

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590219

研究課題名（和文） 生殖系発生・性分化の分子機構-生殖腺特異的遺伝子破壊マウスの解析

研究課題名（英文） Gonadal development and sex differentiation of the gonad specific SF-1 knockout mouse

研究代表者 池田 やよい（ IKEDA YAYOI ）

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：00202903

研究成果の概要（和文）： Cre-loxP 系により生殖腺特異的に核内受容体 SF-1 遺伝子破壊マウスを作製し、精巣と卵巣の生後発生を解析した。精巣では、生後 14 日から精細管の形態異常、セルトリ細胞の分化の遅延、アポトーシス・細胞増殖の異常が認められ、卵巣では、卵巣索形成、卵胞形成の異常が示唆された。また、内分泌攪乱因子 DES 暴露実験の結果、胎生後期から生後 14 日の卵巣で卵巣索形成の遅れと顆粒膜細胞の減少が認められた。

研究成果の概要（英文）：

The orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 (SF-1) plays key roles in gonadal development. This study investigates the postnatal development of the testes and the ovaries of a gonad-specific SF-1 knockout (KO) mouse, in which SF-1 was specifically inactivated. In the KO testes, we detected abnormalities in the seminiferous tubule morphology, the positive cell number for SF-1 and Sertoli cell markers, apoptosis, and cell proliferation, at postnatal day 14 (P14) and P21. The KO ovaries exhibited morphologically abnormal ovarian cord and decreased SF-1 immunoreactivity as early as P0. We further investigated testes and ovaries that were exposed to the endocrine disruptor DES during embryonic development, showing that the DES-exposed ovary exhibited morphological abnormalities accompanied with decreased SF-1 expression, during the first 2 weeks after birth. These results suggest SF-1 is essential for normal formation of the seminiferous tubule and the ovarian cord during postnatal development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：細胞・組織、発生・分化、発現制御

1. 研究開始当初の背景

我々は、核内受容体 Steroidogenic factor 1 (SF-1) を発見し、その生殖内分泌系における

役割を研究している。SF-1 遺伝子を破壊したマウス(オリジナル SF-1KO)を作製、解析した結果、生殖内分泌調節系器官の異常を示す

ことから、SF-1 が生殖内分泌系制御の鍵となる因子であることを明らかにしている。また、副腎・生殖腺が発生の初期にアポトーシスにより消失することを示し、SF-1 が細胞増殖制御にも関与することを示唆している。我々はさらにコンディショナルノックアウトの手法を用いて生殖腺特異的 SF-1 遺伝子破壊マウスを新規に作製し、解析を行なっている。これまでに、生殖腺特異的 SF-1 マウスが、雄では下降不全による停留辜丸、雌では卵巣の卵胞異常を示し、雌雄ともに不妊となることを明らかにしている。本研究では、これら生殖異常の成因を調べるため、生殖腺特異的 SF-1KO の発生過程を詳細に解析する。さらに、これら生殖異常が SF-1 破壊に起因することを確認する方法として、SF-1 遺伝子の再導入による精巣下降の誘導実験という発想に至った。また我々は、SF-1 が生殖系の内分泌攪乱に関与する可能性を示唆してきた。本研究で行う内分泌攪乱実験は、これまでと同様の方法を生殖腺特異的 SF-1KO に応用することにより、生殖系内分泌攪乱と SF-1 の関連性を証明するという発想に基づくものである。

## 2. 研究の目的

生殖系は、形態的に男女で異なる組織・器官から構成される。我々は、生殖系の発生・性分化の分子機構の解明を目標として、その制御に働く核内受容体 SF-1 に着目して研究を進めている。本研究は、SF-1 遺伝子を生殖腺特異的に破壊したマウスを用いる点に特色があり、このマウスの生殖系の(1)発生、(2)性分化、(3)細胞増殖の異常を解析し、(4)標的遺伝子を探索する。また、この遺伝子破壊マウスの(5)精巣下降不全をレスキューする試みと、(6)生殖系の内分泌攪乱実験を行い、SF-1 の重要性を *in vivo* で証明する。本研究は、ヒトの生殖器異常、性同一性障害、生殖器腫瘍、内分泌攪乱の原因究明と治療のための基礎研究として意義がある。

