

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790343

研究課題名(和文) 男子乳癌におけるエストロゲン作用の解明 内分泌療法の向上を目指して

研究課題名(英文) Estrogens in male breast carcinoma

研究代表者

高木 清司 (TAKAGI, Kiyoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80595562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：男子乳癌組織におけるエストロゲン受容体(ER)の発現および組織中エストロゲン濃度の測定、エストロゲン応答遺伝子の発現解析を行った。組織中エストロジオール濃度は非腫瘍部と比較して腫瘍部で有意に高かった。また、男子乳癌組織においてもエストロゲン合成酵素の発現が認められた。対象とした男子乳癌組織30例は全てERが陽性で、プロゲステロン受容体と正相関を示した。エストロゲン応答遺伝子の発現をマイクロアレイにて検索したところ、発現プロファイルは男女間で異なっていた。以上より、男子乳癌組織ではエストロゲンが合成酵素によって局所で合成されて作用しているが、その作用は女子乳癌と質的に異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined intratumoral estrogen concentration, estrogen receptor and its responsive genes in male breast carcinomas in order to clarify estrogen action in male breast carcinomas. Tissue estradiol level was markedly higher in male breast carcinoma tissues, and estrogen producing enzymes were significantly detected in male breast carcinoma tissues. All cases examined in this study were positive for estrogen receptor (ER), and significant association was detected between ER and progesterone receptor. Microarray analysis did demonstrate that expression profiles of estrogen responsive genes are markedly different between male and female breast carcinomas. Therefore, it was suggested that estrogens were locally produced in male breast carcinoma tissues as well as female ones, while its action was quite different between male and female breast carcinomas.

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：男子乳癌 エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

男子乳癌の罹患率は女子乳癌の1%程度と希少な疾患であるが、近年は増加傾向にあり、さらに進行癌で発見されることも多い予後不良の癌のひとつである。従ってその治療法の開発に向けた生物学的特徴の理解が強く望まれる。

一方、女子乳癌は代表的なエストロゲン依存性腫瘍であり、エストロゲン応答遺伝子の探索や閉経後女子乳癌におけるエストロゲンの局所合成メカニズムの研究が精力的に行われている。これらの研究結果は現在の抗エストロゲン療法の発展に大きく寄与し、抗エストロゲン療法は乳癌内分泌療法を中心となっている。

近年、男子乳癌においてもエストロゲンとの関連性が示唆されており、男子乳癌においてもエストロゲン受容体(estrogen receptor; ER α およびER β)が過剰発現していること等が報告されている。しかしながら、男子乳癌におけるエストロゲン作用、すなわちエストロゲンが男子乳癌の増殖を促進するかどうかという議論はほとんどなされておらず、女子乳癌におけるエストロゲン作用と同質なものかどうかも分かっていない。さらに、男子乳癌組織へのエストロゲンの供給経路についてはほとんど報告がない。

2. 研究の目的

上記のような問題点を踏まえ、本研究では男子乳癌組織におけるER α およびER β 、エストロゲン応答遺伝子の発現を検討することで男子乳癌におけるエストロゲンの意義を明らかにし、女子乳癌と比較検討するとともに、男子乳癌組織中エストロゲン濃度の測定およびエストロゲン合成酵素に対する免疫染色を施行することで男子乳癌組織へのエストロゲンの供給経路を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

臨床検体について：

未固定凍結検体として、男子乳癌組織検体4例、男性由来非腫瘍部乳腺組織検体3例、女子乳癌組織検体7例を得た。腫瘍組織検体はマイクロアレイ解析およびホルモン濃度測定に供し、正常乳腺組織は組織中性ホルモン濃度の測定に供した。ホルマリン固定パラフィン包埋検体として、男子乳癌組織検体30例、女子乳癌組織検体72例を得た。

組織中性ホルモン濃度の測定：

あすか製薬メディカルにて、LC-MS/MS法にて測定された。

免疫染色：

抗原抗体反応の後、ストレプトアビジン-ビオチン法にて酵素標識を行い、チアミノベンチジンにて検出した。

マイクロアレイ解析：

レーザーマイクロダイセクション法にて凍結標本より癌細胞のみを単離し、アジレン

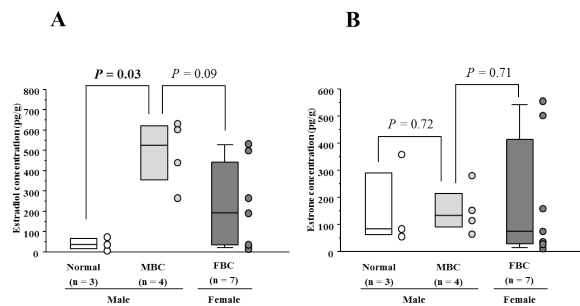
ト社のマイクロアレイスライド (G4112F, GEO Accession; GPL6480) を用い、プロトコルに従って施行した。発現解析は教師なし分類のひとつである階層的クラスター解析を用いて行った。

