

胎生期卵巣における NR5A1/Ad4BP/SF1 の転写抑制は Notch シグナルを介した卵巣発生の最適化に必要である

野村 莉紗, 鹿島田 健一

東京医科歯科大学発生発達病態学

緒言

Nr5a1 (Nuclear receptor family 5 group A member 1) は, *Ad4bp* (adrenal 4-binding protein) あるいは *Sf-1* (steroidogenic factor-1) とも呼ばれ, 当初はステロイド産生酵素発現に必要な転写因子として同定された¹⁾. さらにその後 *Nr5a1* は性腺においてその発生から精巣の体細胞であるセルトリ細胞, ライディッヒ細胞分化まで多くの役割を果たすことが明らかとなった²⁻⁶⁾. 性腺発生および精巣分化に必須の転写因子であることから, *NR5A1* はヒトでは46,XY DSDの主要な原因遺伝子の1つとして知られる⁷⁾.

性腺における *Nr5a1* の発現は, 雌雄差が明らかでない原始性腺では発現レベルに差はないが, 性決定以降, 精巣では亢進し卵巣では低下する⁸⁾. 従来, この卵巣での発現の低下は主には promoter や enhancer の活性の低下によるもので, 胎生期卵巣発生において高いレベルでの *Nr5a1* が不要であるためであると考えられていた. 近年われわれは, 胎生期卵巣における *Nr5a1* の発現抑制の意義について興味深い2つの知見を得た. 一つ目は卵巣特異的な転写因子である FOXL2 (Forkhead box L2) が胎生期 *Nr5a1* の発現を抑制していること⁹⁾, 二つ目はある特定のミスセンス変異 (R92W) をもつ *NR5A1* は46,XX DSDの原因となり, その病態として R92W をもつ *NR5A1* は胎生期に *NR0B1* (Nuclear receptor family 0 group B member 1) などの卵巣発生に必須の分子による抑制的な機構から免れることが示唆されたことである¹⁰⁾.

このことは, 卵巣の正常な発生において, *Nr5a1* はある一定以下の発現レベルまで抑制される必要があること, XX性腺において異所性に発現した場合, 精巣決定遺伝子である *Sry* (*Sex-determining region Y*) 不在下でも単独で性腺分化を精巣に誘導できる可能性があるこ

とを示唆するが, 詳細については明らかでない.

目的

胎生期 XX性腺に異所性に *Nr5a1* を強制発現させたマウスを作成し, 胎生期 XX性腺における *Nr5a1* の発現抑制の意義を明らかにする.

方法

Nr5a1 強制発現マウスの作成には, 胎生期の XY性腺, XX性腺支持細胞に同レベルで発現する *Wt1* (*Wilms Tumor 1*) のプロモーター領域を含む160kbのBACクローンをを用いた¹¹⁾. 導入にあたり, *Nr5a1* はIRES配列を介して *Egfp* (*Enhanced green fluorescent protein*) を連結させ, 内因性 *Nr5a1* と区別できるようにした. その結果, XX性腺において *Nr5a1* の発現レベルが異なる2ライン (TgAおよびTgS) の強制発現マウスを作成した (図1A). TgSはTgAに比べ, XX性腺における *Nr5a1* の発現がより強くXY性腺と同程度を示した (図1B, C).

結果

NR5A1は精巣決定因子ではない.

15.5dpcの性腺においてEGFP陽性のNR5A1陽性細胞を認め, 導入した *Nr5a1* が発現していることを確認した (図1C). Tg-A, Tg-Sとも内外性器は雌性型であった. 性腺は免疫染色でSOX9 (*Sry*-type HMG box-9) の発現を認めず, セルトリ細胞の分化を認めなかった (図2). これらは, *NR5A1* の強制発現のみでは *Sry* 不在下では単独で精巣誘導できないことを示した.

Nr5a1 Tg XXマウスはsub fertileである.

胎生期卵巣において *Nr5a1* は卵巣発生に必須な Notch signal を抑制する.

