

子宮体癌 Ishikawa 株由来の Estrogen 非依存性株の分離と その特性に関する研究

日本大学医学部産科婦人科学教室

白川 貴士 坂元 秀樹 佐藤 和雄

Separation and Characterization of Estrogen Independent Endometrial Cancer Cell Line Originated from Ishikawa Strain

Takashi SHIRAKAWA, Hideki SAKAMOTO and Kazuo SATOH

Department of Obstetrics and Gynecology, Nihon University School of Medicine, Tokyo

概要 ヒト高分化型内膜腺癌 Ishikawa 株から長期間の estrogen (E) 欠乏状態で培養することで E 非依存性株の分離を試み、その形質の検討を行った。その結果；1. 長期間の E 欠乏状態で E 非依存性の株 E 非依存性 Ishikawa 株：Estrogen Independent Ishikawa Line (EIIL) を分離した。2. この株は E 負荷によっても核内 estrogen receptor (ER) の集積ならびに progesterone receptor (PR) の誘導は起こらなかった。3. Western blot による解析では Ishikawa 株には 65Kd の単一 band を検出したが EIIL では 65Kd と 43Kd の二つの band を認めた。4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) による ERmRNA 発現の解析では EIIL においては Ishikawa 株の 60% 程度の発現に低下していた。5. Gel shift assay による Estrogen Responsive Element (ERE) 結合蛋白の発現の検討では Ishikawa 株、EIIL の両者に 130Kd 相当の ERE 結合蛋白を検出したが、EIIL ではこの蛋白はホルモン結合領域認識抗体 H222 と反応しなかった。以上の結果より Ishikawa 株を長期間 E 欠乏状態におくと E 抵抗性が発現し、ER の質的、量的変化が起こることを初めて報告した。

Synopsis An estrogen independent sub-clone of human endometrial carcinoma Ishikawa was established by culturing the mother cells in the absence of estrogen over a year. The daughter cells (designated as EIIL) possessed truncated estrogen receptors of an apparent size of 43Kd as well as normal 65Kd receptors and had lost sensitivity to estrogen or tamoxifen but remained sensitive to ICI 164,384. Analysis of the expression of the estrogen responsive element binding protein showed the presence of variant proteins which can recognize ERE. These observations indicate that long time estrogen deprivation may alter the expression of ER and this, in turn, alters cell response to estrogen as well as antiestrogens.

Key words: Ishikawa strain • Estrogen receptor • Estrogen responsive element

緒 言

体癌は子宮内膜由来の腫瘍であり、estrogen (E) 依存性がその本来の性質と考えられる。しかし体癌症例の必ずしもすべてに estrogen receptor (ER) は検出されず、さらには E 依存性の一つのパラメーターともいえる progesterone receptor (PR) も検出されない場合が少なくない。このことは ER の有無により体癌を二つに分類することが可能である。すなわち E 依存型と E 非依存型である。この分類はすでに Deligdisch and

Holinka¹⁾によって検討されており、臨床的な体癌の経過との関連も検討されている。それによると、高 E 状態を示す内膜増殖症を伴った体癌は高分化型のものが多く、PR も陽性で予後がよいとされている。しかし本来 E 依存性であった内膜細胞が癌化の過程でどのようにして E 非依存性の増殖能を獲得するのか、またその形質の変化にほかのどのような変化が伴うのかは明らかではない。我々はこの点を検討する目的でヒト高分化型内膜腺癌 Ishikawa 株から E 非依存性株の分離を試

み, その形質の検討を行った。

研究方法

1. 細胞培養: Ishikawa 株は樹立者である筑波大学臨床医学系産婦人科西田正人博士より供与を受けた²⁾。Ishikawa 株は phenol 除去 Eagle's MEM 培地中で $\text{CO}_2 : \text{O}_2 = 5 : 95$ 気相下で 10% 仔牛血清 (以下 FCS: 最終 estradiol (E_2) 濃度 $10^{-10} \sim 10^{-9}\text{M}$) と共に培養維持を行った。また E 非依存性 Ishikawa 株の分離には野生株をチャーコールで処理した 10% FCS (最終 E_2 濃度 10^{-11}M 以下) を添加した phenol 除去 Eagle's MEM 培地を用い, 350 日間以上の継代培養を行った。以下, 分離した細胞は E 非依存性 Ishikawa 株: Estrogen Independent Ishikawa Line (EII) と略す。

