

ラット口蓋癌由来培養細胞の生物学的性状解明

伊東博司 奥山典子 阿部匡聡¹ 櫻井裕子
遊佐淳子 堀内 登¹ 山崎 章

Biological Characteristics of a New Cell Strain Isolated from a Squamous Cell Carcinoma of the Rat Palate

Hiroshi ITO, Noriko OKUYAMA, Masatoshi ABE¹, Yuuko SAKURAI
Junko YUSA, Noboru HORIUCHI¹ and Akira YAMASAKI

4-nitroquinoline N-oxide (4NQO) administrated rats have high occurrence of palatal squamous cell carcinoma (SCC), which almost always accompanies resorption of the jaw bone. We have developed a cell strain (11/8F) from a rat palatal SCC induced by 4NQO administration. The cultured cells are polygonal or round in shape, and they exhibited cobble-stone growth pattern. Immunocytochemically, 11/8F cells were positive with four anti-cytokeratin antibodies ; AE1, AE3, CAM5.2, and KL1. It is also found that an immunoreactivity for parathyroid hormone-related protein (PTHrP), which is closely related to cancerous bone resorption. In addition, expression of PTHrP mRNA were identified. The cell strain 11/8F, exhibiting characters as noted above, might permit establishing an experimental model to clarify mechanisms of bone destruction with oral SCC invasion.

Key words : cell culture, oral squamous cell carcinoma, bone resorption, rat

緒 言

口腔癌は、原発部で浸潤増殖する際に、しばしば周囲の骨の破壊をきたすという、全身の他部位に生じる癌腫には見られない生物学的性質を有している。口腔癌の浸潤増殖とともに生じる顎骨吸収が、口腔癌患者に起こると機能障害・審美障害をきたして、その患者の生活の質 (quality of life ; QOL) が低下してしまう。口腔癌の伸展に伴う顎骨吸収の機序については不明な点が多く、口腔癌による顎骨吸収のメカニズムを解明するた

めの実験モデルは確立されていない。

4-nitroquinoline N-oxide (4NQO) 水溶液を飲水としてラットに経口投与すると口蓋粘膜に扁平上皮癌が高頻度で生じる¹⁾。これら口蓋癌の大多数は上顎の骨を破壊・吸収しつつ浸潤増殖する²⁾。4NQO飲水投与によって生じた骨破壊性ラット口蓋扁平上皮癌に由来する培養細胞を樹立することは、口腔癌の浸潤増殖とともに生じる顎骨吸収のメカニズムを解明するために有益であると考えられる。

副甲状腺ホルモン類似タンパク (PTHrP) は

受付：平成17年12月28日，受理：平成18年1月20日
奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔病理学
奥羽大学歯学部口腔機能分子生物学講座口腔生化学¹

Department of Oral Medical Science, Oral Pathology,
Ohu University School of Dentistry
Department of Oral Function and Molecular Biology,
Biochemistry, Ohu University School of Dentistry¹

破骨細胞分化を促進し、かつ、破骨細胞の活性を高めるサイトカインである^{3,4)}。また、検索した24例の下顎骨侵襲性口腔扁平上皮癌組織の全てにおいて、PTHrPの局在が見いだされたという報告⁵⁾もあることから、PTHrPは口腔癌病巣近傍において生じる骨吸収に深く関わっていることが推察される。

本研究では、口腔癌の浸潤増殖に伴って生じる骨吸収の機序を解明するのに適した実験モデルを開発するための足がかりを得ることを目的に、4NQOにより惹起されたラット口蓋癌より培養細胞を樹立し、その細胞の生物学的性状を検討した。

