

学位論文
Doctor's Thesis

乳癌組織におけるエストロゲン産生にかかわる酵素の局在と
その臨床病理学的意義について
(Localization of estrogen producing enzymes
and its clinicopathological significance in breast cancer tissue)

山 本 豊
Yutaka Yamamoto

熊本大学大学院医学研究科博士課程外科系専攻外科学第二
指導：岩瀬弘敬教授

2005年度

- ① 要旨
- ② 学位論文の骨格となる参考論文①関連論文、②その他の論文リスト
- ③ 謝辞
- ④ 略語一覧
- ⑤ 研究の背景と目的
- ⑥ 実験方法
- ⑦ 実験結果
- ⑧ 考察
- ⑨ 結語
- ⑩ 参考文献

① 要旨

[目的]乳癌のホルモン依存性増殖には癌組織へのエストロゲン供給が重要であるが、閉経後乳癌では乳癌組織におけるエストロゲン産生が最も重要であることが知られている。このエストロゲン産生に関与する酵素としてステロイドサルファターゼとアロマターゼがある。これらの酵素活性については以前より検討されているが、これらの酵素の乳癌組織内の局在に関する検討は少ない。今回我々は免疫組織化学法によりこれらの酵素の局在を検討し、加えて、これらの酵素の発現状況と臨床病理学的因子との比較検討によりこれらの酵素の発現意義について検討することを目的とした。

[対象と方法]浸潤性乳管癌組織 83 例を用いてステロイドサルファターゼとアロマターゼの局在を免疫組織化学法で検討した。また、これらの酵素発現と臨床病理学的因子や生物学的因子との関連を検討した。さらに、予後との関連についても検討した。

[結果] ステロイドサルファターゼの発現は主に腫瘍細胞の細胞質に認められた。83 例中 49 例 (59.0%) にその発現を認めた。アロマターゼは主に腫瘍組織の間質細胞の細胞質に発現を認めた。83 例中 39 例 (47.0%) にその発現を認めた。これらの酵素と臨床病理学的因子との関連では、両酵素発現はどの臨床病理学的因子とも相関が認められなかった。生物学的因子との関連では、アロマターゼは血管新生因子である vascular endothelial growth factor(VEGF)や platelet-derived epithelial growth factor(PD-ECGF)と正の相関関係を認めた。ステロイドサルファターゼとアロマターゼ発現には正の相関が見られる傾向にあった。単変量解析において両酵素と予後との関係は、アロマターゼ陽性腫瘍は陰性腫瘍に比べ無再発生存期間が長いことが示された。ステロイドサルファターゼは予後因子ではなかった。

[考察] 乳癌組織にステロイドサルファターゼとアロマターゼ発現を認めたが、それぞれ異なる細胞にその発現が認められ、両酵素が協調し、エストロゲン産生を促進し、乳癌増殖に関与している可能性が示唆された。また、両酵素の発現状態が異なることにより、乳癌治療では単にアロマターゼのみを抑制するのみでなく、ステロイドサルファターゼが発現している腫瘍ではステロイドサルファターゼ阻害剤を用いた治療法が必要となる可能性がある。

[結論] 乳癌組織では腫瘍細胞から産生されるステロイドサルファターゼと腫瘍間質細胞から産生されるアロマターゼが協調し、局所でのエストロゲン産生を促進し、乳癌増殖に関与している可能性が示唆された。

② 学位論文の骨格となる参考論文①関連論文、②その他の論文リスト

① 関連論文

1. Yamamoto, Y., Yamashita, J., Toi, M., Muta, M., Nagai, S., Hanai, N., Furuya, A., Osawa, Y., Saji, S., and Ogawa, M.
Immunohistochemical analysis of estrone sulfatase and aromatase in human breast cancer tissues.
Oncology Reports 10: 791-796, 2003.

② その他の論文リスト

1. Yamamoto, Y., Toi, M., Kondo, S., Suzuki, H., Kitamura, M., Tsuruta, K., Taniguchi, T., Mori, T., Okamoto, A., Yoshida, M., Ikeda, T. and Tominaga, T.
Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients.
Clin Cancer Res 2:821-826, 1996.
2. Toi, M., Kondo, S., Suzuki, H., Yamamoto, Y., Inada, K., Imazawa, T., Taniguchi, T. and Tominaga, T.
Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer.
Cancer 77:1101-1106, 1996.
3. Yamamoto, Y., Toi, M., Yamada, R. and Tominaga, T.
Combination effect of an angiogenesis inhibitor AGM-1470 with 5'-deoxy-5-fluorouridine, and with hormonal drugs in DMBA- induced rat mammary tumors.
Oncology Reports 2:793-796, 1995.
4. 山本豊
乳癌患者血中増殖因子。乳腺疾患—state of art—、
医学のあゆみ、別冊、医歯薬出版(株) pp.18-22, 2004 年
5. 岩瀬弘敬、山本豊、川添輝、山下啓子
乳癌のホルモン依存性
治療学 39(2),146-149,2005.

③ 謝辞

本研究は次の方々の御指導により完成に至ることができました。

御指導いただきました諸先生方に心より感謝の意を表します。

東京都立駒込病院臨床試験科・外科部長 戸井雅和先生（検体提供、実験指導、論文指導）

前愛知医科大学乳腺内分泌外科学講座 教授 山下純一先生（実験指導、論文指導）

前熊本大学医学部第二外科学講座 教授 小川道雄先生（論文指導）

熊本大学大学院医学薬学研究部乳腺内分泌外科学分野 教授 岩瀬弘敬先生（Thesis 指導）

④ 略語一覧

ER; estrogen receptor, ERE; estrogen responsive element, IGF; Insulin-like growth factor. TGF; Transforming growth factor, Efp; estrogen-responsive finger protein. PDGF; platelet-derived growth factor, VEGF; vascular endothelial growth factor, Pgr; progesterone receptor. IL; Interleukin, bFGF; basic fibroblast growth factor. E1S; estrone sulfate. E1; estrone, E2; estradiol. COX-2; cyclooxygenase-2. PD-ECGF; platelet-derived endothelial growth factor. TP; thymidine phosphorylase. 5'-DFUR; 5'-deoxy-5-fluorouridine. MDM2; murine double minute 2. RT-PCR; reverse transcriptional polymerase chain reaction. DHEA; dehydroepiandrosterone.

⑤ 研究の背景と目的

日本における乳癌患者は著しく増加傾向にあり、年齢調整罹患率は 1990 年代に胃癌を抜いて女性では最も罹患率の高い癌である¹⁾。一方、2000 年における日本での女性乳癌死亡数は約 9200 人（全癌死亡の 7.9%）で、胃癌（同 15.3%）、肺癌（同 12.6%）、結腸癌（同 9.9%）、肝癌（同 8.9%）についで第 5 位であった²⁾。また、2002 年の人口 10 万人あたりの粗死亡率は 14.9、年齢調整死亡率は 10.8 であり、1950 年から 2002 年までの約 50 年で乳癌死亡数は 6.8 倍に増加し、粗死亡率は 4.5 倍、年齢調整死亡率は 2.0 倍にそれぞれ上昇していた³⁾。どの年代でも増加しているが、特に 50 歳以降の閉経後において著しく増加している。また、2000 年では 30 歳代から 50 歳代までの日本人女性の癌死亡のうち、乳癌による死亡は胃癌、肺癌を抑えて第 1 位を占めていることはきわめて重要である。

日本の乳癌は欧米諸国と比較すると、罹患率、死亡率ともに依然として 1/3~1/4 程度である。しかしながら、アメリカ、イギリス、北欧などでは乳癌死亡率は 1990 年頃より低下してきている²⁾。この低下の原因は、タモキシフェンによる補助療法の普及とマンモグラフィ検診普及による早期乳癌発見増加によると考えられている。日本では補助療法は普及しているが、検診の普及はいまだ不十分であり、死亡率低下には結びついていない。

日本での乳癌罹患率上昇の原因は、食生活やライフスタイルの欧米化が原因とされている。乳癌のリスクファクターは、高齢、乳癌家族歴、乳癌の既往、良性増殖性乳腺疾患、未婚、未経産、高齢初産、早い初経・遅い閉経、閉経後の肥満、ホルモン補充療法などが挙げられる⁴⁾。遺伝性素因による乳癌発症は全乳癌の 5~10%とされ、その中の約 1/3 から 1/2 は BRCA1 または BRCA2 遺伝子の生殖細胞変異により生じているとされている。しかしながら、乳癌発症の多くは環境因子が大きな比重を占めており、特にエストロゲンの関与が最も重要であると考えられている。

乳癌に対する初期治療には、外科的治療、薬物治療、放射線治療がある。進行度や癌の特性によりこれらが組み合わされ治療される。薬物療法には乳癌の増殖・進展に深く関与しているエストロゲンの作用をブロックする内分泌療法といわれる抗癌剤を用いた化学療法がある。乳癌と診断されると 90%は外科的治療を受け、そのうち 10 年以内に 30%が再発する。現時点では乳癌患者の約 60%は上記治療により治癒する。

乳癌は前立腺癌、子宮体癌とならんで代表的なホルモン依存性癌である。その発生、進展にはエストロゲンが深く関与している。エストロゲンの機能発現はエストロゲンが標的細胞の核内に存在するエストロゲンレセプター (estrogen receptor;ER) に結合することにより発揮される。乳癌細胞の核内の ER にエストロゲンが結合し、エストロゲン-ER 複合体が二量体を形成して、標的遺伝子のプロモーターにある DNA 上の特異的配列である estrogen responsive element(ERE)と結合する。ここで、転写共役因子との相互作用から、ヒストンアセチル化や脱メチル化などの DNA の転写調節機構が働き、基本転写装置群の働きを介して標的遺伝子の転写活性が促進される。その結果、標的遺伝子産物の生成が促進され、生理活性が誘導され、標的臓器に特徴的なエストロゲンの機能が発現する⁵⁾。

