

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790303

研究課題名(和文)胎生期精巣における男性ホルモン産生機構に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of a regulatory mechanism underlying androgen production in the fetal testis

研究代表者

宮戸 真美 (Miyado, Mami)

独立行政法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・研究員

研究者番号：00386252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：MAMLD1 (Mastermind-like domain containing 1) は、ヒトにおける尿道下裂の責任遺伝子である。マウス相同遺伝子 (Mam1d1) は胎生中期から後期のマウス胎仔精巣で発現すること、その発現量は経時的に増加することを明らかにした。また、Mam1d1遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現量は有意に低下していた。本研究から、Mam1d1はライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現制御に関与することが見出された。

研究成果の概要(英文)：MAMLD1 (Mastermind-like domain containing 1) has been identified as a gene responsible for with hypospadias in humans. The Mam1d1 mRNA expression was gradually and steadily increased from 12.5 to 18.5 day post coitum in the fetal testis of wild-type male mice. To study the role of MAMLD1 in mice, we produced Mam1d1 knockout mice. Mam1d1 knockout male mice showed mildly but significantly reduced fetal testicular mRNA levels of genes exclusively expressed in Leydig cells (Star, Cyp11a1, Cyp17a1, and Hsd3b1). These results provide the evidence that MAMLD1 plays a role in androgen production, indicating the presence of a mechanism shared between mouse and human. Further studies will explore the MAMLD1-dependent molecular network in the steroid hormone production and the pathological condition of MAMLD1-mutated patients.

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：男性ホルモン産生

## 1. 研究開始当初の背景

尿道形成には、胎生期における細胞増殖因子群の形成制御シグナルおよび男性ホルモンが関与している。そのため、男性ホルモン産生量減少および精巣機能の低下は、尿道下裂を引き起こすと考えられている。尿道下裂は、外生殖器腹側の発育異常により正常な尿道が形成されない症状であり、出生男児の約0.5%に認められる頻度の高い性分化疾患である。尿道下裂患者の中で、特異的遺伝学的診断がなされる症例はごく少数であり、本症の発症メカニズムには未知の遺伝的因子が多く関与すると推測される。

当研究部における解析の結果、*Mastermind-like domain containing 1* (*MAMLD1*) がヒトの尿道下裂発症の責任遺伝子であることが明らかになった。また、*MAMLD1* 翻訳領域の上流には NR5A1 結合配列が存在し、NR5A1 により転写活性化されること、男性ホルモンを合成している胎生 14.5 日胚のマウス胎仔精巣において、マウス相同遺伝子 (*Mamld1*) が男性ホルモン産生に関与する細胞 (セルトリとライディッヒ細胞) で発現することが見出された。さらに、培養細胞を用いたノックダウン実験の解析から、*Mamld1* 遺伝子の発現低下は男性ホルモン産生細胞におけるテストステロン産生量の減少とホルモン産生関連酵素である *Cyp17a1* 遺伝子の発現量低下を招くことを報告した。

しかし、*MAMLD1* 変異が尿道下裂を招く機序は不明であり、*MAMLD1* の生体内機能はわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

*MAMLD1* は、ヒトにおける尿道下裂発症の責任遺伝子である。胎生期における男性ホルモン作用により尿道が形成されること、*Mamld1* 遺伝子がマウスの胎仔精巣の男性ホルモン産生細胞において強く発現していることから、*MAMLD1* 変異陽性男性は男性ホルモン産生障害を介して、尿道下裂を生じると考えられる。

そこで、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスを用いて、胎生期精巣の男性ホルモン産生における *MAMLD1* の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 胎仔精巣における *Mamld1* 遺伝子発現解析：

胎生 12.5 - 18.5 日胚のマウス精巣における *Mamld1* 遺伝子の発現量を、qRT-PCR 法にて解析した。内部標準として *Gaphd* 遺伝子を使用した。

### (2) *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの作製：

生体内での *MAMLD1* の機能を明らかにするために、翻訳領域を含む Exon 3 をネオマイシン耐性遺伝子で置き換えて、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスを作製した。

### (3) 胎仔精巣の解析：

*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣内の体細胞・生殖細胞の発生・分化状態を明らかにするために、免疫組織染色を行った。抗 AMH 抗体と抗 HSD3B 抗体でセルトリ細胞とライディッヒ細胞などの体細胞、抗 DDX4 抗体で生殖細胞を検出した。それぞれのシグナル陽性細胞数を比較した。

### (4) 男性ホルモン産生酵素遺伝子群の発現量変化の解析：

qRT-PCR 法にて、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣における男性ホルモン産生酵素遺伝子群の発現量の変化を調べた。内部標準として *Gaphd* 遺伝子を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 胎仔精巣における *Mamld1* 遺伝子発現解析：

*Mamld1* 遺伝子は胎生中期から後期のマウス胎仔精巣で発現すること、その発現量は経時的に増加することを見出した (図 1)。これは、マウス胎仔精巣において報告されているテストステロン合成量の増加と一致している。

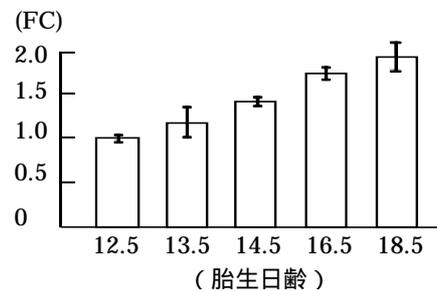


図 1 胎仔精巣における *Mamld1* 遺伝子発現

*Mamld1* 遺伝子の発現量は、胎生中期から経時的に増加した。

FC: Fold Change.

