

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

肺扁平上皮癌に対するエストロゲン療法の可能性

研究代表者 阿部 佳子 (総合医療センター 病理部)

研究分担者 田丸 淳一*

緒言

エストロゲンは、乳癌のみならず前立腺癌、卵巣癌、直腸癌などの癌化や増殖に関与することが知られている。肺癌とエストロゲンの関係については、非喫煙女性の肺腺癌が多く研究されてきたが、扁平上皮癌に焦点をあてたものは乏しい。閉経後女性における喫煙が、血中エストロゲンの上昇と相関するという疫学的報告があり、喫煙がリスクファクターである肺扁平上皮癌の発症や進行にもエストロゲンが影響する可能性は十分に考えられる。

エストロゲンはエストロゲン受容体(ER)に結合して、その標的遺伝子の発現を調整するものであり、ERには、ER α 、ER β という2つのサブセットがある。ER α は乳癌治療の標的とされるサブセットで、主に腫瘍の増殖に関与することが知られている。これに対し、ER β は腫瘍の増殖抑制やアポトーシスに関与すると言われている。肺の非小細胞癌では主にER β の発現が認められ、ER α の発現は少ないことが報告されてきた。近年、ER β に対する選択性が高い刺激剤が開発されたことを背景として、前立腺癌や一部の乳癌に対するER β 選択的刺激治療が提案されている(*Oncogene Sep 30. doi: 10.1038/onc.2013.384. Breast Cancer Research 2014; 16: R21. BMC Cancer 2014; 14: 749.*)。肺癌でもER β が治療標的となる可能性が考えられる。

そこで、我々は肺扁平上皮癌とER(ER β を中心として)との関係について研究した。

(当研究は埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会の承認を得ている(申請番号472-II))

材料と方法

1. 肺扁平上皮癌症例に対する免疫組織化学染色

研究対象：埼玉医科大学総合医療センターで外科的に切除された肺扁平上皮癌109症例(平成25年度学内グラントにおいて用いた76症例を含む)。臨床病理学的背景は以下の通りである。男性：女性94:15(症例数)、年齢 69.3 ± 7.4 (44-86) 歳、組織型高分化：中分化：低分化

* 総合医療センター 病理部

26:69:11(症例数)、病変部位central type: intermediate type: peripheral type 34:7:62(症例数、6症例不明)、最大腫瘍径 3.7 ± 2.3 cm、静脈侵襲陽性：陰性71:38(症例数)、胸膜浸潤p0: p1: p2: p3 64:26:1:15(症例数、3症例不明)、肺内転移あり：なし5:97(症例数、7症例不明)、リンパ節転移あり：なし36:70(症例数、3症例不明)。

方法：

免疫染色の結果について以下の項目について検討した。

- (1) 各ホルモン受容体とaromataseの発現の関係
- (2) ER β の発現と臨床病理学的事項との関係
- (3) p53蛋白の発現と臨床病理学的事項との関係

免疫組織化学染色は従来の方で行い、用いた抗体およびその前処理は表に示す。

免疫染色標本の評価方法：

- ・ エストロゲン受容体(ER α 、ER β 、ER β 1、ER β 2)、プロゲステロン受容体(PgR)およびアンドロゲン受容体(AR)、Ki-67、p53の発現率については、癌細胞500個あたりの陽性率を算定した。
- ・ aromataseについては、癌の細胞質陽性所見が10%以上占めるものを陽性、それ未満を陰性とした。
- ・ CD31については、陽性となる脈管の癌胞巣に対する分布の粗密をtentativeにスコア化した。Score 0：脈管の介在なし、Score 1：癌胞巣周囲に非連続性に分布、Score 2：癌胞巣周囲にほぼ連続性に分布、Score 1.5：Score 1とScore 2の混合とした。

なお、結果に示すごとくER β 1、ER β 2という2つのsplicing variantに対する免疫組織化学染色は109症例中33症例に行いpilot studyとした(稀少抗体入手困難のため、現時点で全症例について行っていない)。

