

頭頸部領域を中心としたヒト正常及び 腫瘍細胞の三次元培養による 組織再構築の研究

奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

鈴木 滋生

TISSUE RECONSTRUCTION OF HUMAN NORMAL AND TUMOR CELLS MAINLY FROM THE HEAD AND NECK REGION USING THREE-DIMENSIONAL CULTURE

SHIGEO SUZUMURA

Department of Otolaryngology, Nara Medical University

Received July 6, 1992

Summary: Three-dimensional culture was performed using gamma-irradiated type I collagen gel prepared from rat tail tendon. The morphological outgrowing appearance with in type I collagen gel provided a marked difference in accordance with histopathological diagnosis, subsequently suggesting the difference in adhesion ability to type I collagen. On the other hand, type I collagen may be involved in differentiation-related proteins expressed during *in vitro* morphogenesis, such as carcinoembryonic antigen for tubulogenesis of the salivary gland.

The present experiment system would be useful for studying further the relation between type I collagen matrix and metastatic potentiality and/or cellular differentiation.

Index Terms

type I collagen, three dimensional culture, salivary gland, tissue reconstruction

緒 言

上皮細胞は常にI型コラーゲンマトリックスを中心とした間質の細胞外マトリックスと相互に作用し、その結果組織の構築や再生をおこなっていく¹⁾²⁾。我々は、γ線照射により物理的条件を修飾したコラーゲンゲルを用いて3次元培養を施行し、正常唾液腺組織¹⁾や頭頸部腫瘍組織²⁾の*in vitro*での形態観察を報告した。またこの培養系を用いて癌胎児性抗原(以下CEA)が*in vitro*で正常の唾液腺にも発現することを予備的に報告し³⁾、さらに経時的観察によりそれが唾液腺の分化マーカーの一つになることも確かめている⁴⁾。今回この実験方法を用いて、頭頸部に加え頭頸部以外の各種正常および腫瘍組織の初

代培養、および7つの細胞株について3次元培養を試み、上皮細胞のコラーゲンゲル内形態形成と悪性度との相互関係について形態学的検討を行った。また唾液腺分化モデルについては免疫組織化学的、電子顕微鏡的ならびに*in situ* hybridizationによる検索を行い、腺管形成という唾液腺分化過程とコラーゲンゲル内でのCEA関連抗原発現との相関について検討し、転移と分化の両面において関連する細胞外マトリックス研究に対してこの実験系が有用であることを確かめたのでその結果について報告する。

実験方法

1. 三次元培養に用いたγ線照射コラーゲン

Table 1. Collagen gel preparation

- 1) pulling out and dissection of mature rat-tail tendon
- 2) washing with distilled water for 30 min
- 3) solubilizing 1 gram tendon into 1,000 ml of acetic acid
acetic acid : distilled water = 1 : 300 (v/v)
- 4) overnight solubilization with constant mixing at 4°C
- 5) discarding ppt by centrifugation at 10,000g for 60 min at 4°C
- 6) lyophilization
- 7) sterilization with ⁶⁰Co gamma-ray irradiation at 5KGy
- 8) solubilization with 10⁻³NHCl

(1) γ線照射コラーゲンの作成とゲルマトリックスの調製 (Table 1)

照射コラーゲンの作成方法は、Price⁵⁾や Jones⁶⁾の方法を一部変法したもので、照射線量と最終ゲル濃度調整は、岩井の報告に従って 5 KGy, 0.2%を用いた⁷⁾。

(2) コラーゲンゲル包埋培養法

研究対象としての培養材料は手術時に得られた腫瘍組織 22 例と非腫瘍組織 17 例の計 39 例、そして細胞株 7 例である (Table 2 a, b)。

手術材料については、術中に無菌状態で得られた組織を細切後、コラゲナーゼ(新田ゼラチン社製)を 0.1%含む培養液 (Dulbecco-MEM)に浸し、一晚インキュベート

Table 2. Cultured Tissues(a) and cell-lines(b)

a)

Site	Histopathological Diagnosis	Number
Parotid Gland	Normal Tissue	9
	Pleomorphic Adenoma	6
	Warthin Tumor	1
	Pleomorphic Adenocarcinoma	1
	Adenoid cystic carcinoma	1
Maxillary Submandibular Gland	Squamous Cell Carcinoma	2
	Normal Tissue	4
Hypopharynx Larynx	Pleomorphic Adenoma	1
	Adenoid Cystic Carcinoma	2
	Squamous Cell Carcinoma	2
Thyroid Gland	Papilloma	1
	Squamous Cell Carcinoma	1
	Normal Tissue (Including Grave's Disease)	2
Mammary Gland	Papillary Adenoma	1
	Papillary Adenocarcinoma	2
	Normal Tissue	1
Pancreas	Cystadenocarcinoma	1
	Normal Tissue	1

b)

Line	Origin	Pathological Diagnosis	Character	Reference
NS-3	Stomach	Poorly Differentiated Adenocarcinoma	Alphafetoprotein Production	(30)
NS-8	Stomach	Poorly Differentiated Adenocarcinoma	CEA Production	(31)
SHIN-3	Ovary	Serous Cystadenocarcinoma	CEA & Mucin Production	(32)
Colo-205	Colon	Differentiated Adenocarcinoma	CEA Production	(13)
HUH-7	Liver	Hepatic Cell Carcinoma	Biliary Glyco-Protein Production	(16)
JYG	Mammary (mouse)	Poorly Differentiated Adenocarcinoma	Virus Induced, Metastatic Potential (++)	(9)
DD-762	Mammary (mouse)	Poorly Differentiated Adenocarcinoma	Virus Induced, Metastatic Potential (+/-)	(10)

(37°C, 5% CO₂)した。翌日低速遠心で細胞を集め、リン酸緩衝液で2回洗浄を繰り返し上清の不要浮遊物を除去した後、パーコール液(Pharmacia製)を用いて2500 rpmで20分間遠心操作を施行して、組織の破片や赤血球等の分離に努めた。パーコール液の細胞の集まっている液層をピペットでゆっくりと吸引し再びリン酸緩衝液で洗浄し、1000 rpmで5分間低速遠心分離を2回施行した。最後に培養液で同様の操作を施行したあと上清を取り除き、沈殿している細胞を培養液を含む氷冷中のゲル状コラーゲンの中に包埋分散した。

