

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870887

研究課題名(和文) 機能的黄体退縮を制御する新たな分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for regulation of functional luteolysis

研究代表者

宮戸 真美 (MIYADO, Mami)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：00386252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：MAMLD1 (Mastermind-like domain containing 1) は胎生期の雄性性腺における新たなステロイドホルモン産生制御因子である。本研究から、MAMLD1は雌性性腺で機能していることが初めて見出された。妊娠後期のマウス卵巣において、MAMLD1は20alpha-Hsdの遺伝子発現調節を介して、プロゲステロン代謝に関与することが明らかになった。妊娠マウスでは、MAMLD1は機能的黄体退縮の調節因子として機能していると推測される。

研究成果の概要(英文)：MAMLD1 (Mastermind-like domain containing 1) is known as a regulatory factor in fetal testicular steroidogenesis. We investigated phenotypes of Mamld1 knockout (KO) female mice and the role of MAMLD1 in the ovary of pregnant mice. Parturition was often delayed, and the serum progesterone level was elevated significantly in the KO female mice compared to WT animals. This phenotype likely results from attenuated functional luteolysis, because expression of the 20alpha-Hsd gene, which encodes an enzyme converting progesterone into the inactive metabolite 20alpha-hydroxyprogesterone, was significantly down-regulated in the ovary of the KO pregnant mice at 18.5 dpc. The present study indicates that MAMLD1 regulates expression of the 20alpha-Hsd gene in the murine ovary and is involved in the progesterone metabolism at late pregnancy. Our results provide the first evidence that MAMLD1 acts as a regulatory factor for functional luteolysis in pregnant mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：卵巣ステロイド MAMLD1 Mamld1 機能的黄体退縮

1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンのひとつであるプロゲステロンは、多くの哺乳類において妊娠の維持に必須である。ヒトでは妊娠初期において、マウスでは全妊娠期間を通して、プロゲステロンは主に卵巣黄体で作られる。プロゲステロンの分泌のみが低下する「機能的黄体退縮」と、その後起こる「構造的黄体退縮」という形態的な消失によって、黄体はその役目を終える。

マウスでは、分娩開始のきっかけとして、黄体からのプロゲステロン分泌量が低下し、母体の血中プロゲステロン濃度が低下する必要がある。母体の血中プロゲステロン濃度の低下は、分娩開始のシグナルとして子宮に伝わる。機能的黄体退縮の指標として、プロゲステロンから不活性化代謝物(20 α -OHP)への代謝に必須である、ステロイドホルモン代謝酵素 20 α -Hsd 遺伝子の発現量の上昇が知られている。また、20 α -Hsd 遺伝子欠損妊娠マウスでは、母体の血中プロゲステロン濃度の持続高値により分娩開始が遅れることが報告されている。

当研究部での解析により、MAMLD1 (Mastermind-like domain containing 1) は胎生期の雄性性腺における新たなステロイドホルモン産生制御因子であることが明らかになった。しかし、これまで雌性において、MAMLD1 がどのような機能を有しているかは未解明であった。Mamld1 遺伝子欠損妊娠マウスが高頻度に分娩遅延を生じることから、MAMLD1 が雌性生殖機能、とくに分娩に関与する可能性が見出された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Mamld1 遺伝子欠損メスマウスを用いた解析から、機能的黄体退縮を制御する新しい分子機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) Mamld1 遺伝子欠損メスマウスの分娩に関わる表現型解析:

Mamld1 遺伝子欠損あるいは野生型メスマウスから生まれた仔について、出生日および出生翌日の生存匹数を調べた。オスの遺伝型を変えた交配も行った。交配後に腔栓の有無を確認し、各母体の妊娠日数を算出した。妊娠 20.5 日目以降に分娩が確認された個体を分娩遅延個体とした。

(2) 母体の血中ステロイドホルモン濃度の測定:

液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)法にて、妊娠 18.5 日目(分娩予定前日)の母体血清のプロゲステロン濃度とその代謝物濃度を測定した。

