

ヒト正常および腫瘍細胞の三次元培養による 組織再構築に関する研究

大阪府立大学附属研究所

岩井 峯子

TISSUE RECONSTRUCTION OF HUMAN NORMAL AND TUMOR CELLS IN THREE-DIMENSIONAL CULTURE

MINEKO IWAI

*Research Institute for Advanced Science and Technology,
University of Osaka Prefecture*

Received March 17, 1992

Summary: Normal and tumor cells were cultivated in three-dimensional collagen gel culture. Collagen was extracted from rat tail tendon and then sterilized with ^{60}Co gamma-ray irradiation. By examining the proliferation of DD 762 cells (mouse mammary tumor cell lines), as well as that of normal mouse mammary gland and salivary gland cells, the collagen gel culture method was evaluated. Five kGy irradiated collagen was found to be suitable for sterilization, gelation and also the growth of normal and tumor cells. The serum-free medium was suitable for reconstruction of a duct-like structure with cells derived from gland tissues. In this culture system normal human cells (derived from salivary, thyroid and mammary glands) and tumor cells from the same glands were cultured. Histologic sections of each culture gel closely resembled the original tissue morphologically. This *in vitro* system is useful for sensitivity tests for various anticancer agents and for studying cell differentiation, organogenesis and tumorigenesis.

Index Terms

collagen gel, gamma ray, human cells, cell culture, tissue reconstruction

緒 言

in vivo に近い状態に組織再構築可能な培養系を確立することは細胞の増殖, 分化, 癌化機構の研究, 薬剤や放射線の感受性についての研究, または機能細胞の産生物質の研究などに有用である。コラーゲンゲルを支持体とした培養では三次元的形態形成あるいは組織構築が認められプラスチック面での二次元的培養に比べ, より *in vivo* に近い状態と考えられる。それゆえ, コラーゲンゲル培養法は乳腺などの正常細胞また乳癌, 胃癌などの腫瘍細胞の培養に試みられている¹⁻⁶⁾。しかし *in vivo* に代替できる *in vitro* の実験の場としてはまだ一般化されて

いない。 ^{60}Co γ線照射で滅菌した, ラット尾の腱のコラーゲンが細胞培養の支持体に適しているかどうか検討することは培養に適したコラーゲンの確実な供給という点で意義深い。マウス乳癌細胞, 正常唾液腺と乳腺の細胞を用いて組織再構築のための培養条件を検討した。さらにその条件を用いてヒト正常唾液腺, 乳腺, 甲状腺およびそれらの腫瘍の細胞を培養し *in vivo* との比較を形態的に観察し有用な培養系としての可能性について検討した。

材料および方法

1. ラット尾コラーゲンの精製および ^{60}Co 線による照射滅菌

コラーゲンの精製はPriceの方法⁷⁾を参考とした。ラットの尾から摘出した腱は蒸留水で洗浄し、0.05 N の希酢酸中で溶解した。酸可溶コラーゲン溶液から不溶残渣を除くために10,000回転(11,600 g), 4°Cで遠心沈澱を行った。上清は0.001 N 希塩酸で一昼夜透析した。透析標品を凍結乾燥して、容器に窒素気流中で封入し、5, 10 kGyの線量で⁶⁰Coによるγ線照射滅菌を行った。細胞培養に使用する際には滅菌乾燥コラーゲンを前述の希塩酸に0.3%になるように溶解して用いた。各線量により照射されたコラーゲンをTGC培地をもちい、日本薬局方に従って無菌試験を行ったところ1 kGy以上の照射標品についてはすべて陰性であった。

2. 培養液

血清添加培地(FCS-培地)としては10%牛胎児血清、10 μg/mlのインシュリンを含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用いた。血清無添加培地(EGF-培地)としては5 mg/mlの牛血清アルブミン(BSA Fraction V, SIGMA Chemical Company)と5 ng/mlのマウスEpidermal Growth Factor(EGF, 宝酒造)、10 μg/mlのインシュリンを培養液(DMEMとHAM'sF12を1:1で混合)に添加してもちいた。また両培地とも100 U/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシンを添加しており培養初期には更に5 μg/mlのファンギゾンおよび1 μg/mlのマイコスタチンを加えた培地を用いた。

