

ヒト乳癌細胞において、インスリンがプロゲステロン受容体の発現に与える影響についての検討

—ヒト乳癌細胞においてインスリンはPgRの発現に影響するか—

引地理浩・林 孝典¹・杉岡 篤²・内海俊明

(藤田保健衛生大学医学部・乳腺外科学教室)

(¹藤田保健衛生大学医学部・生化学講座)

(²藤田保健衛生大学医学部・肝・脾外科学教室)

1. 緒 言

糖尿病は乳癌のリスクおよび予後不良因子とされ¹、その機序として Insulin-like growth factor I (IGF-I) やインスリン (INS) の関与が示唆されている。IGF-I は PI3K/Akt/mTOR 経路を活性化し、p70 S6 kinase を介してエストロゲン受容体 α (ER α) の S167 のリン酸化を亢進させることで癌細胞の増殖を促すことが報告された³。さらに IGF-I は ER 陽性乳癌において予後因子であるプロゲステロン受容体 (PgR) の発現を抑制するとの報告もある⁴。一方で INS は Insulin-like growth factor I receptor (IGFR) やインスリン受容体 (INSR) を介して乳癌細胞の増殖を促進させることが知られているが²、PgR への影響に関する報告は少ない。そこで ER 陽性ヒト乳癌細胞を用い INS が PgR の発現に及ぼす影響を検討した。

2. 実験方法

①検討材料

ER 陽性ヒト乳癌細胞株である MCF-7 および T47D を用いた。IGF-I および INS は Sigma 社 (St. Louis, MO)、ウサギ由来抗 PgR 抗体は Abcam 社 (Cambridge, MA) より入手した。MCF-7 および T47D は 37°C、5%CO₂ 下で 10% 牛胎仔血清を含む Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640) (GIBCO BRL, Grand Island) で培養した。なお 17 β -Estradiol (E₂)、INS および IGF-I の添加実験の際は 10% dextran-coated charcoal (DCC)-stripped FBS を加えたフェノールレッド不含 RPMI 1640 を用いた。

② PgR mRNA 発現の定量

mRNA 逆転写には PCR RNA キット (Takara Bio Inc.) を用い、定量的 RT-PCR は SYBR GREEN 法を

用いた。Primer の塩基配列は次の通りである。PgR-forward, 5'-CCT CCA GTT CTT TGC TGA CAA GT-3'; reverse, 5'-TTT CGA AAA CCT GGC AAT GAT-3' beta-actin forward, 5'-AAG GCC AAC GCG AGA AAG-3'; reverse, 5'-ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A-3'。

③ PgR タンパク発現の定量

PgR タンパクの検出はウサギ由来抗 PgR 抗体 (Abcam Cambridge, MA) を用い、二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用い、Western blotting 法にて解析した。

④ データ解析

実験で得られたデータは一元配置分散分析および post-hoc test にて解析し、P < 0.05 を統計学的有意とした。

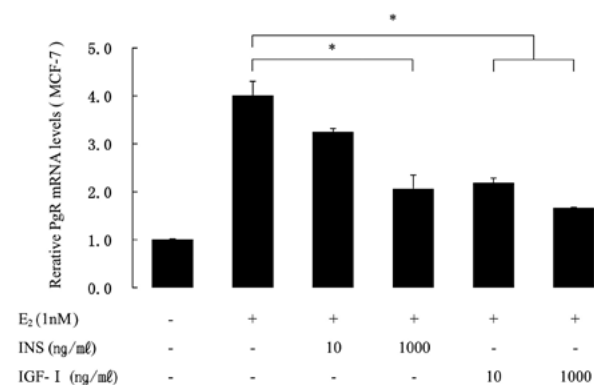


図1 INS, IGF-I が PgR mRNA の発現に及ぼす影響
E₂ 存在下で MCF-7 に、INS/IGF-I (10, 1,000 ng/mL) 添加 5 日後の PgR mRNA 量。(* p < 0.05)

