

## 〔一般演題／基礎 2〕

## ウエスタンブロットによる正所性子宮内膜 PR 同位体比と PGP9.5 発現の予備的解析

帝京大学ちば総合医療センター産婦人科

五十嵐敏雄, 秋山 育美, 中村 泰昭, 落合 尚美  
中川 圭介, 矢部慎一郎, 梁 善光

## I. 緒 言

近年, 正所性子宮内膜の蛋白や遺伝子に関して健常者と子宮内膜症患者との違いを示す報告が多い (Giudice 2004) [1]. 患者の正所性子宮内膜に発現が多いものとして Aromatase cytochrome P-450, Hepatocyte growth factor, 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2, メタロプロテアーゼ (MMPs) などが, 発現が少ないものとして Hox A-10, 11などが報告されているが, われわれも以前に正所性子宮内膜をウエスタンブロット法 (WB 法) で解析して, プロゲステロン受容体同位体発現比 PR-B/PR-A が子宮内膜症患者で有意に低いことを報告した (図 1, 2005) [2].

これは子宮内膜症を発症する女性ではプロゲステロン作用が修飾された内膜が腹腔内に流出することを意味し, 発現機序を考えるうえでは興味深い話になるが, 疾患マーカーとして有用か? という観点では, 現在検討を行っているも

のの, 今のところ有用とは言い難い状況である. PR 同位体発現比をマーカーとして用いる利点は同位体のバンド濃度比を算出するために基本的にコントロール物質が不要であること, 少量のサンプルで検出が可能なこと, SDS-PAGE 前の正確な蛋白定量が不要なことが挙げられる. 欠点はサンプル採取が増殖期に限定されること, きれいな PR のバンドを得るためには原則として可溶化が必要なこと, 感度/特異度が高くないこと, また WB 法の特徴でもあるが, 機能層/基底層を区別できないことなどが挙げられる.

子宮内膜症の疾患マーカーに関して, 最近驚くべき報告がなされた. シドニー大学の Tokushige N らは免疫組織化学的手法を用いて子宮内膜症患者では全例, 正所性子宮内膜の機能層に小神経線維の 1 つである PGP9.5 の発現を認めたが, 健常者には全く発現を認めず, PGP9.5 が子宮内膜症の疾患マーカーとして有用であると報告した (2006, 2007, 2007) [3-5]. 一方, 浙江省ジャージャン大学の Zhang X らは同様な免疫組織化学的手法ではあったが, 子宮内膜機能層の PGP9.5 発現は子宮内膜症よりも月経困難症がある場合に高頻度に発現がみられると報告した (2009) [6-8].

Tokushige N や Zhang X らの報告によると, 子宮内膜症/月経困難症の有無で PGP9.5 の発現にはっきりと違いが認められている. 子宮内膜の生検サンプルの大半は機能層であり, われわれは解析法が正所性子宮内膜の WB 法であ

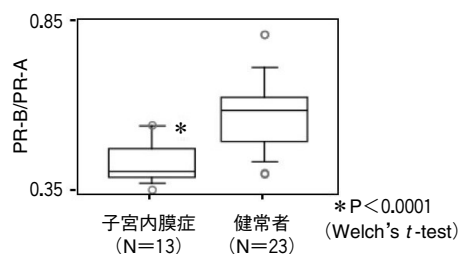


図 1 正所性子宮内膜 PR-B/PR-A 比  
われわれは正所性子宮内膜の WB 法で PR-B/PR-A 同位体発現比が内膜症患者で有意に低いことを報告した (2005 Igarashi)

ってもそれなりに違いがみられるのではないかと考えた。免疫組織化学的手法による検査よりも WB 法によるバンドの濃さを判定した方が定量性も期待できる。以下、本調査は予備的な追試ではあるが、正所性子宮内膜の WB 法による PGP9.5 の発現解析が子宮内膜症や月経困難症の疾患マーカーとして有用かどうか、検証を目的とした。

