

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390109

研究課題名 (和文) 肺がんとエストロゲン—癌局所でのホルモン産生と作用機序の解明—

研究課題名 (英文) Estrogen in human lung cancer -intratumoral hormone production and analysis of intracrine mechanisms-

研究代表者

笹野 公伸 (SASANO HIRONOBU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50187142

研究成果の概要：ヒト肺癌での E2 レベルは腫瘍部位で非腫瘍部位よりも高い濃度で認められ、種々の方法で検討した結果腫瘍細胞でアロマトーゼの発現が認められた。次に肺癌培養細胞の検討で肺癌組織内での E2 濃度で有意に細胞増殖を刺激され、種々の受容体拮抗剤でその増殖は抑制された。肺癌における腫瘍内アロマトーゼは腫瘍細胞で発現している ERβ と有意の相関を示し、特に腺癌ではアロマトーゼ及び STS を中心とした合成酵素により腫瘍局所でエストロゲンが合成され腫瘍細胞核の ERβ を介して作用している事が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肺癌、エストロゲン、アロマトーゼ、エストロゲン受容体、Intracrinology, STS, EST, アンドロゲン

1. 研究開始当初の背景

肺癌とエストロゲン：近年多くの悪性腫瘍の発生、進展過程あるいは治療に対しての反応性における”性差”が注目され始めている。肺癌もこのような“性差”が問題になっている悪性腫瘍の一つである。肺癌の発生では喫煙が重要な危険因子である事

は言うまでもない。一方疫学的に本邦女性の肺癌症例では間接喫煙を考慮しても喫煙との相関が男性よりも低いというデータも発表されている。最近月経を有する期間が長い日本人女性では短い女性と比較して肺癌のリスクが増大するという厚生労働省研究班の疫学的研究が発表されるなど、これら

の性差を説明する一つの可能性として “女性ホルモンと肺癌”の關係に大きな注目が注がれている。 このように疫学的知見からはエストロゲンの肺癌、特に非小細胞癌の発生、進展過程への関与が想定され、進行した症例でも癌細胞でエストロゲン受容体 α 及び β の発現が報告されてきた。しかしヒト肺はホルモン関連臓器として今まで位置づけられておらず、肺癌でのエストロゲン作用、代謝に関しては詳細な検討はほとんど行われてはいない。

エストロゲン作用と Intracrinology:
我々の研究を中心に1990年代に入り閉経期に発生する乳癌や子宮内膜癌などのエストロゲン依存性腫瘍では血液中のエストロゲン濃度に関係なくエストロゲンが癌組織内局所で産生、代謝される事で活性が調整されるというまったく新しいホルモン作用機序が明らかになった。この機序は従来の "Endocrinology" に対して "Intracrinology" と呼ばれており、血液中のエストロゲン濃度に左右されないでこれらの腫瘍はホルモン依存性の増殖を行う事が可能となる。肺癌においても血液中のエストロゲン濃度が必ずしも高くない男性、閉経期以降の女性に発生する症例が多い事から、エストロゲンは上記の腫瘍同様に局所でホルモン活性が調整されて作用している可能性が考えられる。しかし 肺癌で "Intracrinology" はまったく検討されていない。

2. 研究の目的

- (1) ヒト肺非小細胞癌で エストロゲンが局所産生されて直接作用しているかどうか?
- (2) 局所で合成、代謝されているものも含め エストロゲンは肺癌細胞あるいは肺/気管上皮細胞にどのような影響を与えているのか?
- (3) エストロゲン作用を阻害してやると肺癌細胞にどのような変化が見られるのか?

