

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
竹原幹雄	主査 教授 植 木 實 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 宮 崎 瑞 夫
主論文題名 Vascular Endothelial Growth Factor A and C Gene Expression in Endometriosis (子宮内膜症における VEGF-A および VEGF-C 遺伝子発現)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>子宮内膜症(内膜症)は、良性でありながら子宮体部内膜あるいはその類似組織が異所性に浸潤、増殖する疾患である。その発生機序として諸説があるが、月経血の逆流移植説や内膜片の脈管転移説などが支持されている。近年腹膜病巣ではその色調が重要視されており、最も活性の高い病巣が赤色病巣、時間が経過し活性の低下した病巣が黒色病巣ではないかと考えられている。この内膜症の発生・進展には血管新生が関与し、血管新生因子である Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)-A についての知見が蓄積されつつあるが、内膜症病巣における VEGF-A の遺伝子発現について詳細に検討した報告は少ない。また、脈管転移説の中のリンパ行性転移説も発生機序のひとつとして重要である。VEGF-C はリンパ管内皮細胞の増殖に関与し、悪性腫瘍でのリンパ節転移や予後との関連性が指摘されている。今回、正所性内膜、異所性内膜における VEGF-A および VEGF-C の遺伝子・蛋白発現を RT-PCR 法と免疫染色により評価し、内膜症の発生病態におけるこれら血管新生因子の生物学的意義について検討した。</p> <p>《対象と方法》</p> <p>対象は、1999 年 12 月から 2002 年 2 月までに内膜症あるいは良性婦人科疾患の診断で手術を施行し、本研究に同意を得られた 62 例であり、非内膜症群(group 1; 15 例)と内膜症群(group 2; 47 例)に分類した。group 1 より正所性内膜を 12 検体、正常腹膜を 9 検体、また group 2 より正所性内膜を 10 検体、正常腹膜を 23 検体、異所性内膜を 62 検体(赤色腹膜病巣 21、黒色腹膜病巣 15、卵巣チョコレート嚢胞 26 各検体)採取し VEGF 遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。VEGF 蛋白発現は、group 1 の正所性内膜 9 検体と group 2 の正所性内膜 9 検体および卵巣チョコレート嚢胞 13 検体採取し免疫染色を用いて検討した。</p> <p>1. 遺伝子発現の検討</p> <p>RT-PCR 法を用いて、手術採取検体における VEGF-A および VEGF-C mRNA の発現を、β-actin を内部標準として、半定量的に測定した。各検体を RNA STAT60 にて融解し、phenol, chloroform 法および ethanol 沈澱法にて total RNA を抽出し、RNase-free DNase により DNA を除去後、</p>	

random primer 法により cDNA を作製した。PCR は cDNA と VEGF-A, VEGF-C, β -actin の oligonucleotide primer を各々含む溶液(20ml)で施行し、cycle 数はそれぞれの増幅産物が蓄積する前の指数関数的増幅の時点とした。増幅産物を ethidium bromide を含む 1.5% agarose gel で電気泳動し、紫外線解析ソフトを用いて VEGF-A, VEGF-C の β -actin に対する量比を求めた。

2. 蛋白発現の検討

ウサギ抗ヒト VEGF-A polyclonal 抗体およびヒツジ抗ヒト VEGF-C polyclonal 抗体を一次抗体として用い、ABC 法により免疫染色を施行した。半定量的な解析として染色強度とその占める割合をそれぞれ 4 段階、5 段階に分類し両者の積を histological score (H 値)として算出した。

《結果》

1. 遺伝子発現について

正所性内膜における VEGF-A mRNA 発現は、group 2 が全月経周期で group 1 よりも高く、周期中では分泌期で増加した。group 2 の腹膜病巣における VEGF-A mRNA 発現は同 group の正常腹膜よりも高く、正所性内膜と同等であった。一方、group 1 の正所性内膜における VEGF-C mRNA 発現は、group 2 の正所性内膜、異所性内膜および両 group の正常腹膜よりも全月経周期で高かった。正所性および異所性内膜の両者において月経周期による VEGF-C mRNA 発現の変動は認められなかった。卵巣チョコレート嚢胞での VEGF-A および VEGF-C mRNA 発現は嚢胞径が、手術適応となる 6 cm より大きいものは、それ未満のものと比較して高かった。

