

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09615

研究課題名(和文) 精巣分化におけるエピジェネティックな分子制御機構の解明と再生医療への応用

研究課題名(英文) Identifying epigenetic mechanisms for testicular development and developing innovative technology for regenerative medicine

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、精巣体細胞(セルトリ細胞)分化におけるepigeneticな分子制御機構の解明を目的とした。

PAD (Peptidylarginine Deiminase)は翻訳後修飾(シトルリン化)する酵素で、ヒストンH3をシトルリン化し epigeneticな制御に関与するとされる。今回我々は、PAD2をコードするPadi2が胎児期性腺においてセルトリ細胞特異的に発現することより精巣発生におけるエピジェネティックな機能について注目した。その結果Padi2はSOX9によって転写活性化すると同時に、SOX9の標的遺伝子発現を補助的に制御する新規の精巣分化関連分子である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify epigenetic mechanisms in development of the testicular supporting cells, Sertoli cells.

Peptidylarginine deiminases (PADs) are a family of enzymes that change the charge of target proteins through citrullination. We identified Padi2 which encodes PAD2 was exclusively expressed in Sertoli cells of fetal developing testes. Our data suggested that Padi2 was a novel gene in fetal testis development which was specifically expressed in Sertoli cells through the regulation of SOX9 and FOXL2 and supported regulation by SOX9 for target genes. The phenotype of Padi2(-/-)XY indicates that a redundant factor compensates for the role of PAD2 in testicular development.

研究分野：小児内分泌

キーワード：性分化 エピジェネティクス 精巣 CRSPR/Cas9 シトルリン化

1. 研究開始当初の背景

精巣の発生異常は、性の分化に異常を来す性分化異常症 (Disorders of Sex Development: 以下 DSD) の原因となり、その多くはいわゆる曖昧外性器 (男女の区別がつきにくい外性器) を伴うため、養育性の決定などを含め、心理学的、社会的な影響は臨床で大変深刻である。さらに成人期以降の精巣機能低下は「男性らしさ」を獲得する二次性徴の欠如、さらには精子形成異常による男性不妊の原因にも成り、その社会的影響は極めて甚大である。従って精巣発生分化異常に伴う疾患の診断、治療法の確立は最も望まれるものの一つである。しかし今日においてもなお、精巣発生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、詳細な病態機構の解明が待たれている。

精巣発生、特にその中心的役割を果たすセルトリ細胞分化において、エピジェネティクスが重要な役割を果たしている可能性を考え、その機構を明らかにし、さらには幹細胞 (ES 細胞) から性腺細胞の作製法の開発および性腺機能不全患者における臨床応用を行なうことを最終目標とすることとし、検討を行って来た。

今回我々は予備実験において、PAD2 をコードする Padi2 が胎児期性腺においてセルトリ細胞特異的に発現することを見いだした。PAD (Peptidylarginine Deiminase) は翻訳後修飾 (シトルリン化) する酵素で、ヒストン H3 をシトルリン化し epigenetic な制御に関与するとされる。

2. 研究の目的

セルトリ細胞発生における PAD2 の転写制御およびその役割を解明する

3. 研究の方法

- (1) Padi2 の転写制御機構の検討
セルトリ細胞のモデルとされる TM3 細胞を用い、SOX9 や FOXL2 の強制発現し、Padi2 の発現の変化を定量的 RT-PCR で検討をした。
SOX9 ノックアウトマウス、FOXL2 ノックアウトマウスにおける性腺での Padi2 の発現を定量的 RT-PCR で検討をした。
Padi2 のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイによる、SOX9 FOXL2 応答領域の同定を試みた。
- (2) Padi2 の精巣発生における機能の検討
CRISPR/Cas9 を用いた Padi2 ノックアウトマウス作成による表現型を検討した
TM3 細胞において siRNA を用い、Padi2 をノックダウンし、SOX9 の標的遺伝子の発現の変化を定量的 RT-PCR で検討した
- (3) Padi2 の機能であるヒストン H3 のシト

ルリン化について以下の検討を行った
野生型マウスにおける、胎仔期性腺 (精巣卵巣) のシトルリン化をウェスタンブロットングを用いて、定量的比較した
同様に Padi2 ノックアウトマウスと野生型における性腺でのヒストン H3 のシトルリン化を定量的に比較した。

