

Influence of Endocrine Therapy on Proliferation of Estrogen Receptor (ER) Positive Cells and ER Negative Cells 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/2297/8044

ヌードマウス可移植性 ER 陽性ヒト乳癌株 (MCF-7) の増殖能に及ぼす内分泌療法の影響について

金沢大学医学部外科学第二講座 (指導: 宮崎逸夫教授)

田 尻 潔

(昭和63年 5月13日 受付)

ヒト乳癌株 MCF-7 の増殖に与える各種内分泌療法の影響を腫瘍重量, 腫瘍倍加時間, デキストランチャコール (dextran-coated charcoal, DCC) 法, ER-immunocytochemical assay (ER-ICA) および著者の考案した 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法 (ER-immunocytochemically stained ^3H -thymidine autoradiography) を用いて検討した。その結果, MCF-7 の増殖は Tamoxifen, Medroxyprogesterone acetate および Aminoglutethimide で抑制される傾向があり, 17β -estradiol dipropionate で有意に促進された。DCC 法による estrogen receptor (ER) 値は Tamoxifen 群, Medroxyprogesterone acetate 群, Aminoglutethimide 群および 17β -estradiol dipropionate 群で有意に低下し, 特に Tamoxifen 群と 17β -estradiol dipropionate 群で顕著であった。ER-ICA で ER 陽性細胞と ER 陰性細胞は腫瘍組織内でモザイク状に混在して認められたが, ER 陽性細胞率は Tamoxifen 群および Medroxyprogesterone acetate 群で有意に低下し, Aminoglutethimide 群で低下の傾向を認め, また 17β -estradiol dipropionate 群で有意に増加した。一方, 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法で ER 陽性細胞と ER 陰性細胞の ^3H -チミジン標識指数を別々に算出した結果, Tamoxifen 群, Medroxyprogesterone acetate 群および Aminoglutethimide 群で ER 陽性細胞のみならず ER 陰性細胞の標識指数も有意に低下し, 逆に 17β -estradiol dipropionate 群では ER 陽性細胞のみならず ER 陰性細胞の標識指数も有意に増加した。すなわち, 従来, 各種内分泌療法の影響を ER 陽性細胞および ER 陰性細胞のそれぞれについて検討した報告をみないが, 著者の考案した 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法で検討した結果, 各種内分泌療法は MCF-7 の ER 陽性細胞のみならず ER 陰性細胞の増殖能にも影響を及ぼしていることが判明した。

Key words human breast cancer, nude mouse, endocrine therapy, estrogen receptor

1896年 Beatson¹⁾が末期乳癌患者に対して初めて卵巣摘除術を施行し抗腫瘍効果を認めて以来, 乳癌はホルモン依存性腫瘍として認識され, 本疾患の治療法として内分泌療法が手術, 放射線および化学療法と共に, 重要な位置を占めている。内分泌療法は外科的内分泌療法と内科的内分泌療法の二つに大別されるが, いずれの内分泌療法でも無選択に行なえば, その有効率は約30%である²⁾。そこで無意味な外科的侵襲や薬剤の

副作用を避けるため内分泌療法の効果を予測する方法が研究された。1962年, Jensenらは子宮などのエストロゲン (estrogen) 標的臓器にエストロゲンと特異的に結合するエストロゲンレセプター (estrogen receptor, ER) が存在し³⁾, また ERの有無と内分泌療法の有効性が相関することを示した⁴⁾。更に McGuireはデキストランチャコール (dextran-coated charcoal, DCC) 法⁵⁾による細胞質内の ERの定量法を

Abbreviations: AMG, aminoglutethimide; DAB, diaminobenzidine; DCC, dextran-coated charcoal; DPM, disintegration per minute; ER, estrogen receptor; ER-ICA, estrogen receptor immunocytochemical assay; E_2 , 17β -estradiol dipropionate; ETW, estimated tumor weight; fmol/mg p, femtomoles/mg cytosol protein; MPA, medroxyprogesterone

開発した。DCC法でER陽性と判定された乳癌の約60%に内分泌療法が有効である²⁾ため、今日、このDCC法は内分泌療法の効果を予測する指標として広く利用されている。一方、エストロゲンの標的細胞内における作用発現の過程は、まずエストロゲンが細胞質中に存在するERと特異的に結合し活性化され、核内に移行しクロマチンのアクセプターサイト(acceptor site)と結合し遺伝子活性をもたらし、m-RNAの生成を介して蛋白合成を営むと考えられた⁶⁾⁷⁾。しかも、ER陽性乳癌にはER陽性細胞とER陰性細胞が混在することが指摘され、エストロゲンの影響はER陽性細胞に限られ、ER陰性細胞はその影響を受けないと考えられた⁹⁾¹⁰⁾。しかし、その後、GreeneらはヒトERに対する単クローン抗体¹¹⁾を用いたER-immunocytochemical assay (ER-ICA)を開発し、ERは核にのみ存在することが明らかとなり¹²⁾、また、Sirbaskuらはエストロゲンで刺激したラット子宮、腎組織の抽出液が乳腺腫瘍細胞の増殖を促進する事実より、エストロゲンの標的細胞内に対する作用発現の機序は特別の増殖因子(growth factor)を介していると考えた¹³⁾。すなわち、エストロゲンはER陽性細胞の核に存在するERに結合することにより、ER陽性細胞より分泌される増殖因子を介してそれを分泌したER陽性細胞のみならず(autocrine control)、周囲のER陰性細胞の増殖も制御する(paracrine control)という仮説が提案された¹⁴⁾¹⁵⁾。そこで著者はヌードマウス可移植性ヒト乳癌株MCF-7を用い、内分泌療法がER陽性細胞およびER陰性細胞のそれぞれの増殖能に及ぼす影響を、DCC法、ER-ICAおよび著者の考案したER-ICAと³H-チミジンオートラジオグラフィ(³H-thymidine autoradiography)による二重染色法を行なって検討し、いくつかの興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

I. 実験動物

実験動物中央研究所由来のBALA/c nu/nu雌マウスを日本クレアより購入して用いた。マウスの飼育は金沢大学医学部付属動物実験施設のアイソラック内で行ない、滅菌水とオリエンタル固形飼料を自由に与えた。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

慶応大学医学部外科久保田講師より供与されたヒト乳癌培養細胞(MCF-7)¹⁶⁾ 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 0.5 ml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(17 β -estradiol dipropionate 1 mg/mlおよび17 α -hydroxyprogesterone caproate 50 mg/mlから成る、帝国臓器社、東京)0.1 mlを大腿筋肉内に注射し、腫瘍増殖を促し継代株化した¹⁷⁾。継代株化された腫瘍塊を提供用ヌードマウスから摘出し2 mm角の固形ブロックとし、その2個をTrocar針を用いて受供用ヌードマウスの両側背部皮下に移植し、EPホルモン・デポ0.1 mlを毎週1回、筋注し腫瘍増殖を促した。このようにして移植された腫瘍が対数増殖を開始する時期(移植後4~7週)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6群を作成した。

