

学 位 論 文 要 旨

氏 名 小泉 雅江

論 文 名 LGR4 はマウスにおいて雌生殖器の分化をコントロールする

学位論文要旨

【背景】 Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 (*Lgr4*)は7回膜貫通構造を持つ膜受容体の一つである。*Lgr4*は卵胞刺激ホルモン受容体(*Fshr*)や黄体形成ホルモン受容体(*Lhcgr*)などのゴナドトロピン受容体と相同性を持つ。近年、*Lgr4*がR-spondinをリガンドとしてWnt/ β -cateninシグナル経路の受容体として働くことが報告されている。また、R-spondin homolog (*Rspo1*)欠損マウスとwingless-type MMTV integration site family, member 4 (*Wnt4*)欠損マウスは雌生殖器の雄化を認めることが報告されており、胎児期雌生殖器においてもWnt/ β -cateninシグナル経路が重要な役割を果たしていることが予想される。

【目的】 マウスを用い、胎児期雌生殖器における*Lgr4*の機能解析とR-spondin・Wnt/ β -cateninシグナルとの関連について検証した。

【方法】

マウスは*Lgr4*の発現とその局在を解析するため*Lgr4*-EGFPノックインマウスを、*Lgr4*の機能解析を行うため*Lgr4*^{-/-}マウスを、コントロールとして野生型マウスを使用した。マウスの遺伝子型と性別はPCR法を用い判定した。

①*Lgr4*の発現解析のため、胎生14.5日の*Lgr4*-EGFPノックインマウスの卵巣に対し、抗GFP抗体を用い免疫染色を行った。*Lgr4*発現細胞の種類を同定するため、顆粒膜細胞・生殖細胞・上皮細胞の各マーカーであるFOXL2・DDX4・Keratin8に対する抗体を用い免疫染色を行った。

②*Lgr4*^{-/-}マウスの胎児期、新生児期における表現型を確認するため、HE染色を用い雌*Lgr4*^{-/-}マウスと雌雄野生型マウスの生殖器を観察した。日齢0においては拡大鏡でも観察した。

③雌卵巣における男性ホルモン合成酵素の発現の有無を確認するため、以下の解析を行った。男性ホルモン合成酵素の一つであり、ライディヒ細胞マーカーであるHSD3Bの抗体を用い、*Lgr4*^{-/-}マウスと野生型マウスの卵巣に対し免疫染色を行った。卵巣における男性ホルモン合成酵素の発現をRT-PCR法で解析した。男性ホルモンの産生量に差があるかをLC-MS/MSを用い測定した。

氏名 小泉 雅江

④ *Lgr4*^{-/-} マウス卵巣における、雄特異的なタンパク質でありセルトリ細胞マーカーであるSOX9の発現を調べるため、SOX9に対する抗体を用い、*Lgr4*^{-/-} マウスと野生型マウスの卵巣、精巣に対し免疫染色を行った。

⑤ 雌生殖腺における Wnt/ β -catenin シグナルとの関連を調べるため *Rspo1*^{-/-} マウス、*Wnt4*^{-/-} マウスで見られる生殖細胞の減少を *Lgr4*^{-/-} マウス卵巣においても認めるか、胎生 14.5 日の *Lgr4*^{-/-} マウス卵巣について抗 FOXL2 抗体と抗 DDX4 抗体を用いた免疫染色を行った。

⑥ 胎児期雌生殖器における *Lgr4* と Wnt/ β -catenin シグナルとの関係について調べるため、*Lgr4*^{-/-} マウス卵巣において Wnt/ β -catenin シグナルの標的因子が減少しているか確認した。*Lgr4*^{-/-} マウスと野生型マウスの卵巣を用い、qRT-PCR 法で *Lef1*、*Axin2*、*sp5* の発現について解析した。また、抗 LEF1 抗体を用い、LEF1 の発現について免疫染色を行った。

⑦ 成獣齢マウス卵巣における *Lgr4* の発現について、野生型マウス卵巣を用い、qRT-PCR 法で解析した。

【結果】 ① *Lgr4* は胎児期から新生児期において、雌卵巣の生殖細胞ではなく体細胞に発現していた。前顆粒膜細胞マーカーである FOXL2 陽性細胞のほとんどと共局在していた。② *Lgr4*^{-/-} 雌マウスが雄様のウォルフ管と性腺体細胞の異常発育を表現型とすることを発見した。③ *Lgr4*^{-/-} 雌卵巣において雄様の性ホルモン合成酵素の異常発現を認めた。*Lgr4*^{-/-} 雌卵巣における男性ホルモンの産生は有意な差を認めなかった。④ *Lgr4*^{-/-} 雌卵巣において野生型では認めない SOX9 陽性細胞の発現を認めた。⑤ *Lgr4*^{-/-} 雌卵巣において FOXL2 陽性細胞と DDX4 陽性細胞の減少を認めた。⑥ *Lgr4*^{-/-} 雌卵巣の体細胞において、lymphoid enhancer binding factor 1 (*Lef1*) や *axin2* (*Axin2*) などの Wnt/ β -catenin シグナル経路の標的遺伝子の発現レベルが野生型よりも低下していた。⑦ 野生型成獣齢マウスの卵巣においても *Lgr4* は発現しており、性周期に伴い発現量に変化した。

【考察】 *Lgr4* が *Rspo1*-Wnt/ β -catenin 共経路を通じて卵巣の分化、特に体細胞の分化において重要な役割を担うことを示唆した。

キーワード (3~5)	Female reproductive tract; Fetal development; Sex determination; Sex differentiation; Steroid hormones
-------------	--