

令和元年5月20日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09996

研究課題名(和文) リポイド副腎過形成症モデルマウスと細胞株によるステロイドホルモン生合成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of steroid hormone biosynthesis in lipoid congenital adrenal hyperplasia by establishing a mouse or cell line model

研究代表者

石井 智弘 (Ishii, Tomohiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：70265867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)の異常で生ずる先天性リポイド副腎過形成症(LCAH)の病態解明に寄与しうる以下の三つの成果を得た。

StARを欠損したステロイドホルモン産生細胞株、タモキシフェン投与でStARを欠損するマウスを作成し、LCAHの病態を二つの手法で再現した。StAR非依存性のステロイドホルモン産生が存在し、cAMPに制御され、コレステロールエステル(CE)蓄積により二次的に障害されることを示した。CE蓄積による二次的なStAR非依存性経路の障害がNR5A1の発現低下と関連することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)を欠損したステロイドホルモン産生細胞株、タモキシフェン投与でStARを欠損するマウスを作成して、先天性リポイド副腎過形成症(LCAH)の病態モデルを細胞とマウスの双方で確立した研究は国内外で初めてである。コレステロールエステル蓄積により二次的に障害されるStAR非依存性のステロイドホルモン産生経路を保持する手段が開発されれば、LCAH女性患者の卵巣機能を維持する新たな治療法への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study developed significant progress in the understanding pathophysiology of lipoid congenital adrenal hyperplasia (LCAH). First, the study successfully established steroidogenic cell lines lacking steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and tamoxifen-inducible knockout mice lacking StAR as in vitro and in vivo models for LCAH, respectively. Second, the results of the study demonstrated the presence of StAR-independent steroidogenic pathway, the role of cAMP in the pathway, and the impairment of the pathway secondary to the accumulation of cholesterol esters in the cytosol of adrenocortical cells. Third, the study indicates that the impairment of StAR-independent steroidogenic pathway secondary to the accumulation of cholesterol esters is associated with global reduction of expression levels of genes related to steroidogenesis probably due to reduced expression of NR5A1.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：StAR 先天性リポイド副腎過形成症 ステロイドホルモン生合成 コレステロール

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Steroidogenic acute regulatory protein (以下 StAR) は副腎および性腺においてコレステロールをミトコンドリア外膜から内膜へ転送し、ステロイドホルモン合成を促進する。STAR 変異による先天性リポイド副腎過形成症 (LCAH) 患者と Star 欠損マウスでは、副腎不全、男性外性器形成障害、卵巣機能不全が認められ、副腎と性腺のステロイドホルモン産生細胞の細胞質にコレステロールエステルが蓄積する<sup>(1-4)</sup>。よって、StAR によるコレステロール転送はヒトとマウスの副腎、性腺のステロイドホルモン合成に必須と考えられている。

一方で、ステロイドホルモン合成に伴うコレステロール転送機序には、StAR 非依存性の経路の存在が示唆されている。実際、古典型の LCAH 女性患者や Star 欠損雌マウスは性ホルモン産生能の一部を保持し、二次性徴を自然発来する<sup>(1,3)</sup>。しかし、遅発性に卵巣機能不全を発症し、最終的には早発閉経に至る。この卵巣機能不全はステロイドホルモン産生細胞に蓄積したコレステロールエステルによる StAR 非依存性コレステロール転送経路の二次的な障害によると推測されている。StAR 非依存性コレステロール転送経路の障害を抑制することは、LCAH 女性患者の卵巣機能不全の軽症化に繋がると期待されるが、この機序は解明されていない。

### 参考文献

- (1) Bose HS, *et al.* The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1870-1878.
- (2) Caron KM, *et al.* Targeted disruption of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 1997; 94: 11540-11545.
- (3) Hasegawa T, *et al.* Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol.* 2000; 14: 1462-1471.
- (4) Ishii T, *et al.* The roles of circulating high density lipoproteins and trophic hormones in the phenotype of knockout mice lacking the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol.* 2002; 16: 2297-2309.

