ヒト膀胱腫瘍継代培養細胞における細胞間

コミュニケーションの検討

東京医科歯科大学医学部泌尿器科学教室

木原 和徳 影山 幸雄* 寿美 周平
東 四雄 福井 巖 大島 博幸A STUDY OF INTERCELLULAR COMMUNICATION OF HUMAN TRANSITIONAL
CELL CARCINOMA CELL LINESKazunori Kihara, Yukio Kageyama, Shuhei Sumi, Yotsuo Higashi,
Iwao Fukui and Hiroyuki Oshima

Department of Urology, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Intercellular communication (IC) was investigated by a dye transfer method in 5 human bladder carcinoma cell lines, JTC-29, JTC-30, JTC-32, HUB-41 and T-24 which showed various histological anaplasia when transplanted into nude mice. IC was investigated as follows; 1) IC among cells of each bladder carcinoma cell lines, 2) IC between various combination of different cell lines and 3) IC between cells of bladder carcinoma cell lines and fibroblasts prepared from the human skin or prostate. High IC was observed among JTC-30 cells which showed a differentiated pattern when transplanted into nude mice. JTC-32 and HUB-41, of which transplanted tumors showed poorly differentiated patterns, demonstrated lower IC than JTC-30. Statistical significance was present only between JTC-30 and JTC-32 cells ($p < 0.05$). T-24 which formed histologically anaplastic tumor in nude mice demonstrated markedly poor IC. Second, IC between two different cell lines was demonstrated only between JTC-30 and JTC-32. Third, fibroblast from the skin and prostate had high IC but showed apparent IC with none of bladder carcinoma cell lines. These findings indicate that ICs of bladder tumor cells vary with cell lines tested and appear to decrease with progress of malignant anaplasia. Furthermore, the fact that there is sometimes high IC and sometimes lack of IC between differentiated and undifferentiated tumor cells suggests a possible role of IC in prevention of malignant progression. The present study provides no evidence of IC between bladder tumor cells and fibroblasts, which in some reports have been suggested to be an important phenomenon in evaluating the metastatic capacity of cancer cells.

要旨: ノードマウス移植における形態で異なる分化度を示す5種のヒト膀胱腫瘍形代培養細胞を対象として、蛍光色素注入法を用いて細胞間コミュニケーション(IC)の検討を行なった。ICは次の項目について検討した。1) 各膀胱腫瘍培養細胞自身のIC。2) 異なる膀胱腫瘍培養細胞同士のIC。3) 膀胱腫瘍培養細胞とヒト皮膚および前立腺由来線維芽細胞とのIC。ノードマウス移植にて中等度分化型を示すJTC-30のICは良好であり、低分化型を示すJTC-32とHUB-41のICはJTC-30より低かった。しかしながら有意の差は、JTC-30とJTC-32との間でのみ認められた($p < 0.05$)。移植にて未分化型を示すT-24のICは著明に低下していた。分化度の異なる膀胱腫瘍細胞同士のICはJTC-30とJTC-32との間で認められ、他の組合せではICの存在は明らかではなかった。線維芽細胞はそれ自身は良好なICを持っているにもかかわらず、いずれの膀胱腫瘍細胞とも明らかなICを示さなかった。以上の結果より膀胱腫瘍細胞は正常膀胱上皮とは異なる多様なICを持っている可能性が高く、特にICの著明に低下している腫瘍

* 現 埼玉医科大学泌尿器科

細胞は悪性度が高いことが想定された。さらに分化度の異なる膀胱腫瘍細胞間にも様々な IC の存在が予想され、これが腫瘍の grade up に関与している可能性も想定された。また癌細胞と間質細胞との IC の有無と転移性との関連も示唆されているが、今回の検討では膀胱腫瘍細胞と線維芽細胞との間には明らかな IC は認められなかった。

