ヒト腎細胞癌細胞株 (KG-2) の樹立とヌードマウスを用いた ヒト腎細胞癌転移モデルの作成

¹⁾神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 守殿貞夫教授)

²⁾ 東京大学応用微生物研究所生物活性 (主任: 鶴尾 隆教授)

郷司 和男¹⁾³⁾ 中島 元夫²⁾ 守殿 貞夫¹⁾

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A NEW HUMAN RENAL CELL CARCINOMA CELL LINE (KG-2) AND METASTATIC MODEL IN NUDE MICE

Kazuo Gohji¹⁾, Motowo Nakajima²⁾ and Sadao Kamidono¹⁾

¹⁾Department of Urology, Kobe University School of Medicine
(Director: S. Kamidono)

²⁾The Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo
(Director: T. Tsuruo)

A new cultured cell line (KG-2) derived from human renal cell carcinoma and a metastatic model in nude mice were studied. KG-2 was cultured from renal cell carcinoma (clear cell carcinoma) of the left kidney. In vitro doubling time of KG-2 was approximately 50 hours. KG-2 cells produced tumors in both the subcutaneous and renal sub-capsular space in nude mice, with tumorigenicity of 75%, showing no difference between the two sites. Histologically, tumors formed in the subcutaneous sites were hypovascular granular cell carcinoma. Moreover, each tumor was encapsulated by a thick fibrous capsule and never produced distant metastasis or invasion into the surrounding tissue. However, tumors formed in the subrenal capsular space were clear cell carcinoma. These tumors were hypervascular, and produced distant metastases. The most common metastatic site was the lung. Immunohistochemical analysis using anti-human collagenase type IV antibody on tumors formed in subcutaneous and subrenal capsular sites demonstrated that the expression of this enzyme in tumors formed in the subrenal capsular space was much higher than that in tumors formed in the subcutaneous site. Additionally, immunohistochemical study using anti-mouse collagen type IV antibody, a major components of the vascular wall, demonstrated many small densely growing vessels in tumors formed in the subrenal capsular space. In contrast, few vessels were produced in tumors formed in subcutaneous sites. These findings suggest that factors relating to the different injection sites may regulate the production of collagenase type IV secreted by KG-2 cells and neovascularity in nude mice. This metastatic model may be useful in the study of the mechanism of cancer metastases.

Key words: renal cancer, collagenase type IV, metastases

要旨: 新しくヒト腎細胞癌培養株(KG-2)を樹立すると共に, ヒト腎細胞癌転移動物モデルを作成した。KG-2細胞は組織型が淡明細胞癌であった摘出左腎腫瘍より樹立され, その in vitro doubling time は約50時間であった。本腫瘍細胞をヌードマウスの皮下および腎被膜下に移植したところ両者間で造腫瘍能に差を認めなかった(共に75%)。しかし, 皮下に形成された腫瘍の組織像は顆粒細胞癌で血管に乏しく線維性被膜に被われ転移浸潤傾向を示さなかった。他方, 腎被膜下に形成された腫瘍は淡明細胞癌で腎実質および同周囲組織へ浸潤傾向を示し, 高率に肺に転移をきたした。抗ヒト collagenase type IV 抗

³⁾ 現: 兵庫県立成人病センター泌尿器科

体を用いた免疫組織学的検討では、腎被膜下腫瘍では皮下腫瘍に比べ本酵素の発現が強くまた抗マウス collagen type IV 抗体を用いた検討では腎被膜下に形成された腫瘍では、皮下に形成された腫瘍に比べより密に腫瘍内新生血管の増生が認められた。これらの事実は腫瘍細胞移植部位での host 例の何らかの因子が移植腫瘍の collagenase type IV 産生、および腫瘍内新生血管の増生を調節している可能性が示唆された。

