

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790661
 研究課題名 (和文) 間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞への分化誘導法の確立および分化機序の解明
 研究課題名 (英文) Establishment of the methods for regeneration of steroidogenic cells from mesenchymal stem cells and analysis of its mechanism
 研究代表者
 田中 智子 (TANAKA TOMOKO)
 福岡大学・医学部・研究員
 研究者番号：10380528

研究成果の概要 (和文) : ステロイド補充療法は確立した治療法であるが多くの場合一生の補充を必要とするなど問題点も存在するため、新しい治療法開発の可能性を模索している。私達の生体内の幹細胞である間葉系幹細胞は副腎・性腺発生に必須な因子 Ad4BP/SF-1 の導入によってステロイド産生細胞へ分化する現象に着目し、Ad4BP/SF-1 によって発現誘導される遺伝子が性腺ステロイド産生細胞への分化に関与することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Although we reported that Ad4BP/SF-1 transformed mesenchymal stem cells (MSCs) into steroidogenic cells, Ad4BP/SF-1-converted steroidogenic cells produce both adrenal-type steroids and gonad-type steroids. To clarify the underlying mechanism, we analyzed the expression profile and focused on the several factors up-regulated by Ad4BP/SF-1. Among these factors, Sfrp-1 and Inhbb might be related to Ad4BP/SF-1-mediated differentiation of MSCs into gonad-type steroidogenic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：内分泌学、ステロイドホルモン、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモン不全症に対するステロイドホルモン補充療法は確立された治療法ではあるが、多くの場合一生の補充を必要とし、副作用などといった問題点も少なからず存在する。

私達の研究グループは自己ステロイド産

生細胞移植療法の確立を目標とし、間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞の再生研究に取り組んできた。これまでに骨髄由来、脂肪組織由来間葉系幹細胞は、副腎・性腺の発生・分化に必須な因子である Ad4BP/SF-1 の遺伝子導入によって、ステロイド産生細胞へ分化することを明らかにした。ヒト骨髄由来間

葉系幹細胞は Ad4BP/SF-1 によって、ACTH および LH 応答性を有するステロイド産生細胞へ分化したことから、間葉系幹細胞がステロイド再生ソースとして有用であることが示された。

2. 研究の目的

Ad4BP/SF-1 誘導性ステロイド産生細胞は培養上製中に、プロゲステロン、コルチコステロン、アルドステロン、コルチゾール、DHEA、テストステロンおよびエストラジオールを分泌し、副腎ステロイドおよび性腺ステロイドの両ステロイド産生性を示した。よって副腎皮質様細胞またはライディッヒ様細胞を得るためには、さらなる分化機序の解明が必要と考えられる。

本研究では、副腎皮質様細胞またはライディッヒ細胞様細胞への分化誘導条件の確立とその機序の解明を目的とする。また、Ad4BP/SF-1 誘導ステロイド産生細胞において内因性 Ad4BP/SF-1 の発現が誘導されない点も問題点である。近年、遺伝子のメチル化による遺伝子発現の制御機構が注目されている。よって、脱メチル化処理による Ad4BP/SF-1 遺伝子発現への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1)骨髄由来間葉系幹細胞へ Ad4BP/SF-1 発現アデノウイルスベクターを感染後、1 日目より培地中に FGF2, FGF9, IGF-1, MIS/AMH を添加し 14 日間培養後、培養 11 日から 14 日目の培地を回収し、培養上清中のステロイドホルモン濃度を EIA キットにて測定した。

(2)脂肪組織由来間葉系幹細胞へ Ad4BP/SF-1 発現アデノウイルスベクターまたはコントロールとして beta-Gal 発現アデノウイルスベクターを脂肪組織由来間葉系幹細胞へ感染し 14 日間培養後、培養 11 日から 14 日目の培地を回収し、ステロイドホルモン濃度を定量した。また定量 PCR を行いステロイド合成酵素の発現量を比較検討した。

(3)骨髄由来間葉系幹細胞を DNA 脱メチル化剤 5-Aza-2'-Deoxycytidine にて 24 時間、DNA 脱メチル化処理した後、Ad4BP/SF-1 の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR にて解析した。また、マウス *Ad4bp/Sf-1* 遺伝子のイントロン内に存在する CpG アイランド (ICI-1, ICI-2, ICI-3) に着目し、これらの領域のメチル化と SF-1/Ad4BP の発現について培養細胞およびマウス組織を用いて検討した。

