

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590329

研究課題名(和文) 幹細胞からのセルトリ細胞の作製と分化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of Sertoli cell differentiation

研究代表者

矢澤 隆志 (Yazawa, Takashi)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00334813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：精巣のセルトリ細胞は、成体において様々な成長因子やサイトカインを分泌して精子形成を支持すると同時に、胎児期には、個体の性を決定する細胞である。本研究では、in vitroで幹細胞や前駆細胞から、機能的なセルトリ細胞を分化誘導する系を確立し、その分化メカニズムを調べることを試みた。そして、セルトリ細胞の前駆細胞に、SF-1/Ad4BPと2種類の転写因子を導入することにより、セルトリ細胞様の細胞を分化させることに成功した。さらに、この細胞を用いて転写共役因子のPGC-1 が、セルトリ細胞の分化に重要な役割を果たすことを証明した。

研究成果の概要(英文)：Testicular Sertoli cells support spermatogenesis by secreting various cytokines and growth factors in adult, whereas they are essential for sex determination and differentiation in fetus. In this study, we tried to establish the systems to induce the differentiation of stem or progenitor cells into mature Sertoli cells, and to investigate the molecular mechanisms of Sertoli cell differentiation. Progenitor cells differentiated into the mature Sertoli cell-like cells by introducing SF-1/Ad4BP and other two transcription factors. Using this system, it was also demonstrated that transcriptional coactivator, peroxisome proliferator activating receptor coactivator-1alpha play an important role in the differentiation of the Sertoli cells.

研究分野：医科学一般

科研費の分科・細目：再生医学

キーワード：セルトリ細胞

1. 研究開始当初の背景

精巣のセルトリ細胞は、ステロイドホルモン産生細胞と同じ発生起源を有し、その master regulator である SF-1/Ad4BP を発現するにも関わらずステロイドホルモンを産生しない。セルトリ細胞は、成体において様々な成長因子やサイトカインを分泌して精子形成を支持すると同時に、胎児期には AMH を分泌し個体の性を決定する細胞である。セルトリ細胞の形成不全は男性を女性化し、さらに成体における機能不全は精子形成不全による不妊症を引き起こす。私は、多様な間葉系幹細胞に SF-1/Ad4BP を導入することによりステロイドホルモン産生細胞へと分化させることに世界に先駆けて成功している (Yazawa et al., Endocrinology, 2006, 2008, 2009, Mol Endo 2010, Mol Cell Endo 2011, World J Stem Cells 2014)。しかしながら、幹細胞は、この手法によりセルトリ細胞に分化することはなかった。よって、SF-1/Ad4BP と他の因子を組み合わせることによりセルトリ細胞を作製できると予想された。

2. 研究の目的

本研究では、in vitro で幹細胞や前駆細胞から、機能的なセルトリ細胞を分化誘導する系を確立する。そして、確立した系を利用して、セルトリ細胞形成の分子メカニズムを解明する。本研究により、セルトリ細胞の分化誘導系が確立されれば、その分化メカニズムが解明されるだけでなく、セルトリ細胞の機能不全による不妊の原因究明や、治療・診断への応用などに繋がる事が強く期待される。

3. 研究の方法

(1) セルトリ細胞の分化誘導

セルトリ細胞の前駆細胞を誘導し、ここにセルトリ細胞分化に必要なと予想される候補遺伝子を SF-1/Ad4BP と共に、レトロウイルスを用いて導入する。遺伝子導入を行った細胞におけるセルトリ細胞のマーカー遺伝子の発現を RT-PCR で調べて、細胞が分化しているか否かを確かめた。

(2) セルトリ細胞分化に機能する遺伝子の同定

セルトリ細胞への分化前後に発現が変化する遺伝子を調べ、セルトリ細胞の分化に重要であることが予想される遺伝子を探索する。探索した遺伝子の機能を調べるために、分化した細胞にレトロウイルスを用いて過剰発現を行ったり、siRNA によるノックダウンを行うことにより、その機能を確かめる。

