

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成18年度博士課程 入学

氏 名 金 花子

指導教員名 眞鍋 昇

論文題目 Changes in Expression of Anti-apoptotic Factor, Cellular FLICE-like Inhibitory Protein, in Porcine and Caprine Corpus Lutea during Estrous Cycle and Pregnancy

(ブタとヤギの黄体における抗アポトーシス因子の性周期と妊娠期間中の発現変化)

哺乳類の卵巣には、胎児期に有糸分裂を終えて減数分裂を途中で停止した卵母細胞を上皮細胞が包む原始卵胞が数十万個含まれ、性周期毎にその一部が発育を開始し、成熟後排卵に至る。しかしこの過程でほとんどの卵胞が選択的に閉鎖し、排卵に至るのは1%に満たない。排卵後に卵胞は黄体となり、妊娠した場合は妊娠黄体として妊娠の維持につとめ、妊娠しない場合は速やかに退行する。黄体の発育と維持および的確な退行は、妊娠の維持あるいは性周期の起動に支配的な役割を果たす。家畜では黄体の退行に異常があるために性周期が乱れたり停止したりすることによって排卵不全に陥って不妊となり、効率的な増産が阻害されることが多く、適切に黄体を退行させる手法を開発することが重要な課題であり続けてきた。しかし、黄体の維持と退行を調節している分子機構には種族差があることが知られており、かつ未だに不明な点が多い。近年の研究から、卵胞の選択的閉鎖は顆粒層細胞のアポトーシスによって支配的に調節されていること、および顆粒層細胞では細胞死リガンド/受容体系（主に Fas ligand/Fas 系が発現している）に依存するアポトーシスシグナルの細胞内伝達を阻害する抗アポトーシス因

子 (cellular FLICE-like inhibitory protein: cFLIP) が発現しなくなった場合に細胞が死滅することなどが分かってきている。この抗アポトーシス因子には2種類のスプライシングバリエーションがある。長い cFLIP_L の構造はプロカスペーゼ-8 (FLICE と呼ばれ、分子内に2つの death effector domain: DED とタンパク分解酵素ドメインをもつ) と似た構造をしており、分子内に2つの DED とタンパク分解酵素様の偽酵素ドメインをもつ。短い cFLIP_S は偽酵素ドメインをもたず、2つの DED のみをもつ。cFLIP_L は主にプロカスペーゼ-8 と、cFLIP_S は細胞死受容体の直下にあつて分子内に2つの DED をもつアダプタータンパク (Fas-associated death domain: FADD) と各々の DED 同士がホモフィリックに結合することを介して複合体を形成する。これによって FADD とプロカスペーゼ-8 との会合が阻害され、その結果としてプロカスペーゼ-8 の活性化が阻止されてアポトーシスシグナルの細胞内伝達が阻害される。このようにして卵胞の顆粒層細胞の生存と死滅を制御している抗アポトーシス因子が、卵胞と同様に細胞死リガンド/受容体系が発現している黄体でも細胞の生存と死滅の制御に関わっているのではないかと考え、完全性周期動物でありかつ重要な家畜であるブタとヤギを材料として本研究を始めた。その結果、卵胞の細胞が再分化して形成される黄体の細胞でも cFLIP が細胞の生存と死滅の制御に関して重要な役割を果たしていることが分かった。

第一章では、食肉処理場で得た経産ブタの卵巣を材料として性周期にともなう黄体における cFLIP の発現の推移を調べた。黄体の形態および同じ卵巣に含まれる卵胞のステージにもとづいて性周期ステージを初期 (黄体発育期)、中期 (黄体機能期) および後期 (黄体退行期) に分類した後、黄体を個別に切り出し、4分割した。この一部を用いて個々の黄体のプロゲステロン濃度を ELISA 法にて測定して黄体のステージを確定した。残りを用いて個々の黄体における cFLIP_L と cFLIP_S の mRNA とタンパクの発現レベルを各々 RT-PCR 法と Western blot 法にて調べた結果、これらのいずれもが黄体の退行に伴って低下した。さらに残りの個々の黄体組織から連続組織切片を作製し、免疫組織化学染色法にて cFLIP および細胞分裂の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の局在を、TUNEL 染色法にてアポトーシス細胞の局在を調べた。性周期初期と中期の発育期と機能期の黄体ではともに多くの PCNA 陽性黄体細胞が観察されたが、TUNEL 陽性細胞はほとんど観察されず、明確な cFLIP 陽性反応は黄体細胞に確認された。しかし、性周期後期の退行期の黄体では PCNA 陽性黄体細胞はほとんど観察されず、多くの TUNEL 陽性黄体細胞が観察され、微かな cFLIP 陽性反応が一部の黄体細胞に観察された。これらの結果から、ブタの黄体においては cFLIP の発現は黄体退行に伴って低下しており、発育期および機能期の黄体では黄体細胞におけるアポトーシスシグナル伝達を抑制して細胞死を阻止することで黄体退行を阻害していることが推測された。

