

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11266

研究課題名(和文) 子宮内膜癌での性ステロイド合成key enzyme:CYP17の役割とその制御

研究課題名(英文) Role and regulation of sex steroid synthesis key enzyme:CYP17 in endometrial cancer

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌はホルモンによって増殖することが知られており、ホルモン合成の遮断が治療につながります。一方で、同じくホルモンによって増殖することが知られている前立腺癌では、アビラテロンという薬剤がホルモン合成酵素CYP17を阻害し、ホルモン依存性の増殖を抑制する効果が認められています。本研究では、子宮内膜癌におけるCYP17の意義について検討し、CYP17阻害剤であるアビラテロンが子宮内膜癌に対しても効果を発揮する可能性を見出しました。CYP17阻害薬は、子宮内膜癌の新規ホルモン治療薬として期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜癌の術後補助療法として副作用の少ないホルモン療法が望まれますが、代表的な黄体ホルモン療法を含めてその効果は明確ではありません。しかし様々な研究から子宮内膜癌はホルモン依存性に増殖することは明らかであるため、さらなるホルモン療法に関する研究の発展が望まれてきました。本研究では、CYP17の子宮内膜癌での意義を初めて明らかにすることができ(学術的意義)、さらに既存の前立腺癌ホルモン療法剤が子宮内膜癌に対しても有効である可能性を示すことができました(社会的意義)。

研究成果の概要(英文)：Endometrial cancer is known to have a hormone-dependent growth. Abiraterone, a hormone synthase CYP17 inhibitor, is used as a hormone therapy drug for prostate cancer patients. In this study, we clarified the significance of CYP17 in endometrial cancer and found that abiraterone may also be effective in endometrial cancer. CYP17 are expected as new hormone therapeutic target for endometrial cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜癌 CYP17 androgen estrogen DHEA androgen receptor

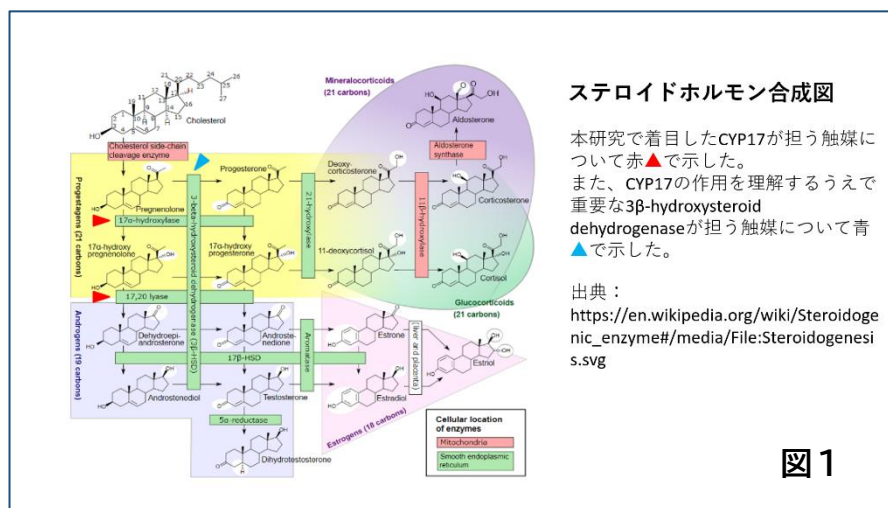
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CYP17 は、生体内でのアンドロゲンおよびエストロゲン生合成、双方の鍵となる酵素である。プレグネノロンおよびプロゲステロンから、テストステロンおよびエストロゲンの前駆体である DHEA およびアンドロステンジオンへの合成を司っている (図 1)。CYP17 は、副腎、精巣および前立腺腫瘍組織内に発現することから、前立腺癌で先行研究がなされた。前立腺癌はアンドロゲン依存性であり、アンドロゲンの供給源として副腎および腫瘍内で合成されるアンドロゲン (Intracrinology) が重要であることから、アンドロゲン合成の阻害薬として CYP17 の選択的阻害剤 (アピラテロン) が開発された①。生存期間を有意に延長するなど、著明な抗腫瘍効果が立証され、本邦でも 2014 年、前立腺癌への治療薬として承認された。CYP17 は、エストロゲン生合成も司ることから、最近、乳癌でも CYP17 阻害剤の治療薬としての可能性が模索されている。2016 年、閉経後乳癌患者を対象とした Randomized phase 2 study の結果が報告された②。興味深いことに、投与後、血清中のエストロゲン、テストステロン濃度の減少のみならず、アピラテロン投与に伴うプロゲステロン生合成の亢進によると考えられる血清中プロゲステロン濃度の有意な上昇が認められている。子宮内膜癌における CYP17 の発現に関する検討は、1 報告のみである③。内膜癌培養細胞での検討で、CYP17 の発現が BCL-2 を介したアポトーシス阻害や浸潤能に関与する可能性が示されている。ヒト内膜癌臨床検体では、少数例の検討で正常内膜に比較して過剰発現が見られているが臨床病理学的な検討はされていない。内膜癌で CYP17 阻害剤を用いた検討は、皆無である。CYP17 阻害剤は、エストロゲン合成の抑制、および血中プロゲステロン濃度の上昇が及ぼす腫瘍抑制、両者の相乗効果により内膜癌でも効果を発揮する可能性が高い薬剤と考えられる。しかし内膜癌でのアンドロゲンの作用動態は検討されておらず、薬剤投与によるアンドロゲン合成抑制に伴う影響は不明である。内膜癌でのアンドロゲン応答遺伝子群の解析はこれまで報告されておらず、検討が必要である。我々はアンドロステンジオンから下流の経路を解析したが、上流の CYP17 の作用動態と発現機構の解明により、エストロゲンおよびアンドロゲン合成代謝経路の全貌を明らかにすることが可能となる。また CYP17 阻害剤の作用機序と効果の解明には、これらのデータが不可欠である。

