

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890146
 研究課題名(和文) 唾液腺腫瘍におけるエストロゲンレセプターの役割
 研究課題名(英文) The role of the estrogen receptor on salivary gland tumors.

研究代表者
 吉村 友秀(YOSHIMURA TOMOHIDE)
 愛媛大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：80452697

研究成果の概要：

エストロゲンレセプター発現唾液腺癌由来細胞株は、エストロゲン処理により細胞増殖が亢進することが明らかとなった。そのため、エストロゲンレセプターの拮抗剤であるタモキシフェンにより、細胞増殖の抑制が期待される。また、耳下腺、顎下腺、舌下腺および口唇線、舌腺、口蓋腺といった小唾液腺の正常唾液腺組織および腺様嚢胞癌、粘表皮癌などの唾液腺癌組織のエストロゲンレセプター発現頻度は多くないと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：唾液腺癌、エストロゲン、エストロゲンレセプター、タモキシフェン、ホルモン療法

1. 研究開始当初の背景

外科病理学において、以前より唾液腺腫瘍と乳腺腫瘍の病理組織学的類似性が指摘されている。乳腺腫瘍におい

て、プロゲステロンレセプター(PR)、エストロゲンレセプターといったホルモンレセプターの発現を維持している症例は、ホルモン療法に反応し、

予後がよいことが知られている。

一方、唾液腺腫瘍において、PR が発現しているという報告がなされているものの、その役割についてはこれまであまり知られていなかった。そこで、我々はこの点に注目し唾液腺癌由来培養細胞株を用いて研究を行ってきた。その結果、PR 発現唾液腺由来細胞株においても、プロゲステロン (PG) 処理することで、著明な形態の変化とともに、乳腺腫瘍と同様な細胞増殖抑制が誘導されることが明らかになった (Yoshimura T, Hamakawa H et al. Growth inhibition of human salivary gland tumor cells by introduction of progesterone receptor and progesterone treatment. *Endocrine-Related Cancer* (2007 Dec;14(4):1107-16))。また、浸潤、転移、in vivo においても PR 発現唾液腺由来細胞株は PG 処理によりその悪性形質が抑制されるということが明らかになっている。

他方、もう一つのホルモンレセプターであるエストロゲンレセプターは、乳腺腫瘍において、その発現を維持している症例では、エストロゲンの拮抗剤であるタモキシフェンを投与することで予後を改善できることが知られており、実際に臨床においてすでに使用されている。しかも、PR と比較しその予後に与える影響は大きいとわかっている。唾液腺において乳腺

と同様にエストロゲンが発現しているという報告がなされているものの、唾液腺腫瘍におけるエストロゲンレセプター、エストロゲン、タモキシフェンの役割はほとんど知られていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、唾液腺癌組織ならびに正常唾液腺組織におけるエストロゲンレセプター発現頻度についての検討をおこなう。その上で、唾液腺癌組織におけるエストロゲン、エストロゲンの拮抗剤であるタモキシフェンの悪性形質に与える影響について検討をおこなう。

3. 研究の方法

正常唾液腺組織ならびに唾液腺腫瘍の生検材料あるいは手術材料を用いて、実際に乳癌の病理組織診断で使用されている Dako の染色システムを用いて免疫組織学的検索を行い、エストロゲンレセプターの発現頻度を明らかにする。また、唾液腺癌組織からの初代培養についても取り組む。その上で、既に所有しているヒト唾液腺癌由来培養細胞株、ACCM、HSY、HSG におけるエストロゲンレセプターの発現スクリーニングを行う。そしてエストロゲンレセプターを発現している細胞株を用いて以後の研究を行う。もしもエストロゲンレセプターを発現している細胞株がなければ Dr. Chambon より既に供与を受けているエストロゲンレセプターの発現ベクターを、lipofectamin 2000 を用い、リポフェ

クション法により唾液腺由来細胞株へ導入する。その上で、安定してエストロゲンレセプターを発現する細胞株 5-10 個程度をエストロゲンレセプター発現細胞株として実験に使用し、エストロゲン処理が悪性形質に与える影響について検討を行う。まずエストロゲンが細胞増殖に与える影響を解析する。具体的には cell count により、エストロゲンが細胞増殖に与える影響について検討する。また、エストロゲンレセプターの発現量と増殖に与える影響に相関関係があるかどうかについても検討を行う。