細胞株は上記操作を省略してトリプシン処理後、維持培養液で3-4回洗浄し、同様に遠心操作の後、沈殿した細胞を培養液を含む氷冷中のゲル状コラーゲンの中に包埋分散した。

それぞれの培養細胞は1.0 ml/dishの割合であらかじめコーティングしておいたコラーゲンゲルのbase layerの上にcell containing layerとして2.0 ml/dishの割合で重層した(Fig. 1)。30分間インキュベーター(37°C, 5% CO₂)に静置し、ゲルが固まってから、維持培養液をover layerとして2.0 ml/dishの割合で加えた。培養デッシュはコーニング社製の径35 mmを用い、コラーゲン濃度は0.2%とした。維持培養液の交換は3日毎に施行した。なお維持培養液には、D-MEM+HAMの1:

1 (V/V)を基礎培養液にして、5 mg/ml bovine serum albumin(BSA, Sigma), 5 ng/ml epidermal growth factor(EGF, 宝酒造社製)および10 μg/ml インシュリンを添加した無血清培地とした。

感染予防のためにストレプトマイシン100 μg/ml ペニシリンG 100 U/mlを培地に添加したが、特に感染が予想される時にはさらにミノサイクリン1 μg/mlとファンギゾン5 μg/mlも添加した。

2. 転移性とゲル内形態との関係についての観察方法

(1) 培養細胞の形態観察

初代培養2週間目に倒立位相差顕微鏡(オリンパスCK-2型)を用いて、細胞の増殖状態について観察をした。すなわちゲル内の細胞増殖形態について、無作為にクラスターを抽出し、Montesanoの分類⁸⁾に従って

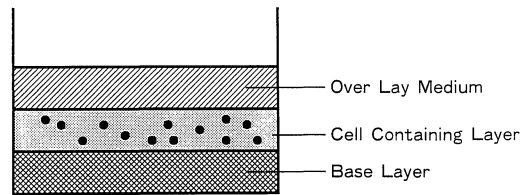


Fig. 1. Schematic diagram of gel embedding culture system.

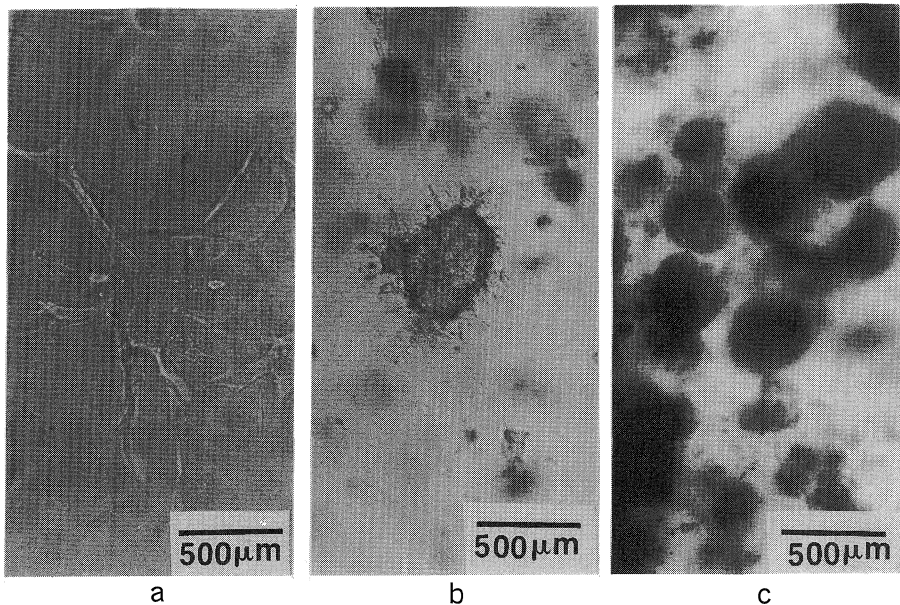


Fig. 2. Three-types of typical outgrowing appearance. a) branching (normal parotid gland tissue), b) spiny cystic (normal thyroid gland tissue), c) smooth cystic (adenoid cystic carcinoma in submandibular gland). Observation by phase-contrast microscopy.

branching, spiny cystic およびその中間型と考えられる smooth cystic の3タイプ(Fig. 2a, b, c)に分けて検討し、各サンプルの増殖形態を対して最も多いクラスタータイプで判定分類し、病理学的悪性度とゲル内増殖形態について比較検討した。

(2) ゲル内形態と各種細胞外マトリックス接着性との関係の観察

培養細胞のI型コラーゲンゲル内形態とフィブロネクチン接着性との関係を調べるため2つのマウス乳癌細胞株(Table 2b)すなわちin vivoで高転移能を示すJYG⁹, in vivoで低転移能であるDD 762¹⁰および細胞の対照として正常マウス乳腺組織を用いて検討した。トリプシン処理によって得られた 2×10^5 個のそれら細胞株を、リン酸緩衝液で25 μ g/mlに希釈したヒトフィブロネクチン(岩城硝子)上に撒き、D-MEM培養液を加えて90分間あるいは24時間37°Cでインキュベートした。その後リン酸緩衝液で洗浄操作で数回施行し、接着細胞数をトリプシン処理し、サイトメトリーを用いて測定した。

また各種細胞外マトリックスとの接着性を比較するため、25 μ g/mlのマウスラミニン(岩城硝子)およびIV型コラーゲン(岩城硝子)を用いて、90分間のインキュベーション後、同様操作を施行した。そして細胞外マトリックス以外の対照として、25 μ g/mlのBovine Serum Albumin(BSA, Sigma)でコーティングしたものに対して同様操作を施行した。

3. I型コラーゲンマトリックス内での唾液腺細胞分化の観察方法

(1) 唾液腺細胞分化の免疫組織化学的検討

培養液中からゲル標本を取り出し、パラフィンによる永久標本作成のあと、ABC法(アビジンビオチン、ペルオキシダーゼキット, Bectastin社)による免疫染色を施行した。各一次抗体の「希釈濃度, 反応時間」は、MEB-011(抗CEAマウスモノクローナル抗体, Biotest社)が「500倍, 30分」, anti-human CEA, Alpha-Fetoprotein(AFP, ラビットポリクローナル抗体, Lipshaw社)が「1000倍, overnight」, 抗唾液腺ホルモン抗体(マウスポリクローナル, 自家作成¹¹)が「1000倍, overnight」であった。そして発色剤としてDiaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)を用いた。

