

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591503

研究課題名(和文) 転写因子 Sf1 の卵巣における発現機構および機能の分子機構の解明

研究課題名(英文) Identifying the regulatory mechanisms and molecular functions of transcription factor, SF1, during ovarian development in mice

研究代表者

鹿島田 健一 (Kashimada, Kenichi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80451938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Steroidogenic Factor-1(SF-1)はステロイド代謝酵素発現、副腎、性腺の発生に必須の転写因子である。マウスではSF-1は未分化性腺に発現し、性決定後、卵巣では出生までその発現が抑制されるが、性決定後の卵巣分化におけるSF-1発現抑制の機序は明らかでない。今回我々はマウス精巣由来の細胞、およびノックアウトマウスの解析を通じ、胎仔卵巣においてFOXL2が、WT1-KTSによるSF-1の転写活性を抑制することを証明した。これらは卵巣発生におけるSF1発現の抑制が重要であることを示唆すると共に、卵巣顆粒膜細胞分化への機構の解明の糸口になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Steroidogenic factor 1 (SF1) plays key roles in gonadal development. Initially, the Sf1 gene is expressed in mouse fetal gonads of both sexes from 9.5 dpc, but later is up-regulated in testes and down-regulated in ovaries after sex determination. While Sf1 expression is activated and maintained by Wilms Tumor 1 (WT1) and LIM homeobox 9 (LHX9), the mechanism of sex-specific regulation remains unclear, especially suppressive mechanisms in ovary. We focused on the transcription factor Forkhead box L2 (FOXL2) which has been considered to be important for ovarian folliculogenesis and granulosa cell development. By using in vitro analysis and Foxl2 knock out mice, we showed that FOXL2 negatively regulates Sf1 expression by antagonizing WT1-KTS during early ovarian development in mice and provide new mechanistic insight into the differentiation of ovaries, especially granulosa cell differentiation.

研究分野：小児科学 発生学

キーワード：性分化 卵巣発生 SF1 再生医学

1. 研究開始当初の背景

雌雄2つの性はほとんどの動物種において認められ、種の保存と進化において必須の役割を果たすと考えられている。さらにヒトにおいては性の分化に異常を来す性分化異常症 (Disorders of Sex Development:以下DSD)、およびそれに伴う外性器異常は、先天性異常症の中でも最も頻度の高いものであり、性の異常がもたらす心理学的、社会的な影響の深さを考えると、診断、治療法の確立が最も望まれる疾患の一つである。しかし今日においてもなお、性分化の機構の解明は十分といえず、臨床においても多くの問題点を残しており、詳細な機構の解明が待たれている。

哺乳類の性腺の分化は、未分化性腺の発生後にY染色体上にあるSex-determining region Y(SRY/Sry)の有無によって精巣・卵巣への分化が決定づけられる[Koopman et al., 1991, Nature]。マウス精巣においては性決定期である胎生10.5日から12.5日にSRYが発現することでSRY-box 9 (Sox9)の転写を活性化し、その下流にある一連の精巣分化を誘導する分子の発現が促進される[Kashimada et al., 2010]。卵巣においては性決定期以降にForkhead box L2 (FOXL2/Foxl2)、Wingless-type MMTV integration site family, member 4 (WNT4/Wnt4)、R-spondin-1といった卵巣特異的因子が発現することで卵巣分化が促進される[Schlessinger et al, 2010]。

SF1(AD4BP, NR5A1)/Sf1 (*Ad4Bp*, *Nr5a1*)は副腎、性腺の発生、分化に必須な転写因子である。これはSf1のノックアウトマウスでは、副腎、および性腺が発生しないこと[Luo et al., 1994]、ヒトではSF1異常症において、副腎低形成および性腺の低形成が生じ、46XY性分化疾患を呈すること[Achermann et al., 1999]から確認される。SF1は原始性腺の発生に必須であることに加え、性決定後においては、精巣の発生にお

いて特に重要な役割を果たす。事実、SF1/Sf1の発現パターンは未分化性腺ではXX, XY性腺において均等に発現するのに対し、性決定後ではXY性腺(精巣)において発現が亢進、XX性腺(卵巣)においては発現が抑制され性腺特異的な発現パターンをとる[Ikeda et al., 1994]。性決定後の精巣においてSF1は、SOX9/Sox9性腺特異的エンハンサーであるTESCOにおいて、SRYと共役的に働きSOX9/Sox9の発現を上昇させる[Sekido et al., 2008]など、種々の精巣分化を誘導する分子の転写活性を正に制御する。一方性決定後の卵巣において見られるSF1/Sf1発現の抑制は出生時までの間持続するが、胎生期卵巣発生におけるSF1の役割や、転写が抑制される意義、その転写抑制機構などは不明であり、詳細は明らかでない。特に精巣におけるSf1の転写の正の制御についてはSOX9が担うと考えられているが[Shen et al., 2002]、これは卵巣でのSf1発現が上昇しない事を説明できても、発現が抑制されることを説明する事はできない。

