

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791762

研究課題名(和文)ES細胞から甲状腺濾胞上皮細胞への分化誘導及び体内でのホルモン産生の研究

研究課題名(英文)Differentiation induction from embryonic stem cells to functional thyroid tissues

研究代表者

菅野 真史 (KANNO, MASAFUMI)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90444215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々が目的としたES細胞から甲状腺組織への分化誘導は、ベルギーのAntonica博士らが2012年に成功し、マウス体内に移植し甲状腺機能を回復させるに至った(Nature. ;491(7422):66-71.2012)。我々はこの分化効率とES細胞の未分化能維持の機能に重要な関係があるのではないかと考え、それを解析することによりES細胞の分化誘導の効率を上げることを目指した。その結果、我々が以前から注目している転写因子Liver receptor homologue 1 (LRH1)がSox2とGata1によって直節発現誘導を受け、self renewalの重要な一角を担っていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Differentiation induction from embryonic stem cells to thyroid tissues, which was our objective, was accomplished by Dr. Antonica and others from Belgium in 2012, leading to transplantation into the body of a mouse and thus to recovery of thyroid function (Nature 491(7422):66-71.2012). We inferred an important relation between this differentiation efficacy and the potency of embryonic stem cells to maintain the undifferentiated state. We analyzed it further to improve the differentiation induction efficacy of embryonic stem cells. Results demonstrated that the liver receptor homologue 1 (LRH1), which we specifically examined, was induced directly by Sox2 and Gata1. It played an important role in self renewal.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：ES細胞 甲状腺 Lrh-1

1. 研究開始当初の背景

(1). 本研究の重要性

甲状腺機能低下症により甲状腺ホルモン剤を内服している患者数は全国に60万人と推計されている(2011年製薬会社調べ)。その原因は橋本病やクレチン症といった疾病によるものや、腫瘍などの理由により甲状腺を外科的に切除されたものなど多様である。甲状腺機能低下症を放置すれば代謝機能の低下をもたらし、強い倦怠感やむくみが生じたり、心機能の悪化を招き、時に生命にも影響しかねない状況となる。東日本大震災の際に製薬工場の被災により甲状腺ホルモン製剤が不足し全国的に深刻な影響が出たことは記憶に新しい。

安定した甲状腺ホルモン分泌細胞を作製し安全に臨床利用できれば、多くの患者が甲状腺ホルモン剤を毎日内服する必要から解放され、ホルモン製剤が不足するといった事態の心配もなくなる。患者のQOLと医療経済に対する貢献は非常に大きなものとなる。

(2). 本研究の妥当性

ES細胞(胚性幹細胞: embryonic stem cells)からの甲状腺ホルモンの分泌細胞への分化誘導の研究は3編報告されているが、その方法はまだ確立されていない。(Jiang N et al. Thyroid. 2010) (Ma R, et al. Endocrinology. 2009) (Lin RY, et al. Endocrinology. 2003)

確立された方法は無いものの、すでに甲状腺ホルモンを分泌する甲状腺濾胞上皮細胞様の細胞への分化誘導の成果が報告されており、本研究が分化誘導段階まで実現される妥当性は十分にある。申請者らはこれらの手法に独自の方法を加え、さらに甲状腺濾胞上皮細胞に酷似し、より安定した甲状腺ホルモン分泌能を有する細胞へと分化誘導する。

2. 研究の目的

甲状腺機能低下症は橋本病などの疾患によるものや、甲状腺手術による2次的なものなど生じる原因は多く、患者数は60万人以上と推定されている。甲状腺ホルモンが不足すると身体機能が低下し多様な臨床症状を呈するため、患者はレボチロキシナトリウムを日々経口摂取し続ける必要がある。本研究はマウスES細胞を分化させて安定的に甲状腺ホルモンを分泌する細胞を作成し、マウス体内への移植生着を試みるものである。将来的に甲状腺機能低下症を再生医療によって治療するという臨床応用のための基礎実験として行う。

3. 研究の方法

これまで、ES細胞から甲状腺濾胞上皮細胞様の細胞への分化誘導に関しては一定の成果がある。これらはいずれも胚葉体から直接的に甲状腺ホルモン分泌細胞へと分化させている。申請者らはES細胞胚葉体内胚葉系幹細胞という生理的な分化経路をたどることにより、より甲状腺濾胞上皮細胞に酷似した細胞へと分化誘導させることを試みる。そのために、新たな誘導因子として内胚葉への分化誘導因子であるアクチビンおよびbFGF等のいくつかの候補を持っている。このように分化させた細胞を橋本病のモデルの1つであるnonobese diabetic (NOD)マウス等に、腎被膜下移植法を行い移植細胞の機能評価と安全性の解析をおこなう。また、直接甲状腺内に移植することも考慮している。