### 2. 研究の目的

CYP17 はアンドロゲンとエストロゲン合成の両方を司る酵素である。CYP17 を選択的に阻害し、この両経路を遮断する阻害剤 (アピラテロン) が開発され、2014 年、前立腺癌が認可を受けた。血中プロゲステロン濃度を有意に上昇させる作用もあることが、最近、明らかとなり、エストロゲン合成抑制との相乗効果で、内膜癌においても有効な可能性が高い。だが内膜癌での CYP17 阻害剤の検討は、皆無である。そこで本研究では、内膜癌での CYP17 発現作用動態、ついで CYP17 阻害剤の作用機序と効果を、アンドロゲンとエストロゲン合成代謝経路のみならずプロゲステロン生合成への影響も含めて解析し、臨床応用の可能性を明確にすることを目的とする。



### 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: 2020-1-005)。

#### (2) ホルモン濃度測定

子宮内膜癌 35 例の凍結組織を対象に、癌組織中のホルモンを liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 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 (DHT),

androstenedione, dehydroepiandrosterone (DHEA)、グルココルチコイド：cortisol, cortisone である。

### (3) 免疫組織化学

子宮内膜癌 35 例のパラフィン包埋組織 (2)と同症例) を対象に、免疫組織化学にて、CYP17、3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) の発現を検討した。免疫組織化学はストレプトアビジン-ビオチン複合体法 (ヒストファイブキット、ニチレイ) にて実施した。

### (4) 培養細胞実験

子宮内膜癌培養細胞：MFE-296, AN3CA, Ishikawa, HHUA および副腎皮質腺腫培養細胞：H295R を用いた検討を行った。DHEA sulfate (DHEAS) を添加し、72 時間後に WST-8 (同仁化学) にて細胞増殖におよぼす影響を評価した。さらにアンドロゲン受容体阻害剤 (Bicalutamide) を用いて DHEAS の作用への影響を検討した。

