



# 論文内容要旨

## 第1章 序 論

哺乳動物の卵管は、受精及び胚の初期発生が起こる場として生殖過程上重要な器官である。最近、これら卵管内で起こる現象に卵管上皮細胞が非常に重要な役割を果していると考えられている。しかし、卵管上皮細胞の生殖過程における機能及び細胞分化に関する系統的な研究はほとんど行われていない。本研究では、これまで卵管上皮細胞に関して比較的研究が進んでいたゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) を材料に、卵管上皮細胞の生殖過程における機能及び細胞分化の機構を明らかにするために以下の研究を行った。第1章では、卵管上皮に存在する分泌細胞の微細構造を電子顕微鏡により詳細に調べ、分泌細胞の部位差を検討した。第2章では、卵管内で起こる諸現象に深く関与していると考えられている卵管糖タンパク質 (ZP-O) の局在を、モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法及び免疫電顕法により調べ、ZP-O の生理機能について考察した。第3章では、卵管上皮細胞の形態的な分化を電子顕微鏡により詳細に調べ、第4章では卵管上皮における ZP-O の出現時期を調べ、それらの結果を基に卵管上皮細胞の分化と ZP-O の関係について考察した。第5章では、卵管上皮細胞の分化と ZP-O の合成に対する性ステロイドホルモンの影響を調べ、卵管上皮細胞の分化の機構について考察した。

### ① 卵管上皮分泌細胞の微細構造

卵管上皮は絨毛細胞と分泌細胞の2種類の細胞により構成されている。分泌細胞は、卵管液の成分となる物質を盛んに合成・分泌している。分泌物の多くは分泌顆粒内に存在していると考えられている。電子顕微鏡による観察の結果、ゴールデンハムスターの卵管上皮分泌細胞は、卵管の部位によって微細形態が異なることが明らかになった。特に、分泌顆粒を含めた顆粒状構造に顕著な部位差が認められた。排卵された卵子の取り込みを行う采部の分泌細胞には、高電子密度及び低電子密度の内容物を含む2種類の分泌顆粒と、電子密度の高い無構造の内容物をもつ多数の顆粒状構造が存在していた。受精の場である膨大部の分泌細胞には、中程度の電子密度の分泌顆粒が存在していた。また初期胚が発生を進めながら通過する峡部の分泌細胞は、中程度の電子密度の内容物をもつ分泌顆粒と、それら分泌顆粒と頻繁に融合するライソゾームとみられる小胞状顆粒が多数存在していた。卵管各部位の分泌細胞の分泌顆粒は、それぞれに特徴的な形態の内容物を含んでいた。分泌物は開口分泌によって放出されていた。

### ② 卵管糖タンパク質 ZP-O の局在

ZP-O に対するモノクローナル抗体 C11E8 を用いて卵管上皮及び排卵卵子における ZP-O の局在を調べた。その結果、卵管上皮において、C11E8 は分泌細胞の分泌顆粒及びゴルジ体に反応した。C11E8 は絨毛細胞に全く反応しなかった。C11E8 の反応を定量的に検討した結果、

膨大部と峽部のほとんどの分泌細胞で強い反応がみられたが、采部ではわずかな反応しか認められなかった。一方、排卵卵子において、C11E8の反応は透明帯及び囲卵腔に認められた。透明帯での反応は、透明帯の外側から内側にかけてほぼ全体に認められたが、その反応を定量的に検討した結果、透明帯の中央部で最も強いことが明らかになった。未排卵（卵巣）卵子の透明帯には全く反応は認められなかった。これらの結果から、ZP-Oは主に卵管膨大部と峽部の分泌細胞により合成・分泌され、卵管腔に分泌されたZP-Oは卵管液の成分となり、排卵された卵子の透明帯及び囲卵腔物質に結合することが明らかになった。また分泌細胞によるZP-Oの合成には卵管の部位で差があり、さらにZP-Oの透明帯への結合にも透明帯の部位によって差があることが明らかになった。

ヒアルロニダーゼ処理した排卵卵子において、透明帯の外側3分の1でC11E8の反応の減少がみられた。この原因は明らかではないが、透明帯の他の部位ではみられないことから、透明帯の外側で特異的に起こる現象であると考えられる。またこの結果は、透明帯の性質が部位によって異なる可能性を強く示唆している。

### ③ 卵管上皮細胞の分化

新生児ゴールデンハムスター卵管上皮細胞の分化過程を電子顕微鏡により調べた。出生直後ほとんどの上皮細胞は形態的に未分化であった。生後3.5日に初めて繊毛形成像が観察され、その後分化した繊毛細胞が多数認められた。一方、分泌細胞の分化は生後10.5日から始まり、15.5日にかけて頻繁に認められた。このようにゴールデンハムスターの卵管上皮細胞は、まず繊毛細胞が分化を始め、その後かなり遅れて分泌細胞が分化することが明らかになった。

### ④ 卵管上皮細胞の分化とZP-Oの関係

モノクローナル抗体C11E8を用いてZP-Oの合成開始時期を調べた。その結果、ZP-Oは生後9日から10日にかけて卵管上皮に出現することが明らかになった。微細構造的には、ZP-Oは分化開始間もない分泌細胞のゴルジ体及び分泌顆粒に存在していた。繊毛細胞ではZP-Oは全く検出できなかった。これらの結果から、ZP-Oは分泌細胞の分化に伴って合成される物質であることが明らかになった。またこのことはZP-Oは分泌細胞の分化形質の一つであることを示唆している。