3. 細胞

DD762: DD/Tbrマウス自然発生乳癌由来の株化細胞⁸⁾でありFCS-培地で継代。マウス正常細胞: 5.5ヶ月令のNIH Swiss処女マウスの唾液腺および乳腺から採取された細胞。ヒト正常および腫瘍細胞: 手術時に摘出された唾液腺、乳腺、甲状腺の非腫瘍部および腫瘍部から採取された細胞。

4. 細胞の調製およびコラーゲンゲル中での培養

DD762はプラスチックシャーレ上に単層状に増殖した細胞をトリプシン液(0.3% trypsin, 0.03% EDTA, 0.02M PBS)で処理して集め、所定の細胞数を包埋培養に用いた。組織からの細胞採取は摘出した組織を細切し、0.1%コラーゲナーゼを含む培養液中で16~24 hr処理した後、およそ10~50個の小細胞塊を遠沈で集めてシャーレ当たり約5~10×10⁵個の細胞を包埋培養にもちいた。ゲル調整法および包埋培養法は榎並らの方法^{9,10)}を参考とした。35 mm径のプラスチックシャーレに1 mlのコラーゲン培地を敷き、37°Cで10分間保温し固め、上層部に2 mlのコラーゲン培地に懸濁した細胞を重層した。さらに2 mlの培養液をみたした。培地中のコラーゲン濃

度は0.05%, 0.1%, 0.2%(FCS-培地またはEGF-培地, 20 mM HEPES 緩衝液)とした。培養上清は3~4日毎に新しく交換した。

5. 組織学的観察

培養細胞はゲルごと10%ホルマリン液で固定し、パラフィン切片標本を作成しHematoxylin-Eosin(HE), Alcian blueおよびPeriodic acid-Schiff(PAS)染色をおこない光学顕微鏡下で観察した。

6. ゲル内細胞数の測定

ゲルを0.1%コラーゲナーゼおよびトリプシン液で処理したのち遠沈で細胞を集めSanfordらの方法¹¹⁾により0.1%クリスタルバイオレット(0.1%クエン酸中)中でホモゲナイズして染色された核数により推定した。

結 果

1) コラーゲンゲル内におけるDD762細胞の増殖

照射コラーゲンの細胞増殖に及ぼす影響および三次元培養に適したゲル濃度について調べた。細胞は樹立細胞株の乳癌細胞DD762を用いFCS-培地で培養した。1 kGy, 5 kGy, 10 kGyの各線量でγ線照射したコラーゲンをういて作成したゲル(0.1%)にシャーレ当たり1×10⁵の細胞を包埋培養し増殖様式を調べた(Fig. 1)。またゲル強度が細胞増殖に与える影響を検討するため5 kGy照射したコラーゲンをういて0.05%, 0.1%, 0.2%ゲル濃度での増殖様式についても調べた(Fig. 2, Photo 1)。Fig. 1, 2に示すように照射線量およびゲル濃度の違いによる増殖曲線の差はほとんど無く、分散後10日頃までは対数的に増殖しその後シャーレ当たり約2×10⁶細胞数で定常状態となった。しかしながら各々のゲル濃度中での細胞増殖の形態は異なっており、濃度0.2%における細胞は比較的密なクローンを形成し(Photo 1A)、濃度

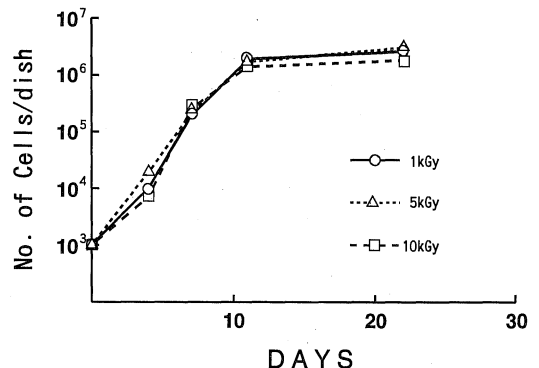


Fig. 1. Effect of gamma-ray irradiated collagen on the growth of DD762 cells (0.1% collagen gel).