2. 蛋白発現について

VEGF-A と VEGF-C の蛋白発現は、正所性内膜および卵巣チョコレート嚢胞の腺上皮細胞と間質細胞の両者に認められた。両 group の正所性内膜で、VEGF-A の H 値は、腺上皮の方が間質よりも全月経周期で高かった。group 2 の正所性内膜では、VEGF-C の H 値は全月経周期で腺上皮の方が間質よりも高かった。卵巣チョコレート嚢胞での VEGF-A, VEGF-C の H 値は、腺上皮の方が間質よりも高値であったが、特に間質での VEGF-A の H 値は、両 group の正所性内膜の間質よりも高値であった。

《結論》

内膜症の腹膜病巣と正所性内膜での血管新生活性は同程度に高いことより腹膜病巣の発生、或いは進展には、正所性内膜が関与している可能性が考えられた。卵巣チョコレート嚢胞の増大には、腺上皮および間質での VEGF-A による血管新生に加えて VEGF-C によるリンパ管新生も重要な働きをしている可能性が考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	竹原 幹 雄
論文審査担当者		主 査 教授 植 木 實 副 査 教授 大 槻 勝 紀 副 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 芝 山 雄 老 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫	
主論文題名 Vascular Endothelial Growth Factor A and C Gene Expression in Endometriosis (子宮内膜症における VEGF-A および VEGF-C 遺伝子発現)			
論文審査結果の要旨			
<p>子宮内膜症(内膜症)の発生機序として諸説があるが、中でも月経血の逆流移植説や脈管転移説が支持されている。一方、内膜症の発生・進展には血管新生が関与し、血管新生因子である Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)-A についての知見が蓄積されつつあるが、内膜症病巣の VEGF-A 遺伝子発現について詳細に検討した報告は少ない。申請者らは、正所性内膜、異所性内膜における VEGF-A および VEGF-C の遺伝子・蛋白発現を RT-PCR と免疫染色により検討し、以下の知見を得ている。</p> <p>方法は内膜症群、非内膜症群の正所性内膜を各々10 検体、12 検体および正常腹膜を各々23 検体、9 検体、また内膜症群の赤色腹膜病巣 21 検体、黒色腹膜病巣 15 検体、卵巣チョコレート嚢胞 26 検体を用いて遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。更に両群の正所性内膜を各々9 検体と卵巣チョコレート嚢胞 13 検体を用いて蛋白発現を免疫染色にて検討した。その結果、正所性内膜における VEGF-A mRNA 発現は、内膜症群が全月経周期で非内膜症群よりも高く、中でも分泌期で増加していた。腹膜病巣における VEGF-A mRNA 発現は同群の正常腹膜よりも高く、正所性内膜と同等であった。正所性および異所性内膜において月経周期による VEGF-C mRNA 発現の変動は認めなかった。卵巣チョコレート嚢胞での両遺伝子発現は嚢胞径が手術適応となる 6 cm より大きいものは、それ未満のものと比較して高かった。蛋白発現は、正所性内膜および卵巣チョコレート嚢胞の腺上皮細胞と間質細胞に認められた。両群の正所性内膜で、VEGF-A の発現強度は、腺上皮の方が間質よりも全月経周期で高かった。内膜症群の正所性内膜では、VEGF-C の発現強度は全月経周期で腺上皮の方が間質よりも高かった。卵巣チョコレート嚢胞での両蛋白発現強度は、腺上皮の方が間質よりも高かったが、間質での VEGF-A の発現強度は、両群の正所性内膜の間質よりも高かった。</p> <p>申請者らは、本研究において、内膜症の腹膜病巣の発生・進展に血管新生活性の高い正所性内膜が関与し、また卵巣チョコレート嚢胞の増大には、血管新生のみならずリンパ管新生も関与する可能性があることをはじめて明らかにした。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌) HUMAN PATHOLOGY In press			