

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
足立 真由美	主査 教授 大道 正英 副査 教授 吉田 龍太郎 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 岡田 仁克
主論文題名 Phagocytosis mechanism of apoptotic granulosa cells regulated by milk-fat globule-EGF factor 8 (Milk-fat globule-EGF factor 8 によるアポトーシス果粒層細胞貪食作用調節機構)	
学位論文内容の要旨	
<p>《目的》</p> <p>卵胞の発育過程において原始卵胞から成熟卵胞として排卵に至る卵胞はわずかであり、ほとんどの卵胞は閉鎖卵胞として消滅する。卵胞閉鎖機序には果粒層細胞のアポトーシスが深く関与し、性腺刺激ホルモンやアポトーシス関連因子などの制御が関係していると考えられる。これまでの研究から果粒層細胞のアポトーシスは、Fas-Fas ligand や tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand を介した death-receptor pathway と、apoptotic protease-activating factor-1 を介した mitochondrial pathway によって誘導されることが報告されている。一般的に細胞がアポトーシスに陥ると、細胞表面に phosphatidylserine (PS) を発現するようになるが、マクロファージは PS を特異的に認識することでアポトーシス細胞を貪食すると考えられている。マクロファージの PS 認識分子として milk-fat globule-EGF factor 8(MFG-E8)や Protein S などの物質が報告されている。特に MFG-E8 はマクロファージから分泌され、PS と結合して“eat me signal”を形成するが、卵胞においては MFG-E8 の関与はほとんど知られていない。本研究ではマウスの発育期卵巣を用い、卵胞閉鎖過程におけるアポトーシス細胞貪食機序と MFG-E8 の関与について検討した。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>2, 6, 10 週齢の B6C3F1 マウスから卵巣を採取し、光顕試料として 10%ホルマリンまたは 4%パラホルムアルデヒドで、電顕試料として 2.5%グルタルアルデヒドと 2%パラホルムアルデヒドの混合液で固定した。光顕用固定標本からはパラフィン切片または凍結切片を作成し、アポトーシス細胞の同定法である TUNEL 染色や抗 ssDNA 抗体および抗マクロファージ抗体である F4/80 と抗 MFG-E8 抗体を用いて免疫染色を行った。さらに通常電顕および MFG-E8 の免疫電顕を行った。凍結標本から total RNA を抽出し、RT-PCR 法で MFG-E8 の発現を検討した。また、3 週齢の B6C3F1 マウスにウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG)を 5IU 投与し、成熟卵胞から果粒層細胞の初代培養株を分離した。eCG の投与により卵巣内に Fas の発現が増強されることが知られているので、培養果粒層細胞に抗 Fas 抗体を添加して Fas-Fas ligand 依存性アポトーシスを誘導し、FITC 標識 annexin V を用いて PS の局在を検討した。また、eCG 投与後 0, 3, 5 日の卵巣から蛋白を抽出してウエスタンブロット法によって MFG-E8 を定量した。</p> <p>《結果》</p> <p>閉鎖卵胞および果粒層細胞のアポトーシス変化は 2 週齢の卵巣ではほとんど認められず、6 週齢以降で観察された。アポトーシス変化を起こした果粒層細胞は、早期の閉鎖卵胞では隣接する健全な果粒層細胞に貪食されていたが、進行した閉鎖卵胞ではマクロファージにより取り込まれていた。F4/80 陽性マクロファージは卵胞閉鎖早期では成熟卵胞周囲の間質に局限していたが、卵胞閉鎖の進行に伴い卵胞内および黄体内に観察された。また 6 週齢以降の閉鎖卵胞内において、MFG-E8 の発現はアポトーシスに陥った</p>	

果粒層細胞の表面にのみ認められた。免疫電顕では、マクロファージと接触しているアポトーシス細胞の表面に MFG-E8 の局在が見られた。しかし隣接する果粒層細胞に取り込まれたアポトーシス細胞には MFG-E8 の局在は認められなかった。培養果粒層細胞に対し抗 Fas 抗体を添加すると PS 陽性細胞が増加し、卵巣からは MFG-E8 が検出された。しかし eCG 投与による MFG-E8 の増加は認められず、アポトーシス細胞は卵胞腔内に多数残存していた。

《考 察》

発育期のマウス卵巣では 6 週齢以降の卵巣において閉鎖卵胞が観察された。卵胞閉鎖の早期では、アポトーシス細胞は MFG-E8 非依存的に隣接の果粒層細胞に貪食された。卵胞閉鎖が進むと、間質からマクロファージの侵入を認めると共に、多くのアポトーシス細胞が MFG-E8 依存的にマクロファージにより貪食された。以上のことから、MFG-E8 は閉鎖卵胞におけるマクロファージのアポトーシス細胞認識機序に関わり、閉鎖卵胞の退行性変化に寄与することが示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	足立 真由美
論文審査担当者			主査 教授 大道 正 英	
			副査 教授 吉田 龍 太郎	
			副査 教授 芝山 雄 老	
			副査 教授 岡田 仁 克	
主論文題名				
Phagocytosis mechanism of apoptotic granulosa cells regulated by milk-fat globule-EGF factor 8 (Milk-fat globule-EGF factor 8 によるアポトーシス果粒層細胞貪食作用調節機構)				
論文審査結果の要旨				
<p>卵胞閉鎖の機序にはマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食が深く関与することが報告されているが、その貪食機序については明らかではない。一般的に、マクロファージは、アポトーシス細胞表面に出現する phosphatidylserine (PS)を認識することにより貪食を始めると考えられている。特に近年 milk-fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) はマクロファージから分泌される蛋白で、PS と結合して“eat me signal”を形成し、マクロファージの貪食機序に深く関わっていることが報告されている。しかし卵胞閉鎖における MFG-E8 の関与についてはほとんど知られていない。申請者はマウス閉鎖卵胞におけるアポトーシス細胞貪食機序および MFG-E8 の関与について検討した。</p> <p>申請者は、免疫組織化学、超微形態学および分子生物学的手法を用いた解析から、卵胞閉鎖の早期ではアポトーシス細胞は MFG-E8 非依存的に隣接した果粒層細胞に貪食されること、また卵胞閉鎖が進むと間質からマクロファージの侵入を認めると共に、多くのアポトーシス細胞は MFG-E8 依存的にマクロファージに貪食されることを明らかにした。MFG-E8 は卵胞閉鎖におけるマクロファージのアポトーシス細胞認識機序に関わり、卵胞閉鎖の退行性変化に寄与することが考えられた。</p> <p>以上のことから本研究は卵胞閉鎖の機序について基礎的に重要な知見を与えるものであり、本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Medical Molecular Morphology 42: 2009, in press</p>				