

ヒト腎細胞癌由来培養細胞 KU-2 の異質性について

—KU-2 クローン株の NK 細胞傷害能に対する感受性—

琉球大学医学部泌尿器科学教室（主任：大澤 炯教授）

早 川 正 道・大 澤 炯

防衛医科大学校泌尿器科学教室（主任：中村 宏教授）

長 倉 和 彦

防衛医科大学校整形外科科学教室

菊 池 寿 幸

HETEROGENEITY OF A KU-2 CELL LINE DERIVED FROM
HUMAN RENAL CELL CARCINOMA—DIFFERENTIAL SUSCEPTIBILITIES OF ITS SUBLINES
TO NK CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY—

Masamichi HAYAKAWA and Akira OSAWA

*From the Department of Urology, School of Medicine, University of the Ryukyu**(Director: Prof. A. Osawa)*

Kazuhiko NAGAKURA

*From the Department of Urology, National Defense Medical College**(Director: Prof. H. Nakamura)*

Hisayuki KIKUCHI

From the Department of Orthopedics, National Defense Medical College

Natural killer (NK) cell activity against 4 different sublines of a permanent cell line KU-2 derived from human renal cell carcinoma were measured by ^{51}Cr -release assay and single cell binding assay.

KU-2 and its sublines exhibited different susceptibilities of interferon (IFN)-augmented NK cell cytotoxicity. Moreover, 2 out of 4 sublines changed in susceptibility to NK cell cytotoxicity in a few months. Along with the direct assay for NK cell activity, frequency and kinetics of NK cell-mediated cytotoxicity against 3 sublines were studied by single cell binding assay where spontaneous killing of target cells was directly visualized by the reading of trypan blue uptake into target cells among effector-target cell conjugates. The frequency of killer cells among conjugates was dependent on the susceptibility of the sublines to the IFN-augmented NK cell cytotoxicity.

These results suggested the following: (1) KU-2 cell line was not homogenous but composed of a heterogenous population of cells and (2) even in one subline derived from a clone, the cells with different susceptibilities to NK cell-mediated cytotoxicity developed spontaneously in ordinary culture conditions with the passage of a certain period of time.

Key words: Cell line, Renal cell carcinoma, Clones, Heterogeneity, NK cell activity

緒 言

人体の腫瘍組織は、生物学的に性質の異なる細胞群より構成される¹⁻³⁾。腫瘍細胞がクローン選択を受けながら増殖する過程で、この異質性 (heterogeneity) を獲得し続けるという現象ゆえに、腫瘍細胞は生体内のあらゆる段階での免疫監視機構の網をくぐり抜け、またさまざまな癌治療剤の使用にもかかわらず、再増殖を続けることができるものと考えられている。長倉⁴⁾は、ヒト腎腺癌由来培養細胞株 KU-2⁵⁾ を用い、一般に均一な細胞集団として取り扱われている培養細胞株にも同様に、細胞学的に性質の異なった複数の細胞集団が含まれることを示した。今回われわれは、KU-2 細胞株より分離したクローン株⁶⁾を用いて、培養腫瘍細胞の heterogeneity と natural killer (NK) 細胞活性に対する感受性について検討を加えたので報告する。

材料および方法

(1) ヒト末梢血リンパ球 (PBL) の分離

ヘパリン加ヒト末梢血より Böyum⁷⁾ の方法に準じて Ficoll-Rompacon (Lymphoprep[®], Nyegaard and Co. Oslo) を用いた比重遠心法で PBL を分離した。10⁷/ml に PBL 浮遊液を調整し、プラスチックへの附着性を利用して単球を除去した⁷⁾。PBL の洗浄にはヘパリン加ハンクス液を、PBL の培養と浮遊液調整には、RPMI 1640 (Gibco, New York) に、3.7 g/l の重曹と牛胎児血清 (FCS) (Gibco) を 10% 濃度 (V/V) になるように加えたもの (これをメディウム-A とする) を用いた。単球除去後、メディウム-A で 5×10⁶ PBL/ml に調整した。