なおMEB-011を用いた免疫染色においては、非特異的染色性のない標本において、一定の染色態度を呈した所見を正常唾液腺細胞のCEA関連抗原発現にとりして採用した。そして発現の強さを、著明に褐色に染色されたもの(distinct(++)), 薄いながらも明らかに染色性を認めるもの(moderate(+)), 100倍視野においてわずかに染色傾

向を示す細胞を有するもの(slightly(+/-)), 同視野において染色傾向を示す細胞がないもの(negative(-))に分類して判定した。

(2) 電子顕微鏡的観察

ゲル標本の一部を0.1Mカコジル酸緩衝液中2.5%グルタルアルデヒド液で前固定、さらに2%オスミウム酸で後固定した。固定標本は、脱水後エポキシ包埋し、超薄切片作成後透過型電子顕微鏡(JEM-1200)で観察した。また一部は脱水操作の後、臨界点乾燥および金属蒸着処理を施して、走査型電顕(S-405)で観察した。

(3) CEA関連抗原の分析

a) CEA関連抗原の免疫電気泳動

培養初期(7日目)と後期(28日目)の培養唾液腺細胞を含むゲルサンプル抽出物に対して、Western blottingを施行した。すなわちゲルサンプルをホモジナイズした後、5%DTTを加え、100°C, 5分間処理を施した。その後8%ランニングゲルを用いて分子量により泳動分離した。さらに30V, 12時間でニトロセルロース膜へ転写し、MEB-011抗体を用いて免疫ペルオキシダーゼ法でDAB呈色反応を施行した。またプレステインド分子量マーカーとしてミオシン, β -ガラクトシダーゼ, BSA, オヴァルミンおよびカルボニックアンヒドラーゼを用いた。

b) in situ hybridizationによるCEA同定

培養ゲルのクリオスタット凍結切片に対してin situ hybridizationをSingerらの方法¹²を一部変法して施行した¹³。内因性アルカリフォスファターゼ活性の除去にはJensenらの方法¹⁴に準じて0.01M MgCl₂で30分間処理した。プローブとしては、CEAの特異的cDNAであるCEA 3'-untranslated regionのRsa I/EcoR I断片0.39Kb(札幌医大第一内科学教室, 東出俊之博士より供与)を用いたランダムプライマー法でピオチン標識dUTP(Bethesda Research laboratories)を取り込ませた。また同定方法としてはFeinbergら¹⁵のnon-isotopic methodに従って、プローブ上のその標識ピオチンにストレプトアビジン(Boehringer)1 μ g/ml, ピオチン化アルカリフォスファターゼ(Vector laboratories)1 U/ml, ニトロブルーテトラゾリウム(Sigma)0.33 mg/ml, 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート(Sigma)0.17 mg/mlの混合溶液を用いて発色した。核染色にはファストレッドを用いた。また産物の免疫組織化学的検索として、NCAと交差しないモノクローナル抗体MA 208¹⁶を用いて同じ凍結切片を用いてABC法で検討した。

結 果

1) 培養細胞増殖形態と転移性

(1) ゲル内増殖形態と悪性度

初代培養においては、branching 型の増殖形態は正常細胞で 15 例中 14 例、良性腫瘍細胞で 7 例中 6 例に認められた。それに対して悪性腫瘍細胞は増殖を示さないものが 12 例中 4 例もあり、branching 型の増殖形態も 8 例中 1 例しか認めなかった。そして悪性腫瘍細胞は smooth cystic 型の増殖形態を 8 例中 4 例に認め、正常および良性腫瘍細胞に比して有意 ($p < 0.01$) に branching 型の増殖形態が少なかった (Table 3)。ところが同じ悪性腫瘍由来でも細胞株においては branching 型の増殖形態を 7 例中 5 例に認めた ($p < 0.05$)。

(2) ゲル内増殖形態と各種細胞マトリックス接着性

乳癌細胞株 DD 762 と JYG について検討した結果、I 型コラーゲンに対して branching 型の増殖を示す DD 762 の接着細胞数が、smooth cystic 型の増殖形態を示す JYG のそれよりも 90 分で 4 倍、24 時間で 36 倍多く、フィブロネクチンに対して接着性の高い傾向を認めた (Fig. 3 a, b, 4 a)。また BSA に比してフィブロネクチンと I V 型コラーゲンには、両細胞株ともに接着性が高い傾向を認めたが、ラミニンについては BSA に比して接着性の差を認めなかった (Fig. 4 b)。

2. 培養唾液腺細胞の分化と細胞マトリックス

(1) 唾液腺細胞のゲル内での腺管形成

正常唾液腺細胞は branching 型の増殖形態を示し (Fig. 5 a)、形成された腺管ではムチン分泌や唾液腺ホ

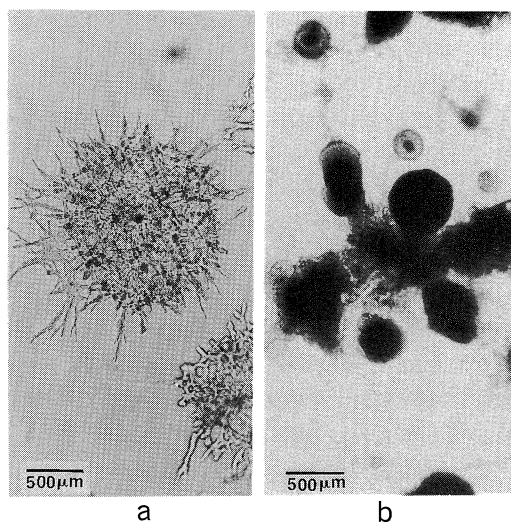


Fig. 3. Morphological difference between the 2 cell-lines within the gel.