4. 研究成果

(1) セルトリ細胞の分化誘導

幹細胞に、転写因子を導入し、低血清の培地で培養したところ、細胞はセルトリ細胞の前駆細胞へと分化した。このセルトリ細胞の前駆細胞に、SF-1/Ad4BP を含む分化誘導候補遺伝子をレトロウイルスにより導入した。すると、候補遺伝子のうち、2種類の転写因子を導入した細胞は、SF-1/Ad4BP 単独導入の時とは、異なりステロイドホルモンをほとんど産生しなかった。この結果を支持するように、この細胞は、ステロイドホルモン産生酵素の発現が、非常に低いものの多くのセルトリ細胞特異的なマーカー遺伝子を発現していた。また、細胞は、AMH (ミュー管障害因子) を産生していたことから、機能的にもセルトリ細胞様の細胞に分化したと考えられる。

(2) セルトリ細胞分化に機能する遺伝子の同定

機能的なセルトリ細胞への分化前後の細胞において、RT-PCR 等により遺伝子の発現を確かめたところ、転写共役因子の PGC-1 が、分化後に、その発現が上昇することが分かった。セルトリ細胞分化における PGC-1 の役割を調べるために、セルトリ細胞様の細胞に PGC-1 の過剰発現を行ったところ、AMH を初めとする多くのセルトリ細胞のマーカー遺伝子の発現が上昇した。レポーターアッセイの結果、PGC-1 は、SF-1/Ad4BP を介して、これらの遺伝子のプロモーター活性を著しく上昇させることが分かった。逆に、細胞株において PGC-1 を siRNA により

ノックダウンすると、AMH 等の発現は低下したことから、PGC-1 は、セルトリ細胞のマーカー遺伝子の発現に、非常に重要な役割を果たしていることが分かった。

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 18 件)

原著論文

1. Yazawa, T., Imamichi, Y., Miyamoto, M., Umezawa, A., Taniguchi, T.: Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells. *World J Stem Cells*, 6(2), 203-12, 2014
2. Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. *Biochim Biophys Acta*. 1839(1), 33-42, 2014.
3. Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Mol Cell Endo*. 369(1-2), 42-51, 2013. IF 4.192
4. Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K.: A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 154(4), 1648-60, 2013. IF 4.459
5. Matsumura, T., Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Ayabe, T., Katsumata, N., Fukami, M., Inatani, M., Akagi, Y., Umezawa, A., Ogata, T., Miyamoto, K.: Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *FASEB J*. 27(8), 3198-208, 2013.
6. Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endo*. 370(1-2), 1-10, 2013.
7. Ju, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Kangawa, K., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology* 153(11), 5522-34, 2012.
8. Soneda, S. *, Yazawa, T.*, Fukami, M.*, Adachi, M., Mizota, M., Miyamoto, K., Ogata, T.: Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and crucial function of Sp1 binding sites. *J. Clin Endocrinol Metab*. 96(11), E1881-7, 2011. (*These authors equally contributed to this work.
9. Yazawa, T., Kawabe, S., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol Cell Endo*. 336, 127-132, 2011.

和文

1. 矢澤隆志、河邊真也、宮本薫：ES 細胞からの副腎ステロイドホルモン産生細胞の分化誘導。ACTH Related Peptides 23, 20-22, 2012.
2. 水谷哲也、今道力敬、河邊真也、矢澤隆志、宮本薫：クロマチン構造変化を介した Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) の転写調節メカニズム。ACTH Related Peptides 23, 17-19, 2012.

総説

1. **矢澤隆志**、今道力敬、梅澤明弘、宮本 薫: ES/iPS細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化. 産科と婦人科. 81(3), 351-356, 2014
2. **矢澤隆志**、宮本 薫: 幹細胞を用いたステロイドホルモン産生細胞の作製と再生医療への可能性. 臨床検査. 57(3), 234, 2013
3. 深見真紀、曾根田瞬、**矢澤隆志**、宮本薫、緒方勤: チトクロームP450オキシドレダクターゼ (POR) 異常症の分子基盤: POR遺伝子発現調節機構. 日本生殖内分泌学会誌. 17, 17-20, 2012
4. 水谷哲也、今道力敬、河邊真也、**矢澤隆志**、宮本薫: 卵巣における遺伝子発現とその調節メカニズム. 日本生殖内分泌学会誌. 17, 11-16, 2012
5. **矢澤隆志**、宮本 薫: 万能細胞からのステロイドホルモン産生細胞の創出. 医学のあゆみ. 239(14), 1445-50, 2011
6. **矢澤隆志**、梅澤明弘、宮本 薫: 卵巣におけるステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の転写調節機構. 日本生殖内分泌学会誌. 16, 5-8, 2011
7. Miyamoto, K., **Yazawa, T.**, Mizutani, T., Imamichi, Y., Kawabe, S., Kanno, M., Matsumura, T., Ju, Y., Umezawa, A.; Stem cell differentiation into steroidogenic cells lineages by NR5A family. Mol Cell Endo. 336, 123-126(1-2), 2011

