

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10654

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞からの顆粒膜細胞の創出と分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Induction of ovarian granulosa cells from mesenchymal stem cells for investigating the molecular mechanisms of their development.

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣顆粒膜細胞は、卵子を取り巻き、その発達に必要不可欠である。本研究の目的は、幹顆粒膜細胞の分化誘導系を確立して、その分化メカニズムを解明することである。そして、間葉系幹細胞や未分化な顆粒膜細胞に転写因子のSF-1/Ad4BPを含む遺伝子を導入することにより、分化した顆粒膜細胞に非常に似た性質を示す細胞を誘導することができた。これらの分化誘導系を用いることにより、顆粒膜細胞の分化に関わる因子やヒトに高濃度で存在するアンドロゲンを発見するなどの成果を挙げることができた。

研究成果の概要(英文)：Granulosa cells constitute the parts of somatic cells in follicles, and are essential for the development of oocytes. The purpose of this study is to induce granulosa cells from stem cells and precursor cells for revealing the molecular mechanism of their development. We established granulosa-like cells from mesenchymal stem cells and undifferentiated granulosa cell tumor-derived cells by introducing SF-1/Ad4BP. Using these systems, it was revealed the genes involved in the differentiation of granulosa cells, and identified a major androgen in human plasma.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：顆粒膜細胞 幹細胞 SF-1/Ad4BP

1. 研究開始当初の背景

顆粒膜細胞は、卵胞発育や排卵にも重要な役割を果たすと同時に、黄体細胞に分化した後はプロゲステロンを産生し妊娠の維持に必須である。顆粒膜細胞の形成不全や分化異常は、卵胞発育や排卵に障害、黄体機能不全により不妊症の原因となる。ノックアウトマウスの解析等より、多くの遺伝子が顆粒膜細胞の形成や機能に関わることが示唆されているものの、その詳しい機構には不明な点が多い。これは卵巣が顆粒膜細胞に加えて、卵母細胞や莢膜細胞など多くの細胞系列から形成されるため、その前駆細胞を単離することが困難であることが原因に挙げられる。また、生殖腺形成のマスター遺伝子とも言えるSF-1/Ad4BP遺伝子が発現しない場合、生殖腺そのものがなくなることが、その解析を一層難しいものになっている。幹細胞から顆粒膜細胞を分化誘導する系を確立することは、このような問題を解決する理想的な手段であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、幹細胞や前駆細胞から、顆粒膜細胞を分化誘導する系を確立する。そして、確立した分化誘導系を用いて顆粒膜細胞形成・分化の分子メカニズムを解明し、特に顆粒膜細胞分化時のCYP19A1遺伝子（顆粒膜細胞の分化マーカー）の発現制御機構を明らかとすることを目的とする。また、顆粒膜細胞が産生する新たなステロイドホルモンの同定も試みる。

3. 研究の方法

(1) 顆粒膜細胞の分化誘導

ヒト間葉系幹細胞や顆粒膜細胞の前駆細胞に、顆粒膜細胞の分化に必要であることが予想されるSF-1/Ad4BPを始めとした候補遺伝子を、レトロウイルスやアデノ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顆粒膜細胞のマーカー遺伝子の発現をRT-PCRにより、またエストロゲン産生をELISAにより確認することにより、細胞が分化しているか否かを確かめた。

(2) 顆粒膜細胞分化に関わる遺伝子群の探索

幹細胞や前駆細胞から顆粒膜細胞への分化後に発現が変化する遺伝子をDNAマイクロアレイにより調べ、顆粒膜細胞の分化に重要な候補遺伝子を探索する。探索した遺伝子の卵巣における発現をRT-PCRや免疫組織化学法によって確か

める。また、この遺伝子の機能を調べるために、ラット初代顆粒膜細胞や分化した細胞に遺伝子産物を添加し、CYP19A1を含むマーカー遺伝子の発現を確認する。

(3) ヒトにおける新たなステロイドホルモンの同定

(1)で分化誘導した細胞が、培地中に産生するステロイドホルモンをELISAで測定することにより同定した。その後、ヒト血中に同定したホルモンが存在するかをLC-MS/MSにより測定した。

4. 研究成果

(1) 顆粒膜細胞の分化誘導

月経血由来の間葉系幹細胞並びに、ヒト顆粒膜細胞腫由来で比較的未分化であるKGN細胞にレトロウイルスやアデノウイルスによりSF-1/Ad4BPを含む遺伝子を複数導入したところ、共にCYP19A1の発現が誘導され、培地にエストラジオールを産生した。また、顆粒膜細胞のマーカー遺伝子の一つであるLRH-1の発現が強く誘導されたことから、これらの細胞は卵胞発達期の顆粒膜細胞に近い形質に分化していることが明らかとなった。(雑誌論文3)

