






学位論文審査結果要旨

氏 名	庄 とも子					
論文審査委員	主査 所属	生体適応 系	生体機構 部門	岩井 佳子		
	副査 所属	環境・産業生態 系	環境適応医学 部門	上野 晋		
		障害機構 系	災害外科 部門	田中 文啓		
		系	部門			
		系	部門			

論文題目

Expression of p53 in endometrial polyps with special reference to the p53 signature
 (子宮内膜ポリープにおける p53 蛋白質の発現と p53signature の関連)

学位論文審査結果要旨

<目的>形態学的に細胞・構造異型を伴わない p53 蛋白質強発現の子宮内膜細胞が 12 個以上連続して集合している状態を p53 signature (p53S) といい、子宮内膜漿液性腺癌との関連が指摘されている。本研究では子宮内膜ポリープにおける p53S の発現頻度を調べ、細胞増殖やアポトーシスとの関連について検討を行った。

<方 法>子宮内膜ポリープ 133 例を対象として p53, Ki67, estrogen receptor (ER)-α の発現について免疫組織学的解析を行った。また TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法を用いてアポトーシスを検出した。さらに同意が得られた 4 例について TP53 遺伝子のエキソン 5 から 9 の領域についてシーケンス解析を行った。

<結 果>子宮内膜ポリープ 133 例のうち、71 例は閉経後、62 例は閉経前で、後者のうち 41 例は月経周期の増殖期、21 例は分泌期に採取された。閉経後子宮内膜ポリープにおいて P53S は 9 例 (12.9%) で検出され、p53S 陽性例と p53S 陰性例で、Ki67 および ER-a 発現に有意差はなかった。一方、p53S 陽性例ではアポトーシスが検出されなかったが、p53S 陰性例では 1% の割合でアポトーシスが検出された。遺伝子解析が行われた 4 症例のうち 2 症例で TP53 遺伝子変異を認め、いずれもヘテロ接合であった。そのうち 1 例ではエキソン 5 のコドン 145 にサイレント変異とコドン 169 にミスセンス変異を認め、もう 1 例ではエキソン 5 のコドン 169 にサイレント変異を認めた。

<考 察>今回検討を行った子宮内膜ポリープでは、閉経後症例において p53S が検出され、p53S 陽性例では陰性例にくらべてアポトーシスの頻度が低下していた。遺伝子解析を行った 4 例のうち 2 例は正常で、残りの 2 例で見つかった点突然変異はヘテロ接合であり、p53 蛋白質の機能異常は考えにくい。

本研究は、子宮内膜漿液性腺癌との関連が指摘されている p53S について、子宮内膜ポリープで検討を行ったものである。p53S を認めた場合子宮全摘を奨励する論文もあるが、本論文により、閉経後子宮内膜ポリープでは p53S が高頻度で検出され、遺伝子解析で必ずしも p53 蛋白質の機能異常を伴うわけではないことが明らかになり、臨床的に重要な発見と考えられ、本学の学位論文として適格であると判断した。

氏 名 庄 とも子

論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)

Expression of p53 in endometrial polyps with special reference to the p53 signature
(子宮内膜ポリープにおける p53 蛋白質の発現と p53signature の関連)

論文要旨

【目的】

卵巣癌を含む骨盤漿液性腺癌は卵管上皮を発生起源とする発がんモデルが提唱されている。そのモデルによれば、細胞異型を伴わないが p53 蛋白質強発現の p53signature (p53S) が最も初期段階に卵管上皮に発生し、その後卵管上皮内漿液性腺癌 (serous tubal intraepithelial carcinoma:STIC) へと進展しその後骨盤漿液性腺癌が完成するとされている。近年子宮内膜漿液性腺癌の発がん過程もこのモデルで説明する報告がなされている。さら子宮内膜ポリープ内に子宮体部漿液性腺癌を認めたとする多くの報告がある。今回我々は子宮内膜ポリープに対して p53 蛋白質の発現と細胞増殖・細胞死との関連を調べることによって p53 蛋白質発現意義を検討し、さらに子宮内膜ポリープでの p53S 発現頻度を明らかにし、p53S が子宮内膜漿液性腺癌の前がん病変である可能性について検討した。

【方法】

産業医科大学産婦人科で手術された子宮内膜ポリープ症例 133 例 (1994 年から 2011 年) を対象として p53 蛋白質発現について検討を行った。62 例は閉経前、71 例は閉経後であった。これらの症例において estrogen receptor (ER)- α 、Ki67、p53 蛋白質の発現を免疫組織学的に評価した。アポトーシス細胞は TUNEL 法を用いて評価した。子宮内膜ポリープにおける p53S の免疫組織学的特性を明らかにするため、TP53 エクソン 5 から 9 まで文章で同意が得られた症例に対して遺伝子解析を行った。

