

京都大学	博士（医学）	氏 名	藤井 治子
論文題目	Eph-ephrin A system regulates murine blastocyst attachment and spreading. (Eph-ephrin A システムがマウス胚盤胞の接着と伸展を制御する)		
(論文内容の要旨)			
胚の着床過程において、胚盤胞の子宮内膜腔上皮細胞への接着は必須の現象であり、子宮腔内に到達したマウス胚盤胞は孵化（ハッチング）を終えた後、ほぼ等間隔を保った位置で接着を開始する。このように胚が適した時期に適した位置へと着床するためには、胚が接着を促進する機構のみならず、これを抑制する機序も重要と考えられるが、その詳細は未だ十分解明されていない。 Eph 分子はレセプター型チロシンキナーゼの一種で、ephrin 分子はそのリガンドである。ともに細胞膜表面に存在しており、細胞接着面でこれらの分子間結合が起こると、両方向性にシグナルを誘導し細胞同士を反発させる事が知られている。その特徴的な作用により、発生の過程で組織構築や血管形成、神経ガイダンスに深く関わっていることが報告されており、その機能はヒトとマウスで種を超えて保存されている。この細胞間反発力を誘導する Eph-ephrin シグナルが、胚着床の制御に関与するかどうかについて検討した。 方法は、まずマウス子宮内膜における EphA の発現とマウス胚における ephrinA の発現を、RT-PCR 法および免疫組織染色法により確認し、妊娠 1.5 日目から 5.5 日目において各々の発現および局在変化を検討した。次に、EphA-ephrinA シグナルがマウス胚の接着能に及ぼす作用を検討するため、リコンビナント EphA1 分子を固相化したディッシュにマウス胚盤胞を添加培養して、接着および接着後の伸展について観察した。 結果、マウス子宮内膜組織に EphA1-A8 の mRNA 発現を認めた。妊娠 1.5 日目から 5.5 日目のマウス子宮において免疫組織染色を行ったところ、EphA1, A2, A4 蛋白が子宮内膜上皮細胞に発現していた。EphA1 の発現は、妊娠 3.5 日目に比べ妊娠 5.5 日目になると胚着床部周囲の腔上皮細胞で減弱していた。EphA2 は腔上皮細胞より腺上皮細胞に強く、妊娠 5.5 日目の着床部では腔上皮細胞よりもむしろ脱落膜細胞に強く発現し、妊娠の時期により発現に変化が生じることがわかった。 マウス胚における RT-PCR では、ephrinA1-5 の mRNA 発現を認めた。妊娠 3.5 日目から 5.5 日目の胚で比較したところ、アポジションの時期に相当する妊娠 4.0 日目周辺で ephrinA1-4 の mRNA 発現が減弱するという結果を得た。免疫染色ではマウス胚盤胞表面の絨毛細胞層に ephrinA1, 3 の蛋白発現を認め、特に ephrinA3 は妊娠 4.5 日目から 5.5 日目に接着部位での発現が局所的に減弱していた。 接着・伸展能解析では、接着と伸展の程度を培養 18 時間後と 42 時間後で評価したところ、胚の接着は EphA1 存在下 18 時間では抑制されるが、42 時間後には EphA1 存在下でも胚の接着が可能となることが観察された。また、EphA1 存在下で浮遊していた胚をコントロールディッシュに移動すると、6 時間以内に速やかに接着を開始する事が示された。			

以上より、胚の着床過程において子宮内膜上皮細胞にある EphA と胚の表面にある ephrinA が結合すると、胚の接着能を抑制し接着をある一定期間遅らせる可能性が考えられた。また、着床期を迎えた胚表面で ephrinA に局在変化を認めたことから、Eph-ephrinA シグナルが胚接着面の選択、いわゆるアポジションに関与する可能性も推察された。マウス妊娠子宮内膜における EphA が着床部付近で特徴的な変化を示したことから、子宮内膜の EphA が接着のみならずその後の絨毛細胞の伸展も制御する可能性が考えられた。 （論文審査の結果の要旨） 本研究は、胚の着床過程における胚の接着制御機構を解明するために、細胞間反発力を誘導するEph-ephrinAシステムに着目し、マウス胚および子宮における遺伝子および蛋白発現を検討しマウス胚盤胞の接着・伸展能に対する機能解析を行ったものである。 マウス妊娠子宮内膜腔上皮および腺上皮細胞においてEphA1,A2およびA4分子の蛋白発現を認め、妊娠5.5日目にはEphA1およびA2が着床部上皮で減弱していた。マウス胚にはephrinA1・A5のmRNAが発現し、ephrinA1-A4のmRNAは妊娠4.0日目に減弱していた。妊娠4.5日目胚盤胞栄養膜細胞層にephrinA1およびA3蛋白が発現しており、EphA機能分子との結合能を有することが示された。ephrinA3は妊娠4.5日目胚盤胞の接着開始部で発現が減弱しており、妊娠5.5日目着床胚の壁栄養外胚葉ではephrinA1およびA3の発現が共に消失していた。EphA1機能分子によりマウス胚盤胞の接着および伸展が抑制されたが、その抑制効果は可逆的なものであった。以上のようにEph-ephrinA系分子がマウス胚盤胞の接着を抑制する作用を持ち、着床期に接着開始部位で発現が減弱することから、マウス胚着床において胚盤胞の接着制御に重要な役割を持つ可能性が示唆された。 以上の研究は、胚着床のメカニズムの解明に貢献し、生殖医学の進歩に寄与するところが多い。したがって、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11月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日 以降