

平成21年3月6日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591028

研究課題名（和文） 可溶性因子による副腎再生の試み

研究課題名（英文） Regeneration of adrenal gland by soluble factor

研究代表者

岡部 泰二郎（OKABE TAIJIRO）

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：40264030

研究成果の概要：マウスのみならずヒトの骨髄間葉系幹細胞においても、さらには脂肪由来の骨髄間葉系幹細胞においても、転写因子 Ad4BP/SF-1 遺伝子を導入することによりステロイド産生細胞への誘導が確認された。また、Ad4BP/SF-1 遺伝子導入により発現が誘導される遺伝子のなかで、その発現の抑制によりステロイド産生細胞への誘導が変化する遺伝子を少なくとも2つ同定した。残念ながらステロイド産生を誘導する可溶性因子の同定には成功しなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：移植・再生医療、遺伝子、再生医学、シグナル伝達、発生・分化、副腎、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

副腎疾患のなかでも慢性副腎皮質機能低下症をきたすアジソン病は高齢者に多く見られ、その治療は糖質コルチコイド(GC)の投与による補充療法がなされるが、投与量によってはGCの副作用としての糖尿病、骨粗鬆症、動脈硬化の問題に一生直面し、かつ疫学調査によれば発熱、手術等のストレス時にしばしば副腎クリーゼを起こし、生命の危機にさらされることが明らかになっている。

先天性副腎低形成はその成因としてDAX-1あるいはAd4BP/SF-1という転写調節因子の遺伝子異常によることが解明されている。特にAd4BP/SF-1は、そのノックアウトマウス

では副腎、性腺の無形成が起こることから、副腎の発生、分化に極めて本質的な役割を果たす因子と考えられ、Ad4BP/SF-1を用いた遺伝子治療は副腎皮質細胞の再生を促す可能性を秘めている。副腎皮質機能低下症の患者におけるステロイド補充療法は一生必要なものであるが、副腎皮質細胞の再生が可能になれば、補充療法の必要性がなくなり、より生理的な加療が可能となる。以上のことより、特にAd4BP/SF-1遺伝子導入による副腎皮質細胞の再生をめざした新しい副腎皮質機能低下症の治療法開発は有望と思われる。

副腎皮質再生に関してThomasらは単一クローン化副腎細胞の移植から副腎皮質組織

そのものが形成される成績を示し、多分化能を秘めた幹細胞が副腎にはもともと存在している可能性を示唆している(Thomas M. et al. Nature Med 3, 978-983, 1997)。一方、組織幹細胞の代表である骨髄間葉系幹細胞は、中枢神経、筋肉、心筋、肝臓、脂肪、軟骨、骨芽細胞等の組織に分化することが注目されている。

このような背景のもと、われわれは、骨髄間葉系幹細胞に近い性格をもつと考えられる骨髄細胞に Ad4BP/SF-1 の遺伝子導入を行い、ACTH 反応性のステロイド産生細胞の誘導に成功した。この細胞は、長期間安定して、各種ステロイド合成酵素遺伝子の発現、ならびに各種ステロイドの産生を行うことができた(Gondo et al. Genes Cells. 9:1239-1247, 2004)。さらに、in vivo においても両側副腎摘出マウスの生存を延長させることが可能であった。また上記研究は、細胞融合ではなくて細胞自身の分化プログラムの変化により骨髄細胞が異なった系統の細胞に分化できることを明らかにした、大変意義のある研究である。

同様な実験として ES 細胞への Ad4BP/SF-1 の遺伝子導入の試みが報告されているが、ごく一部のステロイド合成が、不完全な形でしか誘導されないため(Crawford et al. Mol. Cell. Biol. 17, 3997-4006, 1997)、ES 細胞を用いた研究はその後ほとんど進展していない。

2. 研究の目的

(1) 今回の研究では、第一に上記研究をさらに発展させて、Ad4BP/SF-1 の遺伝子導入によって引き起こされる一連の情報伝達カスケードを明らかにすることを目指す。われわれは既に DNA チップを用いた解析により、Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子である可能性のあるものを相当数同定している。これらのうちステロイド産生細胞への分化に関与するものを明らかにして、その機能を明らかにすると同時に、可溶性因子による副腎再生への応用の可能性を検討する。

(2) 第二に、各種細胞株ならびに primary culture の培養液ならびに各種既知の生理活性物質を用いて、骨髄細胞からステロイド産生細胞への誘導能のあるものをスクリーニングし、ステロイド産生細胞誘導能を有する可溶性因子の同定をめざす。

3. 研究の方法

(1) 副腎細胞分化誘導能を有する可溶性因子の同定

われわれはマウス骨髄細胞を Dexter culture にて付着細胞のみを長期間培養することにより、未分化な間葉系幹細胞様の細胞を濃縮できることを見いだした。そこでこれ

