

氏名	法上 拓生
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第4433号
学位授与の日付	平成23年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Changes in the function and density of luteal vasculature throughout the estrous cycle and its regulatory mechanism in cattle (ウシ黄体機能の周期的変化と黄体内血管分布変化ならびにその制御機構に関する研究)
論文審査委員	教授 奥田 潔 教授 近藤 康博 准教授 アコスタ アヤラ トマス

学位論文内容の要旨

ウシにおける繁殖制御技術の向上や不妊治療のために黄体機能調節機構を明らかにすることは重要である。黄体は血管が非常に密な組織であり、黄体細胞の生存および機能維持に毛細血管が重要な役割を果たすこと、また、血管を構成する黄体内血管内皮細胞 (LEC) が黄体機能を調節する生理活性物質を分泌することから、黄体機能の調節に血管の分布が密接に関与していると考えられる。本研究ではウシ黄体機能調節機構の一端を明らかにするため、発情周期を通じた黄体組織内における血管分布変化ならびに LEC のアポトーシス誘導機構について調べた。

(1) 発情周期各期の黄体内における血管の分布変化を明らかにする目的で、発情周期各期のウシ黄体の組織切片に、LEC の指標として von Willebrand factor (vWF) 抗体を用いて免疫組織染色を行った。染色後、組織中心部における単位面積当たりに陽性を示す部分が占める割合を数値化することで黄体組織における血管占有率を算出した。また、 α -smooth muscle actin の局在を血管平滑筋の指標として調べ、血管平滑筋を伴う血管の数を算出した。さらに、黄体期中期のウシにプロスタグランジン F₂ α (PGF) を投与し、0.5, 2, 12 時間後に摘出した黄体内における血管分布を調べた。血管占有率は、形成期および後期において他の周期と比較して高く、また血管平滑筋を有する血管の数は後期および退行期に有意に多かった。PGF 投与後の黄体組織内における血管占有率ならびに平滑筋を有する血管の数はともに時間依存的に増加した。これらの結果より、後期から退行期にかけて黄体内の血管占有率が減少する一方で、平滑筋を有する血管の数が増加したことから、黄体機能の衰退に伴い毛細血管が減少していることが示された。

(2) LEC におけるアポトーシス誘導機構を調べるために、培養 LEC に腫瘍壊死因子 (TNF) またはインターフェロン γ (IFNG) をそれぞれ 1, 10, 20, 50 ng/ml 添加し、24 時間後細胞生存率を調べた。また、TNF (10 ng/ml) と IFNG (10 ng/ml) を組み合わせて添加し、24 時間後細胞生存率を調べた。さらに TNF (10 ng/ml) および IFNG (10 ng/ml) を単独または組み合わせて添加し、24 時間培養後アポトーシスに関連する遺伝子である *TNFR1*, *FAS*, *BAX*, *BCL2*, *CASP8*, *CASP9* および *CASP3* mRNA 発現を調べた。いずれのサイトカインを添加した区においても濃度依存的に LEC 細胞生存率が低下した。また、TNF および IFNG を組み合わせて添加した区においてそれぞれのサイトカインを単独で添加した区と比較して細胞生存率が有意に低下した。IFNG を単独または TNF と組み合わせて添加した区において control 区ならびに TNF 単独添加区と比較して *TNFR1* および *CASP3* mRNA 発現が有意に増加した。

以上の結果より、黄体の退行に毛細血管の消失が重要な役割を果たすこと、また TNF および IFNG が相乗的に LEC のアポトーシスを誘導することが示され、TNF および IFNG によって誘導された LEC のアポトーシスにより黄体内の毛細血管が消失し、黄体退行が促進される可能性が示された。

論文審査結果の要旨

本論文は、ウシ黄体機能調節機構を解明するための基礎的研究として実施された以下の実験の成果をまとめたものである。

ウシ黄体機能調節機構一端を明らかにする目的で、1) 発情周期を通じたウシ黄体組織およびプロスタグランジン F₂ α (PGF) 投与による退行時の黄体組織における血管占有率ならびに平滑筋を有する血管数の変化、2) ウシ中期黄体由来血管内皮細胞 (LEC) の生存率ならびにアポトーシス関連因子遺伝子発現に及ぼす腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターフェロン γ (IFNG) の影響について検討した。その結果、血管占有率は、形成期および後期において他の周期と比較して高く、また血管平滑筋を有する血管の数は後期および退行期に有意に多かった。PGF 投与後の黄体組織内における血管占有率ならびに平滑筋を有する血管の数はともに時間依存的に増加した。これらの結果より、後期から退行期にかけて黄体内の血管占有率が減少する一方で、平滑筋を有する血管の数が増加したことから、黄体機能の衰退に伴い毛細血管が減少していることが示された。培養 LEC においていずれのサイトカインを添加した区においても濃度依存的に LEC 細胞生存率が低下した。また、TNF および IFNG を組み合わせて添加した区においてそれぞれのサイトカインを単独で添加した区と比較して細胞生存率が有意に低下した。IFNG を単独または TNF と組み合わせて添加した区において control 区ならびに TNF 単独添加区と比較して *TNFR1* および *CASP3* mRNA 発現が有意に増加した。本研究の結果より、黄体の退行に毛細血管の消失が重要な役割を果たすこと、また TNF および IFNG が相乗的に LEC のアポトーシスを誘導することが示された。TNF および IFNG によって誘導された LEC のアポトーシスにより黄体内の毛細血管が消失し、黄体退行が促進される可能性が考えられる。

これらの知見は黄体機能調節機構を解明するための基礎材料として極めて意義深いものである。本学位審査会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文が博士学位 (農学) に値するものと判断した。