

平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461380

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた化合物スクリーニングによる副腎皮質分化・再生の分子機構解明

研究課題名(英文) Chemical screening for steroidogenic differentiation of human iPSC-derived intermediate mesoderm cells.

研究代表者

曽根 正勝 (SONE, Masakatsu)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：40437207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：副腎・性腺ステロイド産生細胞は中間中胚葉から分化することが知られている。我々は、ヒトiPS細胞から誘導されたOSR1陽性中間中胚葉細胞を用いて、ステロイド合成酵素を誘導する化合物のスクリーニングを行い、ドーパミンD1受容体がOSR1陽性細胞の3 $\beta$ -HSD2発現上昇に寄与していることを見いだした。OSR1陽性細胞に転写因子SF-1/Ad4BPを強制発現させるとACTH受容体及び多くのステロイド合成酵素が発現し、そこにD1受容体アゴニストを添加すると、種々のステロイド合成酵素の発現が増強し、コルチゾールなどの産生が増大した。これらの結果は、副腎皮質分化における髄質-皮質相互作用の重要性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We tried to elucidate the steroidogenic differentiation processes using hiPSC-derived intermediate mesoderm (IM) that is known to be the origin of the human adrenal cortex and gonads. We first performed chemical screening to identify small molecules that induce steroidogenic differentiation of IM cells expressing OSR1, an early IM marker. We identified cabergoline as an inducer of 3 $\beta$ -HSD2, an essential enzyme for steroidogenesis. Although cabergoline is a potent dopamine D2 receptor agonist, additional experiments showed that cabergoline exerted effects as a low-affinity agonist of D1 receptors. Further analysis of OSR1+ cells transfected with SF-1/Ad4BP revealed that D1 receptor agonist upregulated expression of various steroidogenic enzymes and increased secretion of steroid hormones. These results suggest the importance of dopamine D1 receptor signalling in steroidogenic differentiation, which contributes to effective induction of steroidogenic cells from hiPSCs.

研究分野：内分泌学

キーワード：ステロイドホルモン 副腎皮質 性腺 発生分化

### 1. 研究開始当初の背景

副腎皮質ホルモンはヒトの生命の維持に必須のホルモンであり、数多くのホルモンの中でもその喪失が重篤な命の危機をもたらすホルモンの一つである。副腎不全患者では生涯に渡るコルチゾールの補充療法が必要であるが、コルチゾールの必要量は体調やストレス状況によって変化するため、体の必要量に合わせた補充量の調整は容易ではない。そのため、患者は補充量不足による副腎不全や補充量過多による代謝障害、骨粗鬆症などに生涯悩まされることになる。

近年、ヒトの幹細胞を用いた副腎再生の研究も行われるようになり、ヒトの間葉系幹細胞に SF-1/Ad4BP 遺伝子を導入することによりコルチゾールを含むステロイド産生細胞への誘導に成功したという報告がなされている (J. Mol. Endocrinology. 39(5):343-50. 2007) (Endocrinology. 149 (9) :4717-25. 2008)。しかし、副腎皮質は発生学的に OSR1 陽性の中間中胚葉から分化することが近年の molecular fate mapping で明らかになっており (Developmental Biology. 324(1):88-98. 2008)、生体内で副腎が骨髓から由来しているとは考えにくい。

一方、受精卵からの発生を mimic する胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた副腎分化の研究については、これまではマウス ES 細胞についての報告 (Mol Cell Biol. 17(7):3997-4006. 1997) (Mol Cell Endocrinol. 336(1-2):127-32. 2011) があるのみで、霊長類についての報告はなかった。そこで、申請者らは、ヒト ES 細胞/iPS 細胞を用いて副腎分化の研究を開始し、最近、ヒト ES および iPS 細胞から中胚葉分化を介してコルチゾールを含むステロイド産生細胞を誘導することに世界で初めて成功し、報告している (Endocrinology. 153(9):4336-45. 2012)。しかし、ヒト ES/iPS 細胞から生体内で働く真に成熟した内分泌細胞を作るのは容易ではない。例えば、世界で最も多く行われているのは膵 細胞分化の研究であり、ある程度のインスリン産生能を有する細胞は誘導されているが、成人の膵 細胞と同等に成熟し正常な内分泌学的フィードバック機能を有したヒト膵 細胞は未だに得られていない。そのため、様々な手法による分化制御因子の探索が行われており、近年、化合物ライブラリーを用いたハイスループットのケミカルスクリーニングにて、ヒトの膵 細胞分化における重要分子の同定が報告されている (Nature Chemical Biology. 5(4):258-65. 2009)。副腎を含む他の内分泌臓器においても、これらハイスループットスクリーニングの手法を応用することが可能と考えられる。また、再生医療への応用を考えると、試験管内で誘導した細胞を生体内に単純に移植するだけでは、正常な内分泌臓器として機能的に働くのは難しいと考えられる。これまでヒト iPS/ES から様々な内分泌臓器を分化誘導

