

(様式3号)

学位論文の要旨

氏名 田邊 学

〔題名〕

Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice

(メラトニンはマウス顆粒膜細胞の核、ミトコンドリア、細胞膜を酸化ストレス傷害から護る)

〔要旨〕

【目的】 活性酸素は排卵には必要であるが、過剰な活性酸素は卵や顆粒膜細胞に傷害を与える可能性がある。我々は松果体ホルモンであるメラトニンが卵胞内で抗酸化物質として働き、卵を保護していることを明らかにした。本研究では顆粒膜細胞に注目し、活性酸素が顆粒膜細胞のDNA、ミトコンドリア、細胞膜といった細胞小器官に与える傷害をメラトニンが防ぐことができるかどうかを検討した。【方法】 3週齢雌ICRマウスより排卵前の成熟卵胞から顆粒膜細胞を分離採取した。①control、②H2O2 (0.1~10 mM)、③H2O2 +メラトニン100 μ g/ml、④メラトニン100 μ g/mlの4群で顆粒膜細胞を2時間培養した。DNA損傷の評価として、塩基損傷マーカー

(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: 8-OHdG)、DNAの2本鎖断裂マーカー (γ H2AX) に対する抗体を用いた蛍光免疫染色を施行し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ミトコンドリア機能は活動性ミトコンドリアマーカーのMito Tracker Red (MTR) で染色し評価した。細胞膜損傷の評価は過酸化脂質マーカー (Hexanoyl-lysine : HEL) 濃度を測定した。また、アポトーシスの評価は核の断片化を有する細胞の割合とカスパーゼ3/7 (Csp3/7) 活性を測定した。

【成績】 H2O2添加では、核内の8-OHdGおよび γ H2AXの蛍光強度は増加、MTRの蛍光強度は低下、HEL濃度は上昇、Csp3/7活性は上昇し、アポトーシス細胞が増加した。これらのH2O2添加による変化は、メラトニン添加により抑制された。【結論】 活性酸素は顆粒膜細胞のDNA、ミトコンドリア、細胞膜を傷害するが、メラトニンはこれらの傷害を軽減させることで顆粒膜細胞を保護している。

(755字) 800字以内

作成要領

1. 要旨は、800字以内で、1枚でまとめること。
2. 題名は、和訳を括弧書きで記載すること。

学位論文審査の結果の要旨

| | | | |
|--|------------|-------|------|
| 報告番号 | 甲 第 1382 号 | 氏 名 | 田邊 学 |
| 論文審査担当者 | 主査教授 | 谷澤 幸生 | |
| | 副査教授 | 山崎 隆弘 | |
| | 副査教授 | 杉野 法広 | |
| 学位論文題目名 (題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) | | | |
| Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice (メラトニンはマウス顆粒膜細胞の核、ミトコンドリア、細胞膜を酸化ストレス傷害から護る) | | | |
| 学位論文の関連論文題目名 (題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) | | | |
| Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice | | | |
| 掲載雑誌名 Journal of Reproduction and Development 第 61 卷 第 1 号 P. 35 ~ 41 (2015 年 1 月) (掲載)・掲載予定) | | | |
| (論文審査の要旨) | | | |
| <p>活性酸素は排卵には必要であるが、過剰な活性酸素は卵や顆粒膜細胞に傷害を与える可能性がある。我々は松果体ホルモンであるメラトニンが卵胞内で抗酸化物質として働き、卵を保護していることを明らかにした。本研究では顆粒膜細胞に注目し、活性酸素が顆粒膜細胞の DNA、ミトコンドリア、細胞膜といった細胞小器官に与える傷害をメラトニンが防ぐことができるかどうかを検討した。</p> <p>3 週齢雌 ICR マウスより排卵前の成熟卵胞から顆粒膜細胞を分離採取した。①control、②H₂O₂ (0.1~10 mM)、③H₂O₂ + メラトニン 100 μg/ml、④メラトニン 100 μg/ml の 4 群で顆粒膜細胞を 2 時間培養した。DNA 損傷の評価として、塩基損傷マーカー (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: 8-OHdG)、DNA の 2 本鎖断裂マーカー (γH2AX) に対する抗体を用いた蛍光免疫染色を施行し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ミトコンドリア機能は活動性ミトコンドリアマーカーの Mito Tracker Red (MTR) で染色し評価した。細胞膜損傷の評価は過酸化脂質マーカー (Hexanoyl-lysine : HEL) 濃度を測定した。また、アポトーシスの評価は核の断片化を有する細胞の割合とカスパーゼ 3/7 (Csp3/7) 活性を測定した。</p> <p>H₂O₂ 添加では、核内の 8-OHdG および γH2AX の蛍光強度は増加、MTR の蛍光強度は低下、HEL 濃度は上昇、Csp3/7 活性は上昇し、アポトーシス細胞が増加した。これらの H₂O₂ 添加による変化は、メラトニン添加により抑制された。</p> <p>活性酸素は顆粒膜細胞の DNA、ミトコンドリア、細胞膜を傷害するが、メラトニンはこれらの傷害を軽減させることで顆粒膜細胞を保護している。</p> <p>本研究成果は、メラトニンが抗酸化物質として、卵巣顆粒膜細胞を保護し、その黄体化に貢献することを明らかにしたもので、黄体機能不全の病態解明やあらたな不妊症治療に繋がるものであり、学位論文として価値あるものと認めた。</p> | | | |
| 備考 審査の要旨は 800 字以内とすること。 | | | |