統計学的検討：

- ・ 109症例に対する免疫染色標本の評価結果(ER β 、p53陽性率)と上記に示した臨床病理学的事項およびCD31陽性パターンとの関係について統計学的解析を行った。
- ・ 33症例におけるER β 1、ER β 2の発現頻度について統計学的解析を行った。

なお、統計ソフトはSTATA version 13.1 (USA, Texas)を用いた。

2. 培養細胞実験

研究対象：肺扁平上皮癌由来の培養細胞3種 (RERF-LC, EBC-1, CK2)

方法：3種の肺扁平上皮癌培養細胞にestradiol (E2), ER α 選択的刺激剤 (PPT), ER β 選択的刺激剤 (DPN) を投与24時間後に各々の培養細胞から蛋白を抽出し, p53蛋白 (clone: DO7) 発現の差異をWestern blotting法により, 対象 (刺激なし) と比較した。

結 果

1. 肺扁平上皮癌症例に対する免疫組織化学染色

(1) 各ホルモン受容体とaromataseの発現

ER α 陽性症例は6例 (陽性率10.91-81.03%), PgR陽性症例は11例 (陽性率3.15-48.18%), AR陽性症例は6例 (いずれもごく一部に陽性となるのみ) であったのに対し, ER β は2症例を除く107症例に陽性となり, 平均53.32 $\pm$ 27.25%と多くの症例が高い陽性率を示した。aromataseに対する染色では, 陽性90症例 (弱陽性53症例

を含む), 陰性19症例であった。aromatase陰性例におけるER β 陽性率は49.46 $\pm$ 28.52%, 陽性例では54.14 $\pm$ 27.07%であった。aromatase陽性症例では, aromatase陽性箇所にER β が陽性となる傾向が見られた (図1) が, aromataseの発現の有無によるER β 陽性率に有意差は見られなかった。

(2) ER β の発現と臨床病理学的事項との関係

ER β の陽性率はKi-67 LIと正の相関を示し, 癌の最大径と負の相関を示した。なお, 腫瘍の最大径とKi-67 LIとの間に相関関係は見られなかった。ER β の陽性率について, 性別, 癌の分化度, 癌が気管支に占める部位, 静脈侵襲の有無, 胸膜浸潤の程度, 肺内転移の有無, リンパ節転移の有無, CD31による癌に介在する脈管の分布パターンとの関係を統計学的に検討したが, いずれも有意な関係は認められなかった。

(3) p53蛋白の発現と臨床病理学的事項との関係

p53に対する免疫組織化学染色は, ubiquitousな蛋白発現がうかがわれるか, または全く発現しない結果となった。p53蛋白発現の比率とCD31を用いて行った癌病変部に

表.

抗体	クローン	前処理	希釈	提供			
ER α	SP1	heat	x1	Roche			
ER β	14C8	autoclave	x1000	Gene Tex Inc			
PgR	1E2	heat	x1	Roche			
AR	QR441	autoclave	x1000	DAKO Cytomation			
aromatase	#677/H7	-	x6000	Dr.Evans DB. Novaritis (contribution)			
Ki67	MIB1	heat	x40	DAKO Cytomation			
ER β 1	ab187291	autoclave	x400	Abcam			
ER β 2	57/3	autoclave	x250	Gene Tex Inc			
p53	DO-7	heat	x40	DAKO Cytomation			
CD31	JC70A	heat	x100	DAKO Cytomation			

