

氏 名 (本 籍) 王 華 芹 (中 国)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 5 6 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Follistatin-Related Gene (FLRG) Expression in Human Endometrium: Sex Steroid Hormones Regulate the Expression of FLRG in Cultured Human Endometrial Stromal Cells

(子宮内膜における FLRG の発現：子宮内膜間質細胞における FLRG 発現に及ぼす性ステロイドホルモンの影響)

審 査 委 員 主 査 教 授 岡 村 富 夫

副 査 教 授 大 久 保 岩 男

副 査 教 授 松 田 昌 之

## 論文内容要旨

|   |   |           |               |
|---|---|-----------|---------------|
| *整理番号   | 458   | (よりがな) 氏名 | 王 華芹 (おう かきん) |
| 学位論文題目  | Follistatin-Related Gene (FLRG) Expression in Human Endometrium: Sex Steroid Hormones Regulate the Expression of FLRG in Cultured Human Endometrial Stromal Cells |           |               |
| <p>【目的】</p> <p>子宮内膜は性ステロイドホルモンの影響を受け、増殖期、分泌期を通じて形態的にも機能的にも大きく変化する。中でも子宮内膜間質細胞は性ステロイドホルモン等により脱落膜化と呼ばれる特徴的な形態変化を起こし、さまざまな増殖因子・サイトカインを分泌することが知られており、胚の着床とその後の発育に密接な働きを及ぼしていると考えられている。近年、子宮内膜局所の TGF ファミリーが卵巣ステロイドホルモンの作用を仲介する形で子宮内膜の増殖・分化の制御に関与していることが示唆されている。子宮内膜には inhibin、activin 及び follistatin の産生が認められている。また、activin は子宮内膜の脱落膜化を促進させ、activin と結合してそれらを不活性させる follistatin は分泌期の上皮及び妊娠期の脱落膜化細胞に発現していることが認められている。FLRG (follistatin-related gene) は最近新しく同定された糖タンパク質で、follistatin と高い相同性を持ち、activin 及び BMPs と結合して、これらの物質の作用を制御することが知られている。子宮内膜においても、これまでの研究結果から inhibin、activin、follistatin 及び FLRG はお互いに作用し、重要な役割を果たす可能性が示唆されている。そこで、本研究ではヒト各月経周期及び早期妊娠の子宮内膜における FLRG mRNA、FLRG 蛋白の発現パターン及び局在をまず検討した。さらにこれらの実験結果を踏まえ、月経周期における子宮内膜の FLRG の発現の変動のメカニズムを探る目的で、ヒト正常子宮内膜間質細胞を分離培養し、性ステロイドホルモンの、FLRG の発現に及ぼす影響について検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>子宮筋腫等の婦人科良性疾患により子宮全摘術を施行した 32 歳から 46 歳までの正常月経周期を有する患者 56 名、及び人工妊娠中絶を希望した正常妊婦 32 名から摘出した組織の中から同意のもとに一部採取し、本研究に供した。子宮内膜から total RNA、タンパク質を回収し、RT-PCR もしくは Western blotting にて子宮内膜における FLRG mRNA 及びタンパク質の発現量を検討した。さらに凍結切片を作製し、免疫組織化学染色法及び免疫蛍光染色法にて、子宮内膜における FLRG の組織内、細胞内局在を検討した。さらに子宮内膜から子宮内膜間質細胞 (ESC) を分離し、エストロゲン/プロゲステロン添加にて、in vitro における FLRG 発現への影響を検討した。</p> |   |           |               |
| <p>(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、<br/>2 千字程度でタイプ等で印字すること。<br/>2. ※印の欄には記入しないこと。</p>   |   |           |               |

