

令和 2 年 9 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09880

研究課題名(和文) ヒトiPS/ES細胞からの副腎性腺原基の同定とその分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of adreno-gonadal primordium from human iPSC and elucidation of its differentiation pathway

研究代表者

曽根 正勝 (Sone, Masakatsu)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：40437207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ヒトiPS細胞からOSR-1陽性中間中胚葉を経て性腺ステロイドおよび副腎皮質ステロイドを産生する細胞を誘導する技術を確立した。SF-1発現後の副腎性腺原基と思われる段階のステロイド産生細胞へのDAX-1導入、LRH-1導入の効果も検討し、さらに三次元での培養がステロイド産生細胞としての成熟に寄与することも示された。しかしながら、in vitroにて性腺と副腎皮質を細分化させる技術の獲得には、さらなる研究が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、世界で初めてヒトiPS細胞から中間中胚葉を経て副腎皮質ステロイド産生細胞を誘導することに成功しており、本研究はその手法のさらなる発展とin vitroでの発生研究への応用を目指したものである。ヒトiPS細胞を利用することによりヒトの発生・分化メカニズムをin vitroで解明することを目指したもので学術的意義は高く、また将来の副腎・性腺の再生療法への応用も考えられるため社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：We tried to elucidate the steroidogenic differentiation processes using hiPSC-derived intermediate mesoderm (IM) that is known to be the origin of the human adrenal cortex and gonads. IM cells expressing Odd-skipped related 1 (OSR1), an early IM marker, were sorted and transfected with steroidogenic factor-1 (SF-1) /adrenal 4 binding protein. Analysis of OSR1+ cells transfected with SF-1 revealed that dopamine D1 receptor agonist upregulated expression of various steroidogenic enzymes and increased secretion of steroid hormones synergistically with adrenocorticotrophic hormone. These OSR1+ cells transfected with SF-1 secreted both gonadal and adrenal steroid hormones. 3-dimensional culture of these cells upregulated the expression of various steroidogenic enzymes. We are now trying to elucidate the mechanism of organ-specific differentiation into gonadal cells and adrenocortical cells.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：adrenal gonad iPS

## 1. 研究開始当初の背景

副腎皮質ホルモンは生体内の電解質や代謝のホメオスタシスを司る、生命の維持に必須のホルモンである。一方、性腺ホルモンは生殖を司るホルモンであり、筋肉や骨の代謝への作用も注目されている。両者は共通のステロイド骨格を持ち、その生合成経路にも共通している部分が多い。また、これらステロイドホルモンとその受容体にはクロストークがあり、進化の過程で細分化してきたことが伺われる。転写因子の発現解析などにより、副腎皮質と性腺は中間中胚葉から共通の副腎性腺原基を介して分化すると考えられているが、副腎性腺原基の特性や詳細は明らかになっていない。以前より申請者らはヒト ES/iPS 細胞を用いた副腎分化の研究を行っており、両者からコルチゾールを含むステロイド産生細胞を誘導することに成功し、報告している (Sonoyama T, et al. *Endocrinology*. 153(9):4336-45. 2012)。さらに、共同研究者らが開発した中間中胚葉マーカー Osr-1 のレポーターヒト iPS 細胞 (Mae S, et al. *Nat Commun*. 4:1367. 2013) を用いて、中間中胚葉細胞を純化し、ケミカルスクリーニングの手法をもちいてステロイド産生細胞分化に関わる因子を探索し、ドーパミン D1 受容体がステロイド産生細胞分化に重要な役割をはたしていることを見いだした (Matsuo K, et al. *Sci Rep*. 7(1):15120. 2017)。その研究過程で、分化途上の細胞で副腎皮質ステロイドホルモンのみならず、テストステロン・エストラジオールなどの性腺ステロイドの分泌も認められたことが、本研究の背景になっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS/ES 細胞由来 Osr-1 陽性中間中胚葉細胞からの、副腎皮質ステロイド産生細胞、性腺ステロイド産生細胞の分化過程を解析し、その過程における共通の副腎性腺原基の存在の確認と、そのキャラクター化を行う。さらに、副腎性腺原基と副腎皮質・性腺分化過程における分化制御因子の探索も行う。再生医療の材料となり得る副腎皮質ステロイド産生細胞、性腺ステロイド産生細胞の樹立を目指すと共に、副腎皮質・性腺の分化とステロイド産生能獲得に重要な役割を果たしている因子を同定することにより、副腎皮質・性腺の機能不全を改善する新規治療薬の開発への足がかりも得る。

