

博士論文

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

目次

要旨.....	4
1) 序文.....	5
2) 方法.....	13
1. 試薬.....	13
2. 細胞培養.....	13
3. 免疫沈降法.....	14
4. プラスミド作成.....	15
5. 免疫組織化学染色法.....	15
6. GST-pull down アッセイ.....	16
7. ウェスタンブロッティング.....	18
8. ルシフェラーゼアッセイ.....	18
9. short-interference RNA による内在性 FOXL2 のノックダウン.....	20
10. RNA 抽出及びリアルタイム定量 PCR.....	21
11. 統計学的手法.....	22
3) 結果.....	23
1. ヒト顆粒膜細胞における FOXL2 タンパク質の発現.....	23
2. 内在性 FOXL2 と ER β との複合体形成についての解析.....	23
3. FOXL2 と ER β の複合体形成と結合部位についての解析.....	24
4. ER β 全長のエストロゲン依存的転写活性化能に対する FOXL2 の影響についての解析.....	26
5. ER α 全長のエストロゲン依存的転写活性化能に対する FOXL2 の影響についての解析.....	26
6. ER β のエストロゲン依存的転写活性化能に対する FOXL2 の影響についての解	

析.....	27
7. 内在性遺伝子発現における FOXL2 の aromatase の発現に対する影響について の解析.....	27
4) 考察.....	29
5) 結論.....	33
謝辞.....	34
略語.....	35
文献.....	36
図.....	47

要旨

早発卵巢不全とは 40 歳未満での閉経を指し、難治性不妊の原因となることが多い。FOXL2 は家族性卵巢機能不全の原因遺伝子であり、FOXL2 変異により早発卵巢不全になることが知られているが、その全体的な機能はいまだ不明な点が多い。本研究において、ヒト卵巢では FOXL2 は初期卵胞に多く発現し、黄体に少ない傾向があった。さらにエストロゲン受容体 (ER) β と FOXL2 が内在性複合体を形成し、FOXL2 が ER β のエストロゲン依存的転写活性化能を抑制することが明らかになり、細胞内でも関与する可能性が示唆された。よって FOXL2 の卵胞発育に関連した一つの機能として、ER β 下流遺伝子発現の抑制という機序が考えられた。

1) 序文

近年日本においては女性の社会進出に伴い晩婚化が進行している。平均初婚年齢の推移をみると昭和 22 年で夫 26.1 歳、妻 22.9 歳であったが、平成 24 年では夫 30.8 歳、妻 29.2 歳と、夫は 4.7 歳、妻は 6.3 歳平均年齢が上昇しており、¹ 晩婚化が進んでいる (Figure 1)。特に大都市では晩婚化傾向が顕著であり、女性の社会進出増加に伴い今後も晩婚化傾向は進んでいくものと考えられる。

不妊とは「生殖年齢の男女が妊娠を希望し、ある一定期間、性生活を行っているにもかかわらず、妊娠の成立をみない状態」² と定義され、世界保健機構 (World Health Organization: WHO) では不妊症は 1 年間の不妊期間をもつものとしている。年齢が高い夫婦では不妊期間が比較的短くてもその後の妊娠率が低いため、1 年未満の不妊期間でも不妊症と考え不妊治療を開始することも多い。現在では 10 組から 5 組の夫婦につき 1 組が不妊症であるものと考えられており、2007 年日本生殖医学会の報告³ では調査された時代や国により 1.3% から 26.4% に分布し、全体では約 9% の夫婦が不妊症であると推定されている。ヒトを含めて大多数の哺乳類における卵巢生殖細胞の増殖は、胎生期のみ限定されている。ヒトの場合、原始卵胞は胎生期に約 700 万個存在するが、そこから減数分裂を開始して出生期には 30 万个程度に減少する。それ以降も卵胞数は一方的に減少していくのみで、決して増加することはない^{4,5}。加齢により卵の量のみならず卵の質低下、排卵機能障害の増加という悪影響が起こるのみならず、子宮内膜症や子宮筋腫等の婦人科的な器質的異

常の増加等が認められることから、女性の妊孕能は加齢とともに相当低下することが疫学的に知られている⁶。上述のような晩婚化傾向も相まって、不妊症は常に増加しており、不妊症治療のため生殖補助医療は常に増加傾向（Figure 2）にあり、不妊症の治療開始年齢も上昇している。不妊症の治療開始年齢が上昇すると、加齢により妊孕性が低下することから、治療予後すなわち妊娠率も低下する（Figure 3）。仮に妊娠に至ったとしても、自然流産の確率が高くなることから生児獲得は困難となることから、概して高齢女性の不妊症は難治性である⁶。難治性の不妊症の原因疾患として、卵巣の急激な老化の一つとも言われる早発卵巣機能不全（primary ovarian insufficiency: POI）があることが近年明らかになってきた。

早発卵巣機能不全とは、高ゴナドトロピン性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と定義される^{7,8}。POI の明確な診断基準はないものの、3-6 ヶ月程度の無月経であり、複数回の測定で FSH 値が 40 mIU/mL 以上、低エストロゲン血症である場合に POI と診断することが一般的である⁹。その発症頻度は 20 歳未満で 0.01%、30 歳未満で 0.1%、40 歳未満で 1%と言われている¹⁰。POI 女性はホットフラッシュ、膣乾燥感、寝汗等の典型的な更年期症状を呈し、骨粗鬆症や不妊症となるリスクが高い⁹。POI の原因として、抗腫瘍剤や骨盤内手術などの医原性のもの、副腎不全や甲状腺機能低下などを合併する自己免疫疾患異常によるもの、ターナー症候群等を代表とする性腺形成不全によるもの、そして特発性のもの

が挙げられる¹⁰。聖マリアンナ医大の報告によれば、約 15%は染色体異常、約 10%は自己免疫疾患を合併しているが、大部分の POI 症例は原因の特定できない特発性であり、しかも 4~30%は家族性に発生することから遺伝子異常に関する知見の集積が必要である。近年の遺伝学進歩により様々な遺伝子が POI 発症に関連することが明らかとなってきた。脆弱性 X 症候群における FMR-1 (Xq27.3 に存在し、第 1 exon 非翻訳領域の CGG repeat 数が 60~200 の場合 POI 合併率が高いことが知られている)¹¹、FMR-2 (FMR-1 近傍の 1Xq28 における microdeletion)¹²、BMP15 (Xp11.2 に位置する卵細胞特異的タンパク質で、初期発育卵胞の段階で発現する。主として homodimer として働き顆粒膜細胞増殖を促進する)¹³、FSH receptor (2p21-p16 に位置し、第 7 exon 566 の 189 番目のアミノ酸残基が Ala から Val に置換する点変異が知られている)¹⁴、LHβ (LHβ サブユニット遺伝子の mutation が POI 症例で報告されている)¹⁵、NOGGIN (NOGGIN ポリペプチドは BMP4, 7 などに結合し、その活性を制御する)¹⁶、NOBOX (7q35 に位置する Homeobox 転写調節因子であり、マウスでは卵胞発育に重要な役割を担う)¹⁷、GALT (9q13 に位置し、ガラクトース血症患者のうち 60~70%が POI を合併すると報告されている)¹⁸、などの因子の報告が相次いでいる。常染色体異常による POI も近年あきらかになってきた。その中で近年注目されている異常として FOXL2 (forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2) 遺伝子異常による家族性 POI 疾患である BPES (blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome) が挙げられる¹⁹。

BPES には type 1 および type 2 が存在する²⁰。BPES type 1 女性は眼瞼異常と早発卵巣機能不全を呈し、BPES type1 男性は眼瞼異常を呈するが妊孕性に異常はない。BPES type 2 では男女ともに眼瞼異常のみが認められる¹⁹ (Figure 4)。BPES の責任遺伝子として、常染色体3q23に局在するFOXL2 が2001年に同定された¹⁹。BPES type 1 患者ではFOXL2 遺伝子が点変異を起こし停止コドンとなることから Q129X, W204X などがホットスポットとして知られているのに対し、type 2 患者ではFOXL2 遺伝子が重複を起こしている (A224_A234dup など) ことが遺伝学的検索により判明した。BPES type1 女性患者の卵巣では、卵胞1つに対し卵子が2個あるというような形態的異常があること、早発卵巣不全に合致するような原始卵胞数とそれ以降の卵胞数の比が年齢不相応に減少しているという異常が報告されている (Figure 5) が、卵巣機能不全の程度は患者により大きく異なり、原発性無月経から続発性無月経まで様々な程度の患者が存在する²¹。FOXL2 遺伝子は forkhead ファミリーに属し核内に局在する転写因子の一つで、翼状の螺旋構造をもつ DNA 結合に重要な forkhead ドメインを持ち、14 残基のアラニン構造を持つ 379 アミノ酸からなる 1 エキシソンの遺伝子である²² (Figure 6)。FOXL2 の属する forkhead ファミリーはヒトでは 44 遺伝子がみつかっており、110 アミノ酸から成る共通した DNA 結合ドメインを持つ。DNA 結合部位である forkhead ドメインは 3 つの α -helix と 3 つの β -sheet と β -sheet を分ける 2 つの winged helix から成り、単量体として DNA

に結合する^{23,24}。例えば、FoxA はヌクレオソームの片側の DNA に結合し、ヒストンのアセチル化と無関係にヌクレオソーム内でより DNA がより構造を変えやすくしている²³。このことから forkhead ドメインはクロマチンを弛緩することで直接的に遺伝子を活性化させることが出来るものと示唆される。このため forkhead タンパク質は転写活性化因子としてふるまうことが多いが、FoxC2, -D2, -D3, -G1 は転写抑制因子として働く事が報告されている²³。また線虫では MAP キナーゼ経路のリン酸化によって転写を抑制したり活性化したりするという報告がある²³。FOXL2 は主に眼瞼と卵巣に発現している¹⁹。FOXL2 の卵巣における局在については、FOXL2 は 12.5 dpc (day post coitum) のマウス卵巣で発現が確認されており²⁵、幼弱マウスの卵巣では卵子以外の全ての段階の卵胞に発現していたが、成熟したマウスの卵巣では小～中卵胞に主に発現し、大きい卵胞にはわずかに発現し、胞状卵胞・黄体には FOXL2 は発現していない²⁶。FOXL2 はマウス卵巣では初期卵胞に存在し黄体に存在しないことから卵胞発育段階の初期に重要な役割を示すと推測されている。FOXL2 の卵巣に関連した機能は、これまでに多数の報告があるが、①卵巣機能に関連した報告と②抗腫瘍的機能に関する報告に大別される。FOXL2 の時期特異的ノックアウトマウスでは、性成熟後のメスマウスの卵巣顆粒膜細胞がセルトリ細胞様に形態的变化を示したという性分化に関連した表現型があり、SOX9 の FOXL2 による発現抑制がその原因であると報告された²⁷が、ヤギでも同様の報

告がある²⁸。FOXL2 の卵胞発育に関連した標的遺伝子としては gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)、steroidogenic acute regulatory protein (StAR)、aromatase などの報告がある²⁹⁻³¹。FOXL2 Q219X は POI となる FOXL2 の変異型の一つだが、FOXL2 野生型では卵胞発育、黄体化促進因子である StAR、aromatase、P450scc のプロモーター活性を抑制するが、FOXL2 Q219X は StAR、aromatase、P450scc のプロモーター活性を抑制しない^{26,31}。他方では、FOXL2 が aromatase プロモーターを活性化させることで aromatase の発現を亢進させるという報告もある^{29,32}。実際タンパク質の発現レベルでは、卵巣における FOXL2 と aromatase の局在は同じで FOXL2 が存在すると aromatase の発現が多い^{29,33}。このため FOXL2 が aromatase の活性化因子かどうかについては明らかになっていず、FOXL2 が aromatase に直接的に働く^{30,34}という以外の機序が FOXL2 と aromatase の関係においてはあり得る。FOXL2 の卵胞発育過程における発現の変化についても報告はなく、卵胞発育の初期段階において重要なのか、中期から後期すなわちゴナドトロピンと関連するのかを明らかにした報告もない。また FOXL2 変異は造腫瘍的になることが知られており、卵巣腫瘍の一種である成人型顆粒膜細胞腫においては 95% 以上で FOXL2 C134W の変異がみられることが報告されている³⁵。FOXL2 変異を細胞に導入すると細胞死抵抗性になる³⁶ことから、野生型 FOXL2 は抗腫瘍的機能を持つことが推測されている。しかしその機序は不明な点もあり、卵巣における

FOXL2 の機能解析はいまだ不十分である。

卵巣顆粒膜細胞において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おり、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) である⁴³。ER には α と β の2つのサブタイプが存在し、ER α は脳、乳腺、卵巣、子宮、骨、精巣に発現し、ER β は脳、心臓、副腎、腎臓、腸、卵巣、膀胱、前立腺に発現しており、明らかな組織特異性が存在する³⁷。ER α は染色体 6q25 に位置し、ER β は染色体 14q23 に位置する。ER は核内受容体スーパーファミリーに属し、核内で働く転写因子であり、リガンドであるエストロゲン (主として 17 β -estradiol: E₂) と結合し、標的遺伝子のプロモーター上の応答配列を認識する³⁸。ヒト ER α は 595 アミノ酸、ヒト ER β は 530 アミノ酸から成り、アミノ基末からカルボキシル基末まで順に A/B・C・D・E・F の5つのドメインを持つ (Figure 7)。DNA 結合部位であるドメイン C は ER α と ER β は 95%の相同性を持つが、リガンド結合部位であるドメイン E の相同性は 55%でありサブタイプの生理的機能の違いと関連付けられている。アミノ基末にある A/B はリガンド非依存的転写活性化領域 (activation function-1: AF-1) があり、カルボキシル基末にあるリガンド結合部位にはリガンド依存的転写活性化領域 AF-2 が存在する³⁷。ER の転写活性化経路は古典的には、ER ホモ 2 量体の DNA 結合ドメインが標的遺伝子プロモーター上に存在するエストロゲン応答配列 (Estrogen responsive element:

ERE) を認識して DNA に結合し、エストロゲンが ER のリガンド結合ドメインに結合することによって立体構造の変化が惹起され、その結果標的遺伝子の転写が制御される (Figure 8)。この古典的経路以外にも、AP-1 (activating protein-1) や SP-1 (stimulating protein-1) 等の転写因子の転写共役因子として働くことで ERE を介さないで転写を活性化する経路や、成長因子や MAP キナーゼ系等の活性化を介した ER のリン酸化による、リガンドを必要としない転写活性化の経路も存在することも報告されている³⁹。ER と卵巣に関する知見については、ER α は卵巣の莢膜細胞や間質細胞に多く発現しているのに対し、ER β はエストロゲン産生の主な部位である顆粒膜細胞に多く発現していることが知られている⁴⁰。ER ノックアウトの生殖器関連の報告⁴¹があり、ER α ノックアウトマウス (α ERKO) は雌雄ともに不妊となり、メス卵巣ではエストロゲンとテストステロンが上昇し、慢性的に黄体化ホルモン (luteinizing hormone; LH) が上昇しているため出血性嚢胞が多く発達し卵胞が成熟しない。一方 ER β ノックアウトマウス (β ERKO) では、オスの妊孕性は変化しないがメスは妊孕性が低下し、ゴナドトロピン・ステロイドホルモン値は正常であるが、卵巣では黄体数が減少している^{42,43}。卵巣顆粒膜細胞特異的 β ERKO では、大きな胞状卵胞の数と黄体の数が減り、大きな卵胞のアポトーシスが増加している傾向が顕著である。

FOXL2 は ER α 、ER β 共に複合体を形成し²⁷、FOXL2 は古典的経路である ERE 依

存性 ER α の転写活性は変化させないが、AP-1 依存性 ER α の転写活性を抑制するという報告⁴⁴がある。排卵に重要な Cyclooxygenase-2 (COX-2) は AP-1 依存性 ER α の転写活性の標的遺伝子であり、ER α 依存性 COX-2 の発現を FOXL2 が抑制する事で卵胞発育を制御している可能性があるという報告⁴⁴されている。しかし卵胞発育に重要な卵巣顆粒膜細胞に主に存在する ER β と FOXL2 の複合体がどのような機能をもつかの報告はない。FOXL2 と同じく顆粒膜細胞に多く発現し、卵胞発育に重要なエストロゲンの核内シグナルを伝達することから、卵胞発育において FOXL2 は ER α より ER β との関連がより深い可能性が考えられる。本研究では FOXL2 と ER β の相互作用、特に FOXL2 が ER β のリガンド依存性転写活性化能に与える影響について分子生物学手法で検討した。FOXL2 は ER β と直接的に結合し、ER β 特異的にエストロゲン依存性転写活性化能を抑制していることが明らかになった。さらに ER を介して ER β の下流因子である aromatase 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示唆された。FOXL2 が ER β の機能抑制に重要であることから、FOXL2 の卵胞発育に関連した機能や FOXL2 の変異型が腫瘍化する機能についての一部が解明された。

2) 方法

1. 試薬

17 β -estradiol (E₂) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。

2. 細胞培養

ヒト卵巣顆粒膜細胞腫細胞株である KGN 細胞（成人型顆粒膜細胞腫由来）およびヒト胎児腎臓由来の培養細胞株 293T 細胞は理研 BRC（つくば, 日本）より入手し、ヒト卵巣顆粒膜細胞腫細胞株である COV434 細胞（若年型顆粒膜細胞腫由来）は Health Protection Agency Culture Collection (Salisbury, UK) より入手した。293T 細胞と COV434 細胞の培養は 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を用いた。ヒト黄体化卵巣顆粒膜細胞は、東京大学医学部附属病院女性診療科・産科において、体外受精プログラムにおいて回収された卵胞液より遠心分離し回収した⁴⁵。ヒト黄体化卵巣顆粒膜細胞を使用する実験は東京大学研究倫理委員会によって承認され（3594-(2)）、患者より書面による事前同意を得て行われた。KGN 細胞とヒト黄体化顆粒膜細胞の培養は 10% FBS を添加した DMEM/F-12 を用いた。FBS、DMEM は Sigma Aldrich より購入した。E₂ を加える際には、溶媒（エタノール）を用いて、培養液中の E₂ 最終濃度は 10⁻⁹ M となるよう調整した。E₂ を加える実験を行う際には、一般の培養液に pH センサーとして添加されている phenol red に弱いエストロゲン作用があるため⁴⁶、phenol red-free の培養液を使用した。また培養液に添加して用いるウシ胎児血清にも微量ながらエストロゲンなどのステロイドホルモンや増殖因子が含まれているため、これらの物質を可及的に吸着・除去するためにチャコール処理した血清を使用した⁴⁷。

3. 免疫沈降法

KGN 細胞と COV434 細胞を用いて細胞内における FOXL2 と ER β との複合体形成能を検討した。KGN 細胞を DMEM/F12 (10% FBS) にて 100 mm dish 上で培養し、細胞をスクレーパーで回収し、TNE バッファー(10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, protease inhibitor cocktail 添加) で溶解し、バイオラプター (コスモ・バイオ株式会社, 東京,日本) を用いて 10 秒破碎、20 秒冷却を 10 回反復して細胞溶解液を調整し遠心処理を行った。上清に anti-ER β 抗体 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA : 2 μ g) を加え 4°Cにおいて 1 時間インキュベートした。ここに Protein G Sepharose 4 Fast Flow ビーズ 25 μ g (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, UK) を加え、4°Cにおいて 16 時間インキュベートすることで免疫複合体を精製した。COV434 細胞では pcMV-myc-FOXL2 野生型を強制発現させ (トランスフェクション前日 100 mm dish に 1.5×10^6 cells / dish の濃度で plating し、pCMV-myc-FOXL2 野生型 2 μ g を Effectene (Qiagen, Duesseldorf, Germany) を用いてトランスフェクションした) 2 日間培養し、得られた細胞溶解液の上清に anti-c-Myc agarose affinity gel (Sigma Aldrich) 25 μ g を加え、同様に免疫複合体を精製した。ビーズを軽く遠心して回収し、十分に洗浄した後に、ビーズ結合タンパクを 10% SDS-PAGE で泳動し、Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, USA) にブロッティングした。ブロッティング後メンブレンを、10%スキムミルク入り TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で 1 時間ブロッキング、一次抗体

anti-FOXL2 抗体 (MBL, 名古屋, 日本) または anti-ER β 抗体 (Santa Cruz) 入り TBS-T に 1 時間、二次抗体 (anti-rabbit IgG 抗体 : 1:3000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 入り TBS-T に 1 時間浸透した。メンブレンは各々の段階で TBS-T で 3 回ずつ洗浄した。二次抗体に結合している horseradish peroxidase は ECL advance (GE Healthcare UK Ltd) のマニュアルに従い化学発光され、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare UK Ltd) で検出した。継代数の違う細胞を用いて 3 回繰り返した。

4. プラスミド作成

pCMV-myc-FOXL2 (野生型・変異型ベクター) は Bae 博士 (Department of Life Science, College of Natural Science, Chung-Ang University, 大韓民国) から供与を受けた。pcDNA Flag ER β は pcDNA3 (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) から作成した pcDNA-Flag ベクターにフレームが合うように ER β の全長を挿入して作成したものを使用した⁴⁸。GST ER β AF-1/2 は、ER β の AF-1 領域 (アミノ酸 1~149)、AF-2 領域 (アミノ酸 248~530) を pGEX 4T-1 vector (GE healthcare) のマルチクローニングサイトにフレームがあうように組み込み構築したものを⁴⁹を用いた。

ルシフェラーゼレポーターは、エストロゲン応答領域 ERE (GGTCAGAGTGACC) がタンデムに 3 回反復した領域、thymidine kinase プロモーター、ルシフェラーゼレポーター-遺伝子という順番に各々が入るように、pGL3 basic vector (Promega, Madison, WI, USA) を元に構築された ERE tk Luc を⁵⁰を用いた。17m8

AdMLP Luc は既報のものを用いた⁴⁸。

5. 免疫組織染色

東京大学研究倫理委員会の承認（324）を得て、文書にて患者から同意を得た組織切片を用いた。本研究で用いた卵巢組織は正常月経周期をもつ 32～42 歳の患者 15 人から得られた。対象患者は全てホルモン剤や gonadotropin releasing hormone (GnRH) アナログの投与を受けておらず、子宮頸癌もしくは子宮内膜癌のため手術が行われた際に摘出された、病理学的に正常な卵巢組織を免疫組織化学染色に使用した。得られた組織は、10%アルデヒドで固定した後パラフィン包埋され、4 μm の切片に薄切した後に organosilane コートスライド上に載せられた。スライドをキシレンで脱パラフィン処理したのち、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 内で電子レンジによる microwave 照射により抗原賦活化をおこなった。十分自然冷却した後、0.3% 過酸化水素含有メタノール液にて内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制した。0.1% NP-40、5% Bovine serum Albumin 含有 PBS にてブロッキング後、FOXL2 に対する特異的二次抗体を用いて 4°C で一晩インキュベートした。コントロールとして preimmune IgG を使用した。PBS にて洗浄後、EnVision Kit (DAKO, Glostrup, Denmark) 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。スライドは Mayer-Hematoxylin 液 (Wako Chemical, 大阪, 日本)

にて核染色した後に包埋された。

6. GST-pull down アッセイ

GST-pull down アッセイにより ER β と FOXL2 との複合体形成能と結合部位について検討した。GST 融合タンパク質カラムは以下のように調整した。GST ER β AF-1、GST ER β AF-2 ベクターを、大腸菌 BL 21 Codon Plus (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) に形質転換した。形質転換後の大腸菌は、37°Cで震盪しながら LB 培地にて培養し、培養液の OD₆₀₀ が 0.4~0.5 に到達した直後に、Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside を最終濃度 0.1 mM になるように培地に加え GST 融合タンパク質としてタンパク質発現誘導を行い、IPTG 誘導後は、培地を 30°Cで 2 時間震盪培養した。タンパク質発現誘導終了後は遠心にて大腸菌を集菌し、PBS (+10% Glycerol、10 mM EDTA) で大腸菌ペレットを溶解し、超音波にて大腸菌を機械的に破碎した。Triton X-100 を最終濃度 1%になるように加え、タンパク質を 4°Cで可溶化し、可溶化したタンパク質を遠心にて回収した後、Glutathione-Sepharose 4B ビーズ (GE Healthcare UK Ltd) に、可溶化画分に含まれる GST 融合タンパク質を結合させた。ビーズは 4 回の洗浄後、少量を SDS-PAGE にかけて Coomassie Brilliant Blue 染色をすることにより、目的のタンパク質の発現を確認した後、アフィニティーカラムとして使用した。以上のように大腸菌により発現され、ビーズに結合した GST 融合タンパク質を、GST pull down assay に用いた。GST 融合タンパク質に

E₂ 10⁻⁹M もしくは vehicle を添加した後、NET-N+ バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, protease inhibitor cocktail) の存在下で pCMV-myc-FOXL2 を強制発現させた (トランスフェクション前日 100 mm dish に 1×10⁶ cells / dish の濃度で plating し、pCMV-myc-FOXL2 野生型 2 μg を Effectene (Qiagen) を用いてトランスフェクション後 2 日間培養) 293T 細胞の全細胞抽出液と 4°Cにて 60 分間インキュベートし、ビーズを NET-N+ buffer で 6 回洗浄後、10%の SDS-PAGE で泳動し、Immobilon-P にブロッティングした。一次抗体に抗 anti-FOXL2 抗体を用いて免疫沈降時と同様の手法でウェスタンブロッティングをおこなった。継代回数の違う細胞を用いて 3 回繰り返した。

7. ウェスタンブロッディング

ヒト黄体化顆粒膜細胞を DMEM/F12 (10% FBS) にて 6 well (35 mm 径) 上で培養し、細胞をスクレーパーで回収し、TNE バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, protease inhibitor cocktail 添加) で溶解し、バイオラプター (コスモ・バイオ株式会社) を用いて 10 秒破碎、20 秒冷却を 10 回反復して細胞溶解液を調整し遠心処理を行った。細胞溶解液の上清を 10% SDS-PAGE で泳動し、Immobilon-P (Millipore) にブロッティングした。ブロッティング後メンブレンを、10%スキムミルク入り TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150

mM NaCl, 0.05% Tween 20) で1時間ブロッキング、一次抗体 anti-FOXL2 抗体 (MBL) または anti- β -Actin 抗体 (Santa Cruz) 入り TBS-T に1時間、二次抗体 (anti-rabbit IgG 抗体 : 1:3000、anti-mouse IgG 抗体: 1:3000、Cell Signaling) 入り TBS-T に1時間浸透した。メンブレンは各々の段階で TBS-T で3回ずつ洗浄した。二次抗体に結合している horseradish peroxidase は ECL advance (GE Healthcare UK Ltd) のマニュアルに従い化学発光され、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare UK Ltd) で検出した。継代回数の違う細胞を用いて3回繰り返した。

