

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07453

研究課題名(和文) ストレスホルモン代謝と癌化ポテンシャル

研究課題名(英文) The stress hormone and carcinogenic potential

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスと発癌の関係については多くの研究から示唆されているが、必ずしも科学的にそのメカニズムが説明されているわけではない。本研究ではストレスによって発現が誘導されるコルチゾールに着目した。子宮内膜癌において腫瘍中のコルチゾール濃度は、疲弊Tリンパ球や癌細胞の細胞老化マーカーの発現に関係することを明らかにした。ストレスはコルチゾールを介して、細胞老化を引き起こすだけでなく腫瘍免疫にも関与し、微小環境全体に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではコルチゾールが癌細胞の細胞老化に関わることを明らかにした。これまでの癌とストレス研究と本研究が異なる点は、本研究ではヒト組織標本を用いて実際の腫瘍局所でのコルチゾールを評価していることであり、学術的に新しい観点である。また、癌細胞の細胞老化に加え、Tリンパ球にも着目し、疲弊Tリンパ球とコルチゾールとの関連を明らかにした。多くの癌で免疫療法の効果が認められているが、Tリンパ球の疲弊とPD-1の発現との関連も報告されており、今回の成果から、癌免疫療法と抗コルチゾール、さらには抗ホルモン療法という新たな治療戦略を提唱できるのではと考えている。

研究成果の概要(英文)：Many studies have suggested a relationship between stress and carcinogenesis, but the mechanism remains unclear. In this study, we focused on the effects of cortisol, which secretion increases with stress. The results of this study revealed that in endometrial cancer, intratumoral cortisol concentration is related to the expression of cellular senescence markers in cancer cells. Intratumoral cortisol also affected the number of exhausted T lymphocytes in endometrial cancer microenvironment. It has been suggested that stress not only causes cellular senescence by increasing cortisol secretion, but also affects the entire microenvironment such as tumor immunity.

研究分野：病理学

キーワード：子宮内膜癌 ストレス 細胞老化 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

ストレスと発癌の関係については多くの研究から示唆されているが、必ずしも科学的にそのメカニズムが説明されているわけではない。我々はストレスホルモンであるコルチゾールに着目し、細胞への直接作用として細胞老化を引き起こすのではと考えている。この現象は癌化ポテンシャルと捉えることができ、我々はさらにこの現象にコルチゾールの組織局所での代謝機構の異常が関与しているのではないかと推測している。本課題では子宮内膜細胞をターゲットとし、「ストレス~コルチゾール~コルチゾール代謝異常~細胞老化」の一連の流れについて、培養細胞、ストレス・モデルマウス、ヒト組織を用いて明らかにすることを目的とする。本研究から、「ストレスと発癌」の化学的根拠が明らかとなり、ひいては癌の予防につながる情報を提示できるものと期待される。

我々はストレスホルモンであるコルチゾールを過剰産生する副腎皮質腺腫を対象に、腫瘍細胞に細胞老化が生じていることを報告した[Kitawaki Y, et al. Hum Pathol. 2018]。細胞老化を起こした細胞の多くが細胞周期の G1 期に停止し、DNA 合成を行うことができなくなってしまうことが知られており、この原因は Cyclin-dependent kinase 阻害因子である p16 や p21 の発現レベルが増加することに起因すると説明されている。我々の報告では、高コルチゾールに曝されている腫瘍細胞において、p16 および p21 の発現が高く、細胞老化マーカーである senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) の発現を確認した。細胞老化と癌化については諸説あるが、老化細胞から分泌される細胞老化関連分泌因子によって、周辺組織の癌化が促進されメカニズムが明らかにされている。

2. 研究の目的

通常のコルチゾールで発生したコルチゾールは、子宮組織において 11 β -HSD2 によって無害化されるが、過度あるいは持続するストレスによって、高コルチゾール状態が維持されると、11 β -HSD2 のダウン・レギュレーションが起こり、処理しきれなかったコルチゾールが上皮細胞の老化を引き起こす。本研究は上記仮説を実証するために、子宮内膜上皮培養細胞およびヒト組織標本を用い、コルチゾールによる発癌メカニズムの一つとして細胞老化現象を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 症例

