

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15355

研究課題名(和文) 新たな不妊原因候補因子Pref-1の卵巣における役割

研究課題名(英文) Role of Pref-1 in the ovary as a novel infertility factor

研究代表者

宮本 薫 (Miyamoto, Kaoru)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：30125877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、私どもが同定したSF-1標的遺伝子のひとつであるPref-1(DLK-1/FA-1/ZOG)に着目して研究を行った。遺伝子発現および免疫組織化学的検討により、Pref-1が卵巣で発現し、ゴナドトロピン刺激により強く発現誘導されることを見出した。PCOSなど卵巣ステロイドホルモンの異常は不妊の原因ともなるが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究により、卵巣ステロイドホルモン合成の新たなメカニズムが解明され、卵巣ステロイドホルモン合成異常を伴う疾患の原因究明や新たな治療法の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously we found Pref-1 as a novel target gene of SF-1. In this study, we examined expression pattern of Pref-1 in the ovary by using gene expression and immunohistochemistry. The expression pattern of Pref-1 was very similar to those of steroidogenesis related genes such as StAR and CYP11A1, suggesting that Pref-1 works as a member of ovarian steroidogenesis or folliculogenesis. Pref-1 is known as a factor involved in the differentiation of adipocyte. In this study, we identified, for the first time, that Pref-1 is also a member of steroidogenesis in the ovary and is involved in follicular development.

研究分野：内分泌学

キーワード：卵巣 Pref-1

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 Ad4BP/SF-1 は性腺および副腎で主に発現し、多くの性腺や副腎特異的遺伝子の発現に重要であることが明らかになっている。Ad4BP/SF-1 のノックアウトマウスでは性腺・副腎が形成されないことから、Ad4BP/SF-1 は性腺・副腎の発生・分化に必須であることも証明されている。そのためその標的遺伝子は副腎・性腺の形成やステロイド産生疾患の原因遺伝子として同定されているものが多い。一方、未だに原因遺伝子が特定されない副腎低形成、性分化異常およびステロイド産生疾患も多く残されている。これらの原因遺伝子として新たな Ad4BP/SF-1 標的遺伝子の存在も考えられる。

私どもは間葉系幹細胞に Ad4BP/SF-1 を導入することにより効率よくステロイドホルモン産生細胞へ分化誘導させ、生体内同様 cAMP 刺激によりステロイドホルモン産生を増強する細胞の創出に成功している。この分化誘導系を用いたゲノムワイドな解析を行うことで、新たな Ad4BP/SF-1 標的遺伝子を同定し、ステロイドホルモン合成異常を伴う疾患の原因究明や新たな治療法の開発を目指している。

## 2. 研究の目的

私どもは間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導系を用いて、Ad4BP/SF-1 標的遺伝子を探索したところ、新たに Pref-1 (DLK-1/FA-1/ZOG) を同定した。Pref-1 は脂肪細胞への分化を負に制御する因子として同定されている。また、胎児組織で多く発現しているが、成人では視床下部や内分泌器官で主に発現が認められる。しかしこれらの組織での Pref-1 の役割は不明である。Pref-1 は Notch シグナル系を介して作用するが、分化誘導などで反対の作用を示す Wnt 系の異常が不妊に繋がることが報告されており (Endocr Rev. er20141020,2014) 実際 Pref-1 に関してもヒトおよび不妊マウスの網羅的遺伝子発現解析の比較から、不妊の原因候補遺伝子の一つであると報告されているが、その詳細は明らかではない。本研究では、卵巣における Pref-1 の発現様式と役割を明らかにすることで、卵巣ステロイドホルモン合成異常を伴う疾患の原因究明や新たな治療法の開発につなげることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット卵巣顆粒膜細胞における Pref-1 の遺伝子発現変化

DES 処理した幼若ラットより調製した初代培養卵巣顆粒膜細胞を用いて、FSH 添加後経時的に回収し、Pref-1 の遺伝子発現変化を検討した。

### (2) Pref-1 の卵巣内における発現様式の解明

卵巣発育と排卵の過程における Pref-1 の発現様式について、PMSG による卵巣発育と hCG による排卵誘発を促進した幼若ラットの卵巣を用いて検討した。

PMSG/hCG 処理したラットから回収した卵巣よりタンパク質を回収し、Pref-1 の発現量をウェスタンブロッティング法により検討した。また、回収した卵巣を固定・切片して組織切片を作製し、Pref-1 タンパク質の発現を特異的な抗体を用いて免疫組織化学法により解析した。

