

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590339

研究課題名(和文) 胎仔型ライディッヒ細胞の新たな生物学的機能の解明

研究課題名(英文) Identification of novel biological functions of fetal Leydig cells

研究代表者

嶋 雄一 (SHIMA, YUICHI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80425420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ライディッヒ細胞は、男性ホルモンの産生を通じて、全身のオス化を担う重要な細胞である。ほ乳類精巣中には、胎仔型ライディッヒ細胞と成獣型ライディッヒ細胞の2種類のライディッヒ細胞が存在することが知られていたが、両者の機能的な差異は明らかではなかった。特に胎仔型ライディッヒ細胞に関しては、その起源や機能等、多くのことが不明であった。

本研究では、胎仔型ライディッヒ細胞と成獣型ライディッヒ細胞では、遺伝子の発現や産生する男性ホルモンが異なることを明らかにした。また、胎仔型ライディッヒ細胞でのみ遺伝子を破壊する実験により、これまで知られていなかった胎仔型ライディッヒ細胞の新たな機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Leydig cells synthesize androgens, and thus they are essential for masculinization of the whole body. It is known that there are two type of Leydig cells, fetal leydig cells and adult Leydig cells, in the mammalian testis. However, functional differences between these two cell populations were not clarified yet. Moreover, the origin and functional importance of fetal Leydig cells were not defined at all.

In this study, we identified that gene expression profiles are quite different between two types of Leydig cells, and they produce different types of androgens. In addition, we have identified novel functions of fetal Leydig cells by disrupting a gene specifically in the fetal Leydig cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ライディッヒ細胞 トランスクリプトーム 男性ホルモン ノックアウトマウス 核内受容体 分化

1. 研究開始当初の背景

ライディッヒ細胞は精巣の間質に存在し、男性ホルモンの産生を通じて、個体の生殖行動や性差構築に必須の役割を担う重要な細胞である。興味深いことに、哺乳類においては、胎仔期に存在する胎仔型ライディッヒ細胞と、出生後に出現する成獣型ライディッヒ細胞の2種類が存在することが明らかにされている。これまで、両者は主にその存在時期と形態学的特徴により区別されてきたが、機能的差異や発生学的起源は不明であった。また、特に胎仔型ライディッヒ細胞に関しては、その生物学的な機能や存在意義も全く解明されていなかった。

我々は、核内受容体型の転写因子 Ad4BP/SF-1 の発現制御領域を解析し、胎仔型ライディッヒ細胞特異的なエンハンサーを同定した。このエンハンサーを用いて EGFP 発現マウスを作成することにより、胎仔型ライディッヒ細胞を特異的に標識し高純度に回収することが初めて可能となった。そこでこのマウスを用いた解析を行ったところ、① これまで出生後に消失すると考えられてきた胎仔型ライディッヒ細胞が、出生後も一定数存在し続けること、② 胎仔型ライディッヒ細胞と成獣型ライディッヒ細胞は起源の異なる細胞集団であること、③ 胎仔型ライディッヒ細胞には、テストステロン合成の最終反応を担う酵素が発現していないこと、を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景をふまえ、以下の3点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 各発生段階における胎仔型ライディッヒ細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにする。
- (2) 胎仔型ライディッヒ細胞におけるテストステロン合成酵素の発現を解析するとともに、胎仔型ライディッヒ細胞で合成される男性ホルモンのレパートリーを明らかにする。
- (3) ジフテリア毒素を用いて胎仔型ライディッヒ細胞を特異的に破壊することにより、生体における胎仔型ライディッヒ細胞の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、上記の3つの目的に対し、それぞれ以下の方法を用いた。

