

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

肺扁平上皮癌に対するアロマターゼ阻害剤選択の可能性

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、乳癌のみならず卵巣癌、直腸癌、食道癌、甲状腺癌、腎細胞癌、骨肉腫などにおいて癌化や増殖に関与することが知られている。今後、エストロゲンの関与が明らかとなれば、ホルモン療法が治療のひとつに加えられる悪性腫瘍が未だ残されていると考える。

肺癌については、非喫煙女性に、肺腺癌が多いことから、肺非小細胞癌におけるエストロゲンの関与について複数の研究が行われてきた。ある種の肺非小細胞癌ではestradiolとEGFの相互作用によるMAPK依存性の細胞増殖メカニズムが明らかにされている。また、肺非小細胞癌におけるアロマターゼの発現は、免疫組織化学染色やlaser-capture microdissectionを用いたRT-PCR法により示され、肺腺癌の88%に達することが報告されている。よって、このような細胞増殖系では、エストロゲン産生酵素であるアロマターゼの阻害剤が、組織局所のエストロゲン濃度上昇を抑制し、細胞増殖を抑えることが期待される。

肺の扁平上皮癌は、気管支の中枢側にできることが多く、手術が難しい症例も多い。適正なadjuvant therapyが待たれるにも関わらず、腺癌に対する分子標的療法が普及してきたのに対し、扁平上皮癌はベバシズマブによる肺胞出血の副作用が知られるように、治療困難な“非腺癌”であり、新しい治療法が望まれる。

女性においてはホルモン補充療法の有無や、初潮の時期、閉経の時期の違いが、肺癌の発症率に関係することが報告されており、概して体内エストロゲンレベルが高い時期の長いことが肺癌の発症に何らかの関係を持つと考えられている。一方で、閉経後女性における喫煙が、血中性ホルモ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となる扁平上皮癌の発症や進行にもエストロゲンの影響が介在

する可能性は十分に考えられる。

本研究は、アロマターゼ阻害剤が肺扁平上皮癌に対する治療のひとつとなる可能性を模索するものであるが、周知のごとくアロマターゼ阻害剤は乳癌の治療に用いられており、乳癌と肺扁平上皮癌におけるエストロゲンの働きの相違を認識する必要がある。エストロゲン受容体には2つのサブセットがあるが、乳癌と肺非小細胞癌ではエストロゲン受容体のサブセット、アロマターゼの発現部位に違いがあることがわかっている。乳癌では、エストロゲン受容体 α (ER α) が癌細胞に発現し、アロマターゼが癌細胞および間質に高率に発現するのに対して、肺非小細胞癌では、エストロゲン受容体 β (ER β) とアロマターゼが、肺癌細胞において、高率に共発現することを我々は以前に報告した。肺癌においては、局所で癌に必要なエストロゲンの供給がなされる可能性があり、アロマターゼ阻害剤による抗エストロゲン作用の有効性が期待されると同時に、乳癌とは異なるエストロゲン受容体サブセットを優位に持つことから、抗エストロゲン作用の違いや治療対象の選択の違いが生じる可能性がある。

これまでの我々の研究では、アロマターゼとER β の癌細胞における同時発現は、非小細胞癌の中の組織亜型(腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌)間に差異が見られず、男女間にも差異が見られなかった。アロマターゼとエストロゲン受容体の発現が見られる限り、男性に多い肺扁平上皮癌においても、同様にアロマターゼ阻害剤が治療の選択に挙がる可能性があると考える。

(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))

材料と方法

1. 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、2005年から2012年の間に外科的に切除された肺扁平上皮癌76症例。男性64症例、女性12症例。平均年齢68.6 ± 7.5歳(44-84歳)。高分化型15症例、中分化型53症例、

*総合医療センター 病理部

低分化型8症例. 最大腫瘍径 37.7 ± 21.0 mm.

方法：免疫組織化学染色に用いた抗体および方法は表1に示す。免疫染色の評価方法は、ホルモン受容体、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、aromataseについては、10%以上陽性のものについて、陽性、弱陽性にわけて評価した。

2. 培養細胞実験

研究対象：肺扁平上皮癌の培養細胞3種(RERF-LC, EBC-1, CK2)（理化学研究所より購入）。

方法：3種の培養細胞から蛋白を抽出し、上記免疫染色に用いたものと同様の抗体を用いて、Western blotting法により各ホルモン受容体およびアロマターゼ蛋白の有無を検討した。比較対照としてMCF-7

(乳癌, ER α を持つ), LN-Cap-FGC (前立腺癌, ARおよびER β を持つ), HSC-1 (皮膚扁平上皮癌, ER α およびER β を持つ)の3種類の培養細胞から得た蛋白を必要に応じて同時に流した。