## 3. 研究の方法

H21 年度は、生殖腺特異的 SF-1KO マウスを作製し、生殖系発生、性分化、細胞増殖・アポトーシスについて解析を行う。方法は、形態学的観察に加え、マーカー遺伝子の発現を免疫組織化学法、*in situ* ハイブリダイゼーション法により定性的に、リアルタイム RT-PCR 法により定量的に解析する。H22 年度は、前年度の成果から得られた候補遺伝子の中から、DNA マイクロアレイにより SF-1 の標的遺伝子の探索を行う。また、アデノウイルスを用いた精巣下降不全レスキュー実験を行い、SF-1 の重要性を証明する。H23 年度は、さらに過剰エストロゲン投与実験による、生殖系の内分泌攪乱実験を行う。代表者 池田やよ

いは試料作製、解析のほとんど、及び研究総括を行う。分担者 池田正明は、細胞増殖・アポトーシスの解析を担当する。

## 4. 研究成果

### (1) 生殖腺特異的 SF-1KO マウスの解析

生殖腺における SF-1 の役割を詳細に調べるため、Cre-loxP 系を用いて時期・生殖腺特異的に SF-1 を破壊できるマウス (SF-1 flox/-; Amhr2cre/+マウス) を用いて、生殖腺の組織学的解析を行った。先行研究では胎生期と成獣期における SF-1 flox/-; Amhr2cre/+マウスの解析が行われている。本研究では出生後の生殖腺における SF-1 の役割を明らかにする目的で、SF-1 flox/-; Amhr2cre/+マウスの解析を行い、精巣、卵巣のそれぞれについて以下の結果が得られた。

### ①精巣の解析結果

SF-1 flox/-; Amhr2cre/+マウスの精巣では生後 14 日 (P14) 以降から組織学的異常が認められた。組織学的異常として、精細管内で生殖細胞の配列の乱れ、セルトリ細胞の空胞化、巨核細胞が観察された。また、出生直後からセルトリ細胞における SF-1 陽性細胞の数が野生型マウスに比べて顕著に減少しており (図 1)、セルトリ細胞分化マーカーを用いた免疫染色でもマーカーを発現する細胞数が減少していることを認め、セルトリ細胞の分化に異常の起こっていることが示唆された。TUNEL 染色を用いてプログラム細胞死を調べたところ、P14、P21 の精巣において正常マウスに比べて TUNEL 陽性細胞の数が多く、アポトーシスの亢進が起こっていることが示唆された (図 2)。一方で、SF-1 flox/-; Amhr2cre/+マウスのライディッチ細胞における SF-1 陽性細胞の発現は野生型マウスと明らかな差が確認されず、ライディッチ細胞マーカーである P450SCC の発現でも同様の結果を確認した。細胞増殖マーカーとして PCNA の発現、および BrdU の取り込みを調べた結果からは、P21 の SF-1 flox/-; Amhr2cre/+マウスのライディッチ細胞に異常な増殖が起こっていることが示唆された。以上の結果から、SF-1 が生後の精巣発生過程において、セルトリ細胞の分化とライディッチ細胞の増殖に重要な役割をもつことが明らかとなった。

### ②卵巣の解析結果

組織学的解析では、SF-1 flox/-; Amhr2cre/+マウス卵巣において、出生直後からすでに卵巣索の形成不全がみられ、P7 以降では野生型マウスに比べて卵巣の大きさが小さく、卵胞の数が少ないという異常が認められた。また P7 では原始卵胞の数が少なく、P21 では正常に比べて原始卵胞の数が多く二次卵胞の数

