

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08800

研究課題名(和文) コレステロール代謝物による肺がん増殖メカニズムと治療に関する研究

研究課題名(英文) The promotion effect of 27-hydroxycholesterol as selective estrogen receptor modulator on the proliferation of lung cancer

研究代表者

古川 欣也 (Furukawa, Kinya)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：20246292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：27-ヒドロキシコレステロール(27HC)は、肺胞マクロファージにて最も合成される酸化ステロールであり、エストロゲン受容体(ERs)の活性化作用を持ち、乳がんの増殖促進作用が報告されている。ER陽性肺がん由来株(H23)に対する27HCの作用を検討した結果、100nM以上の濃度で有意に増殖が促進し、ER阻害剤PHTPPの同時添加でその促進効果は消失した。肺がん患者より摘出したがん部では、27HCの含有量やERとcMycの遺伝子発現が非がん部に比べて高い事も明らかとなった。以上より、27HCはERs発現肺がんの増殖に影響を与える因子あると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんは発生率と死亡率共に、世界的に高く、2018年には210万人が罹患し、180万人が死亡している。本研究における成果は、エストロゲン受容体の発現が確認された肺がんに対して、27-ヒドロキシコレステロールを合成する肺胞マクロファージの活性化をコントロールする事やエストロゲン受容体の選択的阻害剤を用いる事で、術後の再発を抑制できる可能性が示唆された。新たな治療方法の開発や、27-ヒドロキシコレステロールが多く存在する他臓器がんでの検討など、応用範囲が広い研究成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：27-hydroxycholesterol (27HC) is synthesized from cholesterol mostly in alveolar macrophage, and promotes the proliferation of breast cancer cells as selective estrogen receptor modulator (SERM). We hypothesized that 27HC modulates ER-positive lung cancer growth. Cell growth of an ER-positive lung cell line (H23) was significantly promoted by adding more than 100 nM of 27HC. Besides, the addition of PHTPP, an antagonist of ER, canceled the growth promotion due to 27HC. In the tumor region collected from 13 lung cancer patients, 27HC content and the mRNA expressions of ER and its target gene c-Myc were significantly higher than in the non-tumor counterpart collected from same patient. These results suggest that 27HC can stimulate the growth of ER-positive lung cancer in vivo. Therefore, the inhibitions of 27HC production and ER activity may be new strategies to suppress the postoperative recurrence of ER-positive lung cancer in both genders.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：27-ヒドロキシコレステロール エストロゲン受容体 肺がん

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺がんは発生率と死亡率共に、世界的に高く、2018年には210万人が罹患し、180万人が死亡している (Bray et al. CA Cancer J Clin 2018;68:394-424)。これまで、コレステロールの代謝物であるオキシステロールのひとつ、27-ヒドロキシコレステロール(27HC)が、エストロゲン受容体(ERs)のリガンドになり(Umetani et al. Nat Med 2007;13:1185-92)、乳がん細胞の増殖・進展を促進させる選択的 ER モジュレーター (SERM)として作用することが報告されている (Nelson et al. Science 2013;342:1094-8; Warner et al. N Engl J Med 2014;370:572-3)。

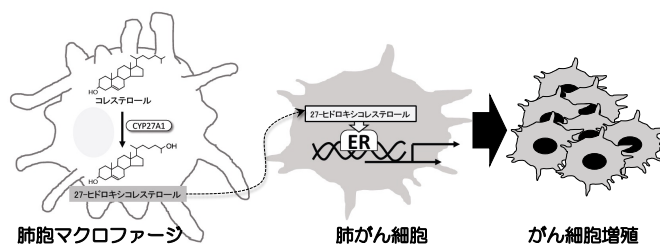


図1 27-ヒドロキシコレステロールによる肺がんの進展メカニズム

(2) コレステロールから合成される 27HC は、生体中では肺胞マクロファージ内で最も合成されること、さらに、肺がん細胞には、ERs が発現しているとの過去の報告があることから、肺がん細胞の増殖や肺がん進展に 27HC が重要な役割を演じている可能性が示唆される。

