

# Effects of Sex Steroids on Human Breast Cancer cell LineZR75-1 and Human Endometrial Cancer Cell Line RL95-2

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8516">http://hdl.handle.net/2297/8516</a>

## 細胞培養系におけるホルモン感受性株 ZR75-1・RL95-2 の 細胞増殖に及ぼす各種性ステロイドの影響について

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

三 輪 正 彦

各種性ステロイドの細胞培養系における細胞増殖に及ぼす影響についてホルモン感受性を有する乳癌株細胞 ZR75-1 と子宮体癌株細胞 RL95-2 を用いて検討した。各濃度のエストラジオール (estradiol,  $E_2$ ), テストステロン (testosterone, T), プログステロン (progesterone, P) およびデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) を, 無処理血清含有培地, デキストラン・チャコール処理血清含有培地または無血清培地にそれぞれ単独あるいは併用で添加し, 細胞増殖に及ぼす効果をみた。ZR75-1 については, 無処理血清含有培地で培養した場合,  $E_2$  および T 添加ではホルモン無添加対照群 (対照群) に比べて軽度の細胞増殖抑制効果が認められた。デキストラン・チャコール処理血清含有培地では, 対照群に比べて  $E_2$  と DHA の細胞増殖促進作用を認めたが,  $E_2$  の促進効果が  $10^{-11}$ M から  $10^{-6}$ M の広い濃度範囲で認められたのに対し, DHA の促進効果は高濃度の  $10^{-6}$ M においてのみ限定して認められた。T 添加では有意の変動を示さなかった。DHA  $10^{-6}$ M 濃度を中心とした他ステロイド各種濃度との併用添加実験では,  $E_2$  と DHA の同時添加の場合その増殖促進効果はそれぞれ単独の場合とほぼ同程度であった。 $E_2$   $10^{-6}$ M または DHA  $10^{-6}$ M 単独添加時に認められた増殖作用は, T の併用添加により抑制されたが, その抑制程度は  $E_2$ +T と DHA+T 併用両群では同程度であった。無血清培地では,  $E_2$  と DHA の増殖効果はデキストラン・チャコール処理血清含有培地使用時と同様の濃度において認められた。これに対し, T および P の添加では細胞増殖抑制効果が認められ, その効果はそれらの添加濃度の上昇に伴って強い抑制効果を示した。 $E_2$   $10^{-6}$ M または DHA  $10^{-6}$ M の細胞増殖促進効果は, 低濃度の P 併用添加でさらに促進され, 高濃度の P 併用添加では逆に抑制された。その P の促進および抑制の程度は  $E_2$ +P と DHA+P の両群では同程度であったが, 併用の場合には P 単独添加とは明らかに異なる細胞増殖パターンを示した。なお, 子宮体癌株細胞 RL95-2 では, 各種性ステロイドの添加において ZR75-1 にみられたような細胞増殖促進効果は認められず,  $E_2$ , T および P では高濃度 ( $10^{-6}$ M) においてのみ抑制効果が認められた。以上の結果から, 乳癌と子宮体癌細胞株は, 性ステロイドに対する反応性は異なるが, ZR75-1 の場合  $E_2$  と高濃度の DHA は増殖促進的に作用し, T と P は抑制的に働くものと考えられた。なお, 腫瘍増殖に及ぼす DHA などの副腎性アンドロゲンの影響については, 生体内における代謝や間質細胞に対する影響など総合的に究明すべきものと思われた。

**Key words** sex steroids, breast cancer, endometrial cancer, cell culture, cell growth

子宮体癌と乳癌はともにホルモン依存性の癌であり, その発生と増殖にはエストロゲン (estrogens) をはじめとする女性特有のホルモン環境が密接に関連していると考えられている。また, 両疾患ともに近年その頻度が増加しているとされ, 疫学的調査から環境因子とくに脂肪摂取量との関連性が指摘されており, また肥満, 高血圧, 糖尿病といった疾患を有する患者に多いとされている。さらに, 子宮体癌と診断された患者の場合にはその後乳癌の合併する頻度が高く<sup>10)</sup>, 逆に乳癌の診断を受けた患者には子宮癌や卵巣癌の合併する頻度が高いと報告され共通点も多い<sup>9)~11)</sup>。

一方, 癌患者においてはしばしば17ケトステロイド (17-ketosteroids, 17-KS) の尿中排出量の減少がみられると報告されている。Bulbrook ら<sup>6)</sup>は乳癌患者についての前方視的研究

(prospective study) において, 尿中副腎性アンドロゲン (adrenal androgens) 代謝物であるアンドロステロン (androsterone) やエチオコラノロン (etiocolanalone) が非癌対照女性群に比べ有意に低値であったと報告しているが, その後の報告では異議を唱える意見もあり, 今日なお乳癌や子宮体癌と副腎性アンドロゲンの関連性について明確な結論は得られていない<sup>7)~10)</sup>。

そこで, 乳癌株細胞および子宮体癌株細胞の増殖に対する性ステロイドの影響を検索する目的で, 細胞培養系においてエストラジオール (estradiol,  $E_2$ ), テストステロン (testosterone, T), プログステロン (progesterone, P) と副腎性アンドロゲンであるデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) の腫瘍細胞増殖に及ぼす効果を比較検討した。

平成5年12月13日受付, 平成6年1月4日受理

Abbreviations: 17-KS, 17-ketosteroids; DCC-FBS, dextran coated charcoal treated fetal bovine serum; D/F M, Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham; DHA, dehydroepiandrosterone; DHA-S, dehydroepiandrosterone-sulfate; DMBA, 7, 12-dimethylbenzanthracene; DMSO, dimethylsulfoxide;  $E_2$ ,

## 材料および方法

## I. 培養細胞

実験に用いた樹立細胞株 (established cell line) は乳癌細胞株 ZR75-1 株 (大日本製薬, 大阪) と子宮体癌細胞株 RL95-2 株 (大日本製薬) である。

ZR75-1 株は, 1978年に Engel らにより樹立報告された細胞株であり, 進行乳癌女性の腹水から採取された浸潤性乳管癌 (infiltrating ductal carcinoma) を起源としている<sup>11)</sup>。購入時の世代数は96世代であった。

RL95-2 株は, 1983年に Way らにより樹立報告された細胞株であり, 子宮体部中等度分化型腺扁平上皮癌 (moderately differentiated adenosquamous carcinoma) を起源としている<sup>12)</sup>。購入時の世代数は144世代であった。

## II. 培地

1. ロズウェルパークメモリアルインスティテュート-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, RPMI-1640) 培地

RPMI-1640 粉末培地は Flow (Scotland, U. K.) より購入し, イオン交換樹脂にて精製しさらに3回蒸留した水にて溶解し, これに炭酸水素ナトリウム水溶液 (sodium bicarbonate, 大塚製薬, 東京) を 1.2mg/ml, 硫酸カナマイシン (kanamycin sulfate, 萬有製薬, 東京) を 100 $\mu$ g/ml および HEPES (和光純薬工業, 大阪) を 2.38mg/ml (10mM) の割合で加えた。pH7.2 に調整した後, メンブランフィルター (孔径 0.22 $\mu$ m, Corning, New York, U.S.A.) を用いて滅菌濾過滅菌した。

なお, この培地には pH 指示薬として終濃度 5 $\mu$ g/ml のフェノールレッド (phenol red) が含まれている。

2. 10%あるいは5%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) 加 RPMI-1640 培地

FBS (Gibco Limited, Scotland, U. K.) を非働化せずに10%あるいは5%濃度で前記の RPMI-1640 培地に添加して作成した。

3. 5%デキストラン・チャコール処理 (dextran coated charcoal treatment, DCC)-FBS 加 RPMI-1640 培地

DCC は Darbre ら<sup>13)</sup> の方法に準じて行なった。すなわち, デキストラン (dextran T-70, Farmacia, Upsala, Sweden) 0.1g とチャコール (Norit A, 和光純薬工業) 1g をリン酸緩衝塩水溶液 (phosphate-buffered saline Dulbecco's formula without magnesium and calcium, PBS) (大日本製薬) に混ぜ, これを毎分2500回転10分間遠心し, その上清を捨てた後 FBS100ml を加えて, 55 $^{\circ}$ C の恒温槽内で30分間攪拌しながら血清に含まれる内因性ステロイドを除去した。再度遠心し, その上清をメンブランフィルターを用いて濾過滅菌した。これを分割して, それぞれを-80 $^{\circ}$ C で凍結保存し, 使用時に5%濃度で RPMI-1640 培地に添加して用いた。

なお, 処理後の血清中ホルモン濃度をラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay) (BML, 東京) 法で測定したところ, E<sub>2</sub> は 10pg/ml 未満, T は 5.0ng/dl 未満, プロラクチンは 0.5ng/ml 未満, P は 0.1ng/ml 未満, DHA は 0.2ng/ml 未満とそれぞれ測定感度以下であった。

## 4. 無血清培地

無血清培地として使用した最少必須培地 (minimal essential medium, MEM) ダルベッコ・ハム F12 等比混合培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham, D/FM) は Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.) より購入した。なお, これには終濃度 8.6 $\mu$ g/ml のフェノールレッドと 15mM の HEPES が含まれている。D/FM の作成は RPMI-1640 培地作成の時と同様に蒸留水で溶解し, 炭酸水素ナトリウム 1.2mg/ml, 硫酸カナマイシン 100 $\mu$ g/ml の割合で加えた。使用直前に牛豚由来インスリン (bovine insulin, Sigma), トランスフェリン (transferrin, Sigma), 亜セレン酸ナトリウム (sodium selenite, Sigma), 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, 新田ゼラチン, 東京) をそれぞれ終濃度が 1 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 25nM, 1mg/ml になるように添加した。

## III. 実験操作

## 1. 継代培養

購入した細胞を, まず37 $^{\circ}$ C, 5%炭酸ガス, 95%空気の条件下の炭酸ガス培養器 (model 3157, Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, U.S.A.) で, 10%FBS 加 RPMI-1640 培地を使用して培地を交換しながら増殖せしめた。細胞が定常期 (stationary phase) となった段階で, 培養液を0.02%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 和光純薬工業) 加 PBS に置換静置し, その後これを捨て0.25%トリプシン (trypsin) (Difco Lab, Detroit, Michigan, U.S.A.) 加 PBS を加えて細胞分散を行ない継代培養した。分散した細胞の一部は, 10%FBS 加 RPMI-1640 培地に10%濃度でジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (Sigma) を加えた保存液で凍結させて液体窒素中に保存した。

ホルモン添加実験に際しては, まず保存した細胞を急速解凍し, 10%FBS 加 RPMI-1640 培地で希釈後遠心し, 同培地で浮遊せしめフラスコ内で培養した。DMSO の影響がとれるまで適宜培地交換と継代培養を繰り返し, 最低8世代経過後に実験に供した。また, 長期の継代培養にもとづく株細胞の変化を極力少なくするために, 解凍後24世代以内の細胞を使用した。

