

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08987

研究課題名(和文)性腺内の副腎性腺前駆細胞の同定と副腎皮質へのリプログラミング機序の解明

研究課題名(英文)Identification of adrenogonadal progenitor cells in the gonads which can be reprogrammed into adrenal steroidogenic cells

研究代表者

石井 智弘 (ISHII, Tomohiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：70265867

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)：本研究は、精巣と副腎皮質におけるステロイドホルモン生合成細胞間のリプログラミングによる相互代償機構の解明を目指し、副腎を摘出した野生型マウスのグルココルチコイド産生能を内分泌学的(コルチコステロン産生能)かつ遺伝学的(トランスクリプトーム)に解析した。本研究の結果から、副腎摘出後の成獣マウスの精巣では、胎生期ないし新生仔期とは異なり、グルココルチコイド産生細胞へのリプログラミングが起こりにくいことが判明した。精巣におけるグルココルチコイド産生細胞へのリプログラミングには臨界期が存在することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性腺と副腎皮質のステロイドホルモン産生細胞間のリプログラミングを示す種々の研究結果がマウスを使用した研究で集積されている。その多くが胎生期の研究である。本研究は、このリプログラミングが成獣期のマウスでは生じにくいことを初めて示した。この結果により、精巣のステロイドホルモン産生細胞のリプログラミング能には臨界期が存在することが示唆され、間葉系幹細胞から副腎のステロイドホルモン産生細胞へ分化させる再生医療研究のためには、胎生期ないし新生仔期の精巣を解析する必要があると示唆される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to define where adrenogonadal progenitor cells are located in the testis and what mechanism the progenitor cells initiate transdifferentiation into adrenal steroidogenic cells. The study endocrinologically and genetically analyzed the ability of corticosterone production and the transcriptome of the testis in adrenalectomized mice. The results of the study indicate that the transdifferentiation is not induced in testis of adult mice compared with that of fetal or neonatal mice and suggest that the transdifferentiation could happen only during the critical period.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：ステロイドホルモン リプログラミング 副腎 精巣

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

性腺と副腎皮質は共通の副腎性腺原基から発生し、ステロイドホルモン合成に関わる酵素や輸送蛋白を一部で共有している。実際に、性腺および副腎皮質の分化に異常を来たず SF1 異常症や DAX1 異常症、性腺および副腎皮質双方のステロイドホルモンの合成に異常を来たず先天性リポイド副腎過形成症や 17-水酸化酵素欠損症がヒトの疾患として同定されている。21-水酸化酵素欠損症や 11-水酸化酵素欠損症では、性腺に副腎皮質組織が迷入して残存する精巣副腎残存腫瘍 (TART) や卵巣副腎残存腫瘍 (OART) が報告されていて、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の作用過剰との関連が示唆されている。以上より、正常の発生過程のみならず病態生理においても、性腺と副腎皮質のステロイド産生細胞は密接に関連していると言える。

近年、性腺と副腎皮質の細胞間のリプログラミングの可能性を示唆する研究が複数で報告されている。Bandiera ら<sup>1)</sup>は、マウスの成獣の副腎皮質で副腎性腺原基様の前駆細胞が副腎被膜下に存在していること、WT1 (Wilms tumor 1) のアイソフォームの1つが前駆細胞を維持し副腎皮質ステロイドホルモン産生細胞への分化を抑制していること、性腺摘出により WT1 陽性の前駆細胞が性腺ステロイドホルモン産生細胞への分化傾向を示すこと、を報告した。また、Val ら<sup>2)</sup>は、マウスの中腎から精巣間質に前駆細胞が遊走し ACTH に反応して副腎皮質ステロイドホルモン産生細胞への分化傾向を示すこと、この前駆細胞は胎児型 Leydig 細胞とは異なる遺伝子発現パターンを示すこと、を報告した。Padua ら<sup>3)</sup>は、*Nr5a1-Cre* トランスジーンを用いた *Gata4* と *Gata6* のコンディショナルノックアウト雄マウスの精巣間質に副腎皮質様の細胞が存在すること、副腎皮質機能低下にもかかわらず雌マウスに比べて雄マウスがある程度生存可能なこと、を報告した。これらの結果は、少なくともマウスの胎児精巣と副腎皮質では、副腎性腺原基様の前駆細胞が存在しうること、ステロイドホルモン産生細胞がお互いの機能を代償するようにリプログラミングしうることを示唆している。しかし、精巣間質における前駆細胞の同定やリプログラミングの機序は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 精巣内においてリプログラミングする副腎性腺原基様の前駆細胞の同定と分子遺伝学的特徴の解明、2) リプログラミングの誘導因子と分子遺伝学的機序を解明することである。

