

鉄ニトリロ三酢酸腹腔内投与により発生したラット腎癌 からの培養細胞株の樹立とその性状

掛橋 千賀子¹⁾, 森 将晏¹⁾, 川端 晃幸²⁾, 岡田 茂²⁾

キーワード: Fe-NTA, 腎癌, 培養細胞株の樹立

緒 言

1979年, Awai らは, 鉄とニトリロ三酢酸の錯体である鉄ニトリロ三酢酸 (ferric nitrilotriacetate; Fe-NTA) をラットに連日腹腔内に投与すると, 鉄は肝, 脾の実質細胞に高度に沈着し, これらの動物に尿糖の排泄を見るようになることを報告した¹⁾. その後, この方法が基本となり岡田らは, Fe-NTA による臓器障害の標的は腎臓であることを見出し, さらに長期投与することにより, ラットのみならずマウスでも腎癌が発生するというについて報告している²⁾. このような癌化の過程には, Fe-NTA によって発生するフリーラジカルが関与しており, 細胞膜成分の脂質過酸化に帰因していることも明らかにされた³⁻⁶⁾. また, *in vitro* での研究においても, *in vivo* と同様, Fe-NTA による細胞傷害にはフリーラジカルが関与し, 細胞膜成分の脂質過酸化によることが明らかになっている⁷⁻¹⁰⁾.

鉄は生体にとって必須金属であり, 人の偶発癌発生を考えるうえで Fe-NTA 投与による発癌のメカニズムについて検討していくことは意義深いことと

言える. 今まで Fe-NTA による腎癌の研究は, *in vivo* での研究が主体で, 癌細胞そのものの性質に関する研究は余りなされていない. 今回, Fe-NTA 腹腔内投与により発生した腎癌より細胞株を樹立し, 若干の性質について検討したので報告する.

材 料 と 方 法

1. 腎癌の作成

岡田らの報告²⁾に従い Fe-NTA を腹腔内投与して腎癌を誘発した. つまり, 栗井らの方法¹⁾に準じて作成した Fe-NTA (Fe³⁺と NTA のモル比 1 : 4) を, 離乳後一週 of Wistar 雄ラットに, 体重あたり 3 mg/kg を週 5 回, 腹腔内投与から始め, その後 5 ~ 8 mg/kg に漸増し, 3 か月間腹腔内投与を続けた. 投与後 12 か月間放置した後屠殺し, 腎に形成された腫瘍を摘出した. 腫瘍の一部は組織学的検査用に 20% ホルマリンで固定し, 残りの腫瘍組織は培養に用いた.

2. 培養細胞の樹立

摘出した腫瘍組織を細切後, 0.25% コラゲナーゼ (Sanko-junyaku, Tokyo, Japan) を加え, 37°C で 30 分インキュベートし細胞を分離した. 分離した細胞は, Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, NY, USA) で 2 回洗浄後, コラーゲンでコートした 25cm² のプラスチック培養瓶 (Iwaki, Chiba, Japan) に移し, 10% 牛胎児血清 (FBS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加した IMDM を使用し, 37°C, 5% CO₂ 下で培養を行った. 培地は 1 週間に 2 回交換し, 細胞が飽和密度に

(平成13年2月7日受理)
岡山大学医学部第一病理学教室
指導: 岡田 茂教授 (岡山大学医学部病理学第一講座)
1) 岡山県立大学保健福祉学部
2) 岡山大学医学部第一病理学教室
論文請求先: 岡山県立大学保健福祉学部
電話: 0866-94-2174 FAX: 0866-94-2174
E-mail: mmori@fhw.oka-pu.ac.jp

達した時、0.2mM EDTAを添加した0.025%プロナーゼ (Ponase-EDTA) (Boehlinger, Mannheim, Germany)で細胞を分散し、 10^5 個細胞を新しい培養瓶に播種した。同様の培養方法で約3か月継代培養を行なって樹立した培養腎癌細胞をRKFe細胞と名づけた。またこのRKFe細胞から限外希釈法によりRKFe-C 1からRKFe-C 6まで6つのクローンを作成した。

3. ラットの正常腎由来細胞

6週令のウイスター系雄ラット (Clea, Tokyo, Japan)の腎臓を摘出し、髄質部と被膜を取り除いた後、細切した。その組織片を0.25%のコラゲナーゼを加えた滅菌試験管に移し、37°C、30分間酵素処理をした。その後IMDMで2回洗浄後、1000回転5分、遠心分離を行い、沈渣表層の白色部をIMDM+10% FBS 培養液に浮遊させ、コラーゲンコートした35mmのプラスチックシャーレ (Corning, Chiba, Japan) に播種し、37°C、5% CO₂下で培養を行った。培養液は週に2回交換をし、週に1回継代培養を行った。この培養細胞をPRC細胞と名づけた。

4. 細胞増殖の測定

細胞の増殖速度を調べるために、25cm²のコラーゲンコートした培養瓶 (Corning) に、RKFe細胞とPRC細胞を 1×10^5 個ずつ播種し、IMDM+10% FBSにて培養した。1, 3, 5, 7日間培養後、Pronase-EDTAにて細胞を剥離し、生存細胞数を血球計算板で算定した。結果は2つのボトルの平均値で求めた。

5. Fe-NTAの細胞毒性試験

RKFe細胞とPRC細胞を、コラーゲンコートした6穴シャーレ (Corning) に 1×10^5 個ずつ播種し、IMDM+10% FBSにて培養した。2日後に、両細胞にFe-NTAを0.5, 1, 2, 5, 10, 20 μ g/mlの濃度で加え、24時間培養した。培養後培地を回収し、培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 量を自動分析装置 (Hitachi Automatic Analyzer 7170) にて測定した。対照として、Fe-NTAを加えずに培養したそれぞれの細胞に、0.3%トリトンX-100 (Wako, Osaka, Japan)を加えたものの培地中

のLDH量を100%とした。

6. 軟寒天培養

35mmシャーレに、0.6%軟寒天 (Sigma)を含むIMDM 2mlを注ぎゲル化させた。その上にRKFe細胞 100 個/mlを含む0.4%軟寒天培地2mlを重ねしゲル化させた。そしてゲルの上に10% FBSを含むIMDM 2mlを重ねし、培養した。培養液は7日毎に交換し、4週間後に位相差顕微鏡下でコロニー形成数を算定した。

7. 腫瘍形成能

RKFe細胞及びRKFe細胞よりクローン化したRKFe-C 6細胞を、 1×10^7 個ずつ、6週令の雌のヌードマウス (BALB/cA jcl-nu) (Clea) 5匹の背部皮下に移植した。移植後11週目に屠殺し、背部腫瘍、肺及び肝臓を取り出し20%ホルマリン液に固定後、組織学的検討を行った。また、腫瘍については一部を電子顕微鏡学的検討に回した。

8. 電子顕微鏡学的検討

飽和密度に達したRKFe細胞及びヌードマウスに移植した腫瘍を、2.5%グルタルアルデヒドで2時間固定、その後1%オスミウム酸で1時間固定した後、エタノールで脱水、エポン812に包埋した。サンプルは薄切後、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7100) にて観察した。

結 果

採取した腎腫瘍は、組織学的には血管を伴った薄い間質で分割された充実性の増殖を示し、中心部は壊死に陥っていた。個々の腫瘍細胞は異型性が強く管腔の形成は見られなかった (図1)。この腎腫瘍より樹立した培養腎癌細胞RKFeは、位相差顕微鏡下では、上皮様の形態を示し、N/C比が大きく、核小体は明瞭であった。また、核の大小不同、多核など異型性が強く、所々で重層化して増殖した (図2)。電子顕微鏡的にもN/C比は大きく、核小体も明瞭で、重層化して増殖し、細胞間に基底膜が見られた。また、所々に細胞間結合装置や微絨毛の形成が見られた (図3)。

