

## 綜 説

## 子宮内膜および子宮内膜癌の増殖制御と性ステロイドホルモン

塩沢丹里\* 小西郁生  
信州大学医学部産科婦人科学教室

**Steroid Hormone-Dependent Growth Mechanism of Normal Human  
Endometrium and Endometrial Carcinoma**

Tanri SHIOZAWA and Ikuo KONISHI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Shinshu University School of Medicine*

**Key words:** endometrium, endometrial carcinoma, sex steroid hormone, cell cycle, mismatch repair  
子宮内膜, 子宮内膜癌, 性ステロイドホルモン, 細胞周期, ミスマッチ修復

## はじめに

子宮内膜は月経周期に伴って周期的に増殖と剥脱を反復する組織である。月経終了直後では内膜の厚さは約1 mmしかないが排卵直前には約6 mmにまで肥厚する。人体内にこれだけ速い増殖を呈する正常組織はなく、またこの増殖はほとんどの固形癌細胞の増殖より早い。一方、排卵後は速やかに増殖が停止するとともに、着床に必要な分泌能を獲得する。この変化は排卵後早くも3日目には腺細胞の核下空胞として観察され、さらに排卵5日後には腺細胞は分泌期像に変化する。排卵の前後約1週間で起きるこの激しい形態的・機能的変化もまた人体の他組織ではみられないユニークな現象である。子宮内膜のこれらのダイナミックな変化はエストロゲンおよびプロゲステロンによって厳密に制御されていると考えられている。

この子宮内膜腺上皮から発生する子宮内膜癌（子宮体癌）は、婦人科領域で我が国では子宮頸癌に次いで頻度の高い悪性腫瘍である<sup>1)</sup>。子宮頸癌の発生率がほぼ横ばいであるのに対し、内膜癌は近年著明な増加を呈し、子宮頸癌患者数に並びつつある<sup>2)</sup>。このため、子宮内膜癌の特性や発癌機構を解明することは非常に重要なテーマとなっている。子宮内膜癌の腫瘍学的な特徴でもっとも重要な点は性ステロイド依存性腫瘍であることで、増殖や発癌にエストロゲン、プロゲステロンなどが深く関与する。言い換えれば、ステロイド

ホルモンによって綿密に調節されている正常内膜の周期的なバイオロジーがホルモン異常によってなんらかの破綻を来し、正常サイクルから逸脱していくことが癌化と深く関わっていると予想される。本稿では、まず正常子宮内膜と内膜癌の性ステロイドホルモンによる増殖と分化の機序について述べ、ついで子宮内膜の癌化と性ステロイドホルモンと関係を当教室のデータを中心として記載する。

**I 正常子宮内膜および内膜癌における  
性ステロイド受容体の発現**

正常子宮内膜は腺上皮とそれを取り巻く間質細胞から構成される。腺上皮と間質細胞の相互作用は子宮内膜の機能を考慮する上で非常に重要な問題であるが、本稿では正常内膜と癌との関わりという観点から特に内膜癌の発生母地となる腺上皮についてのみ記載する。

正常子宮内膜の腺上皮は月経周期前半の増殖期にはエストロゲン(E)の作用で増殖し、排卵後はEとプロゲステロン(P)の作用で増殖を停止するとともに、着床に必要な分泌性変化という分化を呈する。妊娠が成立すると妊娠黄体および胎盤から産生されるPの作用で子宮内膜は妊娠性の変化を呈しながら存続し、間質とともに脱落膜へと変化していくが、妊娠が成立しない時は黄体からのPは通常2週間で著明に減少し、それに伴って子宮内膜の剥脱が起き、月経現象が起こる。子宮内膜のこうしたダイナミックな変化は血中EとPの厳密な制御下に起きると考えられているが、このホルモンの作用を発現する上でまず重要なのがエストロ

\* 別刷請求先: 塩沢 丹里 〒390-8621  
松本市旭3-1-1 信州大学医学部産科婦人科

ゲン受容体 (ER) とプロゲステロン受容体 (PR) である。ER には近年新しいサブユニットが発見され、従来からのものが  $\alpha$ 、新規のものが  $\beta$  と命名された<sup>3)</sup>。正常子宮内膜腺上皮に発現する ER はほとんどが ER $\alpha$  で、機能的には主に内膜腺上皮の増殖に関与していると考えられている<sup>4)5)</sup>。一方 ER $\beta$  は  $\alpha$  と染色体部位も異なり、またその機能も明らかになっていない<sup>3)</sup>。ER $\alpha$  は増殖期ではほぼ全ての細胞に発現されるが、排卵後直後の分泌期初期には著明に減少し、分泌期中期にはほぼ陰性化するという周期的変化を呈する<sup>4)5)</sup>。一方、PR も 2 つのサブユニットからなる。従来からのものは PR-B と命名され、新しく発見されたものを PR-A とよぶ。PR-A と PR-B の違いは両者の転写開始点が異なることによる。すなわち、PR-A も PR-B も C 端側の構造は同じであるが、PR-B のほうがより上流から転写が開始されるため、PR-A と比較して分子量がその分だけ大きくなっている<sup>6)</sup>。正常子宮内膜の腺上皮においては、PR は A も B も概ね同じ量は発現されており、PR-B は子宮内膜の増殖抑制と分泌能の獲得に関与していると考えられるが<sup>7)</sup>、PR-A の機能も現在明らかになっていない。PR は増殖期では ER と同様、ほぼ全ての細胞に陽性であり、分泌期でも ER と同様 PR の発現は減弱するが、減衰の程度は ER よりややマイルドであり、分泌期の初期にはまだ多くの PR の発現が残り、分泌期中期では著明に減少し、分泌期後期でほぼ陰性化する<sup>7)8)</sup>。従って、正常子宮内膜においてはこのような ER および PR の周期的変動、すなわち、ER/PR の P による down regulation がもっとも重要な特徴のひとつである。この ER/PR の発現量の調整は主に転写レベルで制御されていると考えられている。ER の P による down regulation のメカニズムはほとんど不明である。一方、PR 遺伝子のステロイドによる転写調節領域は遺伝子上流のいわゆる promoter には存在せず、PR 遺伝子の構造遺伝子領域 +698~+723 に存在する estrogen responsive element (ERE) が重要であると報告されている<sup>9)</sup>。E によって ER はこの領域の ERE に結合し PR の転写を促進する。一方、P によって PR の発現は低下する。この時もやはりこの ERE が関与しているが、PR は ERE には直接結合できないため、何らかの PR によって誘導される二次的な因子が ERE を介した PR の転写抑制に関与している可能性が示唆されている<sup>9)</sup>。

ER/PR を発現する子宮内膜から発生する子宮内膜

癌もこれらの受容体を発現し、その増殖が E や P の制御を受ける。ER/PR は正常内膜に発現される一種の分化形質であることから子宮内膜癌における発現はいわゆる高分化型 (子宮内膜類内膜腺癌 grade 1) に高く、組織分化度が grade 2 あるいは 3 と低下するに従って、あるいは非類内膜腺癌 (漿液性腺癌、明細胞腺癌) になると発現は低下する<sup>10)11)</sup>。子宮内膜癌において ER $\alpha$  の発現率は grade 1, 2, 3 の腺癌で各々 50-60%, 30-40%, 5-15% で漿液性腺癌および明細胞腺癌はほぼ陰性である<sup>10)11)</sup>。内膜癌における ER $\alpha$  の意義は E による増殖に関与すると考えられている。ER $\beta$  の発現は全体で約 30% であるが、組織分化度をはじめとする臨床病理学的因子との明らかな相関はなく、その発現の意義は不明である<sup>12)</sup>。PR の発現に関して、PR-A と PR-B を厳密に区別した報告は乏しい。Total PR としての発現は ER $\alpha$  とよく類似しており、grade 1, 2, 3 で各々約 55-70%, 35-45%, 5-15% である<sup>10)11)</sup>。

子宮内膜癌の組織分化度が低下するにつれて ER/PR の発現が低下する現象の分子機序は両遺伝子の CpG island のメチル化によると考えられている。我々は ER 陽性および陰性の子宮内膜癌細胞株、および免疫染色上 ER 陽性部位と陰性部位の組織切片から採取した DNA を用い、ER $\alpha$  遺伝子の exon 1 に存在する CpG island のメチル化の有無を methylation sensitive な制限酵素によって検討したところ、ER の発現消失とこの部位のメチル化がよく相関することを見出した<sup>13)</sup>。しかしながら、ER 遺伝子の被メチル化部位はさらに上流にも報告されており<sup>14)15)</sup>、ER の発現とメチル化の関係に関しては、メチル化を受ける部位が重要なのか、あるいは部位よりもいわゆる methylation density のほうが重要なのかについてはまだ明らかではない。また PR-B の発現低下にも CpG island のメチル化が関与しているという報告がある<sup>16)</sup>。

## II 正常子宮内膜と内膜癌の増殖制御機序 —特に細胞周期調節因子の観点から

子宮内膜は腺上皮とそれを取り囲む間質細胞から構成される組織である。子宮内膜は周期的に増殖し、妊娠が成立しないときは剥脱するというサイクルを反復するが、これは性ステロイドホルモンによって厳密に調節されている。エストロゲン (E) は腺上皮細胞と間質細胞の増殖を刺激し、プロゲステロン (P) は腺上皮細胞の増殖を抑制して着床に必要な分泌能獲得を誘導

し、間質細胞には脱落膜化を起こす。我々はまず正常内膜腺上皮のEによる増殖機序とPによる増殖抑制機序に関して検討を行った。

従来までの性ステロイドホルモンによる子宮内膜の増殖と分化の機序は、性ステロイドホルモンによる性ステロイドホルモン代謝酵素活性の変化<sup>17)</sup>、性ステロイドホルモンによるホルモン受容体の発現の増強や減弱<sup>18)</sup>、あるいは性ステロイドホルモンによって誘導される各種の増殖因子やその受容体発現量の変化<sup>19)</sup>といった研究が主体で、実際にどのような細胞内分子がどのような機序で細胞増殖を引き起こしているかについてはほとんど何も知られていなかった。この増殖機序の研究を始めるにあたり、我々は細胞周期調節因子に注目した。

細胞周期はG0期(静止期), G1期(間期), S期(DNA合成期), G2期(間期), M期(分裂期)の5つphaseからなる(図1)。通常体細胞はG0期で停止しているが、細胞外から増殖シグナルが入るとG1期に入り、さらにG1→S→G2→M期と細胞周期が進行して1回の有糸分裂が終了する。この細胞周期の進行を調節する中心的分子が細胞周期調節因子である。細胞周期調節因子には細胞周期の進行を促進するサイクリン, サイクリン依存性リン酸化酵素(cyclin-dependent kinase, cdk)と細胞周期促進を抑制するp53やRb(retinoplastoma gene product)などの癌抑制遺伝子産物およびp16, p27といったcdk inhibitorから構成される。従って細胞の増殖機序を解明するためにはこれらの因子の発現や相互作用を研究することが極めて重要である<sup>20)-22)</sup>。細胞周期調節はそれ自体大きな研究分野であり、詳細は成書をご参照頂きたいが、大き

な流れとして、

- 1 各種のサイクリンが細胞周期特異的に発現される。
- 2 それらのサイクリンが特定のパートナーであるcdkと複合体を形成してリン酸化活性を獲得する。
- 3 細胞周期の前半ではサイクリン(特にD1とE)/cdkの複合体が器質であるRbをリン酸化するとRbに結合していた転写因子E2FがRbから乖離してDNA合成酵素を活性化し、S期に入る。
- 4 また細胞周期の後半ではサイクリン(特にAとB1)/cdk複合体は核膜などをリン酸化して分解し、細胞分裂を起こしやすくすると考えられている(図1)。細胞周期の前半, すなわちG1期からS期に入る過程の分子機序はかなり解明が進んだが、後半の有糸分裂の機序はその過程の複雑さのためにいまだ多くの未知な点を残しており、現在生物学界で最もホットな領域のひとつとなっている。

我々はまず正常子宮内膜におけるこれらの因子の発現を免疫染色によって観察した。正常子宮内膜腺上皮においては、各種サイクリン(D1, E, A, B1)やcdk(4, 2, cdc2)の発現が主に観察された。さらに連続切片を用いて相互の関係を検討すると、サイクリンD1陽性細胞はcdk4, サイクリンEはcdk2, サイクリンB1はcdc2などととも陽性に染色されることが判明し、加えて、これらのサイクリン/cdk陽性細胞は増殖マーカーであるKi-67も陽性になることが判明した<sup>8)</sup>。これらの所見から、子宮内膜腺上皮の増殖にはサイクリンをはじめとした細胞周期調節因子が関与している可能性が示された。また子宮内膜癌では各種のサイクリンやcdkの過剰発現が観察された。これらのなかで、サイクリンD1, サイクリンA, p53

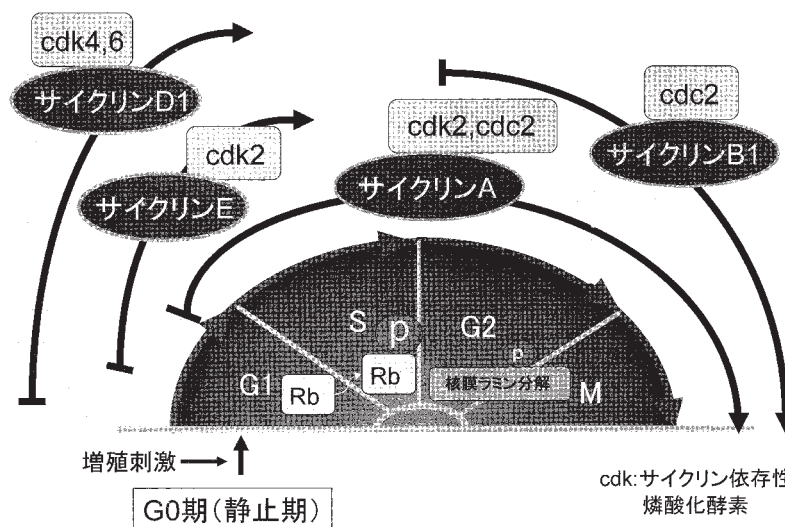


図1 細胞周期進行促進因子

などは細胞学的悪性度が高いとされている組織 grade の高い症例により高頻度に観察され、特にサイクリン A 高発現症例は進行期とならんで独立した予後不良因子であった<sup>10)11)23)24)</sup>。

次に子宮内膜腺上皮細胞のエストロゲン依存性増殖の分子機序を検討するために、我々は蛋白分解酵素とフィルターを用いた子宮内膜腺上皮の分離培養法を確立した<sup>25)</sup>。この細胞は ER, PR を有し、E によって増殖し、P によって増殖が抑制されることが確認された。この細胞にエストラジオール (E2) を添加し、その後の各種細胞周期調節因子の発現を検討したところ、E2 添加4時間後よりサイクリン D1 の発現がみられ、引き続いてサイクリン E, A, および B1 の発現が観察された。サイクリンが D1, E, A, B1 の順序で発現される現象は多くの細胞で共通に観察されるモチーフであったため、子宮内膜腺上皮のエストロゲンによる増殖機序の特異性を解明するためには、エストロゲンによるサイクリン D1 の発現の分子機序を検討することが極めて重要であると考えられた。これを検討するために、サイクリン D1 遺伝子のプロモーター領域を検討したところ、サイクリン D1 プロモーター領域には ER が結合する ERE 配列がないこと、また上流約900bp の領域に c-Jun や c-Fos といったいわゆる初期転写因子群である AP-1 が結合する AP-1 結合領域が存在することが判明した。ここで、この AP-1 は他の細胞種でエストロゲンによって誘導されることが報告されていたため、我々はエストロゲンのサイクリン D1 の誘導は AP-1 を介しているのではないかという仮説をたてた。これを検証するために前述の培養子宮内膜腺上皮細胞に E2 を添加して AP-1 の発現を観察したところ、E2 添加2時間後に特に c-Jun の発現が観察された。これはサイクリン D1 の発現に先立つものであった。このため我々はエストロゲンによるサイクリン D1 の転写亢進における AP-1 結合部位と c-Jun の関与をさらに検討するため種々の長さのサイクリン D1 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを施行したところ、エストロゲン依存性の転写活性は AP-1 結合部位を有するレポーターにのみ観察された。さらにエストロゲン非存在下で c-Jun 発現ベクターを共導入してルシフェラーゼアッセイを施行したところ、やはり AP-1 結合部位を有するレポーターにのみサイクリン D1 の転写活性の亢進が観察された。さらに、このサイクリン D1 プロモーター上に存在する AP-1 結合配列と c-Jun 蛋白の

直接的な結合の有無をゲルシフトアッセイによって検討したところ、抗 c-Jun 抗体の添加による super shift を呈するバンドを認め、両者の特異的な結合が証明された。これらの結果から、培養子宮内膜腺上皮でのエストロゲン依存性増殖には c-Jun と AP-1 を介したサイクリン D1 の発現が中心的な役割を果たしていることが判明した<sup>26)</sup>(図2)。

次に我々は子宮内膜癌のエストロゲン依存性増殖の機序について研究した。ER 陽性の子宮内膜癌細胞株 Ishikawa 細胞にエストロゲンを添加し、各サイクリンの発現を検討すると、正常内膜と同様サイクリン D1 の発現の亢進が観察されたものの、サイクリン D1 はすでにエストロゲン添加以前から発現されていることなど、正常内膜とは異なった発現パターンであった。また、前述と同様のサイクリン D1 のプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを施行したところ、正常内膜とは異なり、AP-1 結合部位の関与は明らかではなかった。そこで我々は Ishikawa 細胞では培養正常内膜腺上皮細胞とは異なった増殖機序があると考え、細胞外の増殖刺激を伝達する MAP kinase 経路の関与に注目した。Ishikawa 細胞に E2 を添加し、MAPK 経路の活性化を誌示す Erk のリン酸化を調べたところ、E2 添加6時間後より Erk のリン酸化が観察された。一般に MAPK 経路の活性化には細胞外の増殖因子が必要であるといわれていることから、我々は次に E2 によって発現が誘導される増殖因子とスクリーニングしたところ、Insulin-like growth factor (IGF)-1 が E2 添加によって著明に発現が亢進していることが明

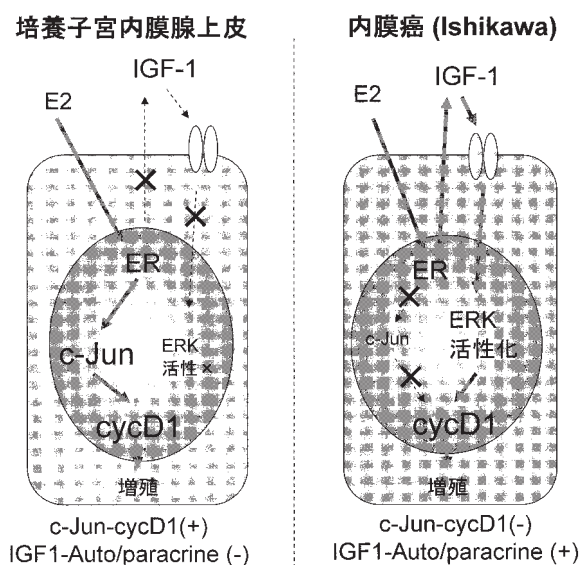


図2 正常内膜腺上皮と内膜癌細胞の E2 依存性増殖機序の違い

らかになった。このため、Ishikawa 細胞に IGF-1 を添加したところ Erk の活性化と増殖能の亢進が観察され、また E2 添加後の培養上清中の IGF-1 の分泌が確認された。さらにこの系にエストロゲン受容体拮抗剤、抗 IGF-1 受容体抗体、および MAPK inhibitor を添加したところ、E2 添加による Erk の活性化および増殖能の亢進が抑制された。これらの結果から、Ishikawa 細胞の E2 依存性増殖においては、E2 によって誘導される IGF-1 およびその受容体を介した autocrine/paracrine 機構が重要な関与をしていることが見出された（投稿準備中）（図2）。

### III 正常内膜上皮および子宮内膜癌の プロゲステロンによる増殖抑制機序

正常子宮内膜および一部の子宮内膜癌細胞は PR を有し、P によって増殖が抑制されることが知られている。この機序を解明するために、まず正常子宮内膜上皮の特に分泌期における各種細胞周期調節因子の発現を検討したところ、各サイクリンの発現低下と特にサイクリン E/cdk2 複合体の inhibitor である p27 の発現が著明に増加したことから<sup>27)</sup>、P による増殖抑制における p27 の関与について検討した。まず前述の培養子宮内膜上皮細胞にプロゲステロン (P4)、および PR 陽性の Ishikawa 細胞に MPA を添加したところ、P4、MPA の濃度依存性に各細胞の増殖は抑制され、p27 の発現が濃度依存性に増加した。次に、この p27 発現ベクターを両細胞に導入したところ、両者に増殖抑制が確認された。このことから、プロゲステロンによる子宮内膜上皮細胞および Ishikawa 細胞の増殖抑制には p27 が関与していることが明らかとなった。次に p27 蛋白の発現機序を検討する目的で上述培養子宮内膜上皮細胞および Ishikawa 細胞に P4 および MPA を添加し、p27/mRNA の発現を検討したところ、興味深いことに、両細胞ともプロゲステロンの添加によって p27 蛋白の発現は増加したものの、p27/mRNA の発現には大きな変化が観察されなかった。これは p27 の蛋白発現量が、産生量によってではなく、いわゆる post translational mechanism として分解速度によって調節されている可能性を示している。これを確かめるために、正常子宮内膜上皮細胞および Ishikawa 細胞に蛋白合成阻害剤を添加し、その後の p27 の蛋白量をプロゲステロンの添加の有無で比較し

たところ、両細胞ともプロゲステロン添加時の方が p27 の蛋白量が多く遺残した。このことから、プロゲステロンは p27 の産生を亢進させるのではなく、p27 の分解を抑制することによって p27 の蛋白量を増加させていることが判明した<sup>27)</sup>。一方、近年、蛋白の分解系に関する研究により、蛋白の分解はまず標的蛋白にユビキチンリガーゼがユビキチンという分解の目印となる小型の蛋白を多数結合させ、そのポリユビキチン化された分子をプロテオソームが加水分解することによって行われることが明らかになってきた。そのなかで、近年、p27 の分解を司る因子として、Skp2、Cullin などからなるユビキチンリガーゼ複合体である SCF 複合体が見出された<sup>28)</sup>。我々はこの SCF 複合体に注目し、正常子宮内膜や内膜癌における Skp2 や Cullin の発現を検討したところ、興味深いことに、この SCF 複体のなかでもっとも重要でありユビキチンリガーゼである Skp2 の発現と p27 との発現の間に逆相関があることを見出した。この所見は実際の組織のなかで Skp2 からなる SCF 複合体が実際に p27 の分解に関与している可能性を示すものであると考えられた。これを検討するために、Ishikawa 細胞に MPA を添加し、添加後の Skp2 と p27 の発現を観察すると、MPA の濃度依存性に p27 の発現が増加したのに対し、Skp2 の発現は濃度依存性に低下し、プロゲステロンによる増殖抑制は蛋白分解因子である Skp2 の低下を介した p27 蛋白の蓄積によるためであることが判明した（投稿中）（図3）。

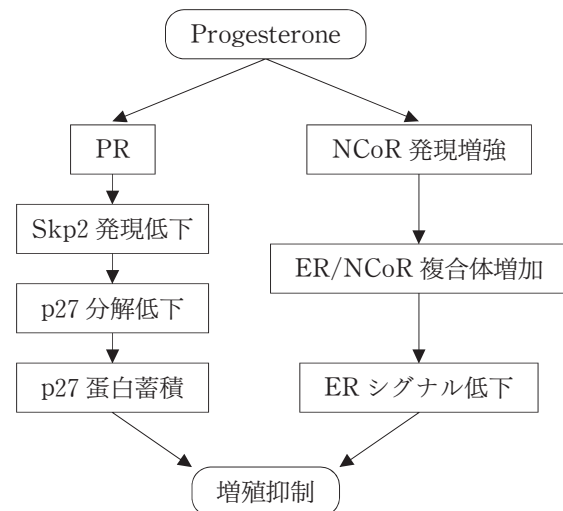


図3 プロゲステロンによる内膜増殖抑制機序モデル

IV 正常子宮内膜および内膜癌における性ステロイド受容体共役因子 (steroid receptor cofactor) の発現と機能

近年、性ステロイドホルモンがその受容体と結合して標的遺伝子の転写を調節する過程において、性ステロイド受容体共役因子 (steroid receptor cofactor) と呼ばれる因子群が同定された<sup>29)30)</sup>。この cofactor は一般に ER や PR などの受容体と標的遺伝子上流の転写調節領域の両者にちょうど橋渡しのように結合し、ホルモンの刺激を伝達したり、阻害したりすると考えられている。この cofactor はさらに2つのグループからなり、ひとつは標的遺伝子の転写を促進する coactivator で、もうひとつは転写を抑制する corepressor である。我々は正常子宮内膜腺上皮の増殖におけるこれら cofactor の発現を検討した。検討したのは coactivator として、steroid receptor coactivator-1 (SRC-1), p300/CBP (p300/cyclic AMP binding protein), また corepressor として NCoR (nuclear receptor corepressor) と SMRT (silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone) である。まず coactivator である SRC-1 と p300/CBP は増殖期の正常内膜腺上皮では、びまん性に強い染色を認め、分泌期ではその染色性は低下するという周期的発現を示した。この発現パターンは腺上皮における ER/PR の発現とよく相関していた。また corepressor では NCoR のみが弱い限局性の染色性を呈するにとどまった。このため、

特に coactivator と ER/PR の相関関係を検討したところ、増殖期の正常内膜腺上皮では、SRC-1 と p300/CBP は ER と複合体を形成しており、これが腺上皮のエストロゲン依存性増殖に関与している可能性が示唆された<sup>31)</sup>(図4)。一方、子宮内膜癌における ER/PR, cofactor との関係をもてみると、まず正常子宮内膜では増殖期の腺上皮ではほぼすべての細胞が ER/PR を発現している。子宮内膜癌では正常内膜と比較すると一般に組織分化度が低下するに従って ER/PR の発現は低下し、高分化型の子宮内膜癌では ER, PR の発現は半数以上の症例に認められるが、低分化型の癌では約10%程度の陽性率である。一方、子宮内膜癌における cofactor の発現であるが、coactivator である SRC-1 と p300/CBP の発現は前述したとおり、増殖期の腺細胞には高率に陽性であるが、子宮内膜癌における発現は ER/PR の発現と同様に組織分化度が低下するほど低下する傾向を示した。一方 corepressor の発現はほとんど陰性であった。しかしながら、子宮内膜癌では ER/PR の発現と SRC-1, p300/CBP の発現の局在との間に有意な相関関係は観察されなかった<sup>32)</sup>(図4)。この所見は正常子宮内膜では ER/PR および SRC-1, p300/CBP とも陽性でしかも ER が SRC-1, p300/CBP と複合体を形成し、ステロイドホルモンの作用をより効率的に伝達するシステムを有するが、内膜癌ではこの ER/PR と coactivator との協調作用が起きない可能性を示している。子宮内膜癌においては、ER や PR を発現しながら、臨床的にエ

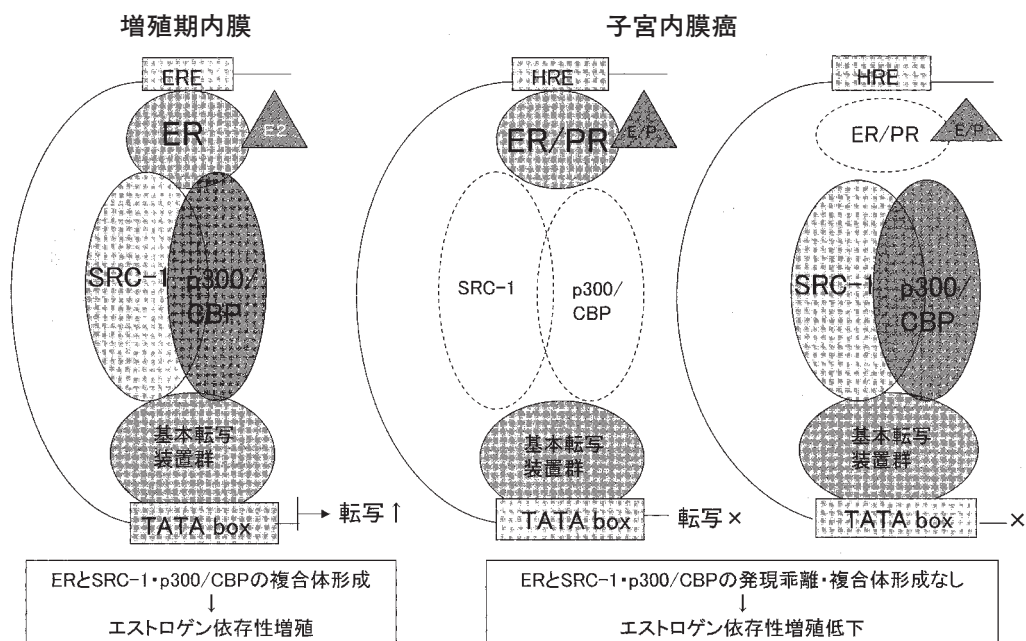


図4 増殖期内膜と内膜癌における cofactor の発現と作用

ストロゲンによる増殖作用やプロゲステロンによる増殖抑制作用があまり観察されない症例がみられるが、このER/PRとcofactorの発現の乖離がその一因となっている可能性が示唆される(図4)。

一方、子宮内膜増殖症に対するMPAなどのプロゲステロン療法における増殖抑制機序へのcofactorの関与について、前述と同じく、MPA治療前後のER/PRと各種cofactorの発現を検討したところ、ER/PR、coactivatorには明らかな変化は観察されなかったが、興味深いことに、corepressorのNCoRの発現のみがMPA治療後に著明に増加していた。このNCoRのプロゲステロンによる増殖抑制機序への関与をさらに検討するため、PR陽性の子宮内膜癌細胞株Ishikawaと乳癌細胞株T47DにMPAを添加したところ、両細胞ともMPA添加による濃度依存性の増殖抑制を認めたが、T47DではMPAの濃度依存性にNCoRの発現の増強を認めた。さらにT47Dでは、MPAの添加によってNCoRとERの結合が観察された。この結果から、NCoRはプロゲステロン存在下でERと結合し、エストロゲンからの増殖シグナルを遮断することで増殖抑制を引き起こしている可能性が示唆された。従って子宮内膜増殖症では前述のSkp2-p27を介した経路とこのNCoRを介した経路の2つのメカニズムによってプロゲステロンによる増殖抑制が起きている可能性が示唆された(図3,5)。

### V 子宮内膜癌の発生におけるエストロゲンの役割

一般に細胞分裂の盛んな細胞あるいは組織の方が癌化が起りやすいと考えられている。これはヒトの消化管の上皮をはじめ、多くの組織で観察されている。これは細胞分裂に伴うDNAの複製の際にDNA mismatchをはじめとしたDNAエラーが起きやすいためと考えられている<sup>33)</sup>。代表的なエストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌の発生母地である正常内膜腺上皮細胞は、前述したようにエストロゲンで活発に増殖することから、高エストロゲン状態、すなわち、正常月経周期を有する生理的な高エストロゲン状態であるエストラジオール(E2)が約100~300pg/mlの方が癌化しやすいと考えられているが、実際にはほとんどの子宮内膜癌は血中エストロゲンが低下する閉経後(E2:100pg/ml以下)に発生する。また、30~40代といった比較的若年の女性にも稀に子宮内膜癌が発生するが、その場合でも血中エストロゲン値は低値で100pg/mlであることがほとんどである。また、子宮内膜癌の大きなリスク因子といわれるエストロゲン補充療法を行っている場合の血中E2値も低値である。このように、子宮内膜癌の発生におけるエストロゲンの意義はまだよく解明されておらず、子宮内膜癌発生のパラドックスであるといえる。

一方、近年、子宮内膜癌の発癌においていくつかの

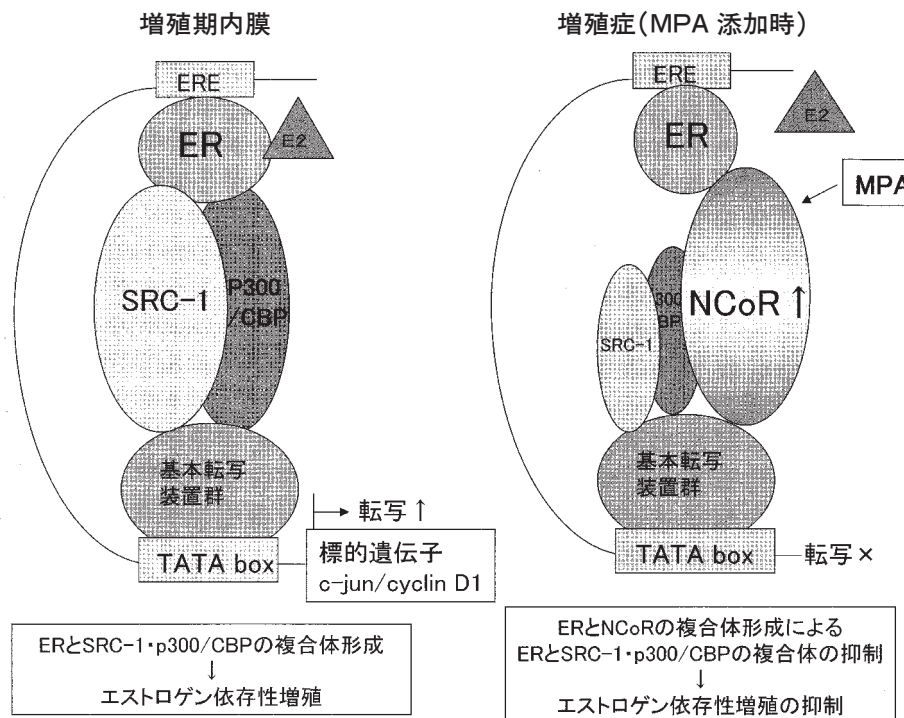


図5 増殖期内膜と増殖症におけるcofactorの発現と作用

遺伝子異常の関与が明らかになってきた。これらのなかで、特に癌化の初期に関与する遺伝子変異として PTEN, K-Ras,  $\beta$ -catenine などの mutation が高頻度に発生していることが報告された<sup>34)35)</sup>。また近年、我々は子宮内膜癌における Ras のシグナル伝達系で Ras の下流に位置する B-Raf の mutation を報告した<sup>36)</sup>。これらの mutation は内膜の癌化の特に初期過程に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、これらの遺伝子異常とエストロゲンの関係を見ても、エストロゲンのなかでも内膜に最も直接的に作用するといわれる E2 は直接 toxic に DNA にエラーを引き起こすことはないといわれている。一方、toxic なエストロゲンとして E2 の代謝産物であるカテコールエストロゲンがあげられるが、このカテコールエストロゲンは産生母体の E2 の濃度が低い際には一般に低値であるといわれている<sup>37)</sup>。従って、エストロゲン自体が直接 DNA エラーを作る可能性はあまり高くないと考えられた。ここでもう一度、内膜癌における遺伝子変異に注目すると、興味深いことに PTEN などの mutation は microsatellite instability に表される DNA mismatch repair (MMR) の異常と高い相関があることが判明した<sup>34)35)</sup>。この MMR は主要な機能蛋白である hMLH1 と hMSH2 の相互作用によって行われるが<sup>38)</sup>、PTEN などの mutation のある症例は hMLH1/hMSH2 などの発現が低下していること、さらに正常内膜にもこれら修復機能蛋白の発現低下が存在することが見出された<sup>39)</sup>。従って、子宮内膜癌の癌化の初期にはこの MMR 機能が低下することが最も重要な因子である可能性が考えられた。またエストロゲンは機能的には転写調節因子であることから、エストロゲンが MMR 関連蛋白の発現調節をしている可能性は充分理にかなうものであると考えた。これらの背景から、MMR 機能とエストロゲンの関係について検討した。

まずはじめに、正常子宮内膜腺上皮における hMLH1/hMSH2 の発現を免疫染色で観察したところ、両者ともエストロゲン優位な環境である増殖期に染色性が観察され、分泌期には染色性が減弱した。次に血中の E2 値およびエストロン (E1) 値の判明している症例の hMLH1 と hMSH2 の発現と血中 E1, E2 値の相関を検討したところ、両分子とも、E1, E2 の値が高いほど有意に発現が亢進した。次に MMR の発現とエストロゲンの関係を *in vitro* で観察するために、培養子宮内膜腺上皮細胞と Ishikawa 細胞に E2 を添

加して MMR 因子の発現を観察したところ、RNA, 蛋白とも E2 添加によって発現が増加した。では実際にこれらの MMR 蛋白を発現した細胞が mismatch repair を起こすか否かを mp13 phage に人工的に DNA mismatch を導入した heteroduplex を用いて *in vitro* MMR アッセイ<sup>40)</sup>を施行した。我々が使用した heteroduplex は 1 塩基対のみ mismatch を導入した G-T mismatch と連続した 2 塩基対を導入した 2 base-insertion deletion loop (2b-IDL) といわれるもので、これに、培養子宮内膜腺上皮および Ishikawa 細胞に種々の濃度で E2 を添加して培養し、細胞から抽出精製した蛋白を反応させて MMR 活性を測定した。この 2 つの heteroduplex とも、また両細胞とも、E2 濃度が高いほど MMR 活性は増加した。加えて、この MMR 反応は ER のアンタゴニストである ICI182.780 添加により有意に低下した。このことから E2 は正常内膜上皮、および Ishikawa 細胞の MMR 活性を実際に高めることが判明した (投稿中)。この所見から、E2 の濃度の高い際には活発に MMR を行い、内膜細胞の癌化を抑制している可能性が示唆され、これは実際の患者で血中エストロゲン濃度の高い女性には内膜癌患者がほとんどいないこととよく相関していると考えられた。これは従来までの予想に反し、E2 が癌に対する一種の防御因子として機能していることを示している。言い換えれば、プロゲステロンに拮抗されずにエストロゲンのみに長期間暴露される、いわゆる un-opposed estrogen (low and chronic estrogen) 状態の発癌における危険性を示唆していると考えられる。

## ま と め

子宮内膜は性ステロイドホルモンの作用のもと、極めてダイナミックな変化を示す組織であるが、その分子機序はあまり解明されていないといえなかった。また、子宮内膜癌も典型的なエストロゲン依存性腫瘍でありながらそのエストロゲン依存性の増殖や発生の機序も知られていなかった。今後はこれらの知見を基礎に、癌特異的な増殖経路をさらに同定し、分子標的療法の可能性を検討したいと考えている。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご指導を賜りました信州大学医学部人体構造学教室中山耕造先生に深謝申し上げます。



## 文 献

- 1) 婦人科腫瘍委員会報告：2003年子宮体癌患者年報. 日産婦学会誌 57：1728-1743, 2005
- 2) 上房敏子, 金井督之, 蔵本博行：子宮体癌の疫学. 日本臨牀 62：243-247, 2004
- 3) Kuiper GG, Gustafsson JA：The novel estrogen receptor-beta subtype：potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. FEBS Lett 410：87-90, 1997
- 4) Matsuzaki S, Fukaya T, Suzuki T, Murakami T, Sasano H, Yajima A：Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. Mol Hum Reprod 5：559-564, 1999
- 5) Press MF, Nousek-Goebel N, King WJ, Herbst AL, Greene GL：Immunohistochemical assessment of estrogen receptor distribution in the human endometrium throughout the menstrual cycle. Lab Invest 51：495-503, 1984
- 6) Graham JD, Clarke CL：Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. Breast Cancer Res 4：187-190, 2002
- 7) Arnett-Mansfield RL, DeFazio A, Mote PA, Clarke CL：Subnuclear distribution of progesterone receptors A and B in normal and malignant endometrium. J Clin Endocrinol Metab 89：1429-1442, 2004
- 8) Shiozawa T, Li SF, Nakayama K, Nikaido T, Fujii S：Relationship between the expression of cyclins/cyclin-dependent kinases and sex-steroid receptors/Ki67 in normal human endometrial glands and stroma during the menstrual cycle. Mol Hum Reprod 2：745-752, 1996
- 9) Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A, Milgrom E：Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. EMBO J 10：1875-1883, 1991
- 10) Li SF, Shiozawa T, Nakayama K, Nikaido T, Fujii S：Stepwise abnormality of sex steroid hormone receptors, tumor suppressor gene products (p53 and Rb), and cyclin E in uterine endometrioid carcinoma. Cancer 77：321-329, 1996
- 11) Shih HC, Shiozawa T, Kato K, Imai T, Miyamoto T, Uchikawa J, Nikaido T, Konishi I：Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma：positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. Hum Pathol 34：471-478, 2003
- 12) Utsunomiya H, Suzuki T, Harada N, Ito K, Matsuzaki S, Konno R, Sato S, Yajima A, Sasano H：Analysis of estrogen receptor alpha and beta in endometrial carcinomas：correlation with ER beta and clinicopathologic findings in 45 cases. Int J Gynecol Pathol 19：335-341, 2000
- 13) Shiozawa T, Itoh K, Horiuchi A, Konishi I, Fujii S, Nikaido T：Down-regulation of estrogen receptor by the methylation of the estrogen receptor gene in endometrial carcinoma. Anticancer Res 22：139-143, 2002
- 14) Navari JR, Roland PY, Keh P, Salvesen HB, Akslen LA, Iversen OE, Das S, Kothari R, Howey S, Phillips B：Loss of estrogen receptor (ER) expression in endometrial tumors is not associated with de novo methylation of the 5' end of the ER gene. Clin Cancer Res 6：4026-4032, 2000
- 15) Sasaki M, Kotcherguina L, Dharia A, Fujimoto S, Dahiya R：Cytosine-phosphoguanine methylation of estrogen receptors in endometrial cancer. Cancer Res 61：3262-3266, 2001
- 16) Sasaki M, Dharia A, Oh BR, Tanaka Y, Fujimoto S, Dahiya R：Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. Cancer Res 61：97-102, 2001
- 17) Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KSJr：Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 67：334-340, 1988
- 18) Tseng L, Mazzella J：Cyclic changes of estradiol metabolic enzymes in human endometrium during the menstrual cycle：The endometrium. In：Kimball FA (ed), SP Medical and Scientific Books, pp 211-226, New York, 1980
- 19) Giudice LC：Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium：their potential relevance to reproductive medicine. Fertil Steril 61：1-17, 1994

- 20) Sherr CJ : G1 phase progression : cycling on cue. *Cell* 79 : 551-555, 1994
- 21) Sherr CJ, Roberts JM : Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9 : 1149-1163, 1995
- 22) Nurse P : Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79 : 547-550, 1994
- 23) Shiozawa T, Xin L, Nikaido T, Fujii S : Immunohistochemical detection of cyclin A with reference to p53 expression in endometrial endometrioid carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 16 : 348-353, 1997
- 24) Shiozawa T, Nikaido T, Shimizu M, Zhai Y, Fujii S : Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and p16INK4 in human endometrioid-type endometrial carcinoma. *Cancer* 80 : 2250-2256, 1997
- 25) Shiozawa T, Horiuchi A, Kato K, Obinata M, Konishi I, Fujii S, Nikaido T : Up-regulation of p27Kip1 by progestins is involved in the growth suppression of the normal and malignant human endometrial glandular cells. *Endocrinology* 142 : 4182-4188, 2001
- 26) Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Nakayama K, Nikaido T, Konishi I : Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence. *Oncogene* 23 : 8603-8610, 2004
- 27) Shiozawa T, Nikaido T, Nakayama K, Lu X, Fujii S : Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in growth inhibition of endometrium in the secretory phase and of hyperplastic endometrium treated with progesterone. *Mol Hum Reprod* 4 : 899-905, 1998
- 28) Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H : p27 (Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF (Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* 9 : 661-664, 1999
- 29) Chen JD : Steroid/nuclear receptor coactivators. *Vitam Horm* 58 : 391-448, 2000
- 30) Weston AD, Blumberg B, Underhill TM : Active repression by unliganded retinoid receptors in development : less is sometimes more. *J Cell Biol* 161 : 223-228, 2003
- 31) Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Uchikawa J, Itoh K, Konishi I : Cyclic changes in the expression of steroid receptor coactivators and corepressors in the normal human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 871-878, 2003
- 32) Uchikawa J, Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Kashima H, Oka K, Konishi I : Expression of steroid receptor coactivators and corepressors in human endometrial hyperplasia and carcinoma with relevance to steroid receptors and Ki-67 expression. *Cancer* 98 : 2207-2213, 2003
- 33) Hahn WC, Weinberg RA : Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347 : 1593-1603, 2002
- 34) Matias-Guiu X, Catasus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, Munoz J, Arguelles R, Machin P, Prat J : Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 32 : 569-577, 2001
- 35) Lax SF : Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma : from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 444 : 213-223, 2004
- 36) Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, Konishi I : BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia : correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clin Cancer Res* 11 : 6133-6138, 2005
- 37) Liehr JG : Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol : possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Hum Reprod Update* 7 : 273-281, 2001
- 38) Li GM : DNA mismatch repair and cancer. *Front Biosci* 8 : 997-1017, 2003
- 39) Kanaya T, Kyo S, Maida Y, Yatabe N, Tanaka M, Nakamura M, Inoue M : Frequent hypermethylation of MLH1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers. *Oncogene* 22 : 2352-2360, 2003
- 40) Thomas DC, Umar A, Kunkel TA : Measurement of heteroduplex repair in human cell extracts. *Methods* 7 : 187-197, 1995

(H 17. 12. 22 受稿)