## 2. ホルモン添加実験

10%FBS 加 RPMI-1640 培地を使用して単層培養された ZR75-1 あるいは RL95-2 細胞を0.02% EDTA 加 PBS と 0.25%トリプシンを用いて細胞分散し, 位相差顕微鏡にて概ね単個細胞となっていることを確認した後, その一部を用いて自動血球計算機 (Coulter Counter model ZM, Coulter Electronics Limited, Luton, U. K.) で細胞数を計測した。残りは5%DCC-FBS 加 RPMI-1640 培地で希釈して 5 $\times 10^4$ ~1 $\times 10^5$  個/ml の細胞濃度とし, 2ml ずつプラスチック製ペトリ皿 (Falcon No. 3013, Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.) に分注して, 炭酸ガス培養器に静置した。これを培養開始日とした。培養2日目に5%DCC-FBS 加 RPMI-1640 培地を除去して, あらかじめエタノールに溶解し作成しておいた E<sub>2</sub>, T, P, および DHA 各種ステロイド (すべて Sigma より購入) を, それぞれの実験に際して5%FBS 加 RPMI-1640 培地, 5%DCC-FBS 加 RPMI-1640 培地または無血清培地に混合し, これに置換した。2~3日毎に, 新たに作成したステロイド添

estradiol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; P, progesterone; PBS, phosphate-buffered saline; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute-1640; T, testosterone; 対照群, ホルモン無添加対照群

加培地で培養液の交換を行ないながら細胞増殖に及ぼす各種ステロイドの影響を検索した。各計測日に細胞をペトリ皿より分散させ、細胞数を計測した。

なお、予備実験において各種ステロイドの溶解に用いたエタノールは0.1または0.2%の割合で各培地に添加した場合、その増殖曲線はエタノール未添加の場合と一致しており、0.2%以下のエタノールはその増殖に影響しないことを確認した。また、同一の実験をそれぞれ2回以上行ない、その再現性について検討した。

#### V. 統計学的検討

各実験の有意差検定には、パートレット検定 (test for homogeneity of variance, Bartlett test) にて各群の分散が均一であることを確認した後、一元配置分散分析 (one way analysis of variance, ANOVA) を行なった。さらに、チューキー (Tukey) 法またはボンフェローニ (Bonferroni) 法による多重比較検定法 (multiple comparison test) を用いて各群の比較を行なった。なお、有意水準を5%未満とした。

### 成 績

#### 1. ZR75-1 株およびRL95-2 株の細胞増殖速度

##### 1. ZR75-1 株

ZR75-1 株を 10%FBS 加 RPMI-1640 培地および 5%FBS 加 RPMI-1640 培地中で17日間培養したところ、細胞数は指数関数的に増加し、その倍加時間 (doubling time) はそれぞれ約60時間と約90時間であった (図1)。また、この ZR75-1 株を

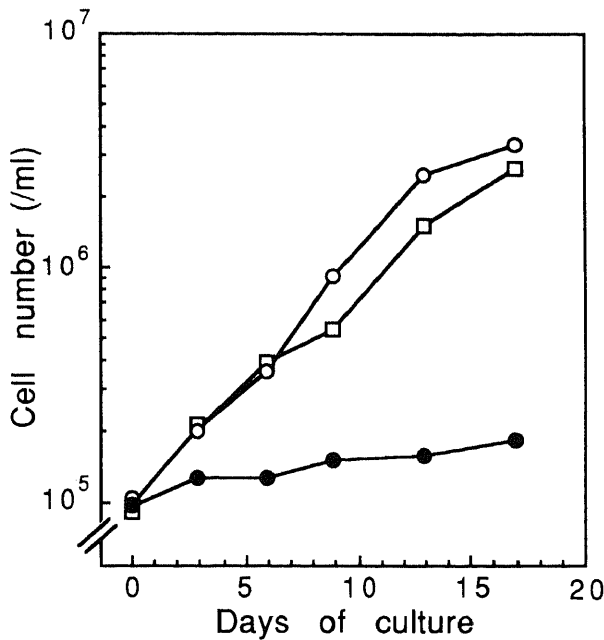


Fig. 1. Growth curves of ZR 75-1 cells cultured in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (○), 5% FBS RPMI-1640 (□), and 5% dextran coated charcoal (DCC) treated FBS RPMI-1640 (●). ZR 75-1 cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were seeded onto 35 mm dishes in 2 ml medium. The medium was removed 3 days later, and cells were incubated with the indicated medium. Medium changes were every 3 days thereafter. Each value represents the mean of triplicate culture dishes. Standard deviations were less than 5%.

5%DCC-FBS 加 RPMI-1640 培地で培養した場合の細胞の倍加時間は13~15日間と増殖の遅延がみられたが、この場合においても実験期間中の細胞数は指数関数的に増加するものとみなされた (図1)。

##### 2. RL95-2 株

RL95-2 株を 10%FBS 加 RPMI-1640 培地、5%FBS 加 RPMI-1640 培地および 5%DCC-FBS 加 RPMI-1640 培地中で17日間培養したところ、その細胞数の増殖曲線は図2に示すごとくであり、培養2日間までは遅延期 (lag phase)、2日目から8日目までは対数増殖期 (logarithmic growth phase)、14日目以降は定常期とみなされた。対数増殖期における倍加時間は10%FBS 加 RPMI-1640 培地約28時間、5%FBS 加 RPMI-1640 培地28時間、5%DCC-FBS 加 RPMI-1640 培地中では31時間であった。

これらの増殖曲線に関する成績から、今回の実験では、ZR75-1 株に対しては細胞接種後8日目または11日目に、RL95-2 株の場合には8日目に、細胞数を計測し比較検討した。

#### II. ZR75-1 株細胞の細胞増殖に及ぼす各種性ステロイドの影響

##### 1. 5%FBS 加 RPMI-1640 培地における性ステロイド投与の影響

5%FBS 加 RPMI-1640 培地において  $E_2$ , T および DHA 各種濃度添加の細胞増殖に及ぼす影響について検討した (図3)。ホルモン無添加対照群 (対照群) に比べ、 $E_2$  添加では  $10^{-10}M$ ,  $10^{-9}M$ ,  $10^{-8}M$ ,  $10^{-5}M$ , T 添加では  $10^{-9}M$ ,  $10^{-8}M$ ,  $10^{-7}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-5}M$  において細胞増殖の抑制が認められた ( $P < 0.05$ )

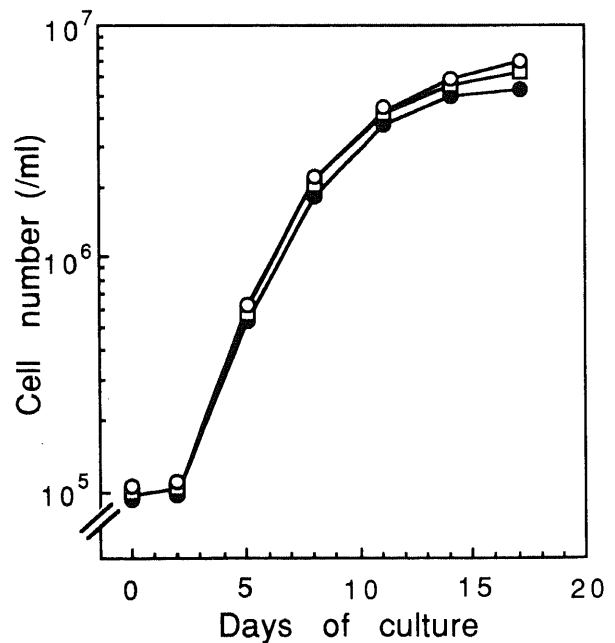


Fig. 2. Growth curves of RL 95-2 cells cultured in the presence of 10% FBS RPMI-1640 (○), 5% FBS RPMI-1640 (□), 5% DCC-FBS RPMI-1640 (●). RL 95-2 cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were seeded onto 35 mm dishes in 2 ml medium. The medium was removed 2 days later, and cells were incubated with indicated medium. Medium changes were every 3 days thereafter. Each value represents the mean of triplicate culture dishes. Standard deviations were less than 5%.

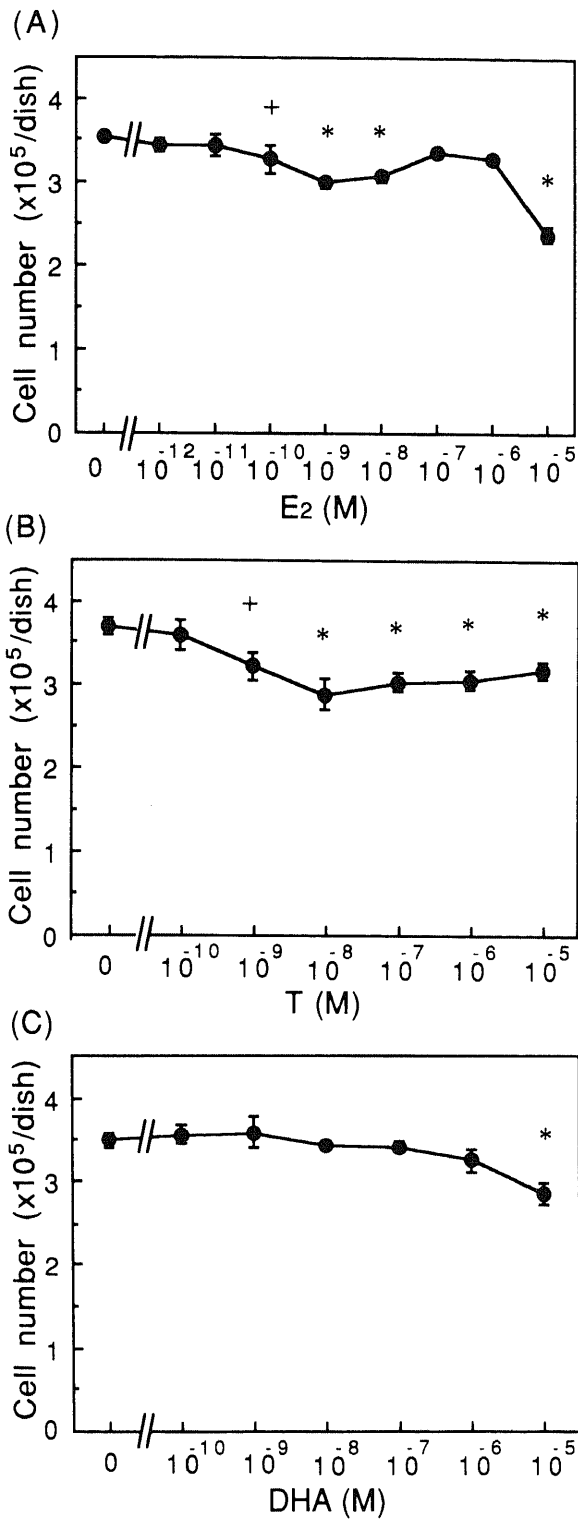


Fig. 3. Effect of increasing concentrations of steroids on the proliferation of ZR 75-1 cells in 5% FBS RPMI-1640. Cells were plated at an initial density of  $1 \times 10^6$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, estradiol (E<sub>2</sub>) (A), testosterone (T) (B), or dehydroepiandrosterone (DHA) (C) was added with 5% FBS RPMI-1640 at the indicated concentrations. Cell numbers were determined after 11 days with a Coulter Counter. Control consisted of vehicle alone. Each value represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD. Statistically significant difference from the control: +, P < 0.05; \*, P < 0.01.

