ヒト前立腺癌細胞 LNCap の軟寒天培養に おける増殖と各種因子の影響 —自己分泌増殖についての検討—

横浜市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 穂坂正彦教授)

原 芳 紀

ANALYSIS OF ANCHORAGE INDEPENDENT GROWTH OF HUMAN PROSTATE CANCER CELL LINE LNCAP

Yoshinori Hara

Department of Urology, School of Medicine, Yokohama City University, Kanagawa Japan
(Director: Prof. Masahiko Hosaka)

LNCap, a human prostate cancer cell line, possess androgen dependent growth characteristics. We studied anchorage independent proliferation of LNCap cells using semi-solid agarose double layer culture.

The cells formed colonies in the semi-solid medium supplemented with charcoal filtered steroid free fetal calf serum and maximal colony formation was obtained in the medium with 10% serum. The addition of several steroids (testosterone, dihydrotestosterone, etinyloestradiol) influenced the colony formation. Testosterone at the concentration of 10^{-8} M to 10^{-10} M stimulated colony formation with optiman of 10^{-9} M.

When LNCap cells were placed under the basal layer of the semi-solid culture as feeder cells, also stimulated was the colony formation of the LNCap cells cultured in upper layer of semi-solid medium.

The addition of EGF, TGF α and TGF β to the medium also stimulated the colony formation. The combined effect of EGF and TGF α was shown to be cooperative with testosterone. TGF β , however, did not show such cooperative effect with testosterone on colony formation. The addition of the anti-body to EGF, TGF α or TGF β to the medium decreased the colony formation of LNCap cells.

These results suggest that LNCap cells excrete EGF, TGF α , TGF β and/or similar substances and these factors autocrinely decorate the cell proliferation of LNCap human prostate cancer cells.

Key words: LNCap, growth factor, semi-solid agarose culture

要旨: ヒト前立腺癌細胞培養株 LNCap 細胞の 2 層軟寒天培地におけるコロニー形成と、それに及ぼす各種因子の検討を行った。LNCap 細胞のコロニー形成はステロイド除去牛胎児血清を使用すると、その濃度 0~10% の範囲では濃度の上昇と共に促進され、テストステロン, dihydrotestosterone (DHT), etinyloestradiol (EE₂) の添加により促進された。LNCap 細胞自身を feeder 細胞として軟寒天培地最下層に静置すると、上層培養層 LNCap 細胞のコロニー形成は促進され、EGF, TGF α , TGF β の各種増殖因子の添加でもコロニー形成は促進された。EGF 及び TGF α の添加では、テストステロンとの併用でその効果は増強したが、TGF β では併用効果は見られなかった。また抗 EGF 抗体、抗 TGF α 抗体、抗 TGF β 抗体の添加によりコロニー形成は抑制された。

これらより andrgen 刺激により EGF, TGF α が、また androgen との関連性は不明であるが TGF β や、それらの類似物質が autocrine に分泌され、LNCap 細胞の増殖促進に関与する可能性があると思われる。

キーワード: LNCap 細胞, 細胞増殖因子, 軟寒天培養

緒 言

前立腺癌はアンドロゲン依存性増殖能を有するため、抗アンドロゲン剤やエストロゲン剤を使用した内分泌療法が有効であることが多い。しかし内分泌療法不応症例や再燃癌出現の問題があるなど予後は必ずしも良くないのが現状であり、前立腺癌増殖メカニズムの解明と治療法の改良は急務である。Horoszwicz ら¹⁾は、ヒト前立腺癌リンパ節転移細胞の培養と継代に成功し、LNCap 細胞と命名した。この細胞はアンドロゲン依存性の増殖能を持つので、前立腺癌の貴重な研究モデルと考えられている。

今回我々は、癌細胞の基質非依存性増殖能を利用して、平板培養と比較してより生体内での癌細胞増殖に近いと思われる軟寒天培地中での LNCap 細胞の増殖を観察した。そしてその増殖に及ぼす各種因子について考察し、また LNCap 細胞の autocrine な増殖についても若干の知見を得ることができたので報告する。

