

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591516

研究課題名(和文) Star欠損マウスのステロイドホルモン産生細胞におけるトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of steroidogenic cells in knockout mice lacking steroidogenic acute regulatory protein

研究代表者

石井 智弘 (Ishii, Tomohiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265867

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)：先天性リポイド副腎過形成症(StAR異常症)の病態を解明するために、マウスStarのプロモーター、エンハンサー下にeGFPを発現する野生型(N=7)、Star欠損マウス(N=4)の胎生17.5-18.5日の副腎からeGFP陽性細胞を集積し、マイクロアレイで遺伝子発現を解析した。Star欠損マウスでは、1,206および767遺伝子の発現が上昇および低下し、コレステロール排出、炎症応答・免疫応答に関する遺伝子発現が有意に上昇し、副腎皮質にマクロファージが著明に浸潤していた。StAR欠損状態の副腎皮質において、コレステロール排出および炎症反応・免疫応答の亢進を初めて同定した。

研究成果の概要(英文)：Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is responsible for congenital lipid adrenal hyperplasia (StAR deficiency). To delineate a specific pattern of gene expression associated with StAR deficiency, we analyzed the transcriptome of adrenocortical cells isolated by fluorescence-activated cell sorting at E17.5 or E18.5 from seven wild-type and four StAR knockout (Star<sup>-/-</sup>) mice with transgene targeting eGFP to StAR-expressing cell lineages. We identified that 1,206 and 767 genes were significantly up-regulated and down-regulated, respectively, and that genes involved in cholesterol efflux and inflammatory or immune response were significantly up-regulated in Star<sup>-/-</sup> mice. An increased number of macrophages were detected in the adrenal glands of Star<sup>-/-</sup> mice by immunohistochemistry. These results revealed the cholesterol efflux and the inflammatory or immune response as new pathophysiological hallmarks in the adrenocortical cells of Star<sup>-/-</sup> mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：StAR 先天性リポイド副腎過形成症 ノックアウトマウス 副腎皮質 ステロイドホルモン トランスクリプトーム マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) はすべてのステロイドホルモン生合成においてミトコンドリア外膜から内膜へのコレステロール転送を制御し、ミトコンドリア内膜でのコレステロール側鎖切断酵素によるプレグネノロン産生を調節している。STAR 遺伝子変異が同定された先天性リポイド副腎過形成患者と gene targeting 法により作成された Star 欠損マウスで副腎不全、男性外生殖器形成不全、卵巣機能不全が認められたことは、ステロイドホルモン生合成における StAR の重要性を示唆する所見である。ヒトとマウスの副腎、性腺におけるステロイドホルモン生合成においては、コレステロール転送は必須のステップと考えられている。

一方で、先天性リポイド副腎過形成症患者や Star 欠損マウスの表現型から、コレステロール転送機序には StAR 依存性のみならず非依存性の経路の存在が示唆されている。実際、古典型先天性リポイド副腎過形成症女性患者、Star 欠損雌マウスでは性ホルモン産生能の一部が保持され、二次性徴が自然発来すると報告されている。さらに変異 STAR 機能が部分的に残存する非古典型先天性リポイド副腎過形成症男性および女性患者では、性腺機能が保持され、二次性徴のみならず妊孕性も保たれている症例が報告されている。想定される StAR 非依存性のコレステロール転送経路を特異的に賦活化させることは、女性の古典型及び男性・女性の非古典型先天性リポイド副腎過形成症患者の性腺ステロイド産生細胞への脂肪滴蓄積を抑え、表現型を軽症化させると期待される。しかし、StAR 非依存性ステロイドホルモン生合成の経路・機序に関しては、現時点では未解明である。

## 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生合成の律速段階であ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を解明すること、である。本研究では、StAR 欠損下のステロイドホルモン産生細胞における細胞レベルの病態生理を分子遺伝学的かつ網羅的に解析し、StAR 欠損下で有意に変動する分子群ないしパスウェイ群の同定を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 胎生期の Star 欠損マウスのステロイドホルモン産生細胞のトランスクリプトーム解析を行った。

マウス Star 遺伝子の内因性のプロモーター、エンハンサーにより enhanced green fluorescence protein (eGFP) を発現する

