



# Immunological Evidence for the Expression of the Fas Antigen in the Infant and Adult Human Ovary during Follicular Regression and Atresia

近藤, 仁

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-01-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2187

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002187>

※ 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)    | 近藤 仁 (兵庫県)   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)   |
| 学位記番号      | 博ろ第1605号   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第2項該当   |
| 学位授与の日付    | 平成10年1月14日   |
| 学位論文題目     | Immunological Evidence for the Expression of the Fas Antigen in the Infant and Adult Human Ovary during Follicular Regression and Atresia<br>(卵巣の退行と閉鎖に伴う幼児と成人の卵巣内での免疫学的なFas抗原発現の評価) |
| 審査委員       | 主査 教授 丸尾 猛<br>教授 守殿 貞夫 教授 熊谷 俊一  |

## 論文内容の要旨

### I. 序 文

Fas抗原は、ヒトのFas抗原のcDNAの構造から、319アミノ酸からなる蛋白で、1つの細胞膜貫通部分を有し、その細胞外領域はTNF受容体ファミリーに属する細胞表層蛋白質である。Fas抗原に対するモノクローナル抗体は、その受容体であるFas抗原を介して細胞にアポトーシスの形態をとる細胞死を誘導する。最近、生体内には、アポトーシスを引き起こすFasリガンドという作用分子とFas抗原という受容体分子がセットで存在していることが明らかになったが、卵巣内でFas/Fasリガンドのシステムがどのように作用しているのかは明らかではない。卵巣での黄体退行や卵胞閉鎖が、アポトーシスに特徴的な形態学的変化を示すことは知られており、またマウス卵巣では、Northern blot analysis からFas抗原mRNAの発現を認めたとの報告がある。しかし、ヒト卵巣でのFas抗原の発現態度は全く知られていない。そこで、我々は幼児期から老年期に至る卵巣において、アポトーシスのシグナルを媒介するFas抗原の発現態度を卵胞の発育、退行、閉鎖との関係から免疫学的手法で明らかにし、卵胞の選択や閉鎖におけるFas抗原発現の意義について検討した。

### II. 方法

対象： 卵巣組織は、インフォームドコンセントを得て、子宮頸癌の根治術を受けた正常月経周期を有する婦人(32例、年齢35~44歳、平均年齢41歳)と閉経後婦人(5例、年齢54~60歳、平均年齢57歳)、また横隔膜ヘルニア、Gaucher病、間質性肺炎で死亡し病理解剖を受けた1才児(3例)から得た。各々の組織は病理学的評価と子宮内膜日付診を受けた。正常月経周期を有した婦人の卵巣は、20例が卵胞期の卵巣で、卵胞期を前期、中期、後期に分類し、更に各卵胞を、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、三次卵胞、成熟卵胞、閉鎖卵胞に類別した。黄体期の卵巣は12例で、黄体期前期(4例、cycle days 14~18)、中期(4例、cycle days 19~24)、後期(4例、cycle days 25~28)に分類した。

方法： 卵巣組織切片を作成し、卵巣内のFas抗原発現を多価の免疫ペルオキシダーゼキッド

(Omnitags, Lipshaw, MI) を用いて、ABA法で免疫組織化学的に検討した。一次抗体として、ヒトのFas抗原に対するマウスモノクローナル抗体 (UB 2, MBL, Nagoya) を1 : 100に希釈して用いた。また、黄体期前期と後期のそれぞれ4例の卵巣から黄体組織の蛋白を抽出し、黄体内でのFas抗原の蛋白の存在を、1 : 100に希釈した抗Fas抗体を用いて、Western blot analysisによって検討した。

### III. 結果

正常月経周期を有する卵巣では、原始卵胞では、Fas抗原発現は約半数の卵細胞で陽性となったが、未熟顆粒膜細胞や間質細胞では陰性であった。一次卵胞でも、Fas抗原発現は卵細胞で陽性となったが、顆粒膜細胞や莢膜細胞では間質細胞と同様に陰性であった。二次卵胞になると、卵細胞でのFas抗原発現の強度は一次卵胞時より減弱し、三次卵胞ではその強度は更に減弱した。二次卵胞と三次卵胞の顆粒膜細胞や莢膜細胞においても、Fas抗原発現は陰性であった。成熟卵胞では、Fas抗原発現は卵細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞、間質細胞のすべてに陰性であった。

黄体では、黄体期前期では、Fas抗原発現は顆粒膜黄体細胞で陽性となった。黄体期中期では、顆粒膜黄体細胞でのFas抗原発現の強度は増強し、莢膜黄体細胞でもFas抗原発現が陽性となった。黄体周辺の間質細胞には、Fas抗原発現は陰性であった。黄体期後期では、退行黄体の黄体細胞でのFas抗原発現の強度は更に増強したが、退行黄体の中心が癒痕化し、白体に変化するにつれて、そのFas抗原発現の強度は減弱した。白体では、Fas抗原発現は陰性であった。