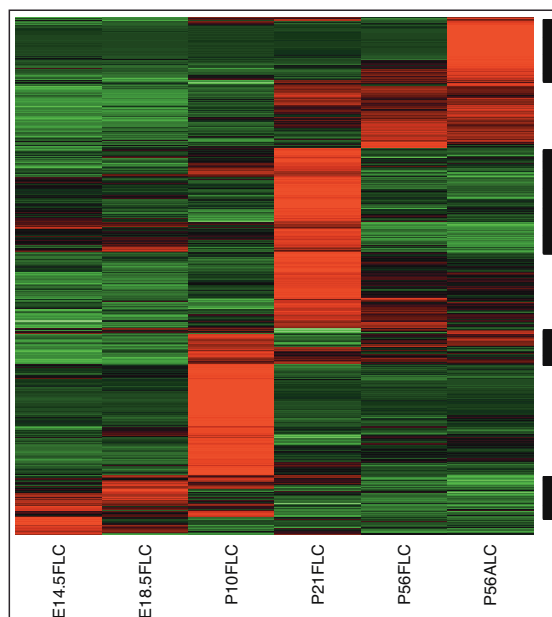
- (1) 胎齢 14.5 日、18.5 日、出生後 10 日、21 日、56 日の各時点でセルソーティングにより胎仔型ライディッヒ細胞を回収し、RNA-sequence 解析により、遺伝子発現プロファイルを明らかにした。
- (2) RNA-sequence 解析とあわせ、各時点におけるテストステロン合成酵素の発現を定量的 RT-PCR により明らかにした。

また、胎仔期の胎仔型ライディッヒ細胞が合成する男性ホルモンのレパートリーを明らかにした。

- (3) 胎仔型ライディッヒ細胞特異的にジフテリア毒素の受容体を発現するマウスを作成し、毒素投与による細胞破壊を試みた。しかし、下に記述するように細胞破壊の効率が低かったため、代替方法として、胎仔型ライディッヒ細胞特異的に Ad4BP/SF-1 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作成し解析した。

4. 研究成果

- (1) 胎仔型ライディッヒ細胞における遺伝子発現は、発生段階にそって変化していた (図)。RNA-sequence 解析の結果をクラスター解析に供することにより、胎仔期に高発現する遺伝子、出生後早期のみを高発現する遺伝子、成獣期に高発現する遺伝子が明らかとなった。組織切片を用いた in situ hybridization 解析により、抽出された遺伝子が実際に高発現していることを確認した。以上の成果は現在投稿準備中である。これに加え、出生後早期に高発現する遺伝子群の中に、「バックドア経路」と呼ばれる男性ホルモン合成経路に関与する遺伝子が含まれていることから、この時期の胎仔型ライディッヒ細胞がテストステロン以外の様々な男性ホルモンを合成している可能性が示唆された。今後、これらの男性ホルモンの同定を進めたいと考えている。ほ乳類における、これらのテストステロン以外の男性ホルモンの生理作用は未だ明らかではない。



図：胎仔型ライディッヒ細胞における遺伝子発現パターンの変化。胎仔型ライディッヒ細胞における遺伝子発現プロファイルは胎齢 14.5 日 (E14.5FLC) から成獣 (8 週齢、P56FLC) まで検討した。また同時に成獣型ライディッヒ細胞 (8 週齢、P56ALC) の遺伝子発現も検討した。胎仔型ライディッヒ細胞の遺伝子発現は出生後早期 (生後 10 日、P10FLC) から思春期前期 (生後 21 日、P21FLC) にかけて大きく変動していた。

(2) 胎仔期の胎仔型ライディッシュ細胞における遺伝子発現解析の結果、テストステロン合成の最終反応を担う酵素が発現していなかった。このことから、胎仔期の胎仔型ライディッシュ細胞がテストステロンを合成できないと予想し、早稲田大学の筒井和義教授との共同研究により、胎仔型ライディッシュ細胞が合成する男性ホルモンのレパートリーを液体クロマトグラフィーにより解析した。その結果、① 胎仔型ライディッシュ細胞はテストステロンの前駆物質であるアンドロステンジオンを合成する、② 合成されたアンドロステンジオンがセルトリ細胞に受け渡されて最終的にテストステロンへ変換される、③ 成獣型ライディッシュ細胞は単独でテストステロンを合成することが可能である、ことを明らかにした。以上の結果は、内分泌系の国際誌である *Molecular Endocrinology* 誌に掲載された (論文リスト⑤)

