

令和元年6月26日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06718

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 pregranulosa 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)・医員

研究者番号：10808710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：中胚葉から卵巣とくに顆粒膜細胞が分化発生するメカニズムは、未だ明らかでない。我々は、ヒト羊膜由来の間葉系幹細胞(以下hAMMSC)を用いて、前顆粒膜細胞を効率よく分化誘導するプロトコルの確立を目的とした。同意が得られた産婦の胎盤より羊膜を採取し、間葉系幹細胞の表面マーカーを用いてセルソーティングし、ヒト羊膜由来の間葉系幹細胞を分離した。このhAMMSCが骨芽細胞や脂肪細胞に分化する多分化能を有することを確認した。アデノウイルスによるSteroidogenic factor 1(SF-1)遺伝子導入により、hAMMSCはステロイドホルモン関連酵素遺伝子を複数発現する細胞へと分化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。今回我々は、ヒト羊膜由来の間葉系幹細胞(hAMMSC)にSF-1遺伝子を導入することで、ステロイド関連酵素を発現する細胞へと分化させた。さらなる条件の検討により、hAMMSCを前顆粒膜細胞へと誘導することを目指している。ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)から始原生殖細胞様細胞を誘導し、マウス胎仔卵巣組織と共培養することで、ヒト卵原細胞を分化誘導することが可能となっている。本研究による顆粒膜細胞の作製は、iPS細胞を用いたヒト卵子再生の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The mechanism by which differentiation occurs from mesoderm to ovary, particularly granulosa cells, is still unclear. We aimed to establish a protocol to induce differentiation of pregranulosa cells efficiently using human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells (hAMMSC). Amniotic membrane was collected from the placenta of pregnant woman who gave consent. Cell sorting was performed using a surface marker of mesenchymal stem cells to separate the human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. It was confirmed that this hAMMSC has pluripotency to differentiate into osteoblasts and adipocytes. Adenovirus-mediated Steroidogenic factor 1(SF-1) gene transfer allowed hAMMSC to differentiate into cells expressing multiple steroid hormone-related enzyme genes.

研究分野：産婦人科

キーワード：間葉系幹細胞 顆粒膜細胞 羊膜 Steroidogenic factor 1

1. 研究開始当初の背景

体外受精や胚移植といった生殖補助医療技術(ART)の進歩は、不妊患者が生児を獲得するチャンスを飛躍的に向上させた。一方で、ARTを駆使しても妊娠が望めない患者も多く存在し、その深刻な原因の一つが早発閉経や高齢不妊における卵子の数・質の低下である。患者自身の細胞から卵子を作成するという再生医療は、このような患者が妊娠するための新たな治療戦略の一つとして大いに期待できるものである。

げっ歯類においては、ES細胞やiPS細胞より始原生殖細胞様細胞(以下PGCLC)を体外培養で分化誘導し、PGCLCを胎仔卵巢組織と共培養することで、卵子へと分化誘導することが可能になっている。この卵子は受精能を有し、顕微授精により産仔を獲得できる。本法を将来的にヒトES/iPS細胞で応用する際、最大のネックは、ヒト胎児の卵巢組織を用いることなく、PGCLCを卵子へと分化誘導するプロトコル確立することである。卵子と、それに隣接する顆粒膜細胞・莢膜細胞のクロストークは、卵胞が正常に発育し、機能的な成熟卵子を獲得するうえで、不可欠な機構である。我々は、前述した「iPS細胞から卵子を誘導するには胎仔卵巢組織との共培養が必須」という事実に着目している。すなわち「ヒト胎児の卵巢組織中に存在するはずの前顆粒膜細胞(PreGC)を前もって作成し、患者自身のiPS細胞から分化誘導したPGCLCと共培養することで、両者にクロストークが生じ、機能的な卵子が分化誘導されるのではないか」と仮説し、本研究でその検証を試みたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、間葉系幹細胞から前顆粒膜細胞(以下 pre-GC)や顆粒膜細胞を分化誘導する系を確立することにある。