閉鎖卵胞では、原始卵胞と一次卵胞の卵胞閉鎖過程の初期では、Fas抗原発現は退行する卵細胞で陽性となり、退行する卵細胞のFas抗原発現の強度は卵胞閉鎖に伴い減弱した。三次卵胞の卵胞閉鎖過程の初期では、Fas抗原発現は退行する顆粒膜細胞で陽性となった。退行する顆粒膜細胞での主に細胞表面のFas抗原発現の強度が卵胞閉鎖に伴い増強し、莢膜細胞でもFas抗原発現が陽性となった。三次卵胞の卵胞閉鎖過程の末期では、Fas抗原発現は、莢膜細胞のみで強陽性であった。

一才児卵巣では、Fas抗原発現は約80%の原始卵胞と一次卵胞の卵細胞で強陽性となり、一才児卵巣の3例とも同様の結果を得た。一方、閉経後卵巣では、その卵巣組織は白体と間質細胞で占められ、Fas抗原発現は陰性であった。

黄体期前期と後期の黄体組織の抽出蛋白を用いたWestern blot analysisでは、45KDaのFas抗原蛋白の発現を認めた。

### IV. 考案

ヒト卵巣では、出生時に約200万個であった卵細胞は、卵胞閉鎖によって思春期には約40万個に減少することが知られている。性成熟期には約400個の卵細胞が排卵するから、卵胞の99.9%以上は閉鎖卵胞を経て消滅していく。正常月経周期を有する卵巣では、原始卵胞と一次卵胞の約半数の卵細胞にFas抗原発現を認めたことは、Fas抗原が卵細胞数の減少に関与している可能性がある。卵胞閉鎖には、2つの型がある。preantral follicleでは卵細胞の顕著な退行性変化が一次的で、顆粒膜細胞の変化は2次的であるが、他方antral follicleでは顆粒膜細胞の退行性変化が著名で、卵細胞はほとんど変化しない。事実、本研究では、原始卵胞と一次卵胞の卵胞閉鎖過程にある卵細胞にFas抗原発現が顕著に認められ、原始卵胞と一次卵胞の卵胞閉鎖の最初の徴候の一つが卵細胞の退行性変化であるとの知見とよく符号している。原始卵胞の未熟顆粒膜細胞は卵細胞の存在なしでは卵胞を形成することができないことより、原始卵胞と一次卵胞の卵細胞でのFas抗原発現は、原始卵胞と一次卵胞の

卵胞閉鎖がFas抗原が媒介するアポトーシスによることを示唆している。また、本研究による卵細胞でのFas抗原発現が、原始卵胞と一次卵胞に顕著に認められ、卵胞発育に伴って減弱し、成熟卵胞では認められなかった事実より、卵胞を閉鎖卵胞に導くことによって発育卵胞選択すなわち主席卵胞の選択にFas抗原が媒介するアポトーシス機構の関与が強く推察される。

排卵後は、排卵を終えた卵胞は黄体へと変化する。本研究では、黄体細胞にFas抗原発現を認め、退行黄体の黄体細胞では、その発現強度は更に増強した。また、黄体でのFas抗原の発現は、黄体組織の抽出蛋白を用いたWestern blot analysisによっても確認された。退行黄体の黄体細胞にFas抗原発現が顕著に認められたことは、黄体退行へのFas抗原が媒介するアポトーシスの関与を示唆している。

三次卵胞の卵胞閉鎖過程において、Fas抗原発現が、卵胞閉鎖に伴い退行する顆粒膜細胞、莢膜細胞に順次増強したことは、三次卵胞の卵胞閉鎖の最初の退行性変化は、先ず顆粒膜細胞に起こることと一致する。また、我々の以前に行ったヒトの卵巣組織切片を用いたin situ DNA 3'-end labelingによる検討では、三次卵胞の閉鎖卵胞での顆粒膜細胞と莢膜細胞にアポトーシス特有のDNA断片化発現を認めた。それゆえに、三次卵胞の卵胞閉鎖には、顆粒膜細胞、莢膜細胞に順次Fas抗原が媒介するアポトーシスが関与していると考えられる。

一才児卵巣では、原始卵胞と一次卵胞の約80%の卵細胞にFas抗原発現が認められたことは、Fas抗原が媒介するアポトーシスが生後の卵細胞数の劇的な減少に関与していると考えられる。一方、閉経後卵巣では、Fas抗原発現は認められなかったが、閉経後卵巣が白体と間質細胞に占有されていることを考えれば、妥当な結果であると思われる。

