

論文の内容の要旨

論文題目 抗老化分子 SIRT1 の活性化因子レスベラトロール
による卵巣顆粒膜細胞の増殖・分化制御機構の検討

森田 吉洋

1) 序文

ヒト卵巣において、原始卵胞の数は胎生期からアポトーシスにより減少していくのみで増加することはない。卵巣は性成熟期には全ての発達段階の卵胞を含み、成熟した卵胞のみが排卵のシグナルに反応する。酵素シグナルとホルモン受容体の時期特異的発現が卵巣内で調整されることにより、卵胞の発達段階に応じた性腺刺激ホルモンに対する感受性を獲得しているものと考えられているが、その原始卵胞から胞状卵胞に至る卵胞形成、およびその後の排卵・黄体化に至る月経周期における詳細な機構や、原始卵胞が休止状態を保つ機構については全く不明である。

抗老化作用という点で、低栄養状態で強く作用し、長寿の酵母や線虫に強発現している遺伝子として同定された Sir2 (Silent information regulator 2)のヒトの Ortholog である SIRT1 が近年多大なる注目を浴びている。SIRT1 は元来 NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素として同定されたが、低栄養状態など細胞内外のシグナルにより、細胞内の NAD/NADH 比が上昇することによって活性化され、ヒストンのみならずタンパクの脱アセチル化をすることで標的タンパクの活性を制御する。SIRT1 が活性化されると、脳では神経細胞の分化、膵臓ではインスリン分泌の促進、血管系では血圧低下といった個体に有利な作用が生じることが近年明らかになってきたが、生殖細胞において SIRT1 に関する報告はまだまだ乏しい。

本研究により、SIRT1 が卵巣顆粒膜細胞に発現していることが判明した。卵巣顆粒膜細胞は、卵胞形成期において形態および細胞数が劇的に変化し、排卵後には莢膜細胞とともに黄体を形成し、多量のエストロゲンとプロゲステロンを分泌し子宮内膜脱落膜化を促進するなど、性周期や受胎に関して大きな役割をもつ。顆粒膜細胞における SIRT1 の作用機構解明は、卵巣機能の病態生理解明に貢献するものと考えられる。卵巣における SIRT1 の機能を解析する一つの手段として、SIRT1 の chemical activator として知られる植物ポリフェノールであるレスベラトロールの卵巣顆粒膜細胞における生理的作用を検討したところ、レスベラトロールが SIRT1 の発現量を増加させ、黄体化関連遺伝子の発現を増加させ、プロゲステロンの分泌を促進することが判明した。

2) 方法

1. 免疫組織化学染色法およびウェスタンブロッティング

免疫組織化学染色用として、子宮頸癌もしくは子宮内膜癌のため摘出された、病理学的に病変のないヒト卵巣組織切片を用いた。パラフィン切片を作成し、一次抗体として抗 SIRT1 抗体、二次抗体として ChemMate EnVision Detection system を使用した。体外受精の際に回収されたヒト卵巣顆粒膜細胞、ヒト顆粒膜細胞腫細胞株 (KGN)、また SIRT1 発現が確認されているヒト子宮頸癌細胞株 (HeLa) を用いてウェスタンブロッティングを行った。一次抗体として抗 SIRT1 抗体、二次抗体として HRP 付加抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

2. ラット卵巣顆粒膜細胞の分離と培養

10 mg の Diethylstilbestrol を入れたシリコン製チューブを、23 日齢 Wistar 系未熟メスラット後頸部皮下に包埋し、4 日後に卵巣を摘出し、形成された卵胞を培地内で穿刺し、ラット卵巣顆粒膜細胞 (GCs) を回収した。48 時間の前培養で細胞を生着させ、10-100 μ M の濃度でレスベラトロールを培地に添加した後、実験に用いた。

3. ラット顆粒膜細胞の細胞数および細胞活性 (MTS アッセイ) の分析

GCs の培養液をレスベラトロール含有培地に交換した後、72 時間まで培養を継続し、Trypan blue 染色法を用いて細胞数を計測し、MTS アッセイキットを用いて各時点・各濃度における細胞活性を測定した。

4. Caspase 3/7 活性測定

GCs の培養液をレスベラトロール含有培地に交換した後、24 時間まで培養を継続し、細胞死実行タンパクである Caspase 3/7 活性を、Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 アッセイキットを用いて測定した。

5. RNA 抽出及びリアルタイム定量 PCR

GCs の培養液をレスベラトロール含有培地に変更した後、24 時間まで培養を継続し、細胞を回収し、精製した RNA から cDNA を作成してリアルタイム定量的 PCR を行った。

