

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591071
 研究課題名（和文） 乳癌と子宮内膜癌のエストロゲン感受性、内分泌治療反応性相違の分子機序の解明に関する研究
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of difference of estrogen sensitivity and response to endocrine therapy in breast and endometrial cancers
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：

乳癌と子宮内膜癌のエストロゲン応答遺伝子について、マイクロアレイを用いて比較したところ、そのプロファイルは大きく異なることが明らかとなった。また、子宮内膜癌の癌微小環境を解析した結果、乳癌と同様、癌細胞の ER 活性化能を有していた。さらに、原発腫瘍細胞への ERE-GFP レポーターウイルスの導入によって、子宮内膜癌細胞も高い ER 活性を有しているものが多いことも明らかとなった。これらの結果は、症例によっては、乳癌同様、アロマターゼ阻害剤が有用である可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Microarray analysis of the breast and endometrial cancer revealed that the expression profile of their ER-response genes was significantly different from each others. The cancer microenvironment of the endometrial cancer showed ER activating ability as similar to that in breast cancer. Furthermore, endometrial cancer cells obtained from surgical specimens showed substantial ER activity by ERE-GFP adenovirus assay. These results suggest that aromatase inhibitor may have some therapeutic value in some endometrial cancers.

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：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：子宮内膜癌、乳癌、エストロゲン、マイクロアレイ、ホルモン療法、核内受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) その発生・進展にエストロゲンが関係すると思われる乳癌、子宮体癌はともに近年、

罹患率が急速に上昇している。乳癌においてはエストロゲンとその受容体が内分泌治療の標的となっており、進行再発癌、術後補助

療法、術前治療と、幅広い局面で施行され、良い成績を上げている。さらに近年、LH-RH アゴニストや第3世代のアロマターゼ阻害剤の登場によってその治療は大きく進歩しているが、再発症例の予後は望めない為、より強力な primary systemic therapy の開発が重要である。一方、子宮体癌においては従来、乳癌で行われているような内分泌療法は効果的でないと言われてきた。

エストロゲンは本来、各種標的臓器においてリガンド依存性転写因子でもあるエストロゲン受容体 (ER) を介して下流標的遺伝子の発現を制御することにより、細胞の増殖、分化を調節している。しかし、乳癌や子宮体癌の発生・進展における ER の役割については十分解明されていない。特に子宮癌に関するこの分野の研究は乳癌よりもかなり遅れているのが実情である。また、これらの腫瘍においては癌部周囲の間質繊維芽細胞からのエストロゲン合成・供給が重要であることも示唆されている。特に乳癌においてはその点のアロマターゼ阻害剤の標的となっているのであるが、子宮癌については癌微小環境についての研究はほとんどない。

2. 研究の目的

そこで、これらの近年著しく進歩した効果的で QOL の良い新規内分泌療法を子宮内膜癌の治療や再発予防に適応する可能性をさぐる、及び乳癌のホルモン療法の効果をより高める手立てを探索することを目的に、乳癌と子宮体癌の癌周辺微小環境も含めた生物学的特性を特に両者の差異に着目して明らかにする。

これまでの我々の長年の乳癌やエストロゲン受容体に関する基礎研究の成果に基づき、乳癌と子宮体癌のエストロゲンに対する反応性の違い、すなわち、なぜ両者は同様にエストロゲン依存性に発生・進展するのに、ホルモン療法の奏効性に大きな違いがあるのか。特にエストロゲン受容体標的遺伝子の発現誘導プロファイルの違いを手がかりに乳癌、子宮体癌の培養細胞、組織標品を用い、我々が開発してきた、エストロゲン応答性マイクロアレイ (培養細胞解析用) や 3 次元型マイクロアレイ (臨床検体解析用)、ERE-GFP を安定導入したエストロゲンシグナル活性化検出用の指示細胞 (研究計画・方法を参照) 等を用いて解析し、分子レベルでの乳癌と子宮癌のエストロゲンシグナル経路の違いとその作用の違いを詳細に明らかにする。特にエストロゲンシグナル経路の制御機構として、増殖因子によるリン酸化シグナルカス

ケードとエストロゲンシグナル経路とのクロストークに着目する。これにより、EGFR や Her2 シグナル経路の遮断薬とホルモン療法の使い分けや併用治療の可能性の理論的根拠を明らかにする。また、臨床検体を用いた子宮癌の微小環境の解析結果から、子宮内膜癌や子宮内膜増殖症へのアロマターゼ阻害剤の適応の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 子宮におけるエストロゲン応答遺伝子の解析と乳癌との比較

