

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18692

研究課題名（和文）間葉系幹細胞からの前顆粒膜細胞の誘導 -体外培養系での卵子獲得を目指して-

研究課題名（英文）Induction of pre-granulosa cells from mesenchymal stem cells

研究代表者

宮崎 有美子（Miyazaki, Yumiko）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・特命助教

研究者番号：10808710

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：Steroidogenic Factor-1 (SF-1)やWilms Tumor 1 (WT1)は、副腎や性腺の発生に重要な役割を果たすことが知られているが、その詳細なメカニズムは不明なままである。本研究では、SF-1とWT1がヒト性腺体細胞の分化に果たす役割を調べた。レンチウイルスを介した遺伝子発現系を用いて、SF-1とWT1がヒト羊膜由来間葉系幹細胞(hAMMSCs)のステロイド形成能にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、SF-1はhAMMSCsのプロゲステロンおよびアンドロゲン産生細胞への分化を誘導し、WT1-KTSはエストロゲン産生細胞への分化を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、SF-1とWT1-KTSがヒト性腺ステロイド形成細胞の分化、特に卵巣発生において重要な役割を果たしていることが明らかになった。これらの知見は、ヒト性腺発生に関する研究の発展に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：Steroidogenic Factor-1 (SF-1) and Wilms Tumor 1 (WT1) are known to play important roles in adrenal and gonadal development, but the detailed mechanisms remain unclear. In this study, we investigated the role of SF-1 and WT1 in human gonadal somatic cell differentiation. Using a lentivirus-mediated gene expression system, we investigated how SF-1 and WT1 affect the steroidogenic potential of human amnion-derived mesenchymal stem cells (hAMMSCs). The results showed that SF-1 induced the differentiation of hAMMSCs into progesterone- and androgen-producing cells, while WT1-KTS promoted their differentiation into oestrogen-producing cells.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：間葉系幹細胞 Wilms Tumor 1 Steroidogenic Factor-1 性腺ステロイドホルモン

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

性腺体細胞で主に合成される性ステロイドホルモンは、性の発生と生殖に極めて重要である。中胚葉から副腎や精巣が分化するメカニズムはある程度解明されているが、卵巣とくに顆粒膜細胞の分化発生メカニズムは未だ明らかでない。

マウス研究では、SF-1 と WT1 が性腺の発生に関与していることが示されているが、ヒトの性腺体細胞の分化機構については不明な点が多い。SF-1 と WT1 は妊娠 6 週目のヒト胎児の未分化性器隆起に発現しており、これらの転写因子がヒトにおいてもステロイド生成細胞の分化に関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

我々のグループは、これまでに、中胚葉由来の間葉系幹細胞に SF-1 遺伝子を導入し、cAMP 刺激を加えることで、雌雄の性ステロイド産生細胞や、副腎皮質のコルチゾール産生細胞を作成した。近年、ヒト羊膜から、高い分化・増殖能を有する幹細胞を作製できること、霊長類のカニクイザル・モデルにおいて、生殖細胞が胎齢 11 胚の 初期羊膜より誘導されることが報告されている。本研究では、ヒト羊膜由来の間葉系幹細胞を用いて、性腺ステロイド生成細胞の分化における SF-1 と WT1 の関与を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

レンチウイルスによる一過性遺伝子発現システムを用いて、SF-1 および WT1 をヒト羊膜由来間葉系幹細胞 (hAmMSC) に一過性発現させ、hAmMSCs におけるステロイド産生能を解析した。

WT1 には、3 番目と 4 番目の亜鉛指の間に 3 つのアミノ酸 (リジン、スレオニン、セリン[KTS]) があるかないかで定義される、2 つの主要なスプライシングされたアイソフォーム(WT1+KTS および WT1-KTS)をもつ。WT1+KTS と WT1-KTS は、それぞれ生化学的、生物学的性質が異なる。最近の研究では、WT1-KTS は、雄の精巣決定遺伝子である性決定領域 Y (SRY) 遺伝子と同様に、雌マウスの卵巣決定因子である可能性が示唆されている。本研究では WT1+KTS と WT1-KTS をそれぞれ遺伝子導入し、遺伝子発現やステロイド合成能について解析した。

