

ヒトアデノウイルス 12 型でトランスフォームした ラットメサンギウム細胞のラット腎臓への移植

坂 井 勇 仁

新潟大学大学院医歯学総合研究科
生体機能調節医学専攻内部環境医学講座
腎・膠原病内科学分野
(主任：下条文武教授)

Transplantable Adenovirus - 12 Transformed Rat Mesangial Cells

Takehito SAKAI

Division of Clinical Nephrology, Rheumatology
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Fumitake GEJYO)

要 旨

本研究は、ラット培養糸球体メサンギウム細胞をヒトアデノウイルス 12 型でトランスフォームさせ、不死化細胞株を樹立する試みである。さらに得られた不死化細胞株の性状、移植後の造腫瘍性についても検討した。6～8 週の雄 Wistar ラットの単離糸球体を初代培養し、outgrowth してきたメサンギウム細胞を継代、培養メサンギウム細胞として使用した。この細胞にヒトアデノウイルス 12 型をトランスフェクトし、不死化株を得た。不死化は E1A 抗原陽性及び長期間の継代後にも細胞形質が変化しないことから確認した。免疫組織学的検索でこの不死化細胞は α 平滑筋 actin および vimentin が陽性であるが cytokeratin, desmin は陰性であった。すなわち間葉系の特徴を維持しつつ上皮細胞類似の性状を獲得していた。造腫瘍性を検索するため、この細胞を腎被膜下へ移植した。移植された不死化細胞は腫瘍を形成し、組織学的には undifferentiated malignant tumor の形態を示した。宿主の拒絶免疫反応を示す組織所見も極めて抑制されていた。現在まで、げっ歯動物において、糸球体固有細胞由来腫瘍を確実に示す報告は認められない。このことから、今回樹立した造腫瘍性不死化メサンギウム細胞は、本来の細胞とは形質転換しているが、糸球体原発性腫瘍の発生抑制機構を含めた腫瘍化の分子機構を理解する上で有益な道具になりうると考えられる。

キーワード：ヒトアデノウイルス 12 型、メサンギウム細胞、形質転換、細胞移植、造腫瘍性、不死化

Reprint requests to: Takehito SAKAI
Division of Clinical Nephrology
Rheumatology Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951 - 8585 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学研究科生体機能調節医学専攻
内部環境医学講座腎・膠原病内科学分野

坂 井 勇 仁

緒 言

ヒトアデノウイルス12型の造腫瘍性が報告¹⁾されて以来、同ウイルスによる培養細胞のトランスフォーメーション実験が多くなされてきた。私どもは、腎糸球体構成細胞由来と思われる腫瘍の報告が未だなされていないことに興味を持ち、ウイルスによる培養糸球体構成細胞のトランスフォーメーション実験を行ってきた。まずヒト糸球体内皮細胞をSV40でトランスフォームし、不死化細胞株を得た²⁾。本研究では、ラット培養糸球体メサンギウム細胞をヒトアデノウイルス12型でトランスフォームさせ、不死化細胞株を得る試みを行った。また得られた不死化細胞株の造腫瘍性についても検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験に使用したラットは Charles River Japan (Yokohama, Kanagawa) から購入し、ラットは6~8週の雄 Wistar ラット (体重 130-150g) を使用した。全ての動物実験計画・処理は新潟大学実験動物倫理委員会の許可を得て行った。

2. メサンギウム細胞の培養

既報³⁾に従いメサンギウム細胞の培養を行った。sieving 法にてラット腎皮質細切標本から糸球体を単離し、初代培養した。4週以上培養し、均一化した細胞を4回以上継代し培養メサンギウム細胞として使用した。

3. ヒトアデノウイルスの培養細胞への導入、及び transformed 細胞の取得

ヒトアデノウイルス12型、TCID₅₀/ml=10^{6.5}を含む溶液1mlを培養細胞に添加し1時間後、5mlのRPMIを含む10%FCS溶液を添加した。2日後RPMI1640を含む5%FCS溶液に交換した。4日後、RPMI1640を含む2%FCS溶液に交換し、1週間に2回培地交換を行った。4週後、0.25%トリプシン、0.02%EDTA溶液によって継代し、週

