

氏 名	ふじ 藤 原 ひろし 浩
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1446 号
学位授与の日付	平 成 5 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ヒト卵巣細胞への膜結合性ペプチダーゼの発現に関する研究

(主 査)
論文調査委員 教 授 中 尾 一 和 教 授 塩 田 浩 平 教 授 森 崇 英

論 文 内 容 の 要 旨

卵胞の重要な構成細胞である卵巣顆粒膜及び莢膜細胞は、性成熟期の卵胞発育、排卵、および黄体形成に伴い周期的な増殖、分化を示し、主に性ステロイドホルモンを分泌する内分泌細胞である。最近これらの細胞の増殖や分化について、性腺刺激ホルモンによる内分泌系の制御以外に、性ステロイドホルモン、各種成長因子、及びその他のペプチドのパラクライン/オートクライン機構による卵巣内局所調節の存在が注目されている。当教室では、サイトカインによる局所調節の可能性を世界に先駆けて提示して以来免疫系の関与という視点よりこれらの機構を研究してきた。また分化機構を解明する新しい試みとして、卵巣細胞に特異的、または分化段階に特異的に発現する抗原を捉えるため、卵巣細胞に対するモノクローナル抗体を作成してきた。その過程で免疫系細胞の細胞表面分化マーカーである CD13 抗原/アミノペプチダーゼ N が卵胞の内莢膜細胞に特異的に発現することを見いだした。この発見をもとに以下の検討を行った。

開腹時に採取した卵巣組織より凍結切片を作成し、アセトン固定後、モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体組織染色にてアミノペプチダーゼ N (APN) の発現の時期と局在を検討した。また同時に酵素基質を用いた組織化学染色も施行し、酵素活性の局在も検討した。さらに、黄体組織を酵素処理して分離した生細胞を間接蛍光抗体染色して、細胞表面における APN の存在についても調べた。

免疫組織染色の結果、5～6層の顆粒膜細胞を有するごく初期の卵胞より、APN が内莢膜細胞に強く発現することが明らかとなった。その発現は卵胞発育の過程において維持され、排卵後も莢膜細胞由来と思われる、外側に位置する黄体化細胞に発現が持続した。排卵後5日目には大黄体細胞と小黄体細胞とが形態的に区別可能となるが、APN は小黄体細胞に強く発現していた。また組織化学染色にても、同様に内莢膜細胞及び小黄体細胞に酵素活性を認めた。更に黄体より得た生細胞の染色では、直径 20 μ m 前後の小黄体細胞の表面に APN の発現を認めた。

これらより、① APN は内莢膜細胞の分化抗原である。② APN は小黄体細胞の細胞表面マーカーである。③ APN の発現様式から、小黄体細胞は内莢膜細胞より分化したと考えられる。これらの3点が明らか

かとなった。また APN は細胞膜結合型であり、かつその活性部位を細胞外に有している特殊なペプチダーゼであることを考えると、APN が細胞外の生理活性ペプチドの濃度を調節することにより卵巣細胞の機能、分化を制御する重要な調節因子である可能性が示唆された。そこで、その他に知られている膜結合型のペプチダーゼであるニュートラルエンドペプチダーゼ (NEP) 及びジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) についても、卵巣内におけるその発現を APN と同様の方法で検討した。その結果、NEP の発現は認められなかったものの、DPPIV は黄体化の程度に伴い内茨膜細胞 (小黄体細胞) 及び顆粒膜細胞 (大黄体細胞) の表面に発現してくることが明らかとなった。このことより、何種類かの膜結合型のペプチダーゼが同時に卵巣細胞の機能、分化に携わっている可能性が示唆されたとともに、卵巣細胞が、膜結合型のペプチダーゼの生理的役割を検討する上で、重要な細胞機能及び分化のモデルであることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、卵巣細胞の分化抗原の検索を目的として、細胞膜結合性で、活性を細胞外に有するペプチダーゼのヒト卵巣における発現を、免疫組織学および組織化学的方法を用いて検討している。

アミノペプチダーゼ N は、初期卵胞の内茨膜細胞から茨膜黄体細胞に至るまで、またジペプチジルペプチダーゼ IV は、茨膜および顆粒膜細胞の黄体化とともに発現してくることが示された。更に酵素処理等によって得た遊離黄体細胞を用いて、両ペプチダーゼが、ともに細胞表面に存在することが確認でき、これらが、卵巣細胞の特異的な細胞表面分化抗原であることが明らかとなった。

以上の研究は、卵巣細胞の分化、機能に、細胞外ペプチド濃度を調節しうるペプチダーゼが深く関わっていることを新しく提唱しており、卵巣機能の局所調節機構の解明に貢献し、生殖内分泌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のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 5 年 7 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け合格と認められ、専門学識試問でも博士課程修了者と同等の学力を有すると認められている。