

されたタンパク質ピーク数 2390 ピーク、Permutation 検定 ($p < 0.05$) 627 ピークが抽出された中、変動パターンによる分類でさらに特徴づけからの候補選択を行った。

特徴づけとして注目したパターンは、

- ・薬剤投与前に有意差がなく投与直後から奏効群、非奏効群の差が手術時まで持続するパターン。(0110、0111) 治療の効果を判定する指標になるマーカーの候補。

- ・薬剤投与前に有意差が存在し手術時まで有意差がなくなるパターン。(1000、1001) 治療の奏効性を予測する指標になるマーカーの候補。

- ・薬剤投与前に有意差があり、投与後手術時まで差が持続するパターン。(1110、1111) 治療の奏効性を予測し同時に効果の判定も行えるマーカーの候補。

これらのパターンを示したピークは 47 ピーク存在しそれぞれマーカー候補として今年度の再現性試験との共通するピークからさらに絞り込んだマーカー候補を抽出する。

B-10 再現性の確認された奏効率に有意差の存在するピークのタンパク質のサンプルからの抽出精製

サンプルの選択

① ProteinChip システムで行った試験により目的ピークが存在するサンプルを使用しフラクション分離を行わない血清サンプルの状態に U9 変性を行ったもの。(サンプル名: Neat)

② ①と同様のサンプルを用いて ProteinChip システム試験と同様に U9 変性を行いさらにフラクション分離したものの

各フラクションサンプル。

フラクション分離の方法は、陰イオン交換樹脂の充填されたスピンカラム (ProteinChip Q Spin Columns) の保存液を 1000rpm の遠心で取り除き 50mM Tris-HCl pH9 200 μ l を 3 回通して平衡化する。このカラムに、サンプル血清 80 μ l に U9Buffer120 μ l を加え 4°C30 分で変性させたものを加えさらに U1Buffer200 μ l を添加して (血清 5 倍希釈)、4°C30 分間かけロータリーミキサーで混和しながら Q レジン (陰イオン交換樹脂) に吸着させる。吸着後 1000rpm30 秒で非吸着分を遠心採取する。さらに平衡化バッファーと同じものに 0.1%OGP (Octyl β -D-glucopyranoside) を加えたバッファーをカラムに 200 μ l 加え同様に 10 分混和し同じく遠心採取した下降液を先の採取分と合わせて Fraction1 とする。以下バッファーを替え各フラクション行程を 2 回ずつ行いそれぞれをあわせる。

バッファーの組成

Fraction2 : 100mM Na-Acetate pH5.8 / 0.1% OGP 400 μ l \times 2

Fraction3 : 100mM Na-Acetate pH4 / 0.1% OGP 400 μ l \times 2

Fraction4 : 33.3% Isopropanol / 16.7% Acetonitrile / 0.1% Trifluoroacetic acid 400 μ l \times 2

③ ProteinChip システム各表面処理チップでの測定を行いサンプル結合用チップの選択を行う。

使用 Chip とバッファー

IMAC30 銅イオン修飾チップ : 100 mM Na

phosphate (pH7) / 0.5 M NaCl
 CM10 陽イオン交換チップ：100 mM
 Na-Acetate(pH4)
 Q10 陰イオン交換チップ：50mM
 Tris-HCl (pH8)
 測定法は B-4 と同様。

ProteinChip システムを利用した目的ピークの結合・洗浄条件のシミュレーション
 前項でよく目的ピークの確認できたサンプルとして Neat サンプルと Fraction4 を使用する。同様に ProteinChip は CM10(陽イオン交換)、Q10 (陰イオン交換) を使用する。

結合条件

前項でピークがよく観察できた表面処理 ProteinChip を使用して目的タンパク質の

イオン交換樹脂への結合性をシミュレーションする。条件は、チップの極性、サンプル処理、バッファー pH の組み合わせとする。この過程で目的たんぱく質のより多くの回収を目的とする。

洗浄条件

過程①で ProteinChip に吸着している目的タンパク質 (あるいは競合タンパク質) の洗浄条件をシミュレーションする。

過程①で結合したタンパク質を塩 (NaCl) の入ったバッファーで洗浄することによって吸着面より離脱させる。このとき塩濃度の調節で競合タンパク質の混在なしに目的タンパク質をできるだけ回収し得る条件を検索する。(表 3)

表 3 結合・洗浄条件のシミュレーション条件リスト

サンプル	Neat	Fraction4
ProteinChip	CM10	Q10
結合 Buffer	100mM Sodium Acetate pH4	
	100mM Sodium Acetate pH5	
	50mM Sodium Phosphate pH6	
	50mM Sodium Phosphate pH7	
	50mM Tris-HCl pH8	
	50mM Tris-HCl pH9	
洗浄 Buffer	100mM Sodium Acetate pH4	50mM Tris-HCl pH9
	+ 0M NaCl	
	+ 0.1M NaCl	
	+ 0.2M NaCl	
	+ 0.3M NaCl	
	+ 0.5M NaCl	
	+ 1.0M NaCl	

シミュレーションの結果を基にした目的タンパクの抽出

シミュレーションの結果を参考に試験検体より目的タンパク質の抽出を行う。計画を以下に示す。

サンプルの変性、フラクシオン化などの処理

血清中に多量に存在し抽出の妨げとなるアバンドントタンパク質の除去。

陽イオン交換カラムを使用した精製。

陰イオン交換カラムを使用した精製。

脱塩、濃縮操作。

SDS-PAGE による泳動。

目的タンパク質バンドの切り出し。

それぞれの工程での ProteinChip システムを使用した目的タンパク質ピークの存在確認。

LC-MS/MS 法などによるペプチド・タンパク質同定。

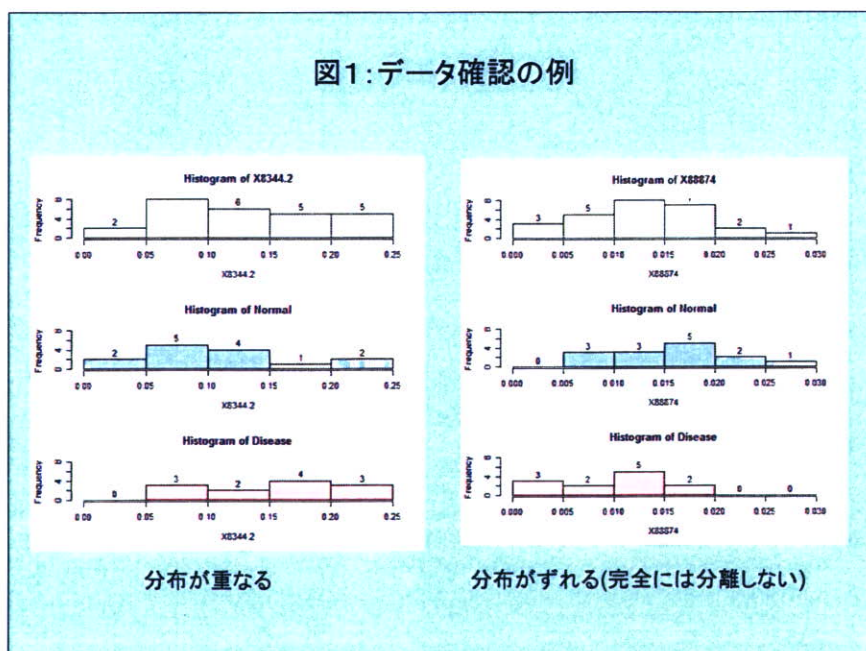
B-11 倫理面への配慮

本研究に使用した患者血清は全て患者本人の研究使用への承諾を受けたものであり、別の目的での使用は行わない。また患者の個人識別ができないよう検体番号の暗号化等の配慮を行った。

C 研究結果

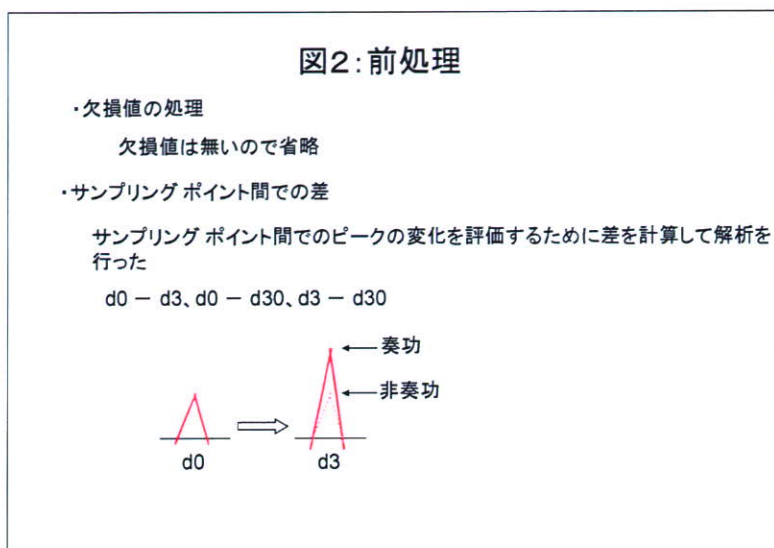
C-1 昨年度研究段階での解析法とその経過

昨年度のデータセットでの予備解析では Permutation 検定、相関係数による絞込みで抽出し、ロジスティック回帰分析、ならびに Bootstrap 法による評価を実施した。各サンプリングポイント (4 ポイント) における奏効群と非奏効群の比較解析に関しては、サンプル数、マーカー候補ピーク数、およびデータの分布を確認した。(図1)



また、経時的な変動解析については、サンプリングポイント間でのピーク強度の差を

計算して解析を実施した。(図2)



2 群間の比較検定ならびに経時変動検定には Permutation 解析を用い、p 値が 0.05 よりも大きいデータを排除することでバイオマーカー候補として 189 のピークを得た。次に、ロジスティック回帰解析の前処理として 189 ピークを対象に相関係数による絞込みを実施した。この際、測定システムの特徴を考慮し質量数 (m/z) がより小さいものをマーカー候補ピークとして選択した。その結果、バイオマーカー候補ピークとして 105 ピークを得た。105 のバイオマーカー候補ピークを対象としてロジスティック回帰解析を実施した結果、3 つの候補ピークを組み合わせることで奏効群と非奏効群を 100% 区別するパネルを複数構築することが可能であった。しかし、ロジスティック解析に適用したサンプル数が少数であったことから Bootstrap 法を用いて、構築したパネルの信頼性を評価した。その結果、Bootstrap 法により一定回数以上選択されたバイオマーカー候補ピークは存在したが 50 回以上選択されたピークは 7 種類、100