DD/762 showed branching outgrowth (a), but JYG-MC showed smooth cystic outgrowth (b). Phase-contrast microscopy

Table 3. The relation between histopathological malignancy and outgrowing appearance within the gel

	Normal Epithelial Cells	Benign Tumor Cells	Malignant Tumor Cells	Malignant Tumor Cell Line
Branching	14*(13)	6*(6)	* 1**(1)	5**(0)
Spiny Cystic	1 (0)	1 (0)	3 (0)	1 (0)
Smooth Cystic	0 (0)	0 (0)	4 (1)	1 (0)
Total Number of Growth Cells	15 (13)	7 (6)	8 (2)	7 (0)
No Growth	2 (0)	3 (2)	4 (2)	0 (0)
Total Number of Cultured Cells	17 (13)	10 (8)	12 (4)	7 (0)

Parenthesis indicates the case number of salivary gland tissue samples. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$

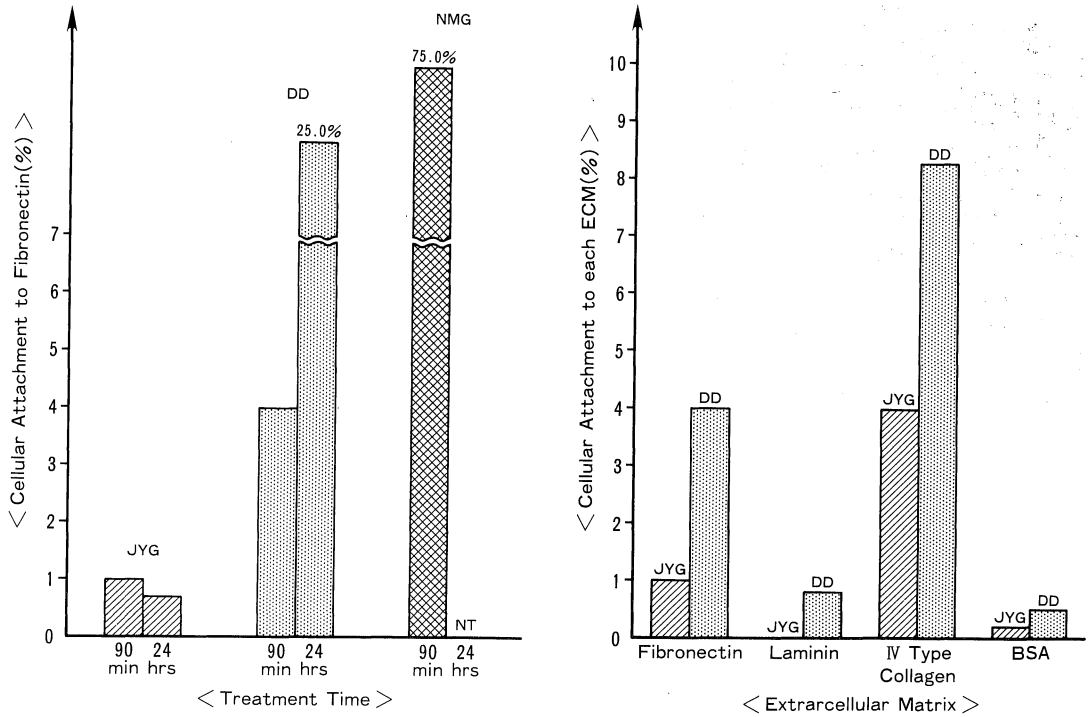


Fig. 4. The outgrowing appearance and cellular attachment to each extracellular matrix. The concentration of each extracellular matrix and BSA was 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (a, b), and treatment time was 90 minutes(b).
 NT : not tested
 ECM : extracellular matrix
 NMG : normal mammary gland

Table 4. Ducts formation and CEA families expression in cultured cells of normal salivary glands.

Anti-CEA Immunostaining		Ducts Formation		
		distinct (n=4)	moderate (n=6)	seldom (n=3)
intensively positive	(#)	4	1	0
moderately positive	(+)	0	2	0
slightly positive	(±)	0	3	1
negative	(-)	0	0	2

Thirteen specimens of normal salivary glands showing branching outgrowth were classified according to the number of formed ducts. CEA families expression was subjected using anti-CEA antibodies (MEA-011). An example of positive staining is shown in Fig. 6a.

*distinct : more than 10 ducts in $\times 100$ light microscopic area.

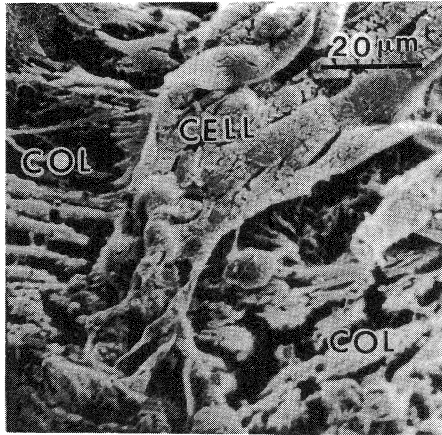
**moderate : a few ducts less than 10 ducts in $\times 100$ light microscopic area.

ルモン産生を組織化学的に認めた(Fig. 5 b, c). 透過型電顕による観察では, 細胞の剝離および分解による空間の形成および微絨毛の存在を認めた(Fig. 6).

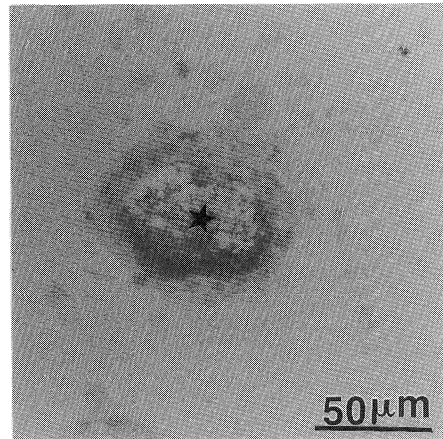
(2) in vitro 腺管形成と抗 CEA 染色率の相関

その培養標本 13 例中, 腺管形成が多数見られたのは 4

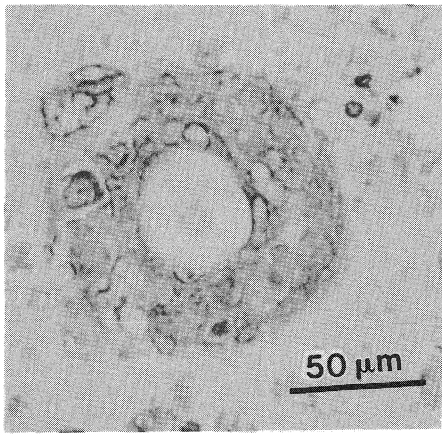
例で, 殆ど見られなかったものも 3 例認め, 多数の腺管を形成したサンプル 4 例は全例とも CEA 抗体に対して濃染傾向を示した(Table 4). CEA 関連抗原と腺管形成との関係において例数が少ないため統計的な有意さは出せなかったが相関傾向を認めた(Table 4).



