

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 5月18日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20780212
研究課題名（和文）性ホルモン産生細胞の性分化メカニズム

研究課題名（英文）The mechanism of sex steroid-producing cell differentiation

研究代表者
渡辺（宮林） 香奈子（WATANABE-MIYABAYASHI KANAKO）
九州大学・大学院医学研究院・テクニカルスタッフ
研究者番号：20469612

研究成果の概要（和文）：本研究は、胎生期雄特異的に出現する性ホルモン産生細胞であるライディッヒ細胞の分化に着目し、そのメカニズムの解明を目的とした。これまでの研究から、胎生期精巣に発現する転写因子 Arx 陽性細胞の中にライディッヒ前駆細胞が存在することが示唆された。この証明のために Arx 遺伝子発現制御領域を用いたトランスジェニックマウスの作製が不可欠であり、Arx 遺伝子を含む 1 MB のゲノム領域について発現制御領域のスクリーニングを行っているが、目的の領域を得るに至っていない。同時に、機能獲得実験として Arx 強制発現マウスを作製中である。

研究成果の概要（英文）：In this study, I am interested in the development of Leydig precursor cells, which has no genetic marker gene and therefore no one can identify in fetal testis, and try to understand the mechanisms of its development through the functional analyses of Arx KO mouse. From observations to date, I hypothesize that Arx positive cells contains Leydig precursor cells. To confirm this hypothesis, it is necessary to make transgenic mouse expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase under control of transcriptional regulatory element of Arx gene. I am now searching for such elements from 5 BAC constructs around Arx gene in fetal testis. By transgenic assay using these BAC DNAs, I could not obtain target element yet.

交付決定額

	（金額単位：円）		
	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：発生

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖腺は胎生期に性染色体の組

み合わせによって、性差のない未分化な状態から精巣あるいは卵巣へと分化する。性分化過程では、精巣においてのみライディッチ細胞と呼ばれる男性ホルモン産生細胞が出現する。胎生期に出現したライディッチ細胞（胎生ライディッチ細胞）は出生前後から消失し始め、性成熟に向けて新たなライディッチ細胞が分化するといわれており、これらは別の由来と考えられている。胎生期特異的に雄のみで出現する胎生ライディッチ細胞から分泌されるテストステロンは、脳や外部生殖器をはじめとする様々な組織を雄化する。一方、性分化過程の卵巣では性ホルモン産生細胞は分化せず、性ホルモンも産生されない。従って、性ホルモンを産生する胎生ライディッチ細胞は個体の性差を生み出す重要な役割を持つ細胞である。このように、胎生期の性ホルモン産生細胞の分化には明確な性差が認められる。

生殖腺の性分化に関する研究は、これまでに国内外の研究グループにより精力的に進められてきた。しかし、生殖腺の性分化過程における胎生ライディッチ細胞の分化に関する研究の成果は乏しく、ライディッチ細胞の起源については、その前駆細胞の存在を含め全く分かっておらず、その分化メカニズムはほとんど分かっていない状況である。生殖腺の性分化を包括的に理解するために、胎生ライディッチ細胞の分化メカニズムの理解は極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では **Arx KO** マウスと **Wnt4 KO** マウスに着目している。これまでの申請者らの解析から、**Arx KO** 雄マウスでライディッチ細胞の出現が遅れ (Kitamura K, et al., *Nature Genetics* 32(3):359-69, 2002)、細胞数が減少すること、一方、他グループの報告から、**Wnt4 KO** 雌マウスは、雌で胎生期には出現しない性ホルモン産生細胞が出現すること (Vainio S, et al., *Nature* 397(6718):405-91999) が明らかとなっている。このことから、ライディッチ細胞の分化に対し、**Arx** が促進的なシグナル、また、**Wnt4** が抑制的なシグナルとして働くことが示唆された。このことから、**Arx** や **Wnt4** が性ホルモン産生細胞の分化を制御していることを強く示唆される。さらに、所属研究室では、副腎や生殖腺に特異的発現を示す **Ad4BP/SF-1** 遺伝子の胎生ライディッチエンハンサーを同定しており (未発表)、この配列によって **EGFP** を発現するトランスジェニックマウス

(ライディッチエンハンサー-**EGFP** マウス) は、性ホルモン産生細胞の性分化を明らかにすることを目的とする本研究において強力なツールとなり得る。これらの結果を踏まえ、本研究では胎生期のライディッチ細胞の分化メカニズムおよび雌における性ホルモン産生細胞の分化抑制メカニズムを明らかにする。すなわち、性ホルモン産生細胞の性分化を促進および抑制するシグナル (遺伝子または遺伝子発現) の存在を仮定し、その働きを通じて性ホルモン産生細胞の性分化メカニズムの解明を目指す。

(1) 胎生期のライディッチ細胞分化の分子メカニズムに関する研究

主に **Arx KO** マウスを用いた解析により、遺伝学的に **Arx** の下流にあり、ライディッチ細胞の分化に関与する因子を同定することで、ライディッチ細胞分化過程における **Arx** シグナルの分子メカニズムを明らかにする。これまでの研究から、**Arx** 陽性細胞の中にライディッチ前駆細胞が存在することが示唆されており、**Arx** 陽性細胞の細胞系譜を追うことで、これまで未同定のライディッチ前駆細胞について、ひいてはライディッチ細胞の分化について理解することを目的とする。一方、機能獲得実験としてライディッチエンハンサー-**Arx** 強制発現マウスを作製する。ライディッチ細胞に強制的に **Arx** を発現させることで、**Arx** が細胞自律的にライディッチ細胞の分化に関与することを示す。