回以上選択されたピークは 0 種類であった。以上の予備解析結果から①Permutation 検定により抽出されたバイオマーカー候補ピークのロジスティック回帰分析により、奏効群と非奏効群とを十分に区別することができる評価パネルを構築することができた。②Bootstrap 法による交差妥当性の評価では、群間識別力が特に高いバイオマーカー候補が選択されなかった。

この予備解析結果に基づき、その他のデータセットについて Permutation 検定、Permutation 検定結果による変動パターンの出現頻度、変動パターンによるバイオマーカー候補の絞込みを行った。Permutation 解析等は予備検討と同様の方法により実施した。その結果、4 つのタイムポイントのすべてにおいて、奏効群と非奏効群の間に有意差が観察されたピークが観察された。さらに、測定上の質量数がほぼ同一なピークが、複数の測定条件において同一の有意差を示す例が観察された。この結果は、これらのピークが同一分子であると仮定した

場合、同様の変化が複数の測定条件で観察されたことを意味し、これらバイオマーカー候補の「確からしさ」が他の候補に比べて高いことが推測できる。以上の解析結果から以下の結論を得た。①Permutation 検定により複数のバイオマー化候補が抽出された。②異なる測定条件において、同一の分子だと考えられるバイオマーカー候補ピークが同一の有意差を示す可能性が示唆された。③生データにおいても、奏効群と非奏効群を区別できる可能性が示された。

C-2 今年度解析結果

今年度の研究解析は前年度の研究結果の検証とバイオマーカー候補のさらなる絞り込みとして位置づけられているもので解析方

法は前年度の方法を踏襲するものである。

(C-1)

Exemestane 術前ホルモン療法を実施した奏効群 5 例、非奏効群 4 例での経時採取血清 4 ポイントにおける ProteinChip システムでの測定結果について ProteinChip Data Manager version 3.0 を用いて行った結果は、B-7 記述の通り自動検出されたピークは各条件合わせて 2,312 ピークとなった。

バイオマーカー候補は、Permutation 検定を行い各タイポイントでの奏効群、非奏効群間の差を P-Value ≤ 0.05 を基準に差のないものを 0、あるものを 1 と表記した。この解析によって候補ピークを 723 ピークに絞り込んだ。(表 4)

表 4 変動パターンによる分類 (Permutation 検定)

サンプル	0000	0001	0010	0011	0100	0101	0110	0111	1000	1001	1010	1011	1100	1101	1110	1111
CM4_Fr1	162	4	15	3	6	2	0	0	14	0	3	0	1	0	2	2
CM4_Fr2	151	3	13	0	11	2	1	1	15	2	4	0	1	1	2	1
CM4_Fr3	99	4	6	0	8	0	0	1	5	9	2	4	0	0	0	2
CM4_Fr4	123	10	6	4	11	0	1	1	7	1	1	4	1	3	2	3
CM7_Fr1	188	24	26	0	19	2	1	0	8	4	2	0	2	1	3	3
CM7_Fr2	129	6	14	2	22	0	1	0	21	4	8	2	4	1	2	2
CM7_Fr3	57	7	7	0	33	1	1	0	4	2	2	0	0	0	0	0
CM7_Fr4	122	9	5	0	4	1	0	0	20	0	10	1	4	0	2	1
IMAC_Fr1	199	16	8	1	5	1	2	0	6	5	1	1	0	4	0	5
IMAC_Fr2	133	2	14	1	15	0	1	0	10	1	3	1	6	2	2	1
IMAC_Fr3	102	3	5	1	8	0	2	1	8	2	4	4	1	0	0	3
IMAC_Fr4	122	14	9	6	7	4	0	0	10	0	7	5	1	0	1	2
合計	1587	102	128	18	149	13	10	4	128	30	47	22	21	12	16	25

C-3 前年度マーカー候補の今年度結果による絞り込み

変動パターン、他調査による前年度バイ

オマーカー候補 47 ピークに関して、今年度抽出された近似分子量 (m/z) のマーカー候補の変動パターンを比較した。(表 5)

表5 比較変動パターン

		BR003									BR003-2									
	ID	Var	d0	d3	OP	OP35	d0_3	d0_OP	d3_OP	pattern	ID	Var	d0	d3	OP	OP35	d0_3	d0_OP	d3_OP	pattern
CM4_Fr1	38	X6193_4	0.045	0.495	0.614	0.727	0.154	0.022	0.584	1000	39	C06146_7	0.006	0.000	0.012	0.035	0.070	0.782	0.093	1111
CM4_Fr1	57	X8940.9	0.010	0.003	0.001	0.006	0.379	0.088	0.301	1111	54	C08834_3	0.161	0.145	0.012	0.166	0.675	0.054	0.018	0010
CM4_Fr1	58	X9149.5	0.006	0.007	0.001	0.002	0.469	0.066	0.246	1111	57	C09312_8	0.324	0.353	0.002	0.027	0.647	0.004	0.006	0011
CM4_Fr2	7	C03200_8	0.019	0.365	0.216	0.411	0.046	0.001	0.034	1000	12	C03278_3	0.371	0.616	0.044	0.985	0.977	0.205	0.183	0010
CM4_Fr3	6	C03089_2	0.996	0.040	0.004	0.613	0.247	0.043	0.004	0110	11	C03141_7	0.938	0.403	0.178	0.561	0.522	0.444	0.710	0000
CM4_Fr3	29	C06436_8	0.000	0.037	0.001	0.006	0.558	0.549	0.213	1111	50	C06438_6	0.212	0.664	0.175	0.413	0.333	0.005	0.021	0000
CM4_Fr4	12	C03494_2	0.042	0.867	0.601	0.203	0.104	0.008	0.520	1000	14	C03490_2	0.551	0.245	0.386	0.904	0.947	0.132	0.088	0000
CM4_Fr4	41	C06437_4	0.002	0.170	0.294	0.516	0.003	0.018	0.966	1000	40	C06327_1	0.055	0.340	0.747	0.849	0.044	0.236	0.250	0000
CM4_Fr4	42	C06483_2	0.004	0.043	0.034	0.120	0.488	0.259	0.764	1110	42	C06483_1	0.285	0.082	0.125	0.146	0.712	0.662	0.963	0000
CM4_Fr4	80	C015341_	0.035	0.122	0.892	0.189	0.404	0.392	0.232	1000	82	C015118_	0.372	0.289	0.862	0.225	0.784	0.456	0.513	0000
CM7_Fr1	25	C03778_2	0.037	0.401	0.302	0.521	0.002	0.410	0.223	1000	27	C03790_3	0.220	0.549	0.077	0.487	0.493	0.004	0.002	0000
CM7_Fr1	82	C08939_5	0.030	0.029	0.000	0.032	0.882	0.058	0.019	1111	80	C08813_9	0.181	0.095	0.002	0.102	0.090	0.012	0.101	0010
CM7_Fr1	83	C09107_0	0.138	0.023	0.001	0.019	0.432	0.035	0.180	0111	82	C09141_6	0.406	0.211	0.094	0.161	0.903	0.443	0.285	0000
CM7_Fr2	37	C06444_4	0.000	0.035	0.005	0.011	0.014	0.819	0.087	1111	43	C06441_3	0.158	0.012	0.119	0.678	0.006	0.891	0.012	0100
CM7_Fr2	78	C017415_	0.027	0.148	0.973	0.028	0.369	0.043	0.162	1001	83	C017396_	0.010	0.000	0.354	0.471	0.376	0.004	0.818	1100
CM7_Fr2	95	C026517_	0.042	0.656	0.204	0.036	0.347	0.006	0.341	1001	95	C026537_	0.001	0.415	0.081	0.520	0.020	0.107	0.307	1000
CM7_Fr3	26	C06443_3	0.000	0.001	0.024	0.000	0.821	0.096	0.129	1111	29	C06435_6	0.656	0.824	0.157	0.301	0.513	0.317	0.124	0000
CM7_Fr3	27	C06496_9	0.058	0.001	0.046	0.025	0.466	0.803	0.196	0111	29	C06435_6	0.656	0.824	0.157	0.301	0.513	0.317	0.124	0000
CM7_Fr3	30	C06851_8	0.074	0.007	0.003	0.008	0.649	0.419	0.817	0111	31	C06841_1	0.810	0.236	0.418	0.920	0.185	0.435	0.314	0000
CM7_Fr4	10	C03252_0	0.439	0.001	0.031	0.770	0.145	0.573	0.483	0110	10	C03244_0	0.161	0.493	0.004	0.059	0.453	0.421	0.070	0010
CM7_Fr4	56	C09732_3	0.044	0.470	0.295	0.965	0.413	0.017	0.119	1000	57	C09693_2	0.190	0.216	0.729	0.074	1.000	0.448	0.407	0000
IMAC_Fr1	59	C08391_3	0.546	0.030	0.025	0.040	0.242	0.253	0.916	0111	67	C08595_8	0.175	0.119	0.000	0.143	0.133	0.001	0.067	0010
IMAC_Fr1	62	C08945_0	0.005	0.002	0.002	0.010	0.317	0.045	0.473	1111	68	C08934_9	0.442	0.200	0.104	0.190	0.854	0.031	0.118	0000
IMAC_Fr1	63	C09155_1	0.013	0.003	0.002	0.006	0.236	0.046	0.499	1111	69	C09134_4	0.414	0.183	0.110	0.188	0.862	0.030	0.120	0000
IMAC_Fr2	84	C013852_	0.025	0.166	0.947	0.124	0.260	0.043	0.220	1000	82	C013816_	0.508	0.206	0.809	0.004	0.317	0.362	0.127	0001
IMAC_Fr3	108	C047434_	0.045	0.739	0.311	0.262	0.067	0.168	0.404	1000	110	C047579_	0.892	0.909	0.420	0.920	0.998	0.354	0.367	0000
IMAC_Fr4	2	C02748_3	0.046	0.138	0.877	0.689	0.023	0.056	0.317	1000	3	C02635_2	0.006	0.888	0.437	0.100	0.030	0.009	0.670	1000
IMAC_Fr4	54	C08923_7	0.127	0.009	0.007	0.707	0.582	0.198	0.333	0110	62	C08807_4	0.006	0.045	0.002	0.009	0.048	0.670	0.157	1111
IMAC_Fr4	59	C09712_6	0.000	0.228	0.626	0.217	0.199	0.078	0.589	1000	71	C09715_9	0.007	0.428	0.001	0.000	0.130	0.406	0.060	1011

ピークの絞込みの結果および、今年度研究における再現性試験の結果に基づき、以下の3つのピークを精製同定候補ピークとした。

第1候補 m/z 9713

第2候補 m/z 26517

第3候補 m/z 3252

C-5 候補ピークの抽出精製

第1候補について ProteinChip 上でのカラム精製を念頭においた結合性、溶出性のシミュレーションを行った。陽イオン交換樹脂を想定した CM10 チップと陰イオン交換樹脂を想定した Q10 チップそれぞれの ProteinChip にはバッファの pH 条件でペプチド、タンパクの吸着状態が性質ごとに変化する。これを利用した実験結果を図3～4に示す。

