

シンポジウム 子宮内膜異常増殖の病態

人子宮内膜癌の受容体分析—ホルモン依存性本態の解明—

帝京大学医学部産科婦人科学教室

加藤 順三

共同研究者

小野内常子, 高松みつ子, 瀬戸 輝一 (病理), 植田 國昭 (駒込病院婦人科)

研究協力者

落合 和徳, 上滝 次郎, 岡野 秀子, 久保 久光 (癌研婦人科),
前田 敏雄 (長野日赤産婦人科), 松沢 真澄, 河本 至誠 (埼玉
がんセンター婦人科), 相原 正博 (東大修養学部)

緒言

子宮内膜癌のホルモン依存性は明らかであるにも拘らず (滝, Siiteri, Kistner, Kelley), その本態については尚解明すべき点が多い. ところで組織のホルモン反応性は, 標的細胞内に局在するステロイド受容体 receptor (以下Rと略) に一義的に依存することが明らかになってきている (Jensen, Gorski, King, O'Malley, Liao). 従つて, 本研究では人子宮内膜癌のホルモン依存性の本態を具体的に解明することを目的として, 自然並びに加工された条件下での正常並びに異常増殖を示す人内膜組織内Rを, 定性的且つ定量的に測定し, 得られた検索結果を基礎的並びに臨床的な面より解析したのでここに報告する.

研究対象並びに方法の概要

手術時子宮剔除後直ちに直視下で切除乃至搔爬でえられた正常・増殖症内膜及び内膜癌組織を直ちにR分析に使用し, すぐに分析しない場合は, 組織片を直ちに凍結し, -80°C で保存した. 組織をポリトロンでホモゲナイズ後, 細胞質分画 cytosol (105,000g 上清) をえた.

R分析には, 10%グリセロール加5~20%蔗糖密度勾配遠心法 (超遠心法と略), Dextran-coated charcoal (DCC) 法及びポリアクリルアミド (PA), PA—アガローズ並びにアンホライン—PA 勾配ゲル電気泳動法, exchange assay 交換測定法, 核結合法並びにクロマチン結合法を用いた. 標識ステロイドとして estrogen (E)R 分析には ^3H -estradiol (E_2), progesterone (P)R 分析には ^3H -R5020 (17, 21-dimethyl-19-nor-4, 9-pregnadiene-3-20-dione) 及び ^3H -P, androgen (A)R 分析には ^3H -R1881 (methyltrienolone), ^3H -testosterone 及び ^3H -5 α -dihydro-testosterone (DHT), corticoid (C)R 分析には ^3H -dexamethasone を用い, 非放射性競合物質としては種々のステロイド及びゲチルスチルベステロールの他に, 抗ホルモンとしてクロムフェン, U11100A 等を使用した. 放射能測定は液体シンチレーション法, 蛋白測定は Lowry 法によつた. R濃度は fmol/mg cytosol protein

で表現した. 尚, 超遠心法による沈降定数 (S値) は Martin and Ames 法に準拠して測定した. ステロイド分析にはクロマトグラフィーを, 血中ステロイド (E, P, A) 測定はラジオイムノアッセイ (RIA)法により, 又子宮内膜・卵巣の組織学的検索も併せ行つた.

研究成績並びに考察

A. 人内膜癌ステロイドRに関する基礎的研究

1. 特異的R分析系の検討

新しい合成ゲスターゲン R5020 は, Pと異つて, PRと特異的に強力且つ安定に結合し, 人内膜癌 PR 分析上でも極めて有効であるので (加藤他, 1977), 本分析系を用いた. 同様に, 合成アンドロゲンである R1881 は human sex steroid binding globulin (hSBG) に結合せず, 適当な競合物質の選択下では, 特異的アンドロゲンレセプターの同定と測定に有用である (後述).

2. 人子宮内膜癌のアンドロゲン結合蛋白 (ABP) の分析

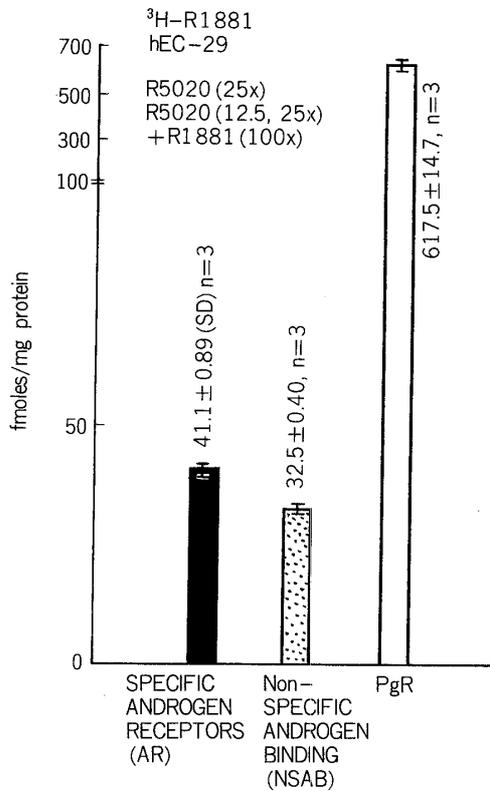
アンドロゲン (A) の子宮内膜への直接作用は臨床的にも示唆されているので, 人子宮内膜組織にAレセプターが存在するか否かの検討は必須であるにも拘らず, 人子宮内膜細胞質に混在する hSBG にTやDHTが結合するので, 従来その同定は困難であつた.

a. 人内膜癌 cytosol ABP の構成因子とアンドロゲンレセプター (AR) の実証とその意義

1) ABP の構成結合因子: ^3H -DHT 及び ^3H -R1881 と非放射性 DHT, R1881 及び R5020 との組合せで検索すると, 人子宮内膜癌 cytosol に含有される androgen binding proteins (ABP) は (i) 特異的A結合蛋白, hSBG 及び非特異的 ABP からなり, 明らかに特異的A結合蛋白が存在する (図1参照). (ii) ABP は~4S に主として存在し 8S 部位には少なく, ER 或いは PR の分子状態とは明らかに異なる.

