

特異的抗ヒト ER β モノクローナル抗体 PPZ0506 発見が ER β 研究に与えた衝撃

石井 寛高 服部裕次郎 肥後 心平 森下 雅大
小澤 実那 大塚 真衣 松本 恵介 小澤 一史[†]

日本医科大学大学院医学研究科解剖学・神経生物学

([†] 佛教大学保健医療技術学部)

Impact of Well-validated Anti-human ER β Monoclonal Antibody PPZ0506 on ER β Research

Hiroataka Ishii, Yujiro Hattori, Shimpei Higo, Masahiro Morishita,

Mina Ozawa, Mai Otsuka, Keisuke Matsumoto and Hitoshi Ozawa[†]

Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

([†] School of Health Sciences, Bukkyo University)

Abstract

Two subtypes of estrogen receptors (ERs) have been identified in mammals: ER α and ER β . Because effective antibodies against ER α proteins are available, expression and localization profiles of ER α proteins have been fully determined. By contrast, the paucity of well-validated antibodies against ER β proteins has caused confusion regarding their expression and localization profiles, which has severely hindered the progress of ER β research. Notably, the recent discovery of a monoclonal antibody (PPZ0506) specific for human ER β proteins and its cross-reactivity to rat and mouse ER β proteins has stimulated development of ER β detection systems and the use of these systems to analyze the true localization profiles of ER β proteins. In our previous studies, we reported the development and optimization of immunohistochemical staining methods for rat and mouse ER β proteins with PPZ0506. Our immunohistochemical results revealed that rat and mouse ER β proteins are expressed only in more localized tissues and cells than previously assumed, and further indicated that considerable species differences exist in ER β expression among humans, rats, and mice. In the present review, we discuss various problems in previous ER β research, new findings obtained using the PPZ0506 antibody, and prospects for future ER β research.

(日本医科大学医学会雑誌 2023; 19: 332–338)