### (5) 共培養実験

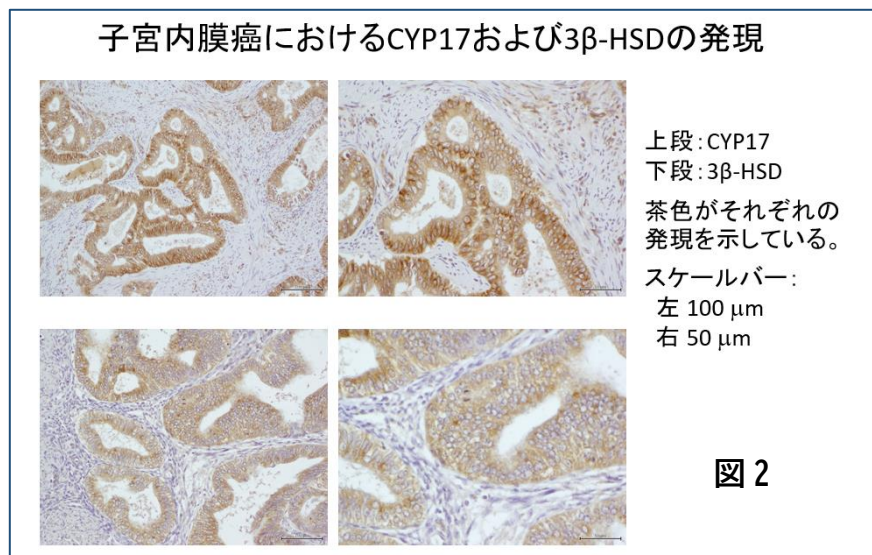
子宮内膜癌培養細胞 MFE-296 と副腎皮質腺腫培養細胞 H295R との共培養を行った。共培養には非接触型トランスウェル (メンブレン孔 0.4  $\mu$ m) を用いた。ウェルに MFE-296 を、インサートに H295R をそれぞれ培養した。共培養後、MFE-296 をトリプシンにて回収し、自動セルカウンター (TC20, Bio-Rad) にて測定した。アビラテロンはインサート内に添加した。また、単独培養した H295R から培地を回収し、conditioned medium とした。Conditioned medium を MFE-296 に添加 (70%) し、同様に細胞数を測定した。Conditioned medium 実験ではアビラテロンは MFE-296 に添加した。

## 4. 研究成果

### (1) 子宮内膜癌における CYP17 の発現

CYP17 阻害剤であるアビラテロンの子宮内膜癌への直接作用を検討するために、子宮内膜癌手術病理標本 (35 例) を用いた CYP17 (CYP17A1) の免疫組織化学を行った (図 2)。さらに CYP17 によって合成されるホルモンを代謝する 3 $\beta$ -HSD の発現を同様に確認した。結果、CYP17 は 19 例、3 $\beta$ -HSD は 16 例で陽性だったが、いずれにおいてもその発現強度は低かった。CYP17 の発現と 3 $\beta$ -HSD の発現に有意な関係は認められなかった (Chi-squared test,  $P=0.681$ )。また、両酵素ともに組織型との有意な関連はなかった (Chi-squared test, CYP17  $P=0.704$ , 3 $\beta$ -HSD  $P=0.675$ )。子宮内膜癌組織局所での性ステロイド濃度と、これらの酵素の発現との相関を検討した (図 3, 4)。CYP17A の発現は、androstenedione および cortisol と、有意な正の相関を認めた (Mann-Whitney U test, androstenedione  $P=0.006$ , cortisol  $P=0.030$ )。また 3 $\beta$ -HSD の発現は、DHEA と有意な逆相関を認めた (Mann-Whitney U test, DHEA  $P=0.023$ )。一方で、両者と局所エストロゲン (estrone, estradiol) およびアンドロゲン (testosterone, dihydrotestosterone) 濃度との間には相関は見られなかった。

3 $\beta$ -HSD は DHEA $\rightarrow$ androstenedione の触媒を担う酵素であり、本検討では DHEA の組織中濃度との逆相関が認められた。したがって、3 $\beta$ -HSD が発現する癌組織では積極的に DHEA $\rightarrow$ androstenedione 変換が行われていると考えられる。CYP17 については androstenedione との正相関が認められており、17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone $\rightarrow$ androstenedione 変換が行われていると考えられる。さらに CYP17 と cortisol との関連については、cortisol は抹消のホルモンであり (図 1)、その濃度が CYP17 の発現に依存するか否かについては、さらに中間に位置する酵素群の発現を同時に検討する必要がある。



