

# 論文要旨

## Expression of estrogen receptor- $\alpha$ protein in the rat digestive tract.

〔 ラット消化管におけるエストロゲン・レセプター $\alpha$ 蛋白の発現 〕

梶島健太郎

### 【序論および目的】

エストロゲンは乳腺や生殖器における様々な細胞の発生と分化を制御していることはよく知られている。近年、消化管では、ヒト食道癌、胃癌、結腸癌の発生及び胃液分泌に性差があることやヒト消化管、生殖器、神経系などでのエストロゲン・レセプター $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) 蛋白の発現が明らかになってきた。ラットでは、免疫組織化学による ER- $\alpha$  蛋白発現が子宮、胃粘膜、腸の神経にみられ、RT-PCRにより正常胃の筋層に ER- $\alpha$  mRNA 発現を認めたという報告がある。しかしながら、無処置ラットにおける免疫組織化学による ER- $\alpha$  蛋白の発現部位は明らかになっていない。

本研究はラットの消化管における ER- $\alpha$  蛋白の発現を検索した。

### 【材料および方法】

動物は雌雄無処置近交系 Sprague-Dawley (SD) ラットを用い、実験は鹿児島大学 FSRC 動物実験施設で、鹿児島大学動物実験指針及び日本政府のガイドラインに準拠して行った。動物は生後 50 (young rat)、100 (adult rat) 及び 300-400 (old rat) 日目に屠殺し、消化管を含む全身諸臓器を採取後ホルマリン固定、パラフィン包埋後、HE 染色標本を作製し、病理組織学的検索を行った。また、消化管及び全身諸臓器の ER- $\alpha$  蛋白の免疫染色を施行し、胃の limiting ridge においては ER- $\alpha$  mRNA の *in situ* hybridization 組織化学染色を施した。

### 【結果】

1. 胃における ER- $\alpha$  蛋白発現は limiting ridge に連続する前胃重層扁平上皮の基底細胞の核に見られた。この limiting ridge における ER- $\alpha$  蛋白発現率は young rat に比し、雄 old rat ( $p < 0.01$ )、雌 adult rat ( $p < 0.05$ ) 及び雌 old rat ( $p < 0.01$ ) において有意に減少した。
2. 雌の前胃では young rat に比し、old rat の ER- $\alpha$  蛋白発現率は有意に減少した ( $p < 0.01$ )。
3. 腺胃では、雄の young rat に比し、雌の young rat の ER- $\alpha$  蛋白発現率は有意に低かった ( $p < 0.05$ )。

# 論 文 要 旨

4. 肛門直腸移行部における ER- $\alpha$  蛋白発現は肛門直腸移行部に連続する肛門重層扁平上皮の基底細胞の核にみられた。雄ではこの肛門直腸移行部における ER- $\alpha$  蛋白発現率は young rat に比し、年齢と共に有意に減少した(adult rat:  $p < 0.01$ , old rat:  $p < 0.01$ )が、雌では減少しなかった。
5. その他の消化管では雌の食道に ER- $\alpha$  蛋白発現が見られたが、雄の食道には見られなかった。
6. その他の全身諸臓器では乳腺、生殖器(子宮、卵巣、膣)、内分泌系(下垂体、甲状腺)、神経系(大脳、脊髄、末梢神経)、胸腺、気管、肝、骨髄に ER- $\alpha$  蛋白発現が見られた。
7. 胃における ER- $\alpha$  mRNA 発現は limiting ridge に連続する前胃重層扁平上皮に見られた。

## 【結論及び考察】

本研究は、limiting ridge に移行する前胃および肛門直腸移行部に移行する肛門の重層扁平上皮において強い ER- $\alpha$  蛋白の発現があることを初めて明らかにした。

ラットの胃は重層扁平上皮に覆われた前胃と円柱上皮に覆われた腺胃からなり、前胃は食物貯蔵が主な機能である。その前胃と腺胃は limiting ridge によって分けられている。その limiting ridge は人における食道胃移行部に相当するものと考えられている。

人でも食道に ER- $\alpha$  蛋白を発現しているという報告があるが、食道胃移行部について詳細に検討した報告はない。肛門直腸移行部の重層扁平上皮の ER- $\alpha$  蛋白の発現については人でも同様な報告がある。

今回の研究より、胃の limiting ridge における ER- $\alpha$  蛋白の発現は雄及び雌とも年齢と共に減少すること及び、肛門直腸移行部における ER- $\alpha$  蛋白発現は雄においては年齢と共に著明に減少するが雌では不変であることが明らかとなった。

これらの所見より、前胃の重層扁平上皮の増殖と分化や肛門部の重層扁平上皮の増殖と分化についてはエストロゲンが何らかの役割を果たしていることが強く示唆される。しかし、この結果からは雌雄ラットの limiting ridge における前胃及び雄ラットの肛門移行部の増殖・分化へのエストロゲンの関与は年齢と共に減少しており、エストロゲンよりアンドロゲンが関与している可能性も示唆されることから同部位のアンドロゲンレセプター発現等の検索が必要である。また、ラット前胃と腺胃の接合部に ER- $\alpha$  蛋白が高頻度に発現することと、化学発癌によりマウスの相当部位に腫瘍が高頻度に発生することは関連があるかどうか大変興味ある点である。

