

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591760

研究課題名（和文） 組織内エストロゲン定量による前立腺疾患リスクおよび伸展予測

研究課題名（英文） Tissue hormone determination and prostate cancer

研究代表者

柴田 康博（SHIBATA YASUHIRO）

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：90344936

研究成果の概要（和文）：前立腺組織内のエストロゲン量は微量で、針生検で得られる微量組織では測定が困難であった。前立腺組織内ではエストロゲンはアンドロゲンと同様の動態を示した。ヒト前立腺周囲脂肪組織内では活性型アンドロゲン、エストロゲン産生に至るステロイド代謝が行われていることが示された。アンドロゲン除去療法を行われた症例でも産生が認められており、去勢抵抗性前立腺癌発生に係わる性ステロイドの供給源になる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：The concentration of estrogen in the prostate tissue was very little, that it was difficult to determine it even with a newly developed ultra-sensitive analytical method utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Steroid hormones including active androgens and androgen-synthetic enzyme activity were demonstrated in human adipose tissue. These results suggest that adipose tissue may be another source of androgen synthesis in prostate cancer and may be related to the development of CRPC by stimulating androgen receptor-bearing cancer cells, which become hypersensitive to its ligand.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、エストロゲン、アンドロゲン、脂肪組織、ホルモン代謝

1. 研究開始当初の背景

前立腺はホルモン依存性の臓器で、その機能や増殖は主にアンドロゲンにより制御されており、前立腺肥大症や前立腺癌をはじめとする前立腺疾患の発生、進展にもアンドロゲンが密接に関与している。前立腺組織内では95%以上を占める精巣由来のテストス

テロン（T）が5 α 還元酵素により速やかに変換されてより活性の強いジヒドロテストステロン（DHT）となり作用する。残りの数パーセントが副腎由来であるが、これはデヒドロエピアンドロステロン（DHEA）等の副腎性アンドロゲンが、前立腺組織内で変換酵素により産生されたものである。さらに、Tは組

組織内のアロマトラーゼによりエストラジオール (E2) へと変換される。このように血中から前立腺内に取り込まれた性ホルモン構成は、組織内の変換酵素の作用により血中と異なり、組織内ホルモン濃度を知ることが、前立腺疾患と性ホルモンの関係を解明する上で重要である。

これまで我々は組織内の性ホルモンと前立腺疾患の関係について、高感度定量法を確立して研究を行い、加齢による前立腺組織内 E2/DHT の上昇が間質優位の前立腺肥大症発生に関与していることを示し (Shibata Y ら Prostate, 2000)、ラットモデルにおける組織内アンドロゲンの評価 (Kashiwagi B ら J Androl, 2005) を行い、同モデルによりホルモンと前立腺機能調節について示し (Shibata Y ら Encocrinology, 2004)、また前立腺肥大症における前立腺組織内副腎性アンドロゲンの定量 (Arai S ら米国泌尿器科学会, 2009) など、国際的にも評価される成果を得てきた。これらの研究を通して、前立腺内に α と β 2 つの受容体の存在が報告されている、エストロゲンの役割は未知であった。エストロゲンに関しては、癌化への関与 (Bosland MC ら Carcinogenesis, 1995)、前立腺肥大症との関係 (Krieg M ら J Clin Endocrinol Metab, 1993)、加齢による相対的なエストロゲン増加の前立腺疾患発生への関与 (Vermeulen A ら Aging Male, 2002) などいずれもアンドロゲンとの協調的作用が示唆される報告があるが、組織内での濃度に関しては、その存在が微量であるために未だ十分に明らかにされていない。前立腺疾患の発生、伸展を明らかにする上では、組織内エストロゲンの評価が急がれる。

このたび、精製過程や誘導体形成に工夫を加え、液体クロマトグラフィー、タンデムマススペクトロメトリー (LC-MS/MS) の分析手法を用いて、微量組織中のエストロゲン定量が可能となった (Arai S ら Steroids, 2009)。本定量法によれば、これまで用いられていた放射免疫測定 (RIA) による定量では不可能であった、通常の前立腺針生検で得られる微量組織での組織内エストロゲン定量が可能と考えられる。さらに同時にアンドロゲンの定量も可能なので、前立腺疾患と重要な関係をもつと思われる組織内のエストロゲン/アンドロゲン比率を計算することも可能となってくる。