### 2. 研究の目的

研究全体の最終的な目標は、ステロイドホルモン合成におけるミトコンドリア外膜から内膜へのコレステロール転送の分子機構および修飾因子の全容を解明すること、である。当該期間においては、Star 欠損ステロイドホルモン産生細胞株および時期特異的 Star 欠損マウスを作成し、StAR 非依存性コレステロール転送経路の制御機構、コレステロールエステル蓄積に伴う二次的障害の機序を *in vitro* および *in vivo* で解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

Star を欠損したマウスの副腎皮質腫瘍由来の細胞株 (Y1)、タモキシフェン (TAM) 誘導型の時期特異的 Star 欠損マウスをそれぞれ作成し、StAR 非依存性コレステロール転送経路の生化学的特性と関連する分子・パスウェイを同定し、コレステロールエステル蓄積に伴う病態生理を解析した。

#### (1) Star 欠損 Y1 細胞株の作成

Y1 細胞株に Star エクソン 1 を標的とする一対の transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 発現ベクター A、Star 相同配列と puromycin 耐性遺伝子を持つドナーベクターをエレクトロポレーションで導入し、puromycin 含有培地で片アレルに Star 変異が導入された Star ヘテロ接合性 Y1 細胞株を選別した。

Star ヘテロ接合性 Y1 細胞株に、標的配列をずらしてデザインした TALEN 発現ベクター B をエレクトロポレーションで導入し、複合ヘテロ接合性に Star 変異が導入された細胞株 (Star 欠損 Y1 細胞株) を選別した。

#### (2) Star 欠損 Y1 細胞株の特性と変異 STAR の機能の解析

Star 欠損 Y1 細胞株と野生型 Y1 細胞株を 3 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素阻害薬および dibutyryl-cAMP (db-cAMP) 刺激下で培養し、プレグネノロン産生能を評価した。また、22-ヒドロキシコレステロール添加下で、StAR をバイパスしたプロセス、すなわちコレステロールがミトコンドリア内膜に到達した以降のプレグネノロン産生能を評価した。

野生型 Y1 細胞株、Star 欠損 Y1 細胞株を db-cAMP 投与下で培養し、オイルレッド O 染色により細胞質内のコレステロールエステル蓄積を評価した。

Star 欠損 Y1 細胞株に野生型ヒト STAR cDNA および CLAH で報告されている変異 STAR cDNA を一過性に発現させ、3 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素阻害薬および db-cAMP 刺激下でプレグネノロン産生能を評価した。

### (3) TAM 誘導型の時期特異的 Star 欠損マウスの作成

Star のエクソン 7 の翻訳領域を LoxP 配列で挟む相同組み換えベクターを作成した。選別のため FRT 配列で挟んだ neomycin 耐性遺伝子を LoxP 配列間に挿入した。

相同組み換えベクターを C57Bl/6N 系統由来の ES 細胞へ導入し、neomycin で選別し、組み換え ES 細胞株をスクリーニングした。

組み換え ES 細胞株からアグリゲーション法でキメラマウスを作成した。

CAG-Flp マウスとの交配でキメラマウスから neomycin 耐性遺伝子を除去し、Star floxed マウスを作成した。

Star floxed マウスと CAG-Cre リコンビナーゼ/Ert1 トランスジェニックマウスを交配し、CAG-Cre/Ert1 陽性 Star floxed マウスを作成した。

### (4) TAM 誘導型の時期特異的 Star 欠損マウスの特性の解析

週齢 6-8 の CAG-Cre/Ert1 陽性 Star floxed マウスに TAM を投与して時期特異的 Star 欠損マウスを作成し、血中副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 濃度、血清コルチコステロン (CS) 濃度、副腎皮質の三層構造と脂肪滴蓄積を経時的に評価した。

