

氏名（本（国）籍）	MISHRA, Birendra（ネパール連邦民主共和国）
主指導教員名	岩手大学 教授 橋 爪 一 善
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第320号
学位授与年月日	平成23年3月14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	岩手大学
学位論文題目	Regulatory Roles of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer in the Bovine Endometrial Function during Gestation (エンプリンのウシ妊娠子宮内膜機能制御に関する研究)
審査委員	主査 岩手大学 教授 居在家 義 昭 副査 帯広畜産大学 教授 鈴木 宏 志 副査 岩手大学 教授 橋 爪 一 善 副査 東京農工大学 教授 加茂前 秀 夫 副査 岐阜大学 教授 志 水 泰 武

論文の内容の要旨

子宮内膜の組織リモデリングが受胎にとって重要であることは言うまでもない。着床時や胎盤形成、分娩時において子宮内膜には機能的変化がもたらされ、また構造的にも劇的な変化が生じる。妊娠に伴う子宮内膜のダイナミックな組織リモデリングは細胞外マトリックス（ECM）の変化に基づき、ECM 分解および再構築の微妙なバランスが子宮内膜の構造的変化および多彩な機能発現と密接に関連していると考えられる。このような ECM の代謝調節はマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）やその関連因子によって制御され、さらに子宮内膜 ECM には各種のサイトカインや増殖因子群が貯蔵されていることから、ECM 改変時のこれら因子の遊離は子宮内膜細胞の MMP 発現も含めた機能的変化をもたらすと考えられる。

Extracellular matrix metalloproteinase inducer（EMMPRIN）は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜表面タンパク質であり、種々の細胞において MMP の産生を増加させることが知られている。しかしながら、ウシ子宮内膜における EMMPRIN の発現および役割についてはほとんど検討されていない。

本研究では、ウシ子宮内膜における EMMPRIN の機能的役割を明らかにすることを目的とし、以下の3項について検証した。

1. 発情周期および着床界面子宮内膜における EMMPRIN の役割

第一章においては、発情周期および着床界面子宮内膜における EMMPRIN の発現動態と局在を調べると共に、EMMPRIN 機能の指標として MMP 群 (MMP-1, -2, -7, -9, -13 および-14) と ADAMTS-1 の発現について調べ、子宮内膜における EMMPRIN の役割について考察した。EMMPRIN はウシ子宮内膜に発現し、発情周期に応じてその動態が変化し、発情中期に高い発現を示した。着床期内膜上皮細胞での EMMPRIN 発現は低下し、MMP 群および ADAMTS-1 の発現動態と一致した。一方、着床臨界期の受胎産物において EMMPRIN の強い発現を認めた。これらの結果から、着床時期の子宮内膜 EMMPRIN は MMP 群および ADAMTS-1 の産生制御を通して子宮内膜の改変を主導することが示唆された。また、着床界面の栄養膜での強い発現から、着床時の栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞の接着、融合に関与すると考えられた。

2. 妊娠子宮内膜における EMMPRIN の役割

第二章においては、妊娠期の子宮内膜および栄養膜における EMMPRIN の機能的役割を子宮内膜、胎盤節に発現する MMP 群、ADAMTS-1 およびアポトーシス関連因子の動態を通して検証した。EMMPRIN の発現は主に子宮小丘の上皮細胞および二核細胞を含む栄養膜細胞に認められ、MMP-14 と ADAMTS-1 の発現も同様な局在を示したが、MMP-2 の発現は子宮小丘の間質細胞に発現を認めた。さらに、EMMPRIN の発現は妊娠後期の胎盤節で顕著に増加し、MMP-14 および ADAMTS-1 も同様な発現動態であった。これらの結果から、EMMPRIN が妊娠後期の胎盤節において MMP-14 および ADAMTS-1 の産生を促進、分娩の誘導に関与することが視えた。妊娠後期での BAX, Fas, FasL および TNF α などアポトーシス促進因子の発現が妊娠後期の胎盤節において有意に高値を示した。これらの結果は、EMMPRIN は MMP 群、ADAMTS-1 およびアポトーシス促進因子と関連して、妊娠の維持および分娩誘起においても重要な役割を果たすことを示唆する。