本転移モデルはヒト腎細胞癌の転移機序の解明に有用と思われた。

キーワード：腎細胞癌，コラゲナーゼタイプIV，癌転移

緒 言

腎細胞癌は、泌尿器科領域の悪性腫瘍のうち膀胱癌、前立腺癌に次いで多いが、制癌化学療法、免疫療法および放射線療法等は有効性に乏しく、手術療法のみ有用とされる。従って遠隔転移を有する進行例の予後は極めて不良である。

遠隔転移を有する進行期癌に対する有効な治療法の開発には、癌転移機序解明のために有用な“転移モデル”を確立することがその第一歩と思われる。そこで最近、我々は新しくヒト腎細胞癌培養株細胞を樹立し、この細胞をヌードマウスの orthotopic site(腎被膜下)に移植することで主に肺転移を形成する“転移モデル”を作成したのでその性状につき報告する。

方 法

1. 培養細胞株の樹立

根治的左腎摘出術により58歳男性から得られた左腎細胞癌を無菌的に切除し、肉眼的に出血巣、壊死巣を除去した後、クーバーと、メスを用いて約1mm³の大きさに細切する。その後270U/mlのDNaseおよび200U/mlのcollagenase type I(共にSigma Chemical Co, St. Louis, MO)の混合液中で37℃, 30分間攪拌し、滅菌4層ガーゼで濾過した後、細胞浮遊液をHank's balanced salt solution (HBSS; GIBCO, Grand Island, NY)で2度遠沈(×1,000g, 5分間)、洗浄する。その後10%fetal bovine serum (FBS), sodium pyruvate, non essential amino acid, L-glutamineおよびvitamin solution(いずれもGIBCO, NY)を含むEagl's minumum essential media (EMEM; GIBCO, NY)を加え trypan blue 染色を施し Coulter Counter (Coulter Electronics Inc. Hialeah, FL.)を用いて非青染細胞を生細胞として数え1×10⁵個/mlの生細胞浮遊液を作成する。こうして得られた生細胞浮遊液を直径60mmの tissue culture petri dish (Costar, Cambridge, MA)に播種し、静置培養した。培地は72時間毎に新鮮10%FBS含有EMEMと半量交換された。細胞がシート状に増殖し

約80%confluent となったとき、培地を捨て dish を5mlのHBSSで軽くすすいだ後、0.02%EDTAと0.25%trypsin(共にSIGMA; NY)混合液5mlを数分間作用させ、軽くピペッティングを施行した後、20mlの10%FBS含有EMEM中で2度遠沈(×1,000g, 5分間)、洗浄した。trypan blue 染色を施し生細胞数をかぞえ5×10⁵個の生細胞を直径60mmの tissue culture petri dishに播種し、37℃で再び培養を続けた。なお摘出腎細胞癌の組織型は日本泌尿器科学会編、腎癌取り扱い規約¹⁾に準じ clear cell common type, grade 2(図1), pT2, V(0), N(0)であった。本腫瘍は術後約1年目に肺および骨に多発性転移をきたした。

2. 細胞倍化時間

1×10⁴個の生細胞を直径35mmの tissue culture petri dish (Costar, MA)に播種し、2mlの10%FBS含有EMEM中で培養した。培養開始後24時間毎に7日間、細胞に0.02%EDTAと0.25%trypsinの混合液を数分間作用させた後、軽くピペッティングを施し単離細胞浮遊液を作成し、前述したのと同様に trypan blue 染色を施して生細胞数を数えた。培養は3プレートずつ行われその平均値をグラフ上に prot し、細胞倍加時間を算出した。なお培地は72時間毎に新鮮10%

