

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08338

研究課題名(和文) 子宮内膜癌局所におけるストレスホルモンの動態と癌への作用

研究課題名(英文) Effects of stress hormone on hormone metabolism and cancer growth in endometrial cancer

研究代表者

三木 康宏 (Miki, Yasuhiro)

東北大学・災害科学国際研究所・講師

研究者番号：50451521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌においてコルチゾールは11 $\beta$ -HSD1と11 $\beta$ -HSD2によって癌局所での濃度が調節されている。コルチゾールは間質細胞に発現するグルココルチコイド受容体(GR)を介して、エストロゲン合成酵素aromataseの発現を誘導し、エストロゲン依存性に寄与している。また、コルチゾールは間質細胞のGRに結合し、Annexin A1を誘導し、癌細胞の増殖に関与すると考えられる。ストレスと関連するDHEAは、steroid sulfataseによって癌局所で合成される。ホルモン濃度の階層クラスター解析では、ストレス関連ホルモンであるコルチゾール、コルチゾン、DHEAが同一クラスターに分類された。

研究成果の概要(英文)：Intratumoral cortisol concentration was considered to be regulated by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) 1 and 11 $\beta$ -HSD2 in endometrial cancer. In endometrial cancer, cortisol induced enzymatic activity of estrogen synthase (aromatase) through glucocorticoid receptor (GR) located in the stromal cells but not carcinoma cells. This finding suggests that cortisol contributed estrogen-dependency of endometrial cancer cells. It is also suggested that cortisol directly relates to cell growth through the induction of annexin A1 expression, which is known as a GR target gene, in stromal cells of endometrial cancer. Dhydroepiandrosterone (DHEA), which is also known as a stress-related hormone, was synthesized by steroid sulfatase in endometrial cancer tissue.

研究分野：腫瘍学 内分泌学

キーワード：子宮内膜癌 コルチゾール アロマターゼ グルココルチコイド受容体 DHEA

## 1. 研究開始当初の背景

癌患者においては罹患の事実によるショックは言うまでもなく、生活環境の変化、治療や通院、経済的不安、将来に対する不安など、様々な心理的ストレスに晒されている。実際、乳癌患者の約4人に1人は、癌の診断後早期に心的外傷後ストレス障害の症状が認められ、特に黒人とアジア人でそのリスクが高いことが報告されている (Vin-Raviv et al. J Nat Cancer Inst. 2013)。このように癌患者の心のケアに関しては、近年、注目されるようになってきたが、ストレスホルモンの癌細胞への影響に関する腫瘍学的検討は行われていない。本課題では子宮内膜癌を対象に、“癌ではストレスホルモンであるグルココルチコイド (cortisol) を無害化する酵素が低下し、その傾向が強い症例はストレスが癌進展に働くのでは?”という仮説を立てた。

子宮内膜癌におけるグルココルチコイドシグナルについては不明な点が多い。培養細胞を用いた検討では、比較的高濃度で cortisol が細胞増殖を抑制することが報告されている (Koyama et al. Mol Cell Endocrinol. 2001)。しかしこの高濃度 cortisol が、ストレス反応で分泌される濃度の範囲を大きく逸脱しているという批判は多い。一方で、子宮内膜癌は乳癌と同様にエストロゲン依存性増殖を示す症例が少なくない。グルココルチコイドはエストロゲン合成酵素である aromatase の発現を誘導することが報告されている (Wang et al. Endocrinology 2012; Cvorovic et al. Immunol. 2011) が、子宮内膜癌でのそれらの関連は検討されていない。さらにこのことはグルココルチコイドが他のステロイドホルモン動態に影響を与えることを意味している。

## 2. 研究の目的

本課題では、ヒト子宮内膜癌を用いた組織解析を行い、ストレスが癌細胞におよぼす影響として、グルココルチコイドとステロイドホルモンの癌局所での動態、受容体を介したシグナルを検討する。本研究ではストレスの癌におよぼす影響を科学することによって、診断後の心のケアに加え、癌進行予防のために早期のストレスホルモンシグナルを標的とした治療を提示することができると考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 症例

子宮内膜癌 35 例の凍結組織および同症例のパラフィン包埋組織を用いた。また、同 35 症例の血清を用いた。

本研究プロトコールについて、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得た (受付番号: 2013-1-244、2014-1-418)。

### (2) ホルモン濃度測定

子宮内膜癌患者 35 例の血清および凍結組織を対象に、癌組織中のホルモンを liquid chromatography-tandem mass spectrometry にて測定した (あすか製薬メディカル、川崎市)。測定したホルモンは、エストロゲン: estrone, estradiol、アンドロゲン: testosterone, dihydrotestosterone (DHEA), androstenedione, dehydroepiandrosterone、グルココルチコイド: cortisol cortison である。