材料および方法

1) 細胞：使用した細胞は、Horoszewicz, J.S. ら¹⁾(1983)により、ヒト前立腺癌のリンパ節転移巣より分離樹立された LNCap 細胞であり、Horoszewicz, J.S. により提供を受けたこの細胞の維持には、Ham's F12 に10%牛胎児血清 (FCS) を加えて使用し、炭酸ガス培養器内 (37°C, 5%CO₂) で培養と継代を行った。

2) 使用薬剤および因子：テストステロン (SIGMA), DHT (SIGMA), EE₂ (SIGMA), ヒト EGF (コスモバイオ株式会社), ヒト TGF α (宝酒造株式会社), ヒト TGF β (宝酒造株式会社), 抗ヒト EGF 抗体 (オンコジーンサイエンス社), 抗ヒト TGF α 抗体 (コスモバイオ株式会社), 抗ヒト TGF β 抗体 (キング醸造株式会社) を使用した。そして下記の軟寒天培地上層培養層作成時に、各種最終濃度となるようにこれらを培養液中に添加した。

3) 軟寒天培養

① 軟寒天培地下層：Ham's F12 にステロイドをチャコール処理により除去した牛胎児血清 (FCS-SF) を加え、それにアガロース type IV (SIGMA) を最終濃度0.4%になる様に混入し、dish に静置した。

② 軟寒天培地上層：Ham's F12 および FCS-SF に各種因子を添加した後に、アガロース type IV を最終濃度0.24%になる様に調整し、それに LNCap 細胞 (1×10^4 個/dish) を混じて下層に重層した。

4) feeder 細胞の作成：継代培地より採取した LNCap 細胞を、Ham's F12 および FCS または FCS-

SF を使用した単層平板培養にて1週間培養。これを feeder 細胞として、培養液を捨てた後に培養 dish を Hanks 液で洗浄し、その上に3)と同様に2層軟寒天培地を作成した。軟寒天培地上層(培養層)には、effector 細胞として LNCap 細胞を同様に播種した。

5) 培養およびコロニーの算定：軟寒天培地に播種した細胞を炭酸ガス培養器内で3～4週間培養した後、形成されたコロニーを顕微鏡下で観察算定した。培養液の交換は行わず、また基本的には約30個以上の細胞集塊をコロニーとして算定した。

結 果

1) LNCap 細胞の軟寒天培地におけるコロニー形成：LNCap 細胞のコロニー形成は、軟寒天培地中にステロイド除去牛胎児血清 (FCS-SF) を加えた場合、その濃度 0～10% の範囲では血清濃度に依存して40～8,000個/ 10^5 cell 程度のコロニー形成が認められた (図1)。FCS-SF を使用した軟寒天培地にテストステロンを添加すると、LNCap 細胞のコロニー形成はテストステロン添加により促進され、 1×10^{-8} M の濃度で最も増強された。これはまた軟寒天培地中の FCS-SF の濃度を変化させると、1～10%の範囲内では同様の増強効果が見られたが、血清濃度10%においてその増強効果は顕著に現われた (図2)。10%FCS-

図1 LNCap 細胞の軟寒天培養に及ぼす FCS-SF 濃度の影響

図2 LNCap 細胞の軟寒天培養に及ぼすテストステロンの影響。○：10%FCS-SFを使用，×：1% FCS-SFを使用

図3 LNCap 細胞の軟寒天培養に及ぼす DHT・EE₂ の影響。○：DHT，×：EE₂

SFを用いた軟寒天培地でのコロニー形成に及ぼす他の各種ホルモンの効果を見ると、DHT添加はコロニー形成を促進し、 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の濃度で最強（約6倍）であった。EE₂もコロニー形成を $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 程度の高濃度で若干促進（約3倍）した（図3）。

図4 feeder細胞を使用した軟寒天培地の作成

2) LNCap 細胞のコロニー形成に及ぼす feeder 細胞の影響：LNCap 細胞を feeder 細胞として dish に播種し、その上に2層軟寒天培地を作成して LNCap 細胞のコロニー形成に及ぼす feeder 細胞の効果を検討した。その結果 feeder 細胞を有する群で LNCap 細胞のコロニー形成は促進（約3倍）された。feeder 細胞の培養条件を10%FCS からテストステロン $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ を添加した10%FCS-SF に変えても、同様にコロニー形成は促進（約2.5倍）された（図4、表1）。