図3

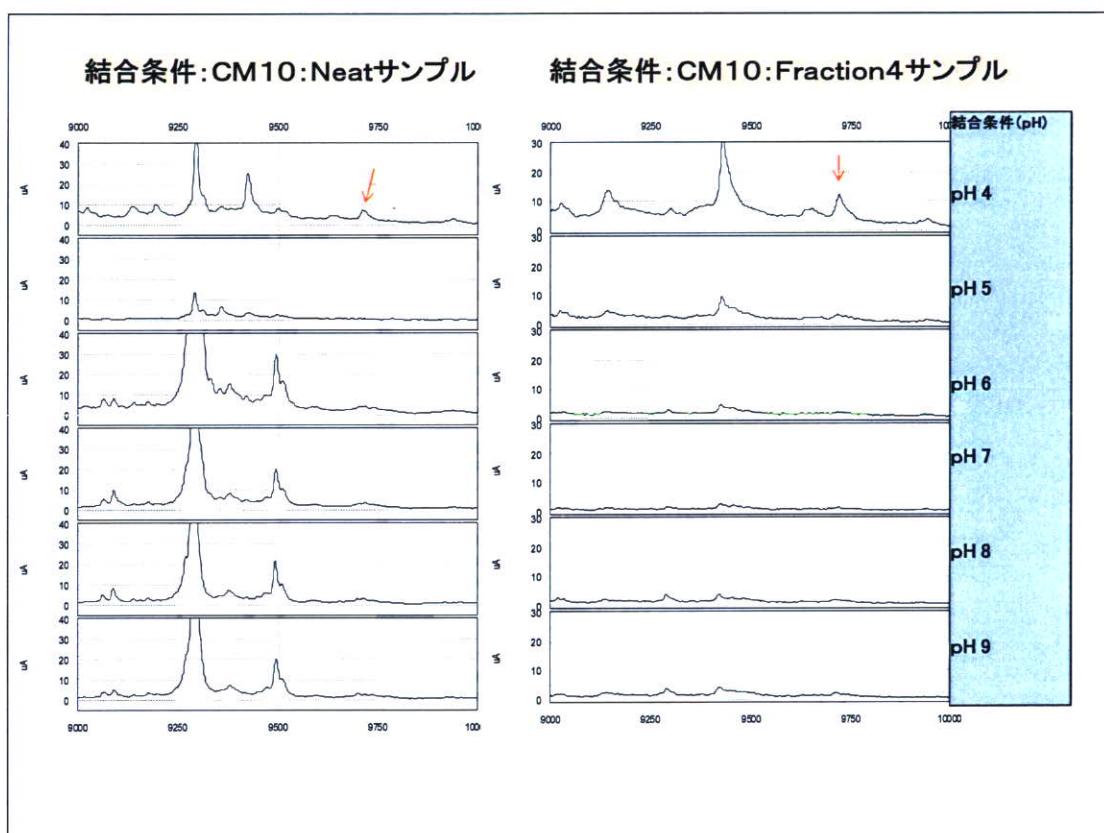
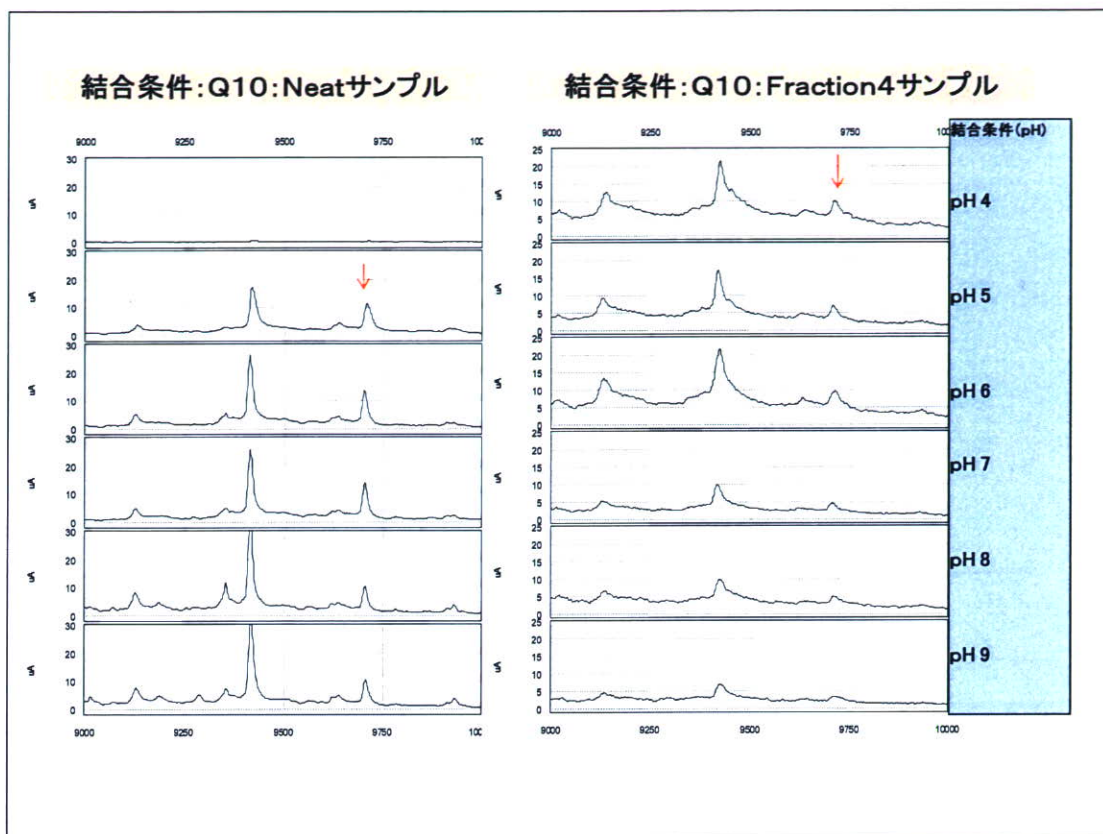


図 4



CM10 チップでは目的のタンパク (矢印部分) はほとんど pH4 においてのみチップ表面に吸着し、Q10 チップでは Neat サンプルにおいては pH5 以上で吸着し Q10 チップでは pH4 バッファーで吸着し pH9 まで減少するものの存在が確認される。

対して所定のバッファーに塩 (NaCl)

を添加することによってチップ表面に吸着されたタンパクが溶出されチップ表面から離脱する。有塩バッファーとの関連を示す図 5～6 はチップ表面からの溶出 (残存しているピークは溶出されていない) を表している。

図 5

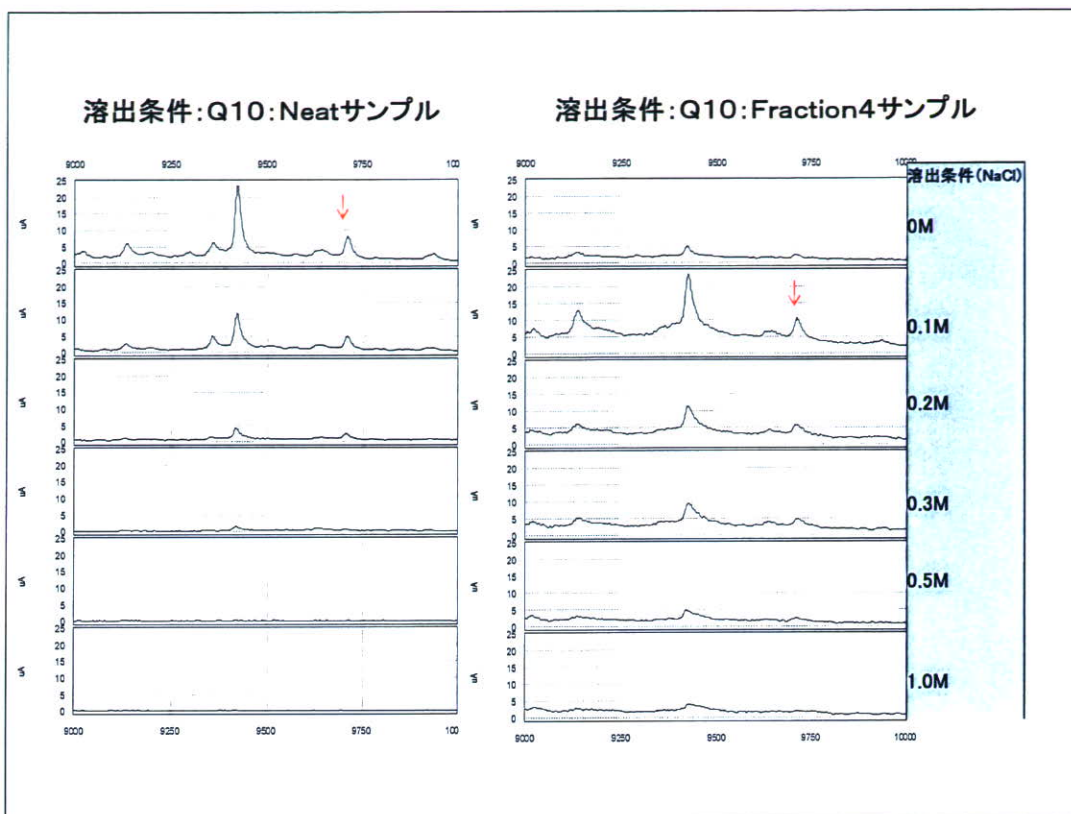
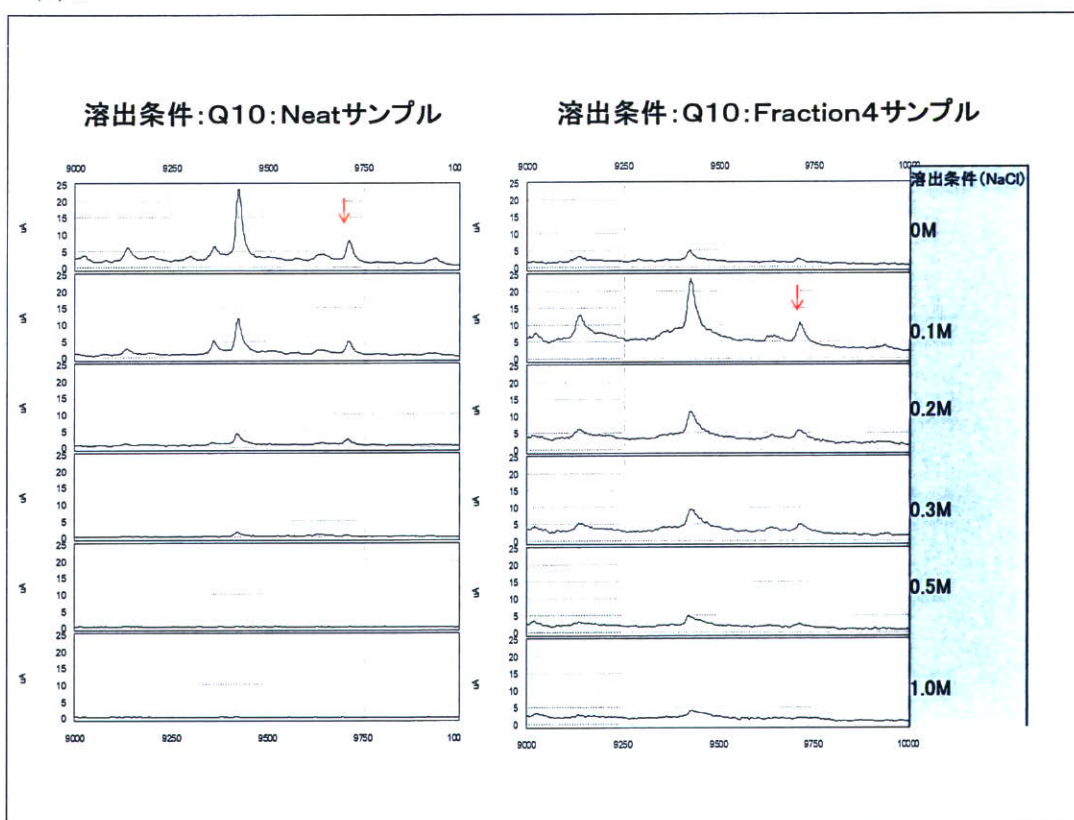