2) 人子宮内膜癌における特異的A結合蛋白 (AR) の証明: 本結合蛋白の解離定数 (Kd) 及び結合能 (NBS) を検討した結果, Aと高親和性であり, 且つ低い結合容

図1 Demonstration of specific androgen binding proteins in human endometrial carcinoma



量からみて、アンドロゲン R (AR) と考えられた。

3. 人内膜癌細胞質エストロゲン及びプロゲステロン受容体蛋白の特性に関する基礎的検討。

a. 人内膜癌 ER 及び PR の特性の分析

1) 密度勾配沈降による 4S, 8S の分離と出現性：分化型腺癌細胞質の示す遠心パターンでは 8S(注)と 4S とに結合因子がみられる (図2参照)。尚、4S の E 及び P 結合因子は症例によりその出現はまちまちであった。

(注：ER 及び PR の S 値は厳密には夫々 8 及び 7~8 であるが、便宜上本論文では後者も 8 S とした。)

2) 4S, 8S の分子相関の検討：図2の如く、KCl 非

存在下の低塩類条件下では、E 結合蛋白は 8S と 4S にみられるが、0.4M KCl 存在下では、8S ピークは消失して、大きい 4S ピークのみが出現し、従つて 8SR の 4SR への解離がみられた。又 PR の場合も全く同様の結果を得た。この際 ER, PR とも 4S 部位で増加した 4SR の ³H-E₂ 及び ³H-R5020 結合部位数は、減少した 8SR のそれとほぼ一致するので、従つて 8SR 分子のすべてが 4SR へ解離して移行したものと解された。更に charged cytosol を超遠心法によつて、分取した 4S (分画 No. 4~9) と 8S (分画 No. 12~19) を濃縮し、0.4M KCl で処理後、再び超遠心法で分離すると、KCl 処理による 4S 因子の沈降は不変であるのに対し、8S 因子は解離し 4S 部位に単一ピークとして出現した。従つて 8SR は重合型、4SR は基本型サブユニットと考えられ、両者は少なくともその一部ではサブユニット・重合型関係にあるものと推定された。

3) 4S 及び 8SR 分子のステロイド結合特異性の検討：8S 因子と 4S 因子とを比較すると、種々のステロイド及び抗ステロイドを用いた競合実験の結果、8S 因子でステロイド特異性がより厳格であることが判明した (表1参照)。

4) 4S 及び 8SR 分子の解離定数及び結合能の検討：DCC法による Scatchard プロットで解析すると、ER も PR も、8S 因子は 8SR そのものに該当すると考えられるが、4S 因子は 4SR 以外に lower affinity, higher capacity binder も含むことが分つた (表1参照)。

5) 4S 及び 8SR 因子結合状態の差の検討：人の分化型腺癌 cytosol の E 及び P 結合蛋白と結合した ³H-ステロイドに対し、DCC により、それらの解離状態を検討すると、その効果は 4S 分子でより大であった。

6) 人内膜癌細胞質の E 及び P 結合蛋白の特性を要約すると表1の如くである。

b. 人子宮正常内膜並びに内膜増殖異常状態における R 蛋白の物理生化学的挙動の比較検討

正常内膜、内膜増殖症及び分化型内膜癌それぞれの細

図 2

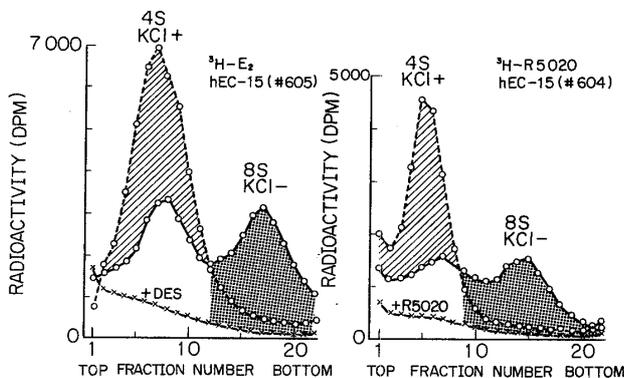


表1 Characterization of estradiol and progesterone binding components of human endometrial cancer cytosols

Parameters	Binding components	
	4 S	8 S
Molecular relationship	Subunit (at least partly)	Aggregate
Steroid specificity	Less strict	Strict
Binding		
Affinity	Higher; lower	High
Saturability	Saturable; less saturable	Saturable
DCC effects	Marked	Moderate
Composition	Receptor subunit and less specific binders	Specific receptors

* Well-differentiated type

胞性格に相異があり、そのためステロイド受容体蛋白の物理化学的性状も偏倚を生じているか否かの検討は、人副腎で癌化に伴って、細胞膜Rの多発・多様化現象が発現するとする、Neyの所謂“multiple receptors”説もあり、内膜癌におけるホルモン依存性の本態の解明に際しても、この検索は1つの手掛りを提供すると考えられる。

1) ER及びPRの解離定数(Kd)値の比較:三者間で統計的に有意の差はなく、ER・PRとも癌化に伴う結合親和性の著明な変化はないと考えられた。

2) ステロイド結合特異性の比較検討:種々の競合物質で検討した結果、ER・PRとも三者間で、顕著な差は認められなかつた。

3) ポリアクリルアミド・アガロース電気泳動法による比較検討:人子宮正常内膜、異常増殖症内膜及び分化型内膜癌組織のcytosolを ^3H -estradiol (7.68nM)及び ^3H -R5020 (8.34nM)で(非放射性 diethylstilbestrol 及び R5020 の存在下、或いは非存在下で)標識後、3.25% polyacrylamide-0.5% agarose disc gel に上層し、2mA/tube で電気泳動した。

正常、増殖症及び内膜癌 cytosol のエストロゲン結合蛋白のいずれの泳動図も、量的差はあるが、a, b, c 三つの結合蛋白の放射能ピークを示し、標準酵素を基準として作成した標準曲線から、それらの分子量は夫々 $27 \sim 28 \times 10^4$ 、 $22 \sim 24 \times 10^4$ 及び 12×10^4 dalton であつた。

プロゲステロン結合蛋白泳動パターンでは、小さい a ピークと著明な b ピークを認めた。cytosol の E 及び P 結合蛋白の泳動パターンは、症例によつて量的差はみられるが、基本的には同一であつた。

更に正常内膜、内膜癌細胞質 E 結合蛋白 8S, 4S と a, b, c ピークとの相関を検討すると、(i) 超遠心パターン上での 8S は、分子量28万 dalton の a 分子と $22 \sim 24$ 万の b 分子から成ることが分り、receptor heterogeneity の存在を示唆すると考えられた。(ii) 又、c ピークは 4S に由来することが分つた。

4) 内膜癌 cytosol E 及び P 結合蛋白の等電点分析とその比較検討:レセプター蛋白分子の性状を、更に分析する目的で、 ^3H -estradiol (10.9nM) 及び ^3H -R5020 (12.3nM) で、charge した cytosol を DCC 処理後、Ampholine-polyacrylamide gel plate (pH 3.5-9.5) (LKB) にスポットし、LKB 2103型 multiphor 装置で電気泳動して等電点 pI を測定した。

泳動パターン上、正常増殖期内膜、増殖症及び分化型内膜癌組織 cytosol の E, P レセプター蛋白の主要なものは、いずれも pI 4.7~4.9 と pI 6 の等電点を示した。定量的差は認められたが、泳動パターンは三者間で基本的には差はなかつた。

尚、E と P 蛋白とで pI に多少の差がみられたことは、超遠心パターン上 ER が 8S, RP が 7~8S であることと考へ併せると、両者間での物理化学的差を示唆する点興味深い。

5) 以上、これらの parameters からみて、ER, PR 分子とも正常・異常増殖間で、有意の差はみとめられず、癌化に伴うステロイドレセプターの特性に著明な変

