

培養絨毛癌細胞における細胞増殖, hCG, β -hCG ならびに SP-1 の産生動態に与える Methotrexate の影響

旭川医科大学産婦人科学教室

林 博章 山下 幸紀 牟禮 一秀
佐川 正 石川 睦男 清水 哲也

Analysis of Cell Growth and Production of hCG, β -hCG and SP-1 in Cultured Choriocarcinoma Cell Lines Using Methotrexate

Hiroaki HAYASHI, Kohki YAMASHITA, Kazuhide MURE, Tadashi SAGAWA
Mutsuo ISHIKAWA and Tetsuya SHIMIZU

Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

概要 絨毛癌の細胞学的特性を検討する目的で, 発生の異なる3種類の培養絨毛癌細胞株(BeWo, GCH-2, SCH)を用いて, それらの類似性, 相違性の確認ならびに Methotrexate (MTX) 添加による細胞増殖様式, hCG, β -hCG と Pregnancy Specific β -1-Glycoprotein (SP-1) 産生様式の変化を検討し, 以下の結果を得た。

A: MTX 非添加時

- 1) 培養液中に放出された, hCG と β -hCG は3株において対数増殖期直前に分泌の亢進が観察され, むしろ対数増殖期に分泌は, 抑制された。
- 2) 細胞内 hCG, β -hCG の変動は, 培養液中に放出された hCG, β -hCG の変動パターンに類似していた。
- 3) SP-1 は, 細胞内, 培養液中とも培養開始から定常状態まで2.5ng/ml 以下であった。

B: MTX 添加時

- 1) BeWo, GCH-2, SCH の MTX 添加による細胞増殖, hCG, β -hCG 産生動態は, きわめて類似していた。
- 2) MTX 濃度について検討すると, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M 添加で, 細胞増殖は dose dependent に抑制され, hCG, β -hCG 分泌は dose dependent に亢進した。
- 3) MTX 24時間, 72時間, 168時間添加において, 細胞増殖, hCG, β -hCG, SP-1 の産生を観察すると, 添加時間による明らかな差は認められなかった。

Synopsis Three choriocarcinoma cell lines (BeWo, GCH-2 and SCH) cultured in MTX or MTX-free medium were investigated with respect to cell growth and production of hCG, β -hCG and specific β -1-glycoprotein (SP-1).

MTX was administered at the concentration of 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M for 24 hours, 72 hours and 168 hours from the fourth day of culture.

Each cell line demonstrated that the cell growth and production of hCG and β -hCG were dose, rather than time, dependent. 10^{-6} M or more of MTX had a distinct effect, but 10^{-7} or less of MTX had little effect.

SP-1 was produced at a low level during culture regardless of the medium used.

The ratio of the extra- to the intracellular hCG level was shown to be about 100:1 after the administration of MTX to BeWo and GCH-2. It is, therefore, possible that the temporary elevation of the hCG level observed *in vitro* after treatment with MTX is the result of an increase in secretion of hCG, rather than cellular damage.

Key words: Choriocarcinoma cell line • Methotrexate • Human chorionic gonadotropin • Specific β -1-glycoprotein

緒 言

絨毛癌に対する臨床レベルにおける Metho-

trexate (MTX) の有効性については, 多数の報告があるが¹⁴⁾¹⁸⁾, 近年 MTX により果して絨毛癌

は完治するののかという疑問²⁾⁵⁾, あるいは絨毛癌のなかに MTX に抵抗性を示すものもあることなどが報告され¹⁵⁾, 現在絨毛癌細胞に対する, 増殖あるいはホルモン分泌動態の MTX に対する反応性などについて詳細な解析が望まれている。また, 最近血中 Pregnancy Specific β -1-Glycoprotein (SP-1) も臨床上の腫瘍マーカーとして注目されているが, 同様, 細胞レベルでの検討が待たれている。

今回, これらの点を解明する一環として著者らの教室で維持している, 3 絨毛癌細胞株 (BeWo, GCH-2, SCH) を用いて, これらの細胞学的特性を観察するとともに, MTX 添加によりそれらがどのように変化を受けるのかについて検討を加えた。

研究方法

1. 実験材料

妊娠性絨毛癌細胞株として BeWo, GCH-2, 非妊娠性絨毛癌細胞株として SCH を用いた。BeWo 株はハムスター頬袋の異種移植腫瘍として累代されていたものを Pattillo & George¹⁹⁾により株化されたもので, GCH-2 株は, 田中ら⁸⁾によりハムスター移植株として樹立されたものである。また SCH は大星ら⁷⁾により男子胃原発絨毛癌の培養株である。