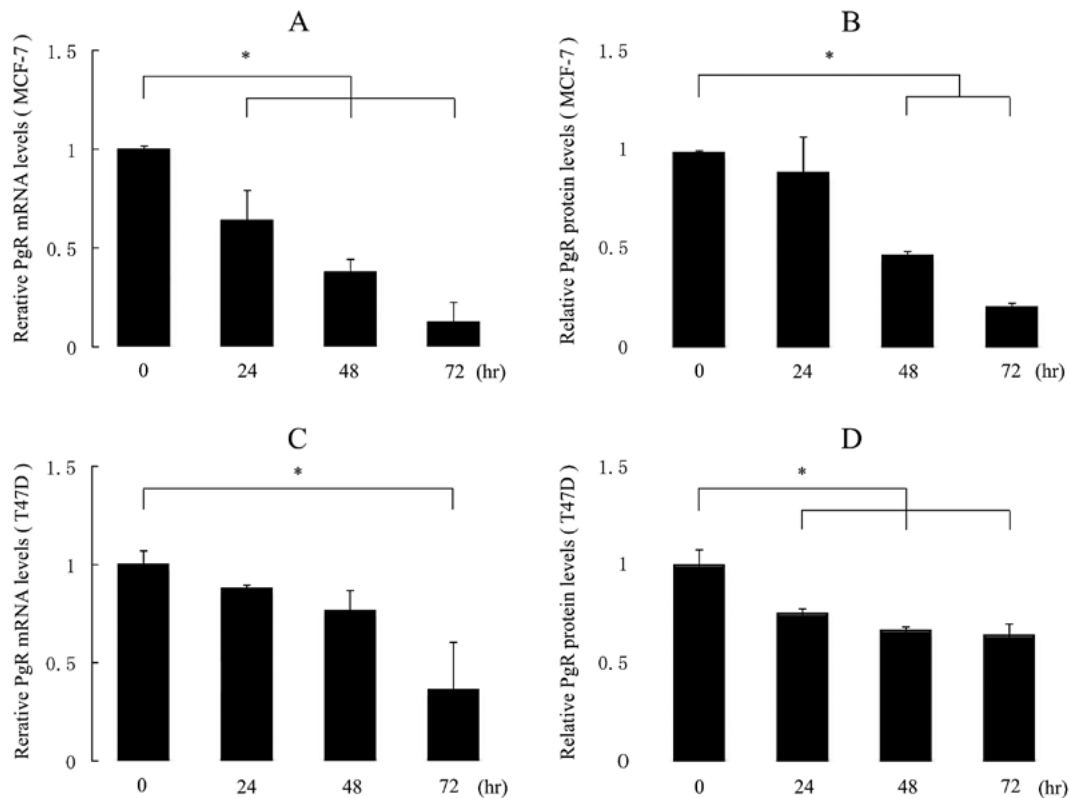


図2 INSがPgR mRNAおよびタンパクの発現に及ぼす影響
E₂存在下でINSを1,000ng/ml添加し, 0, 24, 48, 72時間後のMCF-7 PgR mRNA発現量 (A), タンパク量 (B), T47D PgR mRNA発現量 (C), タンパク量 (D)。(*p < 0.05)

3. 実験結果

10% DCC-stripped FBSを加えたフェノールレッド不含RPMI 1640にて培養したMCF-7にE₂ 1nMを添加し, 5日間培養すると同条件下でE₂ 1nMを添加しない場合と比べてPgR mRNA量が約4.0倍に増加した[図1]。次にE₂ 1nM存在下でINSまたはIGF-Iをそれぞれ10ng/ml, 1,000ng/ml添加しPgRの発現状況を検討した。INS 10ng/ml添加した場合, PgR mRNAの発現は変化しなかったが, 1,000ng/ml添加した場合は51.6±4.2%に低下した(p < 0.05)[図1]。IGF-I 10ng/ml添加した場合, PgR mRNAの発現は55.4±10.0% (p < 0.05), 1,000ng/mlでは41.3±0.6% (p < 0.05)に低下した[図1]。

さらにMCF-7, T47DにE₂存在下でINSを1,000ng/ml添加し, 添加前, 添加後24時間, 48時間, 72時間のPgR mRNA量ならびにタンパク量の経時的変化を検討した。

MCF-7ではPgR mRNAの発現はINS添加後24時間で64.2±18.4% (p < 0.05)に低下し, 48時間で37.9±7.5% (p < 0.05), 72時間で12.5±11.4% (p < 0.05)と時間依存的に低下した[図2-A]。PgRタンパク量はINS添加後24時間までは変化しなかったが, 48時間で46.2±2.3% (p < 0.05), 72時間で21.3±2.0% (p < 0.05)に低下した[図2-B]。

また, T47DではINS添加後48時間まではPgR mRNAの発現は低下しなかったが, 72時間で36.2±26.9% (p < 0.05)に低下した[図2-C]。PgRタンパク量はINS添加後24時間で75.7±5.5% (p < 0.05)に低下し, 48時間で67.2±4.8% (p < 0.05), 72時間で65.3±13.3% (p < 0.05)に低下した[図2-D]。

4. 考 察

本研究結果によりINSはER陽性乳癌に対して, 濃度および時間依存的にPgRの発現を抑制することが明らかとなった。糖尿病を合併する乳癌患者ではPgR陰性例が多いとの報告もあり, 高濃度のINS血症に陥った場合や長期間INSが高い状態に置かれた場合, PgRの発現が抑制される可能性が考えられる。

