

2種の新しいヒト腎癌細胞株の樹立

自治医科大学泌尿器科学教室 (主任: 徳江章彦教授)

村木 淳郎*, 菅谷 泰宏, 小林 実, 橋本 紳一
森田 辰男, 小林 裕, 徳江 章彦

栃木県立がんセンター泌尿器科

中 蘭 昌 明

ESTABLISHMENT OF TWO RENAL CANCER CELL LINES

Junro MURAKI, Yasuhiro SUGAYA, Minoru KOBAYASHI, Shin-ichi HASHIMOTO,

Tatsuo MORITA, Yutaka KOBAYASHI and Akihiko TOKUE

From the Department of Urology, Jichi Medical School

Masaaki NAKAZONO

From the Department of Urology, Tochigi Cancer Center

Two renal cell carcinoma (RCC) cell lines, JMSU2 and JMSU3, derived from the primary sites of mixed cell type and spindle cell type RCC, respectively, have been established and maintained for 31 and 22 months. Karyotypic analysis revealed human karyotypes with modal numbers of 84 and 55, respectively. Consistent chromosomal abnormalities were 1p+, 3p-, 6q- or 8p- in the JMSU2 cells and 1p-, inv (5p+q-) or loss of sex chromosome in the JMSU3 cells. Electron microscopy revealed abundant glycogen granules, lipid droplets and microvilli.

The JMSU3 cells transplanted to nude mice produced tumors with a spindle cell pattern similar to that of the original tumor. High concentrations of cytokines, such as interleukin-6 (145,000 pg/ml), interleukin-8 (35,300 pg/ml) and granulocyte-colony stimulating factor (6,340 pg/ml), were detected in the culture supernatant of the JMSU3 cells. Interleukin-1 β (IL-1 β) dose-dependently inhibited the proliferation of the JMSU2 and JMSU3 cells in culture. Tumor cytotoxic factor/hepatocyte growth factor (TCF/HGF) dose-dependently enhanced JMSU3 cell proliferation, but suppressed JMSU2 cell proliferation.

These findings suggest that IL-1 β and TCF/HGF have regulatory roles in the proliferation of RCC.

(Acta Urol. Jpn. 43: 177-183, 1997)

Key words: Renal cell carcinoma, Cell line, Spindle cell type

緒 言

転移を有する腎細胞癌患者の中でも、血中インターロイキン6 (IL-6) の上昇や CRP が高値を示す患者の予後は不良であり、生存期間も短い傾向にあることが報告されている¹⁾ 現在のところ、この機序は不明であるが IL-6 などの炎症性サイトカインが腫瘍の増殖に強く関わり合っている可能性は高い。IL-6 が腎細胞癌において自己増殖因子である報告もあるが、一方で否定的な意見もあり確定的な結論は導き出されていない。われわれは、今まで2種の腎癌細胞株を樹立し、インターロイキン1 β (IL-1 β) や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生についての検討を行ってきた²⁻⁴⁾ 今回、われわれは新たに2種類の新しい腎癌

細胞株を樹立し、種々のサイトカイン産生と、外因性のサイトカインが細胞増殖に及ぼす影響について検討したので報告する。

対象および方法

1. 培養材料

症例1: 46歳, 女性. 1994年3月, 右根治的腎摘除術を施行し, 病理診断は腎細胞癌, alveolar type, common type, mixed subtype, G2 > G3 > G1, pT3a, pV1a, pN2 (3/35, 傍大静脈リンパ節2/17, 大動静脈間リンパ節1/4), M0, stage IVであった. なお術前の検査値として, 血沈 104/136 mm (1 hr/2 hr), CRP 6.82 mg/dl (正常値 < 0.3), α 1-antitrypsin 389 mg/dl (190~250), IL-6 17.6 pg/ml (< 4), IAP 1,390 μ g/ml (< 500) が認められた. 術後1カ月目には上記急性期炎症性蛋白の正常化が見られた. 再

* 現: 下都賀総合病院泌尿器科

発予防に α -インターフェロンを使用していたが、1996年4月小脳転移が出現し、放射線照射と α -インターフェロン療法を行ったが、同年10月死亡した。なお、剖検はできなかった。

