研究フロンティア　（平成25年度学術奨励賞受賞論文）

出生後の精巣における胎仔型ライディッヒ細胞の細胞運命と生理機能の解明

嶋　　雄一，宮林香奈子，松崎佐和子，井上　実紀，諸橋憲一郎

九州大学大学院医学研究院分子生命科学系部門性差生物学講座

はじめに

男性ホルモン（アンドロゲン）は，精巣内での精子形成に必須であるばかりでなく，脳や外生殖器を含む全身の雄性化を促進する重要な機能を担っている．有胎盤類においては胎仔期にアンドロゲンの産生が始まり，出生以前に脳や外生殖器の性差が生じることが知られている．また，アンドロゲンの産生量は出生後に一時的に低下し，思春期以降に再び増加することがよく知られている［1-3］．アンドロゲンの産生を担うのは精巣間質に存在するライディッヒ細胞であり，胎仔期の精巣にも成獣の精巣にもライディッヒ細胞が存在する．しかしながら興味深いことに，アンドロゲン産生量の増減に一致して，ライディッヒ細胞の数は胎仔期にいったん増加した後出生後に減少し，思春期以降に再び著しく増加すると報告されている．また，胎仔期と成獣期のライディッヒ細胞は形態的・機能的に多くの相違点を示すことが報告されている．たとえば，ラットの胎仔期のライディッヒ細胞は細胞質に多数の脂肪滴をもつが，成獣のライディッヒ細胞には脂肪滴は少数しか認められない［4］．さらに，成獣のライディッヒ細胞では *Ptgds* 遺伝子（プロスタグランジンD2合成酵素）や *Sult1e1* 遺伝子（エストロゲン硫酸基転移酵素）の発現が高い一方で，胎仔期のライディッヒ細胞ではこれらの遺伝子の発現は認められないなど，両者の間で異なる発現パターンを示す遺伝子群が同定されている［1］．これらの観察結果をもとに，胎仔期に存在するライディッヒ細胞（胎仔型ライディッヒ細胞）と出生後に出現するライディッヒ細胞（成獣型ライディッヒ細胞）は異なる起源をもつ別個の細胞集団であり，出生後に胎仔型ライディッヒ細胞が消失し，成獣型ライディッヒ細胞に置き換わると考えられてきた［2，3，5，6］．しかしながら，これまでの解析は両者の違いを断片的に記述するにとどまっていたことから，胎仔型ライディッヒ細胞と成獣型ライディッヒ細胞の細胞系譜や機能的差異の詳細な解明が待たれていた．

筆者らは最近，トランスジェニックマウスを用いた解析により，核内受容体型の転写因子をコードする *Ad4BP/SF-1*（*Nr5a1*）遺伝子の上流領域に，胎仔型ライディッヒ細胞特異的エンハンサーを同定した［7］．Ad4BP/SF-1は副腎皮質におけるステロイド代謝酵素群の転写活性化因子として諸橋らによって同定され［8］，その後の解析により，副腎の他にも，視床下部腹内側核や脳下垂体前葉，精巣のライディッヒ細胞や卵巣の莢膜細胞に発現することが明らかにされている［9］．また，われわれは，これらの組織におけるAd4BP/SF-1の発現が，それぞれの組織特異的なエンハンサーによって制御されていることを明らかにしてきた［10-12］．胎仔型ライディッヒ細胞特異的エンハンサーの同定により，細胞を特異的にEGFPで標識し，セルソーティングにより純粋な胎仔型ライディッヒ細胞を回収することが可能となった．そこで，胎仔型ライディッヒ細胞および胎仔期のセルトリ細胞をそれぞれ回収し，その遺伝子発現を検討した結果，過去に報告された通り［13］，胎仔型ライディッヒ細胞にはテストステロン合成の最終反応を担う17β-HSD type3（17β-hydroxysteroid dehydrogenase type3）が発現しておらず，その代わりに胎仔期セルトリ細胞に発現していることが明らかになった．この結果を踏まえ，分取した細胞のステロイド合成能を測定したところ，胎仔期の精巣においては，胎仔型ライディッヒ細胞がアンドロステンジオンを合成し，これが胎仔セルトリ細胞へ受け渡され，最終反応を経てテストステロンへ変換されることが明らかになった．一方で，成獣型ライディッヒ細胞は単独でテストステロンを合成可能であった［14］．以上の結果は，胎仔型ライディッヒ細胞と成獣型ライディッヒ細胞の機能的差異の一端を明らかにするものであった．

