



Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Cultured Porcine Granulosa Cells Is Characterized by Increased Expression of p53 Protein, Fas Antigen and Fas Ligand and by Decreased...

彭, 新建

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1990

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001990>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	ホウ 彭	シン 新	ケン 建	(中華人民共和国)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)			
学位記番号	博い第1234号			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
学位授与の日付	平成11年3月31日			
学位論文題目	Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Cultured Porcine Granulosa Cells Is Characterized by Increased Expression of p53 Protein, Fas Antigen and Fas Ligand and by Decreased Expression of PCNA (培養ブタ顆粒膜細胞での serum deprivation 誘導アポトーシスに伴う P53蛋白, Fas 抗原, Fas ligand 発現の増加と PCNA 発現の増加と PCNA 発現の減少)			
審査委員	主査	教授	丸尾	猛
		教授	片岡	徹
			教授	熊谷俊一

論文内容の要旨

緒言

これまでアポトーシスの研究には数多くの実験モデルが用いられてきた。その一つに *in vitro* 培養系において、培養液から血清を取り除くことによる培養細胞のアポトーシス誘導がある。血清には多くの細胞成長因子が含まれており、これまで多くの種類の細胞で培養液から血清除去がアポトーシスを誘導することが知られている。また、血清除去によりアポトーシスが誘導された細胞では、*c-fos*, *c-myc*, *c-jun* の発現が高いことが報告されている。

卵胞発育は顆粒膜細胞の機能発現に不可欠であることから、ブタ卵巣顆粒膜細胞培養系はしばしば卵胞発育調節機構を捉えようとする実験に用いられる。顆粒膜細胞培養系において培養液中の血清を除去するとアポトーシス特有の DNA 断片化シグナル発現が3倍に増加することが報告されているが、血清除去による顆粒膜細胞アポトーシス誘導の生化学的メカニズムは全く解明されてない。そこで、二種類の抗体を同時に用いた *double probe-immunoblot* 法により、血清除去が顆粒膜細胞の増殖関連蛋白とアポトーシス関連蛋白の発現に及ぼす影響をおよぼすかを検討した。

材料ならびに方法

1) ブタ顆粒膜細胞の培養と血清の除去

ブタ顆粒膜細胞は屠殺直後のブタ卵巣より *needle aspiration* 法により卵胞液を採取することにより得た。なお、卵胞は直径1~2mmのものを小卵胞、3~5mmのものを中卵胞、6~12mmのものを大卵胞として、卵胞の発育段階別に顆粒膜細胞を採取した。ブタ顆粒膜細胞の培養は10%血清添加下に6日間予備培養し、7日目に10%血清添加群と血清非添加群に分け、さらに2日間培養を続けた。

2) DNA 断片化シグナルの検討

培養終了時点で回収した細胞を、PBSで洗浄後、*lysis buffer*, *RNase* ならびに *proteinaseK* 処理を行なってDNAを抽出し、アガロースゲル上で電気泳動を行ない DNA ladder の出現をエチジウムブロマイド添加下に観察した。

3) PCNA, p53, c-myc, Fas, Fas ligand 蛋白発現の Western blot 法による検討

培養終了時点で回収した細胞より蛋白を抽出し、Bradford 法により蛋白定量を行なった後、抗 PCNA, 抗 p53, 抗 c-myc, 抗 Fas, 抗 Fas ligand 抗体を用いて、Western blot 法により各蛋白の発現レベルを検討した。二種類の抗体を用いた double probe-immunoblot 法では、まず 1 種類の抗体を結合させた後に、十分な洗浄を行なった後、もう一方の抗体を結合させることにより施行した。

結果

1) DNA ladder の検出

10%血清添加下あるいは非添加下に48時間培養した顆粒膜細胞より回収した DNA を用いて、電気泳動を行ない DNA ladder の出現を観察したところ、血清非添加群では DNA ladder の出現を認めたが、血清添加群では DNA ladder の出現は観察されなかった。