Key words: antibody validation, ER β , ESR2, immunohistochemistry, PPZ0506

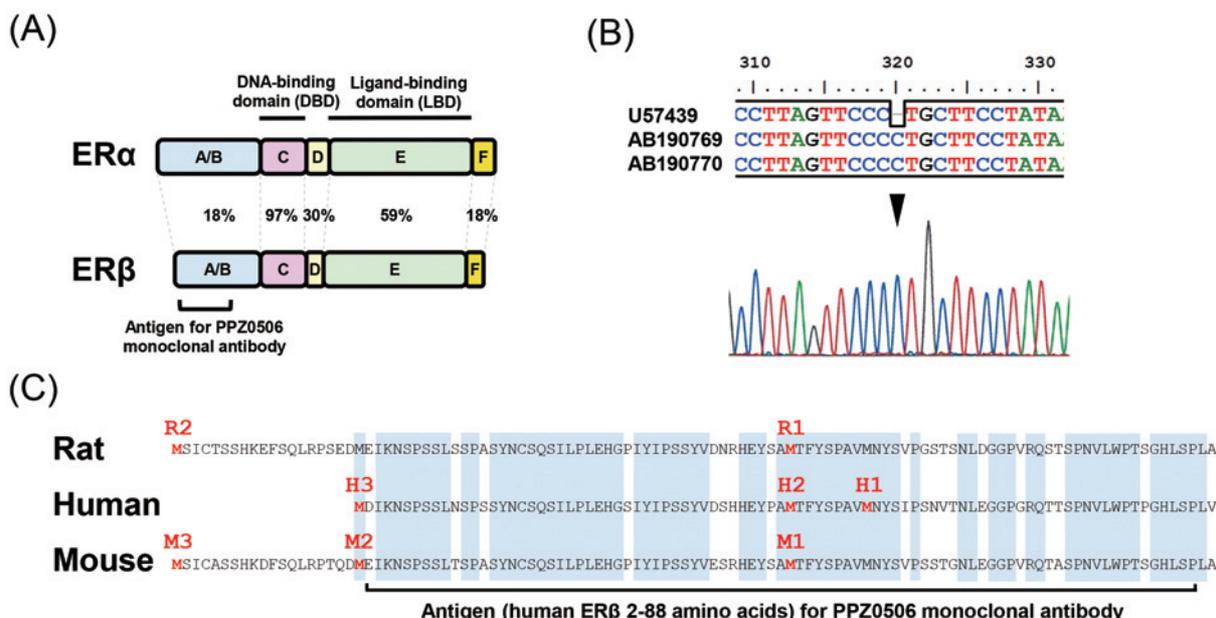


Fig. 1 Schematic structures of ERs and N-terminal sequences of ER β proteins. (A) Schematic structures of human ER α and ER β proteins. The ERs contain distinct motif and domain structures. The similarity score between each domain structure of human ER α and ER β is indicated. (B) An extra nucleotide insertion in the 5'-region of the rat ER β cDNA sequence. Pairwise alignment of U57439, AB190769, and AB190770 and the corresponding electropherogram of the cloned rat ER β sequence are shown. (C) Detailed amino acid sequences of the N-terminal regions of human, mouse, and rat ER β proteins. Panel C was constructed with reference to Leygue et al.³⁸ and our previous study⁹.

1. 緒言

標的分子と特異的に結合する抗体は、生命科学・医学分野で不可欠なツールであり、様々な免疫学的測定法で使用される。免疫組織化学染色法は、生命科学・基礎医学分野では組織切片中の標的分子の発現・局在を同定する手法として、組織病理学分野では病理組織検体内での標的マーカー分子の発現を評価することで診断手法として用いられる。

信頼性の高い免疫学的測定法の確立には、使用する抗体の特異性が要となる。特異性の高い抗体の存在は、測定の再現性を高め、該当する研究分野の発展に寄与する。しかし、研究分野で普及している抗体が必ずしも抗原への特異性が保証されているわけではない¹。そのため、非特異的な抗体の使用により、研究の発展が阻害されることもありうる²⁻⁴。

ER β 研究は、まさに非特異的な抗体使用によって矛盾する結果が積み重なり、その発展が損なわれてきた1例である。これまで特異的抗ER β 抗体を作製・検索する試みがなされた⁵⁻⁷が、十分な特異性を持つ抗体を同定できずにいた。しかし、2017年に Anderssonらにより、13種類の抗体から唯一の特異的抗ヒトER β

モノクローナル抗体 (PPZ0506) が発見され⁸、さらに、その抗体のラット・マウスER β に対する交差性・特異性が確認された⁹。これにより、ER β 研究の状況は一変し、積み重ねられてきた問題を解決する試みが加速している¹⁰⁻¹³。本総説では従来のER β 研究の問題点、PPZ0506抗体を用いて行われた問題解決の試み、そして今後のER β 研究の課題について概説する。

2. エストロゲン受容体

エストロゲンは、広汎な器官の正常な生理機能調節に必須のホルモンであり、さらに、乳がん、子宮内膜がん、前立腺がんなどのエストロゲン感受性腫瘍の増殖を制御する。エストロゲン作用は、核内受容体であるエストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) との結合を介して発揮される。ERは、核内受容体スーパーファミリーに属する転写調節因子であり、エストロゲン依存的に標的遺伝子の発現調節を介して作用する¹⁴。ERには、別々の遺伝子上にコードされた2種類のサブタイプ、すなわち α 型エストロゲン受容体 (estrogen receptor α , ER α) と β 型エストロゲン受容体 (estrogen receptor β , ER β) が存在する¹⁵ (Fig. 1A)。ERは、核内受容体スーパーファミリー共通の

構造を持ち、A/B, C, D, EモチーフはそれぞれN末端転写活性化領域, DNA結合領域, 蝶番領域, C末端転写活性化/リガンド結合領域と呼ばれる領域構造を形成する。特にER α , ER β 間ではDNA結合領域とリガンド結合領域の相同性が高く保持されている。