我々は、卵巣分化におけるSf1の発現調節に何らかの卵巣特異的因子が関与していると仮説を立て、卵巣発生およびその維持に必須である[Uhlenhaut et al, 2009] FOXL2に注目し、FOXL2が卵巣分化におけるSf1発現に与える影響を検討した。

2. 研究の目的

DSD(性分化異常症)および性腺機能不全の分子生物学的機構の解明を最終目標とし、

- (1) 本研究においては性腺発生および分化に重要な役割を果たすSF1について、マウス胎児卵巣の発生過程における卵巣特異的因子が及ぼすSF1(NR5A1)/Sf1(*Nr5a1*)分子の転写制御機構を解明する。
- (2) 卵巣発生分化におけるSF1の機能解析
- (3) SF1異常に伴う46XX性分化異常症

(DSD)、卵巣機能不全の病態の解明

3. 研究の方法

マウス精巣体細胞由来の TM3 細胞を中心とした、*in vitro* の解析

および *Foxl2* ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の解析

4. 研究成果

● *Sf1* と *Foxl2* は胎仔卵巣において相反的な発現経過をとる

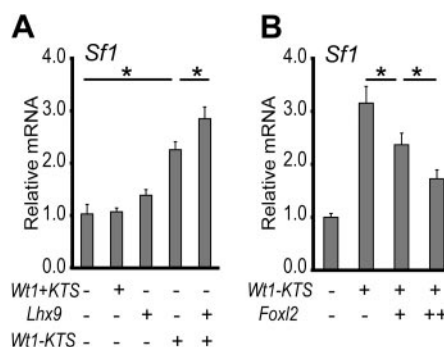
我々はまず胎仔マウス性腺における *Sf1*、*Foxl2* の発現をリアルタイム PCR にて定量、評価した。既報の通り、性決定後の胎生 12.5 日以降、*Sf1* の発現は精巣において亢進、卵巣において有意に抑制される一方、それとほぼ同時期に卵巣における *Foxl2* の発現が亢進した。また、未分化性腺において *Sf1* の上流の制御因子であることが既に報告されている *Wt1* および *Lhx9* の発現は性差を認めなかった。これらは、FOXL2 が *Sf1* の発現を抑制するという我々の仮説と矛盾しないものであった。

● FOXL2 は WT1-KTS による *Sf1* の転写活性化作用を *in vitro* において抑制する

続いて、内因性 *Foxl2* の発現がないマウス精巣体細胞由来である TM3 細胞を用いて *in vitro* での解析を行った。TM3 細胞に *Wt1-KTS*、*Lhx9* を導入したところ、既報通り [Wilhelm et al., 2002]、WT1-KTS および LHX9 によって *Sf1* の発現が亢進することが確認された (図 1A)。さらに FOXL2 を共発現することで、WT1-KTS による *Sf1* の発現亢進が FOXL2 によって用量依存的に抑制されることが確認された (図 1B)。一方、FOXL2

による *Sf1* 発現抑制作用は LHX9 による *Sf1* 転写制御に対しては明らかではなかった。

(図 1)

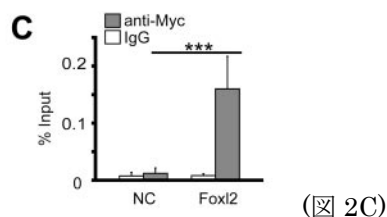


● FOXL2 は *Sf1* 近位 promoter に直接結合し WT1-KTS による *Sf1* 転写活性化を抑制する

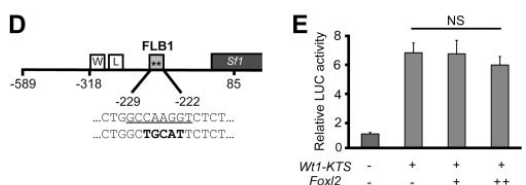
FOXL2 による *Sf1* の発現抑制の機序を明らかにするために、*Sf1* 遺伝子 5' 側 674bp (-589 ~ +85) のプロモーターを用いてレポーターアッセイを行った。このプロモーターは胎生 11.5 日の性腺において、WT1-KTS および LHX9 が直接結合することで活性化されることが *in vivo* で確認されている [Wilhelm et al., 2002]。レポーターアッセイでも WT1-KTS により *Sf1* プロモーターの転写活性が上昇し、それは FOXL2 によって用量依存的に抑制された。さらに興味深いことに、我々はこのプロモーター領域内に FOXL2 の結合モチーフと相同性の高い配列を (-229 ~ -222) に見いだした。この配列は哺乳類の間ではよく保存されており、その重要性が示唆される上、*Sf1* の転写を活性化する WT1-KTS、LHX9 結合領域よりも *Sf1* の近位にあることから、FOXL2 による *Sf1* 転写抑制に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