## II. 研究方法

帝京大学ちば総合医療センターにおいてインフォームドコンセントが得られた方で子宮筋腫のために子宮全摘術を行った症例の内、子宮内膜症の有無や進行期を評価するとともに半米粒大の正所性子宮内膜を生検し、WB 法で PGP9.5 を発現解析し、予備的に検討した。子宮内膜を子宮内膜症疾患マーカーの検討のために使用することに関しては当院倫理委員会の承認を得た。

具体的には健常者とホルモン療法未施行の子宮内膜症患者の正所性子宮内膜を増殖期/分泌期に生検し、液体窒素で凍結保存した。半米粒大組織を洗浄後、Buffer (20mM Tris/HCl pH 7.5, 0.25 M sucrose, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20, 1 mM PMSF, 1% protease inhibitor cocktail, 1 mM Trypsin inhibitor) 500 $\mu$ l に懸濁し、小乳棒 (20回) と超音波処理 (117W, 60Hz, 10分間) で細胞破碎し、遠心10,000xg, 15分で可溶化したサンプル10 $\mu$ g を SDS-PAGE でゲルに展開した後に PVDF 膜に移した。膜は一度 PR 抗体でウエスタンブロットした後、抗体を剥がしてポリクローナル・ウサギ抗 PGP9.5 抗体 (DAKO, 1:3000) でウエスタンブロット解析を行い、ECL で得られたバンドを NIH ソフト Image J で半定量した。子宮内膜における PGP9.5 発現はウエスタンブロットで分子量およそ25kDa のバンドを確認できた。

子宮内膜における PGP9.5 発現を免疫組織化学的に確認する方法は現在大変有望視されているが、今回われわれは WB 法による PGP9.5 の発現解析も可能かどうか、予備的な追試を行った。

表 1 背景

調査対象を子宮摘出例としたため、子宮内膜症群で特に年齢が高かった。

	健常者 (n = 6)	内膜症患者 (n = 6)
年齢	42.3 $\pm$ 5.0 歳	48.0 $\pm$ 2.0 歳
月経周期 増殖期	3 例	3 例
分泌期	3 例	3 例

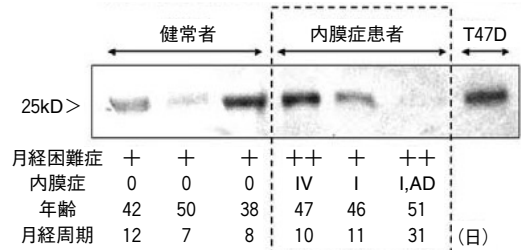


図 2 正所性子宮内膜 (増殖期) における PGP9.5 発現  
左 3 例が健常者、右 3 例 (点線) が内膜症例の PGP9.5 発現。内膜症の有無では発現に違いを認めなかった。低年齢で発現が多い傾向があり、40 歳代では月経困難症や重度内膜症例で発現が多い可能性がみられた。AD は子宮腺筋症合併例。

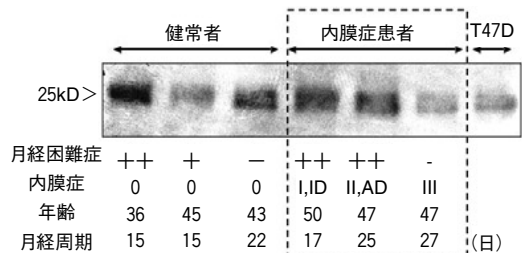


図 3 正所性子宮内膜 (分泌期) における PGP9.5 発現  
左 3 例が健常者、右 3 例 (点線) が内膜症例の PGP9.5 発現。内膜症の有無では発現に違いを認めなかった。低年齢で発現が多い傾向があり、40 歳代では月経困難症で発現が多い可能性がみられた。AD は子宮腺筋症合併例。

