

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15688

研究課題名(和文) Leydig細胞の分化誘導

研究課題名(英文) Differentiation of Leydig cells

研究代表者

石田 貴樹 (Ishida, Takaki)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10771850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年社会的に注目されてるテストステロンの低下により様々な臨床症状を認めるLOH症候群の細胞治療を目的とし、ヒトiPS細胞からテストステロン産生能を有するLeydig細胞の作製に成功した。まず、薬剤依存性に副腎・性腺分化に重要なNR5A1を強制発現する系をヒトiPS細胞に導入し、Leydig細胞へと分化誘導を行った。作製した細胞集団はテストステロン産生に必要な各種酵素(StAR、17 HSD3)や、Leydig細胞のマーカーであるINSL3やLH受容体遺伝子(LHCGR)の発現を認め、培養上清中のホルモン濃度測定により、著名なテストステロンの産生が確認された。

研究成果の概要(英文)：we transduced NR5A1 expressing system by doxycycline addition to human iPS cell. NR5A1 forced expression iPS cells differentiate into Human iPS cells-derived testosterone-producing Leydig cells. Leydig cell marker (INSL3 variant2) and LH receptor (LHCGR) and Leydig cell-specific enzyme (17 HSD3) and expression of various enzyme (StAR, CYP11A, 3 HSD2, CYP17A) necessary for testosterone production were confirmed in RT-PCR. INSL3 and LHCGR were confirmed in immunohistochemical staining. Testosterone production was confirmed by the hormone measurement in supernatants.

研究分野：泌尿器

キーワード：leydig細胞 ヒトiPS細胞 テストステロン NR5A1 17 HSD3 LHCGR アルドステロン コルチゾール

1. 研究開始当初の背景

近年、テストステロンの部分欠如による諸症状が中高年の男性の生活の質を低下させることが注目されている。アンドロゲンの低下に伴う臨床症状は身体症状としては、骨密度の低下、筋肉量の減少、脂肪の増加、認知力の低下などを認め、性機能としては性欲の低下や勃起不全との関連が指摘されており、抑うつなどの精神症状も出現する。加齢に伴うアンドロゲンの低下に起因し前述の症状を認める病態を加齢性男性性腺機能低下症候群 (LOH 症候群) と呼び、アンドロゲン補充療法 (ART) による治療が行われている。臨床の現場で LOH 症候群の患者を治療していて感じたことは、ART により症状の改善を認める反面、効果が持続せず、定期的に補充を続けなければならないということである。テストステロン値が生理的な分泌に近づけば更なる症状の改善が望め、また定期的な通院から解放されれば更なる QOL の改善が望めると考え、これらの解決策となるのが Leydig 細胞の移植治療と考え、この研究を行うことに至った。

2. 研究の目的

2006 年に山中らにより体細胞から様々な組織や臓器の細胞に分化する能力とほぼ無限に増殖する能力を持つヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) が作成され、現在様々な細胞への分化誘導の研究が行われている。ヒト iPS 細胞から Leydig 細胞を誘導する系を開発することを目的とし、Leydig 細胞の作製が可能になれば LOH 症候群の患者に対するアンドロゲン補充療法の代替療法となると考える。Leydig 細胞の分化誘導の研究としてはマウス ES 細胞から Leydig 細胞の分化誘導を試みた報告や (*Stem cells and development*, 24, 4, 2015, 459-470) マウス ES Fibroblast に *Dmrt1*, *Gata4*, *Nr5a1* の複数の遺伝子を導入することで in vitro で

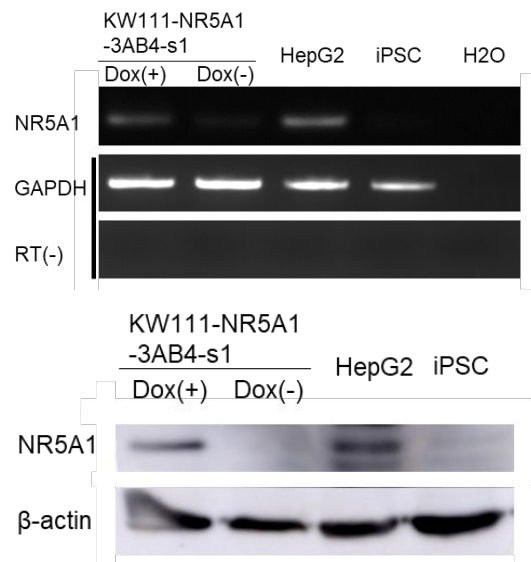
テストステロン産生能を有する Leydig 細胞の作製に成功した (*Stem Cell Reports*, 2017 Jan 10; 8(1): 39-53) 報告はあるが、ヒト iPS 細胞から Leydig 細胞の作製の報告は見られない。ヒト iPS 細胞から Leydig 細胞の分化誘導を研究の目的とした。