材料および方法

1. 細胞培養法

4-ニトロキノリン N-オキシド (東京化成) の20ppm水溶液を生後7週から8週間、飲水として経口投与された⁶⁾F344雄性ラット (チャールズリバー) の口蓋粘膜に生じた、扁平上皮癌組織 (図1) の一部をエーテル麻酔下に滅菌済みメスにて切除した。鎌田の方法⁷⁾に従い、切除された組織片は直ちに消毒用イソジン[®] (明治製菓) に1分間浸漬し、その後10mg/mlの濃度のゲンタシン (Sigma) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に2時間浸漬した。組織片は、さらにゲンタシン添加PBSで10秒ずつ10回洗浄したのち、1mm角に細切し、細切された組織片を培養面積25cm²の培養フラスコ (Nunc) 底面に付着させた。その後、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen) および50U/mlペニシリン (Invitrogen)、50μg/mlストレプトマイシン (Invitrogen) を含むDulbecco's変法Eagle培地 (Invitrogen) をフラスコに入れ、37℃、5%CO₂の条件下で培養を開始した。培地は週2回交換し、癌細胞の増殖が確認されたのちには、癌細胞とともに増殖する線維芽細胞を、0.05%トリプシン (Difco) および0.007%EDTA (和光純薬) 含有PBSで37℃2分間処置して、可及的に除去した⁷⁾。線維芽細胞の除去は週1回行い、培養開始後73日目には癌細胞の敷石状増殖巣から、癌細胞を0.25%トリプシンおよび0.007%EDTA含有PBSに予め浸した3mm角の滅菌濾紙にて剥離し、剥離した細胞を直径35mmのペト

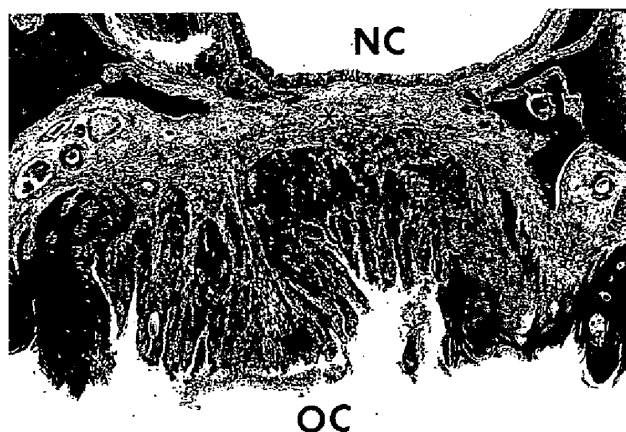


図1 顎骨侵襲性口蓋癌組織
顎骨吸収 (*) を伴って増殖する口蓋扁平上皮癌組織の病理組織像。NC : 鼻腔, OC : 口腔

表1 使用した一次抗体

クローン/抗体名	標識分子	Source	
AE1	低・中分子量CK	Bi φ meda	稀釈済み
AE3	高分子量CK	Bi φ meda	稀釈済み
CAM5.2	低分子量CK	BECTON DICKINSON	
		SON	稀釈済み
KL1	低・中・高分子量CK	IMMUNOTECH	稀釈済み
V9	vimentin	ダコサイトメーション	1 : 25
Y202	PTHrP	矢内原研究所	1 : 500

リディッシュ (Nunc) に播種した⁸⁾。同様の操作を培養開始後96日目に再度行い、今度は剥離細胞を直径60mmのディッシュ (Nunc) に播種した。60mmディッシュへの播種後に同ディッシュ上で増殖する細胞コロニーが1個のみであることを確認し、増殖細胞が60mmディッシュでコンフルエント状態となった培養開始130日後からは、0.25%トリプシンと0.007%EDTAを含むPBSで分散した⁷⁾細胞の継代培養を行い、増殖した培養細胞を11/8Fと命名した。

2. 細胞増殖能の測定

40枚の35mm (Nunc) ディッシュに、1枚のディッシュあたり 2×10^5 個ずつの細胞を播種し、2日ごとに培地を交換して培養した。培養開始1日後より7日までは毎日、7日からは1日おきに、3枚のディッシュから細胞を採取して細胞数を算定した。算定した細胞数より細胞増殖曲線を描き、細胞倍化時間を算出した。

