乳癌に対する prolactin の意義に関する研究

第 2 編

マウス男性ホルモン依存性乳癌と prolactin について
(この論文の要旨は第48回中国・四国外科学会において報告した)

岡山大学医学部第1外科教室(主任:田中早苗教授)

岩 藤 真 治

[昭和50年11月4日受稿]

第1章 緒 言

下垂体前葉より分泌される prolactin は乳腺发育、乳汁分泌などに重要なホルモンとして知られている。この prolactin はマウス、ラットなど実験動物における乳癌の発生に関与し、prolactin が欠除している場合は estrogen や発癌剤を投与しても乳癌の発生がみられないことが明らかになり、乳癌と最も関連の深い重要ホルモンと考えられるようになった^{1,2}。最近 Disc 電気泳動や Radioimmunoassay の開発により prolactin に関するいくつかの新しい知見がえられているが、私は男性ホルモン依存性乳癌として知られているシオノギ carcinoma を用い、その担癌マウスの脳下垂体中に含有される prolactin を Disc 電気泳動により定量し、非担癌マウスと比較検討した。また prolactin 投与による腫瘍組織のホルモン依存性の変化についても検討を行った。

第2章 実験方法

1. 実験動物

DS line 1-2 はシオノギ研究所 Aburabi farm で継代維持されたものを用いた。シオノギ carcinoma-115 は、同一母体から生まれた雄雌の交配により生まれた雄にのみ移植可能な乳癌で、男性ホルモン依存性乳癌として知られている^{3,4,5}。このマウスを繁殖飼育して生まれた雄マウス(生後35~40日、体重約20g)にシオノギ研究所より分与をうけたシオノギ carcinoma-115 の腫瘍を背部皮下に移植した。また、ホルモン非依存性癌シオノギ carcinoma-42 を同様にして腫瘍対照として用いた。

移植方法は腫瘍を無菌的に摘出し、生理食塩水の中で細切したのちガーゼで露過し、生理食塩水と共に背部皮下に移植する。約2週間経過すると腫瘍はほぼ示指頭大となる。

2. prolactin あるいは testosterone の投与

腫瘍移植後10日目より prolactin 2mg/day, testosterone 100mg/day を隔日に6回皮下注射し prolactin あるいは testosterone の投与によって腫瘍がどのような影響を受けるかということを、各グループ5例づつについて観察した。また、腫瘍移植後14日目に testosterone propionate 100 μ g 皮下注射し、30分後 32 P 10 μ ci を腹腔内に注入す。prolactin 2 μ g 皮下注射後30分 32 P を同様に投与する。 32 P 投与後1時間で腫瘍を摘出し、対照群は生食投与後同様に処置した。対照群と比較した腫瘍におよぼすホルモンの影響をしらべた。すなわち、各腫瘍1g をホモジネートし、核酸抽出を行ってえた抽出液の cpm を計測した。

3. 下垂体摘出

腫瘍移植後4週を経過したシオノギ carcinoma-115 と対照のマウス各10匹を12時間絶食後、エーテ麻酔下で開頭し下垂体を摘出し、生理食塩水に保存し、湿重量にて各10匹の下垂体重量を計測した後ホモジネートした。

4. ディスク電気泳動⁶

(1) 装置

ミツミ科学産業株式会社より市販されているディスク電気泳動装置を使用した。泳動用ガラス管は5 $\times$ 80mm のものを用いた。

(2) 試薬

- 1) acrylamide (生化学工業)
- 2) N, N'-methylenebis-acrylamide (B. I. S.) (和光純薬)
- 3) N, N, N', N'-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) (東京化成工業)
- 4) 2-amino-2-hydroxymethyl (TRIS) (和光純薬)
- 5) riboflavin (和光純薬)
- 6) 1 N hydrochloric acid (和光純薬)
- 7) ammonium persulfate (和光純薬)

- 8) glycine (和光純薬)
 9) gracial acetic acid (石津製薬)
 10) Amido Schwarz 10 B (第一化学薬品)
 11) Brom Phenol Blue (B. P. B.) (石津製薬)

(3) 試薬の調合

A溶液: 1 N HCl 48ml, Tris 36.6g, TEMED 0.23ml

Ad. aqua 100ml (pH 8.9)

