

リン脂質代謝と性分化疾患

東京科学大学 難治疾患研究所 病態生理化学分野
佐々木 純子

【研究概要】

ヒトの性は、遺伝的性、生殖腺の性、体の性の3つの要素から構成される。性分化疾患とは、これらの過程のどこかに異常が生じ、典型的な男性または女性の形態をとらない状態を総称したものである。このため性分化疾患の病態は多岐にわたり、性染色体異常の他に、染色体上の性と性腺や体の性が一致しないものや、卵巣の中に精巣細胞が存在する卵精巣など多様である。発生頻度は約4500人に1人と推定されており、そのうち遺伝子変異が特定されるものは約20%と低く、原因不明のものが多い。このような多様な性分化疾患を理解するには、どの細胞のどのタイミングでどのような異常が生じたのかを解明することが重要であり、その意味で病態モデルマウスは極めて有用なツールである。

我々はこれまでに細胞内シグナル伝達脂質であるイノシトールリン脂質 (PIPs) の生理機能解析を行っている。その過程で作製した組織特異的PIPs代謝酵素欠損マウス (PIPs-cKOマウス) は、生後約2週以降に卵巣に精巣での支持細胞であるセルトリ細胞が出現して卵精巣となり、不妊であることを見出した。本研究ではこの独自のマウスモデルを解析することで、性分化疾患の新たな分子機構を提示したい。

【研究背景と目的】

哺乳動物の性分化は、性的に未分化な胎児性腺の支持細胞において開始される。Y 染色体上の精巣決定遺伝子Sry (Sex-determining region Y) が発現した場合は雄型のセルトリ細胞に、発現しない場合は雌型の顆粒膜細胞へと分化する。その後、生殖細胞を含む種々の細胞の性分化が誘導され、精巣または卵巣が発達してくる。この発生過程で決定した支持細胞の性は、出生後もそのまま安定して発現するわけではないことが明らかになってきた。出生後の顆粒膜細胞ではEsr (エストロゲン受容体) やFoxl2 (Forkhead型転写因子) が、セルトリ細胞ではSox9 (HMG ボックス型転写因子) やDmrt1 (DM ドメイン転写因子) が、互いの発現を抑制しながら支持細胞の性を維持している(1-3)。即ち一見性分化が終了し、卵巣や精巣が形成された後でも、雌に維持されなければ雄になり、雄に維持されなければ雌になるという、2つのいずれかの性を担保する支持細胞自律的な機構が備わっていると考えられている。このように成体の性制御において転写因子や性ホルモンが重要な役割を担うことが明らかになってきたが、その他の生体内分子の関与についてはほとんど知られていない。そこで我々は、PIPs-cKOマウスの病態を解析すれば性分化疾患発症の新たな分子機構を解明できるのではないかと考え、以下の解析を行った。

【結果と考察】

1. PIPs-cKOマウス卵巣の病態解析

卵巣の組織学的解析の結果、生後2週以降からSox9陽性細胞が出現し、時間経過とともに異常卵胞が

増加することを見出している(図1)。レポーターマウスを用いてCreリコンビナーゼの発現時期と場所を特定したところ、生後7日の顆粒膜細胞の一部でレポーター遺伝子の発現が認められたことから、生後の性分化異常はCreリコンビナーゼの発現時期に起因することが明らかとなった。次に卵巣のPIPs動態を解析したところ、PIP3の有意な上昇を認めた(図2)。そこでPIP3のターゲット分子であるAktの活性化について、抗リン酸化Akt抗体を用いた免疫組織染色にて検出したところ、生後10日以降の顆粒膜細胞においてAktの活性化亢進が認められた。以上の結果をまとめると、PIPs-cKOマウス卵巣の性分化異常は図3のように進行することが明らかとなった。

