

**P-493** ヒト子宮内膜における calpain の存在と活性化型 calpain の細胞機能への影響

名古屋市立大

青山和史, 尾崎康彦, 佐藤 剛, 松原寛和, 岡田英幹, 杉浦真弓, 生田克夫, 鈴木 薫

【目的】ヒト子宮内膜における calpain の局在と, 活性化型 calpain の細胞接着に關与する integrin $\beta$ 3, talin 及び細胞骨格, 細胞表面蛋白の機能調節を担う fodrin に対する影響を検討した。

【方法】正常月経周期を有する患者より同意のもとに得た子宮内膜組織及び常法により分離した内膜上皮と間質培養細胞を実験に供した。前駆体及び活性化型 calpain と, in vitro で基質であることが報告されている integrin $\beta$ 3, talin, fodrin のペプチド抗体を作製し, 光学及び共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色法と SDS-PAGE, Western Blotting 法によってその動態を観察した。

【成績】免疫染色法で内膜上皮と間質細胞において前駆体型 calpain は主に細胞質に観察され, 低酸素培養下で活性化型 calpain の細胞膜近傍での染色性が増加した。integrin $\beta$ 3, fodrin は主に細胞膜近傍に観察され, 低酸素培養下でその染色性は低下した。talins の calpain 特異的分解産物 (TDP) の染色性は通常培養下においても細胞膜近傍に観察され低酸素培養下で染色性が増加した。黄体期ヒト子宮内膜組織では活性化型 calpain, fodrin, integrin $\beta$ 3 は TDP の局在と一致した。Western Blotting では低酸素培養によって前駆体型 calpain, fodrin, integrin $\beta$ 3 の染色性が減少し, 通常培養でも存在した活性化型 calpain と TDP の染色性の増加が観察された。

【結論】ヒト子宮内膜組織及び細胞レベルにおいて, 活性化型 calpain の生理的作用への関与の可能性が示唆された。また低酸素状態などによって過剰に活性化された calpain が integrin $\beta$ 3, fodrin, talin を分解し, 子宮内膜の機能障害を惹起することが考えられた。

**P-494** Src ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤 PP1 は子宮内膜間質細胞の分化を促進する慶應大<sup>1</sup>, 横浜・けいゆう病院<sup>2</sup>清水重紀<sup>1</sup>, 丸山哲夫<sup>1</sup>, 山本百合恵<sup>2</sup>, 酒井のぞみ<sup>1</sup>, 下木明香<sup>1</sup>, 升田博隆<sup>1</sup>, 吉村泰典<sup>1</sup>, 野澤志明<sup>1</sup>

【目的】われわれはこれまで, 子宮内膜間質細胞の分化 (脱落膜化) 過程で c-Src のチロシンキナーゼ活性が上昇することを報告してきた。今回は, 脱落膜化における c-Src の役割を明らかにするために, Src ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤である PP1 の in vitro 脱落膜化に対する影響を検討した。

【方法】患者の同意を得て摘出した良性疾患子宮の内膜より間質細胞を分離・純化した後, 性ステロイド (17 $\beta$ -estradiol + progesterone) ならびに PP1 の存在下で培養し, 形態変化に加えて脱落膜化マーカーである IGFBP-1 の発現を解析し, 脱落膜化の指標とした。また, 活性化型 c-Src (チロシン530脱リン酸化型) を認識するモノクローナル抗体 clone 28 を用いたウェスタンブロットにより活性化型 c-Src の発現を, さらに, in vitro キナーゼアッセイにより c-Src のキナーゼ活性についても検討した。

【成績】脱落膜化の際に活性化される c-Src は, PP1 (0.1~1 $\mu$ M) の存在下において抑制されず, 逆に活性化型 c-Src の発現増強とそのキナーゼ活性の上昇を認めた。また, PP1 は, 形態的な脱落膜様変化を促進するのみならず, IGF-BP1 発現を濃度依存性に約10倍程度増強した。

【結論】至適濃度下において PP1 は逆に c-Src を活性化し, その挙動とほぼ一致してステロイド依存性の脱落膜化が促進された形態的にも機能的にも in vitro 脱落膜化が促進された。C-Src はチロシン530の脱リン酸化とキナーゼ活性の上昇を通じて脱落膜化をまさに制御することが示唆された。

**★P-495** Melanoma cell adhesion molecule (MCAM) 発現を指標としたヒト Extravillous trophoblast の分化機構の解析京都大<sup>1</sup>, 京都・日本バプテスト病院<sup>2</sup>, 大阪・新香里病院<sup>3</sup>樋口壽宏<sup>1</sup>, 江川晴人<sup>2</sup>, 佐藤幸保<sup>1</sup>, 西岡良泰<sup>1</sup>, 吉岡信也<sup>1</sup>, 山田成利<sup>3</sup>, 藤原 浩<sup>1</sup>, 藤井信吾<sup>1</sup>

【目的】ヒト胎盤を構成する trophoblast は, 絨毛を形成する villous trophoblast (VT) と子宮内膜に浸潤し胎盤循環の確立に關与する extravillous trophoblast (EVT) に分化する。VT に関しては hCG 産生等の機能を指標に分化機構を含めた解析が行われてきたが, EVT に関しての詳細は不明である。そこで今回 EVT に対してマウス単クローン抗体 (mAb) を作製し, 得られた分子情報を基に EVT の分化機構の解析を試みた。

【方法】ヒト EVT を含む妊娠後期卵膜を免疫源に mAb を作製した。その中で免疫組織染色法にて EVT に特異的に反応する mAb CHL1 を選別し, その認識抗原 (CHL1 抗原) を cDNA パニング法により同定した。次に CHL1 抗原発現陽性のヒト絨毛癌細胞株 JEG3 を用いて種々の刺激による CHL1 抗原の発現変化を検討した。なお, ヒト由来組織は文書による同意を得たものを用いた。

【成績】CHL1 抗原はヒト EVT における特異的な発現が既に報告されている Melanoma cell adhesion molecule (MCAM) であることが明らかになった。JEG3 細胞において脱落膜組織との共培養により MCAM の発現増強が観察されたが, 脱落膜組織での産生が報告されている IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 3 等の添加では明かな変化は認められなかった。一方 Forskolin による細胞内 cAMP の増加は JEG3 細胞における MCAM 発現を増強した。

【結論】今回 EVT に特異的に発現する MCAM を指標とした解析により, 絨毛癌細胞株 JEG3 において脱落膜由来因子及び細胞内 cAMP の増加が MCAM の発現を増強することが明らかになった。これらの結果より EVT の分化機構に脱落膜因子が關与する可能性, 更に従来 VT の分化機構への関与が知られていた cAMP が EVT の分化にも關与する可能性が示唆された。