

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成14年度博士課程 入学

氏名 峯畑 二子

指導教員名 酒井 仙吉

論文題目 The expression and anti-apoptotic function of cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) in ovarian granulosa cells

(卵巣顆粒層細胞における抗アポトーシス因子・cFLIP の発現とその役割)

哺乳類の卵胞は、原始卵胞から、卵母細胞が一層の顆粒層細胞で覆われた一次卵胞、顆粒層細胞が多層になった二次卵胞、さらに卵胞腔を形成し大きく成長した三次卵胞へと発達し、最終的に排卵される。しかし、99%以上の卵胞は様々な発育段階の途中で死滅し(卵胞退行)排卵まで至るものは全体の1%にも満たない。どのようなメカニズムで卵胞が選別されるかについては未だ不明な点が多いが、近年顆粒層細胞のアポトーシスが卵胞退行の引き金となることが明らかになってきた。まず顆粒層細胞がアポトーシス小体の形成やDNAの断片化等の典型的なアポトーシスによる死の形態を呈して死滅し、その後卵母細胞が死に至ることが、げっ歯類、家畜動物、ヒトを含む多くの哺乳動物で確認されている。分子レベルでも様々な因子が顆粒層細胞のアポトーシスに関わっていることがわかってきた。

哺乳類細胞にアポトーシスを誘導する因子として重要なものに Fas と Fas リガンド (FasL) がある。細胞膜上に存在する Fas に FasL が結合することによって、Fas の細胞膜内部分にアダプタータンパクの Fas associated death domain (FADD) が結合する。さらに、death effector domain (DED) を介して FADD に procaspase-8 が二量体となって結合す

ると procaspase-8 が切断されて活性型 caspase-8 となり、さらに下流の caspase が活性化された結果アポトーシスが完了する。様々な動物種の顆粒層細胞において、この FasL-Fas シグナルがアポトーシスの誘因となっていることが報告されているが、FasL と Fas の相互作用が必ずしもアポトーシスを起こす訳ではないことが多くの細胞で知られている。退行卵胞のみならず健常卵胞の顆粒層細胞でも FasL や Fas が発現していることから、FasL-Fas 結合によって誘起されるアポトーシスシグナルを止める機構が顆粒層細胞の生死を決定する要因であることが予測された。

最近、私たちは抗アポトーシス因子として知られる cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) の mRNA がブタの顆粒層細胞において発現していることを発見し、ブタ cFLIP の mRNA 配列を初めて同定した。Procaspase-8 はふたつの DED と酵素ドメインで構成されているが、cFLIP short form (cFLIP_S) はふたつの DED から成り、cFLIP long form (cFLIP_L) はそれに加えて偽酵素ドメインを持つ。このように cFLIP は procaspase-8 のホモログであり、どちらの isoform も procaspase-8 に競合することによって Fas を介したアポトーシスを抑制すると考えられている。これらの事実から、私は cFLIP が顆粒層細胞の生死決定因子であると予測し、本研究を行った。

第一章では、ブタ卵巣における cFLIP の発現レベルについて検討した。食肉処理場より成熟雌ブタの卵巣を採取し、それぞれの卵胞を開いて顆粒層細胞を分離し、顆粒層の状態を顕微鏡下で観察した。顆粒層がシート状になっているものを健常卵胞、シートが少しばらばらになり始めているものを退行初期卵胞、顆粒層細胞が完全にばらばらになっているものを退行卵胞の顆粒層細胞とし、それぞれから total RNA とタンパクを抽出した。ブタ cFLIP_S と cFLIP_L に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、cFLIP_S は発現量の差がみられなかったが、cFLIP_L の mRNA 発現量は退行に伴って減少することがわかった。また Western blotting による cFLIP タンパク発現量の解析では、cFLIP_S のタンパクは検出できなかった一方、顆粒層細胞の cFLIP_L はタンパクレベルでも卵胞退行に従って減少することが示された。次にブタ卵巣における cFLIP の局在を調べるため、*in situ* hybridization と免疫染色を行った。*in situ* hybridization の結果、健常な卵胞の顆粒層で cFLIP_L の mRNA が発現し、退行卵胞では減少することがわかった。また免疫染色においても、顆粒層の cFLIP タンパクは退行に伴って減少することが示された。以上から、ブタ卵巣の顆粒層細胞における cFLIP_L の発現量は健常卵胞で高く、退行に伴って減っていくことが示唆された。このような発現パターンから、cFLIP_L が顆粒層細胞のアポトーシスを抑制して卵胞の退行を制御していることが予測された。

ブタ cFLIP の抗アポトーシス活性を検討するため、第二章では顆粒層細胞由来の培養細胞を用いて実験を行った。はじめに、ヒト子宮頸がん細胞・HeLa とヒト顆粒層がん