8. ルシフェラーゼアッセイ

FOXL2 による ER α および ER β のリガンド依存性転写活性化能への影響を調べるためにルシフェラーゼアッセイをおこなった。293T 細胞を用いて phenol red-free DMEM (5% チャコール処理 FBS) にて前培養し、トランスフェクションの前日 12 well dish に 1×10^5 cells / well の濃度で plating した。トランスフェクションは Effectene (Qiagen) を用いて行われた。トランスフェクションの内容は以下の通りである。

- ① Lane 1~4: E₂ なし、1: pcDNA3、2: pcDNA3 Flag ER β 、3: pCMV-myc-FOXL2、4: pcDNA3 Flag ER β + pCMV-myc-FOXL2 を加えた。Lane 5~8: 10^{-9} M の E₂ を培地中に添加、5: pcDNA3、6: pcDNA3 Flag ER β 、7: pCMV-myc-FOXL2、8: pcDNA3 Flag ER β + pCMV-myc-FOXL2 を加えた。

② Lane 1: E2 なし、 pcDNA3 Flag ER α 、 Lane 2~4: 10⁻⁹ M の E₂ を培地中に添加、 2: pcDNA、 3: pcDNA3 Flag ER β 、 4: pcDNA3 Flag ER β + pCMV-myc-FOXL2 を加えた。

③ Lane 1~3; E2 なし、 1: pM + pcDNA3、 2: pM ER β AF-2 + pcDNA3、 3: pM ER β AF-2 + pCMV--myc-FOXL2、 Lane 4~6: 10⁻⁹ M の E₂ を培地中に添加、 4: pM + pcDNA3、 5: pM ER β AF-2 + pcDNA3、 6: pM ER β AF-2 + pCMV-myc-FOXL2 を加えた。

①および②の well 全てにルシフェラーゼレポーター遺伝子 (ERE tk Luc) を 250 ng、
③の well 全てにルシフェラーゼレポーター遺伝子 (17m8 AdMLP Luc) を 250 ng 添加し、 ①~③全ての well に internal control として phRL CMV Luc を 1 ng 共にトランスフェクションしている。発現ベクター (pcDNA3、 pcDNA3 Flag ER β 、 pCMV-myc-FOXL2、 pM ER β AF-1、 pM ER β AF-2) は 0.1 μ g をトランスフェクションした。各々トランスフェクションの 24 時間後、 Dual Luciferase Reporter System (Promega) のマニュアルに従い firefly luciferase 活性を測定し、 トランスフェクション効率の影響を是正するため Renilla luciferase 活性も同時に測定した。活性測定は、 3 点採取した実験を、 別個に最低 3 回繰り返したものの平均と標準偏差を用いた。

9. short-interference RNA (siRNA) による内在性 FOXL2 のノックダウン

6 人の患者から得られたヒト黄体化顆粒膜細胞の内在性 FOXL2 を、 合成 siRNA を用いることでノックダウンした。 siRNA には siFOXL2 として、 FOXL2 の mRNA

領域 254-272 (アミノ酸 84-91)、283-301 (アミノ酸 94-101)、773-791 (アミノ酸 257-264)、808-826 (アミノ酸 269-276) をカバーする FOXL2-RNAi (Thermo Scientific, Lifetechnologies ジャパン, 東京, 日本) の混合した物を用いた。Sense 側配列は各々以下の通りである。

5'-UCGCGAAGUCCCGUUCUA-3'

5'-AAGAAGGGCUGGCAAAAUA-3'

5'-ACACACGCGUGCAGAGCAU-3'

5'-GUAGUGAACUCGUACAAUG-3'

コントロール siRNA には All Stars Negative Control siRNA (1027281: Qiagen) を用いた。siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAimax (Lifetechnologies ジャパン, 東京, 日本) を使用して行い、siRNA の最終濃度はすべて 10 nM となるように調整した。FOXL2 がノックダウンされていることはウエスタンブロット法およびリアルタイム定量 PCR にて確認した。

10. RNA 抽出及びリアルタイム定量 PCR

FOXL2 による ER β の内因性の転写活性化能への影響を調べるために、ER β の発現により増加する黄体化促進因子である aromatase の mRNA 量測定を行った。ヒト黄体化顆粒膜細胞に 10% FBS を添加した DMEM/F12 にて前培養し、negative control siRNA または siFOXL2 を Lipofectamine RNAimax でトランスフェクションした。ト

ランスフェクション後、培地を 5% チャコール処理 FBS を添加した DMEM/F12 に交換し 48 時間追加培養した。回収した各細胞から Isogen (ニッポンジーン, 東京, 日本) を用いて RNA を抽出し、精製した RNA から ReverTra Ace (TOYOBO, 大阪, 日本) を用いて cDNA を精製して、リアルタイム定量 PCR を行った。LightCycler 2.0 : DX400 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) を用い、PCR 増幅は 95°C 10 秒、55°C 10 秒、72°C 10 秒を 1 サイクルとし、サイクル数 40 回の条件にて行った。PCR のサイクル数は予備実験を繰り返し、各試料すべての PCR による増幅がプラトーとなるサイクル数とした。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。用いたプライマー配列は以下の通りである。

aromatase

Forward : 5'- GAGAATTCATGCGAGTCTGGA -3'

Reverse : 5'- CATTATGTGGAACATACTTGAGGACT -3'

StAR

Forward : 5'- AAAGTTACGTGGCTACTCAGCATC -3'

Reverse : 5'- GACCTGGTTGATGATGCTCTTG -3'

GAPDH

Forward : 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'

Reverse : 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

解析には LightCycler 2.0 : DX400 および LightCycler FastStart DNA Master SXBR Green I (Roche Applied Science) を使用した。

11. 統計学的手法

実験結果の統計的処理にあたっては、統計プログラムとして StatView Version 5 for Windows (SAS, Cary, NC, USA) を使用した。多群間の比較に対し One-factorial ANOVA の後に、Bonferroni/Dunn post hoc test を用いた。

3) 結果

1. ヒト顆粒膜細胞における FOXL2 タンパク質の発現

免疫組織化学染色法を用いてヒト卵巣における FOXL2 タンパク質の局在を検討した。様々な発育段階の卵胞を抗 FOXL2 抗体で染色し、FOXL2 が卵巣顆粒膜細胞の核に局在することを確認した。そこで FOXL2 染色陽性であった卵胞数を数えたところ、FOXL2 は様々な発育段階の顆粒膜細胞において発現していたが、特に第一次卵胞・第二次卵胞の顆粒膜細胞に多く、黄体には少ない傾向であった (Figure 9)。

2. 内在性 FOXL2 と ER β との複合体形成についての解析

KGN 細胞は FOXL2 の変異型 C134W が多く発現していることが知られている。KGN 細胞から全細胞抽出液を調整し anti-ER β 抗体を用いて免疫沈降を行い、anti-FOXL2 抗体を用いたウエスタンブロット法により、ER β を含む複合体中に FOXL2 タンパク質が存在することが示された (Figure 10)。

COV434 細胞は FOXL2 は野生型であるが発現量が少ないという特徴があるため、COV434 細胞に pCMV-myc-FOXL2 を強制発現させて、複合体の形成を検討した。全細胞抽出液より anti-c-Myc agarose affinity gel を用いて免疫沈降を行い、anti-ER β 抗体によってウエスタンブロット法の結果、FOXL2 と ER β が COV434 細胞内において複合体を形成することが示された (Figure 11)。

3. FOXL2 と ERβの *in vitro* での複合体形成と結合部位についての解析

Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare UK Ltd) ビーズに結合した GST-ERβ AF-1 および GST-ERβ AF-2 タンパク質に E₂ 10⁻⁹ M または vehicle を添加したのち pCMV-myc-FOXL2 を強制発現させた 293T 細胞の細胞溶解液とともにインキュベートした。GST ビーズに結合するタンパク質を 10% SDS-PAGE で泳動し、バンドの解析を行ったところ、FOXL2 と ERβ AF-1、FOXL2 と ERβ AF-2 が結合することが示された。また ERβのリガンドである E₂ (10⁻⁹ M) の存在の有無でバンドに変化はなかった (Figure 12)。

4. ERβ全長のエストロゲン依存的転写活性化能に対する FOXL2 の影響についての解析

293T 細胞に、発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 ERE tk Luc、phRL CMV Luc をリポフェクション法でトランスフェクションし、FOXL2 が ERβの E₂ 依存的転写活性化能に与える影響について検討した。全長 ERβは E₂ (10⁻⁹ M) 依存的な転写活性化能の上昇を認めたが、FOXL2 野生型の過剰発現によって ERβのリガンド依存性転写活性化能は抑制された (Figure 13)。

5. ERα全長のエストロゲン依存的転写活性化能に対する FOXL2 の影響についての解析

FOXL2 は ERαにおいてはエストロゲン依存的転写活性能を変化させないが、

AP-1 依存的転写活性能を抑制するという報告があった⁴⁴。今回 FOXL2 が ER β においてはエストロゲン依存的転写活性能を抑制するという結果を得たため、実際に ER β 特異的であるかを検討するために ER α においても同様の実験を行った。293T 細胞に、発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 ERE tk Luc、phRL CMV Luc をリポフェクション法でトランスフェクションし、FOXL2 が ER α の E₂ 依存的転写活性化能に与える影響について検討した。全長 ER α は E₂ (10⁻⁹M) 依存的な転写活性化能の上昇を認めたものの、FOXL2 の過剰発現による有意な影響はみられなかった (Figure 14)。Figure 13 と併せて考えると FOXL2 は ER β 特異的に E₂ 依存的転写活性化能を抑制することが示唆された。

6. ER β のエストロゲン依存的転写活性化能に対する FOXL2 の影響についての解析

FOXL2 が ER β の E₂ 依存的転写活性化能または E₂ 非依存的転写活性化能に与える影響について検討するため、ER β のドメインを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。293T 細胞に、発現ベクターER β AF-2、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 17m8 AdMLP Luc、phRL CMV Luc をリポフェクション法でトランスフェクションした。ER β AF-2 は E₂ 依存的転写活性化能を示した (Figure 15) が、FOXL2 の過剰発現によって転写活性化能が抑制された。

7. 内在性遺伝子発現における FOXL2 の aromatase の発現に対する影響についての

解析

ルシフェラーゼアッセイによって FOXL2 が ER β のリガンド依存的転写活性化能およびリガンド非依存的転写活性化能を抑制することが判明したが、この現象が内在性遺伝子発現においても合致するかどうかを検討するために、ER β の発現により増加する卵胞発育促進因子 aromatase を用いて検討を行うこととした^{51,52}。FOXL2 が ER β のリガンド依存的転写活性化能を抑制するのであれば、FOXL2 をノックダウンさせた時に aromatase の発現が増加することになるはずである。Lipofectamine RNAimax (Lifetechnologies) を使用して All stars Negative Control siRNA (コントロール) または FOXL2 siRNA をトランスフェクションしたヒト黄体化顆粒膜細胞を 5% チャコール処理 FBS で 48 時間培養後、aromatase の相対的 mRNA 濃度を定量的 PCR 法にて測定した。この結果、FOXL2 の siRNA にて内在性 FOXL2 発現は抑制された (Figure 16) が、FOXL2 のノックダウンにより aromatase mRNA の有意な上昇がみられた (Figure 17)。Aromatase はエストロゲンの下流因子である^{51,52} から、細胞内においても FOXL2 により ER β のリガンド依存的転写活性化能が抑制される可能性が示唆された。

4) 考察

FOXL2 は眼瞼異常を引き起こす家族性 POI の原因遺伝子として同定され、FOXL2 の点変異で停止コドンとなることで機能喪失し POI となる¹⁹。常染色体に位置するが男性の妊孕性は変化させず、女性のみ妊孕性が低下する。FOXL2 が POI の責任遺伝子であると決定されて以来、本症候群の患者の遺伝学的検索により、様々な FOXL2 の変異が見つかっており、FOXL2 の卵巣における機能解析は十分ではない。FOXL2 の卵巣における発現自体はマウスで確認されている^{26,52}のみでヒトでの発現時期については検討されていない。本研究によりヒト卵巣でも同様の傾向を得た。胎生期のヒト卵巣や幼弱なヒト卵巣での発現の検討は倫理的にも難しく、今回は検討出来なかったが、FOXL2 はヒトでも発生の初期の段階から発現し、性分化を決定する上で重要な役割を示し、成人においては卵胞発育に密接に関わる可能性が示唆された。