図 6



溶出条件のシミュレーション結果から CM10 チップ、Q10 チップとも Neat サンプルでは 0.2M 程度の塩濃度バッファーで溶出され Fraction4 サンプルでは 0.5M ~ 1.0M NaCl バッファーまで比較的幅をもって溶出することが観察された。

以上の結合、溶出実験の結果を踏まえて精製過程を以下のように組み立てた。

- ① 血清サンプルの変性、またはフラクション化処理
- ② アバンダントタンパクの除去
- ③ CM(陽イオン交換樹脂)カラムに pH4 バッファーで吸着させる
- ④ CM(陽イオン交換樹脂)カラムから NaCl 0.1M にて溶出
- ⑤ Q(陰イオン交換樹脂)カラムに pH5 NaCl 0.1M で結合
- ⑥ Q(陰イオン交換樹脂)カラムから NaCl 0.3M にて溶出
- ⑦ 各ポイントでのピーク確認

この過程で目的ピークを保持したまま目的以外のタンパクをできるだけ篩い落とし次の工程で行う SDS-PAGE によるバンドの分離を明確にする。

現在精製工程を評価、実行中である。

D 考察

本研究では昨年度より引き続き術前ホルモン療法の奏効性に関連する新規血清バイオマーカーを検索しているが、検証用の本年度の研究により精製、同定の対象になり得るタンパクが抽出された。3 つに絞られた候補ピークは第 1, 2 候補が術前ホルモン療法効果予測、第 3 候補が術前ホルモン療法治療応答性または腫瘍除去への関与を

表す変動パターンを示している。

Goncalves らは、アジュバント化学療法を受けたハイリスク原発乳がん患者のがん転移予測に有効な血清タンパク質のプロファイルを報告している (Goncalves et. al., *Oncogene* (2006) 25, 981-989)。本報告では、血清中のタンパク質発現パターンを ProteinChip SELDI システムで解析し、がん転移患者群と非転移患者群との間で発現量が異なる 40 種類のタンパク質 (バイオマーカー候補) を抽出した。これら 40 種類のタンパク質の発現プロファイルを多変量解析 (Partial Least-Squares 法と Logistic Regression Model) し、がん転移群と非転移群を効率的に識別するマルチタンパク質識別パネル (Multiprotein-based Classification) を構築し、本パネルで 2 群に区別された原発乳がん患者の 5 年生存率 (94% vs. 49%) および非転移 5 年生存率 (84% vs. 22%) に有意差を見出した。

E 結論

本研究では、Goncalves らが探索した 40 種類のバイオマーカー候補のうち、16 種類については、昨年度の研究により同一のタンパク質を抽出できた可能性が高いと考えている。さらに、検証用の本研究により、*m/z* 9713 のバイオマーカー候補が抽出された。したがって、本バイオマーカーは、昨年度の探索研究、本年度の検証用研究、および Goncalves らの研究の、独立した 3 種類の研究により乳がんとの関連性が確認されたバイオマーカー候補である。さらに、本バイオマーカー候補は、Goncalves らの報告では同定されておらず、本分子がどのようなタンパク質 (あるいはタンパク質の

分解物等)であるのかを明らかにすることは、当該分子と乳がんとの関連性を検討する上で価値が高い。今後は、本バイオマーカー候補の精製同定を完結させるとともに、本年度の検証用研究で再現性が確認されたバイオマーカー候補による奏功性予測パネルの構築を推進したい。

サンプル数の少なさに起因する不安定性は依然存在しており、同定されたタンパクを臨床診断等で応用してゆくためには、試験検体を多数用いた検証(バリデーション)が必要になる。本研究の到達目的となっている治療意思決定のためのアルゴリズム構築に組み込むことができるバイオマーカー開発のために、構築中のアルゴリズムにバイオマーカー候補を組み込んだ演算を行い逆の検証を行う可能性も視野に入れて研究の継続を行いたい。

また抗Her2療法の効果予測、遺伝子シグナチャーを用いて術後の化学療法の必要性を判断するシステムの導入は研究継続中であり、非浸潤性原発性乳癌に関するバイオマーカーの探索は同じくProteinChipシステムを用いた候補の抽出予備試験を昨年実施しており、今回の研究同様、検体数を増やした検証試験が必要と思われる。今後も継続して新たなバイオマーカーの開発に尽力したい。

F その他

研究発表

知的財産権の出願・登録なし

以上

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
（総括 分担）研究報告書

非浸潤性乳管癌における性ステロイドホルモン局所濃度
および合成／代謝酵素の発現に関する研究

分担研究者 笹野 公伸 東北大学教授

研究要旨

性ステロイドはヒトの浸潤性乳管癌 (IDC; invasive ductal carcinoma) の発育で重要な役割をしている事が知られている。しかし、IDCの先駆病変ともされている非浸潤性乳管癌 (DCIS; ductal carcinoma in situ) における性ステロイドの生物学的／臨床的な意義に関してはまだ不明瞭な部分が多く残っており、これにはDCIS組織内の性ステロイド濃度の検索がまったくなされてない事も一因となっている。そこで今回の研究では、私はまずDCIS内のestradiolと5 α -dihydrotestosterone (DHT)の濃度をliquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometryにて測定した。

DCISの腫瘍内estradiolおよびDHT濃度はいずれも非腫瘍性の乳腺組織より3倍高値を呈しており、またエストロゲン産生酵素 (aromatase, steroid sulfatase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β HSD1)) およびアンドロゲン産生酵素 (17 β HSD5, 5 α -reductase type 1 (5 α Red1)) とともにreal-time PCRおよび免疫組織化学的解析にてDCIS内で高い発現が認められた。腫瘍内のDHT濃度はDCISよりもIDCで有意に低く、癌細胞および腫瘍内間質細胞のaromatase mRNA発現はDCISよりもIDCの方で有意に高い値を示した。DCIS症例での性ステロイド産生酵素に対する免疫組織化学的検討では、5 α Red1の発現動態がKi-67 labeling indexおよびhistological gradeと正相関しており、再発のリスクの上昇とも正相関を示した。

以上今回の私の研究の結果、estradiolおよびDHTがDCIS組織内でも産生される事によって、これら性ステロイドのDCIS組織内濃度が増加する可能性が示唆された。従って、estradiolおよびDHTは浸潤癌同様にヒト乳癌DCIS病変の発達／進展にも重要な役割を果たしていると考えられる。

渋谷里絵

東北大学大学院
医学系研究科医科学専攻
病理病態学講座 病理診断学分野

A. 研究目的

乳癌は女性の悪性新生物の中では世界的に最も発症頻度が高い癌の一つであり、本邦でもこの傾向は近年顕著に見られるようになってきている。特に最近の20年間で、集団検診などでマンモグラフィなどの画像診断を用いたスクリーニングが

多くの婦人に対して行なわれるようになり、非浸潤性乳管癌 (DCIS; ductal carcinoma in situ) と診断される患者数が著明に増えてきている。国際的に、現在では乳癌として見つかる患者の約20%をDCISが占めるようになってきている¹⁾²⁾³⁾。このDCISは浸潤性乳管癌 (IDC; invasive ductal carcin-

oma)の先駆病変とも考えられており、DCISと診断された患者でIDCが発生する頻度は健常な女性の4~10倍と報告されている⁴⁾⁵⁾。従って、このように発生頻度が本邦でも顕著に増加しているDCISの臨床/生物学的動態を知る事が、乳癌の発生、発展を正しく理解するにあたり極めて重要である。

乳腺が性ステロイドの標的臓器であることはよく知られている。性ステロイドの中でも特にエストロゲンはIDCの発生/進展過程で極めて重要な役割を果たしており⁶⁾、近年ではtamoxifenなどの抗エストロゲン剤やアロマターゼ阻害剤、luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) agonistが腫瘍内のエストロゲン作用を遮断する目的でIDC患者に内分泌療法として広く処方されてきている。DCISにおいても大部分の症例では性ステロイドレセプター(estrogen(ER), progesterone(PR), androgen(AR) receptors)が発現していることは従来からよく知られており²⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾、DCISでも多くのIDC症例と同様に性ステロイドホルモンが何らかの生物学的役割を果たしている事が想定される。実際にthe National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) P-1 trialにてtamoxifenが非浸潤性乳癌のリスクを50%下げると報告されており¹²⁾、NSABP B-24 trialではadjuvant tamoxifen therapyがER陽性のDCISに臨床的効果があり非浸潤癌の再発率を27%下げると報告もされている¹³⁾。このようにエストロゲン作用を遮断するとDCISの発生は明らかに低下する事が種々のデータから明らかになりだして来ており、乳癌の化学的予防に関する重要な裏付けデータの一つとなっている。

