

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790271
研究課題名 (和文) 肺癌と喫煙との関係：タバコ煙成分と核内受容体・応答遺伝子との関連
研究課題名 (英文) Lung cancer and Smoking: Effect of cigarette smoke extra on nuclear receptors
研究代表者
三木 康宏 (MIKI YASUHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50451521

研究成果の概要 (和文)：

近年、肺癌におけるエストロゲン依存増殖機構が注目されている。タバコ煙成分は直接エストロゲン受容体に結合し、またエストロゲン合成酵素を誘導することで肺癌局所でのエストロゲン濃度を増加させること明らかとなった。エストロゲン合成酵素の誘導には喫煙によって増加したサイトカインの関与も重要であると考えられた。以上、喫煙は肺癌局所でのエストロゲン環境を攪乱し、エストロゲン依存性を直接的・間接的に助長すると示唆される。

研究成果の概要 (英文)：

Recently, sex steroid hormones such as estrogen have been considered to play some roles in lung cancer. In this study, we demonstrated that cigarette smoke condensate (CSC) has estrogenic action through the estrogen receptor *in vitro*. In lung carcinoma patients, a correlation was found between the patients smoking history and CYP19 expression evaluated using quantitative RT-PCR. Results from our study suggested that CYP19 expression might be increased smoking through the cytokine signal. These findings all suggested that smoking might stimulate the estrogen signals directly and /or indirectly in lung carcinoma tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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、喫煙、核内受容体、エストロゲン、CYP19

1. 研究開始当初の背景

喫煙者は非喫煙者よりも肺癌による死亡率が高いことは国内外を問わず周知の事実として認識されている。この原因として喫煙

に伴う煙・タール中に微量に含有されている発がん物質があげられており、特に benzo (a) pyrene を代表とする多環芳香族炭化水素、ニトロソノルニコチンのようなニトロソ化合

物が考えられている。これら発がん物質は体内にて代謝酵素による触媒を受けるが、この酵素活性のバランスが発癌に際して重要となる (Bartsch H *et al.*, *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 2000)。また、これら酵素の発現調節には種々の核内受容体が大きく関与している。しかし、実際のヒト正常肺もしくは肺癌組織での、喫煙と核内受容体の関係についての知見は乏しい。肺組織での喫煙と核内受容体の関連では、唯一、aryl hydrocarbon receptor (AhR) とその応答遺伝子 CYP1A1 の解析が報告されてきているが (Smith GB *et al.*, *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 2001; Hayashi S *et al.*, *Carcinogenesis*, 1994)、その他の関連する核内受容体については不明な点が多い。

申請者らは薬物代謝酵素 (第 I 相、第 II 相酵素) の regulator として重要な役割を担っている Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) がタンパクおよび遺伝子レベルで正常ヒト肺組織に認められることを報告 (Miki Y *et al.*, *Mol Cell Endocrinol*, 2005) し、大気中の汚染物質と直接接する肺組織での代謝に SXR が重要な役割を担うことを初めて示した。

近年、エストロゲンに依存した肺癌の増殖が注目されており、実際に肺癌患者を対象とした抗エストロゲン療法に関する臨床試験が実施されている。また、申請者らはプロゲステロンの肺癌に対する増殖抑制効果、肺癌組織における aromatase と estrogen receptor β の発現意義についてそれぞれ報告してきた (Ishibashi H *et al.*, *Cancer Res*, 2005; Abe K *et al.*, *Hum Pathol*, 2010)。以上のことから性ホルモン受容体を含めた核内受容体が肺癌の病態に大きく関与し、喫煙が何らかの核内受容体シグナルに対する攪乱作用を示すことが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では以下の検討を行い、肺/肺癌における核内受容体シグナルおよびエストロゲンシグナルに対する喫煙の攪乱作用を明らかにすることを目的とした。

- (1) タバコ煙抽出液の核内受容体依存性転写活性への影響
- (2) 肺癌組織におけるエストロゲン合成と喫煙歴との関連
- (3) タバコ煙抽出液のエストロゲン合成酵素の発現に対する影響
- (4) エストロゲン合成酵素の発現に対する炎症性サイトカインの影響

3. 研究の方法

- (1) タバコ煙抽出液の核内受容体依存性転写活性への影響

国内で市販されているタバコから、ガス洗浄瓶 (ガラスフィルター付き、ポアサイズ

100 ~ 160 μ m) を用いて煙成分を溶媒 (DMSO) 中に抽出した。20 本分を 50mLDMSO に抽出/濃縮し、これを cigarette smoke condensate (CSC) とした。

