原	著
---	---

各種癌細胞における増殖活性と トランスフェリンレセプター発現量に関する研究

塩 谷 健 一

東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第 1 講座 (主任: 天笠光雄教授)

(1994 年 9 月 30 日 受付)

A Study of Relationship Between Proliferative Activity and Expressed Transferrin Receptor Content in Cancer Cells

Kenichi Shionoya

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Chief: Prof. Teruo Amagasa)

Transferrin receptor (TfR) is expressed in the proliferating cells. The author performed an immunohistochemical investigation with TfR and an analysis of TfR protein and mRNA in several cell-lines and examined the relationship between the TfR content and the proliferative activity of the tumor cells.

Immunohistochemical examination revealed a strong reaction of the TfR was found in the cell membrane of the epithelial malignant tumors and the non-epithelial malignant tumors showed diffuse staining in the cytoplasm.

TfR was almost regulated by the cellular density in the culture dishes. A confluent phase growth led to a low level of TfR. And among the several cell-lines, a higher level of TfR was seen in the cell of the short-doubling time than that of the long-doubling time.

In vivo, similarly the rapid growth tumor indicated a high level of TfR rather than the slow growth one.

Thus, the level of TfR indicates the degree of the proliferative activity of the tumor cells, so the examination of TfR content is helpful for the determination of the degree of malignancy in each tumor case.

I. 緒 言

悪性腫瘍における悪性度の判定は、現在臨床的進展度や転移の有無などの臨床所見、組織型、分化度、細胞異型、浸潤様式などの病理学的所見によって検討されているが、患者の治療法の選択や予後の推測においては未だ十分とはいえないのが

現状である。予後を推測する因子にはさまざまなものがあるが、著者は癌細胞に内在する増殖活性に注目し、細胞膜上に表現されるトランスフェリンレセプター (以下 TfR と略す) の発現量と腫瘍の悪性度との関連を検討した。

本来すべての哺乳動物の細胞において、酸化・呼吸酵素の組成として鉄が重要な役割を担ってお

り、分裂期の細胞がその増殖のために鉄を必要とし、鉄輸送蛋白であるトランスフェリン(以下 Tf と略す)が無血清培地での細胞増殖に必須であることも明らかになっている^{1,2)}。この Tf に結合した鉄イオンの細胞内への取り込みが、細胞表面の特異的結合蛋白である TfR を介して行われる³⁾。この TfR は各種培養細胞や悪性腫瘍組織に多数存在することが報告されている⁴⁻¹⁰⁾。

本研究では、各種培養細胞株を用いて TfR 発現量と悪性腫瘍細胞の増殖活性との関係を明らかにし、これが悪性腫瘍の悪性度の判定に有用であるかどうか検討した。

II. 実験材料および方法

各種ヒト培養細胞株およびヌードマウスに移植して形成された腫瘍を用いて TfR の発現様式を免疫組織化学的に検索し、さらに、TfR 発現量の変化をタンパクレベルおよび mRNA レベルにて定量することにより細胞の増殖活性との関連を探索した。

1. 細胞および培養法

細胞は、正常線維芽細胞株(KD 細胞, TIG 103 細胞)、口腔由来扁平上皮癌細胞株(KB 細胞, HSC-2, 3, 4, 7 細胞, HOC 313 細胞)、子宮頸部由来扁平上皮癌細胞株(HeLa 細胞)、非上皮系悪性腫瘍細胞株{MeWo 細胞(悪性黒色腫細胞)、NY 細胞(骨肉腫細胞)、HT 1080 細胞(線維肉腫細胞)}を使用した。なお KD 細胞, TIG 103 細胞, KB 細胞, MeWo 細胞, HT 1080 細胞, NY 細胞は、Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB) より供与を受けた。

これらの細胞のうち、TIG 103 細胞, KB 細胞, HeLa 細胞, MeWo 細胞, NY 細胞, HT 1080 細胞は 10%ウシ血清(FBS, 日本生物材料センター)含有 Eagle's MEM(日水製薬)を培地とし、他は 10%ウシ血清(FBS, 日本生物材料センター)含有 Dulbecco's modified Eagle's MEM(日水製薬)を培地とし、5%CO₂, 37℃条件下で継代維持した。

2. ヌードマウスへの細胞の移植方法

実験動物には 6 週齢・雌ヌードマウス BALB/c-nu/nu(日本クレア)を、東京医科歯科大学動物実験施設においてクリーンラック内で飼育したものをを用いた。飼料および飲料水は自由摂取とし、飼育管理は可及的無菌状態にて行い、固形飼料は滅菌したもの、飲料水、床敷およびゲージは清潔なものを使用した。