ところで、生物学的に活性を持つエストロゲンであるestradiolの濃度は形態的に正常な乳腺組織よりもIDC内で優位に高くなっており¹⁴⁾、estradiolは血中を循環している不活性ステロイドから種々のエストロゲン産生酵素によってIDC組織内で“*Intracrine*機構”により局所合成されると考えられている(図1参照)¹⁵⁾。

この*Intracrine*機構は、血液中のエストロゲン濃度が顕著に低下する閉経期以降の婦人でエストロゲン依存性の乳癌がより多く発生してくる事実に対する大きな理由の一つであり、この*Intracrine*機構に基づき開発され投与されるアロマターゼ阻害剤は閉経期以降のエストロゲン依存性の乳癌における現在もっとも有効な内分泌療法となっている。この*Intracrine*機構を理解するには、乳癌組織の中でどのようなエストロゲン合成/代謝酵素が発現し、病変内でエストロゲンがどのように産生されどのように代謝されるのかという事を理解するのが極めて重要になる。DCISでもaromataseおよび17 β HSD1の免疫学的な局在は既に報告されており¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾、IDC同様に性ステロイドが局所合成されている可能性が強く示唆されている。しかし、実際にエストロゲン合成/代謝酵素が発現しているにもかかわらず、DCISにおいてはこの局所性ステロイド濃度を測定した研究は未だになく、IDC同様に本当に組織内でエストロゲン濃度が亢進しているのかどうかは未だ不明である。すなわちこれらDCIS病変内で発現している種々の合成/代謝酵素には本当に意義があるのかどうかは今までよく知られてこなかった。更にDCISにおけるアンドロゲン合成酵素の発現に関する情報も未だ得られてはいない。DCISにおける性ステロイドの臨床的・生物学的動態に関して得られる情報は現在非常に限られており、IDCに比べて不明瞭な部分が多く残されている。

今回の研究で、私はまずDCISにおけるestradiolおよびDHTの腫瘍内濃度と性ステロイド産生酵素の発現を検索し、それらの結果を非腫瘍性の乳腺組織やIDCと比較検討した。さらに、性ステロイド産生酵素の免疫学的な局在と臨床病理学的な因子との関連を83件の純粋なDCIS症例にて検討し、性ステロイドのDCISにおける意義に関して更に検討を加えた。

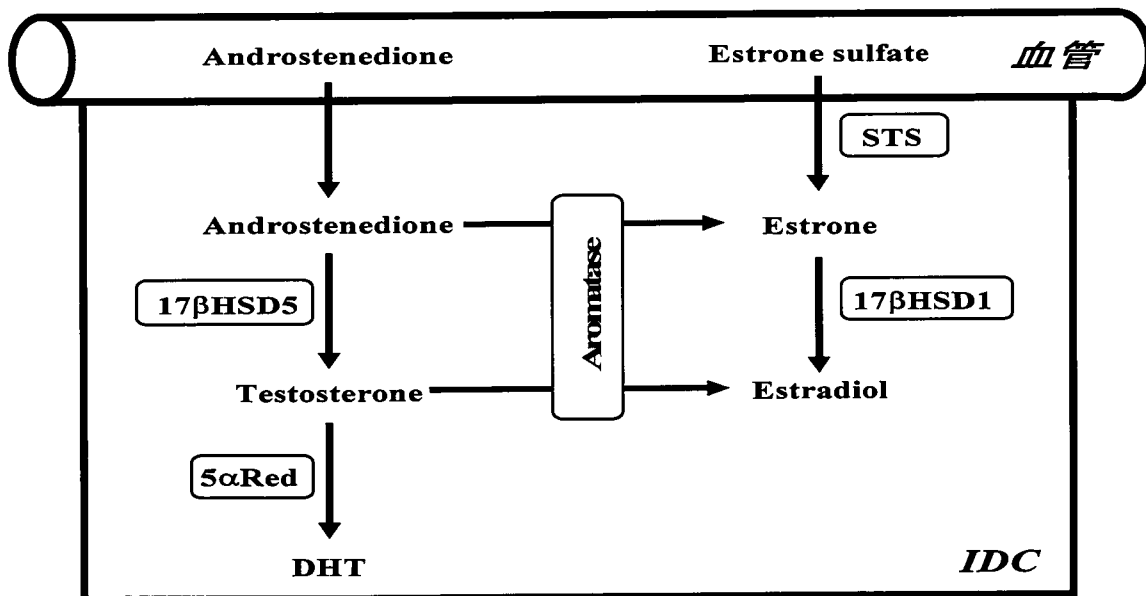


図1. ヒト浸潤性乳管癌(IDC)における性ステロイドの腫瘍内局所合成の概要。STS; steroid sulfatase, 17 β HSD1; 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 17 β HSD5; 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 and 5 α Red1; 5 α -reductase

B. 研究方法

B-I 患者・組織 (表1 参照)

東北大学病院および東北公済病院にて2001-2004年の間に外科的切除された女性の乳腺組織よりDCIS12症例、IDC12症例を選択した。また、total mastectomyを受けたIDC12件中8件より、非腫瘍性の乳腺組織を得た。これらの組織において一部をステロイド抽出およびRNA分離用にsnap frozen・-80°Cで保存し、また免疫組織化学検索用に一部を10%ホルマリン固定・パラフィン包埋処理した。病理組織の悪性度分類に関しては、DCISはthe Van Nuys classification¹⁹⁾、IDCはElston & Ellis変法²⁰⁾にて評価した。東北大学病院および東北公済病院いずれの症例においても、研究目的での使用に際して患者の同意を得た。

また、免疫組織化学用に1990-2005年の間に東北大学学病院にて外科的切除されたpure DCIS検体を83件使用した。これらの患者の平均年齢は57.0歳(30-80)で、いずれも術前に放射線化学療法やホルモン療法は受けていなかった。この内78件にて術後経過データが得られ、そのフォローアップ期間は平均54ヶ月(8-117月)であった。いずれの検体にも10%ホルマリン固定およびパラフィン包埋処理を行った。

以上の全ての症例・検体の使用に関して、倫理委員会の承認を受けた(東北大学: 受付番号2005-178, 2005-68/東北公済病院: 平成17年8月5日承認)。

表1. 症例の背景

永久標本のpure-DCIS検体(83件) 外科的切除されたDCIS検体(12件)		
年齢*(年)	57.0 (30-80)	56.0 (42-72)
閉経		
閉経前	27	5
閉経後	56	7
Van Nuys classification		
Group 1	27	
Group 2	40	
Group 3	16	

*; LI中央値(min - max(%))をMann-Whitney's U testにて解析。

B-II Liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

DHTおよびestradiolの濃度測定をLC-MS/MS解析(Teizo Medical Co. Kawasaki, Japan)にて行った。乳癌組織(それぞれ32-89mg)を1mlの蒸留水で均質化し、

100pgのEstradiol-¹³C₄(Hayashi Junyaku, Tokyo, Japan)ないしDHT-²H₃(CDN Isotope, Quebec, Canada)を加えた後、diethyl etherにてhomogenateよりステロイドを抽出した。分離した有機層を蒸発させた後、それらをpicolinic anhydrideを入れたtetrahydrofran (THF)溶液100μlとtriethylamine20μlの混合液に溶解し、Bond Elut C₁₈ columnに入れ、80%acetonitrile溶液でステロイド誘導体を溶出した。そして誘導されたDHTおよびestradiolをLC溶媒(Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)に溶解した。

LCとAPI 4000 triple-stage quadrupole mass spectrometer(Applied Biosystems, Ontario, Canada)を組み合わせ、electrospray ionizationで陽イオン化し、Cadenza CD-C₁₈ colum(3X150mm, 3.5μm, Imtakt, Kyoto, Japan)にてクロマトグラフィ分離した。注入量は20μlで、mobile phaseは溶剤A(0.1%ギ酸)およびB(acetonitrile)を使用して0.4ml/minで導出し、total run timeは10分とした。初期段階ではA&B合剤(30:70)を使用し、注入後は100%B溶剤に4分で直線的に変化させていき、3分間維持(0.05分で初期の割合に戻り、2.95分間維持)した。貯留時間はestradiolでは5.3分、DHTでは5.8分で、イオン化環境は4.5kV、450°Cとした。

estradiolおよびDHTの最少検出量はともに0.2pgであり、変動係数は20%を越えなかった。

B-III Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

TRIzol試薬(InVitrogen Life Technologies, Inc.)にてtotal RNAを抽出し、reverse transcription kit(SUPERScript II Preamplification system (Gibco-BRL))にてcDNA合成を行った。Real-time PCRのmRNA発現レベルの半定量にはLight Cycler System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を使用した(primer sequenceはそれぞれ表2を参照)。温度環境に関しては、初期変性95°C10分、増幅サイクル40回を95°Cで10秒、annealingにはそれぞれ60°C(17βHSD1)、64°C(17βHSD5, STS)、68°C(aromatase, 5αRed type1(5αRed1), 5αRed2, ribosomal protein L13a(RPL13A))で10秒とし、elongationを72°C12秒とした。ステロイド産生酵素のmRNAレベルは、RPL13Aの割合(%)と同様にまとめた。

表2. real-time PCR解析におけるprimer sequencesのまとめ

cDNA (Gene symbol; Accession no.)	Sequence (Position in cDNA)	Size (bp)	参照
Aromatase* (Aromatase; X13589)	FWD: 691-712, REV: 786-806	116	
STS* (STS; M16505)	FWD: 1,550-1,569, REV: 1,683-1,702	153	
17βHSD1* (HSD17B1; NM000413)	FWD: 1,300-1,321, REV: 1,604-1,625	326	
17βHSD5* (AKR1C3; NM003739)	FWD: 969-992, REV: 1,052-1,071	103	
5αRed1* (SRD5A1; NM001047)	FWD: 658-677, REV: 796-815	158	
5αRed2 (SRD5A2; NM000348)	FWD: 500-520, REV: 794-814	315	Suzukiら ⁴²⁾
RPL13A (RPL13A; NM012423)	FWD: 487-509, REV: 588-612	125	Vandesompeleら ⁴¹⁾

*; Oligonucleotide primers used in this study were designed in the different exons.

