前立腺肥大症由来の細胞培養に関する研究

名古屋市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大田黒和生教授)

津ヶ谷 正 行 大田黒 和 生

STUDY OF CELL LINES DERIVED FROM BENIGN HYPERTROPHIC PROSTATE TISSUE

Masayuki Tsugaya and Kazuo Ohtaguro

Department of Urology, Nagoya City University Medical School

(Director: Prof. K. Ohtaguro)

Primary epithelial and fibroblast cells from benign hypertrophic prostate tissue were established. The prostate tissues were obtained by transurethral resection of the prostate or retropubic prostatectomy in patients with benign prostatic hypertrophy. Growth factors for cultured epithelial cells and fibroblasts were studied. The epithelial cells grew well in the WAJC-404 culture medium with insulin, epidermal growth factor and dexamethasone. Fibroblasts grew well in culture medium containing 10% fetal calf serum. The prostate tissue was stored at 4°C for 7 days and no degenerative change in the stromal cells was seen during this period. Although epithelial cells did degenerate with the passage of time, epithelial cells cultured after storage for 4 days at 4°C behaved similarly to those cultured immediately after being isolated. These primary cultures of epithelial cells and fibroblasts from hypertrophic prostate may be useful for various studies.

Key words: benign prostatic hypertrophy, epithelial cell culture, fibroblast culture

要旨: 前立腺肥大症患者における TUR-P や被膜下前立腺摘除術で得られた組織から上皮細胞と線維芽細胞それぞれの初代培養を確立し, 上皮細胞と線維芽細胞の増殖に関与する因子を検討した。上皮細胞培養における細胞増殖は WAJC-404 培地に insulin, EGF と dexamethasone の 3 者を添加した培地において盛んであった。線維芽細胞培養における細胞増殖では培養液に添加する FCS の濃度は 10% で良好な増殖を示した。前立腺肥大症組織を 4°C で保存し, 組織の変性の程度を組織学的に検討したところ, 間質組織では 7 日間保存後でも変性は認められなかったが, 上皮細胞は経時的に変性細胞が増加した。しかし, 前立腺肥大症組織を 4°C で 4 日間保存後培養したところ, 上皮細胞は保存期間に関係なく, 即日培養したときと同様の増殖を示した。以上のように TUR-P の検体が使用でき, また 4 日間冷所保存が可能である前立腺の上皮細胞と線維芽細胞それぞれの初代培養は手軽で利用価値が高い培養法と考えられる。

キーワード: 前立腺肥大症, 上皮細胞培養, 線維芽細胞培養

緒 言

前立腺の上皮細胞と線維芽細胞それぞれの生理機能, 殊に種々のホルモン, 薬剤や増殖因子に対する応答, 上皮細胞と線維芽細胞における細胞間の相互関係ならびに腫瘍の発生や病理などを解明するため, 一つの有用なる手段として主にラットの前立腺細胞を用いた細胞培養に関する研究が散見される^{1)~4)}。ヒト前立腺由来の上皮細胞と線維芽細胞のそれぞれが容易に培養できれば上記諸問題の解明に役立つ。著者らはヒト前立腺肥大症由来の上皮細胞と線維芽細胞それぞれの

初代培養を確立し, 上皮細胞と線維芽細胞それぞれの増殖に関与する因子を検討したので報告する。

方 法

前立腺肥大症患者における経尿道的前立腺切除術 (TUR-P) や被膜下前立腺摘除術で得られた組織約 2g を 200IU/ml の penicillin と 200 μ g/ml の streptomycin を加え, また 5% fetal calf serum (FCS) を加えた RPMI-1640 培地 (RPMI 1640 medium, L-Glutamine, penicillin, streptomycin と FCS は GIBCO 社製) 10ml 中に入れて実験室に運んだ。得ら

れた組織を約10mlの balanced salt solution (以下MSS と称し、その組成は NaCl=28.28g, KCl=0.6g, glucose=2.88g, KH₂PO₄=0.544g, HEPES=28.6g, phenol red 3.3 μ M で、蒸留水に4Nの NaOHを加えて全量4,000ml, pH 7.6に調整した)で振盪し、3回洗浄した後、シャーレ上で2~4mmほどの立方体の細片とし、200IU/mlの penicillin と200 μ g/mlの streptomycinを加え、さらに200U/ml collagenase(Worthington collagenase #4196 specific activity greater 160U/mg)添加の5%FCS加 RPMI-1640培地で37℃, 20時間, shaker 上で incubate した。その後, pipetting を数回施行した。この digest した組織液を遠心管に移し、約10mlの MSSを加えて振盪混和し、1,069.0G (2,400rpm)10分間遠心し、この操作をさらに2回繰り返して、collagenase を除去した。沈澱した細胞塊に5mlの RPMI-1640培地を加えて振盪混和して、185.6G (1,000rpm)20秒間遠心し、上皮細胞と線維芽細胞を分離した。沈澱した上皮細胞は無血清の WAJC-404培地(極東製薬工業社製)、線維芽細胞は RPMI-1640培地で培養した。

