

氏 名	異 啓 司
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2126 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Expression of calcium binding protein D-9k messenger RNA in the mouse uterine endometrium during implantation (着床期のマウス子宮内膜におけるカルシウム結合蛋白D-9k遺伝子の発現に関する研究) (主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 塩 田 浩 平 教 授 成 宮 周 教 授 藤 井 信 吾

論 文 内 容 の 要 旨

着床期のマウス子宮内膜の変化は、主に卵巣の性ステロイドホルモンによってもたらされるが、胚との相互作用も着床期の子宮内膜の分化誘導に重要であることが示唆されている。本研究では、着床期のマウス子宮内膜に胚着床の成立によって発現が誘導される遺伝子の同定およびその解析を試みた。

妊娠5日目および発情期の子宮よりcDNAサブトラクション法を用いて着床期に特異的な遺伝子を濃縮したライブラリーを作成した。ノーザンブロット法にて、妊娠3日目より増加し、着床期である妊娠4から6日目に発現がピークとなる遺伝子クローンを確認したため、その塩基配列を調べたところ、ラットのカルシウム結合蛋白D-9kのcDNAと87%の相同性があった。マウスホモログの塩基配列はまだ報告されていなかったため、RACE法を用いてcDNAの全長の塩基配列およびアミノ酸配列を決定した。カルシウム結合蛋白D-9kは、カルシウム輸送やカルシウム濃度調節に関与する細胞内蛋白であり、ラット子宮ではエストロゲン依存性に誘導され、発情期や妊娠中期以後の子宮内膜上皮や筋層に発現するが、着床期には発現しないとされている。マウス子宮では、同様に妊娠中期以後の発現は報告されているが、着床期での検討報告はない。そこで着床期子宮でのカルシウム結合蛋白D-9kの発現について以下の検討を行った。

まず卵巣ステロイドホルモンの作用を調べる目的で、卵巣摘出マウスにエストラジオールまたはプロゲステロンを全身投与したあと、ノーザンブロット法にて子宮での発現変化を観察した。カルシウム結合蛋白D-9kは、プロゲステロンの投与で発現が誘導されたが、エストロゲン単独では誘導されなかった。またその発現はプロゲステロン投与後12時間後より誘導され、24時間後にピークとなり、48時間後には減少した。さらに、このステロイドホルモンに対する反応性のラットとの違いの一つの原因として、プロモーター領域の塩基配列の差異が確認された。次にin situハイブリダイゼーション法にて発現部位を調べると、その発現は子宮内膜上皮に局限しており、子宮内膜間質、筋層および胚には認められなかった。着床期での発現は、妊娠4日目には子宮内膜の腔上皮、腺上皮両方で見られ、腔上皮では妊娠5日目以後も持続していたのに対し、腺上皮では妊娠5日目以後消失していた。一方、偽妊娠子宮では、腔上皮、腺上皮ともに6日目まで発現が継続していた。そこで、着床の成立による腺上皮でのカルシウム結合蛋白D-9kの発現消失を確認するために、偽妊娠4日目の子宮の片側に胚盤胞を、他側には培養液のみを移植し、36時間後の子宮を観察した。その結果、胚盤胞を移植した側でのみ腺上皮での発現の消失が認められた。

以上の結果により、カルシウム結合蛋白D-9kは着床期のマウス子宮内膜において、プロゲステロンによって子宮内膜上皮に発現が誘導されること、および腺上皮での発現は着床胚の存在により制御されることが示された。マウス妊娠において、高濃度のカルシウムは胚の成長にとって好ましくないとされ、着床部位のカルシウム濃度は妊娠5日目以後急激に減少することが報告されているが、その機序は不明であった。本研究の結果は、着床期のマウス子宮内カルシウム濃度の調節機構に

カルシウム結合蛋白D-9kが関与している可能性を新たに示唆したといえる。以上より本研究は、着床現象の解明という観点から生殖医学の発展に寄与するものである。

論文審査の結果の要旨

本研究では、着床現象の分子機構を明らかにする目的で、cDNAサブトラクション法を用いて、カルシウム結合蛋白D-9k遺伝子が着床期のマウス子宮内膜に発現することを発見し、以下の検討を行っている。まず、マウスcDNAの全長の塩基配列およびアミノ酸配列を決定し、次に、プロゲステロンの投与で12時間後より発現が誘導されることが示された。さらに、プロモーター領域の塩基配列のラットとの差異が検討された。また、発現部位は子宮内膜上皮に限局していたが、妊娠子宮では妊娠5日目以後、腔上皮でのみ発現していたのに対し、偽妊娠子宮では、腔上皮、腺上皮ともに6日目まで発現が継続していた。そこで、胚移植実験系を用いて、着床の成立によって腺上皮での発現が消失することが確認された。これらの結果は、着床期のマウス子宮において、カルシウム結合蛋白D-9kがプロゲステロン胚の存在によって制御され、子宮内カルシウム濃度の調節機構に関与していることを示唆している。

以上の研究は、着床現象の解明に貢献し、生殖医学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11年2月22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。