



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## ウサギ胎盤形成における上皮細胞成長因子の生理学的意義に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 原, 洋明 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2364">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2364</a>

氏名（本籍）	原 洋 明（秋田県）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博甲第23号
学位授与年月日	平成7年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学位論文題目	ウサギ胎盤形成における上皮細胞成長因子の生理学的意義に関する研究
審査委員	主査 信州大学教授 佐々木 晋 一 副査 信州大学教授 大 谷 元 副査 岐阜大学教授 中 村 孝 雄 副査 静岡大学教授 番 場 公 雄 副査 信州大学教授 太 田 克 明

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

医薬品の開発において、ウサギは薬物の生殖に及ぼす影響を評価する上で必須の実験動物であり、ほぼ全ての医薬品はウサギを用いて評価が行われている。しかし、実験動物としてより汎用されているマウスやラットに比べ、ウサギの生殖生理に関する研究は少なく、不明な部分が多い。胎盤は哺乳類の妊娠期にのみ存在し、次世代児の発生を支持する役割を演じ、栄養膜細胞の急速な増殖により形成される組織である。現在、ヒト等において胎盤の形成や機能における成長因子、特に上皮細胞成長因子（EGF）の役割について関心が払われているが、ウサギの胎盤における EGF の役割については不明である。こうした現状において、ウサギの生殖事象における成長因子の関与を解明することは、ヒトの生殖機能に及ぼす成長因子の影響を作用機構の面においても正確に予測し、臨床応用にとって有益な情報を提供する上で重要である。本論文はウサギの生殖生理に関する基礎的研究として、胎盤の EGF に対する反応性および感受性ならびに胎盤に対する EGF の作用様式について検討し、胎盤形成における EGF の生理学的意義について考察した。

第2章第1節では、ウサギ胎盤迷路層組織からの栄養膜細胞の単離法について検討した。迷路層組織からトリプシンおよびコラゲナーゼ処理により分散され、パーコール密度勾配遠心により比重1.035~1.062の間に集められた細胞は、その95%以上が直径10~20 $\mu$ mの小型単核細胞であり、かつ全てが抗サイトケラチン抗体に陽性であった。したがって、ウサギの胎盤迷路層組織から栄養膜細胞を単離する方法として、本法は適切であると判断した。

第2章第2節では、成長因子のウサギの胎盤形成に対する関与について検討する為、胎盤迷路層細胞に対するEGF、IGF-I、IGF-II、インスリン、あるいはG-CSFの増殖能および糖代謝に

及ぼす作用効果をひかくした。増殖能はプロモデオキシウリジンの細胞DNAへの取り込み、糖代謝は 2-deoxy-D-glucoseの細胞への取り込みを指標として評価した。その結果、EGFは胎盤形成期のウサギ胎盤迷路層細胞の糖代謝ならびに増殖能を亢進させることにより、胎盤形成に寄与する主要な因子の一つであることが明らかとなった。また、これらの効果は胎盤形態の完成以降消失したことから、EGFはウサギ胎盤において胎盤の形成に局在して重要な意義を持つものと考えられた。

第3章では、ウサギ胎盤迷路層細胞における上皮細胞成長因子の初期情報伝達機構について検討した。最初に、 $^{125}\text{I}$ -EGFを用いて、妊娠11、17、23および29日の胎盤迷路層細胞とEGFとの結合実験を行い、妊娠の経過に伴うEGF受容体の数および親和性の変化について検討した。その結果、ウサギ胎盤迷路層細胞にEGF特異的受容体が存在することが証明された。EGF受容体を介する増殖情報が形成期の胎盤成長を促進する因子であることが明らかとなった。また胎盤迷路層細胞の増殖能ならびにグルコース取り込みに対するEGFの亢進効果が妊娠の経過に伴い低下したことは、EGF受容体の親和性の変化ではなく、数の減少に起因するものであることが示唆された。EGF受容体のC末端付近に存在する自己リン酸化部位は、活性化されたEGF受容体と基質タンパク質との相互作用において何らかの調節的役割を果たすと考えられている。そこで次に、胎盤由来のEGF受容体における自己リン酸化能を形成期と胎児期の胎盤から部分精製したEGF受容体を使用して検索した。その結果、ウサギ胎盤の成長はEGF受容体のpost receptor情報伝達の変化ではなく、受容体数の変化により調節されていることが示唆された。