卵巣内の卵胞すべてが最終的に卵胞閉鎖あるいは黄体退行の過程を経ることより、Fas抗原が媒介するアポトーシス現象は、すべての卵胞にとり避けられない運命であると言える。

## V. 結 論

ヒト卵巣において、黄体退行と卵胞閉鎖へのFas抗原が媒介するアポトーシスの関与が示唆された。また、卵胞発育過程における発育卵胞選択すなわち主席卵胞選択にもFas抗原が媒介するアポトーシス機構の関与が推察された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、生体内にはアポトーシスを引き起こすFasリガンドとFas抗原という受容体分子がセットで存在していることが知られる。そこで、ヒト卵巣でのFas抗原発現態度を卵胞の発育、退行、閉鎖との関係から免疫組織学的に検討した。卵巣組織は、インフォームドコンセントを得て、子宮頸癌根治術を受けた正常月経周期を有する婦人32例と閉経後婦人5例から得た。卵巣内のFas抗原発現はヒトFas抗原に対するマウスモノクローナル抗体を用いてABA法で検討し、同時に黄体組織の内でのFas抗原蛋白の発現を、Western blot法で検討した。

Fas抗原発現は、原始卵胞と一次卵胞では、約半数の卵細胞で陽性であったが、未熟顆粒膜細胞や間質細胞では陰性であった。二次卵胞の卵細胞でのFas抗原発現は減弱し、三次卵胞では更に減弱した。成熟卵胞では、卵細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞、間質細胞のすべてでFas抗原発現は陰性であった。黄体では、黄体期前期に、Fas抗原発現は顆粒膜黄体細胞で陽性となり、中期では、その発現強度は増強し、莢膜黄体細胞でも陽性となった。黄体期後期では、Fas抗原発現は更に増強したが、退

行黄体の白体化と共に減弱し、陰性となった。

他方、原始卵胞と一次卵胞の閉鎖過程初期では、Fas抗原発現は退行する卵細胞で陽性であったが、三次卵胞の閉鎖過程初期では、Fas発現は退行する顆粒膜細胞で陽性で、卵胞閉鎖の進行と共に増強し、莢膜細胞でも陽性となった。一才児卵巣では、Fas抗原発現は約80%の原始卵胞と一次卵胞で陽性であったが、閉経卵巣でのFas抗原発現は陰性であった。黄体組織抽出蛋白を用いたWestern blotでは、45KDaのFas抗原蛋白の発現を認めた。

ヒト卵巣では、出生時に約200万個ある卵細胞は、卵胞閉鎖によって思春期には約40万個に減少し、女性の一生の中で約400個の卵細胞のみが排卵することより、卵胞の99.9%以上は閉鎖過程を経て消滅する。本研究で原子卵胞と一次卵胞の約半数の卵細胞にFas抗原発現を認めたことは、Fas抗原発現が卵細胞の減少に関与している可能性を示唆する。卵胞閉鎖には、2つの型があり、preantral follicleでは卵細胞の退行が一次的であるが、antral follicleでは顆粒膜細胞の退行が顕著で、卵細胞はほとんど変化しない。本研究で、閉鎖過程にある原始卵胞と一次卵胞の卵細胞にFas抗原発現を顕著に認めたことは、未熟卵胞の閉鎖の最初の徴候が卵細胞の退行性変化であるとの知見とよく符号する。また、卵細胞でのFas抗原発現が、卵胞発育に伴って減弱し、成熟卵胞では認められなかったことより、発育卵胞の選択特に主席卵胞の選択には、Fas抗原を介するアポトーシス機構の関与が推察される。

また、黄体細胞にFas抗原発現を認め、退行黄体の黄体細胞でその発現は増強し、黄体組織の抽出蛋白を用いたWestern blotによって45KDaのFas抗原蛋白の発現が確認された。他方、三次卵胞の閉鎖過程において、Fas抗原発現が、退行する顆粒膜細胞、莢膜細胞に順次増強したことは、三次卵胞の閉鎖の最初の退行性変化が先ず顆粒膜細胞に起こることとよく符号している。さらに、一才児卵巣で原始卵胞と一次卵胞の約80%の卵細胞にFas抗原発現を認めたことは、Fas抗原を介するアポトーシスが出生後の卵細胞の劇的な減少に関与していることを示唆する。

これらの知見より、ヒト卵巣での黄体退行と卵胞閉鎖へのFas抗原を介するアポトーシスの関与が示唆され、卵胞発育過程における主席卵胞の選択にもFas抗原を介するアポトーシス機構の関与が推察された。

本研究は、ヒト卵巣でのFas抗原発現態度を卵胞の発育段階別に検討したものであるが、従来行われなかった卵胞の発育、閉鎖とFas抗原発現の関与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。