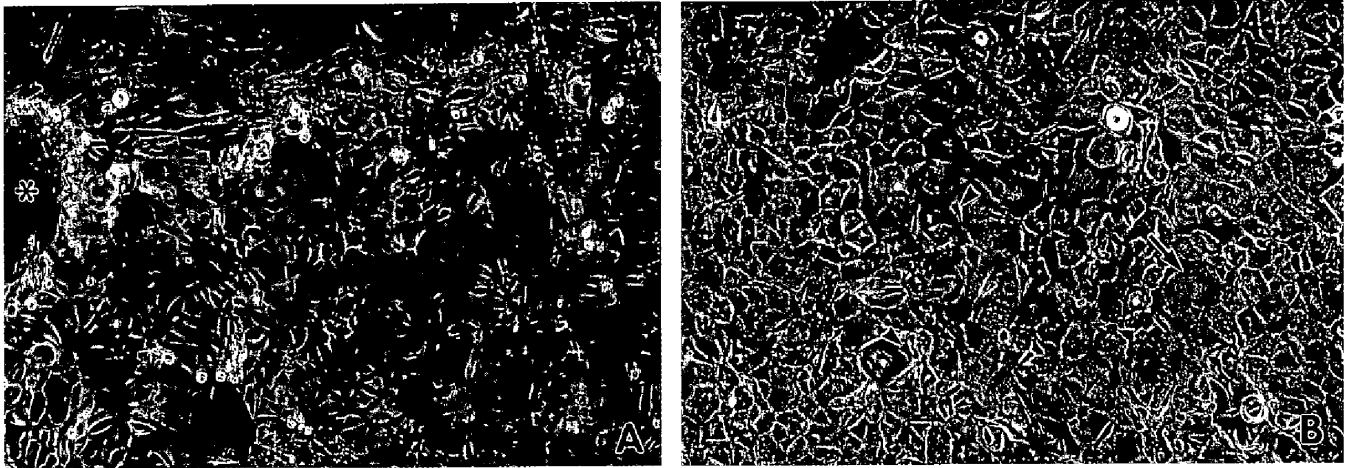


図2 初代培養細胞
 A：組織片（*）から癌細胞が増殖しているのが見られる。B：初代培養細胞は多角形または類円形の形態を示し、多核細胞の出現（矢印）も観察される。初代培養細胞には、線維芽細胞と見なされる短紡錘形または星芒状の細胞の混在（矢頭印）も認められる。

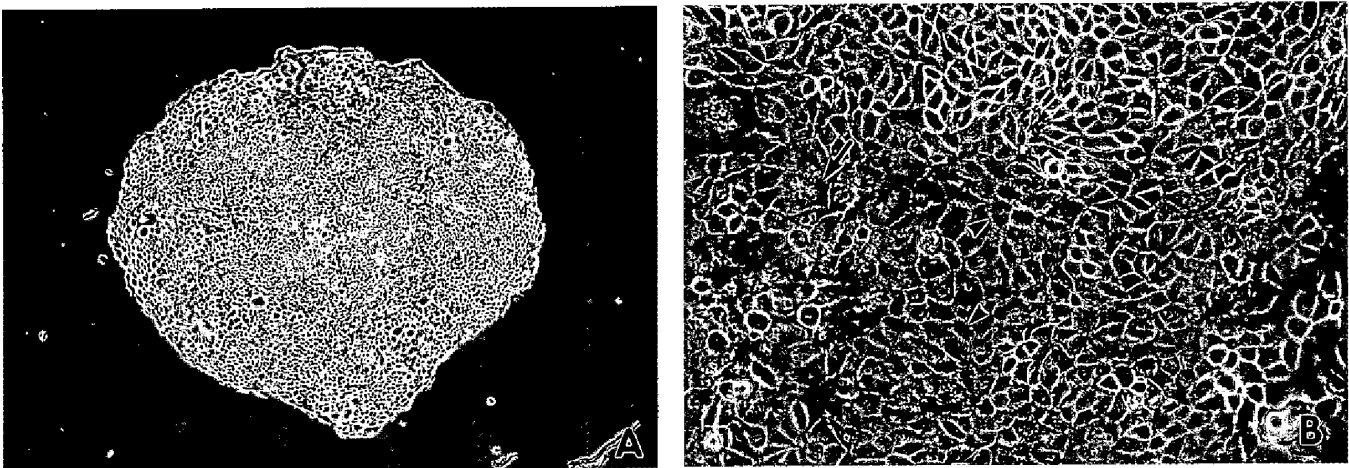


図3 11/8F細胞
 A：11/8F細胞が形成したコロニー。B：11/8F細胞の形態は初代培養細胞の形態とほぼ同様で、増殖形態は敷石状である。11/8F細胞には多核細胞出現（矢印）や細胞間橋形成（矢頭印）が観察される。