2. 培養方法

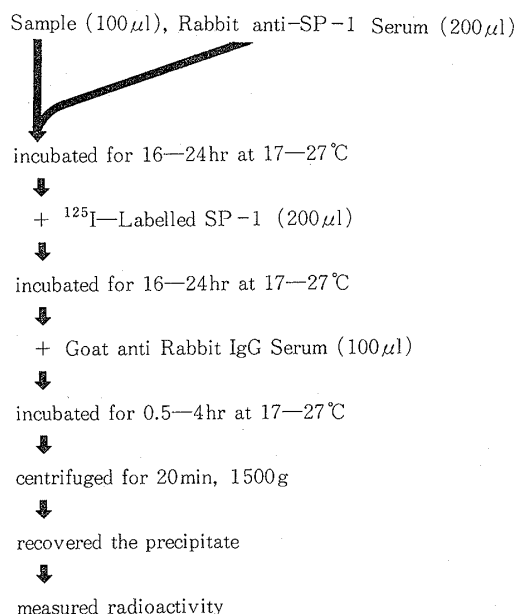
BeWo, GCH-2, SCH をそれぞれ $0.5-1 \times 10^6$ 個, Plastic flask (Lux 社製) に植え込み, 培養液は, RPMI 1640 に 10% FCS を加えたものを用いた。培養液 3ml を加え, 37°C, 5 %CO₂ incubator 内で静置培養を行なった。培養液は, 24 時間ごとに交換した。

3. 実験方法

(1) MTX を RPMI 1640 で希釈し, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M に調節した。培養開始 4 日目より, 上記濃度の MTX を 24 時間, 72 時間, 168 時間添加し以下の実験に供した。MTX 含有培養液は, 前述の培養方法のように 24 時間ごとに交換した。

(2) 細胞数の変化を観察するために, 0.1% Trypsin + 0.02% EDTA 溶液で細胞を混和し, Bürker-Türk 計算盤で算定した。

図1 Cold preincubation method



(3) 培養液中に放出された, hCG, β -hCG, SP-1 の測定は, それぞれの培養液を 2,000rpm で 5 分間遠沈し, その上清を対象として Radioimmunoassay (RIA) により測定した。

(4) 細胞中の hCG, β -hCG, SP-1 の測定は, それぞれの細胞を, FCS free RPMI 1640 にて 3 回洗浄後, 150W, 30 秒間で超音波破碎 (大岳製) し 800rpm で遠沈, 上清を RIA により測定した。

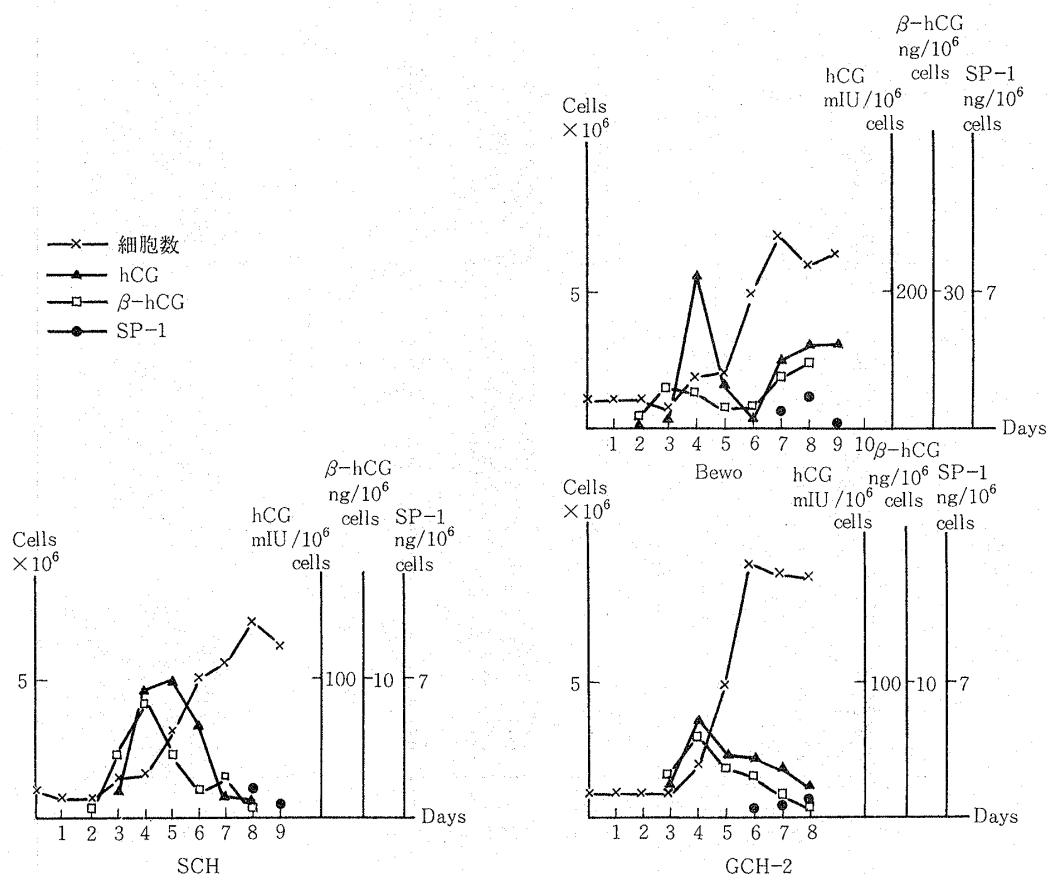
(5) RIA 測定は, duplicate sample にて行なつた。hCG は, CIS 社 RIA-Kit (測定感度 2.0~250 mIU/ml), β -hCG は, CIS 社 RIA-Kit (測定感度 0.2~50ng/ml) により測定した。SP-1 は Hoechst 社 RIA-Kit で cold preincubation method (測定感度 2.5~50ng/ml) で測定した (図 1)。

