

学位論文題名

産婦人科領域におけるステロイドスルファターゼに関する研究

—とくに、その臨床応用について—

学位論文内容の要旨

I 研究目的

血液中に存在する硫酸ステロイドホルモンは不活性で、組織局所においてステロイドスルファターゼ(以下STSと略す)により脱硫酸化を受けて活性ホルモンとなる。

STSにより脱硫酸化を受けたエストロゲンが卵巣癌および子宮内膜癌の発生と増殖に関与することが報告されている。本酵素は血中濃度が非常に低いため、従来の活性測定法（³H標識したデヒドロエピアンドロステロン(DHA)硫酸を基質として、酵素反応で生じた標識DHAを測定）ではその臨床応用は不可能であった。そこで、STSを精製し、それに対する抗体を作製し、その抗体を用いてSTSの酵素免疫測定法(ELISA)を確立し、婦人科領域のSTS関連疾患とくに婦人科悪性腫瘍の診断に臨床応用することを本研究の目的とした。

さらに、先天性の皮膚疾患であるX染色体性魚鱗癬はSTS欠損によって発症するが、先天性魚鱗癬患者複数例について、抗体を用いた酵素蛋白レベルおよび遺伝子レベルでの検索により病因の解明を目的とした。

II 研究材料および方法

STS精製はDibbeltら(1986)の方法を一部改変して行ない、ヒト正期産正常分娩後の胎盤を用いた。

ELISAによる血清中のSTSの測定は、60例の婦人科悪性疾患（子宮頸部扁平上皮癌30例；0期：1 2例, I期：9例, II期：2例, III期：7例、子宮内膜腺癌17例；I期：1 0例, II期：4例, III期：2例, IV期：1例、原発性上皮性卵巣癌13例；I期：5例, II期：2例, III期：3例, IV期：3例）を対象にした。また、X染色体性魚鱗癬症6例を研究対象とした。

抗STS抗体の作製は、家兎に免疫し、得られた抗血清からIgG画分を精製した。抗体の特異性の

検定はWestern法による免疫染色で確認した。抗STS IgG Fab'とペルオキシダーゼとの抱合はYoshitakeら(1982)の方法によった。STSのELISA法はマイクロタイタープレートに抗STS IgGを加え、洗浄の後、患者血清100 μ lを加え、さらにペルオキシダーゼ抱合Fab'を加えた後、発色させて490nmの波長で吸光度を測定した。

一方、X染色体性魚鱗癬症例(case 1)の分娩後の胎盤のSTS活性を測定し、酵素蛋白の欠損か否かを検討するために、Western法を施行した。胎盤のホモジェネートをSDS-PAGEにかけ、ニトロセルロース膜に転写後、抗STS抗体を用いた免疫染色を行なった。STS酵素のmRNAの検討には、魚鱗癬患者(STS欠損症)皮膚組織の培養線維芽細胞からRNAを抽出し、M-MLV逆転写酵素を作用させてcDNAを合成し、PCR法によってその一部を増幅した。

つぎに、魚鱗癬患者(6例)の白血球DNAについてエクソン1およびエクソン10をPCR法により解析した。STS全遺伝子のSouthern プロット解析では制限酵素EcoR Iで反応させたのち、アガロース電気泳動を行ない、変性させたのちナイロン膜に転写した。プローブは全長のSTS cDNAをランダムプライマー法で³²P標識したものをを用いた。ハイブリダイズ後、オートラジオグラフィを行なった。

III 研究結果

1.STSの精製

ヒト正常胎盤100gより120倍の精製度および6%の収量で1.7mgのSTSが得られた。得られた精製標品はSDS-PAGEで分子量63,000の均一なバンドを示した。

2.STS抗体の特異性

精製途中のCon A Sepharose溶出画分についてWesternプロットを行ない、抗STS IgGを用いて免疫染色した結果、STSに相当する分子量の単一バンドが染色された。

3.ELISA法の測定感度ならびに再現性

測定可能範囲は10-1,500ng/mlであった。再現性は変動係数にて評価したが、intra-assay 7.9%, inter-assay 6.5%で、いずれも10%以内であった。