(2) 顆粒膜細胞分化に関わる遺伝子の探索

(1)で確立した顆粒膜細胞の分化誘導系を用いて、遺伝子の導入後の細胞において発現が誘導・抑制される遺伝子群をDNAマイクロアレイによって探索した。すると、細胞の分化に伴い誘導型の一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現が低下することが分かった。そこで、ラット卵巣におけるiNOSの発現を調べたところ、分化誘導系の結果を支持するように、卵胞形成初期の未分化な顆粒膜細胞において高レベルの発現が検出された。しかしながら、卵胞発達期になるとその発現はほとんど検出できなくなり、これはCYP19A1の発現パターンと対照的であった。そこで、初代培養の顆粒膜細胞や分化誘導した顆粒膜細胞に一酸化窒素の生成剤を添加したところ、CYP19A1の発現は著しく低下した。以上の結果から、iNOSは一酸化窒素産生を介してCYP19A1の発現を抑制し、顆粒膜細胞の分化を抑制することが明らかとなった(雑誌論文1)。

(3) ヒトにおける新たなステロイドホルモンの同定

分化した細胞が培地中に産生するステ

ロイドホルモンを測定したところ、これまで魚類特異的なアンドロゲンであると考えられてきた 11-ケトテストステロン (11-KT) が検出された。そこで、ヒト血中における 11-KT を測定したところ男女で共に存在していた。特に女性ではテストステロンよりも高い濃度で存在し、もっとも量の多い活性型アンドロゲンであることが分かった (雑誌論文 4)。

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. Imamichi Y, Sekiguchi T, Kitano T, Kajitani T, Okada R, Inaoka Y, Miyamoto K, Uwada J, Takahashi S, Nemoto T, Mano A, Khan MRI, Islam MT, Yuhki KI, Kashiwagi H, Ushikubi F, Suzuki N, Taniguchi T, Yazawa T: Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary. *Scientific Reports*, 7 (1), e8374, 2017
2. Uwada J, Yazawa T, Islam MT, Khan MRI, Krug SM, Fromm M, Karaki SI, Suzuki Y, Kuwahara A, Yoshiki H, Sada K, Muramatsu I, Taniguchi T: Activation of muscarinic receptors prevents TNF- α -mediated intestinal epithelial barrier through p38 MAPK, *Cellular Signalling*, 35, 188-196, 2017
3. Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, Khan MR, Uwada J, Umezawa A, Taniguchi T: Induction of steroidogenic cells from adult stem cells and pluripotent stem cells. *Endocrine Journal*, 63, 945-951, 2016
4. Imamichi Y, Yuhki KI, Orisaka M, Kitano T, Mukai K, Ushikubi F, Taniguchi T, Umezawa A, Miyamoto K, Yazawa T: 11-ketotestosterone is a major androgen produced in human gonads. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101, 3582 - 3591, 2016
5. Khan MR, Uwada J, Yazawa T, Islam MT, Krug SM, Fromm M, Karaki S, Suzuki Y, Kuwahara A, Yoshiki H, Sada K, Muramatsu I, Anisuzzaman AS, Taniguchi T: Activation of muscarinic cholinergic factor- α -induced barrier dysfunction in intestinal epithelial cells. *FEBS Letter*, 589 (23), 3640 - 3647, 2015
6. Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, Khan MR, Uwada J, Umezawa A, Taniguchi T: Regulation of Steroidogenesis, Development, and Cell Differentiation by Steroidogenic Factor-1 and Liver Receptor Homolog-1. *Zoological Science*, 32 (4), 323- 330, 2015
7. Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, Khan MR, Uwada J, Taniguchi T: Overviews of Stem Cells for Gonadal and Adrenal Steroidogenic Cells. *American Journal of Life Sciences*, 3 (3-2), 58-64, 2015
8. Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, Khan MR, Uwada J, Taniguchi T: Biology and Medicine of Peptide and Steroid Hormones: Special Issue for the Fifth Workshop on Peptide & Hormone Research. *American Journal of Life Sciences*, 3 (3-2), 1-2, 2015
9. Khan RI, Yazawa T, Anisuzzaman AS, Uwada J, Taniguchi T: Intestinal Secretion and Barrier Function; Implication with Muscarinic Cholinergic Receptor. *American Journal of Life Sciences*, 3 (4), 311-315, 2015

[学会発表] (計 22 件)