2) 血清除去による PCNA, p53, c-myc, Fas ならびに Fas ligand 蛋白発現の変動血清除去群での培養顆粒膜細胞における PCNA 蛋白発現は、血清添加群でのそれに比して著明に低下したが、一方、血清除去群での p53 蛋白質発現は血清添加群に比して大きく増強することを認めた。また、2 種類の抗体を同時に用いた double probe-immunoblot 法による成績では、血清除去による PCNA 蛋白発現の低下とともに 115kDa の c-myc 蛋白発現の増強を認めた。さらに血清除去群の培養顆粒膜細胞では PCNA 蛋白発現は低下するのに対して Fas ならびに Fas ligand 蛋白発現は増強することを認めた。

考察

顆粒膜細胞は血清非添加の培養条件下では細胞の viability が維持できず、長期間の培養は不可能である。今回、我々の成績でも、顆粒膜細胞培養系より血清を除去することによりアポトーシスが誘導されることが DNA ladder の出現から確認された。

p53 は種々の細胞でアポトーシスを誘導することが知られており、ラット閉鎖卵胞の顆粒膜細胞にその発現が高いこと、また、ラット卵胞を血清非添加の条件下で培養すると、p53 発現が高まることが報告されている。われわれの成績でも、顆粒膜細胞培養系より血清を除去することにより p53 蛋白発現が高まるとを認めており、顆粒膜細胞のアポトーシスに p53 が関わる可能性が示唆された。

また、顆粒膜細胞培養系より血清を除去した際に、本来の 66kDa c-myc 蛋白の発現は観察されなかったが、抗 c-myc 抗体にハイブリダイズする 115kDa のバンドが観察され、この蛋白も血清除去による顆粒膜細胞のアポトーシス誘導に何らかの役割を担う可能性が推察された。

他方、アポトーシス誘導の重要な因子であることが知られる Fas は、卵、閉鎖卵胞、黄体にその発現が観察され、Fas ligand は卵にのみその発現が観察される。我々の成績では顆粒膜細胞培養系において血清除去が顆粒膜細胞の Fas ならびに Fas ligand 発現を高めたことにより、Fas-Fas ligand 系は顆粒膜細胞アポトーシス誘導の一翼を担っていると考えられた。

以上の成績より、卵巣の機能発現の中で中核的役割を担う顆粒膜細胞のアポトーシス誘導には、p53 ならびに Fas-Fas ligand 系が密に関与することが示唆される。また、二種類の抗体を同時に用いる double probe-immunoblot 法は 2 種の蛋白の発現レベルを比較検討するうえで有用な方法と考えられた。

論文審査の結果の要旨

ヒト卵巣では、排卵に至る卵胞は全体の 0.1% 以下にとどまり、99.9% の卵胞はアポトーシスによって閉鎖することが知られている。本研究では卵胞閉鎖の分子機構を明らかにする目的で、卵巣顆粒

膜細胞培養系において血清除去によりアポトーシスが誘導されることに注目し、ブタ顆粒膜細胞培養系をモデルとして、血清除去が顆粒膜細胞の増殖関連蛋白とアポトーシス関連蛋白の発現にいかなる影響を及ぼすかを検討した。ブタ顆粒膜細胞は屠殺直後のブタ卵巢より needle aspiration 法により卵胞液を採取することにより得た。ブタ顆粒膜細胞は10%血清添加下に6日間予備培養後、血清添加群と血清非添加群に分け、さらに2日間培養した。

まず、培養終了時点で回収したブタ顆粒膜細胞より DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動で DNA ladder の出現を観察したところ、血清非添加群では DNA ladder の出現を認めたが、血清添加群では DNA ladder の出現は観察されなかった。次に、Western immunoblot 法で proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53, c-myc, Fas, Fas ligand 蛋白発現を検討したところ、血清除去群での培養顆粒膜細胞における PCNA 蛋白発現は、血清添加群でのそれに比して著明に低下したが、他方、血清除去群での p53 蛋白発現は血清添加群に比して大きく増強することを認めた。また、2種類の抗体を用いた doubleprobe-immunoblot 法による検討で、血清除去により PCNA 蛋白発現の低下と c-myc 蛋白発現の増強ならびに Fas/Fas ligand の発現が確認された。

以上の成績より、卵巢の機能発現の中で中核的役割を担う顆粒膜細胞のアポトーシス誘導には、p53 蛋白、c-myc 蛋白ならびに Fas ligand の発現増強が密に関与することが明らかとなった。

本研究は従来明らかでなかった卵巢顆粒膜細胞アポトーシスの分子機構につき重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。