時期特異的 Star 欠損マウスの副腎から cDNA ライブラリを作成し、RNA シーケンス解析を経時的に行った。

## 4. 研究成果

### (1) Star 欠損 Y1 細胞株の作成と応用

#### Star 欠損 Y1 細胞株の同定

Star 遺伝子に 5 塩基と 1 塩基の欠失を複合ヘテロ接合性に持つ Y1 細胞株を 2 クローン同定した。同細胞株について、db-cAMP 刺激下での Star の mRNA 発現、蛋白発現ともに野生型 Y1 細胞株に比し有意に低下していることを、RT-PCR および western blot で確認した (図 1)。この結果は LCAH の *in vitro* の病態モデルとなる Star 欠損ステロイドホルモン産生細胞株の獲得に成功したことを示唆する。

#### Star 欠損 Y1 細胞株のプレグネノロン産生能 (図 2)

Star 欠損 Y1 細胞株 2 クローンの 3 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素阻害薬添加下のプレグネノロン産生能は野生型 Y1 細胞株に比し有意に低下していた。また、Star 欠損 Y1 細胞株 2 クローンは db-cAMP に反応し、プレグネノロン産生能が有意に上昇した。この結果は、StAR 非依存性コレステロール転送経路が存在すること、同経路が cAMP に依存することを示唆する。

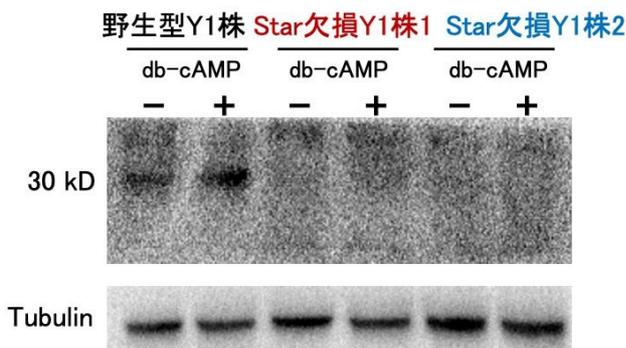


図 1 Star 欠損 Y1 細胞株の Star 蛋白発現

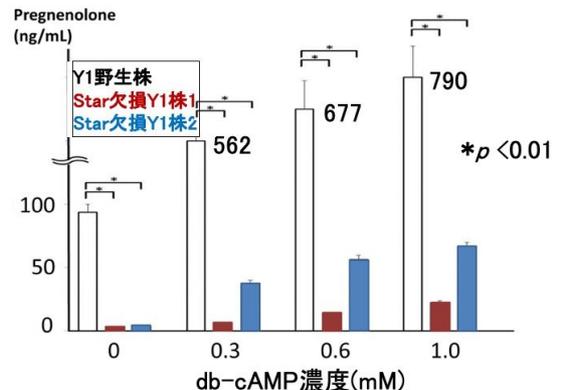


図 2 Star 欠損 Y1 細胞株のプレグネノロン産生能

#### Star 欠損 Y1 細胞株のコレステロールエステル蓄積 (図 3)

野生型 Y1 細胞株、Star 欠損 Y1 細胞株を db-cAMP 投与下で培養し、固定後にオイルレッド O 染色を行った。その結果、Star 欠損 Y1 細胞株の細胞質内にのみコレステロールエステルが蓄積した。この結果は、LCAH におけるステロイドホルモン産生細胞の病態を *in vitro* で再現できたことを示唆する。

#### Star 欠損 Y1 細胞株を用いた変異型 STAR の機能解析 (図 4)

Star 欠損 Y1 細胞株に変異型 STAR 蛋白 (p.Gln258\*, p.Arg272Cys, p.Ser195Ala) を導入し、野生型 STAR 導入時に比し 3 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素阻害下におけるプレグネノロン産生能が有意に低下することを確認した。この結果は、Star 欠損 Y1 細胞株が変異型 STAR 蛋白の機能解析系として応用できることを示唆する。