0.1%では、細胞は良く伸びた樹枝状に増殖した(Photo 1 B). 濃度 0.05%では、ゲルの底に細胞が沈み平面的に増殖した(Photo 1 C). また照射線量の低い(1 kGy)ゲルでは高い(10 kGy)ゲルに比べ細胞は密なクローンを形成した. 1 kGy は滅菌線量としては不十分であり長期培養に用いるのに不相当と考えられ、一方 10 kGy 照射ではゲル化が不安定であったので、培養条件として 5 kGy 照射コラーゲンの 0.2%濃度がもっとも適当と考え、以後のゲル内培養実験はこの条件を採用した.

2) 無血清培地でのマウス乳癌細胞および正常細胞の培養

細胞を血清添加なしに培養することは薬剤などの効果を血清成分の影響から分離して調べる上で、また細胞の産生物質を調べるためにも有用である. そこで三次元培養における無血清培地での培養条件を検討した. FCS-培地による株化細胞の DD762 はプラスチックシャーレ上で石畳状に増殖したが(Photo 2A), EGF-培地ではプラスチック表面に付着しないで増殖した(Photo 2B). しかしコラーゲンゲル内培養では EGF-培地でも、FCS-培地(Photo 1)と同様に樹枝状に伸展する増殖像を示した. 増殖速度については FCS-培地での培養細胞が分散初期に対数的増殖を示しその後定常状態となるのに比べ、EGF-培地での培養細胞はやや遅い増殖速度を示した(Fig. 3).

つぎに正常細胞の三次元培養をマウス唾液腺と乳腺の細胞を用いて調べた. EGF-培地を用いた場合、培養後 2~3 日目に細胞は伸展し初め(Photo 4A) 6 日目頃から徐々に支持体であるゲルの収縮がおこりプラスチック面から離れて浮遊ゲル塊状となった(Photo 3). その後も培地交換をしながら培養を続けるとゲル内で塊状および管状構造が顕微鏡的に観察されるようになり(Photo 4B), このゲル内では Photo 4C に示されるように多数の構造が再構築されているのが観察され明瞭な管腔も認められた(Photo 4D). マウス乳腺細胞も唾液腺細胞と同様の経過をたどり Photo 5 にみられるような分泌物を有する管腔が再構築された. このように培養にともない明瞭な形態変化が観察されるが正常細胞では細胞数の増加は少なく 1 ヶ月経過後で約 5~8 倍であった(Fig. 4). EGF-培地を用いた培養では上述のような明瞭な管腔形成を再現したが、FCS-培地をもちいての乳腺細胞の培養では紡錘形の細胞がシャーレ面に多数伸展しゲル内では EGF-培地のような明瞭な管腔形成は観察されなかった. 管腔の再構築には EGF を添加した無血清培地が適していることが示されたのでこの条件を用いてヒトの細胞培養を試みた.

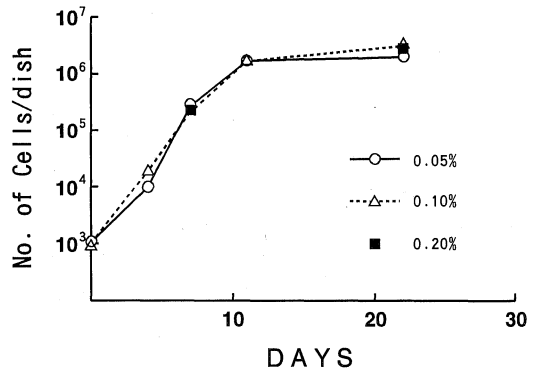


Fig. 2. Effect of gel concentration on the growth of DD762 cells (5kGy irradiated collagen).

