Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Establishment and characterization of cell line TNMY1 derived from human malignant fibrous histiocytoma

中谷，徹也

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2002-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2421
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002421

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【６６】

氏　名・（本　籍）　中谷　徹也（兵庫県）

博士の専攻分野の名称　　博　士　（医学）

学　位　記　番　号　　博い第１３８８号

学位授与の　要　件　　学位規則第４条第１項該当

学位授与の　日　付　　平成１４年３月３１日

【学位論文題目】

Establishment and characterization of cell line TYMY1 derived from human malignant fibrous histiocytoma

（ヒト悪性線維性組織球腫由来細胞 TYMY1 の樹立とその性状）

審　査　委　員

主査　教授　黒坂　昌弘

教授　尾原　秀史　　教授　松尾　雅文

緒言

悪性線維性組織球腫(malignant fibrous histiocytoma:MFH)は、軟部組織に好発する悪性腫瘍である。組織学的に線維芽細胞様細胞と組織球様細胞など多彩な細胞より構成されるため、その腫瘍の起源、本態に関して統一した見解がない。本研究の目的は、ヒト悪性線維性組織球腫由来細胞株 TNMY1 を樹立し、その性状を検討することにより、MFH の起源を解明することである。

材料と方法

60 歳女性の左胸壁に発生した悪性線維性組織球腫を手術時に採取し、研究に用いた。

手術時組織切片の組織学的、組織化学的、免疫組織学化学的検討:採取した切片を10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋した後、hematoxylin and eosin(HE)染色し、光学顕微鏡で観察した。同様に Sudan black B, oil red O, 鍍銀染色, periodic acid-Schiff (PAS), coroid iron, Alcian blue (pH=2.5), alkaline phosphatase(ALP), naphthol AS-D acetate esterase 染色を用いて組織化学的検討を行うと共に、epithelial membrane antigen(EMA), vimentin, desmin, α-smooth muscle actin, α-sarcomeric actin, myoglobin, CD68, lysozyme, α-1-antichymotripsin, S100protein について免疫組織化学的検討を行った。なお免疫組織化学的検討は ABC 法を用いた。

細胞株の樹立:手術時採取した切片を phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄した後、可及的に砕片し、37℃、5% CO_2の incubator 中で培養した。培養液には 10% fetal bovine serum, penicillin G (100U/ml), streptomycin (100ug/ml), L-glutamine(2mmol/l)を含む Eagle's Minimun essential medium を用いた。細胞がconfluentに達した時点で0.02%トリプシン処理を行い細胞を培養液中に浮遊させて、単層培養として継代培養を行った。

細胞株 TNMY1 の性状

細胞学的、細胞化学的、免疫細胞化学的検討:継代培養した細胞をガラススライドの上に付着させ、3 日間培養した後 95%ethanol で固定し、組織切片と同様の染色を行った。

生物学的特性

増殖曲線と倍化速度:継代数 91 代目の細胞を 6 穴プレートで培養し、各ウェル中の細胞数を 2 日毎に Burker-Turk 血球計算型を用いて計測して作成した増殖曲線から倍化速度を算出した。

コロニー形成能:10%FBS を含む 0.5%寒天培地の上に 1000 個の細胞を播種し、4 週間培養した後に形成されたコロニー数を計測した。

異種動物移植:4週齢のヌードマウス(BALB/cA, Jcl-nu, nu/nu,)の背部皮下へ $5X10^6$ 個の腫瘍細胞を接種し、形成された腫瘍を摘出後、組織学的に検討した。

collagen I-V の発現:腫瘍細胞における collagen I-V の発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を用いて検討した。

結果

ヒト悪性線維性組織球腫細胞株 TNMY1 は、継代開始より 23 ヶ月以上経過し 95 回以上継代した現在も増殖を続けている。

手術時組織切片の組織学的、組織化学的、免疫組織化学的検討:腫瘍は異型核を有する紡錘型、多型性細胞よりなり、これらの細胞が storiform pattern 状配列を示していた。多核巨細胞を多数伴っており、病理診断は多型性悪性線維性組織球腫であった。鍍銀染色では多数のコラーゲン線維が細胞間を走行し storiform pattern を示していた。組織化学的、免疫組織化学的検討の結果は Table 1 および 2 に示した。

細胞株 TNMY1 の細胞学的、細胞化学的、免疫細胞化学的検討:TNMY1 細胞も同様に紡錘型、多型性細胞が storiform pattern を示し、多核巨細胞を伴っており、鍍銀染色においても同様に細胞を取り囲む細網線維の配列を認めた。また腫瘍細胞は pile up するように増殖した。細胞学的、細胞化学的、免疫細胞化学的検討の結果は Table 1,2 に示した。