第二章では、ブタの妊娠黄体と性周期卵巣の白体における cFLIP の発現を調べた。妊娠中のブタの卵巣から個々の黄体と白体を切り出し、4分割した。妊娠ステージは胎児の体長から推定した。第一章と同様に、個々の黄体と白体におけるプロゲステロン濃度を測定するとともに、cFLIP の mRNA とタンパクの発現レベルを各々 RT-PCR 法と Western blot 法にて調べ、局在を組織化学的に調べた。妊娠黄体においても cFLIP は黄体細胞に局在しており、ここでは PCNA 陽性黄体細胞がわずかに観察されたが、TUNEL 陽性細胞は観察されなかった。cFLIP_L と cFLIP_S の mRNA とタンパクの発現レベルは、性周期の機能期の黄体と比較して低かったが、一定のレベルを保ち、それが妊娠期間を通じて維持されていた。白体においては、PCNA 陽性が観察される線維芽様細胞と血管内皮細胞にのみ cFLIP が発現し、他では観察されなかった。これらから妊娠を維持する役割を果たしている妊娠黄体の黄体細胞では cFLIP が高発現して黄体の退行を防いでいるが、瘢痕組織である白体においては発現していないことが分かった。

第三章では、東京大学附属牧場で飼育しており、反芻類のモデル動物としても貴重であるシバヤギを用いて、性周期にともなう黄体における cFLIP 発現の推移を調べた。超音波画像診断法にて成ヤギの卵巣における卵胞と黄体の形態変化を連日観察して性周期を決定した。排卵日を 0 日として、性周期の初期（3 日後：黄体発育期）、中期（8 日後：黄体機能期）および後期（17 および 20 日後：黄体退行期）のヤギの頸静脈から採血した後、麻酔下に卵巣を摘出した。末梢血漿中プロゲステロン濃度を測定して性周期を確定するとともに、第一章と同様に黄体のプロゲステロン濃度を測定するとともに cFLIP の mRNA とタンパクの局在および発現の推移を調べた。ヤギの性周期黄体においても、TUNEL 陽性黄体細胞が観察されず PCNA 陽性の増殖黄体細胞が多数観察される初期の発育期黄体、および TUNEL と PCNA 陽性がほとんど観察されない中期の機能期黄体（盛んにプロゲステロンを産生しており、黄体中および末梢血漿中プロゲステロン濃度がともに高い）の黄体細胞において強い cFLIP 陽性反応が観察された。性周期後期の PCNA 陽性黄体細胞が観察されず TUNEL 陽性黄体細胞が多数観察される退行期には黄体退行にともなって cFLIP 陽性反応が減少した。生化学的に調べた結果でも、発育期および機能期黄体では cFLIP の mRNA とタンパクの高発現が認められ、退行にともなって急激に減少した。これらの知見から、ヤギにおいても cFLIP は黄体細胞においてアポトーシスシグナル伝達を阻害することで生存因子として働き、黄体退行の調節に関わっていると考えられた。

第四章では、妊娠中のシバヤギの黄体における cFLIP の発現の推移を第三章と同様にして調べた。交配日を 0 日とし、妊娠の初期（19 日後）、中期（31 および 92 日後）および後期（142 日後）のヤギの血液と卵巣を採材した。妊娠の初期から後期まで黄体中

および末梢血漿中プロゲステロン濃度がともに高く維持されていた。妊娠期間を通じて、黄体では TUNEL と PCNA 陽性がほとんど観察されず、高い cFLIP 陽性反応が観察された。生化学的に調べた結果からも、妊娠期間中を通じて黄体では高い cFLIP の mRNA とタンパクの発現が確認された。これらの所見から、ヤギにおいても妊娠期の黄体では cFLIP が生存因子として働き、妊娠の維持に貢献していると考えられた。本研究によって、cFLIP は、重要な家畜であるブタおよびヤギの性周期中および妊娠期間中の黄体細胞においてアポトーシスシグナルの伝達を阻害することで生存因子として働き、これの生存と死滅の制御に支配的に関わっており、このことを介して黄体退行の調節に重要な役割を果たしていると考えられた。