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

第2群(MPA群): Medroxyprogesterone acetate (MPA, 協和発酵社、東京)原末20 mgをゴマ油1 mlに溶解して、100 mg/kg 毎週2回筋注した。

第3群(E₂群): 17 β -estradiol dipropionate (E₂, Sigma社、Saint Louis)原末1 mgをゴマ油1 mlに溶解して、5 mg/kg 毎週1回筋注した。

第4群(無処置群): 薬剤を投与せず、TAM群、MPA群およびE₂群の対照とした。

第5群(AMG群): Aminoglutethimide (AMG, 日本チバガイギー社、宝塚)原末30 mgを0.5%カルボキシメチルセルロース(Carboxymethyl cellulose) 1 mlに懸濁し毎日150 mg/kgを腹腔内注射すると共に、糖質コルチコイドを補充する為に毎日ベタメサゾン(Betamethasone) 1 mg/kgを筋注した。

第6群(ベタメサゾン群): 毎日ベタメサゾン1 mg/kgを筋注し、AMG群の対照とした(図1)。

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、一方は屠殺後、直ちに腫瘍を摘出し、その湿重量を測定し、-80°Cに保存しDCC法に供した。他方は³H-チミジン(³H-thymidine, specific activity 23.6 Ci/mmol, radioac-

acetate; NSB, nonspecific bound; PAP, peroxydase/anti-peroxydase; PBS, phosphate buffered saline; r, correlation coefficient; SB, specific bound; TAM, tamoxifen; TB, total bound; Td, tumor doubling time.

tive concentration 1.0 mCi/ml, Amersham Japan 社, 東京) 5 μ Ci/kg を腹腔内注射し, 1 時間後に屠殺し (Flash labelling 法), 直ちに腫瘍を摘出し, その湿重量を測定し, -80°C に保存し ER-ICA および 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法に供した. 更に, 腫瘍の一部は 10%ホルマリン (formalin) にて固定後, H&E 染色を施し鏡検した.

IV. 治療効果の判定

1. 推定腫瘍重量 (estimated tumor weight, ETW)

N.C.I. protocol¹⁸⁾ に準じ, 各腫瘍毎に

$$\text{推定腫瘍重量} = \frac{\text{長径} \times \text{短径}^2}{2} \text{ (mg)}$$

を計算し, 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. 腫瘍の倍加時間 (tumor doubling time, Td)

個々の腫瘍について推定腫瘍重量 (ETW) の自然対数値と, 治療開始後の日数 (t) の間で相関係数 (r) および標本回帰方程式 $\text{LnETW} = a + b(t)$ を求めた.

$t = r \div \sqrt{1-r^2} \times \sqrt{n-2}$ により r の信頼性が $p < 0.05$ であることを確認して, $Td = \text{Ln}2/b$ より腫瘍倍加時間を求めた.

V. 体重の測定

薬剤の投与量を決めるため, 週 3 回, 体重を測定した.

VI. DCC 法による ER 値の測定

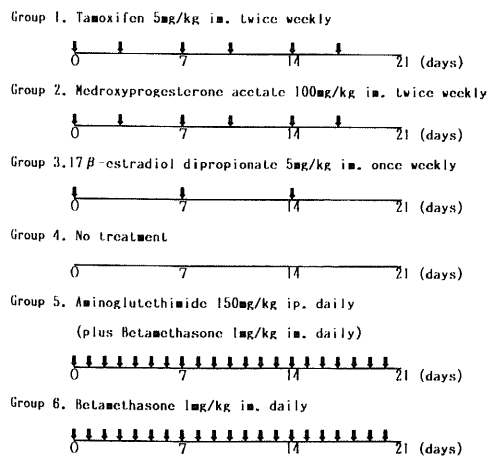


Fig. 1. Designs of experimental endocrine therapy. im., intramuscular injection; ip., intraperitoneal injection

1. Cytosol の調整

-80°C に凍結保存された腫瘍組織 0.5~1.0 g を解剖ハサミで細切後, 4 倍量のホモジナイズ用リン酸緩衝液 [20 mM リン酸 (phosphate), 9.5 mM Dithiothreitol, 259mM サッカロース (saccharose), pH 7.5] を加え, ガラスホモジナイザー (山下製作所, 大阪, 特別仕様) で氷冷しながら, 15 秒間, 5~10 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器 (Beckman, Fullerton, model L8-70) で 45,000 rpm, 0°C , 30 分間遠心し, 上清を細胞質分画 (Cytosol) として得た. Cytosol は結合アッセイ用リン酸緩衝液 (20 mM リン酸, 0.5 mM Dithiothreitol, pH 7.5) を用いて 2 倍希釈し, この希釈 Cytosol を次の操作に移すと共に, 一部を Lowry 法による蛋白定量に供した.

2. 結合アッセイ

各 8 本の小試験管中 7 本に結合アッセイ用リン酸緩衝液 50 μ l を入れ, それに各変化量 (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2 pmole) の ^3H -エストラジオール ([2,4,6,7-(H)]-estradiol, specific activity 101.7 Ci/mmole, New England Nuclear 社, Boston) を標識ステロイド調整用緩衝液 [20 mM リン酸, 0.5 mM Dithiothreitol, 40 mM Sodium molybdate, 10% エチレングリコール (ethylene glycol), 4% エタノール (ethanol), pH 7.5] に溶解して 50 μ l とし添加した. 更に希釈 Cytosol 100 μ l を加えて全量を 200 μ l とし, 混和後 0°C , 16 時間インキュベーションした. また, 残りの 1 本には非特異的結合量を得る為, 2 pmole の ^3H -エストラジオールと共に, 1,000 倍量の非標識 17β -

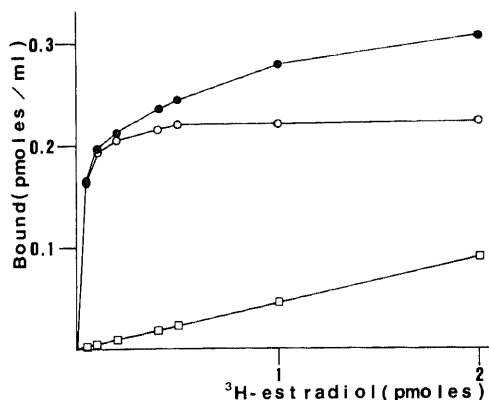


Fig. 2. ER saturation curve.

●—●, total bound estradiol (TB); □—□, non-specific bound estradiol (NSB); ○—○, specific bound estradiol (SB).