ヌードマウスへ移植した細胞としては、口腔由来扁平上皮癌細胞株(HSC-2, 3 細胞, KB 細胞)、非上皮系悪性腫瘍細胞株(MeWo 細胞, HT 1080 細胞)を用いた。継代を行っている細胞を 0.2%トリプシンにて分散後、培養液中の細胞密度が 1×10^7 cells/ml となるように調整し、ヌードマウスの背部に 0.2 ml 注射し移植した。*in vivo* での腫瘍の増殖曲線から倍加時間を求めた。腫瘍体積が 200~300 mm³ となったところで切り出し、免疫組織化学用および RNA 抽出用材料とした。

3. 免疫組織化学的検索

スライドガラス上で細胞を培養し、subconfluent 状態および confluent 状態になったところで、細胞を PLP(periodate-lysine-paraformaldehyde)固定液にて 4℃, 4 時間固定した。免疫組織化学は間接酵素抗体法である ABC(avidin-biotinylated peroxidase complex)法にてベクタステイン ABC キット(抗マウス IgG, Vector Laboratories)を用い、江石ら¹¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、PBS(Phosphate Buffer Saline)にて 5 分、3 回洗浄後、正常ウマ血清により非特異結合をマスキング(室温, 20 分)し、一次抗体(抗 TfR モノクローナル抗体, HuLy-m 9¹²⁾, AMD 社)を室温, 1 時間反応させた。PBS にて洗浄後、二次抗体(ビオチン化抗マウス IgG)を室温にて 30 分作用させ、PBS にて洗浄後、ABC 溶液にて反応(室温, 1 時間)後、0.005% H₂O₂-DAB(3, 3-diaminobenzidine)溶液に浸漬し、発色させた(室温, 10 分)。水洗後メチルグリーンによる核の対比染色を行い、透徹・封入後、光学顕微鏡にて観察した。

ヌードマウスから摘出した腫瘍は、PLP 固定液

に一昼夜固定後, 10, 15, 20%ショ糖に各々 4 時間浸漬し, O. C. T. コンパウンド中に試料を沈め急速凍結した。試料はクリオスタット (Leiz 社) にて厚さ $6\mu\text{m}$ の薄切切片を作製した。薄切切片は風乾後, PBS にて洗浄し, 内因性ペルオキシダーゼ処理のために 0.3% H_2O_2 メタノール溶液 (30 分, 室温) 浸漬後, 江石ら¹¹⁾の方法に準じて免疫組織化学反応を行った。

4. フローサイトメトリー (以下 FCM と略す) による解析

各種培養細胞株の subconfluent 状態の細胞と confluent 状態の細胞における TfR 発現量を FCM を用いてタンパクレベルで解析した。培養細胞を PBS にて洗浄後, 0.02%トリプシン (37℃, 3 分) およびピペッティングにて細胞を浮遊状態とした。PBS にて遠心洗浄 (1,500 rpm, 5 分) 後, 10% γ -グロブリン (4℃, 10 分) により Fc レセプターの非特異結合をマスキングし¹³⁾, Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 TfR モノクローナル抗体 (B. D. 社) を 4℃, 30 分間反応させた。PBS にて洗浄後, 死細胞を認識するため Propidium iodide (PI) 染色 ($50\mu\text{g}/\text{ml}$, 室温, 20 分) を行い, $50\mu\text{m}$ ナイロンメッシュにて濾過後, FACStar (Becton Dickinson 社製) にて解析した。解析は 10^4 個の細胞につき細胞数軸モードの蛍光値を測定し検体の TfR 発現量とした。条件はノズル径 $70\mu\text{m}$, 濃度は $10^6\text{cells}/\text{ml}$, 流速 $500\text{cells}/\text{秒}$ にて行った¹⁴⁾。

5. ノーザンブロット解析

各種培養細胞株の subconfluent 状態と confluent 状態の細胞およびヌードマウスから摘出した腫瘍を PBS で洗浄後, 全 RNA の抽出を acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法 (AGPC 法) に従い行った。抽出した全 RNA $20\mu\text{g}$ を 2.2mol/L ホルムアルデヒド含有 1.0% アガロースゲルにて電気泳動した。その後, エレクトロブロット法により RNA をナイロンメンブランフィルター (Zeta Probe, BIORAD 社) へ転写させ, ^{32}P 標識 DNA プローブとハイブリダイズさせた。DNA プローブはヒト TfR cDNA 4.9

