

氏 名 (本籍)	羽 田 真 悟 (北海道)		
学 位 の 種 類	博士 (獣医)		
学 位 記 番 号	獣医博甲第 2 8 1 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 1 年 3 月 1 3 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当		
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学 位 論 文 題 目	雌ウマの着床期の子宮内膜において発現する遺伝子の検 索と着床機構に関する研究		
審 査 委 員	主査	帯広畜産大学 教授	三 宅 陽 一
	副査	帯広畜産大学 教授	北 村 延 夫
	副査	岩 手 大 学 教授	橋 爪 一 善
	副査	東 京 農 工 大 学 教授	田 谷 一 善
	副査	岐 阜 大 学 教授	深 田 恒 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

ウマの受精卵は胚へと発育する形成期初期から着床期において、子宮内での遊走を終えた後、初期段階で存在するカプセルが融解して子宮内の特定の部位で着床に至るなど、特異的で連続的な過程を経て妊娠が成立する。また、この時期には着床に向けた子宮内膜の構造変化が起こっているが、これらに関する知見は十分知られていない。そこで本研究では非妊娠 13 日 (cyclic 13 ; C13)、妊娠 13 日 (pregnant 13 ; P13 ; 胚の遊走期)、妊娠 19 日 (pregnant 19 ; P19 ; 胚の固着後)、妊娠 25 日 (pregnant 25 ; P25 ; カプセル融解後) のウマの生体材料である子宮をもとに、着床期の子宮内膜に起こる生理的変化を分子生物学的手法によって解析したものである。

研究の第一段階として、着床期のウマの子宮において着床に関係すると思われる因子を検索するために、PCR-Selected Suppression Subtraction Hybridization 法 (以下 SSH) を実施した。その結果、P19 の胚存在部の子宮内膜において P13 の子宮角尾側と比較して interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) と neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) の発現が上昇していることが示唆された。IL-1RN は IL-1 の拮抗的阻害物質であり、IL-1 は胚の着床過程において重要な役割を持つと考えられている。一方、NGAL は matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の活性を増強する作用を持ち、MMP-9 は胚の着床時に組織の分解、再構成を担う因子として考えられている。

これらの結果を踏まえ、これら 2 つの因子に着目して、ウマの着床過程におけるその役割を検討する目的で、第二段階として、IL-1RN と IL-1RN に関係する因子の発現を解

析した。その結果、IL-1RN mRNA は P19 と P25 の妊角において発現が顕著に上昇していた。IL-1RN には分泌型と細胞質型があり、その分泌型の存在が確認された。IL-1RN タンパク質の発現は腺上皮細胞と子宮腺の管腔に認められたことから、IL-1RN は子宮の管腔内に分泌されていることが示唆された。胚存在部において顕著な IL-1RN mRNA の発現上昇が見られたことから、IL-1RN の発現を誘導する因子として、estradiol-17 β (E₂) に着目して研究を進めた。その結果、妊娠 25 日の卵黄嚢中および、胚存在部位の子宮内膜中の E₂ 含有量は高いこと、子宮内膜組織にステロイドホルモンを添加して培養したところ、10 ng/ml の E₂ を 10 ng/ml のプロジェステロン (P₄) と同時に添加した群において E₂ を添加しない群と比較して IL-1RN mRNA の発現が有意に上昇したことが認められた。IL-1RN と関係のある遺伝子の解析より、IL-1 α と IL-6 mRNA 発現の顕著な上昇が妊娠 25 日の妊角において認められた。しかし、これらの発現はステロイドホルモン処理した内膜組織では上昇しなかった。IL-6 mRNA は管腔上皮の一部に限局して存在していて、胚が IL-1 β を産生すると仮定すると、この一部の管腔上皮に見られた IL-6 mRNA の発現は胚の接着の結果 IL-1 β が局所的に作用した結果であるものと考えられ、非接着部位での反応は IL-1RN によって阻害されているということが考えられた。これらの結果から、IL-1RN の発現は黄体期レベルの P₄ 存在下において胚からの高濃度の E₂ により誘導され、IL-1 刺激の調整に関わるというモデルが示された。

ついで第三段階として、NGAL, MMP-9 および MMP-9 と作用が類似する MMP-2 について解析した。リアルタイム PCR の結果、NGAL mRNA の発現は P19G と P25G において顕著に上昇していた。また、mRNA の発現と一致して NGAL タンパク質が存在することが示され、さらに、NGAL は腺上皮から腺腔内へと分泌していることが確認された。一方、MMP-2 mRNA の発現は妊角において高い傾向を示し、MMP-9 mRNA の発現は P25 において上昇していた。P25 における MMP-9 の活性は、両子宮角において mRNA の発現に変化がなかったにもかかわらず、P25G において P25N と比較して約 2 倍高かった。また、MMP-9 の活性は管腔上皮と腺上皮において認められた。本研究において、ヒトにおいて見られるような NGAL-MMP-9 複合体は確認できなかったが、ウマ NGAL を強制発現させたヒト胎盤由来の絨毛性癌細胞 (JEG3) において MMP-9 活性の上昇が見られたことから、ウマにおいても NGAL による MMP-9 活性の増強作用があることが示唆された。妊娠 25 日ではウマの胚は子宮内膜の上皮を越えて侵入しないことや、NGAL が管腔内に存在すること、そして MMP-9 の活性が上皮細胞に見られることから、この時期における MMP-9 の作用の一つとして、上皮もしくは胚の栄養膜細胞の細胞外基質を分解し、胚の子宮内膜への接着を促進することが考えられた。また、子宮内膜は胚の成長に伴い圧迫されつつ伸展するため、それに伴った子宮内膜の再構築に関わる可能性が示唆された。