- 1、矢澤隆志、“ステロイドホルモン合成経路の探求”、第 8 回ペプチド・ホルモン研究会、2017 年 12 月 16 日、長浜
- 2、矢澤隆志、“幹細胞を用いたステロイドホルモン産生経路の解析”、第 2 回性と生殖の懇話会、2017 年 12 月 12 日～13 日、名古屋
- 3、矢澤隆志、佐藤貴弘、“ホルモンが農と食に及ぼした光と影” ConBio2017、2017 年 12 月 6 日～9 日、神戸
- 4、矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“ヒト血中における 11-ケトテストステロンの存在と機能”、第 17 回日本内分泌学会北海道支部学術集会、2017 年 11 月 5 日、大阪
- 5、矢澤隆志、今道力敬、宇和田淳介、谷口隆信、“哺乳類における 11-ケトテストステロン産生”、日本動物学会富山大会、2017 年 9 月 21 日～23 日、富山
- 6、矢澤隆志、今道力敬、“DES 投与が幼若ラット卵巣のステロイドホルモン産生に及ぼす影響”、第 62 回日本動物学会北海道支部第 62 回大会、2017 年 8 月 26 日、札幌
- 7、矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“ライディッシュ細胞における EP 受容体を介したステロイドホルモン産生調節機構”、第 90 回日本内分泌学会学術集会、2017 年 4 月 20～22 日、京都
- 8、矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の分化誘導”、第 90 回日本内分泌学会学術集会、2017 年 4 月 20～22 日、京都
- 9、矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“ライディッシュ細胞にお

- ける Cox-2 の転写調節機構 ”、第 21 回日本生殖内分泌学会、2017 年 1 月 14 日、大阪
- 1 0、 Takashi Yazawa, Yoshitaka Imamichi, Junsuke Uwada, Takanobu Taniguchi, “Novel androgen metabolic pathway in human gonads”, 第 22 回国際動物学会、2016 年 11 月 15 日～19 日、那覇
 - 1 1、 矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“ヒトにおける 11-ケトテストステロン産生と機能 ”、2016 年 11 月 5 日、第 17 回日本内分泌学会北海道支部学術集会
 - 1 2、 矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“精巣におけるプロスタグランジンとステロイドホルモンの産生制御 ”、2016 年 9 月 30 日、第 67 回日本薬理学会北部会、札幌
 - 1 3、 矢澤隆志、“生殖内分泌とステロイドホルモン産生 ”、第 7 回ペプチド・ホルモン研究会、2016 年 9 月 17 日、久留米
 - 1 4、 矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“マウス精巣における Cox-2 の発現制御とその機能 ”、2016 年 7 月 14 日～16 日、第 34 回内分泌代謝サマーセミナー、福岡・対馬
 - 1 5、 矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“ヒト生殖腺における新たなアンドロゲン代謝経路解析 ”、第 53 回日本生化学会北海道支部例会、2016 年 7 月 8 日、札幌
 - 1 6、 矢澤隆志、“幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の分化誘導とホルモン産生機構の解明 ”、第 89 回日本内分泌学会学術総会、2016 年 4 月 21 日～23 日、京都
 - 1 7、 矢澤隆志、“Journal の Editor と Reviewer の話 ”、第 6 回ペプチド・ホルモン研究会、2015 年 10 月 16 日～17 日、能登
 - 1 8、 矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“ライディッチ細胞におけるプロスタグランジン産生とその機能 ”、2015 年 9 月 17 日～19 日、第 86 回日本動物学会新潟大会、新潟
 - 1 9、 矢澤隆志、宇和田淳介、谷口隆信、“TJ 構成因子 FAK は、ムスカリン M1 受容体シグナルを介した腸上皮バリア機能維持や修復の標的となる ”、2015 年 9 月 12 日、第 112 回北海道癌談話会例会、札幌
 - 2 0、 矢澤隆志、今道力敬 “ヒト生殖腺での 11-ケトテストステロンの産生と機能 ”、第 17 回日本内分泌学会北海道支部学術集会、2016 年 8 月 26 日、札幌
 - 2 1、 矢澤隆志、“幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の誘導とホルモン産生機能の解明 ”、帝京大学若手内分泌セミナー、2016 年 4 月 25 日、東京

- 2 2、 矢澤隆志、今道力敬、宮本薫、宇和田淳介、谷口隆信、“ライディッチ細胞における Cox-2 の発現制御とプロスタグランジン産生 ”、第 88 回日本内分泌学会学術集会、2016 年 4 月 23～25 日、東京

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

(2) 研究分担者

谷口 隆信 (TANIGUCHI, Takanobu)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 6021730

加藤 剛志 (KATO, Tsuyoshi)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60194833

宇和田淳介 (UWADA, Junnsuke)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 70580314