

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590339

研究課題名（和文） 乳癌におけるアンドロゲン作用の解明

研究課題名（英文） Analysis of androgen actions in human breast carcinoma

研究代表者 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

研究成果の概要（和文）：

アンドロゲンは乳癌の増殖を抑制するため、治療上有効な可能性がある。そこで本研究では乳癌におけるアンドロゲン作用を詳細に解析した。その結果、(1) 乳癌組織ではアンドロゲンが合成されているが、エストロゲンのためアンドロゲン作用が抑制されていること、(2) アロマターゼという酵素はアンドロゲン合成を抑制すること、(3) 乳癌患者にアロマターゼ阻害剤を投与するとアンドロゲン作用が亢進すること、(4) アンドロゲンにより 17 β HSD2 が誘導され、それがアンドロゲンの乳癌増殖抑制作用に関与していること等が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Previous studies have demonstrated that androgens exert anti-proliferative effects in the breast carcinoma, but the detailed mechanisms remain unclear. Results of our present study demonstrated that (1) androgen actions were markedly suppressed by estrogens in the breast carcinoma, (2) an estrogen-producing enzyme, aromatase, also plays as a negative regulator of intratumoral androgen production, (3) androgen actions were increased in the breast carcinoma treated with an aromatase inhibitor, and (4) 17 β HSD2 was identified as an androgen-induced gene in the breast carcinoma, which was involved in the anti-proliferative effects of androgens on the breast carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：乳癌、アンドロゲン、アロマターゼ

1. 研究開始当初の背景

乳癌は代表的なホルモン依存性癌であり、内分泌療法がきわめて重要な位置を占めている。女性ホルモンであるエストロゲンは乳癌細胞を増殖させるため、その作用を阻害する“抗エストロゲン療法”が乳癌内分泌療法を中心である。しかし乳癌がエストロゲン療法に抵抗性を示すことはしばしば経験され、内分泌治療法の更なる向上が望まれている。

男性ホルモンであるアンドロゲンは、エストロゲンとは逆に乳癌細胞の増殖を抑制するため、乳癌内分泌療法として有効となりうる可能性がある。しかし乳癌におけるアンドロゲン作用の詳細はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では乳癌におけるアンドロゲン活性と細胞増殖抑制機序を *in vivo* と *in vitro* の両面から詳細に検討し、乳癌におけるアンドロゲン作用とその制御を解明する。

3. 研究の方法

(1) 組織。外科手術で得られた正常乳腺組織 (8 例)、非浸潤性乳癌 (12 例)、浸潤性乳癌 (12 例)、アロマターゼ阻害剤 (エキセメスタン) を術前に投与された乳癌組織 (9 例)。

(2) 性ホルモン濃度測定。Liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)。

(3) 培養細胞。MCF-7 及び T-47D 乳癌細胞と 74T 乳癌間質細胞を用いた単及び共培養実験。

(4) 性ホルモン合成酵素発現解析。RT-PCR、immunoblotting、免疫組織化学。

(5) 網羅的マイクロアレイ。アジレント社の Whole Human Genome Oligo Microarray。

(6) 性ホルモン受容体活性測定。Luciferase assay。

(7) 細胞増殖能解析。WST-8 assay。

4. 研究成果

(1) 乳癌組織におけるアンドロゲン濃度の解析。正常乳腺組織、非浸潤性乳癌、及び浸潤性乳癌におけるエストロゲン及びアンドロゲンの組織濃度を測定し、性ホルモン合成酵素の発現と合わせて解析した。その結果、

① 非浸潤性乳癌の段階から性ホルモンが活発に局所合成されること、② 非浸潤性乳癌ではアンドロゲンの局所合成が活発であり、乳癌の発育進展に重要な役割を担っていること、③ 浸潤性乳癌では非浸潤性乳癌よりもアロマターゼの発現が亢進していることが明らかになった。

(2) 乳癌細胞におけるアンドロゲン合成とその制御。乳癌培養細胞と乳癌間質細胞を共培養し、性ホルモン合成を検討した。その結果、① アロマターゼはエストロゲン合成のみならずアンドロゲン合成の抑制にも関与していること、② アロマターゼの発現は共培養することで発現が亢進すること等を明らかにした。

(3) アロマターゼ阻害剤術前投与と患者における乳癌組織中アンドロゲン濃度の解析。エキセメスタンを術前に投与された乳癌組織に関し、エストロゲン及びアンドロゲン濃度を測定し、性ホルモン合成酵素発現と合わせて解析した。その結果、① アロマターゼを阻害することで乳癌組織中アンドロゲン濃度が増加することや、② エストロゲン代謝酵素である 17 β HSD2 の発現が亢進していること等が明らかになった。

(4) 乳癌細胞におけるアンドロゲン応答遺伝子の同定。乳癌培養細胞に活性型アンドロゲン DHT を添加後、マイクロアレイを施行し、610 個のアンドロゲン応答遺伝子を同定した。またエキセメスタン療法が行なわれた乳癌患者の乳癌組織を用いてマイクロアレイを施行した。その結果、培養細胞より同定したアンドロゲン応答遺伝子 610 個中 194 個 (32%) の発現が亢進していた。従って、これらの遺伝子は乳癌において普遍性の高いアンドロゲン応答遺伝子であると考えられた。その中には研究成果 (3) に記載した 17 β HSD2 が含まれていた。そこで乳癌細胞における 17 β HSD2 の発現制御を精査したところ、アンドロゲンがアンドロゲン受容体 (AR) を介して直接誘導する一次応答遺伝子であることが明らかになった。