生物学的特性

増殖曲線と倍化速度:増殖は播種後 14 日でプラトーに達し、倍化速度は 62.7 時間であった。

コロニー形成能:1.2%。

異種動物移植:8 匹中 2 匹のヌードマウス背部皮下で腫瘍細胞は腫瘤を形成した。組織学的には紡錘型、多型性細胞が多核巨細胞を伴い storiform pattern 配列を示して増殖しており、この所見は手術時の組織片と類似していた。

collagen の発現:collagen I、III, V の mRNA の発現を認めた。collagen II および IV の mRNA 発現は認めなかった。

考察

TNMY1 細胞は①23 ヶ月にわたり、95 回を超える継代によってもその増殖は衰えず、現在も増殖していること②細胞相互の接触阻止能の喪失を認め、multi-layer で増殖すること③寒天でのコロニー形成能があり、足場非依存性の増殖を認めること④異種動物への移植可能であったことより、細胞株を樹立したと言える。また、TNMY1 細胞は手術時組織切片と同様の生物学的特性を持ち合わせていることから、ヒト悪性線維性組織球腫細胞株と言える。

従来、MFH の起源は①組織球由来②線維芽細胞由来③未分化間葉系細胞由来という説があり現在でも統一した見解はない。組織球様細胞が多数存在し、lysozyme, α-1-antichymotripsin に染色され、貪食能を有することから組織球由来であると述べる報告がある一方で、紡錘型の形態を示し、vimentin,

antifibroblast(5B5)に染色され、免疫染色でcollagen IよりcollagenIIIを強く染色されることより、脱分化した線維芽細胞由来であると述べている報告もある。今回の我々の研究で形態の上では紡錘型細胞と組織球様細胞の両方を認めたことは、腫瘍に対するhostの細胞性防御により出現した組織球が採取時に混入したとも考えられる。しかしながらTNMY1細胞の紡錘型の細胞も組織球様細胞も23ヶ月、95代以上の継代後、依然として両者とも存在していることより、その両者とも腫瘍細胞であると考えられる。また、紡錘型の細胞も、多形性細胞もCD68, α-1-antichymotripsinに染色される一方で、collagen 産生能を有し、組織球と線維芽細胞の両方の性格をを有することから、組織球や線維芽細胞へ分化する前段階のstem cell由来であると考えられた。

collagen V は悪性腫瘍に多く認めると述べられており、悪性腫瘍とその正常組織における collagen V 量を比較した報告もある。多数の腫瘍細胞株(fibrosarcoma, leiomyosarcoma, osteosarcoma, epidermoid carcinoma, colon carcinoma, choriocarcinoma, adenocarcinoma)には collagen V 産生能は有さず、rhabdomyosarcomaのみ少量のcollagen Vを産生し、collagen Vは腫瘍自体が産生するのではなく、host の防御反応であるという報告もある。一方、MFH 細胞株において免疫染色を用いた collagen V の発現を指摘する報告は散見されるが、mRNA の発現を検討した報告は今回の我々の報告を除いて存在しない。我々の研究において、host の防御反応として出現した細胞は混入していないにもかかわらずcollagen V の mRNA を発現したことは、MFH 自身に collagen V 産生能力があることを示唆している。また他の悪性腫瘍細胞株において collagen V の産生能力がないことより、collagen V の発現は MFH 特有の性質であり、補助的診断の一つと成り得るのではないかと考えた。

Stain	Original tumor (tumor cell/matrix)	TNMY1 cell line (tumor cell/matrix)
Periodic acid–Schiff	–/–	–/–
Colloid iron	–/+	–/+
Alcian blue	–/+	–/+
Hyaluronidase†	–/–	–/–
Oil red O	ND	+/–
Sudan black B	ND	+/–
Alkaline phosphatase	–/–	–/–
Napthol AS-D acetate esterase	–/–	–/–

ND, staining not detected; +, positive staining; –, negative staining; †Alcian blue stain with prior treatment of hyaluronidase.

Table 1

Antigen	Original tumor	Cell line
Vimentin	++	++
Epithelial membrane antigen	–	–
Desmin	–	–
Muscle actin (BHF35)	+	–
α-Smooth muscle actin (IA4)	+	+
α-Sarcomeric muscle actin (SRI)	–	–
Myoglobin	–	–
CD68 (KP1)	++	++
α-1-antichymotrypsin	+	–
Lysozyme	–	–
S-100 protein	–	–

++, positive; +, weakly positive; –, negative.

