

## 論文内容の要旨

申請者氏名 小川拓哉

哺乳類の雌性生殖においては中枢からの性腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン）の指令の下、卵胞内における卵母細胞の成熟が進行するが、卵母細胞自身はゴナドトロピン応答性を持たず、FSH、LH といったゴナドトロピンの直接的な標的細胞として実際に機能するのは、卵母細胞の周囲を取り囲む卵胞上皮層の顆粒膜細胞である。すなわち卵成熟は、卵母細胞と顆粒膜細胞との細胞間相互作用としてとらえられる。顆粒膜細胞の機能を考える上で最も重要な因子の一つとして、アクチビンの存在がある。アクチビンは顆粒膜細胞で産生される TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する因子であり、その最も重要な作用は下垂体からのゴナドトロピンの分泌調節である。加えて、アクチビンは卵巣内部における局所調節因子としても重要であることが近年明らかとされ、産生細胞である顆粒膜細胞自身に働いてその FSH 受容体を増加させるとともに顆粒膜細胞の増殖を促進するという、自分泌・傍分泌作用を有することが知られていたが、後者の分子機構については不明であった。本研究は、アクチビンの顆粒膜細胞に対する増殖促進作用の分子機構を明らかにすることを目的として行った。

まず、三週齢ラットの卵巣より顆粒膜細胞を調製し、無血清培養条件下において FSH 刺激を行い、cAMP 産生および LH 受容体の誘導を指標として細胞の FSH 応答性を調べ、調製した細胞が顆粒膜細胞であることを確認した。続いてアクチビン刺激による顆粒膜細胞の増殖について種々の方法を用いて評価し、アクチビンが 72 時間以内に顆粒膜細胞の数を FSH 非依存的に倍化させること、細胞周期 G1 期から S 期への移行が刺激後約 12 時間で見られることなどを明らかにした。また、G1 サイクリン依存性キナーゼ (cdk) の主要な基質として知られる pRb のリン酸化状態を調べたところ、アクチビン依存的なリン酸化の亢進が認められた。そこで、細胞周期制御因子の発現について調べたところ、

他の細胞周期制御因子に比べ、サイクリン D2 (CycD2) の発現レベルが最も著しいアクチビン依存性を示すことが明らかとなった。続いて顆粒膜細胞に対する増殖促進作用が知られる FSH についても同様に調べたが、いずれの細胞周期制御因子においても FSH 依存的な発現変化は認められなかった。しかしながらアクチビンとともに FSH を作用させたところ、FSH はアクチビン刺激後の pRb のリン酸化をさらに亢進することが見出され、両者が協同的に顆粒膜細胞の増殖を促進していることが示唆された。また、発現レベルの上昇に加えて、FSH 刺激が CycD2 の核内への局在を促進することも示唆された。一方、アクチビンによって誘導された CycD2 は cdk4 と cdk6 とも複合体を形成していることが示された。なお、FSH 刺激により CycD2 と共沈する cdk4 の量に増加が認められたのに対し、cdk6 の量には変化が認められなかった。さらに、用いた抗体のエピトープである CycD2 の C 末端部分と相互作用する何らかの因子が、FSH 刺激の結果解離することが示唆された。すなわち、FSH とアクチビンの協同効果とは、CycD2 の C 末端に結合する因子を解離させることにより、核内 CycD2/cdk4 複合体の量を増加させ、その細胞周期促進活性を亢進させているものと結論される。

以上の結果より、アクチビンは単独で CycD2 の発現量を mRNA レベルで上昇させ、FSH 非依存的に増殖促進作用を示すこと、その細胞増殖促進作用は FSH によって増強されるが、その作用は CycD2 の発現量変化をとまわず、CycD2 と cdk4 の複合体の核局在の亢進が関与していることを示したことで、卵胞発育過程におけるゴナドトロピン非依存性・依存性の両段階を通じて、顆粒膜細胞の増殖機構の差に関する分子メカニズムの一端を明らかにすることが出来たと考える。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 小川拓哉

哺乳類の雌性生殖機能は、視床下部—下垂体—卵巣系と呼ばれる巧妙な内分泌調節系により維持されている。このうち、生殖活動において最も重要な卵成熟を営む末梢器官が卵巣であり、中枢からの性腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン）の指令の下、卵胞内における卵母細胞の成熟が進行するが、卵母細胞自身はゴナドトロピン応答性を持たず、FSH、LHといったゴナドトロピンの直接的な標的細胞として実際に機能するのは、卵母細胞の周囲を取り囲む卵胞上皮層の顆粒膜細胞である。申請者は、卵成熟を「卵母細胞と顆粒膜細胞との細胞間相互作用」としてとらえ、顆粒膜細胞の増殖制御機構を明らかにする目的で、アクチビンに注目して研究を行った。アクチビンは卵巣内部における局所調節因子としても重要であることが近年明らかとされているが、その分子機構については不明である

まず、三週齢ラットの卵巣より顆粒膜細胞を調製し、アクチビンが 72 時間以内に顆粒膜細胞の数を FSH 非依存的に倍化させること、細胞周期 G1 期から S 期への移行が刺激後約 12 時間で見られることなどを明らかにした。また、G1 サイクリン依存性キナーゼ (cdk) の主要な基質として知られる pRb のリン酸化状態を調べたところ、アクチビン依存的なリン酸化の亢進が認められた。その要因として、まず、他の細胞周期制御因子に比べサイクリン D2 (CycD2) の発現レベルが最も著しいアクチビン依存性を示すことを見出した。続いて顆粒膜細胞に対する増殖促進作用が知られる FSH についても同様に調べたが、いずれの細胞周期制御因子においても FSH 依存的な発現変化は認められなかった。しかしながらアクチビンとともに FSH を作用させたところ、FSH はアクチビン刺激後の pRb のリン酸化をさらに亢進することが見出され、両者が協同的に顆粒膜細胞の増殖を促進していることを明らかにした。また、発現レベルの上昇に加えて、FSH 刺激が CycD2 の核内への局在を促進することが分かった、一方、アクチビンによって誘導された CycD2 は cdk4 と cdk6 とも複合体を形成していることが見られたが、FSH 刺激により CycD2 と共沈する cdk4 の量に増加が認められたのに対し、cdk6 の量には変化が認められなかった。さらに、用いた抗体のエピトープである CycD2 の C 末端部分と相互作用する何らかの因子が、FSH 刺激の結果解離することが示唆された。すなわち、アクチビンは単独で CycD2 の発現量を mRNA レベルで上昇させ、FSH 非依存的に増殖促進作用を示すこと、その細胞増殖促進作用は FSH によって増強されるが、その作用は CycD2 の発現量変化をとまわず、CycD2 と cdk4 の複合体の核局在の亢進が関与していることを明らかにした。

以上のように、本論文は哺乳類卵形成における卵胞細胞の増殖制御機構を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。