

卵巣顆粒膜細胞における転写共役因子 PGC-1 α の役割

矢澤 隆志¹⁾, 梅澤 明弘²⁾, 宮本 薫¹⁾

1) 福井大学医学部分子生体情報学

2) 国立成育医療センター研究所・生殖医療部門

はじめに

哺乳類の主要なステロイドホルモン産生器官は、副腎と生殖腺である。両者は、中間中胚葉由来の生殖腺・副腎原基と呼ばれる共通の発生学的な起源をもつが、発生が進行するにつれて分岐し、それぞれのステロイドホルモン産生細胞へと分化する [1]。発生の起源と同じく、副腎と生殖腺のステロイドホルモン合成経路は、コレステロールが P450_{scc} によりプレゲネロンに変換される過程で始まり、途中までは共通であるが、それぞれに発現する P450 水酸化酵素や脱水素酵素により特有のステロイドホルモンが産生される。これらの現象に深く関わっているのが、転写因子の Steroidogenic factor-1 (SF-1) / adrenal 4 binding protein (Ad4BP) / NR5A1 である。SF-1 / Ad4BP は、核内受容体スーパーファミリーに属し、ステロイドホルモン合成系遺伝子全般のプロモーター領域に結合して転写を制御している。そのノックアウトマウスでは、副腎と生殖腺が形成されないことから、ステロイドホルモン産生器官のマスターレギュレーターであることが証明されている [2]。

私たちは、このステロイドホルモン産生器官の発生・分化の複雑な分子メカニズムを調べる系を作るべく、幹細胞から生殖腺や副腎の細胞を作製することを試みてきた。そして、*in vivo* と *in vitro* の実験を通じて、ステロイドホルモン産生器官と同じ中胚葉起源である骨髄由来の間葉系幹細胞が、SF-1 / Ad4BP の安定導入と培地への cAMP の添加により、生殖腺や副腎のステロイドホルモン産生細胞に分化することを証明した [3]。さらに、SF-1 と同じ核内レセプターの 5A ファミリーに属する Liver receptor homolog-1 (LRH-1) にも、間葉系

幹細胞をステロイドホルモン産生細胞へと分化させる能力があることを証明している [4]。

私たちは、この間葉系幹細胞の分化系を用いて、ステロイドホルモン産生酵素遺伝子群の発現における DNA メチル化の役割、卵巣におけるアンドロゲン代謝経路や電子伝達体・P450 oxidoreductase (POR) の下垂体ホルモンによる発現制御機構などについて、新たな知見を得ている [4-6]。本研究では、間葉系幹細胞の研究に端を発して、転写共役因子の PGC-1 α が、卵巣顆粒膜細胞におけるプロジェステロン産生に重要な役割を果たすことを証明したので、以下に報告する [7]。

ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の黄体化顆粒膜細胞への分化

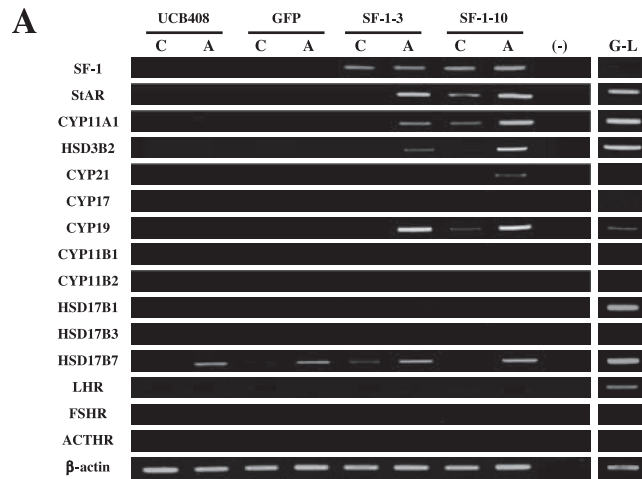
まずはじめに、上記の骨髄由来の間葉系幹細胞をステロイドホルモン産生細胞へと分化させる方法を、ヒト臍帯血由来の間葉系幹細胞株である UCB408E6E7T-33 に適用した。臍帯血に含まれる間葉系幹細胞は、骨髄の間葉系幹細胞に比べると非常に希少であり、4 検体から 1 コロニー程度しか得られない [8]。しかしながら、骨髄の細胞に比べて、増殖活性が著しく高いなどの理由により、幹細胞の供給源として注目されている。

