



Mechanisms of estrogen action on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells in an improved culture medium

古谷, 義彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-10-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1587

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001587>

※ 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。



氏名・(本籍)	ふる や よし ひこ 古 谷 義 彦 (大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	博ろ第1276号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成3年10月9日
学位論文題目	Mechanisms of Estrogen Action on the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells in an Improved Culture Medium (新しい培地に於けるヒト乳癌細胞MCF-7の増殖にエストロジェンが与える影響の機序について)
審査委員	主査 教授 斎藤 洋一 教授 望月 真人 教授 守殿 貞夫

論文内容の要旨

I. 緒言

Estradiol (E_2) と Tamoxifen (TAM) が, ヒト乳癌培養株細胞MCF-7とHBC-4の細胞増殖に及ぼす影響を新しい培地下で調べた。女性ホルモン (E_2) は, 乳癌の発生及び増殖に重要な役割を担っている。また抗エストロジェン剤TAMは乳癌の内分泌療法における代表的な薬剤である。MCF-7を代表とするヒト乳癌培養細胞において, 種々の培養条件下において E_2 及びTAMが増殖に及ぼす影響が, 多くの研究者によって調べられている。しかしその結果は, 増殖を維持する為培地に添加される血清の複雑な作用の為, 一定の結果が得られていない。今回我々は, MCF-7の増殖を安定に維持する無血清培地を作製し, 血清の影響を除外し E_2 及びTAMがMCF-7の増殖に及ぼす影響を調べ, E_2 及びTAMにより増殖が影響されないHBC-4を対照としてMCF-7の増殖に E_2 が及ぼす影響の機序について調べた。

II. 対象及び方法

1) DCFBS

胎児ウシ血清 (FBS) に10分の1量のデキストラン-活性炭 (DC) (5 g/100ml, Tris-HCl Ph7.4) を添加し, 20℃で2時間, 内因性エストロジェンを吸着した。この操作は2回行った。

2) RIA

Estrone (E_1) 及び Estriol (E_3) は Wien 研究所の test set, E_2 は第一研究所の E_2 Assay kit を用いて血清成分の E_1 , E_2 および E_3 濃度を測定した。

3) AIT培地

T基礎培地に insulin $2\mu\text{g/ml}$, transferrin $2\mu\text{M}$, ethanol-amine $2\mu\text{M}$ 及び selenite 25nM を添加した, ITES-T培地にグロブリン除去アルブミンを 3mg/ml 添加した。

4) ヒト乳癌培養株細胞

MCF-7は Soule らにより樹立された代表的な Estrogen receptor 陽性のヒト乳癌培養細胞株であり, HBC-4はガン研究所にて河口らにより樹立されたヒト乳癌培養株細胞である。

5) 細胞増殖実験

MCF-7及びHBC-4は10% FBS添加 Waymouth MB752/1に 1×10^4 個/1 mlの細胞浮遊液を作製し Corning 24Well-plate に1穴あたり1 ml播種し24時間静置した。実験開始後実験培地に培地交換し, 24時間毎に培地交換を行った。細胞数は, 4穴毎に Trypsin-EDTA にて浮遊せしめ Coulter counter にて測定した。

III. 結果

1) 血清成分のエストロゲン濃度

FBSの E_2 濃度は 230pM であった。DC処理により $<55\text{pM}$ となった。グロブリン除去アルブミンは 50mg/ml の溶液においても $<55\text{pM}$ であった。一方, ウシ血清の55-70%硫酸分画 35mg/ml においては 120pM であった。

2) DCFBSおよびsGFがMCF-7の増殖におよぼす影響

血清成分を加えない培地ITES-T培地においてはMCF-7は doubling time 2.0日の増殖を5日間維持するがそれ以降は増殖が維持されない。この培地に血清成分sGFを 1mg/ml (または1%DCFBS)添加すると doubling time 1.7日の安定した増殖がえられ, さらに E_2 100pM を加えると doubling time 1.1日と増殖が刺激された。このようにDCFBSやsGFをITES-T培地に添加することにより安定した増殖がえられるがDCFBSやsGFの濃度を上げると濃度依存性に増殖が抑制され, 10%DCFBSおよび 6mg/ml sGFは1%DCFBS, 1mg/ml sGFに比し4日目においてそれぞれ39%, 37%の増殖抑制を認めた。添加する血清成分により培地中の E_2 濃度が, それぞれDCFBSでは $<0.55\text{pM}$ より $<5.5\text{pM}$, sGFでは 3.4pM より 20pM と上昇しているにもかかわらずこの増殖抑制作用が見られた。 E_2 添加により増殖が影響されないHBC-4に於いてはDCFBS, sGFの増殖抑制作用は認めず, 濃度を上昇させると軽度の増殖刺激作用をみとめた。一方, TAM 10^{-6}M 添加によりMCF-7の増殖は血清成分の濃度が低い場合は増殖抑制作用が見られるが, 血清成分の濃度が高い場合にはTAM 10^{-6}M 添加により増殖がさらに抑制されることがなくかえって血清成分の持つ増殖抑制作用とTAMの増殖抑制作用が相殺された。