### (2) *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの作製：

遺伝子の転写産物およびタンパク質の欠損を認め、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスが得られたことを確認した。*Mamld1* 遺伝子欠損オスマウスは尿道下裂を示さず、正常な妊よう性をもつことが明らかになった。

*Mamld1* 遺伝子は、X 染色体上に存在するため、全ての遺伝子型の仔を、一度の交配で得ることは出来ない。そこで、ヘテロのメスと野生型あるいは欠損オスを交配させて、全ての遺伝子型の仔が生まれることを確認した。生まれてきた仔は、それぞれの遺伝子型が 25%前後となり、正常なメンデル比を示した (表 1)。

*Mamld1* 遺伝子欠損マウスは、雌雄ともに離乳まで野生型マウスと外見上区別できずに成長した。

表 1 遺伝子型の頻度

Female +/- (n = 49) x Male +/Y (n = 9)			
Female +/+	Female +/-	Male +/Y	Male -/Y
85 (25.0%)	84 (24.7%)	85 (25.0%)	86 (25.3%)
Female +/- (n = 46) x Male -/Y (n = 14)			
Female +/-	Female -/-	Male +/Y	Male -/Y
82 (23.0%)	94 (26.4%)	96 (27.0%)	84 (23.6%)

正常なメンデル比を示した。

(3) 胎仔精巣の解析：

*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣の形態を調べた結果、正常な精細管の形成が観察された。*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣は、野生型マウスと比べて違いがなく、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、生殖細胞は正常に発生・分化していた(図2)。また、野生型マウスと同様に、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスにおいて精巣下降が認められた。さらに、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣内におけるテストステロン値は、野生型マウスと比べて、ほぼ同等の値を示した(野生型:  $2.38 \pm 0.31$ ,  $n = 4$ ; *Mamld1* 遺伝子欠損:  $2.31 \pm 0.30$ ,  $n = 4$ )。

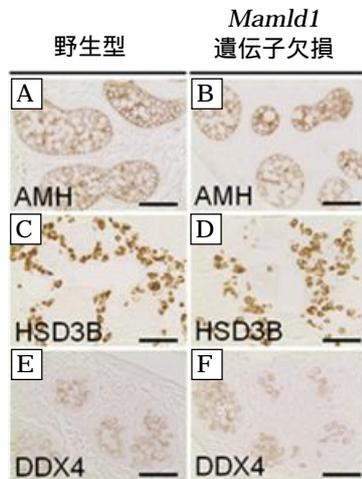


図 2 胎仔精巣 (胎生 14.5 日胚) における免疫組織学的解析

*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣は、野生型マウスと比べて違いがなかった。

- A, C, E: 野生型マウス.
- B, D, F: *Mamld1* 遺伝子欠損マウス.
- AMH: セルトリ細胞のマーカー.
- HSD3B: ライディッヒ細胞のマーカー.
- DDX4: 生殖細胞のマーカー.
- スケールバー: 50  $\mu$ m.

(4) 男性ホルモン産生酵素遺伝子群の発現量変化の解析：

男性ホルモン産生への影響を調べるために、胎仔精巣における遺伝子発現解析を行った。その結果、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子 (*Cyp17a1*, *Hsd3b1* など) の発現量が有意に低下していた(図3)。この

時、セルトリ細胞特異的に発現している *Sox9* 遺伝子、ライディッヒ細胞とセルトリ細胞で発現している *Nr5a1* 遺伝子、ライディッヒ細胞と生殖細胞と管周細胞で発現している *Ar* 遺伝子、生殖細胞特異的に発現している *Ddx4* 遺伝子について発現量の変化は認められなかった(図3)。

