

## テストステロンによるヒト乳ガン由来細胞 MCF-7 の 増殖抑制及び増殖促進

藤田 博<sup>\*</sup>, 小 縣 昭 夫<sup>\*</sup>

### Inhibition and Stimulation of Proliferation by Testosterone in Human Breast Cancer Cell MCF-7

Hiroshi FUJITA<sup>\*</sup> and Akio OGATA<sup>\*</sup>

**Keywords :** テストステロン testosterone, アンドロジェン androgen, MCF-7, 増殖 proliferation

近年, 様々な化学物質の内分泌かく乱作用による生体影響が懸念され, 化学物質がホルモン様作用を有するかどうかを検討する試験がいろいろ行われるようになってきた。それらの中にあつて, MCF-7 細胞の増殖性をマーカーにしたエストロゲン様作用の検出系は, 安定した検出系として利用され, いくつものエストロゲン様作用を示す化学物質を明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。この MCF-7 細胞は, ヒト乳ガン由来の細胞でエストロゲンと結合するエストロゲンレセプターを有しており, レセプターに化学物質が結合すると, 乳腺細胞の性質を反映して細胞増殖の促進が起こる。そこで, MCF-7 細胞の培養液中に化学物質を添加した後の細胞の増殖を見て, 増殖が促進された場合, エストロゲン様作用があると判断される。

性ホルモンには, 女性ホルモンのエストロゲンに対して男性ホルモンにはアンドロジェンがある。両者は基本構造は同じでありよく似た化学物質であるが, ホルモン作用としては相反するものであると一般的に理解されている。このアンドロジェンを MCF-7 培養系に添加した場合の細胞増殖を調べてみると細胞の増殖が促進される場合と抑制される場合があることが確認された。これまでの研究報告を検討してみると, アンドロジェンにはエストロゲン作用があると言われており<sup>3)</sup>, MCF-7 細胞が増殖することが報告されている<sup>2,4,5)</sup>。また, アンドロジェンには MCF-7 細胞の増殖を抑制するとの報告<sup>6)</sup>も有り, 増殖の抑制と促進は確認されている現象であった。しかし, これらの反応についての実験が様々な研究者によって行われているため実験条件が大きく異なっていたり, 増殖の抑制と促進の反応がどのようなレセプターを介して発現しているか, また細胞内で代謝された代謝物質が関与しているかなどの解釈が相反しているなど統一的になされていないため, 非常に複雑で理解しがたい状況であった。この MCF-7 細胞を用いてエストロゲン作用を検討するに当たり, アンドロジェン作用も有する化学物質があった場合, 結果の解釈が困

難であることが予想されることから, 今回アンドロジェンの代表的化学物質であるテストステロンに対する MCF-7 細胞の反応について検討することにした。テストステロンを MCF-7 細胞培養液に添加した場合に細胞増殖の抑制と促進が同一実験で観察できた。従つて, その反応がどのような作用によって発現しているかについても同一実験系で検討できたので報告する。

#### 実験材料及び方法

**試薬** Testosterone, 17 $\beta$ -estradiol, dihydrotestosterone, tamoxifen, 4-androsten-4-ol-3,17-dione, aminoglutethimide はシグマ製を用いた。その他 ICI 182,780 (TOCRIS), 2-hydroxyflutamide (LKT Labs), vinclozolin (和光純薬), glycyrrhetic acid (和光純薬), trisodium glycyrrhizinate (東京化成) を用いた。培地は, 通常継代用に Earle's MEM (GIBCO) に FBS (GIBCO) を 10% に添加 (以下継代培地と略す) し 7 日間で継代した。増殖試験には, フェノールレッド不含の DMEM (GIBCO) に 5% 4-16 時間で charcoal, dextran coated (シグマ) 処理した FBS を 5% 添加 (以下増殖試験用培地と略す) し用いた。試薬は trisodium glycyrrhizinate を除き DMSO (和光純薬, 生化学用) に溶解し, 細胞培養液での最終濃度 0.1% で用いた。trisodium glycyrrhizinate は, Dulbecco's PBS (GIBCO) に溶解し用いた。増殖した細胞数の計数にはテトラゾリウム塩 (WST-8) の還元による発色を利用した Cell Counting Kit-8 (和光純薬) を用いた。

**培養細胞** ヒト由来乳ガン細胞 MCF-7 は, ATCC より購入した。

**増殖試験** 基本的には Soto ら<sup>1)</sup>の方法を用いているが異なる点もあるので具体的に記載する。25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ (CORNING) に継代培地で継代している細胞を Dulbecco's PBS で洗い trypsin-EDTA (シグマ) で分離した。細胞を継代培地に懸濁し, 2 × 10<sup>4</sup>/well で 24 well プ

