OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Impaired Fertility in Female Mice Lacking Urinary Trypsin Inhibitor
Author(s)	佐藤, 博行
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47421
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

氏名	佐藤博行（さとうひろゆき）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　２０５８４　号
学位授与年月日	平成 18 年 4 月 24 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	Impaired Fertility in Female Mice Lacking Urinary Trypsin Inhibitor （尿由来トリプシンインヒビター欠損雌性マウスにおける生殖機能の障害）
論文審査委員	（主査） 教授　宮崎　純一 （副査） 教授　米田　悦啓　　教授　仲野　　徹

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

尿由来トリプシンインヒビター分子の生体内における機能を解明する。

〔　方法ならびに成績　〕

尿由来トリプシンインヒビター（Urinary Trypsin Inhibitor：UTI）機能欠損マウス（Knock Out mouse：KO マウス）を作製し、表現型を解析した。

⑴　機能欠損動物の作製

UTI ゲノム DNA エクソン１から６まではα１ミクログロブリンをコードし、エクソン７から 10 までが UTI をコードする。α１ミクログロブリンと UTI は一つの融合蛋白質として翻訳された後にプロテアーゼにより切断され別々の蛋白質として機能する。

今回 UTI は欠損し、α-1 ミクログロブリンは発現する事を前提としたターゲティングコンストラクトを設計し、129/Ola 系マウス由来の胚性幹細胞 E14TG2A 株に遺伝子導入を行い相同組換体を得て、UTI-KO マウスを得た。

なお、UTI は血液中に分泌される際に重鎖と結合しインターαトリプシンインヒビター（：IαTI）、或いはプレαトリプシンインヒビター（：PαI）の形をとる。このため、血漿をサンプルとし抗 UTI 抗体を用いたウエスタンブロットでは、通常 IαTI、PαI が認識され、UTI 単独では検出されない。作製した UTI-KO マウス血漿をサンプルとし抗 UTI 抗体で実施したウエスタンブロットでは、約 200 kDa の IαTI 及び約 120 kDa の PαI は検出されなかった。

⑵ UTI-KO マウスの表現形解析

ヘテロマウス同士の交配からワイルド、ヘテロ、ホモがほぼ１：２：１の比で得られたことより、UTI の欠損自体は致死ではなかった。また、SPF 環境下でホモマウスの外観、成長、寿命、行動も特に異常は認められず、組織学的、血液学的、血液生化学的にも顕著な変化は認められなかった。

しかし UTI-KO ホモ雌マウスの交配の結果、その生殖能力に異常が確認された。UTI-KO ホモ雌マウスは、交配相手のオスの遺伝子型に関わらず殆ど妊娠せず、まれに妊娠してもその同腹仔は非常に少なかった。一方、UTI-KO ホモ雄マウスは、交配相手の遺伝子型に関わらず正常に仔を得る事ができた。

このためホモ雌マウスの生殖機能を精査した。ホモ雌マウスの膣開口時期及び性周期に異常は認められなかったが、交尾後の回収卵数は非常に少なく、その卵の形態も異常なものが多かった。

次に、着床、妊娠維持での異常の有無を確認する目的で野生型マウスの受精卵をホモ雌マウスの子宮内に移植したが、これにより仔を得る事が出来た。

これらの事実より不妊の主原因は卵形成・卵成熟・受精の段階までにあり、着床・妊娠の維持・出産の段階にはない事が強く示唆された。

また一方、これがUTI遺伝子の無い卵巣の機能不全によるのか血液中のUTI関連蛋白質（UTI、IαTI、PαI）の欠損によるのかを確認する目的で、野生型マウスの卵巣とUTI-KOマウスの卵巣を相互に移植した。その結果KOマウスの卵巣は野生型マウス中で機能し、その卵巣由来の仔が確認されたのに対し、野生型マウスの卵巣はKOマウス中で機能せず、その卵巣由来の仔は確認されなかった。

次に、過排卵処理したKOマウスの卵巣組織像を観察した。hCG処理後6時間のKOマウス卵巣では、変性した卵子を含む卵胞が多く、卵の周囲への卵丘細胞の集合状態が異常であった。またhCG処理後20時間では、野生型マウス卵巣では排卵が行われ成熟卵胞は殆ど残っていなかったが、UTI-KOマウスでは排卵されずに閉鎖に向かう過程が多く観察された。

〔　総　　括　〕

上記実験結果よりUTI-KOマウスの生殖機能障害の機序を考察した。

hCG処理後排卵に至る過程で以下の事実が知られている。①卵成熟の過程でIαTIとヒアルロン酸とリンクプロテインが卵周囲に3量体として集積し卵丘膨張をおこす②これらの構成成分の内、ヒアルロン酸とリンクプロテインは卵丘細胞から産生されるが、IαTIは血液中から供給される

今回KOマウスを用いて以下の事実が明らかになった。

③UTI-KOマウスではこの卵丘膨張及び排卵が阻害されている④卵巣移植実験で、血液中にIαTIが存在する環境ではUTI-KOマウス卵巣は正常に機能する

これらの事実から、UTI分子は生殖において卵成熟の最終段階で卵丘膨張に必須であり卵の機能維持および排卵に重要な役割を果たしていることが判明した。

なお、過排卵処理したUTI-KOマウス卵巣の組織では、卵丘膨張に異常のある卵が多い一方で、それらが排卵される像は少ない。これが異常卵を排卵させない機構が卵巣に存在しているためか、UTI-KOマウスには排卵機構にも異常が存在するためなのかは不明である。

今回UTIが少なくとも生殖において重要な機能を果たしていることが明らかとなったが、UTIの他の生理機能については今後引き続き解明していく予定である。

論文審査の結果の要旨

本論文はUTI-KOマウス作出により、プロテアーゼインヒビターであるUTIの欠損が雌にのみ著しい生殖機能障害を引き起こす知見を示し、引き続きその原因を解明するために主に以下の解析、①UTI-KOマウスへの正常受精卵移植実験、②正常マウスと相互に卵巣移植実験③性腺刺激ホルモン投与前後の卵巣の組織学的変化の観察、などを*in vivo*で検討したものである。

その結果①正常受精卵はUTI-KOマウス体内で発生した。②UTI-KOマウス卵巣は正常マウス体内で機能し由来仔を得たが、正常マウス卵巣はUTI-KOマウス体内で機能せず由来仔を得られなかった。③UTI-KOマウス卵巣ではhCG処理後、透明帯に異常を有し正常に成熟しない卵が多く、それらの排卵も阻害された。などの結果が得られた。

これまで、UTIが妊娠に関与するとの知見は得られていたが、UTIまたはUTIを構成成分とするInter α Trypsin Inhibitor（ITI）は卵成熟の最終過程で卵巣外より供給され受精能を有する正常な卵の形成に必須である事を明らかにし、UTIが生殖に本質的に重要な役割を果たしている事を明らかにしたものであり学位に値するものと認める。