症例2：30歳、女性。1994年12月腰椎転移を有する腎細胞癌に対して右根治的腎摘除術を施行した。病理診断は腎細胞癌、solid type, spindle cell subtype, pT2, pV0, pN0, M1, stage IVであった。術前の検査値として、血小板 67.5 万/mm³, 血沈 134 mm (1 hr), CRP 21.8 mg/dl, IL-6 39.5 pg/ml, IAP $2,050$ μ g/ml が認められた。術後、腰痛に対して腰椎に放射線照射、さらに α -インターフェロンを使用した。術後、約1カ月の時点で多発性の肝転移、肺転移、縦隔リンパ節転移が出現した。明らかな感染源は確認しえなかったが、1月上旬より、 $39\sim 40^{\circ}\text{C}$ に至る発熱と、白血球増多 ($34,600$ /mm³, cf. 入院時は $7,000$ /mm³) が見られた。黄疸の増悪や DIC を併発し術後2カ月に死亡した。

2. 培養方法

1) 細胞培養：それぞれの症例の腎摘除術の際、2 cm 角の腎癌組織を剪刀にて細切し、子牛血清 (FCS: Gibco. labo., Grand island, NY, USA) をコートした培養フラスコ上に静置した。2～3週後、順調に細胞増殖を示し、その後は EDTA+0.25% トリプシン (Sigma. Co., St. Louis, MO, USA) を用いて細胞の継代を行い、培養液としては10% FCS 入りの RPMI 1640 medium を使用した。培養細胞のマイコプラズマ感染の有無は Mycotest (Gibco.) を用いて細胞培養上清中の adenosine phosphorylase を測定した。この実験に使用したマウス繊維芽細胞 3T6 は JCRB より供与をうけた。

2) 細胞株の染色体分析：対数増殖期にある JMSU2, JMSU3 細胞を 0.05 μ g/ml の濃度のコルセミドで2時間処理しトリプシンにより single cell 化した。KCl 75 mM を15分間加え酢酸メタノールで固定後、Giemsa 染色を行った。それぞれ50個の細胞についての検討を行った。

DNA 分析、電子顕微鏡検査については、先に報告した方法を用いた^{2,3)}

3) 細胞増殖試験：JMSU2, JMSU3 細胞増殖に与える種々のサイトカインの影響を調べるため、遺伝子組み換えサイトカイン IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, tumor cytotoxic factor/hepatocyte growth factor (TCF/HGF)⁵⁾ を 10 μ g/ml までの最終濃度で培養液中に添加した。7日目の細胞数を血球計算盤を用いてカウントし、無刺激群の細胞数との比を算出、細胞増殖に及ぼす影響を判定した。なお G-CSF は中外製薬株式会社、GM-CSF はシェリング・プラウ株式会社、IL-1 β は大塚製薬株式会社細胞

工学研究所、IL-6 は味の素中央研究所、TCF/HGF は雪印乳業株式会社生物化学研究所よりそれぞれ供与を受け実験に使用した。IL-8 は Petro Tech inc. (Rocky Hill, NJ, USA) より購入した。

4) サイトカイン測定：JMSU2 細胞, JMSU3 細胞のそれぞれ継代45, 25代目の7日目でフルシートとなった培養上清を凍結し、IL-1 α , IL-1 β , G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-8 の濃度をそれぞれ ELISA 法を用いて測定した。また、この測定に用いたキットは IL-1 α : 大塚製薬 ELISA No. 655855 (測定限界 < 7.8 pg/ml), IL-1 β : Medgenix RIA No. 54923380 (測定限界 < 10 pg/ml), G-CSF: カイノス EIA No. CY-2100 (測定限界 < 10 pg/ml), GM-CSF: アマシャム ELISA No. RPN2151 (測定限界 < 8 pg/ml), IL-6: 富士レビオ CLEIA No. LC01T (測定限界 < 0.2 pg/ml), IL-8: 東レ ELISA No. 54923530 (測定限界 < 12.5 pg/ml) である。なお、この測定は SRL に依頼して測定した。なお、培養に用いた培養液単独では、いずれのサイトカインも測定限界以下であった。