(2) 腫瘍細胞

細胞稀釈液による Single cell cloning 法により KU-2細胞より分離された13種類のクローン株⁶⁾の凍結保存ストックから、4種の株 (N-7,8,10,13) を凍結半年後に解凍、再増殖させて実験に用いた。これらの細胞の培養液として、カナマイシン 60 mg/l および 0.292 g/l の L-glutamine を含むイーグル MEM (日本製薬、東京) に、3.7 g/l の重曹と FCS (10% V/V) を加えたものを用いた。

(3) NK 細胞活性の増強

メディウム-A で 5×10⁶/ml に調整した PBL に、500 IU のヒト α インターフェロン (IFN-α) (Wellferon[®], 1×10⁷ IU/mg 蛋白, 住友化学工業), あるいは、0.1 KE の OK 432 (ピンバニール[®], 中外製薬) を加えて12時間培養した。ついでメディウム-A で2

回洗浄して、これをふたたび 5×10⁶/ml に調節して、これらを Effector cell (EC) とした。

(4) NK 細胞活性の測定

原細胞株の KU-2 あるいは、その4種の subline の 5×10⁶個をそれぞれペトリ皿 (35 mm, Falcon, California) に播き、翌日、新しいメディウム-A 1.5 ml に交換し、50 μCi の放射性クロム酸ナトリウム (⁵¹Cr, 第一化学薬品) を加えて、1~1.5時間培養した。ついでトリプシンで細胞を分散させ、メディウム-A で3回洗浄し、これを 10⁵/ml に再調節して標的細胞 (TC) とした。96 well のU字型 マイクロプレート (6.4 mm, Falcon, USA) の各 well に TC の 100 μl と、EC あるいはメディウム-A を分注して、EC:TC 比が50:1, 25:1, 12:1 の well を準備した。各 well の総量は 200 μl とした。同時に EC を含まず、かわりに 2% Triton-X 100 または、メディウム-A を加えた well も準備し、それぞれを最大 ⁵¹Cr 放出用と、自然 ⁵¹Cr 放出用 well とした。マイクロプレートを 37°C で4時間培養し、その上澄 100 μl をプラスチックチューブに分注して、γ カウンターにて放射能活性を測定した。すべての実験は、triplicate でおこなわれた。NK 細胞活性 (% cytotoxicity) は以下の式により算出した。

% cytotoxicity

$$= \frac{\text{実験 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)}}{\text{最大 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)}} \times 100$$

各クローン細胞株に対する NK 細胞活性をより客観的に比較する方法として Total lytic unit (TLU)⁸⁾ を算出した。

$$\text{TLU} = \frac{10^6 \text{ EC}}{1 \text{ lytic unit (LU) の EC 細胞数}}$$

なお、1 LU とは、30% cytotoxicity 値を得るのに必要な EC の細胞数である。

(5) Single cell binding assay

Grimm と Bonavida⁹⁾ の方法に準じて実験をおこなった。100 μg の Poly-L-Lysin (m.w, 30,000, Sigma Chemical Co. St Louis) をリン酸バッファー (PBS)/ml に溶解し、これをペトリ皿 (35 mm, Falcon) に重層させて1時間放置後、これを除去して自然乾燥させた。0.5 ml のメディウム-A に浮遊させた 2×10⁵個の EC と TC を混和し、37°C で10分間培養して反応させた。遠心後、0.5 ml の上澄を除去し、ついで非特異的な EC と TC の結合を解離させる目的で、パスツールピペットを用い、静かに10回攪拌した。45°C の0.5%アガロース液 (Agar CM[®] 生化学工業) を 5 ml のピペットで約10回攪拌して冷却し、

その 2 ml をすみやかに、0.5 ml の EC、TC 浮遊液に加えてゆっくり混和したのち、その 0.2~0.3 ml を前処置したペトリ皿上にすみやかに加えて、薄いアガロース膜を形成させた。1 ml のメディウム-A を静かに重層し、CO₂ インキュベーター内で培養した。適時にペトリ皿を取り出し、0.4% トリパンブルーを加えて 5 分間染色させ、メディウム-A で静かに洗浄してトリパンブルーを除去した。続いて顕微鏡で観察し、100 個以上の EC を数え、そのうち TC と結合しているリンパ球数、またリンパ球と結合しながら青染している TC の数を数えた。同時に対照として EC を含まず、TC のみのアガロース培地を前述の方法に従って作製し、TC がトリパンブルーで染色されないことを実験ごとに確認した。