a



c



b

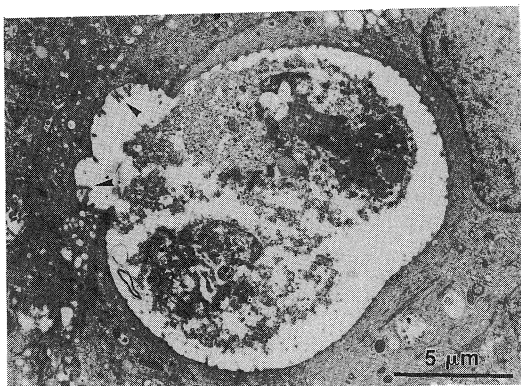


Fig. 6. Ultrastructural observation of lumen formation.

Duct space was formed by cellular elimination and microvilli were observed on the cell surface (arrowheads) from the same sample of Fig 7a.

Fig. 5. In vitro differentiation of human submandibular gland.

Normal submandibular gland cells showed branching outgrowth within the collagen fibers after 7 days of primary culture (a). As for submandibular gland cells, mucinous substance was observed in the lumen (b), salivary hormone was only in the formed cells (c) after 4 weeks of primary culture.

a) : Scanning electron microscopy

b) : Alcian blue staining (Nuclei were stained with hematoxylin.)

c) Immunostaining with anti-salivary hormone polyclonal antibody (Counter staining was performed with methylgreen.)

抗体陽性部位は一部コラーゲンとの接点でも陽性を示すが(Fig. 7), 主にクラスター内部の細胞であった(Fig. 7 a, 7 c). それに対して対照として用いた CEA 産生細胞株 SHIN-III (Table 2 b) は, 部位特異性がなく全ての細胞において濃染傾向を認めた(Fig. 7 b). 正常唾液腺細胞において, CEA 関連抗原はモノクローナル抗体, ポリクローナル抗体に陽性であるが同じ分化関連蛋白である AFP についてはポリクローナル抗体でも陰性であった(Fig. 7 c, d).

(3) CEA 関連抗原の同定

免疫電気泳動による分子量からの検討で, 培養前期(1週目)では, 関連蛋白である BGP (M. W. 80-100 KDa) がその分子量から示唆された(Fig. 8(1)). それに対し培養後期(4週目)では, いわゆる CEA (M. W. 180-200 KDa) の出現および Biliary Glycoprotein (BGP) の存在が考えられた(Fig. 8(2)). また in situ hybridization およびその産物の組織化学的検索からも CEA 特異的 cDNA の分布をクラスターにおいて認めた(Fig. 9 a, b).

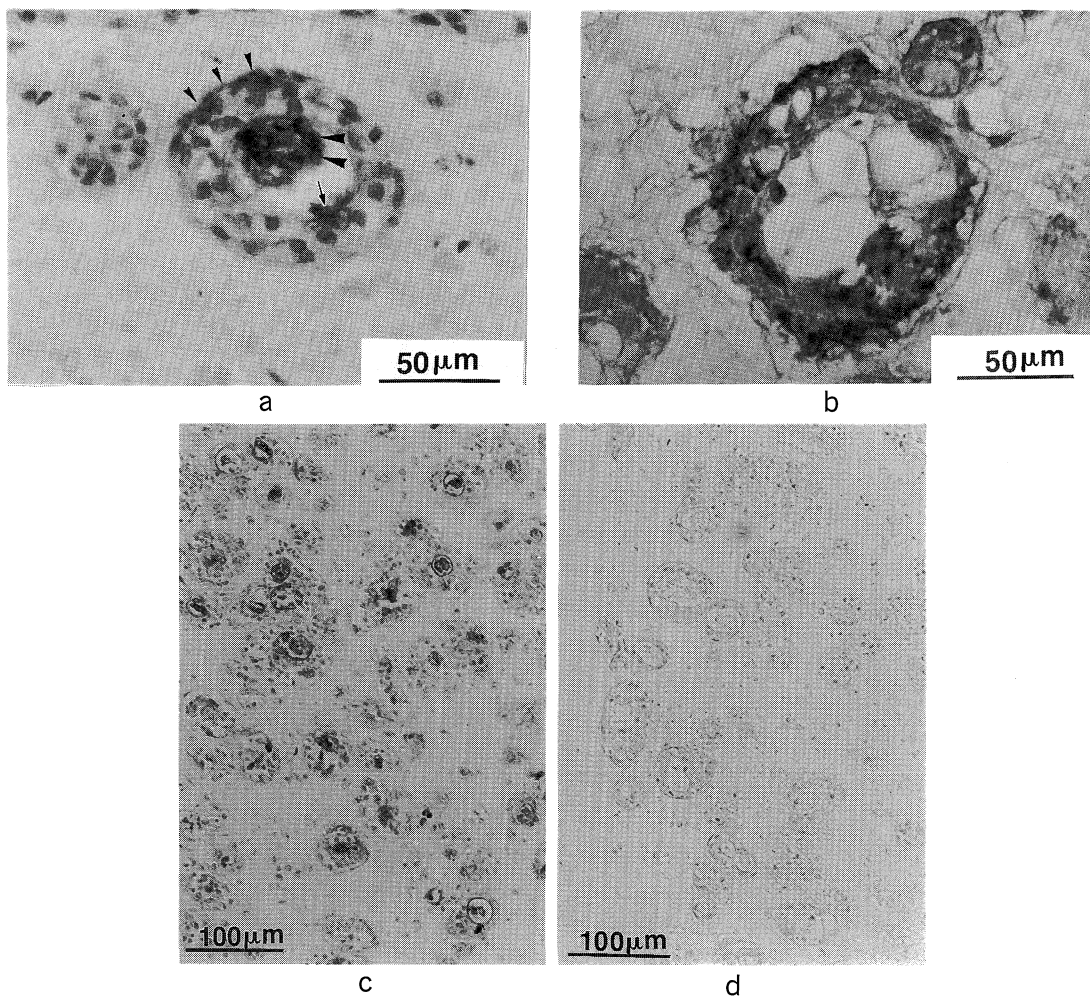


Fig. 7. In vitro differentiation and CEA families expression.