結 果

1. 細胞増殖様式と hCG, β -hCG, SP-1 の産生動態 (図 2)

細胞増殖様式は, 3 株とも培養開始 2~3 日目に誘導期 (lag phase), その後対数増殖期 (exponential phase) に入り, 培養開始 8 日目前後に定常期 (stationary phase) となつた。

培養液中に放出された hCG, β -hCG は, 3 株とも対数増殖期直前に分泌の亢進が認められ, むしろ対数増殖期に hCG, β -hCG の分泌は抑制された。また細胞内の hCG, β -hCG は, 培養液中に放

図2 細胞増殖様式と hCG, β -hCG, SP-1 産生動態

出された hCG, β -hCG の変動と同様のパターンを示した。

SP-1 は細胞内、培養液中ともに培養開始から定常状態まではほとんど測定感度以下であつた。しかし、定常状態 2～3 日目に細胞内および培養液中で 0～5ng/ml 以内であつた。

2. 細胞増殖様式に対する MTX の影響

各培養絨毛癌細胞株ごとに各濃度の MTX 添加による影響を検討した (図 3)。

BeWo, GCH-2 は, MTX 10^{-8} M 24時間, 72時間, 168時間添加により細胞増殖抑制は, 対照群と著明な差はなかつた。 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M 添加により明らかな増殖抑制が観察されたが, それぞれの添加時間(24時間, 72時間, 168時間)による差は, 認められなかつた。 MTX 10^{-7} M と 10^{-6} M を境に細胞増殖抑制に著明な差が認められた。すなわち, MTX 10^{-7} M 添加では, 添加前の細胞数を 2～3 日間維持し, その後再び増殖を開始した。一方, MTX 10^{-6} M 以上の添加では, 細胞数は添加前の

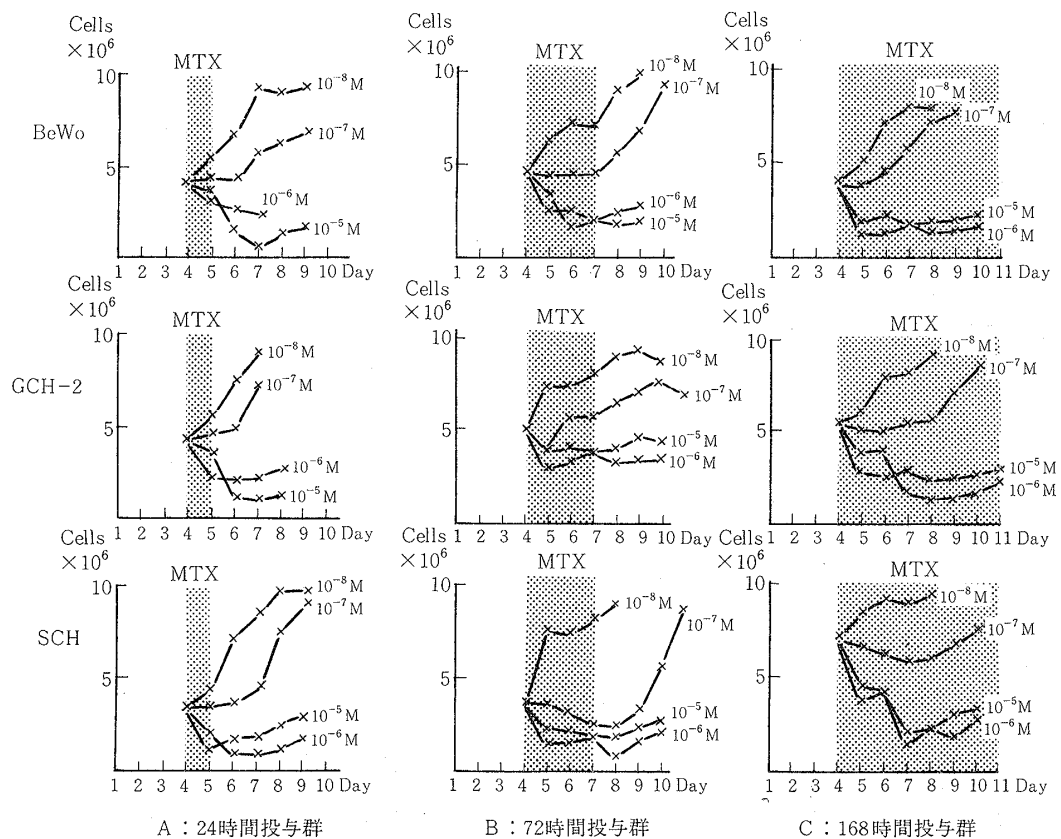
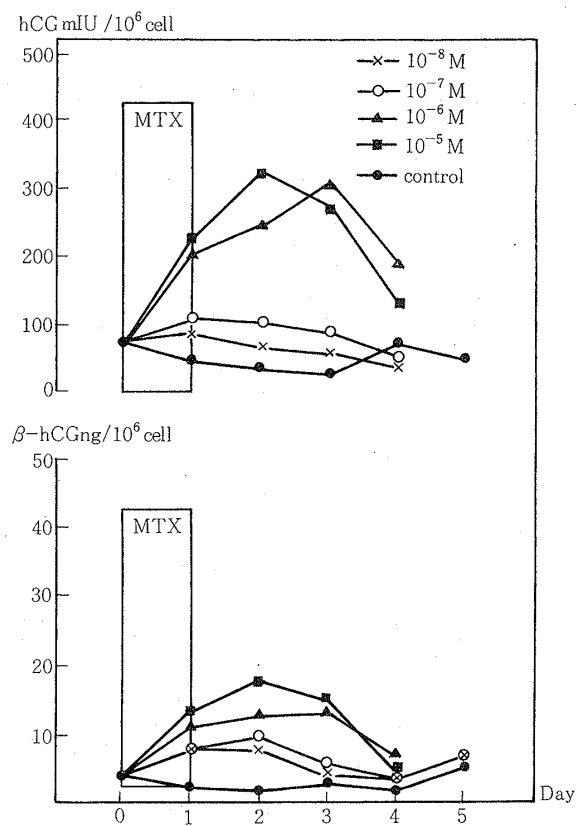
約 50% にまで減少したが, 死滅することなく増殖は漸次回復を開始した。