エストラジオール (1 mM エタノール溶液を結合アッセイ用リン酸緩衝液で希釈調整) を加え, 希釈 Cytosol と混和し, インキュベートした。

3. B/F 分離

インキュベーション後, 各試験管に DCC 液 [1% (W/V) ノリット Sx-3 (Norit Sx-3), 0.1% (W/V) デキストラン T-70 (Dextran T-70)/結合アッセイ用緩衝液] 200 μ l を加えて混和後, 氷水中で 10 分間静置した。3,000 rpm, 0°C, 10 分間遠心分離し, その上清 200 μ l に Scintisol Ex-H (同任化学研究所, 熊本) 10 ml を加えて混和後, 液体シンチレーションカウンター (Packard, Downerf Grove, TRI-CARB 4640) にて 5 分間, 放射能を測定した。

4. Binding parameter の算定

液体シンチレーションカウンターで計測されたカウント数 (Disintegration per minute, DPM) を

$$\text{DPM} \times \frac{400}{200} \times \frac{1}{99 \times 2.22 \times 10^3} \times \frac{1000}{200} \text{ (pmole/ml)}$$

に代入し, ^3H -エストラジオールの総結合量 (total bound, TB) および非特異的結合量 (nonspecific bound, NSB) を得, 各 ^3H -エストラジオール添加量を横軸に, その時の結合量を縦軸にプロットし, 更に TB と NSB の差 (TB-NSB) を特異的結合量 (specific bound, SB) としてグラフ上にプロットし, ER の飽和曲線を作成した (図 2)。次に Scatchard analysis により, ER の結合部位数 (number of binding sites, NSB) を求めた。即ち, 横軸に SB, 縦軸に SB と非結合型 ^3H -エストラジオール量 (F) との比 (SB/F) を

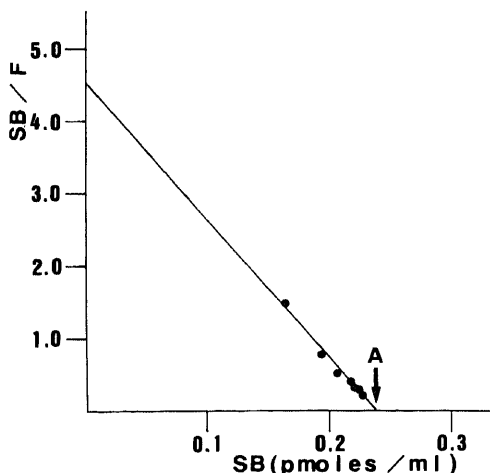


Fig. 3. Scatchard analysis for binding parameter. SB, specific bound estradiol; F, free ^3H -estradiol; A, Number of binding sites (NSB).

7 点, プロットし, 各点を結んだ直線と横軸の交点 A を NBS (femtomoles/ml) とした (図 3)。更に NBS は Lowry 法で測定した Cytosol の蛋白量 (mg) 当たり換算し, femtomoles/mg cytosol protein (fmol/mg p) と表わした。

VII. ER-ICA

凍結保存した腫瘍組織を Cryostat (Tissue-Tec II, Miles 社, Elkhart) にて厚さ 4~6 μ m に薄切し, 組織接着剤 (protein solution with antimicrobial agent) で処理したスライドガラスにのせ, 3.7%ホルマリンを含む 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) pH 7.2 中で 15 分間固定した。PBS 槽で 5 分間放置した後, スライドガラスを -15~-25°C のメタノール (methanol) 中に 4 分間, -15~-25°C のアセトン (acetone) 中に 1 分間浸し, 非特異的反応を抑え, PBS 槽中で 5 分間の洗浄を 2 回行った。次に非特異的な抗体の結合を抑える為, 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 槽中で 5 分間の洗浄を 2 回行ない, 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 槽中で 5 分間の洗浄を 2 回行ない, PAP 複合体 (peroxydase/rat anti-peroxydase) を滴下し, 30 分間, 湿箱中で反応させた。PBS 槽中で 5 分間の洗浄を 2 回行ない, diaminobenzidine (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 (ethanol) 槽中に 2 分間づつ 2 回, 100% エタノール槽中に 2 分間づつ 2 回浸し脱水, 透徹を行い, マリノール (Malinol) にて封入した (図 4)。

その評価は 400 倍の視野で鏡検し, 一検体につき 1000 個の癌細胞を DAB による特異的核染色の有無により ER 陽性細胞と ER 陰性細胞に分けて数え,

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

を計算した。

VIII. 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法 (ER-immunocytochemically stained ^3H -thymidine autoradiography)

上述の ER-ICA の操作の内 DAB 滴下後の水洗までの操作を同様に行なった。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 (SakuraNR-

M2)に約3秒、静かに浸して引き上げ (Dipping 法)、室温で1時間乾燥後、シリカゲル (silicagel) と共に暗箱内に入れ、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 Sakura Conidol-X で 20°C、5分間現像し、Sakura 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-ICA と同様に脱水、透徹、封入を行った (図5)。

その評価は400倍の視野で鏡検し一検体につき1000個の癌細胞をDABによる特異的核染色の有無によりER陽性細胞と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、

ER陽性細胞の標識指数 (Labelling index of ER positive cells =

$$\frac{\text{ER 陽性 } ^3\text{H-チミジン標識細胞数}}{\text{ER 陽性細胞数}} \times 100 (\%)$$

ER陰性細胞の標識指数 (Labelling index of ER negative cells =

$$\frac{\text{ER 陰性 } ^3\text{H-チミジン標識細胞数}}{\text{ER 陰性細胞数}} \times 100 (\%)$$

を計算した。

IX. 統計学的処理方法

本実験の成績はすべて Mean ± S.D. で表わした。多群間の平均値の差の検定には分散分析後 Duncan の

1. 3.7% Formalin in PBS (4°C)	10 min
2. PBS rinse	5 min
3. Absolute methanol (-10 to -25°C)	4 min
4. Acetone (-10 to -25°C)	1 min
5. PBS rinse	5 min, twice
6. Blocking reagent (Normal goat serum)	15 min
7. Primary antibody (H222Sp2 γ , monoclonal rat anti-ER)	30 min
8. PBS rinse	5 min, twice
9. Bridging antibody (Goat anti-rat antibody)	30 min
10. PBS rinse	5 min, twice
11. Peroxidase-antiperoxidase complex (Rat)	30 min
12. PBS rinse	5 min, twice
13. Diaminobenzisine 4HCl (10mg in 16ml PBS containing 0.06% hydrogen peroxide)	5 min
14. Distilled water rinse	
.....	
15. 1%V/V Harris hematoxylin	5 min
16. Tap water rinse	5 min
17. Dehydration in graded alcohols	
18. Mounting in Permount	

Fig. 4. ER-immunocytochemical staining procedure.

1. Drying at 37°C	
2. Dipping in photographic emulsion kept at 40°C	
3. Drying at room temperature	1 hr
4. Exposure at 4°C	4 weeks
5. Development by Conidol-X	5 min
6. Fixing by Conifix	10 min
7. Tap water rinse	5 min
8. 10% V/V Harris hematoxylin	5 min
9. Tap water rinse	5 min
10. Dehydration in graded alcohols	
11. Mounting in Permount	

Fig. 5. ER-immunocytochemically stained ³H-thymidine autoradiography. Followed by the distilled water rinse after the color development with diaminobenzisine. See Fig. 4..