5) Ras 癌遺伝子の増幅と再構成： 10^7 個の JMSU2 細胞, JMSU3 細胞を Genomix (Talent 社抽出キット) を用いて処理し、抽出した DNA 5 μ g を EcoR I, BamH I, Hind III, sac I 等の制限酵素で処理、0.7% アガロースゲル上で電気泳動を行った (Gibco BRL 社: HORIZON^R 11～14 使用)。ニトロセルロースフィルターにトランスファーした後、以下の ³²P ラベルした DNA プローブとハイブリダイゼーションを行った。K-Ras: Onco science 社: Human c-K-Ras Cat # HP131, H-Ras: Onco science 社: Human c-H-Ras Cat # HP128, N-Rac: Onco science 社: Human c-N-Ras Cat # HP129。

6) K-Ras, N-Ras の codon 12, 13, 61 の点突然変異： 10^7 個の JMSU2, JMSU3 細胞より上記方法を用いて DNA を抽出し、ras 遺伝子を PCR を用いて増幅した。使用したプライマーは、K-Ras codon12: GGC CTG CTG AAA ATG ACT GA, N-Ras codon 12: CTG GTG TGA AAT GAC TGA GT, N-Ras codon 13: CAT CTA CAA AGT GGT TCT GG, N-Ras codon 61: GTT ATA GAT GGT GAA ACC TGT T (宝酒造製) である。使用した thermal cycler は、アステック社製プログラムテンプコントロールシステム PC-700 であり、条件として、denaturation 94°C 1.5分, annealing 55°C 1分, primer extension 72°C 1分を1サイクルとして、計35サイクルの増幅を行った。増幅した DNA は、Schleicher and Schuell 社製の Minifold slot blotter, SRC-96 を用いて Pall, Biotyne plus (BNXF3R)

blotting membrane にブロット. 以下の wild type に対するオリゴヌクレオチドプローブを用いてドットブロットハイブリダイゼーションを行った. K-Ras codon 12: GTT-GGA-GCT-GGT-GGC-GTA-G, N-Ras codon 12: GTT-GGA-GCT-GGT-GGC-GTA-G, N-Ras codon 13: GTT-GGA-GCT-GGT-GTT-GGG-A, N-Ras codon 61: ACA-GCT-GGA-CAA-GAA-GAG-T (宝酒造製).

結 果

上記の症例 1 よりえられた細胞は現在まで55代, 2年7カ月にわたり継代しており, 細胞の倍加時間は継代22代目で26.7時間, 継代49代目で17.2時間であった. 症例 2 よりえられた細胞は現在まで35代, 1年10カ月にわたり継代している. 細胞の倍加時間は継代8代目で33.4時間, 継代26代目で31.0時間であった. それぞれ新しい腎癌細胞株 JMSU2, 3 (Jichi Medical School Urology 2, 3) と命名した. いずれも, FCS 依存性は低く, JMSU2 細胞では FCS 2%, JMSU3 細胞では FCS 0.2%での継代も可能であった. なお JMSU2 細胞と JMSU3 細胞はそれぞれ継代45, 25代目の検査でマイコプラズマ感染は陰性であった. 培養

細胞の倒立顕微鏡像を Fig. 1 に示すが, JMSU2 細胞, JMSU3 細胞とも敷石状配列を示し, JMSU2 細胞は多角形, JMSU3 細胞は紡錘型の細胞形態を呈していた. 両細胞とも contact inhibition の消失, 細胞の piling などの特徴が見られた.

透過型電子顕微鏡検査では, JMSU2 細胞において豊富なグリコーゲン顆粒や脂肪滴, microvilli の存在など腎癌細胞由来に矛盾しない所見がえられた. 一方, JMSU3 細胞では比較的 microvilli は少なく, 細胞膜の一部が突起様の構造を呈する特徴を有していた (Fig. 2).

