

ヒト正常膀胱上皮および膀胱腫瘍における サイトケラチンの形態の検討

東京医科歯科大学泌尿器科学教室 (主任: 大島博幸教授)

寿美 周平, 木原 和徳, 影山 幸雄

東 四雄, 福井 巖, 大島 博幸

A STUDY OF CYTOKERATIN IN HUMAN NORMAL BLADDER EPITHELIUM AND BLADDER CARCINOMA CELL LINES

Shuhei Sumi, Kazunori Kihara, Yukio Kageyama,
Yotsuo Higashi, Iwao Fukui and Hiroyuki Oshima

From the Department of Urology, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Normal epithelial and carcinoma cells of human bladder were investigated for the cytokeratin which is one of the intermediate filaments and comprises cytoskeleton using the immunofluorescence method. Carcinoma cell lines used were JTC-30, JTC-32, HUB-41 and T-24. In normal urothelium, keratin fibers were fine and straight with unchanged diameter and distributed regularly in the cytoplasm. By contrast, keratin fibers in bladder carcinoma cells were kinked and changed in diameter and were distributed irregularly in the cytoplasm. The above findings were most obvious in T-24 which formed undifferentiated carcinoma when transplanted to nude mice, and keratin fibers were dominantly located in the perinuclear area. The changes of keratin fibers appeared to be parallel to the grade of histological anaplasia of the tumor formed by implantation of bladder carcinoma cell line cells to nude mice. These observations suggest that the morphology of cytokeratin is a useful indicator for evaluating the grade of malignancy in transitional cell carcinoma.

(Acta Urol. Jpn. 36: 903-907, 1990)

Key words: Cytokeratin, Human bladder epithelium

緒 言

細胞が癌化することにより多くの形質が変化するが、これらの形質のうち形態や運動性の変化を担っているのは細胞骨格である¹⁾。癌化した細胞の細胞骨格も正常細胞と同様に形態学的にはマイクロフィラメント、微小管、中間径線維の3種類から構成されている。サイトケラチンはこれらの中の中間径線維に属しており、上皮系細胞に特異的とされ¹⁾、細胞質内において直径 7~11 nm の線維性構造を形成している。このサイトケラチンは細胞の分化および腫瘍化に伴い、鋭敏に変化するとされている。しかしながら悪性化に伴うサイトケラチンの形態上の変化については報告がいまだ少なく、特にヒト尿路上皮を対象とした検討はほとんどなされていない。われわれは今回、ヒト膀胱上皮においてサイトケラチンの形態を検討し、正常上皮と腫瘍細胞における相違を調べるとともに、腫

瘍細胞の悪性度とサイトケラチンの変化の程度との関連について検索した。

対 象

正常膀胱上皮細胞として、手術時に採取した正常膀胱粘膜を細切し、初代培養した細胞を用いた。膀胱腫瘍細胞として継代培養細胞株 JTC-30, JTC-32, HUB-41, T-24 を用いた。JTC-30, JTC-32, HUB-41 は当教室の患者より樹立された細胞であり²⁾、JTC-32は低分化型、他の2種は中等度分化型の移行上皮癌に由来している。また T-24 は Bubenik ら³⁾ により、grade 3 の膀胱癌より樹立された細胞である。

方 法

1) 細胞培養

膀胱腫瘍継代培養細胞のうち JTC-30, JTC-32, HUB-41 は DM-170 (極東製薬工業株式会社) + 13

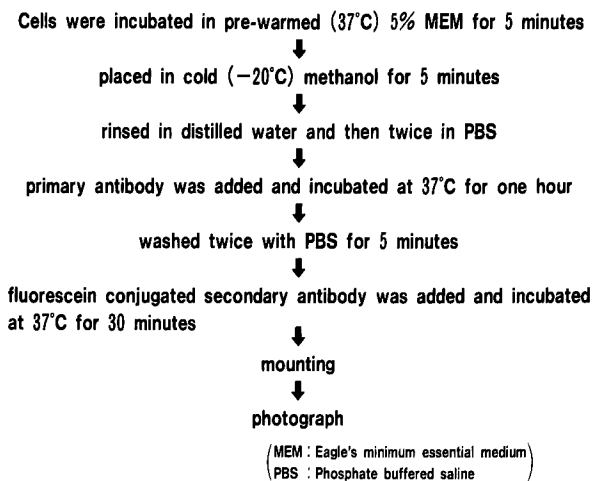


Fig. 1. Procedure of cytokeratin staining

% FCS (Gibco) を, T-24 は α -MEM (Gibco) + 13% FCS を培養液として用い, 37°C, 5% CO₂ の条件下にインキュベーター内で培養した. 正常膀胱上皮細胞は, 正常膀胱粘膜をメスにて 1~2 mm 角に細切り, 小フラスコ内に静置して, DM-170 + 13% FCS を培養液とし, 37°C, 5% CO₂ の条件下にインキュベーター内で培養し, 組織片周囲に上皮細胞を, outgrow させた.

