九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Development of an In Vitro Model to Study Uterine Functions and Early Implantation

モハメド ラシドウル, イスラム

https://hdl.handle.net/2324/1785440

出版情報：九州大学, 2016, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏　　名	モハメド　ラシドウル　イスラム
論　文　名	Development of an *In Vitro* Model to Study Uterine Functions and Early Implantation (子宮機能および初期着床を解析するための生体外モデルの開発)
論文調査委員	主　査　　九州大学　　准教授　　山内伸彦 副　査　　九州大学　　准教授　　Vishwajit Sur Chowdhury 副　査　　九州大学　　名誉教授　　服部眞彰

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

子宮内膜は腔上皮細胞と腺上皮細胞、間質細胞およびそれぞれの細胞の周囲に局在する細胞外マトリックス成分によって構成されており、着床の開始から妊娠の進行に伴って組織改変が行われる複雑な組織として認識されている。胚と子宮の共同作用である着床にはサイトカイン、成長因子、ホルモン、接着因子等の様々な因子が複雑に関与しているため、そのメカニズムは依然として不明な点が多く残されている。複雑な子宮機能と着床機構を明らかにするためには生体外モデルを用いた解析が有効であると考えられるが、着床機構を解析できる適切な生体外モデルは未だ確立されていない。

本研究では、形態的特徴、性ステロイドホルモン（E2 および P4）への応答性および脱落膜化能を明らかとすることで、培養子宮組織片を子宮内膜の生体外モデルとして確立することを第一の目的とした。ラット子宮組織を細切して細胞非接着性のフラスコで培養し、組織学的および免疫組織化学的観察を行った。採取直後の子宮組織片は切断面が外部に露出し外周部がいびつであったが、培養日数の経過とともに次第に表面が滑らかな球形に凝集した。培養 2 日目以降の組織片では、外周部に透明な細胞層が確認された。上皮細胞マーカーであるサイトケラチン、間質細胞マーカーであるビメンチンに対して蛍光免疫染色を行ったところ、上皮細胞が間質細胞を覆う構造が認められた。ついで、培養子宮組織片を性ステロイドホルモンで処理し、生体子宮で E2 および P4 に反応する *Muc1*、*Pr*、*Areg* および *Igfbp1* の発現に対する影響を解析した。リアルタイム qPCR の結果、*Muc1* および *Pr* の発現は E2 によって、*Areg* の発現は P4 によってそれぞれ促進された。これらの結果は、生体における性ステロイドホルモンの作用と同様であった。一方、ラット *Igfbp1* の発現は E2 に依存するとされるが、培養子宮組織片では E2 と P4 の共作用によって発現が促進された。さらに、培養子宮組織片の脱落膜化能をそのマーカー遺伝子である *Prl8a2* と *Bmp2* の発現から解析した。MPA（酢酸メドロキシプロゲステロン）と db-cAMP による人為的な脱落膜化処理を行った結果、対照区と比較して処理区では *Prl8a2* と *Bmp2* の発現が有意に高い値を示した。これらの結果は、培養子宮組織片が形態的・生理的に生体内の子宮組織と同様の性質を示し、脱落膜化能を有することからも着床の生体外モデルとして利用でき得る可能性を示すものである。

生体組織に近い性質を有する培養子宮組織片の利用は、胚との共培養システムにおいて生体外における着床研究を可能とするものと考えられる。よって、脱出胚盤胞期胚と培養子宮組織片の共培養を行い初期着床の観点から解析することを次の目的とした。子宮灌流によって胚盤胞期胚を回収し、酸性タイロード液による処理を行い透明帯を除去した。底面が U 字型の 96 穴培養プレートを用い、脱出胚盤胞期胚と培養子宮組織片の共培養を行った。軽い振盪とピペッティングによって胚

の培養子宮組織片への接着を確認したところ、共培養 24 時間後では安定して接着していた胚は認められなかった。しかし、48 時間後には一部の共培養では安定した接着状態であることが認められた。さらに、性ステロイドホルモンが子宮内膜の受容能とその後の着床過程に重要であることから、接着性に対する影響を解析した。共培養液中に性ステロイドホルモンを添加した結果、胚の組織片への接着率は対照区と比較して P4 添加区で有意に高い値を示した。一方、E2 添加区では組織片と接着した胚は全く認められなかった。これらの結果は、初期着床過程である胚の子宮内膜への接着は性ステロイドホルモンによって影響を受け、P4 によって促進され E2 によって抑制されることを示している。

以上要するに、本論文は、培養したラット子宮組織片の形態的・生理的な特性を明らかにするとともに、胚と共培養を行うことにより初期着床における胚の接着に性ステロイドホルモンが重要な役割を果たすことを明らかにしたものであり、動物繁殖生理学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本論文は博士（農学）の学位に値すると認める。