## 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞 (3D45、OSR1-GFP knock-in) は mitomycin C で処理したマウス胚線維芽細胞のフィーダー層上で培養した。培地は 1% penicillin/streptomycin と 4ng/mL recombinant human bFGF を含む Primate ES medium を使用した。細胞は、0.25% トリプシン、1mg/ml コラゲナーゼ IV、20% KnockOut™ Serum Replacement (KSR)、1mM CaCl<sub>2</sub> を含む生理食塩水 (PBS) リン酸緩衝液を使用して、7 日ごとに継代した。

未分化なヒト iPS 細胞を回収し、100ng/mL recombinant human/mouse/rat activin A、2μM CHIR99021 を含む Stage1 medium (0.5% penicillin/streptomycin と 2% foetal bovine serum (FBS) を添加した DMEM/F12+Glutamax) で 2 日間培養して EB を形成させた。EB はゼラチンコーティングしたプレートに播種し、100ng/mL recombinant human BMP7 と 2μM CHIR99021 を含む Stage2 medium (0.1mM Non-Essential Amino Acid Solution、0.5% penicillin/streptomycin、0.55mM 2-mercaptoethanol、10% KSR を添加した DMEM/F12+Glutamax) で 12 日間培養することで、OSR1 陽性細胞を誘導した。

細胞は Accumax™ を用いて解離して回収し、Hank's Balanced Salt Solution で洗浄した。死細胞は BD Via-Probe™ を用いて染色した。機器としては FACS Aria™ を用い、推奨されるマニュアルに従って細胞のソーティングを行った。

フローサイトメトリーで回収した OSR1 陽性細胞は、collagen コーティングしたプレートに播種し、10 μM の Y-27632 を含んだ Stage3 medium (0.5% penicillin/streptomycin、10% FBS、2mM L-Glutamine、1x Insulin-Transferrin-Selenium media supplement、0.1ng/mL bFGF を添加した DMEM/F12) で 1 日間培養した。その後、2 日目にレンチウイルスベクターまたはエレクトロポレーション法によって SF-1 をトランスフェクションした。レンチウイルスベクターを用いる場合、SF-1 発現レンチウイルスベクターは MOI 100~500 で、DAX-1 発現レンチウイルスベクターは MOI 50 でトランスフェクションした。薬剤選択は、SF-1 トランスフェクション時は 1.0 μg/mL puromycin 3 日間、DAX-1 トランスフェクション時は 50 μg/mL hygromycin 2 日間とした。エレクトロポレーション法の場合、約 5×10<sup>5</sup> 個の細胞に対して 2μg の SF-1 または LRH-1 発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションは Nucleofector™ のプロトコル通りに行った。トランスフェクション効率は約 60% であった。

Total RNA は NucleoSpin® RNA Kit を用いてプロトコル通りに抽出した。cDNA は PrimeScript™ RT Reagent Kit を用い、1μg の total RNA から合成した。逆転写反応は、37 15分 85 5秒とした。qRT-PCR には Step One Plus™ と Fast SYBR™ Green Master Mix を用いた。PCR のプロトコルは、95 10秒で変性させ、その後 95 5秒と 60 31秒を 1 サイクルとして 40 サイクルとした。mRNA 発現量はハウスキーピング遺伝子として -actin を用いノーマライズした。

## 4. 研究成果

ヒト iPS 細胞由来の OSR1 陽性中間中胚葉細胞に転写因子 SF-1 を導入した細胞は、StAR、3-HSD、CYP11A1、CYP21A2、CYP11B1、CYP11B2、CYP17 のみならず、17β-HSD、アロマトーゼも発