3) LNCap 細胞のコロニー形成に及ぼす各種増殖因子の影響：1%FCS-SF 濃度の軟寒天培地に各種増殖因子を添加し、LNCap 細胞のコロニー形成に及ぼす効果を検討した。その結果 EGF 添加により LNCap 細胞のコロニー形成は促進され、EGF 10 ng/ml の濃度で最強（約3倍）であった。またその効果はテストステロン $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ との併用で増強した。TGF α 添加でもコロニー形成は促進され、TGF α 10 ng/ml で最強（約2倍）であった。またその効果はテストステロンとの併用で増強した。一方 TGF β を添加すると LNCap 細胞のコロニー形成は促進され、TGF β 10 ng/ml の濃度で最強（約4倍）であったが、テストステロンと併用してもテストステロン単独添加の場合と比較してコロニー形成の更なる増強は認められなかった（図5、

表1 LNCap 細胞の軟寒天培養に及ぼす feeder 細胞群の影響

群	feeder 細胞と培養条件		colony 形成数(個/ 10^5 cell)
A	(-)	(-)	4080 ± 796
B	LNCap(1×10^4 個)	10% FCS	11840 ± 2030*
C	LNCap(1×10^4 個)	10% FCS-SF 及びテストステロン	10800 ± 970*

(個/ 10^5 cell : Mean ± M.D.)

* : $p < 0.01$ (A群との比較)

図5 LNCap細胞の軟寒天培養に及ぼすEGF・TGF α ・TGF β の影響。○：EGF，△：TGF α ，×：TGF β

図6 LNCap細胞の軟寒天培養に及ぼすEGF・TGF α ・TGF β の影響。—テストステロン 1×10^{-9} Mとの併用効果。○：EGF+テストステロン，△：TGF α +テストステロン，×：TGF β +テストステロン

図6)。

4) LNCap細胞のコロニー形成に及ぼす各種増殖因子抗体の影響：10%FCS濃度の2層軟寒天培地に各種増殖因子の抗体として、抗EGF抗体(64倍～256倍希釈)、抗TGF α 抗体(64～256倍希釈)、抗TGF β 抗体(32～128倍希釈)を添加しLNCap細胞のコロニー形成の状態を調べると、これらの抗体によりコロニー形成は抑制され、その効果はいずれも抗体を64倍程度に希釈した時に最大であった(図7)。

考 察

Horoszewicz, J.S.¹⁾によると、LNCap細胞は男性ホルモン依存性増殖能を持つユニークな細胞であると述べている。今回、このヒト前立腺癌細胞の軟寒天中でのコロニー形成とそれに及ぼす各種因子の影響を検討したが、その結果LNCap細胞の軟寒天中でのコロ

図7 LNCap細胞の軟寒天培養に及ぼす各種抗体の影響。○：抗EGF抗体，△：抗TGF α 抗体，×：抗TGF β 抗体

ニー形成には、EGFやTGFなどの増殖因子を介したautocrineな増殖促進機構の存在が示唆された。

このLNCap細胞は5～15%FBS濃度の培養液中で最も増殖し、FBS濃度の減少と共に増殖は緩徐となり、FBS濃度0.01%で徐々に死滅するとされている¹⁾。またLNCap細胞はステロイドを除去した牛胎児血清(FCS-SF)を使用しても、緩徐ではあるが増殖する。我々は、Ham's F12にチャコール処理によりステロイドを除去したFCS-SFを0～10%の濃度で加えた2層軟寒天培地を作成後、LNCap細胞のコロニー形成を観察したが、この範囲ではFCS-SF濃度に依存したコロニー形成が認められた。FCS-SF 0%ではコロニー形成は殆ど認めなかったが、各種因子の添加実験では、血清の影響(特にステロイド)を考慮して行わなければならない。以後我々は1～10%濃度のFCS-SFを使用した。テストステロンの添加では 1×10^{-9} Mの濃度で最強(約5倍)のコロニー形成が見られ、DHTでは 1×10^{-8} Mの濃度で最強(約6倍)であった。これにはBernsら²⁾が指摘するごとく、LNCap細胞のDHT早期代謝が影響しているのかも知れない。EE₂ではコロニー形成が促進されたが、形成されたコロニーは比較的小さなものであった。Schuurmanら³⁾は、LNCap細胞の単層平板培養では、エストロゲンおよびプロゲステロンは増殖を促進せたと報告している。LNCap細胞にエストロゲンおよびプロゲステロン受容体の存在は報告されておらず、Schuurmanらは、これらはアンドロゲン受容体を介して作用をしている。一方Sonnenscheinら⁴⁾は、去勢雄性マウス