図4にRKFe細胞の増殖曲線を示す。1日目には

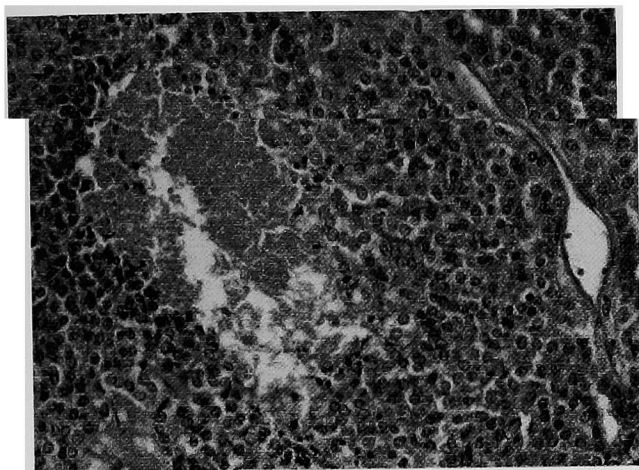


図1 Fe-NTA 誘発腎腫瘍の組織像

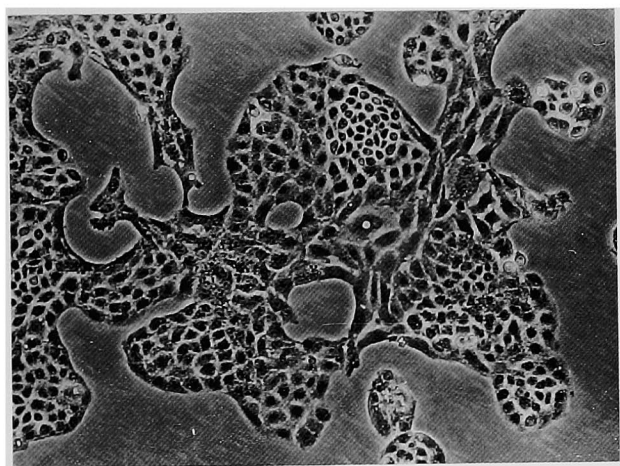


図2 RKFe 培養細胞の位相差像

わずかに減少したが、以後は盛んな増殖を繰り返し、7日目では約21倍の増殖となり、倍加時間は約36時間であった。一方、PRC細胞の倍加時間は約76時間であり、形質転換によってRKFe細胞は増殖速度が約2.1倍増加していた。

図5はFe-NTAの細胞毒性を検討したものである。RKFe細胞のLDH releaseは、Fe-NTA濃度が $1\mu\text{g/ml}$ で5.5%, $20\mu\text{g/ml}$ でも8.0%と低かったのに対し、PRC細胞では、Fe-NTA濃度が $1\mu\text{g/ml}$ の低濃度からLDH releaseは16.7%と亢進し、 $5\mu\text{g/ml}$ では60%以上放出していた。この結果は、RKFe