HEK293 に転写因子である核内受容体 [steroid and xenobiotic receptor (SXR), constitutive androstane receptor (CAR), retinoid X receptor (RXR) α , RXR β , RXR γ , estrogen receptor (ER) α , ER β , androgen receptor (AR), progesterone receptor (PR), estrogen-related receptor (ERR) α , ERR β , ERR γ , peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α , PPAR β , PPAR γ] とそれぞれの認識配列 (転写開始に必要な配列を含む)、ルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を導入した。1/200~1/204800 希釈した CSC を各細胞に添加し、Luc 活性を測定した。

- (2) 肺癌組織におけるエストロゲン合成と喫煙歴との関連

ヒト組織を用いた喫煙の影響に関しては、種々の核内受容体による転写調節を受けることが知られているエストロゲン合成酵素である CYP19 (aromatase) の発現に注目した。肺癌組織 (59 例) から癌部および非癌部をそれぞれ採取し、凍結保存した。非癌部は病理組織学的に癌細胞が存在しないことを確認し、検討に使用した。定法にて RNA 抽出・cDNA 作成を行い、CYP19 の発現を定量的 PCR にて確認した。喫煙の評価は Brinkman 指数 (BI; 一日の喫煙本数に喫煙年数を乗じて得られる数値) を用い、BI と CYP19 mRNA の発現との相関を解析した。なお、本検討ではヒト組織を使用したため、研究遂行に先立って研究プロトコールについて東北大学・医学系研究科/医学部 倫理委員会の承認を得た。

- (3) タバコ煙抽出液のエストロゲン合成酵素の発現に対する影響

(1) で作成した CSC を用い、あらかじめ肺癌 (もしくは正常上皮) 培養細胞に対する無毒性用量を細胞増殖に対する影響 (WST-8 assay) にて検討した。培養細胞は肺癌由来 A549、正常気管支上皮由来 BEAS-2B を用いた。これら培養細胞に CSC 無毒性用量を添加 (72 時間) し、エストロゲン合成・代謝酵素である CYP19、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type1 および 17 β -HSD type2 の発現変動を定量的 RT-PCR にて確認した。

- (4) エストロゲン合成酵素の発現に対する炎症性サイトカインの影響

喫煙は種々の炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されている (Yanbaeva DG *et al.*, *Chest*, 2007)。本件では CYP19 の発

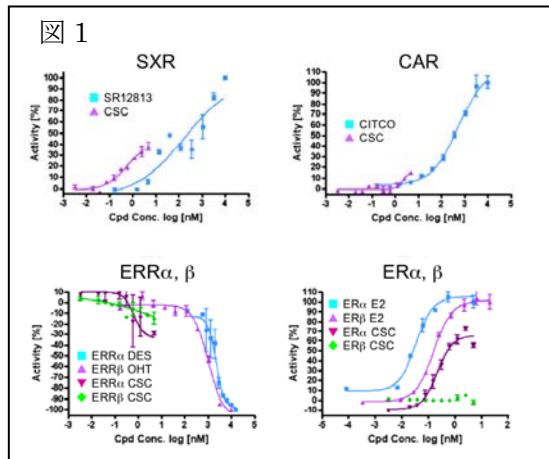
現に対するサイトカイン (IL-6, oncostatin M, TNF- α) の影響を確認した。サイトカインはヒトリコンビナントサイトカインを用い、肺癌培養細胞 A549 および LK87 に添加した。添加 72 時間後に CYP19 の発現を定量的 RT-PCR にて確認した。また、A549 の CYP19 タンパク発現に対する oncostatin M の影響を免疫染色にて評価した。A549 を直接染色用のガラスに培養し、oncostatin M 添加 72 時間後に免疫染色を行った。抗体は抗ヒト CYP19 monoclonal 抗体 (#677) を用いた。反応後のガラスはスキャナーでデジタル画像化し、その発色強度を Multi Gauge software にて数値化した。

4. 研究成果

(1) タバコ煙抽出液の核内受容体依存性転写活性への影響

SXR, CAR および ER α において、コントロールと比して有意な Luc 活性の増加が CSC 濃度依存性に認められた。ERR α および ERR γ に関しては agonist である diethylstilbestrol (DES) および tamoxifen (OHT) による転写をそれぞれ抑制する antagonist 作用が観察された。その他の検討した核内受容体においては、CSC 添加による変化は認められなかった。以上、データを図 1 に示した。