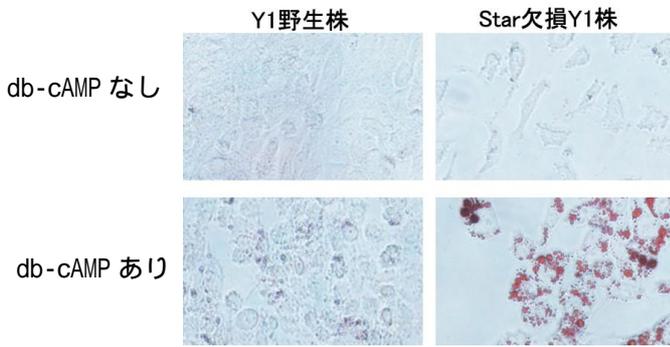


図3 Y1細胞のオイルレッドO染色

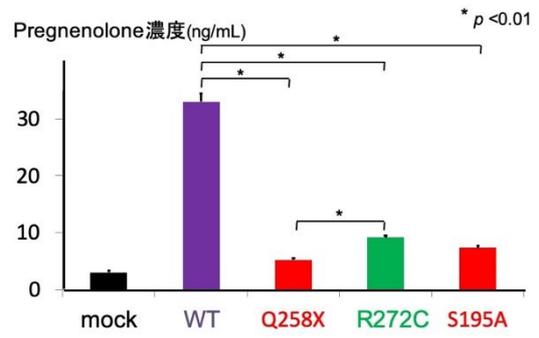


図4 変異STARの機能解析

## (2) TAM誘導型の時期特異的Star欠損マウスの作成と応用

### 時期特異的Star欠損マウスの作成

Star遺伝子に相同組み換えを生じたマウスES細胞株を6クローン同定し、Star floxedヘテロ接合性マウスを作成した。Star floxedヘテロ接合性マウスとCAG-Cre リコンビナーゼ/Ert1トランスジェニックマウスを交配し、CAG-Cre/Ert1陽性Star floxedホモ接合性マウスを作成した。週齢8のCAG-Cre/Ert1陽性Star floxedマウスにTAMを投与し、副腎組織を用いてStarエクソン7をプローブとした*in-situ* hybridizationを行い、副腎皮質における野生型Star mRNAの消失を確認した(図5)。この結果は、時期特異的Star欠損マウスの獲得に成功したことを示唆する。

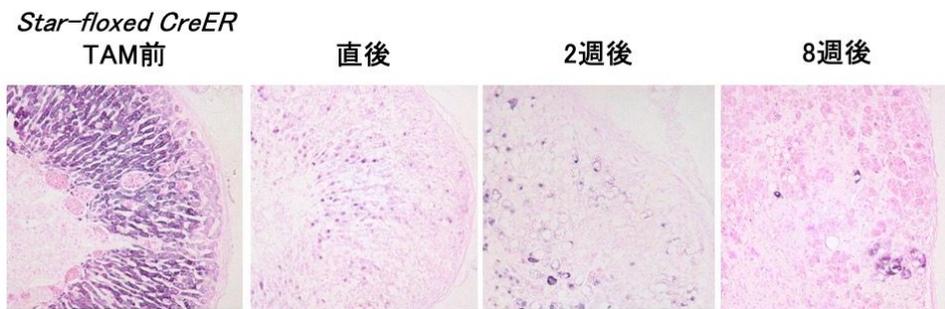


図5 成獣副腎におけるStarの*in-situ* hybridization

### 時期特異的Star欠損マウスの副腎組織(図6)

週齢8のCAG-Cre/Ert1陽性Star floxedマウスにTAMを投与し、副腎皮質の組織を経時的に観察した。その結果、TAM投与後に経時的に副腎皮質の脂肪滴が増大し、三層構造が不明瞭になることを確認した。この結果は、LCAHにおける副腎皮質の病態を*in vivo*で段階的に再現できたことを示唆する。