(3) ジフテリア毒素受容体を胎仔型ライディッシュ細胞特異的に発現するマウスを作出し、毒素を投与することにより胎仔型ライディッシュ細胞を破壊することを試みた。しかし、受容体の発現強度が比較的弱いマウスしか得られず、細胞破壊の効率が低かった。そのため、毒素投与後も明らかな異常が認められなかった。そこで細胞破壊の代替方法として、ライディッシュ細胞の機能分化に必須の因子である Ad4BP/SF-1 を胎仔型ライディッシュ細胞特異的に破壊したノックアウトマウスを作出し解析した。その結果、ノックアウトマウスにおいては、胎仔期のテストステロン合成が消失した。一方、出生後の精巣においては、成獣型ライディッシュ細胞が出現はするものの機能的に成熟できないことから、胎仔型ライディッシュ細胞が成獣型ライディッシュ細胞の機能分化に関与する可能性が示唆された。また、精巣間質の高度の線維化と、精子形成の異常が認められたことから、胎仔型ライディッシュ細胞が精巣間質の正常な環境の維持や、精細管の形成、精子形成にも関与することが示唆された。以上の結果は現在投稿準備中である。

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7件)

- ① Hoivik EA, Bjanesoy TE, Mai O, Okamoto S, Minokoshi Y, Shima Y, Morohashi KI, Boehm U, Bakke M, DNA Methylation of Intronic Enhancers Directs Tissue-Specific Expression of Steroidogenic Factor

1/Adrenal 4 Binding Protein (SF-1/Ad4BP). *Endocrinology*. 152: 2100-12, 2011 doi: 10.1210/en.2010-1305.

- ② Gardiner JR, Shima Y, Morohashi KI, Swain A, SF-1 expression during adrenal development and tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 351: 12-8, 2011 doi: 10.1016/j.mce.2011.10.007.

- ③ Shima Y, Miyabayashi K, Baba T, Otake H, Katsura Y, Oka S, Zubair M, Morohashi KI, Identification of an enhancer in the Ad4BP/SF-1 gene specific for fetal Leydig cells. *Endocrinology*. 153: 417-25, 2012 doi: 10.1210/en.2011-1407.

- ④ Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T, Owaki A, Baba T, Shima Y, Kidokoro T, Kanai Y, Schedl A, Wilhelm D, Koopman P, Okuno Y, Morohashi K, Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice. *Endocrinology*. 153: 913-24, 2012 doi: 10.1210/en.2011-1055.

- ⑤ Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, Matsuzaki S, Shishido Y, Akiyama H, Tachibana T, Tsutsui K, Morohashi KI, Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Mol Endocrinol*. 27: 63-73, 2013 doi: 10.1210/me.2012-1256.

- ⑥ Miyabayashi K, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Kitamura K, *Morohashi K, Aristaless related homeobox gene Arx, is implicated in mouse fetal Leydig cell differentiation possibly through expressing in the progenitor cells. *PLoS ONE*. 8: e68050, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0068050.

- ⑦ 嶋雄一、諸橋憲一郎「性ホルモン産生細胞の性差」*細胞工学* 32 巻 2 号 158-163、2013

[学会発表] (計16件)

- ① 嶋雄一、諸橋憲一郎「胎仔型ライディッシュ細胞の生理学的機能の解明」第84回日本内分泌学会学術集会

2011年4月21日 神戸国際展示場

- ② **嶋雄一**、宮林香奈子、馬場崇、大竹博之、諸橋憲一郎
「胎仔型ライディッヒ細胞特異的 Ad4BP/SF-1 ノックアウトマウスの解析」(ポスター発表)
文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第3回領域会議 2011年8月31日~9月2日 国民宿舎虹の松原ホテル(佐賀県)
- ③ **嶋雄一**、馬場崇、宮林香奈子、大竹博之、諸橋憲一郎
「胎仔型ライディッヒ細胞特異的 Ad4BP/SF-1 遺伝子ノックアウトマウスの解析」
第19回日本ステロイドホルモン学会学術集会
2011年11月26日 福岡大学病院メディアホール
- ④ **嶋雄一**、宮林香奈子、馬場崇、大竹博之、諸橋憲一郎
「胎仔型ライディッヒ細胞による精子形成幹細胞ニッチ形成機構の解明」(公募研究・口頭発表)
文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「配偶子幹細胞制御機構」第5回領域会議 2011年12月5日~7日 浜名湖かんざんじ荘(静岡県)
- ⑤ **嶋雄一**、宮林香奈子、馬場崇、大竹博之、鈴木堅太郎、山田源、諸橋憲一郎
「Functional characterization of fetal Leydig cells by cell-specific disruption of Ad4BP/SF-1 gene」
第34回日本分子生物学会年会 1T5a 再生・幹細胞・分化
2011年12月13日 パシフィコ横浜
- ⑥ **嶋雄一**、宮林香奈子、馬場崇、大竹博之、鈴木堅太郎、山田源、諸橋憲一郎
「Functional characterization of fetal Leydig cells by cell-specific disruption of Ad4BP/SF-1 gene」
第34回日本分子生物学会年会 1P-0223
2011年12月13日 パシフィコ横浜
- ⑦ **嶋雄一**、宮林香奈子、馬場崇、大竹博之、諸橋憲一郎
「胎仔型ライディッヒ細胞によるオス特異的性分化プロセスの内分泌的制御」(ポスター発表)
文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第4回領域会議
2012年10月15日~17日 和歌山マリーナシティロイヤルパインズホテル
- ⑧ **嶋雄一**、宮林香奈子、馬場崇、大竹博之、諸橋憲一郎
「胎仔型ライディッヒ細胞によるオス特異的性分化プロセスの内分泌的制御」(口頭発表)
文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「性差構築の分子基盤」若手研究会
2012年10月17日~18日 和歌山マリーナシティロイヤルパインズホテル
- ⑨ **嶋雄一**、宮林香奈子、原口省吾、馬場崇、大竹博之、筒井和義、諸橋憲一郎
「胎仔精巣におけるテストステロン合成経路の解明 -ライディッヒ細胞とセルトリ細胞の機能的連携-」
第17回日本生殖内分泌学会 学術集会(口頭発表)
2012年12月8日 東京ステーションカンファレンス
- ⑩ **嶋雄一**、宮林香奈子、原口省吾、鈴木堅太郎、馬場崇、大竹博之、筒井和義、諸橋憲一郎
「Male-specific sex differentiation regulated by fetal Leydig cells」
第35回日本分子生物学会年会 1W3I-2 (ワークショップ)
2012年12月11日 福岡国際会議場
- ⑪ **嶋雄一**、宮林香奈子、原口省吾、鈴木堅太郎、馬場崇、大竹博之、筒井和義、諸橋憲一郎
「Male-specific sex differentiation regulated by fetal Leydig cells」
第35回日本分子生物学会年会 1P-0486 (ポスター発表)
2012年12月11日 マリンメッセ福岡
- ⑫ **嶋雄一**、宮林香奈子、原口省吾、馬場崇、大竹博之、筒井和義、諸橋憲一郎
「胎仔精巣におけるテストステロン合成経路の解明」
第85回日本生化学会大会 3S02-2 (シンポジウム)
2012年12月16日 福岡国際会議場
- ⑬ **嶋雄一**
「胎仔型ライディッヒ細胞の運命と機能」(公募研究・口頭発表)
文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「配偶子幹細胞制御機構」第7回領域会議 2013年1月23日~24日 東京海洋大学
- ⑭ **嶋雄一**、宮林香奈子、馬場崇、大竹博之、諸橋憲一郎
「胎仔型ライディッヒ細胞の存在意義」
日本アンドロロジー学会第32回学術大

会 特別講演
2013年7月25日 大阪

- ⑮ **嶋雄一**、宮林香奈子、松崎佐和子、井上実紀、馬場崇、大竹博之、諸橋憲一郎
「胎仔型ライディッチ細胞の分化・脱分化に伴う遺伝子発現変化」(ポスター発表)
文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「性差構築の分子基盤」第5回領域会議
2013年9月5日～7日 国民宿舎 虹の松原ホテル (佐賀県唐津市)
- ⑯ **嶋雄一**、宮林香奈子、松崎佐和子、井上実紀、馬場崇、大竹博之、諸橋憲一郎
「胎仔型ライディッチ細胞の細胞運命と機能」
第18回日本生殖内分泌学会 学術集会
2013年12月7日 東京砂防会館別館 (シェーンバッハ・サボー) (口頭発表・学術奨励賞受賞)

[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

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋 雄一 (SHIMA Yuichi)

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・助教

研究者番号：80425420