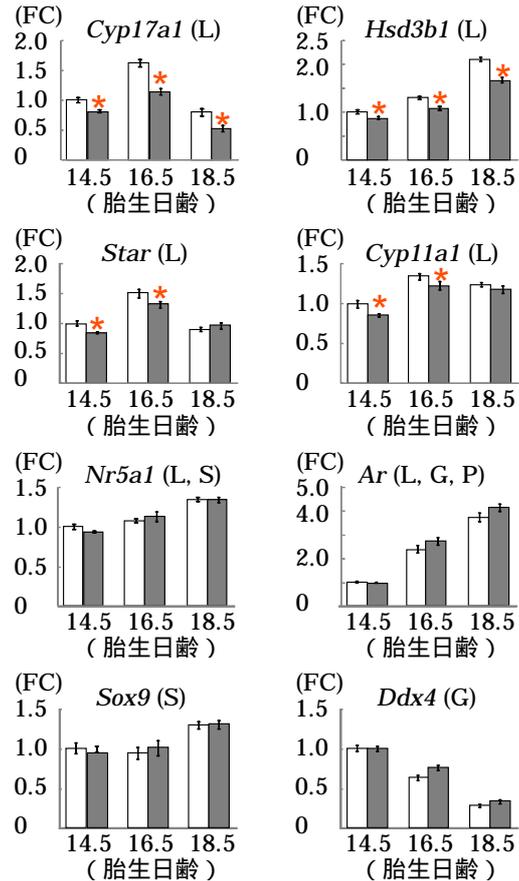


図 3 胎仔精巣における遺伝子発現変化

*Mamld1* 遺伝子欠損マウスにおいて、ライディッヒ細胞 (L) 特異的に発現する遺伝子の発現量が有意に低下していた。

- FC: Fold Change.
- 白色棒: 野生型マウス.
- 灰色棒: *Mamld1* 遺伝子欠損マウス.
- アスタリスク:  $p < 0.05$ .
- L: ライディッヒ細胞.
- S: セルトリ細胞.
- G: 生殖細胞.
- P: 管周細胞.

以上の成績から、*Nr5a1* 遺伝子の調節下において、*Mamld1* 遺伝子は *Cyp17a1* 遺伝子の発現調節を介して、テストステロン産生に関与すると示唆される。なお、ヒトとマウスの表現型の違いは、性分化臨界期の種差やステロイドホルモン合成の主要経路が異なることに起因すると推測される。

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8件)

- (1) Fukami M, Miyado M, Nagasaki K, Shozu M and Ogata T. Aromatase excess syndrome: a rare autosomal dominant disorder leading to pre- or peri-pubertal onset gynecomastia. *Pediatr Endocrinol Rev*. 11 (3): 298-305, 2014. DOI: なし. 査読有.
- (2) Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, Ogata T and Fukami M. De novo Frameshift Mutation in *Fibroblast Growth Factor 8* in a Male Patient with Gonadotropin Deficiency. *Horm Res Paediatr*. 81 (2): 139-144, 2014. DOI: 10.1159/000355380. 査読有.
- (3) Shihara D\*, Miyado M\*, Nakabayashi K, Shozu M, Ogata T, Nagasaki K\* and Fukami M. Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol (Oxf)*. (in press). \*These authors contributed equally to this work. DOI: 10.1111/cen.12329. 査読有.
- (4) Qin XY, Sone H, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Hisada A, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M and Ogata T. Individual variation of the genetic response to bisphenol a in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One*. 7 (12): e52756, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0052756. 査読有.
- (5) Ohnami N\*, Nakamura A\*, Miyado M\*, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K and Umezawa A. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biol Open*. 1 (7): 640-647, 2012. \*These authors contributed equally to this work. DOI: 10.1242/bio.20121420. 査読有.
- (6) Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M and Ogata T. *Mamld1* deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology*. 153 (12): 6033-6040, 2012. DOI: 10.1210/en.2012-1324. 査読有.
- (7) Kagami M, Matsuoka K, Nagai T,

Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M and Ogata T. Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics*. 7 (10): 1142-1150, 2012. DOI: 10.4161/epi.21937. 査読有.

- (8) Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T and Sone H. Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS One*. 7 (5): e36711, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0036711. 査読有.

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 宮戸真美, 志原大蔵, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀. *Mamld1* 遺伝子欠損妊娠マウスは黄体退縮不全による分娩遅延を呈する. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会, 2013年12月7日, 東京.
- (2) 宮戸真美, 志原大蔵, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀. *Mamld1* 遺伝子欠損は, 成獣マウスの精巣サイズ減少を招くが, 妊孕性には影響を与えない. 第36回日本分子生物学会, 2013年12月5日, 神戸.
- (3) 宮戸真美, 志原大蔵, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀. *Mamld1* 遺伝子欠損は, 妊娠マウスにおける黄体退縮不全と分娩遅延を招く. 第21回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2013年11月16日, 大阪.
- (4) 宮戸真美, 志原大蔵, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀. *Mamld1* はマウス分娩開始シグナルに参与する卵巣ステロイド産生調節因子である. 第47回日本小児内分泌学会学術集会, 2013年10月12日, 東京.
- (5) 宮戸真美, 緒方勤, 深見真紀. 精巣における男性ホルモン産生制御機構: *MAMLD1* 変異陽性患者とノックアウトマウスからの知見. 第35回日本分子生物学会, 2012年12月13日, 福岡.
- (6) 宮戸真美, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀. 雌性生殖器官における *Mamld1* の役割. 第46回日本小児内分泌学会, 2012年9月29日, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮戸 真美 (MIYADO, Mami)

独立行政法人国立成育医療研究センター

・分子内分泌研究部・研究員

研究者番号: 00386252