SCH は, BeWo, GCH-2 と同様に MTX 10^{-8} M 添加で対照群と差はなく, MTX 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M 添加で増殖抑制が観察された。 BeWo, GCH-2 は, それぞれの濃度での添加時間による差は認められなかつたが, SCH では MTX 10^{-7} M 24時間添加時と 72時間添加時とにおいて, 24時間添加時より 72時間添加時の方が増殖抑制は著しかつた。しかし, 72時間添加時と 168時間添加時には, 添加時間による差は観察されなかつた。

3. hCG, β -hCG, SP-1 産生に対する MTX の影響

MTX 10^{-8} ～ 10^{-5} M 24時間添加時の BeWo において 10^{-7} ～ 10^{-5} M で添加翌日より hCG, β -hCG 値は上昇し Day 2～3 に対照群と比較して 5～7 倍の値を示した (図 4)。 また 10^{-7} M 72 および 168 時間添加時で添加翌日 (Day 5) に hCG, β -hCG は約 2 倍の値を示したが, その後漸次減少した。 10^{-6}

図3 MTX 各濃度添加時の増殖曲線

図4 Effect of MTX upon hCG and β -hCG by BeWo cell

M72および168時間添加でDay 6~7に最高値を示す上昇が観察されhCG, β -hCG値は 296 ± 35 mIU/ 10^6 cell, 12 ± 3 ng/ 10^6 cellで添加前と比べ5~7倍の上昇であつた。

GCH-2は 10^{-7} M72および168時間添加でhCG, β -hCGの産生を亢進するが, 168時間添加時にhCG, β -hCGは 19 ± 5 mIU/ 10^6 cell, 4 ± 1.5 ng/ 10^6 cellから最高値 42 ± 9 mIU/ 10^6 cell, 7 ± 1.5 ng/ 10^6 cellの上昇にとどまつた。 10^{-6} M72時間添加でDay 6に, 168時間添加でDay 5にhCG, β -hCGの最高値が観察された。しかしBeWoの反応とは異なり約3倍の上昇にあつた(図5, 6)。

SCHは 10^{-7} M72および168時間で若干の上昇しか観察されず, 10^{-6} M72時間, 168時間添加においては一定の傾向は認められなかつた。

MTX添加による培養液中と細胞内のhCG推移の比較をBeWoを用いて行なつた。MTX 24時間添加後3日目の培養液中および細胞内のhCGは 10^{-6} Mと 10^{-5} M添加群で対照群(薬剤非添加時)と比べ培養液中と細胞内の両方で5~7倍の