フローサイトメーターを用いた DNA 分析では, JMSU2 細胞と JMSU3 細胞は継代45代, 25代の時点でそれぞれ DNA index 1.81, 1.17と単一の aneuploid peak を示した (結果未掲載). G-banding 法による染色体分析の結果 (Fig. 3), JMSU2 細胞は84本 (4n) にモードを示すヒト型染色体で4個のマーカー染色体と 1p+, 3p-, 6q-, 8p- などの特徴, また第4, 5, 10, 12, 13番染色体のトリソミーが見られた. 一方, JMSU3 細胞は55本にモードを有するヒト型染色体で一つのマーカー染色体と 1p-, inv (5p+

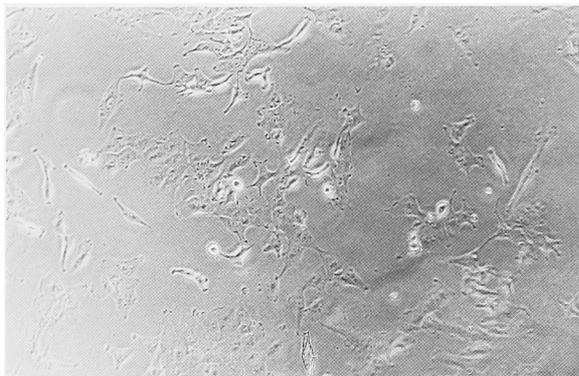


Fig. 1A. Light microscopic appearance of JMSU2 cells showing polygonal shape. $\times 100$.

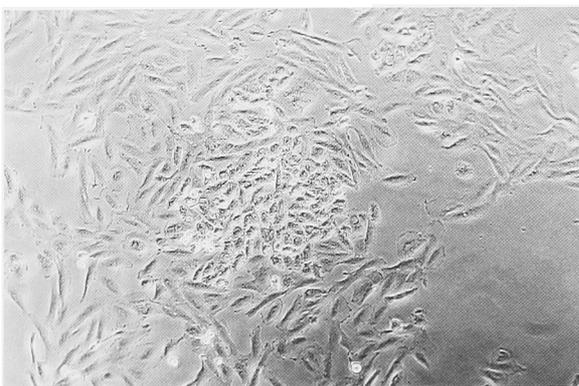


Fig. 1B. Light microscopic appearance of JMSU3 cells showing fusiform-like shape. $\times 100$.

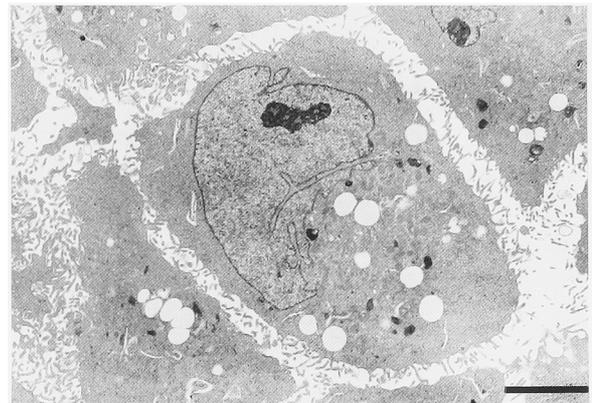


Fig. 2A. Electron microscopic appearance of JMSU2 cell. Bar indicates $5 \mu\text{m}$. $\times 3,000$.

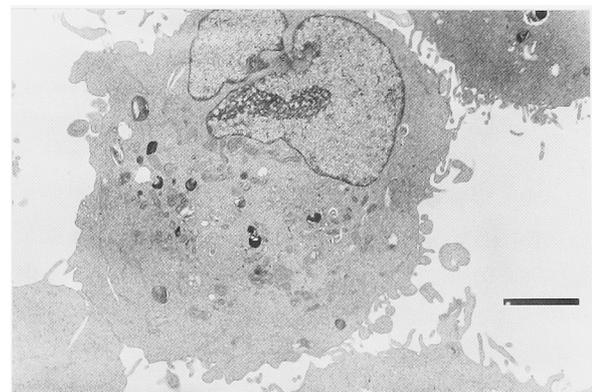


Fig. 2B. Electron microscopic appearance of JMSU3 cell. Bar indicates $3 \mu\text{m}$. $\times 4,000$.

