

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08780

研究課題名（和文）悪性胸膜中皮腫は性ホルモン依存性腫瘍か？～その作用・応答遺伝子の解析～

研究課題名（英文）Sex steroid hormone receptors in malignant pleural mesothelioma-clinicopathological analysis and effects on tumor cell growth

研究代表者

石橋 洋則（ISHIBASHI, HIRONORI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：20597968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：性ホルモン依存性腫瘍である乳がんや前立腺癌以外にも原発性肺癌など様々な悪性腫瘍が注目されてきた。本研究で、悪性胸膜中皮腫においても性ホルモン（エストロゲン・プロゲステロン・アンドロゲン）に対する受容体、estrogen receptor α (ER α)と β (ER β)、progesterone receptor (PR)、androgen receptor (AR)の発現を認めた。特にER β は発現率が高く、陽性群は外科治療後の予後が有意に良好であったことから、エストロゲン受容体を介したカスケードが腫瘍細胞増殖抑制に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年増加している難治性悪性腫瘍である悪性胸膜中皮腫に各性ホルモンに対する受容体、ER α 、ER β 、PR、ARの発現を認めた。特にER β 陽性群は予後が有意に良好であり、エストロゲン受容体 β を介して悪性胸膜中皮腫の腫瘍細胞増殖抑制に関与することが示唆され、そのメカニズム・カスケードを解明することで今後の新たな治療法への糸口となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In addition to hormone-dependent tumors such as breast and prostate cancer, various other malignancies including primary lung cancer have received increasing attention. In the present study, the expression of sex hormones (estrogen, progesterone and androgen) receptors, estrogen receptor alpha (ER α) and beta (ER β), progesterone receptor (PR) and androgen receptor (AR) in malignant pleural mesothelioma were recognized. The expression of ER β was particularly high and ER β positive patients were significantly better prognosis after surgical treatment. These findings suggested that a cascade mediated by the estrogen receptor might inhibit the tumor cell growth.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 性ステロイドホルモン エストロゲン受容体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

乳癌や前立腺癌をはじめとし様々な悪性腫瘍の増殖に性ホルモン(エストロゲン・プロゲステロン・アンドロゲン)が深く関与している。以前よりエストロゲン依存性肺癌が注目され、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も行われ、“女性ホルモンと肺癌”の関係に世界的にも大きな注目が注がれてきた。

一方、悪性胸膜中皮腫の日本における死亡は1995年500人であったが2015年には1504人と3倍に増加し、アスベスト使用禁止が遅れた日本では患者数も少なくとも2040年までは今後急激に増加すると考えられている。悪性胸膜中皮腫は早期発見・診断・治療が非常に困難で、手術療法単独で2年生存率30%、手術療法+化学放射線療法で2年生存率40%、生存期間中央値17ヶ月と非常に予後が悪い。また現存する抗がん剤による治療の中央生存期間が12か月と非常に短い。それゆえに抗がん剤のような今までの治療とは違った切り口での治療法開発が急務である。一方で、悪性胸膜中皮腫は男:女は5~10:1と明らかに男性に多く、性差を認める疾患であり性ホルモンが関与している可能性は十分に高いと考えられるがその検討は全くされていない。

2．研究の目的

本研究では、悪性胸膜中皮腫への性ステロイドホルモンの作用を明らかにし、新しい治療アプローチへの糸口をつかむことを目的とした。

性ステロイドホルモンには主にエストロゲン・プロゲステロン・アンドロゲンがあり、それらの**受容体**にはエストロゲンに対する **estrogen receptor α (ER α)**と β (ER β)、プロゲステロンに対する **progesterone (PR)**、アンドロゲンに対する **androgen receptor (AR)**がある。いずれも細胞核内に存在し、血中の性ホルモンはこれら受容体に結合するとさまざまな多様性あるカスケードを介して細胞増殖・抑制などに関与する。