kb¹⁵⁻¹⁷⁾ およびコントロールとしてヒト glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA を用い, Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim 社) により ^{32}P -dCTP (NEN 社) で標識し, Quick Spin Column (Boehringer Mannheim 社) で精製し, $5\sim 10\times 10^8\text{cpm}/\mu\text{g}$ の比活性をもつプローブを作製した。プレハイブリダイゼーションは, 50%formamide, $4\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}: 0.15\text{M NaCl}/0.015\text{M Na citrate}$), 0.1%SDS, 10%Denhart's solution, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ salmon sperm DNA にて 42℃ 18~24 時間行い, ハイブリダイゼーションは, 50%formamide, $4\times\text{SSC}$, 0.1%SDS, 10%Denhart's solution, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ salmon sperm DNA の混合液に ^{32}P 標識プローブをおよそ $1\times 10^6\text{cpm}/\text{ml}$ の割合で加え, 42℃ 16~24 時間行った。ナイロンメンブランは $2\times\text{SSC}$, 0.1%SDS, $0.5\times\text{SSC}$, 0.1%SDS, $0.1\times\text{SSC}$, 0.1%SDS 溶液を用い, 室温にてそれぞれ 15 分ずつ洗った。洗浄後, 増感紙を用いて通法によりオートラジオグラフィーを行った。その後, 同じメンブランを用いてコントロールのヒト GAPDH cDNA プローブとハイブリダイゼーションを行った。陽性バンドの放射線量は, イメージングアナライザー BAS 2000 (富士フイルム社製) にて測定し, TfR mRNA/GAPDH mRNA により各種培養細胞株および各種腫瘍組織における TfR mRNA 発現量を定量した。

III. 結 果

1. 各種ヒト培養細胞株を用いた検索

1) 各種培養細胞株の倍加時間

通法に従い各種培養細胞株の倍加時間を算出した。正常線維芽細胞は KD 細胞 17.7 時間, TIG 103 細胞 71 時間であった。上皮系悪性腫瘍細胞株では HeLa 細胞の 13.1 時間から HSC-7 細胞の 22.4 時間で, 平均 16.9 時間であった。また, 非上皮系悪性腫瘍細胞株では MeWo 細胞の 21 時間から NY 細胞の 66 時間で, 平均 36.6 時間であった。

2) 免疫組織化学的所見

正常線維芽細胞株では、細胞全体にびまん性に TfR 陽性反応がみられたが、全体的に染色強度は弱かった。

口腔由来扁平上皮癌細胞株では、細胞膜に一致して、いわゆるリング状に TfR 陽性反応が認められた (図 1) が、染色強度は各種培養細胞株により異なり、細胞の倍加時間と染色強度の間に相関性は認められなかった。また、confluent 状態の細胞と subconfluent 状態の細胞との間、つまり細胞密度の違いによる染色強度の差も認められなかった。

図 1 口腔由来扁平上皮癌細胞株 (KB 細胞) の免疫組織像 (×130)
細胞膜に一致してリング状に TfR 陽性反応が認められる

非上皮系悪性腫瘍細胞株では細胞膜および細胞質にびまん性に TfR 陽性反応が認められ (図 2)、上皮系悪性腫瘍細胞株とは染色パターンが異なっていた。染色強度は各種培養細胞株により異なり、細胞密度や倍加時間との相関性は認められなかった。

3) FCM による解析

TfR 発現量をタンパクレベルで FCM を用いて定量し、TfR 発現量の違いを各種培養細胞株における倍加時間および細胞密度と比較すると、倍加時間の短い上皮系悪性腫瘍細胞株のほうが、倍加時間の長い非上皮系悪性腫瘍細胞株より TfR 発現量が多く、正常線維芽細胞株においては発現

図 2 非上皮系悪性腫瘍細胞株 (MeWo 細胞) の免疫組織像 (×130)
細胞膜および細胞質にびまん性に TfR 陽性反応が認められる

図 3 各種細胞株の subconfluent 状態における TfR 発現量と倍加時間の関係

量が低かった (図 3)。また、同一細胞株内において subconfluent 状態の細胞と confluent 状態の細胞で TfR 発現量を比較すると、各種細胞株ともに confluent 状態の細胞において TfR 発現量が低下していた (図 4)。しかし、TfR 発現量の低下率は各種培養細胞株で一定ではなかった。

4) TfR mRNA 発現量の検索

各種培養細胞株における TfR mRNA 発現量を細胞の倍加時間および細胞密度の違いで比較検

図4 HeLa 細胞の subconfluent 状態と confluent 状態における TfR 発現量の比較

図5 各種細胞株の subconfluent 状態における TfR mRNA 発現量と倍加時間の関係

討した。TfR mRNA 発現量は、タンパクレベルでの発現量と同様に、倍加時間の短い細胞ほど発現量が多かった (図5)。また、confluent 状態の細胞と subconfluent 状態の細胞における TfR mRNA 発現量を比較すると、多くの細胞株において confluent 状態の細胞で TfR mRNA 発現量の低下を示し (図6)、タンパクレベルでの TfR 発現量と相関性が認められた。

