腎細胞癌の内分泌療法に関する基礎的研究

—正常腎および腎細胞癌組織内における progesterone
および androgen receptor について

大阪大学医学部泌尿器科 中 野 悦 次
(主任: 園田孝夫教授)

FUNDAMENTAL STUDY OF ENDOCRINE THERAPY FOR RENAL CELL CARCINOMA—PROGESTERONE AND ANDROGEN RECEPTORS IN NORMAL KIDNEYS AND RENAL CELL CARCINOMAS

Etsuji Nakano

Department of Urology, Osaka University Hospital

(Director: Prof. T. Sonoda, M.D.)

Recent advances in tumor biology of renal cancer, obtained in estrogen dependent tumor of hamster, leads to a clinical utilization of progesterone and testosterone as adjunct therapy for human renal cancer, and now it is generally recognized that some patients respond to endocrine therapy to a certain degree objectively or subjectively.

At present, however, there is no knowledge about what kind of patient should be selected for this therapy or which of the steroids is indicated. To answer these questions, direct measurement of progesterone receptor (PR) and androgen receptor (AR) was carried out in the cytosol of 8 normal renal tissues and 25 renal cell carcinoma tissues.

PR and AR were detected mainly by dextran coated charcoal (DCC) method, utilizing synthetic progesterone and androgen, R5020 and R1881 respectively.

Specific binding molecules to R5020 detected by DCC assay were determined 7—8s sedimentation constants with sucrose density gradient centrifugation. And the ability to this binding was not inhibited by cortisol competitively. For these reasons, it was confirmed that the specific binding protein was not a corticosteroid binding globulin (CBG) but PR itself.

Specific binding protein to R1881 detected by DCC was 8—9s molecules with sucrose density gradient. This binding was not inhibited by estradiol, therefore, the contamination of serum sex hormone binding globulin (SHBG) was avoided. But it was slightly inhibited by progesterone and R5020 competitively. Therefore, it was thought that AR was detected with non-negligible contamination of PR.

The results obtained were as follows:

1) PR was detected in all 8 normal kidneys. PR contents were lower in those below 50 years of age than in those over 50.

Out of 25 renal cell carcinoma tissues, PR was detected in 7 cases (28.0%). There was no correlation between the presence of PR and age, sex, cell type or malignancy.

2) AR was detected in 5 out of 8 normal kidneys. Since AR-negative 3 kidneys were normal portion obtained by nephrectomy due to renal cancer, it was speculated that some unknown endocrinological change had already processed in normal portion of tumor bearing kidneys.

Out of 25 renal cell carcinomas, AR was detected in 11 cases (44.0%), and no obvious correlation

was found between the level of AR and the histological character of the tumor.

3) In 6 cases, comparative study of concentration of these receptors in cancerous tissue against their normal counterpart was performed and it was revealed that in 4 cases, AR concentration was higher than that in normal controls, but lower or almost equal in other 2 cases. On the other hand, PR was surely detected in all 6 normal tissues but not detected or lower in malignant part of these specimens. This finding might show the disappearance of the differentiated biochemical function accompanied by malignant transformation.

要 旨: ヒト腎細胞癌の補助療法として, progesterone および testosterone を用いた内分泌療法が臨床的に広くおこなわれているが, その効果は15%前後とされている. しかし現在では内分泌療法は無作為におこなわれており, どのような患者が適応となるのか, あるいはいかなるホルモン剤を使用すべきかは明らかではない. このような問題を明らかにし, 内分泌療法の効果を高めるために, 正常腎も含め腎細胞癌組織内の progesterone receptor (PR) および androgen receptor (AR) の測定をおこなった.

PR の測定には合成 progesterone R 5020を用いた. DCC 法による特異的結合分子はショ糖密度勾配遠心法で 7~8S の分子量と確認し, さらに cortisol による阻害はみられず, CBG の混入は防止でき, PR と断定できた. PR は正常腎では8例全例に, 腎細胞癌では25例中7例 (28.0%) にその存在を認めた.

AR の測定には合成 androgen R 1881を用いた. DCC 法による特異的結合分子は 8~9S の沈降係数を有していた. またこの結合能は estradiol で阻害をうけないことより, SHBG の混入は防止することができた. しかし progesterone および R 5020では少し阻害がみられることから, PR の混入はあるが大部分 AR と考えられた. AR は正常腎では8例中5例に, 腎細胞癌では25例中11例 (44.0%) にその存在を認めた.

PR, AR とともに陽性の腎細胞癌は1例のみであった.

はじめに

腎細胞癌に対する治療は現在でも外科的摘除が第1に選択されるべき手段である. 一方化学療法や放射線療法も試みられるが, 所期の効果を挙げ得てない.

腎細胞癌に対する他の補助治療として, 内分泌療法も最近よくおこなわれ, progesterone あるいは testosterone の投与により腫瘍の縮小や延命効果がみられることも知られている. しかしこのような内分泌療法は, 副作用もほとんどなく, 臨床的に広く使用されているが, その効果は症例による個体差が大きく, 一般に有効例は全症例の15%程度といわれ, 有効率は決して高いものではない. さらにどのようなタイプの腎細胞癌がホルモン依存性であつて内分泌療法を適用すべきであるかは明確ではない. 著者は前報¹⁾において, 正常腎ならびに腎細胞癌の細胞質内の estrogen receptor (ER) について検討し, 正常腎では過半数に, 腎細胞癌では一部の症例ではあるが, ER を認め, 本腫瘍にはホルモン依存性のものが存在する可能性があることをすでに述べた. しかし内分泌療法をおこなう際, progesterone や testosterone あるいは anti-estrogen などの薬剤選択の理論的根拠をその研究結果から確立することは出来ないまま残されていた. そ

こで今回腫瘍組織内の progesterone および testosterone の receptor に対しても検討をおこなった. その結果は腎細胞癌に対する内分泌療法におけるホルモン剤選択に一つの指標と, その適確性を高めるための有益な示唆をもたらすものと考えられるのでここに報告する.