子宮内膜癌 35 症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いた。これらの症例は凍結組織から液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) によって、癌組織中のエストロゲン (estrone, estradiol)、アンドロゲン (testosterone, 5 α -dihydrotestosterone (DHT), androstenedione) およびグルココルチコイド (cortisol, cortisone) の測定が行われており、本研究にはそれらのデータを利用した。LC-MS/MS による測定はあすか製薬メディカル (藤沢市、神奈川) で行われた。ヒト組織を用いる本研究に対しては、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認が得られている。

(2) 免疫組織化学

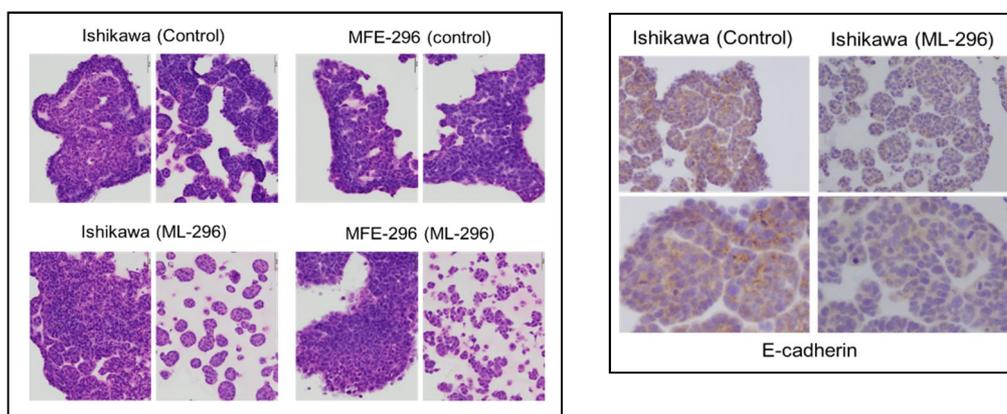
子宮内膜癌の FFPE 組織を対象に免疫組織化学によって、エストロゲン関連因子 (estrogen receptor (ER) α , ER β , aromatase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 2)、グルココルチコイド関連因子 (glucocorticoid receptor (GR), 11 β -HSD type 1, 11 β -HSD type 2)、アンドロゲン受容体 (androgen receptor (AR))、細胞老化マーカー (p16, p21) およびストレス関連因子 (Kruppel-like factor (KLF) 5, heterogeneous nuclear ribonucleic protein K (hnRNP K)) 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 (ヒストファインキット、ニチレイ、東京) にて行った。また、本研究では腫瘍免疫との関連を明らかにするため、T リンパ球マーカー (CD3 (成熟)、CD4 (ヘルパー)、CD8 (細胞傷害)、FOXP3 (調節) および TOX (疲弊)) についても同様に検討した。ミスマッチ修復因子 (MLH1, MSH2, MSH6) および P53 の発現についても、それぞれ免疫組織化学にて検討した。なお、ミスマッチ修復因子の一つである PMS2 については、研究期間中に染色条件を確定することができなかった。

(3) 培養細胞

KLF5 の検討には、子宮内膜癌培養細胞 Ishikawa および MFE-296 (American Type Culture Collection, USA) を使用した。KLF5 の管腔形成に及ぼす影響を確認するために、マトリゲル (Corning, USA) を用いた三次元培養を行った。三次元培養を行った細胞は、ホルマリン固定後、パラフィン包埋を行い FFPE サンプルを作成した。さらに KLF5 阻害剤 (CID-591923 および ML-263) を添加し、FFPE サンプルを作成して管腔形成への影響を確認した。通常の培養下で細胞に 5 α -DHT もしくは dexamethasone および cortisol を添加し、KLF5 の発現を定量的 PCR および western blotting にて確認した。

