人髄膜腫および胸腺腫における estrogen receptor の検討

名古屋市立大学医学部第2外科

小林 俊三, 飛岡 紀彦, 佐本 常男,
田中 宏紀, 正岡 昭

Studies on the Estrogen Receptor in Human Meningioma and Thymoma

**Shunzo KOBAYASHI, Norihiko TOBIOKA, Tsuneo SAMOTO,
Hironori TANAKA and Akira MASAOKA**

Second Department of Surgery,
Nagoya City University, Medical School,
Nagoya 467, Japan

The cytoplasmic estrogen receptor was measured in 9 intracranial meningiomas and 8 thymomas. The binding affinities of the estrogen receptor derived from the tumors to various estrogens and antiestrogens were compared with that observed for the receptor from rat normal uterus. The cytoplasmic progesterone receptor was measured concomitantly.

The estrogen receptor was positive in 4 and 3 cases of meningioma and thymoma, respectively. The positive rates of estrogen receptor in those tumors did not differ from each other, however, rather low than that in breast cancer in Japan. The numbers of hormone binding sites were almost equal to those of estrogen receptor in breast cancer from premenopausal patients.

The binding affinities of estrogen receptor derived from those tumors to estrogens and antiestrogens were equivalent with that observed for rat uterine receptor. Namely, diethylstilbestrol inhibited the protein binding of tritiated 17β -estradiol to 50% by the same amount addition with the latter. Tamoxifen and epithiostanol caused 50% inhibition with 250 and 100 fold amounts, respectively. 17α -Estradiol showed median affinity. Again no differences were observed between the receptors derived from both tumors.

The progesterone receptor was not detected in all of the assayed cases. Therefore, the positive rates of this receptor seemed very low in those kinds of tumors.

These results suggest that the cytoplasmic estrogen receptor found in diverse human tumors other than meningioma or thymoma may have same biological characteristics.

Therefore, as observed in human breast cancer, so neither the positiveness of estrogen receptor nor the binding affinity to estrogens and antiestrogens will coincide directly with the hormone dependency of those tumors.

緒 言

従来、人の乳癌や子宮体部癌などでは、腫瘍組織の細胞質上清中の estrogen receptor (ERc) が hormone 依存性の良い指標として測定されてきた。これらの腫瘍では、ERc 陰性の場合には hormone 依存性は認められないが、逆に ERc 陽性の場合には同依存性の有る例と無い例とが分かれることが知られている⁹⁾。更に ERc 陽性に加えて progesterone receptor (PgRc) が認められるものでは、前者のみが陽性のものよりは hormone に依存する場合が多いことも確認されている²⁾⁴⁾。ところが、近年になって様々な良性・悪性腫瘍組織に ERc が見出されてきた³⁾¹⁰⁾¹³⁾。そのような腫瘍には、かねてから hormone 依存性がうかがわれていた髄膜腫や悪性黒色腫がある一方、従来はあまりこの面の注目を引いていなかった胸腺腫、肺癌、消化器癌なども含まれている。我々は既に日本人の頭蓋内髄膜腫、肺癌、胸腺腫、悪性リンパ腫に ERc 陽性例が相当数存在することを確認しているが⁸⁾、今回これらの内から hormone 依存性に関して相違があると思われる頭蓋内髄膜腫と胸腺腫について、ERc, PgRc を測定した。更に各 1 例の両腫瘍組織の ERc について各種 estrogens, antiestrogens との親和性をラット正常子宮由来の ERc と比較検討した。

