



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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	あめ 雨 宮 京 夏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 1 9 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 2 月 2 8 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 (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) 教 授 米田 悦啓 (副査) 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いないが, 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モノクローナル抗体 (0.5, 5 μ g/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モノクローナ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モノクローナル抗体 (5 μ g/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リン・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する。