【結果】

閉経前子宮内膜ポリープのうち 41 例は月経周期の増殖期に 21 例は分泌期に採取されていた。多変量解析において Ki67 指数が p53 蛋白質と有意に関連しており ($p < 0.001$)、アポトーシスとの関連はなかった。この結果は月経周期に依存していた。一方で閉経後子宮内膜ポリープでは Ki67 指数がアポトーシスと有意に関連していた ($p < 0.001$)。p53S は閉経子宮内膜ポリープにおいて 9 例 (12.7%) に認められた (平均年齢 70.2 歳)。p53S を有する症例の Ki67 指数は平均 7% で、これは p53S のない閉経子宮内膜ポリープ症例 (12%) と比べて明らかな違いはなかった ($p = 0.058$)。p53S を有する症例のアポトーシス指数は平均 0% で、これは p53S のない閉経子宮内膜ポリープ症例の平均 1% と比べて明らかに少なかった ($p = 0.002$)。p53S の存在の有無に関わらず、全ての閉経子宮内膜で p53S を含めて ER α 陽性であった。p53S は遺伝子解析が行われた 4 症例のうち 2 症例に TP53 遺伝子変異が認められた。一例 (71 歳) はエクソン 5 のコドン 145 とコドン 169 に二つの変異 (サイレント変異とミスセンス変異) を認め、もう一例 (82 歳) はエクソン 5 のコドン 169 にサイレント変異を認めた。P53S 陰性の 3 例の閉経後子宮内膜ポリープと 3 例の閉経前子宮内膜ポリープ (増殖期) は全て wild type であった。

【考察】

漿液性腺癌は主に高齢女性の萎縮内膜に発生し、p53 蛋白質の強発現と TP53 変異を伴う。今回の検討では p53S は閉経前には認めず、閉経後の高齢者に認められた。閉経子宮内膜ポリープでは細胞増殖とアポトーシスは正の相関関係があり、ER- α を介した細胞増殖刺激に対して p53 蛋白質がアポトーシスを誘導している可能性が示唆され、また p53S は p53 蛋白質の機能破綻によりアポトーシスが誘導されていない可能性が示唆された。閉経前子宮内膜ポリープについては、p53 蛋白質の発現はエストロゲン刺激によって増加し、プロゲステロンにより抑制されていることが示唆された。

【結論】

閉経後子宮内膜ポリープにおける p53 蛋白質の発現は閉経前の子宮内膜ポリープと異なる発現を示した。p53S を子宮内膜ポリープなどの生検標本に認めた場合、子宮全摘出術を推奨する論文がある。しかし、今回の検討からは、p53S の発現頻度は閉経後では 12.7% と高く、日本産科婦人科学会の全国集計では 2015 年子宮内膜漿液性腺癌症例数が 551 例であったことと比較するとあまりにも高頻度であり p53S を認めただけで子宮全摘術を推奨することはできないと考えられた。

学位論文審査結果要旨

氏 名	大隈 佳世子			
論文審査委員	主査 所属	障害機構系	病態機構部門	田中 良哉 (印)
	副査 所属	生体適応系	生体構造部門	佐藤 寛晃 (印)
		障害機構系	災害医学部門	原田 大 (印)
		系	部門	(印)
		系	部門	(印)

論文題目

Disruption of the aldehyde dehydrogenase 2 gene results in no increase in trabecular bone mass due to skeletal loading in association with impaired cell cycle regulation through p21 expression in the bone marrow cells of mice (アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子欠損マウスにおいて、骨格への荷重負荷による海綿骨量増加がみられないのは、骨髓細胞における p21 発現を介した細胞周期制御の障害と関連している)

学位論文審査結果要旨

アルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde dehydrogenases; ALDH) 2 は、アルコール代謝のみならず、エネルギー代謝、心血管系、神経系、悪性腫瘍などとも関連することが明らかになってきた。しかし、ALDH2 は日本人の約 45% では低活性型か不活性型であり、多様な代謝系に影響を及ぼす可能性がある。実際、本酵素が不活性型の日本人高齢者は低骨密度であることが報告されている。そこで、本研究では、*aldh2* 遺伝子欠損 (knock out; KO) マウスを用いて、荷重負荷による骨量増加における本酵素の役割を検証することを目的とした。

4 週齢、雄の C57BL/6J マウスをベースとした野生型 (WT)、及び、*aldh2* KO マウス (*aldh2* KO) について、クライミング運動で荷重負荷をかけた群と通常のケージ内で飼育した群に分け、計 4 群を比較した。クライミング運動群のマウスは、最高部に給水瓶を設置した高さ 1 メートルの金網製ケージ内で飼育し、実験開始後 28 日目に屠殺した。

大腿骨の骨量を DXA、pQCT、microCT で評価したところ、28 日目の大腿骨海綿骨量は、WT では荷重負荷により有意に増加したが、*aldh2* KO では荷重負荷と通常飼育で有意差がなかった。Villanueva 染色標本で脛骨近位二次海綿骨領域の骨形態計測を行い、海綿骨量および骨代謝動態を評価したところ、荷重負荷による骨形成パラメータ値の上昇は、WT では認めしたが *aldh2* KO では認めなかった。7 日目に採取した骨髓細胞を用いて、初代骨髓細胞培養を行ったところ、WT では荷重負荷により骨分化能は有意に促進されたが、*aldh2* KO では荷重負荷と通常飼育で有意差がなかった。また、7 日目の培養骨髓細胞の p21 の mRNA および蛋白の発現は、WT では荷重負荷により有意に低下したが、*aldh2* KO では荷重負荷と通常飼育で有意差がなかった。さらに、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析したところ、S 期の割合は WT では荷重負荷により有意に増加したが、*aldh2* KO では荷重負荷と通常飼育で有意差がなかった。