## 【結果】

- (1) Competitive quantitative RT-PCR 法及び Western Blotting 法によって、各月経周期、早期妊娠の子宮内膜に FLRG mRNA 及びタンパク質が発現することを判明した。とりわけ、増殖期、分泌期及び早期妊娠の順で FLRG mRNA 及びタンパク質の発現が増加する傾向を示した。
- (2) 抗ヒト FLRG モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検討により、FLRG タンパク質は増殖期には子宮内膜上皮細胞の細胞質にしか発現しないが、分泌期内膜および脱落膜においては間質細胞の核内にも発現することが確認できた。
- (3) *in vitro* 脱落膜化モデルを用いた実験では、プロゲステロン及びエストロゲンの両方を添加した場合のみ、子宮内膜間質細胞の脱落膜化につれて、プロラクチン分泌の上昇とともに、FLRG 発現の増加を認めた。

## 【考察】

子宮内膜は性成熟婦人においては周期的変化を示し、排卵後に分泌期を迎え、形態学的には脱落膜化様変化を子宮内膜間質細胞に引き起こし、受精卵の着床に備える。着床の舞台となる子宮内膜組織は上皮と間質よりなり、それぞれの構成細胞が役割を分担しながら生理機能を営んでいる。子宮内膜にはさまざまな TGF ファミリーの発現が報告され、follistatin は分泌期の上皮及び妊娠期の脱落膜化細胞に発現することが知られている。今回の成績では FLRG は子宮内膜上皮には月経周期を通じて発現しているのに対し、子宮内膜間質では分泌期、脱落膜化の時期に特異的に発現していることが判明した。培養子宮内膜間質細胞での FLRG 発現は、E2 及び P4 単独添加に比較して、E2 及び P4 同時添加により強く増強することが確認されたが、follistatin 発現への影響は認めなかった。これらの実験結果は、FLRG は構造的に、機能的に follistatin とかなり相同性が高いが、子宮内膜での発現様式及び発現調節機構は異なることが推測された。その理由の一つとして E2 及び P4 が子宮内膜間質細胞での FLRG 発現に重要な役割を果たすが、follistatin 発現への関与は希薄であるか、不十分である可能性が示唆され、*in vivo* 子宮内膜間質細胞では follistatin が妊娠してから発現することから、子宮内膜間質細胞での follistatin 発現は胚の存在が必須である可能性も考えられ、今後、子宮内膜間質細胞と胚との共培養して検討する必要があると考える。

## 【結論】

各月経周期および早期妊娠における子宮内膜における FLRG の発現及び局在を検討した。さらに子宮内膜間質細胞培養系を用いて FLRG 発現に対する性ステロイドホルモンの影響を検討した。FLRG は子宮内膜上皮には月経周期を通じて発現しているのに対し、子宮内膜間質では分泌期、脱落膜化の時期に発現誘導されていることが判明した。また、子宮内膜間質細胞では性ステロイドホルモンによる FLRG 発現調節機構が存在している可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

|   |     |    |       |
|---|-----|----|-------|
| 整理番号  | 458 | 氏名 | 王 華 芹 |
| (学位論文審査の結果の要旨)  |     |    |       |
| <p>Follistatin-related gene (FLRG)タンパクは activin と結合し、その作用を中和することが知られている。本研究は、子宮における FLRG タンパクの生理的役割を解析する第一歩として、ヒト子宮内膜における FLRG タンパクの発現様式及び局在を検討し、さらに FLRG の発現に対する性ホルモンの影響について検討したものである。その結果、FLRG タンパクは増殖期、分泌期、早期妊娠の順で増加する傾向を示し、子宮内膜上皮には月経周期を通じて発現しているのに対し、同間質では分泌期から認められ、かつその発現様式が多彩であることが判明した。また、間質細胞の初代培養では卵胞及び黄体ホルモンの協調作用により、間質細胞の脱落膜化に伴って FLRG 発現の増大が認められた。</p> <p>これらの結果より、子宮内膜間質細胞における FLRG の発現が性ホルモンにより調節され、同タンパクが脱落膜化を制御する可能性が示唆された。</p> <p>本研究はヒト子宮内膜における FLRG タンパクの役割について初めて明らかにしたものであり、博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> |     |    |       |
| (平成 16 年 2 月 10 日)  |     |    |       |