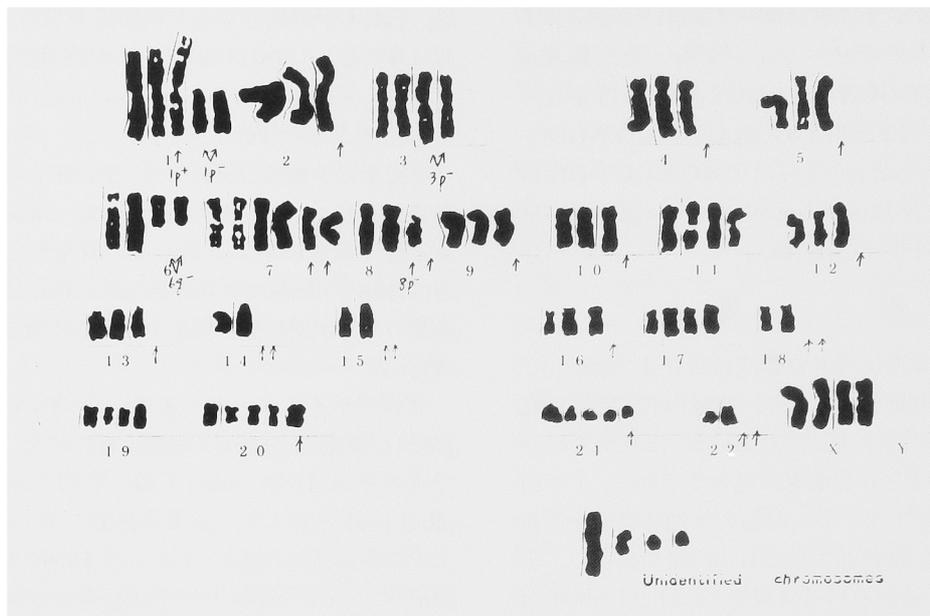


Fig. 3A. Karyotypic analysis of JMSU2 cells using G-banding staining.

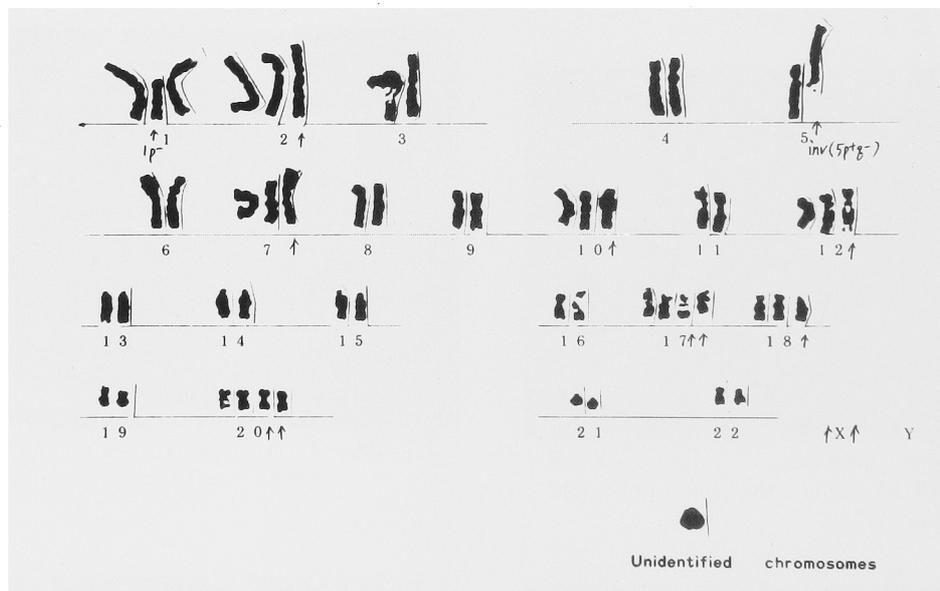


Fig. 3B. Karyotypic analysis of JMSU3 cells using G-banding staining.

q-), 性染色体欠損などの特徴, また第2, 7, 10, 12番染色体のトリソミーが観察された. また, JMSU3細胞は, ノードマウスに可移植性を示し, 組織学的には, 原発巣類似の紡錘細胞の形態を保持していた (Fig. 4).