IGF-Iは, PI3K/Akt/mTOR経路を介してPgRの発現を抑制するとの報告があり, INSも同様の機構でPgRの発現を抑制する可能性が考えられる。一方で, INSとIGF-Iでは異なるシグナル伝達経路が存在するとの報告³や様々なシグナル伝達経路が複雑にクロストークしているとの報告⁶もあり, その詳細は未だ不明な点が多い。今後, INSがPgRの発現を抑制する機序の解明が必要であると考えられる。

今回の検討では, INSがPgRの発現を抑制するのに要した濃度は, 生理的濃度よりはるかに高濃度であ

った。人における INS の空腹時正常血中濃度は 5-10 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ (0.193 - 0.386 ng/mL , INS : WHO 1987 年国際標準品 1 ng/mL = 26 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ で計算) であり, 15 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ 以上の場合に INS 抵抗性の存在が示唆される^{8,9}。血中 INS 値のピークに関する報告としては, 鈴木らの肥満が INS 抵抗性と INS 分泌能に及ぼす影響を検討した研究があり, 75g 経口糖負荷試験後 0-120 分の血中 INS 値のピークは, 肥満の糖尿病症例がもっとも高く 65.0 \pm 32.2 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ であった。本研究では *in vitro* にて INS のみの効果を検討したが, 生体内では INS 以外にも IGF-I などの PgR の発現を抑制する生理分子が存在する。INS 抵抗性に伴う高 INS 血症は, 血中 IGF-I 濃度を増加させるとの報告もあり¹¹, 生体内ではこれらの複雑な機構を介して PgR の発現が抑制される可能性がある。それゆえ今回の実験では生体内に比べて高濃度の INS を要した可能性が考えられる。

本研究では ER 陽性乳癌細胞のみを用いて INS が PgR の発現を抑制することを示したが, その効果が ER を経由した作用であるか確認することは重要である。この点を明らかにするため, 今後, ER 陰性乳癌細胞を用いた実験や INS 存在下での ER 陽性乳癌細胞における PgR の発現が ER アンタゴニストや mTOR 阻害剤で変化するか検討し, INS が PgR の発現を抑制する経路の詳細を明らかにしていく予定である。

5. 結 論

INS は MCF-7 および T47D において PgR の発現を濃度および時間依存的に抑制した。

文 献

- 1) Kaplan MA, Pekkoly Z, Kucukoner M, Inal A, Urakci Z, Ertugrul H, Akadogan R, Firat U, Yildiz I, and Isikdogan A : Type 2 diabetes mellitus and prognosis in early stage breast cancer women. *Med. Oncol.* 2012 ; 29 : 1576 - 1580.
- 2) Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AK, Gans RO, and de Vries EG : Metformin : Taking away the candy for cancer? *Eur. J. Cancer.* 2010 ; 46 : 2369 - 2380.
- 3) Becker MA, Ibrahim YH, Cui X, Lee AV, and Yee D : The IGF pathway regulates ER α through a S6K1-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 2011 ; 25 : 516 - 528.
- 4) Cui X, Zhang P, Deng W, Oesterreich S, Lu Y, Mills GB, and Lee AV : Insulin-like growth factor- I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway : progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer. *Mol. Endocrinol.* 2003 ; 17 : 575 - 588.
- 5) Hou G, Zhang S, Zhang X, Wang P, Hao X, and Zhang J : Clinical pathological characteristics and prognostic analysis of 1,013 breast cancer patients with diabetes. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013 ; 137 : 807 - 816.
- 6) Yamnik RL and Holz MK : mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor α serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett.* 2010 ; 584 : 124 - 128.
- 7) 矢野正生 : インスリン測定について. CDEJ News letter. 2011 ; 30 : 7.
- 8) 安藤明彦, 石橋 俊 : 糖代謝検査. 臨床と研究. 2010 ; 87(2) : 163 - 170.
- 9) 日本糖尿病学会. 糖尿病治療ガイド. 2014 - 2015.
- 10) 鈴木 清, 黒瀬 健, 今村美紀, 岡野真弓, 菊山宗嗣, 門脇誠三, 三橋順子, 吉元勝彦, 石田均 : 非肥満ならびに肥満症例での耐糖能異常に及ぼすインスリン抵抗性とインスリン分泌低下の影響について. 医と薬学. 2005 ; 54(1) : 67 - 74.
- 11) 中村友昭, 坂口一彦, 小川 渉 : 糖尿病とがん発生のメカニズム. *Prog. Med.* 2014 ; 34(11) : 1927 - 1931.

(平成 27 年 6 月 2 日受理)