

論文の内容の要旨

論文題目 The roles of cell-death ligand and receptor systems for granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovary

(ブタ卵胞閉鎖時の顆粒層細胞アポトーシスにおける細胞死受容体系の役割)

氏名 井上直子

哺乳類の卵巣には、出生時すでに何万〜百万という数の原始卵胞が含まれ、出生後も原始卵胞が作られ続けるにもかかわらず、生涯にわたり 99%以上の卵胞が発育途上で選択的に閉鎖することで消滅してしまい、排卵されて次世代に受け継ぐことが可能な卵胞は1%未満である。近年この閉鎖過程には卵胞上皮細胞（顆粒層細胞）のアポトーシスが支配的に関与していることがわかってきたが、未だその分子制御機構は解明されていない。アポトーシスシグナルの伝達経路には様々なものが存在するが、その一つに cell-death ligand and receptor を介したものがある。Cell-death receptor は ligand からのアポトーシスシグナルを細胞内に伝える細胞膜受容体で、細胞表層に存在し細胞内領域に death domain (DD) を持つ。特異的な cell-death ligand が cell-death receptor と結合すると、これに同様に分子内に DD を持つ Fas-associating death domain (FADD) や tumor necrosis factor (TNF) associated death domain (TRADD) 等のアダプタータンパクが DD を介して結合する。これらのアダプタータンパクは分子内に death effector domain (DED) を持っており、これを介してシステインプロテアーゼである procaspase-8 を誘導して death inducing signal complexes (DISC) を形成する。ここで procaspase-8 は 2 量体を形成して活性化し、これが下流の caspase 等を分解することで活性化させてアポトーシスを実行する。ヒトやマウス

においては cell-death receptor を介したアポトーシスシグナル伝達経路である Fas ligand (FasL)/Fas 系や TNF α /TNF receptor (TNFR) 系が卵巣で発現していることが報告されているが、その役割には不明な点が多い。重要な家畜であり多産であることが有用な形質とみなされているブタの卵巣においては cell-death ligand/receptor 系の役割についてほとんど研究されていないため、本論では卵胞閉鎖に焦点をあてて究明した。

私の研究グループは、ブタ卵胞顆粒層細胞において cell-death ligand 系のひとつである TNF α を介してアポトーシスシグナルを伝達する TNFR1 が発現せず、細胞生存・増殖シグナルを伝達する TNFR2 のみが発現していることを見出し、TNF α がブタ卵胞においては生存因子として働いていることを明らかにした。この知見は卵胞閉鎖に関わる cell-death ligand/receptor 系に種属差があることを示唆する。そこで本研究ではブタ卵胞閉鎖に関わる cell-death ligand/receptor 系を検索し、それらの顆粒層細胞アポトーシスにおける役割を調べた。

第1章では tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) と TRAIL receptor (TRAILR) のブタ卵胞における発現ならびにブタ顆粒層細胞におけるアポトーシス誘導能について調べた。ブタ卵巣組織における TRAIL とそのレセプター (death receptor 4: DR4) の局在を免疫組織化学的に調べたところ、TRAIL と DR4 は顆粒層の基底膜側の細胞に局在し、TRAIL は退行にしたがって発現が増加したが、DR4 の大きな変化は見られなかった。Western blot 法にてタンパク発現量の解析を行ったところ、TRAIL の発現は卵胞閉鎖に伴って上昇したが、DR4 はどの段階の卵胞においても等しく発現していた。RT-PCR 法により顆粒層細胞における TRAIL mRNA の卵胞閉鎖に伴う推移を調べたところ、閉鎖に伴って発現が増加した。さらにブタ初代培養顆粒層細胞を用いて TRAIL のアポトーシス誘導能を調べた結果、TRAIL を添加して共培養開始12時間後までは濃度および経過時間依存的にアポトーシスが誘導された。これらよりブタ卵胞の閉鎖時に TRAIL が顆粒層細胞におけるアポトーシスの制御に関与し、TRAIL は顆粒層細胞にアポトーシスを誘導できることが分かった。