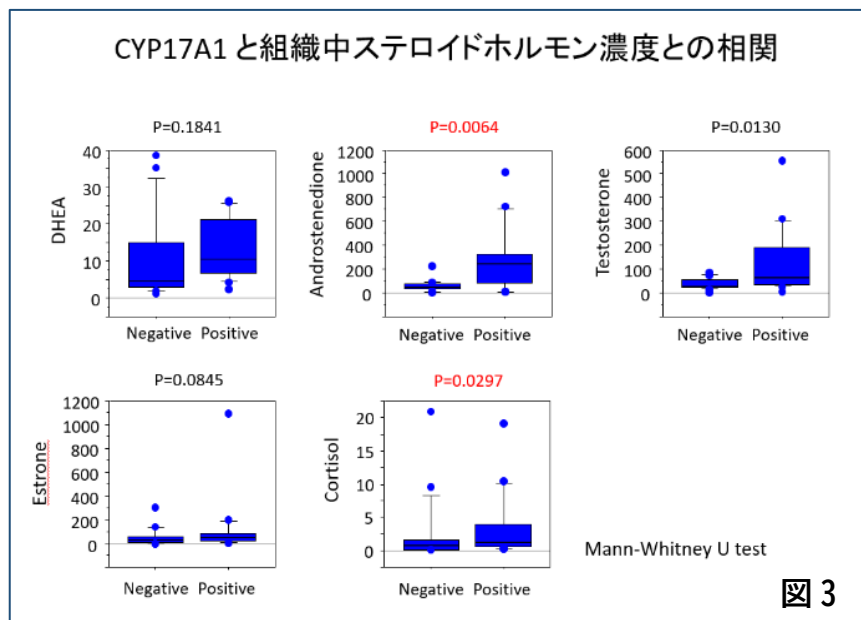


図 3

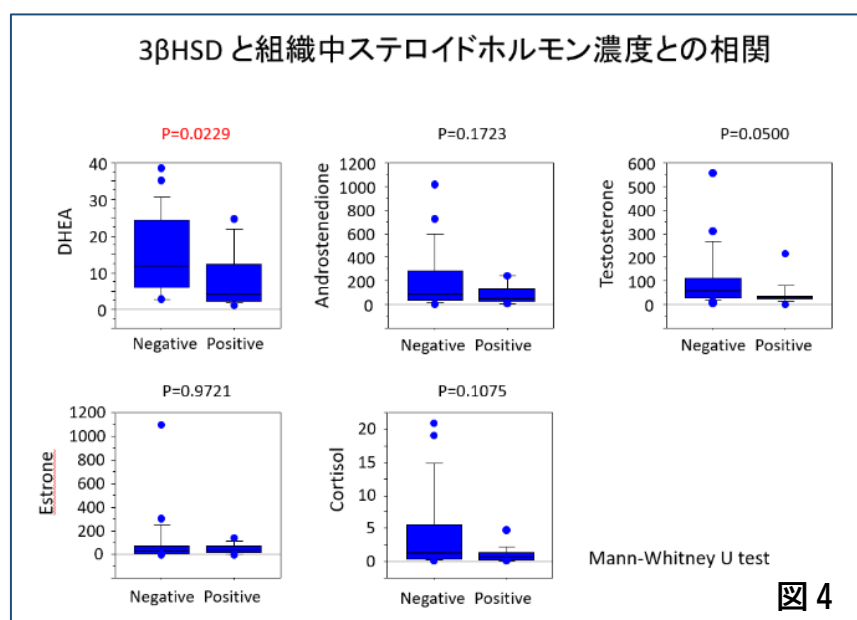


図 4

## (2) 子宮内膜癌における DHEA の意義

CYP17 は、DHEA および androstenedione の合成をつかさどる酵素であると考えられたため、DHEA の発現動態と作用について検討した。子宮内膜癌培養細胞(アンドロゲンレセプター (AR) 陽性株 MFE-296 および陰性の細胞株 : AN3CA) を用いた細胞増殖実験では、DHEAS (1 および 10 μm) 添加により、MFE-296 で有意な増加が認められた (t-test, P<0.05)。DHEAS による MFE-296 の増殖は AR 阻害剤によって抑制された。

