

生殖腺体細胞の性差構築の分子機構の解析

研究代表者： 矢澤 隆志 (医学部・学内講師)

概 要	精巣と卵巣は、ステロイドホルモンを初めとする性ホルモンの産生を通じからだ全体に性差を誘導する。性差の構築は、精巣と卵巣の体細胞が、性特異的なホルモンを産生するよう分化することであると言える。よって、ホルモン産生を行う生殖腺体細胞の性差を知ることは、性分化の本質を知ることになると考えられる。これまでの研究により、生殖腺体細胞で性差を持って発現する多くの遺伝子が同定されている。本研究では、その中で精巣で強い発現が観察される HMG 合成酵素である Hmgcs2 遺伝子に着目した。ノックダウンや過剰発現の実験から Hmgcs2 は、ライディッヒ細胞において、ケトン体の合成やステロイドホルモンの産生に重要な役割を果たしていることが分かった。その一方で、肝臓において明らかとされているような転写調節に関する役割は、ライディッヒ細胞において果たさないことが分かった。
関連キーワード	Hmgcs2、ライディッヒ細胞、性差、生殖腺体細胞、SF-1

研究の背景および目的

高等脊椎動物の生殖腺は中間中胚葉に由来し、副腎皮質と起源を共にする。これは、生殖腺と副腎皮質がステロイドホルモンを産生するという共通の機能を有することからも明らかである。このステロイドホルモン産生機能に深く関与しているのが、オーファン核内受容体の SF-1 である。SF-1 は、生殖腺の体細胞に発現し、ステロイド合成酵素や性分化に関わる因子の転写を司る転写因子である。私は、生殖腺や副腎皮質と同じ中胚葉由来の間葉系幹細胞に SF-1 を安定導入し、培地に cAMP を添加することによりライディッヒ細胞や副腎皮質のコルチゾール産生細胞に分化誘導することに成功している。現在、この細胞を用いて、ステロイドホルモン産生細胞の発生・分化の詳細な解析を行うことが可能となった(Yazawa et al. Endocrinology, 2006, 2008, 2009; Mol Endo. 2010)。

生殖腺、すなわち精巣と卵巣は、ステロイドホルモンを初めとする性ホルモンの産生を通じ、からだ全体に性差を誘導する。すなわち性差の構築は、精巣と卵巣の体細胞が、性特異的なホルモンを産生するよう分化することであると言える。よって、ホルモン産生を行う生殖腺体細胞の性差を知ることは、性分化の本質を知ることになると考えられる。これまでの研究から、

多くの遺伝子が、生殖腺体細胞で性差を持って発現し、性差の構築に貢献していることが知られているものの、不明な点が多く残されている。これは生殖腺が性ホルモンを産生する体細胞に加えて、生殖細胞など多くの細胞系列から形成されるため、解析が困難であることが理由に挙げられる。私たちが、確立した幹細胞から生殖腺体細胞を分化させる系は、このような問題を解決し、性差を調べるための有用な系となりうる。

実際に、私は、幹細胞由来の生殖腺体細胞を解析することにより、これまでに報告されていない性差を持って生殖腺に発現する遺伝子群を同定している。本研究では、これらの遺伝子のうち HMG 合成酵素である Hmgcs2 遺伝子に着目した。Hmgcs2 は、肝臓においてケトン体合成の律速酵素として働くことがよく知られている。生殖腺においては精巣のライディッヒ細胞で強い発現が見られるが、卵巣では、その発現を検出することができない。そこで、Hmgcs2 の精巣 (ライディッヒ細胞) における転写調節機構ならびに、機能を調べることにより生殖腺体細胞の性差の一端を解明することを目的に研究を行なった。

