

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460412

研究課題名(和文) ヒト膀胱尿路上皮癌でのエストロゲン受容体 の役割とその臨床応用

研究課題名(英文) Expression of ER beta in urinary urothelial carcinoma: pathological and clinical significance

研究代表者

中村 保宏 (NAKAMURA, YASUHIRO)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：80396499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膀胱尿路上皮癌細胞では、エストロゲン受容体(ER)と各種エストロゲン合成・代謝酵素が発現していること、ERは癌細胞の遊走能や癌の進展に關与する遺伝子の1つであるMMP11の発現量を抑制していることが確認された。一方、上記エストロゲン合成・代謝酵素の発現量は癌の深達度の上昇により有意に低下していた。以上より、ヒト膀胱尿路上皮癌細胞では局所で合成されたエストロゲンが癌細胞に発現するERを介して癌の進展を調節している一方、進行した膀胱尿路上皮癌ではこれらの酵素の発現低下により局所で合成・代謝されるエストロゲンの關与が低下することで、癌の進展に影響が生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that ER beta and estrogen-producing/metabolizing enzymes were expressed in human urinary urothelial carcinoma, and ER beta might inhibit migration of the carcinoma cells as well as the expression level of MMP11 in the cells. On the other hand, we also confirmed that the expression levels of these enzymes were significantly and inversely correlated with pT stage. Therefore, we conclude that estrogen synthesized in situ could repress development of urinary urothelial carcinoma cells via ER beta, but the lower expression levels of these enzymes in advanced pT stage cases might result in decreased estrogen production and progression and invasion of carcinoma cells.

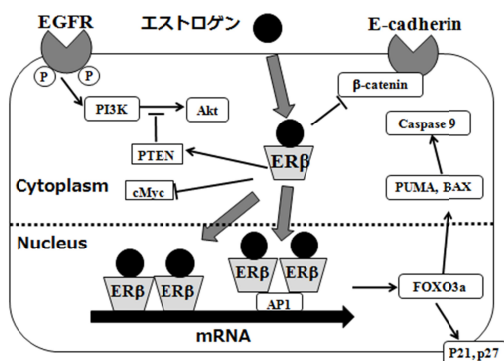
研究分野：人体病理学

キーワード：膀胱尿路上皮癌 ER エストロゲン合成酵素 遊走能 MMP11

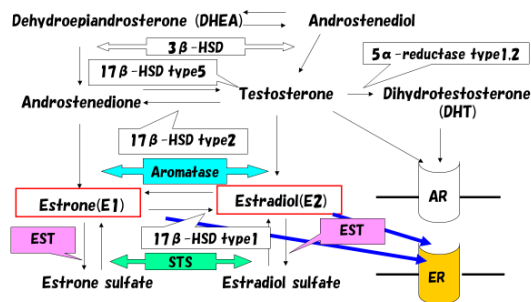
1. 研究開始当初の背景

膀胱尿路上皮癌の本邦での発生頻度は近年増加傾向にあり、その死亡率も決して低くはない。また、最近の疫学データでは、本邦での罹患率の男女比は3:1で男性に多く、罹患率も男性のみが増加傾向であることから、性ホルモンが膀胱尿路上皮癌発症の男女差に関与している可能性が示唆されている(宮崎淳 et al., 病理と臨床, 2012)。さらに、膀胱尿路上皮癌での様々な性ステロイド受容体の発現が検討され、とくにエストロゲン受容体β (ERβ)の発現が比較的高いことが知られている(Shen et al., 2006; Tuygun et al., 2011; Kauffman et al., 2013; Kontos et al., 2011)。加えて、ERβ発現は非筋層浸潤膀胱尿路上皮癌症例で予後良好の予測因子であると報告されている(Han et al., 2014)のに対し、ERβ発現量は膀胱尿路上皮癌の筋層浸潤や転移症例でより高いとされている(Shen et al., 2006)。一方、ERβは乳癌や前立腺癌等での発現も知られており、様々な経路でこれらの癌細胞の増殖、進展に関与することが証明されている。また、乳癌や前立腺癌等の組織では局所で合成されるエストロゲンがERβを介して様々な経路で癌細胞の増殖、進展に関与することが証明されている。以上からは、膀胱尿路上皮癌発症や進展とエストロゲンの局所合成およびERβとの関連が示唆され、これらの関連の詳細を解明することは極めて重要であると考えられる。しかし、これまで膀胱尿路上皮癌においてERβの発現動態と局所でのエストロゲン合成やERβの機能的意義との関係を網羅的に検討した報告は皆無である。以上から、我々は局所で合成されたエストロゲンが膀胱尿路上皮癌に発現するERβに作用することで様々な膀胱尿路上皮癌を調節する因子の発現や機能に影響を与え、かつ膀胱尿路上皮癌細胞の進展や予後などに重要な役割を果たしているのでは、との着想に至った。

