

Influence of Hormones on Proliferation of Tumor Growth, Cell Kinetics, Estrogen Receptor (ER), Insulin-like Growth factor-1 (IGF-1) of Human Breast Cancer (MCF-7) Serially Transplanted into Nude Mice

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	http://hdl.handle.net/2297/8283

ヌードマウス可移植性エストロゲンリセプター陽性ヒト乳癌腫瘍 (MCF-7) の増殖, 細胞動態, エストロゲンリセプターおよび IGF-1 に及ぼすホルモンの影響について

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

小矢崎 直 博

(平成3年6月14日受付)

ヌードマウス可移植性エストロゲンリセプター陽性ヒト乳癌腫瘍 MCF-7 の増殖に及ぼすホルモンの影響を, エストロゲン (estrogen, 17 β -estradiol dipropionate) 投与群 (E₂群), タモキシフェン (tamoxifen) 投与群 (TAM 群), 薬剤非投与群 (対照群) の3群に分け, 腫瘍重量, フローサイトメトリーによるS期分画 (S phase fraction (SPF)), エストロゲンリセプター酵素免疫測定法 (estrogen receptor enzyme immunoassay (ER-EIA)), エストロゲンリセプター免疫細胞化学測定法 (estrogen receptor immunocytochemical assay (ER-ICA)), ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay (RIA)) による血中インスリン様増殖因子1 (insulin like growth factor-1 (IGF-1)), 腫瘍内 IGF-1, IGF-1 染色 (IGF-1 免疫組織化学染色), ER-ICA と ³H-チミジンオートラジオグラフィによる二重染色および IGF-1 染色と ³H-チミジンオートラジオグラフィによる二重染色を用いて検討した. その結果, 1) MCF-7 の増殖は E₂群で促進され, TAM 群で抑制され, SPF も E₂群で上昇し, TAM 群で低下を示した. 2) ER-EIA による ER 値は E₂群で極めて低い値を示し, TAM 群でも有意に低い値を示した. 3) ER-ICA による ER 陽性細胞率でも, E₂群では陽性細胞をほとんど認めず, TAM 群で低い傾向を示した. 4) 血中 IGF-1 は, E₂群で有意に低下を示し, TAM 群で差を認めなかった. 5) 腫瘍内 IGF-1, IGF-1 染色による IGF-1 陽性細胞率はともに E₂群で有意に低く, TAM 群で有意に高い値を示した. 6) ER-ICA と ³H-チミジンオートラジオグラフィの二重染色による ER 陽性細胞, 及び ER 陰性細胞の ³H-チミジン標識細胞指数は, TAM 群, 対照群ともに, ER 陰性細胞の標識指数が ER 陽性細胞のそれに比べ有意に高かった. 7) IGF-1 染色と ³H-チミジンオートラジオグラフィの二重染色による IGF-1 陽性細胞, 及び IGF-1 陰性細胞の ³H-チミジン標識細胞指数は, 3群ともに IGF-1 陰性細胞の標識指数が IGF-1 陽性細胞のそれに比べ有意に高かった. 8) 各腫瘍毎に IGF-1 陽性細胞率, ³H-チミジン標識指数をプロットし, その相関関係を検討した結果, 負の相関関係を認めた. 以上の結果より, 免疫反応性 IGF-1 は, 生体内において MCF-7 腫瘍の増殖に促進的に働かないことが示唆された.

Key words estrogen receptor, hormones, IGF-I, MCF-7, nude mouse

ホルモン依存性乳癌はホルモンによってその増殖が制御されているが, その機序についてはなお, 不明な点が多い. 最近, 乳癌のホルモンによる制御は, 上皮増殖因子 (epidermal growth factor (EGF)), 腫瘍化増

殖因子アルファ (transforming growth factor- α (TGF- α)), 腫瘍化増殖因子ベータ (transforming growth factor- β (TGF- β)), インスリン様増殖因子1 (insulin-like growth factor-1 (IGF-1)) といったオート

Abbreviations: avidin-biotin peroxidase complex; BrdU, 5-Bromo-2'-Deoxyuridine; DAB, diaminobenzidine; E₂, 17 β -estradiol dipropionate; EGF, epidermal growth factor; EIA, enzyme immunoassay; ER, estrogen receptor; ER-ICA, estrogen receptor immunocytochemical assay; ETW, estimated tumor weight; FCM, Flow cytometry; H&E, hematoxylin and

クリン (autocrine), パラクリン (paracrine) の増殖因子を介するとする説が有力視されている¹¹⁻¹⁴。最近, 乳癌腫瘍に対してノーザンブロッティング (northern blotting) を施行した研究において, 特に IGF-1 は癌細胞でなく間質細胞で産生され, それが近在する癌細胞の増殖を刺激するパラクリン増殖因子 (paracrine growth factor) であると示唆されている⁹。また, IGF-1 は, 種々の乳癌細胞の増殖を促進するが⁹⁻¹⁰, 血清 IGF-1 濃度を低下させるソマトスタチンの類似物質¹⁵は乳癌細胞の増殖を抑制すると報告されている¹⁶。一方, 生体内の研究で卵摘したヌードマウスに MCF-7 細胞を注入し, それに IGF-1 を投与すると腫瘍形成が認められたという報告¹⁰があり, また, タモキシフェン (tamoxifen) の抗腫瘍効果の一部は, IGF-1 産生に対する抑制によることも報告されている¹⁰。しかしながら, 生体内における血中 IGF-1 は成長ホルモンの影響を強く受けており, 閉経後の患者に ethinyl-estradiol を投与すると, 血中 IGF-1 が低下し^{16,17}, その後のタモキシフェン投与により血中 IGF-1 値が回復すると報告されている¹⁸。間質細胞由来の IGF-1 は, 肝で産生される IGF-1 と同様であり, 生体においてはこの間質細胞のみならず, 肝で産生される IGF-1 も MCF-7 乳癌細胞の増殖に関与すると考えられ, エストロゲンやタモキシフェンが血中, 及び腫瘍内 IGF-1 に及ぼす影響は非常に複雑であると考えられる。従って, 生体に各種ホルモン剤を投与し, 腫瘍増殖や細胞動態に対する影響を血中 IGF-1, 及び腫瘍内 IGF-1 との関係から検討することは大変興味深いと思われる。そこで今回, エストロゲンリセプター (estrogen receptor (ER)) 陽性乳癌 MCF-7 腫瘍をヌードマウスに移植し, 各種のホルモンによる内分泌療法を行い, 腫瘍増殖, 細胞動態, ER, IGF-1 に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

I. 実験動物

実験動物中央研究所由来の BALB/c nu/nu 雌マウス (日本クレア, 東京) を金沢大学医学部付属動物実験施設のアイスラック内で, 滅菌水とオリエンタル固形飼料 (オリエンタル酵母, 東京) を投与し飼育した。実験開始時のマウスの体重は 20g 前後, 週令は 6~7 週

とした。

II. 移植腫瘍

ER 陽性ヒト乳癌培養細胞 (MCF-7) (慶応大学医学部久保田講師より供与) 1×10^7 個を 10% 牛胎児血清とペニシリン/ストレプトマイシン 100 単位を含む培養液 RPMI-1640 0.5ml に浮遊させ, ヌードマウス背側皮下に接種した。毎週 1 回, EP ホルモン・デポー (17 β -estradiol dipropionate 1mg/ml, および 17 α -hydroxyprogesterone caproate 50mg/ml, 帝国臓器社, 東京) 0.1ml を大腿筋肉内に注射し, 腫瘍の増殖を促した。増殖した腫瘍をヌードマウスから摘出し, 2mm 角の塊とし, その 2 個を Trocar 針を用いて受供用ヌードマウスの両側背側皮下に移植し, EP ホルモン・デポー 0.1ml を毎週 1 回筋注し腫瘍増殖を促した。移植された腫瘍が対数増加する 28 日目に次に示す内分泌療法を行った。

III. 内分泌療法

マウスを無作為に分け, 以下の 3 群を作成した。

第 1 群 (E 群): 17 β -estradiol dipropionate (E₂) (Sigma 社, St. Louis, MO, USA) 原末 1mg をゴマ油 1ml に溶解して, 5mg/kg 毎週 1 回筋注した。

