

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石井 万幾

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、生体内の様々な器官・細胞で発現が認められる。MFG-E8 およびそのホモログの機能として、受精時の卵子-精子結合、生理的血液凝固阻害、乳児の腸管におけるウイルス感染防御、マクロファージとアポトーシス細胞の架橋などが知られている。MFG-E8 は2つの EGF ドメインと2つの discoidin ドメインからなる接着分子であり、discoidin ドメインを用いて細胞膜に結合し、エクソサイトーシス様分泌を行うことが知られている。2番目の EGF ドメイン内の RGD 配列はインテグリン $\alpha\beta 3$  および $\alpha\beta 5$  と結合し、2番目の discoidin ドメインはフォスファチジルセリン (PS) やフォスファチジエタノラミン (PE) を認識する。マウス生殖腺発生過程において MFG-E8 は胎齢 11.5 日から 12.5 日頃の生殖腺-中腎境界部の体細胞周囲や体腔上皮下の間質領域に発現が見られるが、その機能は明らかでない。そこで本論文では、MFG-E8 の細胞接着性と MFG-E8 の標的となる生殖腺細胞を検討し、胎仔生殖腺での機能を解析した。まず、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 adhesion assay で検討した。EGF ドメインに対して胎齢 11.5 日をピークとした胎齢特異的接着性が見られ、discoidin ドメインへは恒常的接着性が見られた。またこれらのドメインに接着できる細胞は、生殖細胞や生殖腺内体細胞といったいずれの細胞でも可能であることを SF1/Ad4BP 抗体 (体細胞マーカー) による免疫染色およびアルカリフォスファターゼ染色により示した。

次に MFG-E8 の EGF ドメインの標的であるインテグリン $\alpha\beta 3$  および $\alpha\beta 5$  の mRNA の胎齢 10.5 日から 13.5 日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。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。これらの発現パターンと MFG-E8 タンパクの局在を比較すると、雄生殖腺においてターゲットとなるイ

ンテグリンは間質領域に発現している $\alpha\beta 5$ であり、雌生殖腺では MFG-E8 が見られる領域に生殖細胞も接していることから、 $\alpha\beta 3$  あるいは $\alpha\beta 5$  のいずれもターゲットであると考えられた。

さらに MFG-E8 の生殖腺発生における機能を解析するために、まず MFG-E8 の 2 番目の discoidin ドメインの標的である PS と特異的に結合するタンパクであるアネキシン V 添加培養液、および GST-discoidin 添加培養液による生殖腺器官培養を行って、両者で見られた形態学的変化を比較した。アネキシン V 添加により、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。またこの領域の細胞を透過型電子顕微鏡で観察すると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。GST-discoidin 添加器官培養では、アネキシン V 添加培養生殖腺と類似した形態学的変化が見られたと同時に、間質領域の体細胞間の接着性脆弱による体腔上皮の剥離や細胞間隙の拡張が見られた。生殖腺発生過程においてアポトーシス細胞を処理している細胞がマクロファージであるのかどうかを確認するために、マーカーである F4/80 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、生殖腺内において F4/80 陽性細胞は間質領域に局在していることが確認された。しかしその細胞数は、MFG-E8 発現細胞数よりはるかに少数であるため、マクロファージではない細胞も MFG-E8 を産生していると考えられる。

以上のことから MFG-E8 の生殖腺発生過程での機能は、間質領域における貪食の架橋、あるいは間質領域での細胞-細胞間接着を強固にすることによる形態維持という 2 つの可能性が考えられる。いずれの可能性においても、MFG-E8 が持つ細胞接着性は生殖腺形態形成・維持に非常に重要な役割を担っていると考えられる。本論文は、生殖腺発生学分野において、MFG-E8 の接着分子としての役割を生殖腺間質領域の生殖腺形態形成という観点から検討し、多くの新知見を提供した。これらの成果は、獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学術論文として価値あるものと認めた。