織化学的研究, 第
2 編. 腎癌細胞の細胞膜糖鎖ならびに近位尿管
上皮抗原に関する研究. 日泌尿会誌, 77, 886—895,
1986.
- 17) Newman, R.A., Klein, P.J. and Rubland, P.S.:
Binding of peanut lectin to breast epithelium,
human carcinomas and a cultured rat mammar-
y stem cell: Use of the lectin as a marker of
mammary differentiation. J.N.C.I., 63, 1339
—1346, 1979.

(1987年9月1日受理)