第 2 群 (TAM 群): Tamoxifen (TAM) (I. C. I. ファーマ社, London, England) 原末 1mg をゴマ油 1ml に溶解して, 5mg/kg 毎週 1 回筋注した。

第 3 群 (対照群): 無処置として E₂ 群, TAM 群の対照とした。

治療開始時より週 3 回, ノギスを用いて腫瘍の長径と短径を計測した。また, 3 週間の内分泌療法後, 各群のヌードマウスを任意に二分し, 一方は 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) (Sigma 社) 20mg/kg を腹腔内に注射して 1 時間後に採血し, 屠殺後直ちに腫瘍を摘出しその湿重量を測定した。Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) を含むスピッツに採取した血液は直ちに 5,000g, 10分, 4°C の条件下で遠心機 (KUBOTA5100 丸文通商, 東京) で血清を分離し, -80°C で凍結保存し血中 IGF-1 測定に供した。腫瘍はその一部を 70% エタノールに固定し, フローサイトメトリー (Flow cytometry (FCM)) による S 期細胞率の測定に供し, 他の部分は -80°C に保存し酵素免疫測定法 (enzyme-immunoassay (EIA)) によるエストロゲンリセプター (estrogen receptor (ER)) の測定, ラジオイム

eosin staining; IGF-1, insulin like growth factor-1; NGS, normal goat serum; PAP, peroxidase anti-peroxidase; PBS, phosphate buffered saline; r, correlation coefficient; RIA, radioimmunoassay; TAM, tamoxifen; Td, tumor doubling time; TGF- α , transforming growth factor- α ; TGF- β , transforming growth factor- β

ノアッセイ (radioimmunoassay ((RIA)) による IGF-1 の測定に供した。他の一方は ^3H -チミジン (^3H -thymidine, 特異活性 (specific activity) 23.6 Ci/mmol, Amersham Buckinghamshire, London, England)) 50 $\mu\text{Ci/kg}$ を腹腔内注射し, 1時間後に屠殺し, 直ちに腫瘍を摘出しその湿重量を測定した。その腫瘍を2分し, 一方は -80°C に保存し, エストロゲンリセプター免疫細胞化学測定法 (ER-immunocyto-chemical assay (ER-ICA)) および ER-ICA と ^3H -チミジンオートラジオグラフィ (^3H -thymidine autoradiography) による2重染色に供し, 他方は10%中性緩衝ホルマリンに固定後, IGF-1 染色, および IGF-1 と ^3H -チミジンオートラジオグラフィによる2重染色に供した。

IV. 治療効果の判定

1. 推定腫瘍重量 (estimated tumor weight, ETW) National Cancer Institute (N. C. I.) プロトコール¹⁰⁾に準じ, 各腫瘍毎に

$$\text{推定腫瘍重量} = \text{長径} \times \text{短径}^2 \div 2$$

を計算し, 各群毎に平均推定腫瘍重量を求め, 治療開始後の日数毎にプロットし, 腫瘍の増殖曲線を求めた。

2. 治療終了時の実測腫瘍重量

摘出した腫瘍は眼科用ハサミで脂肪組織, 線維組織を可及的に除去し, 腫瘍の湿重量を測定した。

3. 腫瘍倍加時間 (tumor doubling time, Td)

Collins らの方法¹⁰⁾に従って, 次式により腫瘍倍加時間を算出した。

$$\text{Td} = \ln 2 / (\ln V_t - \ln V_0)$$

t: 内分泌療法期間 (21日)

V_t: 21日目の推定腫瘍重量

V₀: 治療開始日の推定腫瘍重量

V. DNA Index (DI) と S 期分画 (S phase fraction, SPF)

70%エタノールで固定した組織片を, 0.5% pepsin solution (pH1.5) にて 37°C , 2時間酵素処理し, 約 2×10^6 個の単離細胞とした。2N HCl にて30分間, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ にて10分間中和した後, 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) pH7.2 で二回洗浄した。次に0.5% Tween-20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) および0.5%正常山羊羊血清 (normal goat serum, NGS) を含む PBS 1ml で15分間再浮遊した後, 一次抗体として抗 BrdU 抗体 (anti-BrdU monoclonal antibody, Becton Dickinson immunocytochemistry System, Mountain View, CA, USA)

10 μl を入れ, 室温で60分間処置した。その後, 0.5% Tween-20 を含む PBS で15分間二回洗浄した後, 二次抗体として FITC conjugated goat anti-mouse IgG (Cappel; Cooper Bio-medical Inc. Malvern, PA, USA) 10 μl を含む PBS で60分間浮遊した。PBS で2回洗浄した後, DNA 染色のため, 細胞は propidium iodide (Prdi, Sigma Chemical Co., USA) 20g/ml を含む PBS 4ml で30分以上再浮遊した。その後, 細胞は40 μm ナイロンメッシュで濾過し, FCM で分析した。尚, 脾細胞を二倍体 (diploid) の対照として用いた。FCM は, EPICS-C (Coulter Co., Hialeah, FLA, USA) を使用した。1検体につき1万個以上の細胞を測定し, 癌細胞の G_0G_1 peak と脾細胞の G_0G_1 peak の比を DNA Index (DI) とし, $\text{DI} = 1.0$ を二倍体, それ以外のものを異数倍体 (aneuploid) とした。S 期分画は bivariate BrdU/DNA distribution より算出した。

VI. EIA 法による ER の測定

1. Cytosol の調整

-80°C に凍結保存した腫瘍組織を細切し, 7倍量のホルモジネート用緩衝液 [トリス塩酸緩衝液 (トリス-ヒドロキシメチル-アミノメタン 10mM, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 1mM, アジ化ナトリウム 3mM, チオグリセロール 12mM, グリセロール 10%, 塩酸にて pH7.4 に調整)] を加え, 4°C , 15秒間, 3回, 各45秒間の休止期を置きホモジナイズした。このホモジネートを超遠心分離機で50,000g, 4°C , 60分間遠心し, 上清を細胞質分画 (Cytosol) として得た。紫外吸光測定で細胞質分画蛋白濃度 2~3 mg/ml になるように上記のホモジネート用緩衝液にて希釈した。この希釈細胞質分画を次の操作に移すと共に Lowry 法による蛋白定量に供した。

2. 測定法

測定は ABBOTT ER-EIA monoclonal kit (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) を用いて行った。各濃度の ER 標準液 (0, 5, 25, 100, 250fmol/ml) 200 μl ずつを, 反応トレイ (以下トレイと略する) の各穴に分注し, 順に検体希釈用緩衝液 100 μl , さらに検体または ER コントロール液 100 μl ずつを分注した。ER 抗体ビーズ (以下ビーズと略する) 1個をトレイの各穴にいれ, トレイをシールでおおい, 5°C で18時間, 1回目のインキュベーションを行った。反応液を吸引除去し, ビーズを蒸留水で洗浄し, (5ml, 2回), 直ちに ER 抗体-ペルオキシダーゼ 200 μl を各穴に加え, トレイをシールでおおい, 37°C , 1時間, 2回目のインキュベーションを行った。再度反応液を吸引除去し, ビーズを洗浄し, (5ml, 2回), 直ちにビーズを

酵素反応用試験管に移し、調整した基質液 (0.02% 過酸化水素 5ml にオルトフェニレンジアミン二塩酸塩 15mg) 300 μ l をビーズの入った試験管に加え、室温で30分間、3回目のインキュベーションを行った。1N 硫酸 1ml をすべての試験管に加え、酵素反応を停止させた後、サンプルミキサーで十分に混和した。蒸留水をブランクとしてゼロ調節し、波長 492nm で吸光度を測定した。標準曲線を作成し、検体の吸光度から ER 量 (fmol/ml) を読み取り、その値を2倍して ER 量とした。検体の ER 量 (fmol/ml) を検体の蛋白濃度で除し、単位蛋白当りの ER 量 (fmol/mg \cdot protein) を求めた。

VII. RIA 法による血中 IGF-1、腫瘍組織 IGF-1 の測定

血中 IGF-1、腫瘍組織 IGF-1 の測定は Somatomedin-C Radioimmunoassay Kit (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA92675, USA) を用いて行った。

