

生殖腺体細胞における遺伝子発現の性差とその機能の解明

研究代表者： 矢澤 隆志 (医学部・学内講師)

概 要	哺乳類における性（男女・雌雄）は、胎児期に性染色体によって生殖腺が精巣になるか卵巣になるかによって決定され、生後は各生殖腺から産生される性特異的なホルモンにより性分化が起きる。この過程を制御しているのは、生殖腺体細胞であり、その性差を調べることは性決定や性分化の解明に大きく寄与すると考えられる。本研究では、精巣の体細胞で強く発現しているものの、卵巣では、ほとんど発現が見られない HMGCS2 と CYP26B1 遺伝子の転写調節機構に関する解析を行った。そして、HMGCS2 は性によって異なるエピジェネティックな制御によって精巣のライディッヒ細胞に発現することが分かった。一方、CYP26B1 は、イントロン部分に、セルトリ細胞での発現を司るエンハンサー領域が存在することが分かった。
関連キーワード	生殖腺体細胞、HMGCS2、CYP26B1、転写、性差

研究の背景および目的

哺乳類における性（男女・雌雄）は、胎児期に性染色体によって生殖腺が精巣になるか卵巣になるかによって決定される。生後、精巣と卵巣から産生される性ステロイドを含む性特異的なホルモンにより、からだ全体の性分化が起こる。これら性の決定から分化に至る一連の過程を制御しているのは生殖腺の特定の体細胞群（精巣のライディッヒ細胞とセルトリ細胞、卵巣の莖膜細胞と顆粒膜細胞）である。よって、これらの細胞の性差を調べることは、性の決定や分化を解明することに大きく寄与できる。

上記の生殖腺体細胞は、発生学的に中胚葉に由来し、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、上記の生殖腺の体細胞に発現し、ステロイド合成酵素やミューラー管退縮ホルモン(AMH)などの性決定や分化に関わる遺伝子の転写を司る転写因子である。私は、ES 細胞や間葉系幹細胞に SF-1 を導入し、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細胞を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)。また、この系では、雌雄の生殖腺体細胞が分化誘導できることから、生殖腺体細胞の性差を調べるためにも非常に有用な系となると考えられる。

私は、幹細胞由来の生殖腺体細胞を解析することにより、性差を持って生殖腺に発現する遺伝子群を同定してきた。本研究では、この中から、精巣の体細胞で強い発現が観察された HMGCS2 と CYP26B1 遺伝子に着目して研究を行う。また、生殖腺体細胞の研究をさらに進めるために、幹細胞に加えて、新たな生殖腺体細胞の分化誘導系の開発を試みる。本研究の遂行により、生殖腺体細胞の分化のメカニズムが解明されると共に、特に精巣に強く発現する遺伝子に着目することから精子形成における新たな知見が得られることが期待される。

研究の内容および成果

本年度は、精巣と卵巣で発現レベルの差がある HMGCS2 と CYP26B1 の発現調節機構について主

に解析を行った。そして、エピジェネティックな発現調節とエンハンサー領域による発現調節が、

これらの遺伝子発現に性差をもたらしている可能性が強く示唆された

(1) HMGCS2の発現制御機構

HMGCS2は、精巣で強い発現が見られ、ライディヒ細胞に局在している。その遺伝子の5'上流域を組み込んだレポーターベクターを作製し、ライディヒ細胞由来の細胞株にトランスフェクションを行ったところ非常に強いプロモーター活性が検出された。過剰発現を含む様々なアッセイの結果から、このプロモーター活性は、核内受容体のPPAR α が、この領域内に含まれる配列に結合して、転写を活性化することからであることが分かった(図1)。しかしながら、PPAR α の発現は、精巣と卵巣では大きな差が見られないことから、エピジェネティックな制御により発現量の差が規定されていることが予想された。

そこで、プロモーター領域のDNAのメチル化について調べたところ卵巣由来の細胞では、この領域が高度にメチル化されていることが分かった。一方、ライディヒ細胞では、この領域は、ほとんどメチル化を受けていなかった。よって、プロモーター領域のメチル化というエピジェネティックな調節が、HMGCS2の雌雄の生殖腺における発現量の違いを決めていることが強く示唆された。

(2) CYP26B1の転写調節機構

CYP26B1は、精巣で強く発現しており、主にセルトリ細胞に局在している。遺伝子の転写開始点付近とその5'上流域3Kbを組み込んだレポーターベクターを作製してセルトリ細胞やライディヒ細胞由来でCYP26B1遺伝子を発現する細胞株にトランスフェクションを行ったところ、全くプロモーター活性を検出できなかった。また、その活性は、ベクターのみで検出される活性と全く差がなかったことから、従来言われているCYP26B1遺伝子の転写開始点と生殖腺における転写開始点が異なるため、その5'領域はプロモーターとし

て働かない可能性が強く示唆された。

そこで、セルトリ細胞株を用いて、5'-RACEを行ったところ、実際の転写開始点は、従来、他の組織で同定されていた場所と全く異なることが分かった。この領域付近を、レポーターベクターに組み込んでアッセイを行ったところ比較的強いプロモーター活性が検出された。しかしながら、この領域には雌雄による発現を規定する配列は存在しなかった。そこで、CYP26B1遺伝子内で塩基配列が種を超えて保存されている領域を同定し、レポーターアッセイを行ったところ遺伝子のイントロン部分に、性特異的な発現を司るエンハンサー領域があることが示唆された。ゲルシフトアッセイ等の結果から、この領域にはセルトリ細胞のみ発現する転写因子が結合することが分かった。

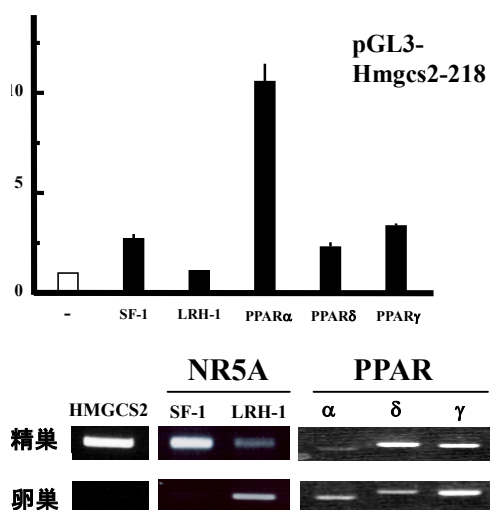


図1. 核内レセプターによるHMGCS2プロモーターの活性化と生殖腺における発現

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. **Yazawa, T.** et al. Androgen/Androgen Receptor Pathway Regulates Expression of the Genes for Cyclooxygenase-2 and Amphiregulin in Periovarian Granulosa Cells. *Mol Cell Endocrinol.*, 369, 42-51, 2013.
2. **Yazawa, T.** et al.: Differentiation of pluripotent stem cells into steroidogenic cells: role of SF-1 regulator In: *Stem cells and cancer stem cells* Vol. 8, by Hayat, H.A., Springer-Company, pp169-177, 2012.
3. **矢澤隆志**ら: ES細胞からの副腎ステロイドホ

ルモン産生細胞の分化誘導. *ACTH Related Peptides* 23, 20-22, 2012.

- 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
助成組織・助成制度・種目・期間・研究課題・代表/分担・採否・採択金額など
1. 科学研究費・基盤研究(C)・平成23～25年・幹細胞からのセルトリ細胞の作製と分化機構の解明・代表・採択・400万円
 2. テルモ科学技術振興財団・一般研究助成・平成24年・幹細胞を用いた副腎・性腺のステロイド産生細胞再生の試み・代表・採択・100万円