(in vivo in press 2007 年)

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 657 号	氏名	槐島 健太郎
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	坪内 博仁	堂地 勉

**Expression of estrogen receptor- $\alpha$  protein in the rat digestive tract.**  
(ラット消化管におけるエストロゲン・レセプター $\alpha$ 蛋白の発現)

エストロゲンは乳腺や生殖器における様々な細胞の発生と分化を制御していることはよく知られている。近年、ヒト消化管・生殖器・神経系などでのエストロゲン・レセプター $\alpha$ (ER- $\alpha$ )蛋白の発現が明らかになってきた。本研究は、ラットの消化管におけるER- $\alpha$ 蛋白の生理的発現を検索した。

雌雄SDラットを、生後50 (young rat)、100 (adult rat) 及び300-400 (old rat) 日目と3群に分け、消化管及び全身諸臓器のER- $\alpha$ 蛋白の免疫染色を施行し、胃のlimiting ridgeにおいてはER- $\alpha$  mRNAの*in situ* hybridization組織化学染色を施した。

1. 胃のlimiting ridgeにER- $\alpha$ 蛋白発現が見られ、雌雄いずれにおいても発現率は加齢と共に減少した。
2. 前胃に若干のER- $\alpha$ 蛋白発現が見られ、雌では発現率が加齢と共に減少した。
3. 腺胃に若干のER- $\alpha$ 蛋白発現が見られ、young ratにおける発現率に雌雄差が認められた。
4. 肛門直腸移行部(anorectal junction)にER- $\alpha$ 蛋白発現がみられ、雄では発現率が加齢と共に減少したが、雌では減少しなかった。
5. その他の消化管では雌の食道に若干のER- $\alpha$ 蛋白発現が見られたが、雄の食道には見られなかった。小腸及び大腸では雌雄共にER- $\alpha$ 蛋白発現は見られなかった。
6. その他の全身諸臓器では乳腺、生殖器(子宮、卵巣、膈)、内分泌系(下垂体、甲状腺)、神経系(大脳、脊髄、末梢神経)、皮膚、胸腺、気管、肝、骨髄にER- $\alpha$ 蛋白発現が見られた。
7. 胃のlimiting ridgeにER- $\alpha$  mRNA発現が見られた。

本研究は、limiting ridge および anorectal junction に強いER- $\alpha$ 蛋白の発現があることを初めて明らかにした。Limiting ridge においてはER- $\alpha$  mRNAの発現も確認された。Limiting ridge におけるER- $\alpha$ 蛋白の発現は雌雄とも年齢と共に減少すること、及びanorectal junction におけるER- $\alpha$ 蛋白発現は雄においては年齢と共に著明に減少するが雌では不変であることが明らかとなった。これらの所見より、limiting ridge や anorectal junction の細胞の増殖と分化に、エストロゲンが何らかの役割を果たしていることが強く示唆された。

以上のように、本研究はラットの消化管におけるER- $\alpha$ 蛋白の発現と加齢性変化を明らかにしたものであり、消化器癌と性ホルモンとの関連を研究する上で、今後大きく寄与する可能性がある。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

質問 1 1) 50 日、100 日、300~400 日のラットはヒトでいえば何歳頃に相当するのか？

(回答) 50 日が思春期頃、100 日が妊娠可能な 20~30 歳代、300 日から 400 日が閉経の頃である。

質問 1 2) 雌 old ラットに月経、排卵はあるのか？

(回答) 教科書的にはラットの閉経は 15-18 ヶ月齢とされているが、文献的には 10-12 ヶ月齢より持続発情に陥り、性周期がなくなり、無黄体となる。我々が繁殖している近交系 SD ラットは 12 ヶ月齢前後で著しく繁殖率が低下するので、本実験の雌 old ラットでは月経・排卵はほとんどないと思われる。

質問 1 3) 血清エストロゲン値はラットでは加齢と共にどうなっているか？

(回答) 文献的に、ラットでは不規則な性周期が 10-12 ヶ月齢で急増する。この時期の血清エストロゲン値は比較的減少するが、枯渇はしない。

質問 1 4) 腺胃では雄 young ラットに比し、雌 young ラットの ER- $\alpha$  蛋白発現が有意に低かったとあるが、雌のほうが低いのか？

(回答) 腺胃において発現を認めたのは雄 young ラット 8 匹中 2 匹のみであり、検体数を増やし検討する必要がある。

質問 1 5) 論文の introduction の中で、「ラットで ER- $\alpha$  蛋白 immunoreactivity が uterus, gastric epithelium に localize しているという報告はあるが、ER- $\alpha$  蛋白を正常胃で認めたという報告はない。」とあるが、これはどういう意味か？