1. 血中 IGF-1

①~⑭の番号を記した試験管を用意して①、②をトータルカウント測定用、③~⑭は標準曲線製作用に使用した。試験管③、④に OmU/ml 標準ソマトメジンC溶液を50 μ l ずつとり、⑤、⑥に 7mU/ml 標準ソマトメジンC溶液と、順次⑬、⑭までの試験管にそれぞれ標準ソマトメジンC溶液を50 μ l ずつ秤取した。ソマトメジン管理血清および検体はあらかじめ緩衝液 (PBS) を用いて20倍に希釈し、次いで1希釈検体につき2本ずつの試験管を準備し、⑮以降の番号を記入して各希釈検体を50 μ l ずつ秤取した。以降の試験管に緩衝液250 μ l ずつ加え、さらにソマトメジンC抗血清溶液を100 μ l ずつ加えミキサーで混和した。室温で1時間インキュベートし、すべての試験管に¹²⁵I 標識ソマトメジンC溶液を100 μ l ずつ加え、ミキサーを用いて混和した。5 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートし、③以降の試験管に第二抗体溶液を50 μ l ずつ加え、ミキサーを用いて混和した。5 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、③以降の試験管に沈澱安定剤溶液を20 μ l ずつ加え、ミキサーを用いて混和した。5 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、3,000r. p. m (2,000 \times g) で冷却遠心分離し、速やかに上清を吸引除去した。シンチレーションカウンター (84-ウェルオートガンマカウンター, Aloka 社製, 東京) を用いて、各試験管の放射能を測定した。OmU/ml 濃度の標準ソマトメジンC溶液の平均カウント数を算出し、各標準ソマトメジンC溶液および検体の B/B₀% を算出した。

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{各試験管のカウント数} \div \text{OmU/ml 濃度の標準ソマトメジン C 溶液の平均カウント数} \times 100}{\text{濃度の標準ソマトメジン C 溶液の平均カウント数} \times 100}$$

片対数グラフ用紙の対数目盛り (横軸) に標準ソマトメジンC溶液をとり、また整数目盛り (縦軸) に B/B₀% をとって、各標準ソマトメジンC溶液の B/B₀% をプロットし、標準曲線を作成した。標準曲線に検体の B/B₀% をあてはめて、検体中のソマトメジンC濃度を読み取った。上記の読み値より、ソマトメジンCの血中濃度を次のように算出した。

$$\text{ソマトメジン C (U/ml)} = \text{読み値} \times 20 \div 1,000$$

2. 組織中 IGF-1

組織重量約0.5g を氷冷下で細切し、リン酸緩衝生理食塩水にてトリポロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、4 $^{\circ}$ C 100,000 r. p. m 1時間超遠心を行った。その上清を上述の血中 IGF-1 と同様の方法で測定し、組織 1g 量で算出した。

VIII. ER-ICA 及び ER-ICA と ³H-チミジンオートラジオグラフィーによる二重染色

ER-ICA は ABBOTT ER-ICA monoclonal kit (Abbott Laboratories) を用いて行った。凍結保存した腫瘍組織を Cryostat (Tissue-Tec II, Miles 社, Elkhart, USA) にて厚さ 4~6 μ に薄切し、リジン膜加工したスライドグラスにのせ、3.7%ホルマリンを含む0.01M PBS pH7.2中で15分間固定した。PBS槽で5分間放置した後、スライドグラスを-15~-25 $^{\circ}$ Cのメタノール (methanol) 中に4分間、-15~-25 $^{\circ}$ Cのアセトン (acetone) 中に1分間浸し、非特異的反応を抑え、PBS中で5分間の洗浄を2回、行った。次に正常山羊血清 (normal goat serum) を滴下し15分間、湿箱中で反応させた後、一次抗体 (anti-ER rat monoclonal antibody) を滴下し、30分間、湿箱中で反応させた。PBS槽で5分間、2回の洗浄を行い、架橋抗体 (goat anti-rat antibody) を滴下し、30分間、湿箱中で反応させた。PBS槽で5分間、2回の洗浄を行い、PAP複合体 (peroxidase/rat antiperoxidase) を滴下し、30分間湿箱中で反応させた。PBS槽で5分間、2回の洗浄を行い、diaminobenzidine (DAB) 液を5分間反応させた。流水中で5分間洗浄した後、1% (V/V) ハリスヘマトキシリン (Harris Hematoxylin) 液で5分間核染色を行った。流水中で5分間洗浄した後、95%エタノール (ethanol) 槽中に2分間ずつ2回、100%エタノール槽中に2分間ずつ2回、更にキシレン (xylene) 槽中に2分間ずつ2回浸し、脱水、透徹を

行い、マリノール (Malinol) にて封入した。その評価は400倍の視野で鏡検し、一検体につき1,000個の癌細胞を数え、DAB による特異的核染色の有無により ER 陽性、陰性細胞に分け、

$$\text{ER 陽性細胞率 (\%)} = \text{ER 陽性細胞数} \div 1,000 \times 100$$

を計算した。

ER-ICA と ^3H -チミジンオートラジオグラフィーによる二重染色は、上述の ER-ICA の操作のうち、DAB 滴下後の水洗までの操作を同様に行った。次にスライドガラスを37°Cにて乾燥後、40°Cに加温した感光乳剤に約3秒間、静かに浸し (Dipping 法)、室温で1時間乾燥後、シリカゲル (silicagel) と共に暗箱室にいれ、4°C、3週間の露出を行った。露出の終了したスライドガラスを Condol-X で20°C、5分間現象し、Conifix で10分間定着、30分間水洗後、10% (V/V) ハリスヘマトキシリン液にて核染色し、その後は上述の ER 染色と同様に脱水、透徹、封入を行った。その評価は400倍の視野で鏡検し、一検体につき1,000個の癌細胞を数え、DAB による特異的核染色の有無により ER 陽性細胞、ER 陰性細胞に分け、更にそれぞれについて核に銀粒子10個以上をみるものを ^3H -チミジン標識細胞とした。

$$\text{{}^3\text{H}\text{-チミジン標識細胞指数 ({}^3\text{H}\text{-thymidine labeling index) (\%)} = \text{{}^3\text{H}\text{-チミジン標識細胞数} \div 1,000 \times 100}$$

$$\text{ER 陽性細胞の {}^3\text{H}\text{-チミジン標識細胞指数 ({}^3\text{H}\text{-thymidine labeling index of ER positive cells) (\%)} = \text{ER 陽性 } {}^3\text{H}\text{-チミジン標識細胞数} \div \text{ER 陽性細胞数} \times 100$$

$$\text{ER 陰性細胞の {}^3\text{H}\text{-チミジン標識細胞指数 ({}^3\text{H}\text{-thymidine labeling index of ER negative cells) (\%)} = \text{ER 陰性 } {}^3\text{H}\text{-チミジン標識細胞数} \div \text{ER 陰性細胞数} \times 100$$

を計算した。

IX. IGF-1 染色および IGF-1 と ^3H -チミジンオートラジオグラフィーによる二重染色

ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織を、厚さ5 μm で連続で数枚薄切した。脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するため、0.3%過酸化水素メタノール液30分間浸し、PBC 液で5分間、2回洗浄した後、免疫染色はアビジンビオチンペルオキシダーゼ複合法 (avidin-biotin peroxidase complex method, ABC method) に従い、Vectastain ABC kits (Vector Lab., Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて行った。一次抗体はポリクローナルヒト IGF-1 抗体