図6 HSC-3, KB, MeWo, HT 1080 細胞の subconfluent 状態と confluent 状態における TfR mRNA 発現量の比較
S : subconfluent, C : confluent

2. ノードマウスに移植し形成された腫瘍を用いた検索

1) 腫瘍の倍加時間

in vivo での腫瘍倍加時間は、腫瘍体積が 200~400 mm³ となるまでの時間から算出した。HT 1080 細胞が最も短く 3 日、次いで KB 細胞 4 日、HSC-2 細胞 5.5 日、MeWo 細胞 8 日、HSC-3 細胞 30 日の順であった。腫瘍の成長様式はいずれも圧迫型であり、浸潤性を示すものはみられず、また、転移も認められなかった。

2) 免疫組織化学的検索

上皮系悪性腫瘍細胞はそれぞれ原腫瘍と同様の分化度を示す組織像を示した。HSC-2 は高分化型扁平上皮癌の組織像を示し、TfR の発現は癌組織の辺縁部に陽性反応を認め、中心部では陽性反応はあまりみられなかった。個々の細胞ではリング状に陽性反応が認められた。

非上皮系悪性腫瘍細胞では、腫瘍組織全般に TfR 陽性反応が認められ、個々の細胞では細胞全体にびまん性に陽性反応が認められた。

3) TfR mRNA 発現量の検索

in vivo での腫瘍倍加時間と TfR mRNA 発現量を比較すると、倍加時間の短い腫瘍ほど TfR mRNA 発現量が多く認められたが、HT 1080 細胞のように倍加時間が短いにもかかわらず TfR mRNA 発現量が少ないものも認められた (図7、

図7 ヌードマウスに移植し形成された腫瘍における Tfr mRNA 発現量と腫瘍倍加時間の関係

図8 ヌードマウスに移植し形成された腫瘍における Tfr mRNA 発現量の比較

8)。

IV. 考 察

悪性腫瘍は局所での自律性増殖を示すとともに周囲組織へ浸潤し、遠隔転移をきたすものが多い。局所浸潤能、転移能は細胞の増殖活性と関連するとされ、核への³H-thymidineの取り込みやAgNOR, Ki 67, BrdU, DNA polymeraseなどの増殖に関するマーカーを用いて、細胞の増殖活性と臨床的悪性度との関連についての検索がなされている。

Tfはヘモグロビン合成や細胞の分裂、増殖に必要な鉄イオンの運搬に関与する蛋白であり、これ

は、細胞表面の特異的レセプターである TfR を介して細胞内に取り込まれる³⁾。TfR が、ヒト癌細胞由来培養細胞株である BeWo 細胞に存在することを Hamilton ら⁴⁾が報告して以来、Faulk ら⁵⁾は乳癌組織に、Lloyd ら⁹⁾は子宮頸癌に存在することを示し、種々の領域の悪性腫瘍および培養細胞株においてその発現が認められている⁴⁻¹⁰⁾。Habeshaw ら⁸⁾、Esserman ら¹⁸⁾は悪性リンパ腫において TfR 発現は細胞の悪性度の指標となりうることを示し、また、悪性黒色腫において、Nicolson ら¹⁹⁾は TfR 発現量と転移能との間に相関性があることを示している。さらに、漆崎²⁰⁾は Balb/c 3 T 3 細胞で、増殖期に TfR 発現量が増加し、PHA によるヒト末梢リンパ球の幼若化に伴い TfR の増加が認められるなど同一の細胞においても細胞の分裂、増殖、DNA 合成の亢進と伴行して TfR の増加が認められると報告していることなどから、これが細胞の増殖活性の指標として有用であると考えられている。

本研究においては、TfR の発現量の解析が悪性腫瘍における悪性度の判定に有用であるかどうかを検討するために、悪性腫瘍の増殖活性と TfR 発現量との関係を検索した。つまり、悪性腫瘍細胞株を用いて TfR の発現様式を免疫組織学的に検索するとともに、増殖活性の異なる種々の細胞株を用いて TfR 発現量の解析をタンパクレベルおよび mRNA レベルにて行い、最終的に各種細胞株における TfR の発現量が、各々の細胞株の増殖活性と相関するか否かを検討した。