\* 東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Public Health Research Institute  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

レート (FALCON) に播種した。24 時間後に Dulbecco's PBS で洗い増殖試験用培地に交換, さらに試薬の DMSO 溶液を加えた増殖試験用培地を添加した。6 日後に細胞数を計数するため, 増殖試験用培地を取り除き, 細胞を Dulbecco's PBS で洗い trypsin-EDTA で分離, 継代用培地に細胞を浮遊させ, 一部を 96well プレート (FALCON) に 100  $\mu$ L 移した後, KIT-8 溶液を 10  $\mu$ L 添加。3 時間後に 450 nm で OD を測定することにより細胞数を求めた。なお 4-androsten-4-ol-3,17-dion, aminoglutethimide, glycyrrhethinic acid, trisodium glycyrrhizinaterythilretin acid のような酵素阻害剤においては, 作用が持続的であるか明らかでは無いため 4 日間連続で添加した。培地及び testosterone 溶液も 3 日目に交換した。結果の有意差検定は *t*-検定を用いた。

結 果

Testosterone を MCF-7 細胞に添加した場合の細胞増殖を図 1 に示した。MCF-7 細胞の増殖は, 比較的低濃度の  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M では 20% ほどの増殖の抑制が見られ,  $10^{-6}$  M 以上では増殖は促進され  $10^{-5}$  M で最高になり, それより高濃度では増殖は低下した。

これらの増殖の抑制及び促進がどのレセプターを介して誘導されているかを確認するため, エストロジェンの作用をエストロジェンレセプター (ER) に結合することにより抑制するエストロジェンアンタゴニストである ICI 182,780 及び tamoxifen, アンドロジェンの作用をアンドロジェンレセプター (AR) に結合することにより抑制するアンドロジェンアンタゴニストである 2-hydroxyflutamide, vinclozolin を添加する実験を増殖の抑制の見られた testosterone  $10^{-8}$  M において行った (図 2)。その結果, 2-hydroxyflutamide 及び vinclozolin では増殖の抑制が阻止されコントロールと同じ増殖を示した。

MCF-7 細胞の増殖が促進された比較的高濃度の

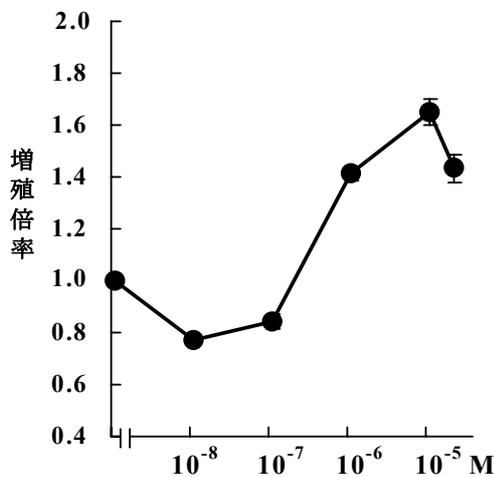


図1. テストステロンのMCF-7細胞の増殖に対する影響

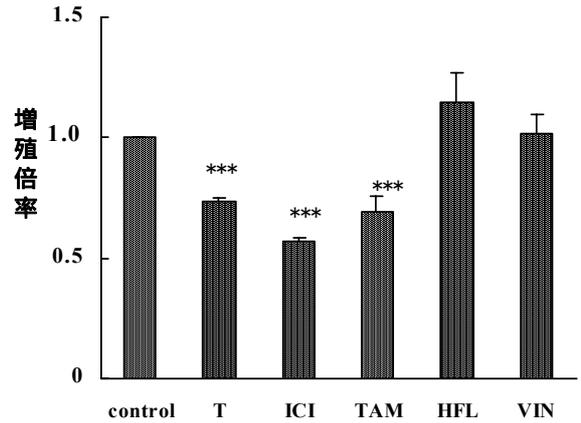


図2. MCF-7細胞のテストステロンによる増殖抑制に対するアンタゴニストの影響

T: testosterone  $10^{-8}$  M, ICI: T+ICI 182, 780  $10^{-8}$  M, TAM: T+tamoxifen  $10^{-6}$  M, HFL: T+2-hydroxyflutamide  $10^{-5}$  M, VIN: T+vinclozolin  $10^{-5}$  M.

