

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03436

研究課題名（和文）性染色体による副腎皮質の性差制御

研究課題名（英文）Regulation of sexually dimorphic functions of adrenal cortex by sex chromosomes

研究代表者

諸橋 憲一郎（Morohashi, Ken-ichirou）

九州大学・医学研究院・主幹教授

研究者番号：30183114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：雌雄の副腎皮質の遺伝子発現を比較したところ、ほぼ全ての遺伝子の発現が1.8倍ほどメスで高かった。1.8倍より大きな性差を示す遺伝子はエネルギー代謝や糖質コルチコイド産生に必要な遺伝子が多く、遺伝子発現に対応するように実際の代謝活性もメスの方が高かった。副腎皮質の形成に必須のAd4BPの標的遺伝子を検索したその結果、発現している遺伝子のおよそ半数の遺伝子が標的遺伝子である可能性が示された。副腎が矮小化しているAd4BPヘテロマウスを用い、副腎皮質の性差が骨格筋の性差に与える影響を調べたところ、糖質コルチコイド量の性差が骨格筋のサイズの性差形成に一定の影響を与えることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に性差は性ホルモンによって作り出されると考えられてきた。したがって男性ホルモンとその受容体の直接的な影響が調べられてきた。本研究では副腎皮質細胞のRNA量、そして遺伝子発現が雌雄で異なることを示した。このような全遺伝子の発現の差が性差の基盤となっていることを示した初めての例であり、性差を問うにあたって着目すべき新たな視点を提供した。また、副腎皮質で合成される糖質コルチコイドによる誘導は骨格筋に限ったことではなく全身に影響が及ぶと推測される。したがって、糖質コルチコイド活性を有する薬剤を使用する場合には、種々の細胞の性差の変化という観点に注意すべきであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Comparing gene expressions of adrenal cortices between male and female reveals that gene expressions in female are totally higher than those of male by 1.8-fold in average. Genes whose expression is highly female-biased (higher than the average) were examined. Consequently, these genes were found to be functionally related to energy metabolism and glucocorticoid synthesis. Indeed, cellular activities corresponding to those processes were higher in female. Target genes of Ad4BP, an essential transcription factor for adrenocortical differentiation, were searched. As the consequence, nearly half of the genes expressed were found to be potential targets of Ad4BP. Finally, we examined the effects of the sexually dimorphic adrenal cortex on the size of skeletal muscles and showed that sexually different amount of glucocorticoid gives a certain effect on sexually differential size of the skeletal muscles.

研究分野：性差生物学

キーワード：性差 副腎皮質 糖質コルチコイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

齧歯類ではメスの副腎サイズがオスより大きいことが知られていた。またこの副腎サイズの性差は、男性ホルモンによってオス副腎のサイズが抑制されることによって生じることが示されていた。しかしながら、どのようなメカニズムのもとに副腎サイズの性差が誘導されるかについては不明の部分が多く残されていた。また、副腎サイズの性差がどのような影響をもたらすのかについても不明であった。

また申請者は、副腎皮質細胞にてステロイドホルモン産生系遺伝子の制御を担う因子として核内受容体型転写因子 Ad4BP を同定し、長年にわたってこの転写因子の機能解析を行ってきた。その結果、この因子は副腎皮質の形成に必須の因子であること、また最近では全ゲノム解析を通じ、本因子がステロイドホルモン産生系に加え、解糖系、コレステロール産生系、NADPH 産生系遺伝子群を制御することを明らかにしてきた。副腎皮質の性差を考える上で貴重なツールになりうると思われた。

### 2. 研究の目的

申請者はこれまでの副腎皮質研究から、メスの副腎はオスのおよそ2倍の重量を有すること、この性差は性ホルモンによって誘導されるが、性ホルモンのみでは説明できない性ホルモン非依存的性差が存在すること、また細胞あたりの RNA 量 (total RNA と poly(A) RNA) もメスの方が2倍ほど多いことなどの興味深いデータを取得していた。以上の研究成果は、副腎皮質細胞に備わっている種々の生物活性の強度が雌雄で異なることを示唆する。そこで本研究では、明瞭な性差を示す副腎皮質を対象に、この性差を制御するメカニズムの解明を目的とし、本研究を推進した。