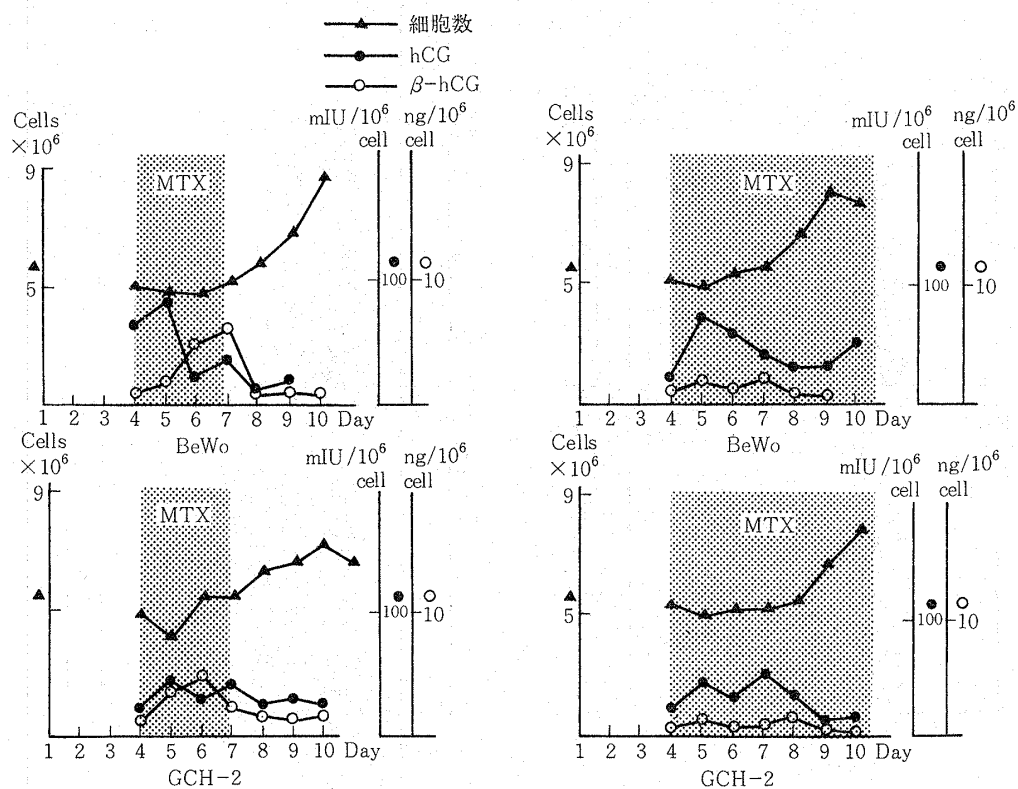
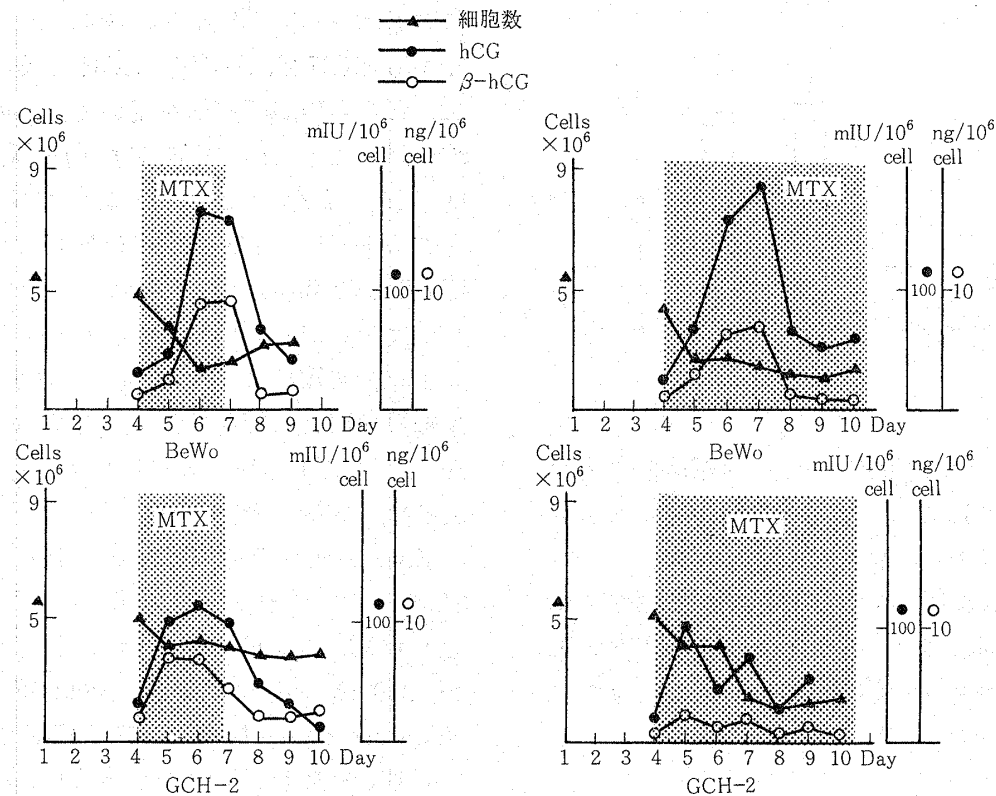
図5 MTX 10^{-7} M 添加時の培養液中 hCG, β -hCG の推移図6 MTX 10^{-6} M 添加時の培養液中 hCG, β -hCG の推移

