

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 石川 智子

着床の過程は、胚と子宮内膜との相互作用に基づいて時間的・空間的に制御されており、胚、子宮、各々の生理とその相互作用の両者を考慮しなければ理解し得ない。本研究では着床現象における胚-子宮内膜相互作用においてレチノイド（ビタミン A およびその類縁体）が何らかの役割を演じている可能性に着目した。

1. ヒト子宮内膜組織における伊東細胞の存在を確認するため、抗 $\alpha$ -SMA 抗体による免疫組織染色を行った。その結果、子宮内膜間質において、血管平滑筋とは別に散在する $\alpha$ -SMA 陽性細胞が認められた。また、マッソン染色により、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞は膠原線維に富んだ子宮内膜間質に散在することが明らかとなり、膠原線維産生に関与している可能性が示唆された。

電子顕微鏡による観察では、子宮内膜間質に脂肪滴含有細胞が認められた。その分布は免疫組織染色による $\alpha$ -SMA 陽性細胞の分布と類似しており、子宮内膜間質に肝の伊東細胞と同様の脂肪貯蔵細胞が存在することが示唆されたが、子宮内膜伊東細胞のほうが肝伊東細胞に比して、脂肪含有量が少なかった。

以上の組織学的検討から、子宮内膜間質には、全身のレチノール貯蔵の主体となる肝臓に比較すると量は少ないものの、局所におけるレチノール貯蔵を担っている可能性のある伊東細胞が存在することが示唆された。

2. アルコール脱水素酵素 (ADH) の各サブタイプの組織分布を明らかにするため、RT-PCR によりラット各種組織における ADH の mRNA 発現を分析した。その結果、子宮において ADH クラス I の mRNA が優位に発現し、ADH クラス IV の転写活性は RT-PCR による検出感度以下であった。in situ ハイブリダイゼーションでは ADH クラス I の局在はラット子宮組織の子宮内膜間質細胞に限られ、内膜上皮や筋層細胞には認めなかった。

また、エストロゲンとプロゲステロンによる ADH クラス I の発現調節機構を解明するために、卵巣摘出ラットにこれらのホルモンを投与し、子宮における ADH クラス I の転写および活性の定量によってこれらのホルモンの効果を検討した。ノーザンブロットでは、プロゲステロン投与後 48 時間の子宮において ADH クラス I 転写がコントロール群に比して 210% に上昇していたが、エストロゲン投与のみでは効果が認められなかった。

そこで、エストロゲンおよびプロゲステロン投与後 48 時間のラット肝臓および子宮の組織抽出液を用いて ADH 活性を測定した。コントロール群、エストロゲン単独投与群およびエ

ストロゲン・プロゲステロン投与群の子宮組織抽出液中の ADH 活性を反応時間 15 分で比較したところ、ラット子宮における ADH 活性はプロゲステロン投与によりコントロール群の 190% に上昇していたが、エストロゲン単独投与投与では変化は認められなかった。

以上より、子宮には肝臓と同様、レチノイン酸の合成において律速酵素となる ADH クラス I が優位に発現しており、かつ、妊卵の子宮内膜への着床の場となる分泌期子宮内膜を誘導するプロゲステロンが ADH クラス I の発現を促進することが明らかとなった。

3. 妊娠初期トロホプラストの細胞増殖能に対するレチノイン酸の作用を検討した。トロホプラスト培養系にレチノイン酸を  $10^{-10}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M の濃度で添加後、48 時間の細胞数には添加したレチノイン酸各濃度で差を認めなかった。また、同様のレチノイン酸添加培養系において、MTT アッセイによっても、添加したレチノイン酸各濃度による細胞増殖能への有意な影響は認めなかった。

着床においてトロホプラストの子宮内膜への侵入に重要な役割を演ずる主なプロテアーゼおよびそのインヒビターとして、MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, uPA, PAI-1 が知られている。そこで、ヒトトロホプラスト培養系におけるこれらのプロテアーゼおよびインヒビターの mRNA 発現に対するレチノイン酸の作用を、定量的 RT-PCR により検討したところ、MMP-2, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, uPA, PAI-1 の各々の mRNA 発現は、レチノイン酸添加により有意な変化を認めなかった。一方、MMP-9 の mRNA 発現は、添加したレチノイン酸濃度  $10^{-10}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M で、各々 90.0%, 50.1%, 30.0%, 33.1%, 13.5% と減少しており、 $10^{-9}$ M 以上の濃度では統計的に有意に抑制されていた。

ザイモグラフィーでも、培養上清中の MMP-9 活性は添加したレチノイン酸が高濃度であるほど低いことが明らかとなった。

本研究では、子宮内膜間質においてプロゲステロンにより誘導されたアルコール脱水素酵素 (ADH) が、子宮内膜伊東細胞から放出されるレチノールを前駆物質としてレチノイン酸合成を促進し、そのレチノイン酸がトロホプラストにおいて MMP-9 発現および活性を特異的に抑制していることが明らかとなった。また、プロゲステロンは卵巣から産生されるのみでなく、トロホプラストからも産生分泌されるため、着床部局所において、プロゲステロンとレチノイン酸を介した子宮内膜-トロホプラストの相互作用が、着床期のトロホプラスト侵入能を調節している可能性が示唆された。