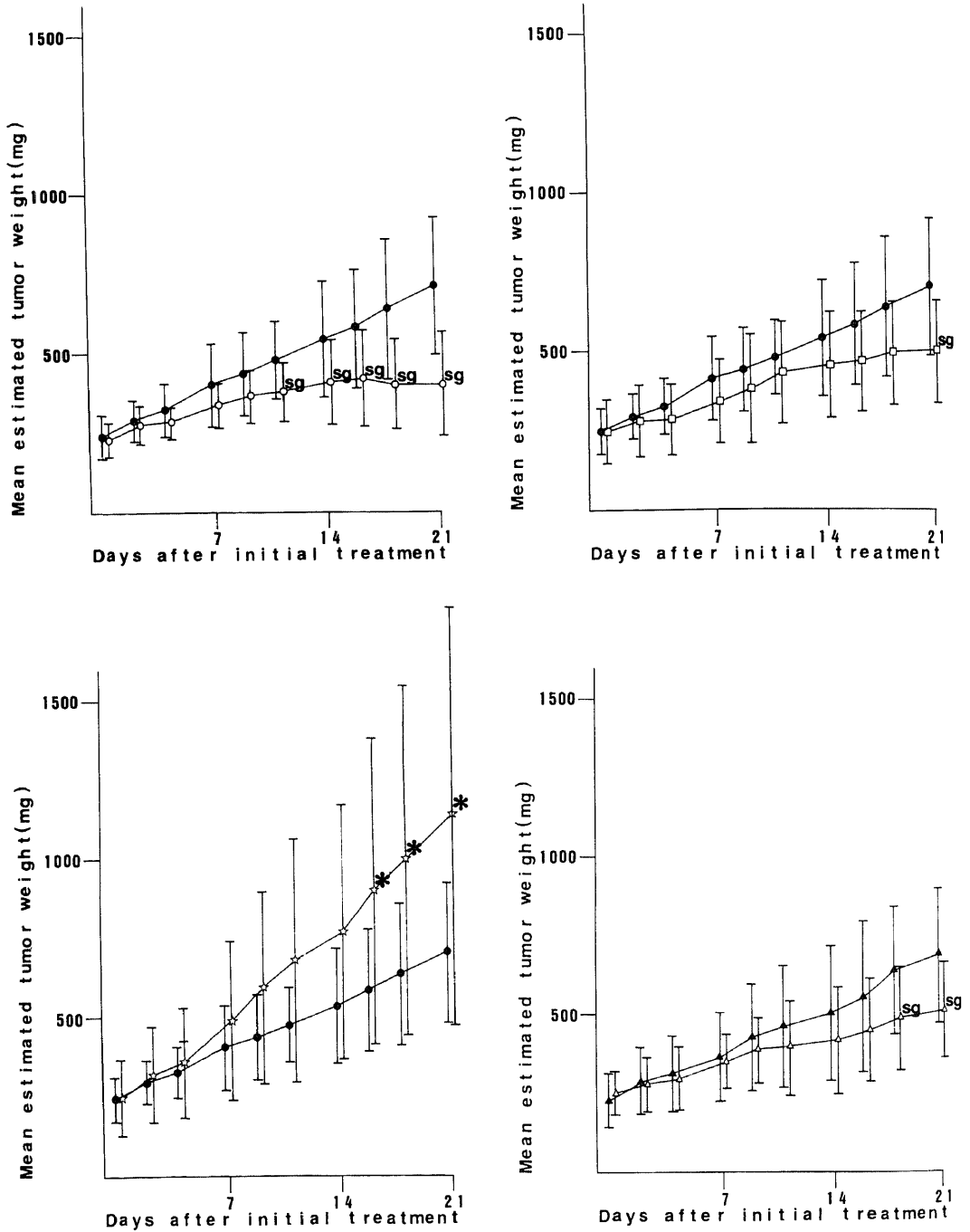


Fig. 6. Influence of hormonal agents on estimated tumor weight (mg)
○—○, TAM group (n=14); □—□, MPA group (n=11);
☆—☆, E₂ group (n=17); △—△, AMG group (n=12);
●—●, No treatment group (n=12); ▲—▲, Betamethasone group (n=14)
See legend in Table 1.

Table 1. Effect of hormonal agents against MCF-7 in nude mice

Agents	No. of mice	No. of tumors	Tumor weight(mg)	Tumor doubling time (days)
TAM	10	14	273±136 ^{sg}	— a
MPA	9	11	322±141 ^{sg}	— a
E ₂	9	17	902±531 [*]	9.90±2.70 [*]
No treatment	7	12	509±211	15.26±6.43
AMG	7	12	352±149 ^{sg}	— a
Betamethasone	8	14	501±201	14.03±3.45

Comparisons were made for TAM group, MPA group or E₂ group vs. No treatment group, and for AMG group vs. Betamethasone group. * < 0.05; sg, 0.05 < p < 0.1; by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison; a, not able to be calculated because the correlation coefficients were statistically insignificant.

Table 2. Influence of hormonal agents on body weight of nude mice

Agents	No. of mice	Body weight(g)
TAM	10	18.9±2.2 ^{N.S.}
MPA	9	22.1±1.5 ^{N.S.}
E ₂	9	19.5±1.7 ^{N.S.}
No treatment	7	20.6±1.5
AMG	7	19.6±0.9 ^{N.S.}
Betamethasone	8	20.7±2.9

See legend in Table 1. N.S., statistically insignificant.

多重比較法を用い、p < 0.05 を有意の差とした。

成 績

I. 治療効果

1. 推定腫瘍重量の経時的変化

TAM 群は治療開始 11 日以後、無処置群に比較して低下する傾向を認め、MPA 群では治療終了時において、無処置群に比較して低下する傾向を認めた。E₂ 群では治療開始後 16 日以後、無処置群に比較して有意に増加した。また、AMG 群では治療開始 18 日以後、ベタメサゾン群に比較して低下する傾向を認めた (図 6)。

2. 実測腫瘍重量

内分泌療法終了時における実測腫瘍重量の平均値 (Mean±S.D.) は TAM 群 273±136 mg, MPA 群 322±141 mg, E₂ 群 902±531 mg および AMG 群 352±149 mg であり、無処置群 509±211 mg またはベタメサゾン群 501±201 mg に比較して TAM 群、MPA 群および AMG 群で低下する傾向を認め、一方 E₂ 群では有意に増加した (表 1)。

3. 腫瘍倍加時間

すべての腫瘍でその相関係数が統計学的に有意であった E₂ 群無処置群、およびベタメサゾン群の腫瘍倍

加時間の平均値 (Mean±S.D.) はそれぞれ 9.90±2.70 日、15.26±6.34 日および 14.03±3.45 日であり、E₂ 群は無処置群に比較して有意に短縮した (表 1)。

II. 腫瘍の病理組織

無処置群は病理組織上、多角細胞の小柱と小巢から成る ductal carcinoma を呈した (写真 1)。一方、TAM 群、MPA 群および AMG 群は共に、空胞形成、小嚢胞形成と線維化が認められ、特に TAM 群では顕著であった (写真 2)。E₂ 群は無処置群とほぼ同様の所見であり、他に中心壊死を認めた。