4. 研究成果

近年、Kruppel-like factor (KLF) ファミリーの細胞老化への関与が指摘されてきた。本研究でははじめに、データベース解析 (GEPIA2 : <http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) により KLF ファミリー (KLF1 ~ KLF17) の子宮内膜癌と正常内膜との遺伝子発現の比較を行った。その結果、KLF2、4、6、7、8、9、11、15 の発現が内膜癌より正常内膜で有意に高く、KLF5 のみが正常よりも癌で有意に高かった。子宮内膜癌組織における KLF5 の免疫組織化学による発現解析では、子宮内膜癌組織中の estrone、estradiol、androstenedione、cortisol および cortisone 濃度と KLF5 発現との関連は認められなかったが、testosterone および 5 α -DHT との有意な正相関を認めた。さらに免疫組織化学にて評価した AR 陽性群において、有意に KLF5 の発現が高かった。ER や GR 等の他のホルモン関連因子との関係は認められなかった。子宮内膜癌培養細胞 Ishikawa および MFE-296 に 5 α -DHT を添加することによって、KLF5 のタンパクおよび mRNA レベルでの有意な増加を認めたが、dexamethasone および cortisol の添加では変化が認められなかった。子宮内膜癌培養細胞を用いた三次元培養モデルでの解析では、Ishikawa (高分化型腺癌由来) および MFE-296 (中分化型) は三次元培養によって、管腔様構造を形成した (下左図)。KLF5 阻害剤 (ML-263) の添加によって、いずれもの管腔形成が低下し、Ishikawa においては E-cadherin のタンパクレベルでの低下が認められた (下右図)。なお、MFE-296 には E-cadherin の発現が認められなかった。hnRNP K については、エストロゲン (腫瘍内 estrone および estradiol 濃度と正相関、ER α と正の関係) との関係は認められたものの、ストレスホルモンをはじめとする他のホルモン関連因子との関係を見出すことは出来なかった。

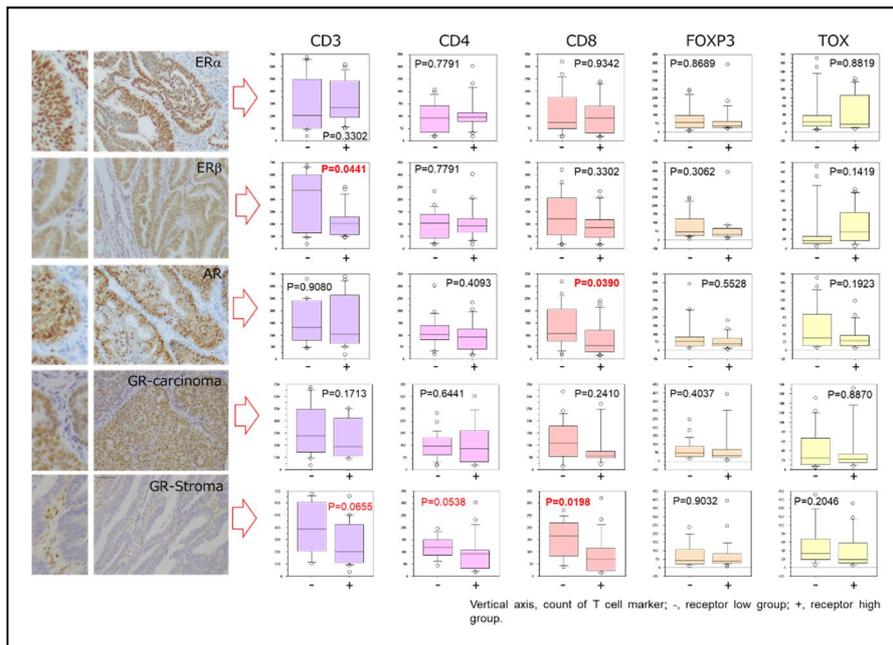
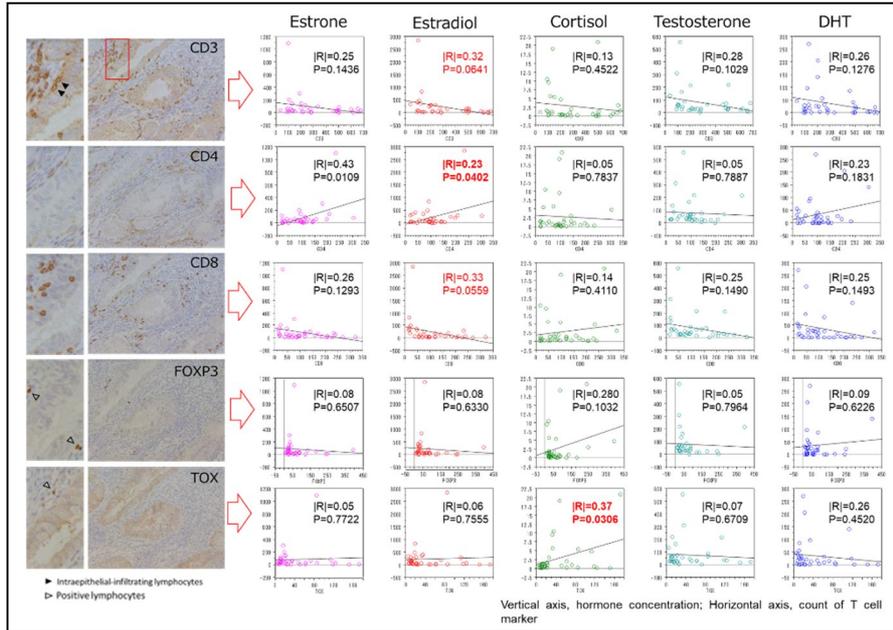