現在までに、性腺と副腎皮質のステロイドホルモン産生細胞間のリプログラミングによる相互代償機構の解明を目指した研究は存在しない。本研究の成果で相互代償機構の存在、その分子遺伝学的メカニズムが明らかになれば、間葉系幹細胞を副腎皮質および性腺のステロイドホルモン産生細胞へ分化させる再生医療研究への応用が期待できる。

### 3. 研究の方法

成獣雄マウスの副腎摘出後の精巣におけるグルココルチコイド産生能について検討した。8週齢の野生型 (C57Bl/6J) 雄マウスに偽手術 (開腹し、副腎被膜を同定後に閉腹) を行った A 群、両側副腎を摘出した B 群、両側副腎と精巣を摘出した C 群の三群に分け、生理食塩水を飲水として投与し、16週齢までの体重の変化、16週時点の血中 ACTH 濃度、ACTH 負荷試験前後の血清コルチコステロン濃度を測定した。A 群と B 群においては、精巣内コルチコステロン濃度測定および精巣のトランスクリプトーム解析を行った。

ACTH 濃度は ELISA 法により、コルチコステロン濃度は液体クロマトグラフ・タンデム質量分析法 (LC/MSMS) のより測定した。ACTH 負荷試験については、腹腔内に ACTH を投与した 60 分後と投与前の血清コルチコステロン濃度の差で評価した。精巣内コルチコステロン濃度については、組織ホモジネートから無水ジエチルエーテルで抽出後に LC/MSMS により測定した。精巣のトランスクリプトームについては、HiSeq 2500 (Illumina Inc. San Diego, CA) で RNA シーケンスデータを収集し、Genedata Profiler Genome (Genedata, Basel, Switzerland) で解析した。

### 4. 研究成果

A 群雄マウス (N=4)、B 群雄マウス (N=4)、C 群雄マウス (N=4) は全例が生存し、各群間で体重増加に有意差は認められなかった。血漿 ACTH 濃度は、A 群:  $345.1 \pm 54.3$  pg/mL、B 群:  $2948.6 \pm 2161.1$  pg/mL、C 群:  $2286.8 \pm 1790.9$  pg/mL であった。B 群と C 群の血漿 ACTH 濃度は A 群に比較して有意に上昇していた。B 群と C 群の血漿 ACTH 濃度の間には、有意差は認められなかった。血清コルチコステロン濃度は、A 群:  $126.92 \pm 16.11$  ng/mL、B 群:  $4.20 \pm 3.38$  ng/mL、C 群:  $13.85 \pm 8.45$  ng/mL であった。B 群と C 群の血清コルチコステロン濃度は A 群に比較して有意に低下していた。B 群と C 群の血清コルチコステロン濃度の間には、有意差は認められなかった。ACTH 負荷試験による血清コルチコステロン濃度の上昇は、A 群  $46.92 \pm 9.32$  ng/mL、B 群:  $1.53 \pm 1.65$  ng/mL、C 群:  $4.00 \pm 4.39$  ng/mL であった。B 群と C 群の血清コルチコステロン濃度の上昇は A 群に比較して有意に不良であった。B 群と C 群

の血清コルチコステロン濃度の上昇には、有意差が認められなかった。精巣内コルチコステロン濃度は、A群:  $23.49 \pm 3.22$  ng/g 組織、B群:  $1.11 \pm 0.88$  ng/g 組織であった。B群の精巣内コルチコステロン濃度はA群に比較して有意に低下していた。RNA シーケンスでは、A群とB群の間でコルチコステロン生合成に関連する遺伝子の発現量に有意差はみられなかった。

副腎摘除群と副腎・性腺摘除群の血漿 ACTH 濃度は有意に高値、血清 CS 濃度は有意に低値であったが、副腎摘除群と副腎・性腺摘除群の間には有意差がみられなかった。副腎摘除群と副腎・性腺摘除群の ACTH 負荷試験における血清コルチコステロン濃度の上昇はどちらも不良であったが、副腎摘除群と副腎・性腺摘除群の間には有意差がみられなかった。副腎摘除群の精巣においては、コルチコステロン生合成に関わる副腎特異的な遺伝子の発現上昇は見られなかった。これらの結果は、副腎摘出後の成獣マウスの精巣では、胎生期とは異なり、グルココルチコイド産生細胞へのリプログラミングが起こりにくいことを示唆する。このことは、精巣のステロイドホルモン産生細胞のリプログラミング能には臨界期が存在することを示唆している。よって、間葉系幹細胞から副腎のステロイドホルモン産生細胞へ分化させる再生医療研究のためには、胎生期ないし新生仔期の精巣を用いた解析が必要と考える。