4.婦人科悪性腫瘍患者における血清中STS濃度

正常婦人(control)では 74.5 ± 1.6 ng/ml (Mean \pm SE, n=69)にたいして、子宮頸癌では 117.8 ± 14.5 ng/ml (n=30, p<0.05)、子宮内膜癌では 166.0 ± 34.0 ng/ml (n=17, p<0.05)、原発性上皮性卵巢癌では 176.1 ± 22.6 ng/ml (n=13, p<0.01)であり、担癌患者血清中のSTSは有意に高かった。また、臨床進行期別の検討では差は認められなかったが、子宮内膜癌I期(197.1 ± 50.7 ; n=10, P<0.05)および、卵巢癌I期(168.6 ± 33.1 ; n=5, P<0.05)では、正常婦人に比べ有意に高値をとった。

5.先天性魚鱗癬患者(STS欠損症)における酵素蛋白の検討

Westernプロット法を施行した結果、患者胎盤ではSTS蛋白に該当する63KDのバンドは認められ

なかった。

6.先天性魚鱗癬患者における本酵素のmRNAの検討

RT-PCRを施行した結果、正常男性線維芽細胞では275bpの増幅産物が認められたが、患者線維芽細胞では観察されなかった。

7.先天性魚鱗癬患者における増幅エクソンの解析

正常男性および正常女性(対照)ではPCRにより214bp(エクソン1)、414bp(エクソン10)の増幅産物が得られたが、魚鱗癬患者6例のDNAについてPCRを施行した結果、対照で得られた増幅産物はいずれも検出することはできなかった。

8.先天性魚鱗癬患者のSouthern解析

Southernプロットを行った結果、正常男性では20, 15, 9, 6.1, 4.9, 4.2, 3.6, 3.1, 2.6, 2.2ならびに1.5kbのバンドが認められた。正常女性では15, 9, 6.1, 4.9, 4.2, 3.6, 3.1, 2.6ならびに2.2kbのバンドが認められた。

しかしながら、魚鱗癬患者では20, 9, 3.6, 2.2, 1.5kbのバンドしか観察されなかった。

IV 考 察

STSの酵素活性測定法は³H標識したDHA硫酸を基質として、酵素反応で生じた標識DHAを測定するものである。血清中の本酵素の測定は困難であったが、今回独自に開発した測定法(ELISA)を用いることにより、血清中STSの定量が可能となった。STSが血中に出現する機構は未だ不明であるが、破壊された癌組織からの逸脱あるいは分泌亢進の機構が考えられる。いずれにせよ今回開発したELISAを用いることにより、血中STSが婦人科領域の悪性腫瘍患者で高値をとることがはじめて示された。

また、本酵素の欠損症であるX染色体性魚鱗癬について酵素蛋白の生成と遺伝子発現の双方から検討を加えた結果、調べた症例では本酵素のmRNAもWestern法による酵素蛋白も検出されなかった。本酵素は10のエクソンから成るが、STS欠損症6例に対するPCR法を用いた解析ではいずれもSTS遺伝子のエクソン1,10に相当する増幅産物が得られなかったことより、STS遺伝子の欠失が疑われ、Southern法によって確認された。

本研究により本邦においてもSTS欠損症の多くが遺伝子の欠失によることが推察された。このことは、本研究で用いたPCR法はアイソトープを使用せずに先天性魚鱗癬の診断を確実にし、病因を特定することができ、今後本症の出生前診断に導入される可能性を現実のものとした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征 一 郎

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 柿 沼 光 明

血液中の硫酸ステロイドホルモンは不活性で、組織においてステロイドスルファターゼ（以下 STS）により脱硫酸化を受けて活性化する。本酵素は、血中濃度が非常に低いため³H標識したデヒドロエピアンドロステロン（DHA）硫酸を基質として、酵素反応で生じた標識 DHA を測定する従来の活性測定法は臨床応用が不可能であった。そこで、申請者は STS を精製し、それに対する抗体を作製し、STS の酵素免疫測定法（ELISA）をはじめて確立して、婦人科領域悪性腫瘍すなわち子宮頸部扁平上皮癌30例、子宮内膜腺癌17例、原発性上皮性卵巢癌13例の60例を対象に血清 STS 値測定の診断的意義を検討することを研究の1つの目的とした。

さらに、STS 欠損によって発症する X 染色体性魚鱗癬患者 6 症例について、抗体を用いた酵素蛋白レベルおよび遺伝子レベルでの検索により本疾患の病因の解明をも目的とした。

