

[別紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 峯畑 二子

哺乳類の卵胞は、一層の顆粒層細胞で覆われた一次卵胞、多層になった二次卵胞、卵胞腔を形成した三次卵胞へ発達する。しかし、大半は発育段階で死滅し、排卵に至るものは1%にも満たない。卵胞が選別されるメカニズムについて不明な点が多いが、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。FasL-Fasシグナルがアポトーシスの誘導因子となっているが、健常卵胞でもFasLやFasが発現していることから、アポトーシスシグナルを止める機構が生死を決定する要因であると考えた。抗アポトーシス因子として知られるcellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) のmRNAがブタにおいて発見されている。cFLIP short form (cFLIP_S) は二つの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。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の発現を検討した。ブタ卵巣を採取し、卵胞を開いて顆粒層細胞を分離した。顆粒層がシート状のものを健常卵胞、少しばらばらなものを退行初期卵胞、完全にばらばらなものを退行卵胞とし、RNAとタンパクを抽出した。RT-PCRを行ったところ、cFLIP_Sは発現量に差がなかったが、cFLIP_LのmRNAは退行に伴って減少した。タンパクでは、cFLIP_Sは検出できなかったが、cFLIP_Lは卵胞退行に従って減少した。健常な卵胞の顆粒層でcFLIP_LのmRNAが発現し、退行卵胞で減少した。cFLIPタンパクも退行に伴って減少した。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明らかになった。

第二章では、cFLIPの抗アポトーシス活性を検討した。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。cFLIP発現ベクターにはEGFP配列が組込まれ、導入された細胞は蛍光を発する。遺伝子導入の24時間後に観察し、多数の蛍光細胞を認めた。抗Fas抗体とタンパク合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) で刺激したところ、empty vectorを導入した細胞は死滅したのに対し、cFLIP_SまたはcFLIP_Lを導入した細胞は生存した。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。cFLIPの発現抑制によって細胞死が誘導された。以上より、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cFLIPの働きを調べた。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。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細胞はアポトーシスに耐性を示した。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。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Fas誘導性アポトーシスを抑制することが示された。

第四章では、FOXO3aとcFLIPとの相互作用を調べた。FOXO3aは脱リン酸化されるとアポトーシス誘導因子の転写を活性化し、卵胞の発育と退行を制御する因子であることが示唆されている。ブタ顆粒層細胞におけるFOXO3aの発現変化を調べたところ、退行初期卵胞で最も多かった。特に卵胞腔側で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であることが示唆された。顆粒層細胞におけるFOXO3aとcFLIP_Lの働きが相反することから、相互作用について調べた。FOXO3aを過剰発現させたKGN細胞の細胞死は、cFLIPを共発現させることにより抑制された。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をリン酸化することによってアポトーシスを阻止していると考えられた。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も示唆された。

これらの結果から、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。cFLIP_Lの発現が低いと、Fas誘導性アポトーシスを止めることができず、卵胞は退行する。FOXO3aは細胞死を起こすが、本研究によりcFLIP_Lが卵胞退行を制御する上位の因子となって顆粒層細胞の生死を決定する新しいメカニズムが明らかになった。以上の成果は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。審査委員一同は、本論分が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。