この細胞は、骨髄の細胞と同様、SF-1 の導入と cAMP の添加により、多くのステロイドホルモン産生に関わる遺伝子を発現した。しかしながら、その発現パターンは、骨髄の細胞とは異なり、黄体化顆粒膜細胞に近い性質を示した (図 1 A)。この遺伝子発現パターンを支持するように、細胞は、大量のプロジェステロンを産生した (図 1 B)。

転写共役因子・PGC-1 α は、顆粒膜細胞におけるプロジェステロン産生に関わる

私たちは、以前、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞株 hMSC

連絡先：矢澤隆志、福井大学医学部分子生体情報学
〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3
TEL : 0776-61-8316
FAX : 0776-61-8102
E-mail : yazawa@u-fukui.ac.jp



B

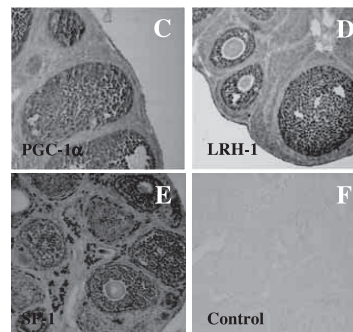
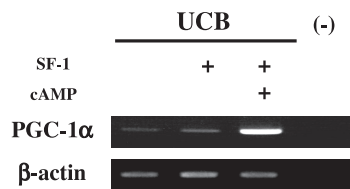
Cell(cAMP)	progesterone	testosterone	estradiol	cortisol	aldosterone
GFP-UCB408 (-)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GFP-UCB408(+)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
SF-1-10-UCB408(-)	113.0±5.00	0.35±0.08	0.25±0.08	N.D.	N.D.
SF1-10-UCB408(+)	568.7±60.4	1.07±0.05	0.62±0.11	0.19±0.07	N.D.

1. N.D. means for no detectable values.

2. Data are means and SEM values of three experiments.

図1 ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の黄体化顆粒膜細胞への分化
 (A) ステロイドホルモン合成系遺伝子 mRNA の RT-PCR による発現解析
 (B) ステロイドホルモン産生量

A



B

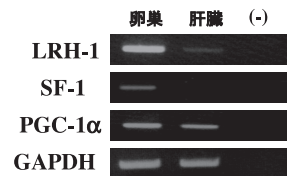


図2 (A) PGC-1α は、臍帯血由来の間葉系幹細胞に発現し、分化に伴い発現が上昇する。
 (B) マウス卵巣と肝臓における NR5A ファミリーと PGC-1α mRNA の発現
 (C-F) マウス卵巣における NR5A ファミリーと PGC-1α タンパク質の免疫組織化学法による解析

