

令和元年9月2日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09815

研究課題名(和文)細胞移植によるステロイドホルモン補充についての検討

研究課題名(英文) Steroid complement by the steroidogenic cell transplantation

研究代表者

田中 智子 (Tanaka, Tomoko)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：10380528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞療法の利点の一つは、生体内の刺激に応答したホルモン補充である。我々は培養実験において間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞の作出に成功し、副腎不全マウスに細胞移植した結果、生存期間延長、血中ステロイド検出効果を証明した。マウス由来細胞は、ACTH受容体が誘導されず、移植マウスのACTH応答性は認めなかった。マウスとは異なり、ヒト由来体性幹細胞をソースとした場合、ACTH応答性を認めたことから、本研究では、免疫不全副腎不全マウスにヒト由来ステロイド産生細胞を移植するため、薬剤誘導性ステロイド産生細胞の作出を行った。必要量の移植細胞の調整が可能になった。移植によるホルモン補充効果は検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副腎不全に対するステロイド補充療法は確立された療法であるが、一生涯の補充、生理的な補充は実現できない、副作用等といった問題点がある。細胞療法の利点の一つは、生体内の刺激に応答したホルモン補充である。動物実験で、副腎組織そのものの移植によるホルモン補充効果は報告されている。近年、体性幹細胞、ES細胞、iPS細胞をソースとしたステロイド産生細胞の誘導が細胞培養では成功しているが、これらの細胞を移植し、生体内での補充効果を検討した研究はない。我々は、マウス副腎不全モデルにおいて、ステロイド産生細胞の移植によるホルモン補充効果を証明し、今後の細胞療法開発の基盤となるデータを提供した。

研究成果の概要(英文)：Hormone replacement therapy by cell transplantation is expected for replacement in response to physiological stimuli. We succeeded in generating steroid-producing cells from mesenchymal cells in vitro, and as a result of transplanting cells to adrenal insufficiency mice, survival time was extended and steroids in blood were detected. The mouse-derived cells did not induce the ACTH receptor by SF-1, and ACTH responsiveness of the transplanted mouse was not observed. Unlike in mice, ACTH responsiveness was observed when human-derived mesenchymal stem cells were used as the source, and in this study, MSCs were generated that turned on SF-1 expression in a drug-induced manner in order to implant them in immunodeficient adrenal insufficiency mice. It has become possible to adjust the required amount of transplanted cells. The hormone replacement effect by transplantation is under investigation.

研究分野：内分泌学

キーワード：ステロイドホルモン補充 副腎不全 NR5A1 分化誘導 移植療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

副腎不全に対するホルモン補充療法は確立された療法ではあるが、長期間のステロイド補充は視床下部-下垂体-副腎軸を抑制し、代謝及び免疫系へ及ぼす影響は大きい。我々は、幹細胞から分化誘導したステロイド産生細胞の移植によるホルモン補充療法の確立を目標とし、分化誘導研究に取り組んできた。間葉系幹細胞に、ステロイド産生における主要な調節因子である NR5A1 を強制発現させることで、副腎ステロイド、性腺ステロイドを産生する細胞に形質転換させることを明らかにした。

近年、国内外の研究者によって、NR5A1 の強制発現によって体性幹細胞や、ES 細胞、iPS 細胞がステロイド産生細胞へ分化誘導されることが示された。細胞療法には生理的な刺激にตอบสนองしたホルモン補充が期待されるが、これまでに、幹細胞から誘導したステロイド産生細胞の移植効果についての報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究において、間葉系幹細胞から作出したステロイド産生細胞を、副腎不全モデルに細胞移植し、ホルモン補充効果を明らかにする。また、細胞培養系にて、間葉系幹細胞において NR5A1 を発現誘導する薬剤のスクリーニングを行った。