現し、副腎性腺細分化前、すなわち、副腎性腺原基の段階にあたると考えられた。

まず、SF-1 の導入について、これまでエレクトロポレーション法で行っていたが、より導入効率を上げるため、新たにレンチウイルスベクターを作成した (pLVSIN-EF1 Pur Vector, Takara)。MOI 50~100 でトランスフェクションすることにより、従来のエレクトロポレーション法と同程度以上に SF-1 および各種ステロイド合成酵素を発現させることができた。それらのレンチウイルスベクターにより SF-1 を導入した細胞において、ACTH と Dopamin D1 agonist、およびそれらの細胞内シグナルである cAMP の効果を検討した。まず、2.4  $\mu$ M ACTH と 1  $\mu$ M SKF83822 (Dopamine D1 agonist) を投与したところ、CYP11B1 の発現は 4.2 倍、CYP11B2 の発現は 4.4 倍、アロマトラーゼの発現は 1.3 倍と、いずれも投与しない場合より上昇した。さらに、1mM 8-Br-cAMP を投与すると、トランスフェクション 10 日後時点において、CYP11B1 の発現は 17 倍、CYP11B2 の発現は 24 倍、アロマトラーゼの発現は 3.0 倍と、いずれもさらに高く保たれた。ただ、ステロイド合成酵素は上記のように全体的に上昇し、副腎皮質あるいは性腺への特定の方向への細分化傾向は認められなかった。

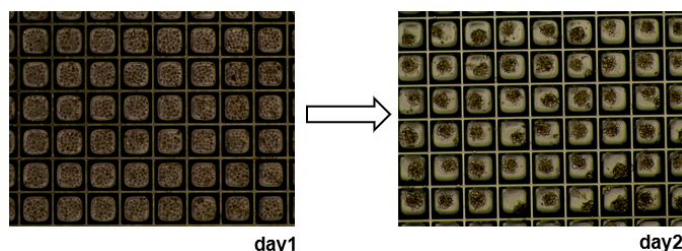
次に、それらの細胞をさらに副腎皮質方向、あるいは性腺方向へ細分化させる可能性のある因子として、分化過程において SF-1 の後で発現し副腎・性腺への細分化を調節していると考えられている転写因子 DAX-1、および、SF-1 と相補的に働く転写因子 LRH-1 について検討した。転写因子 DAX-1 についてはレンチウイルスベクターを (pLVSIN-CMV Hyg Vector, Takara) 作成し、LRH-1 についてはプラスミドベクターを作成した。

OSR1 陽性細胞に SF-1 発現レンチウイルスベクターをトランスフェクションし、トランスフェクション後 5 日目に DAX-1 発現レンチウイルスベクターを MOI 50、100、500 でトランスフェクションした。MOI 100 と 500 では、ウイルスベクターそのものの毒性あるいは細胞選択に用いた hygromycin の影響で細胞活性が低下し、十分量の RNA を回収することができなかった。SF-1 に次いで DAX-1 を MOI 50 でトランスフェクションした細胞は、SF-1 のみをトランスフェクションした細胞と比較して、トランスフェクション後 10 日目の時点において、SF-1 の発現は 0.27 倍と低下した。また、ステロイド合成酵素の発現も、CYP11B1 の発現は 0.25 倍、CYP11B2 の発現は 0.19 倍、アロマトラーゼの発現は 0.10 倍と、副腎特異的なものも性腺特異的なものもいずれも低下した。今回検討した SF-1 と DAX-1 の発現バランスでは、DAX-1 の SF-1 活性を抑制する作用が強く出たため、副腎皮質・性腺への細分化以前に、ステロイド産生細胞としての能力獲得に弊害を生じた可能性が考えられ、ステロイド産生細胞としてもう少し成熟した段階での再検討が必要と考えた。

次に、LRH-1 について、OSR1 陽性細胞に SF-1 発現レンチウイルスベクターをトランスフェクションし、トランスフェクション後 5 日目に、LRH-1 発現プラスミドをエレクトロポレーション法でトランスフェクションした。トランスフェクション効率は 60 %程度であった。SF-1 トランスフェクション後 10 日目の時点において、CYP11B1 の発現は 1.0 倍、CYP11B2 の発現は 0.94 倍、アロマトラーゼの発現は 0.68 倍と、ステロイド合成酵素の発現は SF-1 のみをトランスフェクションした細胞と著変を認めなかった。LRH-1 は SF-1 と相補的に働くとされるが、SF-1 が発現した状態で LRH-1 をさらに発現させても、分化誘導を進める作用は乏しい可能性が考えられた。