- a) Anti-human CEA monoclonal antibody (MEA-011, Biotest) was positive in the cells in the lumen (large arrowheads), cell onto the lumen (small arrowheads) and some cells adjacent to the collagen (arrow).
- b) Positive control for Fig. 6a. CEA was positive in all ovarian cancer cells (SHIN-3).
- c) Anti-human CEA polyclonal antibody (Lipshaw) was also positive in the cells in the lumen and on the glycocalyx of the lumen forming cells.
- d) Anti-human AFP polyclonal antibody (Lipshaw) as a negative control for Fig. 6b.
- a) c) d) : The same samples obtained from a 14-year-old submandibular gland
- b) : See Table 2b.

考 察

1. ゲル内増殖形態と転移性との関係について

正常上皮細胞は、接着依存性細胞(anchorage-dependent cells)として、I型コラーゲンマトリックスを中心とした骨格蛋白と接着し、それを物理的支柱にして branching 型の増殖形態を規定しようとする¹⁷⁾。現在の

ところ形態形成に関与した上皮細胞とI型コラーゲンとの接合モデルとして、接着蛋白であるフィブロネクチンを介して、細胞内骨格系と接合したインテグリン部分でそれと結合するという見方が有力である^{18),19)}。いわゆる smooth cystic 型は何等かの理由で細胞骨格であるI型コラーゲンと接着できなかつたため、個々の細胞が形態形成できず球形状構造になった可能性が高いと考える。

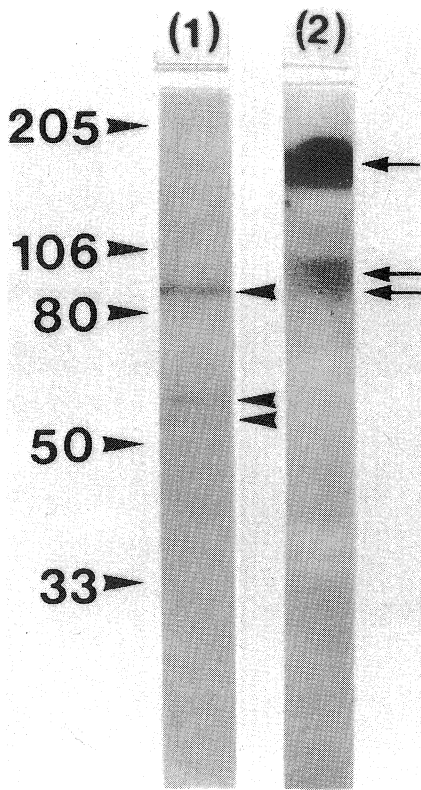


Fig. 8. Immunoelectrophoresis.

- 1) 7 days after primary culture.
 - 2) 4 weeks after primary culture.
- 1), 2) : The same sample as Fig 6.
Anti-CEA monoclonal antibody (MEB-011, Biotest) was used as 1st antibody.

乳癌細胞株 DD 762 と JYG を用いた予備的実験では branching 型の増殖パターンを示す DD 762 が上皮細胞の形態保持とも関係があるフィブロネクチン²⁰⁾との接着性が JYG に比べて高く、またコントロールとして用いた BSA よりもフィブロネクチンが接着性が高いという本研究の結果により、少なくとも接着性の影響が示唆された。またゲル内で smooth cystic な増殖形態をとっていた JYG が *in vivo* でも DD 762 に比べて転移性が高いという事実は、両細胞株においてゲル内形態の違いが細胞骨格への接着力の違い、ひいては *in vivo* 転移性とも関係がある可能性と矛盾しない。

初代培養においても一般に転移性があるとされる悪性腫瘍細胞は転移性がないとされる良性腫瘍および正常細胞に比べて有意に branching タイプの増殖形態が少なかった。これは I 型コラーゲンへの接着性への低さ、言い換えれば細胞の易移動性とも関係してくる接着依存性の低さを示唆するものである。*in vivo* での転移性の有無と I 型コラーゲンゲル内形態の差異についてさらに高い相関関係を見いだせれば、今後ある腫瘍細胞の潜在的悪性度を推測するにあたり、核異型性や N/C 比等に加え、新しい簡易定性システムを確立できる可能性を示唆する。

また細胞株は悪性腫瘍から継代樹立したものであるのかにかかわらず、7 例中 5 例が樹枝状増殖を示し、初代培養の悪性腫瘍細胞と異なる増殖形態になった。この実験結果は、細胞株が必ずしもそのオリジナルの特性を保持するものとは限らないことを示すとともに、逆に継代により正常に近い形質に戻っている可能性も示唆しており興味深い。

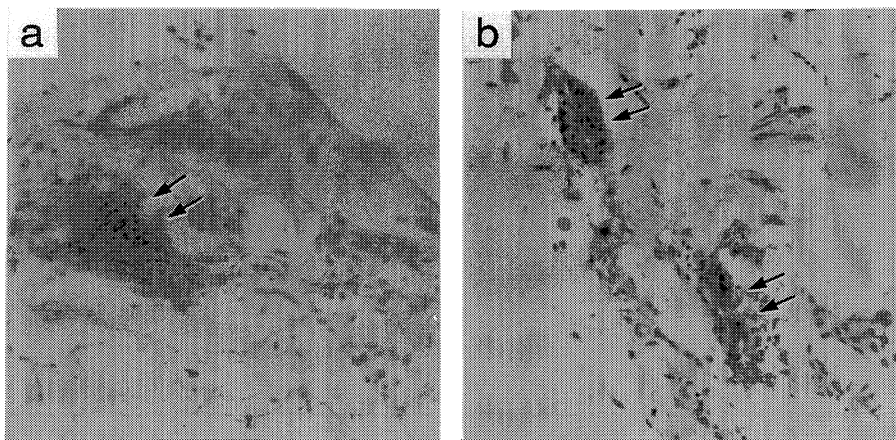


Fig. 9. Detection of CEA specific mRNA and its product.

