

氏名	Anom Bowolaksono		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	学術		
学位授与番号	博甲第3921号		
学位授与の日付	平成21年 3月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文の題目	Study on anti-apoptotic factors in bovine corpus luteum (ウシ黄体のアポトーシス抑制因子に関する研究)		
論文審査委員	教授 奥田 潔	教授 近藤 康博	准教授 アコスタ アヤラ トマス

学位論文内容の要旨

ウシ黄体細胞 (LSC) のアポトーシス誘導機構については、FAS/FAS ligand (FASLG) 系 または腫瘍壊死因子 (TNF)、interferon γ (IFNG) といったサイトカインの関与することが示されているが、これら以外のアポトーシス制御機構については不明な点が多く残されている。本研究では、黄体細胞におけるアポトーシス制御系をより詳細に調べる目的で、以下に示す研究を実施した。

1) アポトーシスシグナル伝達経路を明らかにする目的で、ウシ LSC の FAS と CASP3 mRNA 発現および P4 分泌に、8-bromo cyclic AMP (8br-cAMP)、protein kinase (PK) C 活性化剤 (PMA) およびカルシウムイオノフォア (A23187) がおよぼす影響について検討した。その結果、8br-cAMP および PMA は黄体細胞の FAS および CASP3 mRNA 発現を有意に抑制した。一方、A23187 は FAS および CASP3 mRNA 発現を増加させた。また、P4 分泌は 8br-cAMP および PMA により刺激され、A23187 により抑制された。

2) アポトーシスにおける PGE2 および PGF2 α の影響を明らかにする目的で、無処理もしくはサイトカイン (TNF、IFNG および FASLG) によりアポトーシスを誘導した LSC の細胞生存率、FAS、BAX、BCL2、CASP8、CASP3 mRNA 発現、FAS タンパク発現、CASP3 活性および P4 分泌に、両 PG がおよぼす影響について検討した。また両 PG の細胞生存率への作用に、P4 レセプターアンタゴニスト (onapristone; OP)、PG 合成、cyclooxygenase 1 および cyclooxygenase 2 阻害剤 (indometacin、FR122047 および NS-398) がおよぼす影響について検討した。

両 PG は LSC の P4 分泌と無処理、TNF+IFNG または TNF+IFNG+FASLG 処理下での細胞生存率を増加させ、TNF+IFNG 処理下での FAS 以外の CASP8 および CASP3 mRNA 発現と CASP3 活性の増加を抑制し、FAS タンパク発現は PGF2 α にのみ抑制された。OP、indometacin、および NS-398 は TNF と IFNG の非存在下で、両 PG による細胞生存率増加を低下させた。

以上より、ウシ黄体において cAMP および PKC を介して作用する物質はアポトーシスを抑制し、カルシウムイオンを介して作用する物質はアポトーシスを誘起する可能性が示された。さらに、ウシ黄体細胞において、PGE2 および PGF2 α は FAS、CASP8 および CASP3 の発現または活性を抑制し、アポトーシスを抑制することによって、黄体機能の維持に関与する可能性が示された。この PGE2 および PGF2 α のアポトーシス抑制作用は、上記 PG によって刺激された P4 を介している可能性が示された。

論文審査結果の要旨

本論文は、黄体退行機構における黄体内局所調節因子の役割を解明するための基礎研究として実施された以下の実験の成果をまとめたものである。

黄体細胞におけるアポトーシス制御系をより詳細に調べる目的で、1) ウシ黄体細胞 (LSC) の *FAS* と *CASP3* mRNA 発現及びプロゲステロン (P4) 分泌に、8-bromo cyclic AMP (8br-cAMP)、protein kinase (PK) C 活性化剤 (PMA) 及びカルシウムイオノフォア (A23187) が及ぼす影響、2) 無処理もしくはサイトカイン (TNF、IFNG 及び FASLG) によりアポトーシスを誘導した LSC の細胞生存率、*FAS*、*BAX*、*BCL2*、*CASP8*、*CASP3* mRNA 発現、*FAS* タンパク発現、*CASP3* 活性及び P4 分泌に、プロスタグランジン(PG) E2 と PGF2 α が及ぼす影響、3) 両 PG の細胞生存率への作用に、P4 レセプターアンタゴニスト(onapristone; OP)、PG 合成、cyclooxygenase 1 及び cyclooxygenase 2 阻害剤 (indometacin、FR122047 及び NS-398) が及ぼす影響について検討した。その結果、8br-cAMP と PMA は黄体細胞の *FAS* 及び *CASP3* mRNA 発現を有意に抑制し、A23187 は *FAS* 及び *CASP3* mRNA 発現を増加させたことより LSC において cAMP と PKC を介する物質はアポトーシスを抑制し、カルシウムイオンを介する物質はアポトーシスを誘起する可能性が示された。また、両 PG が TNF+IFNG 処理下での *FAS* 以外の *CASP8* 及び *CASP3* mRNA 発現と *CASP3* 活性の増加を抑制し、細胞生存率を増加させたことより、両 PG は *FAS*、*CASP3* 及び *CASP8* の発現または活性を抑制し、アポトーシスを抑制することによって、黄体機能の維持に関与する可能性が示された。さらに、OP が TNF と IFNG の非存在下で、両 PG による細胞生存率増加を低下させたことより両 PG は、P4 産生の刺激を介している可能性が示された。これらの知見は、ウシを含む哺乳動物の黄体退行機構の解明に寄与するだけでなく、卵巣の機能性疾患に起因する不妊症の診断、治療法の開発のための基礎資料として極めて意義深いものである。本学位審査会は、これらの成果をまとめた本論文の内容及び参考文献を総合的に審査し、本論文が博士学位 (学術) の学位に値するものと判断した。