

令和元年6月6日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09798

研究課題名(和文) 新たなシグナル伝達系Hippo経路による卵巣機能調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulation of the ovarian function through the Hippo pathway

研究代表者

水谷 哲也 (Mizutani, Tetsuya)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：90322734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo pathwayは、細胞の増殖や器官サイズを制御するシグナル伝達系で、この経路が転写共役因子YAP/TAZの活性を調節する。卵巣顆粒膜細胞におけるYAP/TAZの役割について解析したところ、YAP/TAZがステロイドホルモン代謝酵素であるCYP19A1, CYP11A1, HSD3B2 (Hsd3b1)の発現を負に制御していることが見出された。さらにその抑制には転写因子TEADが関与していることを明らかにした。以上の結果から、卵巣顆粒膜細胞ではHippo pathway下流のYAP/TAZ-TEAD複合体がステロイド産生を抑制的に制御していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、新たなステロイドホルモン産生メカニズムが解明された。

これにより未だ不明なステロイドホルモン産生疾患の解明につながる可能性が示された。また、将来的に本研究から新しいステロイドホルモン産生疾患に対する治療法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Hippo pathway is an evolutionarily conserved signaling pathway that controls organ size by phosphorylating and inhibiting the transcription co-activators YAP/TAZ in mammals. To elucidate the role of YAP/TAZ in ovarian granulosa cells, the gain-of-function (using the constitutively active mutant) and the loss-of-function analyses (using the siRNA) of YAP/TAZ were performed. Gene expression of steroidogenic enzymes, CYP19A1, CYP11A1 and HSD3B2, were down-regulated by YAP/TAZ. Furthermore, the transcription factor TEAD is involved in YAP/TAZ-mediated these gene expressions. These results suggest that the YAP/TAZ-TEAD nuclear complex is novel negative regulator of steroidogenesis in ovarian granulosa cells.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：卵巣 顆粒膜細胞 ステロイドホルモン YAP TAZ

1. 研究開始当初の背景

排卵誘発剤低感受性の poor responder は、年齢に相関し増加するが 35 歳以下のどの年齢層でも約 10% 存在しており、不妊の原因に挙げられている。その理由のひとつは、ゴナドトロピン(LH および FSH)作用が卵巣で正常に機能しないためだと考えられる。申請者はゴナドトロピンの下流シグナルの新たな候補として Hippo pathway を発見し、卵胞発育の調節に重要だと考えている。

Hippo pathway は、細胞の増殖や器官サイズを制御するシグナル伝達系で、この経路が活性化すると転写共役因子 YAP/TAZ をリン酸化し核外に移行させ不活性化する。卵胞の発育期では、Hippo pathway の標的遺伝子である CTGF と CYR61 の発現量は非常に高く、CTGF の発現が卵胞発育に重要なことがノックアウトマウスの解析より明らかになっている。さらに申請者の予備実験より、FSH によって CTGF と CYR61 が顕著に発現抑制されることから、Hippo pathway を介した機能調節が示唆された。

本研究では、顆粒膜細胞における YAP/TAZ の解析を通して、新たな卵胞発育メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

- (1) 顆粒膜細胞におけるステロイドホルモン代謝酵素の遺伝子発現に対する YAP/TAZ の影響を明らかにする。
- (2) 転写共役因子 YAP/TAZ が相互作用する転写因子を明らかにする。