B溶液: 1 N HCl 48ml, Tris 5.99g, TEMED 0.46ml

Ad. aqua 100ml (pH 6.7)

C溶液: acrylamide 40g, BIS 0.8g

Ad. aqua 100ml

D溶液: acrylamide 10g BIS 2.5g

Ad. aqua 100ml

E溶液: riboflavin 4mg, water 100ml

F溶液: Tris 6.0g, glycine 28.8g,

Ad. aqua 10l (pH 8.3)

各液は蒸留水を用いて調製し、透明な液がえられなければ濾過し、かっ色びんに入れて冷蔵庫に保存する。

(4) 分離用ゲル溶液

a溶液: A溶液 1容, C溶液 2容,
水 1容

b溶液: ammonium persulfate 0.14g/100mg
water

分離用ゲルの調製

ガラス管をゴム栓つきのガラス管立てに垂直に立て、分離用ゲル溶液 a および b をポリエチレンチューブを用いて等量づつ注射器に吸取りよく混合し、脱気後ガラス管内に静かに注ぐ。ガラス管 1 本あたり約 1 ml を要する。酸素との接触は重合を阻害するから溶液の上面に蒸留水を約 2 mm 加えて空気との接触を防ぎ、蛍光灯下にて光重合を行い、約 40 分にて完了する。これで 10% の acrylamide の分離用ゲルが出来る。

試料用、濃縮用ゲル溶液: B溶液 1容,

D溶液 2容, E溶液 1容, 水 4容

(5) 濃縮用ゲルの調製

分離用ゲルの重合が完了後ガラス管内の水を捨て少量の濃縮用ゲル溶液で洗う。分離用ゲルの上に静かに約 0.13 ml の濃縮用ゲル溶液を加え上面を水で覆う。蛍光灯下で光重合を行い約 15 分で完了する。

(6) 試料用のゲル調製

移植後 4 週間経過したシオノギ carcinoma-115 と

対照マウスの下垂体を湿重量 1 mg につき、0.05 M phosphate buffer 0.02 ml にて homogenize する。この下垂体 homogenate 0.025 ml (下垂体湿重量にして約 1 mg を含む) と試料用ゲル溶液 0.1 ml をよく混ぜ濃縮用ゲルの上部にのせる。蛍光灯下で光重合を行い約 20 分で完了する。

(7) 電気泳動

ガラス管は試料用ゲルが上端になるように立て、上部電極槽の底に取り付けたゴム栓の穴に垂直に差し込む。上下両電極槽に F 溶液を入れ、ガラス管の上下両端の気泡を除いて泳動を開始する。電極は上を陰極とする。上部 F 溶液 100 ml あたり 0.001% の B. P. B. 0.5 ml を加えると泳動中の leading ion の位置を容易に追跡出来る。ガラス管 1 本あたり 2 ~ 5 mA の電流が適当で約 60 分で泳動は完了する。

(8) 分離用ゲルの染色および脱染色

泳動終了後ガラス管を取りはずし、水を満たした水槽中にゲルを取り出し、Amido Schwarz 10 B 1 g を 7% acetic acid 100 ml に溶解した染色液に浸し 60 分放置する。

ついで、染色したゲルを脱染色用試験管に移し、7% acetic acid を満たし 60 分脱色する。これを約 10 回位行くと脱色される。

(9) 泳動物質の固定および定量

10% の acrylamide の分離用ゲル上にて下垂体 extract は陰極より growth hormone, albumin, prolactin の順に band で分離される。

100 μ g を 10% acrylamide の分離用ゲルに同様に泳動し prolactin の band の部位を同定した。富士理研株式会社製の自記濃度記録計 (吸光度 0 ~ 4.0) で分離用ゲルに染色された growth hormone, albumin, prolactin の各 band の積分値を数字で読み取り総合計を 100% とし各々の % を算出した。

5. ホルモン依存性の検討

腫瘍のホルモン依存性については第 1 編に記した。山本の方法に従って行った⁷⁾。

第 3 章 実験成績

1. マウス体重と腫瘍の変化

各群の体重増加曲線を図 1 に示したが、prolactin 投与群に最も大きな変化がみられ、腫瘍無処置群、testosterone 投与群は体重の変動が大きくない。腫瘍の最大径をしるしたもので、腫瘍無処置群に比して testosterone, prolactin 投与群は腫瘍増大速度が早く、体重増加の大部分を腫瘍がしめているのがわかる。

