

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：25406

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19254

研究課題名（和文）鉄依存的な脱メチル化によるライディッヒ細胞の成熟化が誘導する精子形成の解明と応用

研究課題名（英文）Elucidation and application of spermatogenesis induced by Leydig cell maturation by iron-dependent demethylation

研究代表者

山下 泰尚（Yamashita, Yasuhisa）

県立広島大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50452545

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）：哺乳動物の精巣間質には性成熟前には幼若ライディッヒ細胞（FLC；LH受容体（LHCGR）無し）、性成熟後には成獣ライディッヒ細胞（ALC；LHCGR有り）が存在する。Transferrin（TF）の受容体（TFR1）LC特異的欠損マウス（Tfr1cK0）では、LHCGR発現低下により、乏精子症となったから、鉄によるエピジェネティック機構がFLCからのALC化への可能性を探索した。その結果、Tfr1cK0ではLhcgrがメチル化された。以上から、鉄はFLCのLhcgr遺伝子の脱メチル化させ、ALC出現を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウスを用いた研究により、鉄依存的にFLCがALCに変化することを見出した。これまでヒトや家畜においてライディッヒ細胞におけるテストステロン合成不全による不妊症の症例は報告されていることから、本研究の基礎的研究はこのような症例の治療に応用可能であると考えられる。加えて、本研究の精巣間質の切片像からTfr1cK0マウスの間質にはALCのみならず筋様細胞様細胞が多数存在している可能性を見出した。このことは、鉄はALCの出現のみならず、FLCからの筋様細胞を含めた他の細胞への分化誘導に関与する新たな可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：In mammalian testicular interstitium, there are fetal leydig cells (FLCs; lacking LH receptor (LHCGR)) before sexual maturity, whereas after sexual maturity, adult leydig cell (ALC; with LHCGR) are present. In mice lacking the LC-specific knockout mice for transferrin (TF) receptor (Tfr1cK0), testosterone (T) could not synthesize due to reduction of LHCGR expression, which lead to oligozoospermia. Therefore, we explored the possibility of an epigenetic mechanism of TF-mediated induction of ALC. As the results, we found that Lhcgr of FLC was highly methylated in Tfr1cK0 mice. These results suggest that iron bound to TF demethylates the Lhcgr gene in FLC, which induces conversion of FLCs to ALCs in mice.

研究分野：生殖生理学

キーワード：雄性不妊 エピジェネティック制御 トランスフェリン 精子形成 ライディッヒ細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

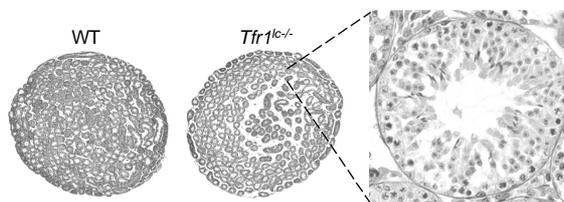
ウシは、種雄牛の産出時に直接検定や後代検定で選抜から漏れる個体が多い。増体量の大きい成長期に性成熟が始まるが、この時期は生理的貧血に陥る個体が多く、繁殖障害との関係については不十分な点が多い。申請者は、貧血モデルマウスを用いた全身性の鉄分不足は、精子形成不全を誘発することを見出したが(Tonai et al., *J Reprod Dev*, 2020)、精巣局所の鉄分不足と精子形成メカニズムに関する更なる基礎的知見の集積が必要である。

哺乳動物の雄では、性成熟前には精巣間質に精子形成を促進するテストステロン(T)を合成させる LH 受容体(LHCGR)の無い幼若ライディッヒ細胞(Fetal Leydig Cell: FLC)が存在するが、性成熟期に達すると LHCGR を有する成獣ライディッヒ細胞(Adult Leydig Cell: ALC)が出現し、T が合成され精子形成が生じる。性成熟期に ALC が精巣間質に出現することは明らかであるが、ALC 出現のメカニズムは全く分かっていない。