B-IV Laser capture microdissection (LCM) / real-time PCR for aromatase

非腫瘍性乳腺組織7件、DCIS8件、IDC9件をLCM / real-time PCRで解析した。LCMはLaser Scissors CRI-337 (Cell Robotics Inc, Albuquerque, NM, USA)を用いて行い、乳腺凍結組織片から癌細胞ないし腫瘍内間質細胞をそれぞれ約5000個ずつ採取した。Real-time PCRは上記IIIと同様に行った。

B-V 免疫組織化学

抗体の情報は、STS, 17βHSD1, 17βHSD5, 5αRed1, 5αRed2に関しては表2にまとめてある。他のモノクローナル抗体に関しては、市販抗体ERα (ER1D5) (Immunotech (Marseille, France)), PR (MAB429) (Chemicon (Temecula, CA, USA)), AR (AR441) (DAKO (Carpinteria, CA, USA)), Ki-67 (MIB1) (DAKO (Carpinteria, CA, USA))を使用し、Histofine Kit (streptavidin-biotin増幅法 (Nichirei, Tokyo, Japan))にて免疫染色を行った。ERα, PR, AR, Ki-67の抗原賦活化には、クエン酸緩衝液を用いてオートクレーブで120°C5分の熱処理を行った。希釈倍率はそれぞれ以下の通りである。[aromatase; 1/6000, STS; 1/9000, 17βHSD1; 1/500, 17βHSD5; 1/1000, 5αRed1; 1/1000, 5αRed2; 1/1000, ERα; 1/50, PR; 1/30, AR; 1/100, Ki-67; 1/50]

抗原-抗体複合体の発色には3,3'-diaminobenzidine (DAB)溶液(1mM DAB, 50mM Tris-HCl buffer (pH7.6), 0.006% H₂O₂)を使用した。

ステロイド産生酵素は細胞質に検出されるため、10%以上の癌細胞に認められるものを陽性とした。ERα, PR, AR, Ki-67は核に検出され、labeling index (LI; 陽性細胞の割合(%))で評価した。

B-VI 統計解析

2グループ間の解析にはMann-Whitney's U testを使用し、P-values 0.05未満で有意差ありとした。2グループ間のrelative ratioはそれぞれの中央値で評価した。生存曲線はKaplan-Meier法にて作成し、log-rank testにて統計学的評価を行った。

C. 研究結果

C-I 性ステロイドのDCIS腫瘍内濃度(LC-MS/MS)

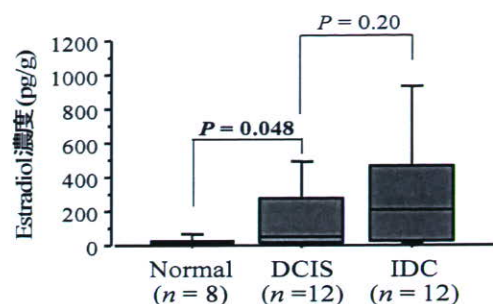
Estradiol濃度の中央値(min-max)は、非腫瘍性乳腺組織で16(5-83)pg/g、DCISで52(10-494)pg/g、IDCで206(11-1586)pg/gであり、DCIS症例が非腫瘍組織より3.3倍有意に高値(P=0.048)であった(図2A参照)。IDCではDCISの中央値の4.0倍高かったが、統計学的に有意差は認められなかった(P=0.20)。

DHT濃度の中央値(min-max)は、非腫瘍組織で100(63-128)pg/g、DCISで323(140-1593)pg/g、IDCで162(41-990)pg/gであり、DCISにて非腫瘍組織(P=0.03, 3.2倍)およびIDC(P=0.04, 2.0倍)よりも有意に高値を示した(図2B参照)。

EstradiolのDCIS腫瘍内濃度は、閉経前(93(10-494)pg/g (n=5))にて閉経後(42(13-70)pg/g (n=7))の2.2倍高値であったが、有意差は認められなかった(P=0.46)。また、DCIS症例での組織内DHT濃度も閉経前260(253-380)pg/gと閉経後326(140-1593)pg/gとで有意差は認められなかった(P=0.52)。

図2.

A



B

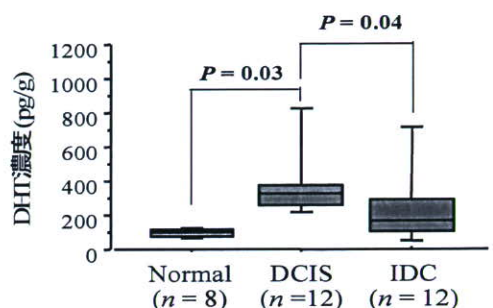


図2. 非腫瘍性乳腺組織(normal)、DCIS、IDCにおけるestradiol (A) およびDHT (B) 濃度。灰色のボックスが25-75%を示しており、ボックス内の線は中央値。ボックス上下の線は、それぞれ90%と10%を示している。DCIS、IDC間の統計解析はMann-Whitney's U testで行い、P-value 0.05未満を有意(太字)とした。

C-II DCISの性ステロイド産生酵素のmRNA発現の検討

表3に結果をまとめてあるが、aromatase (P=0.03, 4.0倍), STS (P=0.01, 9.5倍), 17βHSD1 (P=0.04), 17βHSD5 (P=0.01, 18倍), 5αRed1 (P=0.02, 5.1倍)のmRNA発現量は非腫瘍性乳腺組織よりもDCISの方ですべて有意に高い値を示した(括弧内の倍数は非腫瘍性乳腺組織よりもDCIS症例が何倍高いかを示している)。5αRed2のmRNAレベルは少量であり、DCISと非腫瘍組織間で有意差は認められなかった(P=0.67)。AromataseのmRNA発現量はDCISよりもIDC症例で有意に高値を示した(P=0.046, 5.9倍)が、他の性ステロイド合成酵素の発現量はDCISとIDC症例との間で有意差はみられなかった。

ヒト乳癌組織中には癌細胞の他に種々の割合で間質細胞が混在しており、Aromataseはヒト乳癌組織内の癌細胞と間質細胞とに局在しているため²¹⁾、LCM / real-time PCRを用いて各々の細胞分画のaromatase mRNA発現を検索した。図3Aにて示すように、上皮細胞成分におけるaromatase mRNA中央値(min-max)は、非腫瘍性乳腺組織では0.00(0.00-0.30)x10⁻²%, DCISの癌細胞では0.06(0.00-0.29)x10⁻²%, IDCの癌細胞では1.00(0.01-3.00)x10⁻²%であり、IDCの方が非腫瘍組織(P=0.01)およびDCIS(P=0.03)よりも有意に高値を示した。加えて図3Bに示すように、間質細胞における

aromatase mRNAは、非腫瘍組織で $0.00(0.00-0.04) \times 10^{-2}\%$ 、DCISで $0.04(0.00-0.10) \times 10^{-2}\%$ 、IDCでは $4.00(1.00-6.23) \times 10^{-2}\%$ であり、上皮細胞成分同様にIDCの方が非腫瘍組織($P=0.001$)およびDCIS($P=0.001$)よりも

有意に高値であった。なお、aromatase以外の性ステロイド合成酵素は癌細胞に限局して発現しているため¹⁵⁾、癌細胞と間質細胞を分けての評価は行わなかった。

表3. 非腫瘍性乳腺組織, DCIS, IDCにおける性ステロイドmRNA発現

酵素	mRNA発現レベル(中央値 (min - max)) (%)			P value	
	Normal (n = 8)	DCIS (n = 12)	IDC (n = 12)	DCIS vs. Normal	DCIS vs. IDC
エストロゲン産生酵素					
Aromatase	3.5 (0.0 - 8.0)	14.1 (1.5 - 113.3)	82.5 (0.0 - 528.5)	0.03	0.046
STS	0.4 (0.0 - 1.5)	3.8 (0.0 - 93.1)	13.6 (0.3 - 241.3)	0.01	0.13
17 β HSD1	0.0 (0.0 - 0.5)	0.6 (0.0 - 4.0)	1.5 (0.0 - 3.9)	0.04	0.07
アンドロゲン産生酵素					
17 β HSD5	0.6 (0.0 - 3.1)	10.8 (1.0 - 57.3)	10.9 (0.0 - 39.6)	0.01	0.91
5 α Red1	11.5 (0.0 - 19.8)	58.6 (3.0 - 223.6)	34.2 (0.0 - 438.4)	0.02	0.60
5 α Red2	0.0 (0.0 - 15.9)	0.2 (0.0 - 49.0)	0.2 (0.0 - 58.8)	0.67	0.83

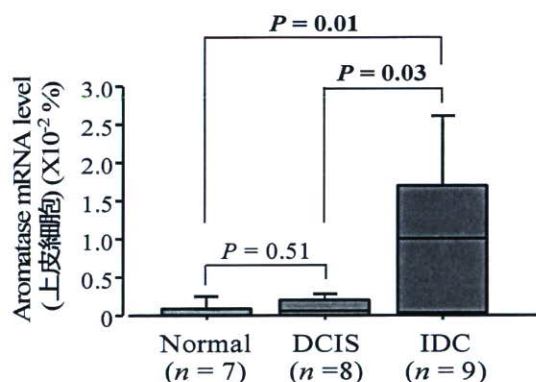
Normal; 非腫瘍性乳腺組織

2グループ間の統計解析はMann-Whitney's U test で行い、P-value 0.05 未満を有意(太字)とした。

ステロイド産生酵素のmRNA レベルはRPL13A の割合(%)と同様にまとめた。

図3.

A



B

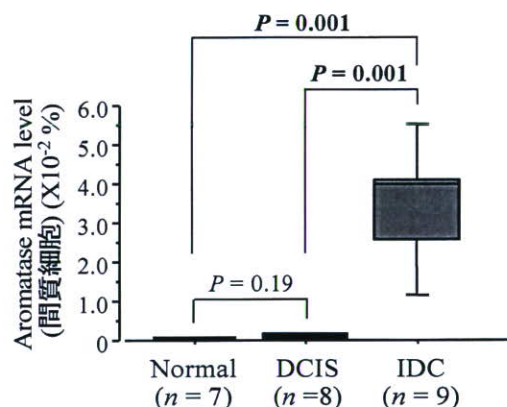


図3. 非腫瘍性乳腺組織(normal)、DCIS、IDCにおけるaromatase mRNA発現。上皮細胞(A)、間質細胞(B)。normal組織における上皮細胞と間質細胞、DCISおよびIDCにおける癌細胞と腫瘍内間質細胞は、いずれもLCMによって別々に集めた。2グループ間の統計解析はいずれもMann-Whitney's U testで行い、P-value 0.05未満を有意(太字)とした。

C-III DCISにおける性ステロイド産生酵素の免疫組織化学

Aromataseの癌細胞胞体における陽性所見はDCIS83件中45件に認められ(54%)、いくつかの腫瘍内間質細胞でもaromatase蛋白が検出された(図4A, 4B)。他の性ステロイド合成酵素はいずれも癌細胞でのみ検出され、陽性検体数と陽性率は以下の通りであった(図4C-4F)。[STS;45/83(54%), 17 β HSD1;54/83(65%), 17 β HSD5;59/83(71%), 5 α Red1;52/83(63%), 5 α Red2;13/83(16%)]

図4.

