

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19375

研究課題名(和文)性維持システムに変革をもたらす細胞の特定

研究課題名(英文)Identification of cells that control gonadal sex stability

研究代表者

佐々木 純子(Sasaki, Junko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：30333371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に作製した組織特異的リン脂質代謝酵素欠損マウス(ITG-cre LKOマウス)は、生後約2週から卵巣の顆粒膜細胞層にセルトリ細胞様細胞が出現し、ITG-cre LKO雌マウスは不妊であることを見出した。卵巣移植やレポーターマウスを用いた解析、および質量分析法による脂質動態解析の結果、顆粒膜層に一過的に出現する細胞が責任細胞であること、さらにその細胞におけるリン脂質代謝が卵巣の性を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により見出した卵巣顆粒膜層に一過的に存在する細胞およびその細胞におけるリン脂質代謝が卵巣の性を制御するという知見は、学術的に新規の知見である。また、ITG-cre LKO雌マウスは不妊であることから、本研究の成果は早発卵巣不全の病因という医学的に重要な知見を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)： We made the conditional knockout mice lacking the phospholipid metabolizing enzymes (ITG-cre LKO mice) and found that in ITG-cre LKO XX gonads, Sertoli-like cells begin to appear at about 2 weeks of age. By ovarian transplantation and validation of Cre gene expression using Cre-reporter mice, we revealed that the cells emerged in granulosa layer transiently can regulate female gonadal sex stability through phospholipid metabolism.

研究分野：脂質生化学

キーワード：性分化 細胞内シグナル伝達

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

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の性分化は、性的に未分化な胎児性腺の支持細胞において開始される。Y 染色体上の精巣決定遺伝子 Sry (Sex-determining region Y) が発現した場合は雄型のセルトリ細胞に、発現しない場合は雌型の顆粒膜細胞へと分化する。その後、生殖細胞を含む種々の細胞の性分化が誘導され、精巣または卵巣が発達してくる。この発生過程で決定した支持細胞の性は、出生後もそのまま安定して発現するわけではないことが明らかになってきた。出生後の顆粒膜細胞では Esr (エストロゲン受容体) や Foxl2 (Forkhead 型転写因子) が、セルトリ細胞では Sox9 (HMG ボックス型転写因子) や Dmrt1 (DM ドメイン転写因子) が、互いの発現を抑制しながら支持細胞の性を維持している。即ち一見性分化が終了し、卵巣や精巣が形成された後でも、雌に維持されなければ雄になり、雄に維持されなければ雌になるという、2 つのいずれかの性を担保する支持細胞自律的な機構が備わっていると考えられている。

2. 研究の目的

インテグリンのプロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現する Cre マウス (ITG-cre マウス) を用いて、リン脂質代謝酵素欠損マウス (ITG-cre LKO マウス) を作製したところ、生後約 2 週から卵巣の顆粒膜細胞層にセルトリ細胞様細胞が出現し、ITG-cre LKO 雌マウスは不妊であることを見出した。一般的に ITG-cre マウスは、ミエロイド系細胞において Cre リコンビナーゼを発現するとされているため、ITG-cre LKO マウスにおけるセルトリ細胞様細胞の出現には、支持細胞以外の細胞が関与する可能性が示唆された。そこで本研究では ITG-cre LKO マウスにおけるセルトリ細胞様細胞の出現機構の解明を通して、卵巣の性を制御する新たな細胞を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 骨髄由来細胞の関与を明らかにするために、骨髄移植と卵巣移植を行った。
- (2) Cre リコンビナーゼ発現細胞を特定するとともに、Cre リコンビナーゼ発現細胞はセルトリ細胞様細胞を卵巣で出現させるエフェクター細胞として機能するのか、あるいは Cre リコンビナーゼ発現細胞自身がセルトリ細胞様細胞になるのかを明らかにするために、レポーターマウスを用いた解析を行った。
- (3) ITG-cre LKO マウスはリン脂質代謝酵素欠損マウスである。そこで卵巣におけるリン脂質動態を質量分析法により解析し、セルトリ細胞様細胞出現におけるリン脂質代謝の意義について解析した。