マウスへ LNCap 細胞接種後の腫瘍の増殖は、ノードマウスへアンドロゲンを投与しても促進されないが、エストロゲンやプロゲステロンを投与すると腫瘍の増殖は促進される事より、エストロゲンやプロゲステロンの効果発現は直接的にはアンドロゲン受容体に関与しないのではないかと報告をしており、エストロゲンやプロゲステロンの LNCap 細胞への作用機序については今後の大きな研究課題であると思われる。

一方 LNCap 細胞の autocrine な増殖促進機構を観察するために、LNCap 細胞自身を feeder 細胞として使用した場合、上層培養層 LNCap 細胞のコロニー形成は、ステロイドを含有する FCS にて feeder 細胞を培養した群で促進され、feeder 細胞を FCS-SF にテストステロンを添加して培養した場合でも同様にコロニー形成は促進された。これらの事より LNCap 細胞の軟寒天中での増殖には、血清の影響、特にアンドロゲンが関与すると思われる autocrine な増殖促進機構の存在が推察される。次に EGF, TGF α および TGF β の増殖因子を添加した実験の結果からは、3 者の増殖因子共に LNCap 細胞のコロニー形成促進作用が認められ、EGF および TGF α はテストステロンと協調的に作用するが、TGF β ではテストステロン併用の効果は見られなかった。そして、各々の増殖因子に対する抗体を添加した場合 LNCap 細胞のコロニー形成はすべて抑制された。これらの増殖因子は細胞表面の受容体を介して作用し、また、これらは様々な細胞内で合成されるペプチドホルモンの一種と考えられる。そして分泌された局所で作用する事が多く、いわゆる autocrine と paracrine な働きを持つ。特に自己分泌機構は細胞が増殖因子と受容体を発現するもので、癌細胞の自己増殖を説明する一つの重要な概念とされる⁵⁾。

EGF は Cohen ら⁶⁾により、マウス新生児の眼瞼開裂および切歯出現の早期化を誘発する因子として発見された。その後の研究で上皮系細胞のみならず中胚葉系細胞、グリア細胞などにも作用し、その作用に細胞特異性がない事から細胞の増殖分化に重要な役割を果たすといわれている⁵⁾。ヒト EGF は乳汁・精漿中に高濃度に含まれるが、前立腺組織内に EGF は存在しないとされ、精漿中 EGF の由来については不明である⁷⁾。LNCap 細胞に対する EGF の影響を見ると、我々の実験では EGF 添加により LNCap 細胞のコロニー形成は促進され、テストステロンとの併用でその効果は増強した。Wilding⁸⁾、Schuurman ら⁹⁾の平板培養で細胞

増殖を検討した報告でも同様の現象を認めており、これは DHT による EGF 受容体の増加に起因するのではないかと考察している。一方 Connolly ら¹⁰⁾は LNCap 細胞の EGF 分泌を肯定してはいるものの、DHT による LNCap 細胞の増殖促進が EGF 分泌増加を介するものではないと述べている。しかし、これは EGF または類似物質の autocrine な増殖促進機構の存在を否定するものではない。今回の検討では抗 EGF 抗体の添加により LNCap 細胞のコロニー形成が抑制された結果であり、この細胞に EGF ないしは EGF 類似物質による autocrine な増殖調節機構の存在が考えられる。LNCap 細胞の EGF 受容体の存在については、Kubota ら¹¹⁾の m-RNA レベルでの検討では LNCap 細胞には EGF 受容体は十分に発現しているが、アンドロゲンによる EGF 受容体 m-RNA の増加や減少は認められていない。すなわち Wilding らの指摘するようなアンドロゲン刺激により EGF 受容体が増加する事は否定的で、むしろアンドロゲンにより EGF ないしは類似物質の分泌が増加し、増殖が促進される可能性が高い。