2回培地交換を行った。塊状の細胞コロニーが確認されたら継代を繰り返し、均一な transformed 細胞群を得た。

4. ヒトアデノウイルス12型 transformed 細胞の腎被膜下への移植

ラットに thiobutabarbital sodium salt (100mg/体重 Kg)を腹腔投与した麻酔下で腹壁正中切開し左腎を露出した。腎門部から腎被膜下にスパーテルを差込み、ポケットを作成した。transformed 細胞5×10⁷個(約0.1mlの細胞ペレット)をこの被膜下ポケット中に挿入、移植した。

5. 肉眼的及び組織学的検索

transformed 細胞を被膜下に移植してから9日目のラットを麻酔下で瀉血し、屠殺した。細胞移植した被膜下部位を観察、写真撮影後、腎臓を単離した。光学顕微鏡検索には10% neutral-buffered for-malin で固定しパラフィン包埋した。その後2~3μmの厚さの切片に、hematoxyline-eosin (HE) 染色、peri-odic acid-shiff (PAS) 染色及び periodic acid methenamine silver (PAM) 染色を行った。免疫組織学的検索には、上述のパラフィン包埋切片を脱パラフィンして酵素抗体法にて検索する方法と、腎組織を液体窒素中(-120℃)で凍結し、クリオスタットで4μm厚の切片を作製して免疫蛍光法にて検索する方法を兼用した。

6. transformed 細胞の免疫組織学的検索

8well Lab-Tech chamber slide (Nalge Nunc, Naperville, IL) で培養した細胞をアセトンで固定し、3回PBS溶液で洗浄した標本を用いた。アデノウイルス12型による形質転換を確認するため、培養細胞標本をウサギで作製した2種類の抗ヒトアデノウイルス12型E1A抗体による蛍光抗体染色を行った。この抗体はヒトアデノウイルス12型E1A部位25個の合成ペプチドからKLHをキャリアとして免疫して得られた。

結 果 考 案

1. ヒトアデノウイルス 12 型 transformed 細胞の性状

培養ラットメサンギウム細胞にアデノウイルス 12 型を感染させると、経時的に細胞が変性し、細胞数が減少してきた。2 週間後に小さな細胞コロニーを形成し始め、3 週間には更に拡大してフォーカスを形成するようになった。その後、4 回（1 回/週）継代培養すると一様の形態と成長パターンを取る細胞群となった。元のメサンギウム細胞は線維芽細胞のように紡錘状であるのに比して、これらの細胞は小型の核細胞比の大きな細胞で、上皮細胞様の敷石状の細胞集団を形成した（図 1）。この均一化した細胞は 100 代以上継代してもその形状、増殖度を変化させることはなく不死化したと考えることが出来た。

不死化した根拠は、抗ヒトアデノウイルス 12 型 E1A 抗体による免疫染色により、トランスフォームした細胞が E1A 抗原陽性となることから明らかであった（図 1）。

免疫組織化学的検索から、トランスフォームした細胞は α 平滑筋 actin および vimentin が陽性（図 2）であるが cytokeratin, desmin は陰性であった。

2. トランスフォームした細胞の腫瘍形成、及び腫瘍の組織学的所見

肉眼的所見では腎被膜下に移植されたトランスフォーム細胞は 3 週程で腫瘍塊を形成してくるが周囲腎組織との境界は明瞭でラット被膜下に固形腫瘍として敷石状に増殖（図 3）していた。組織学的所見では腫瘍周囲にリンパ球、マクロファージの細胞浸潤を認めた。また腫瘍中心部に壊死を伴っていた。腫瘍細胞は中型で紡錘形の核を持ちクロマチンが凝集していた。核胞体比は大きく幼若性の目立つものであった。腫瘍中には小血管の増生を認めるが angiogenesis として目立つ程（図 3）ではなかった。以上の所見から、この腫瘍は undifferentiated malignant tumor と考えた。