抗 STS 抗体の作製にあたっては、ヒト正常産正常胎盤(100 g)より STS (1.7mg) を精製し、家兎に免疫し、得られた抗血清から IgG 画分を精製した。得られた精製標品は SDS-PAGE で分子量63,000の均一なバンドを示した。STS 抗体の特異性を検定するために、精製途中の Con A Sepharose 溶出画分について Western プロットを行い、抗 STS IgG を用いて免疫染色した。その結果、STS に相当する分子量の単一バンドが染色され、その特異性が確認された。

抗 STS IgG をマイクロタイタープレートに加え、洗浄の後、被検血清100 μ lを加え、さらにペルオキシダーゼ結合 Fab' を加えた後、発色させて490nm の波長で吸光度を測定する STS の ELISA 法を申請者は独自に開発した。本測定法の測定可能範囲は10-1,500ng/mlで、intra-assay 7.9%, inter-assay 6.5%の変動係数で、再現性は良好で臨床応用に供されることが判明した。

正常婦人では74.5 \pm 1.6ng/ml (Mean \pm SE, n=69) にたいして、子宮頸癌では117.8 \pm 14.5 ng/ml (n=30, p<0.05), 子宮内膜癌では166.0 \pm 34.0ng/ml (n=17, p<0.05), 原発性上皮性卵巢癌では176.1 \pm 22.6ng/ml (n=13, p<0.01) であり、担癌患者血清中の STS は有意に高値を示した。とくに子宮内膜癌 I 期 (197.1 \pm 50.7; n=10, p<0.05), 卵巢癌 I 期 (168.6 \pm 33.1; n=5, p<0.05) では、正常婦人に比べ有意に高値を示し、腫瘍マーカーとして

の可能性が示唆された。

次いで、先天性魚鱗癬患者（STS 欠損症）における酵素蛋白を Western ブロット法にて検討した結果、患者胎盤では STS 蛋白に該当する 63KD のバンドは認められなかった。魚鱗癬患者における本酵素の mRNA を RT-PCR により検討した結果、正常男性線維芽細胞では 275bp の増幅産物が認められたが、患者線維芽細胞では観察されず、STS の正常 mRNA が形成されないために酵素蛋白が欠損していることが判明した。正常人では PCR により 214bp（エクソン 1）、414bp（エクソン 10）の増幅産物が得られたが、魚鱗癬患者 6 症例の DNA について PCR を施行した結果、正常人で得られた増幅産物はいずれも検出することはできなかった。

そこで、STS 遺伝子の解析を目的に Southern blotting を行った結果、エクソン 7、6、10、8、2 に相当する 6.1、4.9、4.2、3.1、2.6kb のバンド、エクソン 1 に相当する 15kb、エクソン 3、4、5 に相当する 9 kb のバンドの消失が 6 症例すべてにおいて観察された。従って、本症の原因が STS 遺伝子全体の欠失によることが本邦においても初めて証明されたので、エクソン 1 からは 214bp、エクソン 10 からは 414bp の領域を増幅するプライマーを作製し、PCR による微量試料による出生前診断の可能性について検討した。その結果、本症患者においてはすべて予想される増幅産物は得られなかった。

発表に際し、西 教授から ELISA 作成に Fab を標識した理由、Southern blotting に用いたプローブの種類と STS 遺伝子と異なる塩基配列の似た別の遺伝子とのクロスハイブリダイゼーションについて、また PCR における non-specific band について質問があった。柿沼教授から、X 染色体性魚鱗癬症の臨床症状と STS 遺伝子欠損との関係、本症の遺伝子異常の人種差について、小林教授からは血清 STS 値の性差とその比が女性と男性とで 2 対 1 にならない理由、また、STS 欠損症 Carrier の血清値による検出の可能性について、さらに、石橋教授からはコレステロールスルファターゼとデヒドロエピアンドロステロンスルファターゼとの関係、コレステロール硫酸と子宮癌との関係について質問があったが、申請者は概ね適切に解答した。

またその後、副査の西 教授、柿沼教授には個別に審査をうけ合格の判定を下された。

以上、本研究は血清 STS の ELISA 法を世界に先駆けて開発し、STS が婦人科癌、ことに腺癌の腫瘍マーカーとしての有用性をもつことをはじめて提唱し、また遺伝子解析のされていなかった本邦の X 染色体性魚鱗癬の DNA 解析を施行し PCR 法による出生前診断の可能性を具現化した意義の高い臨床研究と判断された。