対 象

対象とした腎細胞癌症例は前報¹⁾と同様であり, 1975年から1979年9月までに当教室および関連施設において手術的摘除がなされた25例である. その臨床像を簡単に示すと, 男性19例, 女性6例, 年齢46歳から74歳まで平均59.6歳, 病理組織学的分類では clear cell type 19例, granular cell type 2例および mixed cell type 4例であり, その悪性度は Skinner ら²⁾の方法で示すと, grade II 16例, grade III 7例および grade IV 2例である (Table 1). 対照群として腎結石のため腎部分切除術で得た腎組織2例, 腎細胞癌で摘除された際, 肉眼的にまったく正常と思われる組織6例の計8例を用いた. なお測定に供するまで組織は摘除後直ちに-70°Cで凍結保存した.

方 法

progesterone receptor 測定には1.5mM EDTA, 1mM

Table 1 Cell type and grade of 25 renal cell carcinomas

cell type	cases
clear	19
granular	2
mixed	4
total	25

grade	cases
II	16
III	7
IV	2
total	25

thioglycerol, 10% v/v glycerol を含む 25mM Tris-HCl buffer (TETG buffer), pH 7.4 を, androgen receptor 測定には 1.5mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol を含む 10mM Tris-HCl buffer (TED buffer), pH 7.4 をもっていた。標識ステロイドホルモンは progesterone receptor 測定には ^3H -R5020 (^3H -Promegestone, New England Nuclear, NET-555, 87.07Ci/mmol), androgen receptor 測定を目的としては, ^3H -dihydrotestosterone (^3H -DHT, New England Nuclear, NET-302, 50.6Ci/mmol) および ^3H -R1881 (^3H -Methyltrienolone, New England Nuclear, NET-590, 87Ci/mmol) を使用し, 非標識化合物は Sigma 社 (progesterone, DHT, testosterone, estradiol, cortisol, dexamethasone) および NEN 社 (R1881, R5020) のものを使用した。これらステロイドの標識化合物は $1\mu\text{M}$ の, 非標識化合物は $100\mu\text{M}$ のエタノール溶液とし, 使用に際しそれぞれの receptor 測定用の buffer にて必要濃度に希釈した。

凍結保存した組織を解凍細切し, 血清の混入を防ぐため冷却した生理食塩水にて 2 回ないし 3 回洗浄した後, 組織の 4 倍量の TETG あるいは TED buffer を加え, ホモゲナイズし, $100,000\times\text{g}$, 2°C にて 1 時間超遠心し, 上清最上部の脂肪を除き cytosol を得た。

Detran coated charcoal assay (DCC assay): 前報¹⁾の estrogen receptor 測定時と同じ方法で, total binding と non-specific binding との差から specific binding を求め, Scatchard plot の解析³⁾から解離定数 (Kd) および結合部位数を求めた。cytosol 蛋白含量はウシ血清アルブミンを標準として Lowry 法⁴⁾に準じて測定をおこな

い, 結合部位数は fmol/mg. cytosol protein で表示した。

5~20% ショ糖密度勾配遠心法: ステロイドホルモンと特異的に結合した蛋白の分子量を決定するため本法をおこなった。方法は前報¹⁾にて述べた通りである。progesterone receptor 測定用 TETG buffer の場合は 48,000 rpm, 2°C にて 16 時間, androgen receptor 測定用 TED buffer の場合は 43,000 rpm, 2°C にて 15 時間超遠心をおこなった。蛋白 marker として蛍光を有する 3.5s ovalbumin および 7s γ -globulin を用いた。

各種ステロイドホルモン競合阻害試験: ステロイドホルモンと結合した蛋白が, はたしてそのホルモンに対し特異的に結合しているかについて検討するために本法をおこなった。前報¹⁾で述べた通りの方法でおこない, ^3H -R5020 に対しては dexamethasone, cortisol, testosterone, estradiol, progesterone および R5020 での阻害率, ^3H -DHT に対しては cortisol, progesterone, estradiol, testosterone および DHT での阻害率, ^3H -R1881 に対しては estradiol, progesterone, R5020, testosterone および R1881 での阻害率について検討した。

結 果

I. Specific binding affinity to R5020

progesterone receptor を検討するため, 合成 progesterone である R5020 を用い, 正常腎 8 例および腎細胞癌 25 例について 測定をおこなったところ, DCC 法にて Fig. 1 のように specific binding affinity を示すものは正常腎では 8 例全例に, 癌組織では 25 例中 7 例 (28%) に陽性であった (Table 2)。これらの解離定数ならびに結合部位数を求めたところ, 正常腎では $0.290\sim 2.11\text{ nM}$, $1.23\sim 24.15\text{ fmol/mg. cytosol protein}$ であり, 癌組織では $0.145\sim 3.800\text{ nM}$, $2.59\sim 6.00\text{ fmol/mg. cytosol protein}$ であった。また ショ糖密度勾配遠心法 にてこれら結合蛋白の分子量を求めたところ, その沈降係数が 7~8s の分子であった (Fig. 2)。さらに他のステロイドホルモンによる阻害程度をみると, testosterone および estradiol ではわずかに阻害されているが, dexamethasone および cortisol ではまったく阻害がみられず, progesterone のみが R5020 と同程度に阻害している (Fig. 3)。progesterone receptor を測定する場合, 最も問題になるのは, progesterone と比較的高い親和性をもつて結合する血清中の corticosteroid binding globulin (CBG) の混入であるが, 以上の結果 および 分子量が 7~8s であることから考え合わせ, R5020 を用いた反応