\*\*\*: control と0.1%有意.

testosterone  $10^{-5}$  M においても同様に 4 種類のアンタゴニストを添加する実験を行った (図 3)。その結果, ICI 182,780 及び tamoxifen では細胞の増殖の促進が阻止されコントロール以下の増殖となった。この反応は  $17\beta$ -estradiol  $10^{-11}$  M での実験と全く同じ反応であった (図 3)。

Testosterone は, 生体中では様々な代謝を受けていると考えられているが大きな流れとして aromatase によって  $17\beta$ -estradiol に変化するか  $5\alpha$ -reductase によって dihydrotestosterone に転換される。これらの代謝の影響を確認するため aromatase の阻害剤であると言われている

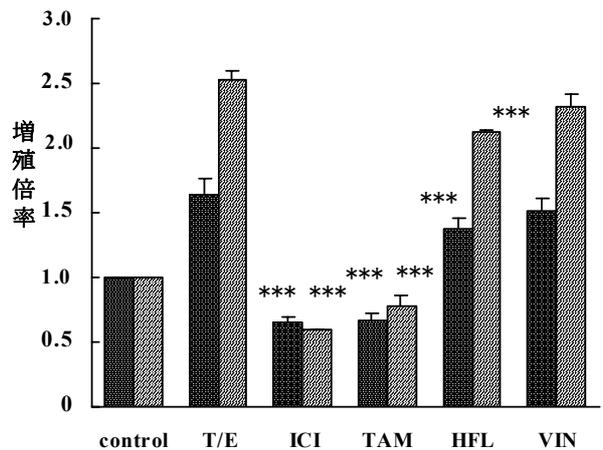


図3. MCF-7細胞のテストステロン及び $17\beta$ -estradiol による増殖促進に対するアンタゴニストの影響

■ T: testosterone  $10^{-5}$  M, ▨ E:  $17\beta$ -estradiol  $10^{-11}$  M, ICI: T/E+ICI 182, 780  $10^{-8}$  M, TAM: T/E+tamoxifen  $10^{-6}$  M, HFL: T/E+2-hydroxyflutamide  $10^{-5}$  M, VIN: T/E+vinclozolin  $10^{-5}$  M.

\*\*\*: testosterone または $17\beta$ -estradiol と0.1%有意

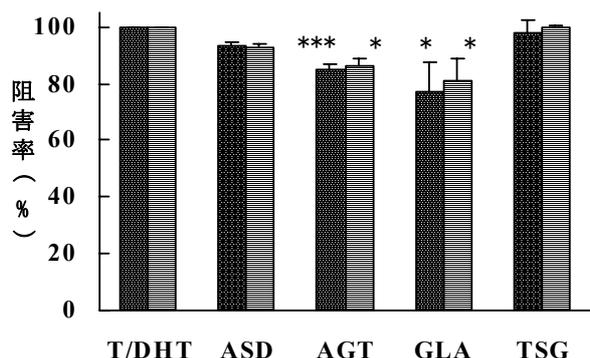


図4. MCF-7細胞のテストステロン及びジヒドロテストステロンによる増殖促進に対するアロマトラーゼ及び5 $\alpha$ -リダクターゼ阻害剤の影響

■ T: testosterone 10<sup>-5</sup>M, ▨ DHT: Dihydrotestosterone 10<sup>-6</sup>M, ASD: T/DHT+4-androsten-4-ol-3,17-dion 10<sup>-6</sup>M, AGT: T/DHT+aminoglutethimide 10<sup>-5</sup>M, GLA: T/DHT+glycyrrhetic acid 10<sup>-5</sup>M, TSG: T/DHT+trisodium glycyrrhizinate 10<sup>-5</sup>M. 阻害剤は4日間添加. \*\*\*: testosterone または dihydrotestosterone と0.1%有意, \*: 5%有意.

4-androsten-4-ol-3,17-dion 及び aminoglutethimide, 5 $\alpha$ -reductase の阻害剤であると言われている glycyrrhetic acid, trisodium glycyrrhizinate を添加する実験を行った (図4). その結果, 4-androsten-4-ol-3,17-dion, aminoglutethimide 及び glycyrrhetic acid で細胞増殖がやや抑制された. 比較のためにこれらの酵素の影響は受けない dihydrotestosterone でも同様な実験を試みたところ 4-androsten-4-ol-3,17-dion, aminoglutethimide 及び glycyrrhetic acid で細胞増殖がやや抑制され testosterone に見られた反応と全く同様の結果となった (図4).