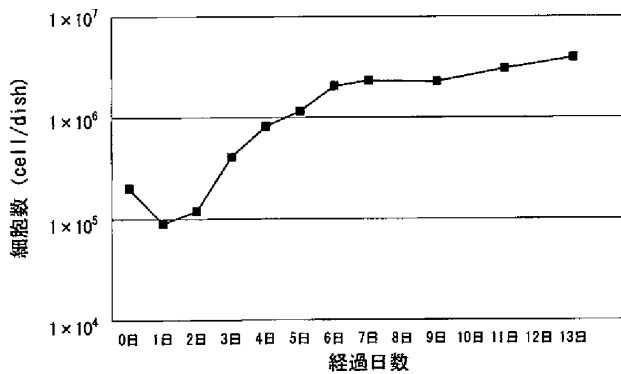


図4 11/8F細胞の増殖曲線
 培養開始2日後から6日後までが対数増殖期と見なされ、細胞倍化時間は13.5時間と算定された。

3. 免疫細胞化学的解析

ラブテックⅡチェンバースライド (Nunc) で培養した細胞⁹⁾に、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン・ビオチン法による免疫染色を行った。まず、チェンバースライド上の培養細胞を4%パラホルムアルデヒド液で4℃5分間固定し、次いで10%正常ヤギ血清によるマスキングを施行した。一次抗体として4種の抗cytokeratin (CK) モノクロナル抗体 (表1) と抗vimentinモノクロナル抗体 (ダコサイトメーション) および抗PTHrPポリクロナル抗体 (矢内原研究所) を表1に示す稀釈倍率で用い、4℃で一晩反

