

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	潘伯臣
<p>学位論文題目</p> <p>ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子 (HB-EGF) のヒト黄体化顆粒膜細胞の生存及びアポトーシス調節機構に関する研究</p> <p>共著者名</p> <p>千石一雄、碁石勝利、田熊直之、山下剛、和田恵子、石川睦男</p> <p>Molecular Human Reproduction, Vol. 8, 734-741, 2002.</p> <p>研究目的</p> <p>黄体は妊娠成立と妊娠の維持に極めて重要な役割を有しているが、その発育、退行機構は十分に解明されていない。一方、ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子(Heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF) は EGF family の新しいメンバーで、膜アンカー型の前駆体 (proHB-EGF) と、ectodomain shedding により前駆体より切断された溶解型 (sHB-EGF) の成熟 HB-EGF として存在する。sHB-EGF は paracrine 作用により細胞の生存と増殖を促進し、一方、proHB-EGF は juxtacrine 作用により細胞に多様な機能をもたらすことが知られている。しかし、黄体細胞における HB-EGF の発現および生理作用に関しては未だ解明されていない。本研究では HB-EGF およびその受容体の黄体細胞における発現、ならびに黄体細胞の増殖、アポトーシス調節機構に関する proHB-EGF, sHB-EGF の役割に関し検討した。</p> <p>材料・方法</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 材料：インフォームドコンセントを得たうえで、体外受精胚移植 (IVF-ET) 時に卵胞より採取した黄体化顆粒膜細胞 (Luteinized granulosa cells, LGC) を Ficoll-Paque を用い遠心分離後、10%血清添加 RPMI1641 培地で 48 時間培養した。</li> <li>2. mRNA の測定：HB-EGF の受容体である HER1 と HER4 および他の EGF 受容体 family メンバーである HER2, HER3 の LGC における mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。また、sHB-EGF の添加による HB-EGF mRNA 発現量の変化は real-time PCR 法で測定し、RT-PCR 産物は sequencing 法で確認した。</li> <li>3. 免疫組織化学法：Vector Laboratories, Inc の ABC-P0 kit を用い、AEC 染色により HB-EGF と HER4 の蛋白発現を免疫組織化学法で検討した。</li> <li>4. アポトーシスの判定：48 時間培養後の LGC を無血清培地に移した後、sHB-EGF である recombinant HB-EGF および HB-EGF と HB-EGF 受容体 (HER1) の相互作用阻害剤である</li> </ol>			

CRM197 を添加し、24 時間培養後のアポトーシス発現頻度を検討した。アポトーシスの判定には、細胞質内の lipid droplet を検出できる Oil red 法を改良して、LGC の特定と同時に細胞のアポトーシスを観察した。また、TUNEL 法 (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP-FITC nick end labelling) を用い、アポトーシス細胞の確認を行った。

## 成 績

1. HB-EGF の発現 : LGC の HB-EGF mRNA 発現量は 10 ng/ml sHB-EGF の刺激により短時間で上昇を認め、その発現レベルは添加 2 時間でコントロールに比し 2.5 倍に上昇し ( $p < 0.01$ )、その後漸減し、24 時間で刺激前値にまで減少した。また、免疫染色では細胞周囲とくに細胞間の interphase が強く染色されたことより、この HB-EGF は膜アンカー型の pro-HB-EGF であることが示唆された。
2. HB-EGF 受容体の発現 : RT-PCR 法により LGC において EGF 受容体 family のメンバーである HER1, HER2, HER3, HER4 の全ての発現が認められた。また、免疫組織化学法では HER4 受容体は膜表面ではなく、細胞核内に強い発現を認めた (nuclear translocation)。
3. LGC における sHB-EGF の作用 : LGC の無血清培地培養下における sHB-EGF 添加実験では、24 時間後コントロールでは細胞の分裂がなかったのに対し、sHB-EGF 添加群では分裂像が認められた。単一細胞のアポトーシス発生率はコントロールで  $38 \pm 7.3\%$  を示したのに対し、10ng/ml および 100ng/ml sHB-EGF 添加群では各々  $28.2 \pm 1.9\%$ 、 $23.0 \pm 2.1\%$  ( $p < 0.05$ ) と用量依存性にアポトーシスが抑制された。重層細胞においても、アポトーシス発生率はコントロールの  $39.2 \pm 6.1\%$  にたいして sHB-EGF 10ng/ml, 100ng/ml 添加により  $25.2 \pm 4.1\%$ 、 $18.2 \pm 2.1\%$  ( $p < 0.01$ ) と用量依存性に抑制された。
4. LGC における CRM197 の作用 : HB-EGF と HER1 の結合阻害剤である CRM1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  添加 24 時間後の LGC のアポトーシス発生率は単一細胞ではコントロール  $40.1 \pm 8.6\%$  に対して各々  $36.2 \pm 9.7\%$ 、 $28.7 \pm 7.0\%$  ( $p < 0.05$ )、重層細胞ではコントロール  $37.8 \pm 8.7\%$  に対し各々  $29.4 \pm 11.2\%$ 、 $17.6 \pm 7.2\%$  ( $p < 0.05$ ) と用量依存性に減少した。また、proHB-EGF の juxtacrine 活性を検討するため、単一細胞と重層細胞のアポトーシス減少率を比較したところ、10  $\mu\text{g/ml}$  CRM197 添加時の単一細胞のアポトーシス減少率が  $20.4 \pm 15.3\%$  であるのに対し、重層細胞では  $52.1 \pm 18.3\%$  と著明なアポトーシスの抑制が認められた ( $p < 0.05$ )。

