

論文の内容の要旨

論文題目 家族性卵巣機能不全原因遺伝子 FOXL2 による 核内受容体エストロゲンレセプター β の転写制御機構の解明

氏名 平野 茉来

1) 序文

近年の晩婚化傾向に伴い、不妊症は増加している。高齢女性の不妊症は難治性である。その中でも特に難治性の不妊症原因として早発卵巣機能不全 (premature ovarian insufficiency: POI) がある。早発卵巣機能不全は高ゴナドトロピン低エストロゲン血症を呈し 40 歳未満で無月経となる病態である。POI の原因として医原性のもの、自己免疫疾患異常によるもの、遺伝子異常のもの、特発性のものが挙げられる。遺伝子異常を呈する家族性 POI の症候群として BPE 症候群 (blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome) がある。BPE 症候群 type1 の女性患者では眼瞼異常と卵巣機能不全を呈する。近年この症候群の患者で FOXL2 (染色体 3q23) 遺伝子の変異がみつかった。

FOXL2 遺伝子は核内に存在する転写因子で卵巣に発現しており、性分化や顆粒膜細胞腫の発生に関係していると言われている。卵胞発育にも関与している可能性が高いが、FOXL2 の卵胞発育における意義は未だ十分解明されていない。

卵巣顆粒膜細胞ではエストロゲンが産生され、卵胞発育、排卵制御に関与することが知られているが、エストロゲンの核内シグナルを伝達する受容体はエストロゲン受容体 (Estrogen receptor; ER) であり、ER には α と β の二つのサブタイプがある。特に ER β は卵巣顆粒膜に主に存在し卵胞発育に関与していると言われている。

本研究では卵胞発育に重要な ER β と FOXL2 の相互関係に着目し、FOXL2 が ER β と結合し、ER β のエストロゲン依存性転写活性を抑制する事で卵胞発育に関与する可能性について検討した。

2) 方法

1. 免疫組織化学染色法

免疫組織化学染色用として、子宮頸癌もしくは子宮内膜癌のため摘出された、病理学的に正常なヒト卵巣組織切片を用いた。パラフィン切片を作成し、一次抗体として抗 FOXL2 抗体、二次抗体として EnVision Kit (DAKO) により horseradish peroxidase 含有二次抗体でプローブし Diaminobenzidine を用いて染色した。

2. 免疫沈降法、ウェスタンブロッティング

ヒト顆粒膜細胞腫細胞株である KGN 細胞と COV434 細胞を用いた。COV434 細胞は myc-FOXL2 WT をリポフェクション法でトランスフェクションした。細胞を回収後、KGN 細胞溶解液は anti-ER β 抗体と Protein G Sepharose 4 Fast Flow ビーズ、COV434 細胞溶解液は anti-myc M2 agarose と混和し免疫複合体を精製した。ビーズは洗浄後、SDS-PAGE に泳動しウェスタンブロッティングを行った。

3. GST pull down assay

GST ER β AF-1 と AF-2 ベクターを大腸菌 BL21 Codon Plus に形質転換し GST 融合タンパクとして大量に発現させ、Glutathione-Sepharose 4B ビーズと結合させた。GST 融合タンパクに 17 β -estradiol (E₂) 10⁻⁹M もしくは vehicle を添加して低温でインキュベート後ビーズを洗浄し GST 融合タンパクに結合したタンパクを SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロッティングを行った。

4. トランスフェクション及びルシフェラーゼ活性測定

293T 細胞をリポフェクション法でトランスフェクションした。ルシフェラーゼレポーター遺伝子、pM ベクター、internal control 用ベクター、発現ベクターを、トランスフェクションし、必要に応じて E₂ 10⁻⁶M もしくは vehicle を添加して培養した。細胞を回収後 Firefly luciferase 活性が測定した。トランスフェクション効率を正のため Renilla luciferase 活性も同時に測定した。

5. RNA 抽出及びリアルタイム定量 PCR

体外受精プログラムの際に回収された卵胞液を遠心分離して得られるヒト黄体化卵巣顆粒膜細胞を用いた。リポフェクション法を用いて FOXL2 の特異的 siRNA またはコントロール siRNA をトランスフェクションし、細胞を回収し RNA を抽出した。精製した RNA から cDNA を精製してリアルタイム定量的 PCR を行った。各試料の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA を測定することによって mRNA 量の補正を行った。

6. 統計解析

統計プログラムとして StatView Version 5 for Windows を使用し、多群間の比較に対し one-way ANOVA の後に、Dunnett *post-hoc* test を用いた。

3) 結果

FOXL2 のヒト卵巣における発現について

免疫組織化学染色法にてヒト卵巣顆粒膜細胞に FOXL2 が発現していることが判明した。さらに FOXL2 は一次卵胞や二次卵胞等の初期卵胞に多く発現し、黄体には発現が少ないという傾向がわかった。