材 料 と 方 法

気管内挿管による GOF 全身麻酔下に手術的に採取した、人頭蓋内髄膜腫 9 例、人胸腺腫 3 例、および ether 麻酔の下に採取した 4 週令の Splugue Dawley 系ラット子宮を材料とした。

estrogen receptor, progesterone receptor の測定: 腫瘍組織あるいは子宮組織を 0.001M EDT-A および 0.001M dithiothreitol を含む 5 ~ 8 倍量の 0.01M tris HCl buffer (pH 7.4) にて Ultra trax PT 1810 homogenizer を用いて homogenization した。操作は、作動 20 秒、永冷 40 秒とし、8 ~ 10 回反復した。homogenate を 4 °C、105000 xg 60 分間遠沈して上清を得、これを cytosol とした。cytosol の 0.2ml に各種濃度の [³H] 17 β -estradiol (specific activity, 108 Ci/mmol, 0.6 pmol-5.6 pmol) あるいは [³H] R 5020 (specific activity, 81 Ci/mmol, 0.2 pmol-1.0 pmol) を加え、4 °C、over night incubation した後 0.5ml の活性化 Dextran charcoal 液を加え更に 10 分間 incubate した。これを 2000rpm 10 分間遠沈して bound と free を分離し、上清の 0.2ml に 5 ml の dioxan scintillator を加え Packard Tricard B2450 型 scintillation counter にて放射能を計測した。specific bound は 100 倍量の非標識 hormone 添加時との差から求め、Scatchard plot から解離定数 (Kd), hormone 結合部位数 (NBS) を算出した。

estrogen receptor の各種 estrogens, antiestrogens との親和性の検討: ERc 陽性の髄膜腫および胸腺腫各 1 例とラット子宮 cytosol について、[³H] 17 β -estradiol と各種 estrogens, antiestrogens の Co-incubation による放射性 hormone の displacement 効果をみることによって検討した。competitor は estrogens として 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, diethylstilbestrol であり、antiestrogens としては、tamoxifen および epithiostanol である。各 cytosol の 0.2ml に 900 pM の [³H] 17 β -estradiol を加え、同時に 9 pM-90 nM の estrogens あるいは 900 pM-9 μ M の antiestrogens を加えて 4 °C、over night incubation し、Dextran charcoal 液によって bound と free を分離した上清の放射能を計測し、蛋白結合 [³H] 17 β -estradiol の各薬剤による displacement を算出した。ERc と各薬剤の親和性は control を 100 % としたときに 50 % displacement を得るに必要なそれぞれの薬剤のモル濃度を比較することによって検討した。

Table 1. Estrogen receptor in meningioma.

Histological Types	Age	Sex	Kd ($\times 10^{-10}$ M)	NBS (fmol/mg prot)
Transitional	51	F	0.7	60
Transitional	65	F	—	—
Transitional	44	F	—	—
Transitional	52	F	13	8
Transitional	70	F	2.8	4.4
Syncitial	65	F	—	—
Syncitial	49	F	—	—
Syncitial	55	M	—	—
Fibrous	81	M	9.5	127

Kd, dissociation constant

NBS, number of hormone binding sites

Table 2. Estrogen receptor in thymoma.

Histological Types	Age	Sex	Kd ($\times 10^{-10}$ M)	NBS (fmol/mg prot)
Mixed	40	M	0.5	44.5
Mixed	71	M	—	—
Lymphatic	21	M	—	—
Mixed	67	M	2.6	14.5
Epithelial	64	M	12	12
Mixed	34	F	—	—
Epithelial	31	M	—	—
Lymphatic	55	F	—	—

Kd, dissociation constant

NBS, number of hormone binding sites

結 果

髄膜腫の estrogen receptor: 9 例の髄膜腫の性別は男 2 例, 女 7 例であり, 組織型は, transitional type 5 例, syncitial type 3 例, fibrous type 1 例である。このうち 4 例(44%) に ERc 陽性であった。解離定数は 10^{-9} M 以下, 結合部位数はそれぞれ, 60, 8, 44, 127 fmol/mg prot. である (表 1)。

胸腺腫の estrogen receptor: 7 例の胸腺腫は男 6 例, 女 2 例である。ERc は 3 例 (38%) に陽性であった。解離定数は髄膜腫と同様に高親和性で, 結合部位数はそれぞれ, 44.5, 14.5, 12 fmol/mg prot. である (表 2)。