2) サイトケラチンの染色

サイトケラチンの染色は, 抗ケラチンモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法で行い, Cytolite kit (第1化学薬品) を用いた. そのフローチャートを Fig. 1 に示す. 膀胱腫瘍継代培養細胞はスライドガラス上に単層培養してから上記の染色操作を行った. 正常膀胱上皮細胞はスライドガラス上での培養が困難であったため, 培養フラスコ内で染色操作を行った.

3) 膀胱腫瘍継代培養細胞の in vivo における組織像

各継代培養細胞の in vivo での形態に関しては, サイトケラチンの染色時に各膀胱腫瘍細胞の一部 (5 × 10⁶) をヌードマウスに移植し, 形成された腫瘍を一月後に摘出しその組織像を膀胱癌取り扱い規約⁴⁾に基づき検討した.

結 果

1) 正常膀胱上皮のサイトケラチン

サイトケラチンは, 正常膀胱上皮では細い均一な太さの線維として細胞質内を直線状に走り, ほぼ均等に分布していた (Fig. 2).

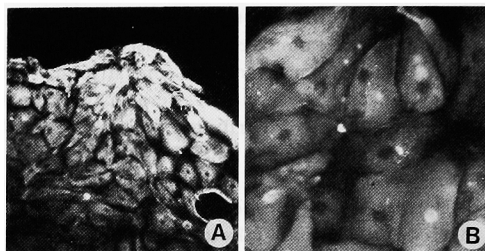


Fig. 2. Normal bladder epithelium. Keratin fibers are thin, straight, constant in diameter and distributed evenly in the cytoplasm. A, ×200 B, ×1,000

2) 膀胱腫瘍継代培養細胞のヌードマウス移植における形態とサイトケラチン

ヌードマウス移植にて JTC-30 は中等度分化型の組織構築を示し, JTC-32, HUB-41 は低分化の像を呈し, T-24 はきわめて未分化な形態を示した (Fig. 3B, D, F).

中等度分化型の形態を示す JTC-30 では, サイトケラチンの細胞質内の分布は正常上皮と同様に, ほぼ均等な細胞が多かったが, 線維径には大小不同があり, 走行にも蛇行, 錯綜が認められた (Fig. 3A). 低分化型の形態を示す JTC-32, HUB-41 では, 線維の大小不同, 蛇行, 細胞質内分布の不均等が強くなり, 線維が錯綜し網目上に絡み合う傾向も認められた (Fig. 3C). また核膜周囲への集積傾向を示した. 未分化な形態を示す T-24 ではサイトケラチンは核膜周囲に強く集積するとともに細胞質内に不均等に分布し, その線維は著しい大小不同を示し, その走行にも著明な蛇行, 錯綜が認められた (Fig. 3E).

