

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 13 年度博士課程 入学

氏 名 石井 万幾

指導教員名 九郎丸正道

論文題目 マウス胎仔生殖腺発生過程において発現する MFG-E8 の細胞接着活性
および機能の解析

MFG-E8 (milk fat globule-EGF factor 8) はマウス乳腺上皮由来の細胞外分泌タンパクで、マウスだけでなくヒト (lactadherin/BA46)、ウシ (PAS-6/7)、ブタ (P47)、およびラット (rAGS) においてもそのホモログが単離されている。MFG-E8 は 2 つの連続した EGF ドメインと 2 つの discoidin ドメインからなる。2 番目の EGF ドメイン内には、細胞膜タンパクであるインテグリン $\alpha v\beta 3$ および $\alpha v\beta 5$ と結合する RGD 配列が存在している。一方、discoidin ドメインは、血液凝固第 V および第 VIII 因子が有する C ドメインと高い相同性があり、細胞表面に露出した、細胞膜リン脂質であるフォスファチジルセリン (PS) やフォスファチジリエタノラミン (PE) と結合することが知られている。MFG-E8 は、これら 2 つの細胞接着ドメインを用いて、細胞-細胞間接着を行っている。

MFG-E8 の発現は、乳腺上皮だけでなく、脳、心臓、腎臓、脾臓、肺、肝臓および小腸、またマクロファージ、樹状細胞、骨芽細胞、精子細胞などのような、様々な器官・細胞において認められている。これらの器官・細胞における MFG-E8 の機能は不明な点が多いが、現在報告されていることは、受精時の卵子-精子結合を行う接着分子として

の役割、生理的血液凝固の阻害、乳児が MFG-E8 を乳汁とともに摂取することによるウイルス感染の防御、マクロファージが MFG-E8 を分泌し、アポトーシス細胞と接着する、などである。

さて近年、MFG-E8 は新たにマウス生殖腺発生過程において発現していることが報告された。生殖腺の発生は、胎齢 10.5 日頃の中腎腹側の隆起に始まり、始原生殖細胞の侵入、体腔上皮の分裂・分化に伴って、胎齢 11.5 日頃には生殖腺と中腎の境界が明瞭となる。この時期の生殖腺-中腎境界部領域の体細胞において MFG-E8 の発現が見られ、形態学的な雌雄差を認めることができる胎齢 12.5 日においては、生殖腺間質領域に発現するようになる。しかし、この発現は、胎齢 13.5 日頃では低下し、15.5 日では見られなくなる。このように、生殖腺発生過程において一過性に限局した発現を見せることは分かっているが、その細胞接着分子としての機能は不明である。そこで、本研究において、MFG-E8 の細胞接着性を検討し、胎仔生殖腺での機能を解析した。

第 1 章では、MFG-E8 の各ドメインにおける GST 融合タンパクを用いて、胎齢 10.5 から 15.5 日の生殖腺細胞の接着性を検討した。EGF ドメインへの接着性は、胎齢 11.5 日をピークとした、胎齢特異性を見せ、さらに接着細胞には伸展が認められた。このことから、EGF ドメインへの接着は RGD 配列依存적であると考えられた。discoidin ドメインへの接着は胎齢とは無関係に恒常的であり、細胞伸展も認められなかった。次に、接着した細胞が体細胞か生殖細胞かを同定するために、ステロイド産生細胞のマーカーである SF1/Ad4BP 抗体と、生殖細胞を染め分けるアルカリフォスファターゼ染色を行い、① SF1/Ad4BP 陽性細胞、②生殖細胞、③SF1/Ad4BP およびアルカリフォスファターゼ陰性細胞、の 3 種類に分類して、それらの細胞数を検討した。その結果、接着前全生殖腺細胞の 3 種類の割合と比較して、EGF、discoidin とともに有意な差は認められなかった。これらのことから、MFG-E8 は、自身の周囲に存在している細胞で、インテグリン、あるいは PS か PE を発現しているものであれば、生殖細胞、体細胞に限らず接着することができると考えられた。