図1 原腫瘍の病理組織像：腫瘍は主に clear cell carcinoma より成る腎細胞癌である(H & E染色×250)。

FBS 含有培地と半量交換された。

3. 培養細胞のヌードマウスへの移植

a) 皮下移植

対数増殖期にある第5代目培養細胞を0.02% EDTA と0.25% trypsin の混合液を作用させ単離細胞浮遊液を作成し、2度 HBSS で遠沈、洗浄し trypan blue 染色を施した後非青染細胞を数え、95%以上の生細胞率を有する 5×10^6 細胞/ml の HBSS 単離細胞浮遊液を作成した。その0.2ml (1×10^6 生細胞を含有) を27G needle 付注射器を用いて8週齢、雄ヌードマウスの皮下へ移植した。毎週、腫瘍形成の有無および腫瘍の長径、短径を測定して下記の数式により腫瘍の推定体積を求め、グラフ上に plot して腫瘍倍化時間を求めた。

$$\text{推定腫瘍体積} = \text{長径} \times (\text{短径})^2 / 2$$

腫瘍の長径が約2cm に達した時ヌードマウスを屠殺し、摘出皮下腫瘍重量を計測すると共に一部は -180°C 液体窒素にて凍結、残りは10%ホルマリン溶液にて固定後組織学的検討に用いた。また全臓器を摘出、10%ホルマリン溶液にて固定後転移の有無を確認し、なお、肺は24時間 Bouins 溶液にて固定後、実体顕微鏡下に直径0.1mm 以上の転移結節を数えた後10%ホルマリン固定し、組織学的に検討した。

b) 腎被膜下移植

内藤らの方法に準じた²⁾。すなわち8週齢雄ヌードマウスを methoxyflurane で麻酔後、左季肋部をクーバーで切開し脾臓を露出、綿棒を用いて脾臓を腹側へ圧排し左腎を露出する。腎下極より27G needle 付注射器をゆっくり腎上極へむけ刺入し、腎被膜に水泡ができる様に 1×10^6 生細胞を含む0.05ml の HBSS を注入し、周囲へもれのないことを確認後、腎を創内へもどし皮膚をクリップにて閉鎖した。約3カ月後にマウスを屠殺解剖し、皮下腫瘍と同様に腎被膜下に形成された腫瘍および全臓器を摘出、ホルマリン固定し、組織学的検討および転移巣の検索を行った。

4. 免疫組織染色

中島らの方法に準じて行った³⁾。すなわちヌードマウスに形成された腫瘍を摘出し、壊死および出血巣を取り除いた後、Tissue TEK, O.C.T. Compound (Miles Laboratory, Elkhart, Ind) を充満した直径20mm のアルミ製容器に腫瘍片を入れ、液体窒素で急速凍結した後 -70°C で保存した。これらを IEC Minotome cryostat で薄切し、3-amino propyltriethoxysilane (Aldrich Chemical Co, Inc) でコートしたスライド

ガラス上で 23°C 、45分間乾燥させた。その後0.125% glutaraldehyde で2分間固定し HBSS で軽くすすぎ、更に1.0% Triton X-100で5分間処理した。次に、phosphate buffered saline (PBS: SIGMA, NY.) で洗浄後1%goat 血清および1%牛血清をふくむ PBS で20分間処理し、次に各抗体を1時間反応させた。その後スライドガラスを PBS で3度すすぎ、4倍に希釈した gold-labeled goat anti-rabbit IgG (GAR5; Janssen Life Science Products, Piscataway, NJ) で1時間処理し、PBS および蒸留水で軽く洗った。これらを Mayer's hematoxylin で対染色を施し、光学顕微鏡下に観察した。抗体は72kda および92kda 抗ヒト collagenase type IV 抗体 (National Cancer Institute of the Lance A Liotta 博士より供与) および抗マウス collagen type IV 抗体 (Collaborative Res; Bedford, Mass, USA.) を用いた。

結 果

1. KG-2細胞の形態および in vitro doubling time

本細胞は培養開始当初より殆ど fibroblast の混入、増殖を認めず、多角形をした大型核を有する細胞が、単層に増殖し所々に分裂像を有していた(図2)。しかし、上皮細胞の単層培養でみられる“敷石状”増殖を示さず、一見、間葉系由来の細胞の如く個々の細胞は単離して増殖する様にみえた。本培養細胞は KG-2 と命名された。KG-2細胞の in vitro doubling time は比較的遅く第5代、第8代および第15代の細胞で各52、48および40時間であった。