4. 研究成果

まとめ

当初、我々が目的としたES細胞(胚性幹細胞: embryonic stem cells)から甲状腺組織への分化誘導は、ベルギーのAntonica博士らによって2012年に成功し、マウス体

内に移植し甲状腺機能を回復させるに至った(Nature. ;491(7422):66-71.2012)。今回の発表により甲状腺への分化誘導は NKX2-1 と PAX8 にて分化誘導ののちに TSH による継続的な刺激が必要であるということが判明した。

我々はこの転写効率と ES 細胞の未分化能維持の機能に重要な関係があるのではないかと考え、ES 細胞の自己再生を解析することにより ES 細胞の分化誘導の効率を上げることを目指した。

我々が以前から注目している転写因子に Liver receptor homologue 1 (LRH1)がある。LRH-1 は ES 細胞の分化初期のエピプラスト期に発現し、Oct3/4 の発現に必須であり、ノックアウトしたマウスは致死的な経過をたどることがわかっている。このことより LRH-1 が細胞分化の面でも重要な役割を果たしている可能性が示唆されていた。しかし、その転写調節機構は依然として不明なままであった。今回我々は胚性腫瘍細胞(EC 細胞)である F9 細胞と ES 細胞を用いて ES 細胞特異的 Lrh1 のプロモーター領域を解析し、重要な 2 領域を同定した。さらにそれぞれの領域には Sox2 と Gabp が結合し直節発現誘導に働いていることを発見し、証明した。SOX2 は OCT4、Nanog とともに pluripotency circule を作ってお互いを活性化しあい、多分化能を維持に働いていることが知られている。ES 細胞特異的 Lrh1 が Sox2 により直接活性化を受けているという今回の我々の成果により、Sox2 が Lrh1 を介し Oct4 を間接的にも活性化しているということを初めて証明した。そしてこの結果は ES 細胞特異的 LRH-1 が多分化能維持に深く関与することを示唆している。また、SOX2 と OCT4 は iPS 細胞誘導の 4 因子としても知られており、LRH1 がそこに介在する可能性が強く示唆されたことになる。これは非常に重要な発見であり、

LRH 1 の発現調節因子を解析することは、幹細胞研究や生殖内分泌発生の分野にとって非常に重要な意味を持つ。

胚性腫瘍細胞(EC 細胞)である F9 細胞で ES 細胞特異的 LRH1 のプロモーター領域をルシフェラーゼアッセイで解析し、重要な 2 領域を同定した。転写開始点より上流-393 ~ -388bp および-179 ~ -174bp の 2 領域であり、この部位に mutation を入れることによってプロモーター活性が低下することを確認した。