(1) 各性ホルモン受容体の発現を免疫組織化学で検索し、臨床病理学的因子と比較検討。

(2) 確立された悪性胸膜中皮腫培養細胞において各性ステロイドホルモンの経時的細胞増殖能を検討。

3．研究の方法

(1) 各性ステロイドホルモン受容体の発現の有無と評価

対象は2010年4月から2021年12月までに東京医科歯科大学呼吸器外科にて手術施行した悪性胸膜中皮腫48例。上皮型40例、2相型または肉腫型は8例。摘出標本を使用し性ステロイドホルモン受容体(ER α 、ER β 、PR、AR)の発現を免疫組織化学にて検索した。本研究ではヒト組織を使用した研究のため、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を得た。

免疫組織染色法

ニチレイヒストファインキットにてStreptavidin-biotin amplification method (SAB法)を使用した。標本は24時間10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋された標本を3 μ mの厚さに薄切した。脱パラフィン後、10mMクエン酸(2mM citric and 9mM trisodium citrate dehydrate, pH 6.0)で120度5分間オートクレーブをかけ、抗原賦活化処理をした。希釈した一次抗体を添加し4 湿潤箱で12-18時間保管した。発色は3,3-diaminobenzidine solution (DAB) [1mM 3,3'-diaminobenzidine, 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.6), and 0.006% H₂O₂] にて行った。ERは乳がん、PRは子宮内膜、ARは前立腺組織をポジティブコントロールとして使用した。各抗体の詳細、一次抗体希釈率は

・ ER α (mouse) ...Leica # NGL-L-ER-6F11, 50 倍希釈

- ・ ER β (mouse) …Gene Tex # GTX70174, 1000 倍希釈
 - ・ PR (mouse) …Novocastra # NCL-L-PGR, 100 倍希釈
 - ・ AR (mouse) …DAKO # M3562, 50 倍希釈
- とした。

免疫染色の評価

性ステロイド受容体は、Labeling Index (LI; 100個の核のうち、核陽性細胞の%) を使用した。LI 10%以上を陽性とした。各症例について5回の評価を行いその平均値を算出した。

(2) 性ステロイドホルモン受容体 (ER α 、ER β 、PR、AR) の発現と臨床病理学的因子と関連性の解析

各性ステロイドホルモン受容体発現の有無と性別・年齢・pT因子・pN因子・組織型との関連を検索し、全生存率を比較した。

(3) 悪性胸膜中皮腫細胞株における性ホルモン作用

悪性胸膜中皮腫細胞株 3 種類 (ACC-MESO-1, ACC-MESO-4, HMMME) の性ステロイドホルモン受容体抗体で蛍光染色し、蛍光顕微鏡 (DMI6000B, Leica) で観察した。陽性対照群として、乳がん細胞株 MCF7 を使用した。染色の二次抗体には、

Goat anti-mouse IgG antibody, Alexa Fluor 647 (1/1000, A21235, Invitrogen)

Goat anti-rabbit IgG antibody, Alexa Fluor 647 (1/500, A-21244, Invitrogen)

を使用した。

続いて、中皮腫細胞株 (NCI-H28, ACC-MESO-1, ACC-MESO-4) および陽性対照としての乳がん細胞株 (MCF7) の性ステロイドホルモン感受性試験を行った。96 ウェルプレート上に細胞を播種し、各種性ホルモンの濃度 (0, 1, 10, 100, 1000, 10000 uM) および事前に設定した時間 (6, 12, 24, 48, 120 時間) でインキュベートした後、Cell Counting Kit-8 (343-07623, Dojindo) および EnSpire マルチモードプレートリーダー (PerkinElmer) を用いた吸光度アッセイにて細胞生存率を推定した。

性ステロイドホルモン試薬は、

β エストラジオール (052-04041, Wako)

プロゲステロン (160-24511, Wako)

テストステロン (201-20551, Wako)

であり、培地内 DMSO 最終濃度は 0.1% w/w である。

4. 研究成果

(1) 各性ステロイドホルモン受容体の発現の有無と評価

悪性胸膜中皮腫の内、上皮型では免疫組織化学により性ステロイドホルモン受容体 (ER α 、ER β 、PR、AR) の発現を腫瘍細胞核に認めた (図 1)。しかし、肉腫型と 2 相型の肉腫部分では認めなかった。

また、各性ステロイドホルモン受容体発現は L.I. で ER α は 3.8 ± 1.2 、ER β は 20.5 ± 2.9 、PR は 4.6 ± 1.6 、AR は 3.0 ± 1.2 であった。L.I. >10% を陽性とする、各抗体の陽性率は ER α 22.5%、ER β 55.0%、PR 17.5%、AR 15.0% であった (表 1)