2. ヌードマウスでの腫瘍形成能および転移能

Ectopic site (皮下) および orthotopic site (腎被膜下) に移植された KG-2細胞の造腫瘍能と転移能を表

図2 KG-2細胞の倒立顕微鏡像：多角形をして大型核を有する細胞が単層に増殖している ($\times 120$)。

図3 ノードマウスに形成された腫瘍の病理像：A) 皮下 (ectopic site) 腫瘍；腫瘍の組織型は granular cell common type で中心壊死を伴っており厚い線維性被膜でよく被われている (H & E 染色×120) 矢印；線維性被膜。
B) 腎被膜下 (orthotopic site) 腫瘍；腫瘍の組織型は原腫瘍とよく類似した clear cell common type である (H & E 染色×120)。

1に示す、Ectopic および orthotopic site での造腫瘍能は共に75%と両者間に差を認めない。しかし ectopic site に形成された腫瘍は転移浸潤傾向を示さないのに対し、orthotopic site に形成された腫瘍は75%の例で遠隔転移をきたした。転移部位で最も多いのは肺、次いで腎茎部リンパ節、腹腔内への直接浸潤の順であった。また肺転移巣結節数はノードマウス1匹あたり2～40個でその中央値は9個であった。

3. ノードマウスにおける ectopic および orthotopic site に形成された腫瘍の病理組織学的検討

Ectopic および orthotopic site に形成された腫瘍の病理組織学的所見の概略を表1に示す。

Ectopic site に形成された腫瘍は病理学的に腎細胞癌, granular cell common type で原腫瘍の組織型 (clear cell common type) とは異なっており、これら

図4 抗マウス collagen type IV 抗体を用いたノードマウス腫瘍の免疫組織像：A) 皮下 (ectopic site) 腫瘍；比較的大型の血管が疎に新生している。B) 腎被膜下 (orthotopic site) 腫瘍；小血管が密に新生している (×100)。

表1 ノードマウスにおける KG-2細胞の造腫瘍性、転移浸潤能および形成腫瘍の組織像

移植部位	皮下 (Ectopic site)	腎被膜下 (Orthotopic site)
造腫瘍能	9/12(75%)	12/16(75%)
組織像	顆粒細胞癌	淡明細胞癌
被膜	+	—
腫瘍血管新生	+	++
	大型の血管が疎に増生	小型の血管が密に増生
中心壊死	+	—
転移・浸潤能	0/9(0%)	9/12(75%)
肺 (転移結節数)	0	9/9 (2—40 : 9) ¹⁾
リンパ節	0	1/9

1) 肺転移結節数中央値

の腫瘍は比較的大きな線維性被膜に被われ周囲組織への浸潤傾向を示さず、また中心壊死を認めた (図3A)。他方、orthotopic site に形成された腫瘍の組織型は原腫瘍のそれと非常によく類似した腎細胞癌, clear cell common type が主体であった (図3B)。また肺転移巣

図5 抗ヒト collagenase type IV 抗体を用いたヌードマウス腫瘍の免疫組織像：A) 皮下 (ectopic site) を腫瘍を抗ヒト72kda collagenase type IV 抗体で染色, B) 腎被膜下 (orthotopic site) 腫瘍を抗ヒト72kda collagenase type IV 抗体で染色 (×100).