I. 上皮細胞培養における細胞増殖の検討

下記6種類の培養液を作製し、T25細胞培養用フラスコで初代培養を開始してから2日目、4日目、6日目に上皮細胞総数を顕微鏡下でコロニーの大きさとそれぞれの細胞数から算定した。

- ① WAJC-404培地単独
- ② WAJC-404培地に insulin 2.5 μ g/ml を添加
- ③ WAJC-404培地に bovine hypothalamus extract (以下 BHE と略す) 20 μ g/ml を添加
- ④ WAJC-404培地に epidermal growth factor 10 ng/ml (以下 EGF と略す) を添加
- ⑤ WAJC-404培地に insulin 2.5 μ g/ml と dexamethasone 1 μ M を添加
- ⑥ WAJC-404培地に insulin 2.5 μ g/ml, EGF 10ng/ml と dexamethasone 1 μ M を添加

また、上記培養液に100IU/mlの penicillin と100 μ g/mlの streptomycinを加えた。

II. 線維芽細胞培養における細胞増殖の検討

下記7種類の培養液を作製し、24-well 細胞培養プレートでそれぞれ培養し、7日目の細胞数を算定した。

- ① RPMI-1640培地に5%FCS を添加
- ② RPMI-1640培地に5%FCS, insulin 2.5 μ g/ml, EGF 10ng/ml を添加
- ③ RPMI-1640培地に10%FCS を添加

④ Dulbecco's Modified Eagle 培地に5%FCSを添加

⑤ Dulbecco's Modified Eagle 培地に10%FCSを添加

⑥ Dulbecco's Modified Eagle 培地に10%FCS, insulin 2.5 μ g/ml を添加

⑦ Dulbecco's Modified Eagle 培地に10%FCS, insulin 2.5 μ g/ml, BHE 20 μ g/ml を添加

また、上記培養液に100IU/mlの penicillin と100 μ g/mlの streptomycinを加えた。

III. 前立腺肥大症組織を200IU/mlの penicillin と200 μ g/mlの streptomycinを加えた5%FCS加 RPMI-1640培地に入れ、4℃で1日間、4日間、7日間保存後、組織の変性の程度を組織学的に検討した。

IV. 前立腺肥大症組織を200IU/mlの penicillin と200 μ g/mlの streptomycinを加えた5%FCS加 RPMI-1640培地または前記抗生剤を加えた生理的食塩水中に入れ、4℃で1日間ないし4日間保存後、前記操作の後に WAJC-404培地に insulin 2.5 μ g/ml, EGF 10ng/ml, dexamethasone 1 μ M, penicillin 100IU/ml と streptomycin 100 μ g/ml を添加した培養液で培養した。培養7日目に上皮細胞の増殖状態を検討する目的で、フラスコ底に増殖した上皮細胞が占める割合を計測した。組織重量によって T25cm²フラスコと T75 cm²フラスコを使用したため、T25cm²フラスコ当たりの組織重量を算定し、さらに組織1g当たりの増殖した上皮細胞がフラスコ底で占める割合として算定した。

結 果

I. 上皮細胞培養における細胞増殖の検討

Fig. 1 に示したように WAJC-404培地に insulin や

Fig. 1 Relationship between epithelial cell growth and medium composition.

Table 1 Relationship between medium composition and fibroblast cell growth after 7 days in primary culture

Patient (sample)	RPMI 5%FCS	RPMI 5%FCS Insulin EGF	RPMI 10%FCS	EAGLE 5%FCS	EAGLE 10%FCS	EAGLE 10%FCS Insulin	EAGLE 10%FCS Insulin BHE
H.A.	—		—	±			
M.C.	±		++	+			
H.P.-1	—	—	+++	+++	+++		
H.P.-2	—	—	—	+	++		
J.I.	±	—	++	±	+	±	+
E.M.-1	—	±	±	±	++	+	+
E.M.-2	—	—	—	±	++	—	±

— : No fibroblasts
± : 1-10 fibroblasts/well (24-well plate)
+ : 11-20 fibroblasts/well (24-well plate)
++ : 21-30 fibroblasts/well (24-well plate)
+++ : More than 31 fibroblasts/well (24-well plate)
FCS : fetal calf serum. BHE : bovine hypothalamus extract.