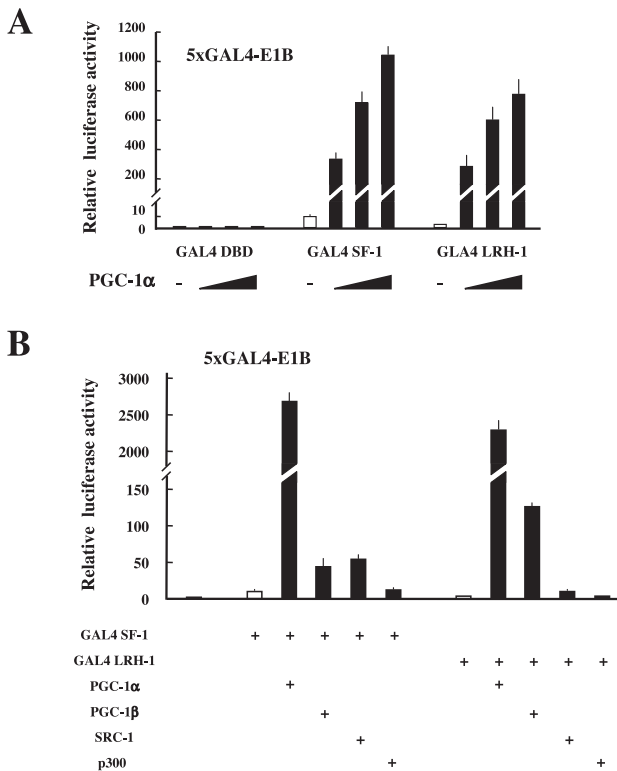


図3 PGC-1 α は、SF-1や LRH-1の強力なコアクチベーターとして働く

-TERT-E6/E7 が、同じ分化誘導法で、副腎束状層様の細胞に分化することを報告している [3]. よって、間葉系幹細胞は、由来に関わらずステロイドホルモン産生細胞へと分化するが、その形質は、細胞間で異なることがわかる. 一方で、分化形質は細胞株内ではほぼ不変であったことから、間葉系幹細胞のステロイドホルモン産生細胞への分化運命は、株化の時点で、あらかじめ決まっているものと考えられる. 私たちは、この間葉系幹細胞間の性質の違いを調べることにより、各ステロイドホルモン産生細胞への分化機構を調べられると考えた. そこで、骨髄ならびに臍帯血由来の間葉系幹細胞で DNA マイクロアレイを行い、両細胞で発現する遺伝子の違いを調べた. すると、転写共役因子の PGC-1 α は、臍帯血由来の間葉系幹細胞に発現しており、その発現量は黄体化顆粒膜細胞への分化と共に上昇することがわかった (図 2 A). PGC-1 α は、PPAR γ を含む核内レセプターの転写共役因子であり、肝臓における糖新生やインスリン感受性など代謝機能に深く関与していることが、よく知られている [9-12]. 私たちは、PGC-1 α が顆粒膜細胞の黄体化 (プロジェステロン産生) において重要な機能をするものと考えて、以下の実験を行った.

まずは PGC-1 α の卵巣における発現を、RT-PCR と免疫組織化学法により調べた (図 2 B,C). すると、PGC-

1 α は卵巣で比較的高いレベルで発現しており、間葉系幹細胞における発現と一致して、顆粒膜細胞に局在していた. PGC-1 α は、顆粒膜細胞において、私たちが間葉系幹細胞を分化させるために用いた SF-1 (顆粒膜細胞と莖膜細胞) や LRH-1 (顆粒膜細胞) と共局在していた. よって PGC-1 α は、これらの転写因子の共役因子として機能する可能性が強く示唆される. そこで、mammalian one hybrid を使ったレポーターアッセイを行ったところ、PGC-1 α は、導入するプラスミド量に依存して、SF-1 と LRH-1 の転写活性を上げることがわかった (図 3 A). PGC-1 α のコアクチベーターとしての能力は、既知の SF-1 や LRH-1 のコアクチベーター (SRC-1, p300) に比べて、著しく強いものであった (図 3 B). この活性は、SF-1 や LRH-1 の標的である StAR, CYP11A1, HSD3B2 や Inhibin- α 遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイにおいても観察された (図 4). よって、PGC-1 α は NR5A ファミリー (SF-1 と LRH-1) の強力なコアクチベーターとして働くことがわかった.

次に、レポーターアッセイの結果が、細胞内の遺伝子上で実際に起こるかどうかを調べるために、ヒト顆粒膜細胞腫由来の KGN 細胞に、アデノウイルスを用いて PGC-1 α を過剰発現させた. すると、レポーターアッセイの結果を支持するように、PGC-1 α により、StAR, CYP11A1, HSD3B2 mRNA の発現が誘導され、細胞はプロジェステロンを産生するようになった (図 5). また、驚いたことに、PGC-1 α の導入は、SF-1 と LRH-1 の発現も誘導した. よって、PGC-1 α は、単に SF-1 や LRH-1 のコアクチベーターとして働くだけではなく、これらの転写因子そのものを誘導することにより、プロジェステロン産生を誘導するものと考えられる. PGC-1 α の効果は、LRH-1 の発現上昇において顕著であり、その発現は SF-1 よりも、はるかに高くなった. この結果は、黄体顆粒膜細胞において LRH-1 の発現が非常に高くなるという事実と一致する [13]. よって、PGC-1 α は、顆粒膜細胞における NR5A ファミリーの発現に関しても、黄体化のパターンを誘導する因子であると考えられる. 私たちは、この KGN 細胞における結果が生理的であることを、未成熟ラット由来の初代培養・顆粒膜細胞において PGC-1 α をノックダウンすることにより証明している [7].