Fig. 1 (A) Saturation curve of ^3H -R 5020 binding. Cytosol was incubated for 18hr at 0°C with ^3H -R 5020 ($60\text{pM} \sim 3\text{nM}$) in the absence or presence of cold R 5020 ($0.4\mu\text{M}$) to evaluate the non-specific binding ($\bullet \cdots \bullet$). Specifically bound R 5020 ($\square \cdots \square$) was obtained by the difference between the total ($\circ \cdots \circ$) and the non-specific binding ($\bullet \cdots \bullet$). (B) Scatchard plot analysis of specifically bound ^3H -R5020

Table 2 The number of cases showing specific binding affinity to R5020

specific binding affinity to R 5020	normal tissue	cancerous tissue
positive	8	7
negative	0	18
total	8	25

系では CBG ではなく progesterone receptor そのものを検出しているものと考えられる。

II. Specific binding affinity to DHT

androgen receptor を測定するため、最初 DHT を用い正常腎 3 例、腎細胞癌 20 例について検討をおこなった。DCC 法で Fig. 4 のように specific binding affinity を求めたところ、正常腎 3 例中 3 例、腎細胞癌 20 例中 19 例にその存在を認めた (Table 3)。さらにこれを 5~20 % ショ糖密度勾配遠心法により、結合分子の沈降係数を求めたところ、大部分が 4s の分子であつた (Fig. 5)。またこの結合に対する他のステロイドホルモンによる阻害程度をみると、cortisol および progesterone では阻害はみられないが、testosterone および estradiol では阻害

Fig. 2 Sucrose density gradient centrifugation. Cytosol was incubated for 4hr at 0°C with 2nM ^3H -R 5020 with ($\circ \cdots \circ$) and without ($\bullet \cdots \bullet$) the addition of $0.4\mu\text{M}$ excess cold R 5020. Aliquots of $200\mu\text{l}$ were applied to 5~20% sucrose density gradient. The tubes were centrifugation at 2°C , 48,000rpm for 16hr, and 5 drops from the top were collected and assayed for radioactivity. The positions of ovalbumin (3.5s) and gamma globulin (7s) markers were indicated in this panell.

Fig. 3 Binding specificity. Cytosol was incubated at 0°C with 0.5nM ^3H -R 5020 and various concentration of the following steroid hormones; dexamethasone ($\times \cdots \times$), cortisol ($\times \cdots \times$), testosterone ($\triangle \cdots \triangle$), estradiol ($\square \cdots \square$), progesterone ($\circ \cdots \circ$) and R5020 ($\bullet \cdots \bullet$). The 100 % value corresponds to the non-inhibited specifically bound ^3H -R 5020.

Fig. 4 (A) Saturation curve of ^3H -DHT binding. Cytosol was incubated for 18hr with ^3H -DHT (125pM – 4nM) in the absence or presence of excess cold DHT ($0.4\mu\text{M}$) to evaluate the non-specific binding ($\bigcirc$ — $\bigcirc$). Specifically bound DHT ($\square$ — $\square$) was obtained by the difference between the total ($\bullet$ — $\bullet$) and the non-specific binding ($\bigcirc$ — $\bigcirc$). (B) Scatchard plot analysis of specifically bound ^3H -DHT.

Table 3 The number of cases showing specific binding affinity to DHT

specific binding affinity to DHT	normal tissue	cancerous tissue
positive	3	19
negative	0	1
total	3	20

Fig. 5 Sucrose density gradient centrifugation of cytosol from renal cell carcinoma. Cytosol was incubated for 4hr at 0°C with 4nM ^3H -DHT with ($\bigcirc$ — $\bigcirc$) and without ($\bullet$ — $\bullet$) the addition of 100-fold excess cold DHT. Aliquots of $200\mu\text{l}$ were applied to 5–20% sucrose density gradient. The tubes were centrifuged at 2°C , 48,000 rpm for 14hr, and $150\mu\text{l}$ were collected and assayed for radioactivity. The position of ovalbumin (3.5s) marker is indicated in this panel.

がみられる (Fig. 6). このことより DHT に対する specific binding affinity は androgen に対し特異的なものではなく, estradiol と結合し, 分子量も 4s であることから, 性ホルモンに対し高い結合能をもつ血清中の sex hormone binding globulin (SHBG) を検出したものと考えられた. このため血清中の SHBG とは結合しない合成 androgen である R1881 (Methyltrienolone) を使用し再検討した.

Fig. 6 Binding specificity. Cytosol was incubated at 0°C with 4nM ^3H -DHT and various concentration of the following steroid hormones: cortisol ($\times$ — $\times$), progesterone ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$), estradiol ($\triangle$ — $\triangle$), testosterone ($\bigcirc$ — $\bigcirc$) and DHT ($\bullet$ — $\bullet$). The 100% value corresponds to the non-inhibited specifically bound ^3H -DHT.

Ⅲ. Specific binding affinity to R1881

R1881 を用い DCC 法にて検討をおこなったところ、正常腎 8 例中 5 例、癌組織 25 例中 11 例 (44.0%) に specific binding を捉えることができた (Table 4). これらの解離定数ならびに結合部位数は正常腎では $0.188 \sim 1.029 \text{ nM}$, $1.15 \sim 4.84 \text{ fmol/mg. cytosol protein}$ であり、癌組織では $0.134 \sim 2.031 \text{ nM}$, $0.92 \sim 5.02 \text{ fmol/mg. cytosol protein}$ であつた。これを 5~20% ショ糖密度勾配遠心法で結合分子の沈降係数を求めたところ、8~9s の分子量であつた (Fig. 7). さらにこの結合に対する他のステロイドホルモンの阻害度をみると (Fig. 8), estradiol ではわずかに阻害されるだけであつて、前述の SHBG はほぼ除外できているが、progesterone および R5020 でも

Table 4 The number of cases showing specific binding affinity to R1881

specific binding affinity to R1881	normal tissue	cancerous tissue
positive	5	11
negative	3	14
total	8	25

Fig. 7 Sucrose density gradient centrifugation. Cytosol was incubated for 4hr at 0°C with 2 nM $^3\text{H-R 1881}$ with (○—○) and without (●—●) the addition of $0.4 \mu\text{M}$ excess cold R1881. Aliquots of $200 \mu\text{l}$ were applied to ~20% sucrose density gradient. The tubes were centrifuged at 2°C , $43,000 \text{ rpm}$ for 15hr, and 5 drops from the top were collected and assayed for radioactivity. The positions of ovalbumin (3.5s) and gamma globulin (7s) markers were indicated in this pannel.

Fig. 8 Binding specificity. Cytosol was incubated at 0°C with 0.7 nM $^3\text{H-R 1881}$ and various concentration of the following steroid hormones; estradiol (×—×), progesterone (□—□), R5020 (△—△), testosterone (○—○) and R1881 (●—●). The 100% value corresponds to the non-inhibited specifically bound $^3\text{H-R 1881}$.

Fig. 9 Comparison of PR concentration in normal renal cytosol between below and over 50. y.o.

ある程度の阻害のあることから、R1881 は progesterone receptor と少し結合していると考えられた。ともあれ R1881 を用いた反応系では主に androgen receptor を検出したものと考えられた。

小括：ステロイドホルモンの receptor を測定する場合には血清中の CBG および SHBG の混入をいかに避けるか非常に重要な問題となることは以上の結果より明らかであるが、R5020 および R1881 を使用すれば、この問題はほぼ解決できているものと思われる。阻害実験からみて本報告 I. で測定した結合蛋白は progesterone receptor (PR) と確認でき、またⅢで検出した結合蛋

Table 5 Dissociation constants and binding sites of progesterone and androgen receptor of cytosol from normal kidney

patient	age	sex	material ¹⁾	progesterone receptor		androgen receptor	
				kd (nM)	binding sites (f mol/mg)	kd (nM)	binding sites (f mol/mg)
1. M.M.	50	♀	St	0.535	9.49	1.029	4.84
2. T.K.	42	♂	St	0.779	1.23	0.878	1.52
3. M.N.	58	♂	Ca	1.380	5.78		
4. T.K.	74	♂	Ca	1.640	7.37	0.428	1.64
5. H.S.	46	♂	Ca	0.290	3.04	0.220	1.15
6. K.F.	65	♂	Ca	2.100	24.15	0.377	4.39
7. T.Y.	71	♀	Ca	1.040	9.94		
8. T.Y.	59	♀	Ca	0.501	4.93		

1) St: normal renal tissue surgically obtained due to stone disease
Ca: normal renal tissue in nephrectomized mass due to renal carcinoma

白は一部 PR 様分子の混入が考えられるが、大部分 androgen receptor (AR) と考えられるので、以下本報告では AR と表示し記述をすすめる。

1) 正常腎組織 8 例の PR および AR の解離定数、結合部位数を Table 5 に一括して示した。PR は全例にみられたが、さらに年齢を 50 歳未満と 50 歳以上についてその濃度を比較したところ、50 歳以上の方が高い傾向を示した (Fig. 9)。また AR は 5 例に検出できたが、残りの陰性 3 例は、年齢とは特に関係がみられず、いずれも担癌腎の正常部分であつた。

2) 腎細胞癌 25 例の cell type, grade および TNM 分類による腫瘍進展度と PR および AR の解離定数、結合部位数を Table 6 に一括して示した。25 例中 PR 陽性 7 例 (28.0%), AR 陽性 11 例 (44.0%) であり、PR および AR とともに陽性のものは 1 例のみであつた。さらに性別, cell type, grade についてわけると (Table 7, 8, 9), 男性 19 例中 PR 陽性 4 例, AR 陽性 8 例であり, 女性 6 例中 PR 陽性 3 例, AR 陽性 3 例であつた。cell type では clear cell type 19 例中 PR 陽性 5 例, AR 陽性 8 例, granular cell type 2 例中 PR 陽性 1 例, AR 陽性 1 例であり, mixed cell type 4 例中 PR 陽性 1 例, AR 陽性 2 例であつた。grade については grade II の 16 例中 PR 陽性 4 例, AR 陽性 7 例, grade III の 7 例中 PR 陽性 2 例, AR 陽性 2 例であり, grade IV では 2 例しかないが、そのうち 1 例が AR 陽性であつ

Fig. 10 Comparison of PR and AR concentration in normal and cancerous tissue.