3. 子宮内膜 MMP の発現制御における EMMPRIN の機能的役割の解析

第三章においては、EMMPRIN の発現制御および EMMPRIN による MMP 群と ADAMTS-1 発現の制御機構について調べるため、ウシ子宮内膜由来上皮細胞および間質細胞を用いた *in vitro* での解析を試みた。培養子宮内膜間質細胞にプロゲステロンを処理したところ、EMMPRIN の発現は有意に増加したが、エストロジェンは影響を及ぼさなかった。一方、MMP-2 および-14 の発現はプロゲステロンおよびエストロジェンの処理により変化を認めなかった。ADAMTS-1 の発現はプロゲステロン処理により増加した。EMMPRIN が高発現する子宮内膜上皮細胞とほとんど発現しない間質細胞の共培養実験では、共培養により間質細胞での MMP-2 および-14 の発現が増加した。本効果は EMMPRIN 抗体により消失したことから、上皮細胞で高発現する EMMPRIN が間質細胞へ直接的に作用して MMP 群の発現を増加させると推測された。さらに EMMPRIN 分子中の細胞外ドメイン I の合成ペプチドを共培養系に添加したところ、MMP-14 の発現増強が抑制されたことから、上皮細胞由来 EMMPRIN はプロゲステロンが高値を示す条件下において、その分子中の細胞外ドメイン I を介して間質細胞の MMP 群の発現を制御していると推測された。

以上のように本研究では、1) ウシ子宮内膜上皮細胞に EMMPRIN が発現すること、2) EMMPRIN はプロゲステロン依存的な特徴的な発現動態を示すこと、3) EMMPRIN は、ECM 分解酵素関連因子の MMP や ADAMTS-1 などの発現制御を介して着床や妊娠の成立、分娩において機能的役割を果たすこと、4) EMMPRIN のこれらの調節作用は細胞外ドメ

インIに依存することが示唆された。これらの結果は、EMMPRINを中心とした、受胎や妊娠維持における子宮内膜リモデリング研究の新展開を導くものであり、ウシだけでなく他の動物も含めて、早期胚死滅や分娩遅延などの解決手段開発への新知見を提供する。

審 査 結 果 の 要 旨

組織改変因子の一種である Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) のウシ子宮内膜における役割を明らかにすることを目的とし、以下の3項を検証し、EMMPRINのウシ子宮内膜での新規の機能を明らかにした。

1. 発情周期および着床界面子宮内膜における EMMPRIN の役割

第一章では、発情周期および着床期子宮内膜における EMMPRIN の発現動態を検証した。子宮内膜での EMMPRIN の発現は発情中期に高く、着床期では子宮上皮細胞で発現が低下、栄養膜細胞で高発現し、MMP 群および ADAMTS-1 の発現は EMMPRIN の発現と一致した。これらの結果から、着床時期の EMMPRIN は MMP 群および ADAMTS-1 産生を通して子宮内膜の改変を主導し、栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞の接着、融合に関与すると結論した。

2. 妊娠子宮内膜における EMMPRIN の役割

第二章では、妊娠期子宮内膜における EMMPRIN 機能を EMMPRIN, MMP 群, ADAMTS-1 およびアポトーシス関連因子の動態を通して検証した。EMMPRIN は子宮内膜上皮細胞および二核細胞に認め、MMP-2, -14 と ADAMTS-1 も同様な局在を示した。また、EMMPRIN は妊娠後期の胎盤節で増加し、MMP-14 および ADAMTS-1 も同様な発現であった。加えて、TNF α や FasL などのアポトーシス関連因子の検証から EMMPRIN, MMP 群, ADAMTS-1 およびアポトーシス因子は、妊娠の維持および分娩誘起に重要な役割を果たすと結論した。

3. 子宮内膜 MMP の発現制御における EMMPRIN の機能的役割の解析

第三章では、ウシ子宮内膜由来上皮細胞および間質細胞を用いた *in vitro* 解析系によりその機能解析を試みた。プロジェステロンは子宮内膜間質細胞での EMMPRIN の発現を促進したが、エストロジェンは影響を及ぼさなかった。子宮内膜上皮細胞と間質細胞の共培養実験では、間質細胞での MMP-2 および-14 発現が増加した。本効果は EMMPRIN 抗体により消失、また EMMPRIN の細胞外ドメイン I の合成ペプチドは、MMP-14 の発現増強を抑制した。これらのことから、上皮細胞由来 EMMPRIN は細胞外ドメイン I を介して間質細胞の MMP 群の発現を制御すると結論した。

本研究は、EMMPRIN は受胎や妊娠維持における子宮内膜リモデリンの主導要因であることを始めて明らかにした。

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十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle
- 著 者 名 : Mishra, B., Kizaki, K., Koshi, K., Ushizawa, K., Takahashi, T., Hosoe, M., Sato, T., Ito, A. and Hashizume, K.
- 学術雑誌名 : Reproductive Biology and Endocrinology
- 巻・号・頁・発行年 : 8・60, 2010