



Tumor Necrosis Factor- α Expression in Human Uterine Leiomyoma and Its Down-Regulation by Progesterone

倉智, 治

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2356

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002356>

※ 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。



【132】

氏 名・(本 籍) 倉智 治 (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1370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13年3月31日

【学位論文題目】

**Tumor Necrosis Factor- α Expression in Human Uterine Leiomyoma
and Its Down-Regulation by Progesterone**

子宮筋腫細胞におけるTumor Necrosis Factor- α の発現と
プロゲステロンによるその発現制御に関する検討

審 査 委 員

主査 教授 丸尾 猛

教授 伊東 宏 教授 尾原 秀史

1. 緒言

腫瘍の発育は細胞レベルでの増殖能と細胞死のバランスにより規定されており、子宮筋腫の発育も子宮筋腫細胞の増殖能と細胞死、つまりアポトーシスの両面から捉える必要がある。子宮筋腫の発育に性ステロイドが深く関わることで種々の臨床的事象から推察されるが、これまで性ステロイドの子宮筋腫発育への関わりは、性ステロイドが子宮筋腫細胞増殖能に及ぼす影響から検討されてきた。一方、性ステロイドが子宮筋腫細胞のアポトーシスに及ぼす影響を調べた報告は極めて少ない。すでに我々は正常子宮筋細胞に比して子宮筋腫細胞にアポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 蛋白が強く発現し、性ステロイドであるプロゲステロン (P4) がその発現レベルを高めることから、P4 は子宮筋腫細胞のアポトーシス抑制を介して子宮筋腫発育に関わることを明らかにしている。

そこで今回、本研究では種々の生殖器官細胞においてその増殖能を抑制し、アポトーシスを促進する Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) に着目し、TNF α の正常子宮筋ならびに子宮筋腫組織での発現動態、さらに培養子宮筋腫細胞を用いて細胞レベルでの TNF α 発現に及ぼす性ステロイドの影響を検討した。

2. 方法

手術時に得られた同一子宮内子宮筋腫ならびに正常子宮筋組織を患者の同意を得て実験に供した。月経周期 7 日目から 10 日目に採取した増殖期の正常子宮筋ならびに子宮筋腫組織 9 検体、また月経周期 20 日目から 24 日目に採取した分泌期の正常子宮筋ならびに子宮筋腫組織 11 検体、また妊娠中に急激な増大をきたした妊娠 25 週から 36 週の妊娠時子宮筋腫組織 7 検体を採取し、組織切片上で ABA 法を用いて TNF α 発現の免疫組織学的検討を行なった。また、それぞれの正常子宮筋ならびに子宮筋腫組織より蛋白を抽出し、Bradford 法で定量後、Western immunoblot 法にて TNF α 発現の検討を行なった。一方、子宮筋腫組織から子宮内膜を除去し、組織片を細切後 collagenase 処理により子宮筋腫細胞を回収した。得られた細胞が子宮筋腫細胞であることは平滑筋細胞特有の Desmin、線維芽細胞特有の Cytokeratin を免疫組織学的に検討することで同定した。得られた子宮筋腫細胞は無血清培地でプロゲステロン (P4, 3.18×10^{-7} mol/L)、 17β -エストラジオール (E2, 3.67×10^{-8} mol/L) ならびに E2+P4 添加下に 72 時間培養し、同様に蛋白抽出を行ない、Western immunoblot 法にて TNF α 発現の検討を行なった。

3. 結果

正常子宮筋組織における TNF α 発現を免疫組織学的に検討した成績では、増殖期、分泌期において TNF α の弱い発現を認め、増殖期と分泌期における TNF α 発現レベルの差は明らかでなかった。他方、子宮筋腫組織における TNF α 発現を免疫組織学的に検討した成績では、正常子宮筋組織に比して増殖期

ならびに分泌期子宮筋腫組織において $\text{TNF}\alpha$ の強い発現を認め、妊娠時子宮筋腫組織では $\text{TNF}\alpha$ 発現は極めて弱かった。また、分泌期子宮筋腫組織に比して増殖期子宮筋腫組織で強い $\text{TNF}\alpha$ 発現が観察された。