結 言

細胞間コミュニケーションは、細胞間接着部のギャップ結合を介する、低分子物質の直接の移動による細胞相互の情報伝達システムであり、生体内のほとんどの組織にみられ、細胞の分化、増殖に重要な役割を果たしていると考えられている¹⁾。つまり、細胞の内部はギャップ結合部にある多数の小孔を通して直接、隣接する細胞の内部と連絡しており、分子量1,000～1,500以下の物質すなわち、 Na^+ 、 K^+ 等のイオンや nucleotide などは自由に細胞間を往来することができる。最近、この細胞間コミュニケーションの変化が発癌や癌の悪性進展に深く関与していると考えられるようになってきており、この説を支持する多くの事実が見い出されてきている^{2)~9)}。今回われわれは、膀胱腫瘍細胞を用いて、分化度の変化に伴う細胞間コミュニケーションの変化、分化度の異なる膀胱腫瘍細胞同士のコミュニケーションの有無、間質細胞とのコミュニケーションの有無について検討した。

対 象

膀胱腫瘍細胞として、JTC-29、JTC-30、JTC-32、HUB-41、T-24の5種の継代培養細胞を用いた。JTC-29、JTC-30、JTC-32、HUB-41は教室の患者より樹立された細胞であり、JTC-32は低分化型、他の3種は中等度分化型の移行上皮癌に由来している。またT-24は1973年、Bubenik ら¹⁰⁾により grade 3の膀胱癌から樹立された細胞である。これらの細胞を継代早期にヌードマウスへ移植した際の形態は、JTC-30が分化型、JTC-29、JTC-32、HUB-41が低分化型を示した¹¹⁾。各継代培養細胞の in vivo での形態に関しては、細胞間コミュニケーション測定時に改めてヌードマウスへの移植を行ない検討した。間質細胞として、手術時に採取したヒトの皮膚および前立腺の組織片より培養した線維芽細胞を用いた。

方 法

i) 細胞培養

培養液としてDM-170+13%FCSを用い、37℃、5%CO₂気相下にインキュベーター内で培養した。培地の交換は3日もしくは4日毎に行なった。

ii) 細胞間コミュニケーションの測定

dye transfer 法を用いた¹²⁾。これは蛍光色素を1個の細胞に注入し、色素の隣接細胞への拡がりを測定する方法であり、細胞間コミュニケーションを蛍光色素の拡がった細胞数で評価するものである。蛍光色素として Lucifer yellow CH (分子量450)を用いたが、この色素は細胞膜を通過して細胞内へ入ることはないの、その隣接細胞への移動はギャップ結合を介した直接の移動と考えられる。Lucifer yellow CH は、0.33 M lithium chloride 液で溶解し、10% (W/V) 溶液として用いた。色素の細胞内注入にはオリンパス製インジェクトスコープ (IMT-2-SYF) を用い、注入に使用したガラス針はナリシゲ製微小電極製作器 (PN-3) にて作製した。各腫瘍細胞のコミュニケーションの測定は、約 5×10^5 個の細胞を小さな cluster としてディッシュに播き、10日間培養した後に行なった。2つの異なる細胞群間のコミュニケーションの測定には、まず一方の細胞を小さな cluster としてディッシュに播き (約 5×10^5 個)、4日間培養後、細胞集団が島状に形成された所で、他方の細胞を cluster もしくは single cell として同数混入し、さらに4日間培養して両細胞群の接触した状態を作製した。次いで両細胞群の接触部位において一方の細胞群の1個の細胞に蛍光色素を注入し、他方の細胞群への色素の移動の有無を観察した。2種の細胞群はその形態にて識別可能であった。

iii) 膀胱腫瘍継代培養細胞の in vivo における組織像

細胞間コミュニケーションの測定と同時に各膀胱腫瘍細胞の一部 (5×10^6 個) をヌードマウスに移植し、形成された腫瘍を1カ月後に摘出し、その組織像を検討した。

結 果

i) 膀胱腫瘍継代培養細胞のヌードマウス移植における組織像

JTC-30は中等度分化型の組織構築を示し、JTC-29、JTC-32、HUB-41は低分化型の像を呈し、T-24は極めて末分化な形態を示した (Fig. 2C)。

ii) 膀胱腫瘍継代培養細胞の細胞間コミュニケーション (Fig. 1)

ヌードマウス移植にて、最も高い分化度を示す

Fig. 1 Intercellular communication of bladder carcinoma cell lines. Each point represents the mean of 26-34 separated injections. Bars indicate S.D.