2. 研究の目的

はじめに新規開発された高感度定量法により、通常 18 ゲージ生検針で得られた前立腺生検組織内のエストロゲン定量が可能であるか検証する。定量可能であれば、多数症例でエストロゲンを含めた組織内性ステロイドホルモン濃度を明らかにして、前立腺

疾患の発生・伸展との関係を解明し、治療方針決定に関わる因子や新たな治療法開発につながる臨床的に有用な情報となるかを検証する。生検組織を用いた前立腺組織内エストロゲン定量に関する研究は皆無であり、研究方針は得られた成果により適宜変更する。

通常 18 ゲージ生検組織での定量が困難であるときは、前立腺癌に対する前立腺全摘除術施行症例より得られた前立腺から採取した前立腺組織を用いて、組織内ホルモン定量を行い、その意義について検討する。また、前立腺周囲には脂肪組織が豊富にあり、近年脂肪と前立腺疾患の関係が報告されており、前立腺周囲組織内の組織内ホルモン濃度、ホルモン代謝についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取、集積

全ての検体採取は当施設の臨床研究倫理審査委員会での審査を経て、承認を得てから行う。実際の検体採取に際しては、対象患者に研究内容を説明し、文書による同意書を得てから行う。集積する組織は、前立腺癌疑いで前立腺生検を施行する患者より 18 ゲージ針生検組織を採取し、前立腺癌で前立腺全摘除術を施行する患者よりは前立腺組織と、前立腺周囲の脂肪組織を採取する。採取した組織は直ちに液体窒素下に凍結し、定量まで保存する。

(2) 針生検組織でのエストロゲン測定の可能性についての予備的検討

少数検体において実際に LC-MS/MS を用いた高感度組織内ホルモン定量法による微量生検組織内エストロゲン定量を行い、定量が可能かを検討する。

(3) 前立腺全摘除前立腺組織内ホルモン定量

前立腺全摘除術施行患者より摘出した前立腺組織内のホルモニー斉定量を行う。対象にはホルモン無治療の患者およびアンドロゲン除去療法施行中の患者を含めて比較検討する。

(4) 前立腺周囲脂肪組織内ホルモン定量

前立腺全摘除術施行患者より摘出した前立腺周囲脂肪組織内のホルモニー斉定量を行う。

(5) 前立腺周囲脂肪組織内ステロイドホルモン代謝の解析

前立腺周囲脂肪組織内のステロイドホルモン代謝酵素の活性を同位体ラベル基質を用いて確認する。

なお、前立腺全摘除術症例の患者背景は表 1

に示す。

表1 組織内ステロイドホルモン代謝酵素活性の検出

Patient	Age	Duration of ADT (months)	Gleason score	Stage	PSA (ng/ml)
1	69	-	4+3	T2cNOMO	5.94
2	56	-	4+3	T1cNOMO	9.56
3	63	-	3+4	T1cNOMO	10.61
4	63	-	4+3	T1cNOMO	18.17
5	48	-	3+4	T2cNOMO	6.44
6	70	-	3+4	T2cNOMO	7.14
7	65	3	4+3	T2aNOMO	9.47
8	56	2	4+5	T2bNOMO	14.46
9	68	2	5+4	T1cNOMO	5.97

ADT: Androgen deprivation therapy

4. 研究成果

(1) 前立腺針生検組織でのエストロゲン定量について

多数例での前立腺生検組織内のエストロゲン定量に先だって、測定精度管理を検討するために前立腺全摘出術症例より摘出した前立腺を用いて予備的検討を行った。その結果、実症例では組織内エストロゲン濃度が低い症例があり、通常の 18 ゲージ生検針で得られる前立腺組織量ではエストロゲン測定の精度は不十分であることが判明した。18 ゲージ生検針で 2 本、あるいは 14 ゲージ生検針で 1 本の組織量では定量可能であったが、実症例から採取することは出血のリスク等に関して倫理的に問題があった。そこで前立腺全摘出術症例より摘出直後に 14 ゲージ生検針により採取した前立腺組織を用いて検討を進めることとした。また前立腺疾患の発生・進展において関連が報告されている脂肪組織でのホルモン代謝解析を検討に加えることにした。