我々はこの FOXL2 結合配列と思われる部位に対して *in vitro* のクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを行い、FOXL2 が *Sf1* 近位 promoter に直接結合することを確認した

(図 2C)。さらにその配列に変異を導入したレポーターを用いてレポーターアッセイを行ったところ、FOXL2 による *Sf1* 転写抑制作用が消失することを確認した (図 2D,E)。



(図 2C)



(図 2D,E)

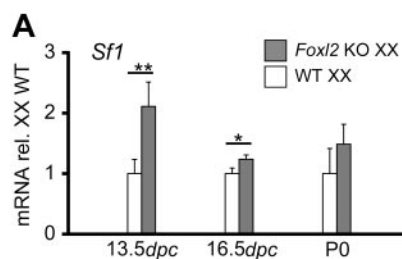
これらは、FOXL2 の WT1-KTS への拮抗作用においては、本シーケンス(-229~-222)への結合が必須であることを示している。

以上の結果より、FOXL2 が *Sf1* 近位プロモーターに直接結合することで、WT1-KTS による転写活性を抑制する機序が *in vitro* において示された。

● FOXL2 は卵巣発生初期に *Sf1* の発現を抑制する

以上で示された FOXL2 が *Sf1* 発現を抑制する機構が *in vivo* においても同様に認められるかどうか、という点について検証を行なうために、*Foxl2* ノックアウトマウスの胎児卵巣における *Sf1* の発現を RT-PCR 法で定量した。その結果、野生型に対して *Foxl2* ノックアウトマウスでは *Sf1* の発現が優位に亢進していた (図 3)。これらは卵巣発生において FOXL2 が SF1 の発現を抑制していることを示唆するものである。さらに、ノックアウトマウスと野生型における *Sf1* 発現の差は胎生 13.5 日で最も大きく、出生時にはその差を認めなかったことから、FOXL2 による *Sf1* 発

現抑制は卵巣分化の比較的早期に限定されると考えられた。



(図 3)

● 結論

我々は、卵巣特異的な *Sf1* の転写抑制において、卵巣特異的転写因子である FOXL2 による能動的な機構が関与する事を示した。

本検討は、卵巣分化を制御する新たな分子機構を明らかにしたものであり、今後の更なる検討を通じて 46,XX 性分化疾患や卵巣形成不全の原因究明につながることを期待したい。

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)

Takasawa K, Pelosi E, Takagi M, Morio T, Asahara H, Schlessinger D, Mizutani S, Koopman P., Kashimada K

FOXL2 transcriptionally represses *Sf1* expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice.

FASEB J. 査読あり 28(5), 2014, 2020-8.

[学会発表] (計 5 件)

1: Takasawa K, Pelosi E, Takagi M, Morio T, Asahara H, Schlessinger D, Mizutani S, Koopman P., Kashimada K

FOXL2 transcriptionally represses *Sf1* expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice.

Seventh International Symposium of

Vertebrate Sex Determination (2015, Apr. Kona, Hawaii)

2: 高澤啓, Emanuele Pelosi, 高木正稔, Dagmar Wilhelm, 森尾友宏, 浅原弘嗣, David Schlessinger, 水谷修紀, Peter Koopman, 鹿島田健一

卵巣発生初期において卵巣特異的転写因子 FOXL2 は WT1-KTS に拮抗し Ad4BP/SF-1 の発現を抑制する

第 19 回日本生殖内分泌学会学術集会
2015 年 1 月 (大阪) 学術奨励賞受賞

3: 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会
2014 年 9 月 (浜松) 最優秀演題賞受賞

2 と発表者、タイトルは同じ

4: ICE/ENDO 2014 (2014 年米国内分泌学会) Poster 発表, Travel award 受賞 (2014 年 6 月, Chicago)

1 と発表者タイトルは同じ

5: 第 87 回日本内分泌学術集会 (2014 年 4 月 福岡) 口演

2 と発表者タイトルは同じ

[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:

出願年月日:

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

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

発生発達病態学・講師

鹿島田 健一 (Kashimada Kenichi)

研究者番号: 80451938