

P-103 未受精卵における survivin の発現量とアポトーシス発生率の関連性秋田大¹, 同医療技術短大²本田陽子¹, 河村和弘¹, 佐藤直樹¹, 谷川秀郎¹, 佐藤敏治¹, 福田 淳¹, 児玉英也², 清水 靖¹, 田中俊誠¹

【目的】着床前期胚をアポトーシスから防御する重要な分子である survivin は、未受精卵でも発現が認められることから、この時期で受精後のアポトーシスの防御能が既に決定されている可能性がある。ヒトおよびマウス未受精卵における survivin の発現量とアポトーシス発生率の関連性を検討することを本研究の目的とした。【方法】(1)過排卵刺激後の幼弱マウス(7~9週齢)と老齢マウス(40~46週齢)から未受精卵を回収し、アポトーシス発生率を比較・検討した。(2)蛍光免疫染色法により、幼弱と老齢マウスの未受精卵、体外受精での余剰卵を用い、survivin の発現について検討した。なお、ヒト余剰卵を用いた研究については、患者からの口頭と文書による承諾と当院の倫理委員会から承認を得ている。【成績】(1)未受精卵のアポトーシス発生率は、幼弱マウス(25匹, 798個)で $3.9 \pm 0.1\%$ ($M \pm SD$, $n=3$), 老齢マウス(25匹, 581個)で $10.7 \pm 1.8\%$ ($n=3$)であり、有意差を認めた($P<0.05$)。 (2)survivin は、老齢マウスの未受精卵(7個)より幼弱マウスの未受精卵(17個)で強く発現した。 (3)ヒト未受精卵(25個)においては個体差を認めたが、加齢による影響は不明であった。【結論】ヒト未受精卵では survivin の発現に個体差を認め、マウス未受精卵では、加齢により survivin の発現の低下にともない、アポトーシス発生率は上昇した。従って、未受精卵に発現している survivin が受精卵の初期発生におけるアポトーシス防御に重要な役割を果たしていることが初めて示された。

P-104 Oocyte と顆粒膜細胞のアポトーシス発現分子機構：Caspase-9 KO マウス卵巣器官培養系での解析神戸大¹, ハーバード大²森山俊武¹, ティリージョナサン², 丸尾 猛¹

【目的】ヒト卵巣 Germ cell のアポトーシスの分子機構の詳細は明らかでない。そこで Caspase-9 KO マウス卵巣の器官培養系で、Oocyte と顆粒膜細胞でのアポトーシス誘導の分子機構を解析した。【方法】(1)胎生13.5日齢と生後42日齢の Caspase-9 KO /WT マウス卵巣の器官培養系で、KO 群と WT 群の non-apoptotic germ cell 数を比較した。(2)マウス顆粒膜細胞培養系で、無血清下あるいは Staurosporine 添加時の Cleaved caspase-9, 3蛋白発現を検討した。(3)マウス顆粒膜細胞より抽出したミトコンドリアには Bax 蛋白を、抽出した細胞質には Cytochrome c 蛋白をそれぞれ添加した際の、ミトコンドリアから放出される Cytochrome c 蛋白および細胞質中 Cleaved caspase-9, 3蛋白の発現を検討した。【成績】(1)胎生13.5日齢と生後42日齢の両方で、WT 群の non-apoptotic germ cell 数は KO 群に比し有意に減少した。(2)無血清下あるいは Staurosporine 添加時の Cleaved caspase-9, 3蛋白発現は、10%血清添加時に比し有意に増加した。(3)Bax 蛋白添加群では Cytochrome c 蛋白発現が、Cytochrome c 蛋白添加群では Cleaved caspase-9, 3蛋白発現が、それぞれ非添加群に比し有意に増加した。【結論】Caspase-9 は、Bax によるミトコンドリアからの Cytochrome c 放出の経路を介し、Oocyte と顆粒膜細胞のアポトーシス遂行の過程で中心的役割を果たすことが示唆された。

P-105 顆粒膜細胞のアポトーシス誘導過程における Fas-Fas リガンドシステムのシグナル伝達機構と NO(nitric oxide)情報伝達機構とのクロストーク

東京大

陳 秋梅, 矢野 哲, 大須賀稔, 久具宏司, 松見泰宇, 矢野直美, 湯 暁暉, 森本千恵子, 許 継平, 堤 治, 武谷雄二

【目的】顆粒膜細胞(GC)のアポトーシス誘導過程に Fas-Fas リガンドシステムが関与すること、および NO が卵胞発育・閉鎖の安定化因子として作用していることを我々はこれまで報告してきた。今回は、この二つのシグナル伝達系間のクロストークの可能性について検討した。【方法】(1)Wistar 系幼若雌ラット顆粒膜細胞培養系において、interferon γ を添加し Fas を強発現させた後、可溶性リコンビナント Fas リガンド(100ng/ml)添加して、MTT 法、Hoechst 染色法、フローサイトメトリーによりアポトーシス誘導効果を解析した。さらに、アポトーシス実行機構としての caspase-3活性を Western blot 法により解析した。また、caspase-3 inhibitor を添加し MTT 法により GC 生存率を測定した。(2)NO 供与剤 SNAP(0.05-0.5mM)を Fas リガンドと同時に添加し、アポトーシス陽性率および caspase-3活性への影響を解析した。【成績】(1)Fas リガンド添加により、GC にアポトーシスが誘導され、caspase-3活性が亢進した。また、caspase-3 inhibitor 添加により、GC のアポトーシス陽性率は 93%抑制された。(2)SNAP と Fas リガンドの同時添加により、GC のアポトーシス陽性率は 93%抑制され、caspase-3活性も有意に低下した。【結論】NO 情報伝達系は、Fas-Fas リガンドシステムにより誘導される caspase カスケードの活性化を抑制し、GC のアポトーシスを阻止することが示唆された。