#### 考 察

Testosterone は, 代表的アンドロジェンであり, 乳ガン由来細胞である MCF-7 の培養液に添加した場合, 細胞増殖の抑制と促進の両方が見られた. MCF-7 細胞に対する testosterone の影響は, いくつかの報告の中で増殖の抑制<sup>6)</sup>と促進<sup>2,7)</sup>が見られ, また DNA 合成の増加から細胞増殖の促進が起こるとしている報告<sup>8,9)</sup>もある. 今回の結果を単純に増殖の抑制と促進という点だけでとらえるとこれまでの報告に見られた結果と同じであった. しかし, これらの報告では培養条件が大きく異なったり<sup>6,7)</sup>, MCF-7 細胞以外の乳ガン由来細胞の反応と比較<sup>6,9)</sup>されたりしたため, 作用の経路を含め抑制と促進は相反する実験結果ととらえられる傾向があり, 解釈を困難にしていると思われた. ところが今回の testosterone に対する MCF-7 細胞の反応では, 抑制と促進が同時に観察され, その反応の違いは, 用いている testosterone の濃度による違いであった. すなわち, どちらかという生理的濃度である 10<sup>-8</sup> M 程度の場合には, 増殖の抑制であり, 生体中ではおそらくあり得ない高

濃度の 10<sup>-5</sup> M では増殖は促進された. このように増殖の抑制と促進という反応の違いは, アンドロジェン濃度が重要である点が明らかになった.

なお, この細胞増殖の促進は, MCF-7 細胞を用いた検出系としてはエストロジェン様作用が検出されたと判断され, testosterone は, エストロジェン様作用を有していることになると思われる. testosterone は, アンドロジェンであり, エストロジェン様作用があるのは矛盾するように思われるが, 多くの実験事実としてアンドロジェンにエストロジェン様作用があることは認められている<sup>3)</sup>.

増殖の抑制と促進が濃度の違いである事が明らかになったが, これらの違いがどのようなレセプターを介して発現しているかについて4種類のアンタゴニストを用いて検討した. その結果, 低濃度の増殖の抑制ではアンドロジェンアンタゴニストである 2-hydroxyflutamide 及び vinclozolin によって増殖の抑制が阻害されたことから AR を介して反応していることが明らかとなった. また高濃度の増殖の促進は, エストロジェンアンタゴニストである ICI 182,780 及び tamoxifen によって増殖の促進が阻害されたことから ER を介して反応している事が明らかとなった.

増殖の抑制と促進がどのレセプターを介しているかについては, testosterone による増殖の抑制が AR は発現しているが ER は発現していない乳ガン由来細胞でも MCF-7 細胞と同様に起こることから AR を介している<sup>6)</sup>と報告されており, 今回のアンドロジェンアンタゴニストの添加により抑制が阻害された反応により確認された. また増殖の促進に関しては, testosterone による DNA 合成の促進が tamoxifen により抑制される<sup>8)</sup>ことから ER を介していると解釈され, 今回の細胞増殖の促進においても同様の結果であった.

Testosterone による MCF-7 細胞の増殖促進は, ER を介していると考えられるが, testosterone は, 生体中で様々な代謝を受けるため, testosterone が直接 ER に作用しているのか代謝物が作用しているのかを明らかにしなければならぬ. testosterone の代謝は, 大きな流れとして aromatase によって 17 $\beta$ -estradiol に変化するか, 5 $\alpha$ -reductase によって dihydrotestosterone に転換される<sup>3,10)</sup>. 特に 17 $\beta$ -estradiol は, 最も強力なエストロジェンであることから, testosterone から 17 $\beta$ -estradiol が生成すれば, 明らかに ER を介して細胞の増殖を促進する. また MCF-7 細胞には 5 $\alpha$ -reductase が存在し, dihydrotestosterone が生産されると報告<sup>12)</sup>されており, dihydrotestosterone には MCF-7 細胞の増殖促進の報告<sup>4,5)</sup>がある. われわれは dihydrotestosterone による ER を介した MCF-7 細胞の増殖促進を確認している. そこで, testosterone による増殖促進が, 代謝を受けて生成した 17 $\beta$ -estradiol または dihydrotestosterone によって引き起こされたかどうかを確認するため, 両酵素の阻害剤を添加した場合 testosterone の増殖促進が変化するかどうかを検討した. 酵素の阻害剤

