

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462538

研究課題名(和文)アンドロゲン分泌性幹細胞の創出とその応用基盤の確立

研究課題名(英文)Establishment and applicational research of androgen producing stem cells

研究代表者

杉本 盛人(Sugimoto, Morito)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30613161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：男性における性腺機能低下症では、血中のアンドロゲン濃度の低下により身体的・精神的に問題となる状態が引き起こされ、また本邦でも多くの患者が存在する。本研究では、Leydig細胞において逆行性幹細胞誘導法を用い、また人工多能性幹細胞等を用いて、アンドロゲン分泌性幹細胞の樹立を目指した基盤的研究を行なった。一定の実験条件のもと、Leydig幹細胞候補株を誘導することができた。その一部の細胞株では、Leydig細胞マーカーの発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：Male hypogonadism is associated with negative effects on a man's physical and psychological well-being and the prevalence is increasing in Japan. In this study, we conducted a regenerative research for the establishment and application of androgen producing stem cells. In the selected stem cells, expression of Leydig cell markers was confirmed.

研究分野：男性不妊、アンドロロジー

キーワード：アンドロゲン 幹細胞 再生

1. 研究開始当初の背景

2012年のノーベル医学生理学賞は、山中4因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC)による成熟細胞の逆行性の「初期化」を通してiPS細胞樹立に成功した京都大学の山中伸弥博士に授与された。本研究では、2つの独自技術「逆行性幹細胞誘導法」および「組織特異的幹細胞分離法」により、山中4因子によりiPS細胞までさかのぼれず、しかもEpigenetic memoryによるLeydig細胞への分化志向性を有したLeydig幹細胞の樹立を目指すものである。実際に、ヒトLeydig幹細胞の誘導・分離が為されれば、これらアンドロゲン分泌性幹細胞の精巣間質内移植・皮下移植等による男性ホルモン機能再生が現実のものとなってくる可能性がある。

2. 研究の目的

iPS(人工多能性幹)細胞の発見により、泌尿器科領域においても当該技術の応用による各種組織の再生に大きな期待が寄せられている。アンドロロジー領域においてはアンドロゲン分泌細胞の再生研究が行われているが、幹細胞移植により臨床応用に直結するようなLeydig幹細胞の樹立は未だ為されていない。本研究では、iPS細胞等の分化万能性細胞を経ることなくアンドロゲン分泌性幹細胞を誘導・分離する新手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

我々の本研究開始前の研究により、山中4因子により誘導された幹細胞のEpigenetic memoryによる各由来組織への分化志向性が明らかとなっていた。すなわち、正常のヒト精巣間質由来の初代培養細胞から誘導・分離されたLeydig幹細胞が、男性ホルモン機能

再生に直結するアンドロゲン分泌性幹細胞となる可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、購入した正常精巣の間質組織由来のヒト初代培養細胞に山中4因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC)をトランスフェクションして、直接的にLeydig幹細胞を誘導した。幹細胞としての長期に渡る自己複製能を確認すると同時に、Leydig幹細胞として必須の胎生期分化誘導因子として考えられているSF-1(Steroidogenic factor-1)とStar(Steroidogenic acute regulator)等について、発現マーカーとして検証を行った。また本研究で得られたLeydig幹細胞について、幹細胞としての多分化能をin vivo分化誘導実験により検証する為、当該幹細胞を同所性(精巣間質内)に注入、移植する手法についての予備的な動物実験(ラットを使用)を実施した。

4. 研究成果

本研究では、独自技術:「逆行性幹細胞誘導法」を用いることにより、iPS細胞等の分化万能性細胞を経ることなくLeydig幹細胞の候補クローン株を樹立することに成功した。また、このLeydig幹細胞候補株のin vivoでのアンドロゲン分泌性細胞への分化・再生能を検証する為の、当該幹細胞の精巣内移植法に関する基盤研究を実施した。具体的には、各種溶媒をラット精巣内に浸潤・拡散させる方法について解析を行った。本研究により、特定の溶媒についてはラット精巣組織内に溶媒を全体的に均一に拡散させる技術を確立した。今後、Leydig幹細胞候補株を動物実験において精巣内に移植する為の溶媒の選定に関する研究を実施する。また付随研究として、当該Leydig幹細胞候補株にレポーター遺伝子を安定強発現させることにより、おかもめメディカルイノベーションセンターの各種分子イメージング装置を用いたin

vivo での同幹細胞の動態イメージングを実施する予定である。これらの研究の実施により、研究目的「アンドロゲン分泌性幹細胞の創出とその応用基盤の確立」を達成する見込みである。