DAX-1 は、PGC-1 α による SF-1 や LRH-1 の活性化を阻害する

初代培養の顆粒膜細胞は、FSH の刺激により大量の

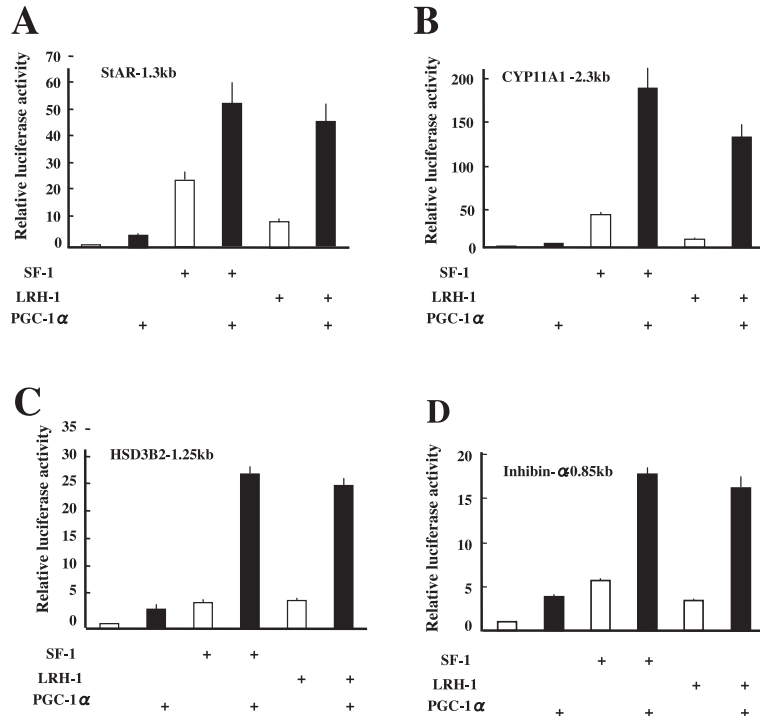


図4 PGC-1α は、ステロイドホルモン合成系遺伝子を含む SF-1や LRH-1の標的遺伝子のプロモーター活性を強く上昇させる

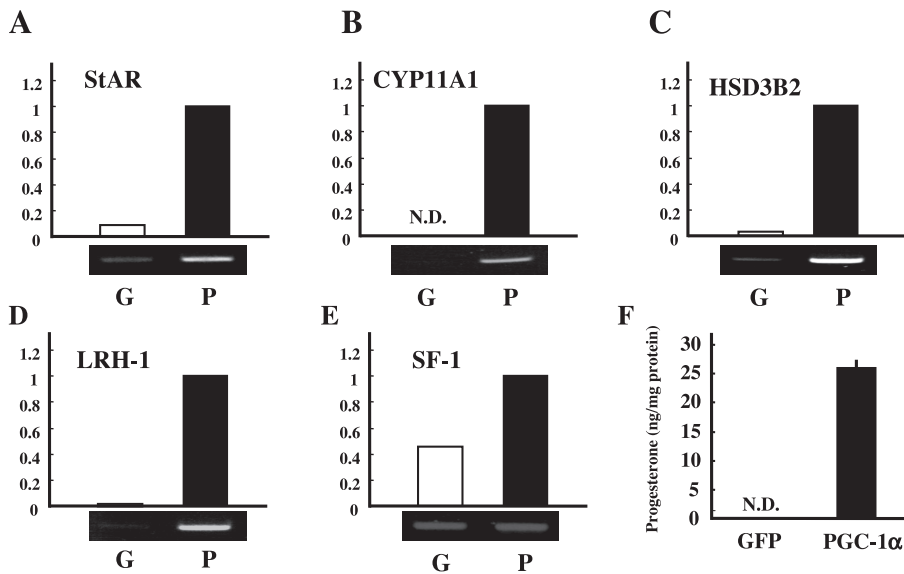


図5 ヒト顆粒膜細胞腫由来のKGN細胞におけるアデノウイルスによる GFP と PGC-1α による過剰発現各遺伝子の mRNA の発現 (A-E) とプロジェステロン産生 (F)

プロジェステロンが産生する細胞に分化することがよく知られている。このとき、StAR (131倍) や p450scc (104倍) といったステロイドホルモン産生に関わる遺伝子が大きく誘導されるのに比べて、PGC-1α (5倍) は FSH 刺激前から比較的高いレベルで存在しており、刺激後もあまり発現が変化しない (図 6A)。