2. 研究の目的

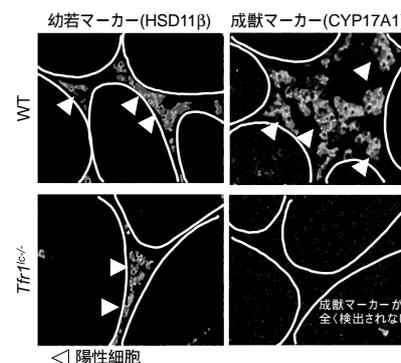
・ライディッヒ細胞(LC)特異的 *Tfr1* 欠損マウスは T 合成能が低下し精子形成不全となる

鉄は鉄輸送タンパク質のトランスフェリン(TF)により末梢組織に運搬される。精巣において TF 受容体(TFR1)は LC 特異的に存在することから、LC 特異的 *Tfr1* 欠損マウス(*Tfr1^{lc-/-}*)の表現系を解析した。その結果、*Tfr1^{lc-/-}*では LC の *Lhcgr* と *Cyp17a1* の発現が低下し、精子形成不全となることを見出した。



*Tfr1^{lc-/-}*ではライディッヒ細胞および精細管内の生殖細胞が脱落し、雄性不妊となる

・*Tfr1^{lc-/-}*マウスが精子形成不全となる理由 哺乳動物では、幼若期には精巣の FLC に LHCGR の発現がないため T が合成されないが、成熟期では LHCGR を備えた ALC の出現により T が合成される。生後 10 日程度の性成熟直前に精巣間質で前駆細胞の FLC の一部が ALC に分化することが明らかになっているが、性成熟した(8 週齢)の *Tfr1^{lc-/-}*の LC には、成獣マーカーが全く認められなかった(右図)。TET2 は、DNA のメチル化シトシンを脱メチルする酵素であり、この発現と活性化に鉄が必須である。申請者は、幼若期(2 週齢)の WT で TET2 と TFR1 が同一の ALC で共発現するが、*Tfr1^{lc-/-}*は ALC で TET2 の発現が全く無いことを見出した。



以上から、マウスを用いて鉄依存的に TET2 が発現・活性化し、FLC の ALC 誘導因子群を脱メチル化する結果、FLC が ALC へ分化することを明らかにすることを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

ライディッヒ細胞の培養

本研究において、ライディッヒ細胞の培養を行うにあたり、Jiang らの報告したライディッヒ細胞分化誘導培地 (DIM 培地) (Jiang et al., 2014) を参考にした DMEM/F12 を基礎培地とした。C57BL/6 マウスの雄から精巣を摘出した。精巣の脂肪をトリミングし、10% ペニシリン-ストレプトマイシン/PBS(±)溶液内で 10 分間静置、洗浄した。その後 5% ペニシリン

-ストレプトマイシン/PBS(±)溶液内でピンセットを用い精巢の白膜を剥離し，精細管をほぐした。溶液から精細管を除去し，ライディッヒ細胞懸濁液を全てエッペンドルフチューブ (As One) に回収した。回収したエッペンドルフチューブを 4,500 rpm 27°C で 5 分間遠心分離した。上清を破棄して，5 % ペニシリン-ストレプトマイシン/PBS で沈殿物を洗浄し，4,500 rpm，27°C 条件下で 5 分間遠心分離した。さらに洗浄を 2 回行い，沈殿物をライディッヒ細胞とし実験に用いた。ライディッヒ細胞を基礎培地で再懸濁し，その後細胞懸濁液 5 μ l とトリパンブルー 5 μ l を混合し血球計算盤を用いて細胞数を計測し，細胞数を調整後 4 日間培養した。タンパク質発現解析用ではこの細胞懸濁液 200 μ l を 48well 培養プレートに播種し，10 日間培養を行った。5 % CO₂，37°C 条件下のインキュベーターで培養し，隔 2 日で培地交換を行った。

WGBS (Whole Genome Bisulfite sequencing) 解析

6 週齢の Floxed および *Tfr1*^{lc-/-} のライディッヒ細胞を回収し，既報に従って Total DNA を抽出した。回収したサンプル Total DNA を MacroGen Japan Corp. (Tokyo , Japan) に解析を依頼した。