FOXL2 は ER β と結合する

FOXL2 がヒト細胞内で ER β と相互作用するか否かを KGN 細胞と COV434 細胞で検討した。COV434 細胞では FOXL2 野性型を発現させて検討した。FOXL2 と ER β は特異的に共沈降するので KGN 細胞と COV434 細胞内において FOXL2 と ER β は結合していることが判明した。さらに結合領域を検討するため、ER β を AF-1 と AF-2 の 2 断片に分けた。GST 結合 ER β AF-1、GST 結

合 ER β AF-2 タンパクを E₂ 10⁻⁶ M もしくは vehicle を添加して低温でインキュベート後 SDS-PAGE にて泳動後、ウェスタンブロッティングで解析した。その結果 FOXL2 は ER β AF-1 と ER β AF-2 とともに結合し、リガンドの有無で結合状態に変化はなかった。

FOXL2 の ER β に対する転写活性抑制効果

FOXL2 が ER β の転写活性化能に影響を与えるか否かを検討した。FOXL2 を GAL-ER β と同時に 293T 細胞に発現させたところエストロゲン存在下でルシフェラーゼ活性はおよそ 0.5 倍に抑制された。この転写活性の抑制は GAL-ER β に特異的なもので、ER α では変化はなかった。さらに ER β AF-1, ER β AF-2 でも同様の結果を得た。この転写抑制の細胞レベルの影響を検討するため、ヒト黄体化顆粒膜細胞の内在性 FOXL2 を特異的 siRNA でノックダウンしたところ、ER β の下流因子であるアロマターゼの発現が上昇した。FOXL2 をノックダウンすることで ER β は脱抑制されると考えられるので FOXL2 の ER β に対する転写活性抑制効果が細胞レベルでも確認出来た。

4) 考察

FOXL2 はマウス卵巣では受精後 12.5 日後に発現が確認出来、初期卵胞に存在し胞状卵胞・黄体には発現しないという報告がある。本研究により FOXL2 がヒト卵巣顆粒膜細胞に発現し、初期卵胞に多く黄体に少ないという傾向が判明し、ヒト卵巣でもマウスと同様の発現パターンが推測される。FOXL2 は ER α と複合体を形成し ER α の AP-1 依存性転写活性能を抑制するという報告がされているが、FOXL2 と ER β については検討されていない。

本研究では、FOXL2 が ER β と結合し、ER β 特異的にエストロゲン依存性転写活性能を抑制する事が判明した。さらに ER を介して ER β の下流因子であるアロマターゼの発現を制御する事で卵胞発育に関与している可能性があることがわかった。アロマターゼは卵胞が黄体化する時に発現が増加する重要な因子であるが、FOXL2 はアロマターゼの発現を抑制するという報告と活性化するという報告共にある。いずれにせよ、既報では FOXL2 がアロマターゼに直接的に働く可能性について議論がされてきたが、本研究の FOXL2 が直接的にではなく ER β を介してアロマターゼの発現を制御するという着眼は初めてであり、FOXL2 と ER β の結合状態の変化によりアロマターゼの発現が調整している可能性がある。これは FOXL2 がアロマターゼについて異なるふるまいをすることについての説明になり得る。

また ER β は卵胞発育においては、卵巣において胞状卵胞から排卵までの卵胞発育、つまり分化に重要であると考えられており、腫瘍的側面からは ER β は細胞死促進作用をもち抗腫瘍作用があるという報告もある。

本研究により FOXL2 が ER β の機能抑制に重要な役割をもっていることが推測された。ER β は全段階の卵胞に存在する一方で FOXL2 が初期卵胞の顆粒膜細胞に多く存在する事で、卵胞発育において FOXL2 は初期卵胞が ER β により分化するのを抑制している可能性が示唆された。また腫瘍的側面では野生型 FOXL2 は ER β の機能を抑制することから、ER β の抗腫瘍性機序を抑制していることが推察される。この点においては FOXL2 は造腫瘍的作用があることが示唆される。

成人型顆粒膜細胞腫の 90%以上で FOXL2 の点変異 C134W がみついているが、私の preliminary な検討では FOXL2 C134W 変異型も、ER β のリガンド依存性転写活性化能を抑制することから、変異型 FOXL2 にも ER β の機能抑制があり、ER β の抑制以外にも何らかの腫瘍化メカニズムが存在する可能性が考えられるため、今後さらに検討すべき課題ではないかと考えられる。本研究により、転写因子 FOXL2 の新規転写機構が判明し、FOXL2 が ER β を介して卵胞発育に関与し、顆粒膜細胞腫の発展についても関与している可能性が示唆された。