本研究により FOXL2 が ER α ¹⁹だけでなく ER β とも複合体を形成することが示され、かつ FOXL2 は ER β のエストロゲン依存性転写活性化能を抑制するという新規機能が明らかとなった。この FOXL2 の ER β に対するリガンド依存的転写抑制能は、ER β により発現が活性化される卵胞発育促進因子 aromatase が FOXL2 のノックダウンにより上昇したことから実際の細胞内においても機能していることが示唆された。FOXL2 が直接的にではなく ER β を介して aromatase の発現を制御するという着眼は本研究が初めてであり、FOXL2 と ER β の結合状態の変化により aromatase の発

現が調整されている可能性があり、FOXL2 が aromatase について異なるふるまいをすることについての合理的な説明になり得る。FOXL2 の DNA 結合部位は典型的には 15-17 塩基であり、非対称的である。Forkhead 遺伝子の大半が 5' [(G/A) (T/C) (C/A) A A (C/T) A] 3' という認識配列をもち⁵⁴、FOXL2 の認識配列の候補として GTCAAGG (T/C) が挙げられている⁵⁵ が、卵巣特異的なヒトの aromatase プロモーター II³⁹ にはその配列がないため、FOXO ファミリーが aromatase プロモーター上にある FOXO ファミリーの認識配列である TGTTT という配列に結合する事で FOXO ファミリーと一緒に FOXL2 が結合するという仮説が唱えられている³⁰。一方、aromatase プロモーター II には ERE half site⁵⁶ が存在するため、本研究により FOXL2 が ER β を介して aromatase の発現を調節するという新たな機序が想定される。

ER β はラット・マウス・ウサギ・ヒツジ・ブタ・ヒト等を含む種々の動物の卵巣に発現している。顆粒膜細胞・莢膜細胞・黄体などに主に発現しているが、卵子でも発現が報告されている³⁷。ER β の発現している場所は種によって異なり、ラットでは ER α と共に 2 次卵胞の顆粒膜細胞に多く発現しているのに対し、ヒトやマモセットでは ER β は全段階の卵胞の顆粒膜細胞に発現しているが ER α は一次・二次卵胞に発現はしていません、ER β と ER α で異なる局在を示している³⁷。先述したように ER β ノックアウトマウスでは産仔数が減り、顆粒膜細胞特異的ノックアウトマウスでは大きい卵胞および黄体数が減少している⁴³。卵巣の分化に重要な aromatase、

LH 受容体の mRNA の発現が減少しており、胞状卵胞のアンドロゲン受容体の mRNA が増加している⁴²ことから ER β は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いる⁵⁷。他方 ER α は出血性嚢胞が多く発達し卵胞が成熟しない⁴³ことから、卵胞発育において ER α はエストロゲンの増殖作用を担い、ER β は分化作用を担っていると考えられている (Figure 8)。

本研究により FOXL2 は ER β のエストロゲン依存性転写活性化能を抑制し、実際の細胞レベルでも機能している可能性が得られた。このことから ER β が全段階の卵胞に存在するが、FOXL2 が初期卵胞の顆粒膜細胞に多く存在することで、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。Figure 18 に FOXL2 と ER β の相互関係のモデル図を示す。

卵巣機能不全を起こす FOXL2 変異型は、いくつか報告されており、FOXL2 野生型との作用の違いが検討されている。FOXL2 野生型が黄体化促進因子である StAR を抑制し、卵巣機能不全を引き起こす FOXL2 Q219X では StAR の抑制がない²⁶という報告がある。この報告からも FOXL2 野生型が未熟な卵胞が黄体化するのを防いでいる可能性があり、本研究と合致する。本研究では FOXL2 野生型と ER β の関係のみ検討したが、既報²⁶から卵巣機能不全を起こす FOXL2 変異型では ER β の抑制がないため卵巣機能不全を起こす可能性が推察される。

また本研究により FOXL2 の変異型により ER β との DNA 結合状態が変化し卵胞発

育において様々な変化をもたらす可能性が考えられ、BPE 症候群 type1 患者では卵巣機能不全の程度が様々である^{19,2158}事も説明し得る。BPE 症候群 type1 患者のホルモン値は、FSH が高値で E₂ が低値であるという以外に一定の特徴はないため、BPE 症候群 type1 患者の卵巣機能不全においては E₂ が重要な因子であると考えられ、卵巣顆粒膜細胞に多く発現し E₂ 依存性のある ERβ が FOXL2 と関与するという本研究は難治性不妊の原因の一つである卵巣機能不全の解明に一助となり得る。

以上のように、私は FOXL2 の卵巣における新規作用を明らかにした。FOXL2 は卵胞発育に関与することと、卵巣腫瘍形成過程に関連するが、結果として卵巣顆粒膜細胞の増殖・分化を制御するメカニズムが存在することが示唆された。これらの経路は、妊孕性を温存するための治療標的になる可能性があり、婦人科領域疾患の診断および治療への臨床適用が今後期待される。

5) 結論

本研究では

- 1) FOXL2 はヒトでは卵巣顆粒膜細胞に存在し、初期卵胞の発育と関連する可能性がある、
 - 2) ER β と FOXL2 は細胞内で内在性複合体をなす、
 - 3) FOXL2 は ER β の AF-1 および AF-2 領域を介して結合する、
 - 4) FOXL2 は ER β 特異的にリガンド依存的転写活性に対し負の制御を行う、
- ということを明らかにした。このことから、ER β と FOXL2 は卵胞発育や顆粒膜細胞腫に対して影響を与えていることが示唆された。

謝辞

稿を終えるに当たり、この研究に関して実験上適切な助言を与えて頂いた、東京大学医学部産科婦人科学教室教授 藤井知行先生、大須賀穰先生、同講師 平池修先生、同前教授 武谷雄二先生、同前教授 上妻志郎先生、同客員准教授 矢野哲先生に深く感謝いたします。

略語

AF-1, AF-2; activation function-1, 2

AP-1; activating protein-1

BPE; blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome

DMEM; Dulbecco's modified Eagle medium

E₂; 17β-estradiol

ER; estrogen receptor

ERE; estrogen responsive element

FBS; fetal bovine serum

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

FSH; follicle stimulating hormone

GST; glutathione S-transferase

GnRHR; gonadotropin releasing hormone receptor

NLS; nuclear localization signal

NR; nuclear receptor

LH; luteinizing hormone

POI; primary ovarian insufficiency

StAR; steroidogenic acute regulatory

文献

1. 厚生労働省ホームページ. <http://www.mhlw.go.jp/>.
2. 日本産科婦人科学会編. 産科婦人科用語集・用語解説集 改訂第3版.
3. 日本生殖医学会ホームページ. <http://www.jsrm.or.jp/>.
4. Oktem, O., Urman, B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* **25**, 2944-2954 (2010).
5. Baerwald, A. R., Adams, G. P., Pierson, R. A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update* **18**, 73-91 (2012).
6. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice and Practice Committee. Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589. *Fertil Steril* **101**, 633-634 (2014).
7. De Vos, M., Devroey, P., Fauser, B. C. Primary ovarian insufficiency. *Lancet* **376**, 911-921 (2010).
8. Fortuno, C., Labarta, E. Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. *J Assist Reprod Genet* **31**, 1573-1585 (2014).
9. Shelling, A. N. Premature ovarian failure. *Reproduction* **140**, 633-641 (2010).
10. 千石 一雄, 宮本 敏伸, 水無瀬 学. POI の病因と病態. *臨床婦人科産科* **68**, 844-849 (2014).

11. Hundscheid, R. D., Smits, A. P., Thomas, C. M., Kiemeney, L. A., Braat, D. D. Female carriers of fragile X premutations have no increased risk for additional diseases other than premature ovarian failure. *Am J Med Genet A* **117A**, 6-9 (2003).
12. Essop, F. B., Krause, A. Diagnostic, carrier and prenatal genetic testing for fragile X syndrome and other FMR-1-related disorders in Johannesburg, South Africa: a 20-year review. *S Afr Med J* **103**, 994-998 (2013).
13. Persani, L., Rossetti, R., Di Pasquale, E., Cacciatore, C., Fabre, S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update* **20**, 869-883 (2014).
14. Huhtaniemi, I. T., Aittomaki, K. Mutations of follicle-stimulating hormone and its receptor: effects on gonadal function. *Eur J Endocrinol* **138**, 473-481 (1998).
15. Takahashi, K., Ozaki, T., Okada, M., Kurioka, H., Kanasaki, H., Miyazaki, K. Increased prevalence of luteinizing hormone β -subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril* **71**, 96-101 (1999).
16. Kosaki, K., Sato, S., Hasegawa, T., Matsuo, N., Suzuki, T., Ogata, T. Premature ovarian failure in a female with proximal symphalangism and Noggin mutation. *Fertil Steril* **81**, 1137-1139 (2004).
17. Bouilly, J., Bachelot, A., Broutin, I., Touraine, P., Binart, N. Novel NOBOX

- loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat* **32**, 1108-1113 (2011).
18. Fridovich-Keil, J. L., Gubbels, C. S., Spencer, J. B., Sanders, R. D., Land, J. A., Rubio-Gozalbo, E. Ovarian function in girls and women with GALT-deficiency galactosemia. *J Inherit Metab Dis* **34**, 357-366 (2011).
19. Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M. S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A., Pilia, G. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* **27**, 159-166 (2001).
20. De Baere, E., Dixon, M. J., Small, K. W., Jabs, E. W., Leroy, B. P., Devriendt, K., Gillerot, Y., Mortier, G., Meire, F., Van Maldergem, L., Courtens, W., Hjalgrim, H., Huang, S., Liebaers, I., Van Regemorter, N., Touraine, P., Praphanphoj, V., Verloes, A., Udar, N., Yellore, V., Chalukya, M., Yelchits, S., De Paepe, A., Kuttann, F., Fellous, M., Veitia, R., Messiaen, L. Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet* **10**, 1591-1600

- (2001).
21. Meduri, G., Bachelot, A., Duflos, C., Bstandig, B., Poirot, C., Genestie, C., Veitia, R., De Baere, E., Touraine, P. FOXL2 mutations lead to different ovarian phenotypes in BPES patients: Case Report. *Hum Reprod* **25**, 235-243 (2010).
 22. Caburet, S., Georges, A., L'Hote, D., Todeschini, A. L., Benayoun, B. A., Veitia, R. A. The transcription factor FOXL2: at the crossroads of ovarian physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol* **356**, 55-64 (2012).
 23. Carlsson, P., Mahlapuu, M. Forkhead Transcription Factors: Key Players in Development and Metabolism. *Dev Biol* **250**, 1-23 (2002).
 24. Uhlenhaut, N. H., Treier, M. Forkhead transcription factors in ovarian function. *Reproduction* **142**, 489-495 (2011).
 25. Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A. C., Treier, M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* **131**, 933-942 (2004).
 26. Pisarska, M. D., Bae, J., Klein, C., Hsueh, A. J. Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* **145**, 3424-3433 (2004).

27. Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A. C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N. I., Riethmacher, D., Schutz, G., Cooney, A. J., Lovell-Badge, R., Treier, M. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* **139**, 1130-1142 (2009).
28. Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Serval, N., Taourit, S., Furet, J. P., Fellous, M., Grosclaude, F., Crihiu, E. P., Cotinot, C., Vaiman, D. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet* **29**, 453-458 (2001).
29. Pannetier, M., Fabre, S., Batista, F., Kocer, A., Renault, L., Jolivet, G., Mandon-Pepin, B., Cotinot, C., Veitia, R., Pailhoux, E. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol* **36**, 399-413 (2006).
30. Fleming, N. I., Knowler, K. C., Lazarus, K. A., Fuller, P. J., Simpson, E. R., Clyne, C. D. Aromatase is a direct target of FOXL2: C134W in granulosa cell tumors via a single highly conserved binding site in the ovarian specific promoter. *PLoS ONE* **5**, e14389 (2010).
31. Bentsi-Barnes, I. K., Kuo, F. T., Barlow, G. M., Pisarska, M. D. Human forkhead L2 represses key genes in granulosa cell differentiation including aromatase, P450scc, and cyclin D2. *Fertil Steril* **94**, 353-356 (2010).