## III. 成績

患者背景を表 1 に示した。今回、調査対象を子宮摘出例としたため、子宮内膜症群で特に年齢が高くなってしまった。

PGP9.5 はウエスタンブロットで分子量およそ25kDa のバンドとして確認でき、増殖期正

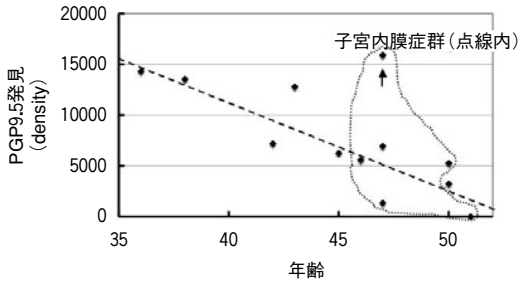


図4 年齢と子宮内膜症と正所性子宮内膜 PGP9.5 発現年齢とともに PGP9.5 発現は減少する傾向にあった。( $r=0.0165$ ) 子宮内膜症群を点線で囲ったが、内膜症の有無と発現に関連性は認められなかったが、重症例(矢印)では発現が多かった。

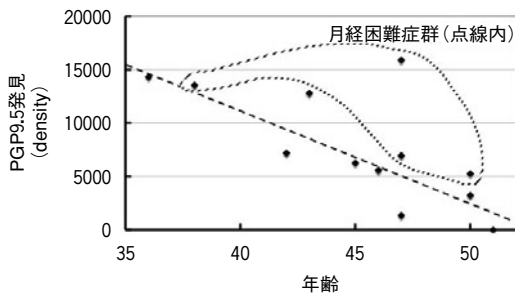


図5 年齢と月経困難症と正所性子宮内膜 PGP9.5 発現年齢とともに PGP9.5 発現は減少する傾向にあるが、月経困難症群を点線で囲むと PGP9.5 発現が多い傾向にあるとわかる。

所性子宮内膜における PGP9.5 発現を図 2 に、分泌期正所性子宮内膜における PGP9.5 発現を図 3 に示した。一見してばらつきがみられたものの、低年齢に発現が多く年齢が上昇するとともに発現が低下する傾向があり、子宮内膜症の有無では発現に違いを認めなかった(図 4)。しかしながら、症例数は少なかったものの重度子宮内膜症患者で発現が多い傾向がみられた。月経困難症が見られる症例においても PGP9.5 発現が多い傾向がみられた(図 5, 6)。

## VI. 考 察

PGP9.5 は別名 ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1) という分子量 24.8KDa の物質で、遺伝子は chromosome 4 の 4p14 に存在する。構造的に Ubiquitin の C 末が glycine からなり、ペプチドを加水分解する蛋白分解酵

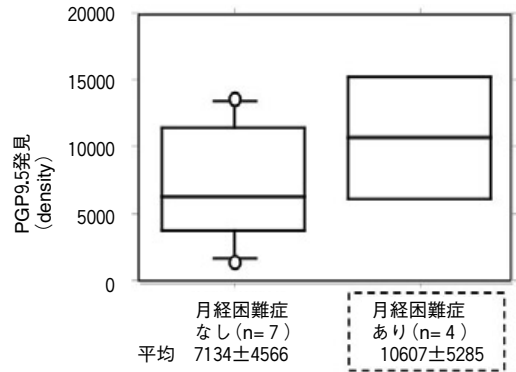


図6 月経困難症と正所性子宮内膜 PGP9.5 発現月経困難症を有する人は発現が多い傾向があった。( $p=0.28$ )