3. 研究の方法

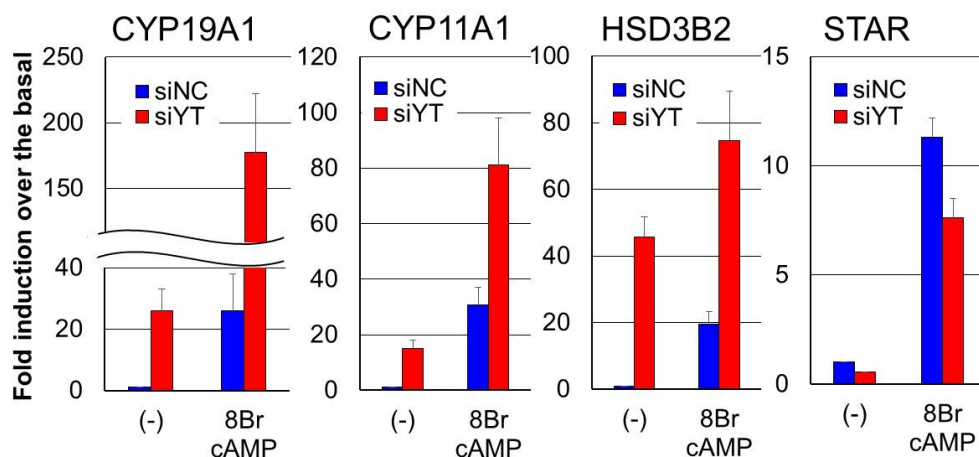
(1) 顆粒膜細胞におけるステロイドホルモン代謝酵素の遺伝子発現に対する YAP/TAZ の役割
ヒト卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞および初代培養卵巣顆粒膜細胞を用いて、YAP 恒常性活性化型のアデノウイルス過剰発現系を構築し、それらの過剰発現によるステロイドホルモン産生酵素の遺伝子発現への影響を明らかにする。さらに YAP/TAZ ノックダウン系を確立し、遺伝子発現への影響を明らかにする。また、CYP19A1 プロモーター領域を用いたレポーターアッセイにより、転写活性に対する役割を解析する。

(2) 転写共役因子 YAP/TAZ が相互作用する転写因子の解析

YAP/TAZ と相互作用することが知られている転写因子 TEAD について、ヒト卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞を用いて、TEAD ノックダウン系を確立し、ステロイドホルモン産生酵素の遺伝子発現への影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 顆粒膜細胞におけるステロイドホルモン代謝酵素の遺伝子発現に対する YAP/TAZ の役割
KGN 細胞を用いて YAP/TAZ ノックダウンの影響を検討したところ、CYP19A1, CYP11A1, HSD3B2 の発現の誘導が認められた (図 1)。



8Br-cAMP: 0.5 mM for 24 h

図 1 ヒト顆粒膜細胞由来 KGN 細胞において、YAP/TAZ ノックダウンによりステロイドホルモン代謝酵素の発現が誘導される

cAMP 刺激時に YAP の恒常性活性化型である 5SA-YAP を強制発現させると、これらの遺伝子発現は抑制された。このことから YAP/TAZ はステロイドホルモン代謝酵素の遺伝子発現を負に制御する因子であることが示された。さらに CYP19A1 遺伝子の卵巣型プロモーター領域(P11)約 2 kb を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、遺伝子発現様式と同様に YAP/TAZ ノックダウンによってルシフェラーゼ活性は上昇し、5SA-YAP の導入によりその活性は抑制された。以上の結果から、YAP/TAZ は転写レベルで CYP19A1 の発現を制御する因子の 1 つであることが示された。

また、初代培養ラット卵巣顆粒膜細胞に 5SA-YAP を導入して、細胞増殖や遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、これらの細胞への 5SA-YAP の導入により、細胞増殖の促進が認められた。また、5SA-YAP の遺伝子発現に対する影響を検討したところ、ステロイドホルモン代謝酵素 CYP19A1, CYP11A1, HSD3B1 遺伝子の発現が 5SA-YAP の導入により発現が抑制された。

