

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成17年度博士課程 入学

氏名 前田 晃央

指導教員名 眞鍋 昇

論文題目 The Role of Interleukin-6 in Regulation of Granulosa Cell
Apoptosis

During Follicular Atresia

(卵胞閉鎖時の顆粒層細胞アポトーシス制御におけるインターロイキン6の役割)

哺乳類の雌においては、胎児期に卵祖細胞の体細胞分裂が終了し、成体の卵巣内にはディプロテン期で減数分裂が休止している卵母細胞が5万から80万個含まれている。性周期毎にこれらの卵母細胞の一定数が減数分裂を再開し、発育・成熟して排卵される。しかしながら、この過程で99%以上の卵胞が選択的に退行して消滅し、実際に排卵されるものは1%にも満たない。この選択的な卵胞退行は卵胞閉鎖と呼ばれ、その誘起に顆粒層細胞のアポトーシスが支配的に関与している。しかしこれを制御している分子機構、すなわちその誘発因子やアポトーシスシグナルの細胞内伝達経路に関しては、未だ多くの点が不明である。近年、様々なサイトカインが卵巣における卵胞発育、排卵、卵胞閉鎖、黄体形成、黄体退行などの様々な現象の制御に関与していることが報告されてきている。サイトカインのひとつである Interleukin-6 (IL-6) は、リンパ系球や単球系細胞などの様々な免疫系の細胞だけではなく、線維芽細胞、表皮ケラチン産生細胞、血管内皮細胞などにおいても産生され、多様な生理活性を示す。IL-6 は膜結合型受容体サブユニット IL-6 receptor α (IL-6R α)あるいは可溶型受容体サブユニット IL-6

soluble receptor (IL-6sR)と結合し、これら IL-6 と受容体サブユニットの複合体は、もうひとつの膜結合型受容体サブユニット gp130 と結合して細胞内にシグナルを伝達する。ほとんどのサイトカインのシグナル伝達においては、可溶性受容体はシグナル伝達を阻害する役割を担うのに対して、IL-6sR は IL-6R α と同様に gp130 を活性化してシグナルを下流に伝達する。最近、IL-6 は様々な細胞においてアポトーシスを抑制する生存因子として重要な役割を果たしていることが示唆されている。卵胞閉鎖に伴って顆粒層細胞のプロゲステロン産生が亢進することが知られているが、IL-6 がブタ顆粒層細胞のプロゲステロン合成を阻害するとの報告があるので、IL-6 は顆粒層細胞において生存因子として機能している可能性がある。しかしながら顆粒層細胞のアポトーシス制御において IL-6 がどのような役割を果たしているのか未だに不明であるので、本研究を行った。

第一章では、ブタ卵胞の閉鎖に伴う IL-6 の発現の推移について調べた。食肉処理場にてブタ卵巢を採取し、外科的に卵胞を単離した。個々の卵胞の形態と卵胞液中エストラジオール・プロゲステロン濃度比に基づいて健常期、閉鎖初期、閉鎖後期に分類し、卵胞液を回収するとともに顆粒層細胞を単離した。卵胞液中の IL-6 タンパク濃度を ELISA 法にて測定し、顆粒層細胞における IL-6 mRNA の発現を RT-PCR 法にて調べた結果、これらが閉鎖に伴って低下した。次に IL-6 mRNA の局在を *in situ* hybridization (ISH) 法にて調べた結果、健常卵胞の顆粒層細胞において IL-6 mRNA が強く発現し、閉鎖に伴って減少した。閉鎖が進行した卵胞の腔内に侵入したマクロファージによる IL-6 産生の有無を ISH 法にて確認したが、マクロファージによる IL-6 mRNA の発現は認められなかった。以上の知見から、ブタ卵巢では健常卵胞の顆粒層細胞において IL-6 が産生され、それは閉鎖に伴って低下することが分かり、IL-6 は顆粒層細胞のアポトーシスを抑制して卵胞閉鎖を阻害している可能性があると考えられた。

第二章では、ブタ卵胞の閉鎖に伴う IL-6 受容体の発現の推移について調べた。顆粒層細胞における IL-6R α mRNA とタンパクの発現を各々 RT-PCR 法と Western blot 法にて調べたところ、共に閉鎖に伴って上昇した。逆に ELISA 法で測定した卵胞液中 IL-6sR タンパク濃度は閉鎖に従って低下した。次いで、ブタ gp130 はクローニングされていなかったため RACE 法にてクローニング (GenBank accession number EF151500) し、その mRNA の顆粒層細胞における発現を RT-PCR 法にて調べたところ、閉鎖に伴って低下した。これら受容体と IL-6 の発現の推移とを合わせて考えると、健常卵胞の顆粒層細胞においては IL-6 のシグナルが IL-6sR と gp130 を介して伝達されてアポトーシスを抑制し、卵胞閉鎖を阻害していると考えられた。