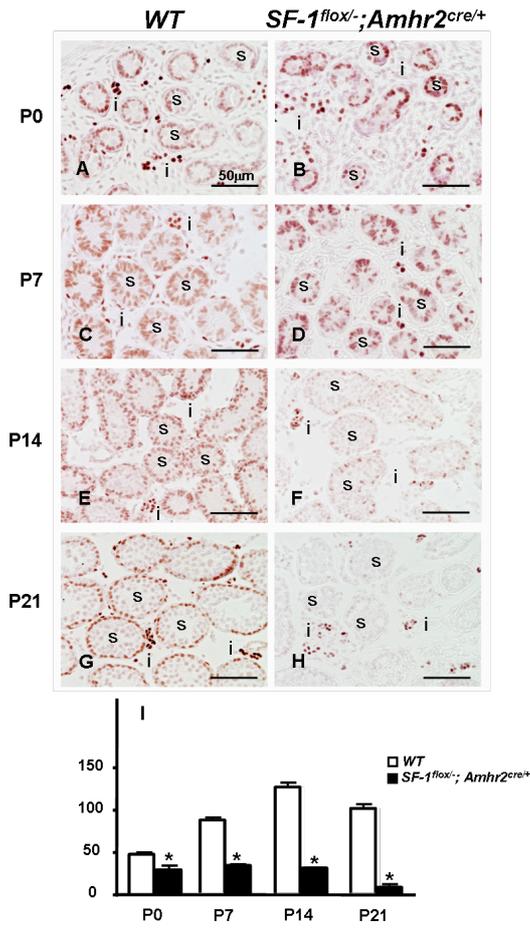


図1 生殖腺特異的 SF-1 破壊マウス精巣の生後発達過程での SF-1 の発現

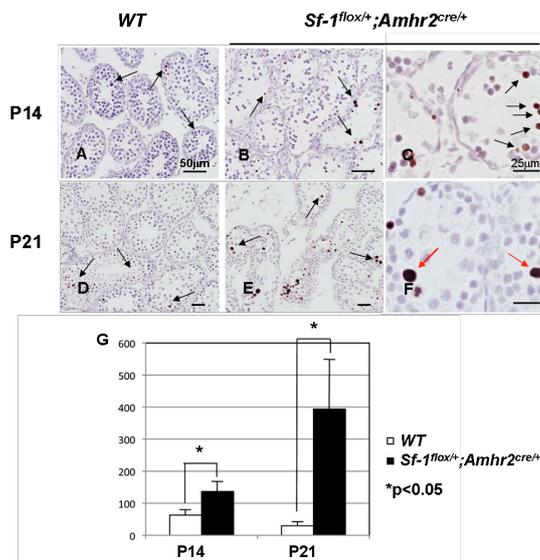


図2 生殖腺特異的 SF-1 破壊マウス精巣の生後発達過程でのアポトーシス

が少ないことがわかった (図3)。免疫組織学的解析結果から、P7の卵巣で顆粒膜細胞と夾膜細胞における SF-1 陽性細胞の発現が野生型マウスに比べて少なくなっていた。P14については、顆粒膜細胞マーカー因子、夾膜細胞マーカー因子を発現が野生型と比べて減少する傾向を認めたものの、因子ごとに結果が異なるため更なる解析が必要である。これらの結果から、SF-1 が胎生期から生後の卵巣分化に関わっていることが示唆された。

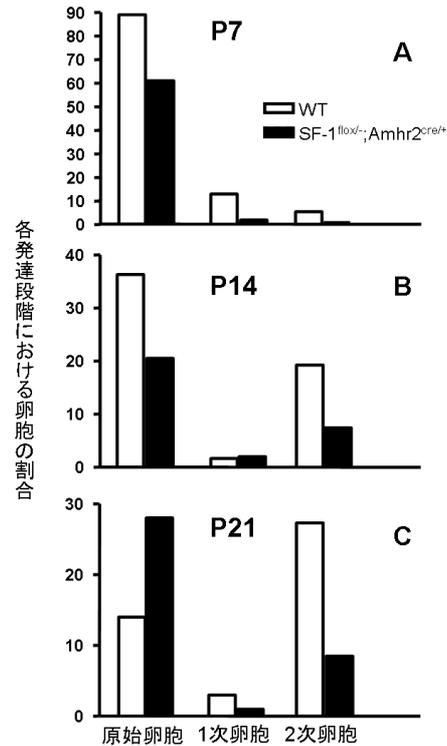


図3 生殖腺特異的 SF-1 破壊マウス卵巣の生後発達過程での卵胞形成

(2) SF-1 と内分泌攪乱の分子機構の関連について

内分泌攪乱物質 DES による生殖腺の発達異常の過程での SF-1 の関わりを明らかにするために、胎仔期からの曝露実験を行い、その精巣や卵巣での発生過程を組織学的観点から解析した。先行研究では、胎齢初期に DES 曝露されたマウスの精巣では SF-1 を初めとする精巣分化マーカー因子の発現が、対照群に比べて減少していた。しかし、卵巣分化マーカー因子の発現は対照群と比べて明らかな差はなく、体細胞における増殖細胞の数が正常と比べて多いことを報告している。本研究では胎仔マウスへの DES 曝露が胎齢後期から出生後に及ぼす影響を調べた。本研究の結果から、DES 曝露後の精巣における精巣分化マーカー因子の発現は、対照群と比べて明らかな差はみられなかった。一方で、DES 曝露後の卵巣では対照群と比べると、胎齢後期から