結 果

同一の EC が、KU-2 細胞およびその 4 種の subline に対して有する NK 細胞活性を比較した (Fig. 1)。Subline 13 と 7 を TC とした場合、KU-2 細胞にくらべ、EC は、いずれの EC:TC 比においても、より高い NK 細胞活性を示すが、subline 10 と 8 に対しては、KU-2 細胞に比して、低い NK 細胞活性を示した。このことは subline 13 と 7 が、subline 10 と 8 より、この実験で用いられた EC の NK 細胞に対して、高い感受性を示したことを意味する。

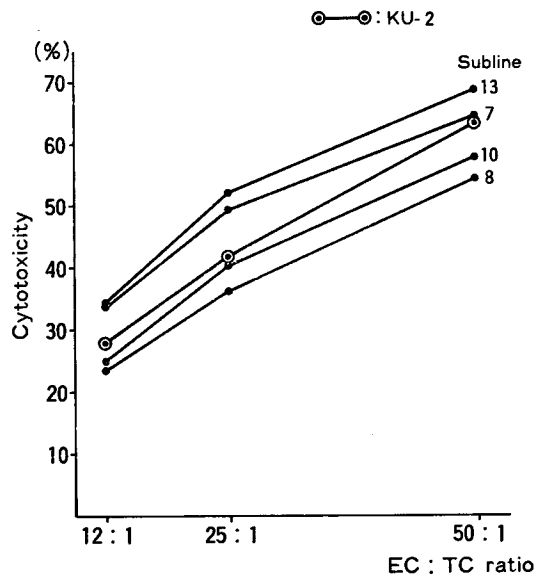


Fig. 1. NK cell activities of the IFN-stimulated PBL against 4 different sublines of KU-2 cells

5 人の供血者より得た PBL を用いておこなった同様の実験の結果を Table 1 に示す。KU-2 細胞を TC とし、IFN 刺激 PBL を EC とした場合の、EC の有する NK 細胞活性を測定し、この値から Total lytic unit (TLU) を計算し、これを 100 とした場合の、各 subline に対する EC の TLU が計算され、

Table 1. Susceptibility of KU-2 cells and their sublines to IFN-augmented NK cell cytotoxicity.

(a) Cytotoxicity against KU-2 cells at a EC:TC ratio of 50:1. (b) Subline 7 differs from KU-2 cells, subline 8 and subline 10 at $p < 0.05$. (c) Subline 8 differs from KU-2 cells at $p < 0.01$. (d) Total lytic unit (TLU) of PBL against KU-2 cells is defined as 100. Other values represent TLU against each subline as the percent of that against KU-2 cells.

Time of Exp	PBL number	Augmented with	Relative NK susceptibility of KU-2 and its sublines				
			KU-2(% cytotoxicity) ^(a)	7 ^(b)	8 ^(c)	10	13
1983.12	1	IFN- α	100 ^(d) (41.9)	157	74	115	185
1984.1	2	IFN- α	100 (92.5)	136	54	55	31
	2	OK432	100 (55.5)	172	21	27	26
	3	IFN- α	100 (35.5)	—	36	—	49
1984.3	4	IFN- α	100 (67.7)	130	77	88	142
	5	IFN- α	100 (71.7)	—	79	—	117

Mean $\pm$ SD : 100

148.8 $\pm$ 16.8, 56.8 $\pm$ 22.1, 71.3 $\pm$ 33.2, 91.7 $\pm$ 60.1,

Table 2. Frequency and kinetics of IFN-augmented NK cell cytotoxicity against 3 sublines of KU-2 cells