### (3) 卵巣機能における Pref-1 の役割の検討

Pref-1 は分泌性タンパク質であるため、その受容体を介して卵巣機能に影響を与えられと考えられる。卵巣機能における Pref-1 の役割を明らかにするため、リコンビナントタンパク質の作製を試みた。GST タグ付きリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ、精製した後、そのタンパク質を用いて卵巣顆粒膜細胞の遺伝子発現に対する影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ラット卵巣顆粒膜細胞における Pref-1 の遺伝子発現変化

初代培養卵巣顆粒膜細胞における Pref-1 の発現を検討したところ、FSH 添加 1 時間で強い発現誘導が見られた (図 1)。Pref-1 は顆粒膜細胞において、他のステロイド関連因子同様、FSH によって早期に誘導される遺伝子の一員であることが明らかとなった。

#### 初代培養卵巣顆粒膜細胞 における遺伝子発現

FSH

M 0h 1h 2h 4h 8h 24h 48h

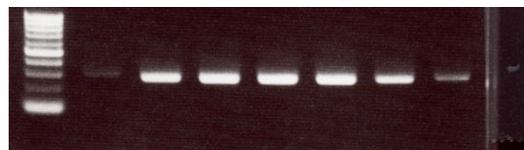


図 1

### (2) Pref-1 の卵巣内における発現様式の解明

卵巣における Pref-1 の発現を検討したところ、ステロイド関連因子 STAR 同様、幼若ラットへの PMSG 投与により発現が強く誘導され、その後 hCG 投与による排卵誘発により、その発現はさらに誘導された (図 2)。

ラット卵巣における  
Pref-1 タンパク質の発現

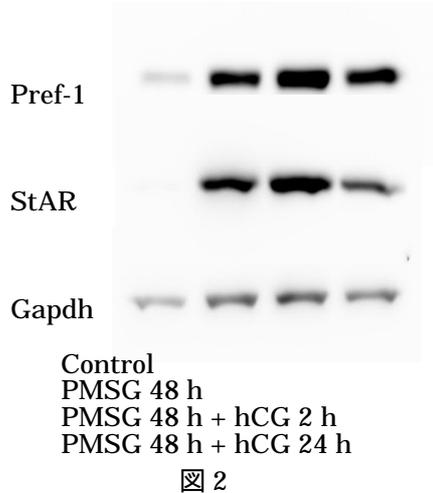


図 2

Pref-1 発現の卵巣内局在を、免疫組織化学法により検討したところ、PMSG の投与前では、莢膜細胞と間質細胞にのみ発現が認められたが、PMSG の投与により顆粒膜細胞で強く誘導されることが明らかとなった(図 3)。

ラット卵巣免疫組織化学

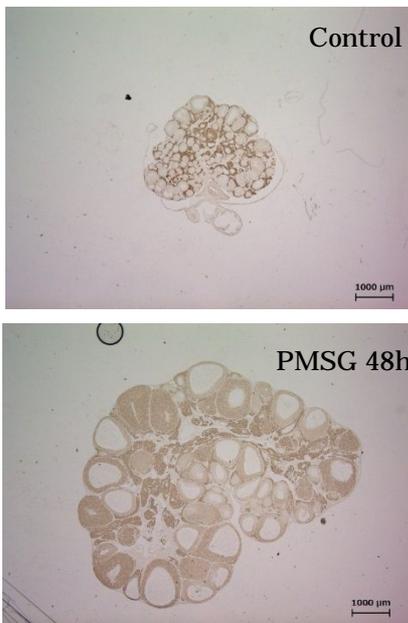


図 3

以上の結果から、Pref-1 は顆粒膜細胞において FSH 刺激によって強く誘導され卵胞液中に分泌されると考えられた。

(3) 卵巣機能における Pref-1 の役割の検討

卵胞液中に分泌された Pref-1 が卵胞の発育・分化やステロイドホルモン産生にどのような影響を与えるか検討するために、リコンビナントタンパク質の作製を試みた。GST タグ付きリコンビナントタンパク質を作製し(図 4) 初代培養顆粒膜細胞への影響を検討