(3) プロゲステロンシグナルの遮断:

妊娠後期の母体に、プロゲステロン受容体

の拮抗薬である RU486 の投与を行った。子宮へのプロゲステロンシグナルの遮断により、分娩が誘導されるか否かを検討した。

(4) 卵巣・子宮・胎仔の形態解析:

Mamld1 遺伝子欠損マウスについて、妊娠 18.5 日目の卵巣、子宮、胎仔を用いて解剖学および組織学的な解析を行った。

(5) 卵巣における Mamld1 遺伝子の発現解析:

妊娠 18.5 日目の野生型マウス卵巣を用いて、Section *in situ* Hybridization 法を行い、Mamld1 遺伝子の発現部位を同定した。

(6) ステロイドホルモン産生・代謝酵素遺伝子群の発現量変化の解析:

qRT-PCR 法にて、妊娠 18.5 日目の Mamld1 遺伝子欠損マウス卵巣におけるステロイドホルモン産生・代謝酵素遺伝子群の発現量の変化を調べた。内部標準として Gapdh 遺伝子を使用した。

(7) 培養細胞を用いた解析:

マウスライディヒ腫瘍細胞(MLTC)を用いて、Mamld1 遺伝子発現量の増減に伴う 20 α -Hsd 遺伝子の発現量の変動を解析した。

4. 研究成果

(1) Mamld1 遺伝子欠損メスマウスの分娩に関わる表現型解析:

Mamld1 遺伝子欠損妊娠マウスでは分娩遅延率が増加した(図1)。この分娩遅延は父の遺伝型には依存しなかった。Mamld1 遺伝子欠損妊娠マウスから生まれた仔では、翌日に多数の死亡個体が確認された。つぎに、帝王切開により得られた仔を里親に預けた結果、産仔生存数は回復した。

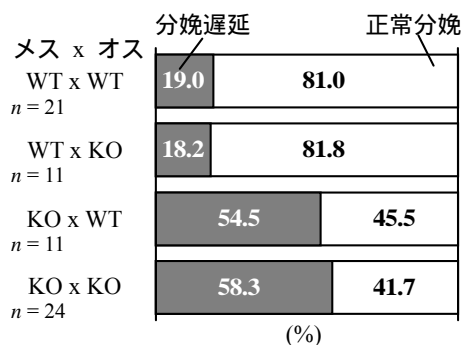


図1 分娩遅延率

Mamld1 遺伝子欠損妊娠マウスでは、分娩開始日が妊娠 20.5 日以降の個体が多く、分娩遅延率が増加した。

WT: 野生型マウス

KO: Mamld1 遺伝子欠損マウス

(2) 母体の血中ステロイドホルモン濃度の測定:

野生型マウスと比べて、Mamld1 遺伝子欠損妊娠マウスの血中プロゲステロン濃度は

持続高値（野生型: 10.9 ± 3.6 ng/mL, $n = 10$; *Mamld1* 遺伝子欠損: 26.8 ± 2.6 ng/mL, $n = 9$; $p = 0.0014$ ）を示し、その不活性代謝物である 20α -OHP 濃度は持続低値（野生型: 37.0 ± 5.5 ng/mL, $n = 10$; *Mamld1* 遺伝子欠損: 20.6 ± 2.1 ng/mL, $n = 9$; $p = 0.041$ ）を示した。

(3) プロゲステロンシグナルの遮断：

子宮へのプロゲステロンシグナルの遮断により、野生型マウスと同様に、*Mamld1* 遺伝子欠損妊娠マウスにおいて分娩が誘導された。

(4) 卵巣・子宮・胎仔の形態解析：

野生型マウスと比べて、*Mamld1* 遺伝子欠損妊娠マウスの卵巣（黄体組織を含む）の構造、子宮の着床痕数、胎仔の形態に違いはなかった。

(5) 卵巣における *Mamld1* 遺伝子の発現解析：

Mamld1 遺伝子は、妊娠後期の野生型マウスにおいて黄体を含む卵巣で発現していた。

(6) ステロイドホルモン産生・代謝酵素遺伝子群の発現量変化の解析：

野生型マウスと比較して、*Mamld1* 遺伝子欠損妊娠マウスの卵巣では、プロゲステロンを 20α -OHP に代謝するために必須である *20\alpha*-Hsd 遺伝子の発現量が有意に低下していた（図2）。

