

論 文 内 容 要 旨

題目 Tumor necrosis factor alpha inhibits ovulation and induces granulosa cell death in rat ovaries
(ラット卵巣においてTNF α は排卵を抑制し顆粒膜細胞死を誘導する)

著者 Yuri Yamamoto, Akira Kuwahara, Yuka Taniguchi, Mikio Yamasaki, Yu Tanaka, Yukari Mukai, Mizuho Yamashita, Toshiya Matsuzaki, Toshiyuki Yasui, Minoru Irahara
平成27年発行 Reproductive Medicine and Biologyに掲載予定

内容要旨

排卵現象は炎症に類似し、その機構には多様な炎症系サイトカインが関与する。これまで我々は、周排卵期に卵巣内のTNF α (tumor necrosis factor alpha)が増加していること、TNF α は炎症ケモカインであるCINC (cytokine induced neutrophil chemoattractant)を増加させること、CINCは好中球遊走を促進すること、さらにCINC中和抗体を投与すると排卵が抑制されることを報告してきた。このようにTNF α は周排卵期において重要な役割を果たすと考えられるが、その詳細は解明されていない。そこで今回我々は、周排卵期におけるTNF α の役割を検討した。

3週齢雌ラットにpregnant mare serum gonadotropin - hCG (human chorionic gonadotropin)による過排卵処置を行い、hCG投与と同時に両側卵巣嚢内にTNF α を投与し、hCG投与後の排卵数およびアポトーシス関連因子とオートファジー関連因子の経時的变化を対照群 (TNF α 非投与群)と比較検討した。

得られた結果は以下の通りである。

1. TNF α 濃度依存性に有意に排卵数が減少し、未破裂卵胞が増加した (対象群: 31.3 ± 6.2 vs. TNF α 群: 7.0 ± 3.7 , $p < 0.01$)。
2. TNF α 群では、顆粒膜細胞でTUNEL陽性細胞が有意に増加した (対象群: $7.0 \pm 2.1\%$ vs. TNF α 群: $46.9 \pm 14.2\%$, $p < 0.01$)。
3. TNF α 投与12時間後にBcl-2が減少し [mRNA (対象群: 2.11 ± 0.33 vs. TNF α 群: 1.16 ± 0.24 , $p < 0.05$) 及び蛋白 (対象との比: 0.54 ± 0.43 , $p < 0.01$)], Bax/Bcl-2比が上昇した [mRNA (対象群: 1.25 ± 0.11 vs. TNF α 群: 2.12 ± 0.33 , $p < 0.05$) 及び蛋白 (対象との比: 2.65 ± 0.85 , $p < 0.05$)]. さらにカスパーゼ実行型であるcleaved caspase3のmRNAが増加していた (対照群: 1.80 ± 0.50 vs. TNF α 2.49 ± 0.48 , $p < 0.05$)。
4. TNF α 投与12時間後にオートファジー関連因子であるLC3 (light chain3)が増加した [LC3 α mRNA (対照群: 0.64 ± 0.54 vs. TNF α 群: 1.80 ± 0.60 , $p < 0.05$), LC3 β mRNA (対象群: 1.57 ± 0.24 vs. TNF α 群: 2.42 ± 0.64 , $p < 0.05$) 及びLC3-II

蛋白 (対象との比: 2.65 ± 0.10 , $p < 0.01$)]。

5. TNF α 投与によりオートファゴソームの増加が認められた (対照群: $38.6 \pm 9.8\%$ vs. TNF α 群: $83.3 \pm 13.4\%$, $p < 0.05$)。

以上より、排卵過程で増加するTNF α は、1) 卵胞破裂を抑制して未破裂卵胞を増加させること、2) 卵胞顆粒膜細胞において、アポトーシス関連因子とオートファジー関連因子を増加させることが明らかとなった。

このことより、周排卵期に増加するTNF α は排卵抑制作用を持つとともに、アポトーシスとオートファジーの2つのプログラム細胞死の経路を介して、未破裂卵胞の顆粒膜細胞死に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1243 号	氏名	山本 由理
審査委員	主査 勢井 宏義 副査 福井 義浩 副査 金山 博臣		

題目 Tumor necrosis factor alpha inhibits ovulation and induces granulosa cell death in rat ovaries
 (ラット卵巣において TNF α は排卵を抑制し顆粒膜細胞死を誘導する)

著者 Yuri Yamamoto, Akira Kuwahara, Yuka Taniguchi, Mikio Yamasaki, Yu Tanaka, Yukari Mukai, Mizuho Yamashita, Toshiya Matsuzaki, Toshiyuki Yasui, Minoru Irahara

平成 27 年発行 Reproductive Medicine and Biology に掲載予定
 (主任教授 苛原 稔)

要旨 排卵現象は炎症に類似し、その機序には多様な炎症系サイトカインが関与している。これまで申請者らは、ラットモデルを用いて、周排卵期に卵巣内の tumor necrosis factor alpha (TNF α) が増加していること、TNF α は炎症ケモカインである cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) を増加させること、CINC は好中球遊走を促進すること、さらに CINC 中和抗体を投与すると排卵が抑制されることを明らかにし、TNF α が周排卵期において重要な役割を果たすことを報告してきた。今回はその一環として、特に卵胞破裂現象における TNF α の意義を検討している。

3 週齢雌ラットに pregnant mare serum gonadotropin - human chorionic gonadotropin (hCG) による過排卵処置を行い、hCG 投与と同時に両側卵巣嚢内に TNF α を投与し、排卵数およびアポトーシ

ス関連因子とオートファジー関連因子の変化を指標として、対照群 (TNF α 非投与群) と比較検討し、以下の結果を得ている。

1. TNF α 濃度依存性に有意に排卵数が減少し、未破裂卵胞が増加した。
2. TNF α 投与により、卵胞顆粒膜細胞において TUNEL 陽性細胞が有意に増加した。
3. TNF α 投与により、Bcl-2 mRNA および蛋白発現が減少し、Bax/Bcl-2 比が上昇した。さらにカスパーゼ実行型である caspase3 の mRNA が増加した。
4. TNF α 投与により、オートファジー関連因子である lightchain3 の mRNA および蛋白が増加した。
5. 電子顕微鏡の観察で、TNF α 投与によりオートファゴソームの増加が認められた。

以上の結果から申請者らは、周排卵期に増加する TNF α は卵胞破裂抑制作用を持つとともに、アポトーシスとオートファジーの2つのプログラム細胞死の経路を介して、未破裂卵胞の顆粒膜細胞死に関与していることを示唆した。

本研究は、排卵現象における卵胞破裂及び未破裂卵胞の退縮機序を解明する上で有意義であり、生殖医学に寄与すること大であると考えられ、学位授与に値すると判定した。