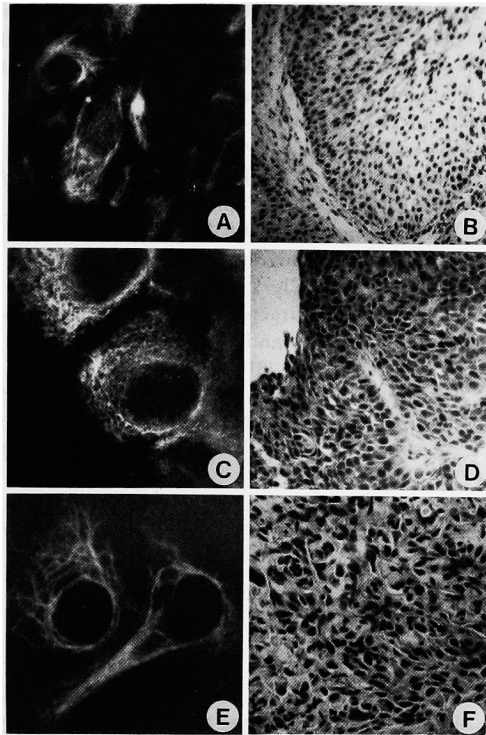


Fig. 3. TCC cell line cells. Cytokeratin and histology when transplanted into nude mice. A, Cytokeratin of JTC-30 cells, $\times 1,000$. B, Histology of JTC-30 cells showing moderately differentiated TCC, $\times 100$. C, Cytokeratin of JTC-32 cells, $\times 1,000$. HUB-41, derived from poorly differentiated TCC showed the same pattern. D, Histology of JTC-32 cells showing poorly differentiated TCC, $\times 100$. E, Cytokeratin of T-24 cells, $\times 1,000$. F, Histology of T-24 cells showing undifferentiated carcinoma.

考 察

細胞質内には細胞内小器官, 限界膜といった構造のはかに線維成分 (fibrous system) が存在する。電顕的および生化学的検索によって, この system の解析が進み, 現在では大別して3種のものが知られている。すなわち, マイクロフィラメント, 微小管, 中間径線維であり, これらをまとめて細胞骨格 (cytoskeleton) という名称が幅広く使われている⁵⁾。

細胞の癌化と細胞骨格の変化に関しては最近多くのデータが蓄積されてきているが, これらの研究は主としてマイクロフィラメントを中心に進められてきている。

マイクロフィラメントは, 直径約 6 nm のアクチ

ンフィラメントに代表される system であり, 癌化に伴うアクチンの突然変異体の出現⁶⁾, マイクロフィラメントの膜への付着部位の変化⁷⁾, マイクロフィラメントの修飾蛋白の変化⁸⁾などが報告されている。また発癌遺伝子の一部に β -アクチンに対応する塩基配列があるとする知見⁹⁾や, 線維芽細胞の悪性度とアクチンの変化が並行するとの知見¹⁰⁾も得られており, これらは細胞骨格の研究が発癌および癌の悪性進展の研究に重要な位置を占めていることを示している。

中間径線維の1つであるサイトケラチンは上皮系細胞にかなりの程度まで特異的とされ, 全身の上皮細胞に幅広く分布するとともに各種の上皮性腫瘍に局在が認められている。このサイトケラチンには現在までに, 数多くの分子量の異なる subtype が知られており, 上皮細胞の種類, 分化度, 腫瘍化により, 含有する subtype が異なることが明らかとなっている¹⁰⁻¹⁴⁾。しかしながら悪性化に伴うサイトケラチンの形態上の変化, すなわちケラチン線維自体の形の変化および細胞質内の走行, 分布の変化についての報告はいまだ少なく, 特にヒト尿路上皮細胞での検討はほとんどなされていない。

今回, われわれはヒト膀胱上皮を対象に, 抗ケラチンモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光法によりサイトケラチンの形態変化を観察した。その結果, 正常細胞と癌細胞との間で, サイトケラチン線維の直径, 走行, 細胞内分布に著明な相違が認められ, しかも癌細胞の中ではその悪性度が高くなるにつれて, ケラチン線維の変化が顕著となる傾向が認められた。今回対象とした膀胱腫瘍継代培養細胞の悪性度については, 組織型のみでなく, 細胞間の低分子物質の直接の移動による情報交換システムである細胞間コミュニケーションの面からも検討されているが¹⁵⁾, それらと今回の検討結果はほぼ一致しており, 細胞間コミュニケーションの低下あるいは消失した細胞ではサイトケラチンも強く変化する傾向が認められた。細胞骨格の変化は, 癌の浸潤性や転移性にも深く関連しているとされ, 予後を左右する因子の1つになりうると考えられる。

今回の検討において, サイトケラチンの形態変化が膀胱腫瘍の悪性度の指標の1つになりうる可能性が示唆された。

結 語

ヒト正常膀胱上皮細胞および膀胱腫瘍細胞において, 細胞骨格の構成要素であるサイトケラチンの形態を抗ケラチンモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光法により検討した。正常膀胱上皮のサイトケラチンは細

い均一な太さの線維で、細胞質内を直線状に走り、かつ均等に分布していたが、腫瘍細胞では、サイトケラチンに、太さの大小不同、蛇行、細胞内分布の不均等などの変化が認められた。各膀胱腫瘍継代培養細胞のヌードマウス移植における組織学的形態とサイトケラチンの形態変化とを対比し、膀胱腫瘍細胞の組織学的悪性度とサイトケラチン線維の変化の強さとが比較的並行している所見を得た。