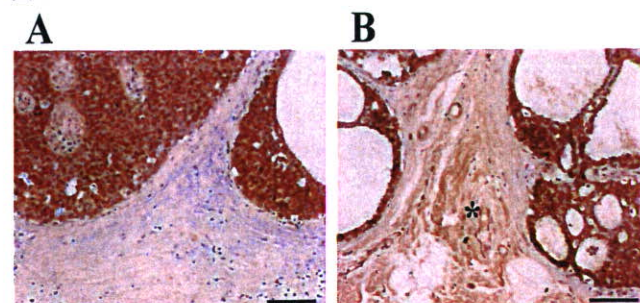


図4.

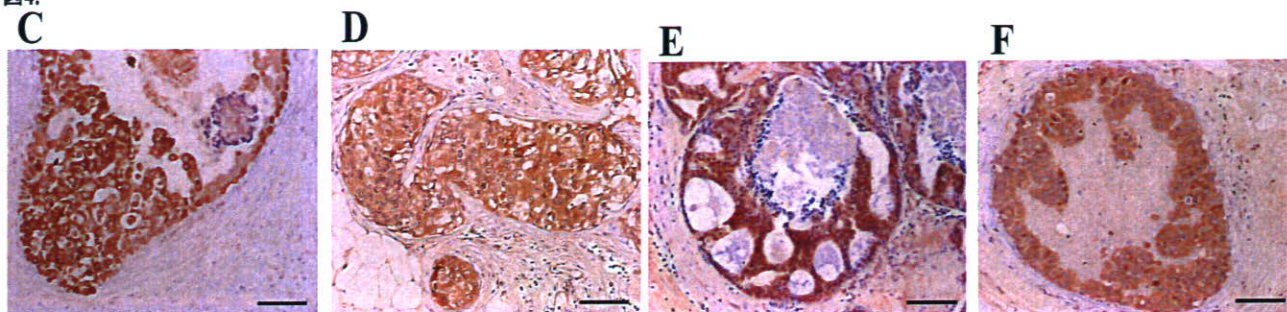


図4. DCISにおけるaromatase (A, B), STS (C), 17βHSD1 (D), 17βHSD5 (E), 5αRed1 (F)の免疫染色。Aromataseの免疫反応性は主として癌細胞の細胞質に認められる (A)が、腫瘍内間質細胞の一部にも陽性となる (*) (B)。STS, 17βHSD1, 17βHSD5, 5αRed1の免疫反応性は癌細胞の細胞質に認められる。 Bar = 100 μm.

性ステロイド産生酵素の免疫反応性と臨床病理学的因子との相関を表4および表5にまとめている。エストロゲン産生酵素の中では、STSがthe Van Nuys classificationと有意な相関を示したが (P=0.01)が、aromataseおよび17βHSD1には臨床病理学的因子との間に有意な相関は認められなかった(表4)。アンドロゲン産生酵素では、5αRed1はthe Van Nuys classifi-

cation (P=0.001)およびKi-67LI (P=0.02)と正相関を示す一方で、17βHSD5には臨床病理学的パラメータとの間に有意な相関は認められなかった(表5)。また、5αRed2陽性所見と臨床病理学的因子との間に有意な相関関係は認められなかった。なおDCISにおいて、これら5つの酵素の発現動態間に有意な相関関係は認められなかった。

表4. DCIS83件におけるエストロゲン産生酵素の免疫反応性と臨床病理学的パラメータとの関係

Value	Aromatase免疫反応性		P value	STS免疫反応性		P value	17β HSD1 免疫反応性		P value
	+(n=45)	-(n=38)		+(n=45)	-(n=38)		+(n=54)	-(n=29)	
年齢* (年)	60 (34-80)	56 (30-77)	0.37	54 (34-77)	61 (30-80)	0.43	57 (30-80)	61 (34-77)	0.70
閉経									
閉経前	13 (16%)	14 (17%)		16 (19%)	11 (13%)		14 (17%)	13 (16%)	
閉経後	32 (39%)	24 (29%)	0.59	29 (35%)	27 (33%)	0.68	40 (48%)	16 (19%)	0.08
Van Nuys classification									
Group 1	14 (17%)	13 (16%)		8 (10%)	19 (23%)		17 (20%)	10 (12%)	
Group 2	21 (25%)	19 (23%)		25 (30%)	15 (18%)		26 (31%)	14 (17%)	
Group 3	10 (12%)	6 (7%)	0.75	12 (14%)	4 (5%)	0.01	11 (13%)	5 (6%)	0.93
ERα LI*	69 (0-97)	82 (0-97)	0.20	67 (0-96)	80 (0-97)	0.13	78 (0-97)	66 (4-94)	0.13
PR LI*	52 (0-92)	33 (0-91)	0.12	33 (6-92)	47 (0-93)	0.63	38 (0-93)	31 (0-92)	0.60
AR LI*	56 (0-97)	55 (5-94)	0.54	53 (0-93)	59 (4-97)	0.39	56 (2-97)	55 (0-93)	0.86
Ki-67 LI*	16 (2-35)	13 (2-35)	0.22	17 (2-35)	12 (2-32)	0.23	13 (2-35)	17 (3-33)	0.45

*; LI 中央値(min-max(%))をMann-Whitney's U test にて解析。

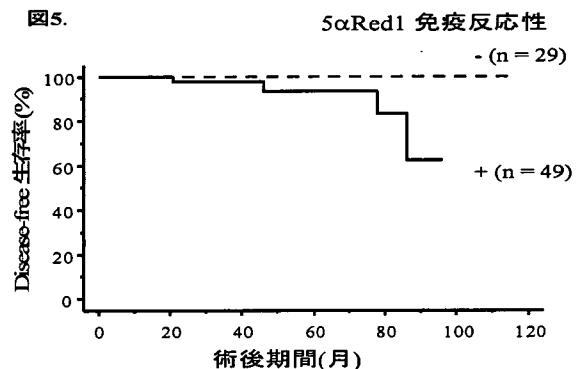
表5. DCIS83件におけるアンドロゲン産生酵素の免疫反応性と臨床病理学的パラメータとの関係

Value	17β HSD5免疫反応性		P value	5α Red1免疫反応性		P value
	+(n=59)	-(n=24)		+(n=52)	-(n=31)	
年齢* (年)	53 (30-80)	61 (42-69)	0.19	55 (30-80)	61 (39-77)	0.43
閉経						
閉経前	23 (28%)	5 (6%)	0.18	19 (23%)	8 (10%)	0.44
閉経後	36 (43%)	19 (23%)		33 (40%)	23 (28%)	
Van Nuys classification						
Group 1	20 (24%)	7 (8%)	0.43	11 (13%)	16 (19%)	0.001
Group 2	26 (3%)	14 (17%)		26 (31%)	14 (17%)	
Group 3	13 (16%)	3 (4%)		15 (18%)	1 (1%)	
ERα LI*	71 (0-97)	87 (0-94)	0.12	73 (0-97)	79 (0-97)	0.48
PR LI*	53 (0-92)	57 (12-87)	0.96	32 (0-92)	43 (0-93)	0.14
AR LI*	73 (16-97)	83 (0-93)	0.10	54 (2-93)	62 (0-97)	0.12
Ki-67 LI*	20 (2-35)	13 (7-24)	0.07	18 (3-35)	11 (2-32)	0.02

*; LI中央値(min-max(%))をMann-Whitney's U testにて解析。
いずれの項目もカイ2乗検定で評価し、P-value 0.05未満を有意(太字)とした。

図5に示すように、78件のDCIS症例における検討にて、5α Red1の免疫活性は再発リスクの上昇と相関していた(5α Red1陰性乳癌症例では再発がなかったため、P valueは得られなかった)。一方で、他のステロイド産生酵素の免疫反応性と再発リスクの間には有意な相関は認められなかった。

図5. DCIS症例(78件)における5α Red1の免疫活性とdisease-free生存曲線との関係(Kaplan-Meier法)



D. 考察

今回の検討はDCISにおける局所性ステロイド濃度を検索した初めての研究である。なおIDC症例での研究において、腫瘍から十分に離れた組織学的に「正常」な部位では腫瘍やその周辺組織に比べてエストロゲン濃度および合成酵素の発現レベルが優位に低いことが既に報告されているため¹⁴⁾、今回の検索で用いた担癌患者から採取された非腫瘍性検体でも非腫瘍性あるいは正常乳腺組織として乳癌組織との比較検討には使用可能であると判断した。EstradiolおよびDHT組織内濃度の中央値は非腫瘍性乳腺組織よりもDCISで有意に高く、またエストロゲン(aromatase, STS, 17β HSD1)およびアンドロゲン(17β HSD5, 5α Red1)産生酵素のmRNAレベルは非腫瘍組織よりもDCIS症例で有意に高いという結果も認められた。Oliveiraら¹⁷⁾は70%のDCIS症例で癌細胞および間質細胞にaromataseの陽性所見を呈したと報告しており、Arigaら¹⁸⁾はDCIS症例の63%に17β HSD1が陽性であったとも報告している。今回の研究ではaromataseは54%、17β HSD1は65%のDCIS症例に陽性であり、上述の従来の研究報告と矛盾しない結果を示した。一方で、DCISにおけるSTS, 17β HSD5,

5α Red1発現に関する研究報告は今まで全くなされてはいない。今回の私の研究結果ではDCISにおけるSTS, 17β HSD5, 5α Red1, 5α Red2の陽性所見はそれぞれ54%, 71%, 63%, 16%であり、これらの割合はSuzukiらの研究¹⁵⁾におけるIDCでの酵素発現と極めて類似している(それぞれ59-88%, 53%, 58%, 15%)。尚、5α Red2発現が非常に低いことから、IDCにおける5α Red活性は主として5α Red1から構成されている可能性が高い¹⁵⁾。尚、図1に示したIntracrine機構において、17β HSD1および17β HSD5の逆転換酵素として17β HSD2が、STSの逆転換酵素としてestrogen sulfotransferase (EST)が知られている¹⁵⁾。これら17β HSD2とESTはいわば性ステロイド分解酵素と位置づけられるが、このうち17β HSD2に関してはIDC, DCISともに癌細胞での発現がほとんどみられないことが既に報告されている¹⁸⁾⁴³⁾。一方ESTに関しては、癌細胞のみならず正常な乳管上皮細胞にも発現が認められ、またIDCでの研究にてESTの免疫反応性と乳癌リスクの減少とは相関するがER発現との相関はみられないと報告されており⁴⁴⁾、癌組織中のIntracrine機構での役割には未だに検討の余地が残っている。今回の研究では、IDC同様にDCISでもes-

tradiolおよびDHTの腫瘍内濃度が上昇しており、DCISにおいてもIDCと同じように性ステロイド産生酵素によって血中の不活型ステロイドからestradiol, DHTが局所合成されていることが示唆された。また、estradiolのDCIS腫瘍内濃度に閉経前と閉経後とで有意差が認められなかったことから、閉経後のIDCにてestradiol濃度の高値が認められたという報告¹⁴⁾と同様に、閉経後のDCISでもestradiolの局所合成が行われていると考えられた。DCISの発育はアロマターゼ阻害剤 (letrozole, anastrozoleなど)によって抑制されるとFaratianらが報告しており²²⁾、今後抗エストロゲン剤やアロマターゼ阻害剤、LH-RH agonistなどの内分泌療法が特定のDCIS患者にも臨床的に効果的となる可能性があると考えられるが、治療効果に関しては今後の更なる検討も必要と考えられた。

