Osaka University Knowledge Archive

Title	Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Epidermal Growrh Factor (EGF), Transforming Growth Factor-α (TGF α), and EGF Receptor in Human Amnion Cells : Possible Role of TGF α in Prostaglandin E2 Synthesis and Cell Proliferation
Author(s)	田原, 正浩
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39452
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 20 】

氏　　名	田原正浩（たはら まさひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第　12000　号
学位授与年月日	平成7年5月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor－α (TGF α), and EGF Receptor in Human Amnion Cells : Possible Role of TGF α in Prostaglandin E_2 Synthesis and Cell Proliferation （ヒト羊膜細胞におけるEGF, TGF αおよびEGFレセプターmRNAの発現：プロスタグランディンE_2産生および細胞増殖におけるTGF αの役割）
論文審査委員	（主査） 教授 遠山 正彌 （副査） 教授 松沢 佑次　教授 青笹 克之

論文内容の要旨

【目　的】

羊膜は外胚葉性の胎児組織で，解剖学的にも機能的にも妊娠の維持及び陣痛発来の起序に重要な働きをしていることが知られている。羊膜細胞の特質として，子宮頚管の成熟や子宮筋の収縮作用のあるPGE_2産生能を有していること，その培養細胞は増殖性が強く，無血清条件下においても増殖性を有していることがあげられる。また，EGF／TGF αにより，PGE_2産生は促進され，その増殖性もEGFで著明に促進されることが報告されている。われわれはEGFによる羊膜細胞の増殖の細胞内機構について検討した結果，EGFが細胞内Ca^{2+}上昇を引き起こすこと，さらにPGE_2の産生は細胞内Ca^{2+}上昇に依存しており，これら細胞内Ca^{2+}上昇，PGE_2産生が細胞増殖に作用していることを明らかにした。しかし，TGF αによるPG産生の細胞内メカニズムや細胞増殖に対する作用は未だ明らかにされていない。また，羊膜は無血管組織であるので，in vivo でEGF／TGF αが作用しているとすれば近隣の脱落膜，絨毛膜，羊水などから供給されている可能性が考えられ，脱落膜，羊水にはEGF／TGF αが存在していることが示されているが，羊膜細胞自体にEGF／TGF αの産生能があるかどうかの報告はない。

そこで，今回の羊膜細胞におけるTGF αの作用を明らかにするため，TGF αの羊膜細胞に対する生物学的な作用について検討し，さらに，リガンドとしてのEGF，TGF α，そしてEGF－Rの発現を蛋白およびMRNAレベルで検討した。

【方法ならびに成績】

羊膜を分娩後の胎盤より用手的に採取し，酵素処理によって回収した羊膜細胞を実験に使用した。TGF α（5ng／ml）添加による羊膜細胞の細胞内Ca^{2+}濃度の変化を蛍光色素（indo－1－AM）によりみたところ，TGF αにより細胞内Ca^{2+}濃度が上昇したが，このCa^{2+}上昇は，Caチャンネルブロッカーであるコバルト2.5mM，Caキレート剤であるEGTA5mMで細胞を前処理することにより抑制された。つまり，TGF αは，羊膜細胞内のCa^{2+}濃度を上昇させ，そのCa^{2+}上昇は，おもに細胞外からのCa^{2+}流入によると考えられた。つぎに，TGF αによるPGE_2産生を検討した。TGF α存在下に24時間培養したmedium中のPGE_2をEIAによって測定したところ，TGF αによるPGE_2産生は濃度依存的

に促進されたが，これはコバル2.5mM，EGTA5mMで抑制され，またシクロオキシゲナーゼインヒビターであるインドメタシン10 μMでも抑制された。さらに，TGF αの羊膜細胞増殖に対する作用は，細胞周期の変化を解析することで検討した。無血清下に72時間単層培養したのち，TGF α（5ng／ml）存在下に24 間培養した細胞のDNAをPI（propidium iodide）で染色し，Flow cytometory にて解析したところ，TGF αにより，S期の細胞数は増加しており，TGF αが増殖促進に働くことが示唆された。TGF αと同時にインドメタシン10 μMを添加した場合では，G_1期の割合が増加し，逆にS期およびG_2M期の割合が減少していることが認められ，PGE_2産生を抑制するインドメタシンがTGF αによる増殖作用を抑制していることが示された。これらのことより，TGF αもEGF同様に羊膜細胞に対し生物学的な作用を持つことが推測された。

さらに，羊膜細胞におけるEGF，TGF α，そしてEGF－Rの発現を蛋白およびmRNAレベルで検討した。まず免疫細胞化学（間接蛍光抗体法）により染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ，抗EGF－R抗体により細胞膜表面に蛍光を認めた。また同様に，抗EGF抗体，抗TGF α抗体により染色した結果，核をのぞく細胞内にEGFおよびTGF αの存在が確認された。さらにこの細胞内の蛍光像が，レセプターとともに細胞内に取り込まれたものでなく，羊膜細胞自身の産生によるものであることを確認するために，細胞内のmRNAの存在の有無を検討した。羊膜細胞を単層培養したのち，回収した細胞よりCsCl法でRNAを採取し，RTによりcDNAとしたのち，EGF，TGF α，EGF－Rそれぞれに特異的なprimerによりPCRをおこない，アガロースゲル上でEtBr染色したところ，EGF，TGF α，EGF－RmRNA の存在が確認された。

【総　括】

羊膜細胞におけるEGF，TGF αの産生と，そのレセプターの発現という結果より，これらの増殖因子が羊膜細胞自身の EGF－R を介してオートクライン／パラクライン的にPGE_2産生および細胞増殖促進に作用していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本申請者は，TGF αによる羊膜細胞の増殖の細胞内機構について検討し，TGF αが羊膜細胞の細胞内Ca^{2+}上昇，PGE_2産生を引き起こすこと，さらにこれらを介して細胞増殖に作用していることを明らかにした。また，羊膜細胞自身にEGF，TGF α，そしてEGFレセプターが発現していることを免疫染色およびmRNAレベルで確認した。このことより，これらの増殖因子が羊膜細胞自身のEGFレセプターを介してオートクライン／パラクライン機構で，PGE_2産生および細胞増殖促進に作用している可能性を示した。

本研究の結果は，羊膜細胞の機能を明らかにするだけでなく，羊膜絨毛膜炎などの周産期感染に対する生体の防御機構のメカニズムを明らかにしていくうえで重要な知見であり，学位の授与に値すると考えられる。