(3) 乳がん細胞では、ER の  $\alpha$  型 (ER $\alpha$ ) が発現している一方で、肺がんでは、 $\beta$  型 (ER $\beta$ ) が発現しているとの報告があることから、肺がんでは、乳がんとは異なった 27HC によるがん増殖メカニズムが存在している可能性がある。

### 2. 研究の目的

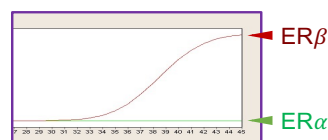
肺がんでは、がん細胞に集まってくる肺胞マクロファージで作られた 27HC がリガンドとして作用し、ER が活性化されて、肺がんの増殖・進展が促される(図1)との仮説を立証するために、1) 肺がん切除組織におけるがん部と非がん部において ER 発現と 27HC 濃度を定量し、病態との関連性を明らかにすること。2) ER 発現肺がん細胞の培養系を用いて、増殖能に及ぼすエストロゲン、27HC、および抗エストロゲン剤の影響を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト肺がん培養細胞における ER 発現の確認

非小細胞肺がん患者より単離した肺腺がん細胞株 (H23 細胞) を、ATCC より購入し、継代培養して実験に用いた。実験を行うにあたり、H23 細胞における ER の発現状態を確認するために、PCR 法と Western blotting 法により、ER $\alpha$  と ER $\beta$  の mRNA と蛋白の発現を検証した。

#### ER $\beta$ mRNA exp. in RT-real time PCR



#### ER $\beta$ protein exp. in Western blotting



図2 H23 細胞におけるエストロゲン受容体の発現

#### (2) H23 細胞への 27HC 投与の影響

H23 細胞を 24-well plate に  $2.5 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、RPMI1640 培地 (10%FBS) にて培養した。24 時間後、フェノールレッド 不含の RPMI1640 培地に交換し、さらに 24 時間培養した。その後、エタノールに溶解した 27HC またはエストラジオール (E2) を、培地中の最終エタノール濃度が 0.1% になるように添加して培養した。48 時間後に細胞数をカウントし、コントロール (0.1%エタノールのみ添加) に対する増加比を算出した。

同様に、フェノールレッド 不含培地で H23 細胞を 24 時間培養した後、27HC または E2 と共に ER $\beta$  特異的アンタゴニストである PHTPP(4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol) を添加した。48 時間後に細胞数をカウントし、コントロール (0.1%エタノールのみ添加) に対する増加比を算出し、PHTPP を同時添加しなかった場合のデータと比較した。

#### (3) 肺がん患者摘出肺組織における 27HC の定量

2018 年 1 月~2019 年 1 月にて、東京医科大学茨城医療センターにて、肺がん摘出術を受けた非小細胞肺がん患者のうち、同意が得られた 13 名から、病理検査用に採取された組織の一部を本研究に用いた。得られた組織から、「がん部」と、その周囲に付着している「非がん部」を、それぞれ 1g 程度を採取し、急速冷凍後、分析まで冷凍保存した。27HC の測定は、凍結保存サンプル約 20 mg をホモジネートし、回収率補正のための内部標準として重水素標識 27HC (27HC-d6) を添加した後、1N KOH/エ

タノール中 37°Cで 1 時間の加水分解を行った。n-ヘキサンを添加してステロールを抽出した後、分析感度を上昇させるため、ピコリン酸で誘導体化した。生成した 27HC ピコリン酸誘導体は、アセトニトリルに溶解し、その一部を HPLC-MS/MS に導入した。得られた 27HC/27HC-d6 比から、肺がん組織中の 27HC を定量した (Honda et al. J Steroid Biochem Mol Biol 121:556-564,2010)。

#### (4) 肺がん患者摘出肺組織における遺伝子発現の評価

肺がん患者より得られた「がん部」と「非がん部」組織より、total RNA を抽出し、cDNA に逆転写した後、ERβ、cMyc、HIF-1α、HIF-1β、VEGF の mRNA 発現量を、house keeping 遺伝子 18SrRNA の発現量にて補正する事で求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) H23 細胞における ERs の遺伝子発現