本研究では，上記の研究結果をさらに発展させ，胎仔

連絡先：嶋　　雄一，九州大学大学院医学研究院分子生命科学系部門性差生物学講座
〒812-8582　福岡市東区馬出3-1-1
TEL：092-642-6182
FAX：092-642-6181
E-mail：yshima@cell.med.kyushu-u.ac.jp

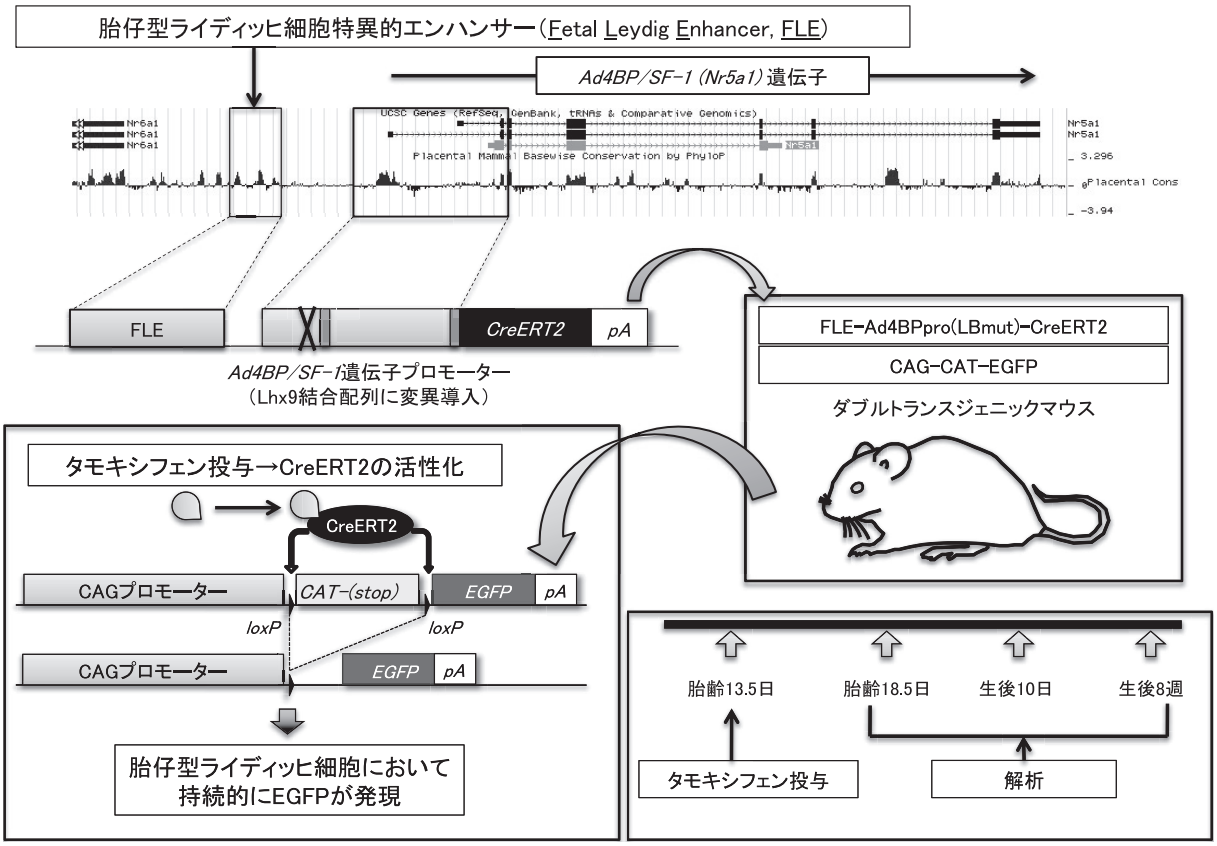

図１　胎仔型ライディッヒ細胞特異的エンハンサーを用いた細胞系譜追跡実験の概要
核内受容体型転写因子 Ad4BP/SF-1をコードする遺伝子は，７つのエクソンから構成される．筆者らが同定した胎仔型ライディッヒ細胞特異的エンハンサー（Fetal Leydig Enhancer, FLE）は，遺伝子の上流領域に位置していた．エンハンサーとプロモーターを用いて，CreERT2を胎仔型ライディッヒ細胞特異的に発現するマウスを作出した．なお，未分化生殖腺における活性を低下させるため，プロモーター上の Lhx9の結合配列に変異を導入した．このマウスと CAG-CAT-EGFP マウスを交配し，胎齢13.5日の時点で妊娠母体にタモキシフェンを投与して胎仔型ライディッヒ細胞を EGFP 標識し，標識された細胞の運命を胎齢18.5日，生後10日，および生後８週の各発生段階において解析した．

