




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 462号	氏 名	唐木田 真也
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	吉岡秀克 
		副査氏名	白石恵男 
		副査氏名	片岡晶志 
<p>The effect of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin on the MAP kinase-induced production of vascular endothelial growth factor by human granulosa cells.</p> <p>(ヒト顆粒膜細胞におけるheparin-binding EGF-like growth factor と amphiregulin による vascular endothelial growth factorの産生調節)</p> <p>血管新生は脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や組織形成に関わっているばかりでなく、成熟個体の性周期における子宮内膜の増殖、黄体形成、胎児期の器官の発育や胎盤形成にも深く関与している。卵巣において血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) が発現し、卵胞液中に高濃度のVEGFが存在することより、VEGFは卵胞発育における血管新生に関与すると考えられている。Follicle-stimulating hormone (FSH) と Luteinizing hormone (LH) はゴナドトロピン受容体に結合し、顆粒膜細胞におけるEGF-like Factor産生を介して、卵子成熟や成長因子の産生調節を行うことが報告されている。Heparin-Binding EGF-like growth factor (HB-EGF) 及びamphiregulinはEGFファミリーに属し、細胞表面に存在するEGF受容体に結合する。これらはそれらを発現する細胞のシグナル伝達を介して細胞増殖や産生物質の調整に重要な役割を担っている。本研究で申請者らはヒト卵巣顆粒膜細胞腫細胞株 (KGN) を用い、HB-EGF及びamphiregulinのVEGF産生におよぼす影響について、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) を中心に細胞内シグナル伝達について検討した。</p> <p>卵巣組織を用いてVEGF及び血管内皮細胞の表面マーカーであるCD31の分布を免疫組織染色法で調べた。KGN細胞株を24ウェルプレートに培養し、コンフルエント後、HB-EGF、amphiregulin、MAPKK (MEK) 阻害剤 (U0126)、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤 (AG1478) を種々の濃度で添加し、24時間後に培養液を回収し、ELISA法でVEGF量を測定した。また、細胞増殖能をWST-1法で行った。次にHB-EGF、amphiregulinによるVEGF産生のシグナル経路を解析するために、KGN細胞株を100 mmプレートに培養し、HB-EGF、amphiregulin、U0126、AG1478を添加後、一定時間後に細胞を回収し、MAPKの活性 (phospho-44/42 MAPK抗体使用) をWestern immunoblot法で解析した。</p> <p>卵巣の発育卵胞の顆粒膜細胞にVEGFの発現、及びその卵胞周囲にCD31陽性細胞を認め、血管形成を確認した。KGN細胞株においてはHB-EGF、amphiregulinの添加でVEGFの産生増加が見られ、U0126、AG1478の添加で濃度依存的に阻害された。同様にWestern immunoblot法でもHB-EGF、amphiregulinの添加でERK1/2のリン酸化が認められ、U0126、AG1478の添加で阻害された。</p> <p>本研究は卵巣顆粒膜細胞腫細胞株において、HB-EGF、amphiregulinのEGF受容体作動性物質がMAPKを介してVEGFの産生に関与していることを証明した。この研究は卵胞の成熟における血管新生の重要性を示す研究であり、審査員の合議により、本論文は学位 (博士) に値するものと判断した。</p>			



## 学 位 論 文 要 旨

氏名 唐木田 真也

## 論 文 題 目

The effect of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin on the MAP kinase-induced production of vascular endothelial growth factor by human granulosa cells.

(ヒト顆粒膜細胞における heparin-binding EGF-like growth factor と amphiregulin による VEGF の産生調節)

## 要 旨

【緒言】血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や組織形成に関わっているばかりでなく、成熟個体の性周期における子宮内膜の増殖、黄体の形成、胎児期の器官の発育や胎盤の形成にも深く関与している。卵巣では下垂体より分泌される卵胞刺激ホルモンや黄体化ホルモンに加えて局所調節因子である各種の成長因子やサイトカインの働きにより、卵胞は成熟し排卵に向かって機能的分化を遂げる。卵巣において血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現が報告され、また卵胞液中には高濃度の VEGF が存在することより、VEGF は卵胞発育における血管新生に関与すると考えられている。Follicle-stimulating hormone (FSH) と luteinizing hormone (LH) は、ゴナドトロピン受容体に結合し、顆粒膜細胞における EGF-like factor 産生を介して、卵子成熟や成長因子の産生調節を行うことが報告されている。Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) ならびに amphiregulin は、epidermal growth factor family に属し、細胞表面に存在する EGF 受容体 に



リガンドとして結合する。そして、これらを発現する細胞のシグナル伝達を介して細胞の増殖や産生物質の調節などに重要な役割を担っている。今回、ヒト卵巣顆粒膜細胞腫の細胞株 (KGN) における HB-EGF と amphiregulin の VEGF 産生におよぼす影響について細胞内シグナル伝達、すなわち mitogen-activated protein kinase (MAPK) を中心に検討した。

【方法】顆粒膜継代培養細胞株 (KGN) を 24-well の culture-plate に培養し confluence 後、serum-free medium で HB-EGF、amphiregulin、MAPKK (MEK) inhibitor (U0126)、EGFR tyrosine kinase inhibitor (AG1478) を種々の濃度で添加した。24 時間後、上清を回収し ELISA 法にて VEGF 産生能を検討した。また、細胞増殖能については WST-1 法で検討した。次に、HB-EGF と amphiregulin による VEGF 産生調節における細胞内シグナル伝達系について、KGN を 100mm dish の plate で培養し、HB-EGF、amphiregulin、U0126、AG1478 を添加の後、定めた時間で細胞回収を行い、MAP kinase の活性を western immunoblot 法 (phospho-p44/42 MAP kinase antibody 1:1,000) を用いて検討した。卵巣組織を VEGF ならびに血管内皮細胞の表面マーカーである CD31 で免疫組織染色を行い、卵巣組織における血管新生因子の関与を検討した。

【結果】卵巣では発育卵胞において顆粒膜細胞に VEGF の発現を認め、その卵胞周囲に CD31 陽性細胞を認め血管の形成が確認できた。KGN における検討では VEGF の産生は、HB-EGF ならびに amphiregulin の添加により有意に増加した。また、HB-EGF および amphiregulin の添加により増加した VEGF 産生は、U0126、AG1478 の添加により濃度依存性に抑制された。さらに、HB-EGF および amphiregulin により phospho-ERK1/2 のリン酸化が認められ、この活性化は U0126 や AG1478 により抑制された。

【結論】今回の結果から顆粒膜細胞においては MAPK を介して VEGF 産生が亢進することが確認できた。顆粒膜細胞では、ゴナドトロピンの刺激により HB-EGF や amphiregulin などの EGF 受容体作動性物質が増加することが報告されている。今回の検討で、HB-EGF と amphiregulin により VEGF の産生が増加したことより、HB-EGF と amphiregulin は、VEGF の発現を介して卵胞における血管新生を促進する可能性が示唆され、またその作用は MAP kinase を介していることが確認された。