以上の結果から、顆粒膜細胞において YAP(TAZ)は細胞の増殖を促進しステロイドホルモン産生を抑制する重要な因子であると考えられた。

(2) 転写共役因子 YAP/TAZ が相互作用する転写因子の解析

KGN 細胞を用いて TEAD ノックダウンの影響を検討したところ、YAP/TAZ のノックダウンと同様、YAP/TAZ 標的遺伝子である CTGF, CYR61 が発現抑制される一方で、ステロイドホルモン代謝酵素 CYP19A1, CYP11A1, HSD3B2 が発現誘導された。KGN 細胞におけるステロイドホルモン代謝酵素の発現抑制に、YAP/TAZ と TEAD の相互作用が及ぼす影響を検討する目的で、TEAD ノックダウン細胞に YAP の恒常性活性化型である 5SA-YAP を強制発現した。その結果、コントロール細胞では 5SA-YAP を強制発現すると、8Br-cAMP 誘導性の CYP19A1, CYP11A1, HSD3B2 発現が著しく抑制される一方、TEAD ノックダウン細胞に 5SA-YAP を強制発現したところ、CYP19A1, CYP11A1, HSD3B2 の発現抑制は観察されなかった。

これらの結果から、卵巣顆粒膜細胞では Hippo pathway 下流の YAP/TAZ-TEAD 複合体がステロイドホルモン産生を抑制的に制御しており、FSH はこの抑制を解除することでステロイドホルモン産生を促進する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hattori K, Orisaka M, Fukuda S, Tajima K, Yamazaki Y, Mizutani T, Yoshida Y: Luteinizing Hormone Facilitates Antral Follicular Maturation and Survival via Thecal Paracrine Signaling in Cattle. *Endocrinology* 159: 2337-2347, 2018 査読有 doi: 10.1210/en.2018-00123.

Ishikane S, Hosoda H, Nojiri T, Tokudome T, Mizutani T, Miura K, Akitake Y, Kimura T, Imamichi Y, Kawabe S, Toyohira Y, Yanagihara N, Takahashi-Yanaga F, Miyazato M, Miyamoto K, Kangawa K: Angiotensin II promotes pulmonary metastasis of melanoma through the activation of adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 154: 136-147, 2018 査読有 doi: 10.1016/j.bcp.2018.04.012.

〔学会発表〕(計 7 件)

水谷 哲也, 河邊 真也, 折坂 誠, 森近 梨里子, 山田 雅己, 吉田 好雄, 宮本 薫: Hippo pathway による卵巣顆粒膜細胞におけるステロイド代謝酵素の発現調節. 第 23 回日本生殖内分分泌学会学術集会. 2018, 12, 14-15, 福岡.

Sawamura H, Maeno M, Yamada M, Mizutani T, Nishimura K: Development of new rapid diagnostic system for differential diagnosis of uterine sarcoma. 日本化学会 第 98 春季年会. 2018, 3, 20-23, 船橋.

水谷 哲也, 前野 光生, 山田 雅己, 西村 研吾: 子宮肉腫の鑑別のための新規高感度診断システムの開発. 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). 2017, 12, 6-9, 神戸.

水谷 哲也: (教育講演) 遺伝子発現を介したステロイドホルモン産生調節メカニズム. 第 90 回日本内分分泌学会学術総会. 2017, 4, 20-22, 京都.

Mizutani T: Transcriptional regulation of genes related to steroidogenesis in the ovary. International Symposium of Reproduction and Metabolism. 2016, 10 1-2, Taipei.

水谷哲也: 遺伝子発現を介したステロイドホルモン合成の制御機構の解明. 第 34 回内分分泌・代謝学サマーセミナー. 2016, 7, 14-16, 久山.

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, 豊平 由美子, 柳原 延章, 宮里 幹也, 宮本 薫, 寒川 賢治: アンジオテンシン II による血管内皮細胞を介した血行性癌転移増悪機構の解明 第 89 回日本内分分泌学会学術総会. 2016, 4, 21-23, 京都.

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：全血液検体を用いる子宮肉腫診断のための迅速測定法
発明者：山田 雅己、水谷 哲也、吉田 好雄、前野 光生、西村 研吾
権利者：同上
種類：特許
番号：2017-148278
出願年：2017 年
国内外の別：国内

名称：尿検体を用いる子宮肉腫診断のための迅速測定法
発明者：山田 雅己、水谷 哲也、吉田 好雄、前野 光生、西村 研吾
権利者：同上
種類：特許
番号：2017-148285
出願年：2017 年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/cell-biology/>

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。