Table 2

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第1389号	氏　名	中 谷 徹 也
論文題目	Establishment and characterization of cell line TNMY1 derived from human malignant fibrous histiocytoma （ヒト悪性線維性組織球腫由来細胞株 TNMY1 の樹立とその性状）		
審査委員	主　査　黒坂昌弘 副　査　松尾雅文 副　査　長島秀夫		
審査終了日	平成 13 年 11 月 22 日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

はじめに

悪性線維性組織球腫(malignant fibrous histiocytoma　以下MFH)は、軟部組織に好発する悪性腫瘍である。組織学的に線維芽細胞様細胞と組織球様細胞など多彩な細胞より構成されるため、その腫瘍の起源に関して統一した見解がない。本研究の目的はヒトMFH細胞株TNMY1を樹立し、その性状を検討することによりMFHの起源を解明することである。

材料と方法

60歳女性の左胸壁に発生したMFHを手術時に採取し、研究に用いた。

1）　手術時組織切片の組織学的、組織化学的、免疫組織学化学的検討

採取した切片を10%ホルマリン固定しパラフィン包埋した後、hematoxylin and eosin染色し光学顕微鏡で観察した。同様にSudan black B, oil red O, 鍍銀染色, periodic acid-Schiff, coroid iron, Alcian blue, alkaline phosphatase, naphthol AS-D acetate esterase染色を用いて組織化学的検討を行うと共に、epithelial membrane antigen, vimentin, desmin, αsmooth muscle actin, α sarcomeric actin, myoglobin, CD68, lysozyme, α-1-antichymotripsin, S100proteinについてABC法を用いた免疫組織化学的検討を行った。

2）細胞株の樹立と生物学的特性

手術時採取した切片を可及的に砕片し、37℃、5% CO_2のincubator中で継代培養を行った。腫瘍細胞を組織切片と同様の細胞学的、細胞化学的、免疫細胞化学的検討を行った。10%FBSを含む寒天培地に1000個の細胞を播種し4週間培養した後に形成されたコロニー数を計測した。異種動物での腫瘤形成能を検討するため、$5X10^6$個の腫瘍細胞をヌードマウスの背部皮下へ接種し、形成された腫瘍を摘出し組織学的に検討した。腫瘍細胞におけるcollagen I-Vの発現をreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を用いて検討した。

結果

1）　手術時組織切片の組織学的、組織化学的、免疫組織化学的検討

腫瘍は異型核を有する紡錘型、多型性細胞よりなり、これらの細胞がstoriform patternを示していた。多核巨細胞を多数伴っており病理診断は多型性悪性線維性組織球腫であった。免疫組織化学的検討の結果、vimentin, α smooth muscle actin, CD68, α-1-antichymotripsinに対し陽性に染色された。

2）細胞株の樹立と生物学的特性

ヒトMFH細胞株TNMY1は、継代開始より23ヶ月以上経過し95回以上継代した現在も増殖を続けている。TNMY1細胞は紡錘型、多型性細胞が多核巨細胞を伴いstoriform patternを示し細胞化学的、免疫細胞化学的検討の結果も含め、手術時の組織片と類似していた。コロニー形成能は1.2%であった。異種動物移植について8匹中2匹のヌードマウスで腫瘤を形成し、組織学所見は紡錘型、多型性細胞が多核巨細胞を伴いstoriform patternを示し手術時の組織片と類似していた。RT-PCRの結果collagen I、III, VのmRNAの発現を認めた。

考察ならびに結論

TNMY1細胞は①23ヶ月、95回を超える継代によっても増殖可能②細胞相互の接触阻止能の喪失③足場非依存性の増殖④異種動物移植可能などの性質を持つことより細胞株を樹立したと考えられ、手術時組織切片と同様の特性を持つことからヒトMFH細胞株と言える。TNMY1細胞の紡錘型の細胞も組織球様細胞もCD68, α-1-antichymotripsinに染色される一方でcollagen産生能を有し、組織球と線維芽細胞の両方の性格をを有することから、組織球や線維芽細胞へ分化する前段階のstem cell由来であると考えられた。悪性腫瘍細胞株におけるcollagen V産生能について多数の報告が見られるが、collagen V産生能は有さないという報告が多い。今回の研究ではMFH細胞株においてcollagen VのmRNAの発現を認めたことよりMFHの補助的診断の一つと成り得るのではないかと考えた。

本研究は、悪性線維性組織球腫について、その細胞株の樹立と性状について研究したものであるが、従来ほとんど行われていない悪性線維性組織球腫におけるコラーゲンVのmRNAの発現について重要な知見を得たと同時に、今回樹立した細胞株はMFHに関する今後の研究の新たなる材料となりうる点において価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。