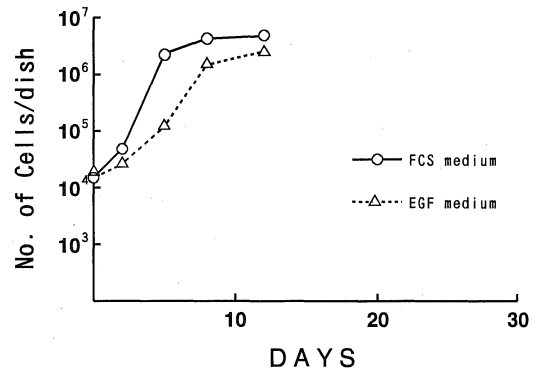


Fig. 3. Growth curve of DD762 cells cultured in collagen gel with 10% FCS supplemented medium and with serum free medium.

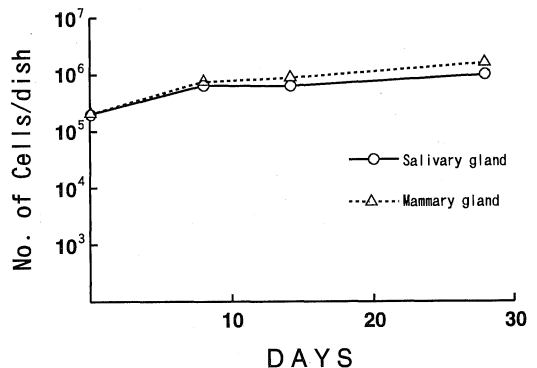


Fig. 4. Growth curve in collagen gel of normal cells derived from mammary glands and salivary glands of NIH Swiss mouse.

3) ヒト正常細胞の培養

形態的特徴の観察が容易な腺組織(顎下腺, 耳下腺, 乳腺, 甲状腺)の細胞の培養をおこなった. 各組織(Photo 6~9の各A)からコラゲナーゼ処理で得られた細胞はシャーレ当たり約 $5 \sim 10 \times 10^5$ 個の密度で培養を始めた. ヒト正常細胞でもマウス正常細胞と同様の培養経過をたどった. 細胞は初期にはゲル内に伸展して増殖し(Photo 6~9の各B), ゲルを収縮させた. そのゲル内形態を Photo 6~9のそれぞれCの写真で示した. 顎下腺および耳下腺細胞は約3~4週間で管腔形成が観察された(Photo 6C). 更に2~3カ月培養を続けると管腔およびその崩壊にともない細胞集団の多くはゲルの表面に移動し(Photo 7C)ゲル外への細胞放出も認められた. 乳腺細胞では8日間の培養ですでに管腔の再構築がみられた(Photo 8C)がそれらは維持されず1カ月後には管腔の崩れがめだつた. 甲状腺細胞はEGF-培地を用いた培養では管腔形成が大変未熟であった(Photo 9C). いずれの腺細胞も未熟ではあるが形態的に元の組織に類似した管腔を再構築した.