文 献

- 1) 石川春律：図説細胞骨格，講談社，東京，1985
- 2) Kakuya T, Yamada T, Yokokawa M and Ueda T: Establishment of cell strains from human urothelial carcinoma and their morphological characterization. *In Vitro* **19**: 591-599, 1983
- 3) Bebenik J, Baresova M, Viklicky V, Jakubkova J, Sainerova H and Donner J: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T-24) containing tumor-specific antigen. *Int J Cancer* **11**: 765-773, 1973
- 4) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編：泌尿器科・病理膀胱癌取扱い規約，金原出版，東京，1980
- 5) 向井方起男，鳥潟親雄：細胞骨格。病理と臨床 **2**: 1580-1588, 1984
- 6) Leavitt J, Bushar G, Kakunaga T, Hamada H, Hirakawa T, Goldman D and Merrill C: Variations in expression of mutant β -actin accompanying incremental increases in human fibroblast tumorigenicity. *Cell* **28**: 259-268, 1982
- 7) Hunter T: Proteins phosphorylated by the RSV transforming function. *Cell* **22**: 647-648, 1980
- 8) Matsumura F, Lin JJC, Yamashiro-Matsumura S, Thomas GP and Topp WC: Differential expression of tropomyosin forms in the microfilaments isolated from normal and transformed rat cultured cells. *J Biol Chem* **258**: 13954-13977, 1983
- 9) Naharro G, Robbins KC and Reddy EP: Gene product of v-fgr onc: hybrid protein containing a portion of actin and a tyrosine-specific protein kinase. *Science* **223**: 63-66, 1984
- 10) Moll R, Franke WW and Schiller DL: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**: 11-24, 1982
- 11) van Muijen GNP, Ruiter DJ, Ponc MJ, Huiskens-Van Der Mey C and Warnaar SO: Monoclonal antibodies with different specificities against cytokeratins. *Am J Pathol* **114**: 9-17, 1984
- 12) Sun TT, Tseng SCG, Huang AJW, Cooper D, Schermer A, Lynch MH, Weiss R and Eichner R: Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Ann N Y Acad Sci* **455**: 307-329, 1985
- 13) Chesa PG, Rettig WJ and Melamed MR: Expression of cytokeratins in normal and neoplastic colonic epithelial cells. *Am J Surg Pathol* **10**: 829-835, 1986
- 14) Nagle RB, Ahmann FR, McDaniel KM, Paquin ML, Clark VA and Chlanker A: Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res* **47**: 281-286, 1987
- 15) 木原和徳，影山幸雄，寿美周平，東 四雄，福井 敏，大島博幸：ヒト膀胱腫瘍継代培養細胞における細胞間コミュニケーションの検討。日泌尿会誌 **80**: 988-994, 1989

(Received on November 2, 1989)
(Accepted on January 30, 1990)

<Editorial Comment>

本論文は膀胱の正常上皮および膀胱癌の培養細胞でサイトケラチンを特異的に染色して観察し、その形態の変化が悪性度と関連することを示唆したものである。サイトケラチンは著者も述べているように細胞骨格を形成する微細線維構造であるが、従来から増殖や分化に関連してその重要性が考えられてきたものの抗ケラチンモノクローナル抗体利用によって特異的検出法が確立されるまでは研究の進展を見なかった。

われわれの研究グループでも培養膀胱癌細胞で同様に細胞骨格の1つであるアクチンと悪性度の関連に注目し検討したことがあるが数種の方法によって形態と分化の関連性を認める結果がえられた¹⁾。

最近では陰茎扁平上皮癌により樹立した細胞株で、サイトケラチンの免疫蛍光染色による検出を行って細胞同定のための有用性を確認している²⁾。しかしながら、これらの微細構造と癌の悪性度の関連においてさらに研究を推進するためには、定量的解析が必要で免疫化学的微量定量とともに画像解析の確立とくに computer assisted technology の開発が期待される。

参 考 文 献

- 1) Tadokoro S: Intracellular concentration and structural states of actin in human bladder carcinomas: new indices for malignancy. *Keio J Med* **34**: 47-59, 1985

- 2) Tsukamoto T: Establishment and characterization of a cell line (KU-8) from squamous cell carcinoma of the penis. Keio J Med

38: 277-293, 1989

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室
田 崎 寛