今回の私の研究では、DCIS症例でもaromatase mRNAは癌細胞と腫瘍内間質細胞の両方に検出され、いずれの発現レベルもDCISよりIDCで有意に高かった。従来のin vitro研究²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾にて、乳癌細胞が様々なアロマターゼ発現誘導因子 (prostaglandin E2, interleukin (IL)-1, IL-6, IL-11, tumor necrosis factor α) を分泌することが報告されてきた。一方Rydeら²⁷⁾やZhangら²⁸⁾の研究により、いくつかの外因性の成長因子 (epidermal growth factor, transforming growth factor, keratinocyte growth factor)がMCF-7乳癌細胞にてアロマターゼ活性を刺激することも知られている。また、Mikiら²¹⁾はMCF-7乳癌細胞のaromatase mRNAレベルおよび酵素活性が、乳癌組織から分離された間質細胞との共同培養にて著しく上昇したと報告している。従って、DCISにおけるアロマターゼ発現も一部は腫瘍-間質間の相互作用によって調節されていることが示唆され、これらの相互作用は癌細胞の間質への浸潤によってさらに増進している可能性があると考えられる。

Recchioneら²⁹⁾やMistryら³⁰⁾が報告したようにIDCにおける腫瘍内DHTレベルはtestosteroneレベルに相関しており、testosteroneはDHT前駆物質とみなされている。図1に示すようにaromataseはandrostenedione \rightarrow estroneおよびtestosterone \rightarrow estradiolの転換をそれぞれ触媒している。Spinolaら³¹⁾は、ラットによる研究でアロマターゼ阻害剤によって腫瘍内testosterone濃度が著明に上昇すると報告しており、それに加えてSonne-HansenとLykkesfeldtのMCF-7細胞による研究³²⁾では、aromataseはtestosteroneをよりその基質として使用するという事も報告されている。更にSuzukiら³³⁾は、IDCにおけるaromatase発現は腫瘍内のDHT濃度と逆相関し、aromataseはandrostendioneからのDHT合成を抑制すると報告している。これらの研究報告から、aromataseはヒト乳癌における局所DHT産生のnegative regulatorであることも示唆される。今回の研究では腫瘍内DHT濃度はDCISよりもIDCで有意に低く、aromatase発現はDCISよりもIDCで有意に高くなっていた。一方アンドロゲン産生酵素の発現レベルはDCISとIDC間で有意差はみられなかった。従って、IDC症例でaromataseが顕著に発現する事によりアンドロゲンからエストロゲンへの転換が増加した結果、腫瘍内DHT濃度が減少した可能性があるという今回の研究結果からは示唆された。

いくつかのin vitro研究³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾にて、DHTは乳癌細胞の増殖を阻害することが示されている。更にKando-

uzらの研究³⁷⁾では、乳癌細胞でDHTがアポトーシスを誘導すると報告されており、Dauvoisら³⁸⁾によるZR75-1細胞を注入した無胸腺マウスの研究では、DHT治療によって腫瘍量が急速に減少したと報告されている。しかしこのDHTの乳癌に対しての作用に関しては多くの論議がある事も事実である。例えば、Birrellら³⁹⁾はDHTおよびmibolerone (代謝されないアンドロゲン)がMCF-7, MDA-MB-453細胞の増殖を増やすと報告しており、Zhangら⁴⁰⁾はDHT-bezonate (DHT-B)がマウスの乳管細胞の増殖を促し、その効果はestradiolより弱いにもかかわらず、estradiolとDHT-Bの両者併用療法ではそれぞれ単独で使用した時に比べて乳管と腺房の著明な過形成を呈したと報告している。私の今回の研究では、5 α Red1の発現動態がKi-67およびthe Van Nuys classificationと有意に相関しており、再発リスクの増加とも有意に相関していた。Vandesompeleら⁴¹⁾は、Ki-67抗体はG0期以外の全ての腫瘍細胞で認められ、Ki-67 LIは特にS期の細胞および核分裂指数とに密接に関連すると報告している。The Van Nuys classificationはDCISの重要な予後因子として知られており、Silversteinら¹⁹⁾はDCIS患者の乳房温存術後の再発率をGroup 1では4%、Group 2では11%、Group 3では27%と報告している。DCISにおけるER, PR発現は組織学的分化度や核グレードと逆相関すると報告されているが⁷⁾⁸⁾、DCISにおけるAR発現はERとは相関せず¹¹⁾、低分化なDCISでもかなりの割合でER-/PR-/AR+となることも報告されている⁹⁾。これらの報告や私の今回の研究結果から、DHTがDCISの発育に関与している可能性も示唆されるが、現在のところDCISにおけるアンドロゲン作用に関する情報は十分に得られておらず、今後のさらなる研究が必要と考えられた。

E. 結論

腫瘍内estradiolおよびDHT濃度は非腫瘍性乳腺組織よりもDCISで有意に高く、エストロゲン産生酵素 (aromatase, STS, 17 β HSD1)およびアンドロゲン産生酵素 (17 β HSD5, 5 α Red1)はすべてDCISの多くの症例で発現していた。腫瘍内DHT濃度はDCISよりもIDCで有意に低く、aromatase mRNA発現はIDCで有意に高かった。このことからIDCでは組織内DHTがaromataseによりエストロゲンに効率よく転換されているが、DCISではaromataseの発現程度がIDCよりも低いためにDHTの濃度が高くなっているという可能性が示唆された。このDHTのDCISにおける作用を今後更に検討していく重要性が今回の私の研究成果からは考えられた。また免疫組織化学で検討したDCISにおける5 α Red1の陽性所見は、Ki-67 LI, histological gradeおよび再発リスクの上昇と相関していた。今回の私の研究結果から、DCISでも腫瘍内でのステロイド局所合成によりestradiolおよびDHTの濃度が上昇している可能性が示された。DCISの多くの症例ではERやARを腫瘍細胞で発現しており、estradiol, DHTいずれもDCISの発育に重要な役割を果たしているのではないかと私は考えた。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Endocrine-Related Cancer (2008) 15:113-124. に掲載予定

2. 学会発表

(1) 2007/06/02~2007/06/05 海外・国際 学会

[その他] J. Akahira, T. Suzuki, F. Suzuki, I. Miura et al.

The Expression of Estrogen beta Related Receptors in Human Epithelia Adenocarcinoma.

THE ENDOCRINE SOCIETY' S 89th Annual Meeting ENDO 07.

(2) 2007/06/02~2007/06/05 海外・国際 学会

[その他] T. Suzuki, Y. Miki, T. Moriya, J. A. Akahira, T. Ishida, Y. Yamaguchi, S. Hayashi and H. Sasano. Early Growth Responsive Gene 3 (EGR3) in Human Breast Carcinoma.

THE ENDOCRINE SOCIETY' S 89th Annual Meeting ENDO 07.

(3) 2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 赤平純一、鈴木貴、鈴木史彦、三浦伊久美、三木康宏、長崎修治、鴨川由紀子 and 伊藤潔、森谷卓也、林慎一、八重樫伸生、笹野公伸。

ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor - related receptor (ERR) β の発現と臨床病理学的因子との関連について
第80回日本内分泌学会学術総会。

(4) 2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 三木康宏、長崎修治、赤平純一、鈴木貴、笹野公伸。

ヒト骨芽細胞における内分泌攪乱物質 Bisphenol A の細胞増殖作用。
第80回日本内分泌学会学術総会。

(5) 2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 新井川弘道、鈴木貴、鈴木聡、近藤丘、笹野公伸。

肺癌における組織内 Estradiol 濃度と Estrogen receptor 発現の関係。
第80回日本内分泌学会学術総会。

(6) 2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 森本玲、佐藤文俊、村上治、戸恒和人、鈴木貴、笹野公伸、伊藤貞嘉 and 高橋和広。

副腎腫瘍における Adrenomedullin2/intermedin 発現の検討。
第80回日本内分泌学会学術総会。

(7) 2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 中村恵美、鈴木貴、林 富、笹野公伸。
難治性副腎悪性腫瘍組織における標的治療因子の検索。
第80回日本内分泌学会学術総会。

(8) 2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 長崎修治、中村保宏、三木康宏、赤平純一、鈴木

貴、林慎一、笹野公伸。

前立腺癌における Estrogen Receptor β 及び β cx の機能解析。

第80回日本内分泌学会学術総会。

(9) 2007/06/14~2007/06/16 日本国内 学会

[その他] 鈴木貴、三木康宏、森谷卓也、赤平純一、石田孝宣、山口ゆり、林慎一 and 笹野公伸。

ヒト乳癌における EGR3 (early growth response3) の発現意義。

第80回日本内分泌学会学術総会。

(10) 2007/09/01~2007/09/01 日本国内 学会

[その他] 笹野公伸。

副腎皮質癌の病理診断の最近の進歩。

第7回日本内分泌学会四国支部学術集会。

(11) 2007/10/03~2007/10/05 海外・国際 学会

[その他] Osamu Dohi, Masahito Hatori, Takashi Suzuki, Katsuhiko Ono, Masami Hosaka, and Jun-ichi Akahira, Yasuhiro Miki, Shunji Nagasaki, Hironobu Sasano.

Sex steroids and human osteosarcoma -Hormone dependent cell proliferation.

66th Annual Meeting of Japanese Cancer Association.

(12) 2007/10/03~2007/10/05 海外・国際 学会

[その他] Jun-ichi Akahira, Takashi Suzuki, Fumihiko Suzuki, Ikumi Miura, Yasuhiro Miki, et al.

The expression of estrogen receptor-related receptors in human epithelial ovarian cancer.

66th Annual Meeting of Japanese Cancer Association.

(13) 2007/10/03~2007/10/05 海外・国際 学会

[その他] Kojiro Tanabe, Mitsuyo Matsumoto, Jun-ichi Akahira, Takashi Suzuki et al.

Expression of midkine in human endometrium and its disorder.

66th Annual Meeting of Japanese Cancer Association Teamwork for Effective Reduction of Cancer.