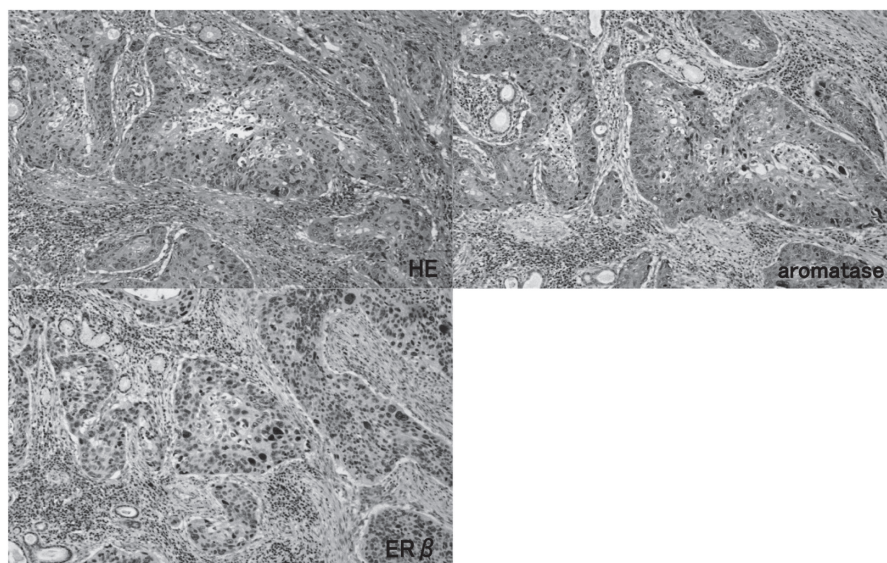


図 1. 免疫組織化学染色.

おける脈管分布のパターンとの間に, “p53蛋白発現が低い癌は脈管の介在に富む”ことが, また, “p53蛋白発現が高い癌に静脈侵襲像が見られる”ことが示された. なお, CD31による脈管分布パターンと静脈侵襲の有無との間に関連性は見られなかった. p53蛋白陽性率について, 性別, 癌の分化度, 癌の最大径, 癌が気管支に占める部位, 胸膜浸潤の程度, 肺内転移の有無, リンパ節転移の有無, Ki67 LIとの関係を統計学的に検討したが, いずれも有意な関係は認められなかった.

なお, p53蛋白発現とER β の発現の間に何等かの相関関係はうかがわれなかった(図2).

2. 培養細胞実験(図3)

平成25年度学内グラントの研究報告に示したごとく, 3種類の肺扁平上皮癌細胞はそれぞれ異なるホルモン受容

体の発現パターンを示した(RERF-LC-AIはER α +/ER β +/PgR+/aromatase+, LK-2はER α -/ER β +/PgR-/aromatase+, EBC-1はER α -/ER β -/PgR-/aromatase+)ことをふまえ, エストロゲンおよびER α , ER β に対する選択刺激剤が, p53蛋白の発現に影響するか検討を試みたが, RERF-LC-AI, およびEBC-1ではp53蛋白の発現は認められなかった. その結果, LK-2のみで検討し, エストロゲン(estradiole), ER α 選択刺激剤(PPT), ER β 選択刺激剤(DPN)のいずれを投与しても, p53蛋白の発現量に変化は見られなかった.

3. ER β のsplicing variantについてpilot study(図4)

33症例におけるER β 1およびER β 2の陽性率は, それぞれ $12.81 \pm 23.98\%$, $60.30 \pm 31.09\%$ であり, ER β 2の陽性率が有意に高かった. 両者の染色性の組み合わせとしては, “ER β 1 Low/ER β 2 High”の群が最も多かった.

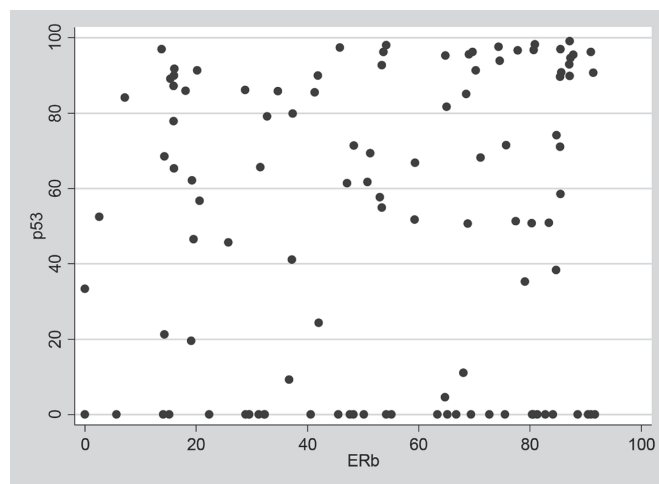


図2. 肺扁平上皮癌109症例におけるER β とp53蛋白の発現の関係.