ヒトアデノウイルス 12 型が培養げっ歯動物細胞をトランスフォームすることは良く知られている。トランスフォームの責任遺伝子は E1A と E1B であることが判明しているが⁴⁾、本研究で得られたトランスフォーム細胞の細胞質中にも E1A 遺伝子産物が免疫組織学的に検出された。トランスフォームする前のメサンギウム細胞は比較的大型で紡錘状の線維芽細胞様形態を取り、突起を交差しながら増殖するが、トランスフォームした細胞は小型で上皮細胞様の配列を取り、細胞増殖も著しい。このようなトランスフォーム後の形態変化は他の報告でも認められる⁵⁾⁶⁾。私どものトランスフォーム細胞は 100 代以上の継代培養後も形態変化は認められず、Wistar rat の腎被膜下への移植後の造腫瘍性、腫瘍の細胞形状も維持されている。

今回得られたトランスフォーム細胞は市販 Wistar rat の培養系球体メサンギウム細胞由来である。市販 Wistar rat は純系化されていないので同種組織を移植すると組織適合抗原が一致しないことから移植拒絶反応を起こす。私どものヒトアデノウイルス 12 型トランスフォーム細胞は Wistar rat の腎被膜下に移植すると造腫瘍性を示し、可移植性で、宿主の拒絶免疫反応も極めて弱い。同じアデノウイルスでも 5 型でトランスフォームした培養細胞は造腫瘍活性を示さない。この分子機構として 12 型 E1A は 5 型 E1A と異なり感染細胞の主要組織適合抗原系クラス I 遺伝子の発現を強く抑制し⁷⁾、その結果、12 型でトランスフォームされた細胞は移植宿主の免疫監視機構を免れるとも解釈される⁸⁾⁹⁾。

私どものヒトアデノウイルス 12 型トランスフォーム細胞は keratin (－), vimentin (+), α 平滑筋 actin (+) の形質を示し、間葉系細胞の特徴を維持しているが、元のラット培養メサンギウム細胞では陽性であった desmin は陰性化し、形態も明らかに変化し、敷石上の配列を示すなど上皮細胞類似の性格を獲得していた。被膜下に増生した腫瘍は未分化で幼若性が目立ち悪性腫瘍と考

