

氏名・(本籍)	笠原 恭子 (大阪府)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第362号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成13年3月26日
学位論文題目	The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells <i>in vitro</i> (子宮内膜間質細胞の <i>in vitro</i> 脱落膜化におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンの役割)

審査委員	主査 教授	佐伯 行一
	副査 教授	服部 隆則
	副査 教授	野田 洋一

論文内容の要旨

【目的】

hCGは胚発育の初期段階から絨毛より分泌され、卵巣に作用してプロゲステロン (P) 分泌を促進して間接的に胚の着床および妊娠の維持に重要な働きをしている。近年、hCGが子宮内膜に直接作用してその脱落膜化に中心的な役割を果たしていると報告され、着床機構におけるhCGの意義はさらに注目されることとなった。子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化は着床および妊娠の維持に重要な機構と考えられるが、未解明な点も多い。本研究においては脱落膜化の主要な誘起因子とされるP、エストロゲン (E)、hCGの役割とこれらの間の相互作用を明らかにし、着床機構の解明および黄体機能不全治療に寄与することを目的として行ったものである。

【方法】

正常月経周期を有し、子宮内膜疾患以外の適応で子宮全摘術を受ける患者より、informed consentを得た上で、摘出子宮から子宮内膜を採取した。細切した子宮内膜を、37°C、5%CO₂の条件下でD-MEM(phenolred-free)+0.2% collagenase+0.005% DNaseとインキュベートさせた後、40μm nylon meshで上皮細胞や未消化組織を除き、ESCを多く含む細胞懸濁液を得た。10分間の遠心でESCを回収し、6-well plastic dishに、約1×10⁶cell/4ml medium/wellずつ播種した。基本培養条件をD-MEM+10% charcoal-stripped FBS-100IU/ml penicillin+100μg/ml streptomycin、37°C、5%CO₂として、後述の条件下で培養した。位相差倒立顕微鏡で、培養細胞の形態変化を観察するとともに、培養上清を2日毎に回収し、脱落膜化の機能指標として広く用いられているPRLの濃度をRIA法で測定することによって、脱落膜化の程度を評価した。

まず、17β-estradiol (E₂) およびPを加えることによって、*in vitro*でESCの脱落膜化様変化(形態変化およびPRL産生)を惹起して、*in vitro*脱落膜化モデルを作成し、これを用いて、hCGの脱落膜化誘起作用や、E₂/Pによる脱落膜化に及ぼす作用を解析した。hCGには、ヒト尿由来のhCG製剤を用いた。また、E₂/PおよびhCGを加えた培養ESCの細胞内cAMPを、RIA法で測定した。E₂/Pとともに、protein kinase A inhibitor (PKI)を加え、PKIがE₂/Pによる脱落膜化に及ぼす作用を解析した。

【結果】

ESCのPRL産生量はE₂あるいはPとの間にdose-dependencyが認められ、E₂を10⁻⁸Mに固定したときのPRL産生量は、P 10⁻⁷Mで最大に達し、Pを10⁻⁷Mに固定したときのPRL産生量はE₂10⁻⁷Mで最大に達した。これらの濃度 (E₂ 10⁻⁸M P 10⁻⁷M) を脱落膜化誘起の至適濃度と考え、*in vitro*脱落膜化モデルの作成に用いて、以下の実験を行った。E₂/Pを加えたESCは、胞体が豊富となり、核も大きくなる*in vitro*の脱落膜化細胞用の形態変化、およびPRL産生能を示したが、hCG(10~10⁵mIU/ml)はESCの形態変化もPRL産生も起こさず、細胞数も変化させなかった。

E₂/P とともに加えた hCG(10~10⁵mIU/ml) は、E₂/P による形態変化、PRL 産生のいずれも促進しなかった。高濃度の hCG(10⁴~10⁵mIU/ml) は、E₂/P による PRL 産生をむしろ抑制したが、細胞数には影響しなかった。E₂/P による脱落膜化に伴って細胞内 cAMP は増加したが、hCG を加えても細胞内 cAMP に変化は認められず、高濃度の hCG は、E₂/P による細胞内 cAMP 増加をむしろ抑制した。PKI を E₂/P とともに加えたところ、PKI は E₂/P による細胞増加を抑制したが、細胞あたりの PRL 産生量に変化はなかった。

【考 察】

E₂/P は ESC の脱落膜化に中心的な役割を果たしていることが、細胞の形態変化、PRL 産生から示された。hCG には、従来提唱されていたような、脱落膜化惹起作用・促進作用や細胞内 cAMP を増加させる作用は認められなかった。高濃度の hCG は、E₂/P による PRL 産生をむしろ抑制することが示されたが、このメカニズムは不明で、ヒト尿由来の製剤を用いたため、高濃度では不純物が多くなった可能性や、未知の低親和性 LH/hCG receptor が ESC に存在しこれと反応した可能性などが考えられる。E₂/P による脱落膜化に伴って細胞内 cAMP は増加するが、PKI によって cAMP の signaling cascade を阻害しても E₂/P による脱落膜化が抑制されないことから、hCG の second messenger である cAMP も脱落膜化にほとんど関与していないものと考えられた。

【結 論】

子宮内膜の脱落膜化において中心的役割を果たしているのは E₂/P であり、近年提唱されている hCG の子宮内膜に対する直接作用は否定的と考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト子宮内膜間質細胞を 17β-estradiol(E) ならびに Progesterone(P) の存在下に培養を行うという脱落膜化のモデル実験系を用いて、絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の脱落膜化誘起作用ならびに E/P との相互作用を検討したものである。

その結果、hCG には脱落膜化を直接誘起する作用も、また、E/P による脱落膜化を促進する作用も認められない事、さらには、hCG のセカンドメッセンジャーである cAMP は脱落膜化に寄与しないことを認め、子宮内膜の脱落膜化の主役は、hCG ではなく E/P であることを明らかにしている。

これらの成果は、子宮内膜脱落膜化の過程を明らかにする事のみならず、胚の着床機構の解明にも寄与し、黄体機能不全治療に新たな視点を提供するものと考えられる。

よって、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月20日実施の論文内容と、それに関連した試問を受け、合格と認められたものである。