No. of Exp	Target cells	% lymphocytes forming conjugates.	% lymphocytes forming conjugates that have lysed target in 1~2 hours.	% killer cells among lymphocytes forming conjugates in 1~2 hours.
1	clone 8	4.50	0.63	16.7
	13	4.90	1.18	23.1
2	clone 8	6.30	0.	0.
	13	4.75	0.98	18.2
3	clone 8	3.94	0.40	10.0
	13	4.32	0.70	22.2
4	clone 8	1.22	0.28	11.1
	13	4.0	0.26	10.0
5	clone 8	5.41	0.	0.
	7	8.01	1.12	14.3
6	clone 8	4.19	0.26	8.3
	7	2.48	0.48	14.3
7	clone 8	4.40	1.0	11.1
	7	3.40	1.80	27.3

表に示されている。したがって、TLU が100以上の場合、KU-2 細胞に比較して、その subline がより高い NK 細胞感受性を有していることを意味している。PBL の(2)は、OK 432 も用いて刺激されている。Subline 7 は、3人の供血者から得た EC のいづれに対しても、KU-2 細胞より高い NK 細胞感受性を示したが、subline 8 は、5種の EC の有する NK 細胞に対して、KU-2 細胞よりいづれも抵抗性を示した。Subline 13 は、5種の EC 中、3種の EC の NK 細胞に、KU-2 細胞に比べ、より高い感受性を示し、subline 10は、1種の EC に対してのみ、高い感受性を示すに過ぎなかった。PBL を IFN- α と OK 432 で刺激したが (PBL の(2))、1回の実験では、各 subline の NK 細胞感受性に関して両者の間に差異を認めなかった。Subline 7 は、KU-2 細胞、subline 8 と 10 より有意に高い NK 細胞感受性を示した ($P<0.05$)。また subline 8 は、KU-2 細胞より低い感受性を示した ($P<0.01$)。

第1回目の実験施行後3カ月目に最終実験がおこなわれているが、subline 7 と 8 の NK 細胞感受性に大きな変化はみられていない。しかし、subline 10 では、1カ月目に、NK 細胞感受性の低下がみられている。

次に各 subline の感受性の違いについて single cell binding assay を用いて検討した (Table 2)。EC と TC である各 subline とを1対1の割合で混合培養し2種の TC 間で比較した結果、Table 2 のごとくリンパ球の1.2~8.01%が TC と結合することが判明した。また TC と結合し、かつ TC を傷害しているリンパ球は、全体の1.8%以下であるが、subline 8 を傷害しているリンパ球の割合は、subline 7 を傷害しているリンパ球の割合よりあきらかに少なかった。TC と結合しているリンパ球のうちで、短時間に TC を傷害するリンパ球の割合が、Table 2 の右端に示してある。Subline 8 と 13 では、4例中3例で、subline 13 を傷害するリンパ球の割合が、subline 8 を傷害するリンパ球の割合より多いことがわかる。同様の結果は、subline 7 と 8 との間でも認められる。しかしこの killer 細胞の割合と、subline とリンパ球との結合性との間に一定の傾向を認めない。

考 察

NK 細胞は、腫瘍細胞の発生、増殖、あるいは転移に対する免疫監視機構の一端を担うとされる heterogeneous なリンパ球集団である。またさまざまな TC 間に共通に存在するとされる target structure

(TS)を認識するNK細胞や、個々のTCの固有のTSを認識し、傷害するNK細胞などの集合体と推定されている^{10,11)}。しかし、NK細胞活性の特異性や、細胞障害のメカニズムを検討するための実験では、いづれも、いくつかの既知の培養細胞株が用いられており、しかもこれらの培養細胞株が全体として有しているNK細胞感受性の検討を基に理論が展開されてきた。しかし、これらの培養細胞株が異なった実験室で、異なった条件下で継代され、しかも時期を異にして実験に利用されていることはいうまでもない。さらに、これらの同一株内にさまざまなsubline株が含まれているわけである。したがって、本来同一の培養細胞から発生した細胞株を用いたNK細胞活性の増強に関する実験や、抗癌剤に対する反応性に関する研究でも、腫瘍細胞株のheterogeneityの存在を常に念頭に置かねばならない。この意味からも、NK細胞を含め、細胞性免疫に関する実験を展開していくうえで、従来のようにリンパ球側のみに視点を置くだけでなく、TCの種類や条件にも着目し、さまざまな検討を加えて研究がなされるべきと考えられる。

