

## 学位論文審査結果の要旨

博士課程 甲	第 号	氏 名	山隈 優
審 査 委 員		主 査 氏 名	澤 口 朗
		副 査 氏 名	梶 本 真 司
		副 査 氏 名	保 田 昌 宏
[論文題名]			
<p><b>Crucial role of high-mobility group box 2 in mouse ovarian follicular development through estrogen receptor beta</b>  (Histochemistry and Cell Biology 157:359-369, 2022,  DOI <a href="https://doi.org/10.1007/s00418-022-02074-4">https://doi.org/10.1007/s00418-022-02074-4</a>)  「マウス卵巣における ER<math>\beta</math> を介した HMGB2 の卵胞形成への関与」</p>			
[要 旨]			
【序論】			
<p>High-mobility group box 2 (HMGB2) は、核内に存在するクロマチン関連タンパク質である。HMGB2 は、DNA の構造変化を介して転写因子へのアクセスや直接タンパク質に作用し特定の転写調節領域との親和活性化を介して転写、複製、組換え、DNA 修復そして細胞増殖などに関与している。HMGB2 の発現は、発生期では、ほぼ全ての細胞に発現するのに対して、出生後では精巣や胸腺リンパなど限られた組織やがん細胞などの増殖活性が高い組織で発現することが知られている。われわれはマウス精巣において HMGB2 がアンドロゲン受容体 (AR) およびエストロゲン受容体 (ER) <math>\alpha</math> を介し、生殖細胞の増殖低下およびアポトーシスによる精細管萎縮に関与することを明らかにした。一方、生殖腺としての卵巣では、未分化の原始卵胞から一次卵胞、二次卵胞を経て、グラーフ卵胞へと成熟する卵胞形成過程において、エストロゲンと ER<math>\alpha</math>、ER<math>\beta</math> が重要な働きをすることが知られている。しかしながら、卵巣での HMGB2 の生物学的役割については不明な点が多い。本研究では、マウス卵巣における ERs を介した HMGB2 の関与を明らかにすることを目的とした。</p>			

### 【材料および方法】

2ヶ月齢および10ヶ月齢のC57BL/6マウス雌(WT、HMGB2 KO)の卵巣を摘出し、サイズおよび重量計測した。さらに摘出した卵巣からパラフィン切片を作製し、HE染色およびマッソン染色を行った。またDDX4/MVH(生殖細胞マーカー)やPCNA(細胞増殖マーカー)、ER(ER $\alpha$ 、ER $\beta$ )の発現について免疫組織化学を、またリガンドと結合したERの活性についてEstrogen responsive element(ERE)の発現をサウスウエスタン組織化学で検討した。

### 【結果】

マウス体重では、2ヶ月齢および10ヶ月齢ともにWTとHMGB2 KOで差は認めなかったものの、HMGB2 KOの卵巣重量は、WTと比べて2ヶ月齢では $35.6 \pm 8.3\%$ 、10ヶ月齢では $59.7 \pm 7.6\%$ と有意に減少していた( $p < 0.05$ )。マッソン染色において2ヶ月齢および10ヶ月齢のKO卵巣では、WTと比較して、有意な線維化を認めた( $p < 0.05$ )。また卵母細胞数は、2ヶ月齢のKO卵巣で、DDX4陽性細胞がWTは $24 \pm 2.3$ 個、KOは $7.3 \pm 0.9$ 個で、KOが有意に減少していた( $p < 0.001$ )。一方で10ヶ月齢のKOでは、卵母細胞がほとんど認められなかった。さらにマウス卵巣におけるHMGB2の発現について免疫組織化学を行った。2ヶ月齢および10ヶ月齢のWTではHMGB2は卵母細胞、顆粒層細胞、一部の黄体および間質細胞で発現しており、同部位でER $\beta$ との共発現を認めた。一方でER $\alpha$ は、卵胞膜細胞および間質細胞に弱く発現していた。2ヶ月齢のKO卵巣では、WTと比較してER $\beta$ の発現が減少しており、10ヶ月齢ではER $\alpha$ 、ER $\beta$ ともにその発現を認めなかった。またサウスウエスタン組織化学を用いて、HMGB2 KOによるERE転写活性への影響を検討したところ、2ヶ月齢および10ヶ月齢のWTでは、EREは主に卵胞の顆粒膜細胞に検出されたのに対して、KOでは、2ヶ月齢ではEREはWTと比べてER $\beta$ と同様に減少しており、10ヶ月齢ではEREの発現は、ほとんど認められなかった。さらにHMGB2とPCNAの二重染色を行ったところ、2ヶ月齢と10ヶ月齢のWTでは、顆粒膜細胞にHMGB2とPCNAが共局在していた。一方で2ヶ月齢のKOでは、卵胞内にPCNA陽性細胞は認めるもののWTと比較して卵母細胞数の減少に伴いPCNA陽性細胞数も減少していた。10ヶ月齢のKOでは、PCNA陽性細胞はほとんど認めなかった。

### 【結語】

マウス卵巣においてHMGB2は、卵胞の顆粒膜細胞でER $\beta$ およびPCNAと共発現し、卵胞形成・成熟過程に重要な役割を担っていることが明らかになった。

## 最終試験結果の要旨

博士課程 甲	第 号	氏 名	山隈 優
審 査 委 員		主 査 氏 名	澤口 潤
		副 査 氏 名	桂 不 真 司
		副 査 氏 名	保 田 昌 宏
[要 旨]			
申請論文の内容及び関連領域について口頭で試問した結果、学位を授与するに値する学力を有するものと認定した。			