

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659732

研究課題名(和文) 婦人科悪性腫瘍における Lgr4 機能解析と抗体医薬品開発に向けた研究

研究課題名(英文) Analysis of Lgr4 function and development of anti-LGR4 antibody drug in gynecology

研究代表者

小泉 雅江 (KOIZUMI, MASAE)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60583028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：新生児Lgr4ノックアウト雌マウスがワルフ管の遺残と卵巣における雄様体細胞の出現という表現型を示すことを発見した。これはRSP01、 β -catenin、Wnt4ノックアウトマウスの表現型と類似していた。一方Lgr4ノックアウト雌マウスでワルフ管上皮と卵巣の体細胞のアンドロゲン受容体発現が増加していることを発見した。またLgr4ノックアウト卵巣においてWnt/ β -cateninシグナルの標的因子であるAxin2の発現が低下していた。これはLgr4がRSP0/Wnt cooperativeシグナルと雌生殖腺のアンドロゲン受容体の発現調節をにより生殖腺の体細胞分化に重要な役割を持つことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4 (LGR4) is a type of membrane receptor with a seven-transmembrane structure. We observed that Lgr4^{-/-} female mice showed abnormal development of the Wolffian ducts, the appearance of male-like somatic cells in the ovaries. Lgr4^{-/-} female mice exhibited masculinization similar to RSP01^{-/-}, β -catenin^{-/-}, and Wnt4-deficient mice. In the Lgr4^{-/-} ovarian somatic cells, Lef1 and Axin2 expression was reduced, which were target genes of Wnt-beta catenin signaling. On the other hand the androgen receptor (AR) expression in Wolffian ducts and ovarian somatic cells of Lgr4^{-/-} female was increased. This study suggested that Lgr4 was critical to ovarian somatic cell specialization through the cooperative signaling of RSP0s and Wnt and involved the regulation of the AR expression in female reproductive organs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 産婦人科学

キーワード：性分化

1. 研究開始当初の背景

LGR4は7回膜貫通型受容体的一种である。Lgr4はFSHRやLHRなどのゴナドトロピン受容体と相同性を持つ。近年Lgr4がRSP0sをリガンドとしてWnt/ β -cateninシグナルを補強することが報告された。Wntシグナルは細胞増殖、分化、癌組織において重要な機能を有すると考えられている。

2. 研究の目的

乳腺、輸卵管、子宮、卵巣の発生・分化・機能維持に非常に重要な働きをもつ7回膜貫通型受容体であるG protein-coupled receptor (GPCR) Lgr4婦人科領域における機能を明らかにすることを目的とした。これまでにR-spondin1、Wnt4、cateninノックアウトマウスで共通してみられる表現型に雌生殖器の発生異常が挙げられる。具体的には雌生殖器における偽両性具有化、雄固有の血管形成を表現型とし、異所性テストステロン産生といった「雌生殖器の雄化」を認める報告がある(8)(9)(10)。

雌生殖器において、腸管におけるLgr4とR-spondin/Wntと同様の関係があるとするれば、Lgr4は雌生殖器において雄性器への分化の抑制に関わると予想し本実験を行った。

3. 研究の方法

Lgr4ノックアウトマウスを用い研究を行った。Lgr4ノックアウトマウスは胎生、新生児致死であるため胎児期、新生児期の雌生殖器についてLGR4の機能解析を行った。

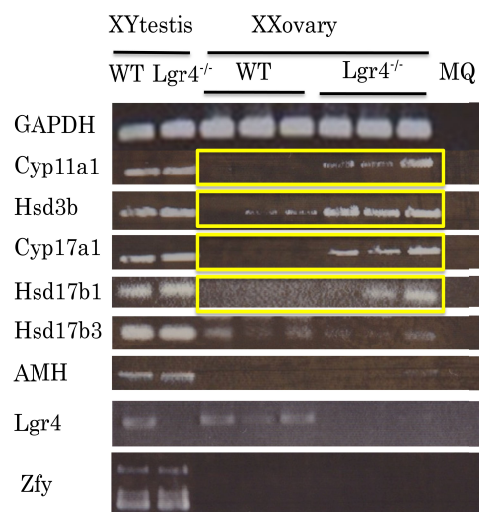
4. 研究成果

(1) Lgr4^{-/-}を用いた性腺分化の観察

Lgr4^{-/-}マウスを胎生12.5~生後0日目

で解剖したところ、Lgr4^{-/-}雌マウスにおいてE12.5、E14.5でははっきりしなかったが、E16.5から子宮uterus、卵巣ovaryと同時に精管vas deferensと精巣上体epididymisが出現しているのを確認した。この表現型はR-spondin1^{-/-}、catenin^{-/-}、Wnt4^{-/-}マウスで報告されている表現型と非常に類似していた。