したという報告はあるが、実際に再生医療への応用に至った例はまだ乏しい。臓器の再生においては、臓器の元となる細胞 (幹細胞・前駆細胞) と、それら細胞が分化・成熟し臓器として機能を維持できるような生体内の刺激や環境の両者が必要となる。

### 2. 研究の目的

申請者らは、昨年までに、ヒト iPS 細胞および ES 細胞から中胚葉細胞を誘導し、そこに遺伝子導入を行うことで副腎皮質ステロイド産生細胞を誘導することに成功している (Endocrinology. 153(9):4336-45, 2012)。本研究ではその研究をさらに発展させ、中間中胚葉マーカー OSR1 レポーター iPS 細胞を用いて、中間中胚葉 副腎性腺原基 副腎皮質ステロイド産生細胞への分化過程に関係する化合物の探索をハイスループットで行う。それらの結果から、ヒトにおける中間中胚葉から成熟副腎皮質細胞への分化機構に関する知見を得る。さらに、ヒト iPS 由来副腎皮質ステロイド産生細胞の生体内での機能獲得や自己の副腎皮質の再生に関わる重要因子を同定し副腎再生に関わる新規薬剤の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

BAC クローンを用いて樹立した、中間中胚葉マーカーである OSR1 のレポーターヒト iPS 細胞ライン (OSR1 陽性になった細胞が GFP を発現するレポーターライン) について、15 日間の分化誘導後 Osr-1 陽性中間中胚葉細胞をフローサイトメトリーにてソーティングした。それら OSR1 陽性細胞の遺伝子発現を解析して、ステロイド産生細胞の原基としての性質を確認した。

また、それら OSR1 陽性細胞を 386 well プレートに散布し、各 well 毎に異なったケミカルを添加して分化誘導後、副腎・性腺ステロイド産生細胞に共通して発現するステロイド合成酵素である 3 $\beta$ -HSD2 をターゲットにして免疫染色を行い、陽性細胞の比率をインセルアナライザーでの自動解析によるハイスループットスクリーニングを行った。

添加するケミカルには、山中伸弥らが JST の特別プロジェクトで樹立した iPS 細胞用のケミカルライブラリーを用いた。

ヒット化合物については、それら化合物が OSR1 陽性中間中胚葉細胞に及ぼす各種ステロイド合成酵素の発現への影響、各種ステロイドホルモンの産生能の変化、上流シグナルへの応答能に与える影響を解析し、ステロイド産生細胞分化過程におけるそれら化合物の意義を検討するとともに、下流の分子メカニズムについても解析した。

それらの結果から、ヒトの副腎皮質分化の分子機構について新たな知見の獲得を目指した。

#### 4. 研究成果

中間中胚葉マーカーOSR1 レポーターヒト iPS 細胞ラインから、既報の手法 (Mae S, et al. Nat Commun. 4:1367, 2013) を用いて中間中胚葉に誘導し、OSR1 陽性細胞をフローサイトメトリーにて純化した。OSR1 陽性細胞におけるステロイド合成酵素の発現を RT-PCR にて確認したところ、StAR, 3 $\beta$ -HSD2 は一部発現していたが、CYP11A1, CYP21A2, CYP11B1, CYP11B2, CYP17 など他のステロイド合成酵素の発現は認めなかった。また、培養上清中にはステロイドホルモンの分泌を検出できなかった。

それら OSR1 陽性細胞にライブラリーのケミカルを添加し、3 $\beta$ -HSD の陽性細胞を増加させるケミカルを探索し、3648 個のケミカルのうち、8 つを Hit 化合物と判定した。

