

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790337

研究課題名（和文） 肺線維化機構における性ステロイドホルモンの関与

研究課題名（英文） The effects of sex steroid hormones on human pulmonary fibrosis

研究代表者

三木 康宏 (MIKI YASUHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50451521

研究成果の概要（和文）：

間質性肺炎／肺線維症組織において、エストロゲンが組織中で産生されていることを初めて明らかにした。そのエストロゲン産生には、肺胞上皮細胞に発現するアロマターゼが関与していると考えられた。マウスを用いた検討では、アンドロゲン依存性にホスホジエステラーゼ mRNA が増加し、肺の循環動態に影響をおよぼしていると考えられた。以上、間質性肺炎／肺線維症組織に対し、性ステロイドホルモンが病態形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This is the first study to demonstrate tissue concentration of estrogen in human interstitial pneumonia (IP) / lung fibrosis tissues. Results from this study suggest that estradiol concentration in IP tissue is increased by aromatase, which is located in alveolar epithelial cells. In the result of mice model, expression level of phosphodiesterase mRNA in lung tissue was increased through the androgen signal. These results all suggest that sex steroid hormones, estrogen and androgen may play an important role in the development of IP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：肺線維症、間質性肺炎、エストロゲン、aromatase

1. 研究開始当初の背景

性ステロイドホルモンであるエストロゲンとアンドロゲンは、男女の生殖器に作用するだけではなく、多くのヒト疾患に関与していることが明らかとなってきた。乳癌では抗

エストロゲン剤が治療薬として役立てられており、高い奏効性が認められている。近年我々は、aromatase が主に乳癌細胞の周囲の間質細胞（線維芽細胞）に優位に発現することを報告し (Miki Y, et al., *J Steroid Biochem Mol*

Biol. 2007; Miki Y, *et al.*, *Cancer Res.* 2007)、間質細胞がエストロゲンシグナルに重要な役割を担っていることを示した。このことから、癌組織中のエストロゲン環境を知る上では、その組織を構成細胞：線維芽細胞や炎症細胞との関係を明らかにすることが重要であると考えられる。一方、肺の非腫瘍性疾患である間質性肺炎 (IP: interstitial pneumonia) / 肺線維症は、炎症細胞の浸潤や線維芽細胞の増生を特徴とし、各々の構成細胞の相互・総合作用が病態形成につながるのではと考えられている。

乳癌患者を対象に、乳癌細胞に対して抗エストロゲン作用を有するタモキシフェンが、放射線療法による肺線維症のリスクを高めることが報告された (Bentzen SM. *et al.*, *J Natl Cancer Inst.* 1996; Koc M. *et al.*, *Radiother Oncol.* 2002)。肺線維症マウスの解析では、その病態生成は雌より雄のほうが有意であることが報告された (VOLTZ JW. *et al.*, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008)。さらに、卵巣摘出マウスは対照マウスに比して、有意にブレオマイシン投与による肺線維症を誘発することが報告された (Tofovic SP. *et al.*, *Vasc Pharmacol.* 2009)。以上のことから、肺線維症の形成にはホルモンが関与すると考えられるが、そのシグナルを発揮するたのホルモン受容体の存在を含めた詳細な作用機序は明らかではない。

2. 研究の目的

「IP/肺線維症組織を構成している細胞に対し、その病態形成にエストロゲンおよびアンドロゲンが関与するのか？」この課題について病理組織標本および動物モデルを用いて解明する。本課題では IP/肺線維症の発生と形成におけるホルモンの関与を明らかにし、新たな薬物療法としての (抗) エストロゲン/アンドロゲン療法の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺組織：

東北大学病院病理部にて保存している肺組織を使用した。IP 組織は 10%ホルマリン固定・パラフィン包埋 (FFPE) 組織 26 症例および未固定凍結組織 10 症例をそれぞれ用いた。また、比較対象として、非 IP 肺炎 (FFPE 23 症例) を用い、また、肺癌の腫瘍を含まない組織を正常肺 (FFPE 21 症例、凍結組織 10 症例) として使用した。本研究計画書は東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得ている。

(2) 免疫組織化学

FFPE ヒト肺組織を対象に、ヒストファイキット (ニチレイ、東京) を用いた免疫組織化学にて aromatase と ER β の発現を検討した。免疫組織化学に使用した一次抗体は次のとおりである。Aromatase : mouse monoclonal #677 [Novartis Pharmaceutical より供与]、ER β : mouse monoclonal 14C8 (GeneTex, San Antonio, USA)。

Aromatase の発現については、その発現の有無によって aromatase 陽性例と陰性例とした。ER β の発現については、肺上皮細胞もしくは細気管支上皮細胞それぞれ 500 細胞における陽性細胞数を計測し、その割合 (LI: Labeling Index) で評価した。