6. Hoechst 33342 染色

細胞核がアポトーシスに特徴的な断片化、クロマチン凝縮形態を呈しているかどうかを検討するため、Hoechst 33342 染色を行った。Chamber slide で GCs を培養し、レスベラトロール含有培地に交換後、12-48 時間までの培養を継続し、Hoechst 33342 を用いて細胞核を染色した。核形態を共焦点顕微鏡にて観察した。

7. ラット顆粒膜細胞におけるプロゲステロン産生促進作用

リアルタイム定量 PCR で確認された mRNA の発現変化が、GCs から分泌されるプロゲステロン量に影響を与えているかどうかを検討するため、GCs の培養液をレスベラトロール含有培地に変更した後 48 時間まで培養を継続し、培地上清中のプロゲステロン産生を EIA 法により測定した。

8. 統計解析

統計プログラムとして StatView Version 5 for Windows を使用し、多群間の比較に対し one-way ANOVA の後に、Dunnnett *post-hoc* test を用いた。

3) 結果

SIRT1 のヒト卵巣における発現について

免疫組織化学染色法にてヒト卵巣顆粒膜細胞に SIRT1 が発現していることが判明した。ウェスタンブロッティング法により、ヒト黄体化顆粒膜細胞においても SIRT1 が発現していることが明らかとなった。

レスベラトロールの GCs 細胞活性および細胞死に対する影響の検討

GCs をレスベラトロール存在下で培養すると、細胞数および細胞活性の濃度依存的減少が認められた。この細胞数および細胞活性の減少が、アポトーシスによるものかどうかを検討するため Caspase 3/7 活性および Hoechst 33342 染色をおこなった。Caspase 3/7 活性は上昇せず、核の凝縮といったアポトーシス特有の核形態変化は認めなかった。またアポトーシス関連遺伝子 Bcl-2 および Bax の発現をリアルタイム定量的 PCR により検討したが、これらは不変であったことから、上記の細胞数および細胞活性の減少はアポトーシスによるものではない可能性が考えられた。

GCs においてレスベラトロール処理で変動する遺伝子群およびプロゲステロン産生の検討

GCs をレスベラトロール存在下で培養すると、濃度依存的に SIRT1 mRNA が増加することが判明した。また顆粒膜細胞の分化マーカーとして、黄体化関連遺伝子の発現やタンパクの変動を検討した。FSH 受容体の発現は不変であった一方で、LH 受容体や、顆粒膜細胞におけるステロイド産生カスケードの初期段階である StAR タンパクおよび最終段階である P450 アロマターゼの mRNA およびタンパクレベルでの発現上昇が確認され、プロゲステロン産生の増加が観察された。

4) 考察

レスベラトロールは、様々な種・組織において、寿命延長・抗炎症・抗癌・認知症予防・放射線による障害の抑止といった個体に有利な生物学的活性をもつことにより、近年研究の焦点となっている。その卵巣における作用としては、レスベラトロールにエストロゲン様作用もあり、組織としては子宮や卵巣の湿重量を増加させる作用や阻血状況の卵巣組織の障害を軽減させるといった保護作用、細胞レベルではラットの卵巣莢膜細胞では細胞死を誘導すること、化学合成されたレスベラトロールアナログが、ブタ卵巣顆粒膜細胞の増殖を抑制することなどが判明しているが、SIRT1 に対する chemical activator としての視点からの研究はいまだ報告がない。

本研究では、SIRT1 がヒト卵巣顆粒膜細胞に発現していることを示した。また、ラット初代培養顆粒膜細胞をレスベラトロール含有培地で培養することで SIRT1 mRNA 発現が増加することから、卵巣顆粒膜細胞において SIRT1 が生理的役割を果たす可能性が示唆された。レスベラトロール処理により細胞数および細胞活性が対照群と比べて減少すること、また、この細胞数および細胞活性の減少は細胞死の誘導によるものではないこと、さらに、ラット顆粒膜細胞の黄体化関連遺伝子として知られる LH 受容体、StAR タンパク、P450 アロマターゼの mRNA およびタンパクの増加がみられ、プロゲステロン産生の増加もみられたことから、レスベラトロールは顆粒膜細胞の分化を促進する可能性が考えられた。類似の既報では、HL60 (前骨髄球細胞株) がレスベラトロール含有培地で培養することで増殖を停止し、骨髄単球への分化が誘導されたという報告がある。

本研究で得られた知見は、黄体機能不全に対する治療、アポトーシスを引き起こす抗癌剤に抵抗性である顆粒膜細胞腫に対する分化誘導による増殖抑制作用などを通じて、婦人科領域疾患の治療への適用が今後期待される。