髄膜腫・胸腺腫の progesterone receptor: ERc 陽性の髄膜腫 4 例, 胸腺腫 3 例について PgRc を測定したが, いずれも陰性であった。

ラット子宮 ERc と estrogens, antiestrogens 親和性: 各剤による [3 H] 17 β -estradiol の displacement curve は平行性を示し, ERc と競合的に結合することが示された (図 1)。

Fig. 1. Displacement of protein bound [^3H]17 β -estradiol with estrogens or antiestrogens in rat uterine cytosol. Cytosol was incubated with 1nM of [^3H]17 β -estradiol and various amounts of $\blacktriangle$ non-tritiated 17 β -estradiol, $\blacksquare$ diethylstilbestrol, $\square$ 17 α -estradiol, $\circ$ epithiostanol, or $\triangle$ tamoxifen at 4° for over night. Bound and free [^3H]estradiol were separated with Dextran charcoal solution. Relative radio activities of protein bound [^3H]estradiol were plotted on the hemilogarithmic coordinates.

Fig. 2. Displacement of protein bound [^3H]17 β -estradiol with estrogens or antiestrogens in meningioma cytosol. The experimental procedure is same as described in fig. 1.

diethylstilbestrol は添加各濃度において非放射性 17β -estradiol と同等の displacement を示し両者の ERc 親和性は等価であった。一方, tamoxifen, epithiostanol はより高濃度の添加が必要で, 50% displacement を得るにはいずれもほぼ500倍当量の添加を要した。これら2種類の antiestrogens は約10000倍当量の添加で最大 level の displacement に達した。

髄膜腫・胸腺腫 ERc と estrogens, antiestrogens 親和性：ラット子宮 ERc の場合と同様に, diethylstilbestrol は非放射性 17β -estradiol と同等の親和性であった。また tamoxifen は $1/250 \sim 1/500$, epithiostanol は $1/100$ の親和性であった。更に 17α -estradiol は他の estrogens と2種 antiestrogens の中間の親和性であった。

各薬剤による $[^3\text{H}]$ 17β -estradiol の displacement curve はいずれの ERc についても平行であった (図2, 3)。但し, ラット子宮に比し, 髄膜腫, 胸腺腫では非特異的結合の割合が高かった。

Fig. 3. Displacement of protein bound $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol with estrogens or antiestrogens in thymoma cytosol. The experimental procedure is same as described in fig. 1.

考 察

人の頭蓋内髄膜腫は女性に発生頻度が高いことに加えて¹⁰⁾, 妊娠によって増悪したり, 月経周期に伴って症状が変動する例があることなどが知られており^{1) 5)}, 一部の症例では sex hormone 依存性があることが推定されていた。したがって, 髄膜腫組織の cytosol 中に ERc が高頻度に見出されることは, この腫瘍の hormone 依存性を検討していく上で重要である。我々は ERc 陽性で腫瘍の全切除が不能であった髄膜腫の1例に antiestrogen (tamoxifen) 20mg/日を4ヶ月間投与した。この間腫瘍の増大や症状の変化はなかったが, 投与中止2ヶ月後の再手術によって得た腫瘍組織での ERc 再測定で同陰性となった例を経験している⁸⁾。この現象は antiestrogen によって hormone 依存性細胞が死滅し, ERc 陰性の非依存性細胞のみが生き残ったことによると考えている。このことと先述の如き臨床的事実を考え合わせると, 髄膜腫には hormone 特に estrogen に依存する例が確かに存在すると思われる。但し, 多くの例では臨床的に hormone 依存性を示唆する症状の消長などを認めることは少なく, また各種の内分泌療法がおこなわれた例はほとんど無いので, hormone 依存性症例の頻度や依存性の程度は明らかではない。

Table 3. Estrogen receptor in human breast cancer.

estrogen receptor	menopausal status		total
	pre	post	
positive	94 (56.3 %)	101 (54.6 %)	195 (55.4 %)
negative	73 (43.7 %)	84 (45.4 %)	157 (44.6 %)
total	167 (100 %)	185 (100 %)	352 (100 %)
mean NBS (fmol/mg prot)	62	127	96
NBS number of hormone binding site			

日本人乳癌組織での ERc 陽性率は閉経の前後を問わず約 55% であるから⁷⁾, 髄膜腫での陽性率 44% はこれにほぼ近似したものである。また NBS についても, 一部の乳癌にみられる如くの高値のものは無かったが, 当教室における閉経前乳癌症例での平均値 62 fmol/mg prot. と比較しても決して少なくはない (表 3)。

ところが一方の胸腺腫については, 発生頻度に性差は無く, sex hormone 依存性を示唆するような臨床的事実も知られていないにもかかわらず, ERc 陽性率は 38% と髄膜腫と同等であった。また NBS も同様の値を示した。

ラット子宮の ERc は正常標的組織における estrogen 作用機序の研究にしばしば用いられている。この ERc に対する各種 estrogens, antiestrogens の親和性は既に報告した結果と同様であった⁶⁾。すなわち, diethylstilbestrol は 17 β -estradiol と等価であり, tamoxifen と epithiostanol は 1/300 ~ 1/500 の値を示した。髄膜腫と胸腺腫由来の ERc についてもこれらとの親和性は全く変りが無い。従来から, 乳癌や子宮体癌など hormone 依存性癌の ERc は子宮など正常標的組織の ERc と本質的な相違は無いとされている。今回の結果によれば, 髄膜腫や胸腺腫の ERc も estrogens や antiestrogens との親和性に関する限り receptor としての機能を变り無くそなえていることになる。

以上のことはこの両腫瘍の hormone 依存性という特性が, 一次的な ERc の有無によって分かれているのでは無いだけでなく, ERc の hormone 結合そのものにも差が無いことを意味している。

steroid hormone の作用には, 特異的 receptor 分子の存在に加えいわゆる post-receptor system が完結していることが必要とされる。PgRc は, estrogen 作用によって誘導される特異的蛋白質のひとつとしてこの system の完結を示すものとされている。仮りに髄膜腫と胸腺腫とが hormone 依存性の点で異なっているならば PgRc の有無に差がみられると予測したが, そのような結果は得られなかった。

PgRc が全例陰性であったことは様々な問題点を改めて提起することとなった。ひとつには今後症例数を増すことにより特に髄膜腫例で PgRc 陽性例が現われるか否かである。また両 receptor 陽性例が hormone 依存性に関してどのような態度を示すかをも明らかにせねばならない。一方見方を変えるならば, estrogen の多様な作用には progesterone を介さないものもあるわけであるから, その様な型の標的組織では PgRc の誘導を必要としない。したがって, 特に胸腺腫の場合 PgRc 以外の蛋白質が誘導されている可能性も否定出来ないであろう。

今回の検討で最も興味深い点は、乳癌などではhormone依存性の有無が先ずERcの有無で大別出来るのに比較して、髄膜腫や胸腺腫では様子が異なり、ERc陽性でhormone非依存性の例がより多くを占める可能性がうかがわれたことである。正常組織においてもestrogenの標的組織と非標的組織がERcの有無とは別にchromatinのacceptor部位によっても分かれることが知られてきており¹²⁾、これと同様の現象が腫瘍においても起っているとも想定出来る。

結 語

人の頭蓋内髄膜腫9例、胸腺腫7例について細胞質内estrogen receptor, progesterone receptorを測定した。また、両腫瘍由来ERcの各種estrogens, antiestrogens親和性をラット正常子宮由来ERcのそれと比較検討して以下の結論を得た。

