

Studies on molecular mechanisms of induction of bovine luteal cell apoptosis by oxidative stress

| | |
|------|--|
| 著者 | Nakamura Tomohiro |
| 内容記述 | Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (A), no. 2779, 2002.3.25 Includes bibliographical references |
| 発行年 | 2002 |
| URL | http://hdl.handle.net/2241/5728 |

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | なかむらともひろ 中村智尋(東京都) |
| 学位の種類 | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 博甲第2779号 |
| 学位授与年月日 | 平成14年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 審査研究科 | 生物科学研究科 |
| 学位論文題目 | Studies on Molecular Mechanisms of Induction of Bovine Luteal Cell Apoptosis by Oxidative Stress (酸化ストレスによるウシ黄体細胞のアポトーシス誘導機構に関する分子生物学的研究) |
| 主査 | 筑波大学教授 理学博士 山根 國 男 |
| 副査 | 筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌 |
| 副査 | 筑波大学教授 理学博士 沼 田 治 |
| 副査 | 筑波大学助教授 理学博士 坂 本 和 一 |

論文の内容の要旨

黄体は排卵後の卵胞より分化し、黄体ホルモンを産出することで子宮内膜の肥大などを促す働きを持つが、発情周期後期になると子宮より分泌されるプロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ の作用で黄体細胞のアポトーシスによる黄体退縮が導かれる事が知られている。黄体退縮は次の性周期を促し、正常な性周期の進行には必須の生理現象であることから、このメカニズムの解明は卵巣や子宮における生殖生理機構の解明や種々の生殖器疾患の治療に大きく貢献することが期待できる。そこで本研究は、ウシ黄体細胞のアポトーシスの誘導機構を分子レベルで明らかにすることを目的とし、その制御因子の同定を試みた。

まず、黄体細胞のアポトーシス制御因子を同定するために、ウシ発情周期の黄体より抽出した全RNAを用いて Differential Display (DD) 法を行ったところ、初期・中期黄体において Mn superoxide dismutase (SOD) の発現の上昇が認められた。そこで、黄体細胞のアポトーシスには酸化ストレスが深く関与しているのではないかと考え、Mn SOD 以外の抗酸化酵素の発現量を調べた結果、glutathione peroxidase (GPx) の発現が黄体体縮の始まる後期で著しく減少していた。これは、初期・中期黄体における高い SOD 活性により生じた H_2O_2 が、後期黄体では GPx が減少しているために十分に消去されなくなることを意味し、その結果蓄積した H_2O_2 が黄体細胞のアポトーシスを活性化していることが考えられた。実際に、酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の DNA 内の蓄積量が後期黄体で最大となっており、しかも黄体細胞の初代培養細胞を H_2O_2 と GPx 阻害剤で処理すると顕著にアポトーシスが誘導された。従って、後期黄体における GPx の発現量の減少が H_2O_2 の蓄積を招き、黄体細胞死のシグナルカスケードを活性化していることが明らかになった。

さらに、酸化ストレスによる黄体細胞のアポトーシス誘導のシグナル機構をより詳細に解明するために、黄体細胞を H_2O_2 で刺激した際にどのような遺伝子の発現が活性化されているのか解析した。まず、既に黄体体縮への関与が報告されている遺伝子について PCR 法や Northern hybridization 法により発現量の変化を調べたところ、Cyclooxygenase (COX) -2, p53 および Bax の mRNA の発現上昇が観察されたが、COX-1, $PGF_{2\alpha}$ 受容体, $PGF_{2\alpha}$ 合成酵素および各種抗酸化酵素類に変化は認められなかった。in situ Hybridization の結果、COX-2, p53 および Bax はいずれも 8-OHdG の蓄積細胞である大型黄体細胞に特異的に発現していることが確認された。さらに DD 法を用いて酸化ストレス刺激で発現が増加する mRNA を検索したところ、Forkhead 型転写因子である FKHR の発現が増

加する事を見出した。この mRNA の発現部位も大型黄体細胞であったことから、*in vivo* においてもこれら mRNA は酸化ストレス刺激に応じて発現が上昇していることが示唆された。また、FKHR の発現は退縮期でのみ特異的に認められたことから、特にアポトーシス実行系への関与が考えられた。以上の結果より、黄体細胞内での酸化ストレスの上昇は COX-2, p53, Bax および FKHR の発現増加を導き、黄体細胞のアポトーシスを誘導する重要な制御因子として作用していることが明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

黄体は黄体ホルモンを分泌して受精卵の着床と妊娠の成立に必要な不可欠な機能を持つが、その働きは一定の性周期に従った黄体の退縮、すなわち黄体細胞のアポトーシスにより維持されている。本論文は、ウシ黄体細胞のアポトーシスを誘導する制御因子を同定し、黄体退縮の誘導機構を分子レベルで解明することを目的としたものである。本研究では、退縮直前のウシ後期黄体における GPx の発現の減少と、それによる H₂O₂ の蓄積が黄体細胞のアポトーシスの直接の引き金になることを明らかにした。さらに、H₂O₂ 刺激による酸化障害の蓄積が、p53, Bax および Cox-2 などのアポトーシス誘導遺伝子の活性化につながることを黄体細胞において初めて明らかにした。本研究は、黄体退縮の基本原理の解明という学術的な意義があるばかりでなく、不妊症など生殖器系疾患の原因解明や治療法の開発にとって極めて重要な意義を持つものである。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。