3. 研究の方法

男性の末梢血単核球から誘導したヒト iPS 細胞に副腎や精巣で発現しており発生に関与していると考えられている NR5A1 遺伝子をドキシサイクリン添加により強制発現する Tet-on システムをヒト iPS 細胞に導入し、forskolin や 8-Br-cAMP を添加し Leydig 細胞へ分化誘導する。分化誘導によって得られた Leydig 細胞を RT-PCR により各種マーカーを検出し、免疫染色により蛋白質の発現を確認する。また培養上清中のステロイドホルモンを測定する。

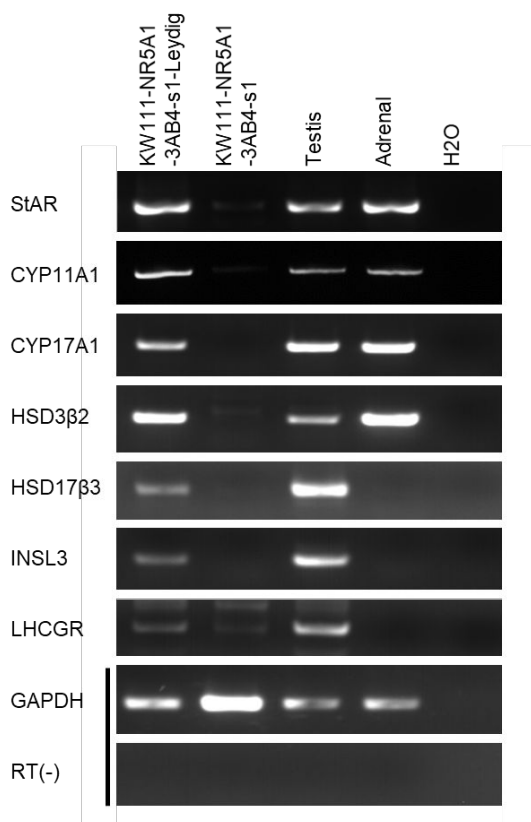
4. 研究成果

(1) ドキシサイクリン添加により NR5A1 を強制発現する Tet-on システムをヒト iPS 細胞に導入した。作製した強制発現細胞は未分化能を維持しているが、ドキシサイクリン添加により NR5A1 を mRNA、蛋白質レベルで産生することを確認した。

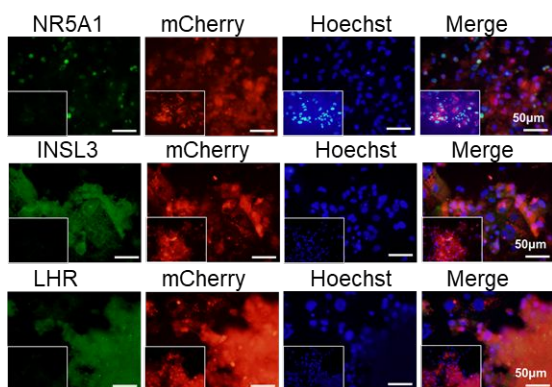


(2) 作製した細胞集団の RT-PCR にてテストステロン産生に必要な各種酵素 (StAR、

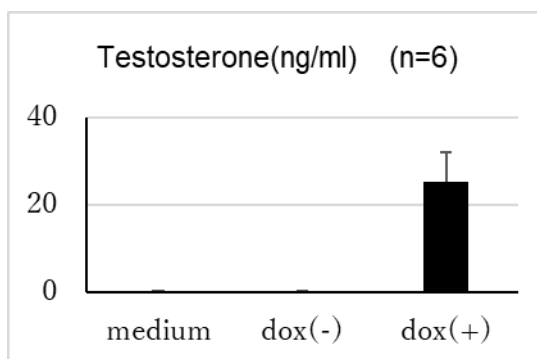
CYP11A1、3 HSD2、CYP17A1) や Leydig 細胞で特異的に発現を認める酵素 (17 HSD3)、Leydig 細胞のマーカーである INSL3 や LH 受容体遺伝子 (LHCGR) の発現が確認された。