2. 抗 E 剤の増殖に対する影響: 細胞は 24 時間 0.5% FCS (dextran-charcol 処理) 含有 Eagle's MEM 培地で培養し, その後同じ条件下で 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9}M (最終濃度) の Tamoxifen (TMX) 又は ICI164,384 (いずれも ICI Pharma より供与) 添加の培養を 48 時間行い, その後の細胞数を算定した ($n=3$)。

3. 受容体 Assay: 上記条件で 24 時間培養後 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9}M (最終濃度) の estradiol 存在下で 12 時間培養した。細胞をトリプシン-EDTA 法で回収し, 核内 total ER と cytosol における PR を同時測定した³⁾。すなわち Ishikawa 株, EII を $300\mu\text{l}$ の TEGDB buffer (50mM Tris-HCl, 1.5mM EDTA, 1mM DTT, 10% (V/V) glycerol, 1mg/ml Bacitracin, pH 7.4) 中で homogenize し, 全 homogenate を $500\mu\text{l}$ の S buffer (1.5M sucrose, 1mM KH_2PO_4 , 3mM MgCl_2 , 1mM DTT, 10% glycerol, 1mg/ml Bacitracin, pH 7.3) に重層し 20,000g にて 60 分間遠心した。最上層を分取し, さらに 105,000g にて 30 分間遠心し, cytosol を得た。また核 pellets は $100\mu\text{l}$ の TEGDB buffer に再懸濁した後, 等量の TEGDBK buffer (1.0M KCl を含む TEGDB buffer) と混和し 30 分間核内 ER を抽出した。cytosol 分画における PR, 抽出した核内 ER はそれぞれ ^3H -R5020 (87Ci/mmol, NEM) および ^3H -

estradiol (115Ci/mmol, NEM) で既報の方法³⁾にて測定した。

4. ER 蛋白の Western blot 解析: 約 10^6 個の細胞をそれぞれ 1% SDS, 10% glycerol を含む 25mM Tris-HCl buffer (pH 6.5) 中で 4°C 2 時間処理し 25mM Tris-base, 192mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3 泳動緩衝液で 60mA, 450V にて 4~20% の濃度勾配ポリアクリルアミド電気泳動 (Multi Gel 4/20, Daiichi Pure Chemical Co.) を行った。分離された蛋白はニトロセルロース膜に 25mM Tris-base, 192mM glycine, 20% methanol pH 8.3 中で 100mA, 500V にて 2 時間セミドライ転写した。転写物はヒト ER のホルモン結合領域を認識するマウスモノクローナル抗体 H222, あるいは N 末端を認識する H226 抗体 (いずれも J. Greene の好意により提供) で 4°C 一晚反応させた後に Western blot 解析を行った。転写された免疫複合体は Vectastain-kit (フナコシ社) を用い ABC 法により検出した。

5. ER mRNA の検出: 約 10^6 個の細胞から RNA ZolB 法 (Bioteck Lab. Inc.) にて mRNA を抽出し, その後 First strand cDNA synthesis-kit (Pharmacia) を用いて cDNA を作成した。異なった時期に調整した cDNA を用いて検討を計 3 回行った。RT-PCR の反応系は全量 $20\mu\text{l}$ とし最終濃度は dNTP (50 μM), Taq polymerase 0.25units (TOYOBO), 1mM MgCl_2 $1\mu\text{l}$ にヒト ER cDNA 上塩基配列 205~973 を増幅する一対の primer (5'-AACGCGCAGGTCTACGGTCAG-3', 5'-GGG GCT CAG CAT CCA ACA AGG-3') を 10p moles 加え, denaturation 94°C 1 分, annealing 55°C 1 分, extension 72°C 2 分を 1 サイクルとして, 計 35 サイクル増幅した (標的 DNA 長さ 769 塩基対)。また同時に β -actin も増幅し (5'-TGT ATT CCC CTC CAT CGT GG-3', 3'-CAA ACT CTG GAA GTT GTG GG-5') PCR 効率の指標とした。増幅された DNA は 2% agarose 電気泳動にて分離し, エチジウムブロマイドにて検出した。PCR により増幅された cDNA の定量は既知量の鋳型ヒト ER cDNA (plasmid cDNA 使用) を用い検量線を作成し, 直線性が得られる範囲で施