型ライディッヒ細胞の機能を生体レベルで解明することを目的とした．特にこれまで出生後に消失すると考えられていた胎仔型ライディッヒ細胞の，出生後の精巣における細胞運命と機能を明らかにすることを目標として実験を行った．

胎仔型ライディッヒ細胞の細胞系譜追跡実験

まず，胎仔型ライディッヒ細胞の細胞運命を追跡するために，筆者らが同定したエンハンサーを用いて，CreERT2（Cre 組換え酵素と変異型エストロゲン受容体の融合タンパク．タモキシフェンと結合することで核内へ移行し loxP 配列の組換えを起こす）を胎仔型ライディッヒ細胞特異的に発現するマウスを作出した．このマウスと CAG-CAT-EGFP マウス［15］を交配し，胎齢13.5日の時点で母体の腹腔内に体重１g あたり0.1mg のタモキシフェンを投与することによってオス胎仔の胎仔型ライディッヒ細胞を EGFP 標識し，その後の細胞運命を追跡した（図１）．その結果，胎齢18.5日の精巣においては，円形の胎仔型ライディッヒ細胞のみが EGFP で標識されていたのに対して（図２A），出生後10日目の精巣では，胎仔型ライディッヒ細胞の一部が扁平な細胞に変化し，精細管周囲に局在することが明らかとなった（図２B）．さらに生後８週齢の成熟雄個体の精巣を解析したところ，円形の細胞と扁平な細胞の両方に EGFP の発現が認められた（図２C）．また，円形の細胞のなかには17β-HSD type3陰性の細胞集団に寄与する細胞（図２D）と，17β-HSD type3を発現する細胞（図２F）の２種類が認められた．現在のところ，出生後に胎仔型ライディッヒ細胞が変化して出現する扁平な細胞や，胎仔型ライディッヒ細胞由来の17β-HSD type3陽性細胞，17β-HSD type3陰性細胞の機能の詳細は不明である．