た。以上より cell type や grade の receptor の存在については特に関係はみとめなかつた。

3) 6 症例について腫瘍部と正常部で PR および AR の結合部位数を比較したところ (Fig. 10), PR は正常部の方がすべて高く、癌化にともない PR の量は低下または陰性化がみられた。一方 AR については腫瘍部の方が高いものもみられ、一定の傾向はみられなかつ

Table 6 Dissociation constants and binding sites of progesterone and androgen receptor of cytosol from renal cell carcinoma

	age	sex	cell type ¹⁾	grade ²⁾	TNM	progesterone receptor		androgen receptor	
						kd (nM)	binding site (f mol/mg)	kd (nM)	binding site (f mol/mg)
1. J. A.	65	♂	C	II	P ₂ N ₀ M ₀ V ₀	2.800	6.00		
2. M. N.	55	♀	C	II	P ₂ N ₀ M ₀ V ₀				
3. A. T.	62	♂	C	II	P ₂ N _x M _x V ₁			0.544	3.16
4. M. N.	68	♂	C	III	P ₂ N _x M _x V ₀				
5. F. C.	69	♂	M	IV	P ₃ N _x M _x V ₀				
6. Y. I.	51	♂	C	II	P ₃ N _x M _x V ₀				
7. H. M.	65	♂	C	III	P ₄ N _x M _{1b} V ₁			2.037	4.16
8. H. K.	48	♂	C	III	P ₄ N _x M _x V ₀				
9. K. I.	50	♂	C	II	P ₂ N ₀ M ₀ V ₀				
10. S. A.	67	♀	G	II	P ₂ N _x M _{1b} V ₀	1.760	4.15		
11. M. E.	52	♀	G	IV	P ₄ N _x M _x V ₀			0.556	5.02
12. M. Y.	65	♂	C	II	P ₃ N ₀ M ₀ V ₀			0.319	0.92
13. Y. Y.	68	♂	C	II	P ₃ N ₀ M ₀ V ₀				
14. Y. I.	55	♂	C	III	P ₂ N _x M _x V ₁	1.020	6.93		
15. K. N.	60	♂	C	II	P ₂ N _x M _x V ₀				
16. M. Y.	58	♂	C	II	P ₂ N ₀ M ₀ V ₀	1.642	2.59		
17. Y. O.	54	♀	C	II	P ₂ N ₀ M ₀ V ₀	1.900	4.92		
18. S. I.	56	♂	M	II	P ₃ N ₁ M _{1a} V ₀			1.020	3.29
19. N. Y.	47	♂	M	III	P ₃ N ₁ M _{1b} V ₀	3.800	4.92		
20. M. N.	58	♂	C	II	P ₂ N ₀ M ₀ V ₀			1.250	2.26
21. T. K.	74	♂	M	II	P ₂ N _x M _{1b} V ₂			0.309	4.38
22. H. S.	46	♂	C	III	P ₃ N ₀ M _{1b} V ₀			0.581	1.26
23. K. F.	65	♂	C	II	P ₂ N ₀ M ₀ V ₀			0.396	2.04
24. T. Y.	71	♀	C	II	P ₂ N ₀ M ₀ V ₀			0.134	4.24
25. T. Y.	59	♀	C	III	P ₂ N ₀ M ₀ V ₁	0.145	2.91	0.192	1.49

1) C : clear cell type, G : granular cell type, M : mixed cell type
2) Grade of malignancy was based on the criteria by Skinner et al

Table 7 Correlation between sex and receptors

		PR (+)	AR (+)
male	19	4	8
female	6	3	3

Table 8 Correlation between cell type and receptors

cell type		PR (+)	AR (+)
clear	19	5	8
granular	2	1	1
mixed	4	1	2

Table 9 Correlation between grade and receptors

Grade	No.	PR (+)	AR (+)
Ⅱ	16	4	7
Ⅲ	7	3	3
Ⅳ	2		1

た。

考 按

hamster における estrogen 誘発腎癌は増殖、維持に estrogen を必要とする⁵⁾⁶⁾⁷⁾こと、あるいはヒト正常腎組織内には estrogen receptor が存在する⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾こと、さらには臨床的に estrogen で誘発されたのではないかと推定される腎細胞癌症例が存在する¹¹⁾¹²⁾ことなどの事実、ヒト腎細胞癌に対する progesterone や testosterone による内分泌療法施行にある程度の根拠を与えている。しかしながらその臨床的効果は前報¹⁾においても紹介したように決して満足させるものではなくて、さらには否定的な意見もみられる¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。これはヒトに自然発生した腎細胞癌が、病理学的所見や生物学的性質において多様性を示すと同様に、内分泌依存性に関しても決して均一なものではないことを意味していると考えられる。

そこで腎細胞癌に対する内分泌療法の意義を明らかにし、さらには治療効果を高めるためには、どのような症例にどのようなホルモン剤を適用すべきかを明確にするには、各々の腫瘍のホルモン依存性を示す明確な根拠が不可欠なものとなるのは当然であろう。この目的に沿って著者は前報¹⁾においてヒト腎細胞癌組織内 ER の存在を検討し、対照とした正常腎では8例中5例(62.5%)にその存在が確認されるのに対し、腫瘍では25例中5例(20.0%)の低率にしか検出しえなかつたこと、およびこの ER はより悪性度の低い腫瘍に高率に検出されることを明らかとした。以上の結果は高分化型腎細胞癌には antiestrogen の適応が考えられる場合のあることを示唆しているようである。しかし現在主に使用されている progesterone や testosterone の治療的意義については決して十分な情報をもたらすものではない。そのため今回 PR ならびに AR につき詳細に検討を加えたのであるが、以下得られた結果につき簡単に考察してみたい。

I. progesterone receptor (PR) について

現在、腎細胞癌の内分泌療法として最初に使われるものは progesterone 製剤であるが、その妥当性について

は PR の測定が不可欠である。しかし PR 測定をおこなう場合、問題となるのは前述したように CBG の混入であるが、これについては合成 progesterone R5020 は CBG とは結合せず、PR のみに結合するといわれており¹⁶⁾、著者もこの点について阻害実験で調べたところ、cortisol ではまったく阻害がみられず、CBG の混入は防止できていることを確認し得た。またショ糖密度勾配遠心法により、その結合分子が 7~8s であることから PR と断定できた。すなわち R5020を用いた反応系では DCC 法のみで十分に PR の検出ができるものと思われる。

正常腎8例について PR を検討したところ、全例にその存在を認めたが、結合部位数を50歳以上と50歳未満の症例で比較すると、50歳以上の方が高い値を示した。Concolino ら¹⁰⁾や電気泳動法にてヒト正常腎内に PR の存在することを報告しており、今回の著者の結果からもヒト腎は progesterone の標的臓器であることを十分に裏付けているといえよう。

つぎに腎細胞癌症例では25例中7例に PR をみとめることができた。さて ER や PR と progesterone 療法の効果との関係については過去2つの重要な報告をみるが、Giuliani ら¹⁷⁾は ER および PR を測定し、内分泌療法の治療効果からみると、ER の方が PR よりもその効果をよりよく反映していることを述べている。しかし Giuliani ら¹⁷⁾の receptor 検出方法では前述した CBG あるいは SHBG について検討がなされておらず、著者の考えではたして検出したものが receptor かどうかについて疑問が残っているのも事実である。また Concolino ら¹⁸⁾も23例について ER および PR の存在と内分泌療法の関係について報告し、内分泌療法による長期生存例4例のうち3例までが両者ともあるいは一方が陽性であつたことから、腎細胞癌組織内の ER および PR を測定し、両者ともあるいはどちらかが陽性であれば内分泌療法をおこない、両者とも検出されない場合は放射線療法あるいは化学療法を施行すべきであると述べている。この意見は ER や PR 測定の臨床的意義につき興味深い示唆をもたらすものであると考えられるが、彼らの結論もいまだ症例数の不足あるいは観察期間の点から確定的なものとは決していえず、著者は今後これら PR の存在と特に progesterone 療法施行の効果につき症例の長期観察をつづけてゆきたいと考えている。

II. androgen receptor (AR) について

臨床的には腎細胞癌に対する内分泌療法の第1選択として progesterone が用いられることはすでに述べたが、第2選択としては主に testosterone が用いられているのが現状である。そしてその治療効果は progesterone にまさる成績も報告され¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾興味をもたれるが、その receptor についての検討は過去にその報告をみることができない。その理由として、まず第1にその測定上の重要な問題が考えられよう。

著者は AR を測定するため、最初は testosterone の活性型である DHT を用いていたが、正常腎では全例に、腎細胞癌では大部分に陽性の結果を得た。しかしシヨ糖密度勾配遠心法により結合蛋白はほとんど 4s の分子であり、さらに他のステロイドホルモンの阻害度をみると、testosterone および estradiol でも阻害がみられることから、検出したものは receptor ではなく、血清中の SHBG の混入と考えられた。測定時に血清の混入をできるだけ防ぐため、数回生理食塩水で洗浄したが、それでも血清の混入は避けきれないものようである。

ところで最近では、SHBG とは結合せず AR に結合する合成の androgen が開発されている²²⁾。そこで著者はさらに AR 測定のため合成 androgen である R1881 を用いて再検討をおこなった。R1881 は rat 前立腺では AR のみに結合し、その蛋白は 8~9s の分子量であるといわれ、また rat 腎にも R1881 に結合する蛋白が存在していることが知られている²³⁾。しかし一方では、ヒト前立腺のように PR の存在する臓器では R1881 は PR にも結合することが報告されている²⁴⁾。また Menon ら²⁵⁾は R1881 を用いヒト前立腺の receptor を測定すると AR よりむしろ PR を測定しているとも述べている。ではヒト腎においてはどうかであろうか。前項にて著者はヒト正常腎に PR の存在することを述べたが、R1881 を用いてはたして AR が検出できるかどうかについて検討した。他のステロイドホルモンによる阻害実験によると estradiol ではほとんど阻害されないことから、血清の SHBG は除外されていると考えられた。しかし、progesterone および R5020 では testosterone ほどではないが阻害のみられることから、PR 様の蛋白の混入を完全に否定することはできないようであるが、シヨ糖密度勾配遠心法により、その結合蛋白が 8~9s の分子量であること、testosterone で最も阻害度が高いことから、主に AR を検出しているものと考えられるが、正確には R1881 binding protein と呼ぶべき分子で

ある。

以上の方法論的問題を前提として、正常腎8例について AR を測定したところ、5例にその存在を認めた。すでに mouse 腎では AR は証明され、androgen に感受性のない tfm mouse では AR が消失していることも知られている²⁶⁾。さてヒト腎が androgen の標的臓器であるとすれば、全例にその存在を認めるはずであろう。しかし3例の陰性例を認めた点については、陰性例はすべて担癌腎の正常部分であつたことから、癌化にともない正常部分における AR にすでに変化をきたしているとも考えられる。あるいは R1881 が DHT あるいは testosterone に比し、AR に結合力が強いとされている²²⁾が、すでに receptor と結合した内因性 DHT あるいは testosterone がすべて R1881 と置換されないことが原因かとも思われ、完全に置換するには別の測定方法の必要性も考慮しなければならないのかもしれない。

腎細胞癌における AR が25例中11例に検出されたことはすでに述べた通りである。またこの receptor の有無と性別・年齢・腫瘍の cell type, grade とは一定の関係はみられなかつた。しかし内分泌療法をおこなう際 progesterone とならび有効とされる testosterone の receptor が存在することをほぼ確認し得たことは、今後の内分泌療法施行において意義あることと考えられる。

Ⅲ. 腎細胞癌における性ホルモン receptor の検出

前報¹⁾において述べたように腎細胞癌症例25例のうち ER は5例に、今回の結果では PR は7例に、AR は11例に認めた。三者とも陽性の症例はなく、ER と PR が陽性のもの1例、ER と AR が陽性のもの4例、PR と AR が陽性のもの1例であつた。これは臨床的にみて progesterone 無効例でも testosterone が有効な場合がみられたり、この逆の現象が観察されるという臨床的事実とよく合致するものと推測され、receptor の測定がホルモン剤選択にあつての重要な手がかりを与えることを示唆していると考えられる。

Ⅳ. 内分泌療法の今後の問題

ヒト腎細胞癌に対する化学療法はいろいろの薬剤で試みられており、その効果についてはさまざまな報告がみられる。全く無効²⁷⁾とか、内分泌療法ほど有効でない²⁸⁾とか、化学療法剤の組合せによつては効果がみられる²⁹⁾など一致した見解はないが、少なくともいまだ満足できる段階ではない。これに比し内分泌療法は化学療法のような副作用もほとんどなく、また今回の receptor に関

する研究からも一部症例ではその効果が期待でき、試みるべき治療の一つであると考えられるが、過去の臨床報告をみても決して根治的なものではないことは十分念頭におかねばならぬことも事実であろう。また腫瘍組織内の receptor 測定の意義については PR あるいは AR が存在するからといって、必ずしも progesterone あるいは testosterone の内分泌療法に腫瘍縮小という反応や延命効果を示すとはかぎらず、逆に腫瘍の増殖を賦活するようなことがあるかもしれぬことは、たとえば androgen が renotropic action³⁰⁾ を有しており、androgen 投与により腎内の RNA の増加、蛋白合成の促進がみられるとの報告³¹⁾³²⁾からも十分推測しうることである。しかしながらまったく意味のない薬剤を選択するというような誤りをおかさないかめにもその測定は重要なものと考えられ、内分泌療法をおこなう際の薬剤選択の一つの指標になるものと考えられる。さらにステロイドホルモンの receptor 測定の真の臨床的意義は、生きた癌細胞に対するこれらホルモンの効果を検討するとともに今後症例数を重ね、内分泌療法の効果と receptor 有無についての詳細な検討を加えなければならないであろう。

さらに、ホルモン receptor 複合体が核内に入つてはじめて作用発現をきたすものであるが、この核内に入る過程を阻害する物質すなわち inhibitor の存在も明らかにされてきており、細胞質内に receptor の存在がみられても、内分泌療法に反応を示さない症例については今後この inhibitor の存在も考えていかなければならない問題であろう。

結 語

前報において著者は、ヒト腎細胞癌の内分泌療法に関する基礎的研究として、細胞質内の estrogen receptor について検討し、癌組織25例中5例にその存在を認めたことを述べたが、今回内分泌療法の適確性をさらに高めるために、臨床的に広く使用されている progesterone および testosterone の receptor について検討をおこなった。正常腎組織8例および腎細胞癌組織25例の cytosol を取り、PR は R5020 を、AR は R1881 を用いて測定をおこなった。

R5020を用いた反応系では、cortisol による阻害はみられず、またその結合蛋白はショ糖密度勾配遠心法で7~8s の分子量であることから、CBG の混入は防止でき、PR のみを検出できた。

AR を検出するため、最初は DHT を用いたところ、その結合蛋白が4s の分子量であること、また estradiol

にて競合阻害がみられることから、DHT を用いた反応系では SHBG の混入が著しく、AR は検出できなかった。このため合成 androgen である R1881を用いて再検討をおこなった。R1881 結合蛋白はその沈降係数が8~9s の分子量であること、estradiol ではほとんど阻害がみられないことから SHBG はほぼ除外できているものと考えられた。しかし progesterone および R5020 では少し阻害がみられることから、R1881 は PR とも結合しているようであるが、大部分が AR と結合していると考えられた。以上から得られた結果は次の通りである。

1) 正常腎8例中全例、癌組織25例中7例に PR を認めた。正常腎では、PR 濃度が高いのは40歳以上で、低いのは若年者であつた。癌組織では PR の存在と性別、cell type、grade については一定の相関がみられなかった。

2) 正常腎8例中5例、癌組織25例中11例に AR を認めた。正常腎では3例に陰性であつたが、いずれも癌腎の正常部分であり、癌化にともない正常部分にも変化が生じているものと推測された。癌組織では AR の存在と性別・cell type、grade には相関はみられなかった。

3) PR および AR 両者とも陽性の腫瘍は1例のみであつて、他は一方のみが陽性であつた。これは内分泌療法をおこなう際のホルモン剤選択の一つの指標になるものと思われた。

稿を終えるにあたり御指導・御校閲を賜った恩師園田孝夫教授に深甚なる謝意を表します。また本研究について終始御協力いただいた第三内科佐藤文三先生、大阪府立成人病センター泌尿器科部長古武敏彦博士に感謝致します。

本論文の要旨は第67回日本泌尿器科学会総会にて発表した。なお本研究の一部は51年度文部省科学研究費補助金157374および52年度 No. 2573395の援助を受けたものである。

文 献

- 1) 中野悦次, 松田 稔, 長船匡男, 園田孝夫, 佐藤文三, 古武敏彦: 腎細胞癌の内分泌療法に関する基礎的研究—正常腎および腎細胞癌組織内における estrogen receptor について. 日泌尿会誌, in press
- 2) Skinner, D.G., Colvin, R.B., Vermillion, C.D., Pfister, R.C. and Leedbetter, W.F.: Diagno-