(2) RT-PCRによるLgr4^{-/-}雌マウスにおける男性ホルモン合成酵素発現確認の結果、Lgr4^{-/-}の卵巣ではWTに類似した性ホルモン合成酵素の発現を認め、WTでは発現を認めない、または弱いことを確認した。



(3) 免疫染色による生殖腺発生不全の解析

Lgr4^{-/-}生殖器の雄化の原因は、胎児期卵巣における男性ホルモンの産生によると予想した。WTとLgr4^{-/-}マウス(E12.5からP0)において精巣特異的マーカー(3

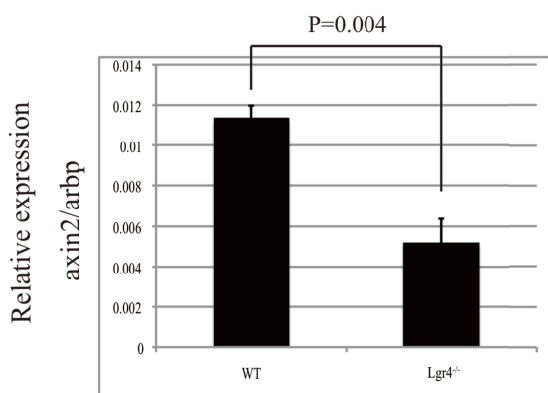
HSD: ライディヒ細胞マーカー、Sox9: セルトリ細胞マーカー)による免疫染色を行った。Lgr4^{-/-}卵巣において、雄特異的なライディヒ細胞・セルトリ細胞様の細胞が出現していた。

5) Wolf 管、性腺における Androgen Receptor (AR)の発現解析

(方法)E14.5 Muller 管、Wolf 管、卵巣、精巣において anti-AR 抗体を用い免疫染色を行った。WT と比較して、Lgr4^{-/-}雌雄で Wolf 管上皮と周囲間質の AR 発現が増加していた。性腺において、Lgr4^{-/-}卵巣・精巣では WT で見られない AR 陽性細胞が出現していた。

(6)免疫染色による Lgr4^{-/-} ovary における Wnt/ β -catenin signal の解析

Wnt/ β catenin 構成因子に対する抗体を用いた免疫染色を行い、Lgr4^{-/-}卵巣において、Wnt/ β -catenin signal が WT に比較して低下しているか調べた。Axin2 について、WT と比較し Lgr4^{-/-}は有意に発現量が低下していた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 6 件)

小泉 雅江

Lgr4 knockout mice show female pseudohermaphroditism

第 46 回日本発生生物学会

2013 年 5 月 28 日-5 月 31 日

島根県 KUNIBIKI MESSE

小泉 雅江

Lgr4 knockout mice show female

pseudohermaphroditism

NIH-Tohoku University-JSPS Symposium

2013 年 5 月 9 日-5 月 10 日

東北大学

小泉 雅江

Lgr4 ノックアウトマウスにおける雌生殖器の雄化

2013 年度日本農芸学会

2013 年 3 月 24 日-27 日

東北大学

小泉 雅江

LGR4 plays an important role in female reproductive tract development.

第 35 回日本分子生物学会年会

2012 年 12 月 10 日-14 日

福岡国際会議場

小泉 雅江

LGR4 plays an important role in female reproductive tract development.

第 45 回日本発生生物学会

2012 年 5 月 28 日-5 月 31 日

神戸国際会議場

小泉 雅江

LGR4 欠損マウスにおける雌生殖器の雄化

第 78 回日本生化学会東北支部会例会

2012 年 5 月 26 日

山形大学医学部

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

（ ）

発明者：

研究者番号：

権利者：

種類：

（ ）

番号：

研究者番号：

出願年月日：

国内外の別：

(3)連携研究者

取得状況（計 0 件）

（ ）

名称：

研究者番号：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小泉 雅江 (Koizumi, Masae)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60583028

(2)研究分担者

那波 明宏 (Nawa, Akihiro)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