32. Batista, F., Vaiman, D., Dausset, J., Fellous, M., Veitia, R. A. Potential targets of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 3330-3335 (2007).
33. Matson, C. K., Murphy, M. W., Sarver, A. L., Griswold, M. D., Bardwell, V. J., Zarkower, D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* **476**, 101-104 (2011).
34. Kuo, F. T., Bentsi-Barnes, I. K., Barlow, G. M., Pisarska, M. D. Mutant Forkhead L2 (FOXL2) proteins associated with premature ovarian failure (POF) dimerize with wild-type FOXL2, leading to altered regulation of genes associated with granulosa cell differentiation. *Endocrinology* **152**, 3917-3929 (2011).
35. Shah, S. P., Kobel, M., Senz, J., Morin, R. D., Clarke, B. A., Wiegand, K. C., Leung, G., Zayed, A., Mehl, E., Kalloger, S. E., Sun, M., Giuliany, R., Yorida, E., Jones, S., Varhol, R., Swenerton, K. D., Miller, D., Clement, P. B., Crane, C., Madore, J., Provencher, D., Leung, P., DeFazio, A., Khattra, J., Turashvili, G., Zhao, Y., Zeng, T., Glover, J. N., Vanderhyden, B., Zhao, C., Parkinson, C. A., Jimenez-Linan, M., Bowtell, D. D., Mes-Masson, A. M., Brenton, J. D., Aparicio, S. A., Boyd, N., Hirst, M., Gilks, C. B., Marra, M., Huntsman, D. G. Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N Engl J Med* **360**, 2719-2729

- (2009).
36. Kim, J. H., Yoon, S., Park, M., Park, H. O., Ko, J. J., Lee, K., Bae, J. Differential apoptotic activities of wild-type FOXL2 and the adult-type granulosa cell tumor-associated mutant FOXL2 (C134W). *Oncogene* **30**, 1653-1663 (2011).
 37. Drummond, A. E., Fuller, P. J. The importance of ER β signalling in the ovary. *J Endocrinol* **205**, 15-23 (2010).
 38. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839 (1995).
 39. Zhao, C., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. A. Estrogen receptor β : an overview and update. *Nucl Recept Signal* **6**, e003 (2008).
 40. Couse, J. F., Korach, K. S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* **20**, 358-417 (1999).
 41. Hamilton, K. J., Arao, Y., Korach, K. S. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reprod Biol* **14**, 3-8 (2014).
 42. Cheng, G., Weihua, Z., Makinen, S., Makela, S., Saji, S., Warner, M., Gustafsson, J. A., Hovatta, O. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen

- receptor β knockout mouse ovary. *Biol Reprod* **66**, 77-84 (2002).
43. Hewitt, S. C., Harrell, J. C., Korach, K. S. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol* **67**, 285-308 (2005).
 44. Kim, S. Y., Weiss, J., Tong, M., Laronda, M. M., Lee, E. J., Jameson, J. L. Foxl2, a forkhead transcription factor, modulates nonclassical activity of the estrogen receptor- α . *Endocrinology* **150**, 5085-5093 (2009).
 45. Morita, Y., Wada-Hiraike, O., Yano, T., Shirane, A., Hirano, M., Hiraike, H., Koyama, S., Oishi, H., Yoshino, O., Miyamoto, Y., Sone, K., Oda, K., Nakagawa, S., Tsutsui, K., Taketani, Y. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol* **10**, 14 (2012).
 46. Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2496-2500 (1986).
 47. Darbre, P., Yates, J., Curtis, S., King, R. J. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res* **43**, 349-354 (1983).
 48. Hiraike, H., Wada-Hiraike, O., Nakagawa, S., Koyama, S., Miyamoto, Y., Sone, K.,

- Tanikawa, M., Tsuruga, T., Nagasaka, K., Matsumoto, Y., Oda, K., Shoji, K., Fukuhara, H., Saji, S., Nakagawa, K., Kato, S., Yano, T., Taketani, Y. Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br J Cancer* **102**, 1061-1067 (2010).
49. Koyama, S., Wada-Hiraike, O., Nakagawa, S., Tanikawa, M., Hiraike, H., Miyamoto, Y., Sone, K., Oda, K., Fukuhara, H., Nakagawa, K., Kato, S., Yano, T., Taketani, Y. Repression of estrogen receptor β function by putative tumor suppressor DBC1. *Biochem Biophys Res Commun* **392**, 357-362 (2010).
50. Wada-Hiraike, O., Yano, T., Nei, T., Matsumoto, Y., Nagasaka, K., Takizawa, S., Oishi, H., Arimoto, T., Nakagawa, S., Yasugi, T., Kato, S., Taketani, Y. The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator of oestrogen receptor α . *Br J Cancer* **92**, 2286-2291 (2005).
51. Akatsuka, N., Komatsuzaki, E., Ishikawa, A., Suzuki, I., Yamane, N., Miyata, S. Expression of the gonadal p450 aromatase gene of *Xenopus* and characterization of the 5'-flanking region of the aromatase gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* **96**, 45-50 (2005).
52. Silva, J. M., Hamel, M., Sahmi, M., Price, C. A. Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH

- involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *Reproduction* **132**, 909-917 (2006).
53. BPES database. <http://users.ugent.be/~dbeysen/foxl2/Tables/tableall.htm>.
54. Kaufmann, E., Knochel, W. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* **57**, 3-20 (1996).
55. Benayoun, B. A., Caburet, S., Dipietromaria, A., Bailly-Bechet, M., Batista, F., Fellous, M., Vaiman, D., Veitia, R. A. The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum Mol Genet* **17**, 3118-3127 (2008).
56. Driscoll, M. D., Sathya, G., Muyan, M., Klinge, C. M., Hilf, R., Bambara, R. A. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem* **273**, 29321-29330 (1998).
57. Emmen, J. M., Couse, J. F., Elmore, S. A., Yates, M. M., Kissling, G. E., Korach, K. S. In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) α and ER β null mice indicate a role for ER β in follicular maturation. *Endocrinology* **146**, 2817-2826 (2005).
58. Fan, J. Y., Wang, Y. F., Han, B., Ji, Y. R., Song, H. D., Fan, X. Q. FOXL2 mutations in Chinese families with Blepharophimosis syndrome (BPES). *Transl*

Res **157**, 48-52 (2011).