正常子宮筋組織、子宮筋腫組織ならびに、妊娠時子宮筋腫組織における $\text{TNF}\alpha$ 発現を Western immunoblot 法により検討した成績では、正常子宮筋組織ならびに子宮筋腫組織に 17.3 kDa の $\text{TNF}\alpha$ の発現が観察され、その発現レベルは正常子宮筋組織に比して子宮筋腫組織で強かった。正常子宮筋組織では増殖期と分泌期との間で $\text{TNF}\alpha$ 発現レベルに差は観察されなかったが、子宮筋腫組織では分泌期に比して増殖期で強い $\text{TNF}\alpha$ 発現が観察された。妊娠時子宮筋腫組織では $\text{TNF}\alpha$ 発現は検出感度以下であった。

また、培養子宮筋腫細胞における $\text{TNF}\alpha$ 発現に及ぼす性ステロイドの影響を Western immunoblot 法で検討した成績では、P4 単独添加で $\text{TNF}\alpha$ 発現の減弱が観察されたが、E2 単独添加では $\text{TNF}\alpha$ 発現に及ぼす影響は観察されなかった。E2+P4 添加では僅かな $\text{TNF}\alpha$ 発現の減弱が認められた。

4. 考察

近年の目覚ましい分子生物学の進歩によりアポトーシスの cascade が次第に明らかになりつつある。種々の細胞におけるアポトーシスはアポトーシス誘導因子とアポトーシス抑制因子の複雑なバランスの上に規定されていると考えられる。

子宮筋腫細胞ではアポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 蛋白が強く発現し、P4 がその発現を高めることから、P4 は子宮筋腫細胞のアポトーシスを抑制することにより、子宮筋腫の発育に関与する。最近、いくつかの生殖器細胞において Bcl-2 蛋白は $\text{TNF}\alpha$ によるアポトーシス誘導を抑制することが明らかにされており、Bcl-2 蛋白が豊富に発現する子宮筋腫細胞における $\text{TNF}\alpha$ 発現を調べることは子宮筋腫細胞のアポトーシス調節機構を知る上で極めて重要であると考えられる。

本研究において正常子宮筋組織に比して子宮筋腫組織において強い $\text{TNF}\alpha$ の発現が観察され、子宮筋腫組織での $\text{TNF}\alpha$ 発現レベルは分泌期に比して増殖期で高く、さらに妊娠時子宮筋腫組織では極めて弱い $\text{TNF}\alpha$ 発現を示した。一方、正常子宮筋組織での $\text{TNF}\alpha$ 発現レベルは増殖期と分泌期の間で差は観察されなかった。このことより、アポトーシス抑制因子の Bcl-2 蛋白のみならず、アポトーシス誘導因子の $\text{TNF}\alpha$ も子宮筋腫細胞のアポトーシス調節に関与すること、さらに性ステロイドが子宮筋腫細胞の $\text{TNF}\alpha$ 発現を調節している可能性が示唆された。また、子宮筋腫細胞培養系で P4 が $\text{TNF}\alpha$ 発現を抑制し、E2 はその発現に大きな影響を及ぼさなかった。P4 は子宮筋腫細胞の Bcl-2 蛋白発現を高め、 $\text{TNF}\alpha$ 発現を減弱することにより、子宮筋腫細胞のアポトーシスを抑制すると考えられた。性ステロイドによる子宮筋腫発育調節機構は、従来より知られている E2 ならびに P4 による子宮筋腫細胞増殖能亢進とともに P4 による子宮筋腫細胞アポトーシス抑制により制御されていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1372号	氏名	倉智 治
論文題目	<p>Tumor Necrosis Factor-α Expression in Human Uterine Leiomyoma and Its Down-Regulation by Progesterone</p> <p>子宮筋腫細胞におけるTumor Necrosis Factor-αの発現と プロゲステロンによるその発現抑制に関する検討</p>		
審査委員	<p>主 査 丸 尾 猛</p> <p>副 査 尾 原 秀 実</p> <p>副 査 伊 東 宏</p>		
審査終了日	平成 13 年 3 月 13 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

<p>腫瘍の発育は細胞レベルでの増殖能と細胞死のバランスにより規定されており、子宮筋腫の発育も子宮筋腫細胞の増殖能と細胞死、つまりアポトーシスの両面から捉える必要性がある。すでに我々は正常子宮筋に比して子宮筋腫細胞にアポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 蛋白が強く発現し、性ステロイドであるプロゲステロン (P4) がその発現レベルを調節することから P4 は子宮筋腫細胞のアポトーシスを抑制することにより、子宮筋腫発育に関わることを明らかにしている。そこで本研究では、アポトーシスを促進する Tumor Necrosis Factor-α (TNFα) に着目し、TNFα の正常子宮筋ならびに子宮筋腫組織での発現動態、さらに培養子宮筋腫細胞を用いて細胞レベルでの TNFα 発現に及ぼす性ステロイドの影響を検討した。組織は増殖期、分泌期ならびに妊娠時子宮より採取し、組織切片上で ABA 法を用いて TNFα 発現の免疫組織学的検討を行なった。また、正常子宮筋ならびに子宮筋腫組織より蛋白を抽出し、Bradford 法で定量後、Western immunoblot 法にて TNFα 発現の検討を行なった。一方、組織片を細切後 collagenase 処理により子宮筋腫細胞を回収した。得られた細胞が子宮筋腫細胞であることは平滑筋細胞特有の Desmin、線維芽細胞特有の Cytokeratin を免疫組織学的に検討することで同定した。得られた子宮筋腫細胞は無血清培地でプロゲステロン (P4, 3.18×10^{-7} mol/L)、17β-エストラジオール (E2, 3.67×10^{-8} mol/L) ならびに E2+P4 添加下に 72 時間培養し、同様に蛋白抽出を行ない、Western immunoblot 法にて TNFα 発現の検討を行なった。</p> <p>正常子宮筋組織における TNFα 発現を免疫組織学的に検討した成績では、増殖期、分泌期において TNFα の弱い発現を認め、増殖期と分泌期における TNFα 発現レベルの差は明らかでなかった。他方、子宮筋腫組織では、正常子宮筋組織に比して増殖期ならびに分泌期子宮筋腫組織において TNFα の強い発現を認め、妊娠時子宮筋腫組織では TNFα 発現は極めて弱かった。分泌期に比して増殖期子宮筋腫組織で強い TNFα 発現を認めた。正常子宮筋組織、子宮筋腫組織ならびに、妊娠時子宮筋腫</p>

組織における TNF α 発現を Western immunoblot 法により検討した成績では、正常子宮筋組織ならびに子宮筋腫組織に 17.3 kDa の TNF α の発現が観察され、その発現レベルは正常子宮筋組織に比して子宮筋腫組織で強かった。正常子宮筋組織では増殖期と分泌期との間で TNF α 発現レベルに差は観察されなかったが、子宮筋腫組織では分泌期に比して増殖期で強い TNF α 発現が観察された。妊娠時子宮筋腫組織では TNF α 発現は検出感度以下であった。また、培養子宮筋腫細胞における TNF α 発現に及ぼす性ステロイドの影響を Western immunoblot 法で検討した成績では、P4 単独添加で TNF α 発現の減弱が観察されたが、E2 単独添加では TNF α 発現に及ぼす影響は観察されなかった。E2+P4 添加では僅かな TNF α 発現の減弱が認められた。

正常子宮筋組織に比して子宮筋腫組織において強い TNF α の発現が観察され、子宮筋腫組織での TNF α 発現レベルは分泌期に比して増殖期で高く、さらに妊娠時子宮筋腫組織では極めて弱い TNF α 発現を示した。一方、正常子宮筋組織での TNF α 発現レベルは増殖期と分泌期の間で差は観察されなかった。このことより、TNF α による子宮筋腫細胞のアポトーシス調節機構が子宮筋腫発育に関与すること、さらに性ステロイドが子宮筋腫細胞の TNF α 発現を調節している可能性が示唆された。また、子宮筋腫細胞培養系で P4 が TNF α 発現を抑制したことから、P4 が子宮筋腫細胞における TNF α 発現調節に重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究はアポトーシス促進因子と考えられる TNF α が子宮筋腫細胞に強く発現していること、プロゲステロンがその発現を抑制することを初めて明かにしたものであり、性ステロイドの TNF α を介する子宮筋腫発育への関与につき、新しい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、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。