〔学会発表〕(計 30 件)

1. **矢澤隆志**、宮本薫、谷口隆信: 精巣におけるCox-2の発現調節機構第87回日本内分泌学会学術総会 2014, 4/24-25, 福岡.
2. 今道力敬、**矢澤隆志**、河邊真也、向井邦晃、折坂 誠、水谷哲也、宮本 薫: ヒト生殖腺におけるHSD11B2の役割. 第87回日本内分泌学会学術総会. 2014, 4/24-26, 福岡.
3. **矢澤隆志**: 幹細胞を用いたステロイドホルモン産生細胞の分化と再生. 第13回静岡県小児糖尿病・内分泌代謝研究会 **特別講演**. 2014, 2/8, 浜松.
4. **矢澤隆志**、谷口隆信、宮本 薫: 卵巣・顆粒膜細胞におけるARによるCox-2の発現調節機構. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 2013,12/7,東京.
5. 今道力敬、**矢澤隆志**、河邊真也、向井邦晃、折坂 誠、水谷哲也、宮本 薫: ヒト生殖腺における新たなアンドロゲン代謝機構. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 2013 12/7,東京.
6. **矢澤隆志**、今道力敬、谷口隆信、宮本薫: 生殖腺におけるCox-2遺伝子の発現調節機構. 日本動物学会 第84回大会. 2013,9/26-28, 岡山.
7. **矢澤隆志**、Khan, M.R., 仙葉慎吾、馬艶菊、竹内昌之、谷口隆信: FAKは、TJの構成因子として腸上皮のバリア機能を制御する. 第108回北海道癌談話会. 2013 9/21 旭川.
8. **矢澤隆志**、Khan, M.R., 谷口隆信: μ スカリンM1受容体を介したFAKの活性化による腸上皮バリア機能の維持と修復. 第86回日本生化学会大会、2013, 9/11-13, 横浜.
9. **矢澤隆志**、谷口隆信、宮本 薫: 幹細胞からの副腎・生殖腺のステロイドホルモン産生細胞の作製. 第31回内分泌代謝学サマーセミナー. 2013,7/11-13, 由布
10. 河邊真也、**矢澤隆志**、菅野真史、水谷哲也、今道力敬、具 云峰、松村健大、宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞におけるSF-1/LRH-1経路を介した転写制御機構. 第31回内分泌代謝学サマーセミナー. 2013 7/11-13, 由布.
11. **矢澤隆志**、河邊真也、菅野直史、水谷哲也、今道力敬、具 云峰、松村健大、宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞におけるアンドロゲンによるCox-2の発現制御機構. 第86回日本内分泌学会学術総会. 2013,4,25-27,仙台
12. 河邊真也、**矢澤隆志**、菅野真史、宇佐美陽子、水谷哲也、今道力敬、具 云峰、松村健大、宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞におけるLRH-1のプロモーター解析. 第86回日本内分泌学会学術総会. 2013 4/25-27, 仙台. 日本内分泌学会雑誌 89(1), 247, 2013
13. **矢澤隆志**、河邊真也、菅野真史、水谷哲也、今道力敬、具 云峰、松村健大、宮本 薫: ES細胞からのステロイドホルモン産生細胞. 第37回日本比較内分泌学会大会. 2012, 11/30-12/1, 福井.
14. 河邊真也、**矢澤隆志**、菅野真史、宇佐