2. 下垂体重量の変化

シオノギ carcinoma-115 10匹の下垂体は41mg (平均4.1mg), 対照10匹の下垂体は25mg (平均2.5mg) で腫瘍移植14日目の下垂体は明らかに担癌マウスの方が大きくなっている。

シオノギ carcinoma-115は男性ホルモン依存性といわれているが, 14日目の睪丸重量は平均81~95mg / 1個で担癌マウス, 対照マウスとも変化はみられなかった (表1)。

表1 担癌マウスの脳下垂体重量

	体 重	脳下垂体	睪 丸
対 照	29.8gr	2.5mg	180mg
SC-115	32.4	4.1	172
SC-42	33.0	2.9	169

SC: シオノギ carcinoma 10mice average

表2 SC-115におよぼすホルモン投与の影響

対 照	3,429cpm/1g tumor extract
	5,058
	4,008
prolactin 投与	20,576
	30,858
	23,247
testosterone 投与	22,290
	33,387
	26,854

prolactin 2 μ g/mouse, testosterone 100 μ g/mouse
皮下注射30分後 32 P投与, 30分後腫瘍摘出

電気泳動によりえられる band は写真 (図2) のごとくである。シオノギ carcinoma-115移植群と正常対照群の下垂体抽出物の泳動結果を図示したが, これをデンストメトリーにて%に示したものが表3である。growth hormone, albumin, prolactin の順

図1 ホルモン投与による体重, 腫瘍径の変動

3. 腫瘍におよぼすホルモンの影響

対照群に比し prolactin 投与群は約 6 倍, testosterone 投与群は, 6.5 倍の 32 P-uptake を示している (表2)。

4. 下垂体中の prolactin 量

になっている。対照群では prolactin 8.4%, シオノギ carcinoma-42 12.1% と差がなく, シオノギ carcinoma-115 では 30.2% と約 4 倍増加しているが, growth hormone は対照群 71.6%, シオノギ carcinoma-42 65.7%, シオノギ carcinoma-115 32.6%

なっている. prolactin と growth hormone と比
てみると対照群では growth hormone は prol-
actin の約 9 倍であるが, シオノギ carcinoma-115
は両者はほぼ同量である. しかしながら, testos-
terone 投与, prolactin 投与による変化は比較的少
く, 腫瘍の存在するか否かによる変化のようであ

rolactin, testosterone を腫瘍移植と同時に投
与すると, 腫瘍は対照よりも急速な増殖を示すこと
は大きさに示したが, 図 3 はホルモン投与による
prolactin および testosterone に対する組織ホルモ
ン依存性の変化を示したものである. prolactin を投
与された腫瘍は14日後には prolactin と共に incub-
ate しても 32 P-uptake は対照群よりも低くなり, ま

図2 Pituitary Hormones in Mice

図3. ホルモン依存性の変動
prolactin 投与群

		依存ホルモン	
		prolactin	testosterone
投 与 前		↑	↑
prolactin 投与後		↓	(-)
1 回 目 移 植 腫 瘍		↑ or (-)	↑ or (-)
2 回 目 移 植 腫 瘍		↑	↑

		testosterone 投与群	
		prolactin	testosterone
投 与 前		↑	↑
testosterone 投与後		↑	↓
1 回 目 移 植 腫 瘍		↑	↓
2 回 目 移 植 腫 瘍		↑	↑

↑: dependent
↓: sensitive
(-): independent

・ ホルモン依存性の変化

た testosterone と incubate しても 32 P-uptake は影
響を受けない. すなわち, 一見, ホルモン非依存性
腫瘍のような反応がみられる. この腫瘍を次代に移
植すると初代腫瘍でみられた 32 P-uptake を示すもの
が 2/3にみられ, 1/3は非依存性の態度を示してい
る. そのような腫瘍も次の代には初代と同じような
反応を示す腫瘍となる.