- sis and management of renal cell carcinoma, a clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*, **28**, 1165—1177, 1971.
- 3) Scatchard, D.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660—672, 1941.
 - 4) Lowry, O.H., Roebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
 - 5) Matthews, V.S., Kirkmann, H. and Bacon, R.L.: Kidney damage in the golden hamster following chronic administration of diethylstilbestrol and sesame oil. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **66**, 195—196, 1947.
 - 6) Horning, E.S.: Observation on hormone-dependent renal tumours in the golden hamster. *Brit. J. Cancer*, **10**, 678—687, 1956.
 - 7) Bloom, H.J.G., Baker, W.H., Dukes, C.E. and Michley, B.C.V.: Hormone-dependent tumours of kidney. II. Effect of endocrine ablation procedures on the transplanted oestrogen induced renal tumour of the syrian hamster. *Brit. J. Cancer*, **17**, 646—656, 1963.
 - 8) Bojar, H., Balzer, K., Dreyfurst, R., Staib, W. and Wittliff, J.L.: Identification and partial characterization of oestrogen-binding component in human kidney. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **14**, 515—520, 1976.
 - 9) Bojar, H., Dreyfurst, R., Marr, K. and Staib, W.: Distribution of oestradiol receptor in human kidney. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **15**, 319—321, 1977.
 - 10) Concolino, G., Marocchi, A., Concolino, F., Sciarra, F., Silverio, F.D. and Conti, C.: Human kidney steroid receptors. *J. Steroid Biochem.*, **7**, 831—835, 1976.
 - 11) Bellet, R.E. and Squitieri, A.P.: Estrogen-induced hypernephroma. *J. Urol.*, **112**, 160—161, 1963.
 - 12) Nissenkorn, I., Servadio, C. and Avidor, I.: Oestrogen-induced renal carcinoma. *Brit. J. Urol.*, **51**, 6—9, 1979.
 - 13) Alberto, P. and Senn, H.J.: Hormonal therapy of renal carcinoma alone and in association with cytostatic drugs. *Cancer*, **33**, 1226—1229, 1974.
 - 14) Morales, A., Kiruluta, G. and Lott, S.: Hormones in the treatment of metastatic renal cancer. *J. Urol.*, **114**, 692—693, 1975.
 - 15) Bono, A.V., Benvenuti, C., Gianneo, E., Comerì, G.C. and Roggia, A.: Progesterones in renal cell carcinoma. A retrospective study. *Eur. Urol.*, **5**, 94—96, 1979.
 - 16) Philibert, D. and Raynaud, J.P.: Progesterone binding in the immature mouse and rat uterus. *Steroids*, **22**, 89—98, 1973.
 - 17) Giuliani, L., Pescatore, D., Giberti, C. and Martorana, G.: Usefulness and limitation of estrogen receptor protein (ERP) assay in human renal cell carcinoma. *Eur. Urol.*, **4**, 342—347, 1978.
 - 18) Concolino, G., Marocchi, A., Conti, C., Tenaglia, R., Silverio, F.D. and Bracci, U.: Human renal cell carcinoma as hormone-dependent tumor. *Cancer Res.*, **38**, 4340—4344, 1978.
 - 19) Bloom, H.J.G. and Wallace, D.M.: Hormones and the kidney; Possible therapeutic role of testosterone in a patient with regression of metastases from renal adenocarcinoma. *Brit. Med. J.*, **2**, 476—480, 1964.
 - 20) Jenkin, R.D.T.: Androgens in metastatic renal adenocarcinoma. *Brit. Med. J.*, **1**, 361, 1967.
 - 21) Papac, R.J., Ross, S.A. and Levy, A.: Renal cell carcinoma; analysis of 31 cases with assessment of endocrine therapy. *Amer. J. Med. Sci.*, **274**, 281—290, 1978.
 - 22) Bonne, C. and Raynaud, J.P.: Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors. *Steroids*, **26**, 227—233, 1975.
 - 23) Dube, J.Y., Tremblay, R.R. and Chapdelaine, P.: Binding of methyltrienolone to various androgen-dependent and androgen-responsive tissues in four animal species. *Hormone Res.*, **7**, 333—340, 1976.
 - 24) Asselin, J., Labrie, F., Gourdeau, Y., Bonne, C. and Raynaud, J.P.: Binding of (³H) methyltrienolone (R1881) in rat prostate and human benign prostatic hypertrophy (BPH). *Steroids*, **28**, 449—459, 1976.
 - 25) Menon, M., Tananis, C.E., Hicks, L., Hawkins, E.F., McLoughlin, M.G. and Walsh, P.C.: Characterization of the binding of a potent synthetic androgen, methyltrienolone, to human tissues. *J. Clin. Invest.*, **61**, 150—162, 1978.
 - 26) Bardin, C.W., Bullock, L.P., Janne, O. and Jacob, S.T.: Genetic regulation of the androgen receptor—a study of testicular feminization in the mouse. *J. Steroid Biochem.*, **6**, 515—520, 1975.
 - 27) Woodruff, M.W., Wagle, D., Gailani, S.D. and Jones, R. Jr.: The current status of chemotherapy for advanced renal carcinoma. *J. Urol.*, **97**, 611—618, 1967.
 - 28) Talley, R.W.: Chemotherapy of adenocarcinoma of the kidney. *Cancer*, **32**, 1062—1065, 1973.

- 29) Merrin, C., Mittelman, A., Fanous, N., Wajsman, Z. and Murphy, G.P.: Chemotherapy of advanced renal cell carcinoma with binblastin and CCNU. *J. Urol.*, **113**, 21—23, 1975.
- 30) Korenchevsky, V. and Ross, M.A.: Kidneys and sex hormones. *Brit. Med. J.*, **1**, 645—648, 1940.
- 31) Kochakian, C.D., Hill, J. and Aonuma, S.: Regulation of protein biosynthesis in mouse kidneys by androgen. *Endocrinology*, **72**, 354—363, 1963.
- 32) Dubovsky, J. and Kochakian, C.D.: Early effect of testosterone in the incorporation of uridine into RNA of mouse kidney and seminal vesicles. *Endocrinology*, **92**, 917—920, 1973.
- (1980年3月17日受付, 特別掲載)
-