3. 研究の方法

- (1) 肺癌腫瘍組織内エストロゲン濃度の検索: 外科手術的に摘出された肺癌組織60例における腫瘍内 estradiol (E2)濃度を腫瘍部、非腫瘍部総計120検体で液体クロマトグラフィー・タ

ンデム型質量分析(LC-MS/MS)法を用いて測定した。得られた結果をこれら60例のエストロゲン受容体(ER) α 及び β の発現動態、腫瘍細胞での Ki67の標識率を含む臨床病理学的因子と関連させて総合的に検討した。

- (2) エストロゲンの肺癌細胞の細胞増殖への影響: ヒト肺癌組織内で合成されるエストロゲンが実際の肺癌細胞の増殖動態にどのような影響を与えているのかをER α ,ER β を transfectionさせた肺癌の培養細胞 LK87 を用いて種々のエストロゲン濃度に暴露して細胞増殖動態を検討した。又エストロゲン受容体の拮抗剤である SERMS(selective estrogen receptor modulators)である Raloxifen, Tamoxifen そして ICI 化合物を投与して、こられの投与下での変化も検索した。
- (3) 肺癌組織におけるエストロゲン合成酵素 aromatase の局在性の検討: ヒト肺癌6例(いずれも腺癌)について、Laser Capture Microdissection (LCM)にて癌細胞と間質細胞から各々 RNA を抽出し、定量的 PCR (LightCycler)にて aromatase の発現量を比較した。
- (4) 肺癌培養細胞株における aromatase 依存性増殖の検討: 昨年までの検討で aromatase の発現が認められた LK87 を本検討では使用した。LK87 に testosterone 単独 (1pM から 1nM: 公比 10)、testosterone + 5nM flutamide (androgen 受容体阻害剤)、testosterone + 5nM flutamide + 10nM letrozole (aromatase 阻害剤) をそれぞれ添加し、72 時間後に細胞増殖を評価した。
- (5) 肺癌症例におけるアロマターゼ発現の臨床病理学的意義の検索: 上記のように肺癌において重要な役割を果たしていると考えられる腫瘍内アロマターゼに関して実際の肺癌症例ではどのような意義が有るのかと言う事を105例の非小細胞肺癌症例を用いて免疫組織化学的に検討してみた。結果は症例の種々の臨床病理学的因子と関連さ

せて総合的に検討した。

- (6) 肺癌における EST/STS の発現動態の検索： 今まで行なってきた肺癌においてのエストロゲンを含む性ステロイドホルモン作用の総合的な解析の一環として今年度は硫酸化型 estrogen を脱硫酸化し estrogen に転換する estrogen 合成酵素の 1 つである Steroid sulfatase (STS) 及び逆に estrogen の硫酸抱合を触媒することで、不活性型 estrogen に変換している estrogen sulfotransferase (EST) に注目して解析を進めた。最初にヒト非小細胞肺癌症例 59 例における STS/EST の免疫組織化学法を用いて解析し、腫瘍部、非腫瘍部を比較した。又同一症例でこれらエストロゲン合成/代謝酵素の発現動態を更に詳細に検討する目的で定量 RT-PCR 法を用いて更に STS に関しては promoter の splicing 変異の有無を検討した。更にこれら EST/STS の発現の生物学的意義を更に検討する目的で非小細胞肺癌細胞 LK87 と肺線維芽細胞 LK002S とを共培養して in vivo に出来るだけ近い形での in vitro の検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 肺癌腫瘍組織内エストロゲン濃度の検索： E2 レベルは男女を問わず腫瘍部位で非腫瘍部よりも有意に高い結果を示し、腫瘍部、非腫瘍部いずれも男性が女性より高値であった。実際の腫瘍組織内 E2 濃度は乳癌組織の 1/10 程度であるが、腫瘍部/非腫瘍部の E の比率は約 2 倍程度と乳癌組織とほぼ同様であった。E2 濃度と肺癌細胞でのエストロゲン受容体 (ER) α 及び β の発現動態の間に有意の相関関係は認められなかったが、ER α 陽性、ER β 陽性いずれの肺癌においても、組織内 E2 濃度は最大腫瘍径、Ki-67 LI と正の相関を認めた。この関係は ER 陰性のものでは認めなかった。以上の結果より乳腺組織と比較して合成されるホルモンの絶対量は少ないものの、ヒト肺癌組織でも E2 の局所合成が行われている可能性が示唆された。