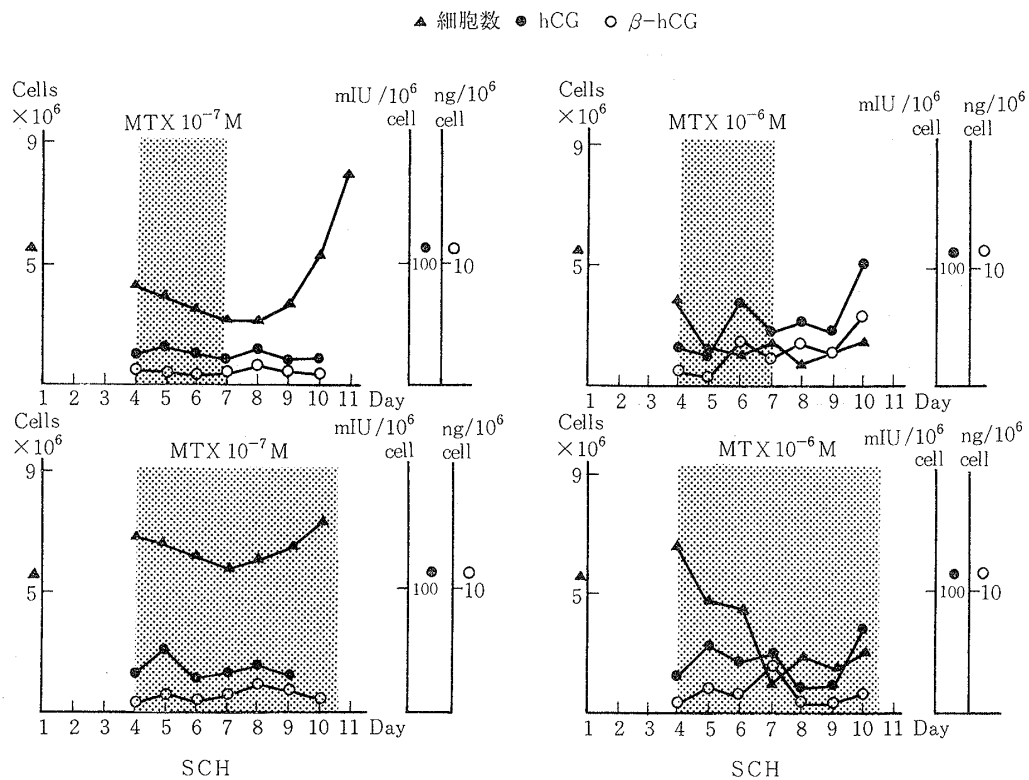
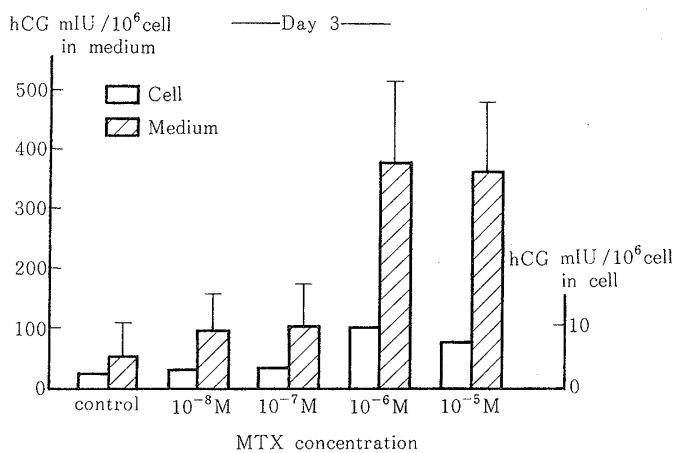
図7 MTX 添加時の培養液中hCG, β -hCGの推移

図8 MTXのhCG (mIU/ml) 産生に及ぼす影響 (BeWo)



高値であつた。また対照群のhCGの細胞内含有量は培養液の約1/10であつたが、 10^{-6} 、 10^{-5} M添加群のそれは約1/40であつた。

3株のSP-1産生をみると細胞当りの産生量は少なくMTX添加においても0~5ng/ml内を変動しhCG, β -hCGのMTX添加による一過性の上昇は認められなかつた。

考 察

最近、妊娠と関係のないhCG産生肺癌と絨毛癌との間にhCG, β -hCGの分泌能に差があると報告されている。著者らの維持している絨毛癌BeWo, GCH-2は妊娠性、SCHは非妊娠性株である。これらの絨毛癌株を用いて、この点につき比較検討してみたが、細胞形態、増殖様式とhCG, β -hCG産生様式などについては、牟禮ら⁴⁾の報告にもあるように、3株は、ほぼ類似した傾向を示し、MTX 24時間添加による変化も、3株はほぼ共通した反応を呈していた。さらに、MTX添加時間、および添加濃度を組み合わせて検討すると、MTX添加濃度による細胞増殖抑制効果は、MTX添加 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} Mの順にdose dependentな反応を、3株で観察された。

hCG, β -hCG産生量をみるとBeWo, GCH-2とSCHにおいて若干の差が認められたが、MTX濃度とhCG, β -hCGの産生量は、MTX 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} Mの順に増加し、細胞増殖抑制効果と同様にdose dependentな反応が観察された。