エストロゲンが乳癌の増殖や進展に与える影響は主に3つあり、乳癌細胞の増殖促進、浸潤や転移の促進、腫瘍内の間質増生や血管新生の促進が考えられている。エストロゲンの乳癌細胞増殖にはエストロゲンにより誘導される Insulin-like growth factor(IGF)や Transforming growth factor(TGF)- α などの増殖因子によるオートクラインまたはパラクライン作用が関与していることが示されている^{6,7)}。他にもエストロゲンは細胞周期のG2停止を起こす14-3-3 σ 蛋白を分解するRING-finger-dependent ubiquitin ligaseである estrogen-responsive finger protein(Efp)を誘導し、直接、細胞回転を促進したり^{8,9)}、アポトーシスを抑制するBcl-2を誘導し、細胞死を抑制している¹⁰⁾。また、エストロゲンは蛋白分解酵素であるcathepsin D発現を促進したり¹¹⁾、trefoil protein TTF1の誘導を介して運動能を高める¹²⁾ことが示されており、転移浸潤にも関与していることが示唆されている。腫瘍細胞と間質との相互作用は、癌の増殖・進展に極めて重要な役割を演じていることが知られているが、乳癌組織ではエストロゲンにより腫瘍細胞から分泌されるTGF- α 、IGF-s、platelet-derived growth factor(PDGF)¹³⁾による線維芽細胞の増殖やコラーゲン沈着により乳癌細胞増殖の足場を提供している。また、腫瘍血管新生において最も重要な因子の一つであるvascular endothelial growth factor (VEGF)もエストロゲンにより転写が促進され、腫瘍の進展に寄与していることが示されている¹⁴⁾。

ホルモン依存性乳癌であるか否かを予測する因子としてはERとその下流遺伝子産物であるプロゲステロンレセプター(progesterone receptor:PgR)が用いられている。乳癌組織内のER、PgRの陽性率は患者の閉経状況や測定法で多少異なるが、ER陽性・PgR陽性が45~60%、ER陽性・PgR陰性が20%、ER陰性・PgR陽性が5%、ER陰性・PgR陰性が20~30%程度である¹⁵⁾。各群でのホルモン療法の効果は、ER陽性・PgR陽性の場合70~80%、ER陽性・PgR陰性の場合30~40%、ER陰性・PgR陽性の場合40~50%、ER陰性・PgR陰性の場合10%程度であり、両レセプター陰性以外はホルモン反応性ありと判断し、内分泌療法の適応となる¹⁶⁾。

ホルモン依存性乳癌においては腫瘍外にどれだけのエストロゲンが存在するか、腫瘍細胞内にどれだけのERが存在するかということがホルモン依存性増殖にとって重要である。閉経前女性におけるエストロゲン産生は主に卵巣の卵胞期の顆粒膜細胞で産生されている。閉経期になると卵巣からのエストロゲン供給は消失する。副腎皮質や卵巣黄体化間質細胞などから分泌されるアンドロステノジオンなどの男性ホルモンが種々の末梢組織においてエストロゲンに転換され血中に放出される。当初、閉経後ホルモン依存性乳癌患者のエストラジオール濃度はage match control populationと比べ高いことが予想されたが、実際には全身的なエストラジオール濃度やその代謝に差異は認められなかった。また、閉経後の血中エストラジオール濃度は閉経前の5~60倍に低下し¹⁷⁾、この血中エストラジオール濃度では十分なエストラジオールによる生物活性が得られない。しかしながら、1980年代に血中エストラジオール濃度は変わらないものの、乳癌組織内エストラジオール濃度は正常乳腺もしくは同一患者の臀部や腹部と比較して、平均して約10倍以上に上昇していること

が報告された^{18,19)}。また、乳癌組織内のエストラジオール濃度は閉経前と閉経後患者でほぼ同じ濃度であり²⁰⁻²²⁾、閉経後乳癌における腫瘍/血中エストラジオール濃度勾配は10~40倍であることが示された²³⁾。この濃度勾配の理由としては①腫瘍内に活発に血中のエストロゲンを取り込む場合、②腫瘍内に取り込まれたエストロゲンを貯蔵している場合、③腫瘍組織におけるエストロゲン産生が考えられる。近年、腫瘍局所におけるエストロゲン産生に関与する酵素の同定と酵素活性の証明により、閉経後の高い腫瘍/血中エストロゲン濃度勾配は局所産生されたエストロゲンによるものと考えられている。このエストロゲン産生に関与する2つの重要な酵素がある。1つはステロイドサルファターゼであり、この酵素は非活性型の硫酸ステロイドを加水分解し、活性型のステロイドに変換する酵素である²⁴⁻²⁶⁾。もう1つはアンドロゲンを芳香化し、エストロゲンに変換するアロマターゼである^{27,28)}。ホルモン依存性乳癌においては腫瘍内エストロゲン産生がいかに腫瘍増殖にかかわっているかを検討することは重要な事項である。

ステロイドサルファターゼは、ヒトでは12種あるサルファターゼ・スーパーファミリーの1つであり^{29,30)}、その遺伝子はX染色体短腕に位置する³¹⁾。ステロイドサルファターゼ遺伝子は10のエクソンからなり、全長は146kbである。コードされる蛋白は583アミノ酸で構成されている^{32,33)}。胎盤由来のステロイドサルファターゼは65kDaである³³⁾。ヒトではステロイドサルファターゼは精巣、卵巣、副腎、胎盤、前立腺、皮膚、脳、胎生期肺、子宮内膜、リンパ球、大動脈、腎、骨に局在している。量的に最も多い部位は胎盤である。ステロイドサルファターゼ活性はInterleukin(IL)-6、TNF- α 、basic fibroblast growth factor (bFGF)、IGF-1などのサイトカインによりup-regulateされる。一方、IL-1 β ではその活性は抑制される³⁴⁻³⁶⁾。ステロイドサルファターゼ活性は乳癌組織^{25,26,37)}および乳癌細胞株^{24,38)}に認められている。正常乳腺組織と乳癌組織におけるエストロンサルファターゼ活性を比較すると乳癌組織でその活性は有意に高い³⁹⁾。硫酸エストロン(estrone sulfate: E1S)は末梢血中に最も豊富に存在するエストロゲンであるが、非活性型であり、それ自身にはエストロゲン作用はない⁴⁰⁾。ホルモン依存性乳癌細胞ではE1Sはステロイドサルファターゼにより加水分解され生理活性を持つエストロン(estrone:E1)へ変換される⁴¹⁾。さらに、E1SはMCF-7ホルモン依存性乳癌細胞株の培養上清中でE1から変換されたエストラジオール(estradiol:E2)の核内移行を促進する⁴²⁾。以上より、E1Sおよびエストロンサルファターゼは乳癌組織におけるエストロゲン産生に重要な役割を果たしていると考えられている。

アロマターゼ蛋白は2つのポリペプチドから構成されており、1つはアロマターゼ cytochrome P-450 であり、もう1つはフラボプロテインであるNADPH cytochrome P-450 reductase である。アロマターゼにより、男性ホルモンであるアンドロゲンのC-19突出メチル基の喪失と芳香環Aの形成によって女性ホルモンであるエストロゲンへ変換される。アロマターゼ遺伝子は70kbにも及ぶ10個のエクソンから構成されている。エクソン1はDNAからmRNAまでしか転写されず、蛋白に翻訳されないが、遺伝子発現のプロモーターとしてきわめて重要な役割を果たしている。乳癌の癌化などにおいては正常とは異なる

エクソン1の部位が alternative splicing として使用されることによりアロマトラーゼ蛋白の過剰発現が認められる^{43,44)}。アロマトラーゼは卵巣、胎盤、精巣、副精巣、前立腺、脳、胎児肝、皮膚、毛根濾胞、脂肪組織、骨、血管組織にその局在は認められる⁴⁵⁾。アロマトラーゼ活性はIGF-1、IL-6、cyclooxygenase-2 (COX-2)などによって up-regulate されている。乳癌組織においてアロマトラーゼ活性や発現が確認されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。また、乳癌組織におけるアロマトラーゼ活性とその発現との間に相関関係があり⁴⁹⁾、加えて、産生されるエストロゲン量とアロマトラーゼ活性とは相関があり、エストロゲンを産生するために十分なアロマトラーゼ活性が乳癌組織中に存在することが認められている^{50,51)}。このように、アロマトラーゼもまたエストロゲンの局所産生に関して重要な役割を演じている。

腫瘍の増殖・進展に関しては、腫瘍細胞自体の性質も重要であるが、腫瘍細胞生存の足場となる腫瘍間質の状態も重要である。間質側の一因として、腫瘍血管新生は腫瘍の増殖・進展に深く関与している。乳癌において腫瘍血管新生の指標である腫瘍内微小血管密度は予後因子の1つであり、血管密度が高いほど予後が悪いことが示されている^{52,53)}。血管新生は血管新生促進因子と抑制因子との微妙なバランスの上に成り立っており、血管新生の著明な腫瘍では促進因子が増加または抑制因子が減少し、血管新生に有利な条件が整えられている。

血管新生促進因子の中で特に重要な因子はVEGFである。VEGFは血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成や血管透過性の亢進などの血管新生過程の全てに関与する強力な general endothelial growth factor である。VEGFはそのレセプターであるVEGF受容体 (Flt-1 やKDR など)を介してその機能を発揮する。VEGF受容体は主に血管内皮に発現しており、このためVEGFは血管内皮特異的に作用する。我々は乳癌組織におけるVEGFの発現を免疫組織化学や腫瘍組織抽出液のELISAを用いて検討した。VEGFの発現と腫瘍内微小血管密度とは相関があり、VEGF発現乳癌では早期再発が高いことを示した^{54,55)}。また、乳癌患者血中においてVEGFが検出でき、血中VEGF濃度と乳癌進行度、組織中VEGF発現や腫瘍内微小血管密度と相関があることを見出した⁵⁶⁾。その後の多くの検討により乳癌組織におけるVEGF発現は独立した予後因子であることが報告されており⁵⁷⁻⁵⁹⁾、乳癌の増殖・進展においてVEGFは重要な因子の1つである。VEGFとエストロゲンの関係については、MCF-7乳癌細胞においてE2はVEGF mRNA および蛋白発現を誘導し⁶⁰⁾、VEGFのプロモーター領域にEREの存在が報告されており⁶¹⁾、ホルモン依存性乳癌においてはVEGFとエストロゲンは密接な関係があることが示唆される。

別の血管新生因子である platelet-derived endothelial growth factor (PD-ECGF)についても乳癌組織での発現とその役割を検討してきた。PD-ECGFは血管内皮細胞に対する増殖促進作用はないが、遊走を促進し、血管新生を誘導する⁶²⁾。Thymidine phosphorylase (TP)は分子量55kDaのサブユニット二量体として機能するピリミジンヌクレオシド代謝に関わる酵素で、チミジンからチミンと2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸への可逆的な変換を触媒する。1992年にPD-ECGFとTPが同一蛋白であることが明らかとなった⁶³⁾。PD-ECGF/TP