私たちは、その中で No.1857 (カベルゴリン) に着目してその作用の解析を行った。

カベルゴリンは mRNA レベルでも 3 $\beta$ -HSD2 の発現を上昇させ、用量依存性を検討したところ、その効果は 10-20  $\mu$ M と高濃度で最も高かった。カベルゴリンはドーパミン D2 受容体アゴニストとして知られている物質であり、D2 受容体の発現を検討したところ、OSR1 陽性細胞にもその発現が認められた。しかし、D2 受容体に対する別の 3 種類のアゴニスト (プロモクリプチン、キンピロール、プロピルノルアポモルフィン) を添加してみたところ、それらはいずれも 3 $\beta$ -HSD2 の発現上昇作用を認めなかった。次に、カベルゴリンは弱いながらもドーパミン D1 受容体に対する作用も持ち、上述の用量依存曲線にて高濃度で効果を発揮したことから、D1 受容体に対する低親和性アゴニストとして働いている可能性を考え、その受容体発現を検討したところ、D1 受容体は未分化 iPS 細胞で発現していないにもかかわらず、OSR1 陽性細胞では強い発現を認めた。D1 受容体に対する他の 3 種類のアゴニスト (ペルゴリド、A68930、SKF83822) を添加したところ、いずれも 3 $\beta$ -HSD2 の発現上昇作用を認めた。また、その作用は D1 受容体のアンタゴニスト SKF83566 によりほぼ完全に阻害された。このことから、OSR1 陽性細胞におけるカベルゴリンの 3 $\beta$ -HSD2 発現上昇作用はドーパミン D1 受容体を介するものであると考えられた。しかし、カベルゴリンやドーパミン D1 受容体アゴニスト単独では、OSR1 陽性細胞において StAR, 3 $\beta$ -HSD2 以外の他のステロイド合成酵素の発現を誘導することはできなかった。

胎児の発生においては、3 $\beta$ -HSD2 は約 20 週から発現してくると考えられており、ドーパミンも 15 週くらいから発現が増えてくると考えられている。しかしながら、OSR1 陽性中間中胚葉細胞は発生学的には 4-5 週に相当すると考えられ、ステロイド産生細胞分化における D1 受容体の働きを十分に検討するには

OSR1 が陽性になったばかりの段階ではまだ未熟であると推測された。

そこで、次に、OSR1 陽性細胞に様々のステロイド合成酵素を制御する転写因子である SF-1/Ad4BP を強制発現させ、それら SF-1/Ad4BP 強制発現後の OSR1 陽性細胞にて D1 受容体アゴニストの作用の検討を行った。

まず、SF-1/Ad4BP を強制発現させた OSR1 陽性細胞では、StAR, 3 $\beta$ -HSD2 のみならず、CYP11A1, CYP21A2, CYP11B1, CYP11B2, CYP17 の発現も認めた。CYP19 の発現は認めなかった。また、これらの細胞では ACTH 受容体も発現していた。そこで、それら細胞を ACTH で刺激したところ、StAR, 3 $\beta$ -HSD2, CYP11B1 の有意な発現上昇を認めた。

次に、ACTH 存在下で D1 受容体アゴニストを添加したところ、StAR, 3 $\beta$ -HSD2, CYP11A1, CYP21A2, CYP11B1, CYP11B2, CYP17 いずれの発現も有意に上昇し、培養上清中へのコルチゾール、アルドステロン、DHEA の分泌上昇も認めた。

我々はヒト iPS 細胞から初めて ACTH 反応性を持つ副腎皮質ステロイド産生細胞を誘導するのに成功した。また、これらの結果から、ドーパミン D1 受容体は中間中胚葉から SF-1/Ad4BP を発現する段階に至った副腎原基あるいは副腎性腺原基において発生学的に重要な働きをしている可能性が示され、胎生期のヒト副腎発生における副腎皮質-髄質連関の重要性も示唆する結果であった。

#### 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9件)(すべて査読有)

Matsuo K, Sone M, Honda-Kohmo K, Toyohara T, Sonoyama T, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Ohno Y, Inoue M, Ohta A, Osafune K, Nakao K, Inagaki N.

Significance of dopamine D1 receptor signalling for steroidogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells.

*Sci Rep*. Nov 9;7(1):15120, 2017

Yamada-Goto N, Ochi Y, Katsuura G, Yamashita Y, Ebihara K, Noguchi M, Fujikura J, Taura D, Sone M, Hosoda K, Gottschall PE, Nakao K.

Neuronal cells derived from human induced pluripotent stem cells as a functional tool of melanocortin system.

*Neuropeptides*. Oct;65:10-20, 2017

Ikeda K, Mizoro Y, Ameku T, Nomiya Y, Mae SI, Matsui S, Kuchitsu Y, Suzuki C, Hamaoka-Okamoto A, Yahata T, Sone M, Okita K, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K.

Transcriptional Analysis of Intravenous Immunoglobulin Resistance in Kawasaki Disease Using an Induced Pluripotent Stem Cell Disease Model.  
*Circ J.* 22;81(1):110-118, 2016

Ameku T, Taura D, Sone M, Numata T, Nakamura M, Shiota F, Toyoda T, Matsui S, Araoka T, Yasuno T, Mae S, Kobayashi H, Kondo N, Kitaoka F, Amano N, Arai S, Ichisaka T, Matsuura N, Inoue S, Yamamoto T, Takahashi K, Asaka I, Yamada Y, Ubara Y, Muso E, Fukatsu A, Watanabe A, Sato Y, Nakahata T, Mori Y, Koizumi A, Nakao K, Yamanaka S, Osafune K.