卵巣の形態学的解析では, 両Tgマウスにおいて, P14にmulti oocyte follicle (MOF) の形成 (図3A), P28

連絡先: 鹿島田健一, 東京医科歯科大学発生発達病態学
〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45
TEL: 03-5803-5249
FAX: 03-5803-5246
E-mail: kkashimada.ped@tmd.ac.jp

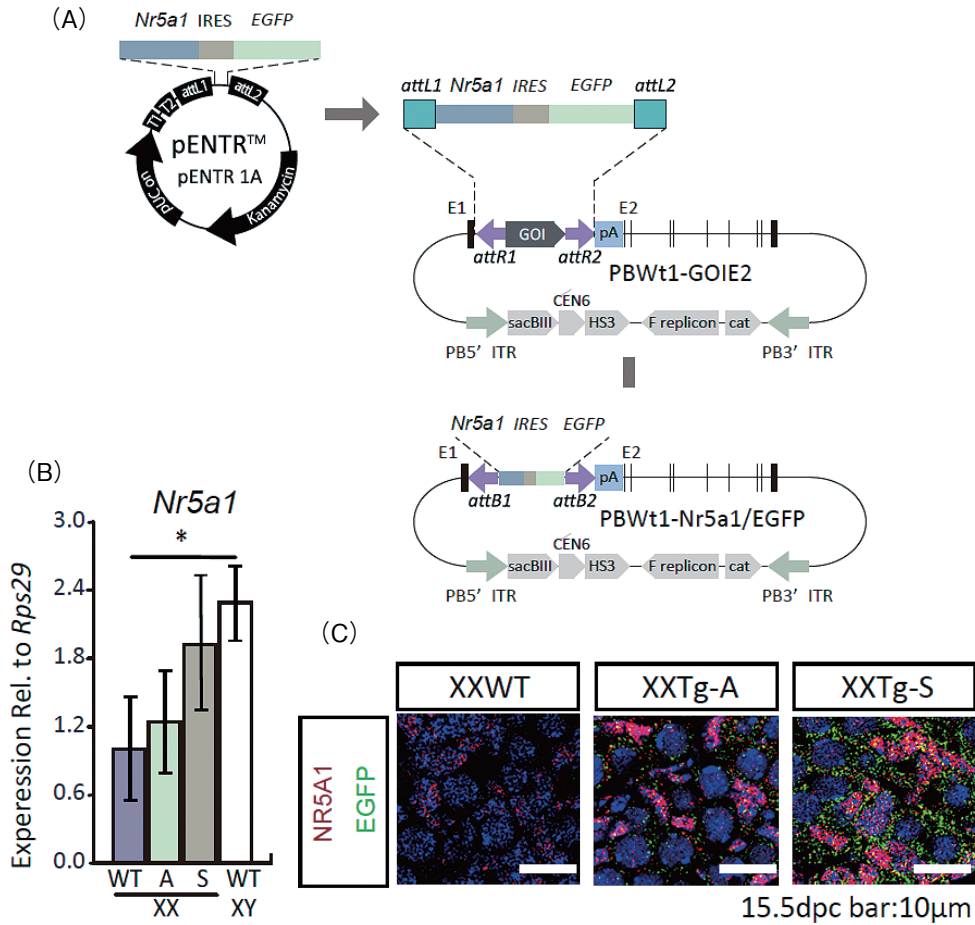


図1 トランスジェニックマウスの作成

- (A) トランスジェニック作成に用いたベクターおよびその方法。IRES 配列を介して *Nr5a1*, *Egfp* をもつフラグメントを *Wt1* の BAC クローンに導入した (PBWt1-Nr5a1/EGFP)。ゲノムへの組み込みには PiggyBac Transposon Vector System を用い効率化を図った。
- (B) XX マウスにおける *Nr5a1* の発現量から 2 ラインを選択、樹立した。TgA ラインは、野生型 XX マウスに比べ *Nr5a1* の発現がわずかに上昇しており、TgS ラインは XY 野生型マウスとほぼ同等に上昇していた。P0 の性腺における qRT-PCR 解析。Mean ± SEM, n = 3, * : p < 0.05
- (C) 蛍光免疫染色による TgS, TgA XX 性腺の解析。EGFP と NR5A1 は同一の細胞に発現している。