子宮内膜癌における腫瘍内ホルモン濃度と T リンパ球マーカーの発現との関係を検討した (次頁上図)。任意の 3 視野の腫瘍内 CD3 陽性細胞の数をカウントし、CD3 に対する比率を各マーカーの score とした。マーカー間の相関では、TOX と CD8 score に正相関が認められた。Type 2 (G3 および漿液性) と比較して Type 1 (G1 および G2) において、CD3 および CD8 スコアが有意に高かった。さらに本研究ではコルチゾール濃度と TOX に正相関が認められた。同様に、子宮内膜癌におけるホルモン受容体の発現と T リンパ球マーカーの発現との関係を検討した (次頁下図)。ホルモン受容体の評価としては、癌細胞 1000 細胞あたりの陽性細胞数 (labeling index) を計測し、labeling index の中央値で二群に分けた (中央値未満を陰性 ~ 弱陽性 (-)、中央値以上を強陽性 (+))。ER β 陽性群で CD3 が、AR 陽性群で CD8 がいずれも有意に低地を示した。GR については癌細胞と同様に間質細胞 (炎症細胞を除く) にも GR の発現が認められたため、同様に評価した。癌細胞 GR と T リンパ球マーカーとの関連は認められなかったが、間質細胞 GR 陽性群で CD3、CD4 および CR8 がそれぞれ有意に低地を示した。子宮内膜癌において、腫瘍局所におけるエストロゲンおよびアンドロゲンは CD4 陽性 T リンパ球の浸潤に影響すると考えられた。また、腫瘍局所のコルチゾールは浸潤性 T リンパ球に対して作用し、その老化に関与することが示唆された。さらに本研究から、子宮内膜癌における免疫療法とホルモン療法の併用療法の可能性が示唆されるが、コルチゾールの T リンパ球への老化作用がその効果に影響を及ぼすものと考えられる。

細胞老化マーカー (p16、p21)、ミスマッチ修復因子 (MLH1、MSH2、MSH6) および P53 の発現と腫瘍内ホルモン濃度、ホルモン関連因子との関係を検討した。ミスマッチ修復因子の発現と ER α との正の関係が認められたが、ER α は Type 2 (G3 および漿液性) と比較して Type 1 (G1 および G2) において発現が高いため、そのことに起因すると考えられる。一方で GR との関係については、有意な差には至らなかったが、ミスマッチ修復因子の発現は GR の発現と正の関係を示す傾向が認められた。ミスマッチ修復因子の発現と腫瘍内ホルモン濃度およびその他のホルモン関連因子との関連は認められなかった。P53 についてはいずれとも関連が無かった。細胞老化マーカー (p16、p21) については、ホルモン関連因子との関連は認められなかったが、p21 陽性群で腫瘍内コルチゾール値が有意に高く、p16 陽性群でコルチゾール値が高い傾向が認めら