1. TfR の免疫組織化学的検索

免疫組織化学的手法を用いた悪性腫瘍における TfR の検索についてはさまざまな報告があり^{5,7-10,21-25)}、悪性腫瘍における TfR 発現率や組織型、分化度などによる TfR 発現パターンの違いについて報告している。本研究で用いたヒト培養細胞株およびヌードマウスに移植し形成された腫瘍ではすべて TfR 陽性反応が認められた。正常組織では基底層、傍基底層にのみ陽性反応がみられ、良性腫瘍ではほとんど陽性反応を示さない^{22,23)}のに対して、悪性腫瘍での TfR 陽性率は、Faulk ら⁵⁾

は 72.7%, Wrba ら²¹⁾は 87.6%, 口腔領域では宮本²²⁾が 100%であったと報告し、いずれも高陽性率であった。また, TfR 発現パターンの違いについては, ノードマウスに移植して形成された腫瘍は原腫瘍と同様の組織像を示し, 上皮系悪性腫瘍の高分化型のものでは, 増殖活性の高い細胞が存在すると考えられる腫瘍辺縁部に, 個々の細胞が一定の構造を形成することなく, 異なる増殖活性を有する低分化型のものではびまん性に陽性反応が認められ, 非上皮系悪性腫瘍ではその多くはびまん性に陽性反応を呈していた。これらの所見は, 宮本²²⁾, 池内ら²³⁾が報告した発現パターンと同様の結果であり, 分化度, 組織型の違いによる発現パターンの差は, 腫瘍組織内における増殖活性の高さの違いを反映しているものと考えられた。Kondo ら²⁴⁾は肺癌において TfR 発現が組織学的分化度, 細胞異型度, 細胞分裂像の数と関連することから, これが腫瘍の増殖活性を反映しているものと推測し, 今後, TfR 発現量を検索することが臨床経過の予知に有用であると述べている。さらに, 宮本ら²⁵⁾は予後不良例において強い染色性を示したと報告している。

次に個々の細胞における TfR 発現パターンについて検討したところ, 上皮系悪性腫瘍細胞と非上皮系悪性腫瘍細胞では発現パターンが基本的に異なっており, TfR 発現パターンは上皮系悪性腫瘍細胞では細胞膜に一致してリング状を呈したのに対して, 非上皮系悪性腫瘍細胞では細胞質全体にびまん性に陽性反応を示した。この違いについて君島ら²⁶⁾は, 上皮系悪性腫瘍細胞株および非上皮系悪性腫瘍細胞株を用いて TfR の局在を免疫電子顕微鏡的に検索したところ, TfR の局在は基本的には細胞膜であることを示すとともに, 細胞表面に存在する微絨毛様突起の多く認められる上皮系悪性腫瘍細胞株のほうが非上皮系悪性腫瘍細胞株に比して相対的に細胞膜表面の TfR 発現量が多いことを報告しているように, 相対的な TfR 発現量の違いにより発現パターンが異なると考えられた。また, Willingham ら²⁷⁾は coated pit にある TfR のみ Tf と結合でき, 他のレセプターは免

疫組織化学的に染色性があっても増殖活性には関与しない可能性があることを指摘しているが, Hansen ら²⁸⁾は細胞密度の低いときには, coated pit 上の TfR の数が増すと述べており, TfR 発現量の増減が細胞の増殖活性を反映していると考えられた。

培養細胞株の subconfluent 状態と confluent 状態の細胞, つまり増殖活性の異なる細胞間で TfR の染色強度の違いを比較してみたが明らかな相関性は認められなかった。これは, 免疫組織化学にて増殖活性の高い細胞を捉えることは可能であるが, 染色強度の違いのみで細胞の増殖活性の差を比較するには限界があると思われ, 免疫組織化学的検索以外のほかの定量的な手法を用いて TfR 発現を検討する必要があると考えられた。

2. TfR 発現量について

腫瘍細胞における TfR 発現を免疫組織化学的検索以外の定量的手法にてさらに検討するために, TfR 発現量をタンパクレベルおよび mRNA レベルで定量し, これを細胞の倍加時間および細胞の増殖様式と比較検討した。本研究では, 各種培養細胞株の増殖様式のうち subconfluent 状態の細胞と confluent 状態の細胞での TfR 発現量を比較したところ, 本実験に用いたほとんどの培養細胞株において, confluent 状態の細胞で TfR 発現量の低下が認められた。これは, Bierings ら²⁹⁾が, cytotrophoblast 細胞を用いたタンパクレベルでの実験において, TfR の発現量は細胞密度によって調節されているという報告を支持するものであり, Kute ら³⁰⁾も静止期の細胞では TfR 発現量が低下していることを示している。このように, 免疫組織化学的検索では染色強度の差で細胞の増殖活性の程度を比較することは非常に困難であったが, タンパクレベルおよび mRNA レベルで定量することにより明確にこれを識別することが可能であった。confluent 状態の細胞では, 正常細胞と同様に contact inhibition などの要因により細胞自身の増殖活性が低下し, これに伴い TfR 発現量が低下したものと思われた。また, 漆崎²⁰⁾, Nishimura ら³¹⁾は対数増殖期の細胞は Tf に対す

