

Death associated protein-like 1

陳, 宏斌

<https://hdl.handle.net/2324/4496021>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	陳 宏斌
論文名	Death associated protein-like 1 (DAPL1) による胎児期・性成熟期の視床下部-脳下垂体-性腺系への影響：DAPL1 欠損マウスを用いた検討
論文調査委員	主査 九州大学大学院薬学府 准教授 石井 祐次 副査 九州大学大学院薬学府 教授 山田 健一 副査 九州大学大学院薬学府 教授 田中 嘉孝 副査 九州大学大学院薬学府 准教授 野田 百美

論文審査の結果の要旨

当研究室では、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の妊娠期母体曝露による児の性未成熟・発育障害の機構について、児の臨界期 (周産期) の脳下垂体ホルモンの変動が関与することが報告されている。これに関与する因子を探索するため、ラット胎児脳下垂体を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行い、TCDD 母体曝露により発現低下をする遺伝子の中から、death associated protein like 1 (DAPL1) が TCDD 次世代影響への重要な遺伝子の候補として見出された。DAPL1 は、角膜上皮、表皮、舌上皮などの様々な上皮において、増殖区画の直上の細胞に発現していることが最初に発見され、上皮細胞の分化の初期段階で役割を果たしているのではないかと推測されている。最近、DAPL1 が細胞周期関連タンパク質を調節することにより網膜色素上皮細胞の増殖を阻害できることが報告された。当研究室の最新の研究結果では、ダイオキシン母体曝露により、胎児ラットの下垂体における成長ホルモン (growth hormone; GH) 陽性細胞の数が減ることが示され、初代培養胎児下垂体細胞で DAPL1 をノックダウンすると GH レベルが低下することも示されている。それにもかかわらず、その高発現レベルの組織における DAPL1 の生理機能は未だ十分に理解されていない。本研究では、CRISPR/Cas9 法を用いて DAPL1 欠失マウスを作製した。ジェノタイピングにより標的遺伝子のノックアウトを確認したマウスと野生型マウスを比較し、DAPL1 欠損による周産期と性成熟期の視床下部-下垂体-性腺軸 (hypothalamic-pituitary-gonadal axis; HPG axis) への影響を調べて、本遺伝子の新たな役割を見出すことを目的とした。

第一章では、視床下部-脳下垂体-性腺ホルモンによって調節される関連タンパク質の mRNA 発現レベルを妊娠 18 日 (GD18) において測定することにより、DAPL1 欠損による胎児期の HPG axis に及ぼす影響を確認した。また、メタボロミクスにより、胎児期の肝臓におけるステロイドホルモンの代謝に DAPL1 が及ぼす影響を解析した。その結果、マウスの臨界期において、DAPL1 欠損により雄胎児の脳下垂体における卵胞刺激ホルモンの β サブユニット (follicle stimulating hormone β ; FSH β) mRNA の発現量が低下傾向、黄体形成ホルモンの β サブユニット (luteinizing hormone β ; LH β) mRNA の発現量は顕著に低下していた。さらに、DAPL1 欠損による胎児期精巣におけるシトクロム P450 11A1 (CYP11A1) mRNA、および CYP17A1 と CYP19A1 mRNA の発現量が減少傾向および有意な減少を示すことが明らかになった。また、雄児の肝臓を用いたメタボローム解析の結果からは estrone および

dihydrotestosterone が減少することが推定された。以上の結果から、DAPL1 欠損は、胎児期の脳下垂体における LHβ の発現低下を通じて胎児期の生殖腺における性ステロイド合成低下を引き起こすことが示唆された。

第二章では、性成熟期 HPG axis の性ホルモン合成系における関連タンパク質 mRNA の発現レベルと血清における性ステロイドホルモン濃度の測定に焦点を当て、DAPL1 欠損による性成熟期の HPG axis に及ぼす影響を解析した。その結果、DAPL1 欠損により、精巣における steroidogenic acute regulatory protein (StAR) の発現量が成獣マウスで増加し、これを起点として血清中の testosterone 濃度が増加することが示唆された。Testosterone の過剰分泌により、視床下部-脳下垂体軸における kisspeptin (KISS1) と gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) の mRNA の発現が負のフィードバック制御により低下し、その結果、ゴナドトロピン mRNA の減少傾向が見られた。また、Dapl1 を一過性発現させた I-10 細胞では、StAR 及び 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) mRNA の発現が有意に低下し、培地中の testosterone レベルも低下した。これらの結果から、DAPL1 は精巣のステロイド産生系において重要な役割を果たしていることが示唆された。

第三章では、DAPL1 が HPG axis の性ホルモン合成を制御するメカニズムを探索した。DAPL1 の欠損は、成獣精巣において、protein kinase cAMP-activated catalytic subunit α (PRKACα) および Mitogen-activated protein kinase3/1 (MAPK3/1) の mRNA 発現量を増加させ、それによって AMP response element binding protein (CREB) / cAMP responsive element modulator (CREM) 経路の活性化を引き起こし、StAR mRNA の転写を促進させた。また、DAPL1 の欠損は、AKAP1 の発現を増加させ、それによって StAR の発現を増加させた。In vitro の実験では、DAPL1 が protein kinase A (PKA) および CREB/CREM 経路の主要なタンパク質の mRNA 発現を抑制することで、StAR の発現が抑制されることが示唆された。一方、成獣精巣を用いたメタボローム解析の結果はアラキドン酸が増加することが推定された。また、動物実験と細胞実験のいずれの結果からも、DAPL1 がアラキドン酸代謝関連酵素に影響を与えた。以上の結果から、DAPL1 は PKA 経路とアラキドン酸代謝を介して精巣の StAR 発現を抑制すると推測された。

本研究で得られた知見から、DAPL1 が精巣のステロイド合成系において重要な役割を果たしていることが明らかになり、DAPL1 欠損マウスでは内因性テストステロン濃度の調節障害に伴う症状が惹起されていると考えられた。

本研究の成果は、ステロイド合成系の調節因子に関する有益な情報を含んでいる。これらのことから、申請者は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。