行した。

6. Gel shift assay による Estrogen Responsive Element (ERE) 結合蛋白の発現の検討: DNA 上の ER 結合部位の塩基配列を Kumar and Chambon の報告⁴⁾に基づき合成した。その長さは35塩基対とし、中央に ERE consensus sequence を配置した (GTC CAA AGT CAG GTC ACA GTG ACC TGA TCA AAG TT)。作成したプローベは³²P にて標識した。約10⁶個の細胞を rubber policeman にて剥離し、2 倍容量の氷冷した TEGDB buffer 中で homogenize した後、TEGDBK buffer 等量を加え、水中にて30分間核内の ER を抽出した。抽出液を105,000g にて45分間遠心し、その上澄の蛋白濃度を測定後これを ER 試料とした。試料5 μ l (蛋白量約1 μ g)を20nM E₂ と incubate (38°C, 10分間)し、さらに3 μ l polydeoxyinosinic deoxycytidylic acid (1mg/ml, Sigma) を加え氷上で10分間反応させた。続いて³²P-ERE (約10⁴cpm) を加え室温で30分間反応させた。その5 μ l の反応液を10%ポリアクリルアミドゲルを用い TBE buffer (50mM Tris, 50 mM bolic acid, 1mM EDTA, pH 8.2) にて泳動した後ゲルを乾燥し、FUJI X-RAY film RNX (Fuji Film) を使用し-30°Cにて約2時間 autoradiography を行った。ヒト ER α DNA を NIH3T3 細胞に挿入し (3T3_{clone 10} と略)、陽性コントロールとした。

研究成績

1. 細胞増殖: E 除去培地での EIIL の増殖は E 存在下の Ishikawa 株と有意の差はなかった。一方 Ishikawa 株は E を除去した環境 (E 濃度 10⁻¹¹M 以下) ではその増殖は抑制されたが死滅はせず継代時の細胞数を維持した (図 1a)。一方低濃度の E 存在下 (10⁻¹⁰~10⁻⁹M) でも EIIL の増殖は Ishikawa 株と同様であった (図 1b)。しかし高濃度の E₂ (10 μ M) では EIIL, Ishikawa 株の増殖は抑制された (図 2a)。培養系への TMX の添加では Ishikawa 株の増殖は容量依存性に抑制されたが、EIIL の増殖は影響を受けなかった (図 2b)。一方 ICI164,384 の添加では Ishikawa 株ならびに EIIL のいずれもが容量依存性の増殖抑制を受け