4. 研究成果

1) ヒト羊膜からの MSC の単離

3 つの陽性マーカー (CD73、CD90、CD105) と 5 つの陰性マーカー (CD45、CD34、CD11b、CD79A、HLA-DR) を用いて、フローサイトメトリーにより細胞表面マーカーをチェックした。CD90 と CD73 は細胞表面に高発現していたが、CD105 の陽性率は 4%であった。

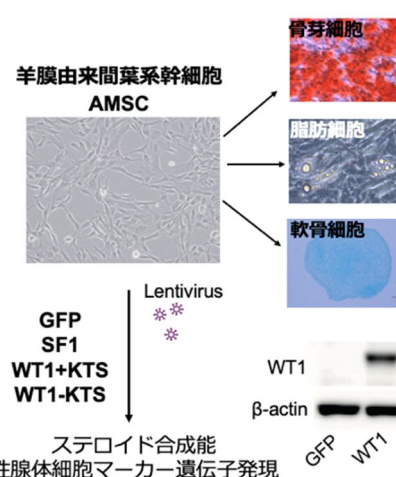
2) hAmMSC の多分化能の確認

hAmMSCs の多能性を確認するため、脂肪、骨、軟骨細胞への分化能を評価した。脂肪細胞への分化をオイルレッド O 染色により、骨芽細胞への分化をアリザリンレッド S 染色により、軟骨分化をアルシアンブルー染色により、それぞれ確認した (図 1)。

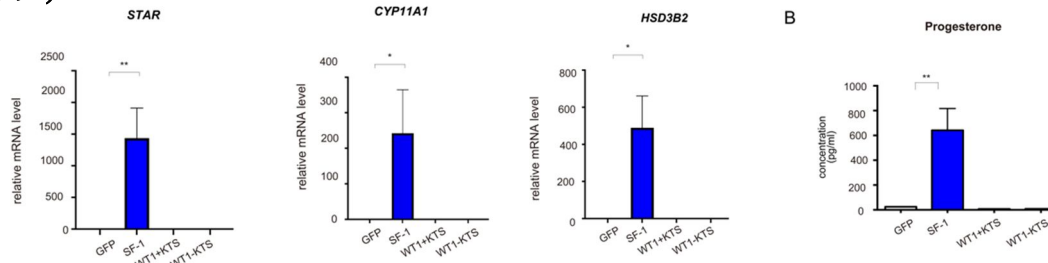
3) プログステロン産生細胞系に対する SF-1 と WT1 の効果

SF-1 は hAmMSCs の StAR、CYP11A1、HSD3B2 の mRNA 発現を著しく増加させプロゲステロン産生を有意に増強した。対照的に、WT1 は、hAmMSCs におけるプロゲステロン産生因子の mRNA 発現を変化させなかった (図 2)。

(図 1)



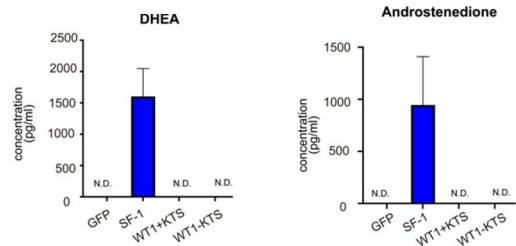
(図 2)



4) アンドロゲン産生細胞系に対する SF-1 および WT1 の効果

SF-1 は、hAmMSCs における CYP17A1 の mRNA 発現を著しく増加させ、DHEA およびアンドロステンジオンの産生を促進した。対照的に、WT1 は、アンドロゲン産生酵素の mRNA 発現を変化させなかった (図 3)。