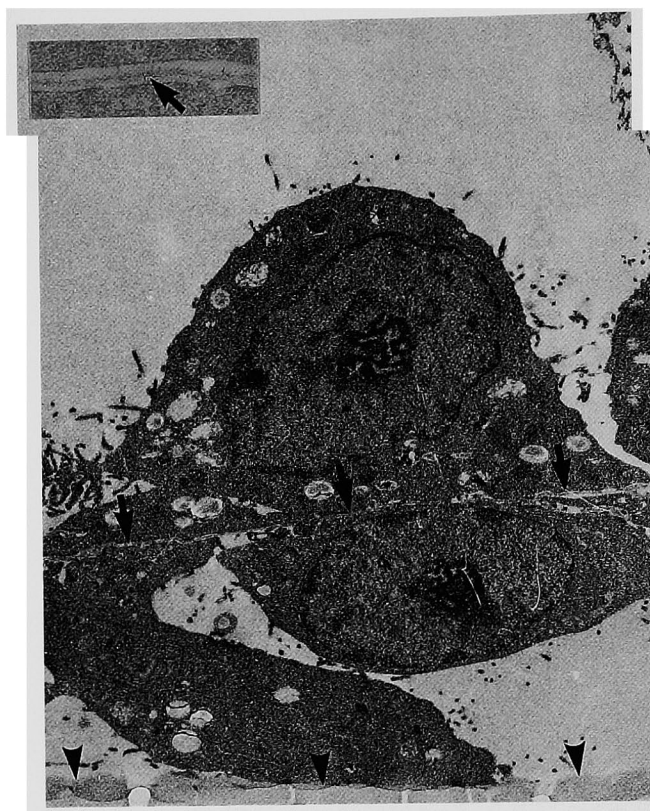


図3 RKFe 培養細胞の透過電顕像（垂直断面）
 $\times 4,900$ 矢印—基底膜形成部位・矢頭—シャーレ面挿入図 基底膜の強拡大 ($\times 27,500$)