4. 研究成果

- (1) Padi2 は 13.5dpc の胎仔マウスにおける WISH で testes cord 特異的に発現し、Wv/Wv マウス XY 性腺において野生型と発現に差がないことから、セルトリ細胞特異的に発現していることを示した。
- (2) TM3 細胞強制発現系で、SOX9 が正に Padi2 の転写を制御し、それに対し FOXL2 が拮抗的に作用することを示した。また AMH-Cre:Sox9flox/flox マウスにおいて Padi2 の発現は著明に低下しており、in vivo において SOX9 により正に制御されることを示した。Foxl2 ノックアウトマウスでは、Padi2 の発現は野生型と比べ差がなかった。
- (3) enhancer 領域として exo1 の配列が、SOX9 により正に応答し、FOXL2 により負に応答することを reporter assay により示した。
- (4) siRNA を用い Padi2 を knock down した TM3 細胞では、SOX9 による Ptgds に対する正の転写制御が抑制された。PAD2 が SOX9 の転写活性に対し補助的に作用する可能性が示唆された。
- (5) Padi2(-/-) マウスを CRISPR/Cas9 を用いて作製し、XY マウスの表現型解析を行ったが、妊孕性は保たれ、精巣分化における明らかな表現型を認めなかった
- (6) PAD2 はヒストン H3 をシトルリン化しエピジェネティックに遺伝子発現制御をする可能性が知られており、H3 シトルリン化を検討をした。野生型と Padi2(-/-) マウスで XY 性腺では、明らかな差を認めなかった。
- (7) 本研究より、Padi2 は SOX9 および FOXL2 の制御によりセルトリ細胞特異的に発現し、翻訳後修飾を介して SOX9 の標的遺伝子発現を補助的に制御する、新規の精巣分化に寄与する分子である可能性を示唆した。これらは新たなエピジェネティックスの機構が精巣発生に寄与している可能性を示唆するもので、今後の精巣発生の分子機構の解明、再生医療への応用が期待される。

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 5 件) 全て査読あり

Phenotypic Variation in 46,XX Disorders of Sex Development due to the NR5A1 p.R92W Variant: A Sibling Case Report and Literature Review. Takasawa K, Igarashi M, Ono M, Takemoto A, Takada S, Yamataka A, Ogata T, Morio T, Fukami M, Kashimada K.

Sex Dev. 2017;11(5-6):284-288. doi: 10.1159/000485868.

The p.R92W variant of NR5A1/Nr5a1 induces testicular development of 46,XX gonads in humans, but not in mice: phenotypic comparison of human patients and mutation-induced mice. Miyado M, Inui M, Igarashi M, Katoh-Fukui Y, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Kashimada K, Miyado K, Tamano M, Ogata T, Takada S, Fukami M. Biol Sex Differ. 2016 Nov 8;7:56. PMID: 27833742

Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues.

Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, Baba T, Morohashi KI, Tajima T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Sekido R, Ogata T, Kashimada K, Fukami M. Hum Mutat. 2017 Jan;38(1):39-42. doi: 10.1002/humu.23116.

A 45,X/46,XY DSD (Disorder of Sexual Development) case with an extremely uneven distribution of 46,XY cells between lymphocytes and gonads.

Nomura R, Miyai K, Okada M, Kajiwara M, Ono M, Ogata T, Onishi I, Sato M, Sekine M, Akashi T, Mizutani S, Kashimada K.

Clin Pediatr Endocrinol. 2015 Jan;24(1):11-4 doi: 10.1297/cpe.24.11.

TALEN-Mediated Gene Disruption on Y Chromosome Reveals Critical Role of EIF2S3Y in Mouse Spermatogenesis.

Matsubara Y, Kato T, Kashimada K, Tanaka H, Zhi Z, Ichinose S, Mizutani S, Morio T, Chiba T, Ito Y, Saga Y, Takada S, Asahara H.

Stem Cells Dev. 2015 May 15;24(10):1164-70. doi: 10.1089/scd.2014.0466.