図 1 悪性胸膜中皮腫（上皮型）

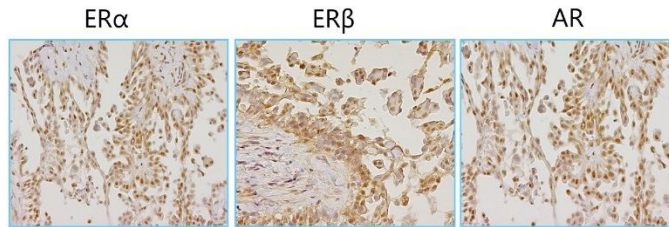


表 1 各性ステロイドホルモン受容体のL.I.と陽性率

	ER α	ER β	PR	AR
L.I. mean $\pm$ S.D.	3.8 $\pm$ 1.2	20.5 $\pm$ 2.9	4.6 $\pm$ 1.6	3.0 $\pm$ 1.2
Percentage of positive cases (%) (L.I. > 10%)	22.5	55.0	17.5	15.0

（２）性ステロイドホルモン受容体（ER α 、ER β 、PR、AR）の発現と臨床病理学的因子と関連性の解析

検討（１）にて肉腫型には性ステロイドホルモン発現が非常に乏しいことから、上皮型のみを検討した。上皮型 40 例において、各性ホルモン受容体発現と全生存曲線を下記に示した。ER α 陽性群は陰性群に比較して予後良好な傾向を示したが、有意差は認められなかった（ $p=0.0639$ ）。一方で、ER β 陽性群は ER β 陰性群に比較して有意に予後良好であった（ $p<0.001$ ）。

図2a ER α

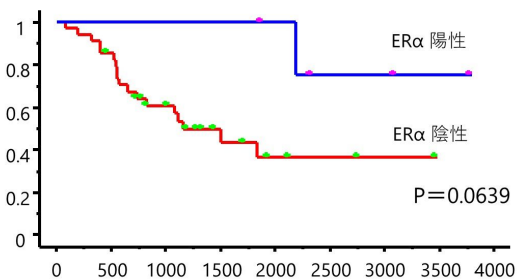
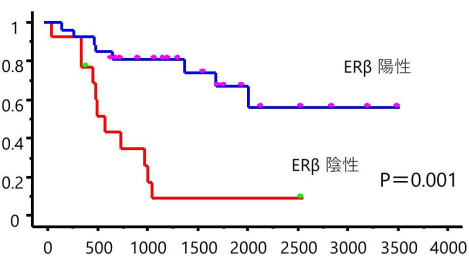


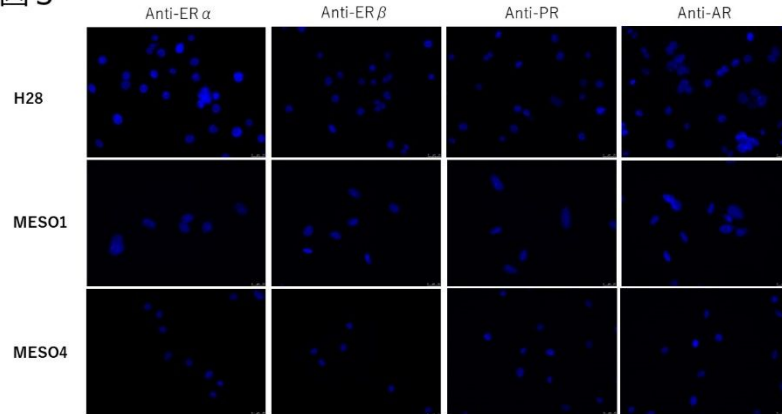
図2b ER β



(3) 悪性胸膜中皮腫細胞株における性ホルモン作用

確立された悪性胸膜中皮腫細胞株3種類(ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、HMMME)における性ステロイドホルモン受容体の局在を蛍光染色するとH28においてER α が陽性、MESO1でER α ・ β が弱陽性であった。他は蛍光染色による明らかな染色は認められなかった。(図3)

