



Title	Investigation of the oxytocin receptor expression in human breast cancer tissue using newly established monoclonal antibodies
Author(s)	伊藤, 康弘
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39879
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	伊 藤 康 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 4 1 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Investigation of the oxytocin receptor expression in human breast cancer tissue using newly established monoclonal antibodies (新たに樹立したモノクローナル抗体を用いて行ったヒト乳癌組織におけるオキシトシンレセプターの発現に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 高 井 新 一 郎 教 授 青 笹 克 之

論 文 内 容 の 要 旨

正常乳腺では種々のホルモンや成長因子が、レセプターを介してその発育や分化に関与している。これらのレセプターは乳癌にも存在し、一部のリガンドは乳癌細胞の増殖を促進または抑制することが知られている。その中でオキシトシンレセプター (OTR) だけは、乳腺筋上皮細胞に局在し、専ら射乳作用に関与すると信じられてきたために、乳癌組織における発現は現在まで全く検討されていない。そこで今回私は新しく作成した抗ヒトOTRモノクローナル抗体及びOTRcDNAを用いて、乳癌組織および乳癌細胞株におけるOTRの発現を蛋白レベル及び分子レベルで検討した。

(方法ならびに成績)

1. 抗ヒトOTR抗体の作成

OTRのアミノ酸配列20番目から40番目、102番目から119番目までの2種の合成ペプチドを抗原としてマウスモノクローナル抗体2F8及び1-2を作成した。

2. ウェスタンブロッティング

ヒト乳癌、妊娠子宮、肝臓及び腎臓をホモジナイズし、SDSバッファーで溶解してlysateを作成した。それらをSDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体として2F8を使用し、OTRのシグナルをAmersham社製のECLウェスタンブロッティングシステムにて検出した。その結果、乳癌でも妊娠子宮と同様にOTRのシグナルが70KDaの位置にみられた。一方、OTRとホモロジーが高いバゾプレッシンレセプターV1a, V2をそれぞれ豊富に有する肝臓と腎臓ではシグナルがみとめられなかった。

3. 免疫染色

乳癌組織パラフィンブロック (マイクロウェーブ固定) 57例より厚さ4 μ mの切片を作成し、ニチレイ社製のキットを用い、ABC法にて染色した。一次抗体として、2F8, 1-2を使用した。両者の染色性には差はなかった。OTRは57例中52例 (89%) に陽性であり、うち28例 (54%) は陽性細胞が80%を越え、強陽性と判定された。OTRの染色性とER, PgR, 月経の有無などの臨床病理学的パラメーターとの間に有意な相関はみられなかった。

4. ノザンブロッティングとRT-PCR

急速凍結した乳癌組織、妊娠子宮よりRNAを抽出し、 32 PでラベルしたOTRcDNAの0.8Kb BamHI-Pst 1フラグメントを用いてノザンブロッティングをおこなった所、すべてにOTRのシグナル (4.4kb) が認められた。又、

OTRmRNA の391bp (1215-1602) のフラグメントを増幅するようにプライマーを設定して施行したRT-PCRにおいても、これらの組織に加えて培養乳癌細胞株MCF-7でも391bpのPCR産物のシグナルが認められ、OTRの発現はmRNAレベルにおいても証明された。

5. フローサイトメトリー

4種類の乳癌由来癌細胞株、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-361、MDA-MB-468に対し、2F8を用いてフローサイトメトリーを行った。その結果、4種類の細胞株すべてに蛍光強度の上昇がみられ、OTRの存在を証明した。更にこれら細胞株に対し、オキシトシン(OT)を 10^{-7} - 10^{-9} Mの濃度で添加し、OTの細胞増殖に対する作用を、BrdU及びMTTアッセイにて検討した。培養7日目まででは有意の変化は見られず、これら細胞株に対してOTは明らかな増殖あるいは抑制効果を示さなかった。

(総括)

OTRcDNAならびにこれに基づいてOTR合成ペプチド断片を用いて作成したモノクローナル抗体を利用して、ヒト乳癌組織におけるOTRの発現を証明し、以下の結果を得た。

- 1) ヒト乳癌組織におけるOTRの発現をmRNAレベルならびに蛋白レベルで確認した。
- 2) 約90%の症例の腺上皮由来乳癌組織にOTRが認められ、その半数以上の症例で強い発現が見られた。
- 3) OTはOTR陽性培養乳癌細胞株に対して、短期培養では明らかな細胞増殖促進作用あるいは抑制作用を示さなかった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、オキシトシンレセプター(OTR)の乳腺および乳癌における発現と局在を検討するとともに、その生物学的作用の解明を試みたものである。まずOTRのこれら組織におけるmRNAレベルでの発現をNorthern blottingおよびRT-PCRにて証明した。次に、抗OTRモノクローナル抗体を作製し、それを用いたWestern blottingにてOTRの発現を蛋白レベルにおいても明らかにした。さらに免疫組織化学的に検索を進めた結果、正常乳腺においてOTRはその腺上皮に局在し、乳癌においてもその90%以上の症例でOTR陽性であることを示した。OTRを発現する培養乳癌細胞株に対してオキシトシン(OT)は短期間(7日間)では明らかな増殖作用や阻害作用を示さなかった。

本研究はOTの主要標的臓器の一つである乳腺組織に着目し、正常乳腺ならびに乳癌におけるOTRの発現、局在を組織学的および分子生物学的に初めて証明したものである。本研究の結果をふまえて乳腺および乳癌に対するOTの生理作用機序の解明が期待でき、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。