による血管新生には酵素活性が必要であり、PD-ECGF/TP によるチミジンの分解産物のうち 2-デオキシ-D-リボースに血管新生活性が認められる⁶⁴⁾。PD-ECGF/TP は乳癌に発現があり、その発現と腫瘍内微小血管密度との間に正の相関関係を認めた⁶⁵⁾。また、PD-ECGF/TP と VEGF は乳癌では共発現しており、両血管新生因子が共発現している腫瘍では腫瘍内微小血管密度が高いことを示した⁶⁶⁾。また、TP は抗癌剤 5^β-deoxy-5-fluorouridine (5^β-DFUR) を 5-fluorouracil に変換する酵素であり、乳癌における TP の 5^β-DFUR の効果予測因子としての意義を見出してきている⁶⁷⁾。また、腫瘍間質で重要な役割を演じている腫瘍関連マクロファージに TP が発現している場合は予後不良であることが示されている⁶⁸⁾。以上から PD-ECGF/TP は腫瘍血管新生に関連する重要な因子の 1 つである。

今回、我々は乳癌組織内のエストロンサルファターゼとアロマトラーゼの発現を免疫組織化学法により検討した。また、これら 2 つの酵素発現と臨床病理学的因子との関連、および、両酵素発現と種々の血管新生因子を含む生物学的因子発現との関連を検討した。さらに、両酵素発現と予後因子としての意義を無再発生存期間および生存期間につき検討した。

⑥対象と方法

1) 腫瘍組織

今回の検討には1984年から1997年までに東京都立駒込病院外科で乳癌根治手術を受けた患者83例の原発性浸潤性乳管癌組織を用いた。乳癌根治手術後、摘出乳房検体より速やかに乳癌組織を切除し、液体窒素により凍結し、研究解析に用いるまで-80度で凍結保存した。

2) ステロイドサルファターゼおよびアロマトラーゼの免疫組織化学染色法による検討

免疫組織化学法によるエストロンサルファターゼ発現の検討には抗ヒト・ステロイドサルファターゼ・マウスモノクローナル抗体⁶⁹⁾を、アロマトラーゼ発現の検討には抗ヒト・アロマトラーゼ・ラビットポリクローナル抗体⁷⁰⁾を用いた。免疫組織化学染色はVector Laboratories社のavidin-biotin complex immunoperoxidase systemを用いて行った。

凍結組織をマイクロトームで4μm厚の新鮮凍結切片を作成した。この凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで10分間固定した。その後、PBSで5分間洗浄し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するために0.3%過酸化水素メタノールで10分間インキュベートした。PBSで洗浄後、背景染色を抑えるために5%正常ヤギ血清で30分間インキュベートした。その後、一次抗体(抗ステロイドサルファターゼモノクローナル抗体15μg/ml、抗アロマトラーゼポリクローナル抗体200倍希釈)を滴下し、室温で120分間インキュベートした。PBSで1回5分間洗浄を3回施行後、ビオチン化二次抗体(ステロイドサルファターゼの場合はビオチン化ヤギ抗マウスIgG、アロマトラーゼの場合はビオチン化ヤギラビットIgG)を滴下し、室温30分インキュベートした。PBSで1回5分間洗浄を3回施行後、horseradish peroxidase-conjugated streptavidinで30分間インキュベートした。蒸留水で洗浄後、0.01%過酸化水素を含む0.05%diaminobenzidine溶液で5分間インキュベートした。蒸留水で洗浄後、マイヤーヘマトキシリン溶液に20秒浸し、核染色を行った。陰性コントロールとして、一次抗体の代わりに正常マウス血清(ステロイドサルファターゼの場合)および正常ラビット血清(アロマトラーゼの場合)を用いて上述の過程を行った。

3) 腫瘍内微小血管密度および他の生物学的因子発現の検討

今回の研究に用いた83例の乳癌組織のうち64例について腫瘍内微小血管密度や血管新生因子を含む生物学的因子を免疫組織化学染色で検討した。検討した生物学的因子はVEGF、PD-ECGF/TP、p53、Bcl-2、murine double minute 2(MDM2)である。免疫組織化学染色に用いた抗体の種類、希釈倍率、インキュベーション時間などの条件を表1に示す。免疫組織化学染色は上述のVector Laboratories社のavidin-biotin complex immunoperoxidase systemを用いて行った。上記の生物学的因子発現は観察範囲の全腫瘍細胞の20%以上に染色陽性所見が得られたものを発現陽性と判定した。VEGF、PD-ECGF/TP、Bcl-2は細胞質に染色所見を認めたものを、p53とMDM2は細胞核に染色所見が得られたものを染色陽性とした。腫瘍内微小血管密度の検討は抗第8因子関連抗原に対するラビットポリクローナ

ル抗体を用いて行った。1mm² 辺りの抗第 8 因子関連抗原抗体で染色される血管内皮細胞数および血管数を計測し、血管密度が高い部位を hot spot とする。腫瘍内微小血管密度は 1 切片あたり 5 つの hot spot の血管密度を計測し、その平均値で求めた⁵⁴⁾。

表 1. 免疫組織化学染色法に用いた抗体

抗原	抗体の種類	提供元	濃度または希釈倍率	インキュベーション時間
ステロイド サルファターゼ	マウスMAb	協和発酵工業	15µg/ml	120分、室温
アロマトラーゼ	ラビットpolyAb	Dr. Osawa Y	1:200	120分、室温
VEGF	マウスMAb	東亜合成化学	1:200	120分、室温
PD-ECGF/TP	マウスMAb	日本ロッシュ	1:200	120分、室温
p53	マウスMAb	Oncogene Science	1:100	120分、室温
Bcl-2	マウスMAb	Novocastra	1:200	120分、室温
MDM2	マウスMAb	Oncogene Science	1:100	120分、室温
第8因子関連抗原	ラビットpolyAb	DAKO	1:200	120分、室温

略語: MAb: モノクローナル抗体、polyAb: ポリクローナル抗体、VEGF: vascular endothelial growth factor、PD-ECGF/TP: platelet-derived endothelial growth factor / thymidine phosphorylase、MDM2: murine double minute 2

4) 組織診断

根治手術で摘出された乳癌の組織診断は 10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片をヘマトキシリン・エオジン染色で行った。病期分類は UICC-TNM 分類に基づいて作成された日本乳癌学会取り扱い規約第 14 版に沿って行った。

5) エストロゲンレセプター測定

ER は ¹²⁵I-エストラジオールを用いた dextran-coated charcoal 法で測定した (E2R 大塚アッセイキット、大塚アッセイ研究所、徳島)。乳癌組織に 5fmol/mg protein 以上の ER がある場合を ER 陽性と判定した。

6) 統計解析

対応のない 2 群の解析には χ^2 検定もしくは unpaired t-test を用いて検討した。無再発生存期間や全生存期間は Kaplan-Meier 法で計算し、ステロイドサルファターゼやアロマトラーゼの発現状況による生存期間の差は log-rank test を用いて統計解析を行った。p 値が 0.05 未

満の場合、統計学的に有意と判断した。

⑦ 結果

1) 乳癌組織におけるステロイドサルファターゼの発現

乳癌組織におけるステロイドサルファターゼ発現は主に腫瘍細胞の細胞質に認められた (図 1 A)。正常乳腺組織や腫瘍間質にはステロイドサルファターゼの発現は認めなかった。乳癌組織において 83 例中 49 例 (59.0%) にステロイドサルファターゼの過剰発現を認めた。

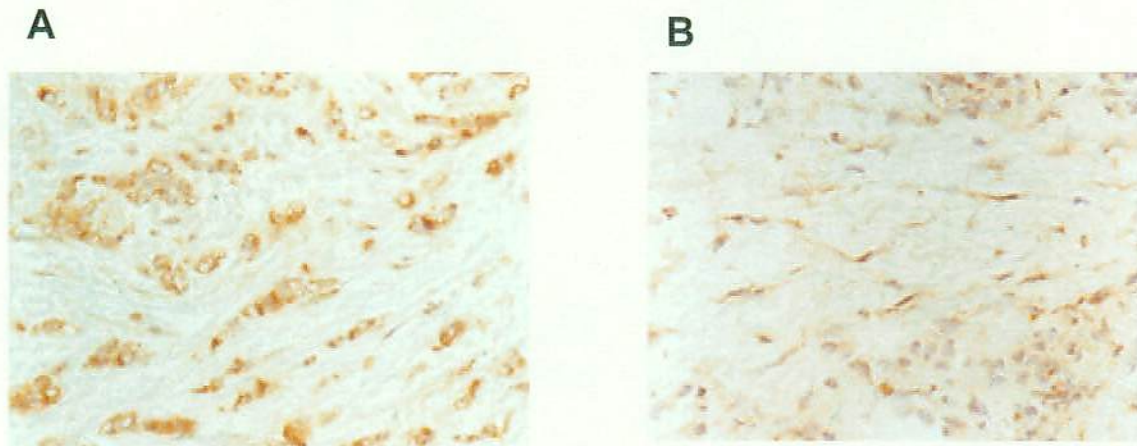


図1. 免疫組織化学法によるステロイドサルファターゼとアロマトラーゼの発現。
A)ステロイドサルファターゼは主に腫瘍細胞の細胞質に発現が認められた。
B)アロマトラーゼは主に腫瘍間質の間質細胞の細胞質に発現が認められた。

2) ステロイドサルファターゼ発現と臨床病理学的因子および生物学的因子との相関

ステロイドサルファターゼ発現と閉経の有無とは関連がなく、年齢、ER、腫瘍径、リンパ節転移の有無、組織型などの臨床病理学的因子との相関は認めなかった (表 2)。また、ステロイドサルファターゼと生物学的因子との関連については、腫瘍内微小血管密度、VEGF、RD-ECGF/TP、p53、Bcl-2、MDM2 との間に正の相関関係は認められなかった (表 3)。

3) 乳癌組織におけるアロマトラーゼの発現

乳癌組織におけるアロマトラーゼ発現は主に腫瘍間質細胞の細胞質に認められた (図 1 B)。腫瘍細胞での発現は認めないものが多く、染色される場合もきわめて弱いものであった。また、正常乳腺組織にはアロマトラーゼの染色陽性所見は認められなかった。乳癌組織における腫瘍間質細胞のアロマトラーゼ過剰発現は 83 例中 39 例 (47.0%) に認められた。

4) アロマトラーゼ発現と臨床病理学的因子および生物学的因子との相関

アロマトラーゼ発現と閉経の有無とは関連がなく、年齢、ER、腫瘍径、リンパ節転移の有無、組織型など臨床病理学的因子との相関は認めなかった (表 2)。また、アロマトラーゼと生物学的因子との関連については、血管新生促進因子である VEGF ($p=0.047$) および

RD-ECGF/TP (p=0.046) と正の相関関係を認めた。しかしながら、腫瘍内微小血管密度とは正の相関関係は認められなかった。また、p53、Bcl-2、MDM2とも関連性は認められなかった(表3)。

表2. ステロイドサルファターゼおよびアロマトラーゼ発現と臨床病理学的因子との関連

		ステロイドサルファターゼ			アロマトラーゼ		
		-	+	p value	-	+	p value
症例数		34	49		44	39	
年齢中央値		48.0	50.5	n.s.	50.0	49.0	n.s.
閉経状態	前	17	23	n.s.	22	18	n.s.
	後	17	26		22	21	
ER	陰性	20	25	n.s.	26	19	n.s.
	陽性	14	24		18	20	
腫瘍径	-2 cm	3	4	n.s.	2	5	n.s.
	2-5 cm	18	25		24	19	
	5- cm	13	20		18	15	
リンパ節転移	陰性	10	19	n.s.	13	16	n.s.
	陽性	24	30		31	23	
組織型	硬癌	8	15	n.s.	12	11	n.s.
	乳頭腺管癌	15	18		17	16	
	充実腺管癌	10	14		13	11	
	その他	1	2		2	1	
補助療法での タモキシフェン	なし	14	17	n.s.	13	18	n.s.
	あり	20	32		31	21	

表3. ステロイドサルファターゼとアロマトラーゼ発現と生物学的因子との相関

	ステロイドサルファターゼ			アロマトラーゼ			
		-	+	p value	-	+	p value
症例数		29	35		31	33	
MVD	-100	14	15	n.s.	14	15	n.s.
	101-	15	20		17	18	
VEGF	-	14	13	n.s.	17	10	0.047
	+	15	22		14	23	
PD-ECGF/TP	-	16	15	n.s.	19	12	0.046
	+	13	20		12	21	
P53	-	19	16	0.11	15	20	n.s.
	+	10	19		16	13	
Bcl-2	-	11	10	n.s.	12	9	n.s.
	+	18	25		19	24	
MDM2	-	17	15	n.s.	16	16	n.s.
	+	12	20		15	17	

略語:MVD;microvessel density(微小血管密度)VEGF;vascular endothelial growth factor、PD-ECGF/TP;platelet-derived endothelial growth factor / thymidine phosphorylase、MDM2;murine double minute 2

5) ステロイドサルファターゼとアロマトラーゼとの相関

乳癌組織においてステロイドサルファターゼとアロマトラーゼ発現は、両酵素とも発現陽性が27例(32.5%)、ステロイドサルファターゼ陽性/アロマトラーゼ陰性が22例(26.5%)、ステロイドサルファターゼ陰性/アロマトラーゼ陽性が12例(14.5%)、両酵素とも陰性が22例(26.5%)であった。両酵素の相関関係は統計学的には有意ではないが、共発現する傾向が示された(表4)。

表4. ステロイドサルファターゼとアロマトラーゼ発現との関連

	ステロイドサルファターゼ		p = 0.075
	-	+	
アロマトラーゼ	-	22	22
	+	12	27

6) 乳癌におけるステロイドサルファターゼ発現と予後

無再発生存期間に関しては、ステロイドサルファターゼ陽性群と陰性群では有意差は認められなかった (図 2a)。全生存期間に関しては、統計学的には有意ではないが、ステロイドサルファターゼ陽性群は陰性群に比べ、予後が良い傾向が認められた (図 2b)。

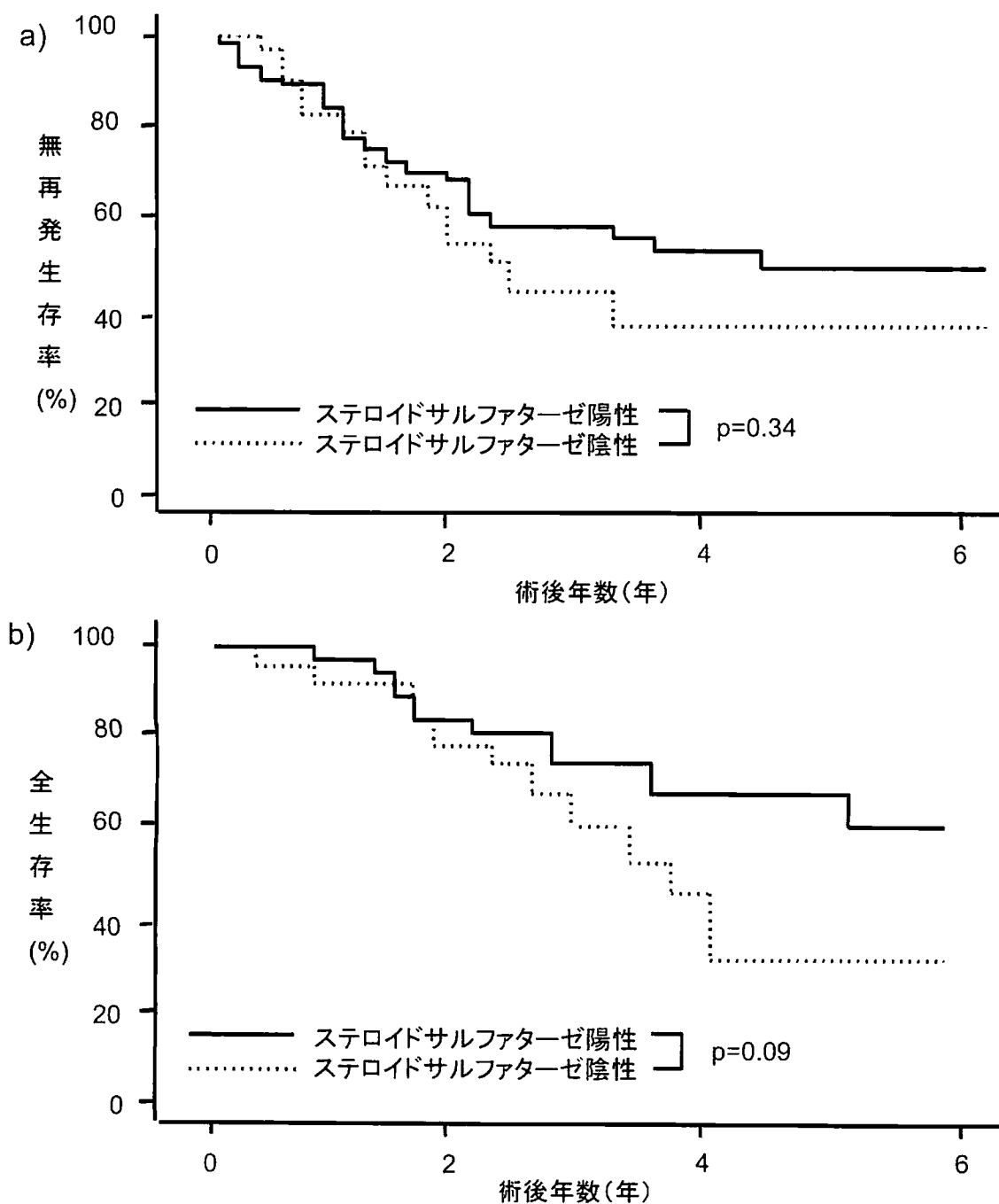


図3. ステロイドサルファターゼ発現状態によるa)無再発生存率とb)全生存率のKaplan-Meier曲線。両群間の比較はlog-rank testで行った。

7) 乳癌におけるアロマターゼ発現と予後

無再発生存期間に関しては、アロマターゼ陽性群は陰性群に比べ有意に予後が良いことが示された ($p=0.045$) (図 3a)。全生存期間に関しては、統計学的には両群間に有意差はみとめられなかった (図 3b)。

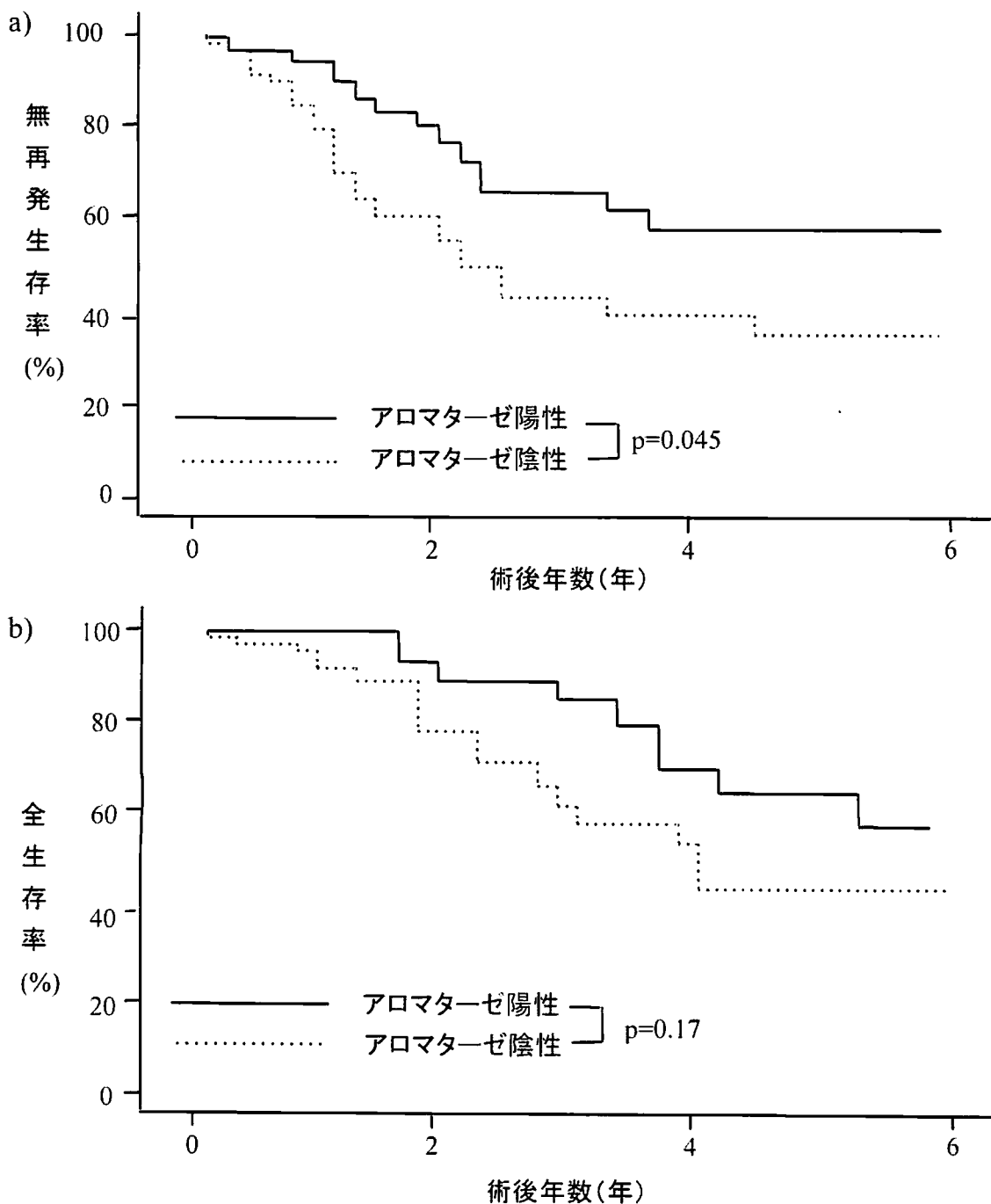


図3. アロマターゼ発現状態によるa)無再発生存率とb)全生存率のKaplan-Meier曲線。両群間の比較はlog-rank testで行った。

⑧ 考察

今回、我々は免疫組織化学染色法を用いて乳癌組織におけるエストロゲン局所産生に深くかかわる2つの酵素の局在を明らかにした。1つは非活性型のE1Sを活性型のE1へ変換するステロイドサルファターゼである²⁴⁻²⁶⁾。もう1つは男性ホルモンであるアンドロゲンを芳香化し、女性ホルモンであるエストロゲンに変換するアロマターゼである^{27,28)}。