術前, 患者血清中の急性期炎症性蛋白の上昇が観察されたため, 腎癌細胞による炎症性サイトカイン産生の可能性について JMSU2, JMSU3細胞培養上清中のサイトカインを測定した (Table 1). JMSU2細胞,

JMSU3細胞とも IL-1 α を除き, 多種のサイトカインを産生する細胞株であることが判明した. 特に JMSU3細胞では高濃度の G-CSF, IL-6と IL-8の産生が観察された. これらのサイトカイン産生が, RAS 癌遺伝子活性化に起因する可能性についての検討を行った. 2種の細胞について, サザンブロッティング法による K-ras, H-ras, N-ras 遺伝子増幅と再構成について検討した. また, PCR法を用いて K-ras, N-ras 遺伝子についてコドン12, 13, 61の点突

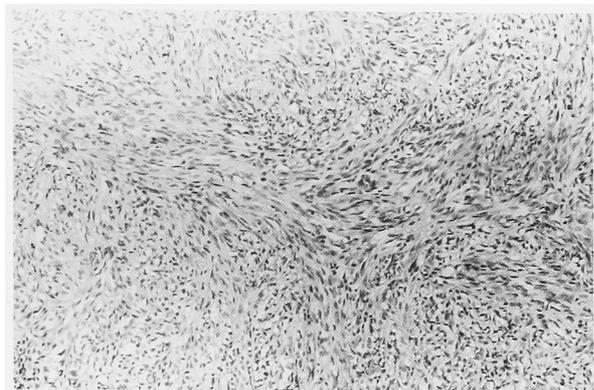


Fig. 4. Histopathologic finding of transplanted JMSU3 cells in nude mouse. The tumor shows a spindle cell appearance which resembled the original tumor. HE staining. ×40.

Table 1. Concentration of various cytokines detected in the supernatants of confluent JMSU2 cell or JMSU3 cell culture. Samples were examined by RIA or ELISA methods. + Values of these cytokines in the culture medium (RPMI 1640+10% fetal calf serum) were below the detectable levels (data not shown).

(pg/ml)	JMSU2 細胞	JMSU3 細胞
IL-1 α	<7.8 ⁺	<7.8 ⁺
IL-1 β	31	25
G-CSF	<30 ⁺	6,340
GM-CSF	131	29
IL-6	1,800	145,000
IL-8	33.5	35,300

然変異の存在を検討したが, JMSU2, JMSU3 細胞ともこれらの癌遺伝子の増幅, 再構成は認められず, また上記の点突然変異も観察されなかった (結果未記載).

つぎに, 外因性の G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8, TCF/HGF が細胞増殖に及ぼす影響を調べた. JMSU 3細胞は TCF/HGF 添加によって濃度依存性に増殖促進作用が観察されたが, JMSU2 細胞は逆に高濃度の TCF/HGF 添加で細胞増殖抑制作用を認めた (Fig. 5). また, IL-1 β は二つの細胞株に対して増殖抑制に働いた (Fig. 6). G-CSF, GM-CSF, IL-6 と IL-8 はいずれの細胞にも増殖促進, 抑制作用をもたらさなかった (結果未記載).

考 察

われわれは, 今まで2種の腎癌細胞株を樹立し, IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生についての検討を行った. 今回, われわれは新たに2種類の腎癌細胞株を樹立した. 1年を越える長期の細胞培養における継代, 電子顕微鏡検査で腎細胞癌由来に矛盾