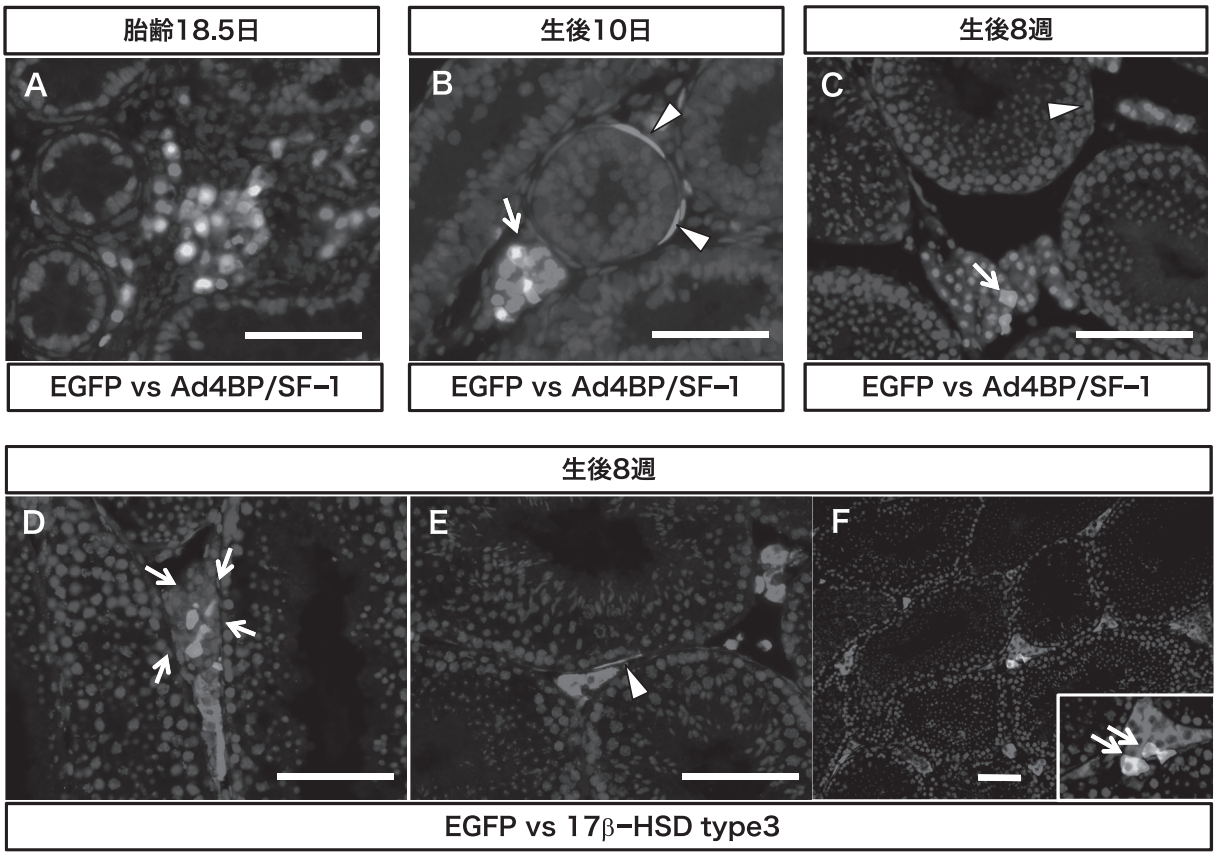

図２　胎仔型ライディッヒ細胞特異的 CreERT2発現マウスを用いた細胞系譜追跡実験の結果
（A）胎齢18.5日の精巣においては，内在性の Ad4BP/SF-1と一致して，円形の細胞に EGFP の発現が認められた．
（B）生後10日の精巣においては，円形の細胞（矢印）に加えて，精細管周囲の扁平な細胞にも EGFP の発現が認められた（矢頭）．
（C）生後８週齢の成熟精巣においても，円形の細胞（矢印）と扁平な細胞（矢頭）に EGFP の発現が認められた．また，円形の EGFP 陽性細胞のうち，一部は17β-HSD type3陰性の細胞集団に寄与していた（D，矢印）が，一部は17β-HSD type3を発現していた（F，矢印）．
（Bar＝100 μm）

胎仔型ライディッヒ細胞特異的 *Ad4BP/SF-1*（*Nr5a1*）遺伝子破壊マウスの解析

次に，胎仔型ライディッヒ細胞の生体における機能を明らかにすることを目的として，細胞特異的 *Ad4BP/SF-1* 遺伝子ノックアウトマウスを作出し解析した．上述したように，Ad4BP/SF-1は核内受容体型の転写因子であり，全身性ノックアウトマウスにおいて副腎や生殖腺が消失することから，本因子は副腎皮質や生殖腺を構成する細胞の発生・分化に必須であると考えられている[16]．このことから，細胞特異的に *Ad4BP/SF-1* 遺伝子を破壊することにより，胎仔型ライディッヒ細胞の機能分化を阻害できると予想した．エンハンサーを用いて胎仔型ライディッヒ細胞特異的 Cre 発現マウスを作出し（図３A），これを *Ad4BP/SF-1* 遺伝子（全身性）ノックアウトマウスおよび *Ad4BP/SF-1* 遺伝子 flox マウスと交配することにより，胎仔型ライディッヒ細胞特異的 *Ad4BP/SF-1* 遺伝子ノックアウトマウス（*Ad4BP/SF-1*$^{\Delta FLC/-}$マウス）を作出した（図３B）．

ノックアウトマウス胎仔を胎齢18.5日の時点で観察すると，精巣の大きさはコントロールとほぼ同等であったが，精巣下降は全く起こっておらず，腎臓の下極付近にとどまっていた（図３C，D）．組織学的解析の結果，精巣の間質からは脂肪滴をもつ細胞が消失し（図３E，F），免疫染色の結果，3β-HSD のシグナルもほぼ完全に消失していた（図３G，H）．この結果は，ノックアウトマウス精巣において，分化した胎仔型ライディッヒ細胞が消失したことを示しており，Ad4BP/SF-1が胎仔型ライディッヒ細胞の機能分化に必須であることが証明された．ノックアウトマウスにおいては，胎仔型ライディッヒ細胞の消失に伴ってテストステロン産生がほぼ消失しており（データ未掲載），アンドロゲン依存性の組織である輸精管は低形成であった（図３D，矢印）．