ステロイドサルファターゼは血中や腫瘍内E1S濃度に依存して、組織内エストロゲンを増加させることができる⁷¹⁾。E1Sは血中の最も豊富に存在するエストロゲンであり⁷²⁾、ステロイドサルファターゼがヒトおよびラット乳癌の腫瘍組織における局所エストロゲン産生に重要な役割を演じていることは知られていた²⁵⁾。今回の免疫組織化学染色によるステロイドサルファターゼの局在の検討では、主に、乳癌細胞の細胞質に発現を認め、腫瘍間質や正常乳腺にはその発現を認めなかった。Saekiらも免疫組織化学染色により我々と同様の結果を得ている⁶⁹⁾。しかしながら、Speirsらは乳癌組織由来の乳癌細胞や間質細胞を用いたreverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR)によるステロイドサルファターゼの解析では両細胞にその発現を認めたことを報告しているが、免疫組織化学染色による検討では、ステロイドサルファターゼの発現は腫瘍細胞と間質細胞を比較すると、腫瘍細胞でより強く発現していることを示している⁷³⁾。Suzukiらはlaser captured microdissectionにより乳癌組織中の癌細胞と間質細胞をそれぞれ分離摘出し、STS mRNAについて検討し、癌細胞のみでSTS発現を認めたことを報告している⁷⁴⁾。われわれの結果と文献報告されている結果とを考慮すると、腫瘍間質よりも腫瘍細胞からのステロイドサルファターゼが局所エストロゲン産生に重要であることが示唆される。

もう1つの局所エストロゲン産生で重要な酵素であるアロマターゼは、正常女性では閉経後、卵巣からのエストロゲン供給が消失すると、副腎皮質から分泌されたアンドロゲンを脂肪組織、筋組織、肝などでエストロゲンに変換し、内分泌的作用により末梢組織にエストロゲンを供給する。しかしながら、閉経後の血中エストロゲン量は微量であり、乳癌においてはこの内分泌的作用により供給されるエストロゲンよりは乳癌組織で局所産生されるエストロゲンが量的にも多く、重要な役割を果たしている。乳癌組織におけるアロマターゼ活性は、ステロイドサルファターゼ活性に比べ少ないが、乳癌細胞の増殖促進をするための十分なエストロゲン産生は可能である。今回の検討で、アロマターゼは乳癌間質細胞の細胞質に発現が認められたが、腫瘍細胞にはほとんど発現は認められなかった。Luらの乳癌組織におけるin situ hybridizationによるmRNA発現解析では、腫瘍細胞および間質細胞いずれにもアロマターゼmRNA発現を認めたと報告している⁷⁵⁾。免疫組織化学染色法による検討でも腫瘍細胞および間質細胞の両者に発現を認めたものと、間質細胞のみに発現を認めたものとが報告され、アロマターゼ発現部位については議論がある^{47,75-78)}。最近の免疫組織化学染色による検討ではアロマターゼに対するモノクローナル抗体では主に腫瘍細胞と間質細胞が染色され、ポリクローナル抗体では間質細胞のみ染色されることが報告されている^{78,79)}。ポリクローナル抗体による染色の方が染色される細胞の種類が少

なくなる理由については不明である。今回の検討で用いたアロマターゼに対する抗体はポリクローナル抗体であり、報告内容と一致する。Santenらは間質細胞にアロマターゼを発現している乳癌の方が、腫瘍細胞にアロマターゼを発現している乳癌より組織学的悪性度が高いことを示している。また、間質細胞のアロマターゼ活性は腫瘍細胞のアロマターゼ活性とは相関がないが、組織スコアとは相関することが示されている^{78,80)}。これらの結果から、局所エストロゲン産生においては腫瘍細胞に発現するアロマターゼよりも間質に発現するアロマターゼがより重要であることが示唆される。

上記のようにアロマターゼに対する抗体を用いた免疫染色結果が報告者により異なる。染色結果が交代や報告者により異なると臨床応用は困難である。臨床応用可能なアロマターゼ染色法が得られていない原因としては、作成された抗体の特性や妥当性の検討が不十分であること、染色結果の検討が少数の病理医で行われてきたこと、アロマターゼ染色のスコアリングシステムやグレイディングシステムなどの定量化が行われず再現性に乏しかったこと、組織内アロマターゼ活性とアロマターゼ染色との相関に関する検討が少ないことなどが考えられている。そこで、最近ではホルマリン固定標本用に、より免疫染色に適した抗体作成を国際的な共同研究で行われている。無処理のアロマターゼ抗原およびホルマリン固定処理したアロマターゼ抗原を用いてマウスを免疫し、26種のマウスモノクローナル抗体が作成された。アロマターゼ染色強度はスコアリングシステムを用いて半定量化し、染色結果は世界4カ国の複数の病理医によって判定された。組織マイクロダイセクションのRT-PCRの結果と合致する発現部位（癌細胞と癌間質細胞、脂肪細胞）に染色が認められた2種（#677、F2）の抗体がホルマリン固定標本用として選ばれた⁸¹⁾。#677は無処理のアロマターゼ抗原由来であり、F2はホルマリン固定処理されたアロマターゼ抗原由来の抗体である。この2種の抗体を用いて、乳癌組織中のアロマターゼ活性と組織内アロマターゼ発現との相関が検討された。#677による免疫組織化学染色において、腫瘍細胞の染色強度と組織中アロマターゼ活性との間に正の相関関係が認められた⁸²⁾。間質細胞の染色強度やF2を用いた腫瘍細胞および腫瘍間質細胞の染色強度と組織アロマターゼ活性との間に有意な相関関係は認められなかった。ホルマリン固定標本を用いたアロマターゼ染色に適した抗体は#677と判定され、今後は#677を用いたアロマターゼ染色とアロマターゼ阻害剤の治療効果との関連性の検討等が予定されている。ステロイドサルファターゼ染色に関しては同様の検討は現在まで行われていない。

今回の免疫組織化学染色による結果から、ステロイドサルファターゼは腫瘍細胞で産生分泌され、血中から組織へ移行したE1SをE1に変換する。また、間質細胞はアロマターゼを産生分泌し、血中から移行したアンドロゲンをエストロゲンに変換する。in vitroにおいてはTNF- α 、IL-6、COX-2などのサイトカインによりアロマターゼはup-regulationされている⁸³⁻⁸⁵⁾。また、乳癌組織においてもアロマターゼとこれらのサイトカイン発現との間に有意な相関関係が認められている⁸⁶⁻⁸⁸⁾。腫瘍細胞から分泌されたTNF- α 、IL-6、COX-2などのサイトカインにより間質細胞でのアロマターゼ産生が促進されていると思われる。

アロマターゼにより変換されるアンドロゲンの多くはアンドロステジオンであり、アロマターゼはこれを E1 へ変換する。今回検討していないが両酵素により産生された E1 は 17 β -水酸化ステロイド脱水素酵素 1 型により E2 に変換され、乳癌細胞の ER へ結合し、エストロゲン作用を発揮する (図 4)。17 β -水酸化ステロイド脱水素酵素 1 型は腫瘍細胞で産生されていることが免疫組織化学染色により確認され、さらに乳癌組織においては 17 β -水酸化ステロイド脱水素酵素 1 型の発現亢進が認められている⁸⁹⁾。

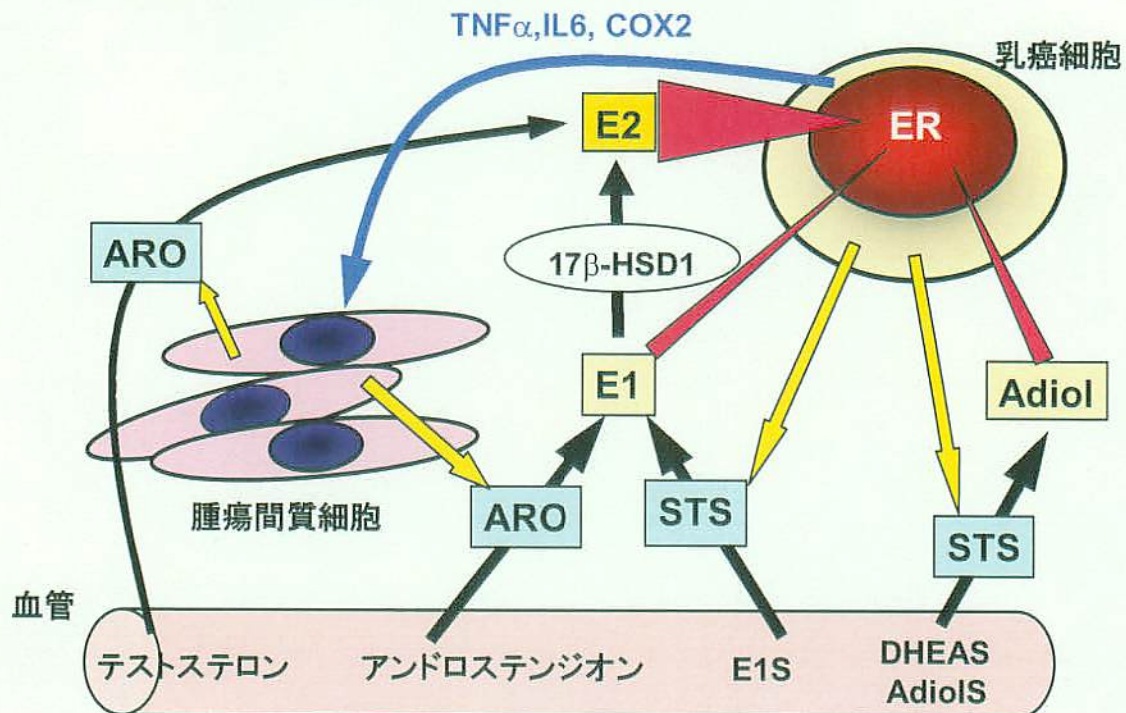


図4. 乳癌組織におけるステロイドサルファターゼとアロマターゼの役割

略語: STS;ステロイドサルファターゼ、ARO;アロマターゼ、17 β -HSD1;17 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型
E1;エストロン、E2;エストラジオール、Adiol;アンドロステネジオール、AdiolS;硫酸アンドロステネジオール、
DHEAS;硫酸デヒドロエピアンアンドロステロン

今回の検討では、乳癌組織にステロイドサルファターゼやアロマターゼ発現を認めているが、腫瘍内 ER 発現とは相関がなかった。ステロイドサルファターゼと ER との関係については主にその酵素活性で検討されているが、今回と同様に、アロマターゼ活性と腫瘍内 ER 発現とは相関がなかったことが示されている^{17,38,90)}。また、アロマターゼと ER の関係についても相関がないことが報告されている^{47,75,91)}。これらの結果より、ステロイドサルファターゼやアロマターゼの発現調節は ER とは関連なく行われていることが示唆される。また、ホルモン非依存性乳癌においても両酵素が過剰発現している場合があることを示している。今回はホルモン非依存性乳癌における両酵素の役割について示唆される所見を得ることはできなかったが、何らかの役割を果たしていることが考えられる。

卵巣機能廃絶後にエストロゲン産生の際は局所産生されるようになると考えていたが、局所エストロゲン産生に関与するステロイドサルファターゼ、アロマターゼともに閉経の有無とは関連がなく、閉経前の乳癌組織においても両酵素の発現が認められた。閉経前においても乳癌組織においてエストロゲン産生が活発に行われていることが示唆された。

ステロイドサルファターゼは臨床病理学的因子および生物学的因子との相関は認めなかったが、アロマターゼは血管新生因子である VEGF および PD-ECGF/TP と正の相関関係を認めた。しかしながら、腫瘍内微小血管密度との正の相関関係は認められなかった。VEGF は血管内皮細胞特異的な増殖因子であるが、強力な血管透過性を有し、腫瘍組織内に血管内皮前駆細胞やマクロファージを誘導する⁹²⁾。また、樹状細胞の成熟を抑制する作用など免疫系への作用も有する⁹³⁾。PD-ECGF/TP は本来チミジンヌクレオシド代謝に関する酵素である。アロマターゼは血管新生よりも VEGF や PD-ECGF/TP の持つ血管新生因子としての作用以外の作用に関与している可能性もあると思われる。加えて、第 8 因子関連抗原に対する抗体を用いた微小血管密度測定では既存の血管も測定されており、純粋に新生した微小血管を同定していない可能性もあるため、必ずしも血管新生因子との相関関係が腫瘍内微小血管密度に反映していない可能性もある⁹⁴⁾。

両酵素の予後因子としての意義については、ステロイドサルファターゼは予後因子としての意義は認められなかった。しかしながら、単変量解析においてステロイドサルファターゼは全生存期間について、ステロイドサルファターゼ陽性乳癌は陰性乳癌に比べ予後が良い傾向が見られた。Evans らはステロイドサルファターゼ活性と予後との間に有意な相関関係はなかったと報告している^{39,95)}。一方、無再発生存期間に関してはステロイドサルファターゼ mRNA 量が多いほど予後不良であるとの報告もある^{96,97)}。加えて、Suzuki らは免疫組織化学法を用いた検討では、ステロイドサルファターゼ染色陽性例のうち特に発現の強いものは予後不良であることを報告している⁷⁴⁾。これらの報告は今回の検討結果とは相反するものとなっている。いずれの検討においてもホルモン療法の有無や使用期間などに関しての記載が不十分であり、ホルモン依存性乳癌に対するホルモン療法の影響については十分検討されておらず、現時点ではステロイドサルファターゼの予後因子としての意義は議論のあるところであると思われる。今回の検討ではエストロゲンレセプター陽性乳癌に対しては全例タモキシフェン投与がなされている。今回の検討でエストロゲンサルファターゼ発現乳癌の予後がやや良好であったことの一因として、ステロイドサルファターゼが発現している腫瘍ではエストロゲン依存性が高く、補助ホルモン療法が奏効したために予後が改善した可能性が推測される。

今回の検討では、アロマターゼは無再発生存期間に関してはアロマターゼ陽性乳癌が陰性乳癌に比べ予後良好であった。Silva らはアロマターゼ活性による予後因子の検討を行っているが、統計学的に有意な予後因子とならなかったが、アロマターゼ活性が高い方が予後良好の傾向にあったことを報告しており⁹⁸⁾、今回の結果とほぼ同様である。アロマターゼ mRNA を用いた解析では独立した予後因子ではなかったことが報告されている⁹⁷⁾。今回

の生存曲線をみるといずれの場合も酵素発現がある場合は発現がない場合に比べ生存曲線が緩やかである。今回は症例数が少なく統計学的有意差が証明されなかった可能性がある。また、ER陽性乳癌は陰性乳癌に比べ予後が良く、ホルモン依存性が強いほど内分泌療法に反応する。両酵素発現とERとは相関していないが、エストロゲンを誘導する能力が高いほどホルモン依存性が高く、内分泌療法に反応し、予後が改善している可能性も考えられる。

両酵素の相関関係に関しては、両因子は統計学的に有意ではないが、ステロイドサルファターゼ発現乳癌ではアロマターゼも共発現する傾向が認められた。しかしながら、発現状態が異なる場合が83例中34例(41%)に認めた。これらの腫瘍では局所エストロゲン産生がどちらかの酵素に強く依存していることが想定される。乳癌内分泌療法においては現在、第3世代アロマターゼ阻害剤が最も有効性が高く、補助療法⁹⁹⁻¹⁰³、術前療法^{104,105}、再発治療¹⁰⁶⁻¹⁰⁸)では従来の標準治療であったタモキシフェンに比較し、第3世代アロマターゼ阻害剤の治療効果が高いことが臨床試験で証明されている。しかしながら、Thurlimannらはアロマターゼ阻害剤の1つであるアナストロゾールの効果がなくなった後に、抗エストロゲン剤であるタモキシフェン投与により奏効率10%、クリニカルベネフィット率48.7%が得られることを報告している¹⁰⁹)。このことはアロマターゼ阻害剤自体に対する耐性の問題も考えられるが、アロマターゼ阻害だけでは不十分であり、アロマターゼ阻害剤治療中にアロマターゼ経路以外のエストロゲン産生経路、すなわち、ステロイドサルファターゼ経路による局所エストロゲン産生が誘導された可能性がある。アロマターゼ阻害剤抵抗性にはステロイドサルファターゼ経路を阻害する必要があると思われる。ステロイドサルファターゼ阻害剤には非可逆性ステロイド性ステロイドサルファターゼ阻害剤である2-methoxyestrone 3-O-sulfamate (2-MeOEMATE)や非可逆性非ステロイド性ステロイドサルファターゼ阻害剤である667 4-methylcoumarin 7-O-sulfamate (667 COUMATE)などがあり、in vivoでのステロイドサルファターゼ阻害活性と乳癌に対する抗腫瘍効果が認められている^{110,111})が、これらのステロイドサルファターゼ阻害剤を含め、数種のステロイドサルファターゼ阻害剤が臨床開発段階である。現在、実地臨床で使用できる薬はないが、乳癌組織中のステロイドサルファターゼとアロマターゼの発現状況は今後、治療選択指標となりうる可能性がある。臨床試験による確認が必要であるが、例えば、ステロイドサルファターゼ陰性/アロマターゼ陽性の場合はアロマターゼ阻害剤単剤による治療を、ステロイドサルファターゼ陽性/アロマターゼ陰性の場合はステロイドサルファターゼ阻害剤単剤による治療を、両酵素陽性の場合は両薬剤の併用を、両酵素陰性の場合は抗エストロゲン剤による治療を選択するなどの治療戦略が考えられる。ステロイドサルファターゼの酵素活性は硫酸エストロンをエストロンに変換するのみでなく、血中に豊富に存在する硫酸デヒドロエピアンドロステロンをデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)に変換する、この変換されたDHEAは17β-水酸化ステロイド脱水素酵素によりアンドロステネジオールに変換される。このアンドロステネジオールはERに結合し、弱いながらもエストロゲン様活性を持つことが示されている¹¹²⁻¹¹⁴) (図4)。アロマターゼ阻害剤治療中の腫瘍内エストロ

ゲン濃度は極端に低下しており、このような弱いエストロゲン作用を持つ物質でもホルモン依存性乳癌では十分に増殖可能である。アロマターゼ阻害のみでなく、今後はステロイドサルファターゼ経路阻害も重要な課題である。

⑨ 結語

乳癌組織では腫瘍細胞から産生されるステロイドサルファターゼと腫瘍間質細胞から産生されるアロマトラーゼが協調し、局所でのエストロゲン産生を促進し、乳癌増殖に関与している可能性が示唆された。

⑩ 参考文献

- 1) 厚生労働省がん研究助成金「地域がん登録」研究班。日本のがん罹患率と推移。In:大島明、黒石哲生、田島和雄、編。がん・統計白書－罹患／死亡／予後－。1版。東京：篠原出版社；2004.p.97-160.
- 2) 黒石哲生、他。日本におけるがん死亡（1950-2000）。In:大島明、黒石哲生。田島和雄、編。がん・統計白書－罹患／死亡／予後－。1版。東京：篠原出版社；2004.p.1-95
- 3) 広瀬かおる。乳癌の罹患率と死亡率。治療学。2005;39:128-130.
- 4) Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative analysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*. 1997; 350:1047-1059.
- 5) Iwase H: Molecular action of the estrogen receptor and hormone dependency in breast cancer. *Breast Cancer*. 10:89-96.2003.
- 6) Osborne CK, Coronado EB, Kitten LJ, Arteaga CI, Fuqua SA, Ramasharma K, Marchall M, Li CH : Insulin-like growth factor-II (IGF-II): a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor. *Mol Endocrinol* 3:1701-1709,1989.
- 7) Bates SE, Davidson NE, Valverius EM, Freter CE, Dickson RB, Tam JP, Kudlow JE, Lippman ME, Salomon DS: Expression of transforming growth factor alpha and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: its regulation by estrogen and its possible functional significance. *Mol Endocrinol* 2:543-555. 1988.
- 8) Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Kondo S, Toyoshima H, Kondo T, Ikegami A, Ouchi Y, Orimo H, Muramatsu M : Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11117-11121.1993.
- 9) Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatus M, Ouchi Y, Inoue S : Efp targets 14-3-3 σ for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 417 :871-875.2002.
- 10) Perillo B, Sasso A, Abbondanza C, Palumbo G : 17beta-estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol Cell Biol* 20 :2890-2901.2000.
- 11) Briozzo P, Morisset M, Capony F, Rougeot C, Rochefort H : In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Cancer Res* 48:3688-3692.1988.
- 12) Prest SJ, May FE, Westley BR: The estrogen regulated protein, TTF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J* 16:592-594. 2002.

- 13) Bronzert DA, Pantazis P, Antoniadis HN, Kasid A, Davidson N, Dickson RB: Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5763-5767, 1987.
- 14) Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Applanat M: Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 62:4977-4984, 2002.
- 15) Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC: Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17:1474-1481, 1999.
- 16) Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA 3rd, McGuire WL: The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 46:2884-2888, 1980.
- 17) Samojlik E, Santen RJ, Wells SA: Adrenal suppression with aminoglutethimide. II. Differential effects of aminoglutethimide on plasma androstenedione and estrogen levels. *J. Clin Endocr Metab* 45: 480-487, 1977.
- 18) Miller WR, Hawkins RA, Forrest APM: Significance of aromatase activity in human breast cancer. *Cancer Res* 42:3365-3368, 1982.
- 19) Perel E, Willkins D, and Kilinger DW: The conversion of androstenedione to estrone, estradiol and testosterone in breast tissue. *J Steroid Biochem* 13:89-94, 1980.
- 20) Edery M, Goussard S, Dehaennin L, Scholler R, Reiffsteck J and Drosowsky MA: Endogenous oestradiol-17beta concentration in breast tumours determined by mass fragmentography and radioimmunoassay: relationship to receptor content. *Eur J Cancer* 17: 115-120, 1981.
- 21) van Landeghem AAJ, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JHH: Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res* 45: 2900-2906, 1985.
- 22) Mistry P, Griffiths K, Maynard PV: Endogenous C19-steroids and oestradiol levels in human primary breast tumour tissues and their correlation with androgen and oestrogen receptors. *J Steroid Biochem* 24: 1117-1125, 1986.
- 23) Samojlik E, Santen RJ, Worgul TJ: Plasma estrone sulfate: assessment of reduced estrogen production during treatment of metastatic breast carcinoma. *Steroids* 39: 497-507, 1982.
- 24) Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM: Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* 5:277-289, 1997.
- 25) Ferrante P, Messali S, Meroni G, Ballabio A: Molecular and biochemical characterization of a novel sulphatase gene: Aryl sulphatase G (ARSG). *Eur J Hum Genet* 10:813-818, 2002.

- 26) Vignon F, Terqui M, Westley B, Derocq D, Rochefort H: Effects of plasma estrogen sulfates in mammary cancer cells. *Endocrinology* 106: 1079-1086, 1980.
- 27) Santner SJ, Feil PD, Santen RJ: In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 29-33, 1984.
- 28) Pasqualini JR, Gelly C, Lecerf F: Biological effects and morphological responses to estriol, estriol-3-sulfate, estriol-17-sulfate and tamoxifen in a tamoxifen-resistant cell line(R-27) derived from MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 1495-1501, 1986.
- 29) Lipton A, Santen RJ, Santner SJ, Harvey HA, Feil PD, White-Hershey D, Bartholomew MJ, Antle CE: Aromatase activity in primary and metastatic human breast cancer. *Cancer* 59: 779-782, 1987.
- 30) Perel E, Daniilescu D, Kharlip L, Blackstein M, Killinger DW: Steroid modulation of aromatase activity in human cultured breast carcinoma cells. *J Steroid Biochem* 29: 393-399, 1988.
- 31) Yen PH, Marsh B, Allen E, Tsai SP, Ellison J, Connoly L, Neiswanger K, Shapiro LJ: The human X-linked steroid sulfatase gene and a Y-encoded pseudogene: Evidence for an inversion of the Y chromosome during primate evolution. *Cell* 55:1123-1135, 1988.
- 32) Yen PH, Allen E, Marsh B, Mohandas T, Wang T, Shapiro LJ: Cloning and expression of the steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: Implications for X-Y inexchange. *Cell* 49:443-454, 1987.
- 33) Stein C, Hille A, Seidel J, Rijnbout S, Waheed A, Schmidt B, Geuze H, von Figura K: Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation, and subcellular distribution in BHK-21 cells. *J Biol Chem* 264:13865-13872, 1989.
- 34) Purohit A, Reed MJ, Morris NC, Williams GJ, Potter BVL: Regulation and inhibition of steroid sulfatase activity in breast cancer. *Ann NY Acad Sci* 784:40-49, 1996.
- 35) Purohit A, Duncan LJ, Wang DY, Coldham NG, Ghilchik MW, Reed MJ: Paracrine control of oestrogen production in breast cancer. *Endoc-Rel Cancer* 4:323-330, 1997.
- 36) Purohit A, Chapman O, Duncan LJ, Reed MJ: Modulation of oestrone sulphatase activity in breast cancer cell lines by growth factors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:563-566, 1992.
- 37) Wilking N, Carlstrom K, Gustafsson SA, Skoldefors H, Tollbonm O: Oestrogen receptors and metabolism of oestrone sulphate in human mammary carcinoma. *Eur J Cancer* 16:1339-1344, 1980.
- 38) Pasqualini JR, Chetrite G, Le Nestour E: Control and expression of estrone sulphatase activities in human breast cancer. *J Endocrinol* 150: S99-S105, 1996.
- 39) Evans TRJ, Rowlands MG, Law M, Coombes RC: Intratumoral oestrone sulphatase activity as a prognostic marker in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 69: 555-61, 1994.

- 40) Loriaux D, Ruder H, Lipsett M: The measurement of estrone sulfate in plasma. *Steroids* 18: 463-472. 1971.
- 41) Pasqualini J, Gelly C, Nguyen BL, Vella C: Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J Steroid Biochem* 34: 155-163. 1989.
- 42) Santner SJ, Wilhelm BO, Santen RJ: Estrogen sulfate promotes human breast cancer cell replication and nuclear uptake of estradiol in MCF-7 cell culture. *Int J Cancer* 54:119-124, 1993.
- 43) Harada N, Utsumi T, Takagi Y: Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11312-11316.1993.
- 44) Utsumi T, Harada N, Maruta M, Takagi Y: Presence of alternatively spliced transcripts of aromatase gene in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2344-2349.1996.
- 45) Harada N: Aromatase and intracrinology of estrogen in hormone-dependent tumors. *Oncology* 57:7-15.1999.
- 46) James VHT, McNeil JN, Lai LC, Newton CJ, Ghilchik MW, Reed MJ: Aromatase activity in normal breast and breast tumor tissue: in vivo and in vitro studies. *Steroids* 50: 269-279, 1987.
- 47) Sasano H, Nagura H, Harada N, Goukon Y, Kimura M: Immunolocalization of aromatase and other steroidogenic enzymes in human breast disorders. *Hum Pathol*, 25: 530-535. 1994.
- 48) Santner SJ, Pauley RJ, Tait L, Kaseta J, Santen RJ: Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 82: 200-208, 1997.
- 49) Brodie A, Lu Q, Nakamura J: Aromatase in the normal breast and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61:281-286, 1997.
- 50) Yue W, Zhou D, Chen S, Brodie A: A new nude mouse model for postmenopausal breast cancer using with MCF-7 cells transfected with the human aromatase gene. *Cancer Res* 54: 5092-5095. 1994.
- 51) Yue W, Wang J, Savinov A, Brodie A: A effect of aromatase inhibitors on growth of mammary tumors in nude mouse model. *Cancer Res* 55:3073-3077, 1995.
- 52) Widener N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic factor in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84:1875-1887.
- 53) Toi M, Kashitani J, Tominaga T: Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 55:371-374,1993.
- 54) Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T: Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat* 36:193-204,1995.
- 55) Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, Taniguchi T and Tominaga T: Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer*

- 77:1101-1106, 1996.
- 56) Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Suzuki H, Kitamura M, Tsuruta K, Taniguchi T, Mori T, Okamoto A, Yoshida M, Ikeda T, Tominaga T: Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2:821-826, 1996.
 - 57) Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 89:139-147, 1997.
 - 58) Manders P, Sweep FC, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot A, van tienoven DT, Foekens JA, Span PN, Bussink J, Beex LV: Vascular endothelial growth factor independently predicts the efficacy of postoperative radiotherapy in node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 9:6363-6370, 2003.
 - 59) Linderholm BK, Lindh B, Beckman L, Erlanson M, Edin K, Travelin B, Bergh J, Grankvist K, Henriksson R: Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers. *Clin Breast Cancer* 4:340-347, 2003.
 - 60) Soares R, Reis-Fiho JS, Gartner F, Schmitt FC: Vascular endothelial growth factor, transforming growth factor- α , and estrogen receptors: possible cross-talks and interactions. *Am J Pathol* 160:381-383, 2002.
 - 61) Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Satancel GM: Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 60 :3183-3190, 2000.
 - 62) Stevenson DP, Milligan SR, Collins WP: Effects of platelet-derived endothelial growth factor / thymidine phosphorylase, substrate, and products in a three-dimensional model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152:1641-1646, 1998.
 - 63) Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguchi M, Akiyama S, Fukui K, Ishizawa M, Yamada Y: Angiogenic factor. *Nature* 356:668, 1992.
 - 64) Yamagishi S, Kobayashi K, Yamamoto H: Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190:418-425, 1993.
 - 65) Toi M, Hoshina S, Taniguchi T, Yamamoto Y, Ishitsuka H, Tominaga T: Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor / thymidine phosphorylase in human breast cancer. *Int J Cancer (Predictive Oncol)* 64 :79-82, 1995.
 - 66) Toi M, Inada K, Hoshina S, Suzuki H, Kondo S, Tominaga T: Vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor are frequently coexpressed in highly vascularized human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1:961-964, 1995.