ER遺伝子は、多重プロモーターにより発現が制御される¹⁶。ヒト・ラット・マウスER α 遺伝子は、生殖器官発現型と広汎臓器発現型プロモーターを保持するため、生殖器官で高発現を示すと同時に広汎な臓器で発現する¹⁷。さらに、乳がん・子宮内膜がんなどのエストロゲン感受性腫瘍で高発現することが知られ、これらの腫瘍ではエストロゲンはER α を介して腫瘍増殖を引き起こす。一方でER β 遺伝子のプロモーター使用は明確ではない。ER β cDNAは、ラットでは前立腺と卵巣¹⁸、ヒトでは卵巣と精巣^{19,20}、マウスでは卵巣²¹から初めて同定された。これらから、ER β 遺伝子は男性生殖器と卵巣で高発現し、また、ER α のように非生殖器官においても広汎な発現を示すと漫然と信じられ、種差も考慮されてこなかった。

3. 従来のER β タンパク質発現プロファイル

ER β タンパク質の発現局在は、ラットを対象に免疫組織化学染色法を用いてSaundersらによって先駆的に解析が行われた^{22,23}。その結果、ラットER β は、卵巣、卵管、子宮、肺、副腎、精囊、膀胱、心臓、前立腺、精巣などの広汎な器官で発現することが示された。マウスにおいては、卵巣²⁴、乳腺²⁵や前立腺、精巣、精巣上部、輸精管などの男性生殖器²⁶、ヒトにおいては卵巣²⁷、子宮内膜²⁸や精巣、前立腺、精巣、精巣上部、精囊、輸精管などの男性生殖器^{29,30}で発現することが報告された。また、ヒト腫瘍において、乳がん³¹、前立腺がん^{32,33}、大腸がん³⁴で発現することが示されており、特に前立腺がんでは、腫瘍の進行にともないER β 発現が減弱・消失する^{35,36}。ER β は、ER α とは対照的に細胞増殖能抑制とアポトーシス誘導を行い、さらに、ER α とヘテロ二量体を形成してER α による標的遺伝子の転写活性化を抑制する。そのため、エストロゲン感受性腫瘍の腫瘍増殖抑制因子として働くことが推測され、腫瘍でのER β の病態生理学的役割が着目されていた。

しかし、近年の網羅的な遺伝子発現解析結果は、従来の免疫組織化学染色法で得られたER β 発現パターンとは異なるER β 遺伝子の発現プロファイルを示している。ER β 遺伝子は、ヒトでは卵巣、精巣、副腎、

消化管、免疫組織で、ラットでは卵巣、前立腺で、マウスでは卵巣でのみ高発現を示すとされ、従来想定されていたよりも限局的かつ種差を伴う発現様式が示唆されるとともに、多くの腫瘍ではER β 発現が極めて低いことが示されている。

4. 抗ヒトER β モノクローナル抗体PPZ0506

PPZ0506抗体は、パルセウスプロテオミクス社によって作製されたヒトER β 2-88アミノ酸領域を抗原とするモノクローナル抗体である³⁷。この抗体は、これまで使用実績がほとんどなかったが、2017年にAnderssonらによって行われた抗ヒトER β モノクローナル抗体の特異性の検証において、商業的に利用可能な13種類のモノクローナル抗体の中で唯一ヒトER β タンパク質を特異的に認識することが示され⁸、一躍注目されることになった。

しかし、PPZ0506抗体のヒト以外のER β タンパク質への交差性・特異性は保証・検討されていなかった。齧歯類ER β タンパク質に対する交差性・特異性が未検討であった理由の一端として、ヒト・ラット・マウスER β タンパク質のN末端領域に関する情報の混乱が挙げられる³⁸。特にラットで混乱が顕著であり、KuijperらによるラットER β cDNA (Accession #, U57439)のクローニング¹⁸の際に5'領域の塩基配列が1塩基読み飛ばされていたため (Fig. 1B)、ラットER β 遺伝子は本来の全長型ラットER β タンパク質 (R2に対応) よりもN末端が短いタンパク質 (R1に対応) をコードすると誤解されていた (Fig. 1C)。その後、O'Brienらがその誤謬を指摘していたもの³⁹、われわれが全長型ER β タンパク質をコードするcDNA配列 (AB190769, AB190770) を登録するまで、DDBJ/EMBL/GenBankに真のラットER β 配列が未登録であった。そのため、ラットER β タンパク質配列について誤った情報が修正されずに共有されていた。また、Western blotting法を用いた抗体の特異性のスクリーニングをこのような誤謬に基づいて行ってきたことが、長年にわたって特異的抗体が取得できない一因であったと推測される。

われわれは、N末端にFLAGタグを付加した全長型ヒト・ラット・マウスER β 発現コンストラクトを作製し、培養細胞に遺伝子導入を行うことでER β タンパク質を一過的に発現させた。そして、ER β 発現細胞とPPZ0506を用いたWestern blotting法、免疫細胞化学染色法により、PPZ0506の齧歯類ER β タンパク質に対する交差性・特異性を確認した⁹。

5. PPZ0506により判明した新たなERβタンパク質発現プロファイル

特異的抗ヒトERβモノクローナル抗体PPZ0506の発見とラット・マウスERβタンパク質に対する交差性・特異性の実証によって、ヒト・齧歯類ERβタンパク質を標的とした免疫染色法への道が切り開かれた^{8,9}。

これまでERβタンパク質は核内移行シグナルを持つものにもかかわらず、ミトコンドリアや細胞膜に局在すると報告されていた^{40,41}。しかし、PPZ0506を用いてERβを発現誘導した培養細胞を染色することで、ERβタンパク質が核に局在することを確認した^{8,9}。

AnderssonらによるPPZ0506を用いたヒトを対象とした免疫組織化学染色法⁸では、免疫陽性を示した細胞は副腎の腺細胞、卵巣の顆粒膜細胞、精巣のライディッヒ細胞といった内分泌細胞、2次リンパ器官である扁桃、リンパ節、脾臓のリンパ球や腸管末梢リンパ球といった免疫細胞、そして、胎盤の脱落膜細胞であった。ヒト腫瘍においては卵巣顆粒膜細胞腫と一部のメラノーマおよび甲状腺がんでERβ陽性反応が観察された。AnderssonらのPPZ0506を用いたヒトERβタンパク質の染色結果は、網羅的な発現解析と良い一致を示していたものの、従来の発現プロファイルを信じていた研究者にとっては驚くべきものであった。特にERβはラット前立腺で初めてクローニングされたため、種を問わず前立腺で高発現すると信じられていた。しかし、ヒト前立腺でERβタンパク質が検出されなかった事実は、ERβ発現に種差が存在することを推測させた。さらに、前立腺、乳がん、前立腺がん、大腸がんではERβが発現することを前提にERβ活性化による細胞・腫瘍増殖抑制効果の研究が行われており、それら臓器・腫瘍でERβが発現しない事実は、ヒトERβを標的とした従来の研究に大幅な変更を強いている。また、ヒト正常下垂体や非機能性下垂体腺腫ではERαとともにERβが発現すると報告されていた^{42,43}が、逆転写一定量digital PCR法とPPZ0506を用いた免疫組織化学染色法による解析からヒト正常下垂体と非機能性下垂体腺腫にはERβが発現しないことが確認された⁴⁴。

われわれは、ラットを対象としたPPZ0506による免疫組織化学染色法の樹立と最適化を行った^{9,10}。ERβ遺伝子の発現定量を逆転写一定量PCR法を用いて行ったところ、ヒトERβ遺伝子発現とは異なり、ラットERβ遺伝子は卵巣、前立腺腹側葉・背側葉で高発

現し、ヒトERβ遺伝子が高発現する副腎、精巣および免疫器官である胸腺、脾臓、リンパ節では発現しないことを確認した。PPZ0506を用いた免疫組織化学染色法によるラットERβタンパク質の発現解析では、卵巣、前立腺腹側葉・背側葉、特定の視床下部神経核のみに発現が観察された。従来、ERβは卵巣の顆粒膜細胞、莢膜細胞、間質細胞、黄体細胞に、前立腺では上皮細胞や間質細胞に局在すると報告されていた²²が、われわれの染色では、卵巣では顆粒膜細胞が強く、莢膜細胞が極めて弱く染色され、前立腺では上皮細胞が中程度に染色された(Fig. 2A)。脳においては、発現が限局しており、室傍核とメスラット前腹側室周囲核の神経細胞に染色が確認された。また、これら免疫組織化学染色法によって得られた組織染色は、*in situ* hybridization法で得られた染色結果と極めて良い一致を示した⁴⁵。さらに、ヒトとラット間のERβ発現の著しい種差はERβ遺伝子の選択的プロモーター使用に起因することを明らかにした⁹。