4. 研究成果

男子乳癌組織中エストロゲン濃度の測定：

組織中性ホルモン濃度の測定結果を図1に示す。組織中エストロゲン濃度(中央値(最小値-最大値))は、非腫瘍部が37.0(8.0-74.0) pg/g、男子乳癌組織が523(267-633) pg/g、女子乳癌組織が190(15.7-540) pg/gであった(図1A)。組織中エストロゲン濃度は非腫瘍部と比較して男子乳癌組織で有意に高く($P = 0.03$, 14倍)、また、女子乳癌と比較しても高値傾向であった($P = 0.09$, 2.8倍)。一方、組織中エストロゲン濃度は非腫瘍部が83.0(56.0-359) pg/g、男子乳癌組織が134(67.0-280) pg/g、女子乳癌組織が75.0(13.0-555) pg/gであり、3群間に有意差は認められなかった(図1B)。

図1. 組織中エストロゲン濃度の測定

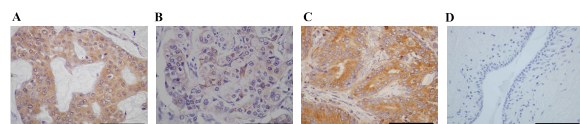


男子乳癌におけるエストロゲン合成酵素の発現：

男子乳癌におけるエストロゲン合成経路を明らかにするために、エストロゲン合成酵素の発現を免疫組織化学的に検索した。アロマトラーゼ(図2A)、ステロイドスルファターゼ(steroid sulfatase; STS, 図2B)、1型17 β 水酸化ステロイド脱水素脱水素酵素(

17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; 17 β HSD1)(図2C)は細胞質に染色性が認められた。STSに関しては染色性が他の酵素と比較して弱く、限局的な局在を示した。陽性症例数はアロマトラーゼが30例中19例、STSが2例、17 β HSD1が20例であった。非腫瘍性乳腺上皮はアロマトラーゼ(図2D)、STS、17 β HSD1ともに陰性であった。

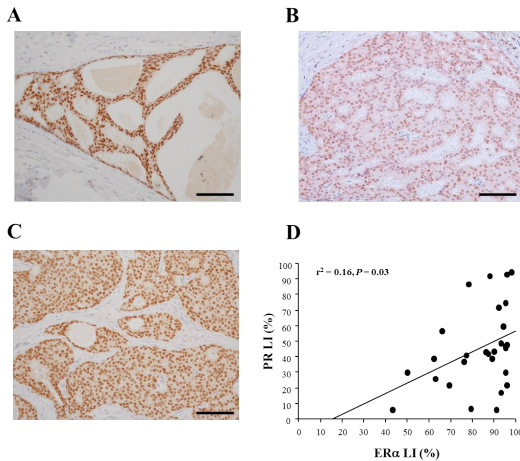
図2. 男子乳癌組織におけるエストロゲン合成酵素の発現



男子乳癌組織におけるエストロゲン受容体の発現:

ER α (図3A)は検索した全ての男子乳癌症例で陽性で、女子乳癌より発現が高かった。ER β (図3B)は約8割の症例に発現が認められ、女子乳癌を上回る発現頻度であった。プロゲステロン受容体 (progesterone receptor; PR, 図3C)の発現も女子乳癌と比較して男子乳癌において優位に高く、また、ER α との間に正相関が認められた (図3D)。

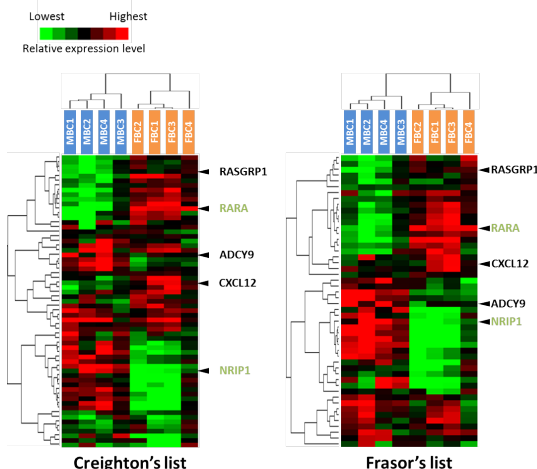
図3. 男子乳癌組織における正ホルモン受容体の発現



男子乳癌組織におけるエストロゲン応答遺伝子の発現:

男子乳癌におけるエストロゲン作用の分子生物学的特徴を精査するために、マイクロアレイ解析によるエストロゲン応答遺伝子の発現プロファイルの検討を試みた。本研究では Frasor ら [Frasor et al. Endocrinology 2003] が報告した 50 個のエストロゲン応答遺伝子および Creighton ら [Creighton et al. Genome Biol 2006] が報告した 63 個のエストロゲン応答遺伝子に着目して検討を行った。階層的クラスタ解析を施行したところ、どちらの遺伝子リストを用いた場合でも同様に男子乳癌と女子乳癌はそれぞれ独立したカテゴリを形成した (図4)。両方のリストに共通する遺伝子のうち、RARA (retinoic acid receptor, alpha) は女子乳癌において高発現する一方、NRIP1 (nuclear receptor

