

Inter-alpha-trypsin inhibitor is concentrated in the pericellular environment of mouse granulosa cells through hyaluronan-binding

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平嶋, 泰之 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1570">http://hdl.handle.net/10271/1570</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 293号	学位授与年月日	平成11年 2月19日
氏名	平 嶋 泰 之		
論文題目	<p>Inter-alpha-trypsin inhibitor is concentrated in the pericellular environment of mouse granulosa cells through hyaluronan-binding                      (Inter-alpha-trypsin inhibitor のヒアルロン酸との結合を介した卵丘膨脹時の顆粒膜細胞周囲環境への集積)</p>		

博士(医学) 平 嶋 泰 之

## 論文題目

Inter-alpha-trypsin inhibitor is concentrated in the pericellular environment of mouse granulosa cells through hyaluronan-binding

(Inter-alpha-trypsin inhibitorのヒアルロン酸との結合を介した卵丘膨脹時の顆粒膜細胞周囲環境への集積)

## 論文内容の要旨

〔はじめに〕

卵とそれを取り囲む数層の顆粒膜細胞よりなる卵丘は、卵胞の構成要素であり、排卵前には卵丘の膨脹が認められる。この卵丘膨脹は排卵及び受精の成功と関係があるとされている。最近ヒトの inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI) と相同の分子配列を持つウシのプロテオグリカンがヒアルロン酸 (HA) と結合することにより顆粒膜細胞外マトリックスを安定・増大化させ、その結果卵丘膨脹が起こると考えられている。またヒアルロン酸結合蛋白 (HABP) は、HA を多量に含んだ細胞外マトリックスにおいてHAと結合し、マトリックスの安定化に関与していると報告されている。そこで、ITIとその構成要素である2種類の heavy chain (H-chains) および light chain (urinary trypsin inhibitor:UTI) の、HA およびHABPとの生理的關係について検討した。

〔方法〕

ヒトITIはSalierらの方法により血清より分離精製した。H-chainsはITIをchondroitinase ABCにて分離した後に分離精製した。HABPはウシ軟骨プロテオグリカンをトリプシンで分解後に分離精製した。UTIは持田製薬より供与された。これらを用いELISA法にて以下の結合について検討した。1. 固層したHAに対するITI、H-chains、UTIの結合。2. 固層したITI、H-chains、UTIに対するHABPの結合。3. 固層したHABPに対するUTIの結合。4. 固層したHABPに対するHABPの結合。さらに、ligand blot assayにてITI、HABP、HA相互の結合について検討した。また動物実験では、5週齢のCD1マウスにpregnant mare serum gonadotropinを用いて卵胞成熟を促し、human chorionic gonadotropin (hCG)投与一定時間後の卵巣におけるITI、HAの局在を凍結切片にて検討した。ITIの染色は間接蛍光抗体法で、HAの染色はビオチン標識HABPをprobeとして蛍光抗体法に準じて行った。

〔結果〕

ELISA法にて、固層したHAに対してITI、H-chainsは特異的に結合したが、UTIは結合しなかった。さらに、HABPは固層したITI、H-chains、UTIと結合し、また逆に固層したHABPに対するUTIの結合も確認された。ligand blot assayではITIとHAの結合が確認され、また、HABPはHAと高い結合能を持つとともに、高濃度ではHABPどうしが結合することが示された。マウス卵巣におけるHAとITIの卵巣内局在の検討に関しては、hCG投与前にはHAは染色されず、hCG投与後1時間で顆粒膜細胞にHAの弱い集積が認められた。hCG投与6時間後の卵巣では卵丘と卵胞液にHAの強い染色を認めた。ITIに関してもhCG投与前、投与1、6時間後のその局在、染色態度はHAと同様であった。