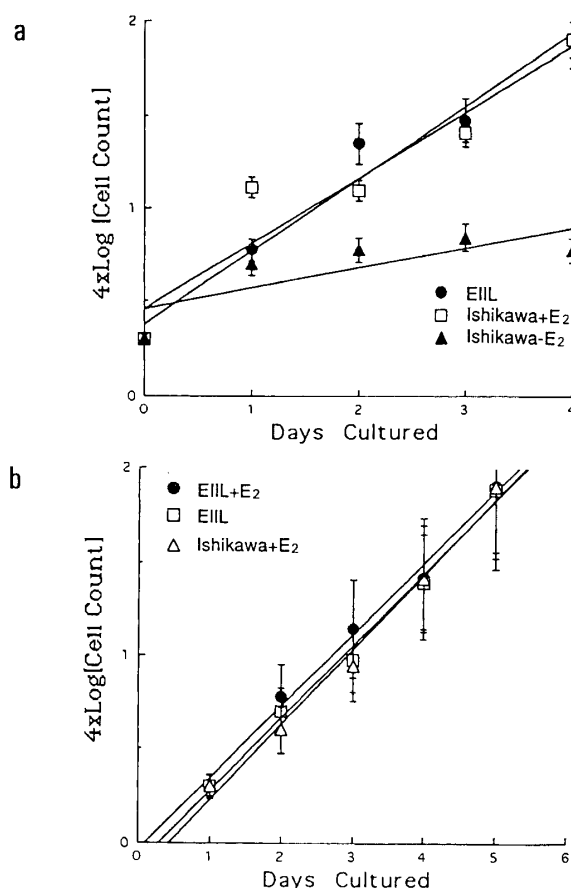


図1 Effects of estradiol on the growth of Ishikawa and EIIL

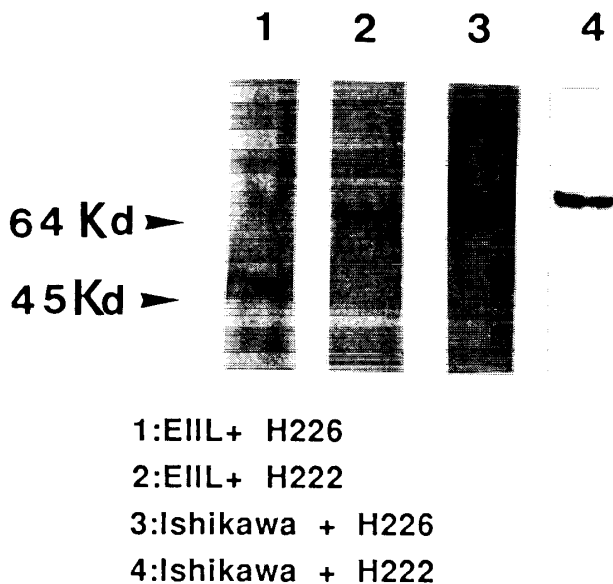


写真1 Western blot analysis using two monoclonal