さらなる細分化の検討には、まずステロイド産生細胞としてのさらなる成熟が必要と考え、これまで行ってきた *in vitro* での平面培養法に加え、*in vitro* にて 3 次元培養法を導入した。3 次元培養法は平面培養と比較して、細胞形態を *in vivo* に近い状態に保つことができ、細胞間相互作用をより強く促して、細胞の分化誘導を進めるのに有用な手法と考えられている。3 次元培養の手法として、porous membrane を用いる方法では、多孔質膜に播種した OSR1 陽性細胞の凝集性が低く十分な大きさの spheroid を形成することができなかった。collagen ゲルを用いる方法では、ゲルの粘稠度が高いためか、spheroid の径を均一にすることができなかった。最終的に、超低接着プレートを用いる手法によって、OSR1 陽性細胞から安定的に spheroid を形成することが可能となった。

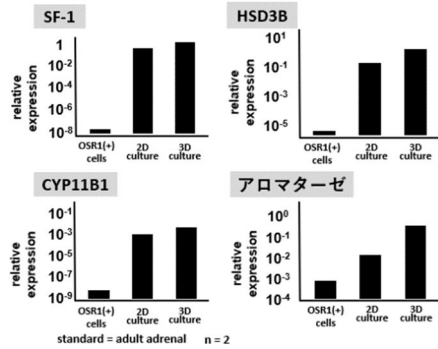
(図 1) 超低接着プレートによる spheroid 形成



OSR1 陽性細胞に SF-1 発現レンチウイルスベクターをトランスフェクションし、3 日間平面培養を行ったのちに一旦回収し、約  $2 \times 10^5$  cells/well で 96 well の超低接着プレート (Corning® Elplasia®) に播種した。2 日間培養することで細胞が自己凝集し、均一な径の spheroid が形成された (図 1)。形成された spheroid を回収して matrigel® 20  $\mu$ L に包埋し、37 °C で 30 分間 incubate した後に Stage3 medium 1mL を加え、Medium には 1mM 8-Br-cAMP を添加して 5 日間培

養した。上記手法で3次元培養を行ったところ、同期間平面培養を行った場合と比較し、SF-1の発現は3.7倍と高く保たれていた。そして、ステロイド合成酵素に関しては、HSD3の発現は11倍、CYP11B1の発現は3.9倍、アロマトラーゼの発現は21倍と、副腎皮質および性腺のいずれのステロイド合成酵素も上昇しており(図2)、ステロイド産生細胞としての成熟度を高めるのに有用な手法と思われる。一方、上記の3次元培養系において培養期間を延長したところ、細胞の増殖能や生存能の低下が認められ、副腎特異的あるいは性腺特異的な方向への分化をさらに進めるためには、培養法の改良や添加因子の投与量、転写因子導入のタイミングなどに関して今後のさらなる検討を要すると考えられた。

(図2) 3次元培養によるステロイド合成酵素発現の上昇(縦軸はログスケール)



