

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07378

研究課題名(和文) 精巣ライディッヒ細胞における胎仔期分化記憶保持の分子基盤解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis of fetal differentiation memory retention in testicular Leydig cells

研究代表者

嶋 雄一 (Shima, Yuichi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：80425420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含む哺乳類では、胎仔期の精巣にライディッヒ細胞が出現し、男性ホルモンの産生を通じて胎仔のオス化を促す。胎仔ライディッヒ細胞は出生前後にいったん未分化状態に逆戻りし、その後思春期に至ると、再びライディッヒ細胞へと分化し、大量の男性ホルモンを産生することで、オスの生殖機能が成熟する。胎仔期のライディッヒ細胞は、未分化な状態に戻った時にも、ライディッヒ細胞としての分化の記憶を保持していると考えられることから、本研究では、分化の記憶がどのようにして保持されるのかを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精巣ライディッヒ細胞の機能不全は、男性不妊症を引き起こすのみならず、更年期男性における男性ホルモンの低下(LOH症候群、性機能の低下に加え、意欲の低下やうつ症状も引き起こす)の原因ともなることから、男性の生活の質を低下させる原因となり得る。本研究の成果は、胎児期の環境(母体の喫煙や飲酒、環境物質への暴露など)が、どのような機構で、成熟男性の男性ホルモン低下を引き起こすのかを明らかにする手がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In mammals, including humans, Leydig cells appear in the testis during the fetal period and promote masculinization of the fetus through the production of androgens. Fetal Leydig cells once revert to an undifferentiated state at around birth, and then differentiate into Leydig cells again at puberty, producing large amounts of androgen, and male reproductive function matures. Since Leydig cells in the fetal period are considered to retain the memory of differentiation as Leydig cells even when they return to the undifferentiated state, we tried to clarify how is the memory of differentiation retained in Leydig cells.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：精巣 ライディッヒ細胞 分化記憶 脱分化 DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

男性ホルモンは生殖機能の獲得・維持に必須であり、その男性ホルモンの産生を担うのが、精巣間質に存在するライディッヒ細胞である。胎仔ライディッヒ細胞が産生する男性ホルモンは、胎仔の外生殖器のオス化や、脳におけるオス特異的な神経回路構築に必須である。一方、思春期以降に成獣ライディッヒ細胞が産生する大量の男性ホルモンは、骨や筋の肥大に加えて、精巣内で精子の成熟を促し、オス個体の生殖機能獲得に寄与する。

ライディッヒ細胞の機能分化のプロセスにおいて、核内受容体型の転写因子 NR5A1(Ad4BP、あるいは SF-1 と呼ばれる) がマスター因子として機能することがよく知られている。我々はこれまでに、*Nr5a1* 遺伝子上流領域に存在する胎仔ライディッヒ細胞特異的エンハンサーを同定し、胎仔ライディッヒ細胞を EGFP で標識したマウスや、胎仔ライディッヒ細胞で Cre を発現するマウスの作出に成功している。これらのマウスを用いた解析から、胎仔ライディッヒ細胞が出生後にいったん未分化な状態に逆戻り(脱分化)し、これらの細胞が思春期に至ると成獣ライディッヒ細胞へ再度分化する(再分化)現象を見出した。

多くの組織において、胎仔期の細胞と成獣期の細胞が異なる性質を示し、胎仔期と成獣期では異なる DNA メチル化パターンを示すことが報告されている。また、胎仔期の細胞において一度活性化された遺伝子発現制御領域(エンハンサー)の一部では、成獣期の細胞でも DNA 脱メチル化状態が保持されることが報告されている(Hon GC., *et al.*, *Nat Genetics* 45:1198-206, 2013)。上記をもとに、胎仔ライディッヒ細胞が脱分化・再分化を経て成獣ライディッヒ細胞へ変化する過程で、ライディッヒ細胞で発現する遺伝子領域のエピジェネティック修飾が保存されることにより、ライディッヒ細胞としての分化記憶が保持されると推論した。

2. 研究の目的

本研究では、上記の仮説に基づき、胎仔ライディッヒ細胞としての分化記憶の実態を分子レベルで明らかにすることを目的とした。胎仔ライディッヒ細胞が出生後に脱分化を起こすことから、新生仔精巣には、胎仔ライディッヒ細胞と脱分化によって生じた細胞が混在する。そこで、新生仔精巣の単一細胞解析を行い、遺伝子発現パターンによって胎仔ライディッヒ細胞の脱分化によって生じた細胞が識別可能か否かを検証する。また、*Nr5a1* 遺伝子の胎仔ライディッヒ細胞エンハンサー領域は、ライディッヒ細胞への分化に必須であることから、この領域のメチル化パターンを、胎仔ライディッヒ細胞、および胎仔ライディッヒ細胞の脱分化によって生じた細胞を用いて解析する。