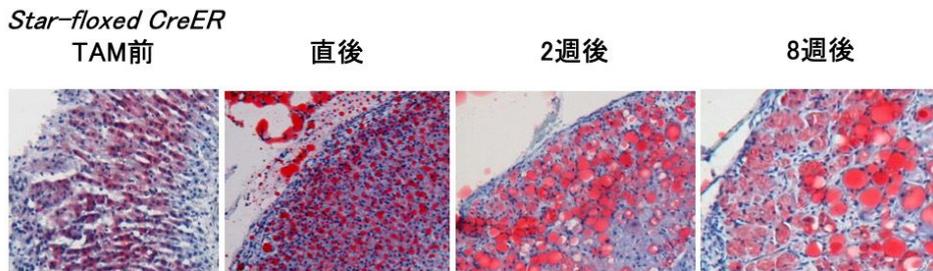


図6 成獣副腎のオイルレッドO染色

### 時期特異的Star欠損マウスのCS分泌能(図7)

週齢8のCAG-Cre/Ert1陽性Star floxedマウスにTAMを投与し、ELISA法で血中ACTH、LC-MSMS法で血清CSを経時的に測定した。その結果、TAM投与後に経時的にCS分泌能が低下することを確認した。この結果は、LCAH副腎皮質におけるStAR非依存性ステロイドホルモン産生能の経時的な低下を*in vivo*で初めて確認できたことを示唆する。

### 時期特異的 Star 欠損マウスの副腎の RNA シーケンス (図 8)

週齢 8 の CAG-Cre/Ert1 陽性 Star floxed マウスに TAM を投与し、副腎皮質から抽出した cDNA を用いて経時的に RNA シーケンス解析を行った。その結果、*Nr5a1* を含むステロイド生成に関する遺伝子群の発現が有意に低下していることを確認した。この結果は、LCAH の病態生理で提唱されているコレステロールエステル蓄積による二次的な StAR 非依存性のステロイドホルモン生成経路の障害の少なくとも一部は *NR5A1* の発現低下に基づくステロイド生成に関する遺伝子群の全般的な発現低下と関連することを示唆する。

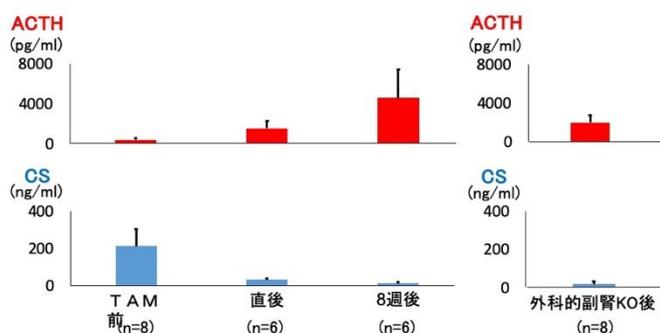


図 7 成獣の血中 ACTH 濃度、血清 CS 濃度

### 遺伝子発現 (*Gapdh*比)

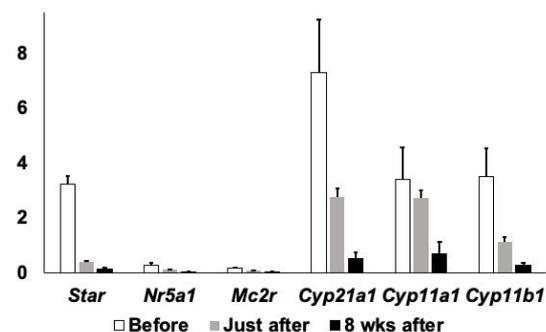


図 8 成獣副腎における遺伝子発現

### (3) 研究成果のまとめ

本研究によりステロイドホルモン生成に関連して以下の三点の成果を得た。

Star 欠損ステロイドホルモン産生細胞株、TAM 誘導型時期特異的 Star 欠損マウスを作成し、LCAH の病態を *in vitro* と *in vivo* で再現することに成功した。

StAR 非依存性ステロイドホルモン産生経路が存在すること、同経路が cAMP の制御下にあること、同経路がコレステロールエステル蓄積により二次的に低下することを示した。