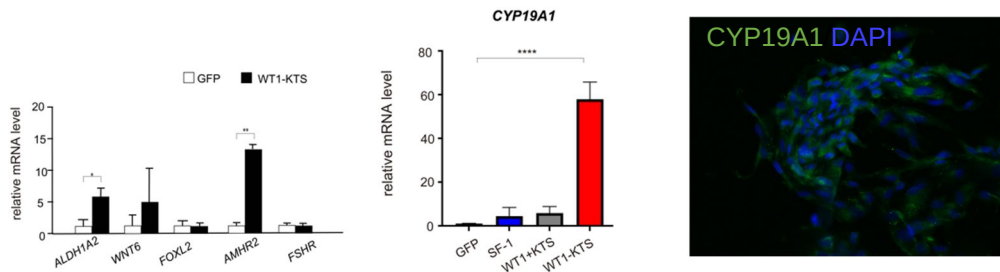
(図 3)



5) エストロゲン産生細胞系に対する SF-1 と WT1 の効果

WT1-KTS は hAmMSCs における ALDH1A2、AMHR2、CYP19A1 の mRNA 発現を有意に増加させた。免疫細胞化学的解析により、WT1-KTS が hAmMSCs のアロマターゼ発現を増加させたことが確認された (図 4)。

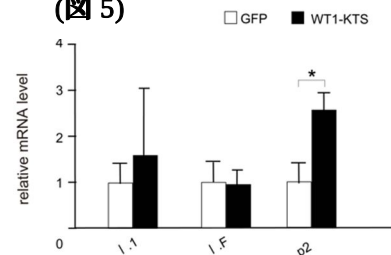
(図 4)



6) WT1-KTS による CYP19A1 PII プロモーターの活性化

I.1 (胎盤)、I.f (脳)、および PII (卵巣) の転写産物の mRNA 発現が hAmMSCs で観察された。WT1-KTS の一過性発現は、hAmMSCs における卵巣特異的 PII プロモーターの mRNA レベルを有意に増加させた。WT1-KTS による CYP19A1 PII プロモーターの活性化を、ルシフェラーゼアッセイを用いて確認した (図 5)。

(図 5)



今回の研究で、SF-1 と WT1-KTS は、hAmMSCs のステロイド産生細胞への分化において、異なる役割を示した。SF-1 は hAmMSCs のプロゲステロンおよびアンドロゲン産生細胞系への分化を誘導し、WT1-KTS はエストロゲン産生細胞系への分化を促進した。

これまでに、転写因子を用いて卵巣体細胞の分化を誘導する試みがいくつかなされている (1, 2)。Gregoire らは、WT1-KTS がマウス XX 胚の前顆粒膜細胞分化の開始に必須であることを示し、WT1-KTS はマウス XY 胚の雄-雌性逆転を誘導した。これらの結果は、WT1-KTS が雌マウスの卵巣決定因子である可能性を示唆している。本研究において、WT1-KTS は hAmMSCs において卵巣特異的アロマターゼの発現を誘導した。この結果は、WT1-KTS がヒトの卵巣顆粒膜細胞の分化に少なくとも部分的に関与していることを示唆している。

本研究では、SF-1 と WT1-KTS の共発現は、hAmMSCs における SF-1 誘導性遺伝子発現やステ

ロイド産生を変化させなかった。Chen らは、マウスにおいて WT1 が SF-1 の発現を抑制することにより、セルトリ細胞と顆粒膜細胞の系譜特異性を誘導することを示した (3)。WT1 と SF-1 の間に観察可能な相互作用が見られなかったのは、マウスとヒトの種差によるものなのか、あるいは我々の hAmMSC システムの限界によるものなのか、さらなる調査が必要である。

(文献)

1. Lipskind S, Lindsey JS, Gerami-Naini B, Eaton JL, O'Connell D, Kiezun A, et al. An embryonic and induced pluripotent stem cell model for ovarian granulosa cell development and steroidogenesis. *Reprod Sci* (2018) 25:712–26.
2. Lan CW, Chen MJ, Jan PS, Chen HF, Ho HN. Differentiation of human embryonic stem cells into functional ovarian granulosa-like cells. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98:3713–23.
3. Chen M, Zhang L, Cui X, Lin X, Li Y, Wang Y, et al. Wt1 directs the lineage specification of Sertoli and granulosa cells by repressing Sf1 expression. *Development* (2017) 144:44–53.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------