らの細胞を用いて、ステロイド産生細胞への誘導能のあるものをスクリーニングする。

まず、各種細胞株約 30 種類の培養液を添加する。スクリーニングは、プロゲステロンを EIA にて測定する。スクリーニングが成功すれば、さらに副腎および性腺の種々のステロイド産生、ステロイド合成酵素の誘導を検討する。具体的には、P450_{scc}、 3β -HSD、P450_{c21}、P450_{c11}、 17β -HSD type3、StaR 等のステロイド合成酵素の発現を real time PCR にて、またプレグネノロン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、テストステロン等のステロイドを EIA または RIA にて測定する。

(2) Ad4BP/SF-1 遺伝子導入による副腎再生の分子メカニズムの解明

DNachip を用いた解析により同定した、Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子候補のいくつかのものについて、以下の検討を行う。

① RNAi の方法を用いて、Ad4BP/SF-1 遺伝子導入による副腎再生に必須な因子、作用を仲介する因子を同定する。RNAi としては、shRNA ならびに siRNA を用いる。

② 上記の解析にて Ad4BP/SF-1 の作用を仲介する可溶性因子が見つければ、その可溶性因子を精製し、上記(1)で記した方法で、ステロイド産生細胞への分化誘導能を調べる。

(3) ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を用いてマウスと同様の検討を行う。

(4) マウス脂肪由来の間葉系幹細胞を用いて同様の検討を行う。

4. 研究成果

(1) マウス骨髄細胞由来の未分化な間葉系幹細胞様の細胞に 30 種類の各種培養細胞株の培養上清を添加し、培養上清に含まれると考えられる可溶性因子によるステロイド産生細胞への誘導の有無を検討したが、誘導能を持つ培養上清は認められなかった。

(2) commercial base で販売されているヒトの骨髄間葉系幹細胞を用いて同様の実験を行い、マウスと同様に Ad4BP/SF-1 遺伝子導入によりステロイド産生細胞への誘導が確認された。また、ヒトにおいてはマウスと比較して ACTH 受容体ならびに LH 受容体の発現誘導に伴う ACTH ならびに LH 反応性の獲得が顕著であった。

(3) マウスでの DNA チップで解析した結果同定された、Ad4BP/SF-1 標的遺伝子候補のうちの数種類について shRNA による RNAi の効果を検討した。なお shRNA の安定形質転換株取得の過程で骨髄細胞の分化能に大きな影響は認めなかったため、この方法の有用性が確認された。

また、ヒトにおいても DNA チップでの解析を行い、Ad4BP/SF-1 発現により遺伝子発現が著明に増加するものが相当数同定され、その

うちのいくつかはマウスで得られたもののヒトホモログと考えられた。これらはAd4BP/SF-1のステロイド産生細胞誘導作用を媒介する因子である可能性が考えられる。

ヒトにてそれらの遺伝子発現をsiRNAを用いたRNAiによりノックダウンすることにより、骨髄間葉系幹細胞へのAd4BP/SF-1遺伝子導入によるステロイド産生細胞への誘導系への影響を検討した結果、ステロイド合成酵素ならびにステロイド産生ともに再現性よく影響を与える遺伝子がみつかった。

そのうち、ヒトならびにマウスとともに発現誘導が認められ、その発現をノックダウンすることにより、Ad4BP/SF-1遺伝子導入によるステロイド産生細胞への誘導が障害されることが見出された2つの遺伝子に注目した(それぞれ遺伝子X、遺伝子Yと呼ぶことにする)。遺伝子Xは既知の可溶性因子であり、一方遺伝子Yは機能が全く不明な未知の因子である。

可溶性因子であるXの精製物を骨髄間葉系幹細胞類似の細胞に添加する実験を行ったが、ステロイド産生への影響は全く認められなかった。Xと複合体を形成するpartnerの精製物をXと一緒に添加することも試みたが結果は変わらなかった。一方、機能が全く不明なYに対して抗体の作成を試み、特異性の高い抗体が得られた。

(4) 骨髄由来のみならずマウス脂肪由来の間葉系幹細胞を用いた検討も行った。骨髄由来のものと同様に、Ad4BP/SF-1の遺伝子導入によりステロイド産生細胞の誘導が認められたが、脂肪由来の間葉系幹細胞では副腎性のステロイド産生が優位であり、一方骨髄由来の間葉系幹細胞では性腺性のステロイド産生が優位であった。このことは、用いる間葉系幹細胞のソースが骨髄由来か脂肪由来かにより、ステロイド産生のプロファイルが異なることを示しており、副腎型もしくは性腺型のステロイド産生の分離への第一歩と考えている。脂肪由来の間葉系幹細胞は採取が比較的容易で、採取細胞量も多いことより、臨床応用の面では有望であるかもしれない。

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4件)

① 岡部泰二郎、柳瀬敏彦、高柳涼一 副腎再生 臨床検査 52: 1247-1247, 2008 査読なし

② Gondo, S., Okabe, T., Tanaka, T., Morinaga, H., Nomura, M., Takayanagi, R., Nawata, H., Yanase, T. Adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal cells develop into different lineage of steroidogenic

cells by forced expression of steroidogenic factor 1. Endocrinology 149: 4717-4725, 2008 査読有り

③ Tanaka, T., Gondo, S., Okabe, T., Ohe, K., Shirohzu, H., Morinaga, H., Nomura, M., Tani, K., Takayanagi, R., Nawata, H., Yanase, T.

Steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells. J Mol Endocrinol 39: 343-350, 2007 査読有り

④ Yanase, T., Gondo, S., Okabe, T., Tanaka, T., Shirohzu, H., Fan, W., Oba, K., Morinaga, H., Nomura, M., Ohe, K., Nawata, H.

Differentiation and regeneration of adrenal tissues: An initial step toward regeneration therapy for steroid insufficiency. Endocr Journal 53:449-459, 2006 査読有り

[学会発表] (計12件)

① 第8回西日本骨・関節関連疾患懇話会(福岡)

2008年7月5日

権藤重喜、田中知子、権藤寿喜、岡部泰二郎、本村誠一、塩川佐斗志、生山祥一郎、柳瀬敏彦、西村純二

骨髄由来間葉系幹細胞と脂肪由来間葉系幹細胞の異同—ステロイドホルモン産生細胞再生の観点から—

② Global COE Symposium (Fukuoka)

2008年11月9日

Gondo, S., Tanaka, T., Gondo, H., Okabe, T., Morinaga, H., Nomura, M., Takayanagi, R., Nawata, H., Yanase, T.

Adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal cells develop into different lineage of steroidogenic cells by forced expression of SF-1.

③ 第81回日本内分泌学会学術総会(青森)

2008年5月16日

田中智子、権藤重喜、岡部泰二郎、野村政壽、河手久弥、高柳涼一、名和田 新、柳瀬敏彦 間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞への分化誘導における各種性分化関連因子の単独効果の検討

④ 第80回日本内分泌学会学術総会(東京)

2007年6月14日

柳瀬敏彦、権藤重喜、田中智子、白水久男、岡部泰二郎、高柳涼一、名和田 新 シンポジウム7「再生医療のトピックス」骨髄及び脂肪由来間葉系幹細胞よりのステロイド産生細胞の創生

⑤ 第80回日本内分泌学会学術総会(東京)

2007年6月14日

権藤重喜、岡部泰二郎、田中智子、森永秀孝、白水久男、大江賢治、野村政壽、名和田 新、

柳瀬敏彦、高柳涼一

SF-1/Ad4BP を強制発現した骨髄・脂肪由来間葉系幹細胞のステロイド産生能の異同とレチノイン酸の影響

⑥ 「ステロイドホルモンを考える会」第6回研究発表会（福岡）

2007年3月9日

田中智子、岡部泰二郎、権藤重喜、高柳涼一、柳瀬敏彦、名和田 新

ヒト骨髄間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞の創出

⑦ 第80回日本内分泌学会学術総会（東京）

2007年6月14日

田中智子、権藤重喜、岡部泰二郎、大江賢治、野村政壽、名和田 新、柳瀬敏彦、高柳涼一

SF-1/Ad4BP はヒト骨髄由来間葉系幹細胞をステロイドホルモン産生細胞へ分化誘導する

⑧ 21th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (Kyoto)

2006年6月20日

Tanaka, T., Shigeki, G., Okabe, T., Nawata, H., Takayanagi, R., Yanase, T.

SF-1/Ad4BP transforms human mesenchymal stem cells into steroidogenic cells.

⑨ 12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Athens)

2006年9月13日

Gondo, S., Tanaka, T., Okabe, T., Morinaga, H., Ohe, K., Nomura, M., Takayanagi, R., Yanase, T.

SF-1/Ad4BP transforms mouse mesenchymal stem cells derived from both bone marrow and adipose tissue into steroidogenic cells.

⑩ 12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Athens)

2006年9月13日

Tanaka, T., Gondo, S., Okabe, T., Takayanagi, R., Nawata, H., Yanase, T.

SF-1/Ad4BP transforms human mesenchymal stem cells into steroidogenic cells.

⑪ 第79回日本内分泌学会学術総会（神戸）

2006年5月19日

権藤重喜、田中智子、岡部泰二郎、森永秀孝、大江賢治、野村政壽、名和田 新、柳瀬敏彦、高柳涼一

SF-1/Ad4BP はヒト長期培養骨髄細胞およびマウス初代長期培養脂肪幹細胞をステロイドホルモン産生細胞に変化させる

⑫ 第43回日本臨床分子医学会（札幌）

2006年7月20日

田中智子、権藤重喜、岡部泰二郎、森永秀孝、大江賢治、野村政壽、名和田 新、柳瀬敏彦、高柳涼一

骨髄および脂肪由来間葉系幹細胞のステロ

イド産生細胞への分化誘導

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 泰二郎 (OKABE TAIJIRO)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：40264030

(2) 研究分担者

柳瀬 敏彦 (YANASE TOSHIHIKO)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30239818

野村 政壽 (NOMURA MASATOSH)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30315080