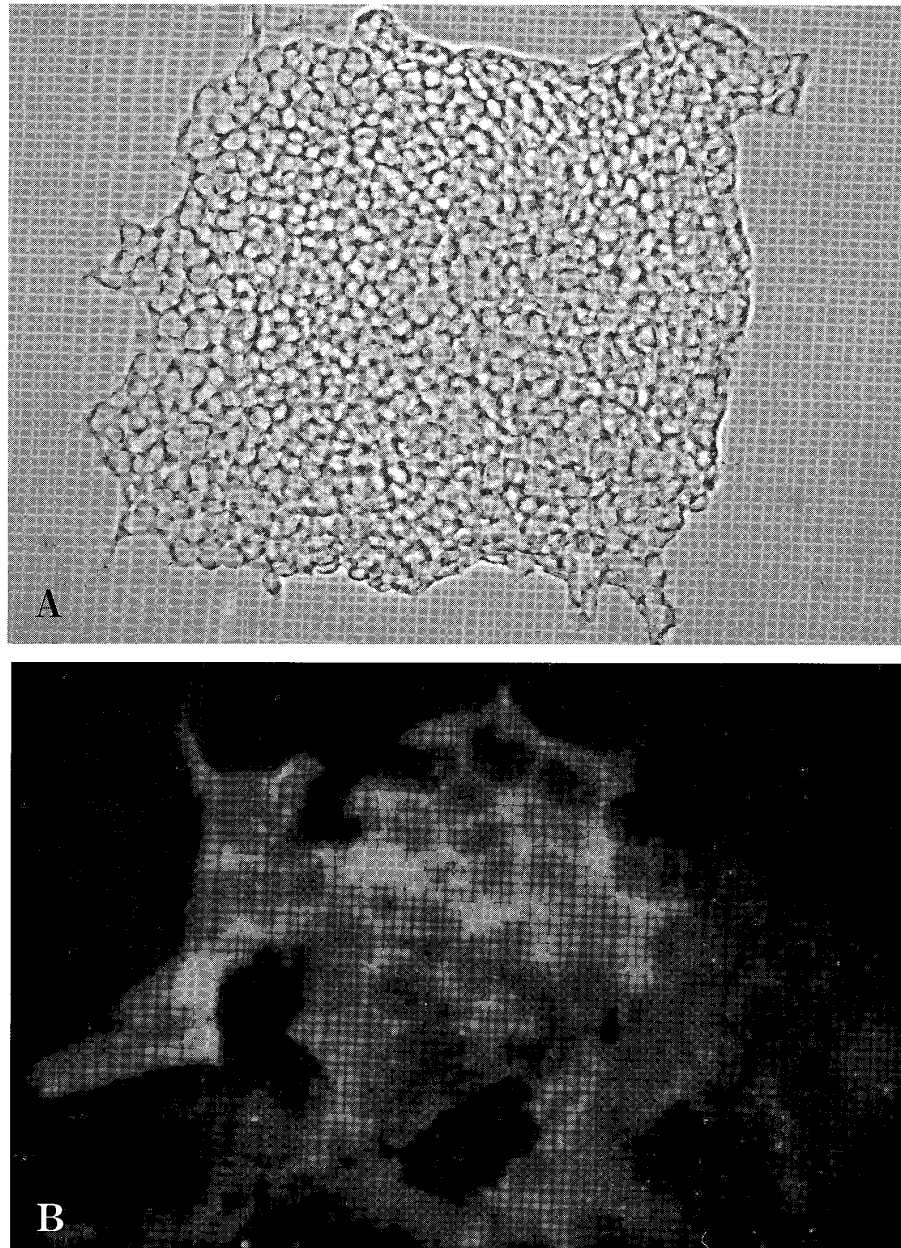


図1 ヒトアデノウイルス12型 transformed 細胞

A. 位相差顕微鏡像

小型の核細胞比の大きな細胞で上皮細胞様の敷石状の集団を形成していた。

B. 抗ヒトアデノウイルス12型E1A抗体による免疫染色像

E1A抗原が陽性となることから不死化を確認した。

えられるが、ヒトの metanephric Wilms tumor (nephroblastoma) に見られる尿細管様構造物(上皮様分化と考えられる)は認められず、平滑筋細胞、横紋筋細胞への分化も認められない。す

なわち本来の糸球体メサンギウム細胞と、かけ離れた細胞に変異したことになるが、SV40でトランスフォームした不死化ヒト糸球体内皮細胞では元の糸球体内皮細胞と類似の形態を取り、血管内