腎被膜下に形成された腫瘍では皮下に形成された腫瘍に比べ72kda collagenase type IV の産生が増強していた。

は orthotopic site の腫瘍と類似した組織型を示しており、また被膜を有せず macrophage の浸潤を認めた (data は示さず)。

4. ヌードマウスに形成された腫瘍の免疫組織学的検討

Ectopic site (皮下) に形成された腫瘍は比較的大型の血管が疎に増生しているのに対し, orthotopic site (腎被膜下) に形成された腫瘍は多数の小血管が密に増生していた (図 4A, B)。また腎被膜下に形成された腫瘍では皮下に形成された腫瘍に比べ72kda および92kda, collagenase type IV の発現が共に強く認められた (図 5A, B, 92kda, collagenase type IV の data は示さず)。

考 察

癌細胞は heterogeneity であることはよく知られて

おり、全細胞のうちわずか $1/10^6$ のクローンのみ転移する能力を有していると考えられる。癌が転移巣を形成するには幾つかの step を経なければならない⁴⁾⁵⁾。即ち、1) 癌細胞が局所 (原発巣) で増殖すること、2) 癌細胞が原発巣から周囲組織への浸潤すること、3) 癌細胞が脈管内皮細胞を破壊し脈管内への侵入すること、4) 脈管内に侵入した癌細胞が脈管内での血流、リンパ流等の機械的外力に打ちかつこと、5) 血小板等により癌細胞が凝集し標的臓器で trap されること、6) 癌細胞が標的臓器での脈管外への浸潤すること、7) 癌細胞が標的臓器での増殖すること、これら諸因子がすべて満たされてはじめて転移が形成される。1889年、Paget は⁶⁾癌が転移巣を形成するためには癌細胞 (seed) のみならず転移を形成する標的臓器 (soil) が重要であると提唱した。彼の仮説は後に前立腺癌は骨、大腸癌は肝、腎癌は肺に最も転移するという事実により正当化されている。また Fidler らは、癌細胞がその原発巣より浸潤し転移を形成するには、癌細胞自身の特性、例えば癌細胞の遊走能、collagenase type IV などの extracellular matrix degradate enzyme の産生能などの他に癌細胞が移植あるいは播種された部位の宿主側の環境因子が重要であると報告した⁷⁾⁸⁾。例えば彼らは、ヌードマウスの皮下にヒト大腸癌細胞を移植すると、皮下に形成された腫瘍は決して転移浸潤傾向を示さないのに対し、同一細胞を結腸壁に移植すると同部位に形成された腫瘍は高率に肝転移を形成する⁸⁾、また同様にヒト乳癌細胞を乳房組織へ⁹⁾、前立腺癌細胞を前立腺へ移植すれば高率に転移を形成することを示した¹⁰⁾。今回、我々は新しい樹立したヒト腎細胞癌培養細胞 (KG-2) をヌードマウスの皮下および腎被膜下へ移植しその造腫瘍能と転移能を検討した。本腫瘍は ectopic site である皮下および orthotopic site である腎被膜下における造腫瘍能に差を認めないが、皮下に形成された腫瘍は決して転移浸潤傾向を示さないのに対し、腎被膜下に形成された腫瘍周囲組織へ浸潤すると共に高率に肺転移をきたした。しかも興味深いのは腎被膜下に形成された腫瘍は原腫瘍と非常に類似した組織像を呈しているのに対し、皮下に形成されたものの組織像は原腫瘍のそれとおおいに異なっていた。このことは、腎細胞癌細胞 (KG-2) にとって ectopic site である皮下と orthotopic site である腎被膜下ではそれぞれの部位で増殖するのに適したクローンのみ増殖したことを示しており、移植部位における宿主由来の異なった増殖因子が関与していることを強く示唆して