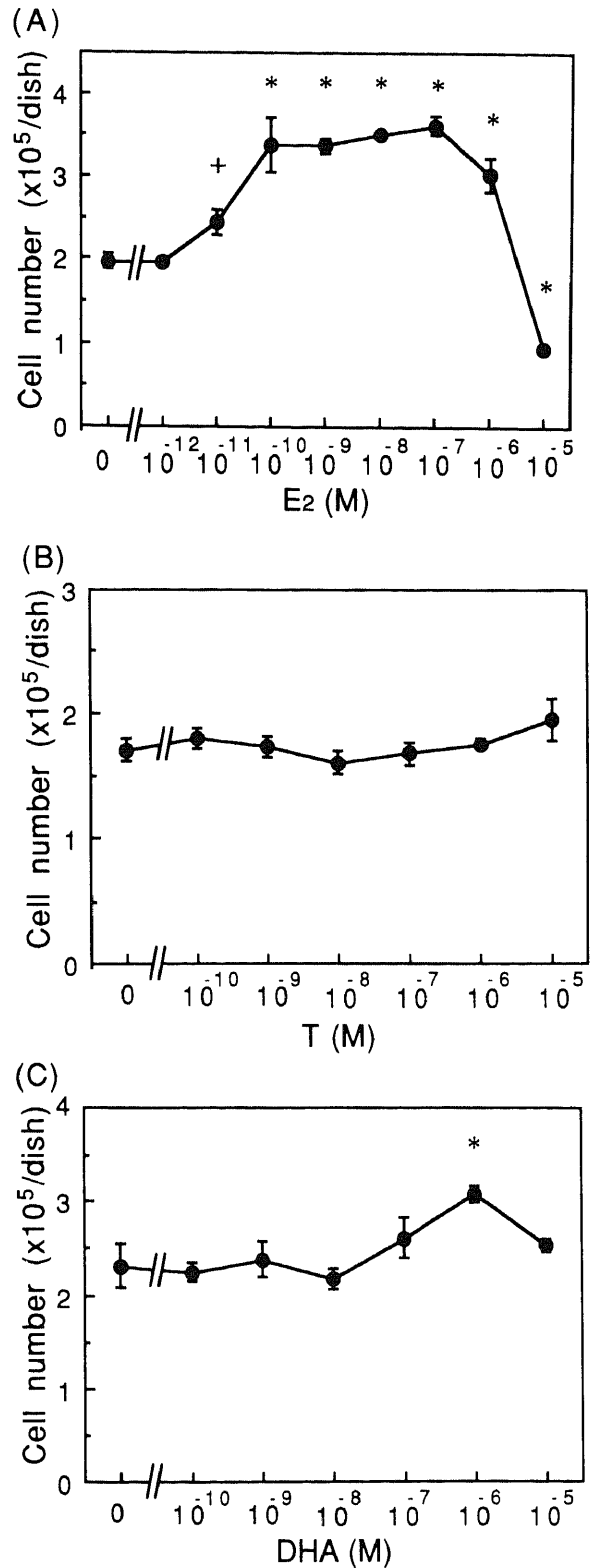


Fig. 4. Effect of increasing concentrations of steroids on the proliferation of ZR 75-1 cells in 5% DCC-FBS RPMI-1640. Cells were plated at an initial density of  $1 \times 10^6$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, E<sub>2</sub> (A), T (B), or DHA (C) was added with fresh medium at the indicated concentrations. Cell number were determined after 11 days. Control consisted of vehicle alone. Each value represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD. Statistically significant difference from the control: +, P < 0.05; \*, P < 0.01.

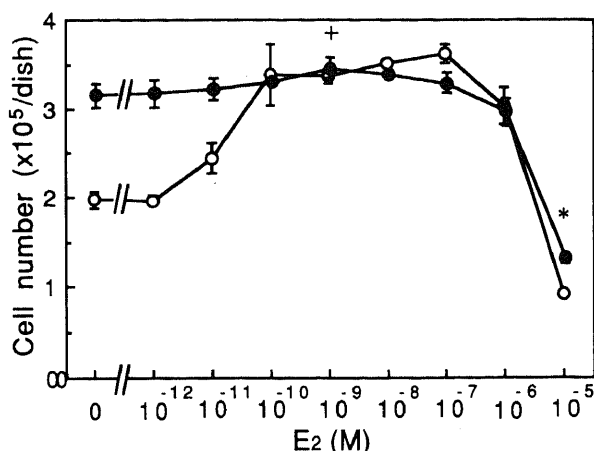


Fig. 5. Effect of increasing concentrations of  $E_2$  on the proliferation of ZR 75-1 cells cultured in the presence of DHA ( $10^{-6}$  M) in 5% DCC-FBS RPMI-1640. Cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days,  $E_2$  was added with fresh medium at the indicated concentrations in the presence of DHA ( $10^{-6}$  M) (final ethanol concentration: 0.2%). Cell numbers were determined after 11 days (●), ○, the same data presented at Fig. 4A. Each point and bar represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD. Statistically significant difference from the control: +,  $P < 0.05$ ; \*,  $P < 0.01$ ; cells treated with  $E_2 +$  DHA ( $10^{-6}$  M) vs. cells treated with DHA ( $10^{-6}$  M) alone.

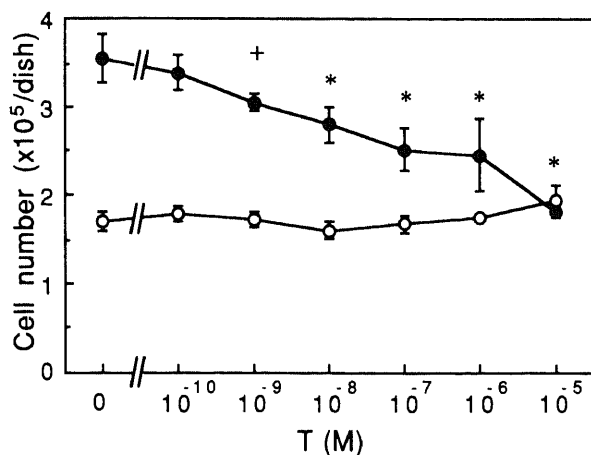


Fig. 6. Effect of increasing concentrations of T on the proliferation of ZR 75-1 cells cultured in the presence of  $E_2$  ( $10^{-8}$  M) in 5% DCC-FBS RPMI-1640. Cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, T was added with fresh medium at the indicated concentrations in the presence of  $E_2$  ( $10^{-8}$  M) (final ethanol concentration: 0.2%). Cell numbers were determined after 11 days (●), ○, the same data presented at Fig. 4B. Each point and bar represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD. Statistically significant difference from the control: +,  $P < 0.05$ ; \*,  $P < 0.01$ ; cells treated with indicated concentrations of T in the presence of  $E_2$  ( $10^{-8}$  M) vs. cells treated with  $E_2$  ( $10^{-8}$  M) alone.

または  $P < 0.01$ ). DHA 添加では  $10^{-10}$  M  $\sim$   $10^{-6}$  M では変化を認めず,  $10^{-5}$  M においてのみ抑制が認められた ( $P < 0.01$ ).

2. 5%DCC-FBS 加 RPMI-1640 培地における性ステロイド添加の影響

1) 性ステロイド単独添加の影響

5%DCC-FBS 添加培地中に  $E_2$ , T および DHA を種々濃度で添加培養したときの細胞数の変動を図 4 に示した.  $E_2$  添加群では, 対照群に比し,  $10^{-11}$  M  $\sim$   $10^{-6}$  M で有意の増加 ( $P < 0.05$  または  $P < 0.01$ ),  $10^{-5}$  M では逆に減少が認められた ( $P < 0.01$ ). これに対し, T 添加群では,  $10^{-10}$  M  $\sim$   $10^{-5}$  M で差は認められなかった. DHA 添加群では,  $10^{-6}$  M のときのみ有意の増加が認められた ( $P < 0.01$ ).

2) 性ステロイド 2 剤併用添加の影響

$E_2$ , T, DHA のうち 2 種類を同時に添加したときの細胞増殖に及ぼす影響について検討した.

i. DHA ( $10^{-6}$  M) と各種濃度  $E_2$  の併用添加

一定の濃度の DHA ( $10^{-6}$  M) に,  $10^{-11}$  M  $\sim$   $10^{-5}$  M の  $E_2$  を併用添加したときの細胞数の変動を図 5 に示した. なお, 比較のために図 4 に示した  $E_2$  単独投与の成績を併記した.

$10^{-6}$  M の DHA 単独添加により, 対照群に比し細胞数の有意の増加が認められたが, この濃度の DHA に  $E_2$  を  $10^{-11}$  M  $\sim$   $10^{-5}$  M の各種濃度で同時併用添加したところ,  $10^{-9}$  M の  $E_2$  併用添加により細胞数は有意に増加し ( $P < 0.05$ ),  $10^{-5}$  M の  $E_2$  併用添加では逆に減少した ( $P < 0.01$ ). なお,  $10^{-6}$  M の  $E_2$  併用添加群にみられた細胞数の減少の程度は,  $10^{-5}$  M の  $E_2$  単独添加群にみられた細胞数の減少と同程度であった.

ii.  $E_2$  ( $10^{-8}$  M) と各種濃度 T の併用添加

一定の濃度の  $E_2$  ( $10^{-8}$  M) に,  $10^{-10}$  M  $\sim$   $10^{-5}$  M の T を併用添

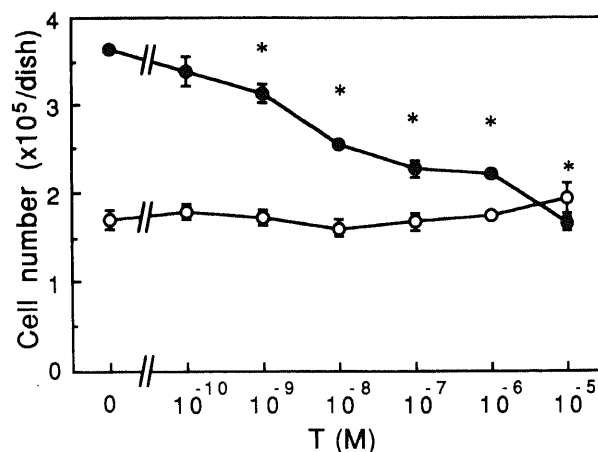


Fig. 7. Effect of increasing concentrations of T on the proliferation of ZR 75-1 cells cultured in the presence of DHA ( $10^{-6}$  M) in 5% DCC-FBS RPMI-1640. Cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, T was added with fresh medium at the indicated concentrations in the presence of DHA ( $10^{-6}$  M) (final ethanol concentration; 0.2%). Cell number were determined after 11 days (●), ○, the same data presented at Fig. 4B. Each point and bar represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD. Statistically significant difference from the control: \*,  $P < 0.01$ , cells treated with indicated concentrations of T in the presence of DHA ( $10^{-6}$  M) vs. cells treated with DHA ( $10^{-6}$  M) alone.