4. 研究成果

はじめに唾液腺組織におけるエストロゲンレセプターの発現について検討をおこなった。耳下腺、顎下腺、舌下腺および小唾液腺の正常唾液腺組織、および腺様嚢胞癌、粘表皮癌、といった唾液腺癌組織について、実際に乳癌においてホルモンレセプターの発現を調べるために臨床で応用されている Dako のシステムを用いて免疫組織学的検討を行った。その結果、正常唾液腺組織、および唾液腺癌組織ともにエストロゲンレセプターの発現を認めなかった。唾液腺組織におけるエストロゲンレセプターの発現頻度は決して多くないものの、エストロゲンレセプターが発現しているという報告があり、さらに検討が必要と考えている。

次に唾液腺腫瘍由来培養細胞株 HSG、HSY、ACCM のエストロゲンレセプターの発現について western blotting により検討を行った。その結果、いずれの細胞にもエストロゲンレセ

プターの発現を認めなかった。また、正常唾液腺組織並びに唾液腺癌組織の初代培養についても取り組んだ。唾液腺癌は一般に増殖が遅く株化することが困難であり、確立された細胞株が少ない。エストロゲンレセプター発現唾液腺癌細胞株の確立を目的に実験を行ったがやはり困難であった。また上記の HSG、HSY、ACCM はエストロゲンレセプターを発現していなかったが、これはエストロゲンレセプターを発現していない高悪性唾液腺腫瘍細胞が培養株化されているためと考えられた。そのため、あらかじめ計画していたとおり、Dr. Chambon より供与されたエストロゲンレセプター発現ベクターを lopofectamin2000 を用いてリポフェクション法により ACCM 細胞へ導入し、エストロゲンレセプター発現 ACCM 細胞を製作した。これらの細胞を用いて、エストロゲンレセプター発現が細胞増殖に与える影響について検討をおこなった。具体的にはエストロゲンレセプター発現培養細胞株およびコントロール細胞にエストロゲンを加え、その細胞増殖に与える影響について検討をおこなった。その結果、エストロゲンレセプター発現 ACCM 細胞はエストロゲンの添加によりコントロール細胞と比較し増殖が亢進することが明らかとなった。

今後であるが、本実験で制作したエストロゲンレセプター発現 ACCM 細胞のエストロゲンだけでなく、タモキシフェン処理をした場合の細胞の増殖に与える影響について検討をする必要がある。それだけではなく、エストロゲン、タモキシフェン処理をした場合の

cell cycle distribution の変化を flowcytometry にて検討したいと考えている。また、エストロゲンレセプター発現 ACCM 細胞にエストロゲン、タモキシフェン処理をすることにより、増殖関連タンパクである P21、P27、c-myc の変化を western blotting により検討をすること、テロメラーゼ活性に与える影響なども検討していきたいと考えている。さらにはエストロゲンレセプター発現 ACCM 細胞のエストロゲン、タモキシフェン処理をした場合の浸潤、転移、In vivo における作用について検討する必要がある。浸潤については、ボイデンチャンバー法、ゼラチンザイモグラム、浸潤に関連するタンパクの発現についてウエスタンブロッティングを用いて検討をすることが考えられる。また、卵巣を摘出したメスのヌードマウスの腹部皮下に腫瘍を接種した後、エストロゲン、タモキシフェンを投与することで、In vivo におけるエストロゲン・タモキシフェンの細胞増殖に与える効果を検討すること、ヌードマウスの尾静脈より癌細胞を接種することにより、肺への転移能に対するエストロゲン、タモキシフェンの効果についても検討することも計画している。これらの一連の実験により、唾液腺癌組織におけるホルモン療法の可能性を明らかにしてゆく予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

① Tomohide Yoshimura, Tomoki Sumida, Ryuichi Murase, Koh-ich Nakashiro, Hiroyuki Hamakawa: Functional restration with dental implant after the treatment of

oral cancer, 12th International Congress on Oral Cancer, 2008 May 22-25, shanghai

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 友秀 (YOSHIMURA TOMOHIDE)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80452697

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者