いる。

近年, extracellular matrix degradate enzyme の一種である collagenase type IV は extracellular matrix および血管内皮細胞基底膜の主な構成成分である collagen type IV を破壊するため本酵素活性の発現の程度と転移浸潤能とはよく相関することが示されている^{2)11)~13)}。今回の我々の検討において、ヌードマウスより摘出した腫瘍を抗ヒト 72kda および 92kda collagenase type IV 抗体あるいは血管壁の collagen type IV と反応する抗マウス collagen type IV 抗体を用い免疫組織学染色を施行したところ、腎被膜下に形成された腫瘍では皮下に形成された腫瘍に比べ非常に強く 72kda および 92kda collagenase type IV の発現と多数の新生血管の増生が認められた。このことから、同一癌細胞でもヌードマウスの移植部位によって癌細胞のもつ collagenase type IV の発現と腫瘍新生血管の増生に差が生じ、その結果として腎被膜下に形成された腫瘍で周囲組織および血管内への浸潤傾向を有し、肺に転移をきたすと推定された。

これらの事実は腎細胞癌 (KG-2) では orthotopic site (腎被膜下) では KG-2 細胞のもつ collagenase type IV の産生が host 側の何らかの因子により促進され、他方 ectopic site (皮下) では抑制されていることを示している。更に orthotopic site (腎被膜下) に形成された腫瘍では小血管が密に増生していたのに対して ectopic site (皮下) に形成された腫瘍では比較的大きな血管が疎に形成されていたこともこれらの両者の腫瘍の転移能に大きく関与しているものと思われる。これら collagenase type IV の発現および腫瘍内血管新生に影響を及ぼす host 側の因子につき現在検討を加えている。

結 語

1) 新しくヒト腎細胞癌細胞 (KG-2) を樹立すると共に本細胞を用いたヌードマウス転移モデルを作成した。

2) KG-2 細胞の転移形成には orthotopic site (腎被膜下) への移植が必要である。

3) KG-2 細胞を orthotopic site (腎被膜下) に移植し形成された腫瘍は ectopic site (皮下) に形成した腫瘍に比べ collagenase type IV の発現が強く、腫瘍内新生血管が豊富であった。これらの相異が両者の転移能の差異に大きく関与していると思われる。

4) Ectopic site (皮下) および orthotopic site (腎被膜下) に形成された腫瘍の collagenase type IV の

発現、および腫瘍新生血管の増生に影響を与える host 側の因子につき検討中である。

5) 本転移モデルはヒト腎細胞癌の転移機序の解明に有用であると思われる。

文 献

- 1) 腎癌取扱い規約：日本泌尿器科学会・日本病理学・日本医学放射線学会編，金原出版，東京，1983.
- 2) Naito, S., von Eschenbach, A.C. and Fidler, I.J.: Different growth patterns and biologic behavior of human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 78 : 377—385, 1987.
- 3) Nakajima, M., Morikawa, K., Fabra, A., Bucana, C.D. and Fidler, I.J.: Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82 : 1890—1898, 1990.
- 4) Nicolson, G.L.: Cancer metastasis; tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochem. Biophys. Acta*, 948, 175—224, 1988.
- 5) Poste, G. and Fidler, I.J.: The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283, 139—146, 1979.
- 6) Paget, S.: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 571—573, 1889.
- 7) Fidler, I.J.; Orthotopic implantation of human colon carcinoma into nude mice for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 10, 229—243, 1991.
- 8) Morikawa, K., Walker, S.M., Jessup, J.M. and Fidler, I.J.: In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res.*, 48, 1943—1948, 1988.
- 9) Price, J.E., Polyzos, A., Zhang, R.D. and Daniels, L.M.: Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res.*, 50, 717—721, 1990.
- 10) Stephenson, R.A., Dinney, C.P.N., Gohji, K., Ordonez, N.G., Killion, J.J. and Fidler, I.J.: Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 951—957, 1992.
- 11) Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I.R., Foltz, C.M. and Shafie, S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 248, 67—68, 1980.
- 12) Nakajima, M., Welch, D.R., Belloni, P.N. and

- Nicolson, G.L.: Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res.*, 47, 4869—4876, 1987.
- 13) Morikawa, K., Walker, S.M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J.M. and Fidler, I.J.: Influence of organ environment on the growth, selection and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res.*, 48, 6863—6871, 1988.
- (1992年12月4日受理)
-