(文献) 研究代表者を下線で示す。

- 1) Bandiera R, et al. *Developmental Cell* 2013;27:5-18
- 2) Val P, et al. *Dev Biol* 2006;299:250-256
- 3) Padua MB, et al. *Endocrinology* 2015;156:1873-1886
- 4) Mizuno Y, Ishii T, et al. *Endocrinology* 2019; 160: 331-338
- 5) Sasaki G, Ishii T, et al. *Molecular Endocrinology* 2008;22:951-964
- 6) Ishii T, et al. *Endocrinology* 2012;153:2714-2723
- 7) Shima Y, et al. *Molecular Endocrinology* 2013;27:63-73

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ishii T, Tajima T, Kashimada K, Mukai T, Tanahashi Y, Katsumata N, Kanno J, Hamajima T, Miyako K, Ida S, Hasegawa T	4. 巻 105
2. 論文標題 Clinical Features of 57 Patients with Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia: Criteria for Nonclassic Form Revisited.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 1870-1879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/clinem/dgaa557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka K, Sato Y, Hoshi S, Koguchi T, Ogawa S, Ishii T, Haga N, Hasegawa T, Kojima Y	4. 巻 3
2. 論文標題 Congenital lipoid adrenal hyperplasia: Immunohistochemical study of testosterone synthesis in Leydig cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology Case Report	6. 最初と最後の頁 53-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iju5.12142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii Tomohiro, Hori Naoaki, Amano Naoko, Aya Misaki, Shibata Hirotaka, Katsumata Noriyuki, Hasegawa Tomonobu	4. 巻 3
2. 論文標題 Pubertal and Adult Testicular Functions in Nonclassic Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia: A Case Series and Review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 1367 ~ 1374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/js.2019-00086	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 Mizuno Yusuke, Ishii Tomohiro, Hasegawa Tomonobu	4. 巻 160
2. 論文標題 In Vivo Verification of the Pathophysiology of Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia in the Adrenal Cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 331 ~ 338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2018-00777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatabu Naomi, Amano Naoko, Mori Jun, Hasegawa Yukihiro, Matsuura Hiroki, Sumitomo Naofumi, Nishizawa Kazumichi, Suzuki Mariko, Katakura Satomi, Kanamoto Naokazu, Kamimaki Tsutomu, Ishii Tomohiro, Hasegawa Tomonobu	4. 巻 104
2. 論文標題 Pubertal Development and Pregnancy Outcomes in 46,XX Patients With Nonclassic Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 1866 ~ 1870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2018-01752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Tomohiro, Kashimada Kenichi, Amano Naoko, Takasawa Kei, Nakamura-Utsunomiya Akari, Yatsuga Shuichi, Mukai Tokuo, Ida Shinobu, Isobe Mitsuhsa, Fukushi Masaru, Satoh Hiroyuki, Yoshino Kaoru, Otsuki Michio, Katabami Takuyuki, Tajima Toshihiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency (2021 revision)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Pediatric Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.2022-0009	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 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石井智弘
2. 発表標題 先天性リポイド副腎過形成症Update-病型別の頻度と臨床像-
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 石井智弘、鹿島田健一、棚橋祐典、向井徳男、田島敏広、勝又規行、長谷川奉延
2. 発表標題 本邦の先天性リポイド副腎過形成症の有病率と病型別臨床像の解明
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishii T, Hori N, Amano N, Aya M, Shibata H, Katsumata N, Hasegawa T.
2. 発表標題 Long-term outcome of testicular function in nonclassic lipid congenital adrenal hyperplasia.
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the European Society of Paediatric Endocrinology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井智弘、堀尚明、天野直子、綾美咲、柴田洋孝、勝又規行、長谷川奉延
2. 発表標題 非古典型先天性リポイド副腎過形成症の思春期・成人期の精巣機能
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 進藤淳也、上牧務、相澤魁人、神野太郎、西田光宏、石井智弘、長谷川奉延
2. 発表標題 GnRH agonist投与後にKaufmann療法を行い、卵巣嚢腫の予防を試みた46,XX 古典型先天性リポイド副腎過形成症
3. 学会等名 第54回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井智弘、田島敏広、鹿島田健一、向井徳男、棚橋祐典、勝又規行、菅野潤子、濱島崇、都研一、位田忍、長谷川奉延
2. 発表標題 本邦の先天性リポイド副腎過形成症:病型別の頻度と表現型
3. 学会等名 第54回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tomohiro Ishii	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 26
3. 書名 Transcriptome analysis of adrenocortical cells in health and disease (IN: Cellular Endocrinology in Health and Disease 2nd. edition)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------