4. 研究成果

- (1) 骨髄移植と卵巣移植
BL/6 マウスに致死量の X 線照射を行い、全身性に GFP (green fluorescent protein) を発現するグリーンマウスの骨髄を移植したところ、正常な卵子や卵胞が消失してしまうことが判明した。そこで既報を参考に、低用量の X 線照射や薬剤 (ブスルファンとシクロホスファミド) 投与による方法で骨髄キメラマウスを作製したが、正常卵胞の消失や骨髄キメラ率の低レベル (1%以下) により解析が叶わなかった。そこで出生 2-4 日のコントロールマウスより卵巣を摘出し、卵巣を除去した ITG-cre LKO グリーンマウスに移植する卵巣移植実験を行った (図 1a)。移植 1 カ月後の卵巣切片を用いた組織学的解析の結果、セルトリ細胞様細胞の出現は認められなかった (図 1b)。一方、出生 2-4 日の ITG-cre LKO マウスより摘出した卵巣を、卵巣除去グリーンマウスに移植したところ (図 1c)、GFP 陰性のセルトリ細胞様細胞が出現した (図 1d)。以上の結果から、セルトリ細胞様細胞の出現に骨髄由来細胞は関与しないと考えられた。

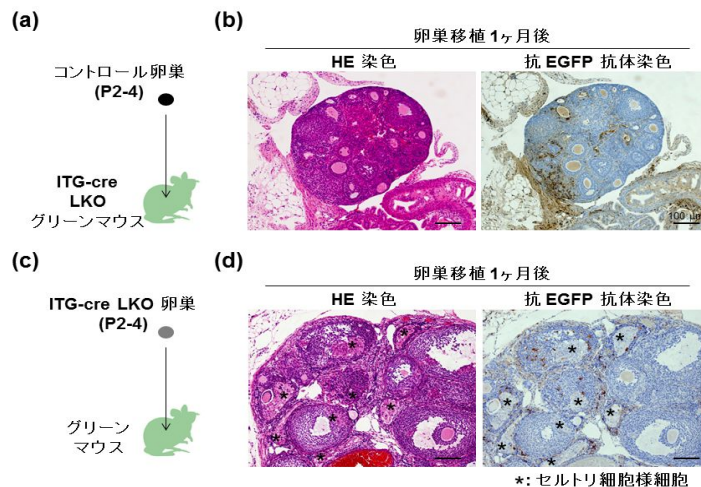


図1 卵巣移植

(2) レポーターマウスを用いた解析

上記(1)の卵巣移植の結果から、生後2-4日にはすでに卵巣に存在する細胞が、セルトリ細胞様細胞の出現に関与すると考えられた。この細胞を特定するために、Cre リコンビナーゼの発現に伴い YFP (yellow fluorescent protein) 発現が誘導される ROSA26 reporter マウス (R26R マウス) を利用した。交配により ITG-cre R26R マウスを作成し、生後0日から2ヶ月にかけての経時的な卵巣組織切片を作製した。抗 YFP 抗体による免疫組織学的解析の結果、YFP 陽性細胞は生後7日から卵胞に出現し増加するものの、その後徐々に減少して生後2か月にはほぼ消失することを見出した。一方、ITG-cre LKO R26R マウスでは、コントロールマウスのような減少は認められず、2ヶ月以降も YFP 陽性細胞は残存した。そしてセルトリ細胞様細胞は YFP 陽性であった。

(3) リン脂質動態

卵巣におけるリン脂質動態について質量分析法により解析したところ、コントロール卵巣に比べ LKO 卵巣では、細胞内シグナル伝達脂質である PI(3,4,5)P3 量が増加していた。さらに PI(3,4,5)P3 のターゲット分子の一つであるセリン/スレオニンキナーゼ Akt のリン酸化が亢進した(図2)。一般的に Akt の活性化は細胞の生存を導くことから、ITG-cre LKO R26R マウスにおける YFP 陽性細胞の残存は、Akt の活性化亢進に起因することが示唆された。現在、ITG-cre LKO マウスと Akt 欠損マウスとを交配し、セルトリ細胞様細胞の出現における Akt の関与について解析を進めている。