加したときの細胞数を図6に示した。なお、比較のために図4に示したT単独投与の成績を併記した。

$10^{-6}$ Mの $E_2$ 単独添加により、対照群に比して細胞数の有意の増加が認められたが、この濃度の $E_2$ にTを $10^{-10}$ M~ $10^{-6}$ Mの各種濃度で併用添加したところ、 $10^{-9}$ M~ $10^{-6}$ MのT併用添加により有意に減少した( $P<0.05$  または  $P<0.01$ )。  $10^{-6}$ MのT濃度での細胞数は、T単独添加群のときと同程度であった。

iii. DHA ( $10^{-6}$ M) と各種濃度 T の併用添加

一定の濃度のDHA ( $10^{-6}$ M)に、 $10^{-10}$ M~ $10^{-6}$ MのTを併用添加したときの細胞数を図7に示した。なお、比較のために図4に示したT単独投与の成績を併記した。

$10^{-6}$ MのDHA単独添加により、対照群に比し細胞数の有意の増加が認められたが、この濃度のDHAにTを $10^{-10}$ M~ $10^{-6}$ Mの各種濃度で併用添加したところ、 $10^{-9}$ M~ $10^{-6}$ MのT併用添加により有意に減少した( $P<0.01$ )。  $10^{-6}$ MのT濃度における細胞数は、T単独添加群の場合と同程度であった。

3. 無血清培地における性ステロイド投与の影響

1) 性ステロイド単独添加の影響

無血清培地での細胞増殖に及ぼす $E_2$ , T, PおよびDHAの種々濃度添加の影響について検討した(図8)。対照群に比べ、 $E_2$ 添加では、 $10^{-11}$ M,  $10^{-10}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ Mにおいて細胞数の増加が認められ( $P<0.01$ )、 $10^{-6}$ Mでは減少が認められた。これに対し、T添加では $10^{-10}$ M~ $10^{-6}$ M, P添加では $10^{-9}$ M~ $10^{-6}$ Mにおいてステロイドの添加濃度の上昇に伴って細胞数の減少が認められた。DHA添加では、 $10^{-6}$ Mおよび $10^{-5}$ Mにおいてのみ細胞数の増加が認められた( $P<0.01$  または  $P<0.05$ )。

なお、各種濃度DHA添加それぞれの細胞増殖曲線は、図9に示すごとくであった。DHA非添加対照群では、約2日の遅延期の後増殖を開始し、指数関数的に細胞数が増加した。DHAを添加した場合、 $10^{-6}$ Mの8日目、11日目にのみ有意の増加が認められた( $P<0.01$ )。

2) 性ステロイド併用添加の影響

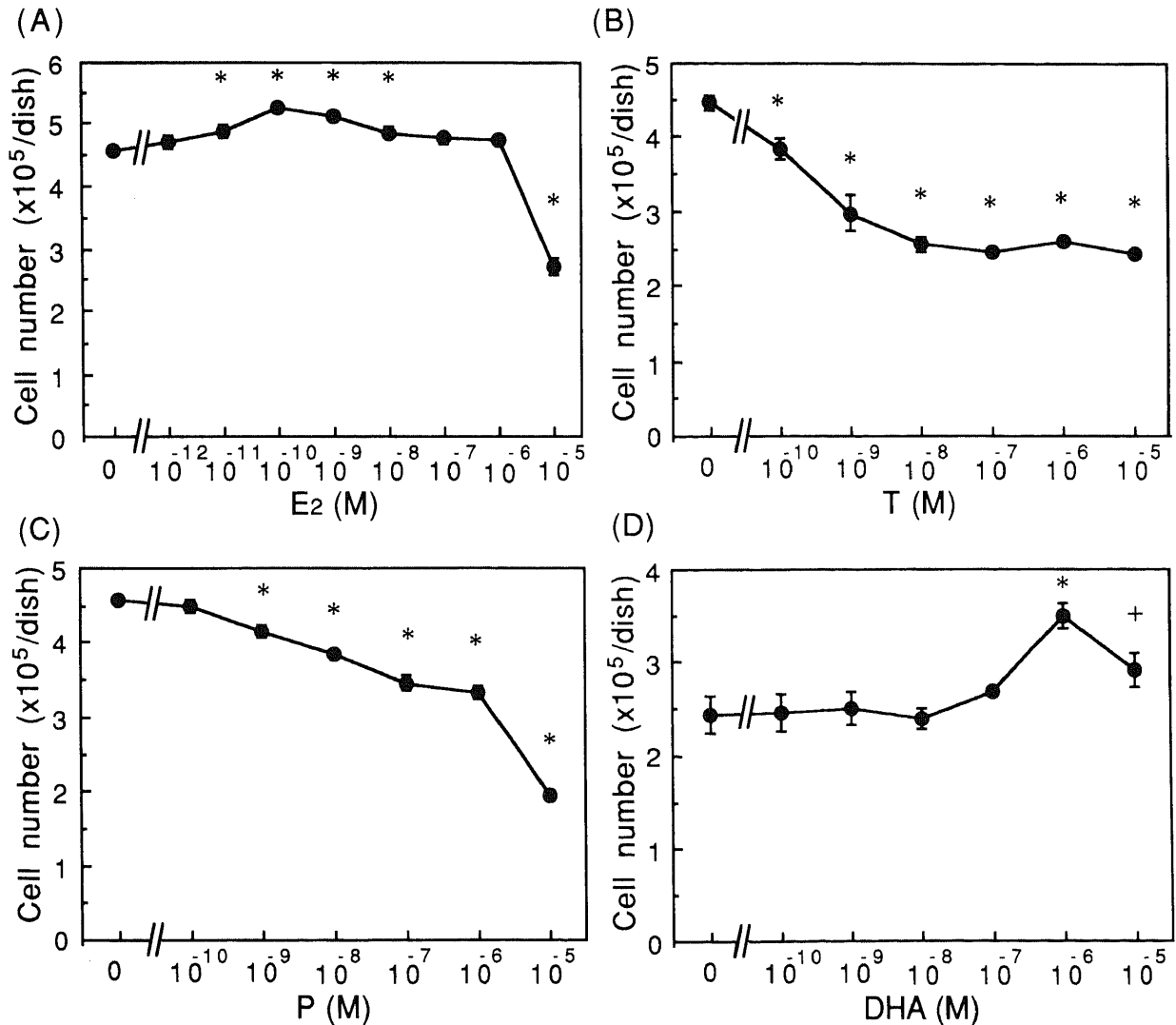


Fig. 8. Effect of increasing concentrations of steroids on the proliferation of ZR 75-1 cells in serum-free, hormone-supplemented medium (insulin, transferrin, selenite, bovine serum albumin). Cells were plated at an initial density of  $1 \times 10^6$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, the medium was changed for serum free medium containing the indicated concentrations of  $E_2$  (A), T (B), progesterone (P) (C), or DHA (D). Cell numbers were determined after 8 days. Control consisted of vehicle alone. Each value represents the mean of triplicate determinations  $\pm$ SD. Statistically significant difference from the control: +,  $P<0.05$ ; \*,  $P<0.01$ .

### i. E<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup>M) と各種濃度 P の併用添加

無血清培地下で一定濃度の E<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup>M) に 10<sup>-10</sup>M~10<sup>-5</sup>M の P を併用添加したときの細胞数を図10に示した。なお、比較のために図8に示した P 単独投与の成績を併記した。

10<sup>-8</sup>M の E<sub>2</sub> 単独添加により、対照群に比し有意の細胞数の増加が認められたが、この濃度の E<sub>2</sub> に P を 10<sup>-10</sup>M~10<sup>-5</sup>M の各種濃度で同時併用添加したところ、10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-7</sup>M の P 併用添加により細胞数は有意に増加し (P<0.01), 逆に 10<sup>-5</sup>M では減少した (P<0.01)。また、10<sup>-5</sup>M の P 濃度での細胞数は P 単独添加群にみられた場合と同程度であった。

### ii. DHA (10<sup>-6</sup>M) と各種濃度 P の併用添加

無血清培地下で一定濃度の DHA (10<sup>-6</sup>M) に 10<sup>-10</sup>M~10<sup>-5</sup>M の P を併用添加したときの細胞数を図11に示した。なお、比較のために図8に示した P 単独投与の成績を併記した。

10<sup>-6</sup>M の DHA 単独添加により、対照群に比し細胞数の有意に増加が認められたが、この濃度の DHA に P を 10<sup>-10</sup>M~10<sup>-5</sup>M の各種濃度で同時併用添加したところ、10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-7</sup>M の P 併用添加により細胞数が有意に増加し (P<0.01), 逆に 10<sup>-5</sup>M では減少した (P<0.01)。また、10<sup>-5</sup>M の P 濃度での細胞数は P 単独添加群にみられた場合と同程度であった。

### III. RL95-2 株細胞の細胞増殖に及ぼす各種性ステロイドホルモン添加の影響

#### 1. 5%DCC-FBS 加 RPMI-1640 培地における性ステロイド添加投与の影響

5%DCC-FBS 添加培地における細胞増殖に及ぼす E<sub>2</sub>, T および DHA の種々濃度添加の影響について検討した (図12)。E<sub>2</sub> 添加では、細胞数は 10<sup>-12</sup>M~10<sup>-8</sup>M で対照群と同じで、10<sup>-5</sup>M でのみ有意の減少を認めた (P<0.01)。T または DHA 添加では、10<sup>-10</sup>M~10<sup>-5</sup>M の濃度範囲では対照群との間に差は認められなかった。

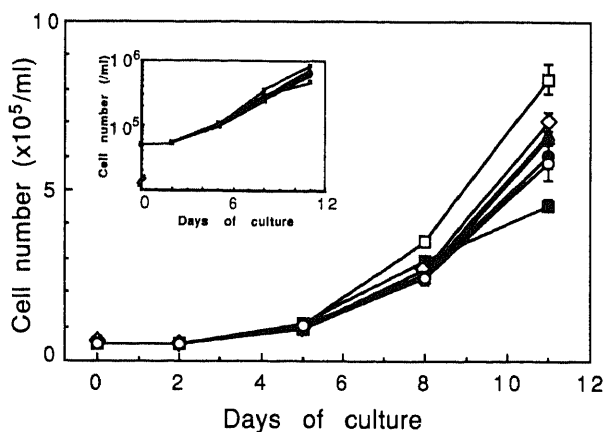


Fig. 9. Effect of DHA on the cell growth kinetics of ZR 75-1 cells in serum free, hormone-supplemented medium. Cells were initially plated at  $1 \times 10^5$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, the medium was changed for serum free medium containing the indicated concentrations of DHA. Control cells received the ethanol vehicle alone (0.1%). (○, control; ●, 10<sup>-10</sup> M; △, 10<sup>-9</sup> M; ▲, 10<sup>-8</sup> M; ◇, 10<sup>-7</sup> M; □, 10<sup>-6</sup> M; ■, 10<sup>-5</sup> M). Cells from each group were harvested and counted. Points represent mean of triplicate determinations. Inset, logarithmic curves of the same data.

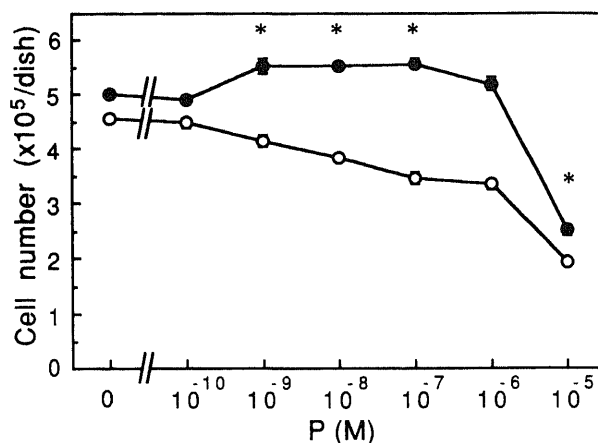


Fig. 10. Effect of increasing concentrations of P on the proliferation of ZR 75-1 cells in the presence of E<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup> M) in serum free, hormone-supplemented medium. Cells were plated at a density  $1 \times 10^5$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, P was added with serum-free medium at the indicated concentrations in the presence of E<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup> M) (final ethanol concentration: 0.2%). Cell numbers were determined after 8 days (●). ○, the same data presented at Fig. 8C. Each point and bar represents the mean of triplicate determinations ± SD. Statistically significant difference from the control: \*, P<0.01, cells treated with indicated concentrations of P in the presence of E<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup> M) vs. cells treated with E<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup> M) alone.