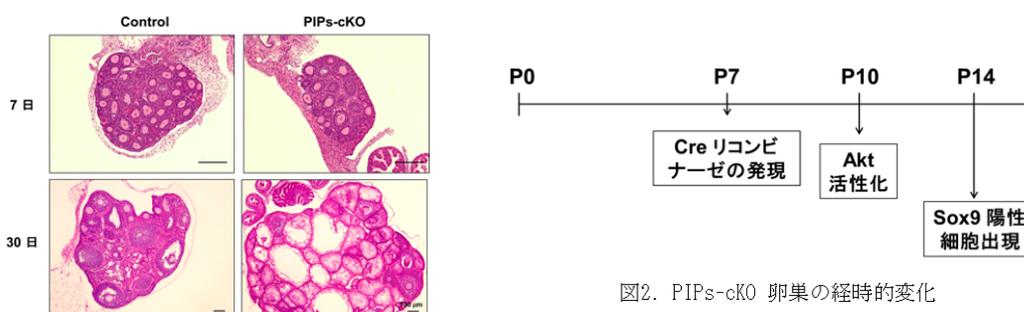


図1. 卵巣の H&E 染色像
 出生 7 日後の PIPs-cKO 卵巣は正常
 出生 30 日後では異常形態の卵胞が多い

図2. PIPs-cKO 卵巣の経時的変化

2. PIPs-cKOマウスの性分化異常にAktは関与しない

PIPs-cKO卵巣における異常卵胞の出現に先立ってAktの活性化亢進が認められたことから、性分化異常はAktに起因することが示唆された。そこで卵巣で主に発現するAkt1とAkt2について、それぞれの欠損マウスとPIPs-cKOマウスとを交配して多重変異マウスを作製し、Akt1またはAkt2の欠損によりPIPs-cKOにおける性分化異常が抑制されるか否か解析した。その結果、Akt1やAkt2を欠損してもSox9陽性細胞は出現したことから、PIPs-cKOマウスの性分化異常にはAktは関与しないことが明らかとなった(図3)。

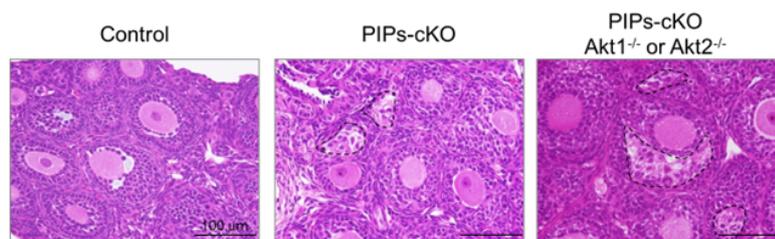


図3. PIPs-cKO マウスの異常卵胞は Akt1/2 欠損条件下でも出現する
 生後 15-17 日齢の卵巣の H&E 染色像
 黒点線で囲った部分は Sox9 陽性細胞

3. PIPs-cKOマウス卵巣の表現型を回復させる分子の特定

研究背景で述べたように、生殖腺の性分化は転写因子群によって調節されることが明らかとなっている。そこでPIPs-cKO卵巣の遺伝子発現を制御する転写因子の予測を試みた。RNAシーケンス解析により、コントロール卵巣とPIPs-cKO卵巣における遺伝子発現を比較した結果、4倍以上の変動を示す分子として345遺伝子を同定した。次にこれらの遺伝子発現を調節する転写因子について、TRRUST解析(4)を用いて予測したところ、最もスコアの高い転写因子として分子Xを見出した。PIPs-cKOマウスと分子X変異マウスを交配して多重変異マウスを作製したところ、異常卵胞の出現が抑制された。以上の結果から、PIPs-cKO

マウスにおける性分化異常は分子Xを介することが明らかになった。

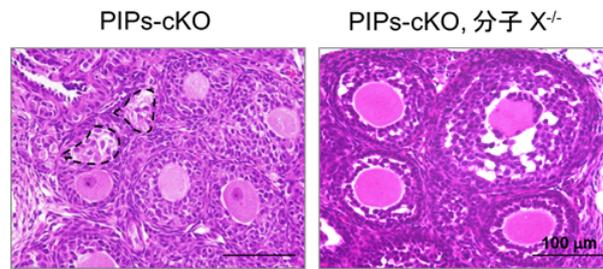


図4. 分子 X 欠損条件下では異常卵胞は出現しない
生後 15-17 日齢の卵巣の H&E 染色像
黒点線で囲った部分は Sox9 陽性細胞

【結論】

独自のマウスモデルを用いることで、生後卵巣の性分化維持における新たな分子機構を明らかにすることができた。PIPsと分子Xとの関連については更なる解析を進める必要がある。

【文献】

- 1) J F Couse, S C Hewitt, D O Bunch, M Sar, V R Walker, B J Davis, K S Korach. Postnatal Sex Reversal of the Ovaries in Mice Lacking Estrogen Receptors α and β . *Science*, 1999; 286(5448):2328-2331. doi: 10.1126/science.286.5448.2328. PMID: 10600740.
- 2) Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schütz G, Cooney AJ, Lovell-Badge R, Treier M. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 2009; 139(6):1130-1142. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.021. PMID: 20005806.
- 3) Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 2011; 476(7358):101-104. doi: 10.1038/nature10239. PMID: 21775990.
- 4) Han H, Cho JW, Lee S, Yun A, Kim H, Bae D, Yang S, Kim CY, Lee M, Kim E, Lee S, Kang B, Jeong D, Kim Y, Jeon HN, Jung H, Nam S, Chung M, Kim JH, Lee I. TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res*, 2018; 46(D1):D380-D386. doi: 10.1093/nar/gkx1013. PMID: 29087512.