## 3. 研究の方法

ヒト脂肪由来間葉系細胞から NR5A1 の強制発現によって得られるステロイド産生細胞を、免疫不全副腎不全マウスの腎皮膜下に移植し、移植前後の血中ステロイドホルモン値、生存期間について検討する。ヒト由来 NR5A1 誘導性ステロイド産生細胞を大量に調整する目的で、Tet-off SF-1 発現レンチウイルスベクターを構築した。ヒト由来ステロイド産生細胞の移植に先行して、マウス脂肪組織由来間葉系細胞から NR5A1 の強制発現によって誘導したステロイド産生細胞の副腎不全モデルへの移植実験を行い、血中ホルモン、生存期間について検討を行った。薬剤スクリーニングは、ヒト脂肪由来幹細胞を、GPCR 阻害剤、キナーゼ阻害剤などを含む薬剤ライブラリー (384 種) にて刺激し、NR5A1 の発現誘導を qPCR にて検討した。

## 3. 研究成果

### (1) Tet-off SF-1 発現系によるステロイド産生細胞の構築

理研 BRC より供与された CS-RfA-ET-Bsd を骨格にして、ドキシサイクリン存在下では NR5A1 を発現せずに、ドキシサイクリン非存在下にて NR5A1 を発現する組換えレンチウイルスを作製した。作製した Tet-off NR5A1 レンチウイルスによって、薬剤誘導性に NR5A1 の発現を ON/OFF 調節可能な間葉系幹細胞を構築した。

### (2) 免疫不全マウスを用いた副腎不全モデルマウス

レシピエントマウスには、重度免疫不全マウス SCID Beige を使用した。二期的に、SCID Beige マウスの両側副腎を摘出し、実験の対照群となる副腎摘出のみの群、両側副腎摘出後に副腎を移植した群を検討した。ヒト由来ステロイド産生細胞の移植は検討を継続している。

### (3) マウス由来ステロイド産生細胞移植による副腎不全のレスキュー

ヒトステロイド産生細胞の副腎不全レスキュー実験に先行して行った、マウス由来細胞を副腎不全マウスに移植する検討では、SF-1 誘導性ステロイド産生細胞の移植によって、副腎不全マウスの血中コルチコステロンが検出され、生存期間が延長した。マウス-マウス移植系では ACTH 応答性は見られなかった。マウス由来細胞は、脂肪組織型の Acth 受容体が発現しており、SF-1 による Acth 受容体の発現誘導がないためと推定された。ヒト由来ステロイド産生細胞では、NR5A1 によって ACTH 受容体が誘導され、培養レベルでは、ACTH 応答性を確認しているため、ヒト由来移植マウスでは、ACTH 応答性が検出されると予想される。

### (4) 新規機序で NR5A1 の発現を制御する薬剤

本来、内因性 NR5A1 の発現誘導に関わる薬剤探索を目的におこなった検討であるが、この研究に関連して、NR5A1 の発現を抑制する薬剤を見出した。これらの薬剤は、NR5A1 を高発現する疾患の治療薬として有用な可能性があり、今後分子機序について検討を行う。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Fukuda, T., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Kawanami, T., Nomiyama, T., and Yanase, T. (2016) Augmented Growth Hormone Secretion and Stat3 Phosphorylation in an Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein (AIP)-Disrupted Somatotroph Cell Line. *PLoS One* 11, e0164131, \* equal contribution
2. Hamanoue, N., Tanabe, M., Tanaka, T., Akehi, Y., Murakami, J., Nomiyama, T., and Yanase, T. (2017) A higher score on the Aging Males' Symptoms scale is associated with insulin resistance in middle-aged men. *Endocr J* 64, 521-530
3. Iwaya, C., Nomiyama, T., Komatsu, S., Kawanami, T., Tsutsumi, Y., Hamaguchi, Y.,