Star-eGFP トランスジェニックマウスと Star 欠損遺伝子ヘテロ接合体マウスを交配して、Star-eGFP/Star 欠損マウスを作成した。

胎生 17.5-18.5 日の Star-eGFP/Star 欠損マウスの副腎を摘出し、機械的・酵素的に細胞レベルまで単離して、

fluorescence-activated cell sorting (FACS) により純粋なステロイド産生細胞を集積した。

集積したステロイド産生細胞から RNA を抽出し、*in vitro* transcription を用いて均一に増幅した。

DNA マイクロアレイ (アジレント社製マウス SurePrint G3) を用いて網羅的に遺伝子発現解析を行った。

Star-eGFP マウスと Star-eGFP/Star 欠損マウスの遺伝子発現データを比較し、Ingenuity Pathway Analyses と NextBio により遺伝子発現変化と有意に関連する既知のパスウェイや生物学的機能、組織や細胞を同定した。

Star 欠損マウスで有意に発現変化する遺伝子群をリアルタイム RT-PCR で検証した。

(2) 遺伝子発現解析の結果をもとに、胎生期の Star 欠損マウスのステロイドホルモン産生組織におけるマクロファージ浸潤について免疫組織化学染色で検討した。

野生型マウスと Star 欠損マウスの胎生 17.5-18.5 日の副腎と精巣を摘出した。

ステロイドホルモン産生細胞に特異的なマーカーとして steroidogenic factor-1 (Sf-1) のモノクローナル抗体、マクロファージに特異的なマーカーとして allograft inflammatory factor 1 (Iba1) ないし Egf-Like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1 (F4/80) のポリクローナル抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。

## 4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析

Star 欠損マウスで有意に発現が変動した遺伝子 (differentially expressed gene, DEG) を、野生型との発現比 2、false discovery rate < 0.2 と定義した。Star 欠損マウスで発現が上昇した DEG を 1,206、低下した DEG を 767 同定した。

ステロイド生合成に関連する遺伝子群 (Fold change 平均 ± SE、\*は  $p < 0.05$  を示す; *Nr5a1* 0.68 ± 0.52、*Mc2r* 0.29 ± 0.18、*Mrap* 0.26 ± 0.51、*Cyp11a1* 0.63 ± 0.48、*Hsd3b1* 0.51 ± 0.53、*Agtr1a* 0.76 ± 0.58) やコレステロール取り込みや合成に関連する遺伝子群 (*Ldlr* 1.58 ± 1.19、*Scarb1* 1.39 ± 2.91、*Hmgcr* 0.77 ± 0.31、*Lipe* 0.93 ± 0.45、*Npc* 23.46 ± 4.7、*Stard3* 4.69 ± 3.15\*、*Bzrp11* 0.82 ± 0.94、*Srebf1* 1.9 ± 0.93、*Acat2*

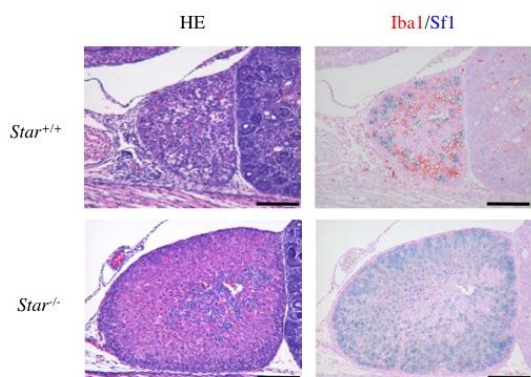
1.19 ± 1.08) は有意に変化していなかった。コレステロール排出に関連する遺伝子群 (*Nr1h2* 3.04 ± 1.21\*, *Nr1h3* 7.76 ± 1.38\*, *Abca1* 2.92 ± 1.59\*, *Abcg1* 5.69 ± 3.1\*, *Abcb1a* 0.37 ± 0.93, *Dhcr24* 0.54 ± 0.62, *ch25h* 0.57 ± 1.69) 炎症応答・免疫応答に関連する遺伝子群 (*Cd86* 6.44 ± 3.39\*, *Cd36* 3.29 ± 2.03\*, *Cd51* 130.95 ± 273.32\*, *Ccl5* 113.14 ± 144.27\*) の発現が有意に上昇していた。

