

氏名 (本籍)	廣瀬 玲子 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 410 号
学位授与日付	平成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	女性生殖器における性ステロイド受容体の変異体の臨床的意義
審査委員	(主査) 教授 玉 舎 輝 彦 (副査) 教授 野 澤 義 則 教授 岡 野 幸 雄

## 論文内容の要旨

女性生殖器の機能は、主に性ステロイドであるエストロゲンおよびプロゲステロンによって調節されている。一方、成熟期の女性において、卵巣および副腎皮質より分泌される血清中のテストステロンの値は、エストラディオールの値の約10倍にも達する。また、子宮内膜や子宮筋腫においてアンドロゲン受容体 (AR) やプロゲステロン受容体 (PR) はエストロゲン依存性に誘導される。これらのことから女性生殖器における機能や女性生殖器疾患における発生、増殖および進展に様々な性ステロイド受容体が関わることは疑いのないことである。近年の分子生物学的手法の進歩により様々な性ステロイド受容体の変異体や多型の存在が明らかにされつつあり、女性生殖器の機能障害や女性生殖器疾患における発生、増殖および進展の亢進や抑制に関与していると推察されている。

そこで、エストロゲン受容体 (ER) 遺伝子のドメインBの多型、すなわちER遺伝子ドメインBにおけるコドン87をコードする塩基配列GCG (野生型ER B) がGCCに変異した遺伝子多型 (ER B'), ERのエキソン5のスプライシングバリエント (ER E5SV) の遺伝子発現、プロゲステロン受容体 (PR) のN末端164アミノ酸を欠失したPR-Aの遺伝子発現、ARのシトシン、アデニン、グアニン (CAG) の繰り返し配列の多型などの臨床的意義を検討した。

### 研究方法

- 1) すべての患者およびボランティアから検体の供与および研究への利用に対するインフォームドコンセントを得た。
- 2) ER B遺伝子の多型に関しては、多岐にわたる疾患背景の213人の日本人女性を対象とし、18人の白人女性を対照とした。その末梢血よりフィコール・コンレイ液で単核球の層を採取し、これよりゲノムDNAをプロテナーゼKおよびフェノールクロロフォルムで抽出し、sodium acetateで沈澱させ、得た。
- 3) ER E5SVの発現、PR-AおよびPR-Bの遺伝子発現、AR遺伝子のCAG反復数の検討において、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、子宮筋腫、子宮内膜症の組織より、グアニジン-アシドフェノール法にて総RNAを抽出した。
- 4) 総RNA3 $\mu$ gを総容量が、20 $\mu$ lとなるように調整し、reverse transcriptionを行い、PCRのテンプレートを得た。
- 5) PCRは総容量100 $\mu$ lで施行した。なお、各種遺伝子のPCRのためのプライマー (オリゴマー) の塩基配列は、すでに明らかにされた各々のcDNAの塩基配列 [ER cDNA, PR cDNA, AR cDNA, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA] によって設定した。
- 6) 電気泳動で分離させたアガロース内のPCR産物をキャピラリートランスファーでImmobilon-S transfer-membrane上に移行させ、ビオチン化プローブとハイブリダイゼーションし、蛍光を発光させ、オートラディオグラムを行った。検出した特異的バンドの強さをデンストメータで測定した。なお、目的遺伝子の発現量を比率で検討するのではなく、個々の発現量として検討する際には内部標準であるGAPDH mRNAの発現を測定するためのプライマーも同時に反応系に加え、GAPDH mRNAの発現量で補正した。
- 7) PCR産物 (AR遺伝子) を12%ポリアクリルアミドゲルの電気泳動により分離し、抽出し、これをQuick Spin G-50 Sephadex Columnで純化した。単鎖のDNAフラグメントを、純化したPCR産物からAutoLoad Solid Sequencing Kitで得た。DNA伸長反応を、得られた単鎖のDNAフラグメントを鋳型として、Cy5でラベルしたプライマーでAutoLoad Solid Sequencing Kitで施行した。PCR産物のCAG反復数はALF express DNA sequencerで解析した。

### 結果

- 1) 日本人女性におけるER Bの多型の検討: 白人女性での報告によると、ER Bの遺伝子多型は、反復自然流産や乳癌の家族歴と関連する。白人女性では、反復自然流産や乳癌の症例でも、正常であっても有意差はあるものの、いずれも10%台のヘテロ変異型が検出される。我々の検討でも、白人女性ではほぼ同じ検出率であったが、日本人女性では、疾病に関わらず検出されなかった。したがって、この遺伝子多型ER Bは人種的傾向があり、日本人にとって、少なくとも決定的な反復自然流産や乳癌に関連する遺伝子多型ではないと考えられた。
- 2) 女性生殖器癌および子宮内膜症におけるER E5SVの発現: 腫瘍において検出されているERのエキシソンのSVのうち、ER E5SV以外は標的遺伝子の転写を活性化しないが、ER E5SVはエストロゲン結合ドメインが欠落しているためAF-2による転写活性はないが、AF-1による転写が活性化されているため、標的遺伝子の転写を活性化し、標的臓器の増殖などに関連すると推察されていた。

女性生殖器癌の原発巣においてのER E5SV mRNAの発現量は、なんら特徴的なことはなかったが、転移巣においてE5SV/野生型(WT) ER mRNAは、原発巣に比して転移巣での発現が低いという症例は1例もなく、卵巣癌4例(8例中)および子宮内膜癌4例(8例中)では原発巣に比して転移巣での発現が有意に高くなっていた。このことからER E5SVはエストロゲンの依存性から逸脱し、卵巣癌や子宮内膜癌の転移能獲得に関連していると考えられた。

子宮内膜症におけるWT ERやER E5SVは正常子宮内膜と比べ低値であったが、E5SV/WT ER mRNAは、正常子宮内膜と卵巣子宮内膜症内膜ではほぼ同じ20%台と低値であった。このことから、エストロゲン作用は子宮内膜症では変化していることが考えられる。さらに正常子宮内膜においては野生型ER mRNAの発現は排卵後ダウンレギュレーションされたが、卵巣子宮内膜症内膜ではされなかった。このことから正常子宮内膜で機能している野生型ERを介した情報伝達が卵巣子宮内膜症内膜では部分的に障害されていると考えられた。したがって、子宮内膜症におけるWT ERやER E5SVは内因性のエストロゲンに対する不完全な反応が子宮内膜症の増殖や進展に関与していると考えられた。

3) 女性生殖器癌および子宮筋腫におけるPR-AおよびPR-B遺伝子の発現:野生型であるPR-BのアイソフォームであるPR-Aは、PR-Bの転写やERを介したエストロゲンの作用を抑制する。子宮内膜ではPR-AとPR-B mRNAは1:1に発現しており、この比率は内因性ステロイドの影響を受けない。しかしながら腫瘍の発生、増殖および進展においてこれらの発現は修飾を受ける。

PR-AとPR-B mRNAの発現量が1:1である発現様式をAB、PR-A mRNAの発現が障害され、PR-B mRNAの発現が優位になった発現様式をB、PR-B mRNAの発現が障害され、PR-A mRNAの発現が優位になった発現様式をAとした。

卵巣癌でのPRの発現様式は進行した症例ではほとんどがBであった。このことから、卵巣癌におけるPR-BやERの転写の抑制因子として働くと考えられているPR-Aの発現障害は、卵巣癌の悪性過程に関連していると考えられた。

原発巣におけるPRの発現様式が正常型ABであった症例も、転移巣における発現様式はBとなり、すべての症例でBであった。このことから、女性生殖器癌におけるPR-Aの発現障害は、転移能の獲得と関連していると考えられた。

子宮筋腫においてPRの発現様式が正常型のABである症例は従来のエストロゲン依存性を保っていると考えられる。一方、筋腫表層部やさらには筋腫深部まで発現様式がBであった筋腫における増殖は、PR-Aの発現が障害されているため、PR-Bの転写が抑制できなくなり、調節から逸脱して生じたprogestational proliferationと関連していると考えられた。

4) 子宮内膜症および子宮筋腫におけるAR遺伝子のCAG反復数:末梢血単核球から抽出したゲノムDNAおよび対象の組織から抽出した総RNAを逆転写したものを鋳型としてPCRを施行し、DNAシーケンス解析にてPCR産物のCAG反復数を測定する。

AR遺伝子は、X染色体上に存在し、転写活性に関与するA/B領域は他のステロイド受容体ファミリーより比較的長く、3種類の3塩基の繰返し配列を含む。このうちポリグルタミン領域であるCAG反復数には多型性がみとめられる。球脊髄性筋萎縮症におけるAR遺伝子のCAG反復数は約2倍で、この反復数と若年での発症や重症化との間に相関がある。また、ヒスパニックの女性における男性化とAR遺伝子のCAG反復数との間に相関がある。

さらに、女性の体細胞には2本のX染色体があるが、一方が恒久的に不規則に、また、各々が同じ確立で不活化されている。このため、組織単位では父由来のX染色体が活性化されている細胞と母由来のX染色体が活性化されている細胞とがほぼ同数混在する。一方、一つの細胞から発育したと考えられる腫瘍組織では、どちらか一方の同一の活性化X染色体をもつことが例証されている。

卵巣子宮内膜症内膜におけるCAG反復数にはなんら特徴はなかったが、ヘテロ接合性のすべての症例において、一つのチョコレート嚢胞内の内膜におけるAR遺伝子の発現は、どちらか一方の同一のAR遺伝子を発現していた。このことから卵巣子宮内膜症は単一のクローンから発生していると考えられた。

各々の子宮筋腫核におけるCAG反復数にはなんら特徴はなかったが、ヘテロ接合性のすべての症例において、一つの筋腫核におけるAR遺伝子の発現は、どちらか一方の同一のAR遺伝子を発現していた。このことから一つの筋腫核は単一のクローンから発生していると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者廣瀬玲子は、日本人女性にとって遺伝子多型ER Bは反復自然流産や乳癌に関連しないこと、ER E5SVの過剰発現は女性生殖器癌の転移能獲得および子宮内膜症の増殖や進展に関与すること、PR-Aの発現障害は、卵巣癌の悪性過程や女性生殖器癌の転移能獲得、子宮筋腫の逸脱したprogestational proliferationと関連していること、AR遺伝子のCAG反復数の検討から子宮内膜症やひとつの子宮筋腫核は単一のクローンから発生していることなどを明らかとした。これらの研究成果は、性ステロイド受容体の女性生殖器における作用発現機構の解明に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

女性生殖器における性ステロイド受容体の変異体の臨床的意義

岐阜大医紀 47 (2):印刷中