

学 位 論 文 題 名

ウシ胎盤における細胞外マトリックスと 成長因子の相互作用に関する研究

学位論文内容の要旨

哺乳動物の妊娠は胚胞の着床により成立するが、着床は胚と子宮の相互作用による胎盤形成を伴う現象である。胎盤は、妊娠維持のために短期間で形成・発達する器官であり、局所的に作用する様々な成長因子がその形成に密接に関与している。近年、成長因子の作用機構には、細胞外マトリックス（ECM）に捕捉されることによりその生理活性を発揮する‘マトリクリン’が介在することが明らかにされつつある。胎盤におけるマトリクリン機序の解明は、ECMの生物活性の一端を明らかにするだけでなく、液性因子の細胞への情報伝達機構を、成長因子とECMの相互作用という観点から解明する極めて重要な細胞生物学的知見をもたらす。さらに、臨床繁殖学の分野においては、多発する人為操作胚の着床不全や流産を軽減する技術の開発に直結するものとして期待されている。したがって本研究では、マトリクリンという視点から、ウシ胎盤の形成・発達に関与するECMと線維芽細胞増殖因子（FGF）の相互作用を検討し、以下の知見を得た。

1. 生体のウシ胎盤において、FGF1とFGF2は共に胎子の絨毛上皮と間質および母体の子宮内膜上皮と固有層に存在し、それぞれの組織における両者のmRNA発現も確認された。またFGF1とFGF2は、基底膜構成ECM成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）と共存しており、かつFGF2の存在量はヘパラン硫酸鎖のヘパリチナーゼ分解により低下したことから、FGF2はヘパラン硫酸鎖に結合し、捕捉・貯蔵されて生理活性を維持・発揮している可能性が高く、ウシ胎盤にはマトリクリン機序が存在することが示唆された。

2. HSPGの存在を支える他の基底膜構成ECM成分であるIV型コラーゲンおよびラミニンは、HSPGと同様、子宮内膜と絨毛上皮細胞の基底膜および間質に存在していた。さらに胎盤分葉部では絨毛上皮細胞そのものにも発現が認められたが、非胎盤分葉部の同細胞における発現は極めて低かった。しかし、それらの各mRNAの発現パターンに胎盤分葉部と非胎盤分葉部の差異はなく、絨毛上皮細胞は接着した母体組織を認識して、mRNAからタンパク質への翻訳以降の過程でIV型コラーゲンおよびラミニンの発現を制御していることが示唆された。

3. 上記1. および2. で明らかとなった母体組織との接着様式の違いによる絨毛上皮細胞の性状の差に着目し、絨毛上皮細胞の起源である栄養膜細胞（トロホブラスト; TB）の培養実験を行った。その結果、TBは敷石状に接着・増殖した単層コロニー（Attached-TB; ATB）とベジクルを形成した浮遊状態（Free-TB; FTB）の2種類の存在様式を示した。ATBとFTBは、妊娠シグナル物質であるインターフェロン τ およびインターロイキン-6のmRNAを発現しており、両者とも胎盤形成初期のウシ胚の特徴を有し

ていた。ATBにおいて、FGF1とFGF2は共に細胞質でのタンパク質発現が認められ、それらの局在はHSPGの局在と類似しており、TB自身が産生したFGFのオートクリン利用にマトリクリン機序が介在する可能性が示唆された。

4. ATBはI型、II型、III型、V型、VI型、VII型の6種類のコラーゲンを産生しており、これはTBが後に分化して形成する絨毛間質の構成成分を発現しているものと考えられた。生体の絨毛上皮細胞と同様、IV型コラーゲンおよびラミニンは、タンパク質およびmRNAの両方の発現がATBにおいて確認され、このことは生体における絨毛上皮細胞が発生初期から高い増殖・浸潤能を有していることを示唆していた。