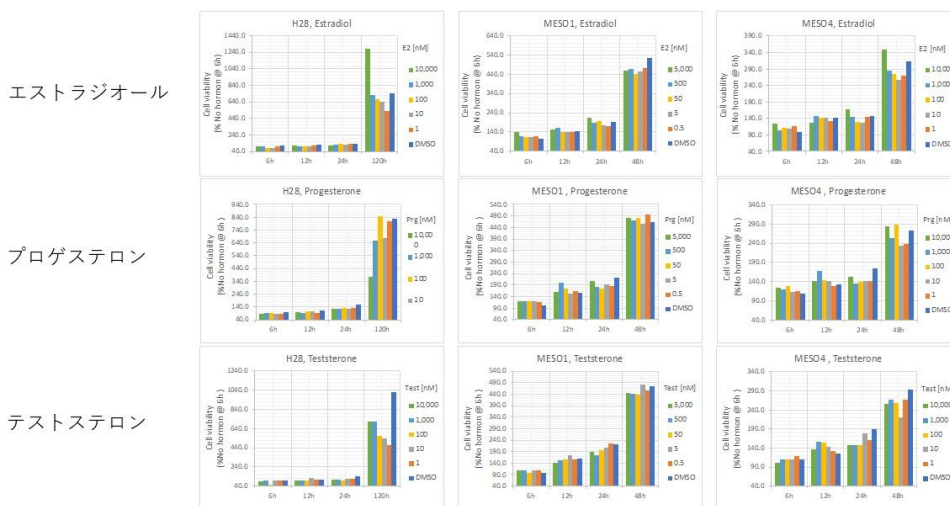
図3



これら3種類の悪性胸膜中皮腫細胞株に各種性ホルモンを経濃度(0, 1, 10, 100, 1000, 10000 μ M)、経時的(添加後6, 12, 24, 48, 120時間)の細胞数変化を計測し、H28細胞株にてエストロゲンホルモン(エストラジオール)を10000 μ M添加後、経時的に細胞増殖を示したがその他は有意な差は認められなかった。

図4

経時変化に伴う増殖率の変化



悪性胸膜中皮腫は肺癌同様に女性が全生存率良好な悪性腫瘍の一つであり、本研究結果から、根治的胸膜摘除術術後患者においても、上皮型において、ER β 陽性群が有意に予後良好、ER α 陽性群は予後良好な傾向であることを示した。培養細胞を使用しての性ステロイドホルモンによる細胞増殖抑制試験では有意な差は認められなかったが、培養細胞の性ホルモン受容体が低発現であった可能性はあり、今後はsiRNAなどを使用して受容体高発現の培養細胞を作成し、性ステロイドホルモンによる細胞増殖抑制試験、さらにはその遺伝子変化についてさらなる検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Hironori Ishibashi
2 . 発表標題 Sex steroid hormone receptors in malignant pleural mesothelioma-clinicopathological analysis and effects on tumour cell growth.
3 . 学会等名 29th European Conference on General Thoracic Surgery (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Hironori Ishibashi, Kuniyo Sueyoshi, Shunichi Baba, Ayaka Asakawa, Ryo Wakejima, Kenichi Okubo
2 . 発表標題 Sex steroid hormone receptors in epithelial type of malignant pleural mesothelioma.
3 . 学会等名 30th European Conference on General Thoracic Surgery (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 石橋洋則、栗原泰幸、熊谷遼介、壽美友里、馬場峻一、瀬戸克年、分島 良、大久保恵一 .
2 . 発表標題 悪性胸膜中皮腫に対する集学的治療の成績エネルギー-デバイスを用いた簡単な肺剥皮術
3 . 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 石橋洋則、中島康裕、杉田裕介、石川祐也、武村真理子、馬場峻一、浅川文香、瀬戸克年、分島 良、大久保恵一 .
2 . 発表標題 悪性胸膜中皮腫に対する集学的治療の成績 - P/Dは再発後の生存期間に寄与する .
3 . 学会等名 第73回日本胸部外科学会定期学術集会
4 . 発表年 2020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
研究 分担者	大久保 憲一 (Okubo Kenichi) (80444454)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究 分担者	小林 正嗣 (Kobayashi Masashi) (90388439)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602)	

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
---------	---------