第 2 章では、前章において、RGD 配列依存적細胞接着が認められたことから、RGD 配列のターゲットであるインテグリン $\alpha\beta 3$ および $\alpha\beta 5$ の、胎仔生殖腺での発現パターンを、whole mount *in situ* hybridization を用いて解析した。また、それらの発現細胞が生殖細胞か体細胞かを検討するために、妊娠 9.5 日マウスに抗癌剤であるブスルファンを投与し、その胎仔の生殖細胞を破壊した生殖腺サンプルにおける、インテグリン $\alpha\beta 3$ および $\alpha\beta 5$ の whole mount *in situ* hybridization を行った。その結果、インテグリン $\alpha\beta 3$ は胎齢 10.5 から 15.5 日にかけて雌雄ともに、主に生殖細胞に mRNA の発現が認められたが、インテグリン $\alpha\beta 5$ は生殖腺内体細胞に発現していることが明らかとなった。インテ

グリンの発現細胞と MFG-E8 の発現領域を比較すると、胎仔生殖腺における MFG-E8 のレセプターは、体細胞で発現を見せるインテグリン $\alpha v\beta 5$ である可能性が高いと考えられた。

第 3 章では、MFG-E8 の生殖腺発生における機能を解析するために、MFG-E8 の discoidin ドメインのターゲットである PS と特異的に結合するタンパクである、アネキシン V を添加した培養液による、胎齢 11.5 日生殖腺の器官培養を行った。この discoidin ドメインの阻害を行うことにより、生殖腺内においてほとんど認められなかったアポトーシス細胞が、MFG-E8 発現領域で有意に増加していることが TUNEL 染色により示された。MFG-E8 の生殖腺発生における役割は、前述した MFG-E8 の機能の一つであるアポトーシス細胞とマクロファージの架橋ではないかと考え、生殖腺内に局在するマクロファージを確認するために、マーカーである F4/80 抗体を用いて、MFG-E8 抗体との免疫二重染色を行った。その結果、生殖腺内に F4/80 陽性を示すマクロファージは存在せず、MFG-E8 タンパクとの関連性が否定された。さらに、アネキシン V 添加培養生殖腺に見られる形態学的変化をより詳細に解析する目的で、電子顕微鏡を用いた観察を行った。MFG-E8 発現が見られる生殖腺間質領域に存在する細胞は、雌雄ともに、豊富なミトコンドリアと小胞体、指状に伸びた微絨毛、という共通の、未分化間葉系細胞の特徴を備えていた。しかし、これらの中で、細胞質内に脂肪滴を持つ細胞が存在し、これらは分化したステロイド産生細胞だと考えられた。アネキシン V 添加培養によりこれらの細胞は、未添加群と比較して数の増加が見られ、また貪食されずに残存しているアポトーシス細胞（アポトーシス小体）を多数、確認することができた。これらのことから、MFG-E8 は生殖腺発生過程において間質領域で発現し、間質領域に存在するステロイド産生細胞や未分化間葉系細胞にアポトーシス誘導が起ると PS が露出され、そのアポトーシス細胞と、それを貪食するインテグリンを発現した近隣の細胞との架橋を行っていると考えられる。

胎仔器官形成において、アポトーシス誘導および貪食は重要な機構である。MFG-E8 は、生殖腺形態形成に際して、間質領域の細胞数を一定に保つようにプログラムされたアポトーシスの過程において、アポトーシス細胞と貪食細胞の架橋を行っていると考えられる。この間質領域のアポトーシスにより、間質領域の容積は異常に増加することなく、中腎からの生殖腺隆起に伴う生殖腺実質領域の発達が促されるものと推測できる。本研究において MFG-E8 の機能解析とともに、これまでほとんど報告がなかった生殖腺形態形成における、生殖腺実質に対する間質領域の影響について明らかにした。このことは、今後の生殖腺形成の研究に大きく寄与するものであると考えている。