(3) ステロイドホルモン濃度測定

凍結ヒト肺組織を対象に、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS: Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry) にて estrone、estradiol、testosterone の組織中濃度を測定した。LC-MS/MS 解析はあすか製薬メディカル (川崎市) に委託した。

(4) マウス肺組織

卵巣もしくは精巣を摘出した C57BL/6 マウスを各 3 頭、対象として同系統のシャム手術マウスを各 3 頭それぞれ入手し、安楽致死後、肺組織を摘出した (ユニータック、柏市)。摘出した肺組織は、凍結後、-80°C にて保存した。

(5) 定量的 PCR

マウス凍結組織をホモジナイズし、RNA を抽出した。Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN Hilden, Germany) にて cDNA を作成し、LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用い、アンドロゲン受容体 (AR: androgen receptor) およびホスホジエステラーゼ・タイプ 5 (PDE5: phosphodiesterase type5) の定量的 PCR を行った。AR および PDE5 の発現量は同組織における Internal Control である RPL13A の発現に対する割合として評価した。

(6) 統計解析

統計解析は StatView 5.0 J software (SAS Institute, Cary, USA) を用い、ウィルコクソン検定、ピアソンのカイ二乗検定を行った。

4. 研究成果

(1) 正常肺、IP および non-IP 組織における aromatase および ER の発現

① aromatase (図 1)

正常肺組織では細気管支上皮細胞において aromatase の発現が認められたが、その発強度は低かった。一方、正常肺の肺胞上皮細胞では aromatase の発現は認められなかった。一方、IP 組織では、細気管支上皮細胞および肺胞上皮細胞ともに強い aromatase の発現を認めた。また、non-IP 組織では、正常肺と同様の aromatase の発現パターンを示した。

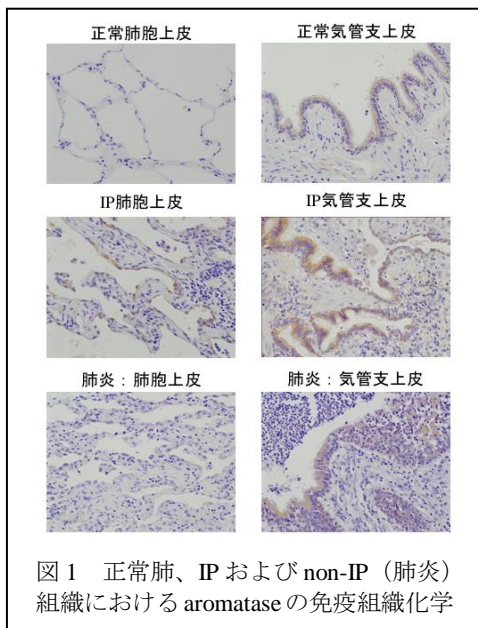


図 1 正常肺、IP および non-IP (肺炎) 組織における aromatase の免疫組織化学

② ER (図 2)

正常肺、IP および non-IP 組織においても ERβ の発現を認めた。スコア化した ERβ の発現を各組織間で比較すると、肺胞上皮細胞では IP 組織での ERβ の発現が non-IP や正常肺に比べると、有意に高い値を示した。一方、細気管支上皮細胞では、各組織間での ERβ の発現に有意な差は認められなかった。

(2) IP 組織における estrone、estradiol および testosterone 濃度 (図 3)

IP 組織における estradiol 濃度は、正常肺と比較して有意に高値を示した。一方、estrone 濃度については、両組織において有意な差は認められなかった。Testosterone 濃度は estradiol とは逆に、正常肺組織に比べて IP 組織で有意に低値を示した。Aromatase 活性を現す estradiol/testosterone 比では、IP 組織において正常肺と比較して有意に高値を示した。各ホルモン濃度の値は表にまとめた。

Aromatase 免疫組織化学陽性例では陰性例に比べ、組織中の estradiol 濃度が有意に高かった。Estradiol の濃度は次のとおりである

[median (minimum-maximum)]: Aromatase 陽性例 : 134 (53-954) pg/g、Aromatase 陰性例 : 28 (4-741) pg/g。

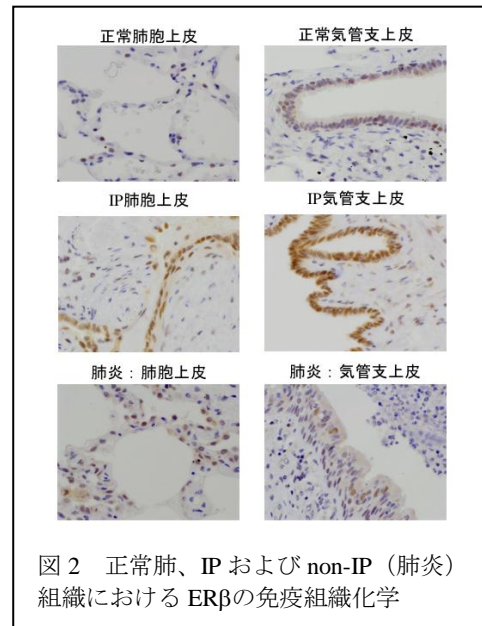


図 2 正常肺、IP および non-IP (肺炎) 組織における ERβ の免疫組織化学

表 IP および正常肺組織におけるホルモン濃度

	Estrone		Estradiol		Testosterone	
	median	Min-Max	median	Min-Max	median	Min-Max
IP	38	11-1056	389	35-954	191	93-426
正常	221	97-534	26	4-97	904	487-1861