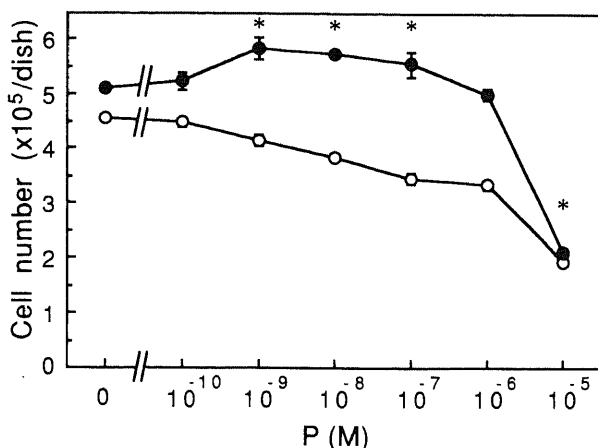


Fig. 11. Effect of increasing concentrations of P on the proliferation of ZR 75-1 cells in the presence of DHA (10<sup>-6</sup> M) in serum free, hormone-supplemented medium. Cells were plated at a density  $1 \times 10^5$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, P was added with serum free-medium at the indicated concentrations in the presence of DHA (10<sup>-6</sup> M) (final ethanol concentration: 0.2%). Cell numbers were determined after 8 days (●). ○, the same data presented at Fig. 8C. Each point and bar represents the mean of triplicate determinations ± SD. Statistically significant difference from the control: \*, P<0.01, cells treated with indicated concentrations of P in the presence of DHA (10<sup>-6</sup> M) vs. cells treated with DHA (10<sup>-6</sup> M) alone.



2. 無血清培地における性ステロイド添加投与の影響

無血清培地で、細胞増殖に及ぼす E<sub>2</sub>, T, P および DHA の種々濃度添加の影響について検討した (図13). E<sub>2</sub> (10<sup>-11</sup>M~10<sup>-6</sup>M), T (10<sup>-10</sup>M~10<sup>-5</sup>M), P (10<sup>-10</sup>M~10<sup>-5</sup>M) の単独添加では、いずれも 10<sup>-8</sup>M の添加で細胞数の減少を認めたが、これ以外の濃度では有意の変化はみられなかった. DHA 添加の場合、10<sup>-10</sup>M~10<sup>-6</sup>M 濃度の範囲内ではその影響は認められなかった.

考 察

近年、生活環境の向上、生活習慣の変化に伴い疾病構造に変化がみられる. 悪性疾患の罹患率をみた場合、女性においては子宮頸癌の頻度は減少しているが、従来日本人では少ないとみられてきた乳癌や子宮体癌の頻度が増加してきている. 現在、乳癌の発生率・死亡率ともに米国の 1/5 程度であるが、近い将来女性の悪性腫瘍の第一位になるであろうと予測されている<sup>14</sup>. また、子宮体癌の罹患率は日本では欧米諸国の約 1/6 程度であるが、子宮頸癌に対する体癌の割合は都市部を中心に増加している<sup>15</sup>. これらの発生率の変化は女性の体格の向上、晩婚化、少産化、食事習慣の変化などに起因すると考えられており、環境因子とくに脂肪摂取量の増加が疫学的原因の一つであ

ろうと考えられている<sup>14,16,17</sup>

一方、子宮体癌および乳癌と性ステロイドホルモンや下垂体性ホルモンとの関連性については、担癌者と非癌対照者との間には血中ホルモン値の差がないとする報告<sup>18</sup>もあるが、エストロゲンがその発生や増殖に密接に関与していることが指摘されており<sup>19</sup>、動物実験においても子宮体癌、乳癌いずれも E<sub>2</sub> の投与により腫瘍増殖が促進されたとする報告が多い<sup>20</sup>. 黄体ホルモンは、エストロゲンの作用に拮抗するとされ、臨床的にも合成プロゲステロゲン (progestogen) である酢酸メドロキシプロゲステロン (medroxyprogesterone acetate) の大量投与が子宮体癌や乳癌に有効とされ用いられている. また、DHA, デヒドロエピアンドロステロン-サルフェート (dehydroepiandrosterone-sulfate, DHA-S), アンドロステンジオン (androstenedione) などの副腎性アンドロゲンや T との関連性を指摘する報告もみられている<sup>21,22</sup>. その他、乳癌と蛋白ホルモンであるプロラクチン、メラトニンとの関係を示唆する報告もある<sup>23,24</sup>.

DHA および DHA-S については従来より弱いアンドロゲン作用を有するとされ、成人女性においてはその大部分は副腎に由来し、1日産生量は 15~20mg とステロイドホルモンの中では最も多量に産生、分泌されている<sup>25</sup>. 血中 DHA-S 値や尿中 17-KS 値は加齢の生化学的指標にもなるといわれ<sup>26</sup>、また末期

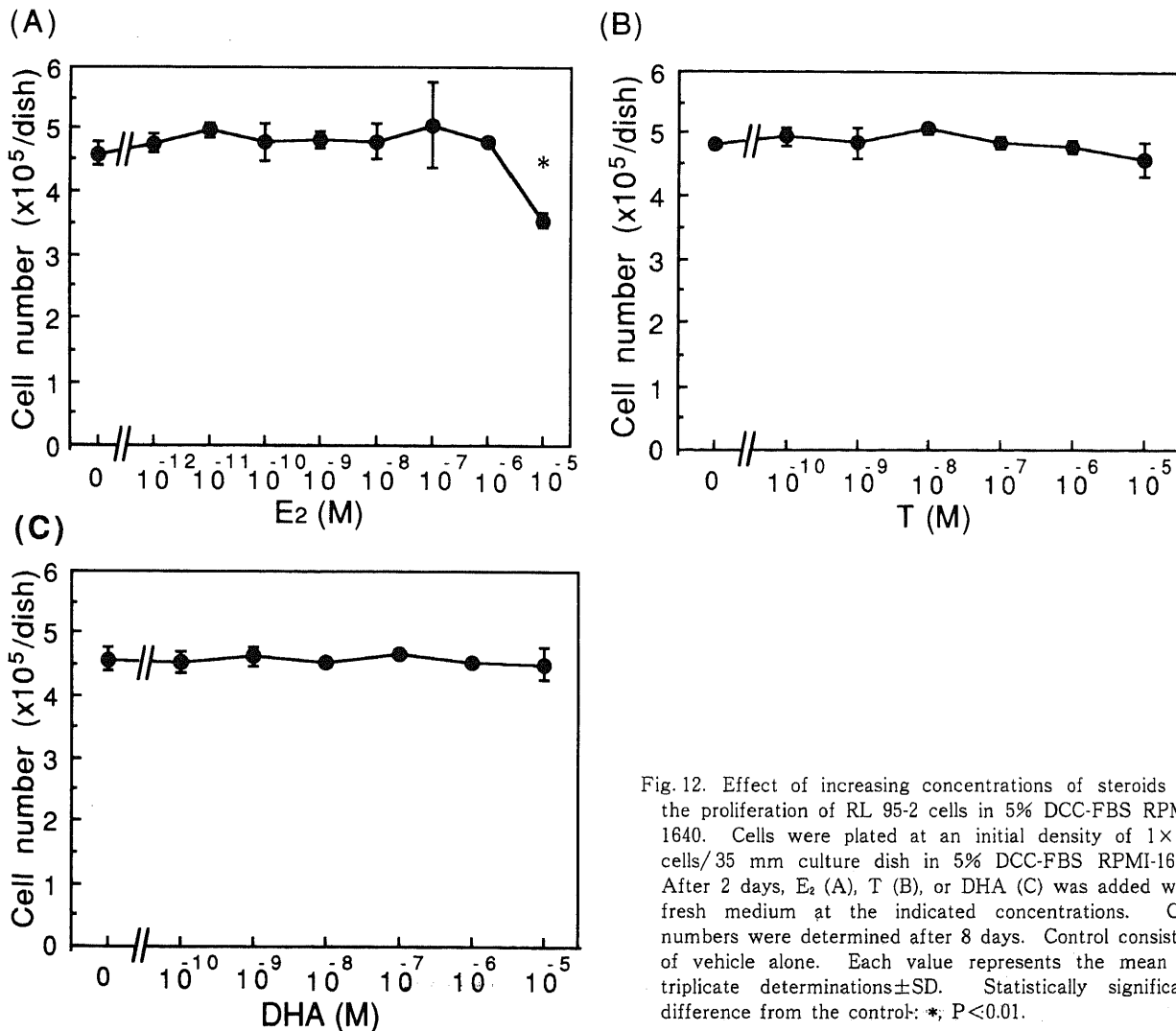


Fig. 12. Effect of increasing concentrations of steroids on the proliferation of RL 95-2 cells in 5% DCC-FBS RPMI-1640. Cells were plated at an initial density of 1×10<sup>6</sup> cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, E<sub>2</sub> (A), T (B), or DHA (C) was added with fresh medium at the indicated concentrations. Cell numbers were determined after 8 days. Control consisted of vehicle alone. Each value represents the mean of triplicate determinations±SD. Statistically significant difference from the control: \*, P<0.01.

癌患者においてはこれらの値が低下していると報告されている<sup>27,28</sup>。DHA および DHA-S の生理学的・病理学的意義については諸家の報告<sup>7,29-31</sup> や教室の一連の研究<sup>32-34</sup> により次第に明らかにならつつあるが、その詳細は今日なお不明である。

乳癌と副腎性アンドロゲンとの関係については、Bulbrook ら<sup>6</sup> は Guernsey 島においてボランティアより尿を採取し、その9年後までに発生した乳癌患者の尿を非発癌対照者と比較分析したところ、エストロゲンやコルチゾール (cortisol) 代謝物には変化がみられなかったが、副腎性アンドロゲン代謝物であるアンドロステロンやエチオコロンが対照に比べ有意に低値であったと報告している。一方、欧米人と比較するとこれら副腎性アンドロゲン代謝物の尿中排泄量は日本人では低く、かつ乳癌発生率も低いとも報告されている<sup>35</sup>。これまでの諸家の報告では、尿中のあるいは血中の副腎性アンドロゲン値は、閉経後の乳癌患者で非癌対照者に比し高いとするものや<sup>35,37</sup>、有意差がみられないとするもの<sup>29</sup>、低いとするもの<sup>38</sup> などと明らか

な結論は得られていない。子宮体癌についても血中、尿中の副腎性アンドロゲンとの関係について調査が行われているが、明確な結論が得られていない<sup>31,36</sup>。

動物実験では、Schwartz<sup>29</sup> は自然発生的に乳癌が誘起されるラットやマウスに対して DHA を投与した場合の癌発生頻度を対照と比較すると、DHA 投与群では有意に癌発生割合が少なく、また、7, 12-ジメチルベンズアントラセン (7, 12-dimethylbenzanthracene, DMBA) やホルボールエステル (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA) などの発癌物質を投与した場合にも、DHA 同時併用投与群では有意に癌発生割合が少ないと報告している。しかし、Spinola ら<sup>40</sup> は DMBA により発生させたラット乳腺腫瘍に対し DHA を1日4mg を24日間投与すると、全腫瘍数、平均腫瘍断面積 (average total tumor area) は卵巣摘除した対照群に比べて有意に大であったと報告している。なお、ラットやマウスなどではヒトと本質的に異なるホルモン代謝経路を有しており、また、