図とその説明

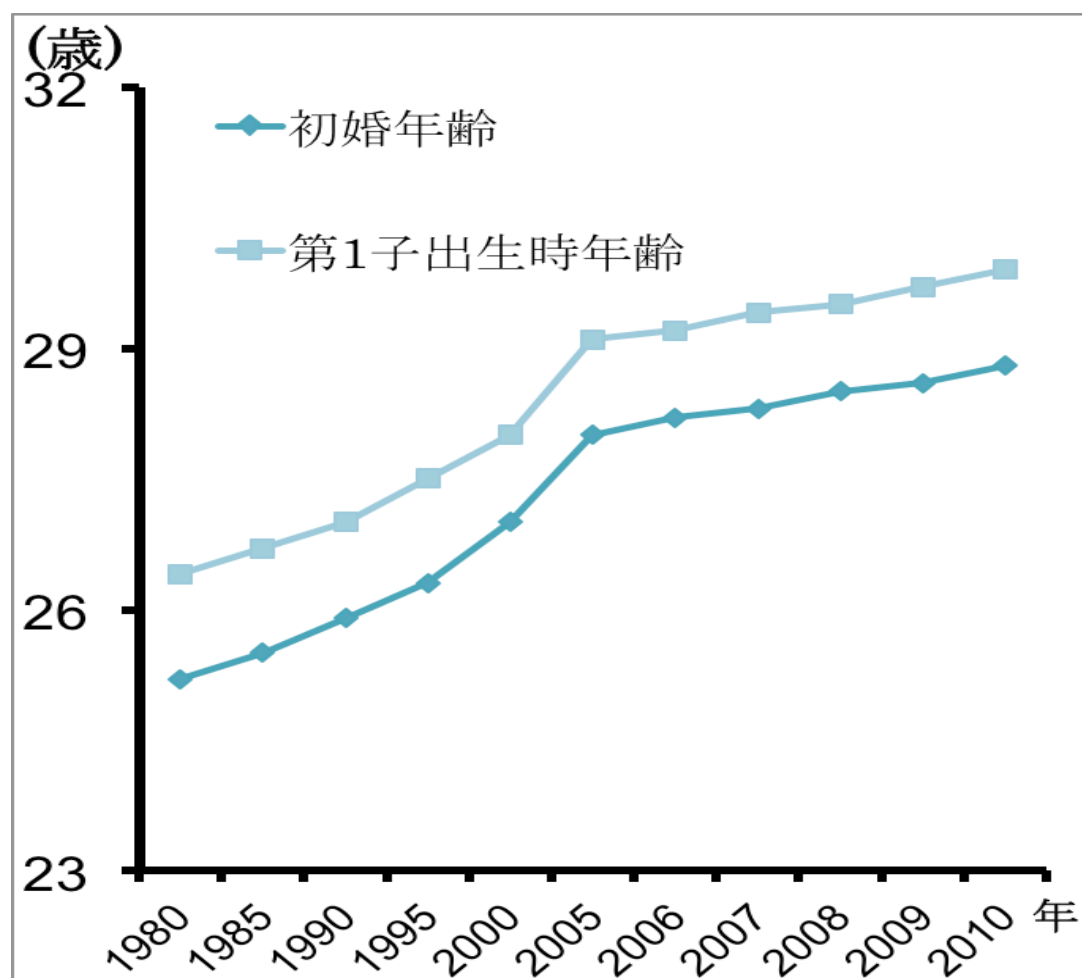


Figure 1 本邦における平均初婚年齢と児出生児時の平均年齢推移

子ども・子育て白書平成 24 年度版「平均初婚年齢と母親の平均出生時年齢の年次推移」より改変

年別 出生児数

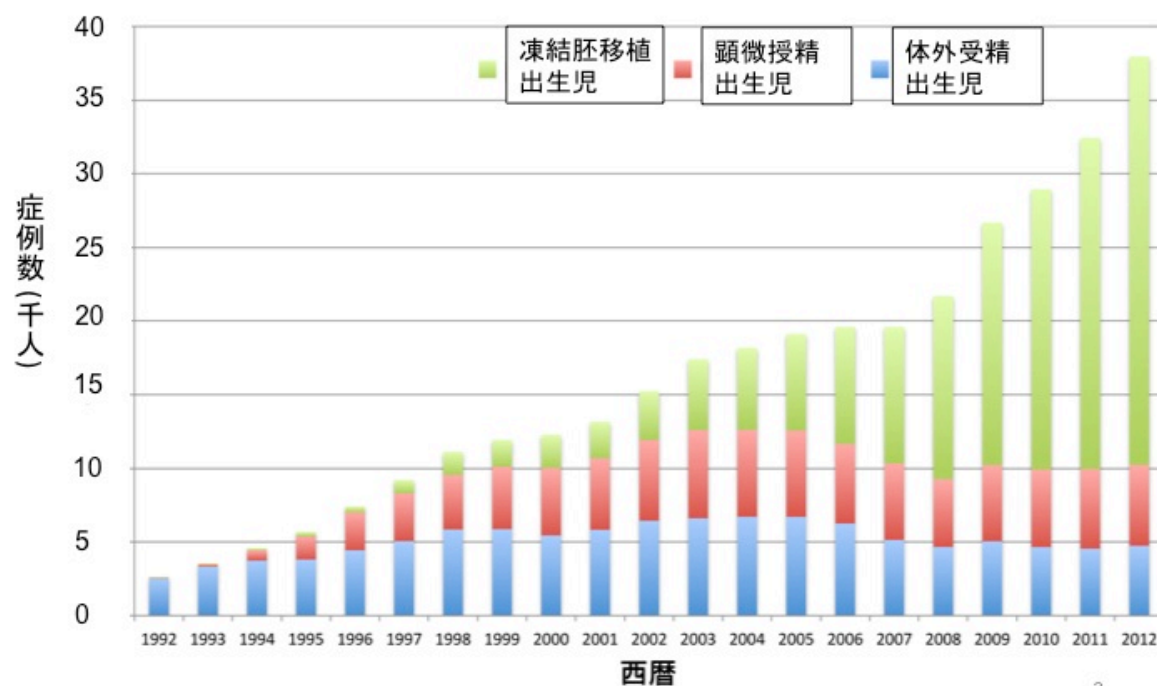


Figure 2 日本における ART 出生時数の年次推移

1978 年には体外受精、1992 年には顕微授精による出生が報告された。年々生殖補助医療による出生は増加傾向にある。

ART; assisted reproductive technology 生殖補助医療
 日本生殖医学会ホームページ³より引用・改変

ART妊娠率・生産率・流産率 2012

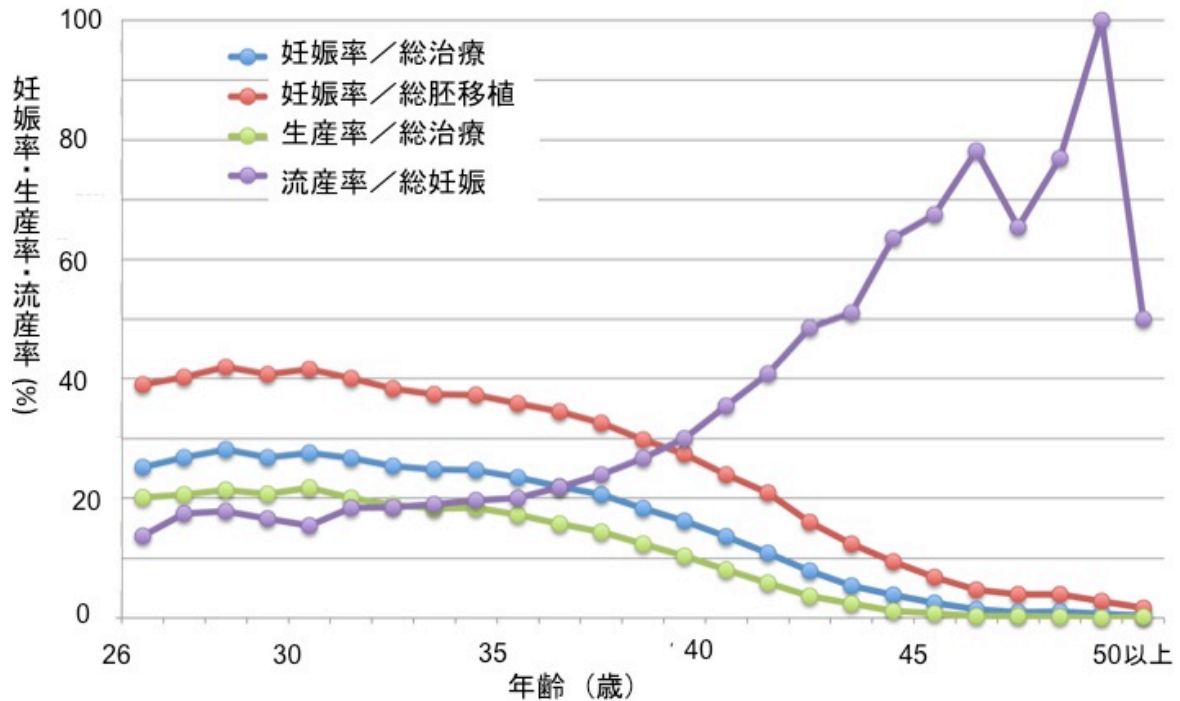


Figure 3 2012年におけるART妊娠率・生産率・流産率統計

年齢が上昇するとともに妊娠率・生産率は減少するが、流産率は年齢とともに上昇している。

ART; assisted reproductive technology 生殖補助医療
 日本生殖医学会ホームページ³より引用・改変

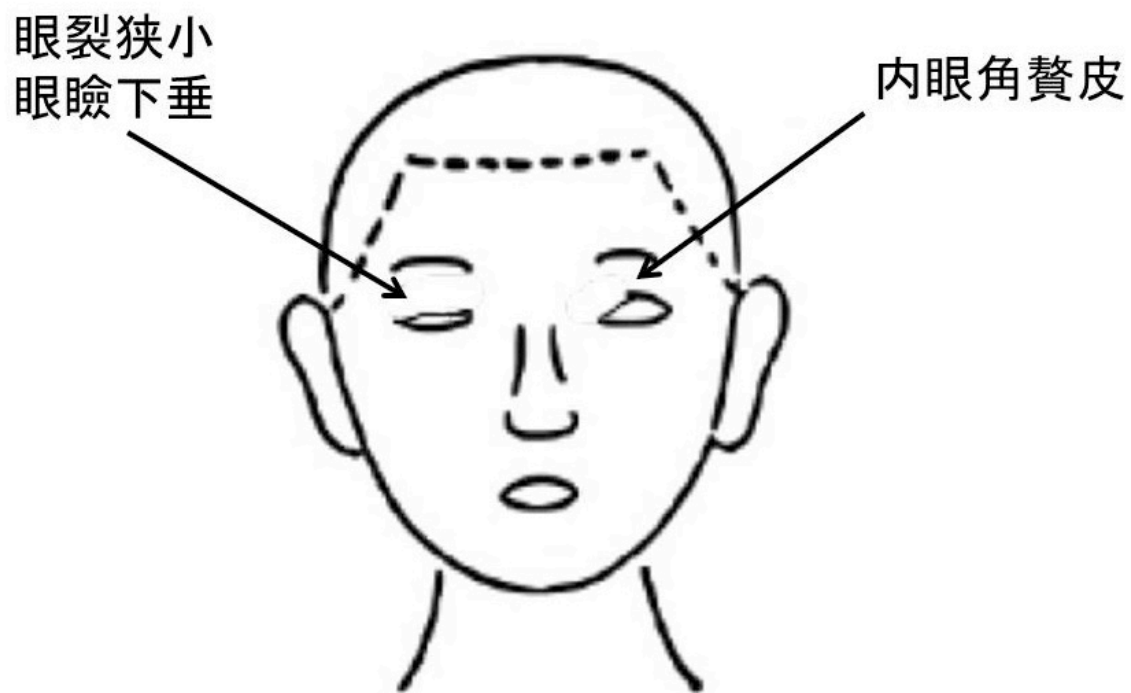


Figure 4 BPE 症候群患者の眼瞼

BPE 症候群の患者では、眼裂狭小、眼瞼下垂と対側の内眼角贅皮を示す。

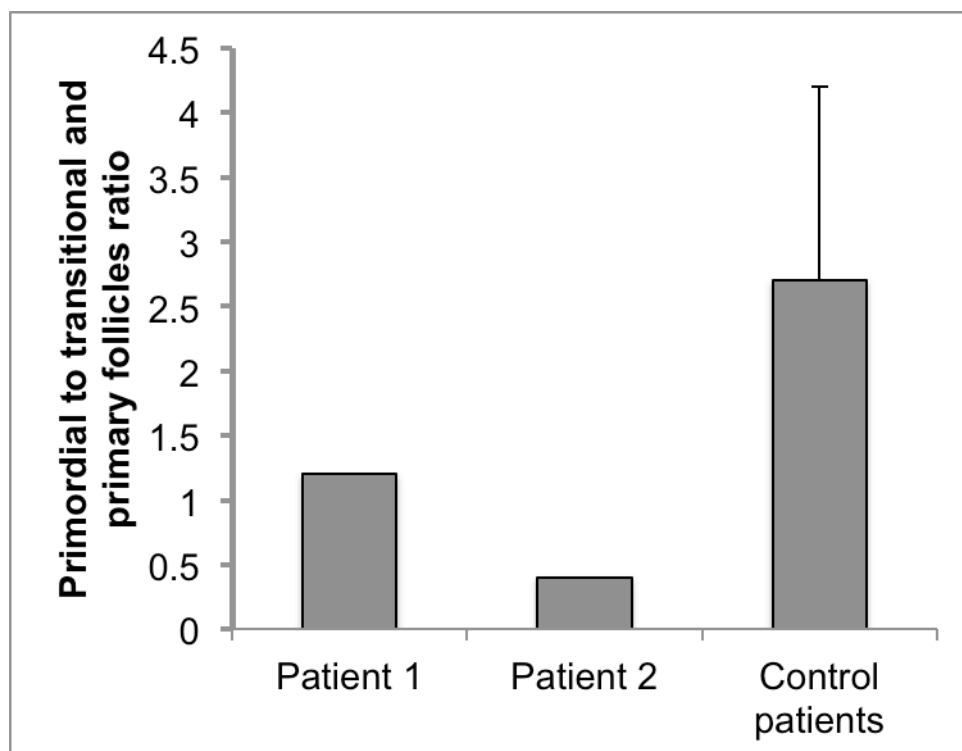


Figure 5 BPE 症候群患者の卵巣における原始卵胞数と一次卵胞の比率

BPE 症候群患者の卵巣では正常卵巣と比べて原始卵胞数が相対的に低い。
文献²¹より引用・改変。



Figure 6 FOXL2 (forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2) の構造

379 アミノ酸から成る 1 エキソンの遺伝子であり、アミノ基末に forkhead ドメインを持ち、カルボキシル基末に 14 残基の poly A 領域を持つ。

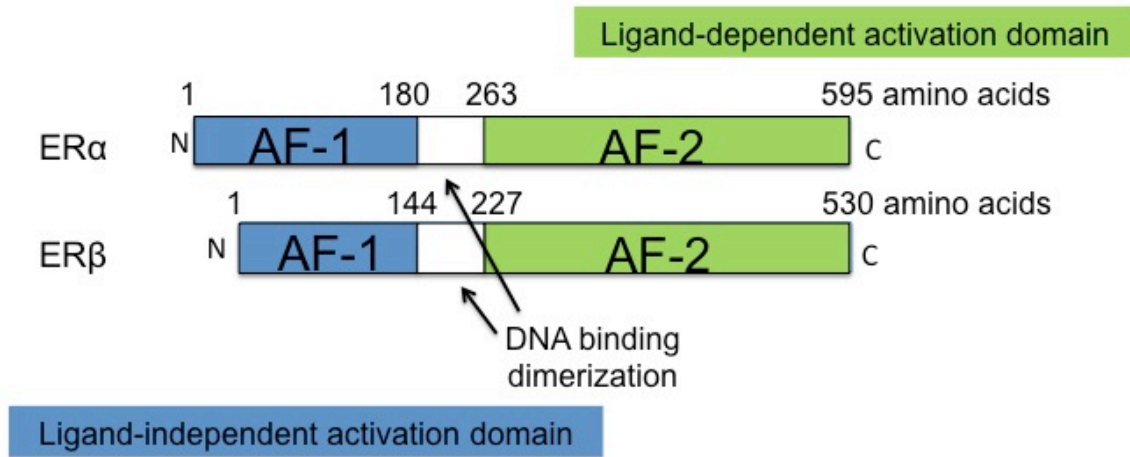


Figure 7 エストロゲン受容体 (ER) α と β の構造

ERには α および β と2つのサブタイプが存在し、ER α は595アミノ酸、ER β は530アミノ酸から成る。アミノ基末にはリガンド非依存的転写活性化領域 activation function -1 (AF-1) が存在し、カルボキシル基末にはリガンド結合部位がありリガンド依存的転写活性化領域 activation function -2 (AF-2) が存在する。AF-1領域とAF-2領域の間にはDNA結合部位が存在し、ER α とER β は95%の相同性を持つのに対し、AF-1およびAF-2領域は相同性が低いため、それぞれの特性に関連しているものと考えられている。

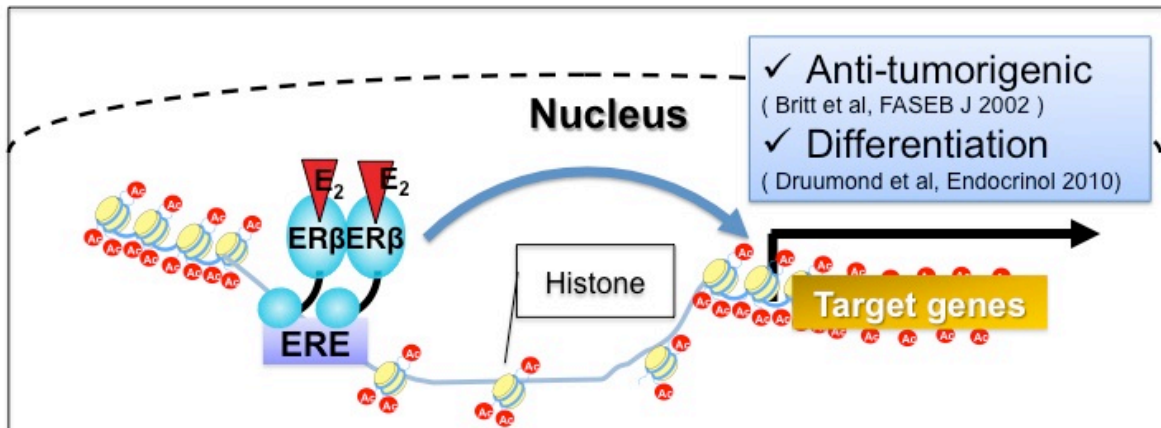


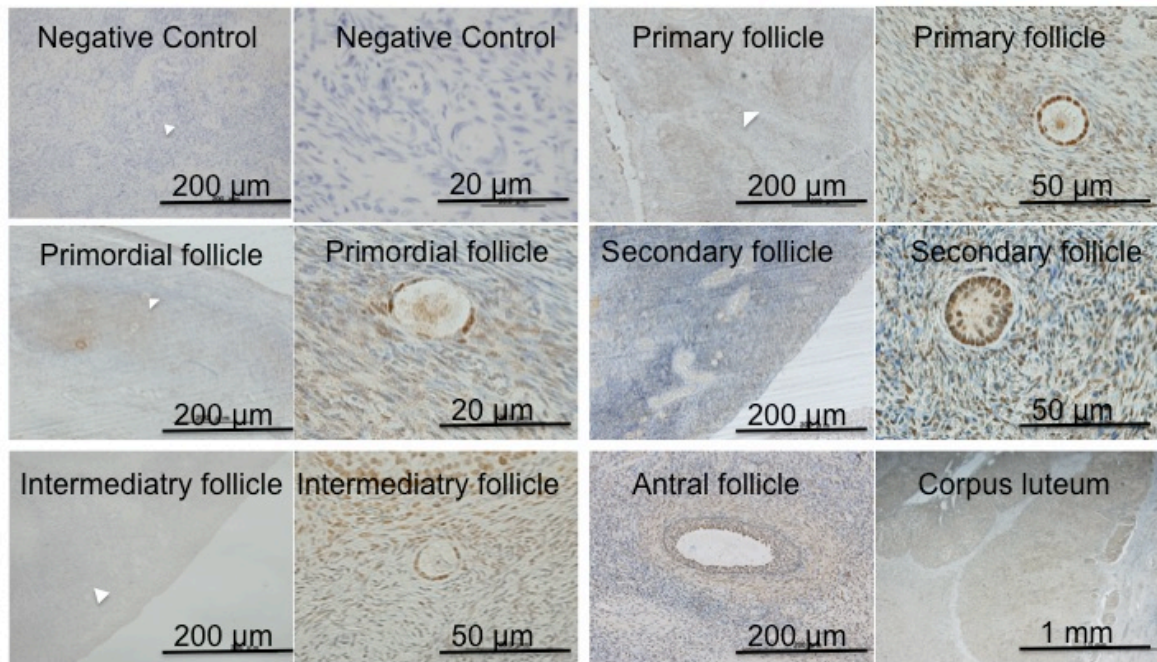
Figure 8 ERβの genomic function について

ER 活性化には様々なメカニズムが存在するが、図に示す genomic function は古典的な ER 活性化メカニズムである。ERβはホモ二量体を形成して標的遺伝子プロモーター上に存在するエストロゲン応答配列を認識して DNA に結合し、標的遺伝子の転写を制御し、抗腫瘍作用や分化作用に働く。一方 ERαは造腫瘍に働く事が報告されている。