EGF 単独あるいは insulin と dexamethasone を添加した培地では上皮細胞の増殖は不十分であったが、WAJC-404培地に insulin 2.5 μ g/ml, EGF 10ng/ml と dexamethasone 1 μ M の 3 者を添加した培地において上皮細胞の増殖が盛んであった。統計上では、WAJC-404培地単独に比べて WAJC-404培地に insulin と dexamethasone を加えた培地の方が増殖が盛んで、培養 2 日目ならびに 2 者の全体の比較で有意差が認められた ($p < 0.05$)。しかし、その他の培地の比較では検体数が少なく、ばらつきが大きいため有意差は認められなかった。

II. 線維芽細胞培養における細胞増殖の検討

Table 1 に示したように insulin, EGF, BHE の添加は線維芽細胞培養における細胞増殖を促進しなかった。insulin はむしろ細胞増殖を抑制する傾向を示した。培養液に添加する FCS の濃度は 5 % に比べて 10 %の方が良好な増殖を示した。

III. 前立腺肥大症組織を 4℃ で保存し、組織の変性の程度を組織学的に検討したところ、間質組織では 7 日間保存後でも変性は認められなかった。上皮細胞はその部位によって多少異なるが、経時的に変性細胞が増加した (Table 2)。Table 2 の Case No. T.C. 7 日目の検体には間質組織のみで、上皮細胞がなかった。

IV. 前立腺肥大症組織を 4℃ で 1 日間ないし 4 日間保存後培養したところ、保存期間に関係なく上皮細胞は増殖した (Table 3)。

V. 上記実験の結果を通じて、上皮細胞と線維芽細

Table 2 Pathological characteristics of degenerating prostatic epithelial cells cultured after a period of storage in RPMI 1640 with 5% FCS and antibiotics

Patient	Not stored	1 day	4 days	7 days
H. E.	—	—	Slightly	Some
T. N.	None	None	Mild	Some
T. C.	None	Some	Mild	No epithelium
N. W.	None	Some	Mild	Many
A. L.	None	Mild	Some	Many

Not stored : cultured immediately. None : no degenerative change. Slightly : slightly degenerative changes. Some : some degenerative changes. Mild : mild degenerative changes. Many : many degenerative changes. No epithelium : no epithelium in the specimen.

胞の培養を確立した。その方法を Fig. 2 に示した。培養された上皮細胞と線維芽細胞を Fig. 3, 4 に示した。なお immunocytochemical staining で上皮細胞は cytokeratin 陽性で、線維芽細胞は vimentin 陽性であった。

考 察

ヒトの前立腺上皮の細胞培養は原組織が硬く、酵素処理による細胞間の分離が困難なことから組織片から out-grow した細胞を対象として行われてきた⁴⁾⁵⁾。種々の collagenase による細胞の分離、さらにラット前立腺腹葉上皮細胞の無血清培地による培養が成功し²⁾、ヒトの前立腺上皮の細胞培養に発展した⁷⁾⁸⁾。血清

Table 3 Primary epithelial cell cultures : Relation between cell growth and tissue storage time.

Patient (sample)	Age	Storage time (days)	Medium	Weight of tissue /T25cm ² flask (gm.)	Area of flask covered with cells after 7 days (%)		[B] ÷ [A] (Mean±SD)
				[A]	[B]		
W.F.-1	72	0	RPMI	1.27	65		51.2
H.E.	75	1	RPMI	0.66	85		128.8
T.N.	61	1	RPMI	0.34	40		117.5
J.E.	78	1	RPMI	0.67	25		37.3
J.G.-1	55	1	RPMI	0.41	85		207.3
J.G.-2	55	1	Saline	0.41	90		219.5
J.B.-1	69	1	RPMI	0.88	40		45.5
P.P.	64	1	Saline	0.62	80		126.4 ± 70.5
A.L.-1	75	2	RPMI	1.00	80		129.0
A.L.-2	75	2	RPMI	0.11	20		80.0
W.N.-1	75	2	RPMI	0.63	75		181.8
W.N.-2	75	2	RPMI	0.21	70		119.1
M.C.	64	3	RPMI	1.08	10		178.5 ± 333.3
J.B.-4	69	1	Saline				111.4
		2	RPMI	1.03	30		9.3
E.M.-1	82	3	RPMI	0.71	75		29.1
E.M.-2	82	3	Saline	0.76	70		105.6
J.B.-5	69	3	Saline	0.80	20		92.1
T.C.-1	62	4	RPMI	0.17	65		52.2 ± 25.0
T.C.-2	62	1	Saline				43.5
		3	RPMI	0.71	80		382.4
H.P.-1	58	4	RPMI	0.91	50		112.7
H.P.-2	58	4	Saline	0.87	10		55.0
							140.4 ± 11.5
							166.6

Fig. 2 Methods of primary culture of cells derived from benign hypertrophic prostate Prostatic tissue (BPH)

Fig. 3 Epithelial cell culture, $\times 300$. Fig. 4 Fibroblast cell culture, $\times 300$.