### (3) アロマターゼ活性の測定

子宮内膜癌における aromatase 活性については、癌組織のホモジネートに  $^{13}\text{C}$ -testosterone もしくは  $^{13}\text{C}$ -androstenedione を添加し、 $^{13}\text{C}$ -estradiol もしくは  $^{13}\text{C}$ -estrone を測定することで評価した (testosterone→estradiol 活性もしくは androstenedione→estrone 活性、あすか製薬メディカル、川崎市)。

### (4) 免疫組織化学

免疫組織化学にて、aromatase、glucocorticoid receptor (GR)、11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) 1 および 2、steroid sulfatase (STS)、DHEA-sulfotransferase (DHEA-ST) の発現を検討した。また GR の応答遺伝子として、Annexin A1 の発現を検討した。癌細胞の増殖マーカーである Ki-67 の発現を同様に検討した。免疫組織化学はストレプトアビジン-ビオチン複合体法 (ヒストファインキット、ニチレイ、東京) にて実施した。

### (5) 階層クラスター解析

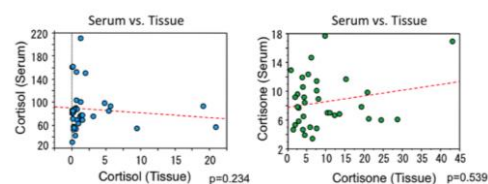
癌組織中のホルモン濃度を対象に、階層クラスター解析を行った (Cluster 2.0 software, Stanford University)。クラスタリングの結果については Tree View program (Stanford University) を用い、Heat map にて示した。

## 4. 研究成果

### (1) 癌組織におけるコルチゾール代謝

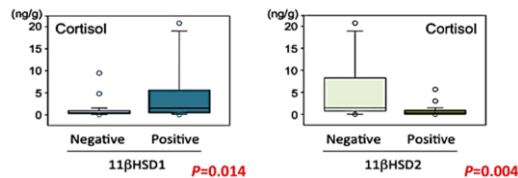
子宮内膜癌において、癌組織中と血清中の cortisol および cortisone 濃度に、それぞれ相関は認められなかった (図 1)。このことから、癌組織中のグルココルチコイドは血液中のものが単純に反映されるわけではなく、癌組織中で代謝もしくは合成が行われていると考えられる。

図 1



グルココルチコイドの合成・代謝に関与する酵素である 11 $\beta$ -HSD1(合成)と 11 $\beta$ -HSD2(代謝)の免疫組織化学と癌組織中濃度との検討では、11 $\beta$ -HSD1 陽性群および 11 $\beta$ -HSD2 陰性群で cortisol 濃度が有意に高かった(図2)。なお、cortisone の濃度とこれら酵素には有意な関係は認められなかった。したがって、癌組織中ではこれら両酵素のはたらきによって cortisol 濃度が規定されていると考えられる。

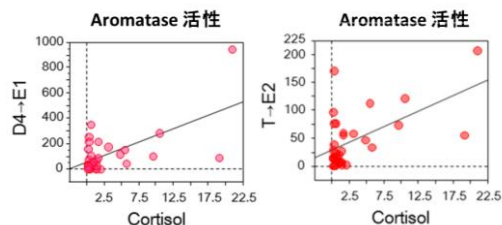
図 2



## (2) コルチゾールとエストロゲン合成

癌組織中の cortisol 値と aromatase 活性 (testosterone→estradiol 活性および androstenedione→estrone 活性)に正相関が認められた(図3)。免疫組織化学での検討では、aromatase および GR はいずれも癌細胞と周囲の間質細胞に発現し、間質細胞において両者の正相関が認められた。したがって、癌組織中の cortisol は間質細胞の GR を介して、癌局所でのエストロゲン合成に関与していると考えられる。

図 3

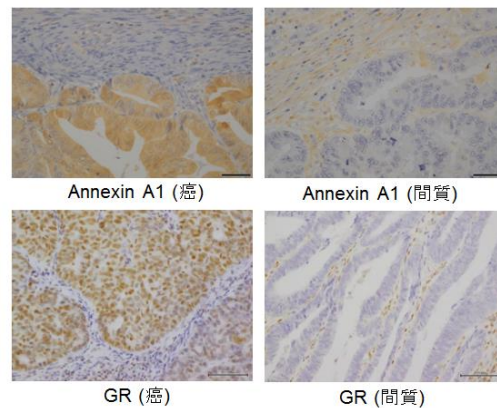


## (3) GR とその応答遺伝子の発現

グルココルチコイドによって発現が誘導されることが知られている Annexin A1 (Perretti et al. Nat. Rev. Immunol. 2009)に着目し、子宮内膜癌におけるグルココルチコイドシグナルの一つとして、cortisol との関連を検討した。Annexin A1 は GR と同様に癌細胞と間質細胞(線維芽細胞)に発現がそれぞれ認められた(図4)。間質細胞の Annexin A1 陽性群では間質細胞の GR の発現が有意に高かった (p=0.0031)。