JTC-30が、最も良好なコミュニケーションを示した。マイクロインジェクション後、色素は5分で約15個の隣接細胞に拡がり、経時的にその数は増加し、約20分でプラトーに達し、平均47個の細胞に拡がった。このプラトーの状態は20分以上維持された(Fig. 2A, 2B)。ヌードマウス移植にて低分化型を示すJTC-32とHUB-41では、色素注入後の細胞間コミュニケーションの経時変化はJTC-30と類似であったが、その値はJTC-30より低い傾向を示した(Fig. 2A, 2B)。プラトーの状態では、JTC-30とHUB-41とのコミュニケーションには有意の差はなかったが、JTC-30とJTC-32の間には危険率5%で有意の差が認められた。一方、ヌードマウス移植にて極めて未分化な形態を示すT-24では、コミュニケーションは色素注入後20分以上経過しても、ないかあるいは2~3個程度であった(Fig. 2A, 2B)。なお、JTC-29は半浮遊状の細胞であり、ディッシュ底面に付着する細胞集団の構成細胞数が少なく、dye transfer法ではコミュニケーションの測定が必ずしも正確ではないため本検討から除外した。

iii) 分化度の異なる膀胱腫瘍細胞間のコミュニケーション (Table 1)

JTC-30はJTC-32との間に良好なコミュニケーションを示した(Fig. 3)。しかしながら他の組合せでは明らかなコミュニケーションを示さなかった。JTC-29, HUB-41, T-24では他のいずれの細胞との間にも明瞭

なコミュニケーションはなかった(Fig. 3)。T-24はそれ自身のコミュニケーション能が極めて低いため、他の細胞とのコミュニケーションが欠如しているとも考えられるが、HUB-41, JTC-29はそれ自身コミュニケーションがあるにもかかわらず、他の膀胱腫瘍細胞との間に良好なコミュニケーションは認められなかった。

iv) 膀胱腫瘍細胞と間質細胞とのコミュニケーション (Table 1)

前立腺由来の線維芽細胞、皮膚由来の線維芽細胞のいずれもそれ自身は良好な細胞間コミュニケーションを示したが、これらの間質細胞はJTC-29, JTC-30, JTC-32, HUB-41, T-24のいずれの膀胱腫瘍細胞とも明らかなコミュニケーションを示さなかった(Fig. 3)。

考 察

細胞間コミュニケーションを担っているギャップ結合部の微細構造は電顕的にみると、Fig. 4の様であり、6個のサブユニットからなるコネクソン分子が筒状に形質膜を貫き、隣りのコネクソン分子と結合している。この筒の内径は約20Åであり、この小孔が隣接細胞内腔を直接連絡している。正常の膀胱上皮細胞には良好なコミュニケーションがあることは知られているが、今回検討したヒト膀胱腫瘍細胞では、コミュニケーションの良好な細胞から極度に低下した細胞まで、多様なコミュニケーションが認められた。腫瘍細胞では正常細胞に比し、コミュニケーションが低下しているとする報告は、1968年菅野ら¹³⁾によりなされており、彼らは肝や胃の癌組織においてこの現象を観察している。しかしながら逆に培養系では、良好なコミュニケーション能を持つ癌細胞も少なからずあることも知られてきている。つまり癌細胞であるからといって必ずしもコミュニケーション能が低下しているとは言えないが、コミュニケーションの著明に低下した癌細胞は、分化度の低い、悪性度の高い癌細胞であろうと考えられている。今回の膀胱腫瘍細胞における検討でも、この考えに一致する結果が得られた。すなわち、ヌードマウス移植にて、高い分化度を示すJTC-30は最も良好なコミュニケーションを持ち、未分化な形態を示すT-24はコミュニケーション能が極端に低下しており、これらの中間の形態を示すJTC-32はJTC-30より低いコミュニケーションを示した。この継代培養細胞における結果からみて、in vivoの膀胱腫瘍細胞でも、そのコミュニケーションの程度には多様な幅があ

Fig. 2 Pattern of dye transfer and histology of bladder carcinoma cell lines. (A) Phase contrast photomicrograph. Magnification, 300 $\times$. (B) Fluorescence photomicrograph of (A). Single cell was injected with lucifer yellow CH (★) and photographed 20 minute later. (C) Histology when transplanted into nude mice. Magnification, 100 $\times$

Fig. 3 Intercellular communication (IC) between various combination of different bladder carcinoma cell lines and IC between bladder carcinoma cells and fibroblasts.