(2) 前立腺全摘除前立腺組織内ホルモン定量

前立腺組織内ホルモン濃度は表 2 の通りであった。ホルモン治療により前立腺組織内のエストロゲン濃度は、無治療群の 30% 程度に減少していた。これは組織内アンドロゲンの減少によるものと思われ、組織内のエストロゲンはテストステロンよりアロマターゼにより代謝産生されていることが考えられた。

表2 前立腺組織内性ステロイド濃度

	E1 (pg/g)	E2 (pg/g)	T (pg/g)	DHT (ng/g)
ホルモン無治療群	25.9 ±12.7	19.5 ±7.2	58.0 ±29.0	3.8 ±1.5
ホルモン治療群	7.7 ±2.1	5.7 ±1.2	8.6 ±3.3	0.1 ±0.1

平均±標準偏差

(3) 前立腺周囲脂肪組織内ホルモン定量

前立腺周囲脂肪組織内には表 3 に示すように活性型アンドロゲン、エストロゲン産生に至る各種ステロイドホルモンが存在した。ホルモン治療施行患者では脂肪組織内テストステロンおよびエストロンは、治療前の 25% 程度存在した。脂肪組織内の DHEA やアンドロステンジオンは、ホルモン治療前後で変化は認められなかった。

表3 前立腺周囲脂肪組織内ホルモン濃度

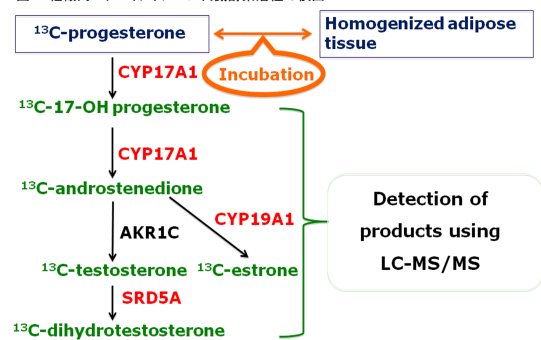
No	Cortisol (ng/g)	Cortisone (ng/g)	P (ng/g)	DHEA (ng/g)	Adione (ng/g)	T (ng/g)	DHT (ng/g)	E2 (pg/g)
1	6.61	2.12	0.62	17.75	3.48	4.51	0.57	110.60
2	4.39	1.78	0.65	13.88	5.63	3.10	0.37	53.00
3	5.33	2.62	0.58	17.65	6.71	3.85	0.35	54.20
4	6.33	2.63	0.50	12.90	4.44	4.00	0.60	40.60
5	4.24	2.53	0.56	20.99	6.30	4.16	0.48	52.60
6	4.51	2.75	0.51	23.94	6.02	3.90	0.46	475.50
7*	4.34	2.63	0.35	15.87	4.37	2.32	0.24	4.20
8*	7.39	4.89	0.13	7.43	1.19	0.08	0.01	3.90
9*	8.55	2.37	0.32	15.39	7.28	0.68	0.09	13.30

* Case with androgen deprivation therapy; P, progesterone; DHEA, dehydroepiandrosterone; Adione, androstenedione; T, testosterone; DHT, dihydrotestosterone; E2, estradiol.

(4) 前立腺周囲脂肪組織内ステロイドホルモン代謝の解析

脂肪組織内でのステロイドホルモン代謝は、図 1 に示す様に、¹³C ラベルした基質を組織ホモジナイズ液とインキュベートし、代謝産物を LC-MS/MS で検出することにより確認した。

図1 組織内ステロイドホルモン代謝酵素活性の検出



本法による検討では、多くの症例でプロゲステロンから、17-OH プロゲステロン、アンドロステンジオンへの代謝が認められ、脂肪組織内での CYP17 活性が確認された (表 4)。またアンドロステンジオンからエストロンへの代謝も認められ、脂肪組織内での CYP19 活性が示された (表 5)。さらに、テストステロンからジヒドロテストステロンへの代謝も確認され、5α還元酵素活性が示された (表 6)。

表4 前立腺周囲脂肪組織内CYP17A活性の検出

No	Matrices	13C-P	13C-17-OHP	13C-Adione	13C-T
		spiked (ng)	measured (pg/g/hr)		
1	adipose tissue (100 mg)	250	158.40	51.80	22.90
2			106.50	92.20	9.80
3			99.90	145.00	0.50
4			92.60	155.20	1.50
5			40.20	105.70	0.00
6			160.50	117.50	2.10
7*			234.80	200.40	16.40
8*			119.70	47.10	0.00
9*			269.70	187.90	0.00

*, Case with androgen deprivation therapy; P, progesterone; 17-OHP, 17-OH progesterone; Adione, androstenedione; T, testosterone.