Quantitative RT-PCR

培養したライディッヒ細胞の Total RNA の抽出を既報に従って行った。NanoDrop One を用いて，前項で抽出した RNA の濃度を測定し，逆転写反応を行った。逆転写により生成された cDNA サンプルを 40 サイクルの PCR を行った。各サンプルにおいて，内部標準は *Rpl19* mRNA とした。Real-Time PCR データ解析は，CFX Maestro software 2.2 (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いた。

免疫蛍光染色

培養の終了した well から培地 100 μ l をエッペンドルフチューブに回収し，well を風乾させた。1ml/well の PBS (-) で 3 回洗浄後，1ml の PBS (-) を滴下し，5 分間静置した。液を吸い取り，200 μ l/well の 0.3% Triton X/PBS (-) を滴下し，30 分間静置した。液を吸い取り，PBS (-) で 3 回洗浄後，1ml の PBS (-) を滴下し，5 分間静置した。液を吸い取り，200 μ l/well の 5% BSA/PBS (-) を滴下し，90 分間静置した。液を吸い取り，5% BSA/PBS (-) で希釈した一次抗体を 70 μ l/well で well 全体を覆うように滴下した。また，well の乾燥を防ぐために，培養 well の周りの well やくぼみに PBS (-) を滴下し，well をパラフィルムでシーリングし，4°C 冷蔵庫で一晩静置した。オーバーナイト後，1well あたり 1ml の PBS (-) で 3 回洗浄後，1ml の PBS (-) を滴下し，5 分間静置した。液を吸い取り，5% BSA/PBS (-) で希釈した二次抗体を 1well あたり 70 μ l 滴下した。well の乾燥を防ぐために，湿らせたキムワイプで well プレートを覆い，その上からさらにアルミ箔で覆い，常温 2 時間，遮光した。液を吸い取り，1well あたり 1ml の PBS (-) で 3 回洗浄後，1ml の PBS (-) を滴下し，5 分間静置した。液を吸い取り，DAPI Fluoromount-G[®] を 1well あたり 70 μ l で well 全体を覆うように滴下し，10 分間静置した。液を吸い取り，PBS (-) で 3 回洗浄後，1 well あたり 400 μ l の PBS (-) を滴下して，BZ-X700 で観察・撮影を行った。また，陽性細胞数をセルカウントにより測定した。各実験における抗体は Table2 に記した。

統計処理

実験はそれぞれ 3 回以上繰り返して行い、その結果は Excel 統計を用いて統計分析した。算出した結果は平均値±標準誤差で表示した。2 群の比較は Student's T 検定を実施し、5%水準で有意差があると評価した。

4. 研究成果

鉄依存的な脱メチル化の検討

ライディッチ細胞における鉄依存的な脱メチル化について検討するために、6 週齢の Floxed マウスおよび *Tfr1^{lc-/-}* マウスからライディッチ細胞を回収し、次世代シーケンスにより、全ゲノムを用いた網羅的メチル化解析を行った。その結果、ヒートマップに示した通り、解析した全ゲノム (1.051 Gbp)のうち、Floxed マウスにおいてメチル化され、*Tfr1^{lc-/-}* マウスで脱メチル化されていたゲノムは 29390 個存在し、Floxed マウスにおいて脱メチル化され、*Tfr1^{lc-/-}* マウスでメチル化されていたゲノムは 35834 個存在した (Fig. 1A)。*Lhcgr* のゲノム上を調べた結果、Floxed マウスにおいて脱メチル化され、*Tfr1^{lc-/-}* マウスでメチル化されている領域が 4 つ存在し、これらのすべての処理区で *Tfr1^{lc-/-}* マウスでメチル化レベルが有意に高い値を示した (Fig. 1B-E)。