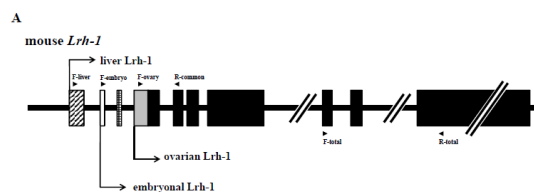


図 1 LRH1 の組織特異的プロモーター領域

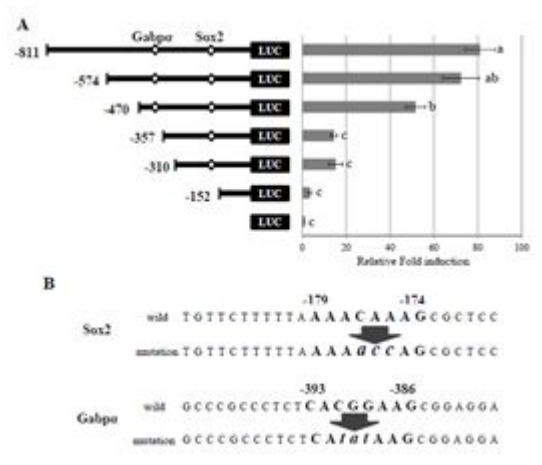


図 2 A ; プロモーターアッセイ

B ; 結合領域のミューテーション

また、それぞれの位置には GABP() および SOX2 が直接結合することを EMSA によって証明した。

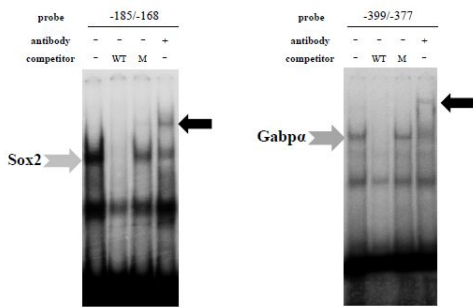


図3 ES細胞を用いた各転写因子のEMSA

さらに、pcDNA 発現ベクター導入により GABP()および SOX2 を過剰発現することによって LRH1 のプロモーター活性は正に制御されることを実証した。

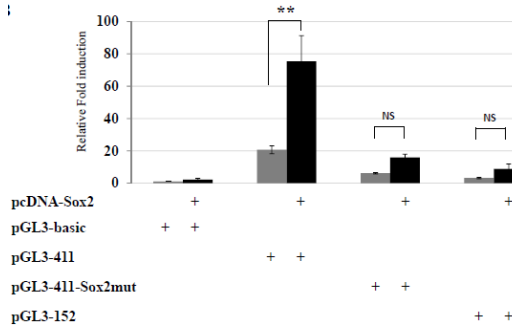


図4 Sox2 過剰発現によるプロモーター活性

さらに EC 細胞を分化誘導することで SOX2 に引き続き LRH1 の発現量も著しく低下することをリアルタイム PCR およびウェスタンブロット法を用いて確認し、SOX2 および GABP()が ES 特異的 LRH1 の発現を制御していることを明らかにした。

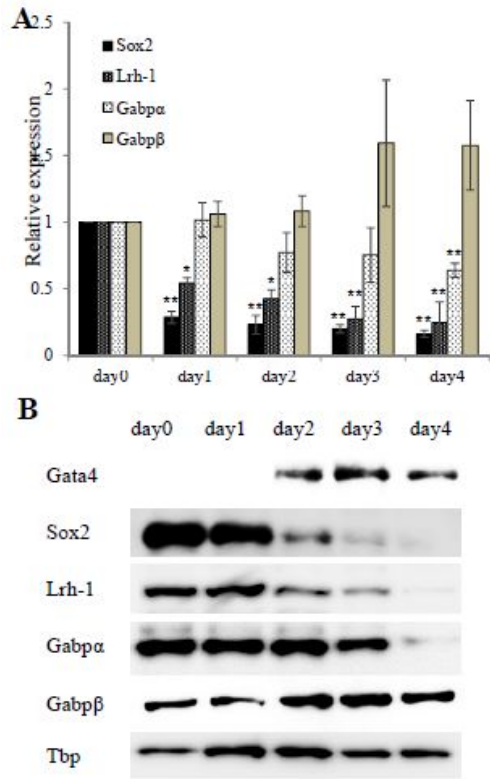


図5 A ; リアルタイム PCR 法
B ; ウェスタンブロット法

ES 細胞特異的 LRH1 が Sox2 により直接活性化を受けているという今回の我々の成果により、Sox2 が Lrh1 を介し Oct4 を間接的にも活性化しているということを初めて証明した。そしてこの結果は ES 細胞特異的 LRH-1 が多分化能維持に深く関与することを示唆している。

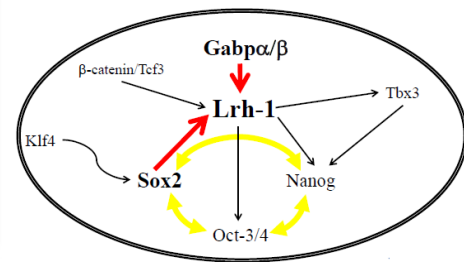


図6 Lrh-1 周囲のネットワークのまとめ

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 1 件)

Kanno M, Yazawa T, Kawabe S, Imamichi Y, Usami Y, Ju Y, Matsumura T, Mizutani T, Fujieda S, Miyamoto K.
Sex-determining region Y-box 2 and GA-binding proteins regulate the transcription of liver receptor homolog-1 in early embryonic cells
Biochim Biophys Acta. 査読有
2014 May;1839(5):406-14.
doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.016. Epub
2014 Apr 3.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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 0 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

菅野 真史 (Kanno, Masafumi)
福井大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90444215