3) 他の血清成分

DCFBSやsGFのように安定した増殖を維持させる他の血清成分を検索した。より純粋なウシアルブミン(BSA-V)をITES-T培地に添加するとDCFBS等と同様に濃度依存性の増殖抑制作用を認めた。一方, さらに純粋なグロブリン除去アルブミンを添加すると増殖抑制作用を認めなかった。

4) AIT培地

ITES-T培地にグロブリン除去アルブミンを3 mg/ml添加した培地をAIT培地とした。このAIT培地に於いてMCF-7は doubling time 1.6日の安定した増殖を示しE₂ 100pM添加により doubling time 1.1日と増殖が刺激された。

また1 μM TAMにより4日間で死滅するが、この作用は100pM E₂により中和された。1 μMのTAM存在下では、E₂が同様の増殖刺激を得るには約50倍の濃度を要した。

IV. 考察

新しいAIT培地は、血清のもつ複雑な作用を除外し且つMCF-7細胞を安定に増殖させる優れた培地である。これまでの報告では、MCF-7に於いてE₂添加によって増殖が促進されたという初期の報告に対する追試が多くの研究者によって再現性が得られていない。その理由として細胞自体の反応性の低下、細胞のもつ 'memory effect' , 培地に添加する血清のLotの違いや濃度の違い等が挙げられている。また、血清因子の添加なしではE₂によって反応する事が稀である。グロブリン除去アルブミンを添加したAIT培地において、MCF-7は、3 pMのE₂にて増殖が促進され0.2-10nMで最大増殖促進作用を認めた。SotoらはMCF-7に対し血清が細胞増殖抑制作用がありE₂にはその作用の中和作用がありE₂の細胞増殖刺激作用は中和作用による見かけ上のものであると報告した。しかし今回100pMのE₂が、血清増殖抑制作用の中和だけではなく増殖を直接刺激することを認めた。

血清増殖抑制因子は、TMAの増殖抑制作用と相互作用を持つ。すなわち、血清増殖抑制因子のないAIT培地に於いてTAMはMCF-7に対し殺細胞作用を示すが、血清増殖抑制因子がある状態では、TAMの増殖抑制作用は軽減される。血清増殖抑制因子の濃度を上げるとTAMの増殖抑制作用が弱くなった。またこの増殖抑制作用は、E₂に反応しないHBC-4においては見られなかった。この事より、血清の増殖抑制作用はE₂反応性であるMCF-7に特異的なものであると考えられた。

V. 結語

ヒト乳癌培養細胞MCF-7に於てE₂, TAM及び血清が増殖に与える影響を調べた所次の結果を得た。

- 1) グロブリン除去アルブミンはMCF-7の増殖に影響を与えないが、他の血清成分BSA-V, DC FBSおよびsGFは濃度依存性に増殖を抑制した。
- 2) E₂にはこの血清の増殖抑制作用を中和する作用と、それ以外直接増殖を刺激する dual action を認めた。
- 3) TAMはMCF-7に対し殺細胞性に働くが、血清の増殖抑制作用と相殺する作用を認めた。

論文審査の結果の要旨

乳癌培養細胞を用いて Estradiol (以下E₂) や Tamoxifen (以下TAM) の作用機序の解明を行

う場合、従来の種々の培養条件下では培地に添加される血清の複雑な作用のため一定の結果が得られていない。

本研究者は無血清培地を新しく作製し、Estrogen receptor 陽性のヒト乳癌培養細胞株MCF-7とHBC-4細胞株を用いてこの問題解明を目的として実験を行った。

すなわち、胎児ウシ血清(FBS)およびデキストラン活性炭処理後胎児ウシ血清(DCFBS)並びにグロブリン除去アルブミンの E_2 濃度を測定し、これが55pM以下であることを確認した。一方、血清成分を加えないITES-T培地においてMCF-7と、HBC-4の doubling time を測定した。

これらを基準としてDCFBSおよびSGF、ウシアルブミン、グロブリン除去アルブミンの各濃度添加時の各細胞の doubling time を測定し検討した。

これらの結果からITES-T培地にグロブリン除去アルブミン 3 mg/ml添加したAIT培地が血清のもつ複雑な作用を除外しかつMCF-7細胞を安定に増殖させる優れた培地であることを確認した。ついでこのAIT培地に於いてMCF-7は doubling time 6日の安定した増殖を示し E_2 100pM添加により doubling time 1.1日と増殖が刺激された。一方、1 μ M TAMの添加によりこの細胞は4日間で死滅するが、この作用は100pMの E_2 により中和された。また、1 μ MのTAM存在下では、 E_2 が同様の増殖刺激を得るには約50倍の濃度を要した。

これらの結果から次の様な結論を導き出した。

- 1) グロブリン除去アルブミンはMCF-7の増殖に影響を与えないが、他の血清成分BSA-V、DCFBSおよびsGF濃度依存性に増殖を抑制した。
- 2) E_2 にはこの血清の増殖抑制作用を中和する作用と、それ以外直接増殖を刺激する dual action を認めた。
- 3) TAMはMCF-7に対し殺細胞性に働くが、血清の増殖抑制作用と相殺する作用を認めた。

本研究は乳癌細胞について、そのホルモン療法の作用機序について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった新しい培地を用いての解析において重要な知見を得たものとし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。