- (2) エストロゲンの肺癌細胞の細胞増殖へ

の影響： 細胞を用いた検討では肺癌組織内における E2 濃度に相当する E2 10~100pM において、有意に細胞増殖を刺激し、エストロゲン受容体の特異的拮抗剤である ICI 化合物により抑制された。肺癌組織における ER α , β の発現は、そのいずれを介しても E2 による細胞増殖促進に関与している可能性が示唆された。更に 10~100pM の E2 による細胞増殖促進は 1 μ M の Tamoxifen, および Raloxifen により抑制され、SERMs (selective estrogen receptor modulators) の肺癌治療への応用も示唆される結果となった。

- (3) 肺癌組織におけるエストロゲン合成酵素 aromatase の局在性の検討： 検索したすべての症例で全ての症例で癌細胞に aromatase の発現を認めた。間質細胞では 3 例に aromatase の発現が認められず、癌細胞での発現よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。

- (4) 肺癌培養細胞株における aromatase 依存性増殖の検討： Testosterone に対する反応性では、10 - 1000 pM Testosterone の添加によって溶媒対照と比較して有意な細胞増殖の抑制が確認された。LK87 においては androgen 受容体が発現 (定量的 PCR) していることを確認しており、この増殖抑制効果は androgen としての直接作用と考えられた。また、testosterone + flutamide 添加によって、1pM testosterone 添加から LK87 の細胞増殖が認められた。さらにこの androgen 受容体阻害状況下での testosterone による細胞増殖作用は、aromatase 阻害剤 (letrozole) によって抑制された。

- (5) 肺癌症例におけるアロマターゼ発現の臨床病理学的意義の検索： 非小細胞肺癌 105 例の検索において免疫組織化学で検索した腫瘍内アロマターゼは 89 例で陽性所見を示したが、症例の臨床病理学的因子とは有意の相関関係は示さなかった。これら 89 例のアロマターゼ陽性症例の中で 70 例が ER β 陽性所見を呈し有意の相関関係が認められた ($p < 0.05$)。更にアロマターゼ陽性所見を呈する肺癌症例での癌細胞における ER β の標識率は陰性例よりも有意に高かった。腫瘍細胞でアロマターゼと ER β 双方が陽性となる症例は

そうでない症例に比して有意に大きな腫瘍径を呈する事が示され ($p < 0.05$), 腫瘍内アロマターゼにより産生されたエストロゲンは腫瘍細胞の核に発現している $ER\beta$ を介して肺癌症例の生物学的動態に深く関与している事が示された。

- (6) 肺癌における EST/STS の発現動態の検索: ヒト非小細胞肺癌症例 59 例における STS/EST の免疫組織化学法による解析の結果、肺癌細胞のみに陽性所見が得られ、陽性率 35.6% だった。非腫瘍部では明らかな STS 発現の局在は確認できなかった。次に定量 PCR 法による発現確認を行ったが、腫瘍部と非腫瘍部とで STS の発現レベルは同程度であり、免疫組織化学法との結果と異なっていた。この発現がみられた STS promoter のスプライシング変異を解析したところ、乳癌特異的に発現しており、酵素活性が高いと考えられている $1a$ promoter の発現が腫瘍部のみで確認できた。一方非、腫瘍部では主に $1a$ promoter が発現していた。一方、EST の肺癌組織における発現解析では、免疫組織化学では 4 例のみ発現が認められ、定量的 PCR の結果においてもほとんどの症例で検出できなかった。非小細胞肺癌の STS 発現における間質細胞共存下の影響を更に検討したが、非小細胞肺癌細胞 LK87 と肺線維芽細胞 LK002S とを共培養した結果、単独培養に比べて LK87 の細胞数が増加していた。さらに LK87 の STS mRNA が増加していた事も認めた。

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 12 件)