単位 : pg/g

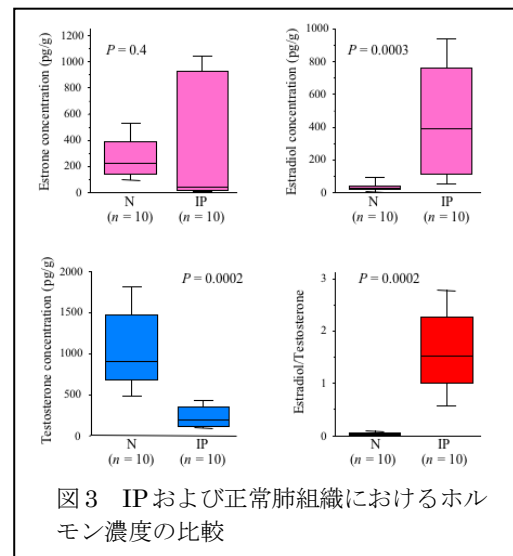


図 3 IP および正常肺組織におけるホルモン濃度の比較

(3) マウス肺組織における PDE5 の発現 (図 4)

雄では、精巣摘出によって PDE5 mRNA の発現が有意に低下した。一方、メスでは逆に、卵巣摘出によって PDE5 mRNA の発現が有意に増加した

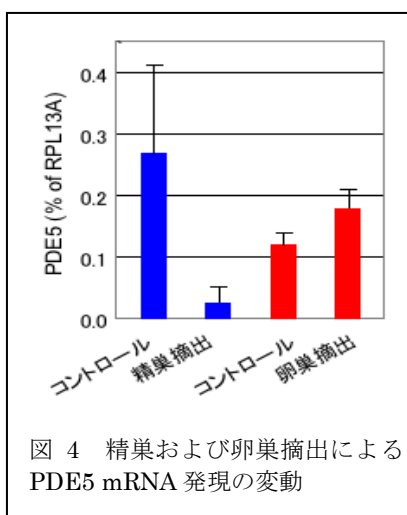


図 4 精巣および卵巣摘出による PDE5 mRNA 発現の変動

正常肺においてエストロゲンはその機能と疾患に対して重要な役割を担っていることが知られている (Verma M, et al, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011)。ER 欠損マウスを用いた解析では、雌マウスでは肺胞形成にエストロゲンシグナルが必要であることが明らかにされている (Massaro D, et al, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 and 2006)。また、アレルゲンを投与した雌マウスでは、気管支炎が雄マウスより著しく、卵巣の摘出によってその気管支炎は雄マウスレベルにまで抑えることができる (Hayashi T, et al, *Scand J Immunol*. 2003)。IP ではまず始めに肺胞上皮細胞の損傷と活性が生じると考えられており、活性化された肺胞上皮細胞からは transforming growth factor- β (TGF- β)、platelet-derived growth factor (PDGF)、endothelin-1 (ET-1)、tumour necrosis factor- α (TNF- α) epidermal growth factor (EGF)などの線維芽細胞増殖に関与するサイトカインが放出される (Selman M, et al, *Proc Am Thorac Soc*. 2006; Willis BC, et al, *Proc Am Thorac Soc*. 2006; Strieter RM, et al, *Chest*. 2009)。これらのサイトカインとエストロゲンシグナルの関係については多くの組織・臓器での検討が行われているが、組織・臓器特異性のために統一した見解は得られていない。たとえば TGF- β は ER α シグナルによって抑制されることが乳腺組織で報告されているが (Band AM, Laiho M. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011)、一方、ドパミンの作用を抑制したマウスにエストロゲンを投与すると著しい TGF- β の活性が認められる (Recouvreux MV, et al, *Endocrinology*. 2011)。肺組織におけるこれらのサイトカインとエストロゲンシグナル、特