E₂; 17β-estradiol

ER; estrogen receptor

ERE; estrogen responsive element



卵胞数	Primordial follicle	Intermediary follicle	Primary follicle	Secondary follicle	Antral follicle	Corpus luteum
陽性	73	96	52	38	42	7
陰性	96	45	12	7	20	10
合計	169	141	64	45	62	17
割合	43%	68%	81%	84%	68%	41%

Figure 9 ヒト卵巣における FOXL2 タンパク質の発現

病理組織学的に正常なヒト卵巣切片 (n=15) を、anti-FOXL2 抗体 (1:100) で免疫組織化学染色法を用いて染色した。染色結果を図に示している。△は当該の卵胞であり、左図は弱拡大・右図は強拡大したものを示している。表は FOXL2 抗体の染色の有無で卵胞数を数えた結果である。FOXL2 陽性率 (FOXL2 陽性卵胞数/該当する卵胞の全卵胞数) は以下の通りであった。primordial follicle 43% (73/169)、intermediary follicle 68%(96/141)、primarymordial follicle 81% (52/64)、secondary follicle 84% (38/45)、antral follicle 68% (42/62)、corpus luteum 40% (7/17)。以上より FOXL2 は一次卵胞・二次卵胞等初期卵胞の顆粒膜細胞に多く発現し、黄体には少ない傾向であった。
一は各図の尺度を示す。



Figure 10 内在性 FOXL2 と ERβとの複合体形成

ヒト顆粒膜細胞腫細胞株 KGN 細胞は FOXL2 の変異型 C134W が多く発現していることが知られている。KGN 細胞を用いて内在性 FOXL2 と ERβとの複合体形成を検討した。ヒト顆粒膜細胞腫細胞株 KGN 細胞を回収し、細胞抽出液を作成後、anti-ERβ抗体 2 μg・Protein G Sepharose 4 Fast Flow を用いて免疫沈降を行い、ビーズ結合タンパク質に対し anti-FOXL2 抗体 (1:500) を用いてウェスタンブロッディングを行った。二次抗体は anti-rabbit IgG 抗体 (1:3000) を用いて ECL advance のマニュアルに従い化学発光させバンドを確認したところ、anti-ERβ抗体で免疫沈降を行ったレーンに特異的バンドが確認された。継代数の違う細胞を用いて 3 回繰り返した中で典型的な結果を示した。

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

ERβ; estrogen receptor β

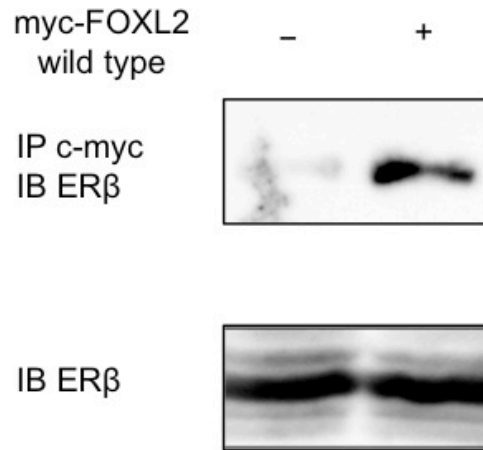


Figure 11 強制発現させた FOXL2 と ERβとの複合体形成

ヒト顆粒膜細胞腫細胞株 COV434 細胞に発現している FOXL2 は野生型であるが発現量が少ないという特徴がある。COV434 細胞を用いて FOXL2 と ERβとの複合体形成を検討した。ヒト顆粒膜細胞腫細胞株 COV434 細胞に pCMV-myc-FOXL2 を強制発現させ、細胞抽出液に anti-c-Myc agarose affinity gel (beads 25μg) を結合させ免疫沈降を行った。ビーズ結合タンパク質に対し anti-ERβ抗体 (1:250) を用いてウェスタンブロッディングをおこなった。二次抗体は anti-rabbit IgG 抗体 (1:3000) を用いて ECL advance のマニュアルに従い化学発光させバンドを確認したところ、anti-ERβ抗体で免疫沈降を行ったレーンに特異的バンドが確認された。継代数の違う細胞を用いて 3 回繰り返した中で典型的な結果を示した。

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

ERβ; estrogen receptor β

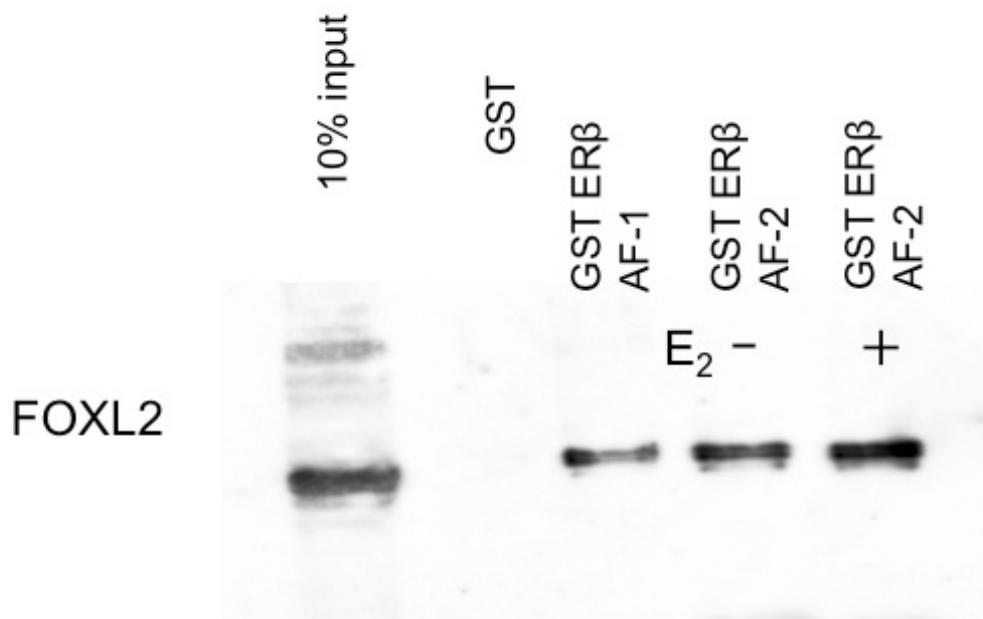


Figure 12 FOXL2 と ERβの *in vitro* での複合体形成と結合部位の同定

GST 融合タンパク質を用いて FOXL2 と ERβの *in vitro* での複合体形成能を検討した。GST 融合タンパク質を大腸菌に発現させ、Glutathione-Sepharose 4B ビーズと結合させ、GST ERβ AF-1 および AF-2 を作成した。GST 融合タンパク質 (GST ERβ AF-2 タンパク質には E₂ 10⁻⁹ M もしくは vehicle を添加した後) を pCMV-myc-FOXL2 を強制発現させた 293T 細胞の細胞溶解液の上清とインキュベートして、GST ビーズと結合するタンパク質 300μg を 10% SDS-PAGE に泳動し、ウェスタンブロッティング法 (anti-FOXL2 抗体: 1:500, anti-rabbit IgG 抗体: 1:3000) を用いて検討したところ、GST ERβ AF-1 / AF-2 レーンともに FOXL2 タンパク質が確認出来た。GST ERβ AF-2 についてはリガンドの有無で FOXL2 の結合は変化なかった。継代数の違う細胞を用いて 3 回繰り返した中で典型的な結果を示した。

GST; glutathione S-transferase

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

ERβ; estrogen receptor β

AF; activation function

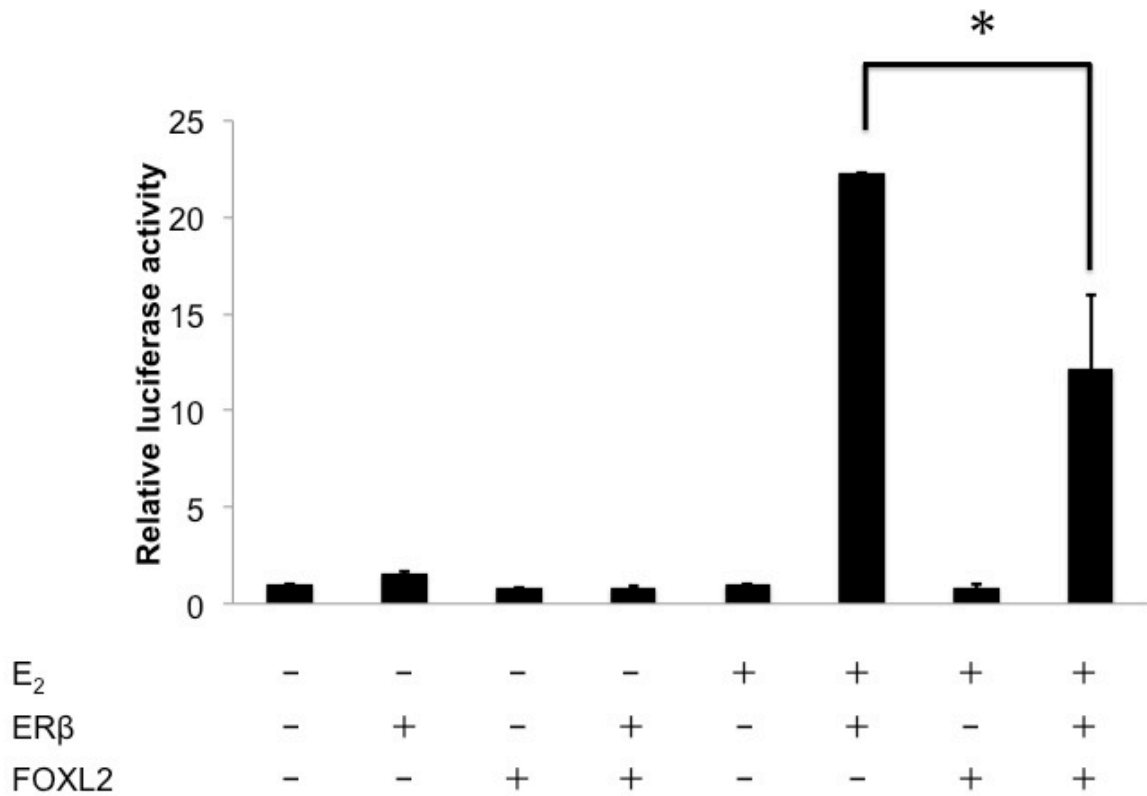


Figure 13 ERβの E₂ 依存的転写活性能に対する FOXL2 の影響

ERβの E₂ 依存的転写活性能に対する FOXL2 の影響をルシフェラーゼアッセイで検討した。293T 細胞に発現ベクター100 ng, ルシフェラーゼレポーター遺伝子 EREtk Luc (250 ng)、internal control phRL CMV Luc (1 ng) をリポフェクション法で Effectene を用いてトランスフェクションした。培地に vehicle または E₂ (10⁻⁹ M) を添加し、24 時間後細胞を回収し Dual Luciferase Reporter System (Promega) のマニュアルに従い firefly luciferase 活性を測定した。トランスフェクション効率の影響を是正するため Renilla luciferase 活性も同時に測定した。活性測定は、3 点採取した実験を、別個に最低 3 回繰り返したものの平均を用いた。エラーバーは標準偏差を示している。多群間の比較に対し one-factorial ANOVA の後に、Bonferroni/Dunn post hoc test を用いた。測定結果により FOXL2 は ERβの E₂ 依存的転写活性能を有意に抑制することが示された (* p < 0.05)。