- ① Sato R, Suzuki T, Katayose Y, Miura K, Shiiba K, Tatenno H, Miki Y, Akahira J, Kamogawa Y, Nagasaki S, Yamamoto K, Ii T, Egawa S, Evans DB, Unno M, Sasano H. Steroid Sulfatase and Estrogen Sulfotransferase in Colon Carcinoma: Regulators of Intratumoral Estrogen Concentrations and Potent Prognostic Factors. *Cancer Res.* 69:914-922 2009 査読: 有
- ② Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Kitada K, Ishida T, Handa H, Ohuchi N, Sasano H. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in human breast carcinoma: a prognostic factor via potential regulation of fattyacid synthesis. *Cancer Res.* 69:1392-1399 2009 査読: 有
- ③ Sasano H, Nagasaki S, Miki Y, Suzuki T. New developments in intracrinology of human breast cancer:estrogen sulfatase and sulfotransferase. *Ann NY Acad Sci.* 1155:76-79 2009 査読: 有
- ④ Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, Akahira J-I, Honma S, D.B. Evans, Hayashi S-I, Kondo T, Sasano H Intratumoral estrogen and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 14:4417-4426 2008 査読: 有
- ⑤ Suzuki T, Inoue A, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sasano H. Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocrine- Related Cancer* 14:279-292 2007 査読: 有
- ⑥ Yang XR, Pfeiffer RM, Garcia-Closas M, Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA, Peplonska B, Hewitt SM, Cartun RW, Mandich D, Sasano H, Evans DB, Sutter TR, Sherman ME. Hormonal markers in breast cancer: coexpression, relationship with pathologic characteristics, and risk factor associations in a population-based study. *Cancer Research* 67:10608-10617 2007 査読: 有
- ⑦ Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Yamaguchi Y, Kitada K, Honma S, Moriya T, Hirakawa H, Evans D B, Hayashi S, Ohuchi N, Sasano H. Aromatase localization in human breast

- cancer tissues - possible interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells.
Cancer Research 67:3945-3954 2007
査読：有
- ⑧ Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Akahira JI, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi SI, Sasano H.
5alpha-reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production.
International Journal of Cancer 120:285-291 2007 査読：有
- ⑨ Suzuki T, Inoue A, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sasano H.
Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor.
Endocrine-Related Cancer 14:279-292 2007 査読：有
- ⑩ Sasano H, Suzuki T, Moriya T.
Analysis of surrogate markers for target-specific therapy in breast carcinomas using archival materials.
Biomedicine & Pharmacotherapy 61:543-547 2007 査読：有
- ⑪ Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H.
Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: A possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. Bone 40:876-887 2007
査読：有
- ⑫ Miki Y, Suzuki T, Kitada K, Yabuki N, Shibuya R, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Blumberg B, Sasano H.
Expression of the steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma. Cancer Research 66:535-542 2006 査読：有
- ① H Sasano, Y Miki, R Shibuya, T Suzuki
Aromatase and in situ estrogen production in DCIS (ductal carcinoma in situ) of human breast
Ninth International Aromatase Conference 2008/10/13~10/17
Shanghai (China)
- ② S Nagasaki, T Suzuki, Y Miki, J Akahira, H Sasano
Immunolocalization of COUP-TF in human breast carcinoma: a possible prognostic factor
13th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2008/9/27~9/30
Quebec Hilton (Canada)
- ③ H Sasano, Y Miki, S Nagasaki, T Suzuki
Intracrinology of Estrogen and Androgens in Human Breast Carcinoma
13th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer 2008/9/29 Quebec Hilton (Canada)
- ④ Y Miki, S Nagasaki, S Hata, J-I Akahira, T Suzuki, H Sasano
Comparative Effects of Raloxifene, Tamoxifen and Estradiol on Human Osteoblast In Vitro.
The Endocrine Society's 90th Annual Meeting 2008/6/15~6/18
San Francisco Convention Center (USA)
- ⑤ 鈴木貴, 三木康宏, 赤平純一, 笹野公伸
ヒト組織中ステロイドホルモン測定 of 臨床的病理的有用性.
第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2007/11/24 長陵会館 (宮城)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹野 公伸 (SASANO HIRONOBU)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50187142

(2) 研究分担者

鈴木 聡 (SUZUKI SATOSHI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：50344669
(平成18年4月1日
ー平成19年3月31日まで)

(3) 連携研究者

鈴木 貴 (SUZUKI TAKASHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10261629

林 慎一 (HAYASHI SHIN-ICHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60144862

三木 康宏 (MIKI YASUHIRO)
東北大学・医学部・助教
研究者番号：50451521