3. 研究の方法

本研究では、上記の目的を達成するために、二つの研究をおこなった。一つは、胎仔ライディッヒ細胞と成獣ライディッヒ細胞の前駆細胞が混在する新生仔期の精巣を用いた単一細胞遺伝子発現解析であり、もう一つは、胎仔ライディッヒ細胞と成獣ライディッヒ細胞を用いた DNA メチル化解析である。

単一細胞解析を行うにあたり、*Nr5a1* 遺伝子の胎仔ライディッヒ細胞エンハンサー(fetal Leydig enhancer, FLE)を欠失するマウスを用いた。このマウスでは、胎仔ライディッヒ細胞における *Nr5a1* 遺伝子の発現が誘導されないため、胎仔ライディッヒ細胞が出現しない(Shima Y, *et al.*, *Development* 145:dev169136, 2018)。正常マウスと FLE 欠失マウス(10日齢)の精巣から細胞を調製し、10X Genomics 社のプラットフォームを用いて、各サンプルにつき1万細胞以上の細胞の遺伝子発現パターンを解析し、サンプル間で比較した。

FLE 領域のメチル化解析については、我々が以前に作出した FLE-Cre マウスと CAG-CAT-EGFP マウスのダブルトランスジェニックマウス(10日齢)の精巣から、胎仔ライディッヒ細胞、胎仔ライディッヒ細胞の脱分化によって生じた間質未分化細胞、および精細管周囲筋様細胞を回収し、bisulfite

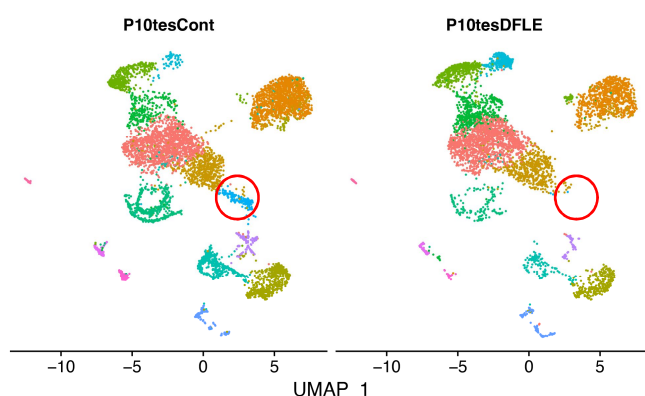


図-1: 10日齢精巣の単一細胞遺伝子発現解析

正常マウス(左)と FLE 欠失マウス(右)の10日齢精巣を取り出し、単一細胞解析を行なった。FLE 欠失マウスでは、胎仔ライディッヒ細胞のクラスター(赤丸)が消失していることが確認された。

細胞を回収し、bisulfite

sequence 法により、FLE 領域のメチル化を解析した。

4. 研究成果

新生仔精巣（10 日齢）を用いた単一細胞解析の結果、FLE 欠失マウスにおいて、胎仔ライディッヒ細胞のクラスターが消失していることを確認した（図-1）。胎仔ライディッヒ細胞以外の細胞種については、FLE 欠失マウスにおいて、将来の精子形成の基盤となる精子形成幹細胞の数が、正常マウスに比べて有意に減少していた。これ以外の細胞種については、細胞数や遺伝子発現パターンに明瞭な差異は認められなかった。以上の結果から、FLE 欠失により、胎仔ライディッヒ細胞の分化が完全に阻害されていることが確認された。また、胎仔ライディッヒ細胞の分化阻害により、精子形成幹細胞集団の形成が影響を受けることが示唆され、今後さらに詳細な解析が必要であると考えられた。一方、遺伝子発現パターンのみから、胎仔ライディッヒ細胞としての分化記憶の有無は検出できないことが示唆された。

FLE 領域の bisulfite sequence を行った結果、胎仔ライディッヒ細胞（FLC）では全く DNA メチル化が見られず、間質未分化細胞（peritubular cell）および精細管周囲筋様細胞・血管周皮細胞（PTMC/VP）では、それぞれ