結果

1. 症例に対する免疫組織化学染色(図1)

- ER α 陽性症例は4例(陽性率10.91-16.89%), PgR陽性症例は3例(陽性率14.94-37.60%), 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1症例を除く75症例に陽性となり、平均 $51.37 \pm 37.11\%$ の陽性率を示した。
- aromataseに対する染色では、陽性30症例、弱陽性37症例、陰性9症例であった。

表1. 免疫組織化学染色

抗体	clone	前処理	希釈倍率	抗体供与会社
ER α	SP1	heat	x1	Roche
ER β	14C8	autoclave	x1000	Gene Tex Inc
AR	AR441	autoclave	x100	DAKO Cytomation
PgR	1E2	heat	x1	Roche
CYP19	#677/H7	-	X6000	Dr.Evans DB, Novartis (contribution)
Ki67	MIB1	heat	X100	DAKO Cytomation
p53	DO-7	heat	x40	DAKO Cytomation

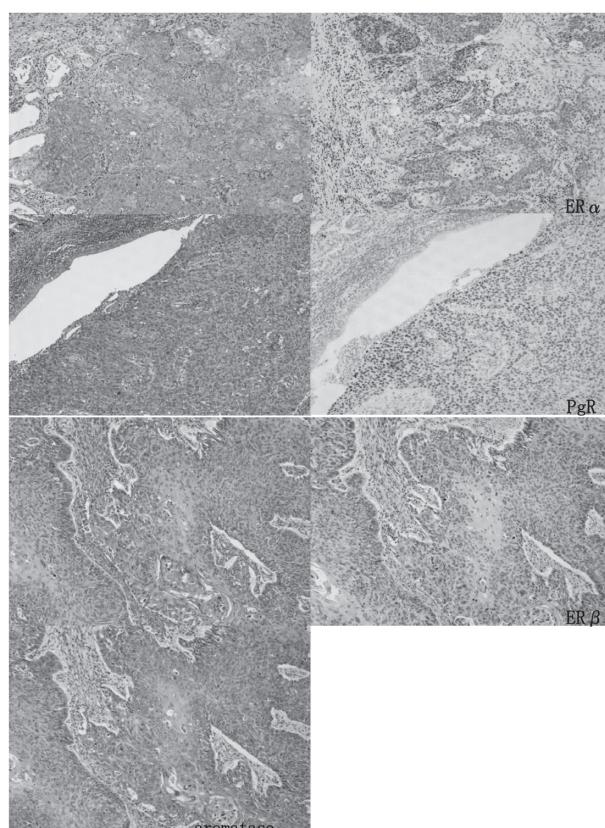


図1. 免疫組織化学染色の結果。

- ER β の陽性率と増殖能を呈するKi-67 LIとの間に相関関係は見られない(R squared 0.1447).
- ER β の陽性率とp53陽性率との間に相関関係は見られない(R squared 0.0076).
- aromataseの染色性に応じてER β の陽性率を比較すると、陰性例34.72 \pm 7.93 %, 弱陽性例49.98 \pm 28.46 %, 陽性例58.07 \pm 24.59 %であった. aromataseの発現が強い程ER β の陽性率は上昇する傾向が見られるが、統計学的有意差は認められない.
- 癌の分化度別にER β の陽性率を比較したところ、高分化型49.78 \pm 31.82 %, 中分化型49.38 \pm 25.84 %, 低分化型57.74 \pm 28.21 %であった. 低分化型扁平上皮は高分化、中分化と比較して陽性率が高い傾向が見ら

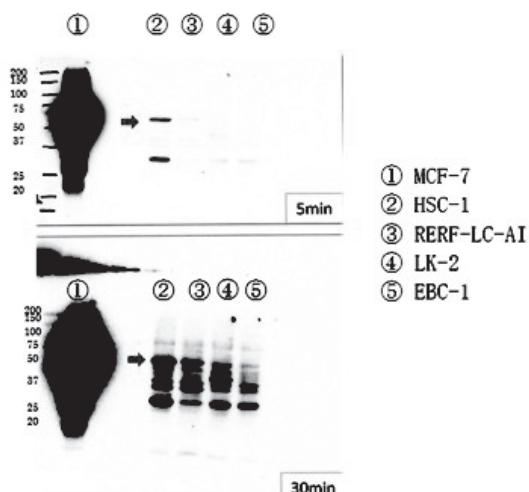
れるが、統計学的有意差は認められない.

・男性症例、女性症例にわけてKi-67 LIとER β の発現率の相関関係を見ると、男性でR squared 0.0940に對して女性ではR squared 0.3151で、統計学的に有意とはいえないが女性ではER β の陽性率が高いものがKi-67 LIが高い傾向にある.