- 美陽子、水谷哲也、今道力敬、具云峰、松村健大、宮本 薫：卵巣顆粒膜細胞における Sp ファミリーおよび SF-1 による LRH-1 の転写制御。第 37 回日本比較内分泌学会大会、2012 11/30-12/1、福井。
15. **矢澤隆志**：失敗の連続の比較内分泌学。第 37 回日本比較内分泌学会大会 サテライト企画～中堅・若手の会 第二部・若手交流会 **失敗から何を学ぶか?**。2012, 11/29, 福井。
 16. **矢澤隆志**, 河邊真也, 菅野真史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本 薫：生殖腺における Cox-2 の発現制御機構。平成 24 年度日本動物学会中部支部大会 2012, 11/18-19、松本。
 17. **Yazawa, T.**, Kawabe, S., Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using SF-1 and LRH-1. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 2012, 11/17-18, Kanazawa, Japan
 18. **矢澤隆志**, 河邊真也, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 宮本 薫: ES細胞由来のステロイドホルモン産生細胞の分化誘導。日本動物学会 第 83 回大会, 2012, 9/13-15, 豊中
 19. **矢澤隆志**, 河邊真也, 菅野真史, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 梅澤明弘, 宮本 薫: 幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製。第 30 回内分泌代謝学サマーセミナー, 2012, 7/12-14, 伊香保
 20. Kawabe, S., **Yazawa, T.**, Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Miyamoto, K.: Identification of a novel ovarian specific isoform promoter of liver receptor homolog-1 in ovarian granulosa cells. The 94th Annual Meeting & Expo (ENDO 2012). 2012 6/23-26, Houston, TEXAS. Abstract 79, 2012.
 21. **矢澤隆志**：幹細胞からのステロイド産生機構の作製。第 85 回日本内分泌学会学術総会 **シンポジウム 4 内分泌器官の再生医療**。2012, 4/19-21、名古屋。
 22. 河邊真也, **矢澤隆志**, 菅野真史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本 薫：顆粒膜細胞における転写因子 LRH-1 の転写活性化領域の同定。第 85 回日本内分泌学会学術総会。2012 4/19-21, 愛知。
 23. 菅野真史, **矢澤隆志**, 河邊真也, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 藤枝重治, 宮本 薫：マウス ES細胞特異的 LRH1 プロモーター解析。第 85 回日本内分泌学会学術総会。2012 4/19-21, 愛知。
 24. **矢澤隆志**, 河邊真也, 菅野真史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 宮本 薫：排卵におけるアンドロジェンの役割。第 36 回日本比較内分泌学会大会。2011, 11, 23-25, 東京。
 25. **矢澤隆志**, 稲岡齊彦, 河邊真也, 菅野真史, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 松村健大, 梅澤明弘, 宮本 薫：ES細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製。第 82 回日本動物学会大会, 2011, 9/21-23, 旭川
 26. **矢澤隆志**：ES細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製。日本動物学会第 82 回大会 2011, 9/21-23, 旭川。
 27. **矢澤隆志**：ステロイドホルモン産生の分子機構の解明。日本動物学会第 82 回大会 **受賞者講演** 2011, 9/21-23, 旭川。
 28. **矢澤隆志**, 河邊真也, 水谷哲也, 今道力敬, 具云峰, 宮本 薫：幹細胞を用いたステロイドホルモン産生機構の解明。平成 23 年度日本動物学会中部支部大会 **公開シンポジウム 1 生殖とステロイドホルモン** 2011, 7/30-31, 福井。
 29. **矢澤隆志**：幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製。第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー **YEC研究発表**。2011, 7/7-9, 仙台。
 30. **矢澤隆志**, 稲岡齊彦, 河邊真也, 水谷哲也, 今道力敬, 梅澤明弘, 宮本 薫：ES細胞からのステロイドホルモン産生細胞への分化誘導。第 84 回日本内分泌学会学術集会。2011, 4, 21-23, 神戸。
- 〔図書〕(計 2 件)
1. **Yazawa, T.**, Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of pluripotent stem cells into steroidogenic cells: role of SF-1

regulator In: *Stem cells and cancer stem cells* Vol. 8, by Hayat, E.A.,
Springer-Company, pp169-177, 2012.

2. **矢澤隆志**: 第 1 2 章- 1 多能性幹細胞、
生命と環境(林要喜知ら編) 三共出版
社, 2011

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢澤 隆志 (YAZAWA TAKASHI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00334813