第2章では、はじめに FasL/Fas 系のブタ卵巣組織における発現を免疫組織化学的に調べた。FasL は健常卵胞では発現しておらず、閉鎖を開始した卵胞の顆粒層細胞で発現し、閉鎖に伴って増加した。Fas は健常卵胞でもわずかに発現しており、退行閉鎖に伴って増加した。FasL と Fas タンパクの発現を Western blot 法にて定量的に確認したところ、免疫組織化学的知見と同様に FasL は健常卵胞で発現しておらず閉鎖に伴って増加し、Fas も閉鎖に従って増加した。RT-PCR 法により FasL と Fas の mRNA 発現の推移を調べたところ、FasL mRNA は閉鎖に伴って増加し、Fas mRNA は退行初期に増加し、その後も高値であった。これらの結果に加えて下流の細胞内シグナル伝達因子である caspase-8 およ

び caspase-3 の顆粒層細胞における発現は、閉鎖に伴って活性型 caspase-8 と caspase-3 の発現が増加するという私の研究グループの過去の知見より、ブタの卵胞においては閉鎖時 FasL が顆粒層細胞の細胞膜に発現している Fas と結合することにより、アポトーシスが誘起され caspase カスケードが活性化され、細胞死を引き起こしていると考えられた。

第3章では、cell-death ligand/receptor を介した細胞内アポトーシス伝達系について精査を進めるために、ブタ FADD と procaspase-8 のクローニングを行い、アポトーシスシグナル伝達能について検討した。ヒトとマウスの FADD と procaspase-8 の DED ドメインをタグとして EST データベースを検索してクローニングを進め、EST clones FADD (db8904657, GenBank accession no. BI32504)、procaspase-8 (db9143457, GenBank accession no. BI336359) を得た。ブタ FADD は全長 636bp (211 aa)、N 末端に DED (1-81, 81 aa) を、C 末端に DD (87-181, 95 aa) をもち、アミノ酸の相同性はヒト FADD に対して 74.0%、マウス FADD に対して 65.4% であった。ブタ procaspase-8 は全長 1431bp (476 aa) で、2 つの DED と、caspase ドメインから構成され、アミノ酸の相同性はヒト procaspase-8 に対して 70.6%、マウス procaspase-8 に対して 63.4% であった。Caspase ドメインの酵素作用部位はヒト、マウスおよびブタの間で高く保存されていた。このようにしてクローニングしたブタ FADD と procaspase-8 のアポトーシスシグナル伝達機能について培養細胞を用いて検討した。リポフェクション法によりヒト子宮頸癌由来細胞株 (HeLa-K)、ヒト顆粒層細胞由来細胞株 (KGN)、マウス顆粒層細胞由来細胞株 (KK1)、ブタ顆粒層細胞由来細胞株 (JC410) にブタ FADD または procaspase-8 発現ベクターを導入した。なお各発現ベクターには下流に enhanced green fluorescent protein (EGFP) 配列を組み込み、FADD または procaspase-8 が導入された細胞が蛍光を発するように設計した。FADD または procaspase-8 を発現させた細胞では生細胞数が激減していたが、caspase インヒビターである p35 を共発現させた細胞では多くが生存していた。顆粒層細胞において FADD ならびに procaspase-8 は種をこえてアポトーシスシグナル伝達することが分かった。

第1章から第3章の結果より、ブタ卵巣においては TNF ファミリーの一員である TRAIL ならびに FasL が卵胞閉鎖時における顆粒層細胞のアポトーシス誘起機構に支配的に関与していること、これらリガンドが顆粒層細胞の細胞膜に発現しているレセプター (DR4 や Fas) にそれぞれ結合し、アダプタータンパク (FADD) を介して下流の細胞死実行因子である procaspase-8 などのカスパーゼカスケードの活性化を誘導して、アポトーシスを完了させること、その結果として卵胞が閉鎖することが分かった。