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Matsuo K, Sone M, Honda-Kohmo K, Toyohara T, Sonoyama T, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Ohno Y, Inoue M, Ohta A, Osafune K, Nakao K, Inagaki N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Significance of dopamine D1 receptor signalling for steroidogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-15485-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohno Y, Sone M, Taura D, Yamasaki T, Kojima K, Honda-Kohmo K, Fukuda Y, Matsuo K, Fujii T, Yasoda A, Ogawa O, Inagaki N.	4. 巻 41
2. 論文標題 Evaluation of quantitative parameters for distinguishing pheochromocytoma from other adrenal tumors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hypertens Res.	6. 最初と最後の頁 165-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-017-0002-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohno Y, Sone M, Inagaki N, Naruse M, et al.	4. 巻 71
2. 論文標題 Prevalence of Cardiovascular Disease and Its Risk Factors in Primary Aldosteronism: A Multicenter Study in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 530-537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohno Y, Sone M, Inagaki N, Yamasaki T, Ogawa O, Takeda Y, Kurihara I, Umakoshi H, Ichijo T, Katabami T, Wada N, Ogawa Y, Yoshimoto T, Kawashima J, Watanabe M, Matsuda Y, Kobayashi H, Shibata H, Miyauchi S, Kamemura K, Fukuoka T, Yamamoto K, Otsuki M, Suzuki T, Naruse M; JPAS Study Group.	4. 巻 103
2. 論文標題 Obesity as a Key Factor Underlying Idiopathic Hyperaldosteronism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 4456-4464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jc.2018-00866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki Y, Sone M, Inagaki N.	4. 巻 3
2. 論文標題 Reversal of Cushing Pigmentation by Sunitinib.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Endocr Soc.	6. 最初と最後の頁 714-715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/js.2018-00415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Y, Sone M, Inagaki N, Takeda Y, Kurihara I, Tsuiki M, Ichijo T, Wada N, Katabami T, Ogawa Y, Okamura S, Fukuoka T, Kai T, Izawa S, Yoshikawa Y, Hashimoto S, Yamada M, Chiba Y, Naruse M; JPAS/JRAS Study Group.	4. 巻 104
2. 論文標題 Latent Autonomous Cortisol Secretion From Apparently Nonfunctioning Adrenal Tumor in Nonlateralized Hyperaldosteronism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 4382-4389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2018-02790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima A, Sone M, Inagaki N, Takeda Y, Itoh H, Kurihara I, Umakoshi H, Ichijo T, Katabami T, Wada N, Ogawa Y, Kawashima J, Fujita M, Miyauchi S, Okamura S, Fukuoka T, Yanase T, Izawa S, Yoshikawa Y, Hashimoto S, Yamada M, Kai T, Suzuki T, Naruse M.	4. 巻 181
2. 論文標題 Renal impairment is closely associated with plasma aldosterone concentration in patients with primary aldosteronism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 339-350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/EJE-19-0047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Y, Kojima K, Taura D, Sone M, Washida K, Egawa N, Kondo T, Minakawa EN, Tsukita K, Enami T, Tomimoto H, Mizuno T, Kalaria RN, Inagaki N, Takahashi R, Harada-Shiba M, Ihara M, Inoue H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Human iPS cell-derived mural cells as an in vitro model of hereditary cerebral small vessel disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Brain.	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00573-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsujimoto H, Kasahara T, Sueta SI, Araoka T, Sakamoto S, Okada C, Mae SI, Nakajima T, Okamoto N, Taura D, Nasu M, Shimizu T, Ryosaka M, Li Z, Sone M, Ikeya M, Watanabe A, Osafune K.	4. 巻 31
2. 論文標題 A Modular Differentiation System Maps Multiple Human Kidney Lineages from Pluripotent Stem Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 107476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Koji Matsuo, Masakatsu Sone, Kyoko Honda-Kohmo, Takafumi Toyohara, Takuhiro Sonoyama, Daisuke Taura, Katsutoshi Kojima, Yorihide Fukuda, Youichi Ohno, Mayumi Inoue, Akira Ohta, Kenji Osafune, Kazuwa Nakao, Nobuya Inagaki
2. 発表標題 Significance Of Dopamine D1 Receptor Signaling For Steroidogenic Differentiation Of Human Induced Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 ENDO2018(米国内分泌学会) (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 曾根正勝、松尾浩司、園山拓洋、河面恭子、岡本健太郎、田浦大輔、長船健二、中尾一和、稲垣暢也
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来中間胚葉からステロイド産生細胞への分化におけるドーパミンD1受容体シグナルの意義
3. 学会等名 日本ステロイドホルモン学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 METHOD FOR PRODUCING STEROIDGENIC CELLS (ステロイド産生細胞の製造方法)	発明者 長船健二、曾根正勝、稲垣暢也、中尾一和、松尾浩司	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、WO/2018/147257	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田浦 大輔  (Taura Daisuke)  (10558612)	京都大学・医学研究科・特定助教    (14301)	
研究 協 力 者	長船 健二  (Osafune Kenji)		