



Up—Regulation by Progesterone of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Epidermal Growth Factor Expression in Human Uterine Leiomyoma

下村, 陽祐

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-05-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1844

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001844>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	しもむらようすけ 下村陽祐	(兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第1177号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成10年5月31日	
学位論文題目	Up-Regulation by Progesterone of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Epidermal Growth Factor Expression in Human Uterine Leiomyoma (ヒト子宮筋腫におけるproliferating cell nuclear antigenならびに epidermal growth factor 発現のプロゲステロンによる up-regulation)	
審査委員	主査 教授 丸尾 猛 教授 前田 盛 教授 尾原 秀史	

論文内容の要旨

【緒言】

子宮筋腫は子宮に発生する最も一般的な良性平滑筋腫瘍であり、35歳以上の女性の30%に子宮筋腫の発生をみる。子宮筋腫発生のメカニズムは明らかではないが、子宮筋腫は性成熟期や妊娠時に増大し、閉経後に縮小すること、卵巣ホルモン産生を抑制するGnRHアナログ療法によって縮小し、その治療終了により再び増大することから、卵巣ステロイドホルモンの子宮筋腫発育への密接な関わりが推察される。そこで我々は、まず正常子宮筋細胞ならびに子宮筋腫細胞の増殖活性を proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の発現動態より観察するとともに、子宮筋腫細胞培養系の中で、卵巣ステロイドホルモンが局所増殖因子として重要な役割を担うと考えられる epidermal growth factor (EGF) ならびにEGF受容体発現にいかなる影響を及ぼすかを解析した。

【材料ならびに方法】

1) 組織検体

正常子宮筋ならびに子宮筋腫組織は、神戸大学医学部附属病院における子宮全摘術施行症例より採取し、インフォームドコンセントを得た上で実験に供した。

2) 免疫染色

得られた組織は4%緩衝ホルマリン液固定後、他方培養細胞は90%エタノール固定後、抗PCNA および 抗EGF 受容体モノクローナル抗体を用いる avidin/biotin Immunoperoxidase 法により免疫染色を行った。また、PCNA陽性細胞比率を算出し増殖活性の指標とした。

3) 細胞培養

同一子宮から分離、採取した正常子宮筋組織と子宮筋腫組織からコラゲナーゼ処理により細胞を回収し、10%FBSを添加したDMEM培養液中で37℃、120時間の予備培養を行った。その後、無血清、フェノールレッド非添加のDMEM培養液に移し、エストラジオール (E_2) (0.1, 1.0, 10ng/ml), プロゲステロン (P_4) (1.0, 10, 100ng/ml) を添加下, 非添加下でさらに72時間の培養を行った。

4) 蛋白抽出及びWestern blot 法

培養終了時点で、培養細胞より蛋白を回収し、Bradford法により蛋白定量を行い、抗PCNA及び抗EGFモノクローナル抗体を用いて、Western blot法により各蛋白発現レベルを検討した。

【結 果】

正常子宮筋組織及び子宮筋腫組織における免疫組織化学的検討では、PCNA陽性細胞比率は正常子宮筋組織に比して子宮筋腫組織において性周期にかかわらず有意に高かった。また、正常子宮筋組織でのPCNA陽性細胞比率は増殖期と分泌期の間で有意な差を認めなかったが、子宮筋腫組織でのPCNA陽性細胞比率は増殖期に比して分泌期で有意に高いことを認めた。

培養正常子宮筋細胞ならびに子宮筋腫細胞の増殖活性に及ぼす卵巣ステロイドホルモンの影響を免疫細胞化学的に検討した成績では、正常子宮筋細胞においては、 E_2 (10ng/ml) 添加により、PCNA陽性細胞比率は有意に上昇したが、 P_4 (100ng/ml) 添加ではPCNA陽性細胞比率に有意な変化は認めなかった。一方、子宮筋腫細胞においては、 E_2 (10ng/ml), P_4 (100ng/ml) とともにPCNA陽性細胞比率を有意に上昇させた。低濃度の E_2 (0.1, 1.0ng/ml), 及び P_4 (1.0, 10ng/ml) 添加群では有意な効果は認められなかった。

培養正常子宮筋細胞ならびに子宮筋腫細胞の増殖活性に及ぼす卵巣ステロイドホルモンの影響をWestern blot法により解析した成績では、正常子宮筋細胞においては、 E_2 (10ng/ml) 添加により36kDaのPCNA蛋白発現の増強を認めたが、 P_4 (100ng/ml) 添加ではPCNA蛋白発現の増強は観察されなかった。一方、子宮筋腫細胞では E_2 (10ng/ml), P_4 (100ng/ml) とともにPCNA蛋白発現を増強させた。

さらに培養子宮筋腫細胞におけるEGF発現に及ぼす卵巣ステロイドホルモンの影響をWestern blot法により解析した成績では、 P_4 (100ng/ml) 添加にて、133kDaならびに71kDaのEGF免疫活性蛋白の強い発現を認めたが、 E_2 (10ng/ml) 添加では、EGF免疫活性蛋白の発現は検出感度以下であった。一方EGF受容体発現を免疫細胞化学的に検討した成績では、 E_2 (10ng/ml) 添加により、EGF受容体発現の著明な増強が観察されたが、 P_4 (100ng/ml) 添加ではEGF受容体発現に及ぼす影響は観察されなかった。

【考 察】

子宮筋腫の発育に卵巣ステロイドホルモンが関与することは種々の臨床的事象からも明らかで、これまでエストロゲンが子宮筋腫発育に対して重要な役割を担うと考えられてきたが、子宮筋腫発育調節機構の詳細はいまだ明らかではない、そこで我々は、エストロゲンとともにプロゲステロンにも注目し、卵巣ステロイドホルモンの子宮筋腫発育に及ぼす影響を明らかにしようとした。

培養正常子宮筋ならびに子宮筋腫細胞におけるPCNA蛋白発現動態に及ぼす卵巣ステロイドホルモンの影響より勘案すると、 E_2 , P_4 両者ともに子宮筋腫細胞では増殖促進因子として働くのに対し、正常子宮筋細胞においては E_2 のみが増殖促進因子として働くことが明かとなった。 P_4 が正常子宮筋細胞に比して子宮筋腫細胞においてより促進的に働くことは、Brandon らが P_4 受容体mRNAが正常子宮筋細胞に比して、子宮筋腫細胞で豊富に発現していると報告していることとよく符号する。また E_2 のみならず P_4 が培養子宮筋腫細胞でのPCNA蛋白発現を増強させたことは、子宮筋腫細胞のPCNA陽性細胞比率が増殖期に比して P_4 が優勢である分泌期に高いこととよく一致する。

卵巣ステロイドホルモンは直接子宮筋腫発育を促すのではなく、細胞成長因子や癌遺伝子などの局

所因子を介していると推察されている。本研究では培養子宮筋腫細胞において、 P_4 は通常のEGFと比較して大きな分子量を有するEGF免疫活性蛋白発現を増強するが、 E_2 はEGF免疫活性蛋白発現を増強しないことが観察された。EGFは6kDaのポリペプチドであるが、前駆体である133kDaのpreproEGFが蛋白分解されることによって産生されることが知られている。このことから、今回検出された133kDa及び71kDaのEGF免疫活性蛋白は、preproEGFとその分解過程で産生されたものの一部と推察される。また、 E_2 は子宮筋腫細胞におけるEGF受容体発現を増強させた。つまり、 P_4 はEGF発現を増強するのに対し、 E_2 はEGF受容体発現を増強することより、 P_4 と E_2 は補完的、協調的に作用してEGF-EGF受容体系を刺激し、子宮筋腫細胞の増殖活性を調節していると推察された。

論文審査の結果の要旨

子宮筋腫は初経開始前の女性には見られないが、性成熟期女性の30%にみられ、閉経と共に退縮することから、その発育は従来よりエストロゲン依存的であると考えられてきた。しかし、最近の教室の研究でプロゲステロン(P_4)が子宮筋腫細胞でのBcl-2蛋白発現を著明に増強させることが明らかになったことより、エストラジオール(E_2)と P_4 が筋腫細胞の増殖活性にいかなる影響を及ぼすかを検討した。

正常子宮筋及び筋腫組織の増殖活性をproliferating cell nuclear antigen (PCNA)陽性細胞比率より検討すると、正常子宮筋組織では増殖期と分泌期の間で差はないが、筋腫組織では増殖期に比して分泌期で有意に高かった。また培養細胞系での検討では、正常子宮筋細胞の場合 E_2 添加によりPCNA陽性細胞比率は有意に上昇したが、 P_4 添加では有意な変化を認めなかった。しかし、筋腫細胞の場合、 E_2 、 P_4 ともにPCNA陽性細胞比率を有意に上昇させた。Western blot法による検討では、正常子宮筋細胞の場合、 E_2 添加によりPCNA蛋白発現が増強したが、 P_4 添加では影響がみられなかったのに対し、筋腫細胞では E_2 、 P_4 ともにPCNA蛋白発現を増強させた。さらにepidermal growth factor (EGF)発現に及ぼす影響を検討すると、 P_4 添加によってEGF免疫活性蛋白発現の増強をみたが、 E_2 添加ではそのような促進効果は観察されなかった。また、EGF受容体発現に及ぼす影響を免疫細胞化学的に検討したところ、 E_2 添加によりEGF受容体発現は大きく増強したが、 P_4 添加ではそのような効果は観察されなかった。以上より、 E_2 のみならず P_4 も筋腫細胞増殖を促進し、 P_4 はEGF発現を、一方 E_2 はEGF受容体発現をそれぞれ増強することが明らかとなった。つまり、 P_4 と E_2 は補完的、協調的に作用してEGF-EGF受容体系を刺激することにより筋腫細胞の増殖活性調節に関与していると考えられる。

本研究は、卵巣ホルモンによる子宮筋腫細胞の増殖調節機構を検討したものであるが、従来明らかでなかった P_4 の子宮筋腫発育への関与について重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。