細胞・KGNにブタcFLIPの発現ベクターを導入し、Fas誘導性アポトーシスに対する反応を調べた。ブタcFLIPの発現ベクターにはEGFP配列が組み込まれており、cFLIPが導入された細胞は蛍光するようになっている。遺伝子導入の24時間後に細胞を観察すると、多数の蛍光細胞が認められた。これらの細胞を抗Fas抗体とタンパク合成阻害剤・シクロヘキシミド (CHX) によって刺激したところ、empty vectorを導入した細胞は死滅してしまったのに対し、ブタcFLIP_SまたはブタcFLIP_Lを導入した場合は蛍光する細胞の生存が観察された。次に、ブタ顆粒層由来細胞株 (JC-410) を用いて、RNA interference (RNAi) によるcFLIPの発現抑制実験を行った。その結果、cFLIPの発現抑制によって有為にJC-410の細胞死が誘導された。以上より、ヒトやげっ歯類のcFLIPと同様にブタのcFLIPもFas誘導性のアポトーシスを阻害する働きを持つことが示された。

第三章では、KGN細胞を用いて顆粒層細胞におけるcFLIPの働きをさらに詳細に調べた。ネオマイシン耐性遺伝子を含んだヒトcFLIP発現ベクターをKGN細胞に導入し、G418を加えてcFLIPを恒常的に発現する細胞を選択した。これらの細胞を抗Fas抗体とCHXで刺激すると、コントロール細胞は死滅したが、cFLIP_SとcFLIP_Lの恒常発現KGN細胞はどちらもアポトーシスに耐性を示した。またRNAiによりKGN細胞のcFLIP発現抑制を行ったところ、有為に細胞死が誘導された。cFLIPの発現抑制によってKGN細胞中の活性型caspase-8が増加したことから、またこの細胞死はcaspase-8阻害剤によって回避されたことから、cFLIPはprocaspase-8の活性化を防ぐことによって顆粒層細胞のFas誘導性アポトーシスを抑制することが示唆された。

第四章では、アポトーシス関連転写因子・FOXO3aとcFLIPとの相互作用について検討した。FOXO3aはアポトーシス誘導性の転写因子として知られ、リン酸化により転写活性を失い、脱リン酸化されるとFasL、Bimなどのアポトーシス誘導因子の転写を活性化する。近年、FOXO3aの遺伝子欠損雌マウスが卵胞の発育異常によって不妊となることが報告され、FOXO3aは卵胞の発育と退行を制御する因子であることが強く示唆された。はじめにブタ顆粒層細胞におけるFOXO3aの発現変化をWestern blottingで調べたところ、FOXO3aタンパクの発現量は退行初期卵胞で最も多いことがわかった。さらに免疫染色での解析において、退行初期卵胞の卵胞腔側でFOXO3aの強い発現が見られた。ヒトFOXO3a発現ベクターを導入したところ、HeLa細胞は耐性を示したのに対し、KGN細胞とJC-410細胞は細胞死を起こした。このことから、FOXO3aが顆粒層細胞でアポトーシス誘導因子として働いていることが示唆された。顆粒層細胞におけるFOXO3aとcFLIP_Lの発現パターンと働きが相反することから、次にこれら両因子の相互作用について調べた。FOXO3aの過剰発現によるKGN細胞の細胞死はcFLIPを共発現させることにより有為に抑制された。このcFLIPによる細胞死の抑制は、リン酸化部位を改変した

FOXO3a発現ベクターでは起こらなかったことから、cFLIPはFOXO3aのリン酸化を阻害することによってアポトーシスを阻止している可能性が考えられた。また、KGN細胞でcFLIP_Lを過剰発現させるとFOXO3aのタンパク量が減少したことから、cFLIP_LはFOXO3aの発現量を抑制する作用を持つことが示唆された。以上の結果から、FOXO3aはブタ卵巣において顆粒層細胞のアポトーシスを促進する働きをもつこと、またcFLIP_LがFOXO3aの転写活性あるいは発現を抑制することによりFOXO3aが引き起こすアポトーシスを阻害していることが示唆された。

第一章から第四章までの実験結果から、cFLIP_Lが顆粒層細胞のアポトーシスを制御していることが強く示唆された。cFLIP_Lが強く発現していると顆粒層細胞のアポトーシスが抑制され、卵胞は健常に保たれる。一方cFLIP_Lの発現レベルが低い場合、顆粒層細胞はFas誘導性アポトーシスを止めることができずに死に至り、卵胞は退行する。加えて、アポトーシス誘導性の転写因子・FOXO3aによる顆粒層細胞の細胞死を、cFLIP_Lが阻害することも示された。本研究により、顆粒層細胞の生死を決定する新しいメカニズムが発見され、cFLIP_Lが卵胞退行を制御する上位の因子であることが示唆された。