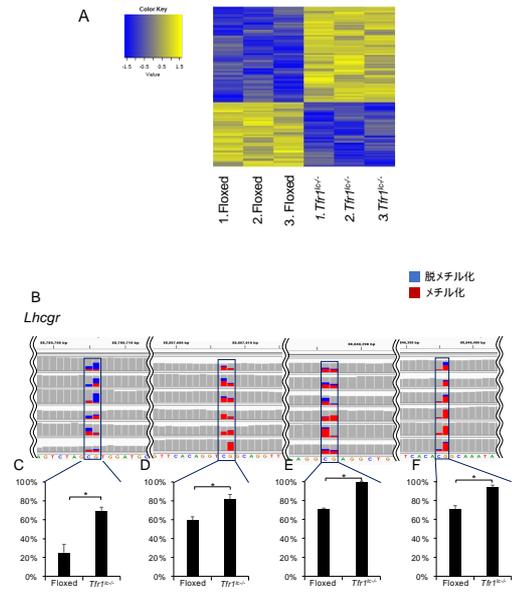


Fig. 1. WGBS解析によって得られたDNAメチル化情報のヒートマップ (A)および*Lhcgr* 遺伝子ゲノム(B)、各塩基上のメチル基割合(C, D, E, F)

6週齢のFloxedマウスおよび*Tfr1^{lc-/-}*マウス3個体ずつの精巣から、ライディッチ細胞を回収しDNA抽出を行いWGBS (Whole Genome Bisulfite Sequencing)解析を委託した

*: 処理区間に有意差あり (p<0.05)

鉄がライディッチ細胞の形態変化に与える影響

鉄がライディッチ細胞に与える影響を調べる目的で、2 週齢の野生型マウス からライディッチ細胞を回収し、TF を無添加 (-TF) および TF を添加 (+TF) してライディッチ細胞を 10 日間培養し、倒立顕微鏡で形態観察を行った。その結果、-TF において、培養 0 日目で認められる小さな円形の細胞は培養 10 日目まで認められ、培養 10 日目では一部の細胞が線維芽細胞様に変化していた。一方、+TF 区においては、培養 2 日目までは -TF 区と同様に小さな円形の細胞が多数認められたが、培養 3 日目から培養 4 日目にかけて一部の細胞が線維芽細胞様に変化していた。培養 4 日以降は大部分の細胞が線維芽細胞様に変化し、培養 10 日目では線維芽細胞様の細胞集団が認められた (Fig. 2)。

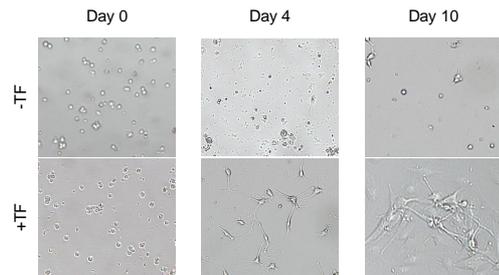


Fig. 2 2週齢の野生型マウスのライディッチ細胞(LDC)をTF無添加, TF添加区で培養したときの形態変化
-TF: TF無添加培地でLDCを培養
+TF: TF添加培地でLDCを培養

鉄がライディッチ細胞の分化誘導遺伝子の発現に及ぼす役割

実験 2 から鉄が FLC を ALC へと分化誘導している可能性が高まった。そこで、実験 3 では、2 週齢の野生型マウスから FLC を採取し -TF, +TF の条件で培養し、形態変化が認められた培養 4 日目における *Tet2*, *Lhcgr*, *Hsd11b2* および *Cyp17a1* の mRNA 発現を qRT-PCR により比較解析すると共に、TET2, LHCGR, HSD11B2 および CYP17A1 の陽性細胞数を免疫蛍光染色により比較解析した。その結果、培養 4 日目において、+TF 区の TET2, *Lhcgr*,

Hsd11b2 および *Cyp17a1* の発現は, -TF 区に比べ有意に高い値を示した (Fig.3A, B, C, D)。培養 10 日目において, +TF 区の TET2, LHCGR および CYP17A1 それぞれの陽性細胞数の割合は, -TF 区に比べ有意に増加した (Fig.4A, B, C)。