中胚葉から副腎や性腺への分化過程において、Steroidogenic Factor-1(以下 SF-1)を始めとする転写因子が重要な役割を担うと推測されているが、中胚葉から卵巢とくに顆粒膜細胞(以下 GC)が分化発生するメカニズムは、未だ明らかでない。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。我々のグループは、中胚葉由来の間葉系幹細胞にステロイドホルモン産生のマスター転写因子である 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、世界に先駆けて作成している。さらには、同様の手法を用いて、ヒト臍帯血由来の間葉系幹細胞が、高率に黄体化顆粒膜細胞へ分化することも証明している。しかしながら、従来のプロトコルは分化誘導を強力的に押し進めてしまうため、幹細胞が GC を飛び越えて、一気に機能分化の最終形である黄体細胞に到達するという課題が残されている。本研究では、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞を用いて、前顆粒膜細胞を効率よく分化誘導するプロトコルを確立し、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

産婦の同意を得て分娩時に採取した胎盤から羊膜を採取し、コラゲナーゼ処理したのち、間葉系幹細胞のマーカー(陽性: CD105, CD90, CD73, 陰性: CD45, CD34, CD11b, CD79A, HLA-DR)を用いてセルソーティングし、ヒト羊膜由来の間葉系幹細胞(以下 hAMMSC)の分離・培養系を確立した。hAMMSCに、SF-1をアデノウイルスを用いて遺伝子導入し、ステロイド関連酵素の遺伝子(StAR, P450_{scc}, HSD3 β 2, P450C17, HSD17 β 3, P450C21, P450aro) や、顆粒膜細胞特

異的マーカー (FOXL2, FSHR) 発現をPCRにて確認した。

4 . 研究成果

ヒト羊膜由来間葉系幹細胞 (hAMMSC) の分離・培養

同意が得られた産婦の娩出胎盤より羊膜を採取し、間葉系幹細胞の表面マーカー(陽性: CD105, CD90, CD73, 陰性: CD45, CD34, CD11b, CD79A, HLA-DR)を標識に cell sorting し、ヒト羊膜由来の間葉系幹細胞 (hAMMSC) を分離・培養した。ちなみに、羊膜から単離した全細胞のうち、約2%が hAMMSC として分離される (図1)。

hAMMSC への SF-1 遺伝子の導入

アデノウイルスベクターを用いて hAMMSC に SF-1 遺伝子を導入したところ、hAMMSC がステロイドホルモン関連酵素の遺伝子を複数発現する細胞に機能分化した(図2)。以前 UCB-MSC を分化誘導するには SF-1 導入に加えて cAMP 刺激が必要だったが、hAMMSC は SF-1 導入のみで効率的に分化誘導しうる。ただ、現段階では、顆粒膜細胞に特異的な FSH 受容体やアロマトラーゼ (CYP19A1) の発現を確認できていない。今後、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入や、hTERT 遺伝子導入による不死化細胞株の樹立を試みる。更には、卵巣分化に重要とされる転写因子 SF-1, WT1, FOXL2, RSPO1, WNT4、精巣分化に重要とされる転写因子 SF-1, WT1, FOXL2, SRY, SOX9 を、単独あるいは組み合わせて遺伝子導入を試みる予定である。

図1: フローサイトメーターを用いたヒト羊膜由来 hAMMSC の分離

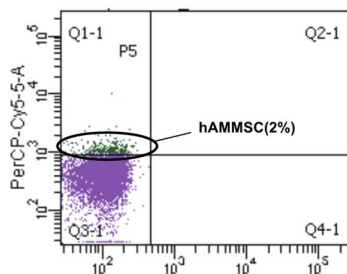
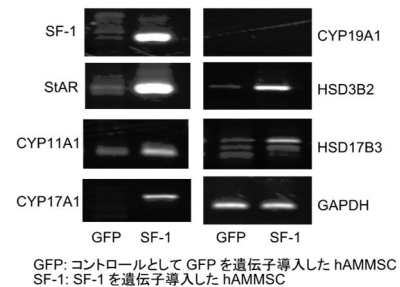


図2: hAMMSC への SF-1 遺伝子導入によるステロイド関連酵素遺伝子の発現プロファイル



5 . 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔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：
国内外の別：

○取得状況（計 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：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：折坂 誠
ローマ字氏名：Orisaka Makoto

研究協力者氏名：水谷 哲也、
ローマ字氏名：Mizutani Tetsuya

研究協力者氏名：矢澤 隆志
ローマ字氏名：Yazawa Takashi

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。