

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 白 汝嵐

---

我が国のウシ生産現場では、その妊娠率が低下し続け、50%を切る事例や地域が散見されるようになってきた。妊娠率10%の低下は少なくとも30億円の損失になり、妊娠率を上げる、あるいは上げるための知見を得ることは国家的な命題になってきた。

妊娠が成立しない原因の一つに「早期胚死滅」がある。これは、受精卵・胚盤胞が子宮内膜に着床できず、胎盤を形成できないために胚死滅が起こってしまう現象である。いままで様々な解析がなされてきたが、もうひとつ突破口を見極められないでいた。

そこで、本研究では胚「上皮細胞」と子宮「上皮細胞」に注目した。通常、上皮細胞同士が接着あるいは融合することはない。ところが、受精卵・胚「上皮細胞」は母親の子宮上皮細胞に接着や融合（着床）することから、妊娠が成立する。そこで、第1章と2章ではリンパ球ホーミングという現象に着目し、第3章では癌細胞における上皮間葉系転換という現象に注目した。リンパ球ホーミングとは、リンパ球が炎症部位に到達するために血管上皮細胞を通過する現象である。そのためには血管内でのリンパ球の輸送の減速化とトラッピング（接着）が起こらなければならない。

第1章では、リンパ球ホーミングの第一段階・リンパ球の減速化に寄与するセレクトリンという因子に注目した。この因子はリンパ球ホーミング現象では、リンパ球側に発現が認められ、そのリガンドは血管内皮上皮細胞側で発現するが、妊娠子宮での検証は全く行われてこなかった。妊娠子宮におけるセレクトリンは子宮側で発現し、そのリガンドは胚の方に存在していた。妊娠子宮にもセレクトリンやそのリガンドが発現していたが、その発現パターンはリンパ球ホーミング現象から予想した部位とは反対であった。これらの発現は子宮内だけではなく、当研究室が保有するウシ子宮内膜上皮細胞とウシ栄養膜（トロホブラスト）細胞の共培養系でも再現できたことから、ウシ胚はセレクトリン・リガンドを発現し、子宮上皮細胞のセレクトリンとインターアクションを起こすことが証明された。リンパ球ホーミングの次の段階は、リンパ球と血管内皮細胞との強固な接着であり、そこにはVCAM-1という因子が関わっている。

第2章では、子宮内VCAM-1とそのレセプターであるインテグリン・アルファ4(ITGA4)の解析を行った。以前から、VCAM-1 遺伝子欠失マウスは胎生致死にいたることが知られていた。近年、ヒトにおいて、VCAM-1 の発現が低い場合には妊娠しにくいことも分かってきたが、それ以外の動物種、とくに反芻動物での発現・機能解析は行われてこなかった。ここでも妊娠子宮内そのものでの発現や、ウシ子宮上皮細胞と胚細胞の共培養での検証の結果、VCAM-1 は子宮上皮細胞側で、そのレセプターである ITGA4 は胚側で発現し、それらの発現は胚細胞と子宮上皮細胞との細胞同士のインターアクションで増加することを見出した。

次に、さらに視点を変えて「癌細胞の転移」に注目した。癌細胞は上皮細胞として増殖・発育する。これらの細胞が他の組織に転移する時には、自らの上皮性を「間葉系細胞」に転換し、元の上皮からそげ落ち、血流に乗って他の組織へと移動し、そこで再び上皮細胞として増殖を開始する。

第 3 章では、子宮内で発育するウシ伸長胚が子宮上皮細胞に強固な接着する時には「上皮間葉系転換」をすることを見出した。ウシは妊娠 19-20 日で接着を開始する。そこで、妊娠 17 日（接着 2 日前）、妊娠 20 日（接着中）と妊娠 22 日（接着開始 2 日後）の子宮内胚と子宮内膜の上皮間葉系転換因子をリアルタイム PCR 法（発現 RNA 解析）や組織免疫染色法（発現タンパク解析）で検証した。子宮は妊娠ホルモン・プロゲステロンにより様々なサイトカインを子宮内に分泌していた。それらの多くは伸長胚のレセプターに感知され、胚細胞内の細胞内シグナル伝達系が活発になり、上皮間葉系転換に関わる因子群を発現していた。伸長胚と子宮内膜を上皮細胞系のマーカーであるサイトケラチン抗体で染色すると胚も子宮上皮細胞もポジティブに反応した。ところが、間葉系細胞マーカーであるビメンチンで染色した時には伸長胚だけが染色像を示し、子宮上皮細胞に染色は認められなかった。次に、上皮系細胞カドヘリン（E-cadherin）と間葉系細胞カドヘリン（N-cadherin）を検証したところ、間葉系細胞カドヘリンだけが見つかった。このことから、伸長胚は上皮系細胞の性質の残しながら、間葉系細胞の機能を示していたことになる。さらに、この間葉系カドヘリンの発現は一過性であったことから、胚が子宮に強固に接着する時には、胚細胞自らが上皮間葉系転換を起こし、子宮上皮細胞に接着していくことが窺われる。

本研究による成果は、妊娠子宮における胚と接着機構がより明確になったことから、学術上だけではなく、妊娠性が下がり続けているウシ生産現場においても妊娠補助剤の開発という観点から貢献するところが多く、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文に価値あるものと認めた。