### 3. 研究の方法

#### 1、副腎皮質束状層細胞の単離方法の確立

副腎皮質はヒトでは3層、マウスでは2層の細胞層よりなる。このうち、束状層は主要成分であり、この層より糖質コルチコイドが産生される。そこで本研究では束状層細胞を対象とした。そのため、純度の高い束状層細胞を単離することが必要であった。実験には、副腎皮質の細胞が GFP によってラベルされたトランスジェニックマウスを用いた。このマウスの副腎より、束状層の領域を顕微鏡下に調製した。調製したサンプルには他の副腎皮質の層は含まれていなかったが、血管内皮やマクロファージが含まれていたため、さらに FACS を行うことでほぼ 100% の純度の副腎皮質束状層細胞を調製した。純度の評価は各種細胞のマーカー遺伝子の発現を RT-PCR にて検討した。

#### 2、遺伝子発現の検討

上記の方法によって、雌雄の副腎、性腺を除去した雌雄の副腎、性腺除去後に男性ホルモンまたは女性ホルモン処理した雌雄の副腎より束状層細胞を調製した。得られた束状層細胞における遺伝子発現を調べるためにトランスクリプトームを取得した。これらのトランスクリプトームを種々のアプリケーションを用いて解析した。

また、Ad4BP の副腎皮質における機能の重要性はこれまでの研究から明らかであることから、全ゲノムを対象に CUT&RUN 法を用い、Ad4BP の集積領域を決定した。

### 4. 研究成果

先にも述べたが、雌雄を比較するとメスの細胞がオスの2倍近い RNA 量を有していることがわかっていたので、本研究では全てのサンプルにおいて同じ数の細胞を用いたトランスクリプトームを取得した。その結果、雌雄を比較すると、ほぼ全ての遺伝子発現がメスでオスの2倍ほどに同化していることが明らかになった。オスにおけるこの様な発現は精巣摘出で上昇し、さらに男性ホルモン投与によってオスメスともに遺伝子発現の低下が認められた。そこで、平均以上に雄での低下が認められる遺伝子を抽出し、これらの遺伝子がどのような細胞内イベント、活性に関与するかを調べたところ、解糖系、TCA サイクル、酸化的リン酸化、脂肪酸酸化、などの細胞内エネルギー代謝系やステロイド合成系への関与が示唆された。実際に、副腎皮質束状層を用い、解糖系、酸化的リン酸化活性を雌雄で比較したところメスにおける活性が高かった。同様に、血中の糖質コルチコイド量もメスの方が高値を示した。

Ad4BP の標的遺伝子を CUT&RUN 法で決定したところ、束状層細胞において発現する遺伝子のおよそ半数の遺伝子領域に Ad4BP の集積が認められた。また、Ad4BP 遺伝子のヘテロ破壊マウスの副腎皮質束状層細胞ではほぼ全ての遺伝子の発現が大幅に低下していた。この結果は、副腎皮質で発現するほぼ全ての遺伝子が Ad4BP の直接的または間接的制御を受けていることを示唆した。Ad4BP の遺伝子破壊マウスからは副腎が消失する。本研究では Ad4BP が多くの遺伝子発現を制御することで、細胞内エネルギーを含む各種の代謝活性の制御に関わることが示されたが、この様な広範かつ重要な活性制御に関わることが、遺伝子破壊による副腎の消失という結果を導くものと推測された。