### ⑤ 卵管上皮細胞の分化に対するステロイドホルモンの影響

卵管上皮細胞の分化に対するエストロジェン及びプロジェステロンの影響を調べた。新生児ゴールデンハムスターにエストラジオール17- $\beta$ 及びプロジェステロンを投与し、未分化上皮細胞の形態変化を観察した。その結果、エストラジオール17- $\beta$ 投与は未分化細胞での繊毛形成及び分泌顆粒の産生を誘導した。一方、プロジェステロンは繊毛形成は促進したが、分泌顆粒の産生には全く影響しなかった。これらの結果から、エストロジェンは繊毛細胞と分泌細胞の両

方の細胞分化を誘導することが明らかになった。一方、プロジェステロンは絨毛細胞の分化は促進するが、分泌細胞の分化には影響していないことが示唆された。またこのことは、絨毛細胞と分泌細胞とでは分化に対するステロイドホルモンの影響が異なる可能性を示唆している。

エストラジオール17- $\beta$ を投与した卵管において、絨毛形成像を示す分泌細胞が観察された。このようなモザイクタイプの細胞の存在は、絨毛細胞と分泌細胞の相互転換の可能性を示唆している。

最後に、新生児ゴールデンハムスター卵管でのZP-O生合成に対するエストラジオール17- $\beta$ 及びプロジェステロンの影響を調べた。その結果、卵管上皮におけるZP-Oの出現は、エストラジオール17- $\beta$ 投与により誘導されることが明らかになった。一方、プロジェステロン投与ではそのような誘導効果はみられなかった。これらの結果から、分泌細胞によるZP-Oの合成はエストロゲンによって制御されていることが示唆された。

本研究の結果から、生殖過程における卵管上皮細胞及び卵管糖タンパク質の機能、そして卵管上皮細胞の分化機構に関して以下に示す可能性が考えられる。

1) ゴールデンハムスター卵管上皮の分泌細胞に存在する分泌顆粒は、形態的及び免疫組織化学的な部位差を示すことから、卵管各部位の分泌物は異なった性質のものであると考えられる。この分泌細胞の部位差の生理的な意義は明らかではない。しかし卵管の各部位ではそれぞれ異なった現象が起こり、それらの現象には上皮細胞由来の分泌物が深く関与していると考えられる。卵管上皮分泌細胞の部位差は、卵管内で起こる現象に対応した変化である可能性が考えられる。

2) 卵管糖タンパク質ZP-Oは、卵管上皮の分泌細胞により分泌され、排卵された卵子の透明帯及び囲卵腔物質に結合する。ZP-Oは透明帯の中央部に最も多く結合し、透明帯に何等かの変化をもたらしていると考えられる。本研究で得られた結果と他の研究結果を併せて考えると、ZP-Oのような透明帯結合卵管糖タンパク質の生理機能は、透明帯に結合しその性質を変えることであると考えられる。特に、受精において重要な役割を果たしている可能性が考えられている。

3) 卵管上皮細胞はある秩序をもって分化するが、その分化にステロイドホルモンが関与している可能性が示唆された。絨毛細胞と分泌細胞では、分化のパターン及び分化に対するホルモンの影響が異なることから、両種の細胞の分化は異なったメカニズムによって制御されていると考えられる。この違いがどのようなレベルで生じているかは今後の重要な研究課題である。

4) ZP-Oは分泌細胞の分化形質の一つであることが示された。このことは、これまで形態的な指標によってのみ行われてきた卵管上皮細胞の分化の研究を物質レベルでの研究に広げる可能性を示している。

本研究は、哺乳動物の卵管上皮細胞を多角的そして系統的に研究した最初の研究であり、生殖過程における卵管上皮細胞、そして卵管という器官の生理機能を解明する上で、今後の研究に多くの示唆を与えている。

## 論文審査の結果の要旨

哺乳動物の卵管は、受精および初期発生の起こる場として生殖過程上重要な器官である。その機能には卵管上皮細胞、特に分泌細胞が卵管液を合成、分泌するという形で深く関与していると考えられているが、その機能分化に関する研究はほとんど行われていない。

本論文は先ずハムスター卵管上皮細胞の電子顕微鏡的観察を行い、卵管上皮の部域によって分泌顆粒の微細構造が異なることを明かにした。このことは分泌物に部域差のあることを示している。次に、卵管糖タンパク質 (ZP-O) に対するモノクローナル抗体 (C11E8) を用いてこの糖タンパク質の局在を組織化学的に検討した結果、膨大部と峽部の分泌細胞のゴルジ体および分泌顆粒に反応が認められた。又、排卵された卵子の透明帯と囲卵腔にも反応があり、その結果、ZP-O 抗原はこの部域の分泌細胞から分泌されて卵管液の成分となり、卵子の透明帯と囲卵腔の物質に結合すると考えられた。

一方、卵管上皮細胞の分化と ZP-O 抗原との関係を検討したところ、この抗原は分泌細胞が形態的に分化する時期のゴルジ体と分泌顆粒に検出された。これは分泌細胞の機能分化を示すものである。又、ホルモンの作用としてエストロジェンとプロゲステロンの影響を検討した。その結果、エストロジェンは卵管上皮細胞において分泌細胞と絨毛細胞の両者を誘導し、プロゲステロンは絨毛細胞の分化のみを促進することが明らかとなった。この結果はこれらの細胞種が異なった誘導機構によって分化することを意味している。さらに、エストロジェンを投与された卵管においては絨毛細胞と分泌細胞の両者の形態的特徴を合わせ持つモザイク状の細胞が観察され、このことから両者が相互に転換する可能性が示唆された。

この成果は哺乳類の生殖に関与する卵管上皮分泌細胞の機能分化についての新しい知見である。従って、この論文は著者がこの分野において自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、よって阿部宏之提出の論文は、理学博士の学位論文として合格と認める。