また、間質細胞の Annexin A1 陽性群では、癌細胞の増殖マーカーである Ki-67 (p=0.0458)、癌組織中 cortisol 濃度 (p=0.0183) がそれぞれ有意に高かった。癌組織中の cortisol は、間質細胞の GR を介して間質細胞で Annexin A1 を誘導し、癌細胞の増殖に関与すると考えられる。

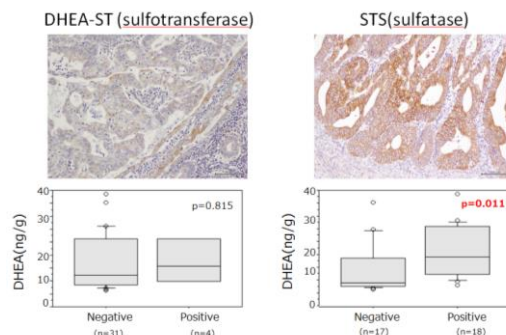
図 4



## (4) 子宮内膜癌における DHEA の意義

DHEA は前駆ホルモンとして種々のステロイドホルモン合成酵素の触媒を受け、エストロゲン、アンドロゲン、グルココルチコイドへと変換され、また、ストレスの影響を受けることが知られている (El-Sakka World J Mens Health. 2018)。DHEA の子宮内膜癌における影響を検討した。子宮内膜癌組織中の DHEA 濃度は、その合成酵素である STS 陽性群で優位に高かったのに対し、代謝酵素である DHEA-ST との関係は認められなかった(図5)。DHEA 合成酵素である STS 陽性群では有意に Ki-67 の発現が低かった (p=0.043)。

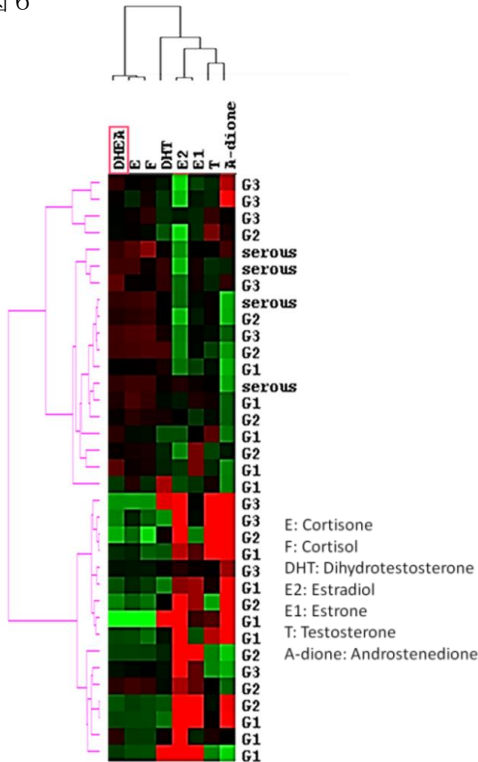
図 5



子宮内膜癌組織中のホルモン濃度について階層クラスター解析を行い、各ホルモンの関連性を検討した。結果、DHEA はアンドロゲンやエストロゲンと同一クラスターには分類されず、グルココルチコイドと同一クラスターに分類された(図6)。

DHEA は子宮内膜癌において癌増殖抑制に関連すると考えられ、STS の免疫組織化学が代替マーカーとして有用であると考えられる。子宮内膜癌では DHEA は従来考えられてきた性ホルモンの前駆物質としての位置付けよりも、グルココルチコイドと同様にストレスホルモンとしての位置付けが高い可能性が考えられた。

図 6



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Hashimoto C, Miki Y, Tanaka S, Takagi K, Fue M, Doe Z, Li B, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression Is Induced by Androgen Signaling in Endometrial Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 19(4). E1139. 査読有  
DOI: 10.3390/ijms19041139.