CYP17 を阻害することによって 17α-hydroxypregnenolone→DHEA 変換が阻害され、DHEA の濃度が低下するのではと考えられる。本検討では、DHEA による細胞増殖効果が認められたため、DHEA の濃度低下は癌増殖抑制につながるものと考えられる。しかし(1)の検討では、CYP17 の発現と DHEA 濃度に関連は認められていない。以前に我々は DHEA 合成経路として DHEAS →DHEA 触媒を担う steroid sulfatase が、組織中の DHEA 濃度に重要な役割を担うことを見出しており(データ未公表)、今後、CYP17 の発現、さらに図 1 に示していない硫酸抱合型ステロイドホルモンの脱硫酸抱合を担う酵素についても同時に検討する必要があると考えられる。さらに本検討から DHEA の作用は AR の発現に依存しており、子宮内膜癌症例を AR 陽性群と陰性群とに分けた解析も必要である。

## (3) 子宮内膜癌における DHEA の意義

子宮内膜癌培養細胞株 (Ishikawa, HHUA, MFE-296) を用いた検討では、いずれの株においても CYP17A の発現は認められなかった。そのため、CYP17A 阻害剤の効果を in vitro で評価す

るために、CYP17A を発現する副腎由来の培養細胞株 (H295R) との共培養系を構築した。まず初めに、MFE-296 および HHUA に DHEA を添加し、下流のステロイドホルモンを LC-MS/MS にて測定した。両細胞とも androstenedione および androstenediol を検出した。DHEA→androstenedione の触媒には 3 $\beta$ -HSD が関与し、DHEA→androstenediol の触媒には 17 $\beta$ -HSD1 が関与する。一方、無細胞系でも DHEA→androstenedione の産成が確認されたことから、これら細胞 DHEA からの下流ステロイドホルモン合成に対する 3 $\beta$ -HSD の影響を明らかにすることは出来なかった。なお、androstenedione および androstenediol より下流のホルモン (エストロゲン、アンドロゲン、グルココルチコイド) は検出限界以下だった。

MFE-296 を用い、H295R と共培養の共培養を行ったところ、MFE-296 の細胞増殖が促進された。この H295R との共培養による MFE-296 の増殖促進作用は、アビラテロンの添加で有意に抑制された。一方で、H295R の conditioned medium によっても MFE-296 の増殖は有意に促進されたものの、アビラテロンによる影響は認められなかった。

本検討から H295R 内で CYP17 依存性にステロイドホルモンが産生され、このホルモンが MFE-296 の増殖に寄与したと考えられる。共培養系でエストロゲンが産生され、MFE-296 の増殖を促したと考えるのが妥当であり、アビラテロンはこのエストロゲン産生を最終的に遮断したと考えられる。だが MFE-296 単独培養では androstenedione および androstenediol より下流のホルモンは検出されなかったため、共培養系でのエストロゲン産生の証明が課題である。げっ歯類の副腎では CYP17 の発現はないとされ、マウスやラットでのアビラテロンの効果を検討するのは困難とされている。本検討では、アビラテロンの作用について、効果的に評価できる共培養系を構築することができた。また副腎合成ホルモンによる内膜癌の増殖は、アビラテロンで抑制されると考えられた。

CYP17 は intracrine の中心に位置する酵素であり、その阻害は子宮内膜癌の増殖抑制につながると期待される。前立腺癌の治療に用いられるアビラテロンの子宮内膜癌治療薬としての可能性を示すことができたが、その臨床応用にはさらなる研究が必要である。また、CYP17 はアンドロゲンおよびエストロゲン合成の両方を司る酵素であるため、アビラテロンの適応症例を選定するためには、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の発現を加味しなくてはならない。さらに今回、子宮内膜癌組織中でのホルモン合成に 3 $\beta$ -HSD も重要な役割を担っていることが明らかとなり、今後、さらに子宮内膜癌組織における intracrine 関連酵素の詳細な検討が求められる。

