

氏 名	やま だ しげ とし 山 田 成 利
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1771 号
学位授与の日付	平 成 14 年 1 月 23 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	ヒト卵巣細胞に対する単クローン抗体 HCL-2 の作製とその解析に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 小 川 修 教 授 北 徹 教 授 藤 井 信 吾

論 文 内 容 の 要 旨

卵巣細胞は卵胞発育, 卵胞閉鎖, 黄体形成, および黄体退縮にともなう, 自ら増殖・分化・細胞死を呈する極めて特徴的な内分泌細胞である。

本研究では黄体細胞の分化や機能調節機構に関与する分子を捉える目的で, ヒト黄体細胞に対する新しい単クローン抗体 (HCL-2) を作製し, その抗原分子の解析を行った。

開腹手術時に患者の同意を得て採取したヒト卵巣より黄体細胞を分離し, BALB/c マウスに 4 週間毎に免疫を行った後, その免疫したマウスの脾臓とマウスのもエローマ細胞とを細胞融合させハイブリドーマを作製した。ヒト黄体の凍結切片標本を用いて間接蛍光抗体法によりスクリーニングを行い, 黄体細胞の細胞質内に存在する物質を認識する抗体 (HCL-2) を産生するクローンを得た。

HCL-2 抗体の精製を行い, その後にヒト黄体および胎盤よりアフィニティクロマトグラフィー法にて抗原を精製した。抗原蛋白のアミノ酸配列を解析したところ, HCL-2 抗原の N 末端より 7 残基が解析でき, その配列はヒト apolipoprotein-B と一致した。apolipoprotein-B は低比重リポ蛋白 (LDL) の主要なコア蛋白であることより, さらにヒト血清と LDL より HCL-2 抗原の大量精製を行った。その結果精製された HCL-2 抗原は分子量および N 末端より 20 残基のアミノ酸配列ともに apolipoprotein-B と一致し, HCL-2 抗原が apolipoprotein-B であることが示された。

体外受精-胚移植法での採卵時に採取されるヒト黄体化顆粒膜細胞は LDL を取り込みプロゲステロンを産生することが知られている。そこで顆粒膜細胞を LDL 添加群と非添加群に分け培養し, apolipoprotein-B の細胞内の局在を免疫組織染色法にて観察した。その結果, LDL 添加群においてのみ顆粒膜細胞質内に apolipoprotein-B の染色が観察され, 通常の免疫組織染色法で LDL の細胞内への取り込みが比較的容易に確認できることが示された。

そこで, 従来より観察が困難とされていたヒト卵胞や黄体組織における LDL の取り込みの経時的变化を, HCL-2 抗体および抗 LDL 受容体抗体を用いた免疫組織染色法にて検討した。その結果, 直径 1 mm 以下の小卵胞において莢膜細胞ではすでに, LDL 受容体が発現しており, また apolipoprotein-B の存在も認められた。また排卵前の卵胞では, 顆粒膜細胞にも LDL 受容体が発現し, LH サージ前後より顆粒膜細胞が, 基底膜を通過した LDL を取り込みはじめている像が観察された。黄体細胞では黄体中期で LDL の取込みが大黄体細胞で最強となること, 黄体後期では LDL 受容体の発現および LDL の取込みがともに減弱していること, さらに妊娠黄体では, 妊娠初期からすでに LDL の取込みが減弱していることが観察された。

以上述べたように, 本研究によりヒト初期卵胞から妊娠黄体へに至る卵巣のステロイドホルモン産生器官における活動動態が, 免疫組織染色法を用いた LDL の取込みの解析という新しい手法により明らかにされた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では, ヒト卵巣細胞の分化機構を解明する目的でヒト卵巣細胞に対する単クローン抗体 HCL-2 の作製し, その認

識する抗原の解析を行い生理的意義を検討した。

まず黄体機能に関連する分子を捉える目的でマウスにヒト黄体細胞を免疫しこれに反応する単クローン抗体 (HCL-2) を作製した。次に HCL-2 抗体が認識する抗原を精製してアミノ酸配列を分析し、この抗原が apolipoprotein-B であると同定した。

さらにヒト黄体化顆粒膜細胞の培養実験で、LDL の細胞内への取り込みがそのコア蛋白である apolipoprotein-B の細胞内染色像として経時的に観察できることが明らかとなった。

そこで、ヒト卵胞や黄体における LDL の取り込みを、HCL-2 抗体を用いた免疫組織染色法で検討したところ、発育初期の卵胞からアンドロゲン産生を司る内荏膜細胞で LDL が積極的に取り込まれていること、また排卵直前には卵胞基底膜を LDL が通過して顆粒膜細胞でも利用され始めることが示唆された。さらに妊娠初期黄体では予想に反して LDL の取り込みが低下していることが観察され、卵巣でのステロイドホルモン産生器官の活動動態に関する新しい知見が、LDL の取り込みという視点より免疫組織染色法を用いて明らかにされた。

以上の研究はヒト卵胞や黄体機能の解明に貢献し、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者と認める。なお、本学位授与申請者は、平成13年11月19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。