一方，成獣の精巣を解析したところ，興味深い表現型が観察された．精巣は矮小化しており（図４A，B），組織学的解析の結果，精巣の間質は高度に線維化しており，

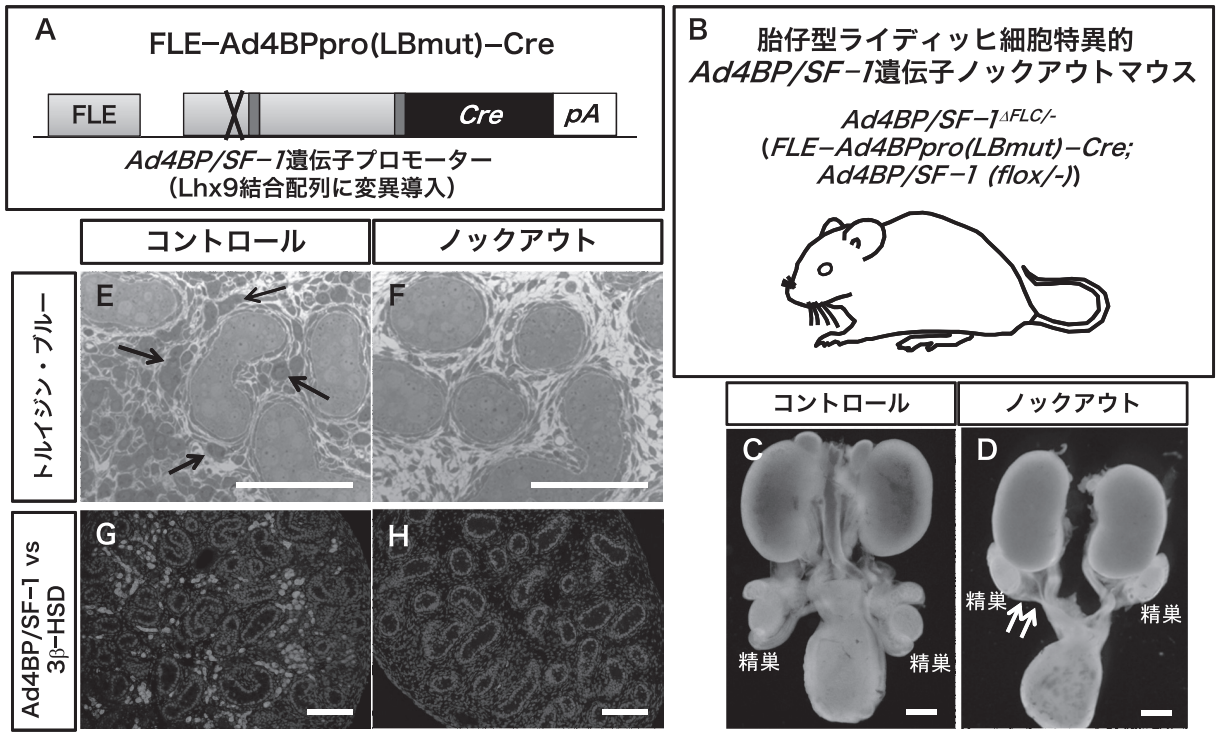

図3　胎仔型ライディッヒ細胞特異的 *Ad4BP/SF−1* 遺伝子ノックアウトマウスの作成と表現型解析（胎齢18.5日）

（A）胎仔型ライディッヒ細胞特異的 Cre 発現コンストラクト.

（B）胎仔型ライディッヒ細胞特異的 Cre マウスと *Ad4BP/SF−1* 遺伝子ノックアウトマウス，*Ad4BP/SF−1* 遺伝子 flox マウスを交配し，胎仔型ライディッヒ細胞特異的 *Ad4BP/SF−1* 遺伝子ノックアウトマウス（*Ad4BP/SF−1*$^{\Delta FLC/-}$ マウス）を作出した.

（C，D）泌尿生殖器の外観　精巣は腎臓下極付近に位置しており，下降していなかった．輸精管は低形成であった（D，矢印）.（Bar＝1 mm）

（E，F）精巣のトルイジン・ブルー染色像　コントロールでは脂肪滴をもつ胎仔型ライディッヒ細胞が（E，矢印）が観察されたが，ノックアウトでは観察されなかった.

