

Title	Na ⁺ /H ⁺ exchanger-3 is involved in mouse blastocyst formation
Author(s)	川岸, 里香子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45445
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	川 岸 里 香 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 8 9 7 3 号
学位授与年月日	平成 16 年 7 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御外科学専攻
学位論文名	Na ⁺ /H ⁺ exchanger-3 is involved in mouse blastocyst formation (ナトリウムイオン、水素イオン交換体-3 はマウスの胚盤胞形成に必要な である)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二 (副査) 教授 内山 安男 教授 高井 義美

論 文 内 容 の 要 旨

【 目的 】

哺乳類の胚盤胞は、将来胎盤をつくる外側の栄養外胚葉層：trophectderm と、将来胎児をつくる内部細胞塊：inner cell mass、およびそれらに囲まれ、液性成分に満たされた腔である胚胞腔：blastocoel の 3 つから構成されている。胚が子宮内膜へ浸潤・着床する能力を得るためには、この胚盤胞を形成することが非常に重要な課程の一つであると考えられる。しかし、胚盤胞形成を制御し維持する分子レベルでの機構はよくわかっていない。

blastocoel 形成のためには trophectderm におけるイオンや水の輸送が重要であることがわかっている。trophectderm には様々なイオン輸送体が存在することがわかっているが、Na⁺/H⁺ exchanger はナトリウムイオンを blastocoel 内に流入させ胚盤胞の細胞骨格を維持する働きをもつと考えられている。マウス胚においては Na⁺/H⁺ exchanger のサブタイプ 1 および 3 の発現が確認されているが、本研究では両蛋白の選択的阻害剤を用い、これらのイオン輸送体の生理的役割について検討した。

【 方法 】

- ① 胚発育における Na⁺/H⁺ exchanger の役割を検討するため、過排卵誘発したマウスの卵管より採取した 2 cell 280 個を Na⁺/H⁺ exchanger-1 の選択的阻害剤である cariporide と Na⁺/H⁺ exchanger-3 の選択的阻害剤である S-3226 の存在下で培養し、倒立顕微鏡下で観察した。
- ② 特に胚盤胞形成時における Na⁺/H⁺ exchanger の役割を検討するため、過排卵誘発したマウスの子宮腔内より採取した桑実胚 256 個を cariporide と S-3226 の存在下で培養し、胚盤胞形成の様子を倒立顕微鏡下で観察した。
- ③ blastocoel 形成時における Na⁺/H⁺ exchanger の役割を検討するため、cytochalasin D によって胚胞腔を虚脱させた胚盤胞を cariporide 及び S-3226 の存在下で培養し、blastocoel 再構築の様子を倒立顕微鏡下で観察した。
- ④ マウス胚盤胞を免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察して、Na⁺/H⁺ exchanger-3 の局在を確認した。

【 成績 】

- ① 2 cell 胚を cariporide 50 μM の medium 中で培養したところ 85%以上が桑実胚まで、77%が胚盤胞まで発育した。一方、S-3226 5 μM の下で 80%以上が桑実胚まで発育するが、胚盤胞まで発育したものは 28%で、桑実胚

から胚盤胞への過程が有意に阻害されていた。

- ② cariporide $50\mu\text{M}$ の medium 中で培養しても桑実胚は大部分が胚盤胞まで発育したが、S-3226 $5\mu\text{M}$ 以上の medium 中で培養した桑実胚はほとんど胚盤胞を形成しなかった。この胚を再び S-3226 非存在下で培養したところ 60–70%が胚盤胞を形成した。
- ③ cytochalasin D によって虚脱した胚盤胞を cariporide $50\mu\text{M}$ で培養すると blastocele は形成されたが、S-3226 $5\mu\text{M}$ で培養しても胚腔は再構築されなかった。再構築された blastocele の直径と虚脱させる以前の blastocele の直径には差は認められなかった。
- ④ Na^+/H^+ exchanger-3 のシグナルは trophectoderm の apical 側および inner cell mass の細胞膜周囲に認められた。

【 総括 】

胚盤胞の形成・維持のためには trophectoderm においての様々なイオンや水の輸送が必要であり、イオン輸送体が非常に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では Na^+/H^+ exchanger-3 が機能しなくても胚は桑実胚まで発育できるが、胚腔形成は阻害され、またこの阻害作用は可逆的であることがわかった。さらに、 Na^+/H^+ exchanger-3 が機能しないと虚脱させた blastocele の再構築も不可能となることから、 Na^+/H^+ exchanger-3 は胚発育の特に blastocele 形成・維持に不可欠であることが示唆された。

一方、同じナトリウムイオン輸送に働く Na^+/H^+ exchanger-1 は trophectoderm の vasolateral 側に局在することがわかっているが、その機能を阻害しても 2 cell 以降胚盤胞形成までの発育に大きな影響を与えず、胚発育に不可欠なイオン輸送体ではないと考えられた。

マウスの初期の胚発育においては、 Na^+/H^+ exchanger のサブタイプ 3 が特に胚盤胞形成に重要な役割を果たしていることが示唆され、不妊治療の新たなターゲットの一つとなると考えられた。

論文審査の結果の要旨

近年、生殖技術は大きく発展している。にもかかわらず、原因不明の不妊症患者数は著減していない。本研究はマウス胚発育の際の特に胚盤胞形成に主眼をおき、そこに関わる分子機構の解析を試みたものである。胚盤胞の形成には trophectoderm におけるイオンや水の輸送が重要であることがわかっているが、イオン輸送を担う Na^+/H^+ exchanger のサブタイプ 1、3 の関与について検討するため、それぞれの選択的阻害剤曝露下でマウス胚を培養し、また免疫蛍光染色の手技を用いて分子生物学的考察を行ったものである。

その結果、 Na^+/H^+ exchanger のサブタイプ 3 が trophectoderm の apical に局在し、胚発育の特に胚盤胞形成に重要な役割を果たしているという新発見が得られ、また、 Na^+/H^+ exchanger-3 を Rho/Rho-kinase 系が制御している可能性も示唆された。

この報告は単に胚発育の分子機構の解明に寄与するのみならず、将来の不妊症治療への応用が期待される独創的かつ意義深いものであり、学位の授与に値するものと考えられる。