p53 (DO-7)

53kDa

DAKO M7001

(clone: DO-7)

Mouse Monoclonal

X200

Ab 10 μ l/全量 2000 μ l

10% SDS-PAGE

Lumi-lightにて発光

30 μ g 相当量 apply

① LK-2

② LK-2 control (24h)

③ LK-2

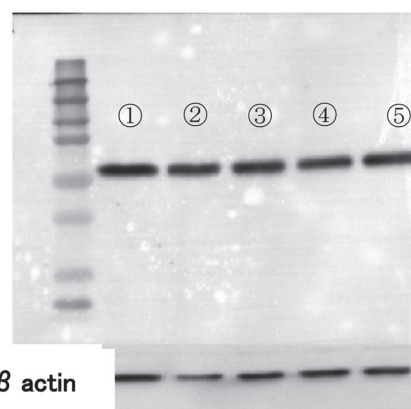
10nME2(24h)

④ LK-2

PPT10nM(24h)

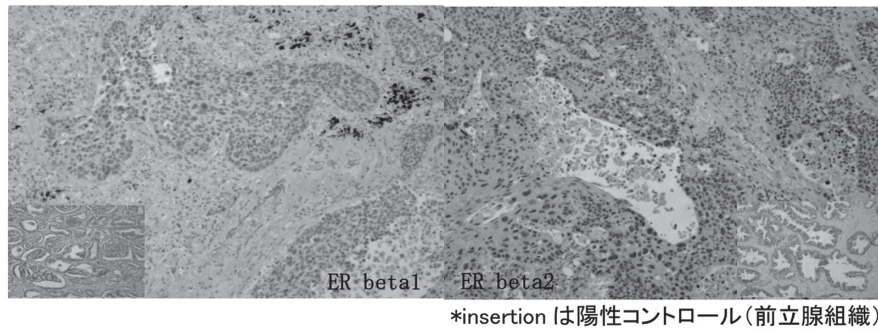
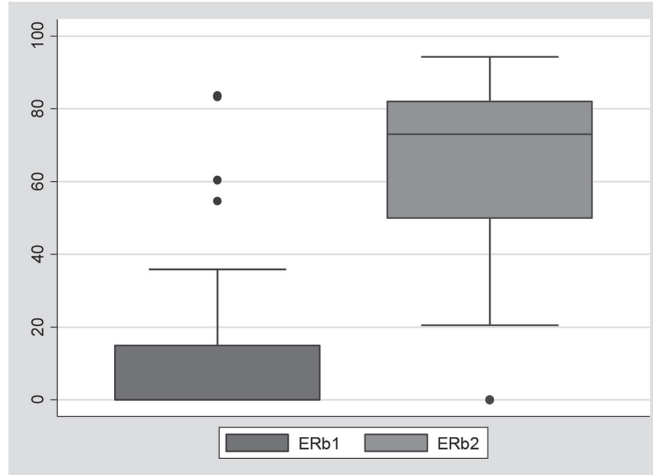
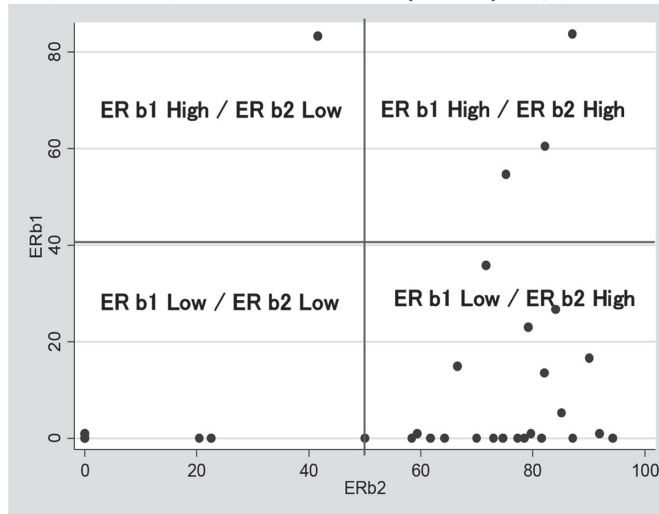
⑤ LK-2