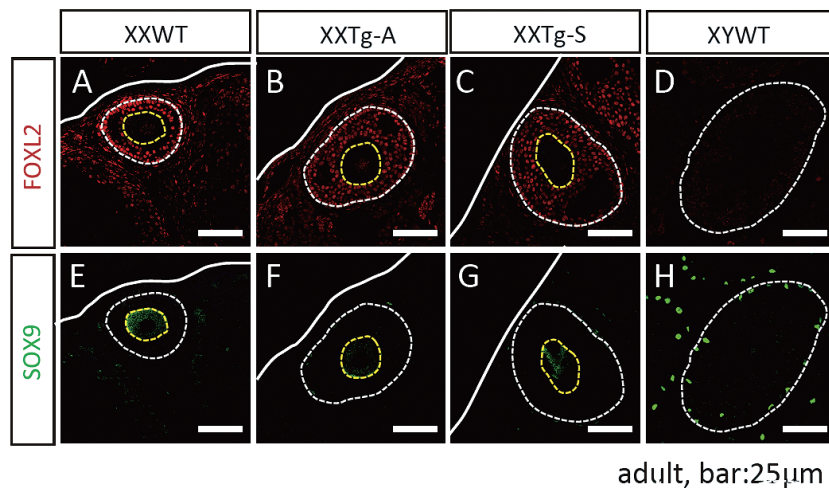


図2 NR5A1 は精巣決定因子ではない。

P28における卵巣の免疫染色。TgA XX, TgS XX とともに卵胞形成を認め (B, C, F, G), SOX9 の発現を認めなかった (F, G)。太い点線：性腺の辺縁, 点線：卵胞と卵子, または精索の辺縁。Scale Bar = 25 μm

に成熟卵胞 (type6-8) の有意な減少を認め (図3B), 卵胞の形成・成熟の障害を認めた. これは, より早期の type4-5 の卵胞におけるアポトーシスの増加が原因であると考えられた (図3C). また TgS では早期より妊孕性に障害を認め, TgA マウスでは産仔数が生後20週ころ (出産を5-6回経験した後) より妊孕性が野生型と比較し有意に低下し, 早発閉経の表現型を示した (図3D). これらの表現型は既報の *Notch2*, *Jag1* knock out マウスと類似していたことから¹²⁾, Notch シグナル分子の発現を解析したところ, TgA において *Notch2*, 3 の発現が有意に減少していた (15.5dpc) (図3E).

胎生期 XX 性腺における過剰 *Nr5a1* は Notch signal を抑制し, 卵巣の正常発生を阻害する.

これらの表現型が実際に Notch シグナルの減弱によるものであることを確認するため, rescue 実験を行なった. 具体的にはハムスターのモノクローナル抗体を用いて作成した *Notch2* agonist (HMN2-29) を胎生期 (13.5, 16.5, 18.5dpc) に妊娠親マウスに投与し解析した¹³⁾ (図4A). その結果, MOF の形成, 成熟卵胞数の減少が有意に改善し, アポトーシス陽性卵胞の数も減少した (図4B, C, D). このことより TgA マウスの卵巣での表現型が体制期の Notch シグナルの低下によることを明らかとした. また, 卵巣の発生に重要な *Wnt4* の発現が, TgA で低下し (P0), *Notch2* agonist 投与で回復した (図4F). これらは XX 性腺では Notch が *Wnt4* の発現を制御していると考えられた. *Foxl2* では有意な変化を認めなかった (図4E).

考 察

上記の結果から NR5A1 は *Sry* 不在下では精巣発生を単独で誘導することはできず精巣決定因子ではないと考えられた.

一方, 胎生期 XX 性腺において NR5A1 は Notch signal を介した卵巣の発生の最適化に必要であると考えられた. Notch signal は隣接する細胞間シグナル伝達系の1つで, さまざまな組織の発生に重要な役割を示すが, 卵巣においては生殖細胞と支持細胞間のシグナル伝達を担い, 卵胞成熟に必須であることが知られている^{12), 14)}. NR5A1 と Notch signal の拮抗的な関係は, 過去には精巣のステロイド産生細胞である Leydig 細胞分化においても知られており, 本研究の結果はこれらの制御機構が卵巣においても保たれていることを示した.

以前より NR5A1 の機能喪失は, 早発閉経を始めとす

る卵巣機能不全の原因となることが知られている¹⁵⁾. 本研究結果は, NR5A1 は機能喪失だけでなく, 発現抑制が解除することによっても同様に早発閉経と同様の臨床像を示すことが示された. このことは卵巣発生において *NR5A1/Nr5a1* の発現はある一定の至適発現レベルに調節される必要があることを示唆する.

近年, NR5A1 は性腺における糖代謝やコレステロールの代謝においても重要な役割を果たすことが見出された^{16, 17)}. NR5A1 はステロイド産生酵素の発現に必須な転写因子として発見されたが, こうした制御はいずれも生体の内分泌代謝系において定量性を伴うことが要求される. 今回のわれわれの結果は, *Nr5a1* が精巣分化, 卵巣分化, それぞれの stage において, その機能の一部は *Nr5a1*-Notch のような定量的な制御に支えられている可能性を示すものである.