卵巣索の形成に遅れがみられ、卵胞の数が少なかった(図4)。また、P7ではSF-1の発現が対照群と比べて減少していた。顆粒膜細胞マーカー因子の発現については、陽性細胞数がP7のDES群で対照群と比べて減少していたが、P14、P21では明らかな差は認められなかった。また、夾膜細胞マーカー因子の発現は対照群と比べて明らかな差が認められなかった。これらの結果から、胎生期にDESを曝露されたマウスは卵巣の分化の過程において出生前から顕著な異常が現れることが明らかとなった。

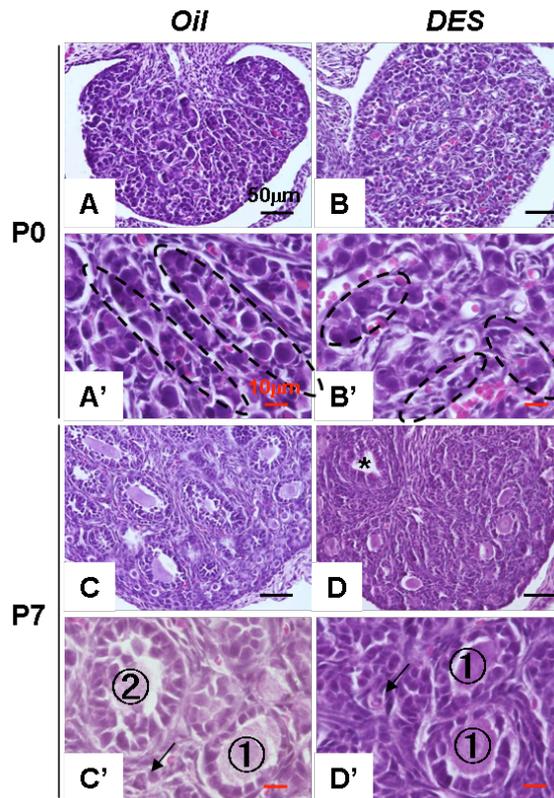


図4 胎生期にDES曝露された卵巣における卵巣索の形成異常

#### 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6件)

- ① Kato T, Esaki M, Matsuzawa A, Ikeda Y: NE5A1 is required for functional maturation of Sertoli cells during postnatal development, *Reproduction*, 143, 査読有, 2012, 663-672
- ② Ma, T, Yamada S, Ichwan SJA, Ohtani K, Iseki S, Otsu M, Ikeda MA, Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46

phosphorylation, *Biochem Biophys*, 417, 査読有, 2012, 931-937

- ③ Lestari W, Ichwan SJA, Otsu M, Yamada S, Iseki S, Shimizu S, Ikeda MA, Cooperation between ARID3A and p53 in the transcriptional activation of p21WAF1 in response to DNA damage, *Biochem Biophys Res Commun*, 417, 査読有, 2012, 710-716
- ④ Ikeda Y, Matsunaga Y, Takiguchi M, Ikeda MA, Expression of cyclin E in postmitotic neurons during development and in the adult mouse brain, *Gene Expr Patterns*, 11, 査読有, 2011, 64-71
- ⑤ Suda N, Shibata H, Kurihara I, Ikeda Y, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Nakagawa K, Oya M, Murai M, Rainey WE, Saruta T, Itoh H, Coactivation of SF-1-mediated transcription of steroidogenic enzymes by Ubc9 and PIAS1, *Endocrinology*, 152, 査読有, 2011, 2266-2277
- ⑥ Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, Ikeda MA, Essential Role of Caspase-8 in p53/p73-Dependent Apoptosis Induced by Etoposide in Head and Neck Carcinoma Cells, *Molecular Cancer*, 10, 査読有, 2011, 95

[学会発表] (計20件)