DPN10nM(24h)



LK-2 ER α (-), ER β (++), PgR(-), aromatase(+)

図3. 培養細胞実験の結果(Western blotting).

(a) 肺扁平上皮癌 33 症例における ER β 1 および ER β 2 の陽性率(b) 肺扁平上皮癌 33 症例における ER β 1/ER β 2 陽性パターンの分布図 4. 肺扁平上皮癌33症例におけるER β 1, ER β 2発現の検討 (pilot study).

考 察

肺扁平上皮癌は、気管支の中枢側に好発するため切除困難な症例が多く、効果的なadjuvant therapyが必要とされる。一方で、アバスタチン投与による重篤な副作用が報告され、扁平上皮癌に対する治療法の選択肢は多いとは言えない。肺扁平上皮癌に高頻度に発現するER β と、多くの症例に見られるp53蛋白の発現異常の臨床病理学的事項

に対する関与、および両者の関係を検討することにより、ER β 刺激剤による新たな治療の可能性をさぐることを考えた。

本研究では、肺扁平上皮癌でER β が高率に発現し、癌の増殖に関与する可能性が示唆された。一方p53蛋白発現は癌の脈管構築や静脈侵襲に関与する可能性が示された。肺扁平上皮癌の81%に変異が見られるというp53遺伝子変異とER発現の関係について、ER (主にER β) の活性が、p53

を介して生じる細胞のapoptosisや血管新生の調整に関与することを示す複数の報告(*Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(4): 1500-5. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 127(2): 417-27. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012; 128(3-5): 113-20. *Cell Cycle* 2013; 12(8): 1211-24.)が見られ、肺扁平上皮癌の血管新生や静脈侵襲に、p53蛋白とER β の相互発現が関係する可能性を期待したが、免疫染色実験と培養細胞実験の結果は、ともにER β の発現とp53蛋白発現の間に関連性がない、または薄いことを示唆するものであった。文献的には、ER β の発現がmutant p53の発現を促進し、wild type p53の発現を抑制する(*Cancer Res* 2009; 69(15): 6100.), ER β の過剰発現がp53により誘導されるアポトーシスを促進する(*Clin J Physiol* 2006; 49(2): 110.), ER β の発現がp53の核への移行を阻害する(*Oncogene* 2005; 24(39): 4789.) など、腫瘍に由来する培養細胞を用いたin vitroの実験報告がある。我々の現時点でのin vitro実験は、p53蛋白

の発現とER β 発現の関係を検討するものとして十分なものとは言い難いく、今後さらに詳細な検討が必要であると考える。

また、ER β は従来増殖を抑制するとされてきたが、そのはたらきは臓器特異性のあることが知られている。これは、ER β のsplicing variantが臓器ごとに特徴があることに関係すると考えられている。ER β には5種類のsplicing variantがあり、正常肺組織に多く発現するER β 1、ER β 2について、一部の症例で検討を行ったところ、ER β 2が多く発現することが示唆された。今後、抗体を入手できれば、すべての症例について検討を行い、ER β 、ER β 1、ER β 2の発現様式と、腫瘍の増殖能や腫瘍径との関係を統計学的に解析したいと思う。

研究成果リスト(論文, 学会発表, 特許出願等)

なし