The mRNA (a : arrows) and the product (b : arrows) were identified on the cryostat sections obtained from the same sample. The sample was parotid gland cells at 3 weeks after primary culture.

なお近年、RGD(Arg-Gly-Asp)というトリペプチドを特異的に認識する $\alpha_5\beta_1$ というインテグリンサブクラスと転移性との関係が注目されている²¹⁾²²⁾。RGD 認識受容体については転移との関係が問題になるビトロネクチンについてもその細胞表面の特異的結合部位が既に報告されており²³⁾、この細胞外マトリックス中に存在するトリペプチドの認識受容体と I 型コラーゲンゲル内形態の相関を調べることが今後の研究課題の 1 つであろう。

2. 唾液腺分化と I 型コラーゲンマトリックスについて

正常唾液腺細胞は、この実験系の中で I 型コラーゲンマトリックスと接着して樹枝状の増殖形態を示し、腺管を形成していくといったような形態的分化をある程度まで再現していく²⁾。今回の研究で樹枝状増殖は正常唾液腺由来培養標本全例にみられ、中でも CEA 関連抗原を強く発現した標本に腺管形成が多数みられた。

CEA とその関連抗原を区別しうる特異的抗体は現時点では作成されていない。しかしウエスタンブロッティングによる分子量同定および CEA 特異的 cDNA を用いた in situ hybridization の結果から今回用いた抗体に反応する物質は CEA であることが強く示唆された(Fig. 8, 9)。正常唾液腺組織が CEA 関連抗原を産生しているという報告は正常顎下腺組織について BFP フラグメントが近年報告されているのみ²⁴⁾であり、分化モデルをつくり CEA 関連抗原を検討した報告は未だ無い。下部消化管である正常成人の大腸粘膜上皮細胞が癌細胞と同様に CEA を活発に産生しているが癌細胞と細胞内の代謝経路が異なるため検索され難いだけであるという報告が近年なされている²⁵⁾。大腸において CEA の発現は分化に関係しているという報告も大腸癌の細胞株を用いた研究から近年なされている²⁶⁾。乳腺についても分化との関係を現在検索中である²⁷⁾。

一方、近年 CEA が I 型コラーゲンの RGD 部位を認識する受容体のサブユニットであるという報告が大腸癌の細胞株を用いた研究でなされた²⁸⁾。唾液腺の分化過程においてコラーゲンとの接触のないクラスター内部の細胞の細胞質内で CEA が豊富に認められ、その細胞が剝離、分解した空間が腺管になる報告⁴⁾およびコラーゲンゲル培養における唾液腺細胞の CEA 産生動態についての報告³⁾はそのサブユニット説と矛盾しない。いずれにしてもサブユニット説の提唱通りこの CEA という胎生期蛋白の発現も RGD と関係があれば、それは転移、分化の研究はさらに重要性を増すことであろう。

CEA の腺管形成への機能的意義については不明であり、過剰産生された CEA は本来の細胞間を接着させる

作用よりもむしろ接着性を弱める作用があるのではないかという報告もある²⁹⁾。この点について現在我々は CEA の cDNA をトランスフェクタントさせた細胞(札幌医科大学第 1 内科杉山敏郎博士より供与)を用いて検討中である。

いずれにしても本培養システムは in vivo に近い形態の変化を観察するのに有用であり⁸⁾¹¹⁾、様々なクローニングされた遺伝子のトランスフェクタント細胞を用いた純粋な実験系が重要であることは上述の通りであるが、この実験系がそういった転移と分化に関係する様々な研究にたいする補助的データの提供に役立つものであると考える。

結 語

1. γ 線照射 I 型コラーゲンゲルを用い、各種手術材料、細胞株に対して三次元培養を施行し、形態学的研究を中心に転移および分化と I 型コラーゲンマトリックスの関係について検討した。

2. 初代培養においては、正常および良性腫瘍細胞は branching 型の増殖形態を認めるものがほとんどで、悪性腫瘍細胞は smooth cystic 型の増殖形態を半数に認め、branching 型の増殖形態は正常および良性腫瘍細胞に比して有意に少なかった。

3. 13 例全例において branching 型の増殖形態を示した正常唾液腺細胞において腺管構築がみられないものもあったが、抗 CEA 抗体に濃染傾向を示したサンプル 4 例は全例とも多数の腺管構築を認めた。

4. 転移および分化の研究のため上皮細胞と I 型コラーゲンマトリックスの相互関係を追求する補助的実験システムとしてこの培養系は有用である。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲をいただいた恩師松永 喬教授に深甚の謝意をさげます。また論文作成にあたりご指導いただきました奈良県立医科大学第 2 病理学教室日浅義雄教授、同皮膚科学教室白井利彦教授に深謝いたします。そして本研究を遂行するにあたり終始温情あふれるご指導を賜りました大阪府立大学附属研究所応用生体科学部門生体利用工学教室岩井良昭講師、岩井峯子講師および研究にご協力ご指導頂きました宮原裕助教授をはじめ奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室諸姉に心より感謝いたします。なお本研究の一部は文部省がん特別研究 I I (04152104, 杉山)の補助による。また本研究の発展のための経済的援助を受けたオランダ政府文部省に感謝いたします。本研究の要旨は第 14 回日本頭頸部腫瘍学会、第 4 回日本口腔咽喉頭学会及び第 93 回