子宮癌あるいは正常子宮内膜におけるエストロゲン依存性のメディエーターとなっている因子を同定し、乳癌の結果と比較する。①現在所有している約 10 種の子宮内膜癌培養細胞株をエストロゲン処理、未処理の状態で培養し、網羅的マイクロアレイ (約 2 万遺伝子) に供し、エストロゲン応答遺伝子を抽出する。

②これらの培養細胞株のエストロゲン依存性増殖能やルシフェラーゼレポーター遺伝子によるエストロゲン応答性転写活性 (ERE 活性)、エストロゲン受容体 (ER) の発現量の解析などを行う

③1 と 2 のデータを比較解析することによって子宮内膜癌におけるエストロゲン応答性責任遺伝子を同定する。

④これらを過去の我々の研究で得た各種乳癌培養細胞株でのエストロゲン応答性遺伝子解析の結果と比較検討し、共通の遺伝子と異なる遺伝子を同定する。これまでの予備的結果から乳癌細胞と子宮癌細胞ではともに ER 陽性であっても、そのプロファイルが大きく異なることが予想される。

⑤網羅的マイクロアレイでは手順の煩雑さ、感度、コストの問題で、多数の臨床検体を解析するのは事実上不可能である。そこで、同定した子宮癌特異的エストロゲン応答遺伝子を載せた 3 次元マイクロアレイ用チップを作成し、最近開発された酵素法による感度増幅法を組み合わせた 3 次元マイクロアレイ解析を行う。乳癌については装置を開発したオリンパス社との共同研究で、すでに乳癌でのエストロゲン応答遺伝子を搭載した 3 次元マイクロアレイチップを作成し、解析を開始している。この新型マイクロアレイシステムによって数時間で従来法の 100 倍の感度の解析が可能であることを確認している (但し搭載できる遺伝子数は数百までであり、むしろこのような focused array に最適である)。本解析に用いる 3 次元マイクロア

レイ装置はすでに林の研究室に設置済みである。

⑥本システムによって少量の検体、あるいはマイクロダイセクション試料からの再現性の高いマイクロアレイ解析が可能となるので、子宮癌、正常内膜、および増殖症の臨床検体の収集を進め、同時に本マイクロアレイによる発現解析の結果を蓄積していく。ここでは八重樫と林が中心となって研究を進める。組織診断、病理学的解析は鈴木が担当する。

(2) 候補遺伝子の患者組織中での詳細な検討

①上記の研究から得られた臨床病理学的諸因子との関係が見られるような候補遺伝子について、その抗体を準備し、パラフィン包埋の保存組織サンプルを対象に免疫染色法によってレトロスペクティブに検討することにより、再発、予後との関係を明らかにする（鈴木が担当）。

②手術前の生検サンプルを用いた解析が可能かどうかを試みる。生検サンプルの場合、材料の量的制限があるため、方法論的検討が重要である。理論的感度からは3次元マイクロアレイで十分可能と思われるが、定量性に問題が生じないか十分に注意が必要である。さらにこれらの結果を同一患者の手術検体の解析結果や実際の治療効果と比較検討する。

4. 研究成果

(1) 子宮癌と乳癌におけるエストロゲン応答遺伝子の解析と比較

乳癌において新規エストロゲン応答遺伝子 EGR3 を同定し、その機能を解析した。その結果、EGR3 はエストロゲン依存性に乳癌細胞の浸潤能を誘導するとともに、乳癌の予後因子となっていることを明らかにした (Suzuki et al. *Endocrine-Related Cancer* 14: 279-292, 2007)。また、IGFBP4 も乳癌の予後と関連することを明らかにした (Mita et al. *Jpn J Clin Oncol* 37: 575-582, 2007)。

子宮癌培養細胞株のエストロゲン依存性増殖能やルシフェラーゼレポーター遺伝子によるエストロゲン応答性転写活性 (ERE 活性)、エストロゲン受容体 (ER) の発現量の解析などを行った。その結果に基づき、複数の子宮癌細胞を対象に網羅的マイクロアレイ等を用いてエストロゲン応答遺伝子を解析した。その結果、MCF-7 細胞等の ER 陽性乳癌細胞の結果とそのプロファイルが大きく異なることが明らかとなった。