(amino acids 1 to 70, IGF-1, Kabigen AB, Stockholm, Sweden) を1,000倍に希釈して用いた。即ち、非特異的反応を抑えるため湿箱中で正常山羊血清を滴下し15分間、湿箱中で反応させた後、一次抗体を滴下し、3時間湿箱中で反応させた。PBS 槽で5分間、2回の洗浄を行い、架橋抗体 (biotylated goat anti-rabbit antibody) を滴下し、30分間湿箱中で反応させた。PBS 槽で5分間、2回の洗浄を行い、ABC 複合体を滴下し、30分間湿箱中で反応させた。PBS 槽で5分間、2回の洗浄を行い、DAB 液を5分間反応させた。流水中で5分間洗浄後、1% (V/V) ハリスヘマトキシリン (Harris Hematoxylin) 液で5分間核染色を行った。流水中で5分間洗浄後、95%エタノール槽中に5分間ずつ2回、100%エタノール槽中に10分間ずつ2回、更にキシレン槽中に10分間ずつ2回浸し、脱水、透徹を行い、マリノールにて封入した。その評価は ER-ICA と同様に鏡検にて、一検体につき1,000個の癌細胞を数え、DAB による特異的細胞質染色の有無により IGF-1 陽性細胞、IGF-1 陰性細胞に分け、

$$\text{IGF-1 陽性細胞率 (\%)} =$$

$$\text{IGF-1 陽性細胞数} \div 1,000 \times 100$$

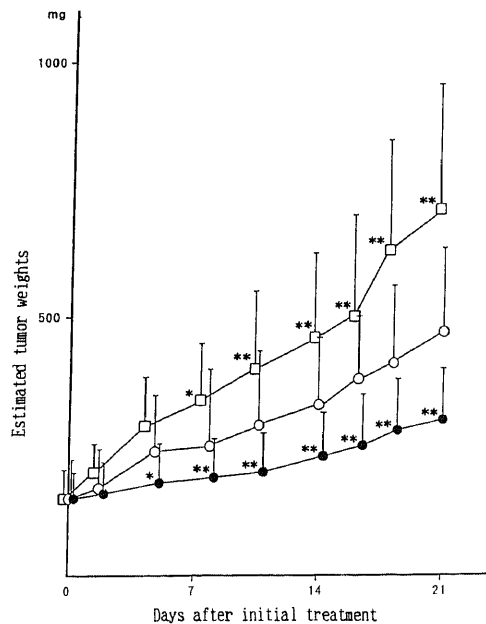


Fig. 1. Changes of the estimated tumor weights in E₂, TAM, and control groups: □—□, E₂ group (n=36); ●—●, TAM group (n=36); ○—○, control group (n=28). *, p<0.05, **, p<0.01 compared with control group.

を計算した。

IGF-1 染色と ^3H -チミジンオートラジオグラフィによる二重染色は、上述の ER-ICA と ^3H -チミジンオートラジオグラフィによる二重染色と同様に行った。その評価も同様に400倍の視野で鏡検し、一検体につき1,000個の癌細胞を数え、DAB による特異的細胞質染色の有無により IGF-1 陽性細胞、IGF-1 陰性細胞に分け、更にそれぞれについて核に銀粒子10個以上をみるものを ^3H -チミジン標識細胞とし、

IGF-1 陽性細胞の ^3H -チミジン標識細胞指数
(^3H -thymidine labeling index of IGF-1 positive cells) (%) = IGF-1 陽性 ^3H -チミジン標識細胞数 ÷ IGF-1 陽性細胞数 × 100

IGF-1 陰性細胞の ^3H -チミジン標識細胞指数
(^3H -thymidine labeling index of IGF-1 negative cells) (%) = IGF-1 陰性 ^3H -チミジン標識細胞数 ÷ IGF-1 陰性細胞数 × 100

を計算した。

X. 統計学的処理方法

本実験の成績はすべて平均 ± 標準偏差 (Mean ± S.D.) で表した。2 群間の平均値の差の検定には Student's t テストを用い、 $p < 0.05$ を有意の差とした。

成 績

I. 腫瘍増殖

推定腫瘍重量は、対照群に比して E_2 群が 8 日目まで有意に増加し、TAM 群が 5 日目に有意に低下した

(図 1)。また、21日目の腫瘍湿重量は対照群に比して E_2 群が有意に大きく ($p < 0.01$)、TAM 群が有意に小さかった ($p < 0.01$) (表 1)。腫瘍倍加時間は対照群に比して E_2 群が有意に短縮し ($p < 0.01$)、TAM 群が有意に延長した ($p < 0.01$) (表 1)。

II. 細胞動態

^3H -チミジン標識細胞指数は対照群に比して E_2 群が有意に高く ($p < 0.05$)、TAM 群が有意に低かった ($p < 0.05$)。S 期分画は対照群に比して E_2 群が有意の増加を認めたが ($p < 0.05$)、TAM 群は対照群と差を認めなかった。また、DNA index は各群間に差を認めなかった (表 2)。

III. 腫瘍の病理組織

対照群の腫瘍は充実性の胞巣を形成していた (図 2)。 E_2 群の腫瘍は対照群に比べ核分裂像が多く、中心壊死を認めたが、その他は対照群のそれとほぼ同様の所見であり (図 3)、TAM 群の腫瘍は細胞が変性し、空胞が多く認められた (図 4)。

IV. ER 値と ER 陽性細胞率

ER-EIA による ER 値は E_2 群、TAM 群ともに対照群に比して有意に低く ($p < 0.01$)、特に E_2 群では測定下限に近い低値を示した。ER-ICA による ER 染色は、核にのみ種々の程度に染色されたが、 E_2 群では 2 個の腫瘍にのみ僅かな陽性細胞を認めた。即ち、ER 陽性細胞率は、 E_2 群が対照群に比して有意に低値を示したが ($p < 0.01$)、TAM 群と対照群は有意の差を認めなかった (表 3)。

V. 血中 IGF-1 値、腫瘍内 IGF-1 値、IGF-1 陽性細胞率

Table 1. Influence of hormonal agents on tumor weights and tumor doubling time

Agents	Estimated tumor weights (mg)	Wet tumor weights (mg)	Tumor doubling time (day)
E_2	761 ± 260 (36) ^a	615 ± 214 (36) ^a	9.7 ± 3.4 (36) ^a
TAM	259 ± 105 (36) ^b	269 ± 102 (36) ^b	22.7 ± 13.7 (36) ^b
Control	473 ± 185 (28)	419 ± 161 (28)	12.9 ± 4.1 (28)

^a, $p < 0.01$ in the E_2 group versus the control group; ^b, $p < 0.01$ in the TAM group versus the control group; (), No. of tumors

Table 2. Influence of hormonal agents on cell kinetics

Agents	^3H -thymidine labeling index (%)	S phase fraction (%)	DNA index
E_2	30.5 ± 3.6 (8) ^a	30.8 ± 3.9 (6) ^a	1.70 ± 0.01 (6)
TAM	15.3 ± 5.3 (9) ^b	21.4 ± 4.6 (6)	1.68 ± 0.03 (6)
Control	22.3 ± 5.0 (7)	25.6 ± 2.0 (6)	1.69 ± 0.01 (6)

^a, $p < 0.05$ in the E_2 group versus the control group; ^b, $p < 0.05$ in the TAM group versus the control group; (), No. of tumors

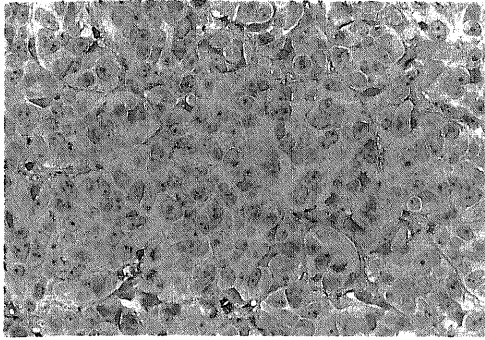


Fig. 2. Microscopic finding of MCF-7, showing a carcinoma with trabeculae and small nests of polygonal cells. (H&E); $\times 200$.

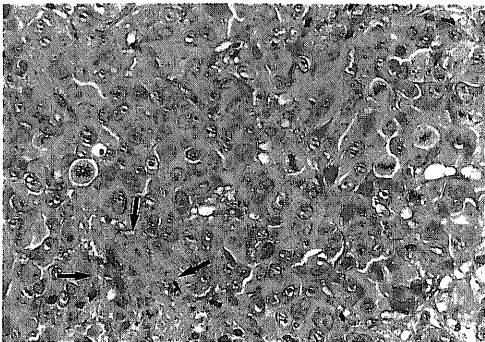


Fig. 3. Microscopic finding of MCF-7 treated with E_2 , showing mitosis and necrosis (arrow). (H&E); $\times 200$.