antibodies H222 and H226

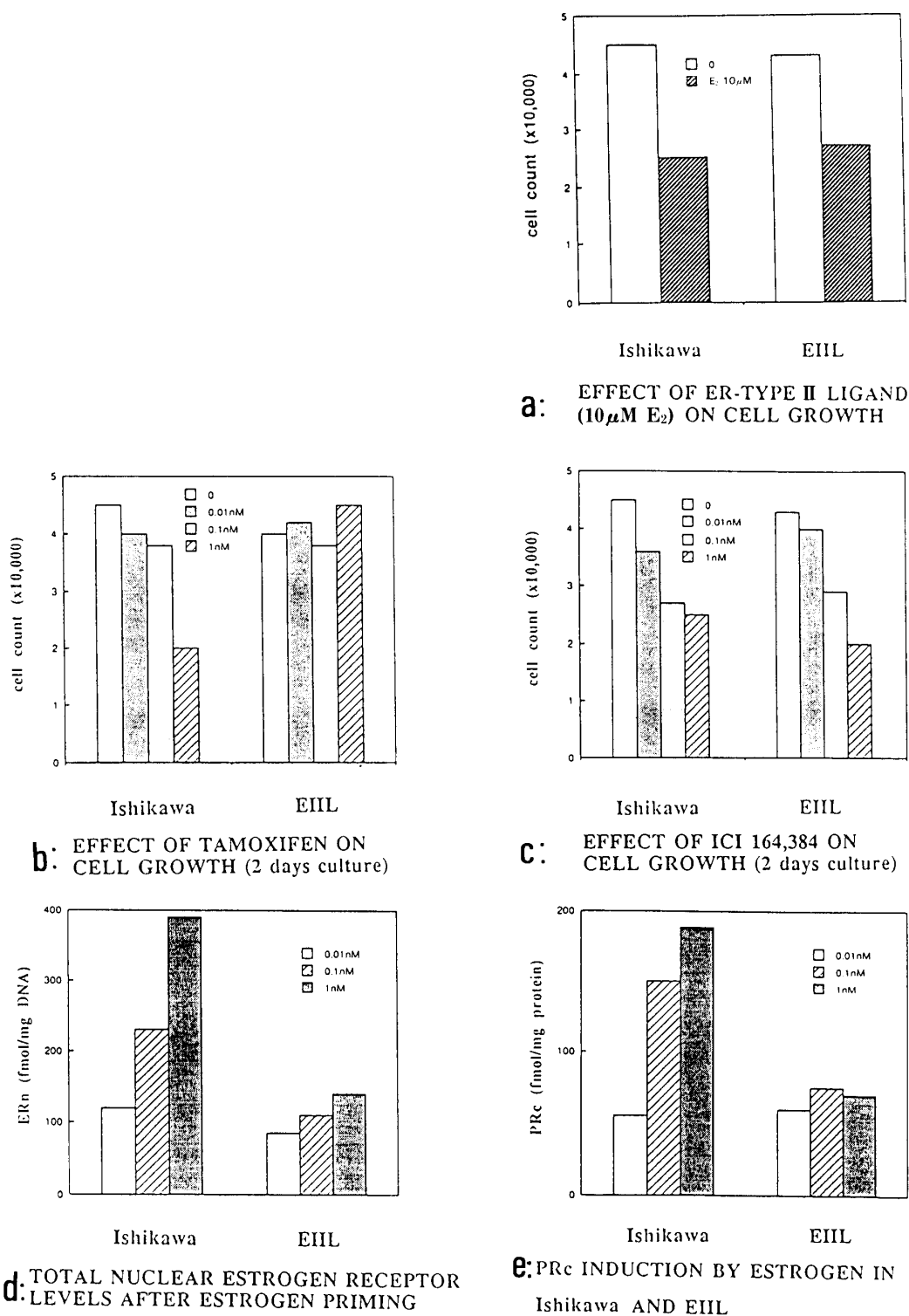
H226による Western blot 解析において、Ishikawa 株は65Kdの単一の band を、EIIL は65Kd, 43Kd の 2 本の band を検出した。H222では共に単一の65 Kd band を検出した。