#### <引用文献>

- ① de Bono JS, et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer, *N Engl J Med* 364, 2011,1995-2005.
- ② O'Shaughnessy J, et al. Abiraterone Acetate, Exemestane or the Combination in Postmenopausal Patients With Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *Ann Oncol*, 27:2016, 106-13.
- ③ Chen Y, et al. Cytochrome P450 17 (CYP17) is involved in endometrial carcinogenesis through apoptosis and invasion pathways. *Mol Carcinog*. 50: 2011, 16-23.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Miki Y, Sugawara Y, Shibahara Y, Tsuji I, Sasano H, Ito K.	4. 巻 45
2. 論文標題 Multiple primary cancers associated with endometrial and ovarian cancers: An analysis based upon the Japan Autopsy Annual Database from 2002 to 2010.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 1012 ~ 1018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13934.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto C, Miki Y, Tanaka S, Takagi K, Fue M, Doe Z, Li B, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K.	4. 巻 19
2. 論文標題 17 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression Is Induced by Androgen Signaling in Endometrial Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E1139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19041139.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fue M, Miki Y, Takagi K, Hashimoto C, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Relaxin 2/RXFP1 Signaling Induces Cell Invasion via the $\beta$ -Catenin Pathway in Endometrial Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E2438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19082438.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miki Y, Iwabuchi E, Ono K, Sasano H, Ito K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Exploring Protein-Protein Interaction in the Study of Hormone-Dependent Cancers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E3173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19103173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuji K, Utsunomiya H, Miki Y, Hanihara M, Fue M, Takagi K, Nishimoto M, Suzuki F, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K.	4. 巻 27
2. 論文標題 Retinoic Acid Receptor : A Potential Therapeutic Target in Retinoic Acid Treatment of Endometrial Cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Gynecological Cancer	6. 最初と最後の頁 643 ~ 650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IGC.0000000000000995.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miki Yasuhiro, Hata Shuko, Ono Katsuhiko, Suzuki Takashi, Ito Kiyoshi, Kumamoto Hiroyuki, Sasano Hironobu	4. 巻 18
2. 論文標題 Roles of Aryl Hydrocarbon Receptor in Aromatase-Dependent Cell Proliferation in Human Osteoblasts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences.	6. 最初と最後の頁 2159 ~ 2159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18102159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 伊藤潔、三木康宏
2. 発表標題 災害科学、災害医学、そしてホルモン-災害科学国際研究所での取り組みを中心にー
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木康宏、岩淵英里奈、鈴木貴、笹野公伸、伊藤潔
2. 発表標題 ホルモン依存性癌におけるホルモンシグナルの可視化
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木康宏、吉田伶奈、高木清司、鈴木貴、伊藤潔
2. 発表標題 子宮内膜癌におけるステロイドホルモンとKruppel-like factor 5の発現
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤潔
2. 発表標題 子宮内膜癌発症機序と多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS)
3. 学会等名 第43回日本女性栄養・代謝学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木康宏、吉田伶奈、高木清司、鈴木貴、伊藤潔
2. 発表標題 子宮内膜癌組織におけるホルモン濃度とKruppel-like factor 5の発現
3. 学会等名 第19回ホルモンと癌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木康宏、吉田伶奈、高木清司、鈴木貴、伊藤潔
2. 発表標題 子宮内膜癌におけるDehydroepiandrosterone(DHEA)の組織中濃度とその意義
3. 学会等名 第25回日本生殖内分泌学会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 三木康宏、吉田伶奈、高木清司、鈴木貴、伊藤潔
2. 発表標題 子宮内膜癌におけるDehydroepiandrosterone(DHEA)の意義
3. 学会等名 第24回東北内分泌研究会 & 第36回日本内分泌学会東北地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida R, Miki Y, Fue M, Takagi K, Suzuki T, Ito K
2. 発表標題 The effect of dehydroepiandrosterone on the proliferation of endometrial cancer cells
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miki Y, Fue M, Yoshida R, Shimizu M, Takagi K, Suzuki T, Ito K
2. 発表標題 Intratumoral Steroid Hormone And Kr&uuml;ppel-Like Factor 5 Expression In Endometrial Cancer
3. 学会等名 The Endocrine Society's 100th Annual Meeting & EXPO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida R, Miki Y, Fue M, Takahashi S, Takagi K, Suzuki T, Ito K
2. 発表標題 Intratumoral Level Of Dehydroepiandrosterone And Its Role In Endometrial Cancer Cell Proliferation
3. 学会等名 The Endocrine Society's 100th Annual Meeting & EXPO (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	三木 康宏  (MIKI Yasuhiro)  (50451521)	東北大学・災害科学国際研究所・講師    (11301)	
連携研究者	鈴木 貴  (SUZUKI Takashi)  (10261629)	東北大学・医学系研究科・教授    (11301)	