(4)間葉系幹細胞に Ad4BP/SF-1 発現アデノウイルスベクターまたは LacZ 発現アデノウイルスベクターを感染後 24 時間培養し、total RNA を回収した。Ad4BP/SF-1 による遺

伝子発現の変化をアフィメトリクス社 MicroArray にて解析し、Ad4BP/SF-1 によって発現が誘導されるいくつかの因子に着目した。これら標的遺伝子に対する発現抑制レンチウイルスベクターを作製し、ターゲット遺伝子の発現抑制下での Ad4BP/SF-1 によるステロイド産生細胞分化への影響を検討した。

4. 研究成果

(1)間葉系幹細胞を Ad4BP/SF-1 の遺伝子導入なしに FGF2, FGF9, IGF-1, MIS/AMH にて刺激した場合、これらの因子の刺激のみでは、ステロイド産生やステロイド産生酵素の発現などを認めず、分化への影響は認めなかった。

アデノ Ad4BP/SF-1 感染間葉系細胞を FGF2 にて刺激した場合、コントロールと比較してプロゲステロン、コルチゾール、テストステロン産生が亢進した。FGF9, IGF-1, MIS/AMH はステロイド産生に影響しなかった。よって FGF2 はステロイド産生細胞への分化または、ステロイド産生を促進することが示唆された。

(2)脂肪組織由来間葉系幹細胞は Ad4BP/SF-1 導入によって、プロゲステロン、コルチゾール、テストステロン、エストラジオールを培地中に分泌し、P450_{scc} など一連のステロイド合成酵素の発現が誘導されたが、P450_{aldo} の発現は転写レベルで検出されなかった。よって、骨髄由来間葉系幹細胞と同様に脂肪由来間葉系幹細胞もステロイド産生細胞の再生ソースとして有用であることが示唆された。

また、マウス同一個体より、骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞を単離し Ad4BP/SF-1 による分化誘導を検討した結果、Ad4BP/SF-1 のウイルスベクター量に依存して骨髄由来細胞は性腺ステロイド産生性、脂肪組織由来細胞は副腎ステロイド産生性が亢進した。またレチノイン酸刺激も同様の結果を示した。これらの結果から、由来組織が異なる間葉系幹細胞の性質の違いが、副腎ステロイドまたは性腺ステロイド産生細胞への分化誘導を方向付けている可能性が示唆された。また、発生期において副腎と性腺は共通の原基から分化することが知られているが、発生期における Ad4BP/SF-1 の発現量や活性調節が共通原基から副腎または性腺への分化において、役割を担う可能性が考えられる。

(3)脱メチル化処理によって、骨髄間葉系幹細胞において内因性の Ad4BP/SF-1 が転写レベルで誘導されたが、その発現量はマウス副腎腫瘍由来細胞株である Y-1 細胞における発

現レベルにはるか及ばず、培地中へのプロゲステロン産生は検出されなかった。

私達は、マウス *Ad4bp/Sf-1* 遺伝子のイントロン内に存在する CpG アイランド (ICI-1, ICI-2, ICI-3) に着目し、Ad4BP/SF-1 発現マウス細胞株およびマウス組織においてこの領域のメチル化状態と、Ad4BP の発現との関連について検討した。結果、Ad4BP/SF-1 発現細胞株である Y-1 細胞および I-10 細胞において ICI-2 領域が脱メチル化状態であることを明らかにした。しかしマウス組織における Ad4BP/SF-1 の発現とこの領域のメチル化状態との関連は認められなかった。

