

京都大学	博士 (医学)	氏名	朴 由美 (高尾 由美)
論文題目	Monoamine oxidase A is highly expressed by the human corpus luteum of pregnancy (モノアミンオキシダーゼ A はヒト妊娠黄体に強く発現する)		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒトの黄体は排卵後の卵胞から形成され黄体ホルモンを産生し子宮内膜を胚着床に適した状態へと分化させる。月経周期における黄体機能は黄体形成ホルモン(LH)で制御されているが、その機能は約2週間で終了し、月経が発来する。一方、妊娠が成立するとLHとレセプターを共有するヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)が胚の絨毛組織から大量に分泌され妊娠黄体として機能が維持される。このように妊娠黄体は、胎盤が十分機能する妊娠7~9週までの妊娠初期において胚の着床を維持する不可欠の臓器となるが、外因性にhCGを投与し続けても黄体機能は維持されない。そのため黄体機能維持におけるLH/hCGレセプターシステム以外の機構の存在が示唆されてきたが詳細は不明であった。そこで本研究では新しい妊娠黄体制御機構を明らかにする目的でヒト妊娠黄体に対する単クローン抗体を作成し、妊娠黄体に発現する分子を同定することとした。</p> <p>生殖可能年齢の女性の手術症例33例から患者同意のもとに卵巣組織を採取した。4~5mmの発育卵胞3例、18~20mmの排卵前卵胞3例、排卵後2日目から5日目の月経周期の初期黄体7例、排卵後6日目から10日目の中期黄体6例、排卵後11日目から14日目の末期黄体3例、妊娠6~15週妊娠黄体11例である。妊娠15週黄体を抗原として8週齢のBALB/Cマウスの腹腔内に免疫した後、脾臓細胞を摘出して、X63Ag8.653骨髄細胞腫細胞と細胞融合させ単クローン抗体産生細胞を作成した。月経周期の中期黄体と妊娠15週黄体の凍結切片と免疫組織化学染色を用いて、妊娠黄体に多く発現する分子(HCL-4抗原)と反応する単クローン抗体産生細胞(HCL-4抗体)を選択した。HCL-4抗体を用いてヒト卵巣組織の卵胞期、黄体期、妊娠初期の黄体におけるHCL-4抗原の発現を免疫組織化学染色で検索した。大黄体細胞に特異的に反応するHCL-1抗体、ステロイドホルモン産生細胞に存在する3β hydroxysteroid dehydrogenase (3β - HSD)、血管内皮細胞で産生される von Willebrand 因子を併用し二重染色を行った。HCL-4抗体の精製を行った後、アフィニティークロマトグラフィ法を用いてHCL-4抗原を精製し、SDS-PAGEにて月経周期黄体より妊娠黄体に発現の強い61kDの蛋白をHCL-4抗原と同定した。ヒト胎盤よりHCL-4抗原を大量精製して、プロテアーゼ処理後の分解蛋白の部分アミノ酸配列を解析した。月経周期黄体と妊娠黄体でのHCL-4抗原の蛋白量をウェスタンブロット法により、HCL-4抗原のmRNAの発現をノザンブロット法により解析した。</p> <p>HCL-4抗原の部分アミノ酸配列を解析した結果、HCL-4抗原がモノアミンオキシダーゼ A (MAO-A EC1.4.3.4) のそれと一致した。HCL-4抗体を用いた免疫組織化学染色ではMAO-Aは妊娠黄体において大黄体細胞の細胞質内に強く発現し、小黄体細胞に中等度に発現していた。月経周期黄体においてMAO-Aは大黄体細胞に弱く発現するかまたは発現を認めず、小黄体細胞では発現を認めなかった。</p>			

免疫組織化学染色の妊娠黄体における二重染色では、3β - HSDは大黄体細胞と小黄体細胞の細胞質に強く存在するが、HCL-1は大黄体細胞に強く発現するが、小黄体細胞には発現しなかった。von Willebrand 因子は黄体の血管内皮に発現するがMAO-Aは黄体の血管には発現しなかった。またウェスタンブロット法やノザンブロット法においても月経周期黄体より妊娠黄体でのMAO-Aの蛋白量やmRNAが多く発現していることが確認された。

本研究のよってMAO-Aがヒト妊娠黄体に発現していることが初めて明らかとなった。その機能は不明であるが、MAO-Aが中枢神経系や胎盤、肝臓や皮膚に広く発現し、カテコールアミンを代謝することを考慮すると、血管収縮を制御し妊娠黄体の血流の維持に自律神経系が関与している可能性が推察された。以上の知見は黄体機能維持の分子機構の解明さらには生殖医学の発展に寄与すると思われる。

(論文審査の結果の要旨)

ヒト妊娠黄体は胚の絨毛組織から大量に分泌されるヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)により、月経周期黄体から形成される。妊娠黄体は、胎盤が十分機能する妊娠7~9週までの妊娠初期において胚の着床を維持する不可欠の臓器となるが、妊娠黄体の誘導や胚の着床の維持などの妊娠初期の母体の急速な変化はhCGのみでは、説明できない。本研究は、新しい妊娠黄体制御機構を解明する目的で、ヒト妊娠黄体に対する単クローン抗体を作成し、妊娠黄体に発現する分子を同定することとした。この抗体で認識される抗原は分子量61kDの蛋白質であり、ヒト胎盤より精製した抗原蛋白の部分アミノ酸配列分析よりヒトモノアミンオキシダーゼA(MAO-A EC1.4.3.4)であることが判明した。月経周期黄体より妊娠黄体において、免疫組織化学染色、ウェスタンブロット法やノザンブロット法にてそれぞれ、MAO-Aの発現量、蛋白量やmRNAが多く発現していることが示された。

本研究のよってMAO-Aがヒト妊娠黄体に発現していることが明らかとなった。その機能は不明であるが、MAO-Aが中枢神経系や胎盤、肝臓や皮膚に広く発現し、カテコールアミンを代謝することを考慮すると、血管収縮を制御し妊娠黄体の血流の維持に自律神経系が関与している可能性が示唆された。

以上の研究はMAO-Aがヒト妊娠黄体に発現していることを示した初めての報告であり、ヒト黄体機能の分子機構の解明に貢献し、生殖生理学に寄与するところが多い。

従って、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお本学位授与申請者は平成21年1月26日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降