各種癌細胞でのERβの作用機序



ステロイドホルモン合成経路



2. 研究の目的

- (1) ヒト膀胱尿路上皮癌組織におけるERβと各種エストロゲン合成・代謝酵素の発現を免疫組織化学的に検討し、これらの発現度と臨床病理学的因子等との関連を評価する。
- (2) ERβ発現膀胱尿路上皮癌培養細胞に同agonist添加を行い、癌細胞の遊走能の計測とERβ関連遺伝子の検索を行う。

3. 研究の方法

- (1) 免疫組織化学的検討

対象：東北大学病院において、膀胱尿路上皮癌と確定診断された症例(手術検体)
ホルマリン固定・パラフィン包埋 (n=113; 術前化学療法、放射線療法は除く。東北大学医学部倫理委員会承認済)。

方法：

The streptavidin-biotin amplification method
抗体：ERβ (Immunotech Gene Tex)、STS、EST (Nakamura et al., 2006)、aromatase (Shibahara et al., 2012)、Ki-67 (Immunotech)。

評価方法：

ERβ, Ki67: 癌細胞を1000個カウント、陽性細胞の割合(%)を求める(LI法)にて発現度を算出する

STS, EST、aromatase: 10%未満; 陰性()
10%以上; 陽性(+)と分類する

統計解析: χ^2 -test or unpaired *t*-test (Statistical significance: $P < 0.05$)

(2) 癌細胞の遊走能測定

培養細胞：T24 膀胱尿路上皮癌培養細胞株 (ERβ発現)

方法：Vehicle あるいは diarylpropionitrile (DPN) 100nM (ERβ agonist) を投与。
→24 時間 incubation 後、細胞遊走能を解析。
PET track-etched membrane cell culture inserts (Becton Dickinson)を使用。

統計学的解析法：unpaired *t*-test (Statistical significance: $P<0.05$)

3)PCR array 法での ERβ関連遺伝子の検索

培養細胞：T24 膀胱尿路上皮癌培養細胞株 (ERβ発現)

方法：Vehicle あるいは DPN 100nM (ERβ agonist) を投与。
→6 時間 incubation 後、RT2 First Strand Kit:(QIAGEN: Cat No.330401)にて cDNA を作成し(n=3)、RT2 Profiler PCR Array (Human Tumor Metastasis)(QIAGEN: Cat No.330231 PAHS-028ZA)および ABI7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)で解析。
Vehicle 群に対して DPN 投与群で有意に発現量が低下した遺伝子を検出。

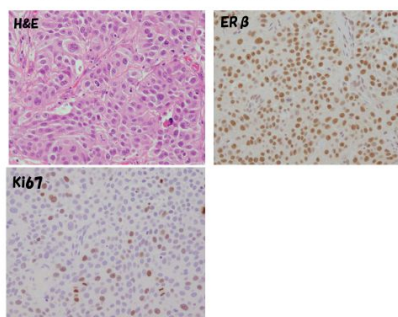
統計学的解析法：unpaired *t*-test (Statistical significance: $P<0.05$)

4 . 研究成果

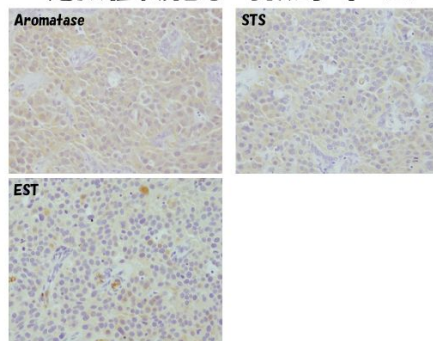
(1)免疫組織化学的検討

ヒト膀胱癌組織では、ERβの発現量は全体的に高いことが確認され、また症例によっては各種エストロゲン合成・代謝酵素も発現していることが証明された。統計学的解析では、pT 間での ERβの発現に有意差はなかった一方で、エストロゲン合成・代謝酵素 (STS, EST, aromatase)の発現は pT の進行とともに有意に低下していた。なお、これらの発現度と他の臨床病理学的因子との関連は認められなかった。