今日までの性分化, 性腺発生の研究は, *Sry-Sox9*, *Wnt4-Foxl2* といった精巣卵巣の分化を司る molecular switch とその拮抗的な役割を中心に形成されてきた. 今後はこうした *Nr5a1*-Notch シグナルといった定量的な連続性のある制御を, 性スペクトラムの形成として捉え, 精巣卵巣それぞれの性腺発生の機構を解明していくことが性分化, 性腺発生の多様性や可塑性を解明する手がかりになる可能性があると考えられる.

(なお本研究は, *Journal of Cell Science* (2019) 132 に掲載された)

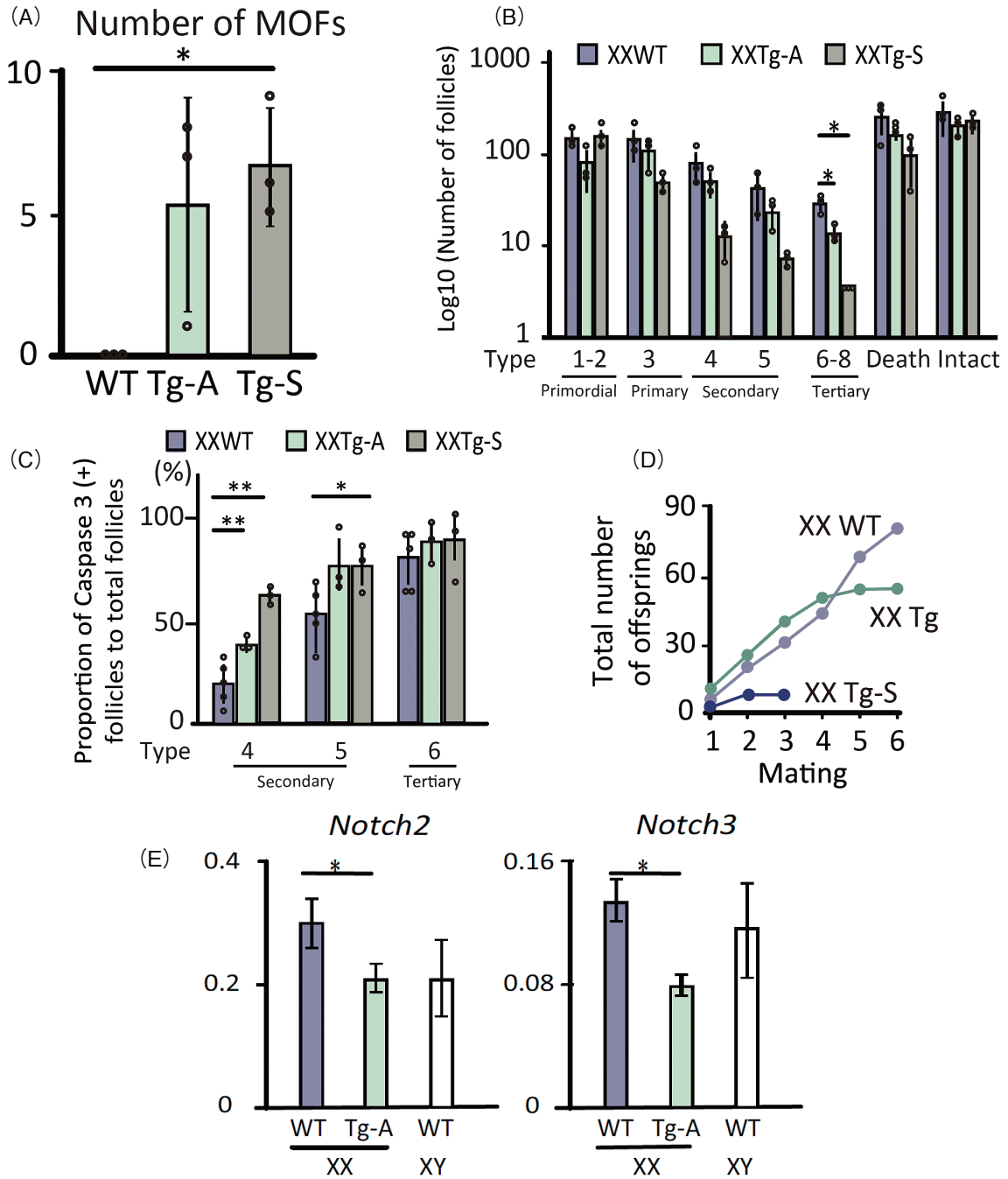


図3 卵巣の組織学的検討

- (A) TgA, TgSとも Multi oocyte follicle (MOF) の形成を認めた. P14, Mean±SEM, n=3, *: p<0.05
 (B) TgA, TgSとも成熟卵胞数 (type6-8) が有意に低下していた. P28, Mean±SEM, n=3, *: p<0.05, **: p<0.01
 (C) Type4, 5の卵胞において Cleaved Caspase3 陽性の卵胞数が有意に上昇していた. P28, Mean±SEM, n=3, *: p<0.05, **: p<0.01
 (D) Matingの回数と合計の産仔数の推移. 同じ2匹のXY野生型と掛け合わせ続け, 累積産仔数を評価したところ, TgSマウスの妊娠性はほぼ廃絶していた. TgAは6回目のMatingのころより有意に妊娠性の低下を認めた. n=3
 (E) TgAマウスにおいて, *Notch2*, *3*のmRNAの発現が有意に低下していた. 15.5dpc Mean±SEM, n=3, *: p<0.05