H23 細胞における ERα と ERβ の発現の有無を明らかにするため、real-time PCR 法と Western Blotting 法を用いて mRNA と蛋白発現を確認した (図2)。PCR 法の結果、ERβ mRNA が発現しており、ERα の遺伝子は発現していない事がわかった。さらに、Western Blotting 法にて、ERβ 蛋白の発現も確認された。

#### (2) 27HC が H23 細胞の増殖に与える影響

培地中へ最終濃度 1-1000 nM の 27HC、またはポジティブコントロールとして 10 nM の E2 を添加し、細胞増殖に与える影響を検討した (図 3A)。その結果、E2 により H23 細胞数の有意な増加が確認され、100 nM 以上の 27HC の添加量で有意な細胞増殖の促進が見られた。

また、E2 は 27HC と同濃度では 27HC より強い増殖促進効果を認めたが、男性または閉経後女性の血中 E2 濃度は 0.07 nM 程度なのに対して、血中 27HC 濃度は 500 nM 程度あり、血中 27HC が E2 と違ってリポ蛋白に包まれていることを考慮しても、27HC の影響は無視できないと考えられた。

#### (3) 27HC の H23 細胞増殖促進に対する ERβ 特異的アンタゴニストの抑制効果

H23 細胞では ERβ のみが発現しているため、27HC と E2 による増殖促進効果は ERβ の活性化を介していると考えられる。この ERβ を介した効果を確認するため、100 nM の 27HC または 10 nM の E2 に加えて、ERβ 特異的アンタゴニストである PHTPP を 10 μM の濃度で添加して細胞増殖を比較した。その結果、PHTPP の添加は 27HC または E2 による細胞増殖促進効果を有意に抑制した (図3B)。このことから、27HC と E2 による H23 細胞の増殖促進は、いずれも ERβ を介していることが確認された。

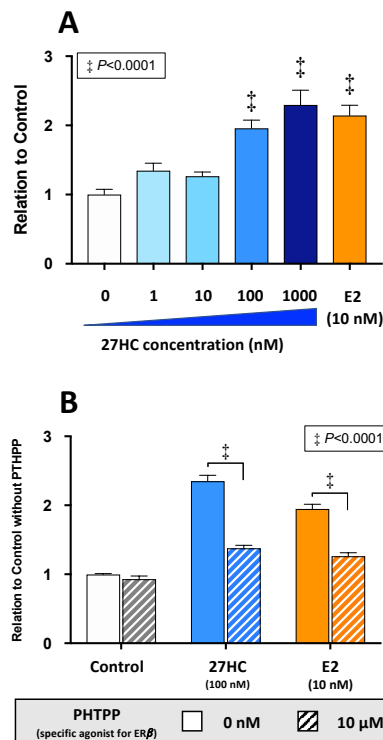


図3 H23 細胞の増殖に与える 27HC の影響 (A)とERβ 特異的アンタゴニストの抑制効果(B)

#### (4) 肺がん患者摘出肺組織における 27HC の定量

「がん部」と「非がん部」が採取できた非小細胞肺がん患者 13 名の内訳は、平均年齢 70.2 年 (±2.9 年;標準偏差)で、男女比は、6:7 であった。がんステージ分類では、Stage IA が 6 名 (IA1: 2 名, IA2: 2 名, IA3: 2 名)、Stage IB が 4 名、Stage IIA が 2 名、Stage IIIA が 1 名であった。分化度分類は、Grade-I、-II、-III が、それぞれ、3 名、7 名、3 名であった。

肺組織中の「がん部」では、同一患者から採取された「非がん部」と比較して、27HC を有意に含有していた (図4A)。「がん部」における 27HC 含有量は、肺がん分化度に依存して高い事も確認された (図4B)。

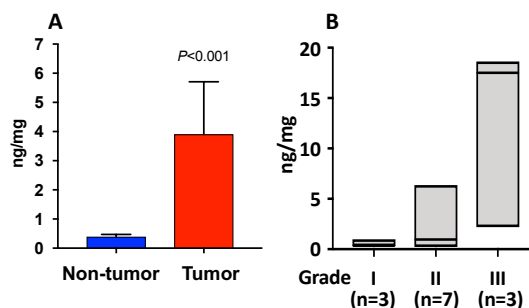


図4 肺がん患者摘出臓器の「がん部」と「非がん部」における 27HC 含有量の違い (A)と「がん部」の 27HC 含有量とがん分化度との関係 (B)