〔学会発表〕(計 16 件)

高澤啓, 五十嵐麻希, 小野真, 高田修治, 山高篤行, 緒方勤, 深見真紀, 鹿島田健一. NR5A1, p.R92W 変異による 46, XX DSD の多彩な表現型. 第 91 回日本内分泌学会学術集会 2018.04.27 宮崎

辻敦美, 加藤朋子, 小川湧也, 野村莉紗, 高澤啓, 森尾友宏, 高田修治, 鹿島田健一. SOX9 により促進的発現制御を受ける PAD2 の精巣発生分化における役割. 第 91 回日本内分泌学会学術集会 2018.04.26 宮崎

野村莉紗, 鈴木仁美, Liang Zhao, 辻敦美, 金井克晃, 八木田秀雄, 森尾友宏, 金井正美, 鹿島田健一. 胎生期卵巣における NR5A1/Ad4BP/SF1 の転写抑制は Notch シグナルを介した卵巣発生の最適化に必要である. 第 91 回日本内分泌学会学術集会 2018.04.26 宮崎

Tsuji-Hosokawa A, Kato T, Ogawa Y, Nomura R, Lavery R, Takasawa K, Harley V, Morio T, Takeda S, Kashimada K. SOX9 and FOXL2 Antagonistically Regulate Peptidyl Arginine Deiminase 2 (PAD12) Expression during testicular Development. 8th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex determination 2018.04.16 Kona

Kashimada K, Nomura R, Suzuki H, Zhao L, Tsuji-Hosokawa A, Kanai Y, Yagita H, Bowles J, Koopman P, kanai-Azuma M, Morio T. Enforced expression of Nr5a1/Ad4bp/Sf1 in mouse fetal ovaries causes premature ovarian insufficiency by dysregulating Notch signaling. 8th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex determination 2018.04.16 Hawaii

鹿島田健一. 胎生期卵巣における Sf1/NR5a1/Ad4Bp の転写抑制は Notch シグナルを介した卵巣発生の最適化に必須である. 第 17 回日本再生医療学会総会 2018.03.26 横浜

鹿島田健一. Enforced expression of Nr5a1/Ad4bp/Sf1 in mouse fetal ovaries causes premature ovarian insufficiency by dysregulating Notch signaling. 第二回性と生殖の懇談会 2017.12.13 名古屋

高澤啓, 五十嵐麻希, 高田修治, 山高篤行, 緒方勤, 深見真紀, 鹿島田健一. NR5A1, p.R92W 変異による 46, XX DSD の多彩な表現型: 本邦同胞例の経験から. 第 51 回日本小児内分泌学会学術集会 2017.09.30 大阪

鹿島田健一. 分子機能から考える性分

化疾患の臨床. 第 51 回日本小児内分泌学会学術集会 2017.09.28 大阪

鹿島田健一. 卵巣の初期発生における Sfi/Ad4BP/Nr5a1 の転写制御とその役割について. 第 58 回日本組織細胞化学会 総会・学術集会 2017.09.23 愛媛

鹿島田健一. 性分化、性腺発生からみた、骨代謝と骨形成. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会 2017.07.27 福岡

五十嵐麻希, 高澤啓, 箱田明子, 菅野潤子, 高田修治, 乾雅史, 宮戸真美, 福井由宇子, 田島敏広, 秦健一郎, 中林一彦, 松原洋一, 緒方勤, 鹿島田健一, 深見真紀. NR5A1 は、46,XX 精巢性分化疾患の新規発症責任遺伝子である. 第 39 回日本小児遺伝学会学術集会 2016.12.09 東京

鹿島田健一. [1PS15-2] 性分化における分子機構の新たな展開に向けて. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.11.30 神奈川

Maki Igarashi, Kei Takasawa, Akiko Hakoda, Junko Kanno, Shuji Takada, Mami Miyado, Toshihiro Tajima, Ryohei Sekido, Tsutomu Ogata, Kenichi Kashimada, Maki Fukami. Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46, XX Individuals with Testicular Tissues. The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Endocrine Society/ The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Pediatric Endocrinology 2016.11.17 Tokyo, Japan

鹿島田健一. 性分化疾患の臨床. 第 21 回小児内分泌専門セミナー 2016.08.27 兵庫

鹿島田健一. 性分化疾患(DSD)の診断と治療. 第 4 回 DSD セミナー in 大阪 2015.12.12 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 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

(2) 研究分担者
森尾 友宏 (MORIO, Tomohiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30239628