（G，H）抗 Ad4BP/SF−1抗体，抗3*β*−HSD 抗体を用いた免疫組織染色像

（C，D：Bar＝1 mm，E，F，G，H：Bar＝100 *μ*m）

基底膜が肥厚していた（図4C，D）．一方，免疫染色の結果，3*β*−HSD 陽性のライディッヒ細胞が精巣の間質に出現していた（図4E，F）．しかし，定量的 RT−PCR の結果，*StAR* 遺伝子（Steroidogenic Acute Regulatory Protein）や *Hsd 3b 1* 遺伝子（3*β*−HSD　type1）の発現はコントロールと差がなかったのに対して，成獣型ライディッヒ細胞の機能的成熟の指標である *Hsd 17b 3* 遺伝子（17*β*−HSD type3）や *Hsd 3b 6* 遺伝子（3*β*−HSD type 6）の発現が低下しており，この結果，精巣重量あたりのテストステロン産生量がコントロールに比べて低下していた（データ未掲載）．また，精子形成にも異常が認められ，円形精子細胞は認められるものの，成熟した伸長精子細胞は全く認められなかった（図4C，D）．以上の表現型をまとめると，①　胎仔型ライディッヒ細胞が消失しても，成獣型ライディッヒ細胞は出現した．②　出現した成獣型ライディッヒ細胞は機能的に十分成熟できず，そのためテストステロンの産生量も少なかった．③　精巣間質の線維化や基底膜の肥厚に加え，精子形成の異常が認められた．

ノックアウトマウスが停留精巣を呈していたことから，上記の表現型が停留精巣によるものであるか否かを確認するために，過去に報告された手法に基づき[17]，ノックアウトマウスの新生仔精巣をヌードマウスの皮下に移植し，8週間後に精巣を摘出して組織学的解析を行った．その結果，ノックアウトマウスの精巣はコントロールより小さく（図4G，H 点線），組織学的解析の結果，間質の高度の線維化と基底膜の肥厚が認められた（図4I，J）．また，免疫染色の結果，3*β*−HSD 陽性のライディッヒ細胞が観察されたものの，その数はコントロールより少なかった（図4K，L）．これらの結果から，ノックアウトマウスで観察された表現型は，停留精巣やホルモン環境（アンドロゲンの低下）によって生じたものではないことが確認された．