5. FTBは、播種すると再びATBとFTBの二形態を呈して増殖したことから、可逆性の性質を持つ伸展・増殖型の細胞と考えられ、生体における非胎盤分葉部の絨毛上皮細胞と仮定され、ATBは伸展・増殖後、接着・浸潤していく胎盤分葉部の絨毛上皮細胞と仮定された。これらの仮定に基づき、ATBとFTBにおけるFGF1およびFGF2の遺伝子発現量の差異を検討した結果、FTBは非胎盤分葉部型の細胞であるため、ECM分解に阻害的に作用するFGF1の発現量が高く、ATBは胎盤分葉部型の細胞であるため、ECM分解を促進し血管新生に作用するFGF2の発現量が高い、と推察された。これらのことは、生体における絨毛上皮細胞の子宮内膜への接着様式の違いが、TBの培養系において再現され得ることを示すものであった。

6. 生体内環境を再現する胎盤モデルとして、マトリゲルを用いたTB三次元培養を試みた。その結果、ゲル上培養では単層コロニーが形成されたのに対し、ゲル内培養では、凝集したTB細胞塊から管腔状の突起物が伸展し、その先端では細胞が遊走していた。これは生体内における絨毛上皮細胞の子宮内膜への浸潤を再現するTBの挙動と考えられ、本研究で作成した三次元培養系は、胎盤の形成・発達機構を調べる有効な手段として利用可能であることが示された。

7. 上記6.の三次元培養におけるECM成分およびFGFの局在を調べたところ、TB自らが産生するIV型コラーゲンおよびラミニンは、ゲル上培養では細胞外のネットワークの再構築に利用されていたのに対し、ゲル内培養においてそれらはTB細胞塊外表面の基底膜構築に関与していた。またゲル上培養においてHSPGとFGF1およびFGF2が共存していたことから、三次元培養系においてもマトリクリン機序が介在していることが示唆された。

8. ヘパリチナーゼ処理したマトリゲル上培養のTB(Hep+)は、無処理のゲル上培養のTB(Hep-)と比較して、FGF1の発現量は低く、逆にFGF2の発現量は高かった。このFGF2の発現量増加は、ヘパリチナーゼ処理によるマトリクリン阻害のために利用不可能となった外因性のFGF2を補填するべく、TB自身がその発現量を増加させたものと考えられた。さらにHep+とHep-のFGF発現量の差異を単層培養時のATB/FTBに準じて考察すると、TB(Hep+)は接着・浸潤型の胎盤分葉部の絨毛上皮細胞、TB(Hep-)は伸展・増殖型の非胎盤分葉部の絨毛上皮細胞に相当すると考えられ、ヘパリチナーゼ処理ゲルは同種の酵素活性が高いとされている胎盤分葉部を再現した基質ゲルと考えられた。したがって、本研究で示されたATBとFTBおよびHep+とHep-という培養環境におけるTBの挙動は、生体内の存在様式を反映するものであった。

9. 本研究の胎盤モデルにおけるTBの形態とタンパク質発現の解析により、ECM、成長因子およびTBは各々相互に作用をおよぼし合っていること、すなわち基底膜構成ECM成分であるHSPGの存在に依拠して成長因子のTBに対する効果は変化し、かつTBはそれらのECM成分と成長因子

の存在様式を自ら変化させていることが結論付けられた。

本研究では、ウシ胎盤において、細胞外マトリックス、成長因子およびトロホブラストの各々がマトリクリン機序を介して相互作用を行っていることを明らかにすることができた。今後は、本研究成果に基づく、成長因子の細胞への情報伝達機構のさらなる解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 村 富美男

副 査 教 授 服 部 昭 仁

副 査 教 授 渡 邊 智 正

副 査 助教授 竹之内 一 昭

学 位 論 文 題 名

ウシ胎盤における細胞外マトリックスと 成長因子の相互作用に関する研究

本論文は、6章からなり、図 30、表 2、文献 77 を含む総頁数 86 の和文論文であり、他に参考論文 2 編が付されている。

胎盤は、妊娠維持のために短期間で形成・発達する器官であり、局所的に作用する様々な成長因子がその形成に密接に関与している。近年、成長因子の作用機構には、細胞外マトリックス (ECM) に捕捉されることによりその生理活性を発揮するマトリクリン機序が介在することが明らかにされつつある。胎盤におけるマトリクリン機序の解明は、液性因子の細胞への情報伝達機構を、成長因子と ECM の相互作用という観点から解明する極めて重要な細胞生物学的知見をもたらすと共に、臨床繁殖学の分野においては、多発する人為操作胚の着床不全や流産を軽減する技術開発に直結するものとして期待されている。そこで本論文では、マトリクリンという視点から、ウシ胎盤の形成・発達に関与する ECM と線維芽細胞増殖因子 (FGF) の相互作用を検討し、以下の知見を得ている。

