The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	妊娠各時期におけるヒト胎盤ならびに単離絨毛細胞のEpidrmal Grow-th Factor受容体およびそのmRNAの変動
Author(s)	陳, 祝芳
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36550
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【106】

氏名・(本籍)	陳(ちん)　祝(しゅく)　芳(ほう)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　8452　号
学位授与の日付	平成元年2月9日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**妊娠各時期におけるヒト胎盤ならびに単離絨毛細胞の Epidrmal Growth Factor 受容体およびその mRNAの変動**
論文審査委員	(主査) 教　授　谷澤　修 (副査) 教　授　松本　圭史　　教　授　坂本　幸哉

論文内容の要旨

〔目　的〕

胎児－胎盤系の発育において Epidermal Growth Factor（EGF）をはじめとする成長因子の役割が注目されている。ヒト胎盤にはEGF受容体（EGFR）が豊富に存在することは良く知られており，妊娠各時期におけるEGFRの変動についても以前より多くの研究がなされてきたが，一致した見解は未だ得られていない。

本研究では，マウスEGFではなく初めてヒトEGFを用いてEGF結合能を測定し，同時にEGFRのmRNAをも測定して胎盤中のEGFRの変動を観察した。また，EGFRが主に絨毛細胞に存在するとの報告に基づいて，胎盤組織より絨毛細胞を単離し，この単離絨毛細胞におけるEGFの結合能の測定を初めて行い，これらの結果を比較検討した。

〔方　法〕

妊娠初期（7週～11週），中期（20週～23週）の中絶手術時と満期（37週～41週）分娩時に得られた胎盤を用いて，以下の実験を行った。

①胎盤EGFの結合能測定－各時期の胎盤組織3 gを細切したのち0.25 Msucrose，25 mM Tris－HCl buffer，pH7.4でホモゲナイズし，differential centrifugation により膜分画を調整した。4 μ gの膜分画と非標識hEGFを24℃，30分でインキュベーションしたのち ^{125}I－hEGFを加え，さらに2時間のインキュベートを行った。反応後の溶液を pore size 1.2 μm の filter を通じて vacuum filtration したのちPBSにて2回洗浄し，filter 上に残された放射活性を測定し，結合能測定を行った。

②ＥＧＦＲ mＲＮＡの測定－ＥＧＦＲの測定に用いたものと同一検体を用いて，Guanidium／Hot phenol 法により総細胞ＲＮＡを抽出した。調整されたＲＮＡを nitrocellulose 膜上に dot blotting または agarose gel 上で電気泳動したのちに Northern transfer を行い，blotting した膜で hybridization し autoradiography を行った。Hybridization 時の probe としてはＥＧＦＲの cDＮＡである pE 7 及び癌遺伝子産物がＥＧＦＲの細胞質内 domain とほぼ同一であるｖ－erb－Ｂを用いた。Autoradiogram を densitometry することによりｍＲＮＡ量を定量した。

③単離絨毛細胞のＥＧＦ結合能測定－胎盤組織を Ca^{2+}，Mg^{2+}－free の0.02％ＥＤＴＡ液中で細切し，37℃，20分間インキュベート後，ピペッティングで細胞を分離し，滅菌金属メッシュで濾過したのち２％ＦＣＳを含むＰＢＳで洗浄し，Ficoll density gradient centrifugation により中層に存在する単離絨毛細胞を得た。絨毛細胞膜分画の調整およびＥＧＦＲの測定方法は①と同様に行った。

〔成　　績〕

①ＥＧＦ結合能測定時のインキュベーション温度と時間を検討した結果，37℃，30分，24℃，２時間と４℃，６時間で結合は plateau に達した。従って，以下の実験では24℃，２時間のインキュベーションを行った。^{125}Ｉ－hＥＧＦの特異的結合は膜分画の蛋白量（0.5－10μｇ）に比例して増加が認められたため，膜分画の蛋白量は４μｇに調整した。Scatchard plot は妊娠初期，中期，満期のいずれの時期の胎盤でも curvilinear なパターンを示し，異なる親和性をもつ二種の結合部位が存在することが示唆された。高親和性結合部位の解離定数（Kd）の平均は初期1.30×10^{-10}M，中期1.40×10^{-10}M，満期1.51×10^{-10}Mであり，妊娠時期による有意な変動を示さなかったが，最大結合部位数（Bmax）は初期0.72pmole／mg protein，中期1.02pmole／mg protein，満期1.89pmole／mg protein であり，初期に比べて中期では1.5倍，満期では2.5倍に有意に増加した。低親和性結合部位についても Kd は変化せず，Bmax は妊娠の進行とともに増加した。

②妊娠初期，中期，満期胎盤のＲＮＡを dot blotting し，pE 7 およびｖ－erb－Ｂで hybridize した autoradiography と densitometry の結果，初期に比べ中期で約2.5倍，満期では約３倍にｍＲＮＡの増加を認めた。Northern blotting の結果では妊娠中いずれの時期でもpE 7 と hybridize するｍＲＮＡは10kbp と5.6kbp の２種類であり，今までの報告からＥＧＦＲのｍＲＭＡであると思われた。

③単離絨毛細胞のＥＧＦＲの Scatchard plot は初期，満期ともに全胎盤組織を用いた場合と同様の curvilinear なパターンを示し，二種の結合部位を認めた。高親和性結合部位の Kd の平均は初期1.44×10^{-10}M，満期1.91×10^{-10}Mであり両者間に有意差は見られなかったが，Bmax は初期0.82pmole／mg protein，満期1.71pmole／mg protein，であり，初期と比べて満期では約２倍の結合部位数となった。低親和性結合部位についても Kd は変化せず，Bmax は約２倍に増加した。

〔総　　括〕

ヒト単離絨毛細胞と全胎盤を用いた本研究において，ＥＧＦＲは妊娠の進行とともに増加することを初めて明らかにした。更に妊娠の進行に伴うＥＧＦＲ mＲＭＡの増加の事実は胎盤中ＥＧＦＲの結合部位数の増加をうらづけた。この事実はＥＧＦが胎児－胎盤系の発育・維持に何らかの生理的意義を持つ可能性を示唆するものと思われる。

論文の審査結果の要旨

これまで妊娠各時期による胎盤中のＥＧＦ受容体の変動については一定の見解を得ていなかったが，今回ＥＧＦ受容体の結合測定のリガンドをマウスＥＧＦでなくはじめてヒトＥＧＦを用いて行った研究の結果，ＥＧＦ受容体は妊娠の進行に伴い増加することを明らかにした。また，分子生物学的手技を応用してＥＧＦ受容体ｍＲＮＡの変動を検討し，結合能測定の結果をうらづける結論を得た。

さらに本研究では単離絨毛細胞を作成し，妊娠時期が進むにつれて，そのＥＧＦ受容体も増加することをはじめて明らかにしたのであり，学位論文に値するものと考える。