第三章では、顆粒層細胞における IL-6 の抗アポトーシス機構を検討した。はじめに、

ヒト顆粒層細胞腫由来細胞 (KGN 細胞) を培養し、抗 IL-6 抗体を添加して IL-6 の作用を中和し、p53 の発現がどのように変化するのか RT-PCR 法と Western blot 法にて調べた。その結果、IL-6 中和により p53 およびリン酸化 p53 (ser15) タンパクの発現が上昇した。p53 はリン酸化されることで分解が阻害されるが、IL-6 は p53 のリン酸化を阻害して p53 分解を亢進していると考えられた。次いで、p53 に結合して転写活性を阻害するとともにそれ自身が E3 ユビキチンリガーゼとして働いてユビキチン-プロテアソーム系を介して p53 分解を促進する murine double minute 2 (MDM2) の発現について同様に調べた。免疫染色の結果 MDM2 は核内に局在し、IL-6 中和によって MDM2 (ser166) のリン酸化が抑制された。MDM2 はリン酸化されることで p53 と結合するが、IL-6 は MDM2 のリン酸化の亢進を介して p53 分解を促進していると考えられた。この時、IL-6 中和により、p53 によって転写が誘導されると報告されている Fas (顆粒層細胞の膜上に発現している主要な細胞死受容体) の発現は上昇したが、Bax (ミトコンドリアを介したアポトーシスを亢進する細胞内因子) の発現は影響を受けなかった。RNA interference (RNAi) 法にて p53 発現を阻害した KGN 細胞においては、Fas と Bax の発現が共に抑制された。これらのことから、顆粒層細胞においては、IL-6 は p53 の分解亢進を介して Fas の発現を制御することで抗アポトーシス作用を示すものと考えられた。

続いて、この機構がブタ顆粒層細胞でも同様に機能しているのか否か検討した。ブタ卵胞の閉鎖に伴う顆粒層細胞における p53 と MDM2 の mRNA とタンパク発現の推移を各々 RT-PCR 法と Western blot 法にて調べた。これに際してブタ MDM2 がクローニングされていなかったため RACE 法にてクローニング (GenBank accession number EU119401) を行った。p53 およびリン酸化 p53 (ser15) タンパクは閉鎖に伴って増加し、逆にリン酸化 MDM2 (ser166) タンパクは減少した。免疫染色の結果、MDM2 タンパクは健常卵胞の顆粒層細胞に強く発現しており、閉鎖卵胞ではほとんど検出されなかった。これらの知見から、ブタ顆粒層細胞においても IL-6 は p53 のリン酸化の抑制および MDM2 のリン酸化の亢進によって p53 を分解し、Fas の発現を低下させることでアポトーシスを阻止していると考えられた。

第四章では、第一から三章の知見から IL-6 により顆粒層細胞におけるアポトーシスが阻害されることが分かったので、何が IL-6 の発現を誘導するのかについて調べた。健常卵胞の顆粒層細胞において発現が高く閉鎖に伴って減少する tumor necrosis factor (TNF)- α を培地に添加し初代培養ブタ顆粒層細胞を培養し、その培養上清における IL-6 タンパク濃度を ELISA 法にて測定した結果、TNF- α によって増加することがわかった。KGN 細胞においても TNF- α は IL-6 の発現を誘導した。TNF- α と TNF- α の下流のシグナル伝達経路 (NF- κ B、ERK1/2、JNK、p38 および PI3K) の阻害剤を培地に添

加して KGN 細胞を培養したところ、NF- κ B 阻害剤を添加した場合にのみ TNF- α による IL-6 の発現誘導が阻害された。TNF- α による IL-6 の誘導は NF- κ B の活性化を介して行なわれていると考えられた。

本研究の知見から、卵胞閉鎖の調節において支配的な役割を果たしている顆粒層細胞のアポトーシスを IL-6 が阻害していることが分かった。すなわち、顆粒層細胞においては、IL-6 は TNF- α のシグナルが NF- κ B の活性化を介して伝達されることによって誘導される。この IL-6 のシグナルは、受容体のうち主に IL-6sR と gp130 を介して細胞内に伝達され、MDM2 をリン酸化する。活性化された MDM2 は p53 の分解を促進し、p53 によって転写制御されている細胞死受容体 Fas の発現を抑制する。このようにして IL-6 は顆粒層細胞のアポトーシスを阻害し、卵胞を健全な状態に維持している。IL-6 の発現が低下すると p53 が蓄積・活性化されて Fas の発現が誘導されることで顆粒層細胞のアポトーシスが誘起され、結果として卵胞は閉鎖すると考えられる。