が効果を示す濃度は in vitro の阻害実験<sup>8)</sup>を参考にしたが、阻害剤単独でやや細胞増殖の抑制が起こり (aminoglutethimide 及び glycyrrhithinic acid), 阻害効果の判断が難しいため、これらの酵素の作用を受けない dihydrotestosterone と比較する実験を試みた。その結果、4-androsten-4-ol-3,17-dion, aminoglutethimide 及び glycyrrhithinic acid では testosterone の増殖促進が阻害されたが dihydrotestosterone でも全く同様な阻害が見られ、この増殖促進の阻害が testosterone に特異的な代謝の阻害ではなく、阻害剤単独で見られた増殖の抑制効果によるものと判断された。この増殖の抑制反応の機構は、現在明らかではないが、一般的な細胞毒性と解釈している。以上の結果より testosterone に見られた  $10^{-6}$  M での細胞増殖の促進は、 $17\beta$ -estradiol または dihydrotestosterone が生成したのではなく、testosterone そのものにより発現していると推察された。

しかし、これまでの報告では aromatase による代謝説<sup>2,7)</sup>が有力であり、MCF-7 細胞に aromatase が存在することも報告<sup>11)</sup>されている。一方存在していないとする報告<sup>12)</sup>もある。また福岡ら<sup>8)</sup>は、testosterone  $10^{-8}$  M での増殖促進では aromatase 阻害剤の aminoglutethimide により MCF-7 の増殖促進が抑制され aromatase の関与を示唆しているが、 $10^{-6}$  M の高濃度では aromatase 阻害剤の効果は見られず、testosterone が直接作用している可能性も示唆している。testosterone は、ER にはほとんど結合しないと報告<sup>2)</sup>されているが、ある程度結合するとの報告<sup>3,13)</sup>もあり、aromatase が関与せずに testosterone がそのまま作用した細胞増殖の促進の可能性はあるものと考えられる。

このように testosterone の MCF-7 細胞の増殖の促進及び抑制の機構に関しては、まだ未解明の点が多い様であるが、今回の結果は、比較的低濃度の生理的濃度では、本来の結合部位である AR を介して細胞の増殖を抑制し、おそらく生体中では異常な高濃度では作用物質は未だ明確ではないが ER を介して細胞の増殖を促進していることが明確になった。

従って、MCF-7 細胞を用いてホルモン様作用を検討する場合、ER と AR の両方に結合可能な試験化合物では、両レセプターへの結合性の違いによって反応が試験濃度により変化する可能性があることに注意が必要であると考えら

れる。

#### ま と め

ヒト乳ガン由来細胞の MCF-7 に testosterone を作用させると、細胞の増殖の抑制と促進が見られた。 $10^{-8}$  M 程度の低濃度では増殖は抑制され、 $10^{-5}$  M 程度の高濃度では増殖は促進された。増殖の抑制はアンドロジェンレセプターを介して発現し、増殖の促進はエストロジェンレセプターを介して発現していると考えられた。

#### 文 献

- 1) Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., et al. : *Environmental Health Perspectives*, **103**(Suppl 7), 113-122, 1995.
- 2) Andersen, H. R., Andersen, A-M., Arnold, S., et al. : *Environmental Health Perspectives*, **107**(Suppl 1), 89-108, 1999.
- 3) Rochefort, H. and Garcia, M. : *Pharmacol. Ther.*, **23**, 193-216, 1984.
- 4) Hackenberg, R., Hofmann, J., Holzel, F., et al. : *J Cancer Res. Clin. Oncol.*, **114**, 593-601, 1988.
- 5) Birrell, S. N., Bentel, J. M., Hickey T. E., et al. : *J Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **52**, 459-467, 1995.
- 6) Ortmann, J., Prifti, S., Bohlmann, M. K., et al. : *Gynecol. Endocrinol.*, **16**, 113-120, 2002.
- 7) Kudoh, M., Susaki, Y., Ideyama, Y., et al. : *J Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **58**, 189-194, 1996.
- 8) 福岡正晃, 北脇 城, 山本 宝, 他 : 日本産科婦人科学会雑誌, **43**, 1667-1673, 1991.
- 9) Tada, A., Sasaki, H., Nakamura, J., et al. : *J Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **44**, 661-666, 1993.
- 10) Theriault, C. and Labrie, F. : *J Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **38**, 155-164, 1991.
- 11) MacIndoe, J. H. : *J Clin. Endocrinol. Metab.*, **49**, 272-277, 1979.
- 12) Jorgensen, L., Brunner, N., Spang-Thomsen, M., et al. : *J Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **63**, 275-281, 1997.
- 13) Zava, D. T. and McGuire W. L. : *Endocrinology*, **103**, 624-631, 1978.