した結果、ステロイドホルモン関連遺伝子の発現に影響を与えることが示唆された。本研究により、卵巣ステロイドホルモン合成の新たなメカニズムが解明され、PCOS をはじめとする卵巣ステロイドホルモン合成異常を伴う疾患の原因究明や新たな治療法の開発に繋がるものと期待される。

大腸菌を用いた Pref-1 タンパク質の作製

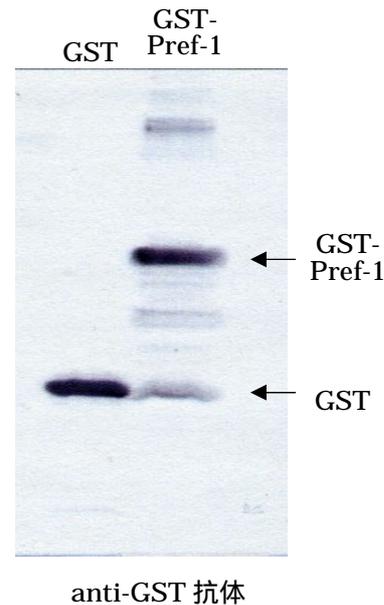


図 4

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 4 件 )

Yazawa, T., Imamichi, Y., Miyamoto, K., Khan, MR., Uwada, J., Umezawa, A., Taniguchi, T.: Regulation of Steroidogenesis, Development, and Cell Differentiation by Steroidogenic Factor-1 and Liver Receptor Homolog-1. *Zoolog. Sci.* 32, 323-330, 2015. DOI: 10.2108/zs140237. 査読有

Mizutani, T., Ishikane, S., Kawabe, S., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of genes related to progesterone production. *Endocrine Journal* 62,757-763, 2015. DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0260. 査読有

Mizutani, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Imamichi, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. *Molecular and Cellular Endocrinology* 408,133-137, 2015. DOI: 10.1016/j.mce.2014.11.019. 査読有

Kawabe, S., Mizutani, T., Ishikane, S., Martinez, M.E., Kiyono, Y., Miura, K., Hosoda, H., Imamichi, Y., Kangawa, K., Miyamoto, K., Yoshida, Y. : Establishment and characterization of a novel orthotopic mouse model for human uterine sarcoma with different metastatic potentials. Cancer Letters 366, 182-190, 2015. DOI:10.1016/j.canlet.2015.06.018. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

河邊真也, 水谷哲也, 石兼 真, 吉田好雄, 宮本 薫 : ヒト子宮肉腫の高肺転移モデルマウスの確立とその解析. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015,10,8-10, 名古屋市.

石兼 真, 細田洋司, 野尻 崇, 徳留 健, 水谷哲也, 河邊真也, 今道力敬, 宮本 薫, 宮里幹也, 寒川賢治 : 血管内皮細胞におけるアンジオテンシン シグナルは癌転移を増悪させる. 第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー. 2015,7,9-11, 福岡県柳川市.

石兼 真, 水谷哲也, 細田洋司, 徳留 健, 野尻 崇, 三浦浩一, 木村 亨, 河邊真也, 今道力敬, 宮里幹也, 寒川賢治, 宮本 薫 : 心房性ナトリウム利尿ペプチドのアンジオテンシン II 誘発メラノーマ肺転移増悪に対する抑制作用. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015,4,23-25, 東京.

水谷哲也, 河邊真也, 石兼 真, 松村健大, 今道力敬, 南野直人, 宮本 薫 : 卵巣における CNP 分子型の同定とその遺伝子発現調節. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015,4,23-25, 東京.

矢澤隆志, 今道力敬, 宮本 薫, 梅澤明弘, 谷口隆信 : ライディッヒ細胞における Cox-2 発現制御とプロスタグランジン産生. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015,4,23-25, 東京.

今道力敬, 矢澤隆志, 河邊真也, 石兼 真, 向井邦晃, 折坂 誠, 水谷哲也, 宮本 薫 : ヒトにおける 11-ケトテストステロンの合成と役割. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015,4,23-25, 東京.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1件)

名称 : 子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別する腫瘍マーカーの開発

発明者 : 水谷哲也, 宮本 薫, 河邊真也, 石兼 真, 吉田好雄, 福田 真, 山本 真

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特許出願 2015-152893

出願年月日 : 平成 27 年 7 月 31 日

国内外の別 : 国内

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://seika2.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮本 薫 (MIYAMOTO, Kaoru)

福井大学・医学部・教授

研究者番号 : 30125877