2. 培養細胞実験(図2 (a)-(d))

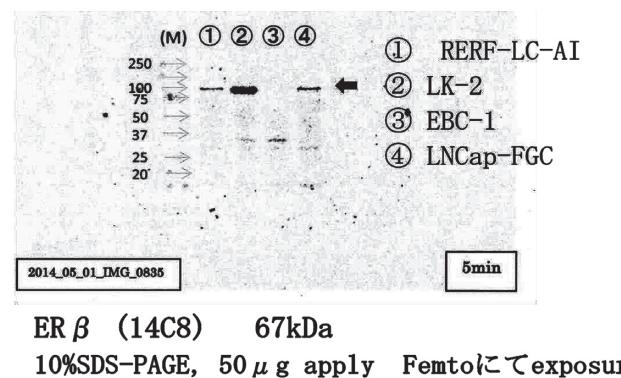
・Western blottingの結果では、RERF-LC-AIはER α + (弱い)/ER β +/PgR+/aromatase+, LK-2はER α -/ER β +/PgR-/aromatase+, EBC-1はER -/ER -/PgR-/aromatase+の3つの異なる発現パターンを呈した. なお、ARの発現はいずれにも認められない.

(a)ER α



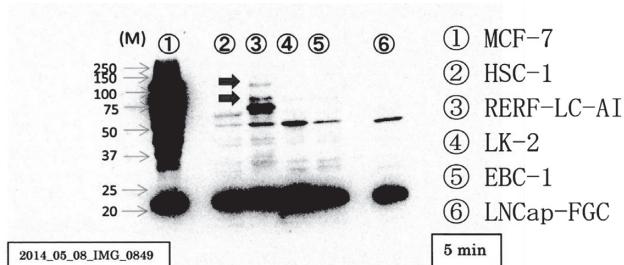
ER- α (SP1) 67kDa
10%SDS-PAGE, 30 μ g apply Femto, Filmでexposure

(b)ER β



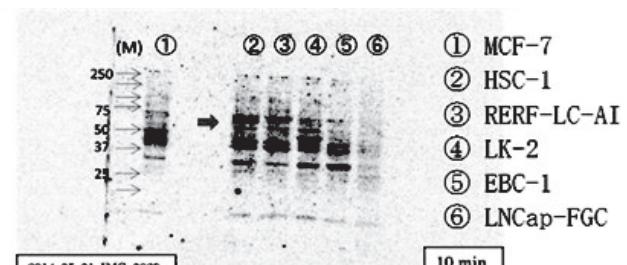
ER β (14C8) 67kDa
10%SDS-PAGE, 50 μ g apply Femtoにてexposure

(c)PgR



PgR (1E2) 94kDa (PgRA) 120kDa (PgRB)
10%SDS-PAGE, 50 μ g apply Femtoにてexposure

(d)aromatase



Aromatase 58kDa
10%SDS-PAGE, 50 μ g apply Femtoにてexposure

図2. Westernblottingの結果.

考 察

肺扁平上皮癌では、ER β と aromatase の発現が高率に見られることが確認された。ER α , PgR, AR については、陽性症例数が少なく、陽性所見も部分像であることが多い。よって、局所で産生されるエストロゲンは ER β を介して何らかの作用をするものと考える。現時点では、Ki-67 LI および p53 発現率と関連性は見いだせていないが、低分化な扁平上皮癌で ER β の発現が高い傾向にあることや、女性の肺扁平上皮癌に限ると Ki-67 LI と ER β の発現に正の相関傾向がうかがわれる。これらのカテゴリーに属する症例が現時点では少ないため、症例を加えて有意差ができるか確認するとともに、予後データを加えた解析を続ける予定である。

また、ER β の働きについて、何らかの仮説が得られた場合、ホルモン受容体発現の異なる培養細胞を用いて実験を行う準備段階にある。

研究成果リスト(論文、学会発表、特許出願等)

- 1) Verma MK, Miki Y, Abe K, Suzuki T, Niikawa H, Suzuki S, Kondo T, Sasano H. Intratumoral localization and activity of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in non-small cell lung cancer: a potent prognostic factor. *J Transl Med* 2013;11:167.
- 2) Iida S, Kakinuma H, Miki Y, Abe K, Sakurai M, Suzuki S, Niikawa H, Akahira J, Suzuki T, Sasano H. Steroid sulphatase and oestrogen sulphotransferase in human non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2013;108(7):1415-24.
- 3) Yazdani S, Miki Y, Tamaki K, Ono K, Iwabuchi E, Abe K, Suzuki T, Sato Y, Kondo T, Sasano H. Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2013;44(8):1586-96.