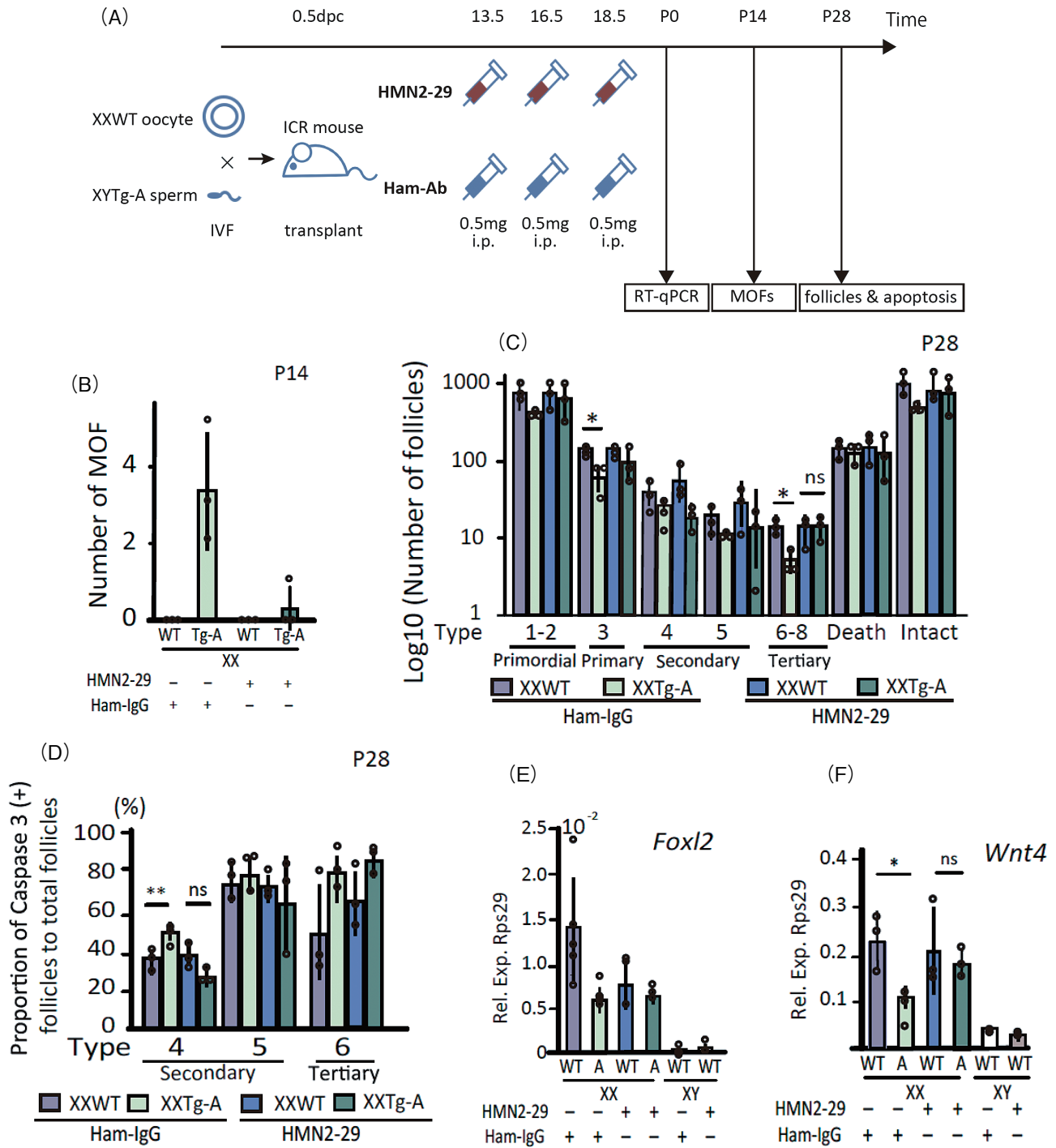


図 4

- (A) Notch2 agonist を用いたレスキュー実験. XX 野生型の卵子に XY TgA または XY 野生型の精子を IVF し ICR マウスに偽妊娠させ, 13.5, 16.5, 18.5dpc に Notch2 agonist 抗体 (HMN2-29) 又はコントロールのハムスター IgG 抗体 (Ham-Ab) を腹腔内投与し出生後の卵胞形成の表現型を評価した.
- (B) HMN2-29投与により TgA の MOF 数が減少した. P14, Mean±SEM, n=3, *: p<0.05
- (C) HMN2-29投与で成熟卵胞 (type6-8) の減少が回復した P28, Mean±SEM, n=3, *: p<0.05, **: p<0.01
- (D) Cleaved Caspase3 陽性の卵胞数が HMN2-29投与により有意に減少した. P28, Mean±SEM, n=3, *: p<0.05, **: p<0.01
- (E, F) *Wnt4* は TgA マウスで発現が減少しており, それは HMN2-29により回復した. *Foxl2* には有意な差を認めなかった. Mean±SEM, n=3, *: p<0.05, **: p<0.01

引用文献

1. Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, and Omura T (1993) Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* 268, 7494-7502.
2. Luo X, Ikeda Y, and Parker K. L (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-490.
3. Hanley N. A, Ball S. G, Clement-Jones M, Hagan D. M, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker K. L, and Wilson D. I (1999) Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev* 87, 175-180.
4. Sekido R, and Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453, 930-934.
5. Buaas F. W, Gardiner J. R, Clayton S, Val P, and Swain, A (2012) In vivo evidence for the crucial role of SF1 in steroid-producing cells of the testis, ovary and adrenal gland. *Development* 139, 4561-4570.
6. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, and Berta P (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18, 6653-6665.
7. Achermann J. C, Ito M, Ito M, Hindmarsh P. C, and Jameson J. L (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22, 125-126.
8. Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, and Morohashi K. I (2001) Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn* 220, 363-376.
9. Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E, Takagi M, Morio T, Asahara H, Schlessinger D, Mizutani S, and Koopman P (2014) FOXL2 transcriptionally represses Sfl expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *FASEB J* 28, 2020-2028.
10. Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, Baba T, Morohashi K. I, Tajima T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Sekido R, Ogata T, Kashimada K, and Fukami M (2017) Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46, XX Individuals with Testicular Tissues. *Hum Mutat* 38, 39-42.
11. Zhao L, Ng E. T, and Koopman P (2014) A piggyBac transposon- and gateway-enhanced system for efficient BAC transgenesis. *Dev Dyn* 243, 1086-1094.
12. Vanorny D. A, Prasasya R. D, Chalpe A. J, Kilen S. M, and Mayo K. E (2014) Notch signaling regulates ovarian follicle formation and coordinates follicular growth. *Mol Endocrinol* 28, 499-511.
13. Tanaka E, Asanuma K, Kim E, Sasaki Y, Oliva Trejo J. A, Seki T, Nonaka K, Asao R, Nagai-Hosoe Y, Akiba-Takagi M, Hidaka T, Takagi M, Koyanagi A, Mizutani S, Yagita H, and Tomino Y (2014) Notch2 activation ameliorates nephrosis. *Nat Commun* 5, 3296.
14. Terauchi K. J, Shigeta Y, Iguchi T, and Sato T (2016) Role of Notch signaling in granulosa cell proliferation and poliovular follicle induction during folliculogenesis in mouse ovary. *Cell Tissue Res* 365, 197-208.
15. Lourenco D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra A. T, Achermann J. C, McElreavey K, and Bashamboo A (2009) Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 360, 1200-1210.
16. Baba T, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon J. Y, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Sato R, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi M. H, Ohkawa Y, and Morohashi K. I (2018) Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids. *Commun Biol* 1, 18.
17. Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang C. Y, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung B. C, and Morohashi K (2014) Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nat Commun* 5, 3634.