免疫組織化学的検討 (pT2)



免疫組織化学的検討 (pT2)



		positive	negative	p-Value
STS	pTa	43	12	0.0007
	pT1	18	10	
	pT2	11	19	
EST	pTa	44	11	0.0302
	pT1	21	7	
	pT2	16	14	
Arom	pTa	15	40	0.0317
	pT1	3	25	
	pT2	2	28	

(2) 癌細胞の遊走能測定

ERβのアゴニスト添加により、癌細胞の遊走能低下が認められた。

(3) PCR array 法での ERβ関連遺伝子の検索

対照群に比較して、ERβ agonist 投与群で Matrix metalloproteinase 11 (*MMP11*)等 3 遺伝子の有意な発現低下が認められた (*MMP11* の発現低下量が最大であった)。

考察

膀胱尿路上皮癌における ERβの機能に関しては、ERβ agonist が ERβ発現の膀胱尿路上皮癌の増殖を抑制することが証明されている(Hoffman et al., 2013)。我々の in vitro による検討結果では ERβ agonist により癌細胞の遊走能は低下することが確認されたが、

両結果からは in vitro 上は ERβ が尿路上皮癌細胞の増殖・進展を抑制する方向に働くことが証明された。

更に、我々の PCR array 解析では ERβ agonist により *MMP11* の発現量が有意に低下することが確認された。*MMP11* は、MMP ファミリーに属しており、細胞外プロテイナーゼによって切断されると活性化する細胞外基質や細胞膜を分解する前酵素である。とくに、癌においては増殖・浸潤・転移に関与している。膀胱尿路上皮癌では、*MMP11* の過剰発現は臨床病理学的予後不良因子で、疾患特異的生存率と転移の発症と関連することが報告されている(Li et al., 2016)。今回の結果は、ERβ agonist が *MMP11* の発現量を低下させることが癌細胞遊走抑制の一機序である可能性を示唆するものである。

一方、今回の免疫組織化学的検討結果では、膀胱尿路上皮癌において ERβ 発現量が異なる pT 間で有意差は認めない一方、各種エストロゲン合成酵素の発現は pT の進行とともに低下していた。これは、癌の進展とともに癌細胞の形質転換などが生じエストロゲン合成・代謝酵素の発現が低下し、局所で合成・代謝されるエストロゲンの影響が癌細胞に作用しにくくなっている可能性が示唆された。

以上から、膀胱尿路上皮癌組織では局所で合成されたエストロゲンが癌細胞に発現する ERβ に作用して *MMP11* 等の遺伝子の発現調節等により癌に機能的影響を及ぼす一方、pT の進行によりエストロゲン合成・代謝酵素の発現低下、さらに局所でのエストロゲン合成低下が生じることで、癌の進展に影響が生じている可能性が示唆された。

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2件)

(1) ヒト膀胱尿路上皮癌におけるエストロゲン受容体、エストロゲン合成・代謝酵素の発現検討、中村保宏、伊勢和恵、島田啓司、齊藤涼子、柴原裕紀子、笠島敦子、藤島史喜、渡辺みか、小西昇、笹野公伸、第104回日本病理学会総会、2015年4月30日~5月2日、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市

(2) ヒト膀胱尿路上皮癌におけるエストロゲン受容体、エストロゲン合成・代謝酵素の発現検討、伊勢和恵、中村保宏、深谷佐智子、端秀子、安藤紘花、島田啓司、笹野公伸、第105回日本病理学会総会、2016年5月12日~5月14日、仙台国際センター、宮城県、仙台市

6 . 研究組織

(1)研究代表者
中村 保宏 (NAKAMURA, YASUHIRO)
東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師
研究者番号：80396499

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
笹野 公伸 (SASANO, HIRONOBU)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50187142