#### (5) 肺がん患者摘出肺組織における遺伝子発現量

「非がん部」と比較して、「がん部」では、ERβ の mRNA 発現が有意に高く、その標的遺伝子である cMyc の mRNA も有意に高く発現していた (図5)。さらに、「がん部」におけるがん細胞の増殖因子である VEGF ならびに HIF-1α と -1β の mRNA 発現も、「非がん部」と比較して有意に高い事も確認された。

(6) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

これまで、乳がんにおいて、27HC の ER $\alpha$  に対する SERM 作用を介して、がん細胞の増殖を促進する事が明らかとなっているが、乳がん以外のがん種での検討は国内外を含めてほとんど行われていない。今回、婦人科系以外のがん細胞の増殖に対して、エストロゲンのみならず 27HC が関連している可能性が明らかになった。この事は、ERs (特に ER $\beta$ ) を発現する婦人科系以外のがんの治療にも性別を問わず、肺胞マクロファージからの 27HC の分泌や ERs 活性を抑制する事が有用である可能性を示している。これらの知見は、がん予防や治療における新しいストラテジーを提案する成果で、学術的、社会的なインパクトは大きいと考えられる。

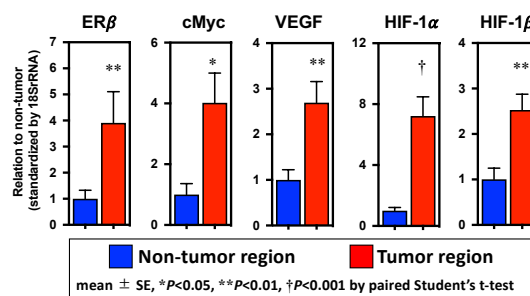


図5 肺がん患者摘出臓器の「がん部」と「非がん部」における ER 関連因子とがん細胞増殖因子の遺伝子発現の比較

(7) 今後の展望

本検証の結果、肺がん患者のがん部や培養細胞株では ER $\beta$  を発現しており、27HC により活性化される肺がん細胞の増殖が、ER $\beta$  特異的アンタゴニストにより抑制された。また、肺がん組織のがん部における 27HC 含有量と分化度に関連性がある事も明らかになった。そのため、肺がん進展予防や治療において、ER $\beta$  の阻害に着目したストラテジーの発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Haruka Namikawa-Kanai, Teruo Miyazaki, Taisuke Matsubara, Shunsuke Shigefuku, Shotaro Ono, Eiji Nakajima, Yukio Morishita, Akira Honda, Kinya Furukawa, Norihiko Ikeda	4. 巻 10 (7)
2. 論文標題 Comparison of amino acid profile between the non-tumor and tumor regions in the patients with lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res	6. 最初と最後の頁 2145-2159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 並川晴佳, 宮崎照雄, 本多彰, 小野祥太郎, 中嶋英治, 古川欣也
2. 発表標題 Comparison of amino acid profile between non-tumor and tumor regions in the patients with lung cancer
3. 学会等名 第183回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田一樹, 宮崎照雄, 本多彰, 松原泰輔, 金井晴佳, 重福俊祐, 中嶋英治, 池田徳彦, 小野祥太郎, 古川欣也, 森下由紀雄
2. 発表標題 27-hydroxycholesterolによる肺がん細胞増殖促進作用
3. 学会等名 第187回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 並川晴佳, 宮崎照雄, 本多彰, 小野祥太郎, 中嶋英治, 古川欣也, 池田徳彦
2. 発表標題 Comparison of amino acid profile between non-tumor and tumor regions in the patients with lung cancer
3. 学会等名 第12回三大学交流セミナー
4. 発表年 2019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	宮崎 照雄  (Miyazaki Teruo)  (60532687)	東京医科大学・医学部・准教授   (32645)	
研究分担者	本多 彰  (Honda Akira)  (10468639)	東京医科大学・医学部・教授   (32645)	
研究分担者	中嶋 英治  (Nakajima Eiji)  (60366143)	東京医科大学・医学部・講師   (32645)	

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