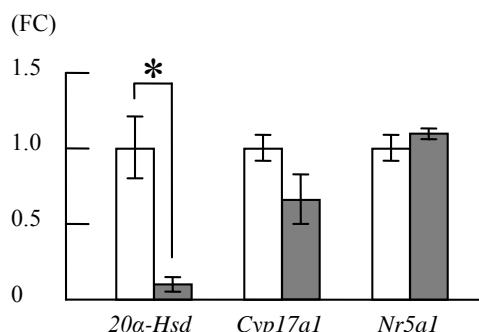


図2 妊娠卵巣における遺伝子発現変化

Mamld1 遺伝子欠損妊娠マウス卵巣において、*20\alpha*-Hsd 遺伝子の発現量が有意に低下していた。

FC: Fold Change

白色棒: 野生型マウス, $n = 6$

灰色棒: *Mamld1* 遺伝子欠損マウス, $n = 6$

アスタリスク: $p < 0.05$

(7) 培養細胞を用いた解析：

Mamld1 遺伝子の発現抑制により *20\alpha*-Hsd 遺伝子の発現量は2~4割低下し、*Mamld1* 遺伝子の過剰発現により *20\alpha*-Hsd 遺伝子の発現量は約2倍上昇した。

以上の成績から、妊娠後期の野生型マウス卵巣において、MAMLD1 は *20\alpha*-Hsd の遺伝子発現調節を介して、プロゲステロン代謝に

関与することが明らかになった。妊娠マウスでは、MAMLD1 は機能的黄体退縮の調節因子として機能していると推測される。

本研究の成果は、雌の生殖機能に関与する新たな遺伝子相互作用の解明につながると期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計13件)

- (1) Saito K, Matsuzaki T, Iwasa T, Miyado M, Saito H, Kubota T, Irahara M, Ogata T and Fukami M. Blood allopregnanolone levels in women with polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf). 85 (1): 151–152, 2016. DOI: 10.1111/cen.13080. 査読有 .
- (2) Kon M, Saito K, Mitsui T, Miyado M, Igarashi M, Moriya K, Nonomura K, Shinohara N, Ogata T and Fukami M. Copy Number Variations of the Azoospermia Factor Region and SRY Are Not Associated with the Risk of Hypospadias. Sex Dev. 10 (1): 12–15. DOI: 10.1159/000444938. 査読有 .
- (3) Saito K, Matsuzaki T, Iwasa T, Miyado M, Saito H, Hasegawa T, Homma K, Inoue E, Miyashiro Y, Kubota T, Irahara M, Ogata T and Fukami M. Steroidogenic pathways involved in androgen biosynthesis in eumenorrhic women and patients with polycystic ovary syndrome. J Steroid Biochem Mol Biol. 158: 31–37, 2016. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.02.010. 査読有 .
- (4) Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nagasaki K, Horikawa R, Nagai T, Tsuchiya T, Suzuki E, Miyado M, Hata K, Nakabayashi K, Hayashi K, Matsubara Y, Baba T, Morohashi K, Igarashi A, Ogata T, Takada S and Fukami M. Testicular dysgenesis/regression without campomelic dysplasia in patients carrying missense mutations and upstream deletion of SOX9. Mol Genet Genomic Med. 3 (6): 550–557, 2015. DOI: 10.1002/mgg3.165. 査読有 .
- (5) Miyado M, Miyado K, Katsumi M, Saito K, Nakamura A, Shihara D, Ogata T and Fukami M. Parturition failure in mice lacking *Mamld1*. Sci Rep. 5: 14705, 2015. DOI: 10.1038/srep14705. 査読有 .
- (6) Tonoike A, Hori Y, Inoue-Murayama M, Konno A, Fujita K, Miyado M, Fukami M, Nagasawa M, Mogi K and Kikusui T. Copy number variations in the amylase gene *AMY2B* in Japanese native dog breeds. Anim Genet. 46 (5): 580–583, 2015. DOI: 10.1111/age.12344. 査読有 .
- (7) 宮戸真美, 宮戸健二, 緒方 勤, 深見真紀 . (REVIEW) MAMLD1: 胎生期精巢