III. 治療終了時の体重

治療終了時の体重の平均値 (Mean±S.D.) は TAM 群 18.9±2.2 g, MPA 群 22.1±1.5 g, E₂ 群 19.5±1.7 g および AMG 群 19.6±0.9 g であり、無処置群 20.6±1.5 g またはベタメサゾン群 20.7±2.9 g と比較して有意の差を認めなかった (表 2)。

IV. DCC 法による ER 値

DCC 法による ER 値の平均値 (Mean±S.D.) は TAM 群 12.30±3.87 (fmol/mg p), MPA 群 118.40±48.99 (fmol/mg p), AMG 群 126.35±16.18 (fmol/mg p) および E₂ 群 9.69±1.99 (fmol/mg p) であった。TAM 群、MPA 群および E₂ 群は無処置群 146.82±3.34 (fmol/mg p) に比較して有意に低下し、特に TAM 群と E₂ 群において顕著であった。また、AMG 群もベタメサゾン群 145.20±6.11 (fmol/mg p) に比較して有意に低下した (表 3)。

V. ER-ICA による ER 陽性細胞率

DAB による ER の特異的染色は癌細胞の核に局限し細胞質はまったく染まらず、またこの特異的核染色の有無により区別される ER 陽性細胞と ER 陰性細胞は組織中にモザイク状に混在して認められた (写真 3)。ER 陽性細胞率の平均値 (Mean±S.D.) は TAM 群 54.7±3.7%, MPA 群 51.1±1.2%, AMG 群 66.6±1.9%, E₂ 群 82.8±4.6% であり。無処置群

68.0±2.6%に比較してTAM群とMPA群で有意に低下し、E₂群で有意に増加した。また、AMG群はベタメサゾン群68.4±1.3%に比較して低下の傾向を認めた(表4)。

VI. ER陽性細胞およびER陰性細胞の標識指数

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法で、³H-チミジン取り込みを有する細胞すなわちS期の細胞はER陽性細胞にもER陰性細胞にも認められた(写真4)。ER陽性細胞の標識指数は平均値(Mean±S.D.)はTAM群7.1±1.8%、MPA群10.0±2.0%、E₂群17.0±3.3%およびAMG群9.5±1.9%であった。無処置群13.5±1.4%またはベタメサゾン群13.2±2.4%に比較して、TAM群、MPA群、AMG群で有意に低下し、E₂群では有意に増加した。一方、ER陰性細胞の標識指数の平均値(Mean±S.D.)はTAM群7.9±1.4%、MPA群10.9±2.1%、E₂群20.2±3.4%およびAMG群9.9±2.5%であった。無処置群16.1±2.3%またはベタメサゾン群15.9±1.3%に比較してTAM群、MPA群、AMG群で有意に低下し、E₂群では有意に増加した(表5)。

考 察

乳癌は今日、エストロゲン(estrogen)をはじめとする多くのホルモンの支配を受けており、乳癌細胞にはそれぞれのホルモンに対する特異的な受容体(receptor)が存在すると考えられる。このような概念は、Jensenらにより標識エストロゲンがエストロゲンレセプター(ER)と特異的に結合し、その標識細胞に長時間貯留することにより立証された⁹⁾。更に、McGuireらにより細胞質分画(Cytosol)中のERをcompetitive binding assayを基礎として測定するDCC法が開発され⁹⁾、临床上、内分泌療法はER陽性と判定された乳癌の約60%に有効であるのに対して、ER陰性と判定された乳癌では10%以下しか有効でないことが確認された²⁾。従って、DCC法は、内分泌療法の効果

Table 3. Influence of hormonal agents on estrogen receptor level (DCC)

Agents	No. of tumors	ER levels (fmol/mg P)
TAM	9	12.30±3.87*
MPA	5	118.40±48.99*
E ₂	7	9.69±1.99*
No treatment	5	146.82±3.34
AMG	5	126.35±16.18*
Betamethasone	5	145.20±6.11

See legend in Table 1.

を予測し得る定量性および再現性の高い方法として評価され¹⁸⁾、今日、広く臨床に應用されている。

しかし、その後、Greeneらはヒト乳癌培養細胞MCF-7の細胞質ER(Cytosol ER)を抗原とする単クローン抗体(monoclonal antibody)を作成し¹¹⁾、これを用いたenzyme immunoassayやER-ICAによるERの測定法が可能となった。Kingらは、このER-ICAを用いて検討した結果、ERは核内にもみ染色され、細胞質は反応しなかったことを報告している¹²⁾。このことは生化学的方法²⁰⁾、オートラジオグラフィー²¹⁾によっても示唆されていた点であるが、最近ではWelshonsらがER陽性ラット下垂体腫瘍細胞をcytochalasin Bで細胞質と核を分離し検討した結果、非飽和のER活性はほとんど核のみに存在することを確認している²²⁾。従って、従来のDCC法で検出された細胞質ERは抽出の過程で核から漏出したものと考えられる。更に、このER-ICAはDCC法と異なりE₂やTAMで飽和されたERをも検出することができる²³⁾。著者の実験結果でも、TAM群およびE₂群におけるDCC法によるER値は共に極端な低値を示したのに対して、ER-ICAによるER陽性細胞率はそれぞれ54.7±3.7%、82.8±4.6%であった。DCC法によるER値は、TAMまたはE₂がERのエストロゲン結合部(bind-

Table 4. Influence of hormonal agents on ER positive cell rate (ER-ICA)

Agents	No. of tumors	ER positive cell rate(%)
TAM	12	54.7±3.7*
MPA	10	51.1±1.2*
E ₂	10	82.8±4.6*
No treatment	10	68.0±2.6
AMG	10	66.6±1.9 [†]
Betamethasone	12	68.4±1.3

See legend in Table 1.

Table 5. Influence of hormonal agents on labelling indices of ER positive cells and ER negative cells

Agents	No. of tumors	Labelling index(%)	
		ER positive cells	ER negative cells
TAM	8	7.1±1.8*	7.9±1.4*
MPA	8	10.0±2.0*	10.9±2.1*
E ₂	8	17.0±3.3*	20.2±3.4*
No treatment	9	13.5±1.4	16.1±2.3
AMG	8	9.5±1.9*	9.9±2.5*
Betamethasone	7	13.2±2.4	15.9±1.3

See legend in Table 1.