以上より、クライミング運動により骨格に荷重を負荷すると、p21 の発現低下により骨髓細胞周期、骨分化能を誘導し、海綿骨量は増加させるが、*aldh2* を KO するとこれらの変化が生じなくなることが明らかになった。アルコールを摂取した *aldh2* KO の骨髓細胞では、p21 の発現が亢進して G2 arrest を生じることにより骨形成能が低下することを報告している。しかし、本研究ではアルコール非摂取下でも *aldh2* 遺伝子欠損状態では、荷重負荷による p21 発現低下による骨量増加が阻害されることから、本酵素がアルコール代謝以外にも骨代謝系に直接作用をもたらした可能性を示唆する初めての論文である。よって、本学の学位論文として適格であると判断した。

氏 名	大隈 佳世子
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
<p>Disruption of the aldehyde dehydrogenase 2 gene results in no increase in trabecular bone mass due to skeletal loading in association with impaired cell cycle regulation through p21 expression in the bone marrow cells of mice</p>	
<p>(アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子欠損マウスにおいて、骨格への荷重負荷による海綿骨量増加がみられないのは、骨髓細胞における p21 発現を介した細胞周期制御の障害と関連している)</p>	
論文要旨	
<p>【目的】 Aldehyde dehydrogenases-2 (ALDH2) は、アセトアルデヒドを酢酸へ分解する酵素である。モンゴロイドにおける酵素活性型の割合はコーカソイドやネグロイドと比べて低く、日本人の約 45% は低活性型か不活性型である。酵素が不活性型の日本人高齢者は低骨密度であることが報告されている。</p>	
<p>本研究の目的は、Aldh2 遺伝子欠損 (knock out ; KO) マウスは、野生型 (wild type ; WT) マウスと比べて、骨格への荷重負荷による海綿骨量増加がみられないという仮説を検証することである。</p>	
<p>【方法】 4 週齢、雄の C57BL/6J マウスと Aldh2 KO マウスにクライミング運動 (climbing exercise ; CE) を行った群 (WTCE と KOCE) と通常のケージ内で飼育した ground control (GC) 群 (WTGC と KOGC) の 4 群を比較した。クライミング運動群のマウスは、最高部に給水瓶を設置した高さ 1 メートルの金網製ケージ内で飼育した。実験開始後 28 日目に屠殺した。大腿骨の骨量を DXA、pQCT、microCT で評価し、Villanueva 染色標本で脛骨近位二次海綿骨領域の骨形態計測を行い、海綿骨量および骨代謝動態を評価した。4 日目および 7 日目に採取した骨髓細胞を用いて、初代骨髓細胞培養を行い、RT-PCR により mRNA 発現を、フローサイトメトリーにより細胞周期と骨髓接着細胞の p21 蛋白発現を解析した。</p>	
<p>【結果】 DXA、pQCT、microCT の結果で、28 日目の大腿骨海綿骨量は、WTCE 群では WTGC 群と比べて有意に増加したが、KOCE 群と KOGC 群の間には差がなかった。また、骨形態計測の結果で、クライミング運動後の骨形成パラメーター値の上昇は、WT では認められたが KO では認めなかった。7 日目の初代骨髓細胞培養で、WTCE 群では WTGC 群と比べて骨分化能は促進されたが、KOCE 群と KOGC 群の間には差がなかった。7 日目の骨髓細胞で、WTCE 群では WTGC 群と比べて p21 の mRNA および蛋白の発現が低下し、細胞周期解析で S 期の割合が増加したが、KOGC 群と KOCE 群の間には差がなかった。</p>	
<p>【考察】 Aldh2KO マウスでは、クライミング運動により骨格に荷重を負荷しても、海綿骨量は増加しなかった。我々は既に、アルコールを摂取した Aldh2KO マウスの骨髓細胞では、細胞周期の調節因子である p21 の発現が亢進し G2 arrest を生じることにより骨形成能が低下することを報告した。また、p21 を knock down することにより、ヒト間葉系幹細胞において S 期の割合が増加し、骨形成能が促進することが報告されている。また、宇宙微小重力環境のマウスで、p21 による細胞周期調節を介して骨量減少を生じることが報告されている。本研究は、骨格への荷重負荷と p21 発現低下による細胞周期調節を介した骨代謝制御との相互関係が、Aldh2 遺伝子欠損状態では障害されることを示した最初の論文である。</p>	
<p>【結語】 クライミング運動による海綿骨量増加は、野生型マウスで認められるが Aldh2KO マウスでは認められなかった。その理由として、Aldh2 遺伝子欠損状態では、荷重負荷による p21 発現低下がみられず、骨形成が促進されない機序が考えられた。</p>	