- ① 池田やよい、加藤朋子、生殖腺特異的SF-1ノックアウトマウスの精巣におけるセルトリ細胞の分化異常、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012年3月26-28日、甲府
- ② Ma T, Yamada S, Ichwan SJA, Iseki S, Ohtani K, Otsu M, Ikeda MA, Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation, 3rd Cancer Targets and Therapeutics, February 27-28, 2012, Las Vegas
- ③ Saadat KASM, Pratama E, Ohtani K, Ikeda MA, Role of ARID3A and ARID3B in Cell Growth and E2F-target gene expression, 2nd Heidelberg Forum for Young Life Scientists, February 23-24 2012, Heidelberg
- ④ Ma T, Yamada S, Ichwan SJA, Iseki S, Ohtani K, Otsu M, Ikeda MA, Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation, 2nd Heidelberg Forum for Young Life Scientists, February 23-24, 2012, Heidelberg

- ⑤ Ma T, Yamada S, Ichwan SJA, Ohtani K, Otsu M, Ikeda MA, Inability of Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, 横浜
- ⑥ Saadat KASM, Pratama E, Ohtani K, Ikeda MA, Role of ARID3A and ARID3B in Cell Growth and E2F-Target Gene Expression, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, 横浜
- ⑦ Lestari W, Ichwan SJA, Otsu M, Yamada S, Shimizu S, Ikeda MA, Role of ARID3A in p53-mediated Transcriptional Transactivation of p21Waf1/Cip1, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, 横浜
- ⑧ Wimardhani YS, Suniarti DF, Freisleben HJ, Wanandi SI, Ikeda MA, Low Molecular Weight Chitosan: Mechanism of Antitumor Activity against Oral Cancer Cells, FDI-IDA Joint Meeting, November 12-13, 2011, Semarang
- ⑨ Wimardhani YS, Suniarti DF, Freisleben HJ, Wanandi SI, Ikeda MA, Low Molecular Weight Chitosan: Antitumor Efficiency against Oral Cancer Cells, The 25th International Association for Dental Research South East Asian Regional Meeting, October 28-30, 2011, Singapore
- ⑩ Ikeda Y, Kato T, Postnatal development of the gonad specific SF-1 KO mouse testis, The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting, June 4-7, 2011, Boston
- ⑪ 加藤朋子、池田やよい、生殖腺特異的 SF-1 ノックアウトマウスにおける生殖腺の組織学的解析、第84回日本内分泌学会学術総会、2011年4月21-23日、神戸
- ⑫ Ikeda Y, Takiguchi T, Ikeda MA, Effects of voluntary physical activity on cyclin E expression in the subgranular layer of the mouse hippocampal dentate gyrus, Neuroscience 2010 (40<sup>th</sup> Annual Meeting), November 13-17, 2010, San Diego
- ⑬ 池田やよい、滝口雅人、松永裕子、池田正明、マウス海馬歯状回顆粒下層における細胞増殖因子サイクリン E の発現、Neuro2010(第33回日本神経科学大会/第53回日本神経化学学会大会/第20回日本神経回路学会大会合同大会)、2010年9月2-4日、神戸
- ⑭ Ikeda Y, Kato T, Takiguchi M, Effects of gestational diethylstilbestrol treatment on gonadal differentiation, 14th International Congress of Endocrinology, March 26-30, 2010, Kyoto
- ⑮ Ikeda Y, Takiguchi M, Ikeda MA, Cyclin E expression in early neural stem cells during adult hippocampal neurogenesis, Keystone Symposia, February 15-20, 2010, Keystone
- ⑯ Ikeda Y, Matsunaga Y, Ikeda MA, Expression of cyclin E in the cerebral and cerebellar cortices, 第32回日本神経科学大会, 2009年9月16-18日, 名古屋
- ⑰ Ikeda Y, Pelusi C, Parker KL, Abnormal ovarian development by granulosa cell-specific ablation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1, XXXVI International Congress of Physiological Sciences, July 27- August 1, 2009, Kyoto
- ⑱ 池田やよい、胎生期 DES 暴露による生殖腺発生初期への影響、日本解剖学会関東支部 第19回懇話会・シンポジウム、2009年6月27日、千葉
- ⑲ 池田やよい、生殖腺発生に働く転写調節因子へのエストロゲン暴露の影響、第84回日本生理学会大会、2009年4月23-25日、大阪
- ⑳ 池田やよい、卵胞細胞特異的 SF-1 ノックアウトマウスの卵巣分化、第84回日本生理学会大会、2009年4月23-25日、大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 やよい (IKEDA YAYOI)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号：00202903

### (2) 研究分担者

池田 正明 (IKEDA MASA AKI)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・  
准教授  
研究者番号：20193211

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：