SXR および CAR はそれぞれ薬物代謝酵素群の発現を制御しており、これらの酵素群によって CSC に含まれる化学物質が代謝されると考えられた。また、CSC は ER α の直接的なリガンドとなり得ることが明らかとなり、また、ERRs の阻害作用を有することが明らかとなったが、その本体となる化学物質の同定が今後の課題である。



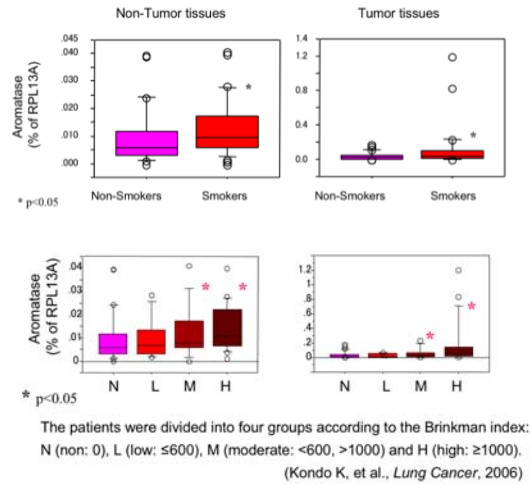
(2) 肺癌組織におけるエストロゲン合成と喫煙歴との関連

肺癌組織における CYP19 の定量的 PCR の検討では、非癌部と比較して癌部で有意に

CYP19 の発現が高かった。喫煙との関係では、非癌部と癌部のいずれにおいても BI の高い症例で CYP19 の発現が有意に高かった。以上、データを図 2 に示した。

臨床検体を用いて、喫煙が肺癌の局所のエストロゲン環境を促進していることが明らかとなった。

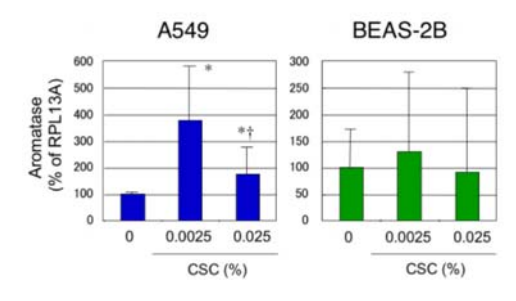
図 2



(3) タバコ煙抽出液のエストロゲン合成酵素の発現に対する影響

CSC の A549 に対する影響では、0.025% CSC 添加によって 17 β -HSD type1 および 17 β -HSD type2 mRNA の発現が有意に増加した。一方、A549 の CYP19 mRNA の発現に対しては、更に低濃度の 0.0025% CSC によって有意な増加が認められた。BEAS-2B に対する影響では、CYP19 mRNA の発現が増加傾向を示したのに対し、17 β -HSD type1 および 17 β -HSD type2 mRNA の発現に変動は無かった。以上、CYP19 に関するデータを図 3 に示した。

図 3

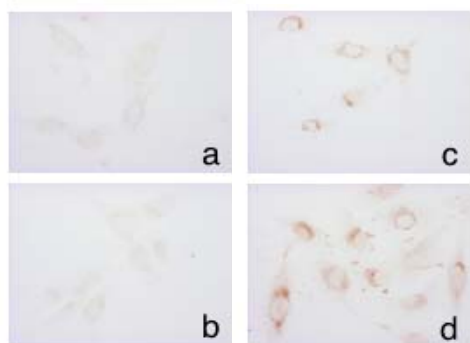


(4) エストロゲン合成酵素の発現に対する炎症性サイトカインの影響

oncostatin M は A549 および LK87 において、

IL-6 は A549 のみで Arom の発現を誘導した (定量的 PCR)。TNF- α はいずれの株においても Arom 発現に影響しなかった (定量的 PCR)。タンパクレベルでの検討では、control の A549 には CYP19 タンパクの発現を認めなかったが、Oncostatin M の添加によって細胞質にその発現を確認することができた (図 4)。また、高濃度 (50ng/mL) の oncostatin M の添加によって顕著な CYP19 タンパクの発現が認められた。数値化データの比較においても、高濃度 oncostatin M 添加によって control、低 (0.5ng/mL) -中濃度 (5ng/mL) oncostatin M 添加と比して CYP19 発現に有意な差が認められた。