日本耳鼻咽喉科学会総会で発表した。

文 献

- 1) 鈴村滋生, 田中 治, 宮原 裕, 松永 喬, 鶴田至宏, 家根且有, 今井俊介, 日浅義雄, 岩井良昭, 岩井峯子: 照射コラーゲンゲル包埋法によるヒト唾液腺組織の3次元培養. 日耳鼻. 93: 1107, 1990.
- 2) Suzumura, S., Imai, S., Morimoto, J., Haga, S., Tanaka, O., Miyahara, H., Matsunaga, T., Iwai, M. and Iwai, Y.: Morphological study of normal and tumor cells in the head and neck region using irradiated collagen gel embedding technique. *Auris Nasus Larynx*(Tokyo)17: 191, 1990.
- 3) Iwai, M., Iwai, Y., Suzumura, S., Miyahara, H., Imai, S. and Matsunaga, T.: Production of carcinoembryonic antigen-related antigen derived from normal human salivary gland cells in collagen gel culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27: 759, 1991.
- 4) Suzumura, S., Iwai, M., Iwai, Y., Higashide, T., Sugiyama, T., Imai, S., Miyahara, H., Matsunaga, T. and Yachi, A.: Carcinoembryonic antigen as a differentiation marker of human salivary gland. *Tumor Biol.* submitted.
- 5) Price, P. J.: Preparation and use of rat tail collagen. *Tissue Culture Association Manual* 1: 43, 1975.
- 6) Jones, W. and Hosick, H. L.: Collagen concentration as a significant variable for growth and mammary parenchyma in collagen matrix culture. *Cell Biol. Int. Prep.* 10: 277, 1986.
- 7) 岩井峯子: 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. 奈医誌. 43: 94, 1992.
- 8) Montesano, R., Scaller, G. and Orci, L.: Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* 66: 697, 1991.
- 9) Morimoto, M., Imai, S., Haga, S., Iwai, Y., Iwai, M., Hiroishi, S., Miyashita, N., Moriaki, K. and Howard, L. H.: New murine mammary tumor cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27: 349, 1991.
- 10) 岩井良昭: DD/Tbr系マウス乳癌細胞株の樹立, 奈医誌. 32: 168, 1981.
- 11) Suzumura, S., Iwai, M., Iwai, Y., Hashimoto, K., Imai, S., Sugiyama, T., Matsuyama, T., Tanaka, T., Miyahara, H. and Matsunaga, T.: In vitro keratinization of the tissue obtained from human salivary gland using bovine salivary hormone. *In Vitro Cell Dev. Biol.* In press. 1992.
- 12) Singer, R. H., Lawrence, J. B. and Villnave, C.: Optimization of in situ hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. *Biotechniques* 4: 230, 1986.
- 13) Higashide, T., Hinoda, Y., Itoh, J., Takahashi, Y., Satoh, Y., Ibayashi, Y., Imai, K. and Yachi, A.: Detection of mRNAs of carcinoembryonic antigen genes in colorectal adenomas and carcinomas by in situ hybridization. *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 1149, 1990.
- 14) Jensen, H., Lyngbye, J. and Davidsen, S.: Histochemical investigation of the thermostable alkaline phosphatase in the normal full-term placenta. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 47: 436, 1968.
- 15) Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6, 1983.
- 16) Kitagawa, H., Ohkouch, E., Fukuda, A., Imai, K. and Yachi, A.: Characterization of carcinoembryonic antigen specific monoclonal antibodies and specific carcinoembryonic antigen assay in sera of patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 77: 922, 1986.
- 17) 櫻並淳平, 肥塚正博, 羽多正隆, 河村和男, 橋陽一, 草間良恵, 古閑睦好: コラーゲンゲル培養(I). 組織培養 13: 64, 1987.
- 18) Erkki, R. and Michael, D. P.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 23: 491, 1987.
- 19) Steven, M. A. and Clayton, A. B.: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB.* 4: 2868, 1990.
- 20) James, L. J. and Ursula, J. H.: Effect of adhesion factors fibronectin, laminin, and type IV collagen on spreading and growth transformed and control rat liver epithelial cells. *Cancer Res.* 47: 3802, 1987.
- 21) Filippo, G. G. and Erkki, R.: Elevated levels of

- the fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of chinese hamster ovary cells. *Cell* **60** : 849, 1990.
- 22) **Lisa, C. P. and Richard, O. H.** : Changes in integrin receptors on transformed cells. *Cell* **56** : 281, 1989.
- 23) **Robert, P., Michael, D. P. and Erkki, R.** : A 125/115 kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginin-glycin-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** : 5766, 1985.
- 24) **Fairouz, Z., Wasif, N. K. and Sten, H.** : Carcinoembryonic antigen gene family members in submandibular salivary gland : Demonstration of pregnancy-specific glycoproteins by cDNA cloning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169** : 203, 1990.
- 25) **Kuroki, M., Arakawa, F., Yamamoto, H., Ikehara, Y. and Matsuoka, Y.** : Active production and membrane anchoring of carcinoembryonic antigens observed in normal colon mucosa. *Cancer Letters* **43** : 151, 1988.
- 26) **Wendy, H. and Clifford, P. S.** : Control of carcinoembryonic antigen gene family expression in a differentiating colon carcinoma cell line, Caco-2. *Cancer Res.* **51** : 3526, 1991.
- 27) **岩井峯子, 岩井良昭, 今井俊介, 鈴木滋生** : ヒト乳腺細胞のコラーゲンゲル内培養 : 培養過程における CEA 及びその関連抗原の産生. *乳癌基礎研究会誌* **2** : 3, 1992.
- 28) **Massimo, P., Helga, D. and Walter, F. B.** : Carcinoembryonic antigen functions as an accessory adhesion molecule mediating colon epithelial cell-collagen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87** : 1541, 1990.
- 29) **Sarita, B., Abraham, F., Serga, J., Nicol, B., Shirota, K. and Clifford, P. S.** : Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, Functions as an intercellular adhesion molecule, *Cell* **57** : 327, 1989.
- 30) **Ezaki, T., Nakatani, K., Miyagi, N., Sakamoto, K., Takahashi, S., Emi, Y., Shiratori, T. and Konishi, Y.** : Establishment of an α -fetoprotein producing human gastric carcinoma in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **74** : 870, 1983.
- 31) **江崎友通, 中谷勝紀, 宮城信行, 酒本和則, 白鳥常男, 高橋精一, 小西陽一** : CEA 産生ヒト低分化腺癌 2 株のヌードマウスへの移植継代について. *日消誌* **80** : 1118, 1983.
- 32) **Imai, S., Kiyozuka, Y., Maeda, H., Noda, T. and Hosick, H. L.** : Establishment and characterization of a human ovarian serous cystadenocarcinoma cell line that produces the tumor markers CA-125 and tissue polypeptide antigen. *Oncology* **47** : 177, 1990.