れた。

本研究結果から、腫瘍局所でのストレスホルモンであるコルチゾールが、細胞老化に関わることが示唆された。さらにコルチゾールは腫瘍の T リンパ球の老化(疲弊)に関与することが示され、ストレスの癌化ポテンシャルを明らかにするためには、癌細胞のみならずストレスと腫瘍免疫との関連についても研究を進める必要がある。本研究では、ストレスの応答に関する遺伝子として KLF5 と hnRNPk に着目したが、いずれもコルチゾールとの関連を見出すことができなかった。今後、免疫細胞を含めた微小環境へのストレスの影響、さらに遺伝子発現を含めたメカニズムの解明、エストロゲンやアンドロゲンとの関係を明らかにすることが課題である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miki Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 New Insights into Breast and Endometrial Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2595 ~ 2595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12092595	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, Iwabuchi Erina, Takagi Kiyoshi, Suzuki Takashi, Sasano Hironobu, Yaegashi Nobuo, Ito Kiyoshi	4. 巻 231
2. 論文標題 Co-expression of nuclear heterogeneous nuclear ribonucleic protein K and estrogen receptor in endometrial cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 153795 ~ 153795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2022.153795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三木康宏	4. 巻 107
2. 論文標題 災害ストレスと婦人科疾患の関連	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本産婦人科医会研修ノート	6. 最初と最後の頁 62 ~ 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuhiro MIKI, Erina IWABUCHI, Kiyoshi TAKAGI Takashi SUZUKI, Hironobu SASANO, Kiyoshi ITO
2. 発表標題 Microtubule-Associated Protein 2 as a DHEA Binding Protein in Endometrial Cancer
3. 学会等名 ENDO2021 - The 103th Annual Meeting of The Endocrine Society - (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木康宏、大沼楓佳、高木清司、岩淵英里奈、鈴木 貴、笹野公伸、伊藤 潔
2. 発表標題 子宮内膜癌における組織中ステロイドホルモン濃度とTリンパ球サブタイプ
3. 学会等名 第28回日本ステロイドホルモン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木康宏、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の直接作用に関する検討
3. 学会等名 第25回 日本生殖内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三木康宏、岩淵英里奈、高木清司、鈴木 貴、笹野公伸、伊藤 潔
2. 発表標題 子宮内膜癌におけるMAP2の発現とDHEAとの関係
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020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intracrineとホルモン受容体シグナルの可視化
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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 日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木康宏
2. 発表標題 Protein-protein interaction検出技術によるステロイドホルモン・シグナルの可視化
3. 学会等名 第 27 回日本ステロイドホルモン学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三木康宏、高木清司、鈴木 貴、伊藤 潔
2. 発表標題 子宮内膜癌におけるKruppel-like factor 5 (KLF5) の発現
3. 学会等名 第24回 日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuhiro MIKI, Fuka ONUMA, Kiyoshi TAKAGI, Erina IWABUCHI, Takashi SUZUKI, Hironobu SASANO, Kiyoshi ITO
2. 発表標題 Correlation between T cell infiltration subtypes and intratumoral hormone levels in endometrial cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Miki, Erina Iwabuchi, Kiyoshi Takagi, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano, Kiyoshi Ito
2. 発表標題 Co-Expression of Nuclear Heterogeneous Nuclear Ribonucleic Protein K and Estrogen Receptor in Endometrial Cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木康宏
2. 発表標題 子宮内膜癌における Intracrinology
3. 学会等名 仙台内分泌フォーラム2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木康宏
2. 発表標題 災害ストレスの健康への影響
3. 学会等名 第42回日本内分泌学会東北支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------