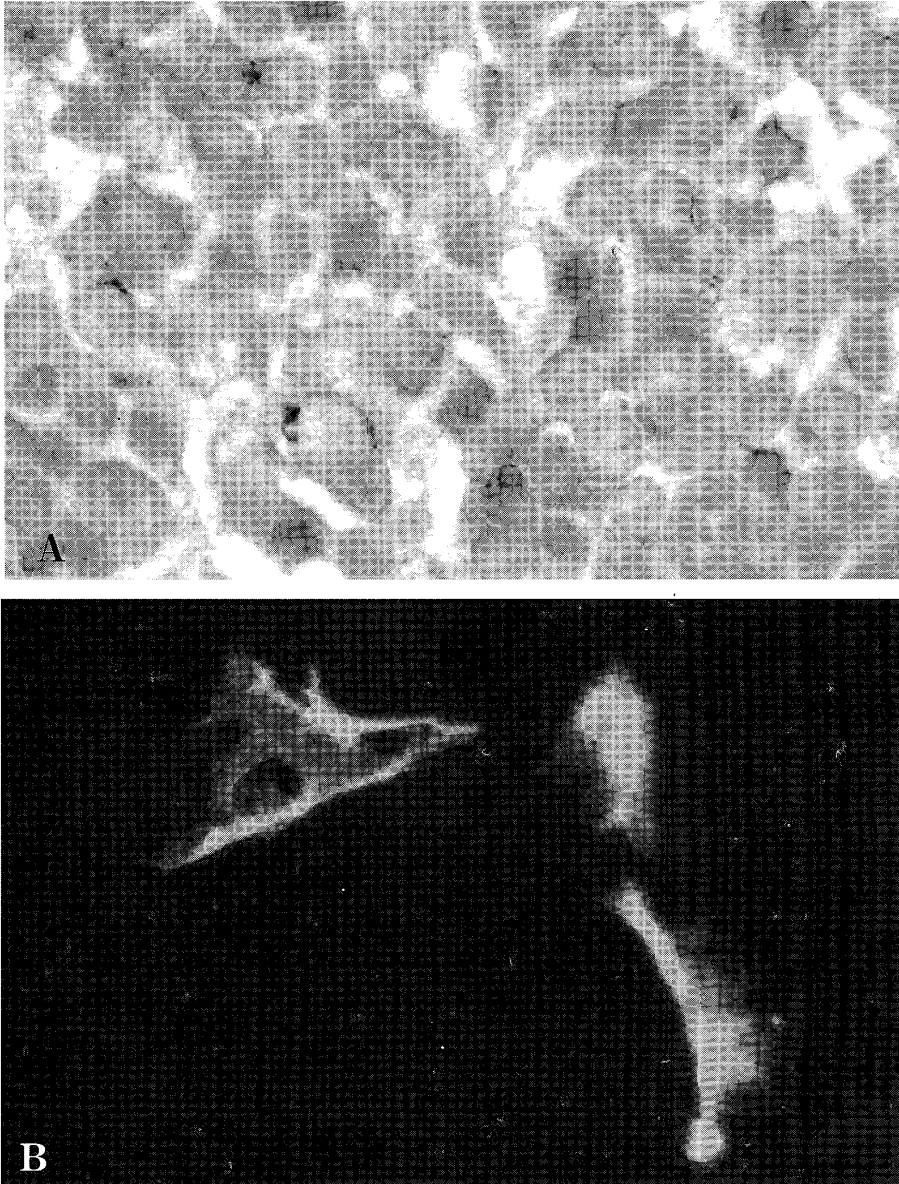


図 2 ヒトアデノウイルス 12 型 transformed 細胞の免疫組織像

- A. α 平滑筋 actin による酵素抗体法による染色像
 B. vimentin の蛍光抗体法による染色像

transformed 細胞は α 平滑筋 actin, vimentin が陽性であり間葉系細胞の特徴を維持していた。

皮細胞に特有の細胞接着分子, ICAM-1, PECAM-1, E-selectin の発現, 及び von Willebrand 因子の産生も認められた²⁾. ウィルスによる細胞形質転換は各種ウィルスに依存するが, 宿主細胞の性状にも支配されるのかもしれない. 現在まで, げ

っ歯動物において, 糸球体固有細胞由来 (糸球体原発性) 腫瘍を確実に示す報告が認められない事は注目し値する. この事実と, 糸球体細胞固有の性状を維持したウィルス誘導トランスフォーム細胞を確立するのが困難な事とは関連しているか否

