

学位論文審査結果の要旨

氏名	小泉 雅江
審査委員	主査 堀内 正嗣 副査 萬家 俊博 副査 福田 光成 副査 津田 孝治 副査 堀内 史枝

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
審査結果の要旨

【背景】哺乳類の性分化は性決定遺伝子 SRY の有無により規定されると考えられていたが、近年、抗精巣遺伝子と呼ばれる遺伝子群が、雌において生殖腺及び生殖器の男性化を抑制しているという説が唱えられるようになった。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、*Lgr4* は卵胞刺激ホルモン受容体や黄体形成ホルモン受容体等のゴナドトロピン受容体と相同性を持つ。既に、*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並びに、R-spondin homolog (*Rspo1*) 欠損マウスと wingless-type MMTV integration site family, member 4 (*Wnt4*) 欠損マウスでは雌生殖器の雄化を認めることが報告されている。これらを踏まえ申請者は、*Lgr4* が R-spondin・Wnt/ β -catenin シグナル経路を介して性分化決定に重要な役割を果たしていると考え、マウス胎児期雌生殖器における *Lgr4* の機能解析を行い、*Lgr4* と R-spondin・Wnt/ β -catenin シグナルとの関連について検証し、性分化機序の解明を目指した。

【方法】まず、胎生 14.5 日の *Lgr4*-EGFP ノックインマウス卵巣を用いて GFP 及び forkhead box L2 (FOXL2)、DEAD box polypeptide 4 (DDX4)、Keratine-8 に対する免疫染色を行い、*Lgr4* 発現部位及び細胞を同定した。次に、*Lgr4* ノックアウトマウス (*Lgr4*^{-/-}) 及び野生型マウスの胎児期、新生児期における生殖器を観察し、*Lgr4*^{-/-} の表現型を確認した。さらに、*Lgr4*^{-/-} の性腺分化を評価するため、アンドロゲン合成酵素の発現（免疫染色並びに RT-PCR 法）、アンドロゲン産生量 (LC-MS/MS 法)、セルトリ細胞への分化 (SRY-box9 (SOX9) 免疫染色)、卵巣の前顆粒膜細胞及び生殖細胞数 (FOXL2 及び DDX4 免疫染色) を検討した。さらに、Wnt/ β -catenin シグナル標的因子である lymphoid enhancer

binding factor 1 (*Lef1*)、*axin2* (*Axin2*) 等の発現量を quantitative RT-PCR 法で定量し、LEF1 発現を免疫染色で確認した。また、野生型成獣齢マウス卵巣に於ける *Lgr4* 発現量を quantitative RT-PCR 法で定量した。

【結果】 1) *Lgr4* は胎児期から新生児期マウスに於いて、雌卵巣の生殖細胞ではなく体細胞に発現し、前顆粒膜細胞マーカーである FOXL2 陽性細胞と共局在していた。2) *Lgr4*^{-/-}雌では雄様ウォルフ管と性腺体細胞の異常発育が認められた。3) *Lgr4*^{-/-}雌卵巣に於いて雄様の性ホルモン合成酵素発現が認められたが、男性ホルモンの産生量には有意差がなかった。4) *Lgr4*^{-/-}雌卵巣では、野生型では認められない SOX9 陽性細胞の発現が認められた。5) *Lgr4*^{-/-}雌卵巣において FOXL2 陽性細胞と DDX4 陽性細胞の減少が認められた。6) *Lgr4*^{-/-}雌卵巣の体細胞では、Wnt/ β -catenin シグナル経路の標的遺伝子である *Axin2* の発現レベルが野生型よりも低下していた。7) 野生型成獣齢の雌卵巣でも *Lgr4* は発現しており、性周期に伴い発現量が変化した。

【結論】 *Lgr4* ノックアウト雌マウスの生殖器の表現型が雄化することを示し、*Lgr4* が抗精巣遺伝子のひとつとして機能することを明らかにした。さらに、*Lgr4* が Rspo1-Wnt/ β -catenin シグナル共経路を介して雌性腺の体細胞分化異常に関わる可能性が示唆された。

本論文の公開審査会は平成 28 年 1 月 12 日に開催された。申請者は研究内容を英語で明確に口頭発表し、以下の内容を含む多くの質疑に対して的確に応答した。さらに、今後、抗 *Lgr4* 抗体を作成し、*Lgr4* の局在や機能について解明するとともに、臨床応用の可能性を探る等、今後の展望を述べた。

1) 性決定機序と抗精巣遺伝子の役割、2) *Lgr4*^{-/-}のアンドロゲン受容体発現、3) *Lgr4*^{-/-}雄での精子形成不全の有無、4) *Lgr4*^{-/-}成獣での検討、5) *Lgr4* 過剰発現マウスの表現型、6) *Lgr4* のリガンド候補、7) 性分化における *Wnt4*、 β -catenin に対する *Lgr4* の相対的重要度、8) ヒトでの *Lgr4* 欠損の報告の有無、臨床症状及び生殖可能性、9) 卵巣機能不全または不妊症治療への *Lgr4* の臨床応用の可能性

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が博士（医学）の学位授与に値すると判定した。