4) ヒト腫瘍細胞のゲル内培養

唾液腺, 乳腺, 甲状腺の各腫瘍組織(Photo 10~16の各A)からコラゲナーゼ処理で得られた細胞を正常細胞と同様に無血清培地で培養した. 培養初期のゲル内細胞の増殖形態を Photo 10~16のそれぞれBの写真で示し, 培養ゲル内の形態を Photo 10~16のCの写真で示した. 顎下部腺様嚢胞癌と乳腺の粘液癌細胞では正常細胞で観察されたような樹枝状の伸展は見られず, 外形的には球状の細胞コロニーを形成し増殖した(Photo 10B, 14B). またそのような球状形態をとらなかった細胞では正常細胞とはやや異なるがゲル内に伸展した形態を示した(Photo 11, 12, 13, 15, 16の各B). 顎下部腺様嚢胞癌の場合, 元の組織では腫瘍細胞は粘液の産生を伴って篩管状に増殖していたが(Photo 10A)そのゲル培養では充実性の細胞コロニーと Photo 10Cに示すような部分的に *in vivo* に似た篩管状形態が観察された. 他の腫瘍においても *in vivo* の特徴を示したゲル内培養像が観察された. 顎下腺多型腺腫(Photo 11A)の培養細胞による角化形成(Photo 11C), フルチン腫瘍(Photo 12A)の培養細胞による大型細胞の増生(Photo 12C), 耳下腺多型腺腫(Photo 13A)の培養細胞による芽状増殖および角化真珠形成(Photo 13C), 乳腺の粘液癌(Photo 14A)の培養細胞による小管腔形成と明らかな粘液産生(Photo 14C), 浸潤性乳管癌の乳頭腺管癌(Photo 15A)の培養細胞では部分的に形成された管腔に分化した乳頭状構築(Photo 15C)が認められた. 甲状腺の濾胞腺癌(Photo 16A)細胞

の培養は今回用いた条件では *in vivo* の組織像とやや異なっていた(Photo 16C). これらの結果は部分的ではあるが腫瘍細胞においても元の組織を反映した再構築が無血清培地を用いてのコラーゲンゲル内培養で可能であることを示し, このような形態は1~3カ月の長期間維持されることも確認された.

考 察

^{60}Co による γ 線照射滅菌したラット尾腱のコラーゲンが細胞培養の支持体として適しているか否かを種々の細胞のゲル内包埋培養による三次元増殖の状態により調べた. また細胞の組織再構築の可能性について検討した.

γ 線照射コラーゲンは線量により再溶解後のゲル化の割合が異なっていた. SDS-PAGE によるサブユニットの分析では10 kGy 以上照射した場合コラーゲン分子の部分崩壊が認められたこと, また10 kGy 照射0.2%濃度と1 kGy 照射0.1%濃度のゲル内で細胞を培養した場合形態学的に似た増殖像を示したことから照射の結果としてゲル強度の減少が生じたと推定された. 線量が1 kGy では滅菌条件としては不十分で長期培養に用いるのに不安があり, 10 kGy 照射コラーゲンのゲルでは強度の減少があるためゲル内培養条件として5 kGy 照射コラーゲン, 0.2%のゲル濃度が適当と推定された.

コラーゲンゲルによる三次元培養ではゲル濃度が細胞の増殖形態に影響することが報告されている^{12,13}. 今回標準として用いられた5 kGy 照射線量のコラーゲンでも0.05, 0.1, 0.2%ゲル濃度の増加に比例してゲル内で増殖する細胞集団が密なクローンを形成するのが観察された. 一方またゲル内の組織再構築には細胞増殖に伴いゲルを収縮, 浮遊させることが必要である¹⁴. 本実験に用いられたコラーゲンゲルでは細胞が樹枝状に伸展した場合自然に収縮, 浮遊が起こった. 乳腺や唾液腺の正常細胞では特に早く4~6日頃から収縮が始まり3 cm³のゲルは1カ月で約0.02 cm³に縮んだ. 今回の甲状腺の正常細胞は樹枝状伸展や収縮が弱く, 浮遊に約2カ月を要した. これらの違いについては採取した組織の状態(年齢など)によるのか, また培養時に組織特異的物質の添加が必要であるのかなど検討している. 一方悪性腫瘍組織の細胞では樹枝状に伸展しないものが多くゲル収縮が弱いか, ほとんど起こらなかった¹⁵. コラーゲンに対する接着性, 親和性が正常細胞と腫瘍細胞, 特に悪性腫瘍細胞において異なることが, そのゲル内の増殖形態の差の原因のひとつと考えられ, さらに臨床における腫瘍細胞の転移とも関連してくると推定される. このような形態的な差を客観的に評価する方法を確立すれば, 核異型度からの増