一方 TGF は正常線維芽細胞を軟寒天中で増殖させる活性を有する増殖因子群であり、当初は癌細胞に特異的であると考えられていたが、各種 TGF が正常細胞にも見られ、その増殖や分化の制御に重要な役割を果たすといわれている¹²⁾。Dickson ら¹³⁾はヒト乳癌細胞における TGF α の増殖促進作用とエストロゲンの協調作用を報告し、またそのエストロゲン依存性増殖を示すヒト乳癌細胞では、エストロゲンの存在とエストロゲンに誘導される autocrine な TGF α が増殖促進に働くとしているが、LNCap 細胞を使用した今回の検討では、アンドロゲン依存性増殖を示すヒト前立腺癌細胞の軟寒天中でのコロニー形成促進に、テストステロンと TGF α の協調作用が見られた。また TGF α は単独でも軟寒天中でのコロニー形成を促進した。Wilding ら⁸⁾の、LNCap 細胞の平板培養での検討結果では、TGF α は増殖を促進し、DHT により LNCap 細胞の TGF α 分泌が促進されたとしている。これらを見ると、TGF α は EGF と同様に LNCap 細胞で autocrine に分泌され、細胞増殖が促進されるものと考えられる。今回の抗 TGF α 抗体を用いた結果とも矛盾しない。

一方 TGF β は広範囲の細胞増殖および分化発現に関与し、細胞の種類や培養条件により異なる作用発現が認められる。TGF β の軟寒天中での細胞増殖促進作用は、マウスおよびラット線維芽細胞の他、ヒト癌細胞

胞 A431において見られているが、一般的には抑制的に作用するとされる¹²⁾¹⁴⁾。Schuurman ら¹⁵⁾は、TGF β の添加はEGFによるLNCap細胞増殖促進作用を阻害するが、テストステロンの増殖促進作用には影響しないと述べている。また Wilding ら¹⁶⁾はアンドロゲン依存性を持たないDU145細胞、PC3細胞の平板培養での増殖においては、その増殖に抑制的に働いたとしている。またLNCap細胞においてはTGF β による増殖抑制効果の発現はなく、TGF β mRNAの存在にも否定的な見解を述べている。今回の検討では、TGF β の外からの添加は単独でLNCap細胞の軟寒天中のコロニー形成を促進したが、テストステロンとの併用効果は認められなかった。これはテストステロン単独(図2)やTGF β 単独(図5)の効果を考えると、この両者の併用で増殖促進効果が相互作用により抑制される可能性と、TGF β のコロニー形成促進作用に比べてテストステロンのコロニー形成促進作用が強力であるために、TGF β の作用がマスクされる可能性があると考えられる。しかし抗TGF β 抗体を使用した場合、LNCap細胞のコロニー形成は明らかに抑制された。この事はLNCap細胞におけるTGF β そのものの存在は否定的であるとしても、LNCap細胞が産生するTGF β 類似物質(抗TGF β 抗体の認識する物質)の存在とそのautocrineな増殖促進機構が存在する可能性はあるものと思われた。

以上よりLNCap細胞の軟寒天培地中での増殖を促進させるメカニズムを総括すると、テストステロン・DHTなどのandrogenによる増殖促進に加えて、その刺激によりEGF、TGF α やそれらの類似物質がautocrineに分泌され、androgenと協調的に作用する可能性が考えられた。一方TGF β またはその類似物質もautocrineに分泌され、細胞増殖を促進させる可能性が示唆されたが、androgenとの関連性については不明である。詳しいメカニズムの解明は今後の研究課題であると思われた。

結 語

ヒト前立腺癌細胞株LNCap細胞の2層軟寒天培地中でのコロニー形成と、それに及ぼす各種因子について検討した。

1) LNCap細胞のコロニー形成は、ステロイド除去牛胎児血清を使用するとその濃度0~10%の範囲では濃度の上昇と共に促進された。またテストステロン、DHT、EE₂添加によりコロニー形成が促進された。