6.8%、2.9%の低メチル化状態であった。FLC と peritubular cell、PTMC/VP の間に有意な差は認められなかった。一方、胎仔ライディッヒ細胞とは無関係な肝臓から調製した細胞（liver cell）では、60.9%の高メチル化状態であり、FLC、peritubular cell、PTMC/VP と有意な差を示した（図-2）。これらの結果から、胎仔ライディッヒ細胞、および胎仔ライディッヒ細胞の脱分化によって生じた細胞では、FLE 領域が低メチル化状態に保たれ、これが成獣ライディッヒ細胞へ再度分化する際の分化記憶として機能する可能性が推測された。

当初予想したとおり、FLE 領域の DNA メチル化が胎仔ライディッヒ細胞の分化記憶として機能する可能性が考えられたため、今後は、成獣ライディッヒ細胞を含めて DNA メチル化解析を行う必要がある。さらに、人為的に FLE 領域の DNA にメチル化を誘導した場合にどのような現象が生じるのかを、ゲノム編集技術を用いたモデルマウスの作出により、明らかにしていく予定である。

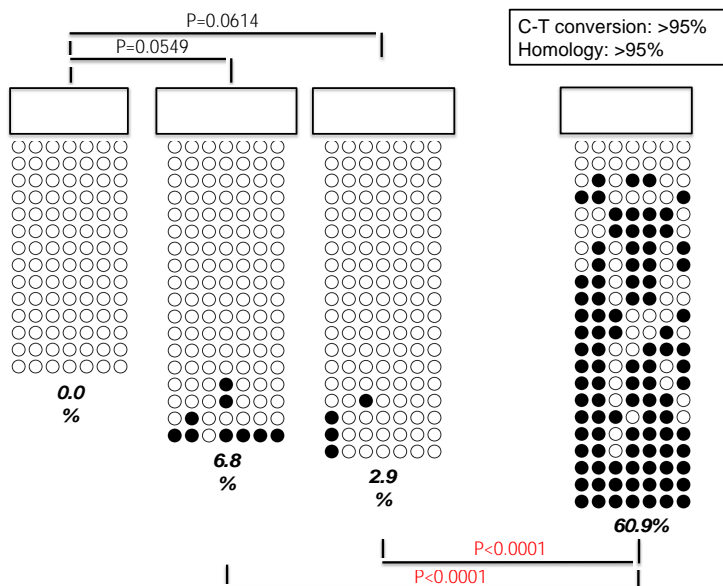


図-2: 10 日齢精巣から回収した細胞の DNA メチル化解析

10 日齢の精巣から回収した胎仔ライディッヒ細胞（FLC）、間質未分化細胞（peritubular cell）、筋様細胞・血管周皮細胞（PTMC/VP）および肝臓から調製した細胞（liver cell）を用いて、FLE 領域の DNA メチル化解析を行なった。その結果、FLC、peritubular cell、PTMC/VP では、FLE 領域が低メチル化状態であり、FLC と無関係の liver cell においては、高メチル化状態であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kikusui Takefumi, Shima Yuichi, Sonobe Miku, Yoshida Yuuki, Nagasawa Miho, Nomoto Kensaku, Mogi Kazutaka	4. 巻 0
2. 論文標題 Testosterone regulates the emission of ultrasonic vocalizations and mounting behavior during different developmental periods in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Psychobiology	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dev.22045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuichi Shima	4. 巻 18
2. 論文標題 Development of fetal and adult Leydig cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 323-330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12287.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嶋雄一
2. 発表標題 Nr5a1遺伝子下垂体エンハンサー欠損マウスの解析
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嶋雄一
2. 発表標題 胎仔ライディッヒ細胞の機能および細胞系譜の解明
3. 学会等名 第28回日本ステロイドホルモン学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶋雄一
2. 発表標題 精巢ライディッヒ細胞の分化メカニズム解明
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶋雄一
2. 発表標題 ゲノム編集により作出したNr5a1遺伝子下垂体エンハンサー欠損マウスの解析
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋雄一
2. 発表標題 Elucidation of stage-specific roles of androgens in masculinization of mammals
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋雄一
2. 発表標題 哺乳類における精巢ライディッヒ細胞の分化と男性化のメカニズム
3. 学会等名 第35回前立腺シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本小児泌尿器科学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 368
3. 書名 小児泌尿器科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学 解剖学教室 http://www.kawasaki-m.ac.jp/anatomy/ 久留米大学医学部 解剖学講座 顕微解剖・生体形成部門 https://www.med.kurume-u.ac.jp/med/anat2/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------