- におけるステロイドホルモン産生の新規調節因子．日本生殖内分泌学会雑誌（日本生殖内分泌学会）20: 19-23, 2015. http://seishoku.org/15_20kan/20-9review3.pdf. 査読無．
- (8) Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Kohri K, Ogata T and Fukami M. Novel Splice Site Mutation in MAMLD1 in a Patient with Hypospadias. *Sex Dev.* 9 (3): 130-135, 2015. DOI: 10.1159/000380842. 査読有．
- (9) Igarashi M, Mikami H, Katsumi M, Miyado M, Izumi Y, Ogata T and Fukami M. SOX3 Overdosage Permits Normal Sex Development in Females with Random X Inactivation. *Sex Dev.* 9 (3): 125-129, 2015. DOI: 10.1159/000377653. 査読有．
- (10) Saito K, Miyado M, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Katsumi M, Saito H, Kubota T, Okada H, Ogata T and Fukami M. Copy-number variations in Y-chromosomal azoospermia factor regions identified by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Hum Genet.* 60 (3): 127-131, 2015. DOI: 10.1038/jhg.2014.115. 査読有．
- (11) Katsumi M, Ishikawa H, Tanaka Y, Saito K, Kobori Y, Okada H, Saito H, Nakabayashi K, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M and Miyado M. Microhomology-Mediated Microduplication in the Y Chromosomal Azoospermia Factor a Region in a Male with Mild Asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res.* 144 (4): 285-289, 2014. DOI: 10.1159/000377649. 査読有．
- (12) Inui M, Miyado M, Igarashi M, Tamano M, Kubo A, Yamashita S, Asahara H, Fukami M and Takada S. Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 4: 5396, 2014. DOI: 10.1038/srep05396. 査読有．
- (13) Kawano N, Miyado K, Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T and Umezawa A. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep.* 4: 4701, 2014. DOI: 10.1038/srep04701. 査読有．

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 宮戸真美, 宮戸健二, 勝見桃理, 齊藤和毅, 緒方 勤, 深見真紀. MAMLD1 はマウスの分娩発来に関与する. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月3日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市).
- (2) 宮戸真美, 吉田 薫, 宮戸健二, 勝見桃理, 齊藤和毅, 緒方 勤, 深見真紀. *Mamld1* 欠損は出生後の精巣サイズ減少を招く. 第49回日本小児内分泌学会学術

集会, 2015年10月8日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区).

- (3) 宮戸真美. MAMLD1: 性腺におけるステロイドホルモン産生の新規調節因子. 第19回日本生殖内分泌学会学術集会, 2015年1月10日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市).
- (4) 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方 勤, 深見真紀. 妊娠マウスの卵巣における MAMLD1 の役割. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- (5) 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方 勤, 深見真紀. 妊娠マウスにおける黄体退縮調節因子の同定. 第22回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2014年11月3日, 都道府県会館(東京都・千代田区).
- (6) 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方 勤, 深見真紀. マウス分娩の開始と完了における *Mamld1* 機能の解明. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 2014年9月27日, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市).
- (7) 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 田中葉子, 岡田 弘, 小堀善友, 吉田 淳, 石川博通, 緒方 勤, 深見真紀. 無精子症・乏精子症発症に関与するゲノム構造変化の解明. 第18回小児分子内分泌研究会, 2014年7月5日, 札幌北広島クラッセホテル(北海道・札幌市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮戸 真美 (MIYADO, Mami)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・研究員

研究者番号: 00386252