よって FSH 刺激前の PGC-1α は、何らかの因子により、その活性が抑制

されているものと考えられる。その最たる候補は、核内レセプターのリプレッサーである DAX-1 である。初代培養の顆粒膜細胞において、DAX-1 は FSH 刺激により急激に発現が低下しステロイドホルモン産生酵素を含む SF-1 や LRH-1 の標的遺伝子の転写が誘導されることが、私たちの過去の研究でわかっている [14]。DAX-1 と PGC-1α の関係を調べるためにレポーターアッセイを行った

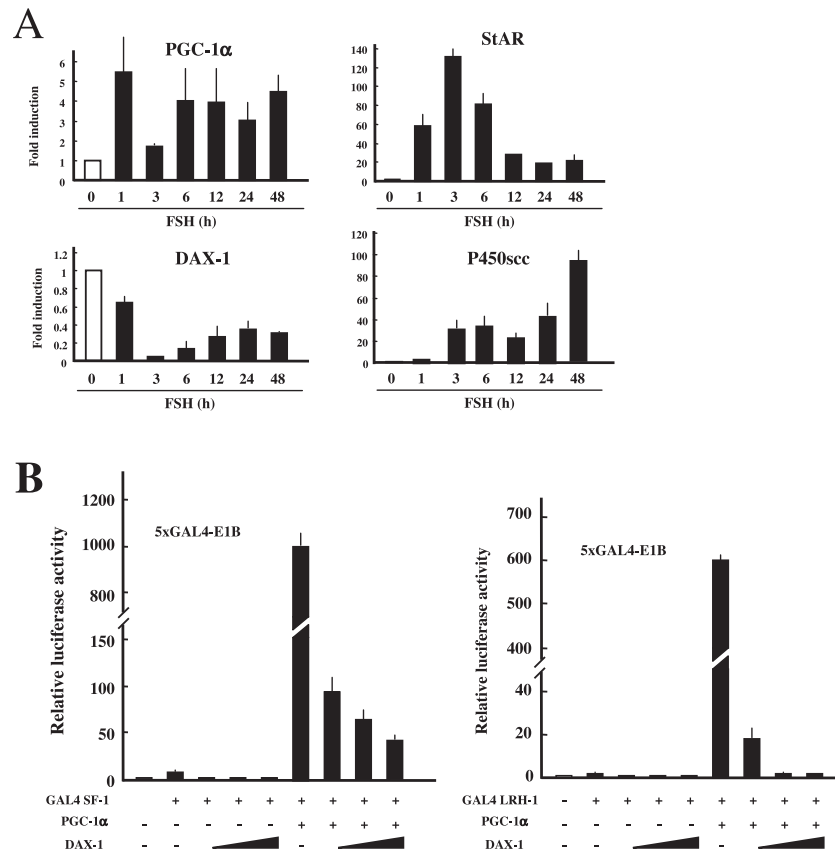


図6 (A) ラット初代培養顆粒膜細胞における FSH による各遺伝子の mRNA 発現の経時的変化 (B) DAX-1は、PGC-1 α のコアクチベーターとしての能力を著しく阻害する