る結合定数は変わらないにもかかわらず、静止期の細胞に比べ TfR 発現量が増加していると述べており、宮本²²⁾は HeLa 細胞に抗癌剤を作用させることによる増殖活性の低下に伴い TfR 発現量が低下することを示していることから、TfR が細胞の増殖活性に応じて発現していることが示唆された。

次に、各種培養細胞株の特性、特に倍加時間と TfR 発現量の関係を比較すると、倍加時間が短い細胞ほど TfR 発現量が多かった。漆崎²⁰⁾は異なった細胞株での TfR 発現量の比較は、起源、分化度、増殖能などの関連する要因が多いため解析困難であるとしているが、本研究では対数増殖期の細胞株を用いて比較したところ、タンパクレベル、mRNA レベルにおいても倍加時間と TfR 発現量が明らかな関連性を示した。細胞の増殖活性の違いにより TfR 発現量は逐次調節されているため、これが明確に倍加時間を反映しているとはいえないかもしれないが、本研究のように数種の細胞株間において TfR 発現量を比較することにより、相対的に増殖活性の高い細胞を捉えることが可能であった。つまり、TfR 発現量を定量することにより、細胞の増殖動態を類推することが可能であるばかりでなく、異なる細胞株間においても増殖活性の違いを識別することが可能であると考えられた。

臨床的に上皮系悪性腫瘍に比べ、非上皮系悪性腫瘍、特に悪性黒色腫や線維肉腫、骨肉腫のほうが一般的に転移が高頻度にみられ、局所での浸潤、増殖も顕著である。それゆえ本実験系においても非上皮系悪性腫瘍細胞株のほうが相対的に倍加時間が短く、TfR 発現量が多いと考えられたが、細胞株によっては上皮系悪性腫瘍細胞株よりも長い倍加時間、少ない TfR 発現量を示す非上皮系悪性腫瘍細胞株も認められた。しかし、*in vivo* にて腫瘍倍加時間に応じて TfR mRNA 発現量がほぼ相関性を示したことは、臨床材料を用いた検索において十分その有用性が示唆されると考えられた。

分子生物学的に TfR 発現量の調節は、転写レベ

ルおよび翻訳レベルにおいて行われていることが明らかにされつつある。通常は鉄による翻訳レベルでの調節が主であり、細胞内の鉄濃度に応じて IRE-BP (Iron responsive element-binding protein) の mRNA に対する親和性が変化することにより翻訳効率が変わり、TfR の発現量が調節されている³²⁾。一方、転写レベルでの調節は IRE 欠如 TfR をもつ細胞において対数増殖期には休止期の 10 倍の TfR 発現量が認められること³³⁾、TfR のプロモーター領域は SV 40 や IL-3 と相同性があること³⁴⁾、G-CSF で骨髄性白血病細胞を刺激すると TfR の発現が増加すること³⁵⁾から、分子生物学的にも細胞の増殖活性に応じた TfR の発現は転写レベルと関連があることが示唆されている。

TfR を免疫組織化学的に検索することは、腫瘍の局在、微小転移巣や浸潤度の把握に有用と思われるが、免疫組織化学的検索のみでは定量性の点で問題があり、細胞の増殖活性を把握するには限界があると思われた。そこで、TfR 発現量を FCM を用いてタンパクレベルで検索すると、種々の培養細胞株の増殖活性の違いを定量的に示唆し得た。さらに、TfR mRNA を定量することにより、*in vitro* ならびに *in vivo* にて各々の腫瘍の増殖活性の違いを詳細かつ正確に検索可能であった。TfR の発現量の調節が転写レベルで行われていることを考慮すると、TfR 発現量を mRNA レベルで定量することは、細胞の増殖活性を捉えるのに最も有用であり、今後悪性腫瘍の悪性度の判定の一助となりうるものと考えられた。

V. 結 語

本研究では、癌細胞の増殖活性と TfR 発現量の関係を明らかにするために、ヒト培養細胞株およびヌードマウスに移植し形成された腫瘍を用いて TfR 発現を免疫組織化学的に検索するとともに、タンパクレベルおよび mRNA レベルで TfR 発現量を定量することにより増殖活性との関連を総合的に検討した。