研究の内容および成果

(1) Hmgcs2 遺伝子のライディッヒ細胞における発現調節機構の解析

Hmgcs2 遺伝子のライディッヒ細胞における転写調節機構を調べるために、遺伝子の5'上流域・1 kb をルシフェラーゼベクターに組み込んだレポータープラスミドを作製した。このプラスミドをラット・ライディッヒ細胞由来の R2C 細胞株にトランスフェクションしてレポーターアッセイを行った。このレポーターは、R2C 細胞において非常に高い活性を示した。レポータープラスミドに deletion と mutation を入れることにより、転写開始点近傍にある SP1 結合サイト並びに、SF-1 或いは PPAR の結合領域が転写活性化に重要な役割を果たしていることが分かった。R2C 細胞の核抽出物を用いた EMSA の結果から、それぞれのサイトには、SP1/SP3 と SF-1/PPAR/RXR が結合していることが分かった。PPAR のアイソフォームのうち、 α と β は、オスの生殖腺で強い発現が観察されることから、これらが Hmgcs2 遺伝子のライディッヒ細胞特異的発現に重要であると考えられる。

(2) Hmgcs2 遺伝子の機能解析

Hmgcs2 のライディッヒ細胞における機能を調べるために、shRNA を用いて R2C 細胞に内在性に発現する Hmgcs2 遺伝子のノックダウンを行なった (図1)。shRNA の導入より R2C 細胞中の90%近い Hmgcs2 の mRNA 発現が抑制され、タンパク質の発現量は著しく低下した。これらの細胞では、ケトン体の産生が低下していた。その一方で、肝臓で報告されているような PPAR を介して遺伝子の転写活性化を行なっている機能はノックダウン細胞株においても全く変化が見られなかったことから、ライディッヒ細胞で Hmgcs2 は転写調節には関わっていないことが明らかとなった。さらに、Hmgcs2 ノックダウン細胞ではプロジェ

ステロンの産生が低下したことから、ライディッヒ細胞の Hmgcs2 はステロイドホルモン産生にも関わる可能性が示唆された。

また、Hmgcs2 遺伝子が内在性に発現していないヒト卵巣顆粒膜細胞由来の KGN 細胞株に、Hmgcs2 遺伝子を異所的に発現させた。するとライディッヒ細胞株におけるノックダウンの実験を反映して、KGN 細胞はケトン体を産生するようになった。また、Hmgcs2 を発現する KGN 細胞のプロジェステロン産生量は、コントロールの細胞株に比べて2倍に増えた。

以上のオスの生殖腺体細胞におけるノックダウンとメスの細胞株における過剰発現の結果は、Hmgcs2 がライディッヒ細胞においてケトン体の産生とステロイドホルモンの産生に関わることを強く示唆するものである。

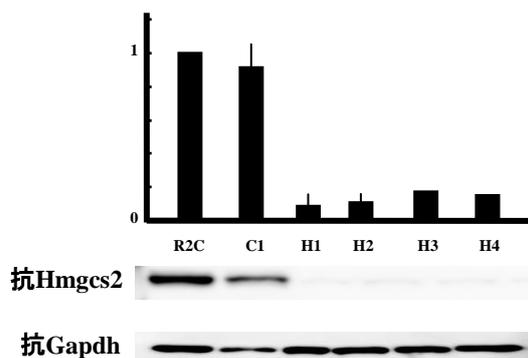


図1 R2C細胞におけるHmgcs2遺伝子のノックダウン細胞株の作製

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Soneda S. *, Yazawa T. *, Fukami M*. et al. 2011 : Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and crucial function of Sp1 binding sites. J. Clin Endocrinol Metab. 96, E1881-7. (*These authors equally contributed to this work.)
2. 矢澤隆志ら 2011 : 卵巣におけるステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の転写調節機構. 日本生殖内分泌学会誌. 16, 5-8
3. 矢澤隆志ら 2011 : 万能細胞からのステロイ

ドホルモン産生細胞の創出. 医学のあゆみ. 239, 1445-50

「特記事項」

平成23年度日本動物学会奨励賞受賞
矢澤隆志 「ステロイドホルモン産生の分子機構の解明」

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費・基盤研究 (C) ・平成23年～25年度・代表・採択・「幹細胞からのセルトリ細胞の作製と分化機構の解明」