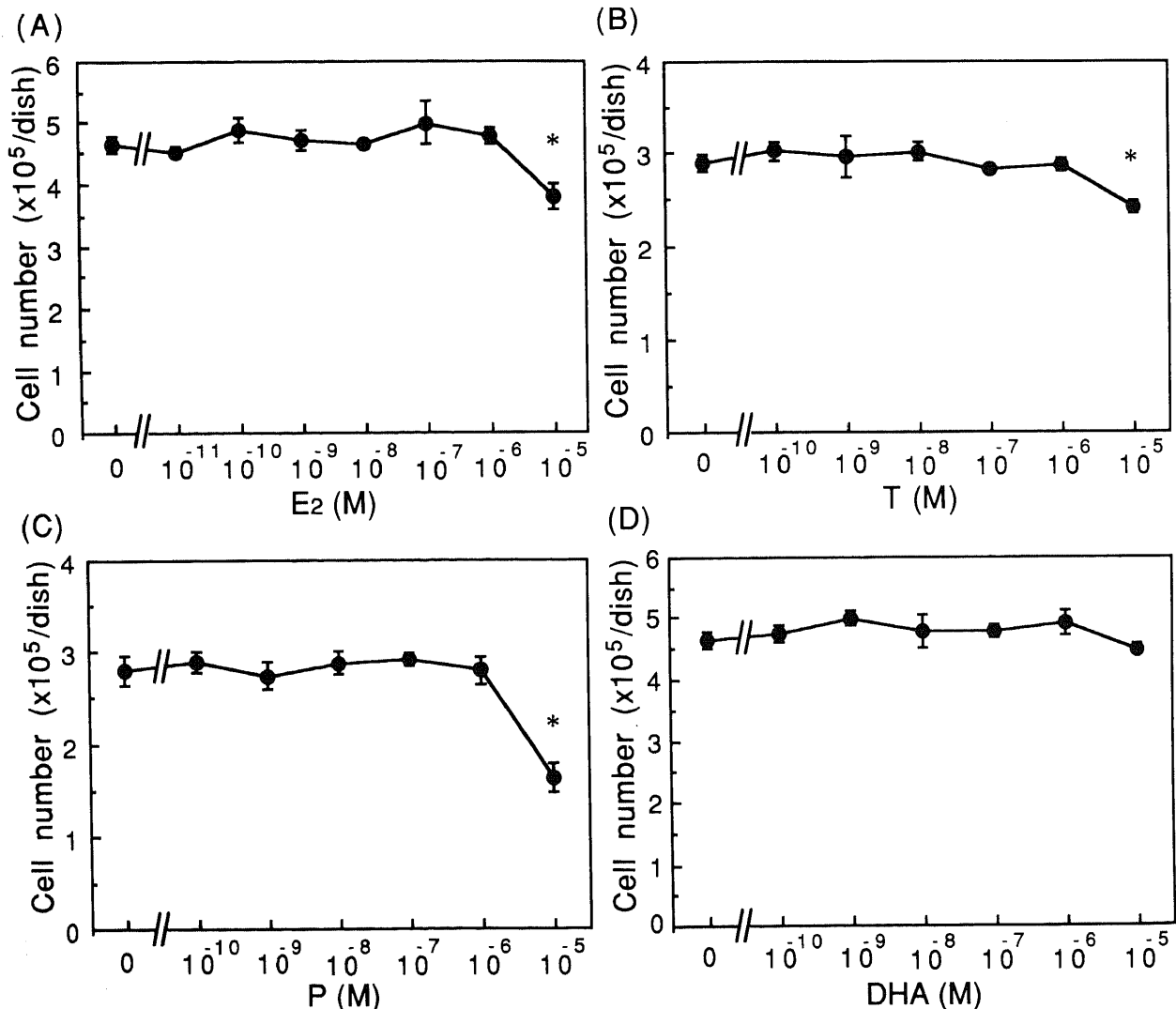


Fig. 13. Effect of increasing concentrations of steroids on the proliferation of RL 95-2 cells in serum free, hormone-supplemented medium. Cells were plated at an initial density of  $1 \times 10^5$  cells/35 mm culture dish in 5% DCC-FBS RPMI-1640. After 2 days, the medium was changed for serum-free medium containing the indicated concentrations of E<sub>2</sub> (A), T (B), P (C) or DHA (D). Cell numbers were determined after 8 days. Control consisted of vehicle alone. Each value represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD. Statistically significant difference from the control: \*,  $P < 0.01$ .

DHA の血中濃度はヒトに比べてはるかに低値で<sup>34)</sup>、かつ乳腺増殖作用はエストロゲンによるものよりもプロラクチンの方が強い<sup>17)</sup>とされていることなどからも動物実験で得られた結果のヒトへの外挿には限界がある。

ところで、細胞培養系を利用した試験管内実験において、腫瘍細胞増殖とエストロゲン、T、Pなどの性ステロイドとの関連について検討した報告は多いが、DHAの作用について言及した報告は著者の渉猟した限りでは少なく、細胞増殖を促進したとする報告と抑制したとする報告がみられる。促進したとする報告<sup>42)</sup>ではDHAがTやエストロゲンその他のホルモンへ代謝変換されて作用したものと推定している。抑制したとするDworkinらの報告<sup>43)</sup>では、ヒト線維芽細胞WI-38や子宮頸癌細胞株HeLa等の細胞に対して $10^{-9}$ Mという比較的高濃度で抑制的に働き、その抑制がヌクレオシド(nucleoside)の添加により解除されるとの結果から、DHAが核酸合成の律速酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素(glucose-6-phosphate dehydrogenase)を抑制するためと推定している。

今回の研究では、性ステロイドである $E_2$ 、T、Pと副腎性アンドロゲンの一つであるDHAの細胞増殖に対する作用をみるため、ホルモン感受性を有するとされる乳癌株細胞株ZR75-1と子宮体癌細胞株RL95-2を用いて比較検討した。細胞培養系を用いた方法は、高位のホルモン中枢との関係や末梢における代謝の影響について考慮する必要が少なく、細胞自身への直接作用をみる面で有用と考えられている。しかし、細胞培養系においてはその系が比較的簡単である反面、培養条件などの条件によりその結果が影響を受けることも指摘されている<sup>44)~46)</sup>。また、生体内の組織ではホルモン感受性がそれぞれの組織により異なっており、実質細胞と間質細胞相互の関係もあるため、一つの細胞培養系の結果がヒト全体のホルモンに対する反応性を演繹するものではないので、その結果の解釈については充分配慮する必要がある。以下、これらの諸点を考慮し、今回の成績について考察した。

まず、ZR75-1株についてであるが、既述のごとくその由来が明らかであり、またエストロゲン、T、P、コルチゾールなどに対するホルモン受容体を有するとされ、ホルモン作用や抗癌剤の検討のモデルとしてよく使用されている。原報告<sup>11)</sup>ではその細胞倍加時間は約80時間とされているが、本研究では、10%FBS加RPMI-1640培地を使用した場合には約60~90時間と算定され、おおよその一致をみた。RL95-2もエストロゲンとPに対する受容体を有し、その細胞倍加時間は22から34時間であり増殖曲線では明らかな定期期がみられないとされている<sup>12)</sup>。本研究でも10%FBS加RPMI-1640培地中では、その増殖曲線は対数グラフでは上に凸の形をとり明らかな直線状にはならなかったが、2から8日目までは対数増殖期とみなされ、その倍加時間は約28時間であった。

培養系において性ステロイドの効果を検討する場合、培地に添加する血清の影響を考慮する必要があることが指摘されており、添加血清の種類によっては添加性ステロイドの効果がみられないとする報告が多い<sup>44)~46)</sup>。今回の結果では、5%FBS加RPMI-1640培地を使用した培養条件下では、 $E_2$ 、T、DHAの各ホルモンはZR75-1に対し細胞増殖の面で抑制的に作用しているものとみなされた。しかし、胎児血清のものには各種のステロイドホルモンや増殖因子などが充分含まれており、これらの因子の存在下でさらにステロイドホルモンを添加しても、

添加ホルモン自体の作用として捉えられないものと考えられた。したがって、今回の研究では血清をDCC処理して、内因性ステロイドホルモンを可及的除去した血清を5%の割合で添加した培養条件下で検討を行なった。このDCC処理により $E_2$ 、T等のステロイドホルモンの90%以上が除去できるとされており<sup>13)60)</sup>、今回のDCC処理後の血清中の性ホルモン濃度はいずれも測定感度以下であった。なお、pH指示薬としてよく用いられているフェノールレッドに弱いエストロゲン作用があり、この薬剤の添加により各種のステロイドホルモンの作用が修飾を受けるとの報告もみられるが<sup>51)~53)</sup>、今回の研究ではすべてフェノールレッドを含有する培地を用いた。

ZR75-1株では、5%DCC-FBS加RPMI-1640培地地下において $E_2$ 添加9日後には無添加対照群に比べて $10^{-11}$ Mの添加で有意の細胞増殖効果が認められ、 $10^{-10}$ M~ $10^{-9}$ Mの濃度ではさらにその促進効果が認められた。また、無血清培地地下での検討でも同様に $E_2$ の細胞増殖効果を認めたが、その程度は軽度であった。一般的には、乳癌細胞株は動物に移植した場合はエストロゲンに良好な反応を示し増殖するが、細胞培養系に移入するとその反応性は低下し、無血清培地地下ではさらに弱くなるとされる<sup>48)</sup>。これらの変化は培養系の一つの特徴とみられ、通常培養系の細胞を動物に移植するとホルモンに対する反応性は回復し、さらに培養系にもどすと反応性が少なくなったり、無くなったりする<sup>54)</sup>。したがって、今回無血清培養下で得られた結果については、細胞培養系における反応性の低下も考慮すべきものと考えられた。

Tについては、Grattalolaら<sup>55)</sup>は子宮体癌および乳癌患者ではTが高値であり、それらの中に卵巣間質の過形成を示す症例があることを示し、子宮体癌や乳癌とTとの密接な関連性を推定している。さらに、アンドロゲンレセプターの有無とホルモン療法の効果との間に相関があり、Tの関与を示唆する報告がみられる<sup>56)</sup>。今回の検討では、T添加の場合、5%DCC-FBS加RPMI-1640培地を使用した条件下では、ZR75-1に対しては $10^{-10}$ M~ $10^{-9}$ M濃度において有意の変動を示さなかった。これに反し、無血清培地地下では、その添加濃度が上昇するにつれ抑制的に働いた。RL95-2においても5%DCC-FBS加RPMI-1640培地地下では効果がみられず、無血清培地地下では $10^{-9}$ Mで抑制効果がみられた。

また、P添加の場合、一般的には子宮体癌および乳癌の細胞を抑制するとする報告が多い。今回の結果でも、無血清培地地下でPは、ZR75-1に対しては $10^{-9}$ M~ $10^{-8}$ Mにおいて、RL95-2に対しては $10^{-9}$ Mの高濃度において、その細胞増殖を抑制した。

DHAを添加した場合は、ZR75-1に対して5%FBS加RPMI-1640培地では効果がみられず、5%DCC-FBS加RPMI-1640培地でも $10^{-10}$ M~ $10^{-9}$ Mでは無添加対照群に比べて有意の増加を認めず、 $10^{-8}$ Mでのみ有意の増加が認められた。さらに、無血清培地地下でも同濃度において有意の細胞増殖効果を認めた。5%DCC-FBS加RPMI-1640培地の条件下で、DHAの $10^{-9}$ MにTを各濃度で併用投与した場合、DHAの作用はTが高濃度になるほど抑制された。また、無血清培地でもDHAにPを各濃度で同時添加した場合、DHAの作用は低濃度のPでは促進され、高濃度では明らかに抑制された。この傾向は $E_2$ の $10^{-9}$ MにTやPを併用添加した場合にも同様に認められた。DHAの $10^{-9}$ Mに各種濃度の $E_2$ を併用添加した場

合、 $E_2$ に $10^{-8}M$ 併用時にDHA単独添加に比べて細胞数の軽度の増加は認められた。これらDHA $10^{-6}M$ 濃度で認められたZR75-1に対する効果は、TおよびPとの併用効果を含めて、 $E_2$ の $10^{-8}M$ の場合とほぼ同様と考えられた。

今回DHAに関し得られた結果は、特定の高濃度でのみ腫瘍細胞の増殖作用を示すものであった。このことは、DHAなどの副腎性アンドロゲンは生体内で他の性ステロイドに変換されるので、今回の実験においても変換されたエストロゲンがTよりも優位に作用したことが考えられる。また、Bonneyら<sup>77,80</sup>は副腎性アンドロゲンは高濃度では $E_2$ の代謝酵素である $17\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素( $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase)を抑制すると報告しており、このことからDHAの細胞内残存 $E_2$ に対する保持作用もこれに関与している可能性が示唆された。一方、今回の実験でみられたDHAの濃度はヒト女性成熟期の血中の生理的濃度( $5\sim 20\times 10^{-9}M$ )<sup>73,74</sup>と比べるとはるかに高いものであった。また、教室におけるDHAを閉経後女性に投与した場合の血中性ホルモン値の変動に関する研究では、血中エストロゲンに比べ血中Tやアンドロステジオンの上昇が大であった<sup>59</sup>。したがって、DHAは生体内腫瘍に対してはアンドロゲン作用優位に作用すると考えられ、DHAの腫瘍に対する作用は、その直接作用の他に生体内における代謝の面からも今後究明されるべきものと考えられた。

5%DCC-FBS加RPMI-1640培地下で、 $E_2$ の $10^{-8}M$ またはDHAの $10^{-6}M$ に、Tを $10^{-10}M\sim 10^{-5}M$ の各種濃度で併用添加した場合、 $E_2$ またはDHAの増殖促進効果はT濃度が上昇するにつれ抑制された。さらに、この併用添加の場合の $10^{-6}M$ 濃度の細胞数はホルモン無添加対照群の場合と同程度であった。このことよりZR75-1に対しては、Tはその基礎増殖には影響しないものの $E_2$ およびDHAの細胞増殖促進作用に拮抗的に働くものと考えられた。

一方、 $E_2$ の $10^{-8}M$ またはDHAの $10^{-6}M$ に、Pを $10^{-10}M\sim 10^{-5}M$ の各種濃度で併用添加した場合、 $E_2$ またはDHAの増殖促進作用は低濃度のPでは促進され、高濃度では明らかに抑制された。このことはP単独添加の場合には濃度の上昇に伴ってその細胞増殖が抑制されるパターンとは異なっていた。以上の併用添加実験の結果よりこれらステロイド相互の併用効果についても注目すべきものと考えられた。

RL95-2株では、使用した性ステロイドでは増殖促進効果は認められなかった。 $E_2$ 添加の場合は5%DCC-FBS加RPMI-1640培地、無血清培地の条件下で、 $10^{-6}M$ の高濃度で増殖抑制が認められ、TとPの場合も無血清培地において高濃度で同様に抑制が認められたが、DHA添加の場合は5%DCC-FBS加RPMI-1640培地、無血清培地のいずれの条件下でもその影響は認められなかった。今回性ステロイドのRL95-2株細胞に対する作用が低濃度で明確に認められなかったのは、RL95-2株の長期の継代培養によりホルモン受容体が消失しホルモンに対する反応性が欠如したため<sup>80</sup>とも考えられるが、増殖曲線よりみればDCC-FBS添加とFBS添加の場合の細胞数の増加の差が小さかったことから性ステロイド以外のその他の増殖因子の影響が強く反映されたことによるものと考えられた。

以上の結果から、乳癌と子宮体癌細胞株は性ステロイドに対する反応性は異なるが、ZR75-1の場合 $E_2$ と高濃度のDHAは増殖促進的に作用し、T、Pは抑制的に働くものと考えられた。

また、性ステロイド同時併用添加実験の結果からその併用効果はそれぞれ単独の効果とは異なる場合もあり、ステロイド相互の関連性や生体内におけるホルモン代謝の面からも充分検討すべきであると推察された。

## 結 論

細胞培養系における各種性ステロイドホルモンの作用を考究する目的で、ホルモン感受性を有するとされる乳癌株細胞ZR75-1と子宮体癌株細胞RL95-2を使用し、その細胞増殖に及ぼす影響を比較検討した。通常は無処理血清添加培地、DCC-FBS添加培地または無血清培地に各種濃度の $E_2$ 、T、P、DHAをそれぞれ単独または併用添加し、それぞれの株細胞の増殖に及ぼす効果を検討して以下の結果を得た。

1. ZR75-1株を10%FBS加RPMI-1640培地で培養した場合、その倍加時間は約60時間であったが、5%DCC-FBS加RPMI-1640培地で培養した場合はその増殖速度が遅延した。RL95-2株を10%FBS加RPMI-1640培地で培養した場合、その倍加時間は約28時間であり、5%DCC-FBS添加培地で培養した場合でも、その増殖は多少抑制されるものの良好であった。

2. ZR75-1株を5%FBS加RPMI-1640培地で培養した場合、対照群に比べ、 $E_2$ 添加では $10^{-10}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、T添加では $10^{-6}M\sim 10^{-5}M$ において有意の抑制が認められたのに対し、DHA添加では $10^{-10}M\sim 10^{-6}M$ では変化を認めず、 $10^{-5}M$ においてのみ有意の抑制が認められた。

3. ZR75-1株に対しFBSをDCC処理し添加すると、 $E_2$ とDHAの細胞増殖促進効果が認められるようになり、9日間のステロイド添加期間中に $E_2$ では $10^{-11}M\sim 10^{-6}M$ の範囲で細胞増殖促進効果が認められた。DHAでは $10^{-6}M$ でのみ細胞増殖促進効果が認められた。Tでは有意の変化が認められなかった。

4. ZR75-1株に対しDHAを $10^{-6}M$ の一定濃度添加し、さらに $E_2$ を各種濃度で同時併用投与した場合、DHA( $10^{-6}M$ )単独添加群に比し、 $10^{-6}M$ の $E_2$ 併用添加時において細胞数の増加がみられたが、その増加の割合は小さいものであった。 $E_2$ ( $10^{-6}M$ )またはDHA( $10^{-6}M$ )の一定濃度と各濃度のTを同時併用した場合、 $E_2$ とDHAの細胞増殖促進作用はTにより抑制され、その抑制の程度は $E_2+T$ とDHA+Tの両併用添加群では同程度であった。

5. ZR75-1株を無血清培地で培養した検討では、 $E_2$ の添加では $10^{-11}M\sim 10^{-6}M$ の範囲で、DHA添加では $10^{-6}M$ と $10^{-5}M$ で細胞増殖促進作用を示した。この条件下ではTとPは細胞増殖に対して抑制的に作用した。一定濃度の $E_2$ ( $10^{-6}M$ )またはDHA( $10^{-6}M$ )と各濃度のPとを同時併用添加した場合、低濃度のPでは増殖促進作用がみられ、高濃度ではPは抑制的に働いた。これらはP単独添加とは明らかに異なる細胞増殖パターンを示した。

6. RL95-2株では5%DCC-FBS加RPMI-1640培地、無血清培地において、 $E_2$ 、T、Pはいずれも高濃度( $10^{-6}M$ )においてのみ抑制的に働いた。DHA投与では添加による影響は認められなかった。

以上の結果より、 $E_2$ とDHAは乳癌細胞株の細胞増殖に対して促進的に働くものと考えられるが、DHAの場合に促進効果の認められた $10^{-6}M$ 濃度はヒトの血中の生理的濃度に比べてかなり高いものであった。また、各種性ステロイドホルモンの

併用投与は単独投与と異なる効果を示すことがあり、ステロイドホルモン相互の関連性にも注目すべきものと考えられた。

### 謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に謹んで謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり貴重な御助言を賜りました本学が研究所免疫生物部高橋守信教授に深謝致しますとともに、終始御指導頂きました赤祖父一知助教授ならびに研究面で御協力頂きました寺田 督講師、橋本 茂博士はじめ教職員各位、並びに穴田幸子、相川みち代事務官に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は第38回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会総会(札幌市, 1990)、第9回北陸合同内分泌・代謝懇話会(1990)において発表した。

### 文 献

- 1) MacMahon, B. & Austin, J. H.: Association of carcinomas of the breast and corpus uteri. *Cancer*, **23**, 275-280 (1969).
- 2) Bailar, J. C.: The incidence of independent tumors among uterine cancer patients. *Cancer*, **16**, 842-853 (1963).
- 3) Schoenberg, B. S., Greenberg, R. A. & Eisenberg, H.: Occurrence of certain multiple primary cancers in females. *J. Natl. Cancer Inst.*, **43**, 15-32 (1969).
- 4) Kelsey, J. L.: A review of the epidemiology of human breast cancer. *Epidemiol. Rev.*, **1**, 74-109 (1979).
- 5) Kelsey, J. L. & Berkowitz, G. S.: Breast cancer epidemiology. *Cancer Res.*, **48**, 5615-5623 (1988).
- 6) Bulbrook, R. D., Hayward, J. L. & Spicer C. C.: Relation between urinary androgen and corticoid excretion and subsequent breast cancer. *Lancet*, **2**, 395-398 (1971).
- 7) Parker, L. N.: Adrenal Androgens in Clinical Medicine, 1st ed., p3-57, Academic Press, California, 1989.
- 8) Jones, D. L. & James, V. H.: Determination of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in blood and tissue. Studies of normal women and women with breast or endometrial cancer. *J. Steroid Biochem.*, **26**, 151-159 (1987).
- 9) Petterson, B., Bergstrom, R. & Johanson, E. D. B.: Serum estrogens and androgens in women with endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, **25**, 223-233 (1986).
- 10) Bonney, R. C., Jones, M. J., Anderson, M. C. & James, V. H. T.: The relationship between estradiol metabolism and adrenal steroids in the endometrium of postmenopausal women with and without endometrial cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **22**, 953-961 (1986).
- 11) Engel, L. W., Young, N. A., Tralka, T. S., Lippman, M. E., O'Brien, S. J. & Joyce, M. J.: Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res.*, **38**, 3352-3364 (1978).
- 12) Way, D. L., Grosso, D. S., Davis, J. R., Surwit, E. A. & Christian C. D.: Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro*, **19**, 147-158 (1983).
- 13) Darbre, P., Yates, J. & King, R. J. B.: Effect of estradiol on human breast cancer cell in culture. *Cancer Res.*, **43**, 349-354 (1983).
- 14) 坂本吾偉: 日本人乳癌の特性と未来. 乳癌の臨, **2**, 327-337 (1987).
- 15) 筒井章夫: 子宮体癌の疫学. 産婦の実際, **37**, 830-847 (1988).
- 16) 加藤育子, 富永祐民: 乳癌の疫学. 病理と臨, **7**, 427-434 (1989).
- 17) Adams, J. B.: Human breast cancer: Concerted role of diet, prolactin and adrenal C19-delta 5-steroids in tumorigenesis. *Int. J. Cancer.*, **50**, 854-858 (1992).
- 18) Wysowski, D. K., Comstock, G. W., Helsing, K. J. & Lau, H. L.: Sex hormone levels in serum in relation to the development of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.*, **125**, 791-799 (1987).
- 19) Henderson, B. E., Ross, R. & Bernstein, L.: Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal foundation award lecture. *Cancer Res.*, **48**, 246-253 (1988).
- 20) Osborne, C. K., Hobbs, K. & Clark, G. M.: Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Res.*, **45**, 584-590 (1985).
- 21) Secreto, G., Toniolo, P., Berrino, F., Recchione, C., Cavalleri, A., Pisani, P., Totis, A., Fariselli, G. & Pietro, S. D.: Serum and urinary androgens and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Res.*, **51**, 2572-2576 (1991).
- 22) Secreto, G., Toniolo, P., Pisani, P., Recchione, C., Cavalleri, A., Fariselli, G., Totis, A., Pietro, S. D. & Berrino, F.: Androgens and breast cancer in premenopausal women. *Cancer Res.*, **49**, 471-476 (1989).
- 23) Bird, C. E., Cook, S., Owen, S., Sterns, E. E. & Clark, A. F.: Plasma concentrations of C-19 steroids, estrogens, FSH, LH and prolactin in postmenopausal women with and without breast cancer. *Oncology*, **38**, 365-368 (1981).
- 24) Hill, S. M. & Blask, D. E.: Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res.*, **48**, 6121-6126 (1988).
- 25) 名和田新, 小河 淳: デヒドロエピアンドロステロン, デヒドロエピアンドロステロンサルフェート. 日臨, **47**, 1217-1220 (1989).
- 26) 赤祖父一知, 荒木克己, 西田悦郎: 加齢に伴う内分泌学的変化. 産婦 MOOK30 (玉田太朗編), 第1版, 65-73頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 27) Akasofu, K.: Studies on adrenal androgens in women. 第25回日産婦学会北日本地方部会特別講演要旨, 16-28頁, 1977.
- 28) Parker, L. N., Levin, E. R. & Lifrak, E. T.: Evidence for adrenocortical adaptation to severe illness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **60**, 947-952 (1985).
- 29) Adams, J. B.: Control of secretion and the function of C<sub>19</sub>-Δ<sup>5</sup>-steroids of the human adrenal gland. *Mol. Cell.*