素であるが、小神経繊維 small nerve fiber の 1 つとされ、神経細胞、神経内分泌組織、癌細胞などに発現が確認されてきた。子宮内膜症との関連では今まで腹水や子宮内膜症組織が調べられたが、健常者と子宮内膜症患者の間に違いを認められていなかった。ところが、2006年にシドニー大学の Tokushige N らが免疫組織化学的手法を用いて子宮内膜症の有無で正所性子宮内膜機能層の PGP9.5 発現が全く異なっていると報告した [3-5]。検体の採取時期を選ばないとされるが、ホルモン治療で発現低下するとされ、主に分泌期機能層で調査がなされ、感度 100%、特異度 100% の疾患マーカーとして注目された。ただし stage 別の評価はなされていなかった。そこで Bokor A, D'Hooghe T らは追試をして子宮内膜症(軽症)にしぼって評価し、疾患の有無で正所性子宮内膜機能層の PGP9.5 の発現が感度 95%、特異度 100% で異なるとした [9]。一方、Zhang X らは子宮内膜症ではなくて月経困難症の有無で正所性子宮内膜の発現が異なるという追試結果を発表し、痛みの原因になっている可能性を示唆した [6-8]。

最近の報告は、患者の正所性内膜は健常者の子宮内膜とは異なっているということが多い。そうすると子宮内膜症患者では異なる内膜が腹腔内に逆流していることになり、子宮内膜を用いた疾患マーカーは単なるマーカーではなくて病態に関与する可能性が出てくる。PR-B/PR-

Aの低下はプロゲステロン反応の修飾を意味し、子宮内膜の腹腔内における生着や免疫反応の違いに関与し、MMPsは子宮内膜の腹膜/卵巣への浸潤増殖に関与し、PGP9.5は痛みに関与する可能性があると考えられる。

子宮内膜機能層のPGP9.5はこのように子宮内膜症の疾患マーカーとして、また子宮内膜症患者や月経困難症患者を痛みから解放するための研究対象として大変有望な物質である。今回、予備的な調査で子宮内膜全層のPGP9.5のWB解析を行ったが、PGP9.5発現と内膜症の有無で関連性は認められなかった。ただし、重症例では関連性がある可能性が残った。Tokushigeらの報告と結果が異なった理由としてはWB法では機能層と基底層を区別できないこと、本研究で子宮内膜の可溶化のプロセスを設けてしまったことなどが挙げられる。一方で子宮内膜のPGP9.5発現と月経困難症と関連性が疑われ、Zhang Xらの報告と一致するところもみられた。今後、子宮内膜PGP9.5発現をWB法で定量性のある疾患マーカーとするには、評価に際して年齢を考慮すべきであり、機能層だけの採取できるような新たな検討や工夫が必要と考えられた。

#### 文 献

- [1] Giudice LC et al. Endometriosis. *Lancet* 2004 ; 364 : 1789-1799
- [2] Igarashi TM et al. Reduced expression of progesterone receptor-B in the endometrium of women with endometriosis and in cocultures of endometrial cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fertil Steril* 2005 ; 84 : 67-74
- [3] Tokushige N et al. High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2006 ; 21 : 782-787
- [4] Tokushige N et al. Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2007 ; 88 : 795-803
- [5] Al-Jefout M et al. A pilot study to evaluate the relative efficacy of endometrial biopsy and full curettage in making a diagnosis of endometriosis by the detection of endometrial nerve fibers. *Am J Obstet Gynecol* 2007 ; 197 : 578 e1-578 e4
- [6] Zhang X et al. Innervation of endometrium and myometrium in women with painful adenomyosis and uterine fibroids. *Fertil Steril* 2009 Apr 13 [Epub ahead of print]
- [7] Zhang X et al. Endometrial nerve fibers in women with endometriosis, adenomyosis, and uterine fibroids. *Fertil Steril* 2009 ; 92 : 1799-1801
- [8] Zhang XM et al. Nerve fibres in ovarian endometriotic lesions in women with ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 2010 ; 25 : 392-397
- [9] Bokor A et al. Density of small diameter sensory nerve fibres in endometrium: a semi-invasive diagnostic test for minimal to mild endometriosis. *Hum Reprod* 2009 ; 24 : 3025-3032