そこで、子宮癌組織を用いて網羅的マイクロアレイを行い、正常子宮内膜に比べて癌に特

微的な遺伝子のひとつとしてミッドカインが挙げられた。子宮内膜におけるその発現は子宮癌の病態と関連が見られた (Tanabe et al. *Cancer Sci.* 99: 1125-1130, 2008)。

(2) 子宮内膜癌微小環境の評価系の確立

エストロゲン関連腫瘍の癌微小環境の評価のため、新たなアッセイシステムを構築した。すなわち、エストロゲン応答配列 (Estrogen Response Element) を、ユビキチン結合部位を持つ半減期の短い (定量的に評価するため) GFP 遺伝子の 5' 上流に繋いだ ERE-GFP を乳癌細胞株 MCF-7 に安定導入した株を樹立した。これにより、エストロゲンシグナルの可視化と定量を可能にした (Yamaguchi et al. *Endocrine J.* 56: 1-7, 2009)。手術時に得た検体を初代培養し、この ERE-GFP 指示細胞と共生培養することによってそれぞれの患者組織のエストロゲンシグナルカスケードに及ぼす影響を評価し、これによって、個々の患者の検体の微小環境評価を試みた。

子宮癌の癌部位を含む微小環境、特にエストロゲンシグナルの調節に関係するものの動態を把握するため、乳癌と同様の解析を子宮内膜癌から得られた間質細胞と共培養にて行った。その結果、子宮癌でも乳癌と同様、間質細胞による癌細胞の ER シグナルの活性化が見られた (Matsumoto et al. *Endocrine-Related Cancer* 15: 451-463, 2008)。

エストロゲンによって制御される遺伝は子宮癌と乳癌で異なるものの、症例によってはアロマターゼ阻害剤のような間質からのエストロゲン刺激を遮断するホルモン療法が子宮内膜癌の治療に有用な可能な可能性が考えられる。

(3) 子宮内膜癌と乳癌の原発腫瘍組織の ERE-GFP 活性のアッセイ

ERE-GFP をアデノウイルスに導入したアッセイ系を用いて、手術時に得た子宮癌検体と乳癌検体の初代培養にウイルスを導入し、原発腫瘍の ER 活性化能を定量、評価し、子宮内膜癌のエストロゲンシグナルの意義と乳癌における結果との比較検討を行った。その結果、多くの子宮内膜癌で、乳癌と同様の高い ER 転写活性を有することを明らかにした (Matsumoto et al. *Endocrine-Related Cancer* 15: 451-463, 2008)。これらのことから、エストロゲンシグナルに依存した増殖機構を有すると思われる症例を選択すれば、子宮内膜癌においても乳癌と同様のホルモン療法、特にアロマターゼ阻害剤を用いた治療も十分有効ではないかと思われる。今後はそのような症例の選択に有用な実用的バイオマーカーの開発が重要と思われる。

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 25 件)

- ① Yamaguchi, Y., Hayashi, S. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, 56(1), 1-7, 2009. 査読有.
- ② Suzuki, F., Akahira, J., Miura, I., Suzuki, T., Ito, K., Hayashi, S., Sasano, H., Yaegashi, N. Loss of estrogen receptor β isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5' untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Sci.*, 99, 2365-2372, 2008. 査読有.
- ③ Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and hormonal therapy. *Breast Cancer*, 15, 256-261, 2008. 査読有.
- ④ Santen RJ, Song RX, Masamura S, Yue W, Fan P, Sogon T, Hayashi S. Nakachi K, Eguchi H. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 630, 19-34, 2008. 査読有.
- 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.*, 14, 4417-4426, 2008 Jun 25. 査読有.
- ⑥ Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 109, 201-206, 2008 Mar 12. 査読有.
- ⑦ Tanabe, K., Matsumoto, M., Ikematsu, S., Nagase, S., Hatakeyama, A., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Kadomatsu, K., Hayashi, S., Yaegashi, N. Midkine and its clinical significance in endometrial cancer. *Cancer Sci.*, 99, 267-271, 2008 Jun. 査読有.
- ⑧ Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Hatakeyama, A., Takei, H., Niikura, H., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H., Yaegashi, N. and Hayashi, S. Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction. *Endocrine-Related Cancer*, 15, 451-463, 2008 Jun. 査読有.
- ⑨ Tanabe, K., Utsunomiya, H., Tamura, M., Niikura, H., Takano, T., Yoshinaga, K., Nagase, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Hayashi, S. and Yaegashi, N. The

expression of retinoic acid receptors in human endometrial carcinoma. *Cancer Sci.*, 99, 1125-1130, 2008. 査読有.

