

令和元年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05142

研究課題名(和文) 活性化型・抑制型核内受容体による胎仔ライディッヒ細胞の分化機構

研究課題名(英文) Mechanism of differentiation of fetal Leydig cells by active and suppressive types of nuclear receptors

研究代表者

諸橋 憲一郎 (MOROHASHI, Ken-ichirou)

九州大学・大学院医学研究院・主幹教授

研究者番号：30183114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：精巣でテストステロン(男性ホルモン)産生を行うライディッヒ細胞の分化はAd4BPなどの転写因子やDHHなどの細胞増殖因子によって制御される。しかしながら、これらの因子による制御メカニズムには不明の点が多く残されていた。本研究では1細胞シークエンスによって新たにTmsb10を同定した。この因子はDHHによる刺激からAd4BPの発現上昇へと続くライディッヒ細胞の分化過程に介在することが明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ライディッヒ細胞の分化に不可欠な転写因子や細胞増殖因子は知られていたが、これらの知見は遺伝子ノックアウトの解析から得られた成果であった。そのため、これらの因子がどのようなメカニズムでライディッヒ細胞を分化させるかは不明であった。本研究は、この点に踏み込むことでライディッヒ細胞の分化メカニズムの理解へ向けた成果となった。

研究成果の概要(英文)：Differentiation of Leydig cells that produce testosterone (androgen) in the testis is regulated by transcription factors such as Ad4BP/SF-1 and growth factors such as DHH. However, the mechanisms for Leydig cell differentiation by these factors remains unclear. In the present study, we newly identified Tmsb10 by a single cell transcriptome study. This factor was demonstrated to work in the process of Leydig cell differentiation from DHH stimulation to enhanced expression of Ad4BP.

研究分野：分子生物学

キーワード：胎仔精巣 ライディッヒ細胞 Ad4BP Tmsb10 DHH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の精巣には、男性ホルモンを合成するライディッチ細胞が存在する。男性ホルモンは動物個体のオス化や精子形成などの生殖能の確立・維持に必須であることから、ライディッチ細胞はオス化には欠かせない。我々はライディッチ細胞を EGFP でラベルしたマウス系統を樹立した結果、ライディッチ細胞の性質を明らかにするとともに、前駆細胞を同定した。

我々は、ライディッチ細胞や副腎皮質細胞に発現し、ステロイドホルモン産生に不可欠な遺伝子の転写を制御する核内受容体 Ad4BP を同定し、その機能解析を行ってきた。その結果、本因子は精巣、卵巣ならびに副腎皮質の形成に必須の役割を担うこと(文献1) 副腎皮質細胞ではほぼすべてのステロイド合成系遺伝子ならびに解糖系遺伝子を制御することを明らかにした(文献2)。これに対し、ARX や核内受容体 COUP-TFII はエネルギー代謝を抑制する可能性がある。細胞増殖因子の刺激によって活性化されるライディッチ細胞の分化に関する複数の因子の存在は知られているが、どのような機能を果たすのかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

DHH (デザートヘッジホック) などの細胞増殖因子はライディッチ細胞の分化を活性化し、最終的に Ad4BP の発現を上昇させる。しかしながら、この過程を制御するメカニズムは不明である。本研究では細胞増殖因子の刺激による Ad4BP の活性化を通じ、ライディッチ細胞が分化する過程を代謝に着目しつつ明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 前駆細胞ならびにライディッチ細胞のトランスクリプトームの取得

研究室ではライディッチ細胞が EGFP ラベルされたマウス系統を樹立している。この胎仔精巣から FACS にてライディッチ細胞とその前駆細胞を含む細胞集団を調製することができる。これらの細胞から RNA を調製し、次世代シーケンサーによってトランスクリプトームを取得した。

(2) 1細胞トランスクリプトーム取得

ライディッチ細胞の前駆細胞を含む細胞集団が複数の細胞より構成されると考えられたため、約 400 の細胞より 1細胞トランスクリプトームを取得した。遺伝子発現解析より、ライディッチ細胞に分化しつつあると思われる細胞集団(前駆細胞)の存在を確認した。

(3) 胎仔精巣の再構築培養系

前駆細胞集団と思われる細胞が実際に前駆細胞を含むかについては、これらの細胞がライディッチ細胞に分化することを示さなければならない。そこで、in vitro の胎仔精巣の再構築培養系を導入した(横浜市立大学小川教授より、文献3)。

4. 研究成果

(1) ライディッチ細胞と前駆細胞における遺伝子発現

ライディッチ細胞と前駆細胞集団を FACS にて調製しトランスクリプトームを取得した。両者の間で発現が異なる遺伝子を抽出した。その結果、予想通りにステロイドホルモン産生に必須の遺伝子発現が上昇していた。さらにこれらの遺伝子に加え、解糖系、TCA サイクル、酸化リン酸化に関する遺伝子の発現増加が認められた。実際に、酸素消費は大幅に増加していた。したがって、前駆細胞からライディッチ細胞へ分化するにあたってはエネルギー代謝が亢進すると考えられた。また分化に際し Ad4BP の発現量が増加するが、Ad4BP を対象とする CHIP-seq の結果では、本因子がステロイドホルモン産生や解糖系のみならず、NADPH やコレステロール産生に関する遺伝子を制御することが示された。

(2) ライディッヒ前駆細胞の確認

FACS によって調製した細胞集団にライディッヒ前駆細胞が含まれることを実験的に証明するため、マウス胎仔精巣の再構築培養を行なった。この精巣再構築培養系では精細管が構築され、管内にはセルトリ細胞と生殖細胞が、管外にはライディッヒ細胞とその他の間質細胞が分布する。ここに調製した EGFP 弱陽性の細胞集団を入れ、培養したところ、約 10 日を経過すると EGFP 強陽性のライディッヒ細胞が出現した。この結果より、この細胞集団にはライディッヒ細胞へ分化する前駆細胞が含まれることが示された。しかしながら、全ての細胞が分化することではなく、前駆細胞は集団に一部と考えられた。

