

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Cross-Talk between Fas/Fas Ligand System and Nitric Oxide in the Pathway Subservicing Granulosa Cell Apoptosis – A Possible Regulatory Mechanism for Ovarian Follicle Atresia

和訳 顆粒膜細胞のアポトーシス誘導における Fas/Fas リガンドシステムと Nitric Oxide のクロストーク…… — 卵胞閉鎖機序に関する新たな視点

指導教官 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

2001 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 陳 秋梅

【緒言】

ヒトでは、卵巣内の卵胞は gonadotropin の刺激により recruitment され発育を開始するが、通常一つの卵胞が主席卵胞として選択され、他の卵胞は発育が遅延し、やがて閉鎖に至る。この卵胞の選択的発育と閉鎖の誘導・調節機構については未だ不明な点が多く、その分子・細胞レベルでの解明は、排卵障害を有する不妊症の診断法、治療法の確立に重要な課題である。最近、卵胞閉鎖は顆粒膜細胞(GC)のアポトーシスを介して起きることが明らかになった。

I型膜貫通タンパク質の Fas (APO-1/CD95)は、Fas リガンドとの相互作用によりアポトーシスを誘導することが免疫細胞において報告されている。我々のグループは、1996年、免疫細胞以外では初めて GC において、そのアポトーシス誘導過程に Fas/Fas リガンドシステムが関与することを世界に先駆けて発表している。

ガス情報伝達物質としての一酸化窒素(nitric oxide、NO)は、生体内では L-アルギニンを基質として NO 合成酵素 (nitric oxide synthase;NOS) によって生成される。NOS には現在までに、血管内皮型 (endothelial NOS ;eNOS)、神経型 (neuronal NOS ; nNOS)、誘導型 (inducible NOS ; iNOS) の 3 種類の isoform の存在が知られている。特に、iNOS により産生される NO は、多彩な細胞・組織において細胞増殖およびアポトーシスを制御している。生殖内分泌領域においても、NO は性ステロイド産生、排卵、卵胞発育などに関与することが報告

されている。我々のグループは、卵巣において iNOS が健常な未熟卵胞の顆粒膜細胞に存在し、NO が卵胞発育・閉鎖の安定化因子としてその選択的発育を制御していることを明らかにしてきた。

現在、Fas/Fas リガンドシステムが誘導するアポトーシスのシグナル伝達機構は、GC においてまだ十分に明らかにされていない。本研究では、まずこのシグナル伝達機構を検証し、NO 情報伝達機構との間のクロストークについて検討した。

#### 【方法と結果】

##### (1) 細胞生存率

生細胞において mitochondrial dehydrogenase により MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] tetrazolium が formazan 産物に転換され蛍光発色するという性質を利用し、細胞生存率を解析した。Wistar 系幼若雌ラットより採取した GC の培養系に interferon  $\gamma$  (200 U/ml) を添加し Fas を強発現させた後、可溶性リコンビナント Fas リガンド (100 ng/ml) を添加した。48、72 時間後の細胞生存率は各々 0 時間の  $86.7 \pm 2.3$ 、 $77.6 \pm 1.7\%$  (平均値  $\pm$  SE、以下同様) に有意に減少した。また、Fas リガンド添加 30 分前に Caspase 拮抗剤を添加すると、細胞生存率は減少せず無添加群と同程度であった。

##### (2) Fas/Fas リガンドシステムのアポトーシス誘導に対する NO の効果

上記 GC 培養系において、Fas リガンドがアポトーシスを誘導するか否かを Hoechst 染色法、フローサイトメトリーにより検討した。Hoechst 染色法では、Fas リガンド添加 72 時間後のアポトーシス陽性率は  $18.2 \pm 0.7\%$  で、対照の  $6.5 \pm 0.8\%$  に対し有意に高かった。NO 供与剤 SNAP (0.5 mM) を Fas リガンドと同時に添加すると、GC のアポトーシス陽性率は  $6.2 \pm 0.7\%$  で、対照と同レベルに抑制された。また、フローサイトメトリーの分析では、Fas リガンド添加 72 時間後のアポトーシス細胞の割合は  $19.6 \pm 1.4\%$  で、対照の  $8.1 \pm 0.6\%$  に対して有意に高かった。SNAP (0.5 mM) と Fas リガンドの同時添加により、GC のアポトーシス細胞の割合は SNAP (0.05-0.5 mM) の濃度依存的に抑制された。

##### (3) アポトーシス関連タンパク質の発現量の変動

上記 GC 培養系において、Fas タンパク発現量、およびアポトーシス実行機構としての Caspase-3、-8、-9 の活性を Western blot 法にて検討した。Fas リガンド添加 72 時間後、Fas 発現量は対照の  $188.5 \pm 9.5\%$  に有意に増加し、SNAP (0.5 mM) の同時添加はこれに影響を与えなかった。一方、Fas リガンド添加により Caspase-3、-8、-9 の活性は、各々対照の  $201.7 \pm 6.0$ 、 $158.8 \pm 12.1$ 、 $141.3 \pm 15.7\%$  に有意に亢進した。SNAP と Fas リガンドの同時添加では、Caspase-3、-8、-9 の活性は各々対照の  $120.7 \pm 5.2$ 、 $112.3 \pm 2.0$ 、 $105.83 \pm 2.9\%$  に有意に低下した。

##### (4) Fas/Fas リガンドシステムの iNOS mRNA レベルへの影響

上記 GC 培養系において、Fas リガンド添加 72 時間後、GC の iNOS mRNA レベルが対照の  $61.1 \pm 6.1\%$  に有意に低下することを Real time RT-PCR 法により確認した。

## 【考察】

本研究により、ラット GC 培養系において、Fas/Fas リガンドシステムの細胞死シグナル伝達機構に Caspase カスケードが関与し Caspase-3、-8、-9 が活性化される一方で iNOS mRNA レベルは低下すること、および NO が Caspase-3、-8、-9 の活性を低下させ Fas-Fas リガンドシステムによるアポトーシス誘導効果を抑制することが明らかになった。

アポトーシス実行因子である Caspase は、特異的にアスパラギン酸残基の C 末端側を切断するシステインプロテアーゼである。これらのプロテアーゼには、核ラミナや細胞骨格のような特定の細胞内標的がある。これらの基質が切断されると、最終的に細胞死を引き起こす。アポトーシス誘導タンパク質は Caspase の活性化をもたらし、反対にアポトーシス抑制タンパク質は Caspase の活性化を抑制する。ヒトでは、少なくとも 14 の isoform が報告されている。細胞内での Caspase 活性化機構には、ミトコンドリアから流出したシトクロム c が Caspase-9 の活性化因子である Apaf-1 に結合する系と、Fas/Fas リガンドの複合体に直接結合する Caspase-8、-10 が活性化される系の 2 つがあるとされている。これらの系は、下流の Caspase-3、-6、-7 を活性化させ、そのシグナルを増幅させアポトーシスに至る。本研究で、Fas/Fas リガンドシステムが誘導するアポトーシス経路において Caspase-3、-8、-9 活性がすべて亢進していることから、GC では主要な 2 つの系がともに機能していることが示された。

最近、我々のグループはラット GC 培養系を用い、卵胞閉鎖誘導因子である gonadotropin-releasing hormone (GnRH)あるいは卵胞発育促進因子である EGF により GC の iNOS mRNA レベルが低下すること、および NO 供与剤の SNAP が、GnRH により誘導されたアポトーシスと EGF により促進された DNA 合成を抑制することを報告した。本研究では、Fas/Fas リガンドシステムによるアポトーシス経路の活性化により iNOS mRNA レベルが抑制されるが、反対に SNAP によりそのアポトーシス経路が抑制された。これは、NO が卵胞内の安定化因子として作用しており、卵胞発育促進因子・閉鎖誘導因子による NO レベルの低下により卵胞が発育・閉鎖のいずれかの方向をとる、という我々のグループの仮説を支持する結果であった。

NO が Fas/Fas リガンドシステムによるアポトーシス経路を不活化するメカニズムとして、本研究では、Caspase-3、-8、-9 活性に対する間接的・直接的抑制効果が示唆された。最近、cGMP の産生亢進、HSP70 の誘導、Bax の発現抑制、Bcl-2 の発現促進などが Caspase-3 活性の抑制に関与していることも諸家により報告されており、今後の詳細な検討が待たれる。

## 【結論】

ラット GC 培養系において、Fas/Fas リガンドシステムによるアポトーシス伝達機構と NO の抗アポトーシス情報伝達系との間にクロストークが認められた。両者の精緻なバランスが、卵胞の運命を決定していると考えられる。また、このクロストークに関する機序の探索により、種々の卵巣疾患の診断と治療に対する新たな指針が提示されるかもしれない。