(A) Phase contrast photomicrograph. Magnification, 300×. (B) Fluorescence photomicrograph of (A). Single cell was injected with lucifer yellow CH (★) and photographed 20 minutes later.

Table 1 Intercellular communication (IC) between two different TCC cell lines and IC between TCC cells and fibroblasts.

+ : IC observed. : - : IC was not observed.

TCC cell lines					
JTC-29					
JTC-30	-				
JTC-32	-	+			
HUB-41	-	-	-		
T-24	-	-	-	-	
Fibroblasts					
from prostate	-	-	-	-	-
from skin	-	-	-	-	-
	JTC-29	JTC-30	JTC-32	HUB-41	T-24
	TCC cell lines				

Fig. 4 Schema of the gap junction.

(by S. Yamashina, 1985)

り、特に悪性度の高い癌細胞ではコミュニケーション能が著明に低下している場合のことが想定された。

一方、実際のヒトの膀胱腫瘍では1個の腫瘍塊の中に悪性度の異なる細胞が混在していることも多い。これら悪性度の異なる細胞間でのコミュニケーションがどのようにになっているかは興味深い問題である。発癌の過程においては、イニシエーターにより遺伝子の変異を生じた変異細胞は、周囲の正常細胞とのコミュニケーションにより癌化が抑制されているが、プロモーターによってこのコミュニケーションが絶たれると癌細胞となり、腫瘍が形成されてくるとも考えられている⁹⁾¹⁴⁾。この説はまた、悪性度の異なる細胞の混在状態においては、悪性度の低い細胞が悪性度の高い細胞の増殖に何らかの抑制的な働きかけをしている可能性も示唆していると思われる。そこで悪性度の異なる膀胱

腫瘍細胞同士のコミュニケーションを検討したが、中等分化型腫瘍と低分化型腫瘍の組合せでも JTC-30 と JTC-32 の様に相互のコミュニケーションの良い組合せと、JTC-30 と JTC-29 の様に相互にはコミュニケーションのない組合せとがあり、さらにそれ自身コミュニケーション能の低い未分化型の T-24 は予測された通り、他のいかなる細胞ともコミュニケーションがなかった。これらの結果は膀胱癌の grade up を研究する場合には、細胞間コミュニケーションの消長を考慮に入れる必要があることを示唆している。

また腫瘍の転移性とコミュニケーションとの関連にも興味を持たれており、転移を生じやすい細胞と生じにくい細胞とを比較して、前者は間質細胞とのコミュニケーションが乏しく、後者は良好であったとのラットの乳癌細胞での実験報告もある¹⁵⁾。しかし今回の検討では、間質細胞とコミュニケーションを持つ膀胱腫瘍細胞はなく、間質との相互作用を示す所見は得られなかった。

最近、細胞間コミュニケーションの抑制を指標として、プロモーターを検出しようとする試みもなされているが、これは主として動物の間質細胞を用いて行なわれている¹⁶⁾。しかしながら、プロモーターには種特異性、臓器特異性があることを考えると、ヒト膀胱腫瘍のプロモーター検出にはヒトの膀胱上皮細胞を用いることが必要不可欠であり、今回の検討で明らかとなった良好なコミュニケーションを持つヒト膀胱癌由来の細胞株は、ヒト膀胱癌のプロモーターの検出にも応用しうるのであらうと考えられる。

結 語

ヌードマウス移植における形態で、異なる分化度を示す5種のヒト膀胱腫瘍継代培養細胞を用いて、各膀胱腫瘍細胞自身のコミュニケーション、異なる分化度を示す細胞間でのコミュニケーションおよび間質細胞とのコミュニケーションについて検討した。

1. 膀胱腫瘍細胞自身のコミュニケーションは、ヌードマウス移植にて最も高い分化度を示す JTC-30 が最良で、未分化型を示す T-24 はそのコミュニケーションが極度に低下しており、低分化型を示す JTC-32 は JTC-30 より低いコミュニケーションを示した。膀胱腫瘍細胞は正常上皮細胞とは異なるコミュニケーションを持っている可能性が高く、かつその程度は多様であり、特にコミュニケーションが著明に低下している癌細胞は悪性度が高いことが想定された。