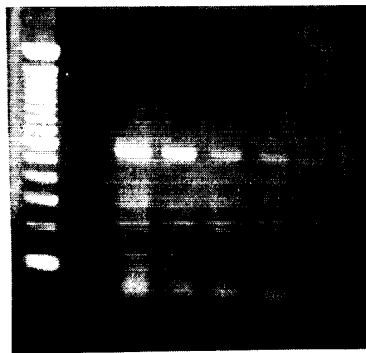
た(図 2c)。

2. ER の核内移行と PR 誘導： 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} M の E と共に12時間培養した Ishikawa 株では容量依存性に核内への ER の集積を認めたが、EIIL ではわずかな増加傾向を認めたのみで

あった(図 2d)。また PR の誘導も Ishikawa 株では容量依存性の増加がみられたのに対し、EIIL では PR の増加は明らかではなかった(図 2e)。

3. Western blot 解析：N 端の A 領域を認識する H226抗体による Western blot 解析では





*PCR定量性確認のため、既知量のplasmid cDNA(ER)を鋳型としてPCRを行った。ERの定量に際しては未知試料のDensitometryの範囲をこの標準曲線内に設定して行った。

Dose Relationship between Densitometry and Template

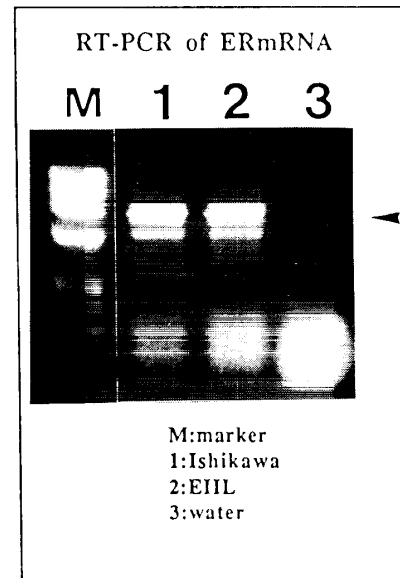
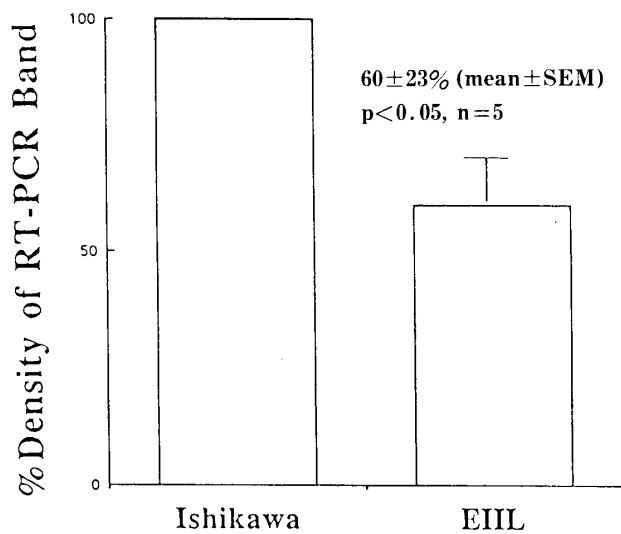
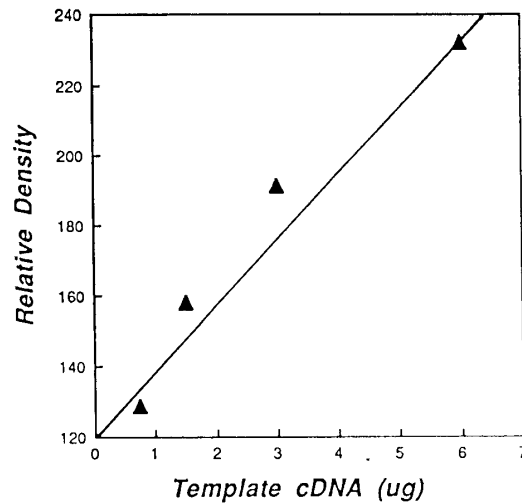


写真2 Comparison of ERmRNA expression by RT-PCR

Ishikawa 株, EIIL において769塩基対の DNA 断片を検出した. EIIL における発現は約60%に減少している.