- 1) 両腫瘍のERc陽性率は髄膜腫で44%、胸腺腫で38%と差は無く、また乳癌での陽性率55%と比較しても決して低くはない。
- 2) ERcのNBSは両腫瘍共に閉経前乳癌例のそれに近似する。
- 3) 両腫瘍由来ERcの各種estrogens, antiestrogens親和性はラット正常子宮由来ERcと差を認めない。
- 4) 両腫瘍はhormone依存性に関し相違があると考えられるが、このことはERcの有無、そのhormone結合特性に差があるためではない。
- 5) 両腫瘍共にPgRcは全て陰性でpost-ERc systemの完結は確認出来なかった。

材料を提供いただいた本学脳神経外科、大阪大学第1外科の諸先生、ならびにtamoxifen, epith-iostanolを提供いただいたICI pharma. KK, 塩野義製薬KKに深謝する。なお、本稿の要旨は第55回日本内分泌学会総会において発表した。

文 献

- 1) Bickerstaff, E.R., Small, J.M. and Guest, I.A.: The Relapsing course of certain meningiomas in relation to pregnancy and menstruation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 21: 89-91, 1958.
- 2) Brooks, S.C., Saunders, D.E., Singhakowinta, A. and Vitkevicius, V.K.: Relation of tumor content of estrogen and progesterone receptors with response of patient to endocrine therapy. *Cancer* 46: 2775-2778, 1980.
- 3) Donnell, M.S., Mayer, G.A. and Donegan, W.L.: Estrogen-receptor protein in intracranial meningiomas. *J. Neurosurg* 50: 499-502, 1979.
- 4) Hawkins, R.A., Roberts, M.M. and Forrest, A.P.M.: Oestrogen receptors and breast cancer: Current status. *Br. J. Surg.* 67: 153-169, 1980.
- 5) Kempers, R.D. and Miller, R.H.: Management of pregnancy associated with brain tumors. *Am. J. Obst. Gynec.* 87: 858-864, 1963.
- 6) 小林俊三, 片岡 誠, 飛岡紀彦, 石原公郎, 斉藤一史, 佐久間修三, 佐本常男, 田中宏紀: Tamoxifenの作用機序, 癌の臨床編「乳癌・内分泌療法」, 篠原出版, 東京, 1981, p.32-43.
- 7) 小林俊三: 乳癌のホルモン受容体, *臨床科学*, 17: 847-852, 1981.
- 8) Kobayashi, S., Mizuno, T., Tobioka, N., Ichimura, H., Samoto, T., Tanaka, H., Masaoka, A., Wakabayashi, S., Umemura, S., Fukuoka, H. and Nagai, H.: Sex steroid receptors in diverse human tumors. *Gann* 73: 441-447, 1982.
- 9) Nomura, Y., Kobayashi, S.,

- Takatani, O., Sugano, H., Matsumoto, K. and McGuire, W.L.: Estrogen receptor and endocrine responsiveness in Japanese versus American breast cancer patients. *Cancer Research* 37: 106–110, 1977.
- 10) Ranelletti, F.O., Carmignani, M., Marchetti, P., Natoli, C. and Iacobelli, S.: Estrogen Binding by Neoplastic Human Thymus Cytosol. *Eur. J. Cancer* 16: 951–955, 1980.
- 11) Rausing, A., Ybo, W. and Stenflo, J.: Intracranial meningioma – a population study of ten years. *Acta Neurol. Scandinav.* 46: 102–110, 1970.
- 12) Spelsberg, T.C., Webster, R.A., Pickler, G.M., Thrall, C. and Wells, D.: Role of Nuclear Proteins as High Affinity Sites (“Acceptors”) for Progesterone in the Avian Oviduct. *J. Steroid Biochem.* 7: 1091–1101, 1976.
- 13) Stedman, K.E., Moore, G.E. and Morgan, R.T.: Estrogen Receptor Proteins in Diverse Human Tumors *Arch. Surg.* 115: 244–248, 1980.
- (受付日: 57. 5. 24)