

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19790206
研究課題名（和文） 骨髄幹細胞を用いたステロイド産生細胞の作製と再生医療への応用
研究課題名（英文） Differentiation and regeneration of steroidogenic cells from bone marrow stem cells
研究代表者
矢澤 隆志（YAZAWA TAKASHI）
福井大学・医