図4. 男子乳癌組織におけるエストロゲン応答遺伝子の発現プロファイル



interacting protein 1) は男子乳癌において高い発現を示した。

考察:

本研究は男子乳癌組織中エストロゲン濃度を測定した初めての報告である。本研究では、男子乳癌組織中エストロゲン濃度は非腫瘍部と比較して 14 倍と有意に高値であった一方、組織中エストロゲン濃度に差異は見られなかった。男子乳癌組織におけるアロマターゼの発現は 63 %の症例で認められたが、この結果は過去の Sasano らの報告 [Sasano et al. J Clin Endocrinol Metab 1996] と一致し、女子乳癌におけるアロマターゼの発現頻度と同程度であった。また、17 β HSD1 の発現は 67 %の症例で認められ、女子乳癌における発現頻度とよく一致した。これらとは対照的に、STS の発現頻度は 7%にとどまり、女子乳癌における発現頻度 (60-90 %)と比較して明らかに低かった。このことから、男子乳癌におけるエストロゲンの局所合成は主にアロマターゼを介して行われ、STS の寄与は少ないものと考えられた。

エストロゲンの生理活性は ER α もしくは ER β との結合によって引き起こされるが、ER α および ER β はヘテロダイマーもしくはホモダイマーを形成して転写因子として機能し、標的遺伝子の転写を調節する。本研究では ER α 、ER β ともに男子乳癌において高頻度に発現していることを見出しており、これらは過去の報告と一致する。さらに今回検討した男子乳癌症例のうち 77 %は ER α と ER β が共陽性であり、その頻度は女子乳癌の 2 倍と有意に高かった。従って男子乳癌組織では ER α /ER β のヘテロダイマーが高頻度に形成されると考えられる。ER α および ER β はヘテロダイマーを形成することにより互いの機能を調節し合うことが知られており、女子乳癌では ER α /ER β 共陽性の症例は有意に予後良好であることが報告されている。また、Weber-Chappuis ら [Weber-Chappuis et al. Eur J Cancer 1996] は男子乳癌における ER の機能および意義は女子乳癌におけるそれとは異なるとの考えを提唱しているほか、Johansson ら [Johansson et al. Breast Cancer Res 2012] はマイクロアレイを駆使した遺伝子発現プロファイルの解析により男子乳癌が Luminal M1 と Luminal M2 の二つに分類できること、そしてこの分類が ER α や HER2 の発現を指標として陽性女子乳癌の予後を規定するといわれる Intrinsic subtype とは概念が異なることを報告している。以上より、男子乳癌におけるエストロゲン作用は女子乳癌のそれとは質的に異なり、その理由のひとつとして ER の二量体化のパターンの違いが考えられた。

本研究では男子乳癌組織におけるエストロゲン応答遺伝子の発現プロファイルを初めて報告した。マイクロアレイ解析の結果、男子乳癌と女子乳癌ではエストロゲン応答

遺伝子の発現プロファイルが異なることがわかった。エストロゲン応答遺伝子の機能の総和がエストロゲンの作用を最終的に特徴づけることを考慮すると、これらの結果は男子乳癌と女子乳癌におけるエストロゲン作用の分子生物学的特徴が異なることが示唆された。

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 2 件)

1. Takagi K, Moriya T, Kurosumi M, Oka K, Miki Y, Ebata A, Toshima T, Tsunekawa S, Takei H, Hirakawa H, Ishida T, Hayashi SI, Kurebayashi J, Sasano H, Suzuki T. Intratumoral Estrogen Concentration and Expression of Estrogen-Induced Genes in Male Breast Carcinoma: Comparison with Female Breast Carcinoma. *Horm Cancer*. 2013 Feb;4(1):1-11. doi: 10.1007/s12672-012-0126-6. (査読有)

2. Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Nakamura Y, Ishida T, Watanabe M, Inoue S, Sasano H, Suzuki T. Kruppel-like factor 5 in human breast carcinoma: a potent prognostic factor induced by androgens. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Nov 6;19(6):741-50. doi: 10.1530/ERC-12-0017. (査読有)

[学会発表](計 2 件)

1. Kiyoshi Takagi, Yasuhiro Miki, Yoshiaki Onodera, Yasuhiro Nakamura, Takanori Ishida, Hironobu Sasano, Takashi Suzuki. Immunolocalization of ARHGAP15 in human breast carcinoma (2013). 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2013.10.3-5, Yokohama, Japan.

2. Kiyoshi Takagi, Yasuhiro Miki, Yoshiaki Onodera, Yasuhiro Nakamura, Takanori Ishida, Hironobu Sasano, Takashi Suzuki. Expression of ARHGAP15 in human breast carcinoma (2012). 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2012), 2012.8.26-29, Kyoto, Japan.

[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

高木 清司 (TAKAGI, Kiyoshi)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80595562

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：