腎腺癌組織より分離したKU-2細胞も継代とともに多様化し、heterogeneityを獲得していくことになる。KU-2細胞は現在でもヌードマウス可移植性を示す培養株であるが、このKU-2細胞より分離した4種のsublineに限っても、subline 8と10は腫瘍形成能を有しているにもかかわらず、subline 7と13ではまったく腫瘍形成が見られていない¹²⁾。今回の実験では、subline 7は、KU-2細胞やsubline 8と10に比して、NK細胞感受性が有意に高いことが示された。またsubline 8はKU-2細胞より低いNK細胞感受性を有することも判明した。ただ、現時点では、この各種sublineのヌードマウスに対する腫瘍形成能と、NK細胞感受性との関連については直接の証明がない。しかし、marine lymphomaから分離したNK細胞感受性株と、耐性株、さらにanti-asialo GM₁を用いてKawaseら¹³⁾は、NK細胞が、in vivoにおける腫瘍形成阻止に深く関与している事実を示している。当研究のsublineを用いて今後検討すべきテーマである。

このようにKU-2細胞株にもNK細胞感受性のあきらかに差異のある2つのクローン株-subline 7と8が自然発生したことになるが、この2種のsublineのNK細胞感受性が、3カ月間の培養期間中にも著変なく、また異なった固体から得たPBLに対しても同様の傾向を示したことは興味深い。いっぽう、Brooksら¹⁴⁾は、ラットの腫瘍細胞とそのsublineを用

い、ラットNK細胞の特異性について検討を加えているが、その結果、一種の細胞株から、培養数カ月以内に異なるNK細胞感受性を示すさまざまなsublineが自然発生してくる、と報告している。

Table 1に示されるクローン株間のNK細胞感受性の差異は、ECとTCが、ともに細胞集団として作用しあった場におけるTCの傷害の程度を、数値にあらわしたものである。そこで、TCとECをアガロース内で1対1で作用させ、NK細胞感受性の差異について検討を加えてみた。実験の初期にPBLをプラスチック皿上で培養し、単球を除去しているが、数%以下の混在は避けられない。また、Rubinら¹⁵⁾が報告しているごとく、TCと結合するリンパ球はheterogenousな集団である、とされている。われわれの実験でも、各sublineのNK細胞感受性と、ECとの被結合率との間に関連は見られなかった(Table 2)。TCと結合後、数時間でTCを傷害させるリンパ球は、NK細胞と考えられる。Subline 7と8を用いて比較した場合、結合したTCを傷害しているリンパ球—NK細胞—の割合の多い実験結果は、NK細胞感受性の高いsubline 7を用いた系より得られている。このことは、IFNで刺激されたPBL中に、subline 8よりsubline 7を認識し、傷害するNK細胞が多く動員されているためか、あるいは同一のNK細胞に両sublineが認識され、その細胞傷害能に対して、subline 7の感受性の閾値がより低く、容易に細胞破壊が生じるためか、あるいは、その両方の機構に起因すると推測される。Subline 8と13に関しても、subline 13を傷害するリンパ球が4PBL中、3PBLにおいてsubline 7を傷害するリンパ球より多く観察されている。したがってTable 1で見られたsubline 7, 8そして10の間の細胞集団としてのNK細胞感受性の差異は、ある程度個々の細胞レベルでも認められることになる。

以上のごとく、KU-2細胞のheterogeneityについて、NK細胞感受性の面から検討を加えた。従来の報告^{5, 15, 16)}と同様に、in vitroにおいて示されたこれら腫瘍細胞の異質性の存在から、in vivoで腫瘍が増殖していく過程で、初期においてはbroadな特異性を有するNK細胞やマクロファージ、あるいはその後のT細胞や各種の抗癌剤の攻撃のなかで、淘汰されずに抵抗性を有したクローン細胞が選択されて残り、腫瘍全体として増殖、転移を続ける、という現象がある程度理解される。それと同時に、試験管内で一定した条件で培養を続けてきた比較的selectされた細胞株のなかから、ヌードマウスへの可移植性を失った、