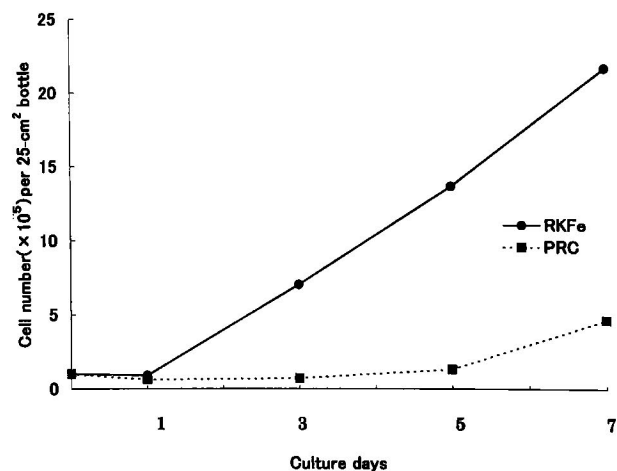


図4 RKFe 細胞の増殖曲線

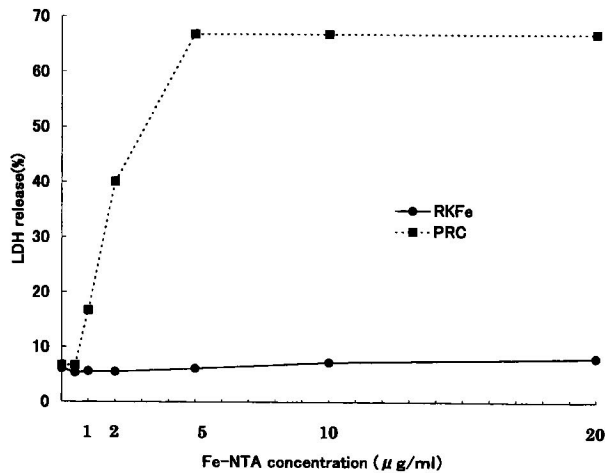


図5 Fe-NTA による細胞傷害

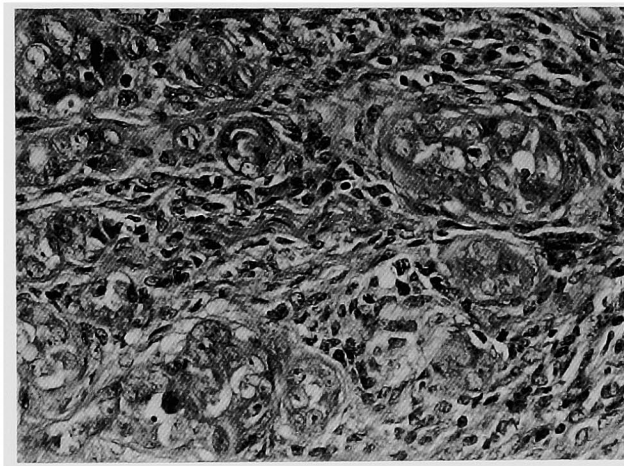
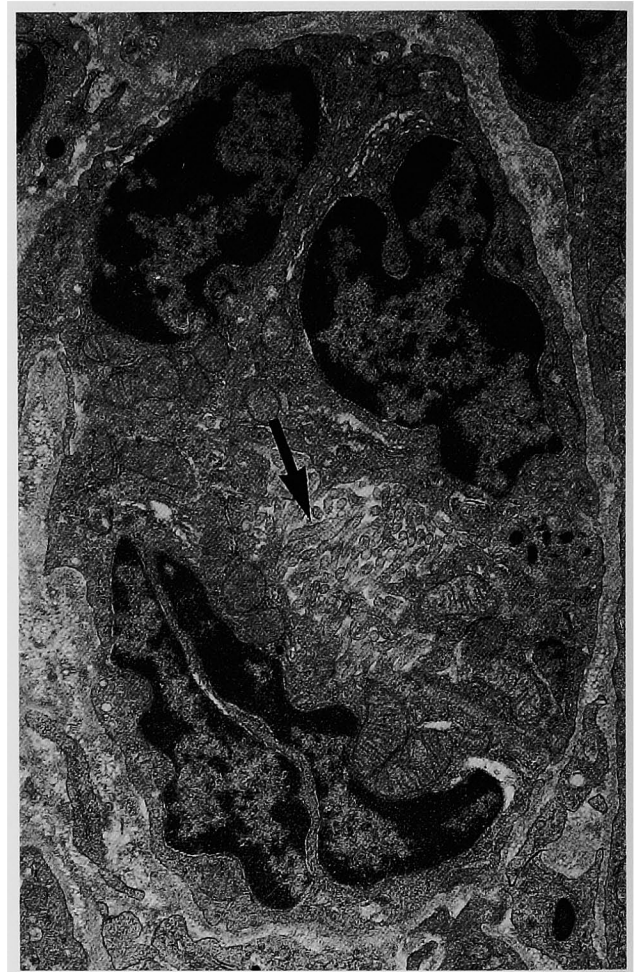


図6 RKFe 細胞ヌードマウス移植腫瘍の組織像

細胞が *in vivo* での頻回な Fe-NTA 投与によって、Fe-NTA に対する抵抗性を獲得していた可能性を示唆していると考ええる。

RKFe 細胞の足場非依存性の性質について soft agar 培養によって検討したところ、4 週間後に 125~325 μm の大きさのコロニーを 7 つ形成し、悪性腫瘍としての性格を有していると考えられた。更に、腫瘍形成能を見るためにヌードマウスに移植したところ、移植 11 週後に、5 匹全部に 1 cm 前後の腫瘍の形成を確認することができた。腫瘍は、組織学的には全体的に線維化が強く、紡錘形細胞が主体の肉腫

図7 移植腫瘍の透過電顕像
×10,000 矢印—管腔面の微絨毛

様部と、大型の細胞が小胞巣を形成して増殖する癌腫様部分とが混在していたが、明らかな腺腔の形成は見られなかった(図6)。肺や肝臓などの検索した臓器には転移巣は確認できなかった。電子顕微鏡的には上皮様部分でわずかながら管腔の形成が見られ、内腔面には微絨毛も観察され、尿細管由来と考えられた(図7)。

また RKFe 細胞をクローン化し樹立した RKFe-C6 細胞を、ヌードマウスに移植した場合では、すべてに腫瘍を形成するとともに、4/5 匹に多数の肺転移巣を確認することができた(図8)。組織学的に