Effect of TCF/HGF on JMSU2 cell and JMSU3 cell proliferation

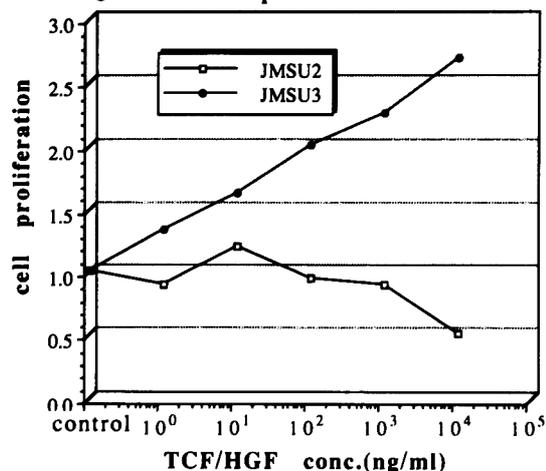


Fig. 5. One ng/ml-10 μ g/ml of TCF/HGF was added to JMSU2 cell or JMSU3 cell culture and the cells were counted using a hemocytometer on day 7. The results were compared with the control (without cytokine stimulation) and the cell-number ratio was expressed. All the experiments were performed in triplicate and the average value was presented.

Effect of IL-1 beta on JMSU2 cell and JMSU3 cell proliferation

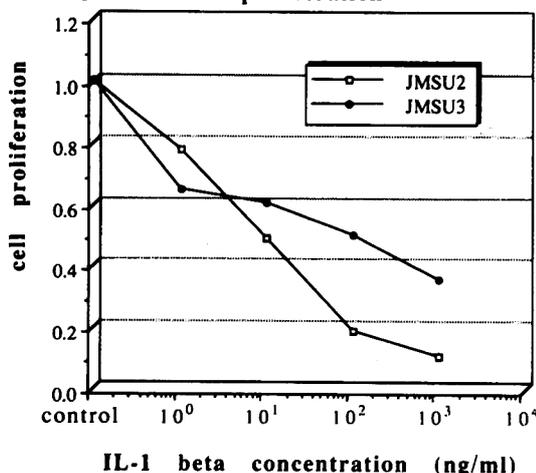


Fig. 6. One ng/ml-1 μ g/ml of IL-1 β was added to JMSU2 cell or JMSU3 cell culture and the cell number was counted using hemocytometer on day 7. All the experiments were performed in triplicate and the average value was presented.

しない所見 (Fig. 2), フローサイトメトリーを用いた DNA 分析での aneuploidy pattern, 特徴を有するヒト型染色体 (Fig. 3), マイコプラズマ陰性, さらにヌードマウス可移植性などの条件を満たし, 新しい腎癌細胞株 JMSU2, JMSU3 と命名した. 紡錘細胞型腎細胞癌由来の細胞株は稀で, われわれが調べた範

圈内では、林らが報告した MR-1 (MRV) 細胞の一株のみであった⁶⁾ JMSU3 細胞はヌードマウス移植腫瘍において原発巣類似的紡錘細胞の形態が保持されており (Fig. 4), 紡錘細胞型腎細胞癌の研究には有用な細胞株と考えられる。

両細胞株を樹立した患者は臨床的に術前, 血中 IL-6 の上昇や CRP の高値が見られたため, 癌細胞による炎症性サイトカイン産生の有無を検討した。JMSU2, JMSU3 細胞培養上清中に IL-1 α 産生は認められなかったが, JMSU2, JMSU3 細胞とも, IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF など多様なサイトカインを産生していることが判明した (Table 1)。特に, JMSU3 細胞の培養上清には, 無刺激の状態でも高濃度の G-CSF, IL-6, IL-8 が確認された。

