The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Involvement of epidermal growth factor (EGF) /EGF receptor autocrine and paracrine mechanism in human trophoblast cells : functional differentiation in vitro |
| Author(s) | 雨宮, 京夏 |
| Citation | 大阪大学, 1995, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39597 |
| 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

【 75 】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 雨宮京夏（あめみやきょうか） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学位記番号 | 第　12199　号 |
| 学位授与年月日 | 平成7年12月28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 | Involvement of epidermal growth factor (EGF) ／EGF receptor autocrine and paracrine mechanism in human trophoblast cells : functional differentiation in vitro<br>（ヒトトロホブラストの機能的分化における，上皮成長因子のオートクリン・パラクリン機構の意義について） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授　米田　悦啓<br>（副査）<br>教授　青笹　克之　　教授　遠山　正彌 |

## 論文内容の要旨

【目　的】

マウスでは上皮成長因子（EGF）は妊娠の維持のために重要な役割を担っている。ヒトにおいても胎盤にはEGF receptor（EGFR）が非常に豊富であり，妊娠の経過とともにその発現量が増加する。このことはヒトの胎盤機能や胎児発育にEGF が関与していることを示唆している。EGFRのヒト胎盤における産生および発現部位についてはよく知られている。すなわちEGFRは分化したトロホブラスト（trophoblast cell）である多核の合胞体細胞（syncytiotrophoblast cell）に主に存在する。一方，EGF のヒト胎盤での局所的な発現および作用は示唆されてはいるが，その産生部位および作用機構は明らかではない。今回，単離したtrophoblast cellを培養，分化させ，この分化の各段階でEGF およびEGFRの産生，発現を観察した。また，トロホブラストの機能的分化におけるEGF／EGFRオートクリン・パラクリン機構の生物学的意義を検討した。

【方法ならびに成績】

ヒト初期胎盤（6－9週）を，トリプシン，DNase で処理した後，重層のパーコールを用いて，栄養膜細胞（cytotrophoblast cell）を単離した。単離したcytotrophoblast cellは10％牛胎仔血清を含むDMEM培養液中で形態的に分化する。すなわち培養開始時の0日目には単核のcytotrophoblast cellであったのが，培養1日目には数個から十数個の細胞が融合した多核のsyncytiotrophoblast cellとなり，培養3，5日目と時間が経過するにつれてさらに融合がすすみ，数十個の核を持つ巨大なsyncytiotrophoblast cellとなる。同時に機能的にも分化してhCG－βとhPLを分泌する。

この培養系において分化の各時期のトロホブラストにおけるEGF とEGFRの蛋白およびmRNAの発現を検討するために，免疫組織化学染色およびReverse Transcription and Polymerase Chain Reaction（RT－PCR）を行った。

1）免疫組織化学染色では，抗EGF 抗体，抗EGFR抗体により，培養0，1，3，5 日目のいずれの分化の段階のトロホ

ブラストにも特異的な染色が観察された。5日間の培養中トロホブラストの形態的な分化にともなって，抗EGFR抗体による染色強度が増加した。一方，EGF の染色強度は分化の段階による変動を認めなかった。

2) 次に，培養0，1，3，5 日目の細胞からpoly（A)$^+$ RNA を抽出し，RT－PCR法でEGF とEGFRのmRNA発現について検討した。poly（A)$^+$ RNA を逆転写（RT）の後EGF とEGFRそれぞれに特異的なprimerを用いて増幅したところ，培養0，1，3，5 日目いずれの細胞にもEGF とEGFRのmRNAが発現していた。β－actinを内部標準としてEGFR mRNA 量を半定量したところ，培養0日目に比較し，培養3日目には4－6倍，培養5日目には8－10倍と，トロホブラストの分化にともなうEGFR mRNA 量の増加が観察された。この結果は，EGFRが，主に分化したsyncytiotrophoblast cellに局在するとの諸家の報告と一致するものであった。また我々の免疫組織化学染色の結果，すなわち分化とともにEGFRの染色強度が増すこととともよく一致した。

3) hCG－β，hPL の分泌はトロホブラストの機能的分化を反映する。この機能的分化におけるEGF の役割を検討し，さらにそのオートクリン・パラクリン機構の意義を知るために，培養液中にEGF（1，10，100 ng／ml），又は抗EGF モノクロール抗体（0.5，5 μg／ml）を添加して8日間培養し，培養液中に分泌されるhCG－β，hPL 量の変動を検討して分化の促進および抑制実験を行った。hCG－βは10ng／ml 以上のEGF の添加で培養4，5，7 日目に有意な分泌促進効果がみられた。また抗EGF モノクロール抗体の添加によってhCG－β分泌量の有意な抑制効果がみられた。一方hPL の分泌はEGF の添加による有意な促進効果はみられなかったが，抗EGF モノクロール抗体（5 μg／ml）で有意に抑制効果がみられた。

【総　括】

以上の成績より，EGF，EGFRの蛋白およびmRNAは，トロホブラストの分化のすべての時期で発現していることが確認された。またEGF は，トロホブラスト局所のオートクン・パラクリン因子として，その機能的分化に重要な役割を担っていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ヒト胎盤にEGF receptorが豊富に産生され発現していることはよく知られているが，EGF の由来については不明であった。本研究の結果，ヒトトロホブラストにおいてEGF，EGF receptorが産生されていることが確認され，トロホブラストでのEGF／EGF receptorオートクリン・パラクリン機構の存在が示された。また，このオートクリン・パラクリン機構がトロホブラストの機能的分化に重要な役割を担っていることが示唆された。

よってこの研究は，学位に値するものと考える。