

氏名	なか やま みず ほ 中 山 瑞 穂
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1200 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 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	農 学 研 究 科 応 用 生 物 学 専 攻
学位論文題目	Histochemical Studies on Comparison of Regulatory Mechanisms of Follicular Development in Mammalian Ovaries (哺乳類卵巣における卵胞の選択的死滅制御機構の比較組織化学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 宮 本 元 教 授 今 井 裕 教 授 矢 野 秀 雄

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類の卵巣内では、胎児期のある一定の時期まで通常の体細胞分裂と同じ有糸分裂によって卵原細胞が増殖する。次いで減数分裂を開始するが、卵核胞とよばれる途中の段階で休止する。出産直後の卵巣にはこのような休止状態の卵母細胞が多数含まれており、この休止状態は性成熟後減数分裂が再開されるまで長期間継続する。性成熟後、性周期ごとに一定の数の卵母細胞が卵胞の中で発育・成熟するが、この過程で卵胞の選抜が行われ最終的に1%以下の卵母細胞のみが排卵に至り、他は消滅する。卵胞の選抜は哺乳類が生き残っていくために、より強靱で優秀な卵子を生殖に供するための貴重な過程であると考えられるが、この制御機構は未解明である。これを明らかにしようとする本研究は重要である。

本論文は六章より構成されており、主な内容は以下に示すとおりである。

第一章では、哺乳類の生殖機能制御における現在までの研究成果をとりまとめるとともに、本研究の概要を簡潔に述べている。

第二章では、卵胞の発育の引き金として作用する内分泌系、すなわち視床下部-下垂体-性腺軸に着目し、下垂体内における卵胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモン分泌細胞の構築を、免疫組織化学的に検討するとともに、これらが産生する性腺刺激ホルモンを体循環へと送る下垂体内血管分布と塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の局在を調べた。これらに種差があり、特にウシやヤギなどの反芻動物を含む数種の哺乳類の下垂体では、bFGFが下垂体内血管分布に支配的に関与することを示唆する特徴的構築が認められることを示すとともに、卵胞選抜の局所的制御をこの内分泌系で説明することは困難であることに触れている。

第三章では、第二章で述べた下垂体ホルモン産生細胞の構築に種特異性があることに呼应するかのようにより、卵胞の選択的死滅の局所的制御機構に種差が認められることを示した。すなわちブタとウシの卵胞を用いて、卵胞退行のごく初期に検出される卵胞顆粒層細胞の生理的細胞死(アポトーシス)の進行を組織化学的に検討した結果、顆粒層細胞アポトーシスの発生開始部位に種差があることが明らかになり、アポトーシスシグナルの伝達系が種間で異なることが推定された。

第四章では、腫瘍壊死因子 α (TNF α)等のアポトーシス関連サイトカインを介した局所的な細胞生存シグナル、あるいはアポトーシスシグナルが細胞外マトリックス(ECM)を介して伝達・制御されていることに着目し、卵胞の発達あるいは退行変性にとともなうECM(I型、III型およびIV型コラーゲン)とこれらのmRNAの局在の推移を、それぞれ免疫組織化学法および*in situ hybridization*法にて検討した。ブタとウシの卵胞を比較すると、ブタでは退行に伴って卵胞膜のI型およびIV型コラーゲンが顕著に減少したが、ウシではそのような減少がほとんど観察されなかった。さらにIII型およびIV型コラーゲンmRNAの発現部位がブタとウシ間で異なることも分かった。このように卵胞内ECMの局在にも種差があることを明らかにしている。

第五章では、卵胞の選択制御においてTNF α が果たす役割を調べた。ブタ卵胞を用いて、TNF α およびそのmRNAの発現が健常卵胞の細胞増殖が盛んな部位にのみ検出されることを明らかにした。特に、TNF α のシグナル伝達系において

アポトーシスに拮抗するシグナルを送る TNF α 受容体結合因子 2 の mRNA も、健常卵胞の細胞増殖が盛んな部位に発現していることを示し、ブタ卵胞において TNF α が生存因子のひとつとして作用していることを明らかにしている。

第六章は、本研究のまとめである。すなわち哺乳類の卵巣において性周期ごとに繰り返される卵胞の発育と選択的死亡は、下垂体で産生分泌される性腺刺激ホルモンを介して制御されているだけでなく、卵巣内においてサイトカインや細胞を取り巻いて細胞の形態や機能を制御する ECMなどを介して、局所的かつ精密に制御されていること、およびこの局所的制御は動物種間で違いがあることを述べている。

論文審査の結果の要旨

これまで哺乳類卵巣の卵母細胞の発育・分化・成熟に関する研究、すなわち「生」の仕組みについての研究は詳細に進められてきたが、細胞の消滅を主な現象とする卵母細胞の選抜過程に関わる研究、すなわち「死」の過程についての知見は乏しい。最近のめざましい生理的細胞死（アポトーシス）研究により、哺乳類卵巣の卵胞選抜に顆粒層細胞アポトーシスが支配的に関わっていることが明らかになりつつあるが、アポトーシスの誘導法や供試細胞などの実験条件によって知見は大きく左右され、生理的アポトーシスの制御機構の解明には未だに多くの課題が残されている。本研究は、哺乳類卵巣の卵胞選抜を決定する顆粒層細胞アポトーシスの制御機構を、*in vivo*に近い条件下で明らかにすることを目的としたものであり、評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. 主要な家畜であるブタおよびウシの卵胞を対象として、退行初期を中心にアポトーシス発生部位を検討したところ、特に顆粒層においてその発生部位に種差があることを明らかにした。これは哺乳類の卵胞選抜機構に種特異性があることを示唆した新しい知見である。

2. 多くのサイトカインは、細胞外マトリックス (ECM) を介して細胞の生存とアポトーシスという相反するシグナルを細胞に伝達する。本研究では卵胞の発育あるいは退行にともなう ECM (I 型, III 型および IV 型コラーゲン) 代謝の推移を検討した。すなわち、これらの局在と各々の mRNA の発現をブタとウシ卵胞間で組織的に比較し、卵胞退行にともなう ECM の局在とその mRNA の発現に種差があることを示した。

3. 腫瘍壊死因子 α (TNF α) はアポトーシスと細胞増殖の相反するシグナルを細胞に伝達するサイトカインである。ブタ卵胞において、TNF α は細胞増殖が盛んな基底膜付近の顆粒層に局在していることを明らかにした。次いで TNF α のシグナルを細胞内で細胞分裂亢進系に伝える TNF α 受容体結合因子 2 の mRNA の発現も、顆粒層基底膜付近の細胞に検出されることを明らかにした。これらの知見は、TNF α が生存因子として顆粒層細胞のアポトーシスに拮抗的に作用していることを裏付けている。

以上のように本論文は、哺乳類卵巣における卵胞の選択的死亡には、下垂体で産生分泌される性腺刺激ホルモンを介した制御のみならず、卵巣内におけるサイトカインや ECM などの局所的制御因子による制御が関与していることを見出すとともに、この局所的制御には動物種間で差異があることを明らかにしたもので、家畜の生体機構学および生殖科学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 13 年 2 月 13 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。