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

ERβ; estrogen receptor β

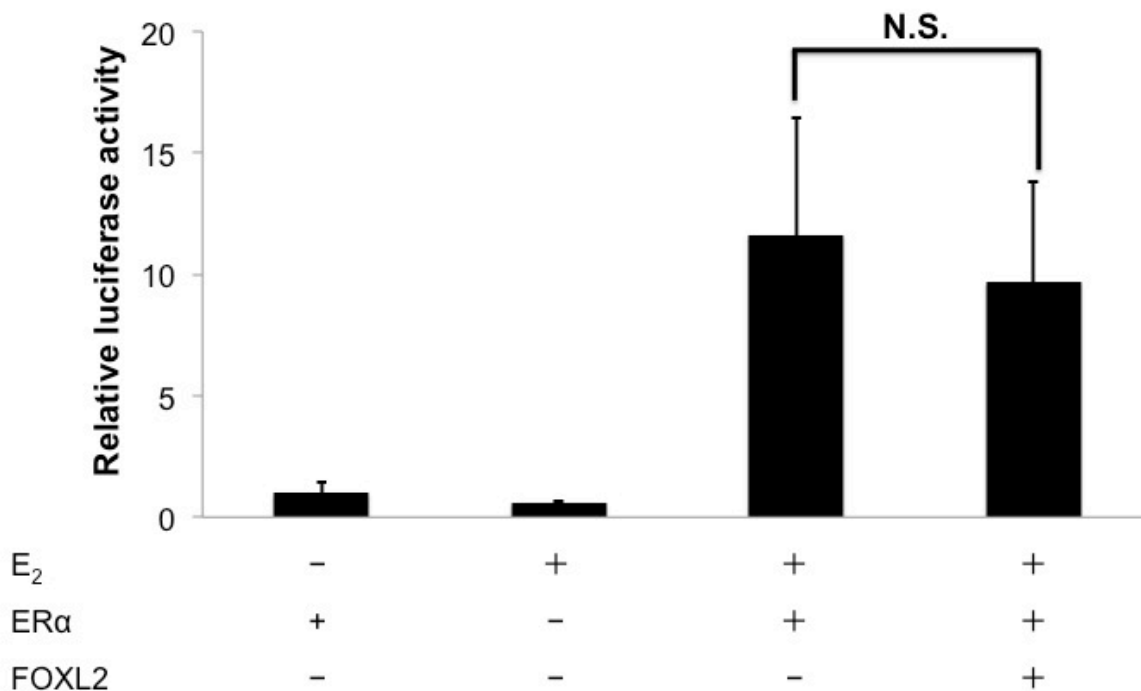


Figure 14 ERαの E₂ 依存的転写活性能に対する FOXL2 の影響

ERαの E₂ 依存的転写活性能に対する FOXL2 の影響をルシフェラーゼアッセイで検討した。293T 細胞に発現ベクター100 ng, ルシフェラーゼレポーター遺伝子 ERE tk Luc (250 ng)、internal control phRL CMV Luc (1 ng) をリポフェクション法で Effectene を用いてトランスフェクションした。培地に vehicle または E₂ (10⁻⁹ M) を添加し、24 時間後細胞を回収し Dual Luciferase Reporter System (Promega) のマニュアルに従い firefly luciferase 活性を測定した。トランスフェクション効率の影響を是正するため Renilla luciferase 活性も同時に測定した。活性測定は、3 点採取した実験を、別個に最低 3 回繰り返したものの平均を用いた。エラーバーは標準偏差を示している。多群間の比較に対し one-factorial ANOVA の後に、Bonferroni/Dunn post hoc test を用いた。測定結果により FOXL2 は ERαの E₂ 依存的転写活性への有意な影響は見られないことが示された (N.S. ; not significant)。

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

ERα; estrogen receptor α

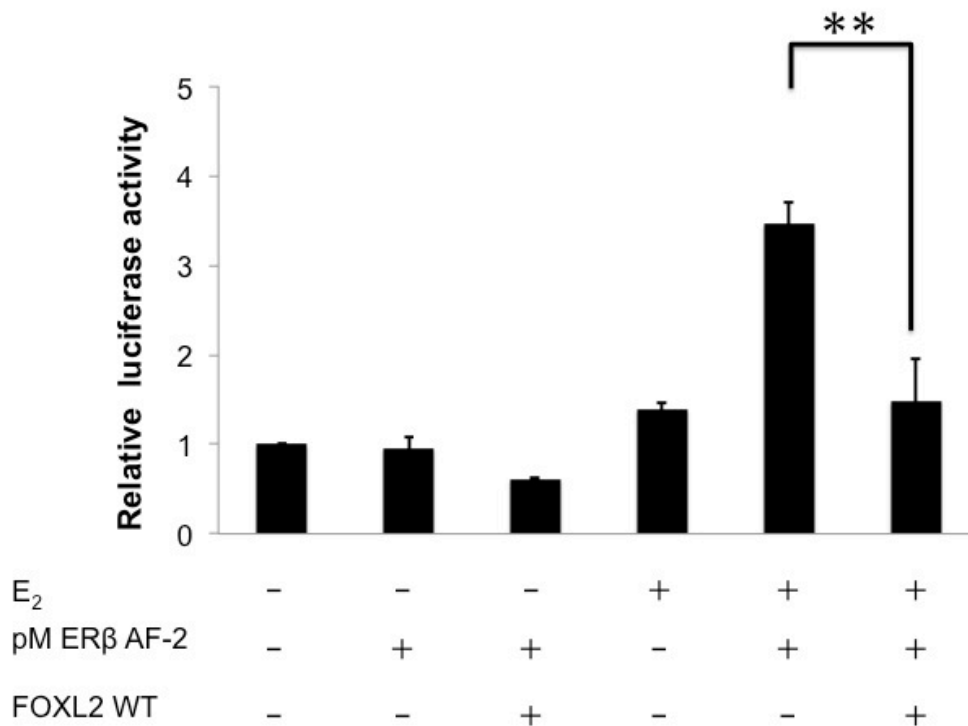


Figure 15 リガンド依存的 ERβ AF-2 の転写活性化能に対する FOXL2 の影響

ERβのリガンド依存的転写活性能に対する FOXL2 の影響をルシフェラーゼアッセイで検討した。293T 細胞に発現ベクター100 ng, ルシフェラーゼレポーター遺伝子 17m8 AdMLP Luc (250 ng)、internal control phRL CMV Luc (1 ng) をリポフェクション法で Effectene を用いてトランスフェクションした。培地に vehicle または E₂ (10⁻⁹ M) を添加し、24 時間後細胞を回収し Dual Luciferase Reporter System (Promega) のマニュアルに従い firefly luciferase 活性を測定した。トランスフェクション効率の影響を是正するため Renilla luciferase 活性も同時に測定した。活性測定は、3 点採取した実験を、別個に最低 3 回繰り返したものの平均を用いた。エラーバーは標準偏差を示している。多群間の比較に対し one-factorial ANOVA の後に、Bonferroni/Dunn post hoc test を用いた。測定結果により FOXL2 はリガンド依存的転写活性化領域である ERβ AF-2 において転写活性能を有意に抑制することが示された (**p < 0.01)。

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

ERβ; estrogen receptor β

AF; activation function

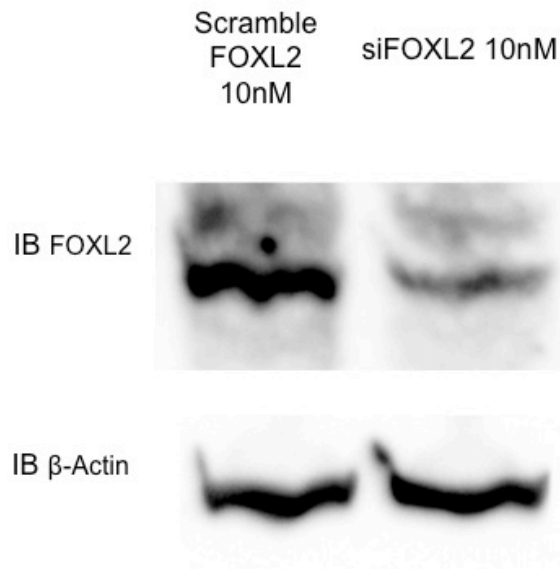


Figure 16 siRNA による内在性 FOXL2 のノックダウン

体外受精時に採取された卵胞液から抽出したヒト黄体化顆粒膜細胞の内在性 FOXL2 を siRNA でノックダウンし、ウェスタンブロッティングで FOXL2 のノックダウンを確認した。ヒト黄体化顆粒膜細胞に FOXL2-RNAi またはコントロール siRNA を Lipofectamine RNAimax を用いてトランスフェクションした。siRNA の最終濃度はすべて 10 nM となるように調整した。トランスフェクション後 48 時間後に細胞を回収しウェスタンブロッティング法を用いて FOXL2 タンパク質 (anti-FOXL2 抗体 : 1:500, anti-rabbit IgG 抗体: 1:3000) の発現を検討した。発現量のコントロールとしてβ-Actin (anti-β-Actin 抗体: 1:500, anti-mouse IgG 抗体: 1:3000) を用いた。各レーン 15 μg のタンパク質を SDS PAGE で泳動したところ、FOXL2-RNAi をトランスフェクションしたレーンでは FOXL2 タンパク質の発現量が減少していた。異なる患者 3 人の検体を用いてそれぞれ別個に実験を行った中で典型的な結果を示した。

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

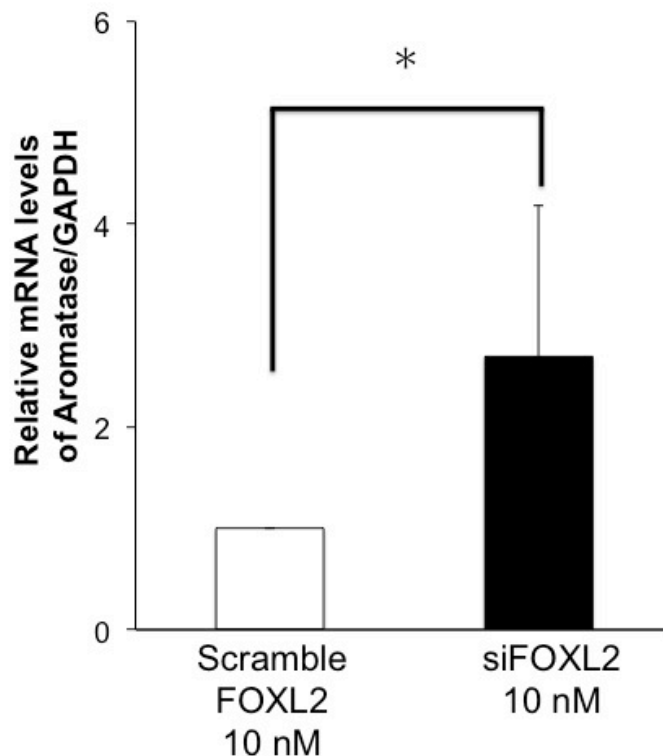


Figure 17 内在性遺伝子発現における FOXL2 の aromatase の発現に対する影響

内在性遺伝子発現における FOXL2 の ER β 転写活性化能に対する影響を検討するため、黄体化促進因子である aromatase の相対的 mRNA 濃度をリアルタイム定量 PCR にて測定した。aromatase はエストロゲンの標的遺伝子と報告されている。ヒト黄体化顆粒膜細胞に FOXL2-RNAi またはコントロール siRNA を Lipofectamine RNAimax を用いてノックダウンし、48 時間後に細胞を回収し RNA を抽出して aromatase の相対的 mRNA 量を定量的 PCR 法で測定した。エラーバーは標準偏差を示している。両者の比較に対し Mann-Whitney U test を用いた。その結果ヒト黄体化顆粒膜細胞において内在性 FOXL2 をノックダウンすると aromatase の相対的 mRNA 濃度が有意に上昇し、内在性遺伝子発現においても FOXL2 が ER β の転写活性を抑制することが示唆された (n=6, * p<0.05)。

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

ER β ; estrogen receptor β

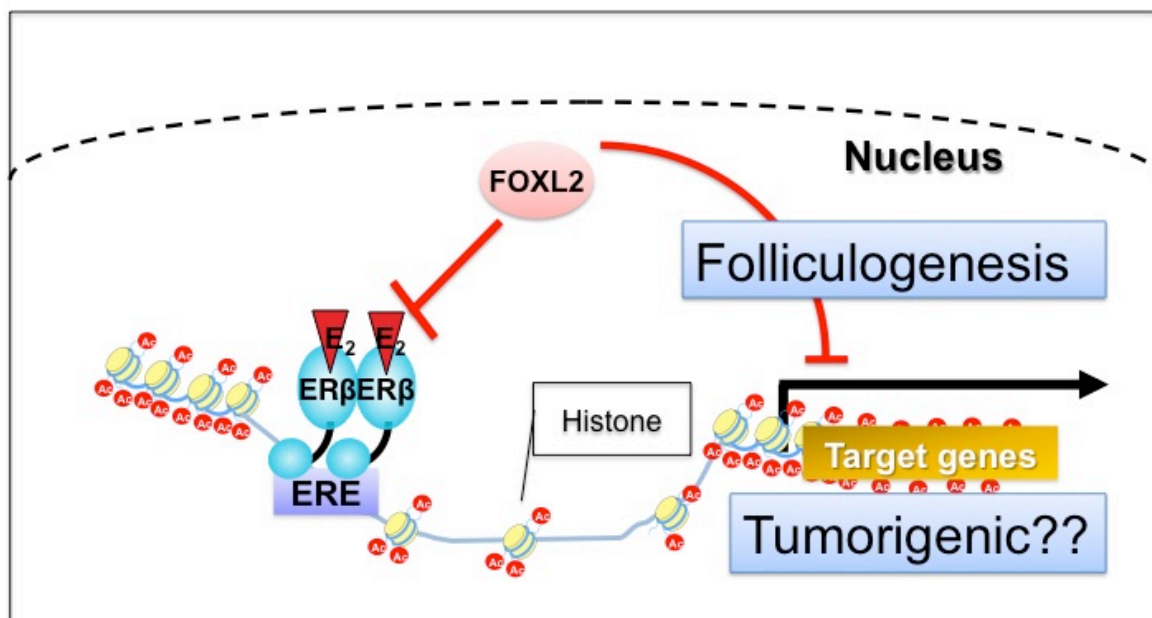


Figure 18 FOXL2 と ERβの相互関係

FOXL2 は図に示す ERβの古典的 ER 活性化メカニズムであるリガンド依存的転写活性を抑制することで、ERβの標的遺伝子の発現の制御を行い、卵胞発育や腫瘍化に関与している可能性がある。

FOXL2; forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family of transcription factor L2

E₂; 17β-estradiol

ER; estrogen receptor

ERE; estrogen responsive element