## 〔考察〕

ITIはその生理的機能に関しては不明な点の多い物質であるが、in vitroでの結合実験、動物実験より卵丘膨脹への関与に対しては以下のように推察される。肝臓で産生された ITI は血清中に分泌され、顆粒膜細胞自身が産生した膜表面の HA と排卵直前に H-chains を介して直接結合し細胞外マトリックスに集積する。さらに、ITI は HA、HABP と相互に結合することによって細胞外マトリックスを安定させ、これにより細胞外マトリックスの飛躍的な増大が可能となる。これが排卵直前に認められる卵丘膨脹の機序と考えられる。また、細胞膜表面の ITI はエラスターゼ様の酵素により H-chains と UTI に切断されることが報告されており、さらに UTI は HABP と結合可能であったことより、UTI は傍細胞環境で蛋白分解酵素阻害剤として機能している可能性がある。

## 〔結論〕

ITI の HA との結合部位は light chain の UTI ではなく、H-chain に存在する。ITI は排卵前に顆粒膜細胞表面の HA と直接結合することによって細胞周囲環境に集積し、排卵直前に認められる卵丘膨脹に関与すると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

## 〔序論〕

排卵前に卵とそれを取り囲む数層の顆粒膜細胞からなる卵丘が膨脹することが認められている。最近血清のプロテアーゼインヒビターの一つである inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI) がヒアルロン酸と結合し顆粒膜細胞のマトリックスを安定化させるということが示され、それにより卵丘の膨脹がおこると考えられてきた。申請者は ITI とその構成要素である二種類の heavy chain と light chain (UTI; 尿中トリプシンインヒビター) のヒアルロン酸またはその結合蛋白である HABP との生理的関係について検討しようとした。

## 〔方法と結果〕

固層したヒアルロン酸に対して、ITI、heavy chain は結合したが、UTI は結合しなかった。すなわち ITI の heavy chain にヒアルロン酸に対する結合部がある。また固層した HABP は UTI にも結合した。HABP はその生化学的特徴より link protein と思われる。マウス卵巣内でのヒアルロン酸と ITI の局在として hCG 投与後、6 時間後に両者の免疫染色を行い、卵丘と卵胞液に強い染色を認めた。さらに ITI の起源としてこれが排卵直前に起きる卵胞-血管関門変化により、血液中から流入するものであることが示され、一方 link protein は顆粒膜細胞が生成するものであることが示された。

## 〔考察〕

排卵中に卵は保護されて排卵の際の衝撃に耐える機序が必要とされる。申請者は血中から流入した ITI がヒアルロン酸または link protein に結合すること、さらに ITI から分解された UTI が link protein と結合することでヒアルロン酸のプロテアーゼによる分解を阻害し、さらに顆粒膜細胞から産生されるヒアルロン酸の合成促進などで卵の周りにマトリックスが保持され、これが卵に安定化をもたらしているのではないかと考察している。

## 〔結論〕

血液由来のITIは排卵前の顆粒膜細胞表面のヒアルロン酸と結合することにより細胞膜周辺に集積し、卵丘膨脹に関与すると考えられた。

以上の研究に以下の質問がなされた。

- 1) UTIとITIの関係、またその合成場所はどこか
- 2) なぜUTIは膜結合のプラスミンを効果的に阻害するのか
- 3) UTIとlink proteinの結合様式はどのようなものか
- 4) 顆粒膜細胞のヒアルロン酸が多くなることとマトリックスの安定化はどのように関係するのか
- 5) 放射冠と周辺部分の膨脹には違いがあるのか
- 6) 顆粒膜細胞はUTI、ITIを合成するのか
- 7) 実験に用いた顆粒膜細胞はprimaryのものか、hCGで刺激されたものか
- 8) 排卵の際に基底膜のメタロプロテアーゼの活性はどうしてITIで抑制されないようになっているのか
- 9) link proteinの存在部位とその役割

これらの質問に対し申請者の解答はおおむね適切であり、問題点も十分理解しており、申請者の論文は博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 高田 明 和

副査 教授 右藤 文 彦 副査 教授 筒井 祥 博