考 案

シオノギ carcinoma-115は男性ホルモン依存性乳
癌として知られているが, 組織ホルモン依存性をみ
ると, 男性ホルモンだけでなく prolactin にも強い
依存性をもつことがわかった. シオノギ carcinom-
a-115 マウスに prolactin, testosterone を投与後
 32 P を注射し, 腫瘍への 32 P-uptake をみると, pro-
lactin, testosterone とも対照の約 5~8 倍の upt-
ake を示しており, このことから, シオノギ car-

表 3. マウス下垂体内の GH, Prolactin GH

	正常マウス	SC-115
対 照	71.6% 65.7 78.3	32.6% 34.9 41.5
prolactin 投与群	65.3 64.8 72.2	39.2 42.3 42.6
testosterone 投与群	72.1 65.4 69.5	38.5 41.4 40.2

	正常マウス	SC-115
対 照	8.4% 9.2 8.6	30.2% 31.3 31.5
prolactin 投与群	9.7 10.1 9.3	35.6 34.5 35.1
testosterone 投与群	10.5 9.6 9.4	32.3 33.7 34.9

Disc electrophoresis of 5 pituitary extract.

cinoma-115 が両ホルモンに依存性をもつことがうかがわれた。この研究で用いたマウスは、すべて雄であるため prolactin 分泌量は低いものと考えられる。下垂体内の prolactin 保有量は移植癌の発育期に高くなることが観察されたが、このことは癌の発育に伴って下垂体で prolactin が産生分泌され、癌の発育に関与していることを示唆している。血中、prolactin 量は prolactin inhibiting substance が存在しない限り、下垂体内の prolactin 量とはほぼ平衡になるものとされていることや^{8,9} prolactin releasing factor 投与により血中 prolactin の増加に伴い下垂体中の保有量も上昇するという報告などより、癌の発育に対して prolactin が直接関与するものと考えられる¹⁰。

DMBA 乳癌に対する prolactin の役割について長沢は多くの文献的考察と共に、estrogen と prolactin の関係について述べている^{11,12}。Ergocornine は prolactin 分泌を抑制し発癌を抑制¹³。Mückter らは prolactin suppressor で同じく発癌が低下すると報告し、Welch らは reserpin 投与で DMBA 乳癌が増加したと報告している^{14,15}。Pearson らは DMBA

ラットに adrenalectomy, hypophysectomy を行いその後 estradiol, prolactin など投与して腫瘍の増殖を認めている¹⁶。また, perphenazine を投与すると DMBA 投与後の発癌率が高く、腫瘍も大きく、5～10倍となるという報告など¹⁷、prolactin 分泌を亢進させることはマウス、ラットなどの発癌、癌の増殖に直接影響を与えるものと考えられる。ただ DMBA 乳癌は女性ホルモン依存性乳癌であり、estrogen と prolactin の分泌はほぼ平衡な関係にあることも、これらの結果を容易に理解しやすくするものであるが、この研究で用いたシオノギ carcinoma-115 は雄マウスで男性ホルモン依存性乳癌であり、これに、prolactin が女性ホルモン依存癌と同様の影響を与える結果を示すことは興味深い。

シオノギ carcinoma-115 移植後、testosterone を隔日に投与すると対照群に比し、腫瘍が著明な増加を示すのは、男性ホルモン依存癌の性質上当然のことであるが、prolactin を隔日に投与すると testosterone 以上に腫瘍の増殖が観察されることは興味深く、prolactin に依存することを示している。これらのマウスは雄であるため、estrogen が関与して、prolactin の作用機序を高めるとは考え難く、むしろ男性ホルモンが prolactin の作用機序を高めるのではなからうかと想像させる。表 2 に示したように prolactin, testosterone 投与により対照群よりも 6 倍の ³²P-uptake がみられており、prolactin, testosterone に依存性を示すことは明らかである。また、移植癌が testosterone, prolactin の投与により増殖してくると、依存性よりもむしろ感受性を示す現象がみられるが、これは feed back による反応か、あるいは薬物に対する免疫反応なのかは不明で prolactin, testosterone とともに 2 代目、3 代目にはその性質が元に戻ってくることから、この反応は feed back および免疫性因子の両者が共存しているように思われる。すなわち、prolactin によって増殖した腫瘍は次第に prolactin により ³²P-uptake は抑制され、testosterone によりのみ依存を示すようになり、また testosterone によって増殖した腫瘍は、prolactin によりのみ依存する傾向を示している。この腫瘍は同系のマウスに移植可能であるので、免疫性因子としては endogenous な testosterone や prolactin ではなく、exogenous なものに対してのみ反応することが想像されるが、癌移植第 2 代マウスに prolactin, testosterone を投与すると腫瘍の発育が対照よりも悪く、移植癌が発育しないものが 1/3 に観察