(2) Tsuji K, Utsunomiya H, Miki Y, Hanihara M, Fue M, Takagi K, Nishimoto M, Suzuki F, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K. Retinoic Acid Receptor  $\beta$ : A Potential Therapeutic Target in Retinoic Acid Treatment of Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2017 27(4). 643-650. 査読有  
DOI: 10.1097/IGC.0000000000000995.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 吉田伶奈、三木康宏、高木清司、鈴木 貴、伊藤 潔 : 子宮内膜癌における Dehydroepiandrosterone (DHEA) の意義 : 第 24 回特定非営利活動法人東北内分泌研究会総会 : 2018 年 4 月 21 日 : 長陵会館

(宮城県仙台市)

(2) Yasuhiro MIKI, Misaki FUE, Rena YOSHIDA, Moeri SHIMIZU, Kiyoshi TAKAGI, Takashi SUZUKI, Kiyoshi ITO : Intratumoral Steroid Hormone and Krüppel-Like Factor 5 Expression in Endometrial Cancer : ENDO2018-The 100th Annual Meeting of The Endocrine Society- : 2018 年 3 月 17 日~20 日 : Chicago (USA)

(3) Rena YOSHIDA, Yasuhiro MIKI, Misaki FUE, Sairi TAKAHASHI, Kiyoshi TAKAGI, Takashi SUZUKI, Kiyoshi ITO : Intratumoral Level of Dehydroepiandrosterone and Its Role in Endometrial Cancer Cell Proliferation : ENDO2018-The 100th Annual Meeting of The Endocrine Society- : 2018 年 3 月 17 日~20 日 : Chicago (USA)

(4) Rena YOSHIDA, Yasuhiro MIKI, Misaki FUE, Kiyoshi TAKAGI, Takashi SUZUKI, Kiyoshi ITO : The effect of dehydroepiandrosterone on the proliferation of endometrial cancer cells (子宮内膜癌における Dehydroepiandrosterone (DHEA) の作用) : 第 76 回日本癌学会学術総会 : 2017 年 9 月 28 日~30 日 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(5) 吉田伶奈、高橋彩理、三木康宏、笹 未崎、高木清司、鈴木 貴、伊藤 潔 : 子宮内膜癌における Dehydroepiandrosterone (DHEA) 作用 : 第 18 回ホルモンと癌研究会 2017 年 6 月 23 日~24 日 : 刀城会館 (群馬県前橋市)

(6) Yasuhiro MIKI, Misaki FUE, Kiyoshi TAKAGI, Takashi SUZUKI, Kiyoshi ITO : Annexin A1 Induced By Intratumoral Cortisol in Endometrial Cancer Microenvironment : ENDO2017-The 99th Annual Meeting of The Endocrine Society- : 2017 年 4 月 1 日~4 日 : Orlando (USA)

(7) Misaki FUE, Yasuhiro MIKI, Kiyoshi TAKAGI, Takashi SUZUKI, Kiyoshi ITO : Effects of relaxin on endometrial cancer malignancy (子宮内膜癌におけるリラキシンの影響) : 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日~8 日 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(8) 三木康宏、笹 未崎、高木清司、鈴木 貴、笹野公伸、伊藤 潔 : 子宮内膜癌組織におけるコルチゾールによる aromatase の誘導 : 第 17 回ホルモンと癌研究会 : 2016 年 6 月 24 日~25 日 : 倉敷アイビースクエア



(岡山県倉敷市)

(9) Yasuhiro MIKI, Misaki FUE, Kiyoshi TAKAGI, Takashi SUZUKI, Hironobu SASASNO, Kiyoshi ITO : Effect of Intratumoral Cortisol on Aromatase Expression in Cancer Stromal Cells of Endometrial Carcinoma : ENDO2016-The 98th Annual Meeting of The Endocrine Society- : 2016年4月1日～5日 : Boston (USA)

(10) 三木康宏、笛未崎、高木清司、橋本千明、鈴木貴、伊藤潔 : 子宮内膜癌におけるコルチゾールの意義 : 第20回特定非営利活動法人東北内分泌研究会総会 : 2016年4月9日 : 良陵会館 (宮城県仙台市)

(11) 三木康宏、笛未崎、高木清司、鈴木貴、伊藤潔 : 子宮内膜癌組織におけるコルチゾール濃度とエストロゲン合成との関係 : 第19回特定非営利活動法人東北内分泌研究会総会 : 2015年10月31日 : 青森市民ホール (青森県青森市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三木 康宏 (MIKI, Yasuhiro)  
東北大学・災害科学国際研究所・講師  
研究者番号 : 50451521

### (2) 連携研究者

伊藤 潔 (ITO, Kiyoshi)

東北大学・災害科学国際研究所・教授  
研究者番号 : 70241594

高木 清司 (TAKAGI, Kiyoshi)  
東北大学・医学系研究科・講師  
研究者番号 : 80595562

### (3) 研究協力者

吉田 侘奈 (YOSHIDA, Rena)

笛 未崎 (FUE, Misaki)