殖動態, 悪性度評価に加えて, 転移性についての客観的評価への一助としての利用が可能であると思われる。顎下腺細胞をゲル内培養し, 管腔形成を経時的に観察すると, 初期の収縮ゲル内では細胞は密に接触した充実性の塊状で存在し, その後管腔など構造形成がおこることがわかった¹⁰⁾。そして管腔形成時に, 分化した成人の正常唾液腺組織にはほとんど観察されない癌胎児性抗原の発現が観察され¹⁶⁾, この抗原が管腔形成に関与していることが示唆された。このことはゲル内培養系は細胞の分化や器官形成の実験の場となり得ることを示している。再構築した管腔内部は Alcian blue, PAS 染色でよく染まり, 分泌物の存在を示している¹⁷⁾。また抗パロチン抗体を用いた免疫組織染色法では管腔構成細胞が陽性反応を示し(未発表), 再構築した細胞が機能のある程度発現していると推定された。一方乳腺細胞の再構築管腔では今回は抗ラクトアルブミン抗体に対する染色像は観察されなかった(未発表)。無血清培地による培養では腺組織に形態学的には特徴のある管腔が形成されるが機能的には必ずしも十分でないと思われる。このことは細胞が分化し, 組織形成するためには組織特異的な成長因子やホルモンなどを必要とすることを示唆している。牛血清添加培地を使用した場合とくに乳腺では管腔形成が不明瞭であったことからこの種の研究には無血清培地でのゲル内培養系を用いることが必要であり, 今後各種物質の添加により機能を持った組織の再構築が期待される。以上のことから⁶⁰Coγ線照射した, ラット尾の腱のコラーゲンを用いてのゲル内培養は細胞の三次元培養に適しており, 主として腺組織の無血清培地における培養で比較的早く組織再構築が形成され, 生体細胞のホルモンや薬剤に対する影響や産生物質の研究, 組織分化や癌化などの研究にも有用性が期待される。また腫瘍細胞のゲル培養では in vivo に近い状態での薬剤感受性試験が可能であり今後臨床面への応用も期待される。

本論文の要旨は第 48 回(1989 年 10 月, 名古屋), 第 49 回(1990 年 7 月, 札幌)日本癌学会総会で発表した。また第 4 回日本動物実験代替法学会(1990 年 10 月, 和光)での発表でゴールデンプレゼンテーション賞を受賞した。

稿を終えるにあたり, 御指導と論文の御校閲をいただいた耳鼻咽喉科学教室松永 喬教授ならびに御校閲いただいた腫瘍病理学教室小西陽一教授, 口腔外科学教室杉村正仁教授に深謝いたします。また本研究に御協力下さった耳鼻咽喉科学教室宮原 裕助教授, 田中 治講師,

鈴木滋生大学院生をはじめとした教室の諸兄, 第 2 病理学教室今井俊介助教授, 大阪医科大学実験動物センターの森本純司講師に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Yang, S. and Nandi, S. : Int. Rev. Cytol. 81 : 249, 1983.
- 2) 榎並淳平, 榎並園子, 川村和男, 肥塚正博, 古閑陸好 : 組織培養 9 : 397, 1983.
- 3) Chen, J., Stucky, E. C. and Berry, C. L. : Br. J. Exp. Pathol. 66 : 551, 1985.
- 4) Yamamoto, R., Tatsuta, M., Nakamura, H., Terada, N., Matsusaka, T. and Tamura, H. : J. Clin. Electron Microscopy 20 : 63, 1987.
- 5) Freeman, A. E. and Hoffman, R. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. 83 : 2694, 1986
- 6) Montesano, R., Schaller, G. and Orci, L. : Cell 66 : 697, 1991.
- 7) Price, P. J. : Tissue culture association manual 1 : 43, 1975.
- 8) 岩井良昭 : 奈医誌. 32 : 168, 1981.
- 9) 榎並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 川村和男, 橋 陽一, 草間良恵, 古閑陸好 : 組織培養 13 : 26, 1987.
- 10) 榎並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 川村和男, 橋 陽一, 草間良恵, 古閑陸好 : 組織培養 13 : 64, 1987.
- 11) Sanford, K. K. : J. Natl. Cancer Inst. 11 : 773, 1951.
- 12) Enami, J., Koezuka, M., Hata, M., Enami, S. and Koga, M. : Dokkyo J. Med. Sci. 12 : 25, 1985.
- 13) Jones, W. and Hosick, H. L. : Cell. Biol. Int. Rep. 10 : 277, 1986.
- 14) Michalopoulos, G. and Pitot, H. C. : Exp. Cell Res. 94 : 70, 1975.
- 15) Suzumura, S., Imai, S., Morimoto, J., Haga, S., Tanaka, O., Miyahara, H., Matunaga, T., Iwai, Y. and Iwai, M. : Auris Nasus Larynx(Tokyo) 17 : 191, 1990.
- 16) Iwai, M., Iwai, Y., Suzumura, S., Miyahara, H., Imai, S. and Matsunaga, T. : In Vitro Cell. Dev. Biol. 27 : 759, 1991.
- 17) 鈴木滋生, 田中 治, 宮原 裕, 松永 喬, 鶴田至宏, 家根亘有, 今井俊介, 日浅義雄, 岩井良昭, 岩井峯子 : 日耳鼻. 93 : 1106, 1990.