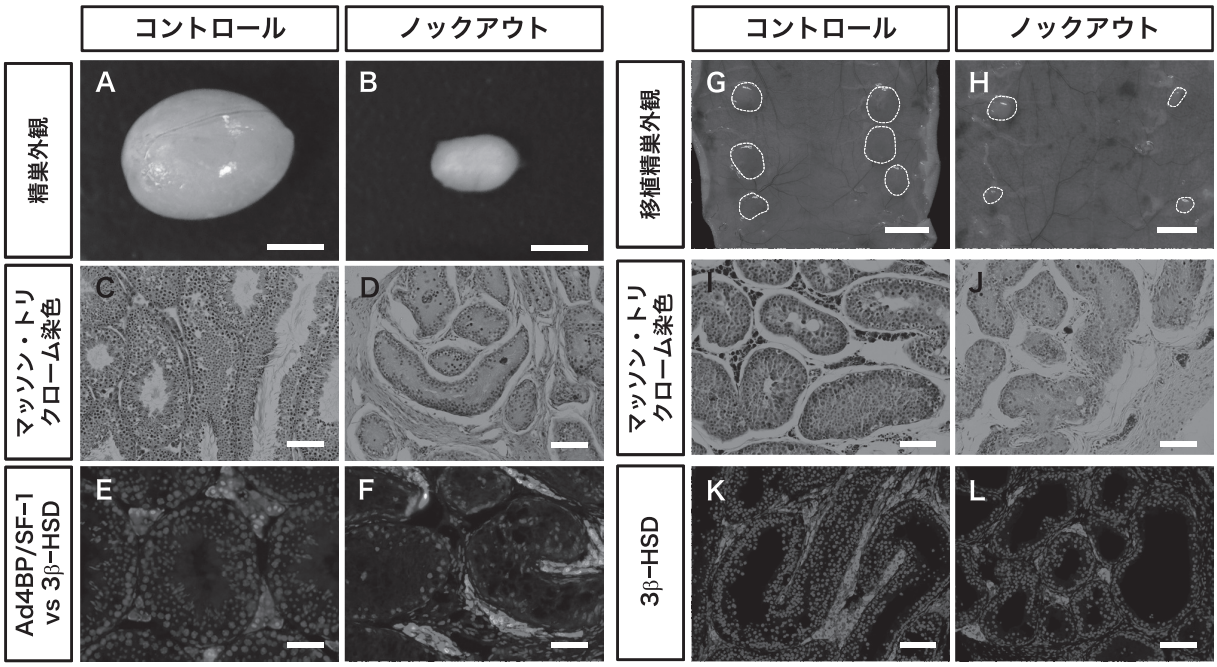

図 4　胎仔型ライディッヒ細胞特異的 *Ad4BP/SF-1* 遺伝子ノックアウトマウスの表現型（生後 8 週齢）と精巣移植実験の結果
（A，B）精巣の外観　ノックアウトにおいて精巣は矮小化していた．
（C，D）精巣のマッソン・トリクローム染色組織像　ノックアウトにおいて，精子形成の異常と精巣間質の著しい線維化が認められた．
（E，F）精巣の免疫組織染色像（Ad4BP/SF-1，3β-HSD）　ノックアウトマウスにおいても，Ad4BP/SF-1陽性・3β-HSD 陽性のライディッヒ細胞が観察された．
（G，H）ヌードマウス背部皮下へ移植された精巣精巣の外観（点線，移植後 8 週間）
（I，J）移植精巣のマッソン・トリクローム染色組織像
（K，L）移植精巣の免疫組織染色像（3β-HSD）
（A，B：Bar＝ 2 mm，G，H：Bar＝ 5 mm，C–F，I–L：Bar＝100 μm）

おわりに

細胞系譜追跡実験により，胎仔型ライディッヒ細胞は出生後にも消失せずに存在し続けること，また出生後に一部の細胞が扁平な細胞へ変化し精細管周囲に局在することが明らかになった．これらの細胞は，Ad4BP/SF-1や3β-HSD を発現しておらず，アンドロゲンを産生するライディッヒ細胞としての性質を失っていることから，どのような機能をもつのかは興味深い点である．過去の報告によると，精細管周囲に存在する PDGF（Platelet-derived Growth Factor，血小板由来成長因子）受容体陽性/GATA4陽性/c-kit 受容体陽性の扁平な細胞が，成獣型ライディッヒ細胞の幹細胞として機能するとされている［18–20］．このことから，胎仔型ライディッヒ細胞が変化した扁平な細胞が，成獣型ライディッヒ細胞の幹細胞として機能する可能性も考えられる．一方，別の研究グループからは，精細管周囲筋様細胞（Peritubular Myoid cell, PTMC）が，精細管の伸長を制御する他，成獣型ライディッヒ細胞の分化や精子形成に関与することが報告され，生後の精巣における PTMC の機能的重要性が注目されている［21–23］．今後，扁平な細胞の遺伝子発現プロファイルの解明や同種移植実験などにより，その機能や運命がさらに詳細に明らかになると期待される．

一方，胎仔型ライディッヒ細胞特異的 *Ad 4 BP/SF-1* 遺伝子破壊マウスの解析からは，胎仔型ライディッヒ細胞が出生後の成獣型ライディッヒ細胞の分化に関与することが示唆された．また，胎仔型ライディッヒ細胞の分化異常が間質の線維化や精子形成の異常を引き起こす病態が観察された．つまり，これまで考えられてきたように胎仔型ライディッヒ細胞は出生後に機能を失って消失するのではなく，出生後にも成獣型ライディッヒ細胞の機能分化や精巣間質の正常な環境の維持に関与すると考えられる．ヒトの非閉塞性無精子症患者の精巣において，高頻度に精巣間質の線維化が認められることから［24］，われわれの作出したノックアウトマウスは，ヒトの精子形成異常の病態をライディッヒ細胞の分化異常という新たな視点から解明する手がかりになるかもしれない．

今後，胎仔型ライディッヒ細胞に由来する細胞の各発生段階のトランスクリプトーム解析や，CreERT2マウスを用いた時期特異的なノックアウトマウスの解析等により，出生後の精巣における胎仔型ライディッヒ細胞の機

