

学位論文題名

ラット卵巣におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-23
(MMP-23) の発現調節機序の解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 雌性生殖器官は、性周期や妊娠・分娩過程に伴い周期的な細胞外マトリックス (ECM) の再構築が観察されるユニークな器官である。この ECM の分解に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の役割について解析を進める過程で、雌性生殖器官に特異的に発現する新規のラット MMP (Rat ortholog of MMP-23) cDNA クローニングに成功した。MMP-23 はシステインスイッチを保持せず、N末端に膜貫通構造を持つ点において他の MMP ファミリーと大きく異なる構造的特徴を有している。また基質に対する分解活性が弱いことから、新しい機能を有する可能性が考えられる。本研究ではラット卵巣細胞の初代培養系を確立し、それらを用いてゴナドトロピンによる MMP-23 の発現調節機序を解析した。

【対象と方法】 実験には、生後 21 日の幼若雌、SD ラットを用いた。*in situ* hybridization 法により、ラット雌性生殖器官における MMP-23 の発現部位を同定した。ラット卵巣細胞における MMP-23 の発現機構を解明するために、ラット顆粒膜細胞および莢膜・間質細胞の初代培養細胞系を確立し、調製した初代培養細胞にゴナドトロピン刺激を与えたところ経時的にステロイドホルモンおよび cAMP を産生することが確認された。又経時的に MMP-23 mRNA 量の変動を RT-PCR 法により定量した。

【結果】 ラット卵巣における MMP-23 の発現は原始卵胞から 2 次卵胞初期まで顆粒膜細胞に局限しており、排卵に向けて卵胞が成熟するに従い、顆粒膜細胞での発現が減少し、代わりに外莢膜細胞層に特異的な発現が見られることを *in situ* hybridization 法により明らかにした。ラット顆粒膜細胞および莢膜・間質細胞の初代培養細胞系を確立した。調製した初代培養細胞は、いずれもゴナドトロピン刺激特異的なステロイドホルモンおよび cAMP を産生したことから、ゴナドトロピン受容体を介した細胞内情報伝達系が機能していることが確認された。これらの細胞にゴナドトロピン刺激を与え、経時的な MMP-23 mRNA 量の変動を RT-PCR 法により定量した結果、MMP-23 の発現は顆粒膜細胞では経時的に減少するが、莢膜・間質細胞では経時的に増加することが判明した。

【考察】 ラット卵巣における MMP-23 の発現部位を *in situ* hybridization 法により検討した結果、MMP-23 が初期の卵胞において顆粒膜細胞層で機能し、排卵直前の成熟卵胞ではその機能場所が外莢膜細胞層へ変わるものと予想される。MMP-23 は既存の MMP 基質に対する分解活性が弱いことから、酵素としての機能はストロメライシン 3 (MMP-11) と

同様に細胞外マトリックスの分解以外にあると予想されるが、特異的な基質は未だ不明である。卵胞形成過程における MMP-23 の機能を解析する上で、その特異的な基質の同定は必須であり、現在検討中である。

ラット卵巣の成熟過程における MMP-23 の局在の変化は、卵胞を構成する細胞群にゴナドトロピン特異的な MMP-23 の発現調節機序が存在することを示唆している。調製した各初代培養細胞は、いずれもゴナドトロピン刺激特異的なステロイドホルモンおよび cAMP を産生し、ゴナドトロピン受容体を介した細胞内情報伝達機序が作用していることを示唆している。また、生理的機能が確認された条件において、各細胞の分化過程における MMP-23 の mRNA を定量した結果、MMP-23 の発現は、顆粒膜細胞では分化に伴い経時的に減少するが、莢膜・間質細胞では経時的に増加することが判明した。この結果は *in situ* hybridization 法で得られた *in vivo* の結果と相関するものであり、ここで確立した初代細胞培養系が MMP-23 の発現調節機序を分子レベルで解析する上で非常に有用なものであることを示している。

また顆粒膜細胞において FSH 刺激後 24 時間で MMP-23 の発現抑制が観察されるが、同時期にプロゲステロン産生が亢進される現象に注目すると、MMP-23 の転写抑制にプロゲステロンが関与している可能性が示唆される。今後、確立した初代培養細胞を用いて、プロゲステロンならびにプロゲステロン受容体拮抗剤による MMP-23 の発現に対する作用を検討し、更に MMP-23 の転写調節領域を解読し、顆粒膜細胞および莢膜・間質細胞における細胞特異的な調節機序の解明を行う予定である。

[結論] ラット卵巣における MMP-23 mRNA の発現は、顆粒膜細胞では卵胞成熟に伴い減少し、代わって外莢膜細胞では増加するということが *in situ* hybridization 法により明らかとなった。

本研究で確立した顆粒膜細胞および莢膜・間質細胞の初代培養系において、ゴナドトロピン刺激に特異的に応答する細胞内情報伝達機構を確認した。

ゴナドトロピンによる MMP-23 mRNA の変動を半定量的 Multiplex RT-PCR 法により定量した。顆粒膜細胞では FSH による分化誘導に伴い MMP-23 mRNA の経時的減少が観察され、一方莢膜・間質細胞では LH 刺激による分化に応じた mRNA の増加が確認された。これらの結果より、ゴナドトロピンによる卵胞構成細胞特異的な MMP-23 の発現調節機構が存在することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

ラット卵巣におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-23 (MMP-23) の発現調節機序の解析

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の役割について解析を進める過程で、雌性生殖器官に特異的に発現する新規のラット MMP (Rat ortholog of MMP-23) cDNA クローニングに成功した。本研究ではラット卵巣細胞の初代培養系を確立し、それらを用いてゴナドトロピンによる MMP-23 の発現調節機序を解析した。

ラット卵巣における MMP-23 の発現は原始卵胞から 2 次卵胞初期まで顆粒膜細胞に限局しており、排卵に向けて卵胞が成熟するに従い、顆粒膜細胞での発現が減少し、代わりに外莖膜細胞層に特異的な発現が見られることを *in situ* hybridization 法により明らかにした。ラット卵巣細胞のうち顆粒膜細胞と莖膜・間質細胞とを別々に分けた初代培養細胞系を確立した。これら 2 つの初代培養細胞は、いずれもゴナドトロピン刺激特異的なステロイドホルモンおよび cAMP を産生したことから、ゴナドトロピン受容体を介した細胞内情報伝達系が機能していることが確認された。これらの細胞にゴナドトロピン刺激を与え、経時的な MMP-23 mRNA 量の変動を半定量的 multiplex RT-PCR 法により定量した結果、MMP-23 の発現は顆粒膜細胞では経時的に減少するが、莖膜・間質細胞では経時的に増加することが判明した。これらの結果から卵巣構成細胞にはそれぞれ特異的な MMP-23 の発現調節機構が存在することが示唆された。

公開発表に当り、副査の細川教授より、半定量的 multiplex RT-PCR による mRNA の定量方法の正確性、蛋白レベルの発現と局在、その機能等についての質問があった。

次いで副査の藤本教授から卵胞成熟に PMSG を用いた理由、用いた FSH の製品について、MMP-23 の卵巣表面細胞での発現に関する意義、ヒト卵巣での発現等について質問があった。また、主査の長嶋教授から卵巣腫瘍における MMP-23 の発現に関して質問された。

いずれの質問に対しても、申請者は過去の論文や共同研究者の研究成果を引用し、概ね妥当な解答を行った。

この論文は、新規に同定された MMP-23 のラット卵胞成熟過程における細胞特異的な発現変化とホルモン応答性とを明らかにした貴重な研究である。今後さらに顆粒膜細胞および莖膜・間質細胞における細胞特異的な調節機序の解明を詳細に行うことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。