表5 前立腺周囲脂肪組織内CYP19A活性の検出

No	Matrices	13C-Adione	13C-estrone
		spiked (ng)	measured (pg/g/2 hr)
1	adipose tissue (100 mg)	500	0.94
2			0.67
3			1.79
4			1.28
5			0.51
6			0.00
7*			0.00
8*			0.66
9*			0.41

*, Case with androgen deprivation therapy; Adione, androstenedione.

表6 前立腺周囲脂肪組織内SRD5A活性の検出

No	Matrices	13C-T	13C-DHT
		spiked (ng)	measured (pg/g/45 min)
1	adipose tissue (150 mg)	250	239.80
2			199.00
3			243.80
4			308.70
5			165.40
6			132.60
7*			228.30
8*			177.00
9*			441.50

*, Case with androgen deprivation therapy; T, testosterone; DHT, dihydrotestosterone.

これらより、ヒト前立腺周囲脂肪組織内では活性型アンドロゲン、エストロゲン産生に至るステロイド代謝が行われていることが示された。単位脂肪組織内でのホルモン産生は多くはないが、脂肪組織は前立腺周囲に豊富に存在し、肥満の程度により個人差がある。この前立腺周囲脂肪組織でのホルモン産生が、肥満による前立腺癌発生や進展リスクの一因となっている可能性が考えられた。またアンドロゲン除去療法を行われた症例でも産生が認められており、去勢抵抗性前立腺癌発生に係わる性ステロイドの供給源になる可能性が考えられた。

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)

[学会発表] (計8件)

- ① 柴田康博、新井誠二、小池秀和、松井博、宮代好通、本間誠次郎、鈴木和浩、前立腺癌患者体脂肪におけるステロイドホルモン構成および代謝の検討、第101回日本泌尿器科学会総会、2013.4.26、さっぽろ芸術文化の館(北海道)
- ② 柴田康博、シンポジウム：各科領域における組織内内分泌とホルモン依存性癌「演題1：前立腺癌と組織内アンドロゲン」、第13回完答ホルモンと癌研究会、2013.2.2、高崎ビューホテル(群馬県)
- ③ 柴田康博、新井誠二、小池秀和、松井博、本間誠二郎、鈴木和浩、前立腺癌患者における脂肪組織でのアンドロゲン代謝の検討、第100回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ④ 柴田康博、新井誠二、古谷洋介、小池秀和、伊藤一人、鈴木和浩、前立腺癌患者における前立腺周囲脂肪組織でのアンドロゲン産生、第27回欧州泌尿器科学会年次総会、2012.2.27、パリ・レ・パライス会議場(パリ、フランス)
- ⑤ 柴田康博、新井誠二、小池秀和、松井博、本間誠二郎、鈴木和浩、脂肪組織内におけるアンドロゲン合成酵素の遺伝子発現解析およびアンドロゲン定量、第19回日本ステロイドホルモン学会、2011.11.26、福岡大学医学部メディカルホール(福岡県)
- ⑥ 柴田康博、新井誠二、小池秀和、松井博、伊藤一人、本間誠二郎、鈴木和浩、前立腺癌と脂肪組織(第一報)ーヒト脂肪組織内性ステロイドホルモン代謝の検討ー、第99回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21、名古屋国際会議場(愛知県)
- ⑦ 柴田康博、前立腺組織内ホルモン定量の進歩と意義、第3回伊勢志摩前立腺生物学シンポジウム、2010.6.18、鳥羽国際ホテル(三重県)
- ⑧ 柴田康博、新井誠二、小池秀和、松井博、野村昌史、伊藤一人、本間誠次郎、鈴木和浩、ヒト脂肪組織におけるアンドロゲン合成酵素遺伝子の発現、2011.3.21、ウィーン・オーストリアセンター(ウィーン、オーストリア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 康博 (SHIBATA YASUHIRO)

群馬大学・医学部・講師
研究者番号：90344936

(2)研究協力者
新井 誠二 (ARAI SEIJI)

群馬大学大学院・医学系研究科・大学院生

鈴木慶二
群馬大学名誉教授