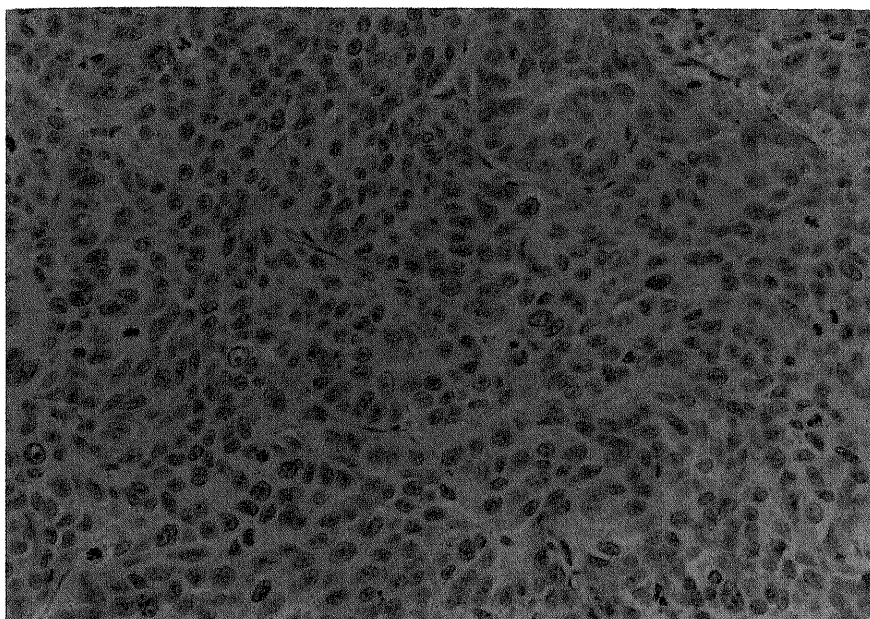


Photo 1. Microscopic finding of MCF-7, showing a ductal carcinoma with trabeculae and small nests of polygonal cells. (H&E); $\times 200$.

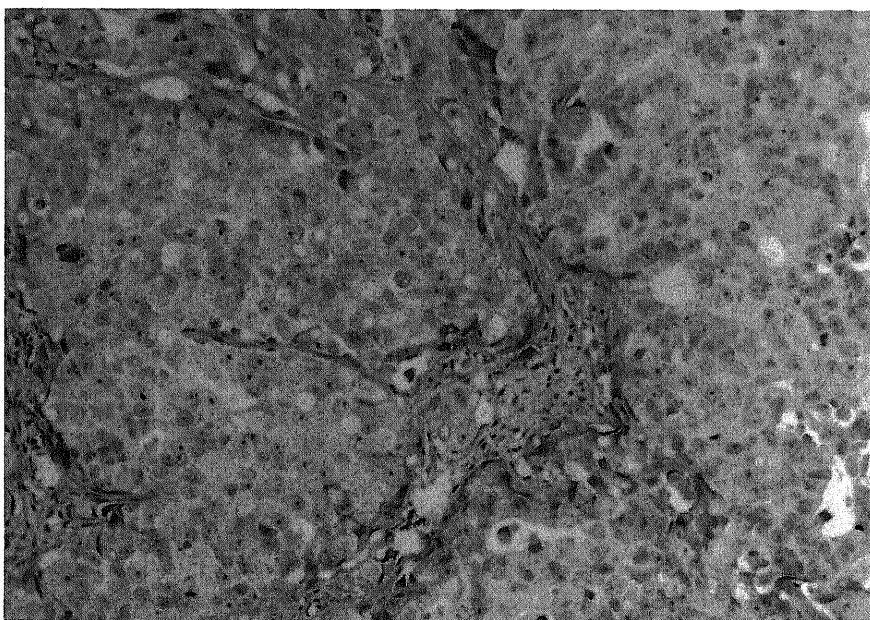


Photo 2. Microscopic findings of MCF-7 treated with TAM, showing vacuolar and microcystic degeneration of tumor cells and interstitial fibrosis (H&E); $\times 200$.

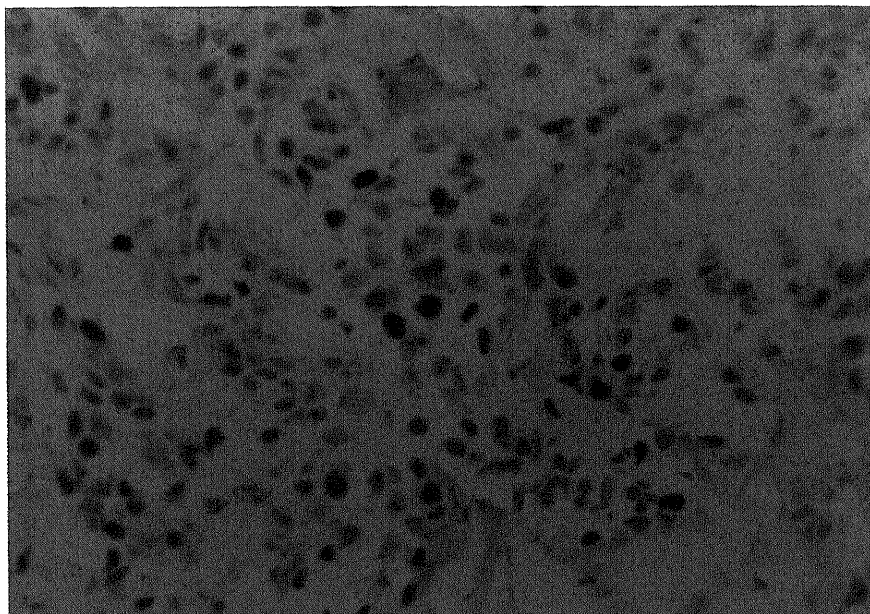


Photo 3. ER-immunocytochemical staining of MCF-7, showing nuclear localization of estrogen receptor and mosaic distribution of ER positive cells and ER negative cells; $\times 400$.

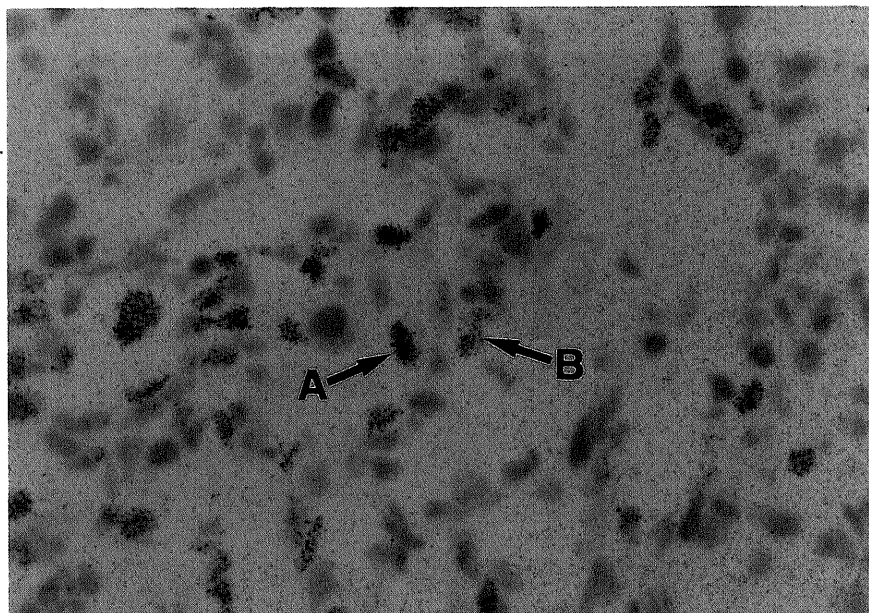


Photo 4. ER-immunocytochemically stained ^3H -thymidine autoradiogram of MCF-7. Tumor is composed of ER positive cells with ^3H -thymidine uptake (arrow A), ER positive cells without ^3H -thymidine uptake, ER negative cells with ^3H -thymidine uptake (arrow B) and ER negative cells without ^3H -thymidine uptake; $\times 400$.