これらの結果から、ウマの胚の遊走期から着床期にかけて様々な変化が起こるが、着床反応の制御には IL-1RN が、接着もしくは組織の再構築には NGAL が関与することが示された。また、IL-1RN の発現は progesterone 存在下で胚由来の estradiol-17 β に誘導されることが示され、このことから、ウマ胚固着後の子宮内膜の胚存在部位における着床反応を誘導する機構の一つとして、ステロイドホルモンの重要性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

学位申請者である羽田真悟君は、ウマの受胎から妊娠に至る一連の繁殖生理に関わる過程で起こる変化を知る目的で、胚が子宮内に着床する妊娠早期に着目して、その前後に発現するウマに特異的な生理情報を分子生物学的に解明するための一連の研究を進めてきた。とくに、胚の遊走期（妊娠 13 日）、胚の固着後（妊娠 19 日）、カプセル融解後（妊娠 25 日）のウマの生体材料の子宮をもとに、着床期の子宮内膜に起こる変化を、PCR-Selected Suppression Subtraction Hybridization 法、着床に関わる遺伝子の発現検索、免疫組織化学的手法、ステロイドホルモン測定法を用いて解析したものである。その結果、以下の成績を得たことを踏まえ、審査した。

I. 着床期のウマの子宮で発現が上昇、または特異的に発現している因子を検索した結果、妊娠 19 日の胚存在部の子宮内膜で interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) と neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) の発現の上昇を認めた。そこでこれら 2 つの因子に着目して、ウマの着床過程におけるその役割を検討した。

II. IL-1RN と IL-1RN に関係する因子の発現を解析したところ、IL-1RN mRNA は妊娠 19 日と 25 日の妊娠子宮角で発現が顕著に上昇していることを認めた。IL-1RN の発現を誘導する因子を検索したところ、妊娠 25 日の卵黄囊中、胚存在部位の子宮内膜中の estradiol-17 β 含有量は高く、子宮内膜組織に estradiol -17 β と progesterone とを同時に添加したところ、IL-1RN mRNA の発現が有意に上昇することを認めた。これらの結果から、IL-1RN の発現は黄体期レベルの progesterone 存在下で胚からの高濃度の estradiol -17 β により誘導され、IL-1 刺激の調整に関わるというモデルを示した。

III. NGAL, MMP-9, MMP-2 の発現を解析したところ、NGAL mRNA の発現は妊娠 19 日と 25 日の妊娠子宮角で顕著に上昇していることを認めた。また、mRNA の発現と一致して NGAL タンパク質が存在することが示され、NGAL は腺上皮から腺腔内へと分泌していることを確認した。一方、MMP-2 mRNA の発現は妊娠子宮角で高く、MMP-9 mRNA の発現は妊娠 25 日の妊娠子宮角で上昇していることから、NGAL による MMP-9 活性の増強作用があることを示唆した。

今回の一連の研究によって、ウマの胚が子宮内に着床する妊娠早期には、IL-1RN は着床反応の制御に、NGAL は接着もしくは組織の再構築に関係する所見を得た。また、ウマ胚固着後の子宮内膜の胚存在部位における着床反応を誘導する機構の一つとして、ステロイドホルモンが同時に存在することが重要であることを示した研究成果はウマの特異的な妊娠早期の子宮内膜再構築を理解する上で重要な所見と考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 名 : Interleukin-1 receptor antagonist expression in the equine endometrium during peri-implantation period

著 者 名 : Haneda, S., Nagaoka, K., Nambo, Y., Kikuchi, M., Nakano, Y., Matsui, M., Miyake, Y., MacLeod, J.N. and Imakawa, K.

学術雑誌名 : Domestic Animal Endocrinology

巻・号・頁・発行年月 :

(In press)

既発表学術論文

1) 題 名 : Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization
of α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testes

著 者 名 : Devkota, B., Sasaki, M., Takahashi, K., Matsuzaki, S., Matsui, M.,
Haneda, S., Takahashi, M., Osawa, T. and Miyake, Y.

学術雑誌名 : Journal of Reproduction and Development

巻・号・頁・発行年月 : 52(1) : 43-49, 2006