血中 IGF-1 値は対照群に比して E_2 群が有意に低く ($p < 0.01$), TAM 群が有意の差を認めなかった。しかしながら、腫瘍内 IGF-1 値は、対照群に比べ E_2 群が有意に低く ($p < 0.01$), TAM 群が有意に高かった ($p < 0.01$)。一方、IGF-1 染色は、細胞質に種々の強度で染色されるが、その染色率は対照群に比して E_2 群が有意に低く ($p < 0.01$), TAM 群が有意に高かった ($p < 0.01$) (表 4)。

VI. ER 染色, IGF-1 染色及びそれぞれにおける³H-チミジンオートラジオグラフィ

³H-チミジンの取り込みは、ER 陽性細胞に比べて、ER 陰性細胞に多く観察され (図 5), また、IGF-1 陽性細胞に比べて、IGF-1 陰性細胞に多く観察された (図

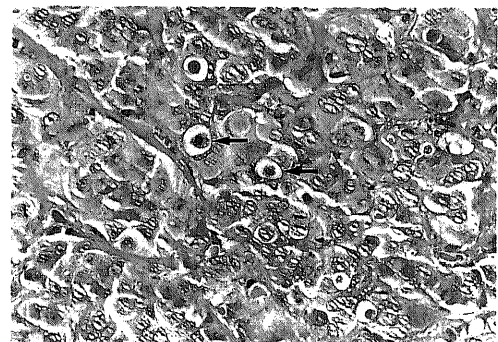


Fig. 4. Microscopic finding of MCF-7 treated with TAM, showing microcystic degeneration of tumor cell (arrow). (H&E); $\times 200$.

Table 3. Influence of hormonal agents on estrogen receptor level (ER-EIA) and ER positive cell rate

Agents	ER (fmol/mg·p)	ER positive cell rate (%)
E_2	16.9 \pm 3.0 (13) ^a	0.6 \pm 1.2 (8) ^a
TAM	51.0 \pm 15.3 (8) ^b	21.2 \pm 5.3 (9)
Control	81.8 \pm 21.1 (8)	23.0 \pm 5.1 (7)

^a, $p < 0.01$ in the E_2 group versus the control group; ^b, $p < 0.01$ in the TAM group versus the control group; (), No. of tumors

Table 4. Influence of hormonal agents on IGF-1 level in serum and tumor and IGF-1 positive cell rate

Agents	IGF-1 in serum (U/ml)	IGF-1 in tumor (U/g)	IGF-1 positive cell rate (%)
E_2	1.18 \pm 0.13 (8) ^a	0.66 \pm 0.14 (18) ^a	8.1 \pm 7.6 (8) ^a
TAM	1.46 \pm 0.22 (8)	1.40 \pm 0.36 (24) ^b	69.5 \pm 10.1 (9) ^b
Control	1.50 \pm 0.16 (9)	1.05 \pm 0.41 (14)	25.7 \pm 10.0 (7)

^a, $p < 0.01$ in the E_2 group versus the control group; ^b, $p < 0.01$ in the TAM group versus the control group; (), No. of tumors

6). TAM 群と対照群において, ER 陰性細胞における ^3H -チミジン標識細胞指数は ER 陽性細胞のそれに比べ, 有意に高く ($p < 0.01$), E_2 群では差を認めなかった. さらに E_2 群は対照群に比べて ER 陽性細胞, 陰性細胞とも ^3H -チミジン標識細胞指数が有意に高かったが ($p < 0.01$), TAM 群では対照群に比して ER 陰性細胞の ^3H -チミジン標識細胞指数のみが有意に低かった ($p < 0.05$) (表 5).

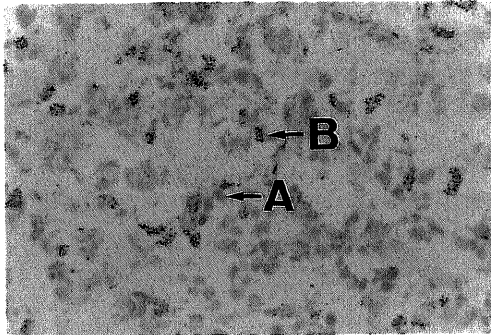


Fig. 5. ER-immunocytochemically stained ^3H -thymidine autoradiography: The ER positive cell without ^3H -thymidine uptake (arrow A), The ER negative cell with ^3H -thymidine uptake (arrow B). $\times 200$.

一方, IGF-1 陽性細胞, 陰性細胞における ^3H -チミジン標識細胞指数は 3 群ともに IGF-1 陽性細胞に比べ陰性細胞で有意に高かった ($p < 0.01$). また, IGF-1 陽性細胞における ^3H -チミジン標識細胞指数は E_2 群が対照群に比べ有意に低く ($p < 0.05$), TAM 群は対照群と有意の差を認めなかった. IGF-1 陰性細胞における ^3H -チミジン標識細胞指数は 3 群間で差を認めなかった (表 6).

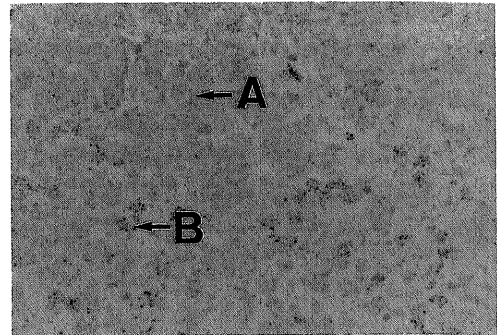


Fig. 6. IGF-1 immunohistochemically stained ^3H -thymidine autoradiography: The IGF-1 positive cell without ^3H -thymidine uptake (arrow A), The IGF-1 negative cell with ^3H -thymidine uptake (arrow B). $\times 200$.

Table 5. Influence of hormonal agents on ^3H -thymidine labeling indices of ER positive cells and ER negative cells

Agents	^3H -thymidine labeling indices (%)	
	ER positive cells	ER negative cells
E_2	26.0 \pm 1.4 (8) ^a	30.7 \pm 5.8 (8) ^a
TAM	8.9 \pm 2.7 (9)	17.4 \pm 5.3 (9) ^{b, c}
Control	9.7 \pm 2.8 (7)	24.2 \pm 5.0 (7) ^b

^a, $p < 0.01$ in the E_2 group versus the control group; ^b, $p < 0.01$ in the ER positive cells versus the ER negative cells; ^c, $p < 0.05$ in the TAM group versus the control group; (), No. of tumors

Table 6. Influence of hormonal agents on ^3H -thymidine labeling indices of IGF-1 positive cells and IGF-1 negative cells

Agents	^3H -thymidine labeling indices (%)	
	IGF-1 positive cells	IGF-1 negative cells
E_2	9.8 \pm 6.0 (8) ^a	32.5 \pm 4.9 (7) ^b
TAM	12.5 \pm 5.1 (9)	24.3 \pm 3.2 (9) ^b
Control	16.7 \pm 5.2 (7)	28.9 \pm 7.2 (7) ^b

^a, $p < 0.01$ in the E_2 group versus the control group; ^b, $p < 0.01$ in the IGF-1 positive cells versus the IGF-1 negative cells; (), No. of tumors

VII. ER 陽性細胞率と IGF-1 陽性細胞率の関係、及び ^3H -チミジン標識細胞指数と IGF-1 陽性細胞率の関係

各腫瘍毎のER 陽性細胞率、IGF-1 陽性細胞率をグラフ上にプロットし、その相関関係を検討すると、対照群において有意な正の相関を認め、 E_2 群と TAM 群では有意な関係を認めなかった (図7)。また、各腫瘍毎に ^3H -チミジン標識細胞指数と IGF-1 陽性細胞率をグラフ上にプロットし、その相関関係を検討すると、全体として有意な逆相関を認めた (図8)。

考 察

乳癌はホルモン依存性癌の一つとして知られているが、特にエストロゲンレセプター (estrogen receptor,

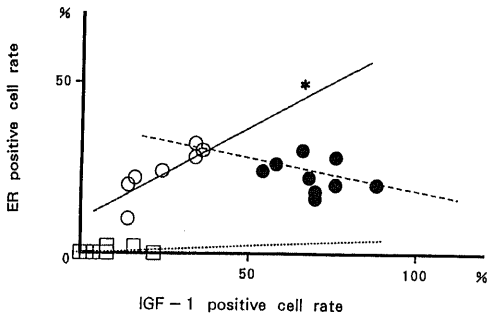


Fig. 7. Correlation between IGF-1 positive cell rates (X) and ER positive cell rates (Y): \square , E_2 group; \bullet , TAM group; \circ , control group. Correlation coefficients (r) were statistically significant in control group ($r=0.8542$, $*p<0.05$), statistically insignificant in E_2 and TAM group.