(2) 雌における性ホルモン産生細胞の分化抑制メカニズムに関する研究

生殖腺において、**Arx KO** マウスと相反する表現型を示す **Wnt4 KO** 雌マウスにおいて、本来雌で出現しないはずの性ホルモン産生細胞が、ライディッチエンハンサーを介した転写調節機構を利用しているかを調べる。このことにより、雌では、雄と同じ分化メカニズムが抑制されることによって性ホルモン産生細胞が出現しないのか、全く別のメカニズムが存在するのかが明らかになる。

3. 研究の方法

(1) **Arx KO** マウスのマイクロアレイ解析で着目した下流候補遺伝子の一つで **KO** において発現が低下する **Cbln1** について、器官培養による機能解析を行う。**Cbln1** タンパクまたはその産物であるペプチド・セレベリンを胎仔より取り出した生殖腺に **injection** し、体外培養を行う。**Arx** 陽性細胞の中にライディッチ前駆細胞が存在することを証明するために、**Arx** 遺伝子発現制御領域を用いたトランスジェニックマウスを作製する。そのために、生殖腺における **Arx** 遺伝子発現制御領域を、**Arx** 遺伝子を含む **1 MB** のゲノム領域

域からスクリーニングする。スクリーニングは、レポーターとして EGFP を組み込んだ BAC トランスジェニックマウスを作製し、胎生 14.5 日生殖腺において EGFP の発現が内在の Arx の発現と一致しているかどうかで発現制御領域を含むかどうかを判断する。ライディッヒエンハンサー-Arx 強制発現マウスの解析では、生殖腺、特にライディッヒ細胞での表現型を詳細に解析する。

(2) 当研究室において Ad4BP/Sf-1 遺伝子の胎生ライディッヒ細胞特異的発現を誘導する転写調節領域（エンハンサー領域）が同定されており、その断片と GFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（ライディッヒエンハンサー-EGFP マウス）を作成・ライン化する。このマウスと Wnt4 KO マウスを掛け合わせることで、雌における性ホルモン産生細胞の抑制メカニズムの根底には雄での分化メカニズムが存在するのかを明らかにする。

4. 研究成果

Cbln1 について、器官培養による機能解析を行ったが、未処理区と比較して変化は認められなかった。この原因として、Cbln1 単独ではなく、他の因子と組み合わせが必要である可能性が考えられる。候補としては、同じファミリーの Cbln4 が生殖腺に発現していることが知られているため、今後の課題として、この因子との複合投与の実験を行うことが必要と考えられる。

Arx KO 雄マウスでは胎生ライディッヒ細胞数が減少することが明らかになっている。Arx が胎生期の雄生殖腺においてライディッヒ細胞に発現しているかどうかを詳細に調べるために、Arx とライディッヒ細胞のマーカーである 3b-Hsd および Ad4BP/Sf-1 の 3 重免疫染色を行った。3b-Hsd 強陽性および Ad4BP/Sf-1 強陽性の細胞では、Arx の発現は認められず、逆に Arx 強陽性の細胞では 3b-Hsd および Ad4BP/Sf-1 の発現は認められなかった。しかし、興味深いことに弱い発現ながらも 3 者が共局在する細胞が存在した。この細胞の存在は、ライディッヒ前駆細胞が、Arx 陽性細胞の中に存在する可能性を示唆するものであった。すなわち、ライディッヒ前駆細胞では Arx を発現しているが分化マーカーである 3b-Hsd および Ad4BP/Sf-1 を発現しておらず、ライディッヒ細胞への分化が始まると Arx の発現は減少し、代わって 3b-Hsd および Ad4BP/Sf-1 が発現し始めることが推測された。この仮説を証明するためには、Arx 遺伝子発現制御領域を用いたトランスジェニックマウスの作製が不可欠である。Arx 遺伝子を含む約 100 kB の領域についてコスミドゲノムライブラリーを用いたスクリーニングを行ったが、Arx 遺伝子発現

制御領域を含むクローンが得られなかった。そこで現在、より広範囲に渡ってスクリーニングを行うために、BAC を用いて Arx 遺伝子を含む約 1 MB の領域をスクリーニング中である。残念ながら、現在までに Arx の生殖腺での発現を誘導する領域は得られていない。ライディッヒ細胞の起源については、その前駆細胞の存在を含め全く分かっておらず、この仮説が正しければ、ライディッヒ細胞の分化メカニズムの解明に大きく寄与すると確信する。ライディッヒエンハンサー-Arx 強制発現マウスについては現在作成中である。ライディッヒエンハンサー-GFP マウスについてはライン化が終了し、順次 Wnt4 KO マウスとの交配を行う予定である。

雌雄で対称的なポイントから研究を進めることによって得られる情報は非常に有用であり、性ホルモン産生細胞の性分化メカニズムの解明、ひいては生殖腺の性分化メカニズムの解明にとって大きな躍進となると確信する。

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 3 件）

- ① 宮林香奈子、マウス胎生ライディッヒ細胞分化過程における Arx 遺伝子の機能、第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB 2 0 0 8)、2 0 0 8 年 1 2 月 1 0 日、神戸市・神戸ポートアイランド
- ② 宮林香奈子、Function of Arx gene during fetal testis development、FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VERTEBRATE SEX DETERMINATION、2 0 0 9 年 4 月 2 2 日、Kona, Hawaii, USA
- ③ 宮林香奈子、マウス胎生ライディッヒ細胞分化過程における Arx 遺伝子の機能、第 1 7 回日本ステロイドホルモン学会、2 0 0 9 年 1 1 月 1 4 日、福岡市・九州大学医学部百年講堂

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
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

6. 研究組織

(1)研究代表者

()
渡辺（宮林） 加奈子
研究者番号： **20469612**

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：