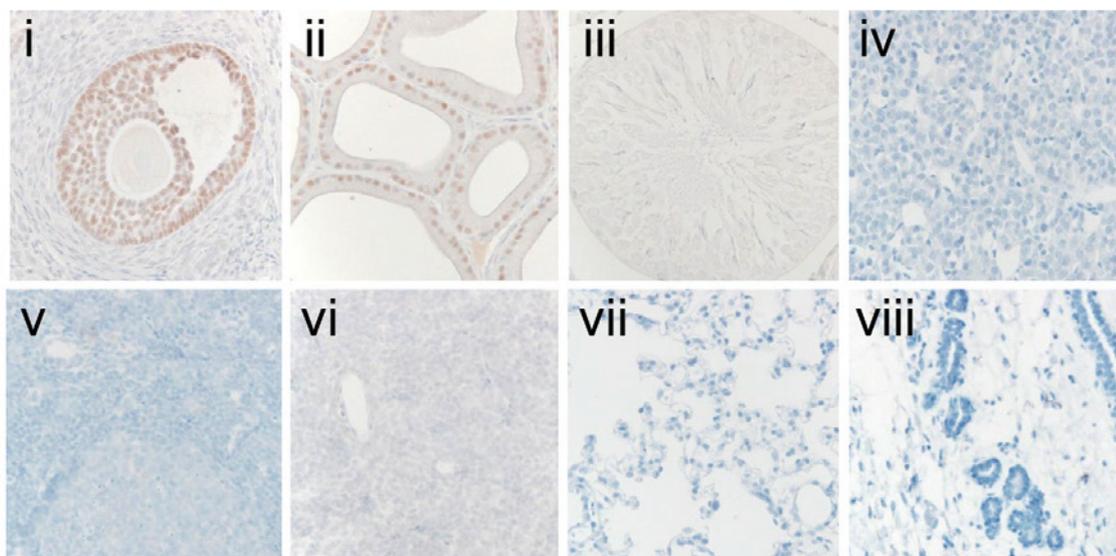
マウスを対象としたPPZ0506による免疫組織化学染色法の最適化も行った¹²。ERβ遺伝子発現の定量により、マウスでは卵巣でのみERβ遺伝子が強発現し、前立腺では肺と同程度に発現は弱く、その他の末梢器官ではほとんど発現を示さないことが判明した。この発現プロファイルと相関して、免疫組織化学染色法で染色が観察された末梢器官は、卵巣のみであった(Fig. 2B)。マウス卵巣では、ラットと同様に顆粒膜細胞で強く、莢膜細胞で極めて弱く染色された。また、全脳においては、ERβ遺伝子の発現は低いものの、特定の視床下部神経核のみ限局した発現が検出された。マウス視床下部において、扁桃核と分界条床核の神経細胞で中～強程度の染色を確認したが、ラットで比較的強い染色像を示した室傍核では弱い染色しか示さなかった。これら結果は*in situ* hybridization法の染色結果と良い一致を示した。

以上より、PPZ0506を用いたERβタンパク質の免疫組織化学染色法の結果は、従来想定されていたERβタンパク質の発現局在プロファイルとは著しく異なっており、ERβはラット・マウスで限局的な発現を示すこと、そして、ヒト・ラット・マウス間で著しい種差があることが判明した。

6. ERβ研究の今後の展望

PPZ0506を用いた発現解析により、ERβ発現には著しい種差があり、齧歯類では限局した器官にのみ発現する一方で、ヒトでは比較的広汎な器官で発現する

(A)



(B)

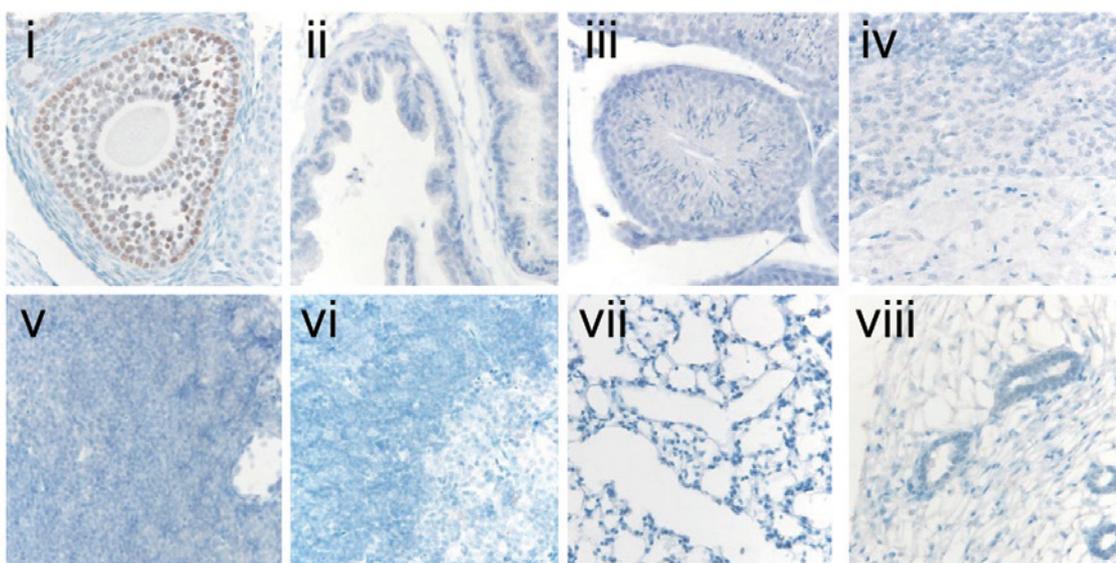


Fig. 2 Tissue localization of rat and mouse estrogen receptor β proteins. Immunohistochemical profiling of normal rat (A) and mouse (B) tissues. Paraffin-embedded sections were prepared from the ovary (i), ventral prostate (ii), testis (iii), pituitary gland (iv), lymph node (v), thymus (vi), lung (vii), and mammary gland (viii), and then immunostained with PPZ0506. Specific immunostaining signals were observed in rat ovary and ventral prostate sections and mouse ovary sections. The sections were counterstained with hematoxylin. The immunostaining images were obtained in parallel with those in our previous studies^{10,12}. Scale bar: 100 μ m.

ことが判明した。そのため、齧歯類で得られた ER β 機能に関する研究結果は、ヒトへの研究に外挿できない可能性が非常に強い。逆に言えばヒト特異的な ER β 機能の存在を示唆している。精巣、副腎、免疫系においてはヒト特異的に ER β が発現するため、これら器官で ER β を介した生理機能の同定が望まれる。

従来の ER β 研究では、乳がん、前立腺がん、大腸がんに発現する ER β を標的とした腫瘍増殖抑制作用の研究が盛んに行われていたが、それら腫瘍では ER β 発現が極めて低いことが判明したため、従来の研究に大幅な修正が必要である。その一方で、近年、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫で ER β 遺伝子が高発現

し⁴⁶、乳がんの化学療法で使用されるタモキシフェンがERβを介してアポトーシスを誘導することが報告されている⁴⁷。そのため、ERβ発現を正しく評価することで、これまで着目されてこなかった腫瘍でのERβ機能を発見する契機となりうる。

これまでPPZ0506を用いて発現解析がなされた臓器は成人・成獣由来である。マウス精巣ではERβ遺伝子が幼若期に強く発現し、成獣では発現が著しく減弱すると報告されており^{48,49}、さらに、十二指腸においても発達期に一過性にERβが発現するとの報告もあり⁵⁰、今後は、発達期の臓器におけるERβの発現解析も行う必要がある。

今後、PPZ0506抗体を用いてERβ研究を推し進めることで、非特異的な抗体の使用により生じていたERβ発現に関する混乱が解消され、ERβ研究が適切に発展することを期待する。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反なし。