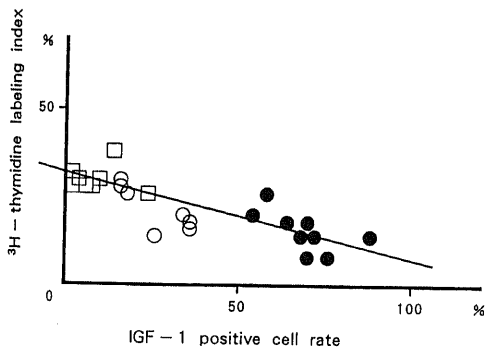


Fig. 8. Correlation between IGF-1 positive cell rates (X) and ^3H -thymidine labeling index (Y): \square , E_2 group; \bullet , TAM group; \circ , control group. Correlation coefficients (r) were statistically significant ($r=-0.8217$, $p<0.01$).

ER) が陽性の乳癌では、約60%にホルモン療法が奏效することが明らかになっている。この ER 陽性乳癌の増殖にエストロゲン (estrogen, E_2) は重要な役割を持ち、非ステロイド系抗エストロゲン剤であるタモキシフェン (tamoxifen, TAM) はエストロゲンと競合して ER と結合することにより抗腫瘍性に働くと考えられている^{20,21)}。しかしながら、乳癌の増殖に関与する ER の役目については依然不明な点が多い。最近の抗 ER モノクローナル抗体を用いた研究により、ER が核に存在し²²⁾、更に ER 陽性乳癌は ER のレベルに応じて ER 陽性、陰性細胞が混在すると報告されている^{24,26)}。また、ER 陽性乳癌にエストロゲンを投与すると、エストロゲンと ER の結合の結果、ER 値及び ERmRNA の down regulation を生じる^{20,27)}と共に、エストロゲンの刺激により急激に増大した腫瘍は、エストロゲンの刺激を受けない腫瘍に比べ、ER 値が低下していると報告されている²⁸⁾。従って ER 値は細胞濃度、増殖速度、エストロゲンとの結合により変化すると考えられる。一方、タモキシフェンの ER 値に対する効果については議論が多い。Kiang ら²⁹⁾はタモキシフェンが ER 量の急激な増加を惹起すると述べているが、Read ら³⁰⁾はタモキシフェン投与で ERmRNA の変化は生じなかったと報告している。一方、Bezwozda ら²⁹⁾は、タモキシフェン投与後、ER 値は有意に低下したと報告している。今回の検討では、 E_2 群、TAM 群の ER 値は対照群のそれに比較して有意に低下していた。更に ER 陰性細胞の ^3H -チミジン標識細胞指数は、ER 陽性細胞のそれに比べて有意に高く、ER 陽性細胞率と ^3H -チミジン標識細胞指数の間に逆相関を認めた。しかし、ER 陽性細胞のみならず、ER 陰性細胞の ^3H -チミジン標識細胞指数も対照群に比べ TAM 群で有意に低く、 E_2 群で有意に高く、内分泌療法は ER 陽性乳癌の ER 陽性細胞のみならず、ER 陰性細胞の増殖にも影響していることが示唆された²⁵⁾。

最近、ホルモン依存性乳癌におけるエストロゲンの作用は、EGF, TGF- α , TGF- β , IGF-1 といった autocrine, paracrine の増殖因子を介するとする仮説が有力になっている¹¹⁻⁹⁾。事実、試験管内の研究において、IGF-1 は様々な乳癌細胞の増殖を促進するとされ⁹⁻¹⁰⁾、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 は、IGF-1 の投与により、短期培養で ^3H -チミジンの取り込みが増加を示し、長期培養により細胞数、DNA 量が増加すると報告されている⁹⁾。また、生体内の研究においては、卵摘マウスに MCF-7 腫瘍細胞を移植し、IGF-1 を投与すると腫瘍形成を認めたと報告されている¹⁰⁾。免疫反応性 IGF-1 (Immunoreactive IGF-1) は乳癌細胞株の増

養液中に検出され、オートクリン増殖因子 (autocrine growth factor) であると報告されていたが⁸³⁾⁸²⁾、最近の研究では MCF-7 乳癌細胞を in situ hybridization で分析した結果、IGF-1 mRNA の発現が認められなかったと報告している⁹⁾。このことは、局所の間質細胞で産生された IGF-1 がパラクリン増殖因子 (paracrine growth factor) として乳癌細胞の増殖を促進することを示唆している。しかし、生体において、血中 IGF-1 に及ぼすエストロゲン、タモキシフェンの役割は複雑であると考えられる。即ち、血中 IGF-1 の大部分は肝臓で産生されるが、それは成長ホルモンの影響を強く受けており、成長ホルモンが過剰の場合には血中 IGF-1 値は上昇し、成長ホルモンが欠損している場合には低下する³⁵⁾³⁶⁾とされている。また、エストロゲンは IGF-1 の産生を抑制するが¹⁶⁾¹⁷⁾³⁷⁾³⁸⁾、成長ホルモンに対しては血中 IGF-1 減少による negative feedback により増加させると報告されている¹⁷⁾³⁷⁾。一方、Colletti ら¹⁸⁾はタモキシフェン投与により乳癌症例の血清 IGF-1 が低下すると報告しているが、Frohlander ら¹⁹⁾は閉経後患者の血中 IGF-1 が ethinyl estradiol の投与により低下するが、タモキシフェンの投与により治療前値にまで回復すると報告している。今回の研究においても血中 IGF-1 は E₂群が対照群と比較して有意に低下していた。乳癌組織の間質細胞から産生される IGF-1 は肝臓で産生される IGF-1 と同様であり、生体においては間質細胞の IGF-1 のみでなく、血中の IGF-1 も MCF-7 乳癌細胞の増殖に関与するものと考えられる。今回の研究では、腫瘍の免疫反応性 IGF-1 は対照群と比較して E₂群で低下し、TAM 群で有意に増加した。さらに各腫瘍における ³H-チミジン標識細胞指数と IGF-1 陽性細胞率は逆相関しており、IGF-1 陽性細胞の ³H-チミジン標識細胞指数は、IGF-1 陰性細胞のそれに比べて有意に低下していた。この結果は、IGF-1 が乳癌細胞の増殖を促進しているという従来の報告からすると一致していない。しかしこれらの結果に対してそれを間接的ながら支持する次のような報告がある。まず第一に、免疫反応性 IGF-1 は IGF-1 関連蛋白、または IGF-1 結合蛋白を現しており³⁹⁾⁴⁰⁾、その染色強度と IGF-1 受容体を現す ¹²⁵I-IGF-1 結合部位とは相関しないと報告³⁹⁾されている。第二に細胞膜に染色される IGF-1 と核に取り込まれるチミジンでは細胞周期上の時期が異なっている。即ち、IGF-1 は late G₁に働く増殖因子であり、G₁期から S 期へ移行する細胞の割合に影響を与えるのに対して⁴⁰⁾、チミジンは S 期の核に取り込まれる。S 期は ER 合成と同様に IGF-1 受容体合成の時期ではないと