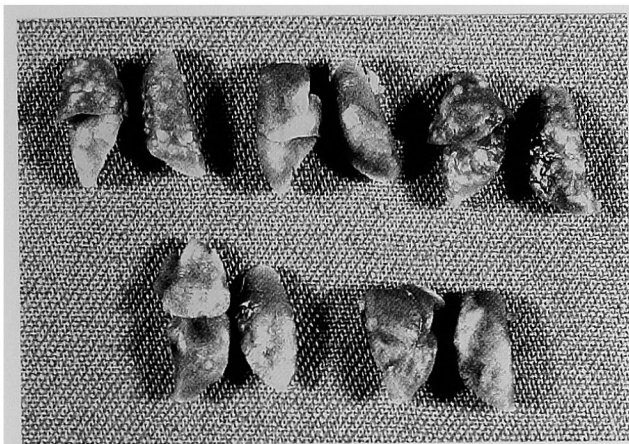


図8 RKFe-C 6細胞移植ヌードマウス肺肉眼所見

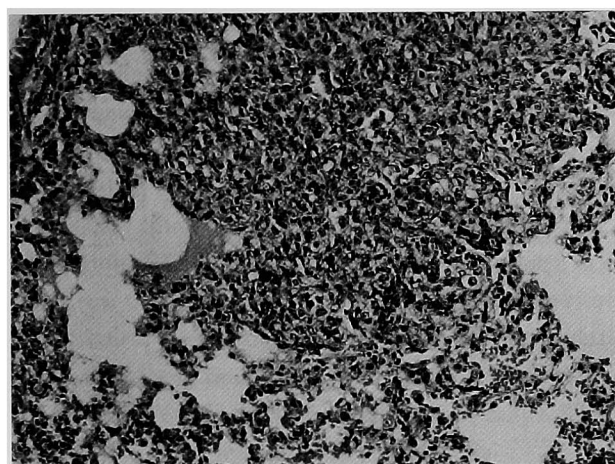


図9 肺転移巣の組織所見

は転移巣は線維化が強く、肉腫様であった(図9)。

考 察

今回樹立したRKFe細胞は、上皮様の性格を有し、培養系において微絨毛を有していることや、ヌードマウスへの移植腫瘍において一部で管腔を形成し、内腔面に微絨毛が見られたことから、尿細管としての性質を有していると考えられた。しかしながら、大部分では肉腫様の増殖を示し、電顕的にも上皮様の性格を示すところが少なかったことから、低分化癌と考えられた。今回の培養に使用したものの腎腫瘍も、組織学的には腺管の形成が見られず低分化で

あり、RKFe細胞の分化が低いのは、このような低分化な癌由来であるからであろうと考えられた。Ebinaら¹⁰⁾のFe-NTA腹腔内投与により形成された腫瘍は、充実性で、蜂巣状のパターンを示しており、また岡田ら¹¹⁾のは、ヒトの腎癌によく見られる明細胞や顆粒細胞のパターンがあることを報告しているが、我々が樹立したRKFe細胞はそれよりもっと低分化な細胞であった。

またヌードマウスへの移植においては、RKFe細胞では転移巣は確認できなかったが、クローン化したRKFe-C6細胞では多数に肺転移巣が確認できた。これは親株であるRKFe細胞が不均一な腫瘍細胞の集団であり、その中で転移性の高いクローンを得ることが出来たためと考える。

RKFe細胞は、PRC細胞と比較すると、Fe-NTAの細胞毒性に対する耐性を獲得していた。これはFe-NTAの反復腹腔内投与により耐性を獲得したと思われるが、この耐性獲得のメカニズムは興味ある問題である。Walkerら¹²⁾はN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineを用いて、試験管内で高分化な腎細胞癌を作成しているが、このような細胞と比較することにより、Fe-NTAによる発癌のメカニズムや、Fe-NTAに対する耐性の獲得メカニズムの解明等が可能になると考えられる。今後はこれらのことについて検討を重ねていきたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、特に細胞培養においてご協力いただきました渡辺洋子技術員に謝意を表します。

文 献

- 1) Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y and Seno S: Induction of diabetes in animal by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate; A model of experimental hemochromatosis. *Amer J Pathol* (1979) **95**, 663-673.
- 2) 岡田 茂, 翠川 修: Fe-nitrilotriacetate (Fe-NTA) によるラット腎腺癌の発生. *内科宝函* (1982) **29**, 485-491.
- 3) Okada S, Hamazaki S, Akiyama T and Liu M: Iron-induced carcinogenesis in experimental ani-