MTX添加時間による、細胞増殖抑制効果、

hCG, β -hCG 産生動態は, 3 株の倍加時間 (BeWo $\approx$ 40時間, GCH-2 $\approx$ 37時間, SCH $\approx$ 72時間) の差を考えると, それぞれの添加時間による有意な差が, 観察されると推測されたが, 細胞増殖抑制効果, hCG, β -hCG の分泌量を測定したが明らかな差は認められなかった。

これらは, Skipper et al.²²⁾による MTX の selflimiting 作用によるのか, Fider, I.J.¹³⁾, Aidells et al.¹⁰⁾のいう腫瘍に Heterogeneity のあることから, 耐性のある細胞集団のみが残っていく結果なのかは今回の実験からは不明であった。

MTX 添加濃度, 時間について, 細胞増殖様式, hCG, β -hCG, SP-1 産生動態を測定したが BeWo, GCH-2, SCH には明らかな差は認められず, 発生の異なる絨毛癌であつても, きわめて類似した細胞特性を有することが推測された。

次に従来化学療法中, また直後に認められる一過性の hCG 値上昇の主要原因に関して, Bagshawe¹¹⁾, 石塚ら¹⁾は, 抗癌剤による絨毛癌細胞の破壊が細胞内 hCG の細胞外への放出を助長すると临床上推測していた。

今回の細胞内, 培養液中へ放出された hCG, β -hCG の測定結果によれば, hCG, β -hCG の細胞内と培養液中の比では, ほぼ 3 株とも定常状態で約 1/10, MTX 添加時の hCG 産生亢進時で約 1/40 であり, 産生された hCG, β -hCG は, 細胞内に蓄積されることなく直ちに細胞外へ放出されると考えられる。したがって少なくとも細胞破壊による hCG 放出助長が主要原因ではないと結論できた。また著者らの実験結果は, BeWo 株で MTX 添加により一過性の hCG 上昇を観察した Speeg et al.²³⁾の結果と同様であった。Speeg et al. は, この現象を Husa et al.¹⁶⁾の実験結果と合せて MTX が細胞周期の S 期前へ回転を停止させ, 換言すれば G1 期への細胞の集積が, DNA 合成を阻害し hCG, β -hCG の産生亢進をもたらすと推測している。蔵本ら³⁾, 田中⁹⁾らは, 酵素抗体法を用いた形態面からのアプローチで, hCG 産生は cytotrophoblast 型絨毛細胞から syncytiotrophoblast 型絨毛細胞へと分化していく過程の中で生じてくるとしている。著者らも, MTX 添加に

より多核細胞の出現を認めているが, これらの細胞の同定, あるいは意義については, さらに詳細な検討が必要であると考えている。

今回の 3 株とも MTX 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} 添加の順に dose dependent に可逆的な細胞増殖抑制を示しこれに対して, MTX 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M の順に hCG, β -hCG の産生が亢進したことは, 西谷ら⁶⁾の DNA 合成を可逆的に抑制する MTX 濃度により, 著しいタンパク合成が促進され, hCG, β -hCG の一過性の分泌亢進に密接な関連があるとする報告に一致し, 可逆的な細胞阻害を起こす MTX 濃度による細胞増殖抑制効果が, 一種の二律背反性とも言うべき細胞の機能発現, すなわち hCG, β -hCG 産生に密接な関係を有していると推測された。

SP-1 は, 絨毛性疾患の腫瘍マーカーとして近年临床上注目されているが, その意義についてはなお詳細は明らかでない, 現在, 临床上 SP-1 と LH との交叉反応¹²⁾がなく hCG の測定と合せると絨毛性疾患の管理上において非常に有用であると報告されている²⁰⁾²¹⁾²⁴⁾²⁵⁾。

hCG と同様に syncytiotrophoblast の細胞質内および細胞膜上に存在する SP-1 が MTX に対してどのような反応を示すかを細胞レベルで検討したが, RIA による SP-1 の測定感度域にも問題があり, 一定の見解は得られなかった。細胞当りの SP-1 産生は, 極めて微量で全培養期間中を通じて, 0~10ng/ml の範囲の変動しか観察されなかった。傾向としては, 細胞が full sheet になつてから測定されることが多く, 細胞数と相関するようである。このことは SP-1 が胎盤重量と正の相関を有するという報告⁵⁾に一致する結果とも考えられた。

MTX による一過性の産生亢進するものとして, hCG, β -hCG 以外では, Al-p が同様な活性増加を示すとされているが³⁾, SP-1 に関する報告はなく, 今回, 行なつた実験では, すくなくとも hCG, β -hCG に認められたような一過性の産生亢進は, SP-1 において観察されなかった。

