

[課程-2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 平野 茉来

本研究では、卵胞発育において重要と考えられている転写因子 forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2 (FOXL2) のエストロゲン受容体 (Estrogen receptor: ER) 転写制御機構を明らかにするため、同じく卵巣顆粒膜細胞に発現している ER $\beta$ と FOXL2 との相関を検討し、その経路の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 病理学的に正常なヒト卵巣組織切片を、抗 FOXL2 抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、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判明した。以上から FOXL2 はヒトにおいても卵胞発育の初期に重要な役割を示す可能性が示唆された。
2. ヒト顆粒膜細胞腫細胞株である KGN 細胞と COV434 細胞を用いて免疫沈降法を行った。COV434 細胞は FOXL2 の発現量が少ないため FOXL2 野生型を強制発現させて行った。FOXL2 と ER $\beta$ は特異的に共沈降するという結果を得たため、KGN 細胞と COV434 細胞内において FOXL2 と ER $\beta$ は複合体を形成していることが判明した。結合領域を同定するため、ER $\beta$ を AF-1 と AF-2 の 2 断片に分け GST pull down assay を行ったところ、FOXL2 は ER $\beta$  AF-1 と ER $\beta$  AF-2 とともに結合し、リガンドである 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) の有無で結合状態に変化はなかった。
3. FOXL2 が ER $\beta$ の転写活性化能にどのような影響を与えるか検討した。FOXL2 と ER $\beta$ を同時に 293T 細胞に強制発現させたところ、E<sub>2</sub> 存在下でルシフェラーゼ活性は約 0.5 倍に抑制された。この転写活性の抑制は ER $\beta$ に特異的なもので、ER $\alpha$ のエストロゲン依存性転写活性に有意な変化はなかった。さらにエストロゲン依存性転写活性化領域である ER $\beta$  AF-2 でも同様の結果を得た。
4. 3 で認めた転写抑制の細胞レベルにおける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 $\beta$ の下流因子であるアロマターゼの発現が上昇した。3.の結果を考慮すると、FOXL2 をノックダウンすることで ER $\beta$ は脱抑制されることから FOXL2 の ER $\beta$ に対する転写活性抑制効果が細胞レベルでも機能する可能性が考えられた。

以上、本研究により FOXL2 が ER $\beta$ の機能抑制に重要な役割をもっていることを示唆するデータが得られた。ER $\beta$  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 $\beta$  により分化するのを抑制している可能性が示唆された。FOXL2 が ER $\beta$ の転写制御をするメカニズムは重要な新規知見であり、将来

的に、FOXL2 が関与する難治性不妊症早発卵巢不全症の治療において大いに貢献する可能性があると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。