

氏 名 (本籍)	木 村 文 則 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士 (論) 第292号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位論文題目	Messenger ribonucleic acid for the mouse decidual prolactin is present and induced during in vitro decidualization of endometrial stromal cells (マウスプロラクチン伝達リボ核酸は脱落膜に存在しin vitroで子宮内膜間質細胞が脱落膜化する際に誘導される)
	審査委員 主査 教授 柏 木 厚 典 副査 教授 西 克 治 副査 教授 岡 田 裕 作

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

着床のためにはestradiolとprogesteroneによる子宮内膜の脱落膜化が必要である。ヒト子宮内膜が脱落膜化するとプロラクチン (PRL) が分泌されるが、それは脱落膜化の指標として研究に利用されている。また、着床機構を解明するために胚の培養も必要と考えるが、ヒト胚を使用することは倫理的に問題がある。そこで我々は胚使用に倫理的問題がなく着床機構の研究により有利なマウスに着目しマウス子宮内膜間質細胞 (ESCs) の脱落膜化モデルを作成し報告してきた。マウス脱落膜におけるPRL遺伝子の発現については報告がなく、今回、マウス子宮内膜間質細胞培養系を利用しそれらからPRLとdecidual trophoblastic prolactin related protein (d/tPRP) の遺伝子が発現するかどうかの検討を行った。

【方 法】

1. 子宮内膜間質細胞の分離、培養

4週齢雌マウスより子宮を摘出し、細切りしcollagenase処理を行った。meshにて濾過し組織塊を除去し、濾過液を遠沈後、洗浄しDMEMに再浮遊させた。24well-dishに1 well中 1.5×10^5 細胞で播種した。ESCsの培養維持には、10%FCS、100IU/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin添加したDMEMを使用し37°C、5%CO₂ in air下で培養し1日毎に培養液交換を行った。培養液にestradiol (E₂) 100pM、progesterone (P) 100nMを添加したE₂/P添加群とそれらを添加していないE₂/P非添加群に分け培養を行った。位相差顕微鏡にて連日観察した。

2. 電子顕微鏡での観察

培養細胞を2.5%グルタルアルデヒド0.1MPBSにて固定した後、0.2Mショ糖加PBSで洗浄し、1%オスミウム0.1MPBSで染色し、上昇エタノールで脱水を行い、包埋の後超薄切片を作製した。電子染色を行い、透過電子顕微鏡を用いて超微形態の観察を行った。また、妊娠マウスを全身概流固定した後に子宮を摘出し、4%パラホルムアルデヒドと0.2%ピクリン酸0.1MPBSにて固定し、15%ショ糖0.1MPBSで洗浄し、10%ゼラチンに包埋の後、100 μ m切片を作製した。切片を1%オスミウム・0.1MPBSで染色し脱水後、包埋を行った。培養細胞との超微形態の比較を検討した。

3. マウスESCsよりのd/tPRPとPRLmRNAの発見

マウスESCsを培養開始後10日目で回収しtotal RNAを抽出した。2 μ gのtotal RNA逆転写した。d/tPRP検出のためPCRを行った。denature95°C 1分間、annealing60°C 1分間、extension72°C 1分間を30回転施行した。同様にPRL検出のためのnested-PCRを施行した。

d/tPRP増幅と同じ温度・時間設定で第1段階のPCRを20回転施行し、第2段階のPCRは第1段階と同じ温度・時間・回転数で行った。

マウス子宮内膜（脱落膜）を妊娠1日目から10日目までの間採取し同様の方法でd/tPRPとPRLmRNAの発現を検討した。

【結 果】

（位相差顕微鏡下の子宮内膜間質細胞の観察）

E2/P非添加群の細胞は培養期間中、紡錘状を呈し細長い細胞質を持ちfibroblast様の形態を示した。一方、E2/P添加群では培養開始後6日頃より1部に細胞質の肥大した大型の細胞が出現しはじめ、10日後には核・細胞質ともに肥大した円形の大型細胞が多数出現した。

【超微形態の観察】

E2/P非添加群の培養10日目のESCsは、辺縁不整な核を有し、細胞質の乏しい細胞であった。E2/P添加群の培養10日目のESCsは、多核化した核を有し細胞質は肥大し粗面小胞体の発達拡張を認めた。

一方、in vivoの4週齢未熟マウスのESCsは不整な核を有し、細胞質の乏しい細胞であった。また、妊娠6.5日目の脱落膜細胞は類円形の核を有し、細胞質は肥大し細胞内小器官の増加を認めた。

【遺伝子発現】

E2/P非添加群ではd/tPRPとPRLの遺伝子発現が認められなかったが、E2/P添加群ではd/tPRPとPRLともに発現が認められた。

妊娠0.5日より8.5日までのマウス子宮内膜のd/tPRPとPRL遺伝子発現を調べると、両遺伝子とも妊娠5.5日から8.5日までの間に認められた。

【考 察】

マウス脱落膜からもPRL遺伝子発現のあることが分かったが、mRNA発現は少なく、免疫染色法にて染色されないことからその分泌も微量であると推察された。脱落膜からPRLが大量に分泌されるヒトとの相違の理由として、マウスではPRL関連蛋白が多数発見されており、それらがPRLの役割の代わりをし、PRLの必要性が低下したためと推察した。マウスESCsは、in vivoにおいてステロイド添加のみでは脱落膜化をおこさないが、in vitroにおいては脱落膜化をおこした。この矛盾の説明として細胞を酵素処理をする際や播種する際の物理的な刺激が関与していると推察した。

【結 果】

今回、マウス子宮内膜脱落膜化モデルを作成した。

今後、このモデルは脱落膜化の研究に役立つと考えた。

論文審査の結果の要旨

子宮内膜間細胞の脱落膜化は受精卵の着床と妊娠の維持に必須であるが、その分子機構については不明点が多い。そこで、本研究ではマウス子宮内膜間質細胞培養系を確立し、その脱落膜化に伴う微細構造変化を電子顕微鏡にて、またマーカー蛋白としてプロラクチン（PPL）とプロラクチン関連蛋白の遺伝子発現状態をRT-PCR法にて検討した。マウス子宮内膜間質細胞を単離し、培養液中にestradiolとprogesteroneを添加し6日目以後脱落膜化が誘導された。in viro脱落膜化細胞では、in vivo脱落膜と同様の核腫大、細胞腫大、粗面小胞体の増加などの形態変化とプロラクチンおよびプロラクチン関連蛋白の遺伝子発現が認められたが、対照群ではこれら変化がなかったとしている。形態的变化と遺伝子発現にて評価したマウスin vitro脱落膜化モデル細胞を作成した報告は初めてであり、プロラクチンとプロラクチン関連蛋白の特徴的遺伝子発現を同定している。

このように、本研究は今後の受精卵の着床機構解明と体外受精胚移植法の着床率向上を目指した研究として意義あるものである。よって本論文は博士（医学）の学位を授与するにふさわしいものと認める。