Identification of MMP1 as a novel risk factor for intracranial aneurysms in ADPKD using iPSC models.

*Sci Rep.* Jul 15;6:30013, 2016

Ueda-Sakane Y, Kanamoto N, Fushimi Y, Tanaka-Mizuno S, Yasuno S, Miura M, Sone M, Yasoda A, Okada T, Togashi K, Nakao K, Inagaki N.

Overall safety and efficacy of high-dose and low-dose intravenous glucocorticoid therapy in patients with moderate-to-severe active Graves' ophthalmopathy.

*Endocr J.* 31;63(8):703-14, 2016

Mori E, Fujikura J, Noguchi M, Nakao K, Matsubara M, Sone M, Taura D, Kusakabe T, Ebihara K, Tanaka T, Hosoda K, Takahashi K, Asaka I, Inagaki N, Nakao K.

Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations.

*Metabolism.* 65(4):543-56, 2016

Kobayashi H, Matsuda Y, Hitomi T, Okuda H, Shioi H, Matsuda T, Imai H, Sone M, Taura D, Harada KH, Habu T, Takagi Y, Miyamoto S, Koizumi A. Biochemical and Functional Characterization of RNF213 (Mysterin) R4810K, a Susceptibility Mutation of Moyamoya Disease, in Angiogenesis In Vitro and In Vivo.

*J Am Heart Assoc.* 4(7). pii: e002146, 2015

Umakoshi H, Tanase-Nakao K, Wada N, Ichijo T, Sone M, Inagaki N, Katabami T, Kamemura K, Matsuda Y, Fujii Y, Kai T, Fukuoka T, Sakamoto R, Ogo A, Suzuki T, Tsuiki M, Shimatsu A, Naruse M.

Importance of contralateral aldosterone suppression during adrenal vein sampling in the subtype evaluation of primary aldosteronism.

*Clin Endocrinol (Oxf).* 83(4):462-7, 2015

Sonoyama T, Sone M, Tamura N, Honda K, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Itoh H, Nakao K.

Role of endogenous ACTH on circadian aldosterone rhythm in patients with primary aldosteronism.

*Endocr Connect.* 3(4):173-9, 2014

〔学会発表〕(計4件)

Koji Matsuo, Masakatsu Sone, Kyoko Honda-Kohmo, Takafumi Toyohara, Takuhiro Sonoyama, Daisuke Taura, Katsutoshi Kojima, Yorihide Fukuda, Youichi Ohno, Mayumi Inoue, Akira Ohta, Kenji Osafune, Kazuwa Nakao, Nobuya Inagaki

Significance Of Dopamine D1 Receptor Signaling For Steroidogenic Differentiation Of Human Induced Pluripotent Stem Cells

ENDO 2018 シカゴ、米国、2017年3月

松尾浩司, 曾根正勝, 本田恭子, 園山拓洋, 田浦大輔, 小嶋勝利, 福田賢英, 大野洋一, 長船健二, 中尾一和, 稲垣暢也

「ヒト iPS 細胞を用いた副腎皮質分化メカニズムの解明」

第 23 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 倉敷、日本、2016年1月15日

曾根正勝

「ヒト iPS / ES 細胞からのステロイド産生細胞分化とケミカルスクリーニング」

第 26 回間脳・下垂体・副腎系研究会 (招待講演) 東京、日本、2015年3月14日

本田恭子, 曾根正勝, 豊原敬文, 園山拓洋, 田浦大輔, 小嶋勝利, 福田賢英, 稲垣暢也, 長船健二, 中尾一和

「ヒト iPS 細胞のステロイド産生細胞分化系におけるケミカルスクリーニング」

第 87 回日本内分泌学会学術総会 福岡、日本、2014年4月25日

〔図書〕(計1件)

曾根正勝、稲垣暢也

「ステロイド産生細胞と再生医療」

クッシング症候群診療マニュアル改定第2版 p278 平田結喜緒編

診断と治療社 2015年12月7日発行

〔産業財産権〕

出願・公開状況 (計1件)

名称：ステロイド産生細胞の製造方法  
発明者：長船健二、曾根正勝、稲垣暢也、中尾一和、松尾浩司  
出願人：国立大学法人京都大学  
種類：特許  
基礎出願：特願 2017-020519  
出願日：2017年2月7日  
国際出願：PCT/JP2018/003946  
出願日：2018年2月6日  
国際公開日：2018年8月16日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曾根 正勝 ( SONE Masakatsu )  
京都大学・大学院医学研究科・特定准教授  
研究者番号：40437207

### (2) 研究分担者

田浦 大輔 ( TAURA Daisuke )  
京都大学・大学院医学研究科・特定助教  
研究者番号：10558612

### (4) 研究協力者

長船 健二 ( OSAFUNE Kenji )