図 4



a. Control; b. 0.5ng/mL; c. 5ng/mL; d. 50ng/mL oncostatin M

近年、肺癌における増殖因子としてのエストロゲンの作用が注目されており、エストロゲン受容体阻害剤や CYP19 阻害剤の適応が検討されている。本研究結果から CSC は直接エストロゲン受容体に結合することによってエストロゲン作用をもたらし、また、CYP19 の発現を誘導することによって肺癌局所でのエストロゲン合成を促進することが明らかとなった。また、喫煙は種々のサイトカインの発現を調節し、間接的に CYP19 の発現を誘導することが示唆された。培養細胞を用いた検討では、17 β -HSD type1 および 17 β -HSD type2 の発現も喫煙によって変動することが示唆された。しかし 17 β -HSD type1 および 17 β -HSD type2 の肺/肺癌における役割は未だ明らかではなく、これらの酵素を含めて種々のステロイドホルモン合成・代謝経路のマッピングが、肺/肺癌のホルモン依存性と喫煙の関係の解明に不可欠である。また、正常肺における喫煙の影響として、今後、CYP19 を中心としたエストロゲンシグナルと喫煙の発癌との関連について更なる検討が必要である。

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 0 件)

[学会発表] (計 14 件)

1. Yasuhiro MIKI, Takashi SUZUKI, Keiko ABE, Satoshi SUZUKI, Shuko HATA, Jun-ichi AKAHIRA, Hironobu SASANO: Regulation of aromatase expression by intratumoral stromal cell-derived factors in lung carcinoma cells: 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) 2010.3.30 Kyoto
2. Mohit K. VERMA, Yasuhiro MIKI, Keiko ABE, Hiromichi NIKAWA, Hironobu SASANO: Estrogen receptor β in human non-small cell lung carcinoma: Cytoplasmic ER β as a potential prognosis marker: 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) 2010.3.30 Kyoto
3. Hideaki KAKINUMA, Yasuhiro MIKI (Presentation), Keiko ABE, Satoshi SUZUKI, Jun-ichi AKAHIRA, Takashi SUZUKI, Hironobu SASANO: Expression of steroid sulfatase in human non-small cell lung carcinoma: 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) 2010.3.30 Kyoto
4. 三木康宏、鈴木 貴、阿部桂子、鈴木 聡、笹野公伸: エストロゲン環境の攪乱を介した喫煙の肺癌プログレッション作用: 第 83 回日本内分泌学会学術総会 2010.3.26 京都市
5. 三木康宏、森 一茂、岡部尚文、阿部佳子、赤平純一、鈴木 貴、笹野公伸: Human lung cancer microenvironment: Effects of intratumoral stromal cells on cell proliferation of carcinoma cells.: 第 68 回日本癌学会学術総会 2009.10.2 横浜市
6. 三木康宏、阿部佳子、鈴木 貴、鈴木 聡、赤平純一、笹野公伸: 肺癌における aromatase の発現とその誘導因子の検討: 第 10 回ホルモンと癌研究会 2009.8.1 仙台市
7. 三木康宏、新井川弘道、鈴木 聡、端 秀子、阿部佳子、鈴木 貴、笹野公伸: 肺癌における aromatase の発現と喫煙の影響: 第 17 回バイオフィジオロジー研究会 2009.3.6 金沢市
8. 三木康宏、新井川弘道、森 一茂、鈴木 貴、赤平純一、鈴木 聡、岡部尚文、近藤 丘、笹野公伸: 肺癌組織における微小環境: 癌細胞増殖における間質細胞の影響: 第 46 回 日本癌治療学会総会 2008.10.31 名古屋

9. 三木康宏、鈴木 貴、赤平純一、阿部佳子、
笹野公伸: Aromatase as a possible target for
human lung cancer therapy: 第67回日本癌学
会学術総会 2008.10.28 名古屋市

10. Yasuhiro. MIKI, Hiromichi NIKAWA,
Keiko ABE, Satoshi SUZUKI, Shuko HATA,
Jun-ichi AKAHIRA, Takashi SUZUKI,
Hironobu SASANO: Proliferative effect of
estrogen on human lung cancer in vitro
-Aromatase as a possible target for human lung
cancer therapy-: 13th International Congress
on Hormonal Steroids and Hormones &
Cancer 2008.9.10 Quebec City (Canada)

[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・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50451521

(2) 研究協力者

阿部 佳子 (ABE KEIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80455782

(3) 研究協力者

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

(4) 研究協力者

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

(5) 研究協力者

赤平 純一 (AKAHIRA JUN-ICHI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90359505