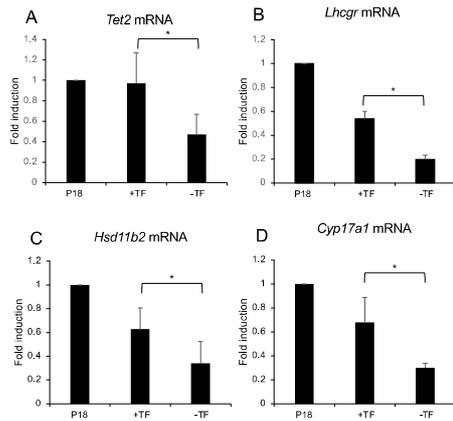


Fig. 3 TF無添加区 (-TF)およびTF添加区 (+TF)でライディッヒ細胞を4日間培養したときのTET2(A), *Lhcgr* (B), *Hsd11b2* (C)および*Cyp17a1* (D)のmRNAの発現

2週齢のWTから回収したライディッヒ細胞を各処理区で4日間培養した後、Total RNAを回収し、qRT-PCR法により*Tet2*, *Lhcgr*, *Hsd11b2*, *Cyp17a1*および*Tet2*のmRNA発現を解析した。

Fold induction, 出生後18日後(P18)のマウスにおけるライディッヒ細胞内の値を1としたときの値

*: 処理区間に有意差あり ($p < 0.05$)

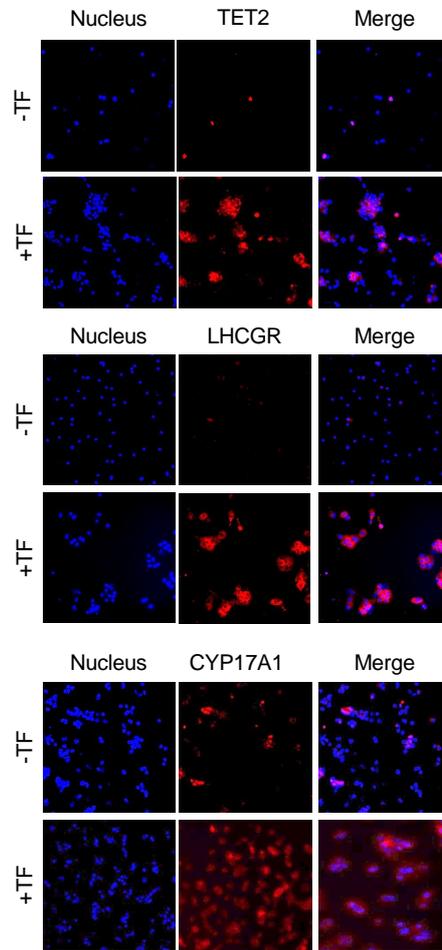


Fig.4 -TFおよび+TFで10日間培養したライディッヒ細胞における、脱メチル化酵素 (TET2), LHCGR, CYP17A1の局在とTET2陽性細胞数の比較解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Naoki, Takeuchi Himeno, Yamaoka Manami, Nakanishi Tomoya, Tonai Shingo, Nishimura Ryo, Morita Takehito, Nagano Masashi, Kameda Shingo, Genda Kaori, Kawase Jun, Yamashita Yasuhisa	4. 巻 23
2. 論文標題 Lipopolysaccharide (LPS) suppresses follicle development marker expression and enhances cytokine expressions, which results in fail to granulosa cell proliferation in developing follicle in cows	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 100710 ~ 100710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.repbio.2022.100710	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤内慎悟, 河端茜, 山岡愛実, 中西寛弥, 島田昌之, 山下泰尚
2. 発表標題 ブタ卵胞液中のTF濃度を基盤とした2ステップ培養(preIVM-IVM)による新規IVM法の開発
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 山下泰尚
2. 発表標題 排卵期の卵巣における脂質転写因子SREBPの活性化亢進によるプロゲステロン産生とその破綻による排卵障害
3. 学会等名 第165回日本獣医学会 生理学・生化学分科会/繁殖分科会合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平山 琢二、須田 義人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 サンライズ出版	5. 総ページ数 100
3. 書名 新 家畜生産学入門	

〔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
---------	---------