を含まない培養液では成分が明らかであるため、細胞増殖に関与した化学物質や成長因子、そしてその濃度の影響が観察でき、さらに細胞の代謝を捉えることが容易となるため前立腺における研究の実験系として極めて有用である。insulin は上皮細胞の増殖を促進するが、 10^{-1} IU/ml 以上ではその効果が低下し、EGF とは相加的に増殖を促進するとされている。また dexamethasone は 10^{-8} M の濃度で細胞増殖が最も盛んになり、insulin との併用ではその濃度によって細胞増殖は抑制されるとされている⁹⁾¹⁰⁾。著者の実験に用いた dexamethasone と insulin の濃度では増殖抑制は認められず、今回 dexamethasone 単独添加群における増殖細胞数の算定は行わなかったが、スラスコ上での発育状態の観察では単独添加より併用のほうが良好であった。BHE は上皮細胞の増殖促進には重要な因子を含んでいるとされているが⁹⁾、今回の検討では期待するほどの効果は得られなかった。dexamethasone、

insulin と EGF との 3 者併用は相乗の効果は認められなかったが、増殖効果は最も良好で、相加的效果であった。増殖細胞数の算定は行わなかったが、増殖促進効果があるとされている BHE⁹⁾や cholera toxin⁷⁾を上記 3 者とともに添加しても増殖促進効果が認められなかった。上皮細胞の初代培養では急速に増殖を示すが、培養 10 日以降および継代培養においてはその増殖速度は緩慢となる。肥大症由来の細胞であるため悪性細胞と本質的に異なることが原因であり、上記種々の成長因子を組み合わせてもこの時期における細胞増殖効果は得られなかった。

前立腺肥大症組織は尿路閉塞による尿路感染を伴うことが多く、前立腺自体が感染し、しばしば微小膿瘍を伴っている。経尿道的前立腺切除術で得られた組織片を主に用いたため、培養の初期段階で細菌感染したことによる培養の失敗は少なくなかった。組織自体の感染を伴わなくても尿路感染や術中操作中に細菌が付着することが考えられ、抗生物質を通常の 2 倍 (200 IU/ml の penicillin と $200\mu\text{g/ml}$ の streptomycin) を転送用溶液や collagenase の溶液に加えた。その結果、細菌感染による頻度は減少した。また組織が得られて直ぐに細胞培養するより 4°C で保存して翌日以降に培養操作をする方が成功率が高かった。

組織を 4°C で保存した後の組織学的検討では、間質組織の変性は 7 日までは、特に認められなかった。しかし、上皮組織では程度の差、部位による差はみられるものの経時的に変性が認められた。このように変性が認められる上皮組織から細胞培養を行うことは困難と考えられたが、実際には 4°C で 4 日間以内の保存であれば、保存期間に関係なく上皮細胞の培養が可能であった。このように 4 日間程度の組織保存の後に細胞培養ができることは、日常診療に忙しい泌尿器科医が研究と両立する上で、極めて有用な実験系である。組織学的に変性が認められても、細胞培養ができることは、分化し、古くなった細胞は死滅し、原始のかつ未熟な細胞が培養されたものと考えられる。TUR-P で得られた検体は電気メスによる組織損傷が強く、被膜下摘除術に比べて細胞増殖が劣る印象を持ったが、検体によっては増殖の良好なものもあり、一定の傾向は得られなかった。

皮膚や他臓器の線維芽細胞培養は数多くの報告があり、前立腺肥大症の培養も行われている。いずれも培養液に血清が添加されており、今回の結果のように線維芽細胞の増殖には血清濃度が重要な要素であった。

初代培養における線維芽細胞の増殖は極めて遅いが、スラスコの底を満たす時点から増殖速度は速く、約3日間で2倍に増殖した。このような時点で血清濃度を10%から5%に低下させたところ、細胞の維持は可能であったが、増殖速度は低下した。上皮細胞と線維芽細胞の両者を分離、培養するため collagenase を使用した。この collagenase が線維芽細胞を障害することと考えられ、collagenase 溶液による incubation の時間を短縮してみたが、その効果は認められなかった。

上皮細胞と線維芽細胞の両者を分離し、その培養を確立することは上皮細胞と間質細胞の相互関係、成長因子、ホルモン代謝やホルモン非依存性の獲得、コレステロールを主とする脂質代謝さらに薬剤の効果とその作用機序の検討等をさらに追求するために有用である。今回の研究では前立腺癌組織を得る機会がほとんどなかったためその培養を確立できなかった。前立腺癌細胞の培養においては肥大症の場合と異なるにせよこのような方法を生かすことができると考える。そのための参考として著者らの経験を付記した。

結 語

1) ヒト前立腺肥大症由来の上皮細胞と線維芽細胞それぞれの初代培養を確立し、上皮細胞と線維芽細胞それぞれの増殖に関与する因子を検討した。

2) 上皮細胞培養における細胞増殖を検討したところ WJJC-404 培地に insulin, EGF と dexamethasone の3者を添加した培地において上皮細胞の増殖が盛んであった。

3) 線維芽細胞培養における細胞増殖では insulin, EGF, BHE の添加は細胞増殖を促進せず、insulin はむしろ細胞増殖を抑制する傾向を示した。培養液に添加する FCS の濃度は5%に比べて10%の方が良好な増殖を示した。

4) 前立腺肥大症組織を4℃で保存し、組織の変性の程度を組織学的に検討したところ、間質組織では7日間保存後でも変性は認められなかった。上皮細胞は経時的に変性細胞が増加した。しかし、前立腺肥大症組織を4℃で1日間ないし4日間保存後培養したところ、保存期間に関係なく上皮細胞は増殖した。

5) 上記実験の結果を通じて、上皮細胞と線維芽細胞の培養を確立し、その方法を記述した。

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導を賜りました英国エジンバラ大学医学部泌尿器外科学教室 G.D. Chisholm 教授ならびに F.K. Habib 助教授に深謝いたします。

なお本研究は ASSOCIATION FOR INTERNATIONAL CANCER RESEARCH の補助金の援助を受けた。

本論文の要旨は第78回日本泌尿器科学会総会（札幌、1990）で発表した。

文 献

- 1) Ofner, P., Vena, R.L., Terracio, L. and Douglas, W.H.J.: Comaparative C₁₉-radiosteroid metabolism in primary monolayer cultures of epithelial cells and fibroblasts from rat ventral prostate, canine prostate, and rat lung. *J. Androl.*, 3, 269—280, 1982.
- 2) McKeehan, W.L., Adams, P.S. and Rosser, M. P.: Direct mitogenic effects of insulin, epidermal growth factor, glucocorticoid, cholera toxin, unknown pituitary factors and possibly prolactin, but not androgen, on normal rat prostate epithelial cells in serum-free, primary cell culture. *Cancer Res.*, 44, 1998—2010, 1984.
- 3) Nishi, N., Matuo, Y., Nakamoto, T. and Wada, F.: Proliferation of eplithelial cells derived from rat dorsolateral prostate in serum-free primary cell culture and their response to androgen. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, 24, 778—786, 1988.
- 4) Chung, L.W.K., Chang, S., Bell, C., Zhau, H., Ro, J.Y. and von Eschenbach, A.C.: Prostatic carcinogenesis evoked by cellular interaction. *Environental Health Perspectives*, 77, 23—28, 1988.
- 5) Stonington, O.G. and Hemmingsen, H.: Culture of cells as a monolayer derived from the epithelium of the human prostate: A new cell growth technique. *J. Urol.*, 106, 393—400, 1971.
- 6) Peehl, D.M., Wong, S.T., Terris, M.K. and Stamey, T.A.: Culture of prostatic epithelial cells from ultrasound-guided needle biopsies. *Prostate*, 19, 141—147, 1991.
- 7) Peehl, D.M.: Serial culture of adult human prostatic epithelial cells. *J. Tissue Culture Methods*, 9, 53—60, 1985.
- 8) Chaproniere, D.M. and McKeehan, W.L.: Serial culture of single adult human prostatic epithelial cells in serum-free medium containing low calcium and a new growth factor from bovine brain. *Cancer Res.*, 46, 819—824, 1986.
- 9) Chaproniere, D.M. and Webber, M.M.: A chemically defined medium for the growth of adult human prostatic epithelium. *Cold Spring Harbor Conferences Cell Proliferation*, 2, 1109—1115, 1982.
- 10) Chaproniere, D.M. and Webber, M.M.: Dexamethasone and retinyl acetate similarly inhibit and stimulate EGF- or insulin-induced proliferation of prostatic epithelium. *J. Cell. Physiol.*, 122, 249—253, 1985.

（1993年2月1日受付，7月9日受理）