以上本研究により、顆粒膜層に一過的に出現する細胞が、リン脂質代謝を通して、卵巣の性を制御していることが明らかとなった。

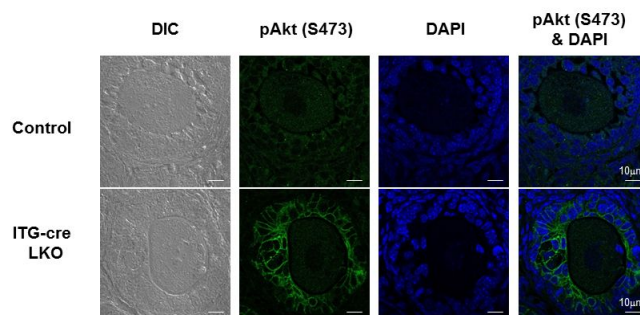


図2 Akt の活性化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Takemasu Shinya, Ito Masaki, Morioka Shin, Nigorikawa Kiyomi, Kofuji Satoshi, Takasuga Shunsuke, Eguchi Satoshi, Nakanishi Hiroki, Matsuoka Isao, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Hazeki Kaoru. Lysophosphatidylinositol acyltransferase 1 is involved in cytosolic Ca²⁺ oscillations in macrophages. *Genes Cells*, 査読有、24(5)、2019、366-376、doi: 10.1111/gtc.12681

Fujioka Yoichiro, Satoh Aya, Horiuchi Kosui, Fujioka Mari, Tsutsumi Kaori, Sasaki Junko, Nepal Prabha, Kashiwagi Sayaka, Paudel Sarad, Nishide Shinya, Nanbo Asuka, Sasaki Takehiko, Ohba Yusuke. A Peptide Derived from Phosphoinositide 3-kinase Inhibits Endocytosis and Influenza Virus Infection. *Cell Structure and Function*, 査読有、44、2019、61-74、doi: 10.1247/csf.19001

Liggins Marc C., Flesher Jessica L., Jahid Sohail, Vasudeva Priya, Eby Victoria, Takasuga Shunsuke, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Boissy Raymond E., Ganesan Anand K. PIKfyve regulates melanosome biogenesis. *PLoS Genetics*, 査読有、14、2018、e1007290、doi: 10.1371/journal.pgen.1007290

Malek M, Kielkowska A, Chessa T, Anderson K E., Barneda D, Pir P, Nakanishi H, Eguchi S, Koizumi A, Sasaki J, Juvin V, Kiselev VY., Niewczas I, Gray A, Valayer A, Spensberger D, Imbert M, Felisbino S, Habuchi T, Beinke S, Cosulich S, Le Novere N, Sasaki T, Clark J, Hawkins PT, Stephens LR. PTEN Regulates PI(3,4)P₂ Signaling Downstream of Class I PI3K. *Molecular Cell*, 査読有、68、2017、566~580.e10、doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.024

Kimura Hirotaka, Matsuyama Yasushi, Araki Sachiko, Koizumi Atsushi, Kariya Yumi, Takasuga

Shunsuke, Eguchi Satoshi, Nakanishi Hiroki, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko. The effect and possible clinical efficacy of in vivo inhibition of neutrophil extracellular traps by blockade of PI3K-gamma on the pathogenesis of microscopic polyangiitis. Modern Rheumatology、査読有、28、2017、530-541、doi: 10.1080/14397595.2017.1367116

Shindou Hideo, Koso Hideto, Sasaki Junko, Nakanishi Hiroki, Sagara Hiroshi, Nakagawa Koh M, Takahashi Yoshikazu, Hishikawa Daisuke, Iizuka-Hishikawa Yoshiko, Tokumasu Fuyuki, Noguchi Hiroshi, Watanabe Sumiko, Sasaki Takehiko, Shimizu Takao. Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. Journal of Biological Chemistry、査読有、292、2017、12054-12064、doi: 10.1074/jbc.M117.790568

Iizuka-Hishikawa Yoshiko, Hishikawa Daisuke, Sasaki Junko, Takubo Keiyo, Goto Motohito, Nagata, Katsuyuki, Nakanishi Hiroki, Shindou Hideo, Okamura Tadashi, Ito Chizuru, Toshimori Kiyotaka, Sasaki Takehiko, Shimizu Takao. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. Journal of Biological Chemistry、査読有、292、2017、12065-12076、doi: 10.1074/jbc.M117.791277

〔学会発表〕(計 3件)

Junko Sasaki, Molecular mechanisms of phosphoinositide signaling. 9th FAOPS Congress (国際学会)、2019

Takehiko Sasaki, Hiroki Nakanishi, Satoshi Eguchi and Junko Sasaki, INPP4B is a tumor suppressor in the context of PTEN insufficiency by modulating the levels of PI3K lipid products. International Symposium on Imaging Frontier 2017 (国際学会)、2017

佐々木純子、中西広樹、刈屋佑美、江口賢史、佐々木雄彦、イノシトールリン脂質クオリティとシグナル伝達。第69回日本細胞生物学会大会、2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：金井 克晃

ローマ字氏名：(KANAI, yoshiakira)

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。