考えられる²⁰⁾。第三に IGF-1 は試験管内の研究において癌細胞の増殖を促進することが知られているが⁹⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾、生体内の研究では試験管内のそれと異なり、次のような矛盾した現象も報告されている。即ち、Osborne ら⁴¹⁾は ER 陰性である MDA-231 ヒト乳癌細胞が IGF-1 を高濃度に分泌しているにもかかわらず、MDA-231 細胞は MCF-7 細胞の増殖を促進しなかったと報告している。また、Arteaga ら⁴²⁾はヌードマウス移植腫瘍において、IGF-1 受容体抗体が MDA-231 ヒト乳癌腫瘍の増殖を抑制するが、MCF-7 腫瘍の増殖に対しては抑制しなかったと報告している。さらに、IGF-1 受容体は ER、PgR と正の相関を示し⁴³⁾⁴⁴⁾、IGF-1 受容体陽性腫瘍の症例は陰性の症例に比べ、予後良好と報告されている⁴⁵⁾。従来より IGF-1 は試験管内の研究において癌細胞の増殖促進因子として知られているが⁹⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾、生体内における腫瘍の増殖には腫瘍自体の増殖の他に、増殖促進因子、増殖抑制因子等が複雑に絡み合っており、複雑であると考えられる。従って、生体内での ER 陽性乳癌における免疫反応性 IGF-1 の働きについては今後、更なる研究が必要であると考えられる。

結 論

ヌードマウス可移植性 ER 陽性ヒト乳癌腫瘍 MCF-7 に対して実験的内分泌療法を行い、腫瘍増殖、細胞動態、ER、及び IGF-1 に及ぼす影響について検討した。

1. 腫瘍重量、腫瘍倍加時間、S 期分画 (S phase fraction) からみると腫瘍増殖は、エストロゲン (estrogen) 投与により有意に促進し、タモキシフェン (tamoxifen) 投与により有意に抑制された。
2. 腫瘍の ER 値および ER 陽性細胞率はエストロゲン、及びタモキシフェン投与により有意に低下した。
3. しかし、血中 IGF-1 値はタモキシフェン投与によりほとんど変化せず、エストロゲン投与により有意に低下した。
4. また、腫瘍中の IGF-1 量および IGF-1 陽性細胞率はエストロゲン投与により有意に低下し、タモキシフェン投与により有意に上昇した。
5. 一方、IGF-1 陽性細胞率と ³H-チミジン標識細胞指数は有意な逆相関を示し、IGF-1 陽性細胞の ³H-チミジン標識細胞指数は IGF-1 陰性細胞のそれに比して有意に低かった。
6. 更に IGF-1 陽性細胞率と ER 陽性細胞率は有意に相関しており、ER 陽性細胞の ³H-チミジン標識細胞

指数は ER 陰性細胞のそれに比して有意に低かった。

以上の結果から、免疫反応性 IGF-1 (Immunoreactive IGF-1) は生体内で MCF-7 の腫瘍増殖に促進的に働かないことが示唆された。この結果は従来の試験管内での研究結果と一致していなかったが、最近、同様に IGF-1 が乳癌の増殖促進因子であることを疑問視する事実も報告されており、今後更なる検討が必要と考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり、終始御指導をいただきました金沢大学医学部附属病院手術部野口昌邦助教授、乳癌培養株を御供与くださりご支援いただいた慶応大学外科久保田哲朗講師、病理組織学的所見を御教示いただいた金沢大学医学部附属病院中央検査部水上勇治講師および第二外科学教室の諸兄に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第3回日本内分泌外科学会総会(1991年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Lippman, M. E., Dickson, R. B., Bates, S., Knabbe, C., Huff, K., Swain, S., McManaway, M., Bronzert, D., Kasid, A. & Gelmann, E. P.: Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **7**, 59-70 (1986).
- 2) Sirbaski, D. A. & Benson, R. H.: Proposal of an indirect (estromedin) mechanism of estrogens-induced mammary tumor cell growth, *In* C. McGrawth & M. Rick (eds.), *Cell Biology of Breast Cancer*, 1st ed., p289-314, Academic Press, New York, 1980.
- 3) Dickson, R. B. & Lippman, M. E.: Estrogenic regulation of polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr. Rev.*, **8**, 29-43 (1987).
- 4) Sporn, M. B. & Todaro, G. J.: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.*, **303**, 878-880 (1980).
- 5) Yee, D., Paik, S., Lebovic, G. S., Marcus, R. R., Favoni, R. E., Cullen, K. J., Lippman, M. E. & Rosen, N.: Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy. *Mol. Endocrinol.*, **3**, 509-517 (1989).
- 6) Zapf, J., Froesch, E. R. & Humbel, R. E.: The insulin-like growth factors (IGF) of human serum: chemical and biological characterization and aspects of their possible physiological role. *Current Top. Cell Regul.*, **19**, 257-309 (1981).
- 7) Furlanetto, R. W. & Dicarlo, J. N.: Somatomedin C receptors and growth effects in human breast cells maintained in long-term tissue culture. *Cancer Res.*, **44**, 2122-2128 (1984).
- 8) Huff, K. K., Kaufman, D., Gabbay, K. H., Spencer, E. M., Lippman, M. E. & Dickson, R. B.: Secretion of an insulin-like growth factor-I-related protein by human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **46**, 4613-4619 (1986).
- 9) Myal, Y., Shiu, R. P. C., Bhaumick, B. & Bala, M.: Receptor binding and growth promoting activity of insulin like growth factor in human breast cancer cell (T47-D) in culture. *Cancer Res.*, **44**, 5486-5490 (1984).
- 10) Karey, K. P. & Sirbaski, D. A.: differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47-D to growth factors and 17 β -estradiol. *Cancer Res.*, **48**, 4083-4092 (1988).
- 11) Huff, K. K., Kaufman, D., Gabbay, K. H., Spencer, E. M., Lippman, M. E. & Dickson, R. B.: Human breast cancer cells secrete as insulin-like growth factor 1 related polypeptide. *Cancer Res.*, **46**, 4613-4619 (1986).
- 12) Lamberts, S. W. J., Uitterlinden, P., Verschoor, L., van Dongen, K. J. & Delpozo, E.: Long-term treatment of acromegaly with the somatostatin analog SMS 201-995. *N. Engl. J. Med.*, **303**, 1576-1579 (1985).
- 13) Setyono-Han, B., Henkelman, M. S., Foekens, J. A. & Klijn, J. G. M.: Direct inhibitory effects of somatostatin (Analogues) on the growth of human cancer cells. *Cancer Res.*, **47**, 1566-1570 (1987).
- 14) Dickson, R. B., McManaway, M. & Lippman, M. E.: Estrogen induced growth factors of breast cancer cells partially replaced estrogen to promote tumor growth. *Science*, **232**, 1540-1543 (1989).
- 15) Colletti, R. B., Roberts, J. D., Devlin, J. T. & Copeland, K. C.: Effect of tamoxifen on plasma insulin-like growth factor I in patients with breast cancer. *Cancer Res.*, **49**, 1882-1884 (1989).
- 16) Frohlander, N. & von Schoultz, B.: Growth hormone and somatomedin C during postmenopausal

replacement therapy with oestrogen alone and in combination with an antioestrogen. *Maturitas*, **9**, 297-302 (1988).

17) **Dawson-Hughes, B., Stern, D., Goldman, J. & Reichlin, S.**: Regulation of growth hormone and somatomedin-C secretion in postmenopausal woman: effect of physiological estrogen replacement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **63**, 424-432 (1986).

18) **Gren, R. I., Greenberg, N. H. & MacDonald, M. M.**: Protocol for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.*, **3**, 51-61 (1972).

19) **Collins, V. P., Loeffler, R. K. & Tivey, H.**: Observations on growth rates of human tumors. *Amer. J. Roentgenol.*, **76**, 988-1000 (1956).

20) **Jensen, E. V., Polley, T. Z., Smith, S., Block, G. E., Ferguson, D. J. & DeSombre, E. R.**: Prediction of hormone dependency in human breast cancer. *In* W. McGuire & E. Vollmer (eds.), *Estrogen Receptors in Human Breast Cancer*, 1st ed., p37-56, Raven Press, New York, 1975.

21) **Heuson, J. C., Longeval, E., Matheim, W. H., Deboel, M. C., Sylvester, R. J. & Leclercq, G.**: Significance of quantitative assessment of estrogen receptors for endocrine therapy in advanced breast cancer. *Cancer*, **39**, 1971-1977 (1977).

22) **King, W. J. & Greene, G. L.**: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, **307**, 745-747 (1984).