(3) ライディッヒ前駆細胞を含む集団の 400 細胞を使い、1 細胞トランスクリプトームを取得した。その結果、特徴的な細胞集団の存在が明らかになった。これらの細胞集団に特徴的な発現を示す複数の遺伝子が同定された。Tmsb10 はその一つであり、アクチンモノマーに結合し、アクチン重合を阻害することで細胞の形態を制御する分子として報告された。さらに近年、この分子が Raf に結合することで Raf-Ras の結合を阻害し、Ras からの MAPK カスケードを阻害するとの報告もある。そこで、上記の精巣再構築培養系を用い Tmsb10 の機能を解析した。その結果、Tmsb10 をロックダウンした前駆細胞集団からはライディッヒ細胞は分化しなかった。また、DHH はライディッヒ細胞の分化に必要であることが KO マウスで示されていたが、精巣再構築培養系においてヘッジホッグシグナルを活性化するとライディッヒ細胞の分化が促進（短時間で分化）された。この時、Tmsb10 をロックダウンするとこの効果は消失した。したがって、Tmsb10 はヘッジホック刺激の下流で、Ad4BP 遺伝子の活性化へとつながる過程で機能することが示された。

(4) 我々は当初 Ad4BP の作用に対し、ARX や COUP-TFII が抑制的に働くことでライディッヒ細胞の分化を制御していると予想した。そこで、ARX と COUP-TFII ロックダウン実験を実施したが、残念ながらロックダウンがライディッヒ細胞の分化を促進することはなかった。

引用文献

- 1, Morohashi K, Omura T. FASEB J. 10, 1569-1577, 1996
- 2, Baba T, et al., Nature Commun 5, 3634, doi: 10.1038/ncomms4634, 2014
- 3, Yokonishi Tet al, Biol Repro 89, 1-6, 2013

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1, Three population of adult Leydig cells in mouse testes revealed by a novel mouse HSD3B1-specific rat monoclonal antibody
Yokoyama C, Chigi Y, Baba T, Ohshitanai A, Harada Y, Takahashi F, Morohashi K
BBRC 511, 916-920, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.100>
- 2, Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids.
Baba T, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon J-Y, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Sato R, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi M-H, Ohkawa Y, Morohashi K.
Communications Biology 1, 18, DOI: 10.1038/s42003-018-0020-z, 2018
- 3, Lysosomal activity maintains Ad4BP/SF-1 protein stability for proper steroidogenic cell growth.

Syu J-S, Baba T, Huang J-Y, Ogawa H, Hsieh C-H, Hu J-X, Chen T-U, Lin T-C,
Morohashi K, Huang B-M, Lu F-I, Wang C-Y

Scientific Report 7, 240, 2017, doi:10.1038/s41598-017-00393-4

- 4, Role of Ad4BP/SF-1 in regulating NADPH production in Y-1 cells
Li B, Baba T, Miyabayashi K, Sato T, Shima Y, Miura D, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi K.
Endocrine J 64, 315-324, 2017, <http://doi.org/10.1507/endocrj.EJ16-0467>
- 5, Alterations in fetal Leydig cell gene expression during fetal and adult development.
Miyabayashi K, Shima Y, Inoue M, Sato T, Baba T, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi K,
Sexual Development 11, 53-63, 2017, <https://doi.org/10.1159/000453323>
- 6, Differential lactate and cholesterol synthetic activities in XY and XX Sertoli cells
Shishido Y, Baba T, Sato T, Shima Y, Miyabayashi K, Inoue M, Akiyama H, Kimura H, Kanai Y,
Ishihara Y, Haraguchi S, Miyazaki A, Rozman D, Yamazaki T, Choi M-H, Ohkawa Y, Suyama
M, Morohashi K.
Scientific Rep 7:41912, DOI:10.1038/srep41912, 2017
- 7, Isolation and characterization of mouse fetal Leydig progenitor cells
Inoue M, Shima Y, Miyabayashi K, Sato T, Baba T, Ohkawa Y, Akiyama H, Suyama M,
Morohashi K
Endocrinology 157, 1222-1233, 2016, DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2015-1773>

〔学会発表〕(計 5件)

- 1、 18th International Congress of Endocrinology, Dec 1-4, 2018, Cape Town, South Africa, Symposium, Adrenal Steroids; new steroids, new functions, new therapies
Ad4BP/SF-1 more than a regulator of adrenal steroids
Ken Morohashi
- 2、 Ad4BP/SF-1 regulates differentiation and metabolic activation in fetal Leydig cells
Miki Inoue, Takashi Baba, Ken-ichirou Morohashi
Kona Hawaii 2018年4月17日
- 3、 第90回日本内分泌学会学術総会、シンポジウム、2017/04/21、京都
Ad4BPを介した細胞分化と代謝の強調的な遺伝子発現制御
井上 実紀、馬場 崇、諸橋 憲一郎
- 4、 ENDO 2017, Orlando, FL, USA, April 1-4, 2017
Symposium; Life history of Leydig and Sertoli cells
History of fetal Leydig cells
Ken-ichirou Morohashi
- 5、 第89回日本内分泌学会学術総会、シンポジウム5 性分化疾患：その基礎と臨床
2016年4月21日 京都 シンポジウム
栄養・代謝と性
馬場 崇、井上 実紀、諸橋 憲一郎

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutu/

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：井上 実紀

ローマ字氏名：Miki Inoue

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。