

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 ウォンパニット カニカ

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 foetal ovaries and adult corpora lutea in rodents
(齧歯類の胎児卵巣と成体黄体における抗アポトーシス因子の発現変化)

成熟した哺乳類の卵巣には、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卵胞上皮細胞が包み込んだ状態の原始卵胞が数万～数十万個含まれている。性周期毎に原始卵胞の一部が発育を開始して成熟した後排卵に至るが、この過程で99%以上の卵胞が選択的に閉鎖してしまい、排卵に至るのは極わずかである。排卵後、卵胞の細胞は再度分化して黄体細胞となり、黄体を形成する。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して次の排卵を促す。この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安定した性周期の起動と維持に対して支配的な役割を果たしている。黄体の退行に異常がある場合には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、効率的な増殖が阻害されるので、適切に黄体を退行させる手法を開発することは繁殖学の重要な課題である。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、かつ未解明な点が多い。近年の研究から、卵胞の選択的閉鎖は卵胞上皮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、および卵胞上皮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ントがある。分子量の大きなスプライシングバリエント (cFLIP_L) の構造はプロカスペーゼ-8 (FLICEとも呼ばれ、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偽酵素ドメインをもつ。小さな cFLIP_S は、偽酵素ドメインが欠損しており、2つの DED のみをもつ。主に cFLIP_L はプロカスペーゼ-8 と、cFLIP_S はアダプタータンパク [Fas-associated death domain (FADD) : 細胞死受容体の直下にあつて分子内に2つの DED をもつ] と各々の DED 同士がホモフィリック結合することを介して複合体を形成する。このようにして cFLIP は FADD とプロカスペーゼ-8 との会合を阻害し、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細胞内アポトーシスシグナル伝達が停止する。このような分子機構で卵巣上皮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、同様に細胞死リガンド・受容体系が発現している黄体細胞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、実験動物として多くの基盤的研究に用いられている齧歯類 (マウス、シリアンハムスターおよびラット) を材料として本研究を行った。まず胎児期の卵巣の始原生殖細胞などの生存に抗アポトーシス因子が重要に関わっていることが分かり、ついで卵巣の細胞が再分化して形成される黄体細胞でも cFLIP が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、妊娠したマウス、シリアンハムスターおよびラットを材料として用い、各々の胎児の発生にともなう生殖腺における始原生殖細胞やそれを取り囲む間質細胞における cFLIP の発現の推移を調べた。個々の生殖腺における 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、マウスとシリアンハムスターにおいては cFLIP_S が始原生殖細胞が体細胞分裂を繰り返す時期である妊娠中期から後期にかけての胎児の生殖腺に高発現していたが、ラットでは比較的初期から高発現を維持していることが分かった。生殖腺の連続組織切片を作製して免疫組織化学染色法にて cFLIP と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ところ、cFLIP は細胞分裂を盛んに行っている始原生殖細胞に高発現しており、これの周辺の間質細胞にも発現していることが分かった。このような局在性は妊娠期間が短いシリアンハムスターでより明瞭であった。胎児期の生殖腺においては、主に cFLIP_S が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

とで始原生殖細胞の増殖に役立っていることが推測された。

第二章では、性周期および妊娠の推移にともなうマウスの黄体における cFLIP の発現と局在の変化を調べた。マウスの性周期は 4～5 日であるので、膣垢試験および ELISA 法にて測定した末梢血中プロゲステロン濃度に基づいて性周期ステージを発情前期、発情期、発情後期および発情間期に分類した後、各ステージの卵巣から黄体を個別に取り出した。組織の一部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、マウスでは cFLIP_L は検出できず、黄体が速やかに発育する発情後期をピークとして cFLIP_S が高発現していることが分かった。残りを用いて連続黄体組織切片を作製し、cFLIP および PCNA の局在を免疫組織化学染色法にて、アポトーシス細胞の局在を TUNEL 染色法にて調べた結果、発情後期の黄体細胞の細胞質中に強い cFLIP 陽性反応が観察され、この染色性は退行に伴って速やかに低下した。同様にして妊娠期間の 20 日間を通じて cFLIP の発現と局在の変化を調べたところ、妊娠中期(10.5～16.7 日)の黄体細胞に cFLIP_S が高発現していたが、cFLIP_L は検出できなかった。マウスの発育期および機能期の黄体の黄体細胞においては、cFLIP_S がアポトーシスシグナル伝達を阻害して細胞死を阻止し、黄体退行を停止させていると考えられた。

第三章では、前章と同様にしてシリアンハムスターの黄体における cFLIP の発現と局在の性周期および妊娠の推移にともなう変化を調べた。シリアンハムスターの性周期は 4 日である。マウスと同様にシリアンハムスターの黄体細胞でも cFLIP_S は発情後期をピークとして高発現していた。しかし性周期中を通じて極低レベルの cFLIP_L の発現が認められた。妊娠期間の 17 日間を通じて cFLIP の発現と局在の変化を調べたところ、妊娠初期から中期(5.5～9.0 日)の黄体細胞に主に cFLIP_S が高発現しており、妊娠期間を通じて極低レベルの cFLIP_L が発現し続けていることが分かった。シリアンハムスターの発育期および機能期の黄体の黄体細胞においては、主に cFLIP_S がアポトーシスシグナル伝達を抑制して細胞死を阻止し、黄体の退行を阻害していることが推測されたが、極低レベル発現している cFLIP_L の役割は不明であり、今後の研究に委ねなくてはならない。

第四章では、第二章と同様にしてラットの黄体における cFLIP の発現と局在の性周期および妊娠の推移にともなう変化を調べた。ラットの性周期は 4～5 日である。マウスやシリアンハムスターと異なって発情後期をピークとして両スプライシングバリエント(cFLIP_L と cFLIP_S) が高発現していた。妊娠期間の 21 日間を通じて cFLIP の発現と局在の変化を調べたところ、妊娠中期(9.0～13.5 日)の黄体細胞に cFLIP_S と cFLIP_L とが高発現していることが分かった。ラットの発育期および機能期の黄体の黄体細胞では cFLIP_S と cFLIP_L が高

発現してアポトーシスシグナル伝達を抑制し、その結果細胞死が阻止されて黄体退行が阻害されていると考えられた。

本研究によって、cFLIP は、貴重な実験動物である齧歯類 3 種の性周期中および妊娠期間中の黄体細胞において細胞死リガンド・受容体を介したアポトーシスシグナルの伝達を細胞内で阻害することで生存因子として働き、黄体細胞の生存と死滅の制御に支配的に関わっていることが分かった。cFLIP は、このような機構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る。また 2 種あるスプライシングバリエントのうちのどちらを用いるのか種間で異なることが明らかとなった。このことは cFLIP の発現を調節する機構が種間で異なることを示唆している。