

岡崎光男 論文内容の要旨

主論文

Induction of Epithelial Cell Apoptosis in the Uterus by a Mouse Uterine Ischemia-Reperfusion Model : Possible Involvement of Tumor Necrosis Factor- α

マウス子宮虚血再灌流モデルにおける子宮内膜上皮細胞のアポトーシス誘導に関する研究: tumor necrosis factor-alpha 関与の可能性について

岡崎光男、松山俊文、河野友子、進藤久和、小路武彦、森本義晴、石丸忠之

Biology of Reproduction 2005; 72: 1282-1288

長崎大学大学院医学研究科新興感染症病態制御学系専攻

(指導教授：松山俊文教授)

【緒言】

月経は黄体期末期における子宮内膜アポトーシスが関与する子宮内膜の退縮現象であり、過度の子宮収縮による月経時の虚血は月経困難症を引き起こすと考えられている。子宮動脈虚血再灌流（以下 I/R）は月経発来機序に重要と考えられているが、従来は卵巣ステロイドホルモンがその調節因子として論じられ、I/R が月経に関与するかは動物モデルで証明されていない。そこで、本研究では本来月経の発来しないマウスにおいて I/R モデルを作成し、子宮内膜アポトーシスが I/R によって生じるかを検討した。また月経期に発現が増加する tumor necrotic factor-alpha（以下 TNF α ）は子宮内膜上皮細胞、間質細胞、マクロファージから産生される分子量 17 k d のサイトカインで、近年アポトーシスへの関与が注目されている。本研究では子宮内膜アポトーシスにおける TNF α とその受容体 TNF-Rp55 の役割についても検討した。

【対象および方法】

（実験 1） 野生型の BDF1 マウスを用い、以下の群に分けた。マウスに pentobarbital (40mg/kg)を腹腔内投与後、開腹し、双角子宮の左側子宮両端部をクリップでクランプし、0, 5, 15, 30 分の虚血後、クランプを外し、血流を再開させた。再灌流は虚血群毎に 6, 12, 24, 48 時間行った(各群 n=4 x16 群、虚血 0 分/再灌流 0 分の群 n=4 を含む合計 n=68)。右側子宮をコントロール群とした。

虚血前、虚血中、再灌流後の子宮組織血流をレーザードップラー血流計（ALF21N、Advance 社）で計測した(n=17)。記録はチャートレコーダーにて行い、非接触性のプローブを子宮に当て、毎秒毎に組織血流量(%）、血流速度(mm/sec)を記録した。

(実験2) 実験1の子宮組織を回収し、組織像をHE染色像にて評価した。Apoptosis細胞の検出にはTUNEL染色(300細胞あたりの陽性率で表示)、透過型電子顕微鏡を用いた。

(実験3) 実験1の子宮組織から抽出したtotal RNAを使って、cDNAを合成し、定量的リアルタイムPCRによるTNF α mRNAの測定を行った。結果は β -actin mRNAの相対値として表した。

(実験4) TNF α がその受容体TNF-R p55を介してアポトーシスシグナルを伝達するか検討するため、TNF-Rp55ノックアウト(以下KO)マウス(C57BL/6)(n=4)とその野生型(n=15)を用いて虚血30分、再灌流24時間の後、子宮を摘出し、定量的リアルタイムPCRによるTNF α mRNAの測定、TUNEL染色を行った。

統計はt検定を用いp value 0.05未満を有意とした。

【結果】

(実験1) レーザードップラー血流計で検討したところ、虚血中の子宮血流は組織血流量 $58.2\pm 4.7\%$ 、血流速度 1.1 ± 0.1 (虚血前 2.1 ± 0.2) mm/secと共に有意に抑制され、I/R後は虚血前のレベルに回復していた。

(実験2) 子宮内膜組織像(HE染色)においてI/R群の内膜上皮はコントロール群に比し、著明な内膜細胞の破壊、脱落を認めた。TUNEL染色では、I/R群で有意に多数のTUNEL染色陽性細胞を認め、30分虚血群では再灌流24時間後に最大値 50.2 ± 2.4 に達し、48時間後には減少していた。虚血時間が延長するに従い、TUNEL陽性細胞数は増加した。透過型電子顕微鏡による観察でもI/R群ではアポトーシス細胞を認めたが、コントロール群では認めなかった。

(実験3) 定量的リアルタイムRT-PCRによりTNF α mRNAの発現を比較したところ、I/R 24時間後のTNF α mRNA発現はコントロール群(405 ± 119)に比べてI/R群(799 ± 389)で高値を示した。

(実験4) TNF-Rp55 KOマウスでI/R実験を行ったところ、TNF α mRNAの発現はTNF-R p55 KOコントロール群、I/R群共に高値を示した。TUNEL陽性細胞数は野生型マウス(C57BL/6) I/R群 46.1 ± 4.8 、TNF-R p55 KO I/R群 2.5 ± 0.6 で有意にTNF-R p55 KO I/R群では抑制された。

【考察】

マウス子宮I/Rモデルを作成し、子宮内膜アポトーシスがI/Rによって生じることを証明した。更に、I/Rによって発現増加したTNF α がTNFR-p55を介して子宮内膜アポトーシスシグナルを伝えている可能性が示唆された。本モデルは正常月経のみならず、I/Rの関与する月経困難症モデルとして有用と考えられた。また子宮内膜アポトーシス抑制にTNF α 阻害が臨床応用できる可能性が示唆された。