23) **Welshons, W. V., Lieberman, M. E. & Gorski, J.**: Nuclear localization of unoccupied estrogen receptors. *Nature*, **307**, 747-749 (1984).

24) **Lee, S. H.**: Cancer cell estrogen receptor of human mammary carcinoma. *Cancer*, **44**, 1-12 (1979).

25) **Noguchi, M., Tajiri, K., Taniya, T., Kumaki, T., Asikari, A. & Miyazaki, I.**: Influence of hormones on proliferation of ER-positive cells and ER-negative cells of human breast cancer (MCF-7). *Oncology*, **47**, 19-24 (1990).

26) **Saceda, M., Lippman, M. E., Chambon, P., Lindsey, R. L., Ponglikitmongkol, M., Puente, M. & Martin, M. B.**: Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cell by estradiol. *Mol. Endocrinol.*, **2**, 1157-1162 (1988).

27) **Bezwooda, W. R. & Meyer, K.**: Effect of α -interferon, 17β -estradiol, and tamoxifen on estrogen receptor concentration and cell cycle kinetics of MCF-7 cells. *Cancer Res.*, **50**, 5387-5391 (1990).

28) **Jakesz, R., Smith, C. A., Aitkin, S., Huff, K., Schnette, W., Shanckney, S. & Lippman, M.**: Influence of cell proliferation and cell cycle phase on expression of estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, **44**, 619-625 (1984).

29) **Kiang, D. T., Kollander, R. E., Thomas, T. & Kennedy, B. J.**: Up regulation of estrogen receptors by nonsteroidal antiestrogens in human breast cancer. *Cancer Res.*, **49**, 531-536 (1989).

30) **Read, L. D., Greene, G. L. & Katzenellenbogen, B. S.**: Regulation of estrogen receptor ribonucleic acid and protein levels in human breast cancer cell lines by sex, steroid hormone, their antagonists and growth factors. *Mol. Endocrinol.*, **3**, 295-304 (1989).

31) **Huff, K. K., Knabbe, C., Lindsey, R., Kaufman, D., Bronzert, D., Lippman, M. E. & Dickson, R. B.**: Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-I-related protein in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, **2**, 200-208 (1988).

32) **Mituno, F., DelMonte, P., Barreca, A., Nicolin, A. & Giordano, G.**: Partial characterization of somatomedin C-like immunoreactivity secreted by breast cancer cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **54**, 179-184 (1987).

33) **De Leon, D. D., Wilson, D. M., Bakker, B., Lamsom, G., Hintz, R. L. & Rosenfeld, R. G.**: Characterization of insulin-like growth factor binding proteins from human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, **3**, 567-574 (1989).

34) **Yee, D., Favoni, R. E., Lupu, R., Cullen, K. J., Lebovic, G. S., Huff, K. K., Lee, P. D. K., Lee, Y. L., Powell, D. R., Dickson, R. B., Rosen, N. & Lippman, M. E.**: The insulin-like growth factor binding protein BP-25 is expressed by human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**, 38-44 (1989).

35) **Schwander, J. C., Hauri, C., Zapf, J. & Froesch, E. R.**: Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the

- perfused rat liver: Dependence on growth hormone status. *Endocrinology*, **113**, 297-305 (1983).
- 36) **Kemp, S. F. & Canfield, M. E.**: Acute effects of growth hormone administration: vitamin A and visceral protein concentrations. *Acta Endocrinol.(Copenh.)*, **104**, 390-396 (1983).
- 37) **Berelowitz, M., Szabo, M., Frohman, L. A., J Firestone, S., Chu, L. & Hentz, R. L.**: Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science*, **212**, 1279-1281 (1981).
- 38) **Stege, R., Frohlander, N., Caristrom, K., Pousette, A. & von Schoultz, B.**: Steroid-sensitive protein, growth hormone and somatomedin C in prostatic cancer: effects of parenteral and oral estrogen therapy. *Prostate*, **10**, 333-338 (1987).
- 39) **Shigematsu, K., Kataoka, Y., Kamio, T., Kurihara, M., Niwa, M. & Tsuchiyama, H.**: Partial characterization of insulin-like growth factor I in primary human lung cancers using immunohistochemical and receptor autoradiographic techniques. *Cancer Res.*, **50**, 2481-2484 (1990).
- 40) **Chen, Y. & Rabinovitch, P. S.**: Altered cell responses to insulin-like growth factor 1, but not platelet-derived growth factor and epidermal growth factor in senescing human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, **144**, 18-25 (1990).
- 41) **Osborne, C. K., Ross, C. R., Coronado, E. B., Fuqua, S. A. W. & Kitten, L. J.**: Secreted growth factors from estrogen-negative human breast cancer do not support growth of estrogen receptor-positive breast cancer in the nude mouse model. *Breast Cancer Res. Treat.*, **11**, 211-219 (1988).
- 42) **Arteaga, C. L., Kitten, L. J., Coronado, E. B., Jacobs, S., Kull, F. C. Jr., Allred, D. C. & Osborne, C. K.**: Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *J. Clin. Invest.*, **84**, 1418-1423 (1989).
- 43) **Pekonen, F., Partanen, S., Mäkinen, T. & Rutanen, E. M.**: Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor I and their relation to steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res.*, **48**, 1343-1347 (1988).
- 44) **Peyrat, J. P., Bonneterre, J., Beuscart, R., Djiane, J. & Demaille, A.**: Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1-R) in human breast cancer, Relation to estradiol and progesterone receptors. *Cancer Res.*, **48**, 6429-6433 (1988).
- 45) **Bonneterre, J., Peyrat, J. P., Beuscart, R. & Demaille A.**: Prognostic significance of insulin-like growth factor 1 receptors in human breast cancer. *Cancer Res.*, **50**, 6931-6935 (1990).

Influence of Hormones on Proliferation of Tumor Growth, Cell Kinetics, Estrogen Receptor (ER), Insulin-like Growth factor-1 (IGF-1) of Human Breast Cancer (MCF-7) Serially Transplanted into Nude Mice Naohiro Koyasaki, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **100**, 601—614 (1991)

Key words estrogen receptor, hormones, IGF-1, MCF-7, nude mouse

Abstract

The influence of hormones on the proliferation of human breast cancer (MCF-7) which had been serially transplanted into nude mice was analyzed by estimating the tumor growth, S phase fraction (SPF), ER-enzyme immunoassay (ER-EIA), ER-immunocytochemical assay (ER-ICA), serum levels of IGF-1, tumor contents of IGF-1, IGF-1 immunohistochemical staining, ER-immunocytochemically stained ^3H -thymidine autoradiography and IGF-1 immunohistochemically stained ^3H -thymidine autoradiography. The mice were divided into the following 3 groups: A, E_2 group with the mice receiving 17β -estradiol dipropionate; B, TAM group with the mice receiving tamoxifen; C, control group which were not treated with hormones. The results showed-(1) tumor growth was promoted in the 17β -estradiol dipropionate (E_2) group, but inhibited in the tamoxifen (TAM) group, Similarly SPF significantly increased in the E_2 group, while significantly decreased in the TAM group. (2) the ER level estimated by the ER-EIA significantly decreased both in the E_2 and the TAM group. (3) the ER positive cell rates measured by the ER-ICA method significantly decreased in the E_2 group and tended to decrease in the TAM group. (4) serum levels of IGF-1 were significantly lower in the E_2 group, and not statistically different between the TAM and the control group. (5) tumor contents of IGF-1 and the IGF-1 positive cell rates significantly decreased in the E_2 group, but significantly increased in the TAM group. (6) ER-immunocytochemically stained ^3H -thymidine autoradiography showed that the labeling index of ER negative cells was significantly higher than that of ER positive cell rates both in the TAM and control group. (7) IGF-1 immunohistochemically stained ^3H -thymidine autoradiography showed that the labeling index of IGF-1 negative cells was significantly higher than that of IGF-1 positive cell rates in all three groups. (8) the IGF-1 positive cell rates were inversely correlated with the ^3H -thymidine labeled cell rates, and the inverse correlation was statistically significant. The results suggest that immunoreactive IGF-1 does not act on the proliferation of human breast cancer (MCF-7) in vivo.