Explanation of photos

- Photo 1. DD762 cells cultured in 0.2%(A), 0.1%(B)and 0.05%(C)collagen gel (2nd month).
- Photo 2. DD762 cells cultured in a plastic dish in 10% FCS supplemented medium(A)and in serum free medium (B).
- Photo 3. Shrunk and floating gel detached from the plastic surface of the dish (3.5 cm diameter).
- Photo 4. Growth of mouse salivary gland cells on the 4th day of embedded culture within a collagen gel(A) and structures observed in a floating gel on the 30th day of cultivation(B). Histologic section of the gel in Photo 4B shows tissue reconstruction(C, D).
- Photo 5. Histologic section of a culture gel of mouse mammary gland cells on the 30th day of cultivation.
- Photo 6. Original tissue(A)of human normal submandibular gland, growth of cells on the 2nd day of gel culture(B)and histologic section of a culture gel on the 22nd day(C).
- Photo 7. Original tissue(A)of human normal parotid gland, growth of cells on the 4th day of gel culture(B) and histologic section of culture gel on the 60th day(C).
- Photo 8. Original tissue(A)of human normal mammary gland, growth of cells on the 3rd day of gel culture(B) and histologic section of a culture gel on the 8th day(C).
- Photo 9. Original tissue(A)of human normal thyroid gland, growth of cells on the 11th day of gel culture(B) and histologic section of a culture gel on the 60th day(C).
- Photo 10. Original tissue(A)of adenoid cystic carcinoma of salivary glands, growth of cells on the 3rd day(B) and histologic section of a culture gel on the 22nd day(C).
- Photo 11. Original tissue(A)of the pleomorphic adenoma of a submandibular gland, growth of cells on the 17th day of gel culture(B)and histologic section of a culture gel on the 90th day(C).
- Photo 12. Original tissue(A)of Warthin's tumor, growth of cells on the 4th day of gel culture(B)and histologic section of a culture gel on the 60th day(C).
- Photo 13. Original tissue(A)of the pleomorphic adenoma of a parotid gland, growth of cells on the 2nd day of gel culture(B)and histologic section of a culture gel on the 60th day(C).
- Photo 14. Original tissue(A)of a mucinous carcinoma of the breast, growth of cells on the 6th day of gel culture (B)and histologic section of a culture gel on the 60th day(C).
- Photo 15. Original tissue(A)of a papillotubular carcinoma of the breast, growth of cells on the 3rd day of gel culture(B)and histologic section of a culture gel on the 8th day(C).
- Photo 16. Original tissue(A)of a follicular adenoma of the thyroid, growth of cells on the 24th day of gel culture(B)and histologic section of a culture gel on the 60th day(C).