メラノーマ細胞において IL-1 α , IL-6 や TNF α 産生のシグナルとして, 癌遺伝子である N-ras codon 61 の点突然変異の関与が報告されており⁷⁾, 今回われわれは点突然変異, 遺伝子増幅, 遺伝子再構成について, N-ras, K-ras, H-ras の検討を行ったが, 残念ながらこれらの異常は指摘できなかった。腎細胞癌において, H-ras の codon 61 の点突然変異は51例中1例と頻度が低いことが報告されている⁸⁾ また, H-ras, K-ras, N-ras の点突然変異は腎細胞癌において発現頻度が低く稀な現象であることが報告されている⁹⁾ これらの点より判断すると腎細胞癌における IL-6 などのサイトカイン産生誘導のシグナルとしては別の機序を考える必要があると思われた。腎細胞癌増殖の機序を調べる目的で培養液に種々のサイトカインを加え, 細胞増殖に及ぼす影響を検討した。TCF/HGF は, 成熟肝細胞に対する増殖因子で, 尿管上皮に対しても増殖促進に働くことが示されている¹⁰⁾。癌細胞において, 多くの上皮由来の癌細胞では高親和性の HGF レセプターを有するが, 外因性の HGF に対しては, 細胞増殖促進に働く系と, 細胞増殖抑制に働く系の2種が存在すると言われている¹¹⁾ 今回の検討では, JMSU2 細胞では, 高濃度の HGF は軽度の細胞増殖抑制を示したが, JMSU3 細胞は, 濃度依存性に増殖促進を示した (Fig. 5)。腎細胞癌細胞にとって, HGF が自己増殖促進因子である可能性について JMSU3 細胞自身による HGF 産生の有無, また細胞膜の HGF レセプターの測定などにより, 今後検討する必要があると考えられた。一方, 外因性の IL-1 β は両細胞株の増殖抑制に働き (Fig. 6), 腎細胞癌自身による IL-1 β 産生も認められることより (Table 1), われわれが以前報告したように³⁾, IL-1 β はこれらの細胞株にとって autocrine growth inhibitor である可能性も考えられた。

結 語

新しい2種の腎癌細胞株を樹立し, 細胞の基礎的な characterization を行った。JMSU3 細胞は紡錘細胞型腎細胞癌に由来する比較的稀な症例であり, ヌードマウスに移植可能である点, 移植腫瘍は紡錘細胞の特徴を保持している点が他の細胞株にない特徴と考えられ, 紡錘細胞型腎細胞癌の研究に有用なモデルとなりうると考えられた。

稿を終えるにあたり, 電子顕微鏡検査に協力していただいた栃木県立がんセンター, 臨床検査部 圓谷 勝氏に深く感謝いたします。

なお, この論文の要旨は, 第84回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Blay J, Negrier S, Combaret V, et al.: Serum level of interleukin 6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res* **52**: 3317-3322, 1992
- 2) 村木淳郎, 中藺昌明: 新しい腎癌細胞株 (TC-1) の樹立とインターロイキン 6 産生能. *日泌尿会誌* **83**: 1882-1889, 1992
- 3) 村木淳郎, 中藺昌明: インターロイキン 1 (IL-1) の腎癌細胞株 TC-1 に対する autocrine growth inhibitor としての役割. *日泌尿会誌* **84**: 1470-1478, 1993
- 4) 村木淳郎, 徳江章彦, 中藺昌明: 腎癌細胞の産生するリンパ球遊走因子についての検討. *日泌尿会誌* **85**: 1649-1655, 1994
- 5) Shima N, Nagao M, Ogaki F, et al.: Tumor cytotoxic factor/hepatocyte growth factor from human fibroblasts: cloning of its cDNA, purification and characterization of recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun* **180**: 1151-1158, 1991
- 6) 林 宣男, 杉村芳樹, 桜井正樹, ほか: ヒト腎癌細胞株 3 株の樹立と制癌剤感受性試験. *日泌尿会誌* **80**: 59-68, 1989
- 7) Castelli C, Sensi M, Lupetti R, et al.: Expression of Interleukin 1 α , Interleukin 6, and Tumor necrosis factor α genes in human melanoma clones is associated with that of mutated N-RAS oncogene. *Cancer Res* **54**: 4785-4790, 1994
- 8) Fujita J, Kraus MH, Onoue H, et al.: Activated H-ras oncogenes in human kidney tumors. *Cancer Res* **48**: 5251-5255, 1988
- 9) Nanus DM, Mentle IR, Motzer RJ, et al.: Infrequent ras oncogene point mutations in renal cell carcinoma. *J Urol* **143**: 175-178, 1990
- 10) Igawa T, Kanda S, Kanetake H, et al.: Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **174**: 831-838, 1991

- 11) 木下大成, 松本邦夫, 中村敏一 : HGF の多様な生理作用と組織再生. 実験医 **10** : 144(330)-153(339), 1992

(Received on August 19, 1996)
(Accepted on November 25, 1996)