

別 紙

論 文 の 内 容 の 要 旨

応 用 動 物 科 学 専 攻  
平成 2 1 年 度 博 士 課 程 入 学  
氏 名 高 紅 梅  
指 導 教 員 名 眞 鍋 昇

論文題目 Changes in the expression of intracellular apoptosis  
regulators in granulosa cells during atresia in porcine  
ovaries  
(ブタ卵巢の卵胞閉鎖における顆粒層細胞の細胞内アポトーシス  
調節因子の発現変化)

性成熟に達した雌哺乳類においては、卵母細胞を内包する卵胞が発育・成熟の途中で99%以上閉鎖してしまい、最終的に極僅かが排卵にまで至る。この卵胞閉鎖は顆粒層細胞のアポトーシスによって調節されている。高度に品種改良された肉用家畜のブタの効率的増産にとって、卵胞閉鎖の制御機構を解明し、それに基づいてより多くの高品質の卵母細胞を排卵して受精に供する手法を開発することが肝要である。これまでに顆粒層細胞においては、アポトーシスが細胞死受容体とミトコンドリアを介して誘起されることが分かってきており、未解明な点が多いもののその細胞内シグナル伝達経路の概要が分かってきている。すなわち細胞死リガンドがその受容体に結合すると受容体の細胞膜内にある death domain にアダプタータンパク (Fas-associated death domain) が結合する。これに2分子のイニシエーターカスパーゼ (procaspase-8) が結合して2量体化する。この結合は両者が分子内にもつ death effector domain (DED) を介したものである。2量体化した procaspase-8 が活性化されて Bid タンパクを切断する。これの断片がミトコンドリアからの cytochrome c の放出を誘起する。ミトコンドリアから細

胞質中に放出された cytochrome c は protease activating factor-1 および procaspase-9 と複合体 (apoptosome) を形成し、これによって procaspase-9 が活性化される。これは下流の procaspase-3 を活性化する。活性型 caspase-3 が内因性ヌクレアーゼを活性化し、これが核内に移行して遺伝子 DNA を切断することでアポトーシスが実行される。最近になって顆粒層細胞においては procaspase-8 の活性化を阻害する cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) と procaspase-9 の活性化を阻害する X-linked inhibitor of apoptosis protein が発現しており、これらがアポトーシスの実行を調節しているらしいことがわかってきた。そこでブタの一層の増産のために選択的卵胞閉鎖を制御している分子機構を解明する研究の一環として、本研究で卵巣から単離した個々の卵胞別に顆粒層細胞のアポトーシスを調節している機構を精査した。

はじめに第 1 章で卵巣から単離した個々の卵胞別に卵胞閉鎖にともなって顆粒層細胞において細胞死リガンド-受容体系のどのような実行因子、促進因子および阻害因子が増減するのか精査した。すなわち、成熟した雌豚の卵巣から卵胞を個別に切出し、形態、卵胞液プロゲステロン/エストラジオール比および TUNEL 染色にて組織化学的に検出したアポトーシス細胞頻度に基づいて卵胞を健常、閉鎖初期および閉鎖後期に分類し、各卵胞の顆粒層細胞におけるアポトーシス関連因子の mRNA 発現を定量的リアルタイム PCR 法にて調べた。その結果、アポトーシス実行因子である TRAIL などの細胞死リガンド、TRAIL-receptors や Fas などの細胞死受容体、caspase-8 などの細胞内シグナル伝達因子およびアポトーシス促進因子である Bax の発現は卵胞閉鎖の初期に有意に高まっていることが分かった。一方 inhibitor of apoptosis (IAP) family に属するアポトーシス阻害因子の cFLIP と XIAP は健常卵胞の顆粒層細胞では高発現していたが、閉鎖に伴って有意に低下することが分かった。これまでにこのような現象を個々の卵胞別に確認した例はなく、新しい知見である。

前章でアポトーシス阻害因子の cFLIP と XIAP が卵胞閉鎖の調節に深く関わっていることが推察されたので、第 2 章では他のアポトーシス阻害因子の関与について調べた。その結果、これまでのヒトでの研究ではがん細胞では発現していることが知られているががん化していない分化した細胞での発現が報告されていない IAP family に属する survivin が、ブタの健常卵胞の顆粒層細胞においては高発現していることを見出した。Survivin は、cFLIP や XIAP と同様に、細胞内でアポトーシスシグナルを伝達しているカスパーゼの活性化を阻害することでアポトーシスを抑制していると考えられる。ブタの健常卵胞では、盛んに細胞分裂を繰り返している顆粒層細胞で survivin が高発現していることも分かった。さらに興味

深いことに、survivin に対して正しいフォールディングを維持して機能を保つことを助けるシャペロンとして働いていると考えられている heat shock protein (Hsp) 90 も健常卵胞の顆粒層細胞においては高発現していることを見出した。Hsp は初めショウジョウバエ幼虫を高温にさらすと発現する抗ストレス因子として発見されたものであるが、哺乳類の Hsp90 は非ストレス環境下においても細胞内で発現してタンパクの構造を安定化することで機能を維持する役割を果たしていると考えられており、ブタの健常卵胞の顆粒層細胞においても細胞の生存に必要なタンパクの安定化に貢献しているものと推察された。

細胞内に異常なタンパクが蓄積することを防いだり、過剰に合成してしまったタンパクを分解してリサイクルに供したりして細胞の恒常性を維持することで抗アポトーシス作用を示すことが分かってきたオートファジーは、排卵を控えて急速に発育している健常卵胞の顆粒層細胞の恒常性を保つのに重要であると考えられる。そこで第3章では健常、閉鎖初期および閉鎖後期の卵胞の顆粒層細胞においてオートファジーとアポトーシスが互いにどのように推移しているのか調べた。すなわちオートファジーの誘導に必要な因子である Beclin-1 とオートファゴソーム形成に不可欠な microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) をオートファジーの指標として、カスパーゼカスケードの最下流に位置する活性化 caspase-3 をアポトーシス実行の指標として用いた。その結果、盛んに細胞分裂を繰り返している健常卵胞の顆粒層細胞ではオートファジーが亢進しているが、アポトーシスが誘起されている閉鎖卵胞の顆粒層細胞ではオートファゴソーム形成が停止していることが分かった。いくつかの細胞では、TRAIL などの細胞死リガンドがアポトーシスだけでなくオートファジーも誘起すること、アポトーシス阻害因子である Bcl-2 はオートファジーも阻害することなどが報告されているが、顆粒層細胞ではそのような現象がないことが推測された。

本研究によって、ブタの健常卵胞では、II型アポトーシス細胞である顆粒層細胞において、顆粒層細胞が産生する TNF $\alpha$  が自身の TNFR2 に結合し、転写因子の活性化を介して cFLIP の産生を亢進することでミトコンドリアより上流のアポトーシスシグナル伝達を阻害していること、TACE が TNFR2 を切断してこのシグナル伝達を阻害してアポトーシスを誘導すること、および cFLIP とは別に XIAP が下流のシグナル伝達を阻害していることが分かった。顆粒層細胞でこれらの阻害因子が減少することでアポトーシスが誘導され、その結果卵胞が閉鎖すると考えられた。これら細胞死阻害因子は、様々な生殖工学などに供する卵胞-卵母細胞の健常性を評価するためのパラメーターとして有用であると推察された。