ざれたことは興味深い。このことは、prolactin が異種のものであるためか、否か不明であり、また steroid binding protein が関与するものか想像の域を出ない。

growth hormone については詳細に検索を行っていないが、乳腺の発育、発癌、癌増殖などに何らかの形で関与することが知られているが、表 3 の結果は正常群に比し、腫瘍群は低値であり、また testosterone, prolactin 投与によっても変化がみられない。このことは、growth hormone はシオノギ carcinoma-115 に対して特異性をもたず、腫瘍増殖的には作用しないことを示唆している。

結 論

わたくしはシオノギ carcinoma-115 を用いて下垂体 prolactin の定量を行い、あわせて testosterone

との関連性について依存性の面より検索し次の結果をえた。

1. シオノギ carcinoma-115 は prolactin, testosterone に依存性をもつ癌で、この 2 つのホルモンによって増殖する。
2. 下垂体中の prolactin 量は腫瘍増殖期に増加する。
3. prolactin, testosterone を投与して腫瘍を増殖させると、腫瘍のホルモン依存性は消失するが、次代・次々代には元の依存性にかえる。
4. growth hormone は腫瘍の増殖に直接関与せず、間接に働くようである。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った、田中早苗教授、山本泰久講師に深謝する。

文 献

- 1) Welsch, C. W., and Meites, J., *Cancer*, **23**: 601, 1969.
- 2) Meites, J., Lu, K. H., Wuttke, W., Welsch, C. W., Hasegawa, H., and Quadri, S. K., *Recent Prog. Hormone Res.*, **28**: 471, 1972.
- 3) Minesita, T., and Yamaguchi, K., *Steroids*, **4**: 815, 1964.
- 4) Minesita, T., Yamaguchi, K., Yahara, I., and Matsumoto, K., *Steroids*, **15**: 751, 1970.
- 5) Minesita, T., and Yamaguchi, K., *Cancer Res.*, **25**: 1168, 1965.
- 6) 永井 裕 蛋白質・核酸・酵素 **11**: 744, 1966
- 7) Yamamoto, Y., *Gann*, **60**: 23, 1969
- 8) Meites, J., Hopkins, T. F., and Talwalker, P. K., *Endocrinol.*, **73**: 261, 1963.
- 9) Meites, J., Cassell, E., and Clark, J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**: 1225, 1971.
- 10) Meites, J., and Kragt, C. L., *Endocrinol.* **75**: 565, 1964
- 11) 長澤 弘 ホルモンと臨床 **19**: 625, 1971.
- 12) 長澤 弘 ホルモンと臨床 **19**: 707, 1971.
- 13) Yanai, R., and Nagasawa, H., *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**: 1105, 1970.
- 14) Mückter, H., Frankus, E., and More, E., *Cancer Res.*, **29**: 1212, 1969.
- 15) Mückter, H., Frankus, E., and More, E., *Cancer Res.*, **30**: 430, 1970.
- 16) Pearson, H. G., Otto Llerena, Luis Llerena, Alberto Molina and Thomas Butler, *Trans. Assoc. Am. Physicians*, **82**: 225, 1969.
- 17) Dannon, A., Dikstein, S., and Sulman, F. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**: 366, 1963
- 18) Yanai, R., and Nagasawa, H., *Gann*, **59**: 543, 1968

The role of prolactin on breast cancer

Part 2. The role of prolactin on Shionogi carcinoma-115

by

Masaharu IWADO

Department of Surgery, Okayama University Medical School

Prolactin concentration of hypophysis of transplantable testosterone dependent tumor, Shionogi carcinoma-115, was studied by disc electrophoresis. Prolactin in hypophysis of Shionogi carcinoma-115 was high concentration than the control mice. The hormonal dependency was altered by administration of prolactin and testosterone, and recovered the dependency in 2nd or 3rd tumor transplantation.