Ishikawa 株において65Kdの単一bandを, EIIL においては65Kdに加え43Kdのbandを検出した. 一方ERのホルモン結合領域認識抗体H222ではIshikawa株, EIILのいずれにおいても65Kdのbandのみを検出した(写真1).

4. ERmRNAの発現: RT-PCRによりER-mRNAの検出を行った結果は写真2に示すようにIshikawa株, EIILいずれにも769塩基対の長

さをもつDNA断片を検出した. β -actinのsignalとの比較ではEIILにおけるER発現はIshikawa株の発現を100%とすると, その約60% ($n=5$, $60 \pm 23\%$ (mean $\pm$ SEM), $p < 0.05$, student's T test) に減少していた.

5. Gel shift assayによるERE結合蛋白の発現の検討: Gel shift assayによる解析では, 写真3に示すようにIshikawa, EIILいずれも正常ヒ

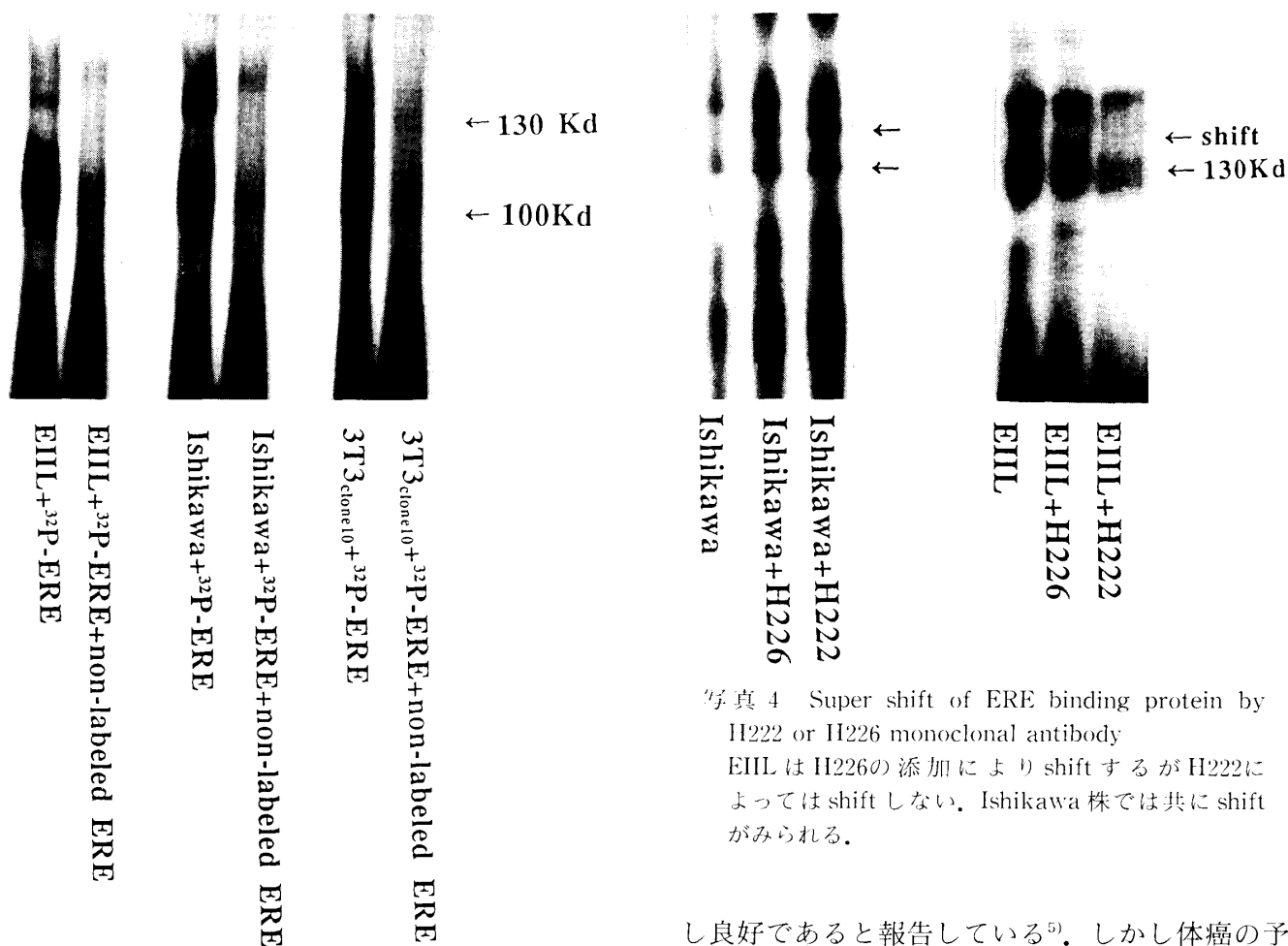


写真3 Gel shift assay of ER competition by non-labeled ERE

Ishikawa株, EIIL共に正常ヒトERを挿入した3T3_{clone10}と同じ位置に130Kdのbandを検出した。

トERを挿入した3T3_{clone10}と同じ130Kdの位置にERE結合蛋白を検出した。このbandは過剰のEREの添加にて消失した。ER抗体の添加では写真4に示すようにEIILの130Kd bandはH226でshiftし、H222ではshiftしなかった。一方Ishikawa株では両抗体の添加でshiftが観察された。

考 案

体癌はERとPRの発現が臨床経過と関連する。すなわち内膜増殖症を伴いE依存性があるType Iの体癌は、E依存性がなく肥満、不妊症などの典型的なE優位の既往のない、高齢者に発生するType IIの体癌より予後がよい¹⁾。ER, PRの有無からの検討でも加藤はER陽性あるいはPR陽性症例の予後がER, PR共に陰性のそれに比較

写真4 Super shift of ERE binding protein by H222 or H226 monoclonal antibody

EIILはH226の添加によりshiftするがH222によつてはshiftしない。Ishikawa株では共にshiftがみられる。

し良好であると報告している⁵⁾。しかし体癌の予後を直接左右する因子はリンパ節転移であり、この転移巣においては転移癌細胞の多くは原発巣と異なりERを発現していないことが報告されている⁶⁾。すなわち非E依存性の獲得が腫瘍増殖や転移形成の過程で起こっている可能性がある。Horowitz et al. は乳癌で、Eに結合することなくDNAに結合する転写活性因子(Positive dominant)としての変異ERを報告している⁷⁾。しかしその後乳癌、体癌あるいは正常内膜においてさえ種々のエクソン欠失ER変異株の存在が報告され⁸⁾、「変異ERの発現陽性=非estrogen依存性」という従来の概念が見直されてきた⁹⁾。このような背景においては、E依存性の定義もERの有無やERmRNA発現を根拠とするのみでは不十分であり、我々はE非存在下で増殖が抑制され生理的濃度のEを培養環境に添加することによって増殖が回復されることをもってE依存性を満たすものと考えて以下の検討を行った。E非依存性増殖能を得た株をIshikawa株より分離したが、

