

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

西島 千絵

専攻分野：産婦人科学

コース：

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

Regulation of Preimplantation Embryo Development in Mice by FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand

(FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Ligandはマウスにおける着床前期胚の発育を調整する)

共著者：

Kazuhiro Kawamura, Naoki Okamoto, Yorino Sato, Nanami Kawamura, Bunpei Ishizuka, Mamoru Tanaka, Nao Suzuki

緒言

良好着床前期胚の発育は生殖に必須の過程であり、生殖管より分泌される成長因子は、着床前期胚の発育に重要な働きを示す。FMS-like tyrosine kinase-3(FLT3)は、コロニー刺激因子1受容体やc-KITに関連したチロシンキナーゼ受容体として知られており、それらのリガンドと結合することで着床前期胚の発育を促進する。今回我々は、マウスを用いて着床前期胚の発育におけるFLT3リガンド/FLT3シグナルの役割を検討した。

## 方法・対象

実験には 25 日齢の B6D3F1 マウスを用いた。着床前期胚を得るために過排卵処理後に交配させ、卵管より 2 細胞期胚を回収し培養した。また、未交配マウスの卵管膨大部より成熟未受精卵（卵子）を回収した。リアルタイム PCR 法を用いて、卵子、着床前期胚、卵管および子宮における FLT3 リガンドおよび FLT3 の mRNA 発現を解析した。また、胚発育促進作用を確認するために、2 細胞期胚に FLT3 リガンドおよび FLT3 阻害剤を添加し体外培養を行った。さらに、2 細胞期胚に FLT3 リガンドを添加した上で、PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) 経路の阻害剤および不活性化アナログを添加し体外培養を行った。拡張胚盤胞期胚におけるアポトーシスと FLT3 シグナルの関連を、TUNEL 法を用いて評価した。統計方法は One-way ANOVA の後、ポストホックテストとして Fisher' s PLSD を用いた。

動物実験承認番号：1204007 号

## 結果

交配後の 2 日及び 4 日のマウス卵管および子宮において、FLT3 リガンドが発現していることを見出した。また、その特異的受容体である FLT3 は着床前期胚の全ての発育ステージで発現が認められ、特に 8 細胞期胚以降にその発現が増加した ( $p < 0.05$ )。一方、FLT3 リガンドの着床前期胚における発現は、桑実期胚以降ではほとんど認めなかった。着床前期胚の体外培養において、FLT3 リガンドは濃度依存性にその発育を促進し、孵化後胚盤胞期胚到達率は対照群で 37%であったのに対し、FLT3 リガンド 1、3、10 ng/ml 添加群でそれぞれ  $48 \pm 2.2$ 、 $53 \pm 4.8$ 、 $57 \pm 3.1\%$  と有意に増加した ( $p < 0.05$ )。また FLT3 リガンドおよび FLT3

の抑制剤である TSC359 を添加したところ、孵化後胚盤胞期胚への胚発育は阻害された ( $p < 0.05$ )。FLT3 リガンドを添加し、胚盤胞培養を行ったところ、内部細胞塊の総細胞数は対照群  $66 \pm 5.5$  に対し、FLT3 添加群  $89 \pm 6.7$  と有意な細胞増殖を伴っていた ( $p < 0.05$ )。一方、細胞死の抑制効果は認めなかった。さらに、FLT3 リガンドおよび PI3K 阻害剤である LY294022 を添加したところ、胚発育促進作用は抑制された ( $p < 0.05$ )。しかし、不活性化アナログである LY303511 を添加すると濃度依存性に抑制されず、さらに LY294022 を添加すると FLT3 リガンドによる胚盤胞の細胞増殖促進作用が抑制された ( $p < 0.05$ )。

## 考察

今回の研究により、FLT3 リガンドの初期胚における発育促進作用を明らかにした。このことから、*in vitro* における初期胚発生に FLT3 リガンドが重要な役割を果たしていると考えられる。FLT3 リガンド mRNA は、卵子および 2 細胞期胚において高い発現を示したが、その後の 4 細胞期胚では低下しており、これは初期胚の FLT3 リガンド mRNA が母性由来であることを示唆する。一方で、卵子や 2 細胞期胚から 4 細胞期胚における FLT3 mRNA 発現が低いことから、*Flt3* の転写は胚性ゲノムの活性化がトリガーとなっている可能性がある。また、8 細胞期胚から孵化後胚盤胞期胚において FLT3 の発現が高いことから、FLT3 リガンドが初期胚への発育促進作用を有している可能性がある。FLT3 リガンドの発現は卵管および子宮に認められるため、この FLT3 リガンドの作用はパラクライン経路によると考えられる。FLT3 リガンドは着床前期胚の発育を促進し、この作用は FLT3 阻害剤である TSC359 により抑制されたことから、FLT3 リガンドは初期胚における細胞機能を制御している可能性がある。FLT3 リガンドの胚発育促進作用は、細胞増殖を伴っていた

が、細胞死の抑制効果は認めなかった。また、特異的な阻害剤を用いて、FLT3 リガンドの初期胚発育促進作用における PI3K シグナル経路の関与について示した。

着床前期胚は妊娠 4 日目まで卵管で発育し、後期桑実期胚、胚盤胞期胚になると子宮へ移動するため、着床前の段階で卵管および子宮における FLT3 リガンドの発現が増加することは、パラクライン経路による FLT3 リガンド/FLT3 シグナルの初期胚発育促進のためと考えられる。

## 結論

FLT3 リガンド/FLT3 シグナルはパラクライン経路により、着床前期胚の発育を制御する重要な因子である。今後、個々の胚発育段階において不可欠である重要な因子を含む胚培養液を開発することが、将来、体外受精および胚移植における着床前期胚の最適な培養環境を作成する一助となり得ると考えられた。