

氏名	ホー 許	ジョン 禎	イム 王
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)		
学位記番号	理 博 第 2546 号		
学位授与の日付	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		
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻		
学位論文題目	Studies on Tissue Factor in Male Accessory Reproductive Organs of Macaque Monkeys (マカクザルのオス副生殖器における組織因子に関する研究)		
論文調査委員	(主査) 教授 竹中	修 教授 林	基治 教授 景山 節

### 論 文 内 容 の 要 旨

サル類の医生物学的特性はヒトに類似しているため、ヒトの健康や疾病に関わる機能因子の生理学的あるいは病態生理学的役割について、サルでのバイオメディカル研究の成果は関連分野に重要な情報・知見を提供することができる。

組織因子 (Tissue Factor, TF) は血液凝固第七因子 (Factor VII, F-VII) のコファクターで、F-VII との複合体形成を通じて血液凝固反応を始動する。最近、TF はこの凝固開始機能に加え、レセプターや細胞内シグナル伝達など TF による細胞機能のモジュレーションとその生理学・病理学的意義が注目されている。

本研究の第一部では、TF の新たな役割を遺伝子レベルで探索する目的で、サル TF の遺伝子発現産物・mRNA の定量測定法として competitive RT-PCR 法を確立した。ついで、マカクザル (ニホンザル、アカゲザルなど) 各組織での TF-mRNA レベルを定量比較し、オス副生殖器の精囊、前立腺において、TF 遺伝子発現が高テストステロン期に抑制され、一方、低テストステロン期に誘導されることを見出した。この遺伝子レベルの結果は免疫組織染色法でも確認され、低テストステロン期の精囊および前立腺の上皮細胞に強い TF 抗原シグナルが観察された。

第二部では、去勢ラットを用いて、テストステロン減少期の精囊 TF の役割を遺伝子レベルで検討した。テストステロン遮断時に発現誘導され、上皮分泌細胞のアポトーシスに関わる clusterin、上皮基底細胞の増殖調節に関与する cell-cell adhesion molecule (C-CAM) および TF について、それらの mRNA レベルの経時変化を比較解析した。去勢ラット精囊での TF mRNA 経時動態が C-CAM のそれとよく一致し、細胞間接着や増殖の調節に関わることが示唆された。従って、TF はテストステロン減少期の精囊において、C-CAM らと共に上皮細胞の増殖制御に関わっていると考えられる。

第三部では、テストステロンによる TF 遺伝子の発現制御機序を検討した。上記の clusterin 遺伝子に関しては、DNA メチル化での発現制御が示されている。TF 遺伝子にもこの DNA メチル化サイトの CpG 部位が存在することに注目して、テストステロンによる TF 遺伝子発現制御と DNA メチル化状態との関連を検討した。マカクザル TF 遺伝子のプロモーター領域を対象に、高テストステロン期および低テストステロン期での DNA メチル化状態の差異を検討した。今回設計したプライマーでは DNA メチル化状態の明瞭な違いは見い出されず、今後、メチル化プライマーの構築など継続検討の必要性が示された。

以上、本研究では TF がオス副生殖器 (特に精囊) の上皮細胞でテストステロン減少期に組織特異的に発現誘導され、副生殖器上皮細胞の増幅・維持など新たな機能を持つことが明らかにされた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はバイオメディカルな視点で、マカクザル副生殖器における組織因子 (Tissue Factor, TF) の新たな機能および遺伝子発現制御に関して、分子細胞生物学的に検討している。

まず、マカクザル各組織での TF 遺伝子の発現特性を比較検討する目的で、サル TF 遺伝子発現産物の mRNA を定量測

定するための競合的 RT-PCR 法を確立した。この競合的 RT-PCR 法を駆使して、オスマカクザルの主要組織での TF-mRNA レベルを解析した。興味深い知見として、マカクザル副生殖器（特に精囊）において、TF の遺伝子発現が組織特異的にテストステロンで抑制されることが示された。タンパク質レベルの実験結果からも、TF 発現が低テストステロン期に誘導され、逆に、高テストステロン期に抑制されることを確認した。さらに、免疫組織染色法で、副生殖器での TF 発現部位は間質細胞ではなく上皮細胞であることが明らかになった。

次いで、精囊 TF の役割を検討するために去勢ラットモデルを用い、TF と同様、テストステロン遮断によって精囊で発現誘導される遺伝子と TF について、mRNA レベルの経時変化を比較解析した。TF mRNA 発現レベルの経時動態は上皮基底細胞の増殖制御に関与する C-CAM のそれとよく一致し、TF が C-CAM と共に精囊上皮細胞の細胞間接着や増殖調節に関わることが示唆された。

さらに、マカクザルの TF 遺伝子配列の結果から、TF 遺伝子には DNA メチル化サイトが存在することに注目して、テストステロンによる TF 遺伝子発現制御と DNA メチル化との関連を検討した。メチル化部位認識プライマーを用いた TF 遺伝子 BS 配列法を確立して、マカクザル TF 遺伝子のプロモーター領域を対象に、高テストステロン期および低テストステロン期での DNA メチル化状態の差異を調べた。これまでの結果からは両時期での TF 遺伝子のメチル化状態には差異が認められず、メチル化解析条件の改善や他の制御機序など今後の検討課題が残った。

以上本研究では、オス副生殖器（特に精囊）における TF の細胞機能とテストステロンによる TF 遺伝子の発現制御を初めて明らかにし、関連研究に新たなトピックスを提供しうる重要な貢献を果たした。加えて、本研究を進める中で、競合的 RT-PCR 法および DNA メチル化分析法など高度で困難な遺伝子解析技術を確立し、テクニカルな面でも関連研究に大きな成果を残した。

よって、本論文は博士（理学）の学位を授与するに価値あるものと認定した。なお、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。