

氏 名	さか た しん いち 坂 田 真 一
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2680 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	Kit 欠損 W^V/W^V 変異マウスの生殖細胞消失における Fas の関与

論文調査委員	(主 査) 教 授 米 原 伸	教 授 西 田 栄 介	教 授 宮 田 隆
--------	--------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

本学位論文「Kit 欠損 W^V/W^V 変異マウスの生殖細胞消失における Fas の関与」において、申請者は、 W^V/W^V 変異マウス（幹細胞増殖因子にたいする細胞表面受容体分子 Kit の遺伝子に機能抑制性の変異が導入されたマウス）の精巣及び卵巣における生殖細胞の消失にアポトーシス誘導刺激を導入する細胞表面レセプター分子 Fas が関与していることを示した。また、 W^V/W^V 変異マウスの精原細胞では野生型マウスと比較して Fas の発現が有意に上昇しており、Kit シグナルの欠損による生殖細胞の消失は、Fas を介したアポトーシス誘導シグナル伝達経路の活性化に起因すること示した。さらに、Kit を介するシグナルは PI3 キナーゼ/Akt 経路の活性化により、Fas の発現を下方制御することを、*in vitro* の系を用いて明らかにし、Kit を介した生存シグナルと、Fas を介した死のシグナルとの間のクロストークが存在することを示唆した。

Kit レセプターとそのリガンドである幹細胞因子 (Stem Cell Factor: SCF) は、造血細胞、メラノサイト、生殖細胞という異なる 3 種の細胞系の増殖、分化に重要な役割を担っており、*kit* 遺伝子に変異を持つ W^V 変異マウスは、大球性貧血、白斑、不妊などの表現系を示す。また、Fas はデスレセプターファミリーに属する細胞表面のレセプター分子で、アポトーシスを誘導する。Fas の生理的機能は免疫系についてよく知られているが、生殖組織においても Fas は発現しており、卵巣閉鎖や黄体退行に関与することが明らかになっている。今回、申請者は、 W^V 変異マウスの加齢に伴う生殖細胞の消失に Fas が関与しているのではないかと考え、 W^V 変異マウスと Fas ノックアウトマウスの掛け合わせにより二重変異マウス (W^V/W^V :Fas^{-/-}) を作成し、組織学的解析を行った。8 週齢のオスのマウスの精巣において、 W^V/W^V :Fas^{+/+} マウスでは生殖細胞が消失しているのに対し、二重変異マウスでは一部の精細管において分化した生殖細胞が見られ、同様に、4 週齢のメスのマウスの卵巣において、 W^V/W^V :Fas^{+/+} マウスでは卵母細胞が見られないのに対し、二重変異マウスでは卵母細胞が存在することを見出した。さらに、申請者は *in vivo* で Kit シグナルを阻害するために、アンタゴニスティックな抗 c-Kit 抗体をオスのマウスに投与し、野性型のマウスでは生殖細胞の消失が誘導されるのに対し、Fas ノックアウトマウスでは多くの生殖細胞が生き残っていることを発見した。また、ノーザンブロットハイブリダイゼーションとフローサイトメーターによる解析により、 W^V/W^V 変異マウスの精原細胞では、野性型のものと比較して Fas 発現の上昇が認められ、分化に Kit シグナルを必要とする精原細胞で、Kit シグナルの上昇により、Fas の発現が上方制御されていることを示し、さらに、c-kit を強制発現させた繊維芽細胞に *in vitro* で SCF による刺激を与えると、PI3 キナーゼ/Akt の活性化を介して Fas の発現が抑えられ、繊維芽細胞に恒常活性化型 Akt を強制発現させることによっても、Fas の発現が抑制されることも明らかにした。

以上の結果は、Kit を介したシグナルの欠損に起因する生殖細胞の消失に Fas を介したアポトーシスの誘導が関与していること及び、Kit を介したシグナルが Fas を介したアポトーシスを負に制御していることを示したものである。

論文審査の結果の要旨

アポトーシスを誘導する細胞表面レセプターである Fas は、生殖組織においてその発現が認められるが、生殖組織、特に精巣における生理機能は未だ未解明の部分が多い。今回、申請者は、幹細胞増殖因子のレセプターである kit 遺伝子に変異を持ち、加齢とともに生殖細胞がアポトーシスにより消失する W^V 変異マウスを材料として、生殖細胞のアポトーシスにおける Fas の関与を示し、Kit シグナルの欠損により、 W^V 変異マウスの精原細胞において Fas の発現が上昇していることを明らかにした。これらの結果は、生殖細胞のアポトーシスについての新たな知見を示しただけでなく、Kit を介した生存シグナルと、Fas を介した死のシグナル間のクロストークの存在を示したという点においても、興味深い研究であるといえる。

まず、申請者は、Kit を欠損した W^V 変異マウスと、Fas 欠損マウスの掛け合わせを行い、二重変異マウスを作製し、組織学的解析を行った。このような二重変異マウスの樹立は、生殖組織におけるアポトーシスと Fas との関係を確実に解析できる手法であり、今回の場合も有効な手法であった。さらに、申請者は Kit の活性抑制型モノクローナル抗体である ACK2 をマウスに投与し、Kit シグナルを人工的に阻害するという別のシステムを用いた実験を行い、二重変異マウスの作成によって導かれた結果を裏付けた。二つの異なった *in vivo* のシステムを用いて、同じ結論を導いたことには重要な意味が存在すると考えられる。また、申請者は、生殖細胞消失のメカニズムとして、Fas の発現レベルにおける制御が寄与することを、m-RNA レベル及び、フローサイトメーターによる細胞表面のタンパク質レベルの両面から明らかにした。これら一連の実験は、精子形成の各分化段階における多様な細胞各々について、Kit シグナルとの関係において詳細に解析されており、評価に値する。

さらに、申請者は、*in vivo* における解析によって得られた結果を基に、*invitro* の系において、Kit シグナルによる Fas 発現の制御がなされることを、そのシグナル伝達の分子機構を含めて解析した。この結果により、Kit シグナルの欠損により Fas を介したアポトーシスシグナルが活性化されるという *in vivo* の実験から導かれた結果がさらに確実なものとした。そして、Kit を介する生存シグナルと Fas を介する死のシグナルとの間にクロストークが存在することを示したことは意義深く、今後の細胞の生存・増殖及び、アポトーシスの研究に重要な影響を及ぼすものと考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。