

# ウシ顆粒層細胞のアポトーシス（細胞死）機構の解明

清水 隆

畜産衛生学研究部門動物医科学研究分野・准教授

## 1. 目 的

メス哺乳動物の性周期において、多くの卵胞（卵子）は発育・成熟途中で卵胞顆粒層細胞のアポトーシスを伴い閉鎖（死滅）に陥り退縮する。この排卵数決定機構は、生殖過程の中でも極めて重要と言えるが、その仕組みの詳細は未だ不明である。本研究では、申請者のこれまでのデータ及び他文献をもとに、卵胞顆粒層細胞のアポトーシスを抑制する可能性のある血管内皮増殖因子（VEGF）に焦点を当てる。研究目的は、卵胞顆粒層細胞のアポトーシス抑制における VEGF の作用機序について、インヒビターを用いたタンパク質レベルでの特異的抑制系を用いて特異的なノックダウンを行い、培養細胞レベルで明らかにすることである。これにより生体内で起こる排卵数決定機構の一端が明らかとなる。

## 2. 方 法

本研究では、食肉処理場由来のウシ卵巢内卵胞から顆粒層細胞を採取し、初代培養顆粒層細胞を用いて体外培養系に供した。栄養飢餓状態で培養することによりウシ顆粒層細胞のアポトーシスを誘導することができる。この実験系を用いて、顆粒層細胞のアポトーシスシグナル伝達系に強く関与すると考えられる Akt あるいは Erk のインヒビターを用いて特異的にこれらを抑制し、VEGF タンパク質を処理した。培養48時間後、培養細胞を回収した。採取細胞からタンパク質を抽出し、アポトーシス決定因子であるカスパーゼ因子をウエスタンブロット法にて解析し、細胞内における Akt あるいは Erk の関与を検討した。また、カスパーゼにより活性化される CAD および ICAD の細胞内局在を解析するため、採取細胞の破壊後、細胞質分画および核分画を分離採取し、ウエスタンブロット法を用いて解析した。

## 3. 結 果

カスパーゼと細胞核の断片化の中間因子として存在する CAD/ICAD のシステムについて解析した。その結果、対照区では CAD/ICAD 複合体からの CAD の放出が促進されていたのに対し、VEGF 処理区ではその放出は抑制されていた。さらに、それらの細胞内局在を調べた結果、対照区では細胞質に局在する CAD/ICAD 複合体からカスパーゼによって分離された CAD が核内に局在していたのに対し、VEGF 処理区では CAD の核内移行が抑制されていた。この CAD/ICAD システムにおける Akt の関与を Akt 阻害剤を用いて調べた結果、Akt を阻害したとき、VEGF を添加してもアポトー

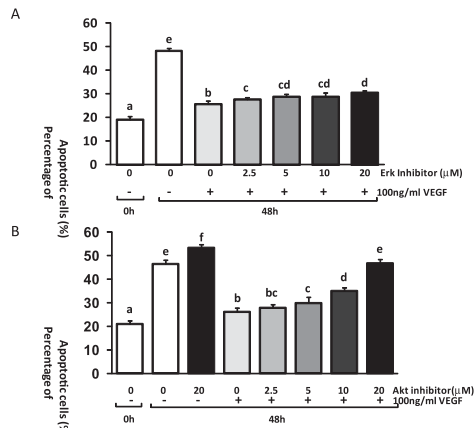


図1 顆粒層細胞のアポトーシスにおけるVEGF経路。  
(A) Erkおよび(B) Akt阻害剤を処理した場合、VEGFのアポトーシス抑制能力がAktを阻害したときに低減した。

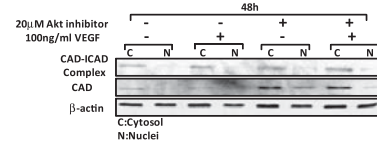


図2 Akt阻害剤を処理した顆粒層細胞のアポトーシスにおけるCADの細胞内局在。

シスは抑制されなかった。

## 4. 考 察

本研究の結果から、VEGFのアポトーシス抑制にAkt経路が関与していることが示唆された。また、CAD/ICAD複合体からのCADの放出およびCADの核内移行は、VEGFを添加しても抑制あるいは阻害しなかった。これらのことから、VEGFはAktを介してCAD/ICAD複合体からのCADの放出を抑制することにより顆粒層細胞のアポトーシスを抑制することが明らかになった。また、顆粒層細胞のアポトーシスにおけるVEGFの抑制経路の1つにAktが強く関与することが示唆された。以上のことから、ウシ卵胞の排卵数決定機能の一つにVEGFが関与していること、またその経路にはAktが関与している可能性が考えられた。

キーワード：卵胞，顆粒層細胞，アポトーシス，シグナル伝達