この様な副腎皮質の性差が身体全体に及ぼす影響について検討した。先にも述べたが、副腎皮質束状層は糖質コルチコイドの供給源として知られる。また、糖質コルチコイドは強力な異化作用を発揮し、骨格筋に対してはサイズの減少を引き起こすことが知られている。一般に、男性ホルモンは骨格筋サイズを増加させるが、この男性ホルモンの作用は骨格筋に対する直接的な作用ではないことが示されている。そこで、本研究では男性ホルモンがオスにおける副腎皮質のサイズの低下、ならびに糖質コルチコイドの低下を招き、最終的にオスで大きな骨格筋の形成、維持に關与する可能性を考えた。実験では、Ad4BP 遺伝子のヘテロ破壊マウスを用い、骨格筋の筋繊維のサイズを評価した。その結果、Ad4BP 遺伝子のヘテロ破壊マウスでは筋繊維のサイズが減少していた。この結果は、副腎皮質の活性の調節を介して男性ホルモンが骨格筋の性差の誘導に關与することを示した初めての例であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Christianto Antonius, Baba Takashi, Takahashi Fumiya, Inui Kai, Inoue Miki, Suyama Mikita, Ono Yusuke, Ohkawa Yasuyuki, Morohashi Ken-ichirou	4. 巻 4
2. 論文標題 Sex differences in metabolic pathways are regulated by Pfkfb3 and Pdk4 expression in rodent muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02790-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshino Takashi, Suzuki Takahiro, Nagamatsu Go, Yabukami Haruka, Ikegaya Mika, Kishima Mami, Kita Haruka, Imamura Takuya, Nakashima Kinichi, Nishinakamura Ryuichi, Tachibana Makoto, Inoue Miki, Shima Yuichi, Morohashi Ken-ichirou, Hayashi Katsuhiko	4. 巻 373
2. 論文標題 Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eabe0237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abe0237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Hiroki, Nishimura Mayu, Uehara Masaaki, Kuribara-Souta Akiko, Yamamoto Motohisa, Yoshikawa Noritada, Morohashi Ken-ichirou, Tanaka Hirotoishi	4. 巻 320
2. 論文標題 Eicosapentaenoic acid changes muscle transcriptome and intervenes in aging-related fiber type transition in male mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E346 ~ E358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpendo.00184.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yanai Shogo, Baba Takashi, Inui Kai, Miyabayashi Kanako, Han Soyun, Inoue Miki, Takahashi Fumiya, Kanai Yoshiakira, Ohkawa Yasuyuki, Choi Man Ho, Morohashi Ken-ichirou	4. 巻 11
2. 論文標題 Gene expression and functional abnormalities in XX/Sry Leydig cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80741-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ken-ichirou Morohashi, Miki Inoue, Takashi Baba	4. 巻 35
2. 論文標題 Coordination of multiple cellular processes by NR5A1/Nr5a1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 756-764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3803/EnM.2020.402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 諸橋憲一郎
2. 発表標題 Ad4BPはステロイド産生細胞のマスター遺伝子か?
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Antonius Christianto, Takashi Baba, Fumiya Takahashi, Kai Inui, Miki Inoue, Mikita Suyama, Yusuke Ono, Yasuyuki Ohkawa, Morohashi Ken-ichirou
2. 発表標題 Male-preferred glycolysis and female-preferred fatty acid utilization of skeletal muscle bestowed by Pfkfb3 and Pdk4
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 翔吾、馬場 崇、井上 実紀、高橋 史也、寺尾 美穂、高田 修治、石渡 啓介、中林 一彦、秦 健一郎、金井 克晃、諸橋 憲一郎
2. 発表標題 Y染色体にコードされる脱メチル化酵素UTYは精巢ライディッヒ細胞における初期応答系遺伝子群の発現をヒストン脱メチル化活性を介さずに制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Miki Inoue, Takashi Baba, Fumiya Takahashi, Miho Terao, Shuji Takada, Ken-ichirou Morohashi
2. 発表標題	TMSB10 regulates fetal Leydig cell differentiation by activation of Hedgehog signal.
3. 学会等名	第44回日本分子生物学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	高橋史也、馬場崇、Christianto Antonius、柳井翔吾、石渡 啓介、中林 一彦、秦 健一郎、諸橋憲一郎
2. 発表標題	Ad4BP/SF-1の発現量の性差によって誘導される細胞内代謝の性差
3. 学会等名	第44回日本分子生物学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	諸橋憲一郎、馬場崇
2. 発表標題	細胞の性
3. 学会等名	第93回日本内分泌学会（招待講演）
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	馬場崇、井上実紀、諸橋憲一郎
2. 発表標題	ライディッヒ細胞の発生分化
3. 学会等名	第93回日本内分泌学会（招待講演）
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 柳井翔吾、馬場崇、宮林香奈子、Soyun Han、井上実紀、高橋史也、金井克晃、大川恭行、Man-Ho Choi、諸橋恵一郎
2. 発表標題 XX/Sryオスマウスのライディッヒ細胞における遺伝子発現と精巢内ステロイドホルモン量の網羅的解析
3. 学会等名 第28回ステロイドホルモン学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yanai S, Baba T, Inui K, Miyabayashi K, Han S, Inoue M, Takahashi F, Kanai Y, Ohkawa Y, Choi MH, Morohashi KI.
2. 発表標題 Sex chromosome composition affects gene expression and function in Leydig cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 大学院医学研究院 分子生命科学系部門 性差生物学講座（分子生物学）ホームページ <a href="https://www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutu/">https://www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutu/</a> 科研費 新学術領域研究 平成29-33年度 性スペクトラムー連続する表現型としての雌雄ーホームページ <a href="http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sexspectrum/">http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sexspectrum/</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	KIST			