⑩ Mita, K., Zhang, Z., Ando, Y., Toyama, T., Hamaguchi, M., Kobayashi, S., Hayashi, S., Fujii, Y., Iwase, H. and Yamashita, H. Prognostic significance of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 expression in breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 37(8), 575-582, 2007. 査読有.

⑪ Suzuki, T., Inoue, A., Miki, Y., Moriya T., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. Early growth responsive gene 3 (EGR3) in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocrine-Related Cancer*, 14, 279-292, 2007. 査読有.

⑫ Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa C., Yamaguchi, Y., Kitada, K., Honma, S., Moriya, T., Hirakawa, H., Evans, D.B., Hayashi, S., Ohuchi, N. and Sasano, H. Aromatase localization in human breast cancer tissues - possible interaction between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res.*, 67(8), April, 3945-3954, 2007. 査読有.

⑬ Sogon, T., Masamura, S., Hayashi, S., Santene, R.J., Nakachi, K., and Eguchi, H. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor α gene is correlated with its enhanced expression in estrogen-ablation resistant MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 105, 106-114, 2007. 査読有.

⑭ Inoue, A., Seino, Y., Terasaka, S., Hayashi, S., Yamori, T., Tanji, M. and Kiyama, R. Comparative profiling of the gene expression for estrogen responsiveness in cultured human cell lines. *Toxicology In Vitro*, 21, 741-752, 2007. 査読有.

⑮ Suzuki, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. 5 α -reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. *Int. J. Cancer*, 120, 285-291, 2007. 査読有.

[学会発表] (計 84 件)

① Motoyuki Kataoka , Yuri Yamaguchi , Noriaki Sawada , Yo-ichiro Morita , Dean B Evans , Hideyuki Yasuno , Kazushige Mori , Shin-ichi Hayashi : Antitumor activity of chemoendocrine therapy in premenopausal

(Capecitabine [CAP]+Tamoxifen[TAM]) and postmenopausal (CAP+Letrozole[LET]) human breast cancer [BC] xenograft models. 31st San Antonio Breast Cancer Symposium(San Antonio) 2008. 12. 11

②神代理史、相馬佳絵、村山明子、仲島由佳、藤村亜紀子、大家祥平、山口ゆり、川野輪香織、木村圭志、黒住昌史、林 慎一、柳澤純：ユビキチンリガーゼCHIPは癌の浸潤性を抑制する。第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会合同大会(神戸) 2008. 12. 9

③山口 ゆり、松本光代、大庭 華子、清野祐子、武井 寛幸、黒住 昌史、林 慎一：乳癌のエストロゲンシグナルとCancer-Associated Fibroblast(CAF)の機能。第 16 回日本ステロイドホルモン学会学術集会(福井) 2008. 11. 22

④Kotaro Azuma, Tomohiko Urano, Shin-ichi Hayashi, Ryuichi Sakai, Yasuyoshi Ouchi, Satoshi Inoue : Association of Estrogen Receptor α and HDAC6 causes novel nongenomic action in breast cancer cells. 第 67 回日本癌学会学術総会(名古屋) 2008. 10. 28

⑤大庭 華子、清野 祐子、小林 康人、武井 寛幸、黒住 昌史、林 慎一、山口 ゆり：乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質線維芽細胞の特性の解析。第 67 回日本癌学会学術総会(名古屋) 2008. 10. 28

⑥山口 ゆり、清野 祐子、林 慎一：乳癌微小環境のエストロゲンシグナルに対するChemo-endocrine併用療法による抑制効果。第 67 回日本癌学会学術総会(名古屋) 2008. 10. 28

⑦今野 広海、白山 知子、山口 ゆり、清野 祐子、松本 光代、丹羽 俊文、林 慎一：ERのリガンド非依存性活性化を呈するエストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株の樹立。第 67 回日本癌学会学術総会(名古屋) 2008. 10. 28