ところ、DAX-1は、PGC-1 α の SF-1や LRH-1対するコアクチベーターとしての能力をほぼ完全に抑制した (図6B)。よって DAX-1は、ゴナドトロピン非存在下では PGC-1 α の活性を抑制することにより、プロゲステロン産生を抑制するものと考えられる。

おわりに

本研究では、間葉系幹細胞に端を発した研究から転写共役因子の PGC-1 α が、卵巣顆粒膜細胞のプロゲステロン産生に重要な役割を果たすことが明らかとなった。PGC-1 α は、肝臓においてインスリン抵抗性を引き起こすことがよく知られている。多くの周産期女性の月経不順や不妊の原因となっている多嚢性卵巣症候群 (PCOS) の患者は、しばしばインスリン抵抗性を併発している [15, 16]。PCOS では、元々、莖膜細胞におけるアンドロゲン産生が過剰になることがよく知られていた。近年は顆粒膜細胞にも異常があることがしばしば報告されており [17, 18], インヒビンや AMH とい

たホルモンの産生が異常となる [18, 19]。PGC-1 α は Inhibin- α や AMH の遺伝子発現に関わっていたことから [7], 今後の研究により、PGC-1 α が生殖機能と代謝機能の異常を関連づける新たな因子となる可能性があると考えられる。

引用文献

- Morohashi K (1999) Gonadal and extragonadal functions of Ad4BP/SF-1: Developmental aspects. Trends Endocrinol Metab 10, 169-173.
- Parker KL, Schimmer P (1997) Steroidogenic factor 1 : a key determinant of endocrine development and function. Endocr Rev 18, 361-377.
- Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K (2006) Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. Endocrinology 147, 4104-4111.
- Yazawa T, Inaoka Y, Mizutani T, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K (2009) Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and

- induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology* 150, 3885-3893.
5. Yazawa T, Uesaka M, Inaoka Y, Mizutani T, Sekiguchi T, Kajitani T, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K (2008) Cyp 11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/ human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen metabolic pathway. *Endocrinology* 149, 1786-1792.
 6. Inaoka Y, Yazawa T, Mizutani T, Kokame K, Kangawa K, Uesaka M, Umezawa A, Miyamoto K (2008) Regulation of P450 oxidoreductase by gonadotropins in rat ovary and its effect on estrogen production. *Reprod Biol Endocrinol* 6, 62.
 7. Yazawa T, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Orisaka M, Umezawa A, Miyamoto K (2010) PPAR-gamma coactivator-1alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. *Mol Endocrinol* 24, 485-496.
 8. Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T (2005) Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol Biol Cell* 16, 1491-1499.
 9. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.
 10. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131-138.
 11. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183.
 12. Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R, Evans RM, Olefsky J, M MM (2004) PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med* 10, 530-534.
 13. Peng N, Kim JW, Rainey WE, Carr BR, Attia G (2003) The role of the orphan nuclear receptor, liver receptor homologue-1, in the regulation of human corpus luteum 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 6020-6028.
 14. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Miyamoto K (2003) Involvement of cyclic adenosine 5' -monophosphate response element-binding protein, steroidogenic factor 1, and Dax-1 in the regulation of gonadotropin-inducible ovarian transcription factor 1 gene expression by follicle-stimulating hormone in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 144, 1920-1930.
 15. Dunaif A (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18, 774-800.
 16. De Leo V, la Marca A, Petraglia F (2003) Insulin-lowering agents in the management of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 24, 633-667.
 17. Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, Raveendran M, Storey A (2008) Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 881-887.
 18. Catteau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzalès J, Dewailly D, Clemente Nd (2008) Anti-Mullerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4456-4461.
 19. Hirshfeld-Cytron J, Barnes RB, Ehrmann DA, Caruso A, Mortensen MM, Rosenfield RL (2009) Characterization of functionally typical and atypical types of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 1587-1594.