## 考 察

本研究により HB-EGF およびその受容体である HER1, HER4 がヒト黄体化顆粒膜細胞に存在し、また、HB-EGF mRNA の発現が sHB-EGF の刺激により短時間で上昇することより LGC での HB-EGF は autocrine 作用を有し、かつ immediate-early gene であることを明らかにした。さらに、sHB-EGF 添加により LGC の細胞分裂が促進され、アポトーシスが用量依存性に抑制される結果より、溶解型の HB-EGF は LGC の増殖促進、アポトーシスの抑制作用を有するものと考えられた。一方、HB-EGF とその受容体である HER1 の阻害作用を有する CRM197 の添加により、アポトーシスが抑制された結果は、無血清培地での培養により産生される内因性の HB-EGF は逆に、アポトーシスを誘起することを示唆するものである。無血清培養下では ectodomain shedding が起こらないために HB-EGF の大部分は proHB-EGF として存在していることより、proHB-EGF は juxtacrine/autocrine 作用を介し、黄体細胞のアポトーシスを促

進するものと考えられる。このように HB-EGF の溶解型と膜アンカー型は相反する生理作用を有することが示唆された。さらに、CRM197 添加により単一細胞に比較し重層細胞でのアポトーシスの減少率が高率であったことより proHB-EGF のアポトーシス誘起作用は主に juxtacrine によることが示唆された。HB-EGF と HER1 の結合阻害によりアポトーシスが抑制され、また、HER4 は LGC における発現量が低く、しかも細胞核内に留まっていることから、proHB-EGF のアポトーシス誘起作用は HER4 を介する機構より主に HER1 受容体を介するものであると考えられる。




## 結 論

HB-EGF およびその受容体がヒト黄体化顆粒膜細胞に存在し、溶解型の sHB-EGF は黄体化顆粒膜細胞の生存と増殖を促進し、一方、膜アンカー型の proHB-EGF はアポトーシスを誘起することを明らかにした。以上の成績から、HB-EGF は局所因子として黄体形成とアポトーシス調節機構を介し、ヒト黄体退縮に重要な役割を果たすことが示唆された。

## 引 用 文 献

1. Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*, 251 (4996): 936-939,1991.
2. Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11(4): 335-344, 2000.
3. Raab G, Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta*, 1333(3): F179-199, 1997.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	潘 伯臣
審査委員長 <u>藤 枝 宏 二</u>  審査委員 <u>石 川 隆 男</u>  審査委員 <u>小 川 隆 洋</u> 			
<b>学 位 論 文 題 目</b> <b>The Soluble and Membrane-anchored Forms of Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor Appear to Play Opposing roles in the Survival and Apoptosis of Human Luteinized Granulosa Cells</b> （ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子の溶解型と膜結合型はヒト黄体化顆粒膜細胞の生存とアポトーシスに対して逆の作用を示す）			
<p>黄体は妊娠成立と妊娠の維持に極めて重要な役割を有するが、その発育、退行機構は十分に解明されていない。一方、HB-EGF は EGF family の新しい member であり、黄体における発現及び生理作用はいまだ不明である。HB-EGF は前駆体 proHB-EGF としての膜アンカー型と成熟体としての溶解型 sHB-EGF の二つの型で存在している。sHB-EGF は paracrine 作用によって目的細胞の生存と増殖を促進している一方、proHB-EGF は juxtacrine 作用によって細胞に多彩な機能を果たす。本論文はこの二つ型の HB-EGF の黄体化顆粒膜細胞における発現、ならびに黄体化顆粒膜細胞の増殖、アポトーシスとの関連を検討した。また、HB-EGF の受容体である HER1, HER4 等の EGF receptor family の発現に関しても検討した。</p> <p>方法は、体外受精時に卵胞から採取した黄体化顆粒膜細胞を培養し、HB-EGF と EGF receptor family の mRNA 及び蛋白発現をそれぞれ RT-PCR 法と免疫組織化学法で検討した。HB-EGF と細胞アポトーシスとの関連を検討する為、sHB-EGF である recombinant HB-EGF、及び HB-EGF とその受容体 HER1 の相互作用の阻害剤であ</p>			

る CRM197 を添加し、24 時間培養した後、細胞のアポトーシスを oil red 法および TUNEL 法で検討した。

結果として、黄体化顆粒膜細胞における HB-EGF mRNA と蛋白の発現が認められた。又、EGF receptor family すべてのメンバーの mRNA 発現が認められた。さらに、HB-EGF の受容体の一つである HER4 は細胞膜ではなく、細胞核内に存在しており、いわゆる nuclear translocation の像が認められた。HB-EGF mRNA 発現量は sHB-EGF の刺激によって短時間に上昇したことより、黄体化顆粒膜細胞での HB-EGF は autocrine 因子で、かつ immediate-early gene であることが明らかになった。又、sHB-EGF は黄体化顆粒膜細胞を増殖し、アポトーシスを抑えた。CRM197 は細胞のアポトーシス発生率を用量依存性に減少させた。さらに、single cell と aggregate cell のアポトーシス発生率の減少率を比較検討したところ、single cell より aggregate cell においてアポトーシスの抑制が著明だった。よって、以上のことから、HB-EGF の溶解型は黄体細胞のアポトーシスを抑え、膜アンカー型は HER1 を介して細胞のアポトーシスを起こすという相反する生理作用を有することが明らかになり、HB-EGF は局所因子としてヒト黄体の形成と退行の調節機構に重要な役割を果たしていることが示された。

これらの結果は黄体の構造と機能の研究に大きく貢献する貴重な資料であり、学問的価値が高く、学位論文にふさわしいものと考えられた。また、論文提出者に対する各委員からの質問に対して適切かつ明解な解答が得られ、関連領域についても十分な知識を有していることが確認された。よって、本審査委員会は、本論文が学位論文に値するものであると判断した。