ing site)に結合したため低値を示し、これに対して抗ヒトER単クローン抗体は飽和したERにも結合できることを示している。従って、ER-ICAは半定量的ではあるが、TAMなどのERに結合する薬剤を投与した場合のER陽性乳癌のERを調べることができる。

一方、DCC法によりER陽性と判定された乳癌でも、腫瘍組織内の採取部位によりER値に差があり(inter-site variation)、必ずしも均一でない²⁴⁾。更に³H-estradiol autoradiographyやER-ICAでER陽性乳癌組織を検討するとER陽性細胞とER陰性細胞が混在していることが観察される⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹²⁾²¹⁾。最近、Jakeszはヒト乳癌培養細胞MCF-7でG₁期、G₂期にERが多くS期には少なく、ER陽性細胞とER陰性細胞の違いは細胞周期の異なった時期を見ていと述べている²⁵⁾。しかし、著者の二重染色法では³H-チミジンを取り込んだ細胞すなわちS期の細胞はER陽性細胞にもER陰性細胞にも同程度に認められ、更に小林らは乳癌臨床材料にER-ICAを施した結果でER陽性細胞とER陰性細胞が明らかに別の集団を形成していると報告している²⁶⁾。従って、少なくともヌードマウスに移植したMCF-7や臨床乳癌などの固形腫瘍ではER陽性細胞とER陰性細胞とは細胞周期の違いではなく、それらは別々のクローンとして増殖していると考えられる。

従来、内分泌療法はER陽性乳癌組織に存在するER陽性細胞にのみ作用し⁹⁾⁷⁾、ER陰性細胞はその影響を受けないと考えられてきた⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。しかし、Sirbaskuらは、(1)細胞増殖に及ぼすエストロゲンの効果はin vivoに比してin vitroでは必ずしも明確に得られないこと、(2)エストロゲンで刺激したラット子宮、腎組織抽出液が乳腺腫瘍のNTW9/PL細胞の増殖を促進するという実験結果より、エストロゲンは標的細胞のER系を介して直接的に細胞増殖を刺激するのではなく、特別な増殖因子(growth factor)を介して、この増殖因子を分泌した細胞のみならず周囲の細胞の増殖にも影響すると考えている¹³⁾。最近、Garciaら²⁷⁾やAdamsら²⁸⁾はヒト乳癌培養細胞MCF-7もこれと同様または類似的増殖因子を分泌することを示し、これらに対する単クローン抗体の作成に成功している。また、LippmanはTAMが細胞増殖を促進する増殖因子の分泌を抑制するのみならず、細胞増殖を抑制するTransforming growth factor β の生成を惹起する可能性を示唆している²⁹⁾。エストロゲンの刺激がER陽性細胞の増殖のみ制御するのであれば、種々の内分泌療法はER陰性細胞には反応せず比較的早期にその乳癌はER陰性細胞のみとなり、癌全体としてER陰性となり、腫瘍は比較的早期に再増殖することにな

る⁹⁾¹⁰⁾³⁰⁾³¹⁾。しかし、内分泌療法に反応する乳癌は、しばしば長期間増大を停止しているか、縮小したままである。このような臨床的な事実からもエストロゲン刺激によりER陽性細胞より分泌された増殖因子は自己の細胞のみならず(autochrine control)、周囲のER陰性細胞の増殖も制御している(paracrine control)ことが推察される¹⁴⁾¹⁵⁾。

そこで、著者はヌードマウス可移植性ヒト乳癌株MCF-7にTAM、MPA、AMGおよびE₂などER系を介するホルモン剤を投与し、ER陽性細胞およびER陰性細胞のそれぞれの増殖能に及ぼす影響をER-ICAおよび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法によって検討した。その結果、TAM、MPA、AMGはMCF-7の増殖に抑制効果を示し、E₂は促進効果を示した。また、ER-ICAによるER陽性細胞率はTAM群およびMPA群で有意の低下を、AMG群で低下の傾向を、E₂群で有意の増加をみた。この結果はDMBA誘発ラット乳癌組織のER値は卵摘などの内分泌療法により減少し、E₂投与によりER値が増加するという従来の実験結果⁹⁾¹⁰⁾に一致した。しかし、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法では、ER陽性細胞の標識指数はTAM群、MPA群、AMG群で有意の低下を、E₂群で有意の増加を認めると共に、ER陰性細胞の標識指数もまた、TAM群、MPA群、AMG群で有意の低下を、E₂群で有意の増加を認めた。なお、著者の用いたホルモン剤の内、MPA以外はER系を介さない直接的な核酸合成阻害はないと考えられる³²⁾。

すなわち、従来、各種内分泌療法の影響をER陽性細胞とER陰性細胞のそれぞれについて調べることが困難であったが、著者の考案した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法で検討した結果、各種内分泌療法はMCF-7のER陽性細胞のみならずER陰性細胞の増殖能にも影響をおよぼしていることが判明した。

結 論

ヌードマウス可移植性ER陽性ヒト乳癌株MDF-7に対して実験的内分泌療法を行ない、腫瘍増殖と共に、ER陽性細胞とER陰性細胞のそれぞれの増殖能に及ぼす影響を検討した。

1. TAM、MPAおよびAMGはMCF-7の増殖に抑制効果を示し、E₂は促進効果を示した。
2. DCC法によるER値はすべての群で有意に低下し、特にTAM群およびE₂群では顕著であった。
3. ER-ICAによるER陽性細胞率はTAM群およびMPA群で有意に低下しAMG群で低下の傾向

を認め、E₂ 群で有意に増加した。

4. 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法で ER 陽性細胞の標識指数は TAM 群, MPA 群および AMG 群では有意に低下し、E₂ 群では有意に増加し、ER 陰性細胞の標識指数もまた TAM 群, MPA 群および AMG 群では有意に低下し E₂ 群では有意に増加した。