(回答) 先の報告では、噴門部に ER- $\alpha$  蛋白を発現する腺細胞を認めたとある。しかし、実際のラットの噴門部は扁平上皮であり、この論文の信憑性が疑わしいため、本実験が最初の報告とした。

質問 1 6) ラットでは limiting ridge よりも上の方の食道の扁平上皮は染まってこなかったのか。

(回答) ラットの雌において少数ではあるが、食道に ER- $\alpha$  蛋白の発現が認められた。

質問 1 7) Limiting ridge で ER- $\alpha$  蛋白は基底部寄りで染まってきている。In situ hybridization では重層扁平上皮全層の核周囲で ER- $\alpha$  mRNA が認められている。核周囲のメッセンジャーが核内に移行して ER- $\alpha$  蛋白がつくられていると思われるが、limiting ridge の上の方で出来るメッセージはどうなったのか？

(回答) 免疫組織化学的染色法と in situ hybridization の差はわかっていない。

質問 1 8) 免疫組織化学的染色で ER- $\alpha$  蛋白の発現に食道と子宮頸部、膣の扁平上皮で違いがあるか？

(回答) 子宮頸部、膣ではほぼ全ての細胞が染まってくるが、食道ではほとんど発現していない。同じ扁平上皮でも子宮頸部・膣と食道では ER- $\alpha$  蛋白の発現に差がある。

質問 1 9) 神経ではどのような細胞が染まってくるのか？

(回答) 神経系の ER- $\alpha$  蛋白発現の報告では、細胞質が染まることになっており、本実験においても、プルキンエ線維の細胞質に ER- $\alpha$  蛋白の発現が認められた。

質問 2 0) 論文の中で、limiting ridge や anorectal junction を除いた消化管の ER- $\alpha$  蛋白の発現は very slight であったと書いてあるが、どういうことか？

(回答) これらの 2 つの部位以外の細胞においても核の淡く染まってくる部分があったが、positive control と比較して淡い染まりは陰性、同じ染まり方を陽性と判断した。

質問 2 1) ER- $\beta$  を今回使っていないのはなぜか。

(回答) 実験を行っていた当初、満足いく一次抗体が手に入らなかったためである。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 <b>657</b> 号	氏名	梶島 健太郎
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	坪内 博仁	堂地 勉

主査および副査の3名は、平成19年5月21日、学位請求者 梶島健太郎に対して、論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 消化管癌にエストロゲン・レセプター $\alpha$ (ER- $\alpha$ )が関与しているのか？

(回答) ヒトの胃癌、大腸癌においてER- $\alpha$ の発現が認められるという報告がある。

質問2) ER- $\alpha$ と発癌の具体的な関連は？

(回答) ヒト乳癌組織や前癌病変では高率にER- $\alpha$ 蛋白の発現が見られることから、発癌と密接に関連していると考えられている。

質問3) 女性では閉経すると大腸癌が増えるといわれている。閉経女性にホルモン補充療法をすると大腸癌が減ると2002年のWHIの報告で明らかになっているが、今回の研究結果からこのことが説明できるか。

(回答) 本実験は扁平上皮細胞にER- $\alpha$ 蛋白の発現を認めているものである。大腸癌は腺癌であり、今回の研究結果からホルモン療法による大腸癌減少は説明できない。

質問4) 胃のlimiting ridgeでは加齢と共にER- $\alpha$ 蛋白の発現が低下しているが、これは加齢によるものか、卵巣ホルモンによるものか？

(回答) 雌と同様に雄も減少しているので、加齢によるものと考えた。

質問5) 胃のlimiting ridgeは生理的にどのような部位なのか？

(回答) ヒトの食道胃接合部に相当する部位と考えられている。

質問6) 胃のlimiting ridgeは発癌の標的部位なのか、あるいは化学発癌を行うとどうなるのか？

(回答) ラットにおいては発癌実験の報告はないが、マウスにおいて、化学発癌物質を投与したところ、papillomaが出現したという報告がある。

質問7) Anorectal junctionでER- $\alpha$ 蛋白の発現が、加齢と共に雄では減少して、雌では減少していないのはどうしてか？

(回答) アンドロゲンが関与しているのではないかと考えている。

質問8) ER- $\alpha$ 発現がアンドロゲンなどで調節を受けているということは今までに明らかになっているか

(回答) 明らかになっていない。リガンド刺激以外にはMAPK (mitogen-activated protein kinase)系を介したシグナルがある。

質問9) エストロゲン・レセプターのシグナル伝達はどうなっているのか、核内レセプターなのか、どのようなメカニズムで調節を受けているのか、性ホルモン依存性なのか。

(回答) ER- $\alpha$ は核内レセプターで、エストロゲン依存性に転写を調節する。機能発現には転写共役因子が必要とされている。

質問10) In vitroでlimiting ridgeやanorectal junctionの細胞の増殖・分化にエストロゲンが影響を及ぼすかを研究することにより、エストロゲンの直接作用が明らかになるのでは？

(回答) この件については今後、検討していきたい。