2. 分化度の異なる膀胱腫瘍細胞間のコミュニケー

ションは、欠如している組合せと、良好な組合せとが認められ、種々の分化度の癌細胞が混在していることも多い *in vivo* での腫瘍では、各分化度の細胞集団間に多様なコミュニケーションの存在が予想され、これが癌細胞の *grade up* に関与している可能性も想定された。

3. 膀胱腫瘍細胞は今回検索した限りでは、いずれも間質細胞とはコミュニケーションを持たず、間質細胞とのコミュニケーションを介した相互作用は今回の検討では認められなかった。

稿を終えるにあたり、東京医科歯科大学写真室の高田正雄氏ならびに本研究に協力して下さいた当科研究室の太田聖子氏に感謝致します。

本論文の要旨の一部は第75回日本泌尿器科学会総会にて発表した。

本研究は文部省科学研究費（一般研究 B, 61480339）によった。

文 献

- 1) Loewenstein, W.R.: Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta*, **560**, 1—65, 1979.
- 2) Yotti, L.P., Chang, C.C. and Trosko, J.E.: Elimination of metabolic cooperation in chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science*, **296**, 1089—1091, 1979.
- 3) Fitzgerald, D.J. and Murray, A.W.: Inhibition of intercellular communication by tumor-promoting phorbol esters. *Cancer Res.*, **40**, 2935—2937, 1980.
- 4) Fitzgerald, D.J., Knowles, S.E., Ballard, F.J. and Murray, A.W.: Rapid and reversible inhibition of junctional communication by tumor promoters in a mouse cell line. *Cancer Res.*, **43**, 3614—3618, 1983.
- 5) Enomoto, T. and Yamasaki, H.: Lack of intercellular communication between chemically transformed and surrounding nontransformed BALB/C 3T3 cells. *Cancer Res.*, **44**, 5200—5203, 1984.
- 6) Enomoto, T. and Yamasaki, H.: Phorbol ester-mediated inhibition of intercellular communication in BALB/C 3T3 cells: Relationship to enhancement of cell transformation. *Cancer Res.*, **45**, 2681—2688, 1985.
- 7) Rivedal, E., Sanner, T., Enomoto, T. and Yamasaki, H.: Inhibition of intercellular communication and enhancement of morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by TPA. Use of TPA-sensitive and TPA-resistant cell lines. *Carcinogenesis*, **6**, 899—902, 1985.
- 8) Mahta, P.P., Bertram, J.S. and Loewenstein, W. R.: Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell*, **44**, 187—196, 1986.
- 9) Trosko, J.E.: Mechanisms of tumor promotion: Possible role of inhibited intercellular communication. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **23**, 599—601, 1987.
- 10) Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., Jaknoubkova, J., Sainerova, H. and Donner, H.: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T-24) containing tumor-specific antigen. *Int. J. Cancer*, **11**, 765—773, 1973.
- 11) Kakuya, T., Yamada, T., Yokokawa, M. and Ueda, T.: Establishment of cell strains from human urothelial carcinoma and their morphological characterization. *In vitro*, **19**, 591—599, 1983.
- 12) Enomoto, T., Martel, M., Kanno, Y. and Yamasaki, H.: Inhibition of cell communication between BALB/C 3T3 cells by tumor promoters and protection by cAMP. *J. Cell Physiol.*, **121**, 323—333, 1984.
- 13) Kanno, Y. and Matsui, Y.: Cellular uncoupling in cancerous stomach epithelium. *Nature*, **218**, 775—776, 1968.
- 14) Yamasaki, H., Hollstein, M., Mesnil, M., Martel, N. and Aguelon, A.M.: Selective lack of intercellular communication between transformed and nontransformed cells as a common property of chemical and oncogene transformation of BALB/C 3T3 cells. *Cancer Res.*, **47**, 5658—5664, 1987.
- 15) Hamada, J., Takeichi, N. and Kobayashi, H.: Inverse correlation between the metastatic capacity of cell clones derived from a rat mammary carcinoma and their intercellular communication with normal fibroblasts. *JPN. J. Cancer Res.*, **Gann**, **78**, 1175—1178, 1987.
- 16) Zeilmaker, M.J. and Yamasaki, H.: Inhibition of junctional intercellular communication as a possible short-term test to detect tumor-promoting agents: Results with nine chemicals tested by dye transfer assay in chinese hamster V79 cells. *Cancer Res.*, **46**, 6180—6186, 1986.

(1989年1月20日受理)