に ER β を介した肺線維化との関係について明らかにすることが今後の課題である。

本研究では、精巣摘出マウスでは肺組織中の PDE5 が著しく減少することを確認した。また、逆に卵巣摘出によって PDE5 の発現は増加した。PDE5 は肺動脈平滑筋に発現し、その阻害が肺動脈性肺高血圧症の経口治療薬として用いられている (肺高血圧症治療ガイドライン)。PDE5 は cGMP を分解することによって平滑筋の弛緩を妨げるが、PDE5 を阻害することによって、肺動脈平滑筋が弛緩し、肺動脈圧及び肺血管抵抗が低下する。今回の結果から PDE5 は肺組織においてはアンドロゲン依存性に発現することが示唆された。PDE は 11 のサブタイプが知られて折り、PDE 阻害作用を有する薬剤は、心不全や高血圧症、気管支喘息や慢性閉塞性肺炎患、さらには間質性肺炎の治療薬として期待されている。PDE5 と間質性肺炎や肺線維化との関連は明らかにされていないが、本研究結果から、性ステロイドホルモンと PDE の関係が新たな肺線維化のメカニズムとして関与する可能性が示唆される。

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 7 件)

1. Yasuhiro Miki, Katsuhiko Ono, Shuko Hata, Takashi Suzuki, Hiroyuki Kumamoto, Hironobu Sasano. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012. In press. 査読あり
2. Mohit K. Verma, Yasuhiro Miki, Keiko Abe, Hiromichi Niikawa, Hironobu Sasano. Cytoplasmic estrogen receptor β as a potential marker in human non-small cell lung carcinoma. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Mar;16 Suppl 1:S91-S102. 査読あり
3. Mohit K. Verma, Yasuhiro Miki, Hironobu Sasano. Sex steroid receptors in human lung diseases. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov;127(3-5):216-222. 査読あり
4. Mohit K. Verma, Yashiro Miki, Hironobu Sasano. Aromatase in human lung carcinoma. *Steroids*. 2011 Jul;76(8):759-764. 査読あり
5. 三木康宏, 笹野公伸. 肺癌とエストロゲン. *医学のあゆみ*. 2011 238(11): 1080-1081. 査読なし

6. **Yasuhiro Miki**, Keiko Abe, Satoshi Suzuki, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano. Suppression of estrogen actions in human lung cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Jul 4;340(2):168-174. 査読あり

7. **Yasuhiro Miki**, Takashi Suzuki, Keiko Abe, Satoshi Suzuki, Hiromichi Niikawa, Shinya Iida, Shuko Hata, Jun-ichi Akahira, Kazushige Mori, Dean B. Evans, Takashi Kondo, Hisafumi Yamada-Okabe, Hironobu Sasano. Intratumoral localization of aromatase and interaction between stromal and parenchymal cells in the non-small cell lung carcinoma microenvironment. *Cancer Res.* 2010 Aug 15;70(16):6659-6669. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1. **三木康宏**, 鈴木 貴, 熊本裕行, 笹野公伸. 肺癌におけるエストロゲンと喫煙の関係. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011.10.5 名古屋

2. 仁平開人, 飯田慎也, **三木康宏**, 小林 誠, 笹野公伸. 非小細胞肺癌におけるオートファジー関連因子 p62 のエストロゲン依存性制御. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011.10.5 名古屋市

3. Mohit K. Verma, **Yasuhiro Miki**, Keiko Abe, Hiromichi Niikawa, Hironobu Sasano. Cytoplasmic estrogen receptor b as a potential prognosis marker in human non-small cell lung carcinoma. 第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー 2011.7.8 仙台市

4. **三木康宏**, 端 秀子, 鈴木 貴, 熊本裕行, 笹野公伸. タバコ煙抽出液の核内受容体リガンド活性. 第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー 2011.7.8 仙台市

5. 谷内真司, 鈴木 貴, **三木康宏**, 阿部佳子, 藤島史喜, 中村保宏, 佐藤聡子, 笠島敦子, 石田和之, 渡邊みか, 笹野公伸. 間質性肺炎におけるエストロゲン受容体とアロマターゼの発現. 第 100 回日本病理学会総会 2011.4.29 横浜市

6. Mohit K. Verma, **Yasuhiro Miki**, Keiko Abe, Hiromichi Niikawa, Hironobu Sasano. Estrogen receptor beta and aromatase in lung cancer: co-expression associated with gender dependent clinical outcome. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010.9.24 大阪市

7. **三木康宏**, 鈴木 貴, 阿部佳子, 飯田慎也, 赤平純一, 笹野公伸. 肺癌におけるアロマ

ターゼ発現に対する癌間質細胞の影響. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010.9.24 大阪市

8. **三木康宏**, 阿部佳子, 鈴木 貴, 笹野公伸. 肺癌における性ステロイドホルモンの作用 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (シンポジウム 1「ステロイドホルモンとその受容体の組織化学」) 2010.9.4 東京都

[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・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 50451521

(2) 研究分担者 ()
研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :

(4) 研究協力者
阿部 佳子 (ABE KEIKO)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 80455782

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

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