1. TfR の発現は、上皮系悪性腫瘍細胞株では

リング状に、非上皮系悪性腫瘍細胞株では細胞膜および細胞質にびまん性に認められたが、増殖活性の違いによる染色強度の差は認められなかった。

2. 種々の細胞株において、TfR 発現量をタンパクレベルで定量すると、倍加時間の短い細胞ほど TfR 発現量が多かった。

3. 種々の細胞株において、TfR 発現量を mRNA レベルで定量すると、タンパクレベルでの発現量と相関して、倍加時間の短い細胞ほど TfR 発現量が多かった。

4. subconfluent 状態と confluent 状態の増殖活性の異なる細胞株間で TfR 発現量を比較すると、タンパクレベルおよび mRNA レベルいずれも confluent 状態で TfR 発現量の低下が認められた。

5. *in vivo* においても、腫瘍倍加時間の短い腫瘍ほど TfR mRNA 発現量が多かった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました本学口腔外科学第 1 講座天笠光雄教授に謹んで感謝の意を表します。また、ご教示とご校閲を賜りました本学歯科理工学第 2 講座佐藤温重教授に深甚なる感謝を捧げます。また、直接懇切なるご指導、ご助言を賜りました口腔外科学第 1 講座田中信幸博士、宮本貴夫博士、本学医学部病理学第 1 講座中村恭一教授、本学医学部病院病理部江石義信助教授、本学医学部難治疾患研究所分子薬理学教室田村正人博士に心より感謝の意を表します。最後に本研究に際しご援助、ご協力をいただきました口腔外科学第 1 講座、医学部病理学第 1 講座の皆様には厚くお礼申し上げます。

本研究の要旨の一部は、第 13 回腫瘍マーカー研究会、第 30 回口腔組織培養研究会において発表した。

文 献

- Asian, P. : Current concepts in iron metabolism. Clin. Haemat. 11 : 241-247, 1982.
- Hutchings, S. E. and Sato, G. H. : Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 901-904, 1978.
- Baker, E., Gunner, D. and Patterson, S. : Effect of iron saturation on transferrin uptake by reticulocytes. Acta Haemat. 67 : 39-48, 1982.
- Hamilton, T. A., Wada, H. G. and Sussman, H. H. : Identification of transferrin receptors on the surface of human cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 6406-6410, 1979.
- Faulk, W. P., Hsi, B. L. and Stevens, P. J. : Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. Lancet 23 : 390-392, 1980.
- Shindelman, J. E., Ortmeyer, A. E. and Sussman, H. H. : Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells. Int. J. Cancer 27 : 329-334, 1981.
- Gatter, K. C., Brown, G., Trowbridge, I. S., Woodston, R. E. and Mason, D. Y. : Transferrin receptor in human tissues ; their distribution and possible clinical relevance. J. Clin. Pathol. 36 : 539-545, 1983.
- Habeshaw, J. A., Lister, T. A. and Stansfeld, A. G. : Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-hodgkin lymphoma. Lancet 5 : 498-500, 1983.
- Lloyd, J. M., O, dowd, T., Driver, M. and Tee, D. : Demonstration of an epitope of the transferrin receptor in human cervical epithelium-A potentially useful cell marker. J. Clin. Pathol. 37 : 131-135, 1984.
- Walker, R. A. and Day, S. J. : Transferrin receptor expression in non-malignant and malignant human breast tissue. J. Pathol. 148 : 217-224, 1986.
- 江石義信, 畠山 茂 : ABC 法による免疫組織染色法. 臨床検査 28 : 353-358, 1984.
- Panaccio, M., Zalcborg, J. R., Thompson, C. H., Leyden, M. J., Sullivan, J. R., Lichtenstein, M. and McKenzie, I. F. C. : Heterogeneity of the human transferrin receptor antibodies to detect tumours *in vivo*. Immunol. Cell Biol. 65 : 461-472, 1987.
- 高瀬浩造, 水野和枝, 大川洋二, 矢田純一 : モノクローナル抗体による細胞表面抗原検出における非特異反応の成因とその除去に関する研究. Jpn J. Clin. Immun. 8 : 184-191, 1985.
- 河本圭司, 赤木 清 : フローサイトメトリー入門. 東京, 1989, 医学書院, 10-13.
- Schneider, C., Owen, M. J., Banville, D. and Williams, J. G. : Primary structure of human

- transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* 311 : 675-678, 1984.
- 16) Kuhn, L. C., McClelland, A. and Ruddle, F. H. : Gene transfer, expression, and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell* 37 : 95-103, 1984.
- 17) McClelland, A., Kuhn, L. C. and Ruddle, F. H. : The human transferrin receptor gene : genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* 39 : 267-274, 1984.
- 18) Esserman, L., Takahashi, S., Rojas, V., Warnke, R. and Levy, R. : An epitope of the transferrin receptor is exposed on the cell surface of high-grade but not low-grade human lymphomas. *Blood* 74 : 2718-2729, 1989.
- 19) Nicolson, G. L., Inoue, T., VanPelt, C. S. and Cavanaugh, P. G. : Differential expression of a Mr~90,000 cell surface transferrin receptor-related glycoprotein on murine B 16 metastatic melanoma sublines selected for enhanced brain or ovary colonization. *Cancer Res.* 50 : 515-520, 1990.
- 20) 漆崎洋一 : ヒト培養細胞株の Transferrin Receptor に関する研究. 札幌医誌 52 : 269-283, 1983.
- 21) Wrba, F., Ritzinger, E., Reiner, A. and Holzner, J. H. : Transferrin receptor expression in breast carcinoma and its possible relationship to prognosis. *Virchows Arch A* 410 : 69-73, 1986.
- 22) 宮本貴夫 : トランスフェリンレセプターによる口腔領域悪性腫瘍の増殖能に関する研究. 口病誌 59 : 21-32, 1992.
- 23) 池内駿之, 田淵勝彦, 有森正樹 : 食道癌の EGF レセプターおよび Transferrin レセプター発現—sm 表在癌を中心として—. *Oncologia* 20 : 117-123, 1987.
- 24) Kondo, K., Noguchi, M., Mukai, K., Matsuno, Y., Sato, Y., Shimosato, Y. and Monden, Y. : Transferrin receptor expression in adenocarcinoma of the lung as a histopathologic indicator of prognosis. *Chest* 97 : 1367-1371, 1990.
- 25) 宮本貴夫, 田中信幸, 江石義信, 嶋田修士, 鈴木和彦, 天笠光雄 : 口腔領域悪性腫瘍におけるトランスフェリンレセプターの免疫学的検討. 頭頸部腫瘍 19 : 176-178, 1993.
- 26) 君島 裕, 田中信幸, 宮本貴夫, 塩谷健一, 三村将文, 天笠光雄 : 腫瘍細胞におけるトランスフェリンレセプター発現の免疫電顕的検討. 腫瘍マーカー研究会誌 9 : 161-162, 1993.
- 27) Willingham, M. C. and Pastan, I. : Ultrastructural immunocytochemical localization of the transferrin receptor using a monoclonal antibody in human KB cells. *J. Histochem. Cytochem.* 33 : 59-64, 1985.
- 28) Hansen, S. H., Sandvig, K. and van Deurs, B. : Internalization efficiency of the transferrin receptor. *Exp. Cell Res.* 199 : 19-28, 1992.
- 29) Bierings, M. B., Baert, M. R. M., van Eijk, H. G. and van Dijk, J. P. : Transferrin receptor expression and the regulation of placental iron uptake. *Mol. Cell Biochem.* 100 : 31-38, 1991.
- 30) Kute, T. E. and Quadri, Y. : Measurement of proliferation nuclear and membrane marker in tumor cells by flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 39 : 1125-1130, 1991.
- 31) Nishimura, J., Muta, K., Yamamoto, M., Ikeda, K., Ideguchi, H. and Ibayashi, H. : Expression and regulation of transferrin receptors on human leukemic cells (HL 60) during cellular proliferation and differentiation. *Acta Haematol. Jpn* 49 : 43-53, 1986.
- 32) Koeller, D. M., Casey, J. L., Hentze, M. W., Gerhardt, E. M., Chan, L. N. L., Klausner, R. D. and Harford, J. B. : A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 3574-3578, 1989.
- 33) Owen, D. and Kuhn, L. C. : Noncoding 3' sequences of the transferrin receptor gene are required for mRNA regulation by iron. *EMBO J.* 6 : 1287-1293, 1987.
- 34) Miskiminis, W. K., McClelland, A., Roberts, M. and Ruddle, F. H. : Cell proliferation and expression of the transferrin receptor gene : promoter sequence homologies and protein interactions. *J. Cell Biol.* 103 : 1781-1788, 1986.
- 35) Morishita, Y., Kataoka, T., Towatari, M., Ito, T., Inoue, T., Ogura, M., Morishima, Y. and Saito, H. : Up-regulation of transferrin receptor gene expression by granulocyte colony-stimulating factor in human myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 50 : 7955-7961, 1990.