- mals : A free radical mechanism of DNA damage and carcinogenesis. *Oxidative Stress and Aging*. Cutler RG, Packer L, Bertram J and Mori A eds. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland (1995) pp. 89—99.
- 4) Hamazaki S, Okada S, Ebina Y, Li J-L and Midorikawa O : Effect of dietary vitamin E on ferric nitrilotriacetate-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* (1988) **92**, 500—506.
 - 5) Okada S, Hamazaki S, Ebina Y, Li J-L and Midorikawa O : Nephrotoxicity and its prevention by vitamin E in ferric nitrilotriacetate-promoted lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. (1987) **922**, 28—33.
 - 6) Toyokuni S and Sagripanti JL : DNA single- and double-strand breaks produced by ferric nitrilotriacetate in relation to renal tubular carcinogenesis. *Carcinogenesis* (1993) **14**, 223—227.
 - 7) Nakamoto S, Yamanoi Y, Kawabata T, Sadahira Y, Mori M and Awai M : Lipid peroxidation and cytotoxicity of Ehrlich ascites tumor cells by ferric nitrilotriacetate. *Biochim Biophys Acta* (1986) **889**, 15—22.
 - 8) Hamazaki S, Okada S, Li JL, Toyokuni S and Midorikawa O : Oxygen reduction and lipid peroxidation by iron chelates with special reference to ferric nitrilotriacetate. *Arch Biophys* (1989) **272**, 10—17.
 - 9) Toyokuni S, Sagripanti JL and Hitchins VM : Cytotoxic and mutagenic effects of ferric nitrilotriacetate on L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Lett* (1995) **88**, 157—162.
 - 10) Ebina Y, Okada S, Hamazaki S, Ogino F, Li J-L and Midorikawa O : Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum-nitrilotriacetate complexes in rats. *J Natl Cancer Inst* (1986) **76**, 107—113.
 - 11) Okada S, Hamazaki S, Ebina Y and Fujioka M : Nephrotoxicity and induction of the renal adenocarcinoma by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) in rats ; In *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins*. Urushizaki I, Aisen P, Litowsky I, and Drysdale JW, eds. Elsevier, New York (1983) pp. 473—478.
 - 12) Walker C and Ginsler J : Development of a quantitative in vitro transformation assay for kidney epithelial cells. *Carcinogenesis* (1992) **13**, 25—32.

**Establishment and characterization of
cell line from ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) – induced
rat renal cell carcinoma**

Chikako KAKEHASHI¹⁾, Masaharu MORI¹⁾, Teruyuki KAWABATA²⁾ and Shigeru OKADA²⁾

¹⁾Department of Nursing, Faculty of Health and Welfare Science,

Okayama Prefectural University,

Soja 719-1197, Japan

²⁾Department of Pathology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700-8558, Japan

(Director: Prof. S. OKADA)

The characteristics of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced rat renal cell carcinoma by intra-peritoneal administration and the effects of hormones on the tumor have been studied *in vivo*. However, to our knowledge there have been no reports on the characteristics of the tumor cells. In this study, we established a tumor cell line from Fe-NTA induced rat renal tumor and investigated tumor cell characteristics. The tumor cell line RKFe was established from Fe-NTA induced rat renal tumor by collagenase digestion. RKFe showed epithelial morphology in culture, and had microvilli and basement membranes under electron microscopy. RKFe cells acquired tolerance to the cytotoxicity of Fe-NTA. They also grew in soft agar culture and formed tumors by the inoculation of cells into nude mice. Histologically, transplanted tumors showed poorly differentiated adenocarcinoma with several tubular structures. A subclone of RKFe, named RKFe-C6, showed metastasis to lungs. The RKFe cell line may be useful for studying the characteristics of Fe-NTA induced rat tumor cells.