- Endocrinol., 4, 1-17 (1985).
- 30) Gordon, G. B., Shantz, L. M. & Talalay, P.: Modulation of growth, differentiation and carcinogenesis by dehydroepiandrosterone. *Adv. Enzyme Regul.*, 26, 355-382 (1987).
- 31) Knudsen, J. F. & Mahesh, V. B.: Initiation of precocious sexual maturation in the immature rat treated with dehydroepiandrosterone. *Endocrinology*, 97, 458-468 (1975).
- 32) 西田悦郎:産科婦人科学領域における老年医学的研究;とくに閉経後婦人における副腎性 androgen の意義と応用. 第21回産婦学会宿題報告要旨, 4-13頁, (1969).
- 33) 荒木克己:女性における血中 Dehydroepiandrosterone の動態に関する研究. 十全医会誌, 89, 852-876 (1980).
- 34) 村上弘一:雌ラットにおける血中 dehydroepiandrosterone の動態に関する研究. 十全医会誌, 100, 693-710 (1991).
- 35) Wang, D. Y., Hayward, J. L., Bulbrook, R. D., Kumaoka, S., Takatani, O., Abe, O. & Utsunomiya, J.: Plasma dehydroepiandrosterone and androsterone sulphates, androstenedione and urinary androgen metabolites in normal british and Japanese women. *Eur. J. Cancer*, 12, 951-958 (1976).
- 36) Zumoff, B., Levin, J., Rosenfeld, R. S., Markham, M., Strain, G. W. & Fukushima, D. K.: Abnormal 24-hr mean plasma concentrations of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate in women with primary operable breast cancer. *Cancer Res.*, 41, 3360-3363 (1981).
- 37) Gordon, G. B., Bush, T. L., Helzlsouer, K. J., Miller, S. R. & Comstock, G. W.: Relationship of serum levels of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate to the risk of developing postmenopausal breast cancer. *Cancer Res.*, 50, 3859-3862 (1990).
- 38) Thomas, B. S., Kirby, P., Symes, E. K. & Wang, D. Y.: Plasma dehydroepiandrosterone concentration in normal women and in patients with benign and malignant breast disease. *Europ. J. Cancer*, 12, 405-409 (1976).
- 39) Schwartz, A. G.: Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H (Avy/a) mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res.*, 39, 1129-1132 (1979).
- 40) Spinola, P. G., Marchetti, B. & Labrie, F.: Adrenal steroids stimulate growth and progesterone receptor levels in rat uterus and DMBA induced mammary tumors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 8, 241-248 (1986).
- 41) 松本圭史, 西沢恭子:乳癌とホルモン. 乳癌における内分泌療法の進歩 (癌の臨床別集13) (癌の臨床編), 第1版, 3-15頁, 篠原出版, 東京, 1987.
- 42) Poulin, R. & Labrie, F.: Stimulation of cell proliferation and estrogenic response by adrenal  $C_{19}$ - $\Delta^5$ -steroids in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Cancer Res.*, 46, 4933-4937 (1986).
- 43) Dworkin, C. R., Gorman, S. D., Pashko, L. L., Cristofalo, V. J. & Schwartz, A. G.: Inhibition of growth of HeLa and WI-38 cells by dehydroepiandrosterone and its reversal by ribo- and deoxyribonucleosides. *Life Sci.*, 38, 1451-1457 (1986).
- 44) van der Burg, B., Rutteman, G. R., Blankenstein, M. A., de Laat, S. W. & van Zollen, E. J. J.: Mitogenic stimulation of human breast cancer cells in a growth factor-defined medium: synergistic action of insulin and estrogen. *J. Cell. Physiol.*, 134, 101-108 (1988).
- 45) Anzai, Y., Holinka, C. F., Kuramoto, H. & Gurdip, E.: Stimulatory effects of 4-hydroxytamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa Line). *Cancer Res.*, 49, 2362-2365 (1989).
- 46) Najid, A., Nicolas, A., Tixier, M. & Habrioux, G.: Mitogenic effect of estradiol on MCF-7 human breast cancer cells can be modulated by serum. *Exp. Cell Biol.*, 57, 139-145 (1989).
- 47) Biswas, R. & Vonderhaar, B. K.: Role of serum in the prolactin responsiveness of MCF-7 human breast cancer cells in long-term tissue culture. *Cancer Res.*, 47, 3509-3514 (1987).
- 48) Lykkesfeld, A. E., Larsen, J. K. & Christensen, I. J.: Cell cycle analysis of estrogen stimulation and antiestrogen inhibition of growth of the human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Res. Treat.*, 7 (Suppl.), 83-90 (1986).
- 49) Soto, A. M. & Sonnenschein, C.: Mechanism of estrogen action on cellular proliferation: Evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1097-1103 (1984).
- 50) Vignon, F., Terqui, M., Westley, B., Derocq, D. & Rochefort, H.: Effects of plasma estrogen sulfates in mammary cancer cells. *Endocrinology*, 106, 1079-1086 (1980).
- 51) Glover, J. F., Irwin, J. T. & Darbre, P. D.: Interaction of phenol red with estrogenic and antiestrogenic action on growth of human breast cancer cells ZR-75-1 and T-47-D. *Cancer Res.*, 48, 3693-3697 (1988).
- 52) Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A. & Katzenellenbogen, B. S.: Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 2496-2500 (1986).
- 53) Welshons, W. V., Wolf, M. F., Catherine, S., Murphy, C. S. & Jordan, V. G.: Estrogenic activity of phenol red. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 57, 169-178 (1988).
- 54) Shafie, S. M.: Estrogen and the growth of breast cancer: New evidence suggests indirect action. *Science*, 209, 701-702 (1980).
- 55) Grattarola, R., Seclero, G., Recchione, C. & Castellini, W.: Androgens in breast cancer. II. endometrial adenocarcinoma and breast cancer in married postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 118, 173-178 (1974).
- 56) Langer, M., Kubista, E., Schemper, M. & Spona, J.: Androgen receptor, serum androgen levels and survival of cancer patients. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 247, 203-209 (1990).
- 57) Bonney, R. C., Reed, M. J. & James, V. H. T.:

Inhibition of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human endometrium by adrenal androgens. *J. Steroid Biochem.*, 18, 59-64 (1983).

58) James, V. H. T., McNeill, J. M., Beranek, P. A., Bonney, R. C. & Reed, M. J.: The role of tissue steroids in regulating aromatase and oestradiol 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities in breast and endometrial cancer. *J. Steroid Biochem.*, 25, 787-790 (1986).

59) Nishida, E., Akasofu, K., Hashimoto, S., Harada,

T., Uchida, K., Nakagawa, T. & Tomimatsu, N.: Any indication for androgen therapy? *In* M. L'Hermite (ed.), *Progress in Reproductive Biology Medicine*, 1st ed., p86-94, Karger, Basel, 1989.

60) Sundareshan, P. & Hendrix, M. J. C.: Growth, morphologic, and invasive characteristics of early and late passages of a human endometrial carcinoma cell line (RL 95-2). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28A, 544-552 (1992).

**Effects of Sex Steroids on Human Breast Cancer Cell Line ZR 75-1 and Human Endometrial Cancer Cell Line RL 95-2** Masahiko Miwa, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med Soc.*, 103, 108—121 (1994)

**Key words** sex steroids, breast cancer, endometrial cancer, cell culture, cell growth

#### Abstract

This study was performed to examine the effects of various steroids (estradiol, E<sub>2</sub>; testosterone, T; progesterone, P; dehydroepiandrosterone, DHA) on cell proliferation of human breast cancer cell line ZR 75-1 and human endometrial cancer cell line RL 95-2 under several culture conditions. We also examined how one of the steroids interacts with the other. ZR 75-1 cell growth was slightly inhibited by E<sub>2</sub> or T under 5% fetal bovine serum (FBS) RPMI-1640 medium and it was stimulated by E<sub>2</sub> or DHA under 5% dextran coated charcoal (DCC)-FBS RPMI-1640 medium. The growth stimulatory effect of E<sub>2</sub> was observed at 10<sup>-11</sup>M to 10<sup>-6</sup>M and that of DHA was observed at only 10<sup>-6</sup>M. The cell growth was unchanged at T concentrations up to 10<sup>-5</sup>M under 5% DCC-FBS condition. The cell proliferation was slightly stimulated by addition of E<sub>2</sub> into the medium containing 10<sup>-6</sup>M of DHA, and the stimulatory effect of E<sub>2</sub> or DHA on the cell growth was reversed by T in a dose dependent manner with same force under 5% DCC-FBS condition. The stimulatory effect of E<sub>2</sub> or DHA on the cell growth was also observed under serum defined condition containing insulin 1  $\mu$ g/ml, transferrin 5  $\mu$ g/ml selenite 25 nM, and bovine serum albumin 1 mg/ml. On the contrary, the cell growth was inhibited by T or P at increasing concentrations under serum defined condition. It was also observed that 10<sup>-10</sup>M to 10<sup>-7</sup>M of P augmented cell proliferation induced by E<sub>2</sub> or DHA, while 10<sup>-5</sup>M concentration of P inhibited cell proliferation induced by E<sub>2</sub> or DHA. The effects of P with E<sub>2</sub> or DHA on cell proliferation were the same. With regard to RL 95-2 cells, none of the steroid hormones stimulated cell proliferation and E<sub>2</sub>, T or P inhibited cell growth at high concentration. It is suggested that E<sub>2</sub> and pharmacological doses of DHA stimulate growth of ZR 75-1 cells *in vitro*, whereas we should consider DHA metabolism and effects on mesenchymal cells *in vivo*, and that we must watch carefully the interaction between sex steroids.