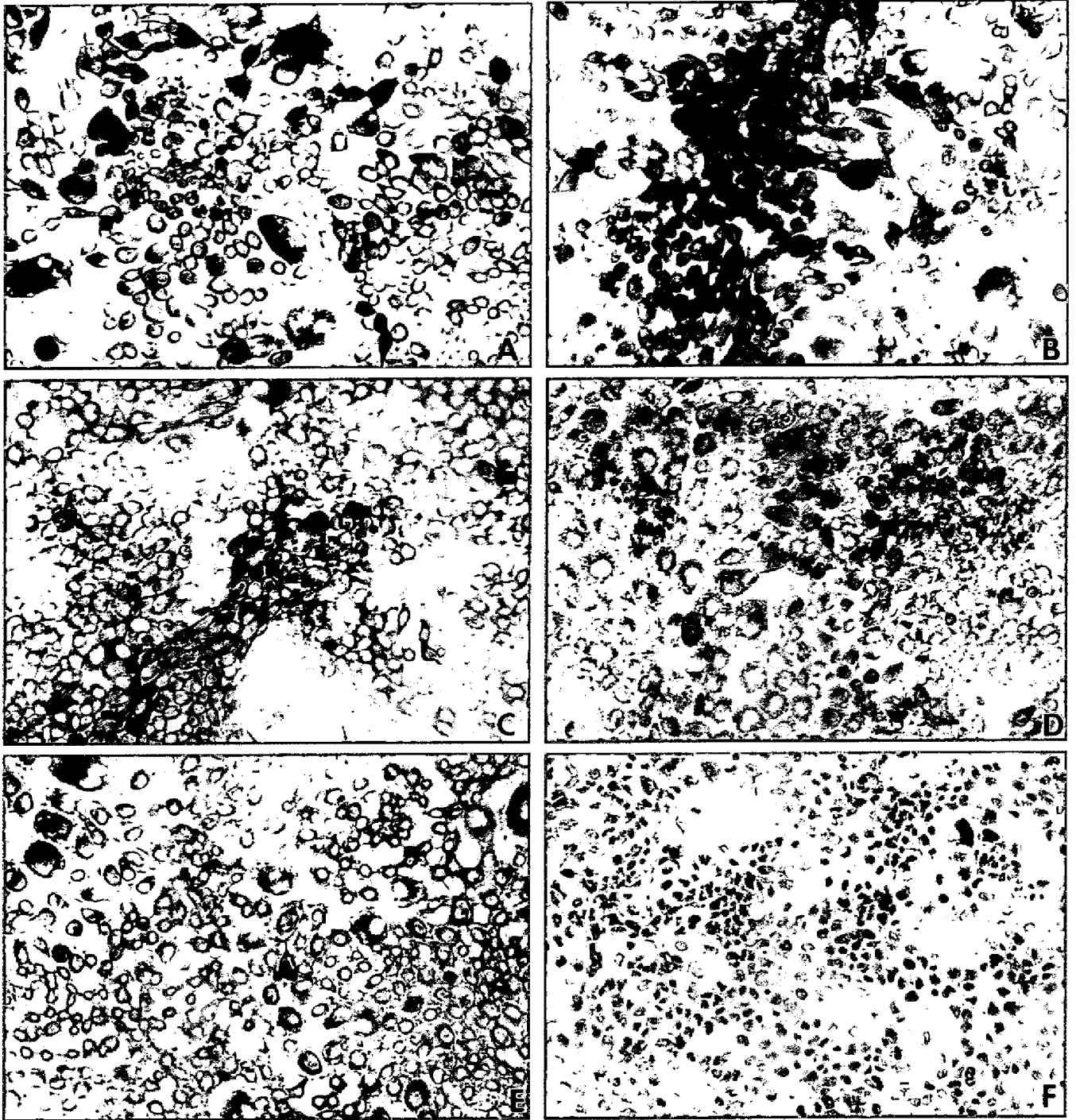


図5 11/8F細胞の免疫染色所見

A-D: A, B, C, Dはそれぞれ抗CK抗体AE1, AE3, CAM5.2, KL1による染色。いずれの抗CK抗体による染色においても明瞭な陽性反応が見られる。E: vimentin染色でも多くの細胞が陽性を示す。F: PTHrP染色でも11/8F細胞が陽性である。

応させた。次いで、ビオチン標識抗マウス・ヤギ抗体 (Chemicon) またはビオチン標識抗ウサギ・ヤギ抗体 (Chemicon) と室温1時間反応させた。その後、稀釈済みのアルカリホスファターゼ標識streptavidin (ニチレイ) を室温で20分反

応させた。アルカリホスファターゼの局在部位をニューフクシン (Merck) を用いた反応液¹⁰⁾で赤色に発色させた後、ヘマトキシリン核染色し、アクアテックス (Merck) で封入した。

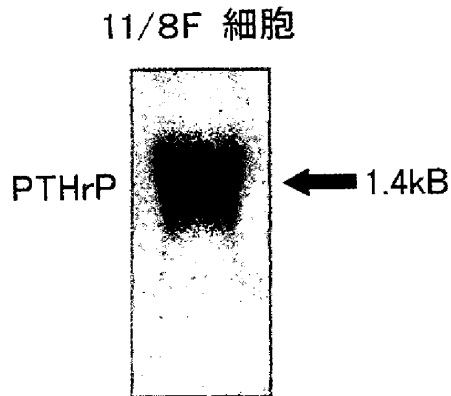


図6 11/8F細胞におけるPTHrP mRNAノーザンブロット解析
20 μ gのtotal RNAのノーザンブロット解析により1.4kbの大きさのmRNAが見られる。

4. PTHrP mRNA発現の解析

ノーザンブロット法によりPTHrP mRNAの発現を検討した。total RNAはguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform法により抽出し、260nmにおける吸光度からRNAを定量した。20 μ gのtotal RNAを2.2Mホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルを用いた電気泳動により分画し、ナイロンメンブレンHybond N⁺ (Amersham) 上にブロッティングした。³²PでラベルしたラットPTHrP cDNAをプローブとして、42℃で48時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロンメンブレンを洗浄した後、Molecular Imager FX (Bio-Rad)で解析し、mRNAを検出した。

結 果

1. 培養細胞の形態的特徴

初代培養細胞の位相差顕微鏡観察では、多角形、類円形および短紡錘形の細胞の敷石状増殖が見られた。細胞の大きさは不均一で、多核を有する細胞も観察され、また、初代培養では線維芽細胞と思われる紡錘形細胞も見いだされた(図2)。

樹立された11/8F細胞の形態は初代培養細胞の形態とほぼ同様であり、細胞の大小不同および多核細胞の出現が見いだされ、培養細胞による細胞間橋形成も認められた(図3)。現在までに継代20代を越えているが、継代開始後から細胞形態は安定している。