1. 生体のウシ胎盤において、FGF1 と FGF2 は、基底膜構成 ECM 成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) と共存しており、かつ FGF2 の存在量はヘパラン硫酸鎖のヘパリチナーゼ分解により低下したことから、FGF2 はヘパラン硫酸鎖に捕捉・貯蔵されて生理活性を維持・発揮している可能性が高く、ウシ胎盤におけるマトリクリン機序の存在が示唆された。
2. 胎盤絨毛上皮細胞の起源である栄養膜細胞 (トロホプラスト; TB) の単層培養において、TB は敷石状に接着・増殖した単層コロニー (Attached-TB; ATB) とベジクルを形成した浮遊状態 (Free-TB; FTB) の 2 種類の存在様式を示したが、ATB と FTB は共に、妊娠シグナル物質であるインターフェロン α およびインターロ

イキン-6 の mRNA を発現しており、両者とも胎盤形成初期のウシ胚の特徴を有していた。

3. FTB は、播種すると再び ATB と FTB の二形態を呈して増殖したことから、可逆性の性質を持つ伸展・増殖型の細胞と考えられ、生体における非胎盤分葉部の絨毛上皮細胞と、ATB は伸展・増殖後、接着・浸潤していく胎盤分葉部の絨毛上皮細胞と仮定され、FTB は非胎盤分葉部型の細胞であるため、ECM 分解に阻害的に作用する FGF1 の発現量が高く、ATB は胎盤分葉部型の細胞であるため、ECM 分解を促進し血管新生に作用する FGF2 の発現量が高い、と推察された。
4. TB のマトリゲル内培養では、凝集した TB 細胞塊から管腔状の突起物が伸展し、その先端では細胞が遊走していた。これは生体内における絨毛上皮細胞の子宮内膜への浸潤を再現する TB の挙動と考えられ、本研究で作成した三次元培養系は、胎盤の形成・発達機構を調べる有効な体外モデルであることが明かとなった。
5. ゲル上培養では、TB 自らが産生した IV 型コラーゲンとラミニンが細胞外ネットワークの再構築に利用されており、HSPG と FGF 1 および FGF2 が共存していたことから、胎盤モデルにおけるマトリクリン機序の成立が示唆された。
6. ヘパリチナーゼ処理したマトリゲル上培養の TB (Hep+) は、無処理のゲル上培養の TB (Hep-) と比較して、FGF1 の発現量は低く、逆に FGF2 の発現量は高かった。この FGF2 の発現量増加は、ヘパリチナーゼ処理によるマトリクリン阻害のために利用不可能となった外来性の FGF2 を補填するべく、TB 自身がその発現量を増加させたものと考えられ、TB(Hep+) は接着・浸潤型の胎盤分葉部の絨毛上皮細胞、TB(Hep-) は伸展・増殖型の非胎盤分葉部の絨毛上皮細胞に相当すると考えられた。
7. 本研究の胎盤モデルにおける TB の形態とタンパク質発現の解析により、ECM、成長因子および TB は各々相互に作用をおよぼし合っていること、すなわち基底膜構成 ECM 成分である HSPG の存在に依拠して成長因子の TB に対する効果は変化し、かつ TB はそれらの ECM 成分と成長因子の存在様式を自ら変化させていることが結論付けられた。

上記のように、本論文では、ウシ胎盤において、細胞外マトリックス、成長因子およびトロホプラストの各々がマトリクリン機序を介して相互作用を行っていることを明らかにしており、今後は、本研究成果に基づく、成長因子の細胞への情報伝達機構のさらなる解明と臨床繁殖学分野での応用が期待される。

よって審査員一同は、森（加藤）ゆうこ が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。