あるいは NK 細胞感受性のより高い細胞群が生じてくることから, *in vivo* においても, 腫瘍細胞の増殖過程で, ある意味では, より分化型の細胞も生じる可能性が考えられる。ひとつの細胞株から生じる細胞学的性質の異なったクローン細胞を, より詳細に検討することにより, 腫瘍の病態生理への理解がさらに深まると期待される。

文 献

- 1) Daninelson KG, Anderson LW and Hosick HL: Selection and characterization in culture of mammary tumor cells with distinctive growth properties *in vivo*. *Cancer Res* **40**: 1812~1817, 1980
- 2) Dexter DL, Kowalsky HM, Blaza BA, Fligial Z, Vogel R and Heppner GH: Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res* **38**: 3174~3181, 1978
- 3) Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J and Brattain DE: Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* **41**: 1751~1756, 1981
- 4) 長倉和彦: ヒト腎細胞癌の異質性 (Heterogeneity) に関する研究 I: 培養細胞株 KU-2 の形態, 染色体および細胞周期について. *日泌尿会誌* **75**: 431~439, 1984
- 5) Katsuka Y, Baba S, Hata M and Tazaki H: Transplantation of human renal cell carcinoma to the nude mice: As an intermediate of *in vivo* and *in vitro* studies. *J Urol* **115**: 373~376, 1976
- 6) Böyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* **21** (supple 97): 1~109, 1968
- 7) Zollen M and Matzku S: Characterization of natural cytotoxicity *in vitro* in a spontaneous rat tumor model. *J Immunol* **124**: 1683~1690, 1980
- 8) Ortaldo JR, Bonard GD and Herberman RB: Cytotoxic reactivity of human lymphocytes cultured *in vitro*. *J Immunol* **119**: 1351~1357, 1977
- 9) Grimm E and Bonavida B: Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. I Estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency. *J Immunol* **123**: 2861~2869, 1979
- 10) Phillips W, Ortaldo JR and Herberman RB: Selective depletion of human natural killer cells on monolayer of target cells. *J Immunol* **125**: 2322~2327, 1980
- 11) 早川正道, Schmitz-Dräger BJ and Ackermann R: 尿路悪性腫瘍由来培養細胞に対するヒト natural killer (NK) 細胞活性に関する研究. 第 II 編: インターフェロン β (IFN) に対する NK 細胞活性の増強効果とそのメカニズムについて. *日泌尿会誌* **75**: 43~52, 1984
- 12) 長倉和彦: ヒト腎細胞癌の異質性 (heterogeneity) に関する研究 II: 培養細胞株 KU-2 の腫瘍形成能について. *日泌尿会誌*, 投稿中
- 13) Kawase I, Urdal DL, Brooks CG and Henney CS: Selective depletion of NK cell activity *in vivo* and its effect on the growth of NK-sensitive and NK-resistant tumor cell variants. *Int J Cancer* **29**: 567~574, 1982
- 14) Brooks CN, Wayner EA, Webb PJ, Gray JD, Kenwick S and Baldwin RW: The specificity of rat natural killer cells and cytotoxic macrophages on solid tumor-derived target cells and selected variants. *J Immunol* **127**: 2477~2483, 1981
- 15) Rubin P, Pross HF and Roder JC: Studies of human natural killer cells. II Analysis at the single cell level. *J Immunol* **128**: 2553~2558, 1982
- 16) Barranco SC, Haenelt BR and Gee EL: Differential sensitivities of five rat hepatoma cell lines to anticancer drugs. *Cancer Research* **38**: 656~660, 1978
- 17) Byers VS and Johnston JO: Antigenic differences among osteogenic sarcoma tumor cells taken from different location in human tumors. *Cancer Research* **37**: 3173~3183, 1977

(1984年10月19日受付)