文 献

- Weller MG: Quality issues of research antibodies. *Anal Chem Insights* 2016 Mar 20; 11: 21–27.
- Ioannidis JP: Why most published research findings are false. *PLoS Med* 2005 Aug 30; 2: e124. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020124>
- Macleod MR, Michie S, Roberts I, et al.: Biomedical research: increasing value, reducing waste. *Lancet* 2014; 383: 101–104.
- Baker M: Antibody anarchy: A call to order. *Nature* 2015; 527: 545–551.
- Skliris GP, Parkes AT, Limer JL, Burdall SE, Carder PJ, Speirs V: Evaluation of seven oestrogen receptor beta antibodies for immunohistochemistry, western blotting, and flow cytometry in human breast tissue. *J Pathol* 2002; 197: 155–162.
- Weitsman GE, Skliris G, Ung K, et al.: Assessment of multiple different estrogen receptor-beta antibodies for their ability to immunoprecipitate under chromatin immunoprecipitation conditions. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100: 23–31.
- Snyder MA, Smejkalova T, Forlano PM, Woolley CS: Multiple ERbeta antisera label in ERbeta knockout and null mouse tissues. *J Neurosci Methods* 2010; 188: 226–234.
- Andersson S, Sundberg M, Pristovsek N, et al.: Insufficient antibody validation challenges oestrogen receptor beta research. *Nat Commun* 2017 Jun 15; 8: 15840. <https://doi.org/10.1038/ncomms15840>
- Ishii H, Otsuka M, Kanaya M, Higo S, Hattori Y, Ozawa H: Applicability of anti-human estrogen receptor β antibody PPZ0506 for the immunodetection of rodent estrogen receptor β proteins. *Int J Mol Sci* 2019 Dec 13; 20: 6312. <https://doi.org/10.3390/ijms20246312>
- Hattori Y, Ishii H, Higo S, et al.: Optimization of immunohistochemical detection of rat ESR2 proteins with well-validated monoclonal antibody PPZ0506. *Mol Cell Endocrinol* 2021; 523: 111145. <https://10.1016/j.mce.2020.111145>
- Birgersson M, Katona B, Lindskog C, Pontén F, Williams C: Antibody validation for estrogen receptor beta. *Methods Mol Biol* 2022; 2418: 1–23.
- Ozawa M, Hattori Y, Higo S, et al.: Optimized mouse-on-mouse immunohistochemical detection of mouse ESR2 proteins with PPZ0506 monoclonal antibody. *Acta Histochem Cytochem* 2022; 55: 159–168.
- Morishita M, Higo S, Hattori Y, et al.: Immunohistochemistry for ESR2 with a mouse monoclonal antibody (PPZ0506). *J Nippon Med Sch (in press)*.
- Nilsson S, Gustafsson JÅ: Estrogen Receptors: Their Actions and Functional Roles in Health and Disease. In *Nuclear Receptors, Proteins and Cell Regulation* 8. (Bunce C, Campbell M, eds). 2010; pp 91–144, Springer, Dordrecht.
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, et al.: International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 773–781.
- Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K: Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 124–129.
- 石井寛高, 服部裕次郎, 小澤一史: エストロゲン受容体 α 遺伝子の 5′ 一非翻訳領域の構造と発現制御. *日医大医会誌* 2018; 14: 157–163.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5925–5930.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R: ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49–53.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, et al.: Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258–4265.
- Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA: Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1486–1496.
- Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR: Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol* 1997; 154: R13–R16.
- Saunders PT, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR: Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 1998; 156: R13–R17.
- Hishikawa Y, Damavandi E, Izumi S, Koji T: Molecular histochemical analysis of estrogen receptor alpha and beta expressions in the mouse ovary: in situ hybridization and Southwestern histochemistry. *Med Electron Microsc* 2003; 36: 67–73.
- Warner M, Wu WF, Montanholi L, Nalvarte I, Antonson P, Gustafsson JA: Ventral prostate and mammary gland phenotype in mice with complete deletion of the ERβ gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 4902–4909.

26. Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA: Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 2002; 23: 870-881.
27. Saunders PT, Millar MR, Williams K, et al.: Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. *Biol Reprod* 2000; 63: 1098-1105.
28. Critchley HO, Henderson TA, Kelly RW, et al.: Wild-type estrogen receptor (ERbeta1) and the splice variant (ERbetacx/beta2) are both expressed within the human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5265-5273.
29. Pasquali D, Staibano S, Prezioso D, et al.: Estrogen receptor beta expression in human prostate tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178: 47-50.
30. Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, et al.: Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 227-236.
31. Saunders PT, Millar MR, Williams K, et al.: Expression of oestrogen receptor beta (ERbeta1) protein in human breast cancer biopsies. *Br J Cancer* 2002; 86: 250-256.
32. Leav I, Lau KM, Adams JY, et al.: Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 159: 79-92.
33. Royuela M, de Miguel MP, Bethencourt FR, et al.: Estrogen receptors alpha and beta in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J Endocrinol* 2001; 168: 447-454.
34. Wong NA, Malcomson RD, Jodrell DI, Groome NP, Harrison DJ, Saunders PT: ERbeta isoform expression in colorectal carcinoma: an in vivo and in vitro study of clinicopathological and molecular correlates. *J Pathol* 2005; 207: 53-60.
35. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, et al.: Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5331-5335.
36. Pasquali D, Rossi V, Esposito D, et al.: Loss of estrogen receptor beta expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2051-2055.
37. ペルセウスプロテオミクス：抗ヒト ERβ マウスモノクローナル抗体 抗体仕様書；2007. https://www.pp.mx.com/img/SpecS_J_PPZ0506-00_ERb.pdf
38. Leygue E, Dotzlaw H, Lu B, Glor C, Watson PH, Murphy LC: Estrogen receptor beta: mine is longer than yours? *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3754-3755.
39. O'Brien ML, Park K, In Y, Park-Sarge OK: Characterization of estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid and protein expression in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4530-4541.
40. Yang SH, Liu R, Perez EJ, et al.: Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4130-4135.
41. Gilad LA, Schwartz B: Association of estrogen receptor beta with plasma-membrane caveola components: implication in control of vitamin D receptor. *J Mol Endocrinol* 2007; 38: 603-618.
42. Gittoes NJ, McCabe CJ, Sheppard MC, Franklyn JA: Estrogen receptor beta mRNA expression in normal and adenomatous pituitaries. *Pituitary* 1999; 1: 99-104.
43. Zhou W, Song Y, Xu H, et al.: In nonfunctional pituitary adenomas, estrogen receptors and slug contribute to development of invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E1237-E1245.
44. Hattori Y, Ishii H, Tahara S, Morita A, Ozawa H: Accurate assessment of estrogen receptor profiles in non-functioning pituitary adenomas using RT-digital PCR and immunohistochemistry. *Life Sci* 2020; 260: 118416. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118416>
45. Kanaya M, Higo S, Ozawa H: Neurochemical Characterization of Neurons Expressing Estrogen Receptor β in the Hypothalamic Nuclei of Rats Using in Situ Hybridization and Immunofluorescence. *Int J Mol Sci* 2019 Dec 23; 21: 115. <https://doi.org/10.3390/ijms21010115>
46. de Jong MRW, Visser L, Huls G, et al.: Identification of relevant drugable targets in diffuse large B-cell lymphoma using a genome-wide unbiased CD20 guilt-by association approach. *PLoS One* 2018 Feb 28; 13: e0193098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193098>
47. Langendonk M, de Jong MRW, Smit N, et al.: Identification of the estrogen receptor beta as a possible new tamoxifen-sensitive target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J* 2022 Mar 7; 12: 36. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00631-7>
48. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS: Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 1997; 138: 4613-4621.
49. Jefferson WN, Couse JF, Banks EP, Korach KS, Newbold RR: Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. *Biol Reprod* 2000; 62: 310-317.
50. Chojookhuu N, Hino S, Oo PS, et al.: Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor β in mouse duodenal epithelium. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; 39: 499-507.

(受付：2022年12月6日)

(受理：2022年12月22日)

日本医科大学医学雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学部が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的の場合、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。