本研究成果が将来的に生かされる可能性がある男性性腺機能低下症では、血中のアンドロゲン濃度の低下により身体的・精神的に問題となる状態が引き起こされ、また本邦でも多くの患者が存在する。我々は今回、Leydig 細胞において逆行性幹細胞誘導法を用い、また人工多能性幹細胞等を用いて、アンドロゲン分泌性幹細胞の樹立を目指した基盤的研究を行なった。一定の実験条件のもと、Leydig 幹細胞候補株を誘導することができた。

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 9 件)

1. Efficacy and safety of 3 day versus 7 day cefditoren pivoxil regimens for acute uncomplicated cystitis: multicentre, randomized, open-label trial. Sadahira T, Wada K, Araki M, Ishii A, Takamoto A, Kobayashi Y, Watanabe M, Watanabe T, Nasu Y, Kumon H, Okayama Urological Research Group (OURG), (査読有), J Antimicrob Chemother. 2017;72(2):529-534. doi: 10.1093/jac/dkw424.
2. Comparison of Purification Solutions With Different Osmolality for Porcine Islet Purification. Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2016;9(1-2):53-59. DOI: 10.3727/215517916X693140.
3. The Evaluation of Islet

Purification Methods That Use Large Bottles to Create a Continuous Density Gradient. Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2016;9(1-2): 45-51. DOI: 10.3727/215517916X693131.

4. Evaluation of Serum-Free, Xeno-Free Cryopreservation Solutions for Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2016;9(1-2): 15-20. DOI: 10.3727/215517916X693122.

5. Cryopreservation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2015;8(1-2):3-7. DOI: 10.3727/215517915X689100.

6. Potential Factors for the Differentiation of ESCs/iPSCs Into Insulin-Producing Cells. Tsugata T, Nikoh N, Kin T, Saitoh I, Noguchi Y, Ueki H, Watanabe M, James Shapiro AM, Noguchi H, (査読有), Cell Med. 2014;7(2):83-93. DOI:10.3727/215517914X685178.

7. Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection. Noguchi H, Saitoh I, Tsugata T, Kataoka H, Watanabe M, Noguchi Y, (査読有), Cell Death Differ. 2015;22(1):145-55. DOI: 10.1038/cdd.2014.132.

8. Establishment of a pancreatic stem cell line from fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. Kuise T, Noguchi H, Tazawa H, Kawai T, Iwamuro M, Saitoh I,

Kataoka HU, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T,(査読有), Biomed Eng Online. 2014 May 27;13:64. doi: 10.1186/1475-925X-13-64.

9. Testosterone replacement elevates the serum uric acid levels in patients with female to male gender identity disorder. Kurahashi H, Watanabe M, Sugimoto M, Ariyoshi Y, Mahmood S, Araki M, Ishii K, Nasu Y, Nagai A, Kumon H,(査読有), Endocr J. 2013;60(12):1321-7. <http://doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0203>

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 盛人 (SUGIMOTO, MORITO)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号 : 30613161

(2)研究分担者

渡部 昌実 (WATANABE, MASAMI)
岡山大学・大学病院・教授
研究者番号 : 70444677

(3)研究分担者

野口 洋文 (NOGUCHI, HIROFUMI)

琉球大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 50378733

(4)研究分担者

植木 英雄 (UEKI, HIDEO)
岡山大学・医学部・技術専門職員
研究者番号 : 90537218

(5)研究分担者

賀来 春紀 (KAKU, HARUKI)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号 : 60346426