(4) Ad4BP/SF-1 によって発現が誘導された遺伝子のうち、Wnt シグナルの調節因子である Secreted frizzled-related protein-1 (Sfrp-1)、アクチビン・インヒビンのサブユニットである Inhibin beta B (Inhbb) および機能未知の遺伝子 GRAM domain containing 1B (GRAMD1B) に着目した。これらの発現抑制下での Ad4BP/SF-1 によるステロイド産生細胞誘導を検討した結果、プロゲステロン、コルチゾール、テストステロン産生が抑制された。この中で特にテストステロン産生が著しく抑制された。このとき Sfrp-1 および Inhbb 発現抑制細胞では、Ad4BP/SF-1 による 3 β -HSD および Cyp17a1 の発現誘導が抑制された。これらの結果から、間葉系幹細胞において Ad4BP/SF-1 によって発現誘導される遺伝子 Sfrp-1, Inhbb, GRAMD1B は、間葉系細胞からステロイド産生細胞への分化誘導に関与し、特に性腺ステロイド産生細胞への分化誘導またはステロイド産生性に関与することが示唆された。

近年、Sfrp ファミリータンパク質の Sfrp-1, Sfrp-2 ダブルノックアウトマウスでは、オスの性腺形成異常が報告されているが、Inhbb と性腺の発生・分化との関連については不明である。

マウスライディヒ細胞由来細胞株 TM3 を hCG にて刺激した結果、内因性の Sfrp-1 および Inhbb の発現増加を転写レベルで認めた。よって Sfrp-1, Inhbb は生体内組織において、LH シグナリングによって発現が制御されている可能性が示唆された。

機能未知の遺伝子 GRAMD1B は構造上 GRAM ドメインを有する。GRAM ドメインは、約 80 アミノ酸からなる構造ドメインで、数種のタンパク質間で共通のアミノ酸配列ドメインとして同定され、タンパク質の細胞内局在の決定に関与していると考えられているが、GRAMD1B の生体内での機能は現在不明である。ヒト組織における GRAMD1B の発現を検討した結果、mRNA レベルで脳、副腎、腎臓、精巣において高発現であった。また、GFP 融合タンパク質発現ベクターを作成し、細胞内局在を

検討した結果、小胞体に局在を認めた。本研究において機能未知の遺伝子 GRAMD1B がステロイド産生細胞の分化に関与している可能性が示唆され、GRAMD1B のステロイド産生細胞の発生や分化における役割について今後の解析が必要である。

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 5 件)

- ① Qiu Y, Yanase T, Hu H, Tanaka T, Nishi Y, Liu M, Sueishi K, Sawamura T, Nawata H, Dihydrotestosterone suppresses foam cell formation and attenuates atherosclerosis development, *Endocrinology*, 査読有, 2010, in press
- ② 柳瀬敏彦、田中智子、ステロイド産生細胞研究の現状、日本生殖内分泌学会雑誌、査読無、14 巻、2009、51-53
- ③ Liu M, Yanase T, Tanaka T, Fan W, Nomura M, Kawate H, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H, A novel synthetic androgen receptor ligand, S42, works as a selective androgen receptor modulator and possesses metabolic effects with little impact on the prostate, *Endocrinology*, 査読有, 12, 2009, 5606-16
- ④ Shirouhzu H, Okabe T, Gondo S, Tanaka T, Ohe K, Morinaga H, Kawate H, Nomura M, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T, Methylation of a conserved intronic CpG island of mouse SF-1 is associated with cell-specific expression of SF-1 in a culture system but not with tissue-specific expression, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 369, 2008, 862-7
- ⑤ 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*, 査読有, 9, 2008, 4717-25

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tomoko Tanaka, Regeneration of steroidogenic cells form mesenchymal stem cells, 14th International Congress of Endocrinology Official Satellite Symposia, 30th March, 2010, Kyoto
- ② Tomoko Tanaka, Effects of Sfrp-1 and Inhibin beta B on SF-1 mediated differentiation of mesenchymal stem

- cells into steroidogenic cells, 14th International Congress of Endocrinology, 28th March, 2010, Kyoto
- ③ 田中智子、間葉系幹細胞における SF-1/Ad4BP 誘導遺伝子のステロイド産生に及ぼす影響、第 17 回日本ステロイドホルモン学会、2009 年 11 月 14 日、福岡
- ④ 田中智子、間葉系幹細胞における SF-1/Ad4BP 誘導遺伝子のステロイド産生に及ぼす影響、アンドロロジー学会第 28 回学術大会、2009 年 7 月 3 日、富山

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/interna5/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 智子 (TANAKA TOMOKO)
福岡大学・医学部・研究員
研究者番号：10380528

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：