文 献

1. 石塚直隆, 友田 豊, 青木考充, 水谷栄彦, 岡本

- 美枝：絨毛腫瘍における低単位 hCG の測定. 日産婦誌, 21: 593, 1969.
2. 加藤孝子, 石毛英男, 小林 法, 高見沢裕吉, 田中 昇, 時田尚志：薬剤低抗性絨毛癌継代マウスを用いた実験化学療法. 日産婦誌, 33: 2055, 1981.
 3. 蔵本博行, 浜野美恵子, 鈴木光明, 新井正夫, 渡辺慶一：絨毛癌に対する Methotrexate の所謂細胞効果の本態とその発現機構に関する研究. 日産婦誌, 34: 187, 1982.
 4. 牟禮一秀, 山下幸紀, 林 博章, 佐川 正, 石川睦男, 清水哲也：絨毛癌細胞株 (BeWo, GCH-2 SCH) の細胞増殖, hCG, β -hCG の分泌能について. 日臨細胞誌, 22, 2: 209, 1983.
 5. 西山幸男, 能勢義正, 山口博司, 二井 栄, 杉山陽一：妊婦血清および尿中の SP₁ (B₁-SP₁-glycoprotein), SP₃ (α_2 -AP-glycoprotein) および HPL の消長と胎盤機能に関する研究. 日産婦誌, 29: 593, 1977.
 6. 西谷 巖, 布川茂樹, 斉藤 怜, 石崎善昭, 山下幸紀：培養絨毛癌細胞の核機能と MTX の障害効果. 日産婦誌, 33: 1910, 1981.
 7. 大星章一, 清藤 勉, 吉田紘一, 下里幸雄, 小出勉, 佐野量造, 北岡久三：胃悪性絨毛上皮腫の組織培養. 日病会誌, 61: 1910, 1972.
 8. 田中憲一, 片野 彰, 清藤 勉, 大星章一：悪性絨毛上皮腫の異種移植と培養. 日本癌学会総会記事, 36: 486, 1977.
 9. 田中 温：酵素抗体法による正常および異常トロホプラストにおける hCG, hPL の局在とその細胞機能との関連に関する研究. 日産婦誌, 34: 579, 1982.
 10. Aidells, B.D. and Lee, A.E.: Transplanted cultured cell from pregnancy dependent mammary tumors have a heterogenous developmental potential. Int. J. Cancer, 23: 718, 1979.
 11. Bagshawe, K.D.: Recent observations related to the chemotherapy and immunology of gestational choriocarcinoma. Advan. Can. Res., 18: 231, 1973.
 12. Bohn, H.: New placental and pregnancy proteins as possible markers in oncology. Klin. Wochenschr., 58: 489, 1980.
 13. Fider, I.J.: Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. Cancer Res., 38: 2651, 1978.
 14. Hammond, C.B. and Parker, R.T.: Diagnosis and treatment of trophoblastic disease. Obstet. & Gynecol., 35: 132, 1970.
 15. Hertz, R., Lewis, J. and Lipsett, M.B.: Five year's experience with the chemotherapy of metastatic choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. Am. J. Obstet. & Gynecol., 82: 631, 1961.
 16. Hussa, R.O., Pattillo, R.A., Delfs, F.E. and Matting, R.F.: Actinomycin D stimulation of HCG production by human choriocarcinoma. Obstet. & Gynecol., 42: 651, 1973.
 17. Liebllich, J.M., Weintraub, B.D., Krauth, G.H., Kohler, P.O., Rabson, A.S. and Rosen, S.W.: Ectopic and eutopic secretion of chorionic gonadotropin and its subunits *in vitro*: Comparison of clonal strains from carcinomas of lung and placenta. Journal of the National Cancer Institute, 56: 911, 1976.
 18. Li, M.C., Hertz, R. and Spencer, D.B.: Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. Pro. Soc. Exper. Biol. Med., 93: 631, 1956.
 19. Pattillo, R.A. and George, G.O.: The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cell *in vitro*. Cancer Res., 28: 1231, 1968.
 20. Rutanen, E.M. and Seppälä, M.: Pregnancy specific β -1-glycoprotein in trophoblastic disease. J.C.E. & M., 50: 57, 1980.
 21. Seppälä, M., Rutanen, E.M., Heikinheimo, M., Jalpanko, H. and Engvall, E.: Detection of trophoblastic tumor activity by pregnancy specific β -1-glycoprotein. Int. J. Cancer, 21: 265, 1978.
 22. Skipper, H.T. and Schabel, F.M.: Quantitative and cytokinetics studies in experimental tumor models. Int. Cancer Medicine (eds. J.F. Holland, and E. Frei, III.), 629. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973.
 23. Speeg, K.V. Jr., Azizkhan, J.C. and Strombery, K.: The stimulation by methotrexate of human chorionic gonadotropin and placental alkaline phosphatase in cultured choriocarcinoma cells. Cancer Res., 36: 4570, 1976.
 24. Tatra, G., Breitenacker, G. and Gruber, W.: Serum concentration of pregnancy-specific β -1-glycoprotein (SP-1) in normal and pathologic pregnancies. Arch. Gynak., 217: 383, 1974.
 25. Timothy, J.O., Engvall, E., Schlacterth, J.B. and Morrow, C.P.: Trophoblastic disease monitoring: Evaluation of pregnancy-specific β -1-glycoprotein. Am. J. Obstet. & Gynecol., 138: 313, 1980.

(No. 5276 昭58・4・1受付)