



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Epidrml 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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36550">https://hdl.handle.net/11094/36550</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

氏名・（本籍）	陳	祝	芳
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	8 4 5 2	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 Epidermal 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 M sucrose, 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 でホモゲナイズし、differential centrifugation により膜分画を調整した。4  $\mu$ 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  $\mu$ m 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 pE7 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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -free の0.02% EDTA 液中で細切し、37°C, 20分間インキュベート後、ピペ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°C, 30分, 24°C, 2時間と4°C, 6時間で結合は plateau に達した。従って、以下の実験では24°C, 2時間のインキュベーションを行った。 $^{125}\text{I}$ -hEGFの特異的結合は膜分画の蛋白量 ( $0.5\text{--}10\mu\text{g}$ ) に比例して増加が認められたため、膜分画の蛋白量は  $4\mu\text{g}$  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 ( $K_d$ ) の平均は初期  $1.30 \times 10^{-10}\text{M}$ , 中期  $1.40 \times 10^{-10}\text{M}$ , 満期  $1.51 \times 10^{-10}\text{M}$  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 ( $B_{\text{max}}$ ) は初期  $0.72\text{pmole}/\text{mg protein}$ , 中期  $1.02\text{pmole}/\text{mg protein}$ , 満期  $1.89\text{pmole}/\text{mg protein}$  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  $K_d$  は変化せず、 $B_{\text{max}}$  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、pE7 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 pE7 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 mRNA 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  $K_d$  の平均は初期  $1.44 \times 10^{-10}\text{M}$ , 満期  $1.91 \times 10^{-10}\text{M}$  であり両者間に有意差は見られなかったが、 $B_{\text{max}}$  は初期  $0.82\text{pmole}/\text{mg protein}$ , 満期  $1.71\text{pmole}/\text{mg protein}$ , 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  $K_d$  は変化せず、 $B_{\text{max}}$  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 mRNA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する。