EIIL の増殖は E の有無に影響されなかった。Ishikawa 株も E 欠損状態で死滅せず、極めて緩徐に増殖するため、親株自身も E を絶対的に要求するものではない。このことは androgen 依存性などの検討¹⁰⁾でも知られていることであり、ホルモン依存性の変化は動的な癌細胞の adaptation の程度を示しているに過ぎないとも考えられるが、今回の我々の検討では、この adaptation の過程において幾つかの機能的変化が起こっていることが観察された。すなわち Ishikawa 株においては E 添加により核内への ER の集積と cytosol での PR の誘導を認めたのに対し、EIIL では ER の集積がみられずその結果 PR の誘導も起こっていない。さらには Ishikawa 株の増殖を抑制する TMX は EIIL に対しては何ら増殖に影響を及ぼしていない。これらの現象から導かれる推測は、EIIL での ER の発現消失又は著しい低下である。しかし実際は EIIL における ER mRNA の低下は Ishikawa 株の 40% の低下であり、EIIL にみられる変化は ER の量的な減少によってのみでは説明できない。むしろ E 非依存性とみられた増殖は ER の質的变化による E 抵抗性を側面にもっていることが明らかとなったが、Western blot 解析の結果、EIIL では Ishikawa 株にはみられない 43Kd の蛋白が通常の 65Kd ER に加え検出された。この蛋白は H226 抗体では検出されるものの、H222 抗体には反応しなかったことからホルモン結合領域に欠損がある変異受容体と考えられる。この変異受容体は negative dominant な性格をもつものとも推察されるが、Gel shift assay では H222 抗体で shift しない蛋白を EIIL に認めており、長期間の E 欠乏環境に置かれた Ishikawa 株ではホルモン結合領域に欠損があるが DNA には結合する受容体が発現すると考えられる。また ICI164,384 が EIIL の増殖を抑制したことから EIIL の増殖の一部は ER の 2 量体形成に依存していると推測された。一方 Gel shift assay において観察された ERE 結合蛋白の分子量は 130Kd 近くであり、Western blot 解析でみられた 43Kd の蛋白が事実 ERE 結合蛋白であるか否かは今回の検討では明らかではない。次に 10 μ M の E は Ishi-

kawa 株と EIIL の両方の増殖を抑制した。このことは E の Type II 結合を介する増殖抑制効果¹¹⁾が両者に保たれていることを示唆している。Type II 結合の意義についてはいまだ一定の見解がないが、フラボノイドなどの抗腫瘍作用のある生理活性物質を ligand とするとの報告もあり、今後の体癌における研究が期待される。以上の結果より Ishikawa 株を長期間 E 欠乏状態におくと E 抵抗性が発現し、ER の質的、量的変化が起こることを我々は初めて報告した。今回の in vitro の観察が体癌の病態にどのように関連するのかは明らかではない。しかし閉経後、E 分泌が著しく低下することが体癌の進行に何らかの影響を与えることは容易に推察される。腫瘍の ER 解析が体癌の病態生理の理解の一助になるものと考えられる。

ヒト ERcDNA の NIH3T3 細胞への導入に関して岡山大学工学部金沢 浩教授の御協力を深謝致します。また位下幸子氏の技術的援助に対し感謝致します。本論文の要旨は第45回日本産科婦人科学会学術講演会にて発表した。本研究の一部は文部省一般研究 B (054544567) により行われた。

文 献

1. Deligdisch L, Holinka CF. Progesterone in two groups of endometrial carcinoma. *Cancer* 1986; 57: 1385—1389
2. 西田正人, 笠原国武, 金子 實, 岩崎寛和, 林 一雄. エストロゲン, プロゲステロンレセプターを持つヒト分化型子宮体内膜腺癌細胞株 (Ishikawa 株) の樹立. *日産婦誌* 1985; 37: 1103—1111
3. Sakamoto H, MacLusky NJ, Schwarz PF, Naftolin F, Den K, Takagi S. A study of cytoplasmic and nuclear estrogen and progesterone receptor in gynecologic neoplasms. *Endocrinol Jpn* 1987; 34: 179—187
4. Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988; 55: 145—156
5. 加藤順三. 人子宮内膜の受容体分析—ホルモン依存性本態の解明—. *日産婦誌* 1978; 30: 818—827
6. 坂元秀樹. リンパ節転移と癌遺伝子. *日本婦人科病理コルポスコピー学会雑誌* 1994; 12: 89—94
7. Horowitz KB, Mockus MB, Lessey BA. Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone-receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance. *Cell* 1982; 28: 633

- 641
8. *McGuire WL, Chamness GC, Fuqua SAW.* Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1571—1596
 9. 白川貴士, 坂元秀樹, 佐藤和雄. 婦人科癌と受容体異常—新しい癌の病態の考え方. *産科と婦人科* 1994; 61: 1606—1617
 10. *Gaddipati JP, McLeod DG, Heidenberb HB, Sesterhenn IA, Fügler MJ, Moui JW, Srivastava S.* Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 2861—2868
 11. *Markaverich BM, Gregory RR, Alejardro MA, Clark JH, Johnson GA, Middleditch BS.* Methyl p-hydroxyphenyllactate. An inhibitor of cell growth and proliferation and an endogenous ligand for nuclear type-II binding sites. *J Biol Chem* 1988; 15: 7203—7210
- (No. 7705 平7・11・17受付)
-