- 67) Yamamoto Y, Toi M, Tominaga T: Prediction of the effect of 5'-deoxy-5-fluorouridine by the status of angiogenic enzyme thymidine phosphorylase expression in recurrent breast cancer patients. *Oncol Rep* 3:863-865, 1996.
- 68) Toi M, Ueno T, Matsumoto H, Saji H, Funata N, Koike M, Tominaga T: Significance of thymidine phosphorylase as a marker of protumor monocytes in breast cancer. *Clin Cancer Res* 5:1131-1137, 1999.
- 69) Saeki T, Takashima S, Sasaki H, Hanai N, Salomon DS.: Localization of estrone sulfatase in human breast carcinomas. *Breast Cancer* 6:331-337, 1999.
- 70) Ng PC, Osawa Y: Preparation and characterization of the F(ab)₂ fragments of an aromatase activity-suppressing monoclonal antibody. *Steroids* 62:776-8130, 1997.
- 71) Masamura S, Santner SJ, Santen RJ: Evidence of in situ estrogen synthesis in nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors via the enzyme estrone sulfatase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58: 425-429, 1996.
- 72) Loriaux D, Ruder H, Lipsett M: The measurement of estrone sulfate in plasma. *Steroids* 18: 463-472, 1971.
- 73) Speirs V, Walton DS, Hall M-C, Atkin SL: In vivo and in vitro expression of steroid-converting enzymes in human breast tumours: associations with interleukin-6. *Br J Cancer* 81: 690-695, 1999.
- 74) Suzuki T, Nakata T, Miki Y, Kaneko C, Moriya T, Ishida T, Akinaga S, Hirakawa H, Kimura M, Sasano H : Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma. *Cancer Res* 63 :2762-2770, 2003.
- 75) Lu Q, Nakamura J, Savinov A, Yue W, Weisz J, Dabbs DJ, Wolz G, Brodie A: Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology* 137: 3061-3068, 1996.
- 76) Esteban JM, Warsi Z, Haniu M, Hall P, Shively JE, Chen S: Detection of intratumoral aromatase in breast carcinomas. An immunohistochemical study with clinicopathologic correlation. *Am J Pathol* 140: 337-343, 1992.
- 77) Santen RJ, Martel J, Hoahland F, Naftolin F, Roa L, Harada N, Hafer L, Zaino R, Santner SJ: Stromal spindle cells contain aromatase in human breast tumours. *J Clin Endo Metab* 79: 627-632, 1994.
- 78) Sasano H, Murakami H: Immunolocalization of aromatase in human breast disorders. *Breast Cancer Res. Treat.* 49: Suppl. 1:S79-84, 109-119, 1998.
- 79) Shenton KC, Dowsett M, Lu Q, Brodie A, Sasano H, Sacks NP, Rowlands MG: Comparison of biochemical aromatase activity with aromatase immunohistochemistry in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 49: Suppl. 1:S101-107, 109-119, 1998.

- 80) Santen RJ, Martel J, Hoahland F, Naftolin F, Roa L, Harada N, Hafer L, Zaino R, Pauley R, Santer SJ: Demonstration of aromatase activity and its regulation in breast tumor and benign breast fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat* 49:Suppl.1:S93-99,109-119, 1998.
- 81) Sasano H, Edwards DP, Anderson TJ, Silverberg SG, Evans DB, Santern RJ, Ramage P, Simpson ER, Bhatnagar AS, Miller WR: Validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry: progress report. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86: 239-244, 2003.
- 82) Sasano H, Anderson TJ, Silverberg SG, Santern RJ, Conway M, Edwards DP, Krause A, Bhatnagar AS, Evans DB, Miller WR: The validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry-A correlation with biochemical activities in 46 cases of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95: 35-39, 2005.
- 83) Zhao Y, Nichols JE, Valdez R, Mendelson CR, Simpson ER: Tumor necrosis factor- α stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter 1.4. *Mol Endocrinol* 10:1350-1357, 1996.
- 84) Reed MJ, Coldham NG, Patel SR, Ghilchik MW, James VH: Interleukin-1 and interleukin-6 in breast cyst fluid: their role in regulating aromatase activity in breast cancer cells. *J Endocrinol* 132:R5-8,1992.
- 85) Richards JA, Petrel TA, Brueggemeier RW: Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenase in normal and malignant breast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 203-212, 2002.
- 86) Girault I, Lerebours F, Tozlu S, Spyrtos F, Tubiana-Hulin M, Lidereau R, Bieche I: Real-time reverse transcription PCR assay of CYP19 expression: application to a well-defined series of post-menopausal breast carcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82: 323-332, 2002.
- 87) Karuppu D, Kalus A, Simpson ER, Clyne C: Aromatase and prostaglandin inter-relationships in breast adipose tissue: significance for breast cancer development. *Breast Cancer Res treat* 76:103-109, 2002
- 88) Ihara N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S: Quantitative analysis of aromatase mRNA expression derived from various promoters (1.4, 1.3, PII and 1.7) and its association with expression of TNF- α , IL-6 and COX-2 mRNAs in human breast cancer. *Int J Cancer* Published online 14 Nov 2005.
- 89) Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H: Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 12:701-720,2005.
- 90) Prost O, Turrel M, Dahan N, Craveur C, Adessi GL: Estrone and dehydroepiandrosterone sulfatase activities and plasma estrone sulfate levels in human breast carcinoma. *Cancer Res* 44:661-664, 1984.

- 91) Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Harada N, Poutanen M, Vihko R, Bulun SE, Silverberg SG, Nagura H: Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I in human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4042-4046. 1996.
- 92) Ferrara N; VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 11: 617-624. 2000.
- 93) Gabrilovich DI, Chen HL, Grigis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP: Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2:1096-1103.1996.
- 94) Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* 17:984-92.2003.
- 95) Evans TRJ, Rowlands MG, Silva MC, Law M, Coombes RC: Prognostic significance of aromatase and estrone sulfatase enzymes in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44: 583-587. 1993.
- 96) Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, Ando J, Maruta M, Maeda K, Harada N: Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer. *Cancer Res* 59: 377-381. 1999.
- 97) Miyoshi Y, Ando A, Hasegawa S, Ishitobi M, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S: High expression of steroid sulfatase mRNA predicts poor prognosis in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 9: 2288-2293. 2003.
- 98) Silva MC, Rowlands MG, Dowsett M, Gusterson B, McKinna JA, Fryatt I, Coombes RC: Intratumoral aromatase as a prognostic factor in human breast carcinoma. *Cancer Res* 49: 2588-2591, 1989.
- 99) ATAC trialists group: Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone and Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 365:60-62,2005.
- 100) Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M, Smith I, Wardly A, Price KN, Goldhirsch A: Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group.: A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med.* 353:2747-2757. 2005.
- 101) Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Cameron DA, Palmer MJ, Pater JL.: Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *J Natl Cancer Inst.* 97:1262-1271.2005.
- 102) Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassen J, Delozier T, Johnes SE, Alvarez I, Bertelli G, Ortmann O, Coats AS, Bajetta E, Dodwell D, Coleman RE, Fallowfield LJ,

- Mickiewicz E, Anderson J, Lonning PE, Cocconi G, Stewart A, Stuart N, Snowdon CF, Carpentieri M, Massimini G, Bliss JM for the Intergroup Exemestane Study: A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 350: 1081-1092, 2004.
- 103) Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M, Guglielmini P, Amoroso D, Fini A, Paladini G, Mesiti M, Romeo D, Rinaldini M, Scali S, Porphiglia M, Benedetto C, Restuccia N, Buzzi F, Franchi R, Massidda B, Distante V, Amadori D, Sismondi P.: Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole Trial. *J Clin Oncol.* 23:5138-5147, 2005.
- 104) Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, Ashley SE, Francis S, Boeddinghaus I, Walsh G; IMPACT Trialists Group.: Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol.* 23:5108-5116, 2005.
- 105) Eiermann W, Paepke S, Appfelstaedt J, Llombart-Cussac A, Eremin J, Vinholes J, Mauriac L, Ellis M, Lassus M, Chaudri-Ross HA, Dugan M, Borgs M: Letrozole Neo-Adjuvant Breast Cancer Study Group.: Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: A randomized double-blind multicenter study. *Ann Oncol.* 12:1527-1532, 2001.
- 106) Irish W, Sherrill B, Cole B, Gard C, Glendenning GA, Mouridsen H.: Quality-adjusted survival in a crossover trial of letrozole versus tamoxifen in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Ann Oncol.* 16:1458-1462, 2005.
- 107) Milla-Santos A, Milla L, Portella J, Rallo L, Pons M, Rodes E, Casanovas J, Puig-Gali M.: Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy in postmenopausal patients with hormone-dependent advanced breast cancer: a prospective, randomized, phase III study. *Am J Clin Oncol.* 2003 Jun;26(3):317-22.
- 108) Paridaens R, Dirix L, Beex L, Nooij M, Cufer T, Lohrisch C, Biganzoli L, Van Hoorebeeck I, Duchateau L, Lobelle JP, Piccart M.: Promising results with exemestane in the first-line treatment of metastatic breast cancer: a randomized phase II EORTC trial with a tamoxifen control. *Clin Breast Cancer. Suppl* 1:S19-21, 2000.
- 109) Thurlimann B, Robertson JFR, Nabholz JM, Buzdar A, Bonnetterre J on behalf of the Arimidex Study Group. Efficacy of tamoxifen following anastrozole('Arimidex') compared with anastrozole following tamoxifen as first-line treatment for advanced breast cancer in postmenopausal women. *Eur J Cancer* 39:2310-2317,2003.

- 110) Raobaikady B, Purohit A, Chander SK, Woo LWL, Leese MP, Potter BVL, Reed MJ: Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation and in vivo steroid sulphatase activity by 2-methoxyestradiol-bis sulphamate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:352-358, 2003.
- 111) Purohit A, Woo LEL, Potter BVL, Reed MJ: In vivo inhibition of estrone sulfatase activity and growth of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by 667COMATE. *Cancer Res* 60: 3394-3396, 2000.
- 112) Adams JB, Garcia M, Rochefort H: Estrogenic effects of physiological concentrations of 5-androst-3 β , 17 β -diol and its metabolism in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 41:4720-4726, 1981.
- 113) Poulin R, Labrie F: Stimulation of cell proliferation and estrogenic response by adrenal C19-delta 5-steroid in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Cancer Res* 46: 4933-4937, 1986.
- 114) Dauvois S, Labrie F: Androstenedione and androst-5-ene-3 beta, 17 beta-diol stimulate DMBA-induced rat mammary tumors – role of aromatase. *Breast Cancer Res Treat* 13:61-69, 1989.