コレステロールエステル蓄積による二次的な StAR 非依存性ステロイドホルモン産生経路の障害が *NR5A1* の発現低下に基づくステロイドホルモン生成関連遺伝子群の全体的な発現低下と関連することを示した。

### (4) 成果の国内外における位置づけとインパクトと今後の展望

Star/STAR を欠損したステロイドホルモン産生細胞株、条件特異的な Star 欠損マウスを用いて LCAH の病態モデルを作成し解析した研究は国内外で初めてである。また、StAR 非依存性コレステロール転送経路の cAMP 依存性、同経路のコレステロールエステル蓄積による二次的障害と *NR5A1* 発現低下の関連も初めて明らかにされた。

本研究の成果により、これまで *in vivo* でのみ可能であった内因性ステロイドホルモン産生制御機構下での Star/STAR 構造-機能解析が *in vitro* で可能となった。また、StAR 非依存性コレステロール転送経路の障害の病態生理の解明が進むことにより、LCAH 女性患者の卵巣機能を保持する新たな治療法への発展が期待できる。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) (査読有り) Mizuno Y, Ishii T, Hasegawa T. *In vivo* verification of the pathophysiology of lipoid congenital adrenal hyperplasia in the adrenal cortex. *Endocrinology* 2019;160:331-338. doi: 10.1210/en.2018-00777.

(2) (査読有り) Hatabu N, Amano N, Mori J, Hasegawa Y, Matsuura H, Sumitomo N, Nishizawa K, Suzuki M, Katakura S, Kanamoto N, Kamimaki T, Ishii T, Hasegawa T. Pubertal development and pregnancy outcomes in 46,XX patients with nonclassic lipoid congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104:1866-1870. doi: 10.1210/jc.2018-01752.

(3) (査読有り) Amano N, Narumi S, Hayashi M, Takagi M, Imai K, Nakamura T, Hachiya R, Sasaki G, Homma K, Ishii T, Hasegawa T. Genetic Defects in Pediatric-onset Adrenal Insufficiency in Japan. *Eur J Endocrinol* 2017; 177: 187-194. doi: 10.1530/EJE-17-0027.

(4) (査読有り) Uchida N, Amano N, Yamaoka Y, Uematsu A, Sekine Y, Suzuki M, Watanabe J, Nishimoto K, Mukai K, Fukuzawa R, Hasegawa T, Ishii T. A novel case of somatic *KCNJ5* mutation in pediatric-onset aldosterone-producing adenoma. J Endocrine Soc 2017; 1: 1056-1061. doi: 10.1210/js.2017-00210.

〔学会発表〕(計 5件)

(1) Mizuno Y, Ishii T, Hasegawa T. *In vivo* verification of the pathophysiology of lipid congenital adrenal hyperplasia in the adrenal cortex. The 18th Adrenal Cortex Conference (2018年)

(2) 水野 裕介、石井 智弘、長谷川 奉延 リポイド副腎過形成症の副腎における二次的なステロイド産生能低下の病態解 第52回日本小児内分泌学会(2018年)

(3) 水野 裕介、石井 智弘、長谷川 奉延 リポイド副腎過形成症の副腎 two hit 仮説の可視化 時期特異的ノックアウトマウスモデルによる検討 第51回日本小児内分泌学会(2017年)

(4) 天野 直子、鳴海 覚志、林 美恵、高木 優樹、蜂屋 瑠見、佐々木 悟郎、本間 桂子、石井 智弘、長谷川 奉延 小児期発症原発性副腎皮質機能低下症63例における遺伝子異常:STAR変異例の遺伝子型と臨床的特徴 第51回日本小児内分泌学会(2017年)

(5) Ishii T. Recent advances in pediatric adrenal disorders. The 39th symposium of the Korean Society of Pediatric Endocrinology meetings(招待講演)(2016年)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 水野 裕介

ローマ字氏名: MIZUNO, Yusuke

研究協力者氏名: 佐藤 武志

ローマ字氏名: SATO, Takeshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。