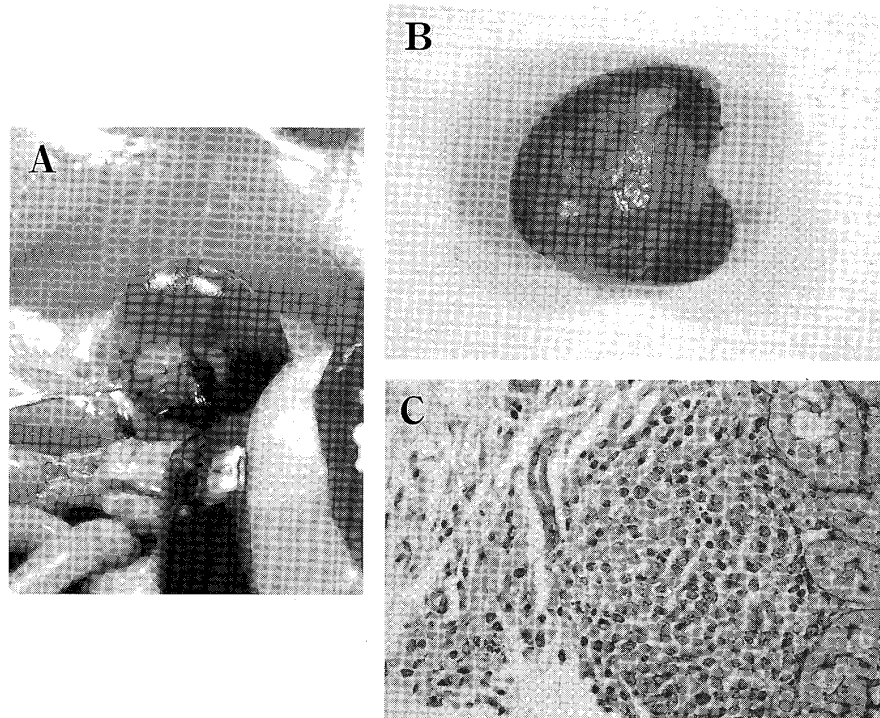


図3 transformed細胞の腫瘍形成、及び腫瘍の組織学的所見

A. 摘出する前の移植ラット腎臓

ラット腎被膜下に移植した transformed 細胞は血管新生を伴って腫瘍塊を形成していた。

B. 摘出した移植ラット腎臓

腫瘍塊は周囲腎組織との境界が明瞭で数石状に増殖していた。

C. 腫瘍の組織像

腫瘍細胞は紡錘形の核をもちクロマチンが凝集していた。細胞体比は大きく幼若性が目立った。腫瘍周囲にはリンパ球、マクロファージの浸潤を認め、腫瘍中心部は壊死に陥っていた。

かは不明であるが、細胞生物学的に興味ある問題と言える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文のデータ作成を御指導いただいた香美祥二先生(徳島大学医学部)、城 謙輔先生(東京慈恵会医科大学医学部)、ならびに研究全般を御指導いただいた追手 巍先生(新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設機能制御学分野)に深く感謝いたします。

また、ヒト adenovirus - type12 を供与下さいました濱田忠彌博士(旧新潟大学医学部ウイルス学教室教授)、ウサギ抗ヒトアデノウイルス12型E1A抗体を供与下

さいました白木和子博士(旧東京大学医科学研究所ウイルス研究部)に深謝いたします。

参考文献

- 1) Trentin JJ, Yabe Y and Taylor G: The quest for human cancer viruses: Science 137: 835 - 849, 1962.
- 2) Harada T, Batsford S, Morioka T, Yao J, Arakawa M, Gejyo F and Oite T: Establishment of immortalized human glomerular endothelial cell lines and their application: Nephron Exp Nephrol 99: e38 - e45, 2005.

- 3) Saeki T, Morioka T, Arakawa M, Shimizu F and Oite T: Modulation of mesangial cell proliferation by endothelial cells in coculture: *Amer J Pathol* 139: 949 - 957, 1991.
- 4) Whyte P, Williamson NM and Harlow E: Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A protein. *Cell* 56: 67 - 75, 1989.
- 5) Petursson G, Armstrong D, de Harven E and Fogh J: In vitro transformation of hamster embryonic kidney cultures exposed to human adenovirus 12: *Cancer Research* 29: 145 - 153, 1969.
- 6) Whittaker JL, Byrd PJ, Grand RJA and Gallimore PH: Isolation and characterization of four adenovirus type 12 - transformed human embryo kidney cell lines: *Molecular and Cellular Biology* 4: 110 - 116, 1984.
- 7) Schrier PI, Bernards R, Vaessen RTMJ, Houweling A and van der Eb AJ: Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells: *Nature* 305: 771 - 775, 1983.
- 8) Tanaka K, Isselbacher KJ, Khoury G and Jay G: Reversal of oncogenesis by the expression of a major histocompatibility complex class 1 gene: *Science* 228: 26 - 30, 1985.
- 9) Tanaka K, Hayashi H, Hamada C, Khoury G and Jay G: Expression of major histocompatibility complex class I antigens as a strategy for the potentiation of immune recognition of tumor cells: *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8723 - 8727, 1986.

(平成 18 年 12 月 18 日受付)