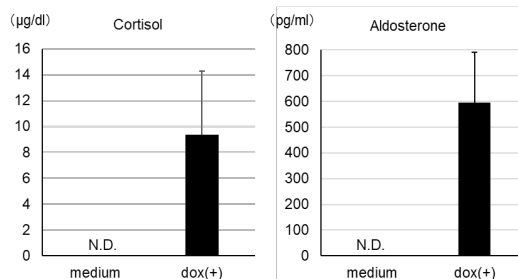
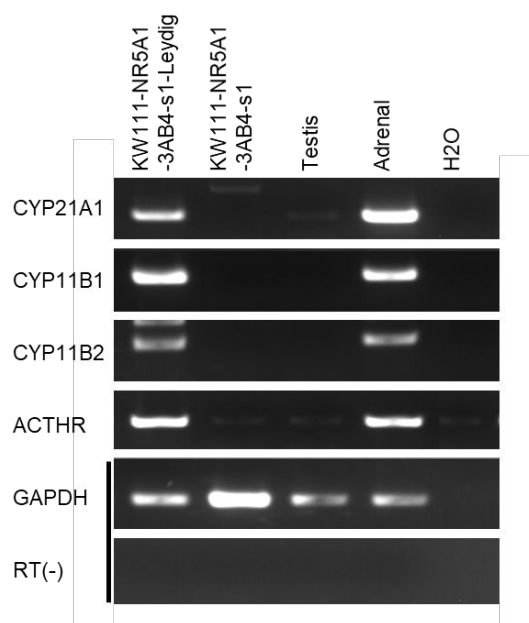
(3)細胞免疫染色でも INSL3、LHR の染色を認めている。



(4)培養上清中のホルモン濃度測定により、著名なテストステロンの産生が確認された。



(5)同細胞集団は、RT-PCR にてコルチゾールおよびアルドステロンの合成酵素 (CYP21A2、CYP11B1、CYP11B2) の発現を認めており、ホルモン濃度測定にて培養上清中へのコルチゾールおよびアルドステロンの分泌を示した。



過去にヒト iPS 細胞から Leydig 細胞作製の報告はなく、今回の研究により初めてヒト iPS 細胞からテストステロン産生能を有する Leydig 細胞の分化誘導に成功した。ただ、本

研究での分化誘導では Leydig 細胞と同時に
コルチゾールやアルドステロン産生能を有
する副腎皮質細胞も分化誘導されており、今
後はより特異的な分化誘導方法の確立や分
離方法などを検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計 6件)

石田 貴樹、ヒト iPS 細胞誘導 Leydig 細
胞の作製、第 105 回 日本泌尿器科学会
総会、2017.4.23、城山観光ホテル(鹿
児島)

石田 貴樹、ヒト iPS 細胞誘導 Leydig 細
胞の作製、国際アンドロロジー学会、
2017.5.6、コペンハーゲン(デンマーク)

石田 貴樹、ヒト iPS 細胞誘導 Leydig 細
胞の作製、日本アンドロロジー学会第 36
回学術総会、2017.6.30、倉敷市芸文館(倉
敷)

石田 貴樹、ヒト iPS 細胞由来テストス
テロン産生 Leydig 細胞の作製、第 22 回
日本生殖内分泌学会、2017.9.30、沖縄コ
ンベンションセンター(沖縄)

石田 貴樹、ヒト iPS 細胞由来テストス
テロン産生 Leydig 細胞の作製、日本泌尿
器科学会中部総会、2017.11.24、大阪国
際会議場(大阪)

石田 貴樹、ヒト iPS 細胞由来テストス
テロン産生 Leydig 細胞の作製、国際性機
能学会、2018.2.28、リスボン(ポルトガ
ル)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 貴樹(TAKAKI ISHIDA)

神戸大学大学院腎泌尿器科学分野 医

員

研究者番号: 10771850

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()