2. 細胞増殖能

培養開始後2日目より、コンフルエント状態となる6日目までの期間が対数増殖期であると見なされ(図4)、細胞倍化時間は13.5時間と算定された。

3. 免疫細胞化学

抗CK抗体を用いた4種の染色(AE1, AE3, CAM5.2およびKL1の各染色)のいずれにおいても、強い陽性反応が見られ赤色の反応産物は細胞質全体に分布していた(図5A-D)。vimentin染色によっても細胞質に陽性所見が観察され、vimentin陽性反応物は細胞核周囲に局在する傾向が認められた(図5E)。PTHrP免疫染色でも陽性反応が見られたが、反応強度は他の免疫染色と比べ弱く、陽性細胞の数も他の染色と比べやや少なかった(図5F)。

4. PTHrP mRNA発現

total RNAを11/8F細胞より抽出し、ノーザンブロット法で解析を行った結果、1.4kbのシグナルが確認され、11/8F細胞がPTHrP mRNAを発現していることと見なされた(図6)。

考 察

我々は今回、ラット口蓋癌由来の培養細胞11/8Fを樹立し、11/8F細胞の生物学的性状解明を行った。11/8F細胞は敷石状配列を示し、細胞間橋を形成しているのが観察され、11/8F細胞の細胞倍化時間は13.5時間と算定された。11/8F細胞の細胞倍化時間は、ヒト舌癌由来培養細胞を24穴プレートに1.5 \times 10⁴個播種して培養した際の細胞倍化時間14時間¹¹⁾と比べほとんど差がない。

本研究では、4種の抗CK抗体染色のいずれにおいても、明瞭な陽性反応が11/8F細胞の細胞質に見いだされた。それら4種の抗体のうちAE3抗体は、重層扁平上皮の角化層に存在する高分子量CKに免疫染色陽性反応を示すことが知られている¹²⁾ことから、11/8F細胞は角化扁平上皮癌の性格を有しているものと推察される。また、単層上皮が有する低分子量CKと反応するCAM5.2抗体¹²⁾による染色、および、低および中分子量CKと反応するAE1抗体¹²⁾を用いた染色においても陽性所見が見られたことから、11/8F細胞は角化重

層扁平上皮組織以外の上皮組織の性質を持っている可能性も示唆される。なお、多種類の間葉系細胞が有している中間系フィラメントである vimentin が、培養上皮細胞において産生されることが報告されており¹³⁾、今回検討した11/8F細胞にも vimentin の陽性反応が見いだされた。

上記のような上皮性性格を示す11/8F細胞には、今回の研究においてPTHrP mRNA の発現とPTHrP免疫染色陽性反応が見られたことから、11/8F細胞はPTHrPを産生する癌細胞であることが確認された。口腔癌由来培養細胞のPTHrP産生¹⁴⁾および*in vivo*の下顎骨侵襲性骨肉癌組織におけるPTHrPの局在が報告されていること、および、PTHrPが破骨細胞活性化因子である receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) の発現を*in vitro*において増強するのが示されていること¹⁶⁾を考慮すると、高頻度で顎骨破壊を生ずるラット口蓋癌に由来する11/8F細胞は、口腔扁平上皮癌による顎骨破壊のメカニズムを解明するための実験モデルの確立を目指す研究の一助となる可能性があるといえよう。

4NQO処置によって悪性化されたラット口腔ケラチノサイトに由来する培養細胞を、胸腺欠如 (nu/nu) マウスの口腔底に移植すると、移植された悪性細胞の浸潤増殖に伴う顎骨吸収が見られたとの報告¹⁷⁾がある。このことから、本研究で得られた11/8F細胞を、免疫不全マウスの顎骨周囲軟組織に移植した場合には、増殖する癌組織の近傍に位置する顎骨に、顕著な量の吸収が生じるとの予想がなされよう。また、11/8F細胞はPTHrPを産生していることから、11/8F細胞と骨髄細胞とを共存培養した際に破骨細胞の分化が生ずる可能性が考えられ、そのような破骨細胞分化を示す共存培養系が確立されると、口腔癌病巣における骨吸収機序の解明がさらに一段階進捗することになるであろう。

結 論

4NQOにより惹起されたラット口蓋癌より培養細胞11/8Fを樹立した。11/8F細胞の生物学的性状を検討することにより、11/8F細胞は癌腫としての性格を有し、また、PTHrPを産生すること