この結果より、内分泌療法は ER 陽性乳癌の ER 陽性細胞のみならず ER 陰性細胞の増殖能にも影響を与えることが判明した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った金沢大学医学部外科学第二講座宮崎逸夫教授に深謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、直接、御指導をいただいた金沢大学医学部付属病院手術部野口昌邦助教授、乳癌培養株を御供与とご支援助をいただいた慶応大学外科久保田哲朗講師、統計学的処理を御指導いただいた金沢大学医学部衛生学橋本和夫教授、病理組織学的所見を御教示いただいた金沢大学医学部付属病院中央検査部野々村昭孝助教授および第二外科教室の諸兄に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) **Beatson, G. T.**: On the treatment of inoperable cases of the mamma. Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet*, ii, 104-107 (1896).
- 2) **野村雅夫**: 乳癌とホルモンレセプター. 外科診療, 47, 77-81 (1982).
- 3) **Jensen, E. V. & Jacobson, H. I.**: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progr. Hormone Res.*, 18, 387-414 (1962).
- 4) **Jensen, E. V., DeSombre, E. R. & Jungblut, P. W.**: Estrogen receptors in hormone-responsive tissues and tumor. In *Wissler, R. W. (ed.), Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance*. p15-30, University Chicago Press, Chicago & London, 1980.
- 5) **McGuire, W. L.**: Estrogen receptors in human breast cancer. *J. Clin. Invest.*, 52, 73-77 (1973).
- 6) **Jensen, E. V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W. E., Jungblut, P. W. & DeSombre, E. R.**: A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Prog. Nat. Acad. Sci.*, 59, 632-638 (1968).
- 7) **野村雅夫, 田代英哉**: 乳癌のホルモン療法. 外科 MOOK 乳癌 (草間 悟, 和田達雄, 三枝正裕編), 第 1 版, 180-187 頁, 金原出版, 東京, 1981.
- 8) **Lee, S. H.**: Cancer cell estrogen receptor of human mammary carcinoma. *Cancer*, 44, 1-12 (1979).
- 9) **松葉 明**: 内分泌環境変化に伴うラット乳癌のエストロゲンレセプター (ER) 値および ER 陽性細胞の組織内分布の変動. 十全医会誌, 91, 695-713 (1981).
- 10) **野口昌邦, 松葉 明, 木下 元, 宮崎逸夫**: 乳癌 Estrogen Receptor の内分泌環境変動に伴う変化. 最新医学, 38, 797-804 (1983).
- 11) **Greene, L. G., Nolan, C., Engler, J. P. & Jensen, E. V.**: Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc. Natl. Sci. USA*, 77, 5115-5119 (1980).
- 12) **King, W. J. & Greene, G. L.**: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, 307, 745-747 (1984).
- 13) **Sirbasku, D. A. & Benson, R. H.**: Proposal of an indirect (Estromedin) mechanism of estrogen-induced mammary tumor cell growth. In *McGrawth, C. M., Brennan, M. J. & Rich, M. A. (eds.) Cell Biology of Breast Cancer*, 1st ed., p289-314, Academic Press, New York, 1980.
- 14) **中尾 誠, 野口真三郎, 小山博記, 佐藤文三**: 免疫組織化学的手法による乳癌エストロゲンレセプターの局在の検討. 乳癌の臨床, 1, 292-302 (1986).
- 15) **Jordan, V. C.**: The development and application of antiestrogens for breast cancer therapy. 乳癌における内分泌療法の進歩 (癌の臨床編), 第 1 版, 64-86 頁, 篠原出版, 東京, 1987.
- 16) **Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, A.**: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51, 1409-1416 (1973).
- 17) **Kubota, T., Kubouchi, K., Koh, J., Enomoto, K., Ishibiki, K. & Abe, O.**: Human breast carcinoma (MCF-7) serially transplanted into nude mice. *Jpn. J. Surg.*, 13, 381-384 (1983).
- 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) **Mobbbs, B. G. & Johnson, I. E.**: Estrogen-binding in vitro by DMBA-induced rat mammary tumors. its relationship to hormone responsiveness. *Europ. J. Cancer*, 10, 757-763 (1974).
- 20) **Zava, D. T. & McGuire, W. L.**: Estrogen

receptor. unoccupied sites in nuclei of a breast tumor cell line. *J. Biol. Chem.*, **10**, 3703-3708 (1977).

21) **Buell, R. H. & Tremblay, G.**: Autoradiographic demonstration of estrogen binding in human breast cancer after in vitro incubation. *Cancer Res.*, **45**, 4278-4284 (1985).

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

23) 野村雅夫: 内分泌療法におけるホルモンレセプターの意義. 乳癌の臨床, **1**, 181-190 (1986).

24) 飯野佑一, 泉雄 勝: 乳癌のホルモン療法-ホルモンレセプターの関連から-. 臨床科学, **17**, 853-860 (1981).

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

26) 小林俊三, 佐本常男, 岩瀬弘敬, 柄松章司, 伊藤由加利, 正岡 昭: モノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学キット (ER-ICA) によるヒト乳癌組織内エストロゲンレセプターの測定, 内分泌外科, **3**, 217-223 (1986).

27) **Garcia, M., Capony, F., Derocq, D., Simon,**

D., Pau, B. & Rochefort, H.: Characterization of monoclonal antibodies to the estrogen-regulated Mr 52,000 glycoprotein and their use in MCF7 cells. *Cancer Res.*, **45**, 709-716 (1985).

28) **Adams, D. J., Haji, H., Edwards, D. P., Bjerke, R. J. & McGuire, W. L.**: Detection of a Mr 24,000 estrogen-regulated protein in human breast cancer by monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, **43**, 4297-4301 (1983).

29) **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. and Treat.*, **7**, 59-70 (1986).

30) **Vignon, F. & Rochefort, H.**: Regulation of estrogen receptors in ovarian-dependent rat mammary tumors. I. Effects of castration and prolactin. *Endocrinology*, **98**, 722-729 (1976).

31) **Tominaga, T., Kitamura, M. & Tei, N.**: Effect of oophorectomy on estrogen receptors in rat mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz (a) anthracene. *Binken J.*, **20**, 143-145 (1977).

32) 泉雄 勝, 飯野佑一: 内分泌動態からみた進行乳癌に対する Medroxyprogesterone acetate (MPA) 治療の作用機序. 癌の臨床, **29**, 270-211 (1983).

Influence of Endocrine Therapy on Proliferation of Estrogen Receptor (ER) Positive Cells and ER Negative Cells of Human Breast Cancer (MCF-7) Serially Transplanted into Nude Mice Kiyoshi Tajiri, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 97, 621—634 (1988)

Key words: human breast cancer, nude mouse, endocrine therapy, estrogen receptor

Abstract

The influence of endocrine therapy on the proliferation of estrogen receptor (ER) positive cells and ER negative cells of human breast cancer (MCF-7) serially transplanted into nude mice was analyzed with tumor growth, dextran-coated charcoal (DCC) method, ER-immunocytochemical assay (ER-ICA) and ER-immunocytochemically stained ^3H -thymidine autoradiography. In the tamoxifen (TAM) group, the medroxyprogesterone acetate (MPA) group and the aminoglutethimide (AMG) group, tumor growth was inhibited, but it was promoted in the 17β -estradiol dipropionate (E_2) group. The ER level by the DCC method significantly decreased in the TAM, the MPA, the E_2 and the AMG groups. The ER-ICA showed that the ER positive cell rate in the TAM, the MPA and the AMG groups decreased, but it increased in the E_2 group. However, the ER-immunocytochemically stained ^3H -thymidine autoradiography showed that not only the labelling index of ER positive cells but also that of ER negative cells significantly decreased in the TAM, the MPA and the AMG groups, but significantly increased in the E_2 group. So it was concluded that endocrine therapy affected the proliferation of both ER positive cells and ER negative cells ER positive breast cancer.