- Horikawa, T., Yoshinaga, Y., Yamashita, S., Tanaka, T., Terawaki, Y., Tanabe, M., Nabeshima, K., Iwasaki, A., and Yanase, T. (2017) Exendin-4, a Glucagonlike Peptide-1 Receptor Agonist, Attenuates Breast Cancer Growth by Inhibiting NF-kappaB Activation. *Endocrinology* 158, 4218-4232
4. Yanase, T., Kawanami, T., Tanaka, T., Tanabe, M., and Nomiyama, T. (2017) Impact of metabolic disorders on prostate cancer growth: Androgen and insulin resistance perspectives. *Reprod Med Biol* 16, 252-257
  5. Kawanami, T., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Nomiyama, T., Nawata, H., and Yanase, T. (2018) Selective Androgen Receptor Modulator S42 Suppresses Prostate Cancer Cell Proliferation. *Endocrinology* 159, 1774-1792
  6. Ohe, K., Miyajima, S., Abe, I., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Harada, Y., Horita, Y., Beppu, Y., Ito, F., Yamasaki, T., Terai, H., Mori, M., Murata, Y., Tanabe, M., Ashida, K., Kobayashi, K., Enjoji, M., Yanase, T., Harada, N., Utsumi, T., and Mayeda, A. (2018) HMGA1a induces alternative splicing of estrogen receptor alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 182, 21-26
  7. Ohe, K., Miyajima, S., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Harada, Y., Horita, Y., Beppu, Y., Ito, F., Yamasaki, T., Terai, H., Mori, M., Murata, Y., Tanabe, M., Abe, I., Ashida, K., Kobayashi, K., Enjoji, M., Nomiyama, T., Yanase, T., Harada, N., Utsumi, T., and Mayeda, A. (2018) HMGA1a Induces Alternative Splicing of the Estrogen Receptor-alpha Gene by Trapping U1 snRNP to an Upstream Pseudo-5' Splice Site. *Front Mol Biosci* 5, 52
  8. Ohe, K., Tanaka, T., Terai, H., Mori, M., Murata, Y., Enjoji, M., Akashi, M., Node, K., and Yanase, T. (2018) Asynchronous Rhythm of Ad4BP/SF-1 and Per2 Expression in Adrenal Tumors of Cushing's Syndrome. *Biomed J Sci & Tech Res*
  9. Tanaka, T., Kojima, D., Mera, T., Matsumoto, M., Yasunami, Y., and Yanase, T. (2018) Expansion of transplanted islets in mice by co-transplantation with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Heliyon* 4, e00632
  10. Ohe, K., Tanaka, T., Horita, Y., Harada, Y., Yamasaki, T., Abe, I., Tanabe, M., Nomiyama, T., Kobayashi, K., Enjoji, M., and Yanase, T. (2019) Circular IRE-type RNAs of the NR5A1 gene are formed in adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun* 512, \* equal contribution

〔学会発表〕(計7件)

1. CX-4945 as a potential drug for adrenocortical carcinoma that induces multiple exon-skipping and circular RNA of NR5A1. Tomoko Tanaka, Kenji Ohe, Takashi Nomiyama, Toshihiko Yanase, ENDO2018, Mar23-26, 2018
2. 新規副腎皮質癌治療候補薬剤 CX-4945 の作用機序について 田中智子、大江賢治、柳瀬敏彦 第26回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2018年11月17日
3. CX-4945 は H295R の増殖およびホルモン産生を抑制する 田中智子、大江賢治、阿部一朗、小林邦久、柳瀬敏彦 第91回日本内分泌学会学術総会 2018年4月26日
4. SF-1/Ad4BP によるステロイド産生細胞への分化誘導における KCNJ5 の役割について 田中智子、野見山 崇、柳瀬敏彦 第25回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2017年11月28日
5. SF-1/Ad4BP によるステロイド産生細胞への分化誘導における KCNJ5 の役割について 田中智子、野見山 崇、柳瀬敏彦 第90回日本内分泌学会学術総会 2017年4月20日
6. APA のアルドステロン産生における KCNJ5 の役割について 田中智子、野見山 崇、柳瀬敏彦 第89回日本内分泌学会学術総会 2016年4月21日
7. Steroid complement by the transplantation of SF-1/Ad4BP induced-steroidogenic cells in mice with adrenal insufficiency. Tomoko Tanaka, Shohta Kodama, Toshihiko Yanase, ENDO2016, Apr1-4, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：NR5A1 発現抑制剤および医薬組成物

発明者：柳瀬敏彦、大江賢治、田中智子

権利者：福岡大学

種類：特許

番号：特願 2018-038982

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：柳瀬敏彦  
ローマ字氏名：Toshihiko Yanase  
所属研究機関名：福岡大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：30239818

研究分担者氏名：小玉正太  
ローマ字氏名：Shohta Kodama  
所属研究機関名：福岡大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：90549338

(2)研究協力者

研究協力者氏名：福田高士、牟田芳実  
ローマ字氏名：Takashi Fukuda、Yoshimi Muta

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、研究者個人に帰属されます。