化はないものと考えられる。

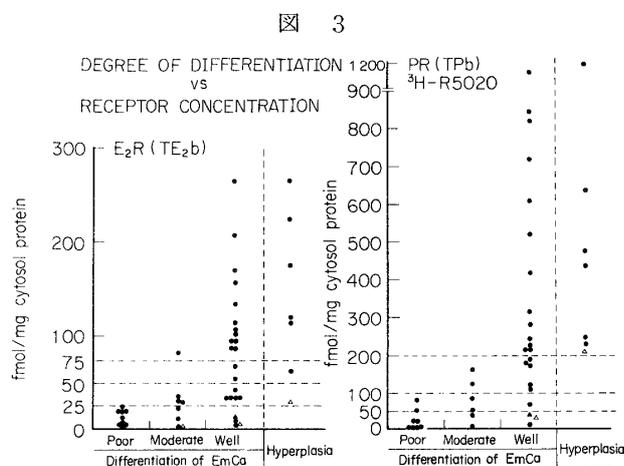
B. 人子宮内膜癌の組織型とステロイド受容体との相関性

人内膜癌の形態成熟度とホルモン反応性との関連性が推定されてきているが、ER 及び PR と組織型との関係については、諸家の成績は尚一致をみない (Pollow et al. 1975; Rao et al. 1974; Terenius 1971; MacLaughlin et al. 1976; Young et al. 1976)。従つて、これらの ER 及び PR を主として密度勾配遠心法で分析すると共に、AR 並びに CR についても、同時分析した。

1. ER 並びに PR 分析

a. 腺癌形態成熟度との相関性

総 ER 値は図3の如くに、増殖症に多く、内膜癌で



も分化型に高いが、中等度分化型では著減し、低分化型での ER 量は極めて低い値を示した。又総 PR も ER とほぼ同様な形態成熟度との関連性を示した。尚、子宮内膜腺癌の組織分類は、胃癌取扱基準のそれに則つてある。

パターン分析上 4S と 8S の動態をみると、表2の如く、ER は増殖症・分化型で 8SR > 4S を示すが、中等度分化型ではその関係は逆転し、8SR の減少が明瞭であり、低分化型では 8SR は殆んど欠如し、4S のみが残存する症例が7/9例 (78%) にみられた。即ち低分化型腺癌は、反応性が欠如するか極めて低いものと考えられた。また PR でも組織形態成熟度の低下と共に、8SR の減少・欠如がより著明であつた。これらの事は 8S は R 分子そのものであるのに、4S は混成であるという基礎研究成績とよく合致している (表1参照)。

ER を横軸に PR を縦軸にとつて、分布をみると、低分化型は原点近くに、中等度分化型もその近くの点線の円の内に集中する (図5参照)。

以上、人内膜癌では、乳癌の場合とは異なり、組織型との相関性が明瞭で、R 分析からみた内膜癌は、組織形態成熟度の低下に平行して、定量的にも定性的にも、段階的偏差が認められ、ホルモン依存性の減少・喪失が推定された。このことは低分化型腺癌にゲスターゲン療法

表2 Determination of E₂R and PR in endometrial hyperplasia and adenocarcinomas

	Estradiol receptors ⁺			Progesterone receptors ⁺		
	4S	8S	TE ₂ b	4S	8S	TPb
Hyperplasia	62.6* ±15.0*(6)	96.3 ±19.9(6)	160.0 ±30.7(6)	255.3 ±48.6(6)	276.8 ±116.8(6)	532.0 ±144.5(6)
Carcinoma						
Well differentiated	38.4 ±7.4(21)	52.0 ±9.4(21)	90.4 ±14.7(21)	151.1 20.5(19)	175.2 ±47.4(19)	350.8 ±67.3(20)
Moderately differentiated	19.1 ±4.3(7)	10.8 ±5.8(7)	29.0 ±9.6(7)	37.3 ±12.7(6)	12.9 ±5.2(6)	66.0 ±21.6(7)
Undifferentiated	8.6 ±2.2(9)	3.7 ±2.3(9)	12.3 ±2.6(9)	18.8 ±7.5(9)	2.4 ±1.5(9)	21.8 ±8.5(9)

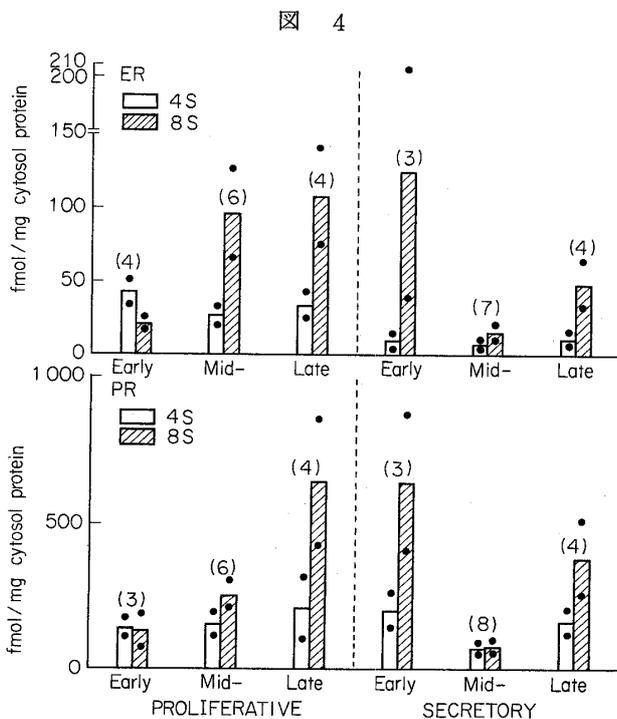
+ fmoles/mg cytosol protein

* Mean and SE (number of samples)

が無効であるという諸家の臨床成績への生化学的根拠を与えるものといえる。尚、中等度分化型腺癌のER, PRは共に低値を示す例が多く、形態面と機能相(ホルモン反応性)との離反が示唆された点、注目し値する。中等度分化型内膜癌は一般的にゲスターゲン療法に低反応性と考えられているが、低値ではあるものの比較的高値に入る症例は、ゲスターゲン反応も期待し得ると予想される。中等度分化型腺癌では組織学的所見のみからゲスターゲン療法の効果予想は困難で、従つて特に中等度分化型腺癌はホルモン療法に先立つてのR測定の実用性が強調される。

2. 内膜癌におけるPR/ER比(E依存性PR誘導比)と臨床的意義

a. 内因性・外因性E依存性PR誘導



月経周期時の内膜 ER 濃度の変動は主として 8SR に基き、増殖期>分泌期で、分泌期中間・後期に最低値を示した。PR パターンでも、ER とほぼ同様の変動を示した(図4)。

E 投与による人内膜 PR の誘導を estradiol benzoate 2mg 3日間投与後、超遠心分析して検討すると、8S, 4S が著増していた。

以上の如く、正常内膜での PR 誘導は内因性・外因性 E に依存することを確認した。

b. 増殖異常時の PR 誘導性

1) PR/ER比: PR/ER 比は増殖症、分化型、中等度分化型及び低分化型で3.3, 3.9, 2.2, 及び1.8と明らかに減少し、PR 誘導性の減少が推定された。PR 濃度は E ホルモン反応の指標(marker)と考えられ、この検索結果は形態成熟度とホルモン反応性との関係を量的に表現したものといえる。

2) 分化型腺癌における閉経前後のホルモン反応性の検討: 図5では、星印(*)のものが閉経前、丸印(O)が閉経後の症例で、ER 及び PR 値を夫々横軸・縦軸にとつて示してある。図5より明らかな如く、閉経前群は1例を除き、ER が75 fmol/mg protein 以下、PR 値が200以上を示す症例が6/7例にみられた。例外的な1例も ER 96, PR 180値であり、比較的低 ER・高 PR を特徴としている。これらの症例では血中 E₁, E₂, E₃, 及び総 E 量の何れも特に高値を示さず、従つて比較的低 ER を内因性 E 濃度のみで説明することは困難である。また閉経後群で低 ER・高 PR 型は1/13例のみで、ER と PR との正の相関性が存在した。以上から閉経前後で反応細胞の内因性反応性の差が示唆されるが、閉経後での嚢胞性腺性増殖症により高率に内膜癌が合併すること(Novak, 滝), 加齢に伴うゲスターゲン療法の有効性の低下(Smith) 及び老齢に平行した PR の減少(Young) 等、臨床的事項と関連して極めて興味ある検索結果と考えられる。

3. 人内膜癌における ER と PR との組合せよりの R 解析

ER+, PR+; ER+, PR-; ER-, PR+ 及び ER-, PR- 型の頻度は、表3の如くで、増殖症及び分化型腺癌ではER+, PR+ 型が殆んどであるのに対し、中等

図5 ER vs PR in endometrial hyperplasia and adenocarcinomas

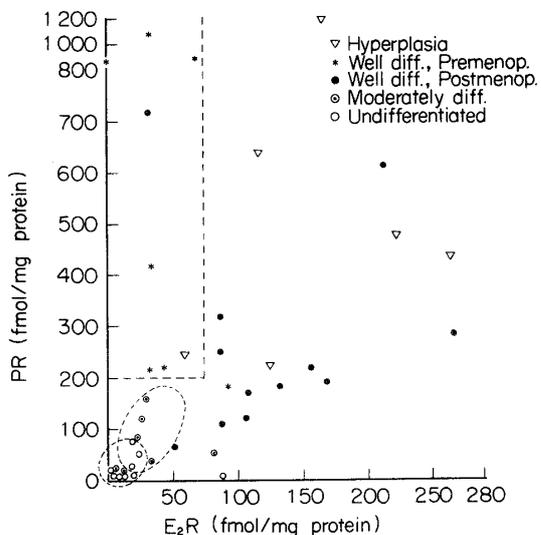


表3 Incidence of various combinations of ER and PR in endometrial hyperplasia and adenocarcinomas*

	ER ⁺ , PR ⁺	ER ⁺ , PR ⁻	ER ⁻ , PR ⁺	ER ⁻ , PR ⁻
Hyperplasia	6	0	0	0
Adenocarcinomas				
Well differentiated	18	0	2	0
Moderately differentiated	2	0	4	1
Undifferentiated	1	2	2	4

* 8SR 基準

度分化型及び低分化型ではER-, PR-の組合せの頻度が多くなり、右方への移動を示した。

ER, PRの各組合せが示すホルモン反応性の意義は、ER+, PR+型はgood responder, ER+, PR-型はpoor responder, ER-, PR-型はnon-responderと判定できる点である。

4. アンドロゲンレセプター (AR) 分析

増殖症, 分化型>>中等度分化型, 低分化型腺癌の順で低分化型では殆んどARを欠如し, 偏倚がみられた。

5. コルチコイドレセプター (CR) 分析

内膜癌のCRは, 他のRに比較して少なく, 特に低分化型腺癌では4/6例に全くCRを欠如していた。

以上の如く, 形態成熟度の低下に伴い, 殆んど全てのステロイドホルモンレセプター (ER, PR, AR及びCR)の減少乃至欠失がみられる結果を得たが, その為ホルモン反応性が低下・喪失するものと判断された。

6. 複数部位でのR分析 Multiple sites receptor assay (MSRA)

癌組織像は, 特に進行癌において決して一様でなく, 低分化から分化型に至る様々な組織型を混在するのが通常である為, 別出子宮同一例より2カ所以上の複数箇所

表4 Multiple sites Receptor assay

Pt	hEC No.	SITE	HISTOLOGY	ER(8S)	PR(8S)	AR
C.M.	14-1	Fundus	Moderately-diff.	32.3 (12.8)	37 (13)	8.6
	-2	Corpus	Poorly-diff.	18.0 (1.1)	25 (2.1)	0
Y.N.	16-1	Diffuse	Well-diff AdenoCa. Pure type	156.3 (107.5)	216 (124)	
	-2	Diffuse	Well-diff. AdenoCa. Secretory(+)	206.5 (145.1)	607 (412)	
S.H.	23-1	Fundus	Well-diff.	67.3 (21.6)	821	2.0
	-2	Corpus	Mixed Ca.	4.8 (2.0)	892	19.4
H.H.	27-1	R. Fundus	Undiff.	17.1 (0)	1.7 (0)	1.0
	-2	Fundus	"	14.1 (0)	1.6 (0)	
	-3	Corpus	"	25.2 (0)	0 (0)	
	-4	Corpus	Normal EM	144.4 (38.9)	425 (110)	
	-5	R. ext. il.		1.8 (0)	0 (0)	
	-6	R. obt.		2.4 (0)	0.8 (0)	
	-7	L. ext. il.		20.1 (0)	5.8 (0)	
S.S.	45-2	Fundus	Well-diff.	21.9 (4.3)	72 (11)	
	-3	Corpus	Adenomatous hyperplasia + normal EM	32.0 (12.2)	415 (208)	
	-4	Fundus	Hyperplasia + Well-diff. AdenoCa	24.6 (4.9)	234 (93)	
F.H.	51-1	Fundus	Undiff.	4.7 (1.0)	18 (2.9)	0
	-2	Fundus	"	8.1 (1.2)	14 /	
	-3	Corpus	Intact mucosa	138.5 (90.0)	/ /	
T.S.	58-1	Fundus	Well 60% Mod. 40%	29.6 (5.1)	24 (5.0)	7.1
	-2	R. Corpus	95-60% 0-20%	50.3 (21.4)	63 (22)	0.6
	-3	L. Corpus	80% 20%	12.9 (4.1)	57 (17)	
	-4	Corpus	10% 90%	47.6 (33.6)	4.6 (0.5)	4.9
	-6	L. Ovary	Metastatic	31.4 (14.8)	0 /	
S.M.	74-1	R. Fundus	Ca-Tumor, Well-diff.	92.4 (58.4)	185 (51)	
	-2	L. Fundus	"	23.2 (11.1)	146 (49)	
	-3	R. Corpus	"	52.6 (16.6)	/ /	
	-4	L. Corpus	Myometrium, intact	70.6 (30.8)	340 (110)	
	-5	Corpus	Intact	123.3 (77.0)	126 (11)	
	-6	Portio	Intact	0 (0)	24 (3.2)	
S.H.	88-1	R. Fundus	Moderately-diff. Adenocarcinoma	22.8 (4.0)	210 (54)	
	-2	L. Fundus	Moderately-diff. AdenoCa	22.2 (3.2)	79 (19)	
	-3	Corpus	Normal EM	83.8 (17.4)	404 (136)	
K.H.	91-1	Corpus	Moderate-well	0.2 (0.2)	39 (6.5)	
	-2	Fundus	Well-moderate	21.9 (4.4)	284 (124)	

でのレセプター測定即ち multiple sites receptor assayを試みた。

表4はMSRAを施行した27例の内臓癌より, その代表例を選出した一覧である。定量的にも定性的にも, R値は組織像とほぼ対応する事が多いが, 同一症例で各組織型の混在も認められるので, 同一子宮での癌細胞性格の多様性が明らかで, それがホルモン依存性の差を反映するものと考えられた。

C. 人内臓癌におけるレセプター (R) の動態分析

ステロイドはまず細胞質レセプター分子 (Rc) と結合し (receptor binding), ついでレセプター変換 (receptor transformation) 活性化後, 核内に取込まれて核レセプター複合体 (Rn) を形成し, 更にクロマチンの“アクセプター”と結合 (acceptor binding), その結果, 遺伝子

活性化がおこり、ホルモン効果が発現する。従つて細胞内における細胞質レセプター (Rc) 及び核レセプター (Rn) の両者を分析する必要がある。

核レセプター (Rn) は Anderson et al. 法に、また細胞質 (Rc) の結合型 (O), 非結合型 (U), 総 (T) は Katzenellenbogen et al. 法に準拠して測定した。

1. ER+, PR+ 型内膜癌のレセプター動態

超遠心分析で ER+, PR+ 型分化型内膜癌の夫々の R の動態を検討した結果が、図6A である。ERc はU及びOが、また ERn も検出され、核内への Rc の転移を示した。高い PR 値は、比較的多い ERc とよく相関し、また PRn の存在は PRc の核転移を意味し、さらにこのことはPがRを介して癌細胞に直接作用することの有力な根拠を提供している。このような細胞質及び核レセプター動態は他の5例の分析結果でも基本的に同一であつた。

尚、Rc 結合型Oが存在することは予想外の成績であり、R動態の解析に際し新しい要因を考慮する必要がある。

要するにER+, PR+ 型内膜癌での細胞内レセプター動態は、図6Bの様に、ER と PR の運動が円滑に行われて、ホルモン依存性が維持されると考えられる。

2. その他の ER, PR 型内膜癌のR動態分析

超遠心(SDG)分析結果から、ER+, PR- 型、ER-, PR+型及びER-, PR- 型の三型の内膜癌を選択し、夫々の Rc のU, O, T及びRnを分析した(図7A 参照)。

a. ER+, PR- 型の場合: ERc のUもOもかなり多

図6 A Receptor dynamics in the ER+, PR+ endometrial carcinoma

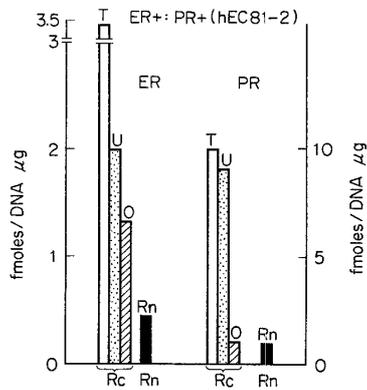


図6 B

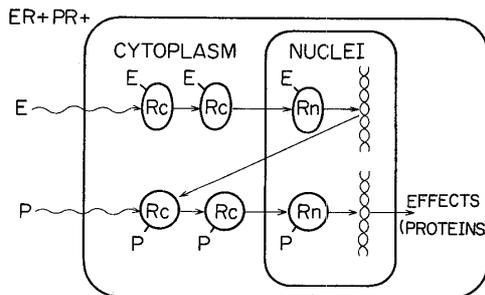


図7 A Receptor dynamics in human endometrial carcinomas having various combinations of ER and PR.

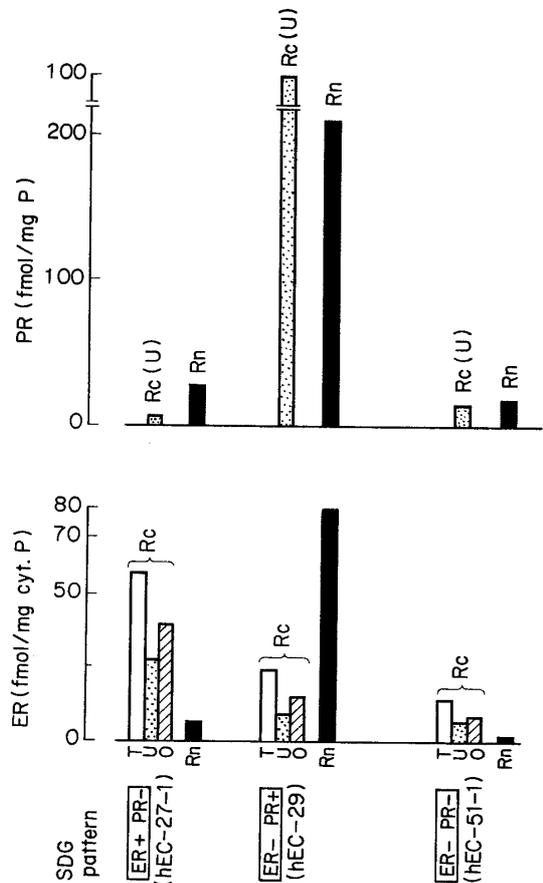
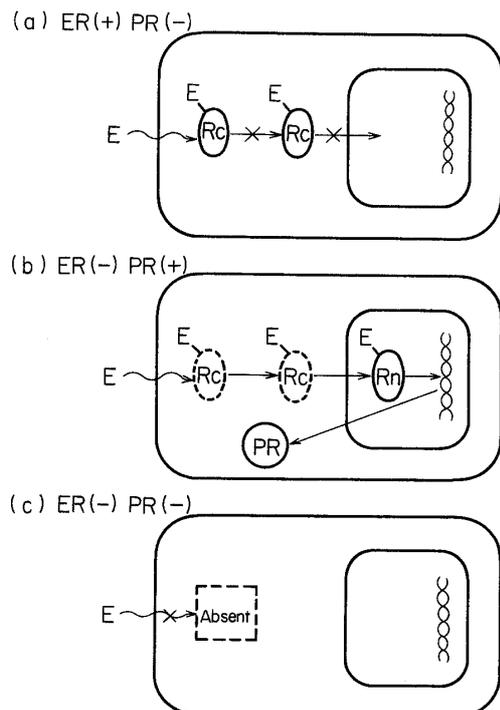


図7 B



いに拘らず, ERn は低値であること, 及び PRc は殆んど検出されないことより, レセプターの核転移が著減し, その結果, 癌細胞に取込まれたエストロゲンによる PR の誘導が極めて低いものと推定された。

b. ER-, PR+ 型の場合: ER の U も O も少ないが, Rn は極めて多く, また PRc, PRn も共に極めて多い事が特徴で, Rc は E と結合後, 活性化され, 大半が核に転移して, PR 合成支配遺伝子を活性化し, 多量の PR が誘導されると解釈される。また PRn の存在から, その癌細胞は P に対するホルモン反応性を有するものと推定された。

c. ER-, PR- 型の場合: いずれも少なく, レセプター欠損症に基くホルモン反応性欠如が考えられた。

図7B のモデルは, 以上の代表症例に加うるに, 種々の組合せを示した他の諸症例の解析から, 内膜癌におけるレセプターの細胞内動態を, R の結合状態, 変換, 活性化, 核転移及び効果発現の過程を勘案して, 3つの基本型にまとめたもので, (a) は ER の変換・活性化・転移機構が, (b) はその促進乃至遺伝子活性化機構の亢進が, (c) は細胞質レセプターの欠損が夫々主な原因であるものと推定される。

D. 人内膜癌の核並びにクロマチン結合

1. 核結合

次にホルモン反応性における核並びにクロマチンの役割も検討する目的で, 低分化型並びに分化型内膜癌組織からえられた同一の精製核に対して, 分化型, 低分化型内膜癌, 増殖症内膜, 正常内膜からえられた cytosol を $^3\text{H-E}_2$ 及び $^3\text{H-R5020}$ で標識した charged cytosol (0.2ml 当り 0.25~1mg protein) を組合せて検討した。これらの cytosol は, 相互の比較検討のために, レセプターをほぼ 100 fmoles 含む様に調整した。尚, 非活性化レセプターは分化型 cytosol を 37°C , 30分インキュベイトしたものを用いた (Kato et al. 1974)。Nuclear binding assay は Schrader の方法に準拠し, 核の DNA は Burton 法で測定を行い, 結合値は fmoles/DNA μg で, duplicate 或いは triplicate の平均値で示した。ER+ 或いは ER- cytosol の核結合成績は次の如くであつた。(表5参照)。

1) 低分化型内膜癌細胞精製核に対する ER 複合体の核結合: cytosol の核結合値はレセプター (+) の正常内膜, 増殖症及び分化型内膜癌の cytosol ではいずれも高いが, レセプター (-) の低分化型腺癌由来の cytosol では甚だしく低く, 非活性化 R の結合値に近かつた。従つて, (i) 低分化型内膜癌由来の細胞核も ERc との結合能を有すること, また (ii) ERc の有無が重要であり, 核結合は Rc に依存することが明らかとなつた。

2) 分化型内膜癌由来精製核への ER 複合体の核結合: 低分化型腺癌由来の核の場合とはほぼ同様で, ERc 依存性の結果が得られた。

2. クロマチン結合

核のステロイド-R 複合体はクロマチンの“アクセプター”に結合して, ホルモン効果が発現するものと考え

表5 Nuclear and chromatin binding of cytosol estradiol receptor complexes in normal, hyperplastic endometrium, and endometrial carcinomas

Cytosol (ER)		Nuclei, chromatin from	Nuclear binding /DNA μg (N)	Chromatin binding /DNA μg (C)	C/N ratio
Tissue	ER Conc.*				
Well-diff. Ca (hEC-15)	(+) 165	Undiff. Ca (hEC-27-1)	1.01	0.37	0.37
Undiff. Ca (hEC-27-1)	(-) 12	Undiff. Ca (hEC-27-1)	0.04	0.08	—
Hyperplasia (hec-11)	(+) 117	Undiff. Ca (hEC-27-1)	1.85	0.09	0.05
Normal EM (hec-83-2)	(+) 126	Undiff. Ca (hEC-27-1)	1.43	0.11	0.08
Inactivated cytosol (hEC-15)	(-) —	Undiff. Ca (hEC-27-1)	0.02	0.03	—

Well-diff. Ca (hEC-15)	(+) 168	Well-diff. Ca (hEC-81-2)	0.76	0.21	0.28
Undiff. Ca (hEC-27-1)	(-) 12	Well-diff. Ca (hEC-81-2)	0.04	0.05	—
Hyperplasia (hec-11)	(+) 17	Well-diff. Ca (hEC-81-2)	1.29	0.07	0.05
Normal EM (hec-83-2)	(+) 126	Well-diff. Ca (hEC-81-2)	1.30	0.07	0.05
Inactivated cytosol (hEC-15)	(-) —	Well-diff. Ca (hEC-81-2)	0.03	0.01	—

* fmoles/mg protein

えられるので, 核結合の場合と同じ実験デザインで, chromatin binding を検討した。

クロマチンは精製核から Schrader らの方法に準拠して調製し, クロマチン結合は Schrader et al. の方法を改良した我々の条件で行い, DNA 20.5~31.5 μg を含むクロマチンに対して, $^3\text{H-estradiol}$ 及び $^3\text{H-R5020}$ で標識した cytosol (0.2ml 当り 0.25~1mg 蛋白) を使用した。クロマチン結合値は triplicate 乃至 duplicate の平均値 fmoles/ μg DNA で表現した。

低分化型及び分化型腺癌組織由来のいずれのクロマチンでも, クロマチン結合値は ER+ の cytosol で高く, ER- の cytosol では低い結果が得られ, ER 依存性であり, また増殖症及び正常内膜よりの cytosol のクロマチン結合値に比較して分化型腺癌での値が高く, 従つて, クロマチン結合/核結合 (C/N) 比が大きいことが注目された (表5参照)。このことの生物学的意義は尚不明であるが, 癌化と共にクロマチン結合の調節の歯止めがとれて, 結果的には過剰に遺伝子活性化が招来されるとする解釈もスペキュレーションとして考えられる。今後の検討すべき課題として甚だ興味深い。

E. 人内膜癌の progestogen 療法の作用機序と様式

プロゲステロン (P) の人内膜癌に対する臨床効果は認容されつつあるが、その作用機序並びに様式に関する詳細については尚不詳の点が多い。

1. Progestogens (P) 負荷時の増殖異常内膜 ER レベルの調節

近時子宮内膜の ER 量が内因性並びに外因性 P で調節されることが明らかにされつつある。

a. 動物子宮における P の ER 調節機序

Estradiol 2.5 μ g をラットに注射後の子宮細胞質 ER の経時的变化をみると、図8の如く、まず減少し、(depletion 期)、ついで増加し、更に投与前より増量してオーバーシュートするが (replenishment 期)、2.5mg の progesterone 投与によつて、図8の点線の如くに、Rc の replenishment が抑制され、P による ERc 合成の抑制がみられた。この成績は Hsueh らの報告を追試確認したものである。

図8 Inhibitory effect of progesterone on the replenishment of rat uterine ER

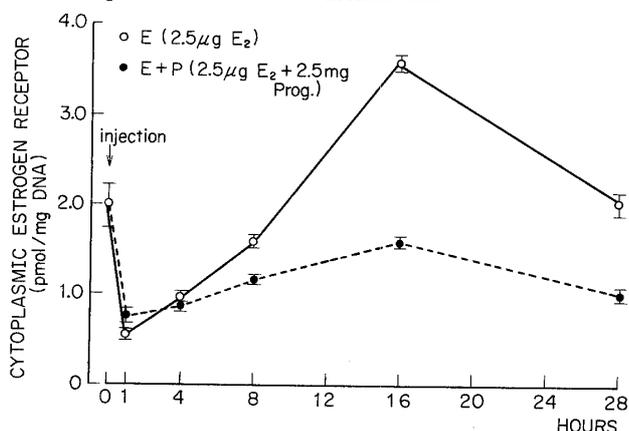
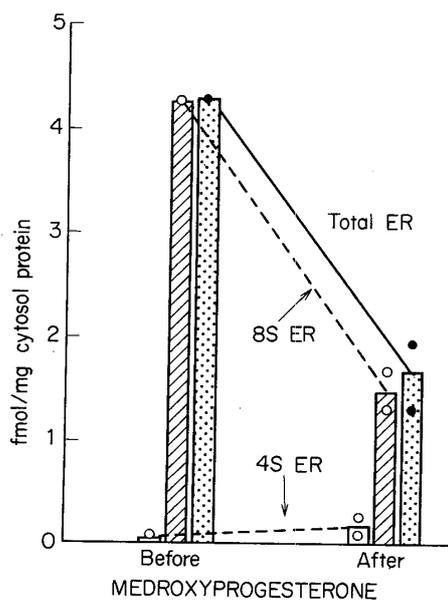


図9 Decrease in endometrial cancer ER by progestogen



b. 正常内膜での調節

月経周期分泌期における子宮内膜 ER 濃度の低下は内因性 P による ER の抑制を推定せしめるが (図4参照)、外因性に progestogen (medroxyprogesterone acetate, MPA) 投与によつて人子宮内膜細胞質 ER、特に 8SR 値を著減せしめた。

c. P 負荷時の人内膜増殖症並びに内膜癌 ER 分析

Tseng and Gurpide は P 投与が人内膜癌細胞核の E₂ 結合値を低下せしめることを報告し、P 療法の効果は ER レベルの調節に基くことを示唆した。我々は更に P 投与による人内膜癌 ER 動態を超速心法で定量的並びに定性的に分析した。

分化型体癌患者に MPA 500mg 3日、投与すると、腫瘍組織細胞質の 4S, 8S 及び総 ER 値は、夫々対照非投与群値の 0.4~22.2%, 0.9~20.4% 及び 7.2~11.7% に著減した。図9は分化型内膜癌で MPA 投与前後に、P 分析が可能であつた症例で、P 投与後の腫瘍組織の 4S, 8SR 値は明らかに減少した。更に内膜増殖症に progesterone capronate 125mg の注射によつて、ER 値は対照の 18% に低下した。以上の如く、人内膜癌並びに増殖症の細胞質 ER は P 負荷によつて著明に抑制された。

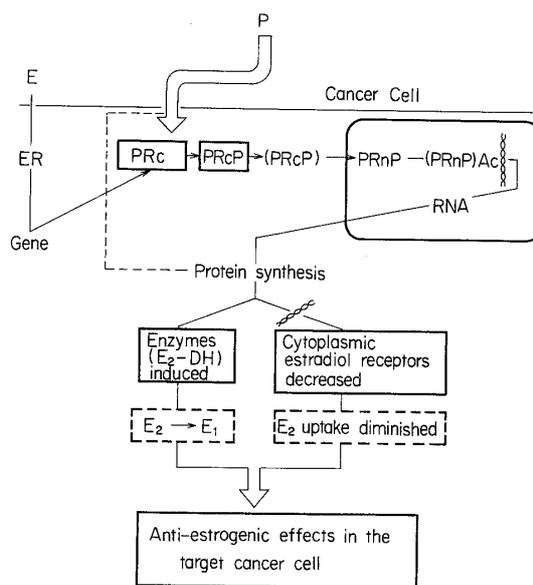
d. P による人内膜癌細胞核 ER の減少

P 投与後の人内膜癌組織 ERn を交換反応により測定すると、Rn 値は対照値に比較して著しく低下した。従つて、ERc のみでなく核 R (Rn) をも含めた細胞の全 ER 量が減少していることが明らかとなつた。

2. 人内膜癌細胞における P の作用機序のモデル (図10参照)

P 投与による人内膜癌 ERc 及び ERn の抑制効果は、酵素活性を介する P の E₂ 代謝の促進作用 (Pollow 及び Gurpide) と相俟つて、E₂ 排除の方向に相乗的に作用する事による。この抗 E 作用が治療効果発現への作用

図10 Possible mechanisms of action of progestogens on endometrial cancer cells



機序の一つである。

3. P療法におけるエストロゲン pulse priming の合理性

P療法の効果はPRを介すると考えられるので、プロゲステロン療法の開始前に、極めて短期間にエストロゲンを負荷即ち pulse priming することは、PRレベルを高める結果を生じ、理論的にも合理的と考えられる。その1例を提示すると、エストロゲン pulse priming 時 (estradiol benzoate 2mg, 3日間連続投与、最後の注射24時間後子宮剥出) の分化型内膜癌のER及びPR値を交換測定法で測定すると、図11の如くで、ERn高値とPRc高値が認められ、P投与によりPRcは核へ転移するものと考えられた。図12は pulse priming 時のPRのRcとRnの動態を模式的にまとめたもので、pulse priming をしない場合のP療法は明らかに不利であろう。ゲスターゲン単独よりゲスターゲン+エストロゲンがより有効であったという滝らの成績は、かかる観点から合理的に解釈し得る。

4. 人内膜癌に対するプロゲステロン以外のホルモン療法

図11 Cytosol and nuclear ER and PR in endometrial cancer before and after the estrogen priming

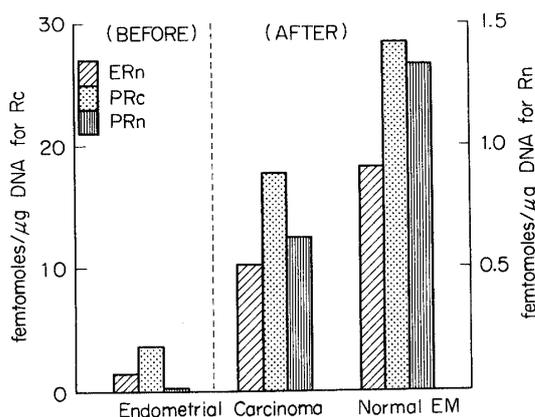
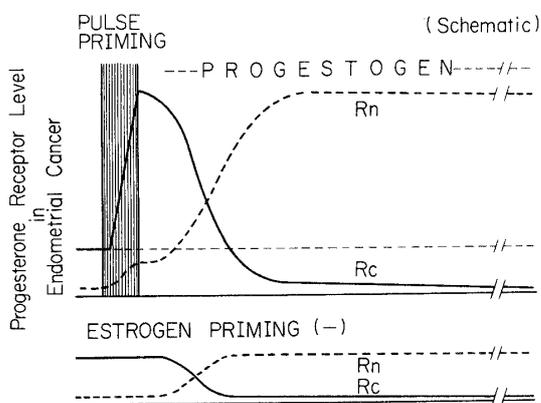


図12 Clinical implications of pulse estrogen priming in progestogen therapy for endometrial cancer



人内膜癌におけるARの同定はアンドロゲンの癌細胞への直接作用を強く示唆するもので、アンドロゲン療法の作用機転と様式を解明する上で考慮すべき点と思われる。尚、抗エストロゲン (Clomiphene, Nafoxidine, Tamoxifen, Epiostanol 等) は、強くERと結合するので、Rを介する作用様式が人内膜癌の場合にも考えられる。

要約並びに結論

1. 人内膜癌の細胞質にはエストロゲン及びプロゲステロンの8Sレセプター(R)並びに4S結合分子が含有される。後者は4SRと lower affinity, higher capacity 4S binder からなる。8S,4S間には少なくとも一部は重合型-subunit(基本型)の分子関係が成立する。

2. 癌化に伴うERとPR分子の物理化学的特性の有意の変化は、検討した範囲内では認められなかった。

3. 増殖異常内膜の病理組織像とER及びPR値。

1) 両者に相関性があり、4S, 8S及び総R濃度は増殖症≧分化型≧中等度分化型≧低分化型腺癌であった。またパターン分析上8SRの変化がより著明であった。Rは形態成熟低下と共に定量的・定性的に著しく減少し、ホルモン依存性の減少・喪失が推定された。尚、中等度分化型腺癌でのR低値は形態と機能相(ホルモン反応性)との分離を示唆した。

2) 分化型腺癌の閉経前と後のER, PRとの相関比(誘導比)の相異から、反応細胞の差が示唆された。

3) 細胞質ER及びPRの有無の組合せから、内膜癌ホルモン反応性を responder と non-responder とに分類できた。

4. 人内膜癌における特異的アンドロゲン(A)結合蛋白(レセプター)(AR)の存在を同定した。主として~4Sに存在する。ARの同定はAの癌細胞への直接作用を強く支持する。

5. ARと形態成熟度との関係は、増殖症・分化型≧中等度分化型・低分化型腺癌の順であった。また、コルチコイドレセプター(CR)も多くの低分化型腺癌で欠如していた。従つて、主要ステロイドホルモンのすべてのレセプター(ER, PR, AR及びCR)が形態成熟低下に伴つて減少・喪失する結果を示した。

6. 同一剥出子宮内膜における複数部位での multiple sites receptor assay を内膜癌27例で施行した結果、R値は各部位の形態成熟度とほぼ対応したが、かなりの症例で多様性がみられた。

7. 種々のER, PRの組合せをもつた人内膜癌の、核レセプター(Rn)及び細胞質レセプター(Rc)の非結合型(U), 結合型(O)を測定して、R動態を分析した結果、

1) ER+, PR+型人内膜癌では、ER及びPRの動態が円滑に作動して、ホルモン反応性が維持されているものと考えられた。この際、結合型Rc(O)の存在がみいだされたことは注目すべきで、R動態分析上重要であろう。

2) ER+, PR-型, ER-, PR+型内膜癌のR動態の障害・促進部位をモデルで示した。

3) ER-, PR- 型は Rc 欠損症で, ホルモン反応性を真に欠除すると考えられた。

8. 同一の精製核への, 種々の細胞質 ER あるいは PR の結合を検討した結果,

1) 低分化型内膜癌由来の細胞核も細胞質 R (Rc) を結合する能力を有し, 且つ Rc 依存性であった。分化型由来核でも同様であった。

9. 同様な実験デザインで, クロマチン結合を検討した結果,

1) 低分化型・分化型腺癌いずれのクロマチンも Rc と結合し, 且つ Rc 依存性であった。

2) 癌細胞 Rc のクロマチン結合値は大きく, 異常増殖性との関連で極めて興味深い。

10. 人内膜癌プロゲステロン (P) 療法の作用機序を解明する目的で R 分析をした結果,

1) P は人内膜癌 ERc 並びに ERn を著減せしめた。P は標的癌細胞の ER 合成を恐らく抑制し, エストロゲン効果の癌細胞内での局所的消却効果をもつと解された。

2) P のエストロゲン効果消却作用を組込んだ人内膜癌における P 作用の機構について考察し, モデルとしてまとめた。

3) エストロゲン (E) の pulse priming 時の内膜癌 R 動態を分析した結果, P 療法上 E priming は理論的に合理的と考えられた。

4) P 以外にホルモン療法としてアンドロゲン並びに抗ホルモン剤療法の作用様式と応用の可能性を R の面から考察した。

謝 辞

本研究発表の機会を与えられた九嶋前会長, 滝会長, 会員各位並びに座長須川教授に謝意を表し, 御指導・御鞭撻・御援助を頂いた帝京大総長沖永教授, 荒井教授並びに小林隆東大名誉教授, 坂元東大教授に深謝する。研究材料蒐集に特別の御配慮と御協力を頂いた癌研増淵副院長, 岡島医局長, 慈恵大蜂屋教授, 寺島助教授, 小池学士, 遠武学士, 国立癌センター笠松部長, 常松博士, 市立青梅病院内田部長, 昭和医大中山教授, 矢内原助教授, 市立富士中央病院多々良部長, 都立大塚病院穂垣医長, 茨城県立中央病院松田部長並びに東大産婦・長野日赤病院桑原博士, 菅生学士, 白水学士, 安水学士, 荻野学士, 安井学士, 多賀学士, 滝沢学士, 田中博士に, また病理組織内検索を頂いた癌研菅野所長, 坂元博士に, 且つ教室各位並びに恩田氏の御協力に厚く感謝する。

本研究の一部は文部省科学研究費助成金によつた。また帝国臓器株式会社の御助力並びに $^3\text{H-R5020}$ 及び $^3\text{H-1881}$ を提供された阪大癌研松本教授並びに Dr. J.P. Raynaud, Roussel-Uclaf, Romainville, France に対しても感謝する。