⑧松本 光代、清野 祐子、山口 ゆり、武井 寛幸、黒住 昌史、八重樫 伸生、林 慎一：ERE-GFPアッセイによる原発性乳がんのエストロゲン受容体転写解析とその臨床病理。第 67 回日本癌学会学術総会(名古屋) 2008. 10. 28

⑨Yamaguchi, Y., Seino, Y., Oba, H., Takei, H., Kurosumi, M., and Hayashi, S. In vivo assessment of estrogen signal-related function of carcinoma-associated fibroblast (CAF) in human breast cancer. 13th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック) 2008. 9. 27

⑩松本 光代、伊藤 潔、新倉 仁、笹野 公伸、八重樫 伸生、林 慎一：子宮体癌-間質細胞におけるエストロゲンを介した相互

作用の解析。第 13 回日本産婦人科乳癌学会(東京) 2008. 9. 14

⑪松本 光代、清野 祐子、山口 ゆり、武井 寛幸、黒住 昌史、八重樫 伸生、林 慎一：ERE-GFPアッセイを用いた原発性乳癌のエストロゲン受容体転写活性解析と臨床病理学的因子との関連。第 9 回ホルモンと癌研究会(岐阜) 2008. 6. 20

⑫鈴木 史彦、赤平 純一、三浦 伊久美、伊藤 潔、鈴木 貴、林 慎一、笹野 公伸、八重樫 伸生：ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor beta isoformsの発現とメチル化についての検討。第 9 回ホルモンと癌研究会(岐阜) 2008. 6. 20

⑬今野 広海、白山 知子、山口 ゆり、清野 祐子、松本 光代、丹羽 俊文、林 慎一：ERの恒常的活性化を呈するホルモン療法耐性モデル乳癌細胞株の樹立。第 9 回ホルモンと癌研究会(岐阜) 2008. 6. 20

⑭大庭 華子、山口 ゆり、小林 康人、武井 寛幸、黒住 昌史、林 慎一：エストロゲンシグナルに関連した乳癌間質細胞の特性の解析。第 9 回ホルモンと癌研究会(岐阜) 2008. 6. 20

⑮東 浩太郎、堀江 公仁子、大内 尉義、林 慎一、堺 隆一、井上 聡：乳癌における細胞膜局在エストロゲン受容体の新規核外作用の解析。第 4 回SERM学術研究会学術集会(東京) 2008. 6. 15

⑯S Saji, M Hirose, H Iwase, Y Yamaguchi, M Toi, S Hayashi, K Kuroi :Rationale for salvage therapy with high-dose Selective Estrogen Receptor Modulator after treatment failure of Aromatase Inhibitors in breast cancer. AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY(Chicago) 2008. 5. 30

⑰F Suzuki, J Akahira, I Miura, S Nagase, T Takano, H Niikura, T Suzuki, K Ito, S Hayashi, H Sasano, N Yaegashi :Expression of estrogen receptor (ER) beta isoforms and its correlation with DNA methylation in human epithelial ovarian cancer. AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY(Chicago) 2008. 5. 30

⑱鈴木 史彦、赤平 純一、伊藤 潔、鈴木 貴、林 慎一、笹野 公伸、八重樫 伸生：ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor beta isoformsの発現とメチル化についての検討。第 81 回日本内分泌学会(青森) 2008. 5. 16

⑲松本 光代、清野 祐子、山口 ゆり、武井 寛幸、黒住 昌史、笹野 公伸、八重樫 伸生、林 慎一：ERE-GFPアッセイによる原発性乳癌のエストロゲン受容体転写活性の解析と臨床病理学的因子との関連。第 16 回日本内分泌学会東北地方会(仙台) 2008. 4. 26

⑳神代理史、相馬佳絵、中島由佳、山口ゆり

、川野輪香織、木村圭志、黒住昌史、林 慎一、柳澤 純：ユビキチンリガーゼCHIPは癌の悪性化を抑制する．第8回関東ホルモンと癌研究会（東京）2008.1.29

〔図書〕（計1件）

①林 慎一、医薬ジャーナル株式会社、みんなに役立つ乳癌の基礎と臨床、2009、53-63

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

①名称：A transgenic cell and method for cell analysis

発明者：林 慎一、山口 ゆり

権利者：オリンパス株式会社

種類：特許

番号：06756855-1222PCT/JP2006310935

出願年月日：2008年2月8日

国内外の別：外国

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

山口 ゆり (YAMAGUCHI YURI)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・

主任研究員

研究者番号：80166628