第4章では、尿、血漿、胎盤迷路層および顎下腺組織のEGF濃度、胎盤迷路層組織の免疫組織化学、顎下腺切除の胎児に及ぼす影響を検索し、ウサギ胎盤形成期にEGF受容体を介して胎盤成長に寄与するリガンドの一つがEGFであることを立証し、胎盤に作用するEGFの由来ならびに作用様式について検討した。その結果、EGFはEGF受容体を介してウサギ胎盤に作用するリガンドであり、顎下腺に由来したEGFにより内分泌的に作用するのではなく、胎盤組織自身が産成し、自己ないしは傍分泌的に局所で作用することが推察された。

本研究の結果から、ウサギの胎盤形成において、EGFによる増殖刺激を主とした情報伝達が重要な役割を果たし、そのEGFは胎盤自身が産生し、自己ないしは傍分泌様式により胎盤に作用しており、胎盤は情報を受け取るEGF受容体の数の増減によって自己増殖を調節していることが明らかとなった。本論文はウサギの胎盤形成におけるEGFの生理学的意義を明らかにし、その作用機序の一端を解明した。このことは哺乳動物の個体発生機構を解明する一助となり、実験動物としてのウサギの質的向上に寄与するものである。

## 審 査 結 果 の 要 旨

医薬品の開発において、ウサギは薬物の生殖に及ぼす影響を評価する上で必須の実験動物であり、ほぼ全ての医薬品はウサギを用いて評価が行われているにも拘わらず、実験動物としてより汎用されているマウスやラットに比べ、ウサギの生殖生理に関する研究は少なく、不明な部分が多々ある。そこで、本論文では、胎盤が栄養膜細胞の急速な増殖により形成される組織であることに鑑み、それを調節している因子が上皮細胞成長因子(EGF)ではないかとの推論に立ち、ウサギの生殖生理に関する基礎的研究の一環として、未だ不明なウサギ胎盤形成におけるEGFの生理学的意義について検討したものである。

本論文は5章からなり、5項目の実験を中心にまとめたものである。最初に、ウサギ

胎盤迷路層細胞からの細胞の単離法を確立し、以下の知見を得ている。胎盤迷路層細胞におけるブロモデオキシウリジン(BrdU)取り込みの亢進効果は、各成長因子の中でEGFが最も高く、妊娠11日および17日の細胞においてEGFは用量反応的にBrdU取り込みを増加させたが、妊娠23日以降の細胞ではBrdU取り込みの増加は認められないことを観察している。さらに、インスリンに比し EGFは反応性および感受性共低いものの妊娠14日においてのみグルコースの取り込みを亢進させることを観察している。

次に、胎盤迷路層細胞に対するEGFの結合を解析し、親和性の異なるEGFに対して特異的な受容体が存在すること、妊娠の経過に伴い受容体数が減少するが親和性には変化がないことを明らかにしている。次に EGFの細胞内初期情報伝達機構を、部分精製した受容体のチロシン残基のリン酸化能から検討し、EGFは受容体のリン酸化を増加させるが EGF非存在下においても既に受容体はリン酸化されていること、妊娠日齢間で自己リン酸化能の明瞭な差がないことを観察している。

最後に、尿、血漿、胎盤迷路層および顎下腺組織の EGF濃度、胎盤迷路層組織の免疫組織化学、顎下腺切除の胎児に及ぼす影響を検索し、ウサギ胎盤形成期に EGF受容体を介して胎盤成長に寄与するリガンドの一つが EGFであることを立証し、EGFはEGF受容体を介してウサギ胎盤に作用するリガンドであり、顎下腺に由来した EGFにより内分泌的に作用するのではないことを示唆している。

結論として、ウサギの胎盤形成において、EGFによる増殖刺激を主とした情報伝達が重要な役割を果し、その EGFは胎盤自身が産生し自己ないしは傍分泌様式により胎盤に作用しており、胎盤は情報を受け取る EGF受容体の数の増減によって自己増殖を調節していることを立証したものである。これらの知見は、実験動物としてのウサギの質的向上に貢献するばかりでなく、哺乳動物の個体発生機構を解明する一助となり、臨床応用にとって有益な情報を提供するものと思われる。

尚、本論文の一部は下記の学術雑誌に掲載され高い評価を得ている。

第一報 Changes in placental cell proliferation during pregnancy in the rabbit. J.Reprod.Dev. 40:133-139,1994.

第二報 ウサギの妊娠期における尿中上皮細胞成長因子の変動  
日本不妊学会雑誌 39:367-372,1994.

第三報 Changes in proliferative response and sensitivity of placental cells to epidermal growth factor during pregnancy in the rabbit.  
J.Reprod.Dev. 40:235-241,1994.

よって、審査委員一同は、詳細に検討した結果、本論文を博士論文として価値あるものと認め「合格」と判定した。但し、審査委員から論文の問題点として指摘された部分を加筆訂正し、最終提出論文とすることにした。