が明らかとなった。11/8F細胞のこのような特性を考慮すると、11/8F細胞が口腔癌増殖に伴う顎骨吸収の機序を解明するための研究に役立つことが推察される。

本論文の要旨は第45回歯科基礎医学学会学術大会（平成15年9月 盛岡）において発表した。

本研究は、平成13、14年度科学研究費補助金（基盤研究C、課題番号13671976）の一部を使用した。

文 献

- 1) 酒井勝衛：4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO) 水溶液の経口投与によるラット口蓋癌の発生。明海歯学誌 **24**；129-152 1995.
- 2) 伊東博司，櫻井裕子，杉浦淳子，山崎 章ほか：ラット口腔癌モデルにおける骨吸収。歯基礎誌 **41**；425-425 1999.
- 3) 前川邦昭，出山義昭，吉村善隆，八田光世ほか：口腔扁平上皮癌によるインターロイキン-6の産生と顎骨浸潤との関連。北海道歯誌 **25**；171-178 2004.
- 4) 米田俊之：骨破壊性癌転移の細胞生物学的メカニズム。病理と臨床 **17**；12-17 1999.
- 5) Dunne, F. P., Bowden, S. J., Brown, J. S., Ratcliffe, W. A. *et al.* : Parathyroid hormone related protein in oral squamous cell carcinomas invading the mandible. *J Clin Pathol* **48**；300-303 1995.
- 6) Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H. *et al.* : 1, 4-phenylenebis (methylene) selenocyanate exerts exceptional chemopreventive activity in rat tongue carcinogenesis. *Cancer Res* **57**；3644-3648 1997.
- 7) 鎌田伸之：①癌細胞の培養。分子生物学研究のための新培養細胞実験法（黒木登志夫ら編）改訂第2版；248-252 羊土社 東京 2001.
- 8) 大場 基：②細胞クローニング。分子生物学研究のための新培養細胞実験法（黒木登志夫ら編）改訂第2版；44-46 羊土社 東京 2001.
- 9) 大谷明夫，鴨志田伸吾，堤 寛，長谷川英章ほか：12. 培養細胞の固定。渡辺・中根 酵素抗体法（名倉 宏ら編）改訂第4版；95-96 学際企画 東京 2002.
- 10) 難波絃二，青木 潤，佐々木なおみ：アルカリフォスファターゼ標識抗体法における発色法の検討—New fuchsin発色による高精度，高カラーコントラスト永久標本の作成。病理と臨床 **5**；333-339 1987.
- 11) 信森 剛：舌癌の原発巣と頸部リンパ節転移巣から樹立した培養細胞の生物学的性状。廣大歯誌 **35**；18-32 2003.
- 12) 長村義之：1.1 ケラチン。外科病理学（石川栄

- 世ら編) 第3版; 1582-1585 文光堂 東京 2000.
- 13) Ben-ze'eb, A. : Differential control of cytokeratins and vimentin synthesis by cell-cell contact and cell spreading in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* **99**; 1424-1433 1984.
- 14) Tannehill-Gregg, S., Kergosien, E. and Rosol, T. J. : Feline head and neck squamous cell carcinoma cell line : characterization, production of parathyroid hormone-related protein, and regulation by transforming growth factor- β . *In Vitro Cell Dev Biol—Animal* **37**; 676-683 2001.
- 15) Shibahara, T., Nomura, T., Cui N. H. and Noma, H. : A study of osteoclast-related cytokines in mandibular invasion by squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* **34**; 789-793 2005.
- 16) 北澤理子, 北澤荘平 : 悪性腫瘍の骨破壊病変における遺伝子発現. *病理と臨床* **22**; 285-289 2004.
- 17) Davies, M., Paterson, I. C., Stone, A., Huntley, S. *et al.* : Loss of differentiation of 4NQO-induced rat malignant oral keratinocytes correlates with metastatic dissemination and is associated with a reduced cellular response to TGF- β 1 and altered receptor profile. *J Oral Pathol Med* **28**; 397-405 1999.

著者への連絡先：伊東博司，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔病理学

Reprint requests : Hiroshi ITO, Department of Oral Medical Science, Oral Pathology, Ohu University School of Dentistry.

31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan