

博士論文

アンドロゲン合成酵素 5 α リダクターゼ 1 を中心と
した類内膜型子宮内膜腺癌におけるアンドロゲン
の作用についての検討

田中 創太

目次

I 要約	1 頁
II 研究背景	4 頁
III 研究目的	7 頁
IV 研究方法	8 頁
V 研究結果	15 頁
VI 考察	20 頁
VII 結論	30 頁
VIII 謝辭	31 頁
IX 文献	32 頁
X 図	39 頁
XI 図説明	45 頁
XII 表	49 頁

I 要約

1 研究目的

子宮内膜癌の大部分はエストロゲン依存性の腫瘍であり、これまでエストロゲンやプロゲステロンに関連した研究は多く行われてきたが、その両者と密接な関係にあるアンドロゲンとの関連を研究した報告はほとんどない。子宮内膜癌細胞株を用いた *in vitro* の実験でエストロゲンシグナルの存在下にジヒドロテストステロン (DHT) が腫瘍増殖を抑制するという報告はあるが、ヒト組織における *in vivo* での検討は報告がない。そこで今回、手術検体を用いて DHT の腫瘍組織局所での生合成について検討した。そしてアンドロゲン生合成に関わる酵素発現の意義を臨床データや予後との相関から検討した。

2 方法

まず 2012 年から 2013 年の間に当院で手術を行った子宮内膜癌 36 症例と正常内膜を持った 5 症例の血清中および組織中のアンドロゲン濃度を、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MSMS 法) で測定した。そしてこれらアンドロゲンの代謝に関与する 5α リダクターゼをはじめ、ステロイドホルモン受容体等の免疫染色

を行い、その関連を調べた。また 1993 年から 2003 年の間に当院で手術を行った子宮内膜癌 86 症例でも上記免疫染色を行い、予後および臨床病理学的項目との関連を検討した。

3 成績

類内膜腺癌 31 症例と正常内膜症例 5 症例の検討で、DHT の組織血清濃度比の中央値は、有意差は無いものの類内膜腺癌症例で約 8 倍高かった。類内膜腺癌 36 症例の検討では、 5α リダクターゼ 1 陽性症例で有意に腫瘍組織中 DHT 濃度が高かった。

長期予後を調べた類内膜腺癌 86 症例の検討では、AR 陽性群が同陰性群に比べ有意に無増悪生存期間が長く、 5α リダクターゼ 1 陽性群は同陰性群に比べ無増悪生存期間、子宮内膜癌特異的生存期間のいずれも有意に長かった。AR と 5α リダクターゼ 1 の陽性、陰性それぞれの組み合わせ 4 群間において、AR 陰性かつ 5α リダクターゼ 1 陰性の組み合わせは有意に生存率が低かった。

5α リダクターゼ 1 はプロゲステロンレセプター (PR) とともに無増悪生存期間、子宮内膜癌特異的生存期間それぞれの単変量解析で有意な予後因子となり、全項目を入れて行った多変量解析においても互いに独立予後因子となった。

4 結論

類内膜腺癌の組織中でイントラクリノロジーによる DHT 合成が行われている可能性が推察された。またテストステロンから DHT への変換酵素である 5α リダクターゼ 1 は、腫瘍組織の DHT 濃度に関連しており、その陽性症例は予後が良く、無増悪生存期間、子宮内膜癌特異的生存期間のいずれにおいても独立予後因子になることが本研究で初めて分かった。さらに今回の新しい知見である AR 陰性かつ 5α リダクターゼ 1 陰性の症例は有意に予後が悪いということは、DHT の作用が乏しいと予後が悪いと置き換える事ができ、これは *in vitro* で報告されている類内膜腺癌における DHT の腫瘍増殖抑制作用が *in vivo* でも同様である可能性を示唆している。類内膜腺癌に対して、DHT に代表されるアンドロゲンはエストロゲンの腫瘍増殖促進作用とは逆に腫瘍増殖抑制に働く可能性が示唆され、アンドロゲンやアロマターゼ阻害剤が子宮内膜癌の治療薬になる可能性が推察された。

II 研究背景

子宮内膜癌は女性生殖器原発の癌の中で一番頻度が高く、その数は近年増加傾向にある^{1) 2)}。類内膜腺癌は子宮内膜癌の中で最も多い組織型であり、その約 80%を占める。類内膜腺癌患者の予後は、一般的に他癌腫や子宮体癌の他の組織型と比較すると良好ではあるが、その約 15%に再発が生じる³⁾。類内膜腺癌とエストロゲンに関しては、プロゲステロンの作用のない状況でエストロゲンに過剰もしくは過長に暴露されるのが、子宮内膜癌のタイプ I 型と呼ばれる類内膜腺癌に罹患するリスクを上昇させると考えられている^{4) 5)}。プロゲステロンに関しても、類内膜腺癌の細胞増殖に重要な作用を有することが明らかにされている。子宮内膜癌に対するメドロキシプロゲステロン酢酸塩 (Medroxyprogesterone acetate; MPA) によるプロゲステロン療法は、プロゲステロンが類内膜腺癌細胞に対し有効な抗エストロゲン作用を及ぼすことを臨床的に示している⁶⁾。男性の生殖活動に役割を持つアンドロゲンは、エストロゲンとプロゲステロンの作用と密接に関連することが知られているが、類内膜腺癌とアンドロゲンの関係については現在もほとんど明らかにされていない。

ジヒドロテストステロン (Dihydrotestosterone; DHT) は最も効力の強いアンドロゲンでアンドロゲン受容体 (Androgen receptor; AR) に対し最も高い親和性を持って結合し、AR の転写活動を促進させる^{7) 8)}。テストステロンから DHT への変換を

触媒する 5α リダクターゼは、様々なアンドロゲン依存性を示す組織においてアンドロゲンの局所での代謝に関わる主要な酵素である⁹⁾ (図 1)。類内膜腺癌と同様にエストロゲン依存性の腫瘍増殖を示す乳癌では、アンドロゲンが腫瘍増殖に関与していることが報告されているが、増殖促進あるいは抑制かについては、現在も議論がなされている。ホルモンがその産生細胞から分泌された状態で直接作用せず、腫瘍組織局所でその前駆体より変換合成されることをイントラクリノロジー (Intracrinology) と言うが、乳癌組織では DHT が 5α リダクターゼを介してこのイントラクリノロジーにより局所で合成される、と考えられている¹⁰⁾。

これまでに当教室では、類内膜腺癌組織中に AR、 5α リダクターゼ 1、 5α リダクターゼ 2 の蛋白質、メッセンジャー RNA の存在を確認している¹¹⁾。 *in vitro* においては、アンドロゲンの類内膜腺癌に対する作用に関して報告されており、テストステロンの誘導体であるダナゾールは、子宮内膜癌細胞である SNG-M 細胞の遊走能と浸潤能に対して抑制的な作用を有する¹²⁾。しかしダナゾールが視床下部一下垂体系に作用することやテストステロンがアロマターゼによりエストラジオール (E_2) に変換されることを考慮すると、ダナゾールは必ずしも純粋なアンドロゲンとして作用するとは言えない。他方、DHT はエストロゲンに変換されることなく、AR シグナルを通してアンドロゲンとして最も強力に作用する。この最大効力を持つアンドロゲンで

ある DHT はヒトの類内膜腺癌細胞株の増殖に抑制的な作用を持つ事を MFE-296 細胞株を用いて 1994 年に初めて報告された^{13) 14)}。続いて、Lovely らが高分化型の類内膜腺癌細胞株である Ishikawa において、エストロゲン受容体 (Estrogen receptor; ER) とプロゲステロン受容体 (Progesterone receptor; PR) とともに AR が発現していることを証明し、この Ishikawa 細胞株を用いて DHT が容量依存性に腫瘍増殖抑制作用を持つ事を示した¹⁵⁾。これらの知見は腫瘍組織中のアンドロゲンが類内膜腺癌細胞の腫瘍増殖能に直接的に重要な役割を果たす可能性を示唆する。しかし子宮内膜癌では、これまでに腫瘍組織中のアンドロゲン濃度を調べた報告はなく、アンドロゲンの合成過程については明らかではない。アンドロゲンシグナルの臨床的意義については、子宮内膜癌では解明されていない状況である。

Ⅲ研究目的

これまで報告の少ない子宮内膜癌とアンドロゲンとの関連について、まず手術検体を微量ホルモン濃度が正確に測定できる液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MSMS 法) で測定し^{16) 17)}、同時にアンドロゲン関連因子の免疫染色を行い、これらの関係を解析することで 5α リダクターゼを中心とした DHT の腫瘍組織局所での生合成について検討する。そして長期予後データの存在する類内膜腺癌症例において、アンドロゲン生合成に関わる酵素発現の意義を臨床データや予後との相関から検討する。これらの検討が、子宮内膜癌に対するアンドロゲン作用の解明の一助となり、アンドロゲン又はアロマターゼ阻害剤が子宮内膜癌の有効な治療法となる可能性を検討することを目的とする。またアンドロゲン合成の中心となる 5α リダクターゼ 1 が類内膜腺癌において臨床病理学的予後因子として重要であることを検討することも目的とする。

IV研究方法

1 患者および患者検体

合計 127 症例の子宮内膜組織（類内膜腺癌 122 症例と正常内膜 5 症例）は東北大学病院産婦人科で手術を施行した手術標本から採取した。2012 年から 2013 年にかけて採取した正常内膜 5 症例を含む 41 症例は、新鮮凍結標本とホルマリン固定パラフィン包埋標本の両方を作製した。1993 年から 2003 年に摘出したその他の 86 症例はホルマリン固定パラフィン包埋標本のみであった。今回の研究に使用することは東北大学倫理委員会の承認を得ている（2012-1-137、2013-1-244）。

LC-MS/MS によるホルモン濃度測定を行った 41 症例の臨床病理学的な特徴については表 1 にまとめている。その他の 86 症例の臨床病理学的な特徴については表 2 にまとめている。手術療法に先立って放射線療法、ホルモン療法また化学療法を行った患者は含まれていない。2003 年以前に検体採取した 86 症例においてはその臨床像と予後との関連を検討したが、2012 年から 2013 年に検体採取した 41 症例においては予後データが得られなかった。

その 86 症例のフォローアップ期間の中央値は 92 ヶ月（8~224 ヶ月）であった。フォローアップ期間中に再発は 14 症例で認め、そのうち 3 症例は骨盤内（後腹膜 2

症例、膣断端 1 症例)、5 症例は肺、6 症例はその他の部位であった。再発の診断後、その中の 3 人はいずれも他院へ転院し、その後の経過は不詳であった。さらにフォローアップ期間中に 12 名が亡くなったが、類内膜腺癌による死亡は 11 名だった。無増悪生存期間 (Progression free survival; PFS) や子宮内膜癌特異的生存期間

(Endometrial carcinoma specific survival; ECSS) は、初回手術日からの再発または再燃、死亡または最終受診日までの期間から求めた。類内膜腺癌 86 症例の生存期間の最終の確認は 2013 年 4 月に行った。

東北大学病院の子宮内膜癌に対する標準的な初回治療は、子宮全摘、両側付属器切除、骨盤リンパ節郭清、(+ 傍大動脈リンパ節郭清) から成る手術療法である。86 症例中 74 症例と 41 症例中 27 症例が前述のいずれかのリンパ節切除を行った。この 74 症例中 5 症例と 27 症例中 4 症例にリンパ節転移を認めた。86 症例における残りの 12 症例と 41 症例における残りの 14 症例は、類内膜腺癌症例でも肥満や合併症などにより周術期のリスクが高い症例、または正常内膜症例であることからリンパ節摘出を行わなかった (表 1、表 2)。

FIGO 2009 の進行期ガイドライン¹⁸⁾ に合わせて進行期を決定した。手術後に 86 名中 50 名が骨盤への外照射または CAP 療法 (シスプラチン 60-70 mg/m², ドキソルビシン 40 mg/m², シクロフォスファミド 500 mg/body) 3~6 コースを行った。41

症例のうち 19 症例は手術後に、3~6 コースの AP 療法（アドリアマイシン 60mg/m², シスプラチン 50mg/m²） または TC 療法（タキソール 75 mg/m², カルボプラチン AUC5)を行った。再発低リスク群である I A 期 G1 症例と I A 期 G2 症例や全身状態の悪い患者はいずれの術後追加治療も行わなかった。術後にホルモン治療を行った患者はいなかった。

2 抗体

マウスモノクローナル抗体である、AR に対しては AR441、PR に対しては MAB429、ER に対しては ER1D5、Ki67 に対しては MIB1 をそれぞれ、DAKO (Carpenteria, CA, USA)、Chemison (Temecula, CA, USA)、Immunotech (Marseille, France)、DAKO から購入した。5 α リダクターゼ 1 に対するヤギのポリクローナル抗体である抗 SRD5A1 抗体 ab79058 と 5 α リダクターゼ 2 に対するウサギのポリクローナル抗体である抗 SRD5A2 抗体 bs-6700R はそれぞれ Abcam (Cambridge, UK) と Bioss (Boston, USA)から購入した。

3 免疫染色

パラフィン包埋標本を免疫染色に用いた。免疫染色はヒストファインキット (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いたストレプトアビジン - ビオチン増幅法で行った。5 α リダクターゼ 1 以外のすべての免疫染色は、標本を抗原賦活のため脱パラフィン化後にクエン酸緩衝液 (2mM クエン酸 + 9mM 無水クエン酸三ナトリウム、pH 6.0) を用いて、121°C で 20 分間、圧力釜で熱処理した。

抗体の希釈については、AR が 1 : 50、5 α リダクターゼ 1 は 1 : 100、5 α リダクターゼ 2 も 1 : 100、PR は 1 : 40、ER は 1 : 50 そして Ki67 は 1 : 50 であった。免疫染色の特異性を確認するため、ポジティブコントロールとして AR は前立腺、5 α リダクターゼ 1 と 5 α リダクターゼ 2 は肝臓、PR は増殖期子宮内膜腺、ER は乳癌を、そして Ki67 は扁桃を用い、ネガティブコントロールにはいずれの染色においても PBS を用い、非特異的反応が認められないことを確認した。抗原抗体複合体は 3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) 溶液 (1mM DAB, 50mM トリス塩化水素緩衝液 [pH 7.6], and 0.006% 過酸化水素) で視覚化し、標本はヘマトキシリンで対比染色を行った。

4 免疫染色活性の評価

AR、PR、ER、そして Ki67 の免疫活性は癌細胞の核に認められる。免疫活性の定量的評価のために、標準的な光学顕微鏡の 3 から 5 視野の代表的な倍率 400 倍の強拡大視野で合計 500 個以上の腫瘍細胞を数えた。続いて、免疫活性を持つ細胞の百分率、すなわちラベリングインデックス (Labeling Index; LI) を算出した。AR、PR そして ER においては、LI が 10%以上の標本を陽性と判定した^{19) 20) 21)}。5 α リダクターゼ 1 と 5 α リダクターゼ 2 の免疫活性は癌細胞の細胞質に認められ、positive、positive/negative、negative の 3 つに半定量的な基準を設けて評価した。免疫活性の強度と面積を考慮して、5 α リダクターゼの免疫活性が 80%以上を占める標本は positive と判断し、免疫活性が占める割合が 20%以下のものは negative と判定した。これら以外を暫定的に positive/negative と見なした。positive/negative 症例は再評価を行い、それらの中で 50%以上の免疫活性を持つ症例は positive と最終的に決定した^{11) 22)}。

5 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS)

類内膜腺癌 36 症例と正常内膜の 5 症例からなる 41 症例の内膜検体の血清および腫瘍組織中アンドロゲン濃度は、これまでの報告と同様にあすか製薬メディカル (川崎) に依頼し liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) で測定した^{2 1) 2 3) 2 4)}。上記 41 症例中、正常内膜症例 5 例を含んだ 36 症例は血清と組織両方のアンドロゲン濃度を LC-MS/MS で測定した。一方でその他の類内膜腺癌 5 症例は組織のみを LC-MS/MS で測定した。新鮮凍結した組織を LC-MS/MS 解析に用いた。組織標本は子宮が摘出された直後に、約 1 立方センチメートル大を目安として採取し、- 80℃の液体窒素で速やかに凍結保存した。その後、これらの標本の隣接部を永久標本で病理組織診断した。類内膜腺癌症例では、組織中の癌の割合が少なくとも 80%以上であることを確認し、LC-MS/MS 解析に用いた。

アンドロゲン濃度測定に用いた組織標本の重量は 9-100 mg (mean ± standard deviation (SD); 49mg ± 21mg) だった。組織標本は 1ml の蒸留水に均一に混ぜ、ステロイドの分画をジエチルエーテルで抽出した。この研究では、陽イオンモードの電子線によるイオン化で操作される API 4000 triple-stage quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Ontario, Canada) と LC (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を連結させて使用した。クロマトグラフィーによる分離は Cadenza CD-C18 column (3 × 150mm, 3.5mm, Imtakt, Kyoto, Japan)

で行った。テストステロンと DHT の定量下限値は両者ともに 1.0 pg/g だった。参考値と見なされた 1.0 pg/g 以下の測定値は 0.0 pg/g として扱った。

6 統計学的解析法

統計学的解析は JMP ソフトウェア(JMP Pro 10.0.2; SAS Institute, Tokyo, Japan)を使用した。5 α リダクターゼの免疫染色活性の状態と腫瘍組織中の DHT 濃度の関連での統計学的有意差は、2 群比較では Wilcoxon 検定を、4 群比較では Kruskal-Wallis 検定を使用して求めた。AR、5 α リダクターゼの免疫染色活性と年齢、グレード、進行期、リンパ節転移の有無などの臨床病理学的項目の関連での統計学的有意差は、 χ^2 検定を用いて評価し、またこれらと PR、ER、Ki67 の LI は Wilcoxon 検定を用いて評価した。単変量解析は Kaplan-Meier 法で評価し、log-rank 検定を用いて比較した。多変量解析は全項目を用いて変数減少法を行った Cox's ハザードモデルを用いて評価した。いずれの解析も P 値 0.05 未満を統計学的に有意と判断した。

V 研究結果

1 類内膜腺癌における AR、5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 の免疫組織反応

AR の免疫反応は癌細胞の核に認められた (図 2A)。一方で 5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 の免疫反応は癌細胞の細胞質で認められた (図 2C、2D)。分泌期正常内膜の腺管上皮細胞の核に AR は弱く免疫反応を認めた (図 2B)。正常内膜の上皮では 5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 の免疫染色は、限局性かつ弱い染まりだった。ホルモン濃度を測定した 41 症例中の類内膜腺癌 36 症例において、AR、5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 の免疫染色結果はそれぞれ 27 症例 (75%)、23 症例 (64%)、25 症例 (69%) で陽性だった (表 3)。類内膜腺癌 86 症例の解析においては、AR、5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 の免疫染色結果はそれぞれ 65 症例 (76%)、56 症例 (65%)、60 症例 (70%) で陽性であった (表 4)。

2 類内膜腺癌の腫瘍組織中アンドロゲン

類内膜腺癌 31 症例におけるテストステロンの腫瘍組織中と血清中の濃度比の中央値は 0.42(range, 0.06–2.60; mean \pm SD, 0.55 \pm 0.60)で、正常内膜 5 症例の中央値 0.32

(range, 0.08–0.64; mean \pm SD, 0.34 \pm 0.18)に比べ 1.3 倍高かった。それに比較し、類内膜腺癌 31 症例における DHT の腫瘍組織中と血清中の濃度比の中央値は 0.63(range, 0.00–7.84; mean \pm SD, 1.45 \pm 2.09)で、正常内膜 5 症例の中央値 0.08(range, 0.00–2.77; mean \pm SD, 0.60 \pm 1.09)と比較しておよそ 8 倍高かった(図 3)。類内膜腺癌症例と正常内膜症例においてテストステロンまたは DHT の組織血清濃度比の中央値には有意差は認めなかった。同様に、類内膜腺癌症例と正常内膜症例において、腫瘍組織中または血清中のテストステロン濃度と DHT 濃度の間には有意差は認めなかった。

類内膜腺癌 36 症例において、免疫組織化学にて評価した 5 α リダクターゼの発現(陽性または陰性)と腫瘍組織中 DHT 濃度の関連を調べた(図 4)。類内膜腺癌 36 症例中 23 症例(64%)で 5 α リダクターゼ 1 が陽性であった。腫瘍組織中 DHT 濃度は 5 α リダクターゼ 1 陰性群(中央値, 1.5 pg/g; range, 0.00–56.2 pg/g; mean \pm SD, 8.3 \pm 15.1 pg/g)に比べ 5 α リダクターゼ 1 陽性群(中央値, 25.7 pg/g; range, 0.00–270.0 pg/g; mean \pm SD, 54.1 \pm 67.4 pg/g)で有意に高かった($P=0.0017$)。同様に、類内膜腺癌 36 症例中 25 症例(69%)で 5 α リダクターゼ 2 が陽性であった。しかしながら 5 α リダクターゼ 2 の免疫染色結果(陽性または陰性)と腫瘍組織中 DHT 濃度の間では、明らかな有意差を認めなかった(5 α リダクターゼ 2 陽性群: 中央値, 24.7 pg/g;

range, 0.00–270.0 pg/g; mean \pm SD, 49.4 \pm 67.1 pg/g; 5 α リダクターゼ陰性群: 中央値, 9.3 pg/g; range, 0.00–32.0 pg/g; mean \pm SD, 10.7 \pm 10.5 pg/g) ($P=0.0857$)。

3 類内膜腺癌における AR、5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 と臨床病理学的データとの関連

AR の免疫染色と臨床病理学的項目との関係について表 4 にまとめている。これまでの報告と同様で、類内膜腺癌症例における AR の免疫染色の結果は 86 症例中 65 症例と 75.6% で陽性であった¹¹⁾。AR の免疫染色の結果は組織学的グレード、脈管侵襲、Ki67 の LI と逆の相関を認め(それぞれ順に $P=0.0435$ 、 $P=0.0247$ 、 $P=0.0005$)、ER の LI とは正の相関を認めた ($P=0.0034$)。AR の免疫染色の結果は臨床病期 (FIGO stage I、II vs III、IV) や PR の LI とは明らかな関連は認めなかった。

5 α リダクターゼ 1 の免疫染色と臨床病理学的項目との関係について表 5 にまとめている。類内膜腺癌症例における。5 α リダクターゼ 1 の免疫染色の結果は 86 症例中 56 症例と 65.1% で陽性であった。5 α リダクターゼ 1 の発現は組織学的グレードに正の相関を認めた ($P=0.0488$)。AR の免疫染色の結果は臨床病期 (FIGO stage I、II vs III、IV) や PR の LI とは明らかな関連は認めなかった。5 α リダクターゼ 1 と 5 α リダクターゼ 2 の間に有意な関連は認めなかった。

4 類内膜腺癌における AR、5 α リダクターゼ 1 と予後の関連

類内膜腺癌患者の無増悪生存率 (PFS) と子宮内膜癌特異的生存率 (ECSS) のグラフは、 Kaplan-Meier 法を用いて作成した (図 5)。 今回の研究では初回手術後も遠隔転移の残存を認める IVB 期症例も含むため無病生存率ではなく PFS を使って評価した。 また子宮内膜癌の再発を認めず、子宮内膜癌と関連なく死亡した患者が 1 名いたため全生存率ではなく ECSS で評価した。 PFS に関して、 AR 陽性患者は AR 陰性患者に比べ有意に生存率が良かった ($P=0.0164$; 図 5A)。 ECSS では、 AR 陽性患者と陰性患者で有意差を認めなかった ($P=0.1071$; 図 5B)。 5 α リダクターゼ 1 の免疫染色結果に基づく PFS と ECSS の Kaplan-Meier 曲線は図 5C、 5D に示している。 5 α リダクターゼ 1 陽性患者は陰性患者に比べ、 PFS、 ECSS とともに有意に生存率が高かった (それぞれ $P=0.0014$ 、 $P=0.0326$)。

AR と 5 α リダクターゼ 1 の免疫染色結果 (陽性、 陰性) の組み合わせ 4 群における PFS と ECSS の Kaplan-Meier 曲線は図 5E、 5F に示している。 AR と 5 α リダクターゼ 1 がともに陰性の患者の生存率は、他の 3 群の生存率に比べ有意に低かった。 AR と 5 α リダクターゼ 1 の免疫染色結果 (陽性、 陰性) の組み合わせ 4 群において、 PFS は $P<0.0001$ 、 ECSS は $P=0.0305$ であり、ともに有意差を認めた。 ログラン

ク検定を用いた PFS の単変量解析は、臨床進行期($P=0.0495$)、AR ($P=0.0164$)、PR ($P=0.0018$)、 5α リダクターゼ 1 ($P=0.0014$)が有意な予後因子であった。すべての項目を用いて変数減少法を使用したコックスの比例ハザードモデルで評価した PFS の多変量解析では、PR ($P=0.0022$)と 5α リダクターゼ 1($P=0.0018$)が独立予後因子となることが示された(表 6)。ECSS の単変量解析では PR ($P=0.0022$) と 5α リダクターゼ 1 ($P=0.0326$)が有意な予後因子であることが示された。同様にすべての項目を用いて変数減少法を使用したコックスの比例ハザードモデルで評価した多変量解析から PR ($P=0.0031$) と 5α リダクターゼ 1 ($P=0.0336$) がともに独立予後因子となることが示された(表 7)。閉経後のみの 58 症例でも同様に PFS と ECSS の多変量解析を行ったが、いずれも独立予後因子は認めなかった。

VI 考察

本研究はヒト類内膜腺癌における組織中アンドロゲンと 5α リダクターゼ 1 の重要性について調べた最初の報告である。今回の研究では、 5α リダクターゼ 1 の免疫活性は類内膜腺癌症例において約 65%(23/36、56/86)に認め、組織中 DHT 濃度と有意に正の相関を認めることが初めて明らかとなった。 5α リダクターゼ 1 陰性の患者は再発、再燃のリスクが上昇し予後が悪く、特に AR の免疫染色結果との組み合わせを考えると、 5α リダクターゼ 1 と AR が共に陰性の患者は、片方が陽性または共に陽性の患者に比べ有意に予後が不良である、ということも本研究で明らかとなった新しい知見である。さらに多変量解析によって、 5α リダクターゼ 1 が類内膜腺癌患者の PFS、ECSS の両者における独立予後因子であることも初めて示された。これらの結果より類内膜腺癌では、アンドロゲンシグナルの欠如が予後不良に関連することが推察される。

今回腫瘍組織中のホルモン濃度を測定した類内膜腺癌 36 症例の AR、 5α リダクターゼ 1、 5α リダクターゼ 2 の免疫染色の結果は表 3 に示したが、これらの発現率は Ito らの報告（類内膜腺癌は 44 症例）¹¹⁾ と同様の結果である。表には示していないが、今回ホルモン濃度測定を行った正常内膜 5 症例（分泌期 3 症例、増殖期 2 症例）において、AR の発現率は 20%（分泌期 1 症例のみ）で LI の中央値は 8.3%であり、

5 α リダクターゼ 1 の発現率は 0%、5 α リダクターゼ 2 の発現率は 20% (増殖期 1 症例のみ) である。今回の研究では、正常子宮内膜の症例数が少なく統計解析を行うことができなかった。前述の Ito らの報告¹¹においても、正常内膜 18 症例 (分泌期 9 症例、増殖期 9 症例) において AR は、分泌期でその LI の中央値が 7.5%、増殖期は LI の記載はなく陰性で染色が非常に弱いとの結果であり、5 α リダクターゼ 1 と 5 α リダクターゼ 2 はどの周期においても染色が弱く限局的である、と本研究と同様の結果を示している。以上の結果から AR、5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 のいずれも類内膜腺癌で発現が高く、正常内膜では発現が低い傾向にあると思われる。

本研究で腫瘍組織中及び血中のホルモン濃度を測定した類内膜腺癌 31 症例と正常内膜 5 症例の間で、組織中テストステロン濃度、組織中 DHT 濃度において有意差は認めなかった (データに示していない)。さらに、類内膜腺癌と正常内膜症例間でのテストステロンの組織中、血清中の濃度比は 1.3 倍とわずかな違いがあるだけであった。しかし DHT の組織中、血清中濃度比は、類内膜腺癌症例において正常内膜症例の 8 倍と顕著に高かった。組織中および血清中アンドロゲン濃度の測定により、類内膜腺癌組織における局所的な DHT 合成の存在が示唆された。腫瘍組織中でイントラクリンにより 5 α リダクターゼ 1 を介して DHT が合成されることは、乳癌で実証されてきた²⁵⁾。類内膜腺癌では、イントラクリンによるアンドロゲンの存在は血中に

存在する DHT の代謝物質の検出を通して間接的に示されてきた²⁶⁾ が、今回初めて類内膜腺癌において組織中のアンドロゲン濃度を直接的に測定した。その結果、類内膜腺癌 36 症例では、5 α リダクターゼ 1 の免疫染色結果と腫瘍組織中 DHT 濃度の間には有意な正の相関関係を認め、腫瘍組織中での DHT 合成への 5 α リダクターゼ 1 の関与が本研究により初めて示唆された。5 α リダクターゼ 2 の免疫染色反応は、腫瘍組織中 DHT 濃度との間に有意な相関を認めなかった。これは 5 α リダクターゼ 1 が、乳癌と同様に類内膜腺癌における DHT 合成においても優位に作用することを推測させる²¹⁾。さらに言うと、今回の結果から 5 α リダクターゼ 1 の免疫染色結果が腫瘍組織中 DHT 濃度の代替マーカーになり得ると考えられる。

今回の研究では、AR 陰性と 5 α リダクターゼ 1 陰性の類内膜腺癌症例が、独立してそれぞれの陽性症例よりも生存率が低かった。さらに AR と 5 α リダクターゼ 1 が共に陰性の症例では、他の 3 群に比べ有意に予後が不良であることが初めて明らかになった。前述のように、5 α リダクターゼ 1 の免疫染色結果が腫瘍組織中 DHT 濃度を反映しているならば、AR と 5 α リダクターゼ 1 が共に陰性の症例では DHT の作用がほとんど生じていない、と思われる。つまり DHT の作用が乏しいと有意に予後が悪くなると置き換える事ができ、これは注目すべき新しい知見である。また今回、AR の免疫染色結果と組織学的グレード、脈管侵襲、Ki67 の間に有意な負の相関関係

があることを示した。これらの結果より DHT が AR シグナルを介して子宮内膜癌の腫瘍増殖や浸潤に対して抑制的な作用を持っていると思われる。Lovely らは高分化型子宮内膜癌由来の Ishikawa 細胞株が AR を発現しており、その増殖は 10^{-8} M の濃度の DHT 添加（72 時間培養）により抑制される、と報告している¹⁵⁾。この知見と今回の研究結果は、効力のあるアンドロゲンによって AR シグナルを活性化させることが類内膜腺癌患者に対する抗癌治療につながる可能性を示唆している。

本研究では類内膜腺癌におけるアンドロゲンシグナルの意義を明らかにするため、類内膜腺癌 86 症例の AR、 5α リダクターゼ 1、 5α リダクターゼ 2 といったアンドロゲン関連因子の発現を免疫染色にて検討した。この 86 症例において、AR の LI は ER の LI と正の相関を認め($P=0.0034$)、PR の LI とも有意水準 $P=0.05$ には至らなかったものの同様に正の相関が得られた($P=0.0521$)。

子宮内膜癌では、ER と PR の発現が無いことが有意に予後の悪い組織型や低い生存率に関連するという報告がある²⁷⁾。本研究から AR の発現の消失は予後不良のマーカーになり得ると考えられる。ER と PR の発現は、類内膜腺癌の予後マーカーとなり得ることが以前から指摘されており^{27) 28)}、進行癌または再発癌症例における治療選択の際にこれらの発現結果を考慮することがある^{28) 29)}。今回の研究では、 5α リダクターゼ 1 と PR が類内膜腺癌の独立予後因子になることを示した（表 6、表

7)。一方で、今回の研究では AR は独立予後因子とならなかった（表 6、表 7）。乳癌ではこの結果と同様に、Suzuki らが乳癌患者の全生存率、無病生存率において AR は独立予後因子ではない、と報告している²¹⁾。それゆえ AR 単独では、類内膜腺癌でも乳癌でも必ずしも AR シグナルを反映しないのかもしれない。ここまですべてをまとめて考えると、AR と 5 α リダクターゼ 1 の発現が共に陰性であることは、類内膜腺癌において予後不良を予測するバイオマーカーになり得ると思われ、実臨床への応用に期待ができる。

今回の研究において 5 α リダクターゼ 1 の免疫染色結果と組織学的グレードの間に認める有意な関連は、Ito らの先行研究と同じ結果である¹¹⁾。組織学的グレードと AR の発現は逆相関するのに対し、5 α リダクターゼ 1 の発現とは正相関した。子宮内膜癌の低分化癌症例で 5 α リダクターゼ 1 の発現頻度が高くなる理由については、現時点の研究では説明することが出来ず今後の検討課題である。ただし本研究では AR の発現と 5 α リダクターゼ 1 の発現に関連がないという結果が得られており（表 4）、組織学的グレードに対して AR と 5 α リダクターゼ 1 が同様の相関を示す必然性はなく、これらの結果の乖離に科学的意義は無いと考えられる。またこの結果から一般的には予後の悪い低分化型類内膜腺癌^{30) 31)}の中に 5 α リダクターゼ 1 を発現す

る予後の良い症例が存在することと、 5α リダクターゼ1がその予後予測マーカーになり得る、ということが推察される。

今回表6、表7に示した臨床病理学的因子と予後との相関において、単変量解析でPR、AR、 5α リダクターゼ1以外に進行期でしか有意差が出ず、多変量解析ではPR、 5α リダクターゼ1のみが独立予後因子になったのは、症例数の少なさに問題があると思われるが、類内膜腺癌の特徴を示している可能性も十分考えられる。子宮内膜癌の一般的な独立予後因子は進行期、筋層浸潤、組織型、分化度のグレード、脈管侵襲と言われている³⁰⁾。しかしHuvilaらはI期、II期の類内膜腺癌182症例の検討で、単変量解析において有意差のついた項目はPR、グレード、p53で、多変量解析で独立予後因子になったのはPRのみであったと報告している³¹⁾。今回の研究では予後因子を示している数々の先行論文に比べ症例数が少なく、今後大規模な検討を行うことで臨床病理学的因子との関係をより明らかにすることができるかもしれないが、類内膜腺癌のみを対象とした本研究においてPRと 5α リダクターゼ1が独立予後因子になっていることは、前述の早期類内膜腺癌を対象にしたHuvilaらの報告に近い結果であったとも考えられる。今後更に症例数を追加した上での、臨床病理学的因子と予後との相関の解析が待たれる。

乳癌では ER 陰性、PR 陰性、HER2 陰性のトリプルネガティブ症例において AR 高発現、 5α リダクターゼ 1 高発現、Ki-67 の LI 低値が予後良好であるとの報告があり²²⁾、治療として「stimulating androgenic signaling」の可能性が示唆されている。

類内膜腺癌においては、HER2 を除いて考えたとしても表 4 で示すように AR 陽性症例は ER、PR の LI が有意に高くなるので、AR 陽性かつ ER 陰性かつ PR 陰性症例は極めて少なく、検討するには多くの症例数を要する。視点を変えて図 5 で示された AR 陰性かつ 5α リダクターゼ陽性症例と AR 陰性かつ 5α リダクターゼ陰性症例の予後における大きな違いに注目すると、腫瘍組織中に 5α リダクターゼ 1 が発現していれば AR 陰性症例であっても少ないながら検出限界以下の AR が発現している症例も含まれていると考えられ、それらの症例では「androgenic signaling」が生じている可能性があり、それにより腫瘍増殖が抑えられている可能性が考えられる。本研究での AR 発現のカットオフ値は 10%であり、乳癌での ER 発現の一般的なカットオフ値 1%に比べて厳しく設定されていることからこの可能性が示唆される。故に類内膜腺癌においても「stimulating androgenic signaling」の治療としての可能性は十分にあると考えられる。

乳癌でのエストロゲン存在下でのアンドロゲンの位置づけは controversial である。本研究ではエストロゲン系を同時に検討していないので、エストロゲン存在下でのア

ンドロゲンの位置づけについて厳密に示すことは出来ない。現在まで子宮内膜癌での報告は少ないが、Lovely らが子宮内膜癌細胞株を用いてエストロゲンの存在下に DHT の投与を行うと容量依存性に細胞増殖が抑制されることを報告している¹⁵⁾。卵巣癌ではエストロゲンの存在下でのアンドロゲン作用の報告はない。卵巣癌でのアンドロゲンの位置づけは子宮内膜癌とは対照的で、卵巣癌の腫瘍増殖を促進させる作用があると考えられており、抗アンドロゲン療法が検討されてきた³²⁾。

乳癌の腫瘍組織中 DHT 濃度は、アロマターゼ阻害剤 (AI 剤) のエキセメスタンで治療中の患者において、この治療を受けていない患者よりも有意に高いという報告がある²⁴⁾。アロマターゼはアンドロゲンのアンドロステンジオンとテストステロンをそれぞれエストロン、エストラジオールに変換するのを触媒する。AI 剤はエストロゲン合成を減弱することにより、アロマターゼにとっての基質であるアンドロゲンの濃度を増加させると考えられている。子宮内膜癌において、アロマターゼとアンドロゲンの作用を分析することがアンドロゲンの作用を明らかにし、奏功する可能性のある AI 剤の治療効果を確かめるために不可欠である。本研究の結果に基づけば、AI 剤やアンドロゲンを含む治療は、類内膜腺癌の AR 陽性症例に対しては治療効果が期待され得る。これまでに子宮内膜癌に対して AI 剤を用いた報告はいくつかあるものの、いずれも症例数が少ない。その中で本研究と同様に類内膜腺癌のみを対象とし、さら

に閉経後症例に絞った Lindemann らの報告によると、進行癌または再発癌 51 症例に AI 剤のエキセメスタン 1 日 1 回 25mg を内服で投与した結果、ER 陰性 11 症例の奏効率は 0%で、いずれの症例も 6 カ月以内に progressive disease (PD)だった。一方 ER 陽性 40 症例の奏効率は 10%で、6 カ月以内に病状の進行が無かったのは 35%だった。いずれの症例も毒性による治療中断はなく、大きな有害事象は認めなかった³⁾。また AI 剤のアナストロゾールを用いて術前に 14 日間ホルモン療法を行うと、手術で採取された腫瘍の免疫染色検査において腫瘍増殖のマーカーである Ki67 が術前に比べて有意に減少する、という報告もある³⁴⁾。子宮内膜癌の標準治療は FIGO 分類のIV期以外がまず手術療法になっており、初回治療として AI 剤を使用する機会が基本的にないというのが現状である。前述の Lindemann らの研究では高分化型症例が全体の 13.5%と少なく³³⁾、分化型の内訳から偏りが無いとは言えず、厳密な意味で類内膜腺癌に対しての AI 剤の治療効果を評価した報告とは言えないと考えられる。また進行癌、再発癌といった元々期待される生命予後が短く根治的治療が困難な患者を対象にして、6 カ月以内の stable disease 以上の治療効果が 35%で得られていると考えると、治療効果に乏しいと切り捨てる結果でもないと考えられる。Thangavelu らの報告にある術前ホルモン療法といった AI 剤の使い方³⁴⁾も引き続き試されるべきと考える。いずれの検討においても大規模な前向き臨床試験が必要である。

以前よりステロイドホルモンは、自身の受容体以外の核受容体とのクロストークの存在が示唆されている。MPA などのプロゲステロン製剤は AR と高い親和性を持って結合するという報告がある³⁵⁾。Moore らは子宮内膜癌において AR に関連のあるプロゲステロンのクロストークについてまとめた報告をしている³⁶⁾。プロゲステロンにより生じる AR シグナルの増加は、子宮内膜におけるエストロゲンシグナルによる作用を抑制する働きを示唆する報告もある^{37) 38) 13) 15)}。

それゆえ 1 つのステロイドホルモンの作用を明確に示すのは、そのホルモンと関連した受容体間の複雑な相互作用があるため難解な事である。アロマターゼの存在もアンドロゲンの作用の正確な評価をより複雑なものにする。このため今回の研究では、エストロゲン合成への関与がより少ないテストステロン以降のアンドロゲン経路のみに研究対象を絞った。本研究はサブグループ解析を行うには症例数が少ない。アンドロゲンの作用の評価をさらに正確に行うためには、卵巣ホルモンの影響を受けない閉経後症例のみの解析が必要とされるだろう。

VII 結論

本研究は、類内膜型子宮内膜腺癌の腫瘍組織中アンドロゲン濃度を測定し、アンドロゲン関連因子の免疫活性を評価し、最終的にこれらの因子を含めた臨床病理学的因子と予後との関連を調べた初めての報告である。結論として 5α リダクターゼ1の発現は、類内膜腺癌のARシグナル経路を介したアンドロゲンの作用において重要な役割を持つ腫瘍組織中DHT濃度に有意な関連があることを子宮内膜癌で初めて明らかにした。さらにARと 5α リダクターゼ1が共に陰性である症例の予後が有意に悪いことは注目すべき新しい知見であり、類内膜腺癌においてアンドロゲンが腫瘍増殖抑制作用を持つ事を示唆している。 5α リダクターゼ1は類内膜腺癌の重要な予後因子の1つであると考えられる。ただしこれらを確実に証明するには更なる研究が必要である。

VIII 謝辞

本研究の遂行に際し、終始適切な御指導を賜りました東北大学八重樫伸生教授に心より御礼を申し上げます。また、本研究ならびに本学位論文作成において御指導、御助力を賜りました東北大学三木康宏先生、高木清司先生、鈴木貴教授、伊藤潔教授に深く感謝いたします。また、実験にご協力いただいた李賓先生、笛末崎先生に心より感謝いたします。

IX文献

1) Kitchener HC, Trimble EL: Endometrial cancer state of the science meeting.

Int. J. Gynecol. Cancer. 2009; 19:134-40

2) Alhilli Podratz KC, Dowdy SC, Bakkum-Gamez JN et al: Risk-scoring system

for the individualized prediction of lymphatic dissemination in patients with

endometrioid endometrial cancer. Gynecol Oncol. 2013; 131(1):103-8.

3) Del Carman MG, Boruta II DM, Schorge JO: Recurrent endometrial cancer.

Clin. Obstet. Gynecol. 2011; 54:266-77.

4) Hulka BS, Kaufman DG, Fowler WC et al: Predominance of early endometrial

cancers after long-term estrogen use. JAMA 1980; 244:2419-22

5) Thomas DB: Do hormones cause cancer? Cancer 1984; 53:595-604.

6) Thigpen AE, Brady MF, Alvarez RD et al: Oral medroxyprogesterone acetate in

the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a dose-response

study by the Gynecologic Oncology Group. J. Clin. Oncol. 1999; 17(6):1736-44.

7) Mainwaring WI: A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate.

J.Endocrinol. 1969; 45:531-41

8) Fang S, Anderson KM, Liao S: Receptor proteins for androgens. On the role of specific proteins in selective retention of

17-beta-hydroxy-5-alpha-androstan-3-one by rat ventral prostate in vivo and in vitro. J. Biol. Chem. 1969; 244:6584-95

9) Russell DW, Wilson JD: Steroid 5 alpha-reductase: 2 genes / 2 enzymes. Annu Rev Biochem 1994; 63:25-61.

10) Suzuki T, Miki Y, Takagi K, et al: Androgens in human breast carcinoma. Med. Mol. Morphol. 2010; 43:75-81.

11) Ito K, Suzuki T, Akahira J, et al: Expression of androgen receptor and 5 α -reductases in the human normal endometrium and its disorders. Int.J.Cancer. 2002; 99,652-657.

12) Ueda M, Fujii H, Yoshizawa K, et al: Effects of sex steroids and growth factors on migration and invasion of endometrial adenocarcinoma SNG-M cells in vitro. Cancer Res. 1996; 87(5):524-33.

1 3) Hackenberg R, Beck S, Filmer A, et al: Androgen responsiveness of the new human endometrial cancer cell line MFE-296. *Int. J. Cancer.* 1994; 57:117–22.

1 4) Hackenberg R, Schulz KD: Androgen receptor mediated growth control of breast cancer and endometrial cancer modulated by antiandrogen and androgen-like steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1996; 56:113–7.

1 5) Lovely LP, Rao KA, Gui Y, et al: Characterization of androgen receptors in a well-differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (ISHIKAWA) *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2000; 74: 235-241.

1 6) Vogeser M, Parhofer KG et al: Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)-technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; Oct; 115(9):559-70.

1 7) Robin Haring, Hannemann A, John U, et al: Age-specific reference ranges for serum testosterone and androstenedione concentrations in women measured by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97(2):408-15.

1 8) FIGO committee on gynecologic oncology: Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2009; 105:103-104.

1 9) Allred DC, Harvey JM, Berardo M, et al: Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol.* 1998; 11(2):155-68.

2 0) Saito S, Ito K, Nagase S, et al: Progesterone receptor isoforms as a prognostic marker in human endometrial carcinoma. *Cancer Science* 2006; vol97 no.12 1308-1314.

2 1) Suzuki T, Miki Y, Moriya T, et al: 5alpha-Reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. *Int. J. Cancer* 2007; 120 285-291.

2 2) Keely M, Yoda T, Miki Y, et al: Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: its correlation with tumor cell proliferation. *Cancer Science* 2013; vol.104 no.5 639-646.

- 2 3) Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, et al: Aromatase localization in human breast cancer tissues: possible interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res.* 2007; 67:3945-3954 15.
- 2 4) Takagi K, Miki Y, Nagasaki S, et al: Increased intratumoral androgens in human breast carcinoma following aromatase inhibitor exemestane treatment. *Endocr. Relat. Cancer.* 2010; 17:415-430.
- 2 5) Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, et al: Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* 2005; 12:701-720.
- 2 6) Fernand Labrie, Alain Belanger, Lionel Cusan, et al: Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: *Intracrinology. J. Clinical Endocrinol. Metab.* 1997; Vol.82 No.8 2403-2409.
- 2 7) Engelsens IB, Stefanson IM, Akslen LA, et al: GATA3 expression in estrogen receptor alpha-negative endometrial carcinomas identifies aggressive tumors with high proliferation and poor patient survival. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008; 199:543-547.

- 2 8) Helga B. Salvesen, Ingfrid S. Haldorsen, Jone Trovik: Markers for individualized therapy in endometrial carcinoma. *Lancet Oncol.* 2012; 13: e353-61
- 2 9) Kokka F, Brockbank E, Oram D, et al: Hormonal therapy in advanced or recurrent endometrial cancer. *Cochrane Database Syst.* 2010; Rev. 12: CD007926.
- 3 0) Frederic Amant, Philippe Moerman, Patrick Neven, et al: Endometrial cancer. *Lancet.* 2005; Vol366; 491-505.
- 3 1) Jutta Huvila, Lauri Talve, Olli Carpen, et al: Progesterone receptor negativity is an independent risk factor for relapse in patients with early stage endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2013;130: 463-469.
- 3 2) Gibson DA, Simitsidellis I, Collins F, et al: Evidence of androgen action in endometrial and ovarian cancers. *Endocr. Relat. Cancer.* 2014 Aug;21(4):T203-18.
- 3 3) Lindemann K, Malander S, Christensen RD, et al: Examestane in advanced or recurrent endometrial carcinoma: a prospective phase II study by the Nordic Society of Gynecologic Oncology (NSGO). *BMC Cancer.* 2014 Feb 5;14:68.

3 4) Thangavelu A, Hewitt MJ, Quinton ND, et al: Neoadjuvant treatment of endometrial cancer using anastrozole: a randomised pilot study. *Gynecol. Oncol.* 2013 Dec;131(3):613-618.

3 5) Poulin R, Baker D, Poirier D, et al: Multiple actions of synthetic 'progestins' on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an in vitro model for the simultaneous assay of androgen, progestin, estrogen, and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids. *Breast Cancer. Res. Treat.* 1991; 17:197-210.

3 6) Moore NL, Hickey TE, Butler LM, et al: Multiple nuclear receptor signaling pathways mediate the actions of synthetic progestins in target cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012; 357:60-70.

3 7) Apparao KB, Lovely LP, Gui Y, et al: Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol. Reprod.* 2002; 66:297-304.

3 8) Brenner RM, Slayden OD: Progesterone receptor antagonists and the endometrial antiproliferative effect. *Semin. Reprod. Med.* 2005; 23:74-81.

X 図

図 1

子宮内膜癌組織局所におけるアンドロゲン合成および代謝経路

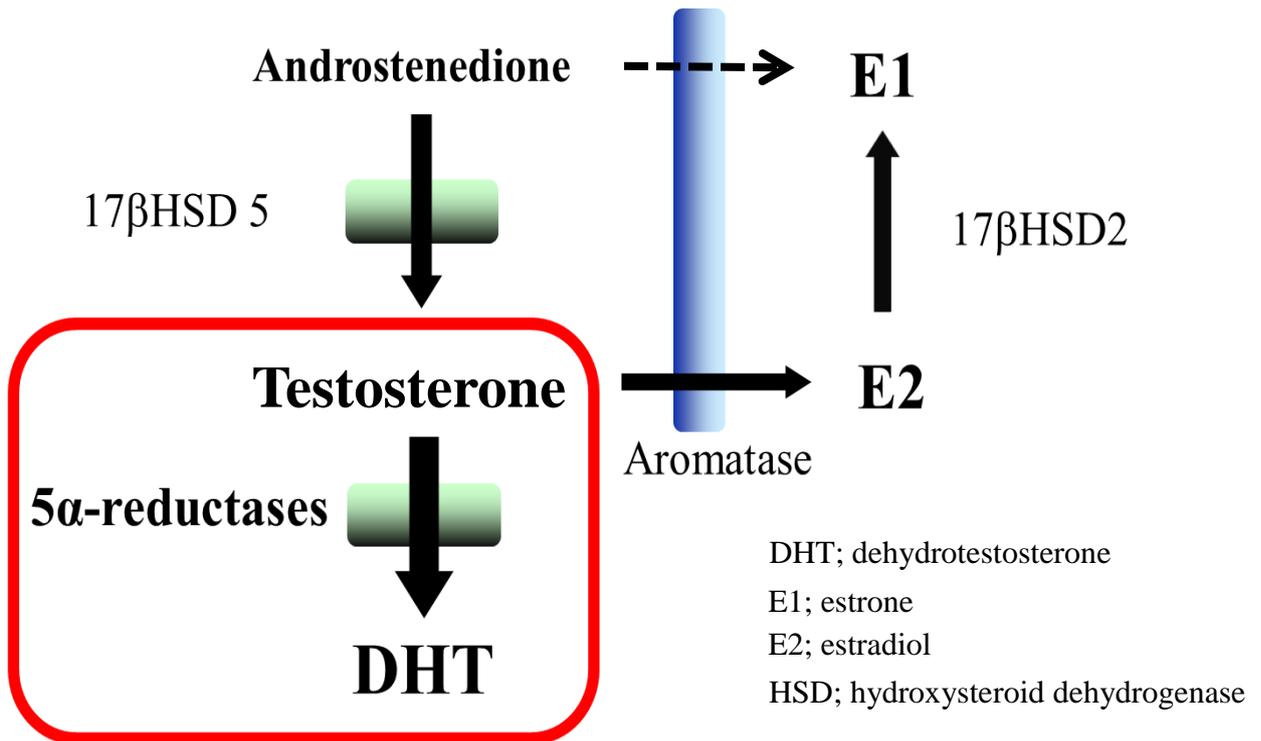
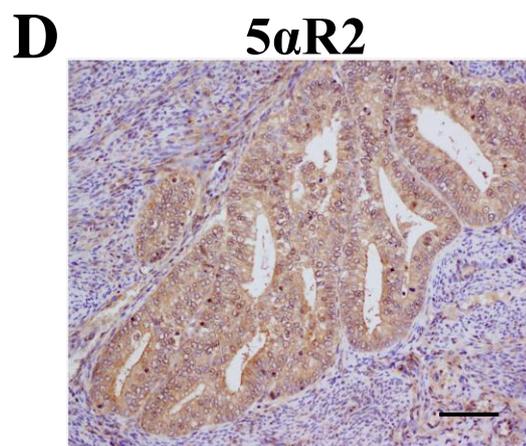
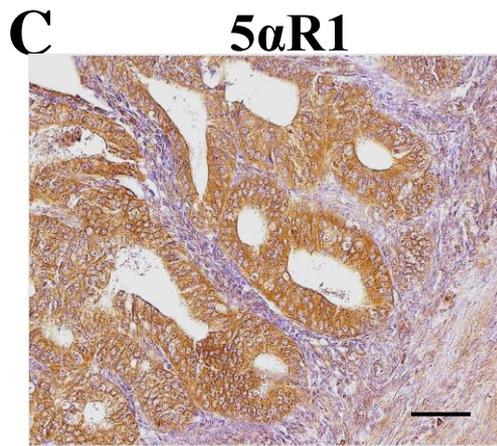
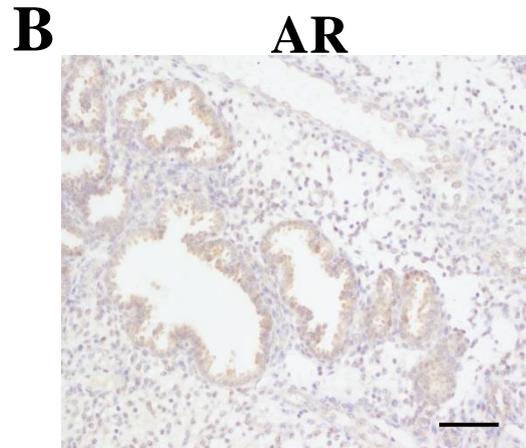
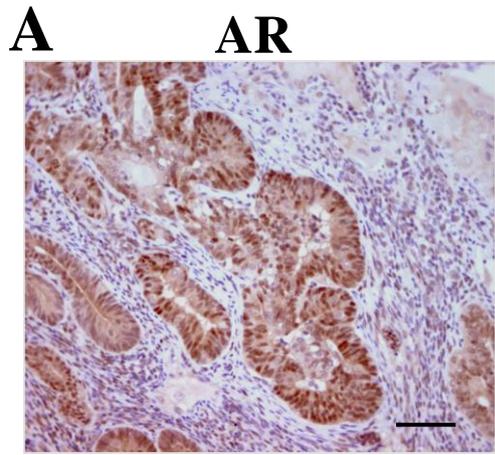
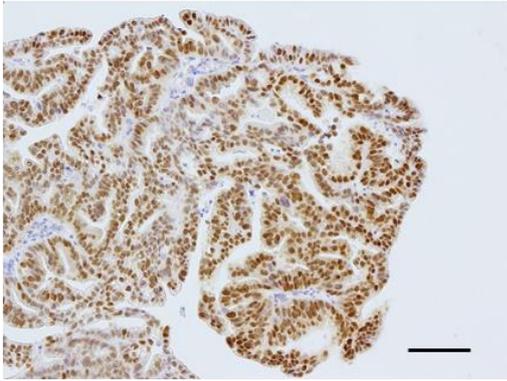


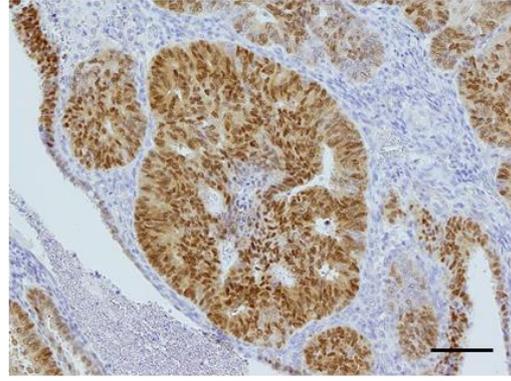
图 2



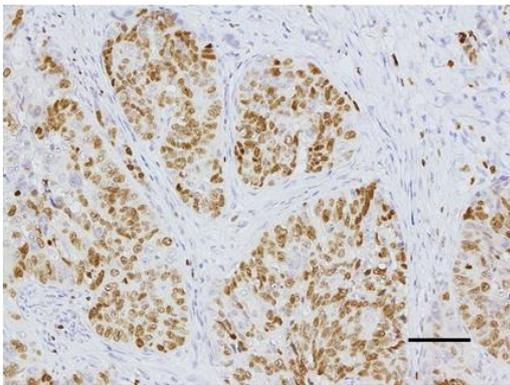
E ER



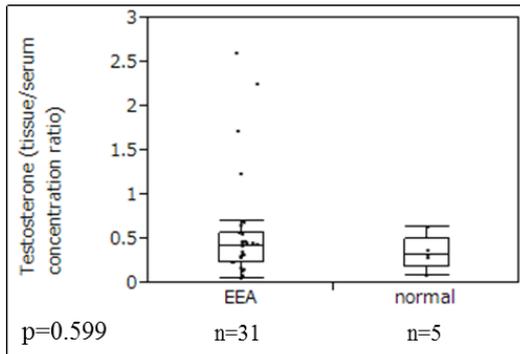
F PR



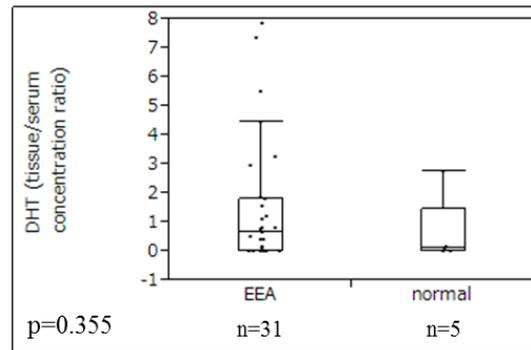
G Ki67



Testosterone

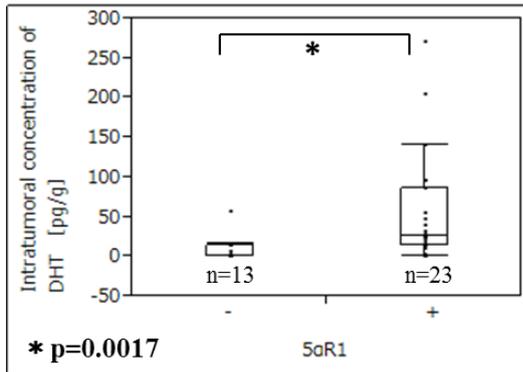


DHT

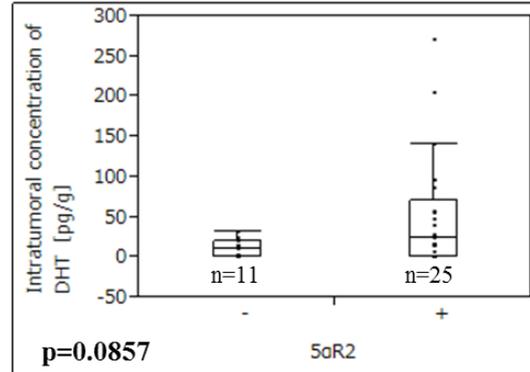


☒ 4

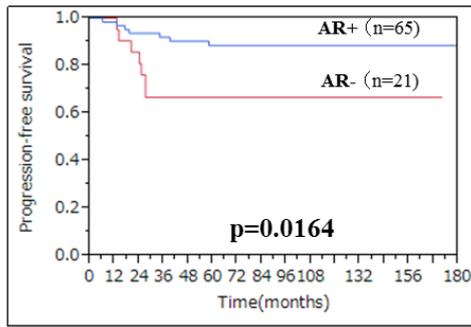
Intratatumoral DHT & 5 α R1 status



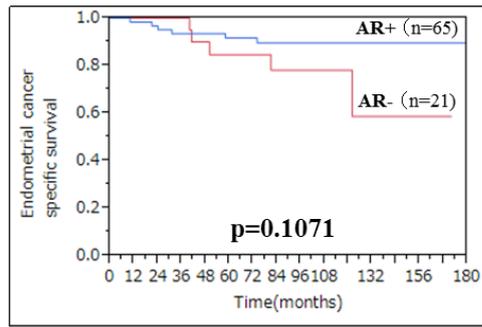
Intratatumoral DHT & 5 α R2 status



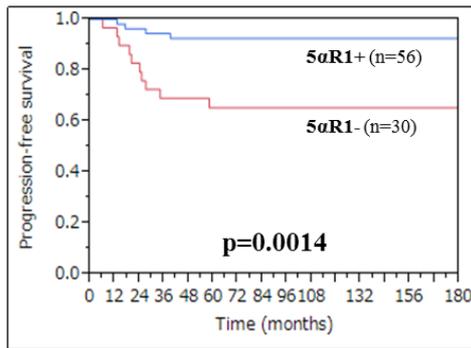
A AR status & PFS



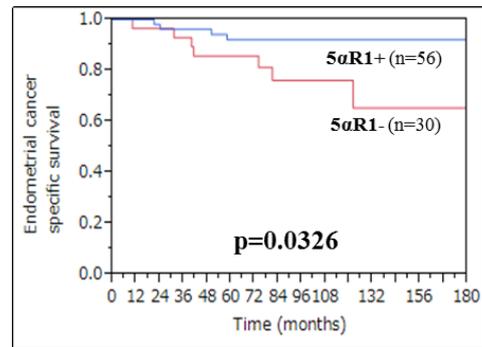
B AR status & ECSS



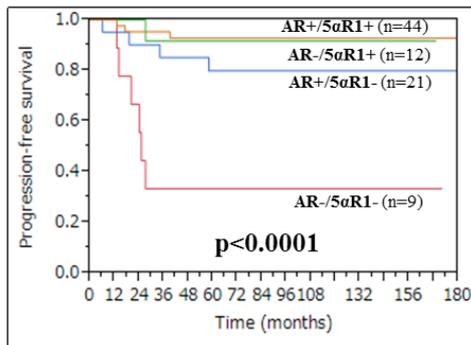
C 5αR1 status & PFS



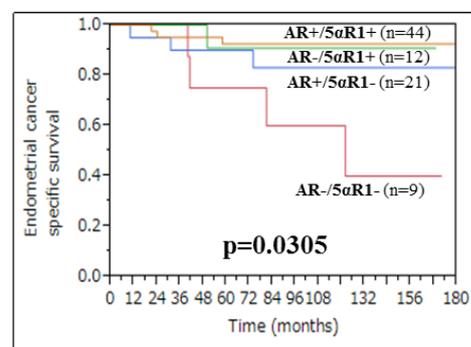
D 5αR1 status & ECSS



E AR/5αR1 status & PFS



F AR/5αR1 status & ECSS



XI 図説明

図 1

アンドロステンダイオンが 17β HSD5 によりテストステロンに変換され、さらにそのテストステロンが 5α リダクターゼにより最も効力の強い内因性アンドロゲンである DHT に変換合成される。DHT 以外のアンドロステンダイオンとテストステロンは間質細胞のアロマターゼによりそれぞれ E1 (エストロン)、E2 (エストラジオール) へ変換される。

図 2

(A) AR の免疫染色 (類内膜腺癌 G1、I A 期)、(B) AR の免疫染色 (分泌期正常内膜)、(C) 5α リダクターゼ 1 の免疫染色 (類内膜腺癌 G1、I A 期)、(D) 5α リダクターゼ 2 の免疫染色 (類内膜腺癌 G3、I A 期)、(E) ER の免疫染色 (類内膜腺癌 G2、I A 期)、(F) PR の免疫染色 (類内膜腺癌 G2、I B 期)、(G) Ki67 の免疫染色 (類内膜腺癌 G3、III A 期)

AR、ER、PR、Ki67 の免疫染色反応は癌細胞の核に認める(A,E,F,G)。一方、 5α リダクターゼ 1、 5α リダクターゼ 2 の免疫染色反応は癌細胞の細胞質に認める(C,D)。分泌期の正常内膜腺上皮細胞の核は免疫染色反応が弱い(B)。

拡大 (A~G) = 200 倍 Bar = 100 μ m

図 3

類内膜腺癌 31 症例と正常内膜 5 症例からなる 36 症例における組織中、血清中アンドロゲン濃度比の比較。類内膜腺癌 31 症例の組織学的グレードの内訳は、G1;13 症例、G2;10 症例、G3;8 症例である。類内膜腺癌 31 症例中 7 症例が閉経前で、残りの 24 症例は閉経後症例である。

類内膜腺癌 31 症例におけるテストステロンの腫瘍組織中、血清中濃度比の中央値は 0.42 (range, 0.06-2.60; mean \pm SD, 0.55 \pm 0.60)、正常内膜 5 症例の中央値は 0.32 (range, 0.08-0.64; mean \pm SD, 0.34 \pm 0.18)であった。類内膜腺癌 31 症例における DHT の腫瘍組織中、血清中濃度比の中央値は 0.63 (range, 0.00-7.84; mean \pm SD, 1.45 \pm 2.09)、正常内膜 5 症例の中央値は 0.08 (range, 0.00-2.77; mean \pm SD,

0.60 ± 1.09)であった。これらのデータはWilcoxon検定で統計学的に解析しており、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

図 4

類内膜腺癌 36 症例の 5α リダクターゼ 1 の免疫染色結果と腫瘍組織中 DHT 濃度との関連。 5α リダクターゼ 1 と 5α リダクターゼ 2 の陽性、陰性は、免疫染色反応が 50% 以上であるものを陽性とし、免疫組織化学的に評価した。

類内膜腺癌 36 症例中 23 症例 (64%) で 5α リダクターゼ 1 が陽性であった。腫瘍組織中 DHT 濃度は、 5α リダクターゼ 1 陽性群で中央値が 25.7 pg/g (range, 0.00-270.0 pg/g; mean ± SD, 54.1 ± 67.4 pg/g) で、 5α リダクターゼ 1 陰性群で中央値が 1.5 pg/g (range, 0.00-56.2 pg/g; mean ± SD, 8.3 ± 15.1 pg/g) であった ($P = 0.0017$)。同様に、類内膜腺癌 36 症例中 25 症例 (69%) で 5α リダクターゼ 2 が陽性であった。 5α リダクターゼ 2 陽性群は中央値が 24.7 pg/g (range, 0.00-270.0 pg/g; mean ± SD, 49.4 ± 67.1 pg/g) で、 5α リダクターゼ 陰性群は中央値が 9.3 pg/g (range, 0.00-32.0 pg/g; mean ± SD, 10.7 ± 10.5 pg/g) であった ($P = 0.0857$)。これら

のデータは Wilcoxon 検定で統計学的に解析しており、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

36 症例中 10 症例が閉経前で、残りは閉経後であった。

図 5

類内膜腺癌 86 症例における AR の免疫染色反応（陽性または陰性）と（A）無増悪生存期間または（B）子宮内膜癌特異的生存期間との関連。同様に 5α リダクターゼ 1 の免疫染色反応（陽性または陰性）と（C）無増悪生存期間または（D）子宮内膜癌特異的生存期間との関連。さらに AR と 5α リダクターゼ 1（それぞれ陽性、陰性）の 4 つの組み合わせと（E）無増悪生存期間または（F）子宮内膜癌特異的生存期間との関連。

AR の陽性、陰性は免疫組織化学的に評価を行い、そのラベリングインデックス (LI) が 10%以上の症例を陽性と判定した。 5α リダクターゼ 1 も同様に免疫組織化学的に評価を行い、50%以上の免疫染色活性がある症例を陽性と判定した。

これらのデータはログランク検定を行い、統計学的に比較した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

XII 表

表 1 LC-MS/MS 法でホルモン濃度測定を行った 41 症例の臨床病理学的特徴 (2012~2013 年)

項目	数 (%)	中央値 (範囲)
閉経		
閉経前	15 (36.6)	
閉経後	26 (63.4)	
検体		
血清と組織	36 (89.4)	
組織のみ	5 (10.6)	
年齢		60 (34-81)
BMI		24.2 (17.1-42.1)
組織型		
類内膜腺癌	36 (76.6)	
正常内膜	5 (23.4)	
*進行期(FIGO 2009)		
I	25 (69.4)	
II	4 (11.1)	
III	4 (11.1)	
IV	3 (8.4)	
*グレード		
G1	15 (41.7)	
G2	11 (30.6)	
G3	10 (27.7)	
*筋層浸潤		
1/2 以内	21 (58.3)	
1/2 を越える	15 (41.7)	
*脈管侵襲		
なし	22 (61.1)	
あり	14 (38.9)	

****リンパ節転移**

陰性 23 (85.2)

陽性 4 (14.8)

***術後治療**

なし 17 (47.2)

あり 19 (52.8)

*類内膜腺癌 36 症例に限る

**リンパ節転移の解析はリンパ節摘出を施行した 27 症例を対象としており、リンパ節摘出を行わなかった 14 症例は除外している

表 2 類内膜腺癌 86 症例の臨床病理学的特徴 (1993~2003 年)

項目	数(%)	中央値 (範囲)
閉経		
閉経前	28 (32.6)	
閉経後	58 (67.4)	
年齢		57 (29-85)
追跡期間 (月)		92 (8-224)
再発または再燃	14 (16.3)	
死亡		
総数	12 (14.0)	
原病死	11 (12.8)	
他病死	1 (1.2)	
進行期 (FIGO 2009)		
I	68 (79.1)	
II	3 (3.5)	
III	13 (15.1)	
IV	2 (2.3)	
グレード		
G1	42 (48.8)	
G2	29 (33.7)	
G3	15 (17.5)	
筋層浸潤		
1/2 以内	54 (62.8)	
1/2 を越える	32 (37.2)	
脈管侵襲		
なし	62 (72.1)	
あり	24 (27.9)	
*リンパ節転移		
陰性	69 (93.2)	
陽性	5 (6.8)	
術後治療		
なし	36 (41.9)	

あり

50(58.1)

*リンパ節転移の解析はリンパ節摘出を施行した 74 症例を対象としており、リンパ節摘出を行わなかった 12 症例は除外している

表3 類内膜腺癌 36 症例の AR、5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2
の免疫染色結果 (2012~2013 年)

		AR		5 α R1		5 α R2	
		+	-	+	-	+	-
総数	36	27	9	23	13	25	11
グレード							
G1	15	12	3	8	7	12	3
G2	11	8	3	7	4	7	4
G3	10	7	3	8	2	6	4
進行期 (FIGO2009)							
I, II	29	22	7	17	12	21	8
III, IV	7	5	2	6	1	4	3

5 α R1; 5 α リダクターゼ 1、5 α R2; 5 α リダクターゼ 2

AR は検体のラベリングインデックス (LI) が 10%以上を陽性と判定した。
免疫染色の強度と範囲を考慮して、まず検体の 80%以上に免疫染色活性のあるものを陽性、20%未満のものを陰性とし、その他は陽性/陰性と判定した。陽性/陰性と判定した症例は再評価し、50%以上の免疫染色活性があるものを陽性、50%未満を陰性と判定した。

表 4 類内膜腺癌 86 症例における AR の免疫染色活性と臨床病理学的データとの関連

項目	総数 (n = 86)	AR		P 値
		+	-	
		(n = 65)	(n = 21)	
閉経				
閉経前	28	22	6	0.6513
閉経後	58	43	15	
グレード				
G1	42	36	6	0.0435
G2	29	21	8	
G3	15	8	7	
進行期				
I, II	71	54	17	0.8248
III, IV	15	11	4	
筋層浸潤				
1/2 以内	54	43	11	0.2608
1/2 を越える	32	22	10	
脈管侵襲				
なし	62	51	11	0.0247
あり	24	14	10	
*リンパ節転移				
陽性	5	3	2	0.4674
陰性	69	52	17	
摘出なし	12	10	2	
5αR1				
陽性	56	44	12	0.3825
陰性	30	21	9	
5αR2				
陽性	60	49	11	0.0515
陰性	26	16	10	

PR LI 中央値 (最小-最大) (%)	30 (0-90)	5 (0-95)	0.0521
ER LI 中央値 (最小-最大) (%)	34 (0-96)	10 (0-64)	0.0034
Ki67 LI 中央値 (最小-最大) (%)	27 (0-90)	48 (4-96)	0.0005

5 α R1; 5 α リダクターゼ 1、 5 α R2; 5 α リダクターゼ 2
LI ; ラベリングインデックス

*リンパ節転移の解析はリンパ節摘出を施行した 74 症例を対象としており、リンパ節摘出を行わなかった 12 症例は除外している

年齢、グレード、進行期、筋層浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移、5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 ; χ^2 検定
すべてのラベリングインデックス; Wilcoxon 検定
 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

表 5 類内膜腺癌 86 症例における 5 α リダクターゼ 1 の免疫染色活性と臨床病理学的データの関連

項目	総数 (n = 86)	5 α R1		P 値
		+	-	
		(n = 56)	(n = 30)	
閉経				
閉経前	28	21	7	0.1748
閉経後	58	35	23	
グレード				
G1	42	22	20	0.0488
G2	29	22	7	
G3	15	12	3	
進行期				
I, II	71	47	24	0.6499
III, IV	15	9	6	
筋層浸潤				
1/2 以内	54	33	21	0.3075
1/2 を越える	32	23	9	
脈管侵襲				
なし	62	39	23	0.4849
あり	24	17	7	
*リンパ節転移				
陽性	5	3	2	0.7637
陰性	69	46	23	
摘出なし	12	7	5	
5αR2				
陽性	60	41	19	0.3452
陰性	26	15	11	
PR 中央値				
(最小-最大) (%)		29 (0-95)	20.5 (0-90)	0.6790
ER LI 中央値				
(最小-最大) (%)		22 (0-87)	28 (0-96)	0.1654

Ki67 LI 中央値 (最小-最大) (%)	36 (0-96)	31 (0-96)	0.4299
------------------------------------	--------------	--------------	--------

5 α R1; 5 α リダクターゼ 1、 5 α R2; 5 α リダクターゼ 2
LI ; ラベリングインデックス

*リンパ節転移の解析はリンパ節摘出を施行した 74 症例を対象としており、リンパ節摘出を行わなかった 12 症例は除外している

年齢、グレード、進行期、筋層浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移、5 α リダクターゼ 1、5 α リダクターゼ 2 ; χ^2 検定
すべてのラベリングインデックス; Wilcoxon 検定
 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

表 6 類内膜腺癌 86 症例における無増悪生存期間の単変量解析と多変量解析

項目	単変量解析	多変量解析	
	P 値	P 値	HR (95% CI)
閉経 (閉経前 vs 閉経後)	0.6136	removed	—
進行期 (I/II vs III/IV)	0.0495	removed	—
グレード(G1or G2 vs G3)	0.2352	removed	—
筋層浸潤 (1/2 以内 vs 1/2 を越える)	0.9765	removed	—
脈管侵襲 (なし vs あり)	0.4452	removed	—
術後治療 (施行あり vs 施行なし)	0.3036	removed	—
*リンパ節転移 (陰性 vs 陽性 vs 摘出なし)	0.1222	removed	—
AR (陽性 vs 陰性)	0.0164	removed	—
PR (陽性 vs 陰性)	0.0018	0.0022	0.183 (0.050-0.547)
5 α R1(陽性 vs 陰性)	0.0014	0.0018	0.177 (0.048-0.531)
5 α R2(陽性 vs 陰性)	0.0672	removed	—
ER (陽性 vs 陰性)	0.4061	removed	—
Ki67 LI (10%未満 vs 10%以上)	0.9611	removed	—

5 α R1; 5 α リダクターゼ 1、5 α R2; 5 α リダクターゼ 2

LI; ラベリングインデックス

HR; hazard ratio (危険率), CI; confidence interval (信頼区間), ND; not determined (測定なし)

*リンパ節摘出を施行した症例は 74 症例 (陽性または陰性) であり、残りの 12 症例はリンパ節摘出を行わなかった (摘出なし)。

単変量解析は Kaplan-Meier 法で評価し、その統計学的な有意差はログランク検定で求めた。多変量解析はコックスの比例ハザードモデルで、すべての項目（変数）を用いて変数減少法を行って求めた。解析中に除外された項目（変数）の P 値は ‘removed’ と記した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

表 7 類内膜腺癌 86 症例における子宮内膜癌特異的生存期間の単変量解析と多変量解析

項目	単変量解析	多変量解析	
	P 値	P 値	P 値
閉経 (閉経前 vs 閉経後)	0.5625	removed	—
進行期 (I / II vs III / IV)	0.3671	removed	—
グレード(G1or G2 vs G3)	0.2412	removed	—
筋層浸潤 (1/2 以内 vs 1/2 を越える)	0.9897	removed	—
脈管侵襲 (なし vs あり)	0.4407	removed	—
術後治療 (施行あり vs 施行なし)	0.3221	removed	—
*リンパ節転移 (陰性 vs 陽性 vs 摘出なし)	0.2643	removed	—
AR (陽性 vs 陰性)	0.1071	removed	—
PR (陽性 vs 陰性)	0.0022	0.0031	0.153 (0.033-0.539)
5αR1(陽性 vs 陰性)	0.0326	0.0336	0.273 (0.071-0.904)
5αR2(陽性 vs 陰性)	0.5612	removed	—
ER (陽性 vs 陰性)	0.6659	removed	—
Ki67 LI (10% 未満 vs 10% 以上)	0.9437	removed	—

5αR1; 5αリダクターゼ 1、5αR2; 5αリダクターゼ 2

LI ; ラベリングインデックス

HR; hazard ratio (危険率), CI; confidence interval (信頼区間), ND; not determined (測定なし)

*リンパ節摘出を施行した症例は 74 症例 (陽性または陰性) であり、残りの 12 症例はリンパ節摘出を行わなかった (摘出なし)。

単変量解析は Kaplan-Meier 法で評価し、その統計学的な有意差はログランク検定で求めた。多変量解析はコックスの比例ハザードモデルで、すべての項目（変数）を用いて変数減少法を行って求めた。解析中に除外された項目（変数）の P 値は ‘removed’ と記した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。