能を分子レベルでより詳細に解明したいと考えている．

謝　辞

本稿では，2013年度に日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容を紹介した．本稿執筆の機会を与えていただいた，日本生殖内分泌学会理事長 苛原　稔先生，第18回学術集会会長 緒方　勤先生，および本誌編集委員長 筒井和義先生に感謝申し上げます．

引用文献

1. O'Shaughnessy PJ, Willerton L, Baker PJ (2002) Changes in Leydig cell gene expression during development in the mouse. Biol Reprod 66, 966-975.
2. O'Shaughnessy PJ, Fowler PA (2011) Endocrinology of the mammalian fetal testis. Reproduction 141, 37-46.
3. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H (2006) The foetal Leydig cell– differentiation, function and regulation. Int J Androl 29, 90-95 ; discussion 105-108.
4. Roosen-Runge EC, Anderson D (1959) The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. Acta Anat (Basel) 37, 125-137.
5. Griswold SL, Behringer RR (2009) Fetal Leydig cell origin and development. Sex Dev 3, 1-15.
6. Svingen T, Koopman P (2013) Building the mammalian testis : origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. Genes Dev 27, 2409-2426.
7. Shima Y, Miyabayashi K, Baba T, Otake H, Katsura Y, Oka S, Zubair M, Morohashi K (2012) Identification of an Enhancer in the Ad4BP/SF-1 Gene Specific for Fetal Leydig Cells. Endocrinology 153, 417-425.
8. Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T (1993) Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. J Biol Chem 268, 7494-7502.
9. Parker KL, Schimmer BP (1997) Steroidogenic factor 1 : a key determinant of endocrine development and function. Endocr Rev 18, 361-377.
10. Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K (2006) Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development : initiation by a Hox -Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. Mol Cell Biol 26, 4111-4121.
11. Shima Y, Zubair M, Ishihara S, Shinohara Y, Oka S, Kimura S, Okamoto S, Minokoshi Y, Suita S, Morohashi K (2005) Ventromedial hypothalamic nucleus-specific enhancer of Ad4BP/SF-1 gene. Mol Endocrinol 19, 2812-2823.
12. Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, Tachibana T, Hjalt TA, Drouin J, Morohashi K (2008) Pituitary homeobox 2 regulates adrenal4 binding protein/steroidogenic factor-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. Mol Endocrinol 22, 1633-1646.
13. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Heikkila M, Vainio S, McMahon AP (2000) Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis–androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells. Endocrinology 141, 2631-2637.
14. Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, Matsuzaki S, Shishido Y, Akiyama H, Tachibana T, Tsutsui K, Morohashi K (2013) Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. Mol Endocrinol 27, 63-73.
15. Kawamoto S, Niwa H, Tashiro F, Sano S, Kondoh G, Takeda J, Tabayashi K, Miyazaki J (2000) A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. FEBS Lett 470, 263-268.
16. Luo X, Ikeda Y, Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell 77, 481-490.
17. Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Scholer H, Dobrinski I, Schlatt S (2002) Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. Nature 418, 778-781.
18. Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR, Hardy MP (2006) In search of rat stem Leydig cells : identification, isolation, and lineage-specific development. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2719-2724.
19. Landreh L, Stukenborg JB, Soder O, Svechnikov K (2013) Phenotype and steroidogenic potential of PDGFRalpha-positive rat neonatal peritubular cells. Mol Cell Endocrinol 372, 96-104.
20. Stanley E, Lin CY, Jin S, Liu J, Sottas CM, Ge R, Zirkin BR, Chen H (2012) Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells. Endocrinology 153, 5002 -5010.
21. Qian Y, Liu S, Guan Y, Pan H, Guan X, Qiu Z, Li L, Gao N, Zhao Y, Li X, Lu Y, Liu M, Li D (2013) Lgr4-mediated Wnt/beta-catenin signaling in peritubular myoid cells is essential for spermatogenesis. Development 140, 1751-1761.
22. Welsh M, Moffat L, Belling K, de França LR, Segatelli TM, Saunders PT, Sharpe RM, Smith LB (2012) Androgen receptor signalling in peritubular myoid cells is essential for normal differentiation and function of adult Leydig cells. Int J Androl 35, 25-40.
23. Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB (2009) Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. FASEB Journal 23, 4218-4230.
24. Mayerhofer A (2013) Human testicular peritubular cells : more than meets the eye. Reproduction 145, R107-116.