(5) エキセメスタンのアンドロゲン作用。乳癌培養細胞に各種アロマターゼ阻害剤を添加し AR 活性を測定した結果、アンドロゲン様構造を有するエキセメスタンにおいて DHT に対し 1/3 程度の AR 活性を認めた。乳癌培養細胞にエキセメスタンを添加後、網羅的マイクロアレイを行った結果、エキセメスタ

ンで誘導される遺伝子は研究成果(4)で示されたアンドロゲン応答遺伝子と80%程度共通であり、エキセメスタン(DHT)に類似した作用を直接的に示すことが明らかになった。研究成果(4)で示された代表的なアンドロゲン応答遺伝子17βHSD2は、エキセメスタンによっても経時・経濃度的に発現が誘導された。

(6)乳癌細胞におけるアンドロゲン作用とエストロゲン作用の協調関係。①乳癌培養細胞におけるAR活性はエストロゲンを添加することで有意に減少し、17βHSD2の発現も有意に減少した。一方エストロゲン受容体(ER)活性はDHT添加では有意な変動がみられなかった。②乳癌細胞における17βHSD2の発現レベルを様々に変化させた後エストロゲン依存性増殖を検討した結果、17βHSD2の発現レベルに応じて有意にエストロゲン依存性増殖が抑制された。

以上の実験結果より、①乳癌組織ではエストロゲンとともにアンドロゲンも合成されているが、強いエストロゲン作用の結果アンドロゲン作用は抑制されていること、②アロマターゼはエストロゲンを合成する一方、アンドロゲンの合成抑制にも関与しており、乳癌が浸潤する過程でアロマターゼの発現が更に誘導され、エストロゲン合成が優位になること、③乳癌患者にアロマターゼ阻害剤を投与するとアンドロゲン濃度の上昇やエストロゲン作用の低下によってアンドロゲン作用が強く発揮されるようになること、④17βHSD2は乳癌組織のアンドロゲン作用を知るよいマーカーであり、アンドロゲンの乳癌細胞増殖抑制機序として17βHSD2の誘導を介した局所エストロゲン濃度の更なる低下が考えられること、等が初めて示された。これは乳癌におけるアンドロゲン作用を理解する上できわめて重要な新知見であるばかりでなく、乳癌におけるエストロゲン作用や内分泌療法の有効性を検討する際、アンドロゲン作用も合わせて考えていくことが今後は重要になってくると思われる。

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9件)

- ① 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. *Endocr*

Relat Cancer. (査読有)14:279-92, 2007.

- ② Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Yamaguchi Y, Kitada K, Honma S, Moriya T, Hirakawa H, Evans DB, Hayashi S, Ohuchi N, Sasano H. Aromatase localization in human breast cancer tissues: possible interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res*. (査読有) 67:3945-54, 2007.
- ③ Shibuya R, Suzuki T, Miki Y, Yoshida K, Moriya T, Ono K, Akahira JI, Ishida T, Hirakawa H, Evans DB, Sasano H. Intratumoral concentration of sex steroids and expression of sex steroid-producing enzymes in ductal carcinoma in situ of human breast. *Endocr Relat Cancer*. (査読有) 15:113-124, 2008.
- ④ Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Moriya T, Ohuchi N, Sasano H. Aromatase in human breast carcinoma as a key regulator of intratumoral sex steroid concentrations. *Endocr J*. (査読有) 55(3):455-63, 2008.
- ⑤ Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, Akahira J, Honma S, Evans DB, Hayashi S, Kondo T, Sasano H. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. (査読有) 14(14):4417-26, 2008.
- ⑥ Takayama K, Tsutsumi S, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Kaneshiro K, Fujimura T, Kumagai J, Urano T, Sakaki Y, Shirahige K, Sasano H, Takahashi S, Kitamura T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S. Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res*. (査読有) 69: 137-142, 2009.
- ⑦ Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Kitada K, Ishida T, Handa H, Ohuchi N, Sasano H. 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in human breast carcinoma: a prognostic factor via potential regulation of fatty acids synthesis. *Cancer Res*. (査読有) 69:1392-9, 2009.
- ⑧ Suzuki T, Miki Y, Takagi K, Hirakawa H, Moriya T, Ohuchi N, Sasano H. Androgens in human breast carcinoma. *Med Mol Morphol*. (査読有) *in press*, 2010.
- ⑨ Takagi K, Miki Y, Nagasaki S, Hirakawa

H, Onodera Y, Akahira J, Ishida T, Watanabe M, Kimijima I, Hayashi S, Sasano H, Suzuki T. Increased intratumoral androgens in human breast carcinoma following aromatase inhibitor exemestane treatment. Endocr Relat Cancer. (査読有) 17:415-30, 2010.

[学会発表] (計5件)

- ① 鈴木 貴、三木康宏、赤平純一ら。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: ホルモン依存性癌を例に (シンポジウム)。日本ステロイドホルモン学会、2007年11月24日、仙台市。
- ② Suzuki T, Moriya T, Hayashi S et al. Intratumoral concentration of sex steroids in ductal carcinoma in situ (DCIS) of human breast (Symposium). The 26th congress of the International Association for Breast Cancer Research, 2008年9月23日、倉敷市。
- ③ 鈴木 貴。乳癌におけるアロマターゼの発現意義 (日本病理学会学術研究賞 (A演説) 受賞講演)。第54回日本病理学会秋期特別総会、2008年11月2日、松山市。
- ④ 鈴木 貴、高木清司、三木康宏ら。乳癌における性ホルモン局所合成 (シンポジウム)。第41回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2009年9月4日、神戸市。
- ⑤ Suzuki T, miki Y, Sasano H. Significance of sex-hormone receptors in human carcinomas (シンポジウム)。第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、横浜。

[図書] (計1件)

- ① 鈴木 貴、森谷卓也、笹野公伸。日本臨床社、乳癌 (分担章: 乳癌におけるアロマターゼ研究)。2007年、632ページ。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

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

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