2) LNCap細胞自身をfeeder細胞として軟寒天培

地最下層に静置すると、上層培養層LNCap細胞のコロニー形成は促進された。

3) EGF、TGF α 、TGF β 添加により、LNCap細胞のコロニー形成が促進された。またEGF、TGF α 添加ではテストステロンとの併用でその効果は増強したが、TGF β 添加では併用効果は見られなかった。

4) 抗EGF抗体、抗TGF α 抗体、抗TGF β 抗体の添加により、LNCap細胞のコロニー形成は抑制された。

5) これらよりLNCap細胞の軟寒天中での増殖には、androgenによる増殖促進に加えて、androgen刺激によりEGF、TGF α が、またandrogenとの関連性は不明であるが、TGF β やそれらの類似物質がautocrineに分泌され、細胞の増殖促進に関与する可能性があると思われた。

稿を終えるにあたり、直接の御指導を賜りました窪田吉信助教授に深謝致します。

文 献

- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E. A. and Murphy, G.P.: LNCap model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 43, 1809—1818, 1983.
- Berns, E.M.J.J., Boer, W.D. and Mulder, E.: Androgen-dependent growth regulation of and release of specific protein (s) by the androgen receptor containing human prostate tumor cell line LNCap. *Prostate*, 9, 247—259, 1986.
- Schuurmans, A.L.G., Bolt, J., Voorhorst, M.M., Blankenstein, R.A. and Mulder, E.: Regulation of growth and epidermal growth factor receptor levels of LNCap prostate tumor cells by different steroids. *Int. J. Cancer*, 42, 917—922, 1988.
- Sonnenschein, C., Olea, N., Pasanen, M.E. and Sato, A.M.: Negative controls of cell proliferation: Human prostate cancer cells and androgens. *Cancer Res.*, 49, 3474—3481, 1989.
- 和田文雄: 体内のがん増殖因子。体の科学, 臨増, 47—51, 1990.
- Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.*, 237, 1555—1562, 1962.
- 碓井 亜, 岸 浩二: 雌性副性器と成長因子。臨増, 41, 1021—1030, 1987.
- Wilding, G., Valverius, E., Knabbe, C. and Gelmann, E.P.: Role of transforming growth factor- α in human prostate cancer cell growth.

- Prostate, 15, 1—12, 1989.
- 9) Schuurman, A.L.G., Bolt, J. and Mulder, E.: Androgens stimulate both growth rate and epidermal growth factor receptor activity of the human prostate tumor cell LNCap. *Prostate*, 12, 55—63, 1988.
 - 10) Connolly, J.M. and Rose, D.P.: Preduction of epidermal growth factor- α by the androgen-responsive LNCap human prostate cancer cell line. *Prostate*, 16, 209—218, 1990.
 - 11) Kubota, Y. and Shuin, T.: Analysis of Anchorage Independent Growth and Protooncogene Expression in Human Prostate Cancer Cell Line LNCap. *Proceeding of the First Workshop on Prostate Cancer*, p. 11—13, 1990.
 - 12) 平井玲子, 山岡和子: Transforming growth factors (TGF): がん細胞の増殖と autocrine 増殖因子. *がん遺伝子研究—最近の進歩*, 初版, p. 173—181, 中外医学社, 東京, 1988.
 - 13) Dickson, R.B., Kasid, A., Huff, K.K., Bates, S.E., Knabbe, C., Bronzert, D., Gelmann, E.P. and Lippman, M.E.: Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17β -estradiol or v-Ha-ras oncogene. *Medical Science*, 84, 837—841, 1987.
 - 14) 中村敏一: 腫瘍増殖因子. *日本臨牀*, 48, 141—144, 1990.
 - 15) Schuurmans, A.L.G., Bolt, J. and Mulder, E.: Androgens and transforming growth factor β modulate the growth response to epidermal growth factor in human prostatic tumor cells (LNCap). *Mol. Cell. Endocrinol.*, 60, 101—104, 1988.
 - 16) Wilding, G., Zugmeier, G., Knabbe, C., Flanders, K. and Gelmann, E.: Differential effects of transforming growth factor β on human prostate cancer cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 62, 79—87, 1989.

(1992年2月21日受理)