## (2) 免疫組織化学染色

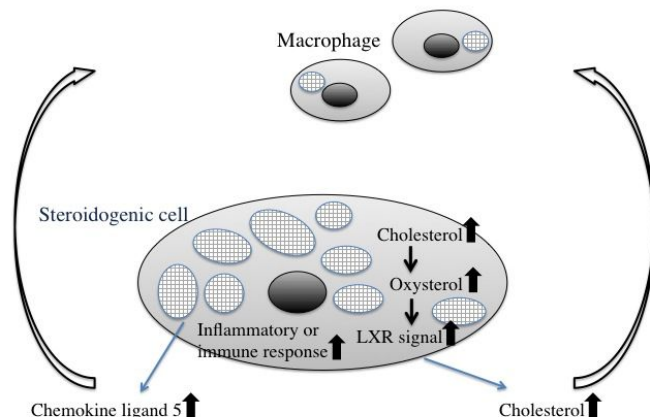
野生型マウス胎仔副腎では、層構造の保たれた皮質にマクロファージが散見される程度に存在していた。一方、*Star* 欠損マウス胎仔副腎では、層構造が乱れ、細胞質内に脂肪滴を蓄積したステロイドホルモン産生細胞の周辺にマクロファージが著明に増加していた (図 1)。

*Star* 欠損マウス胎仔精巣では、有意なマクロファージの増加は認められなかった。

本研究の成果から、*StAR* 欠損下の副腎皮質における細胞レベルの新たな病態生理として、コレステロール排出の亢進、炎症反応・免疫応答の亢進が初めて同定された。コレステロール排出の亢進は細胞毒性のある遊離コレステロール過剰を防ぐために合目的な反応であるが、炎症反応・免疫応答の亢進の意義は明らかではない。いずれの経路も副腎皮質へのマクロファージ浸潤の誘因となりえて、*StAR* 欠損下の副腎皮質で肥満症例の白色脂肪組織と同様の「リモデリング」が生じている可能性を示唆する (図 2)。*StAR* 非依存性ステロイドホルモン生合成の障害との関連が解明できれば、先天性リポイド副腎過形成症患者の古典型の卵巣機能や非古典型の精巣・卵巣機能の軽症化解明の一助となると期待される。



(図 1) 胎仔副腎 (胎生 17.5-18.5 日) における Sf1 (青) と Iba1 (マゼンダ) の免疫二重染色 (上段: 野生型マウス、下段: *Star* 欠損マウス)。



(図 2) 「副腎リモデリング」。上矢印: 遺伝子・蛋白発現量増加のみられる分子・パスウェイ、下矢印: 遺伝子・蛋白発現量低下のみられる分子・パスウェイ

## 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 1 件)

(1) (査読有り) Ishii T, Mitsui T, Suzuki S, Matsuzaki Y, Hasegawa T. A genome-wide expression profile of adrenocortical cells in knockout mice lacking steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 2012; 153: 2714-2723. doi: 10.1210/en.2011-1627.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 石井智弘, 福澤龍二, 佐藤武志, 室谷浩二, 安達昌功, 井原健二, 井垣純子, 長谷川行洋, 佐藤清二, 三井俊賢, 長谷川奉延. 先天性リポイド副腎過形成症の卵巣にマクロファージが浸潤する. 第 47 回日本小児内分泌学会 (2013 年 10 月 12 日、東京)

(2) 石井智弘, 三井俊賢, 鈴木禎史, 松崎有未, 長谷川奉延. Steroidogenic acute regulatory protein ノックアウトマウス副腎皮質細胞のトランスクリプトーム解析. 第 46 回日本小児内分泌学会 (2012 年 9 月 27 日、大阪)

(3) Ishii T, Mitsui T, Suzuki S, Matsuzaki Y, Hasegawa T. A genome-wide expression profile of adrenocortical cells in knockout mice lacking steroidogenic acute regulatory protein. The Conference on the Adrenal Cortex (2012 年 6 月 21 日、League City)

(4) 石井智弘, 三井俊賢, 鈴木禎史, 松崎有未, Keith L. Parker, 長谷川奉延. 緑色蛍光タンパク質を用いた steroidogenic acute regulatory protein ノックアウトマウス副腎のトランスクリプトーム解析. 第 85 回日本内分泌学会 (2012 年 4 月 21 日、名古屋)

〔図書〕(計 1 件)

(1) Ishii T. Transcriptome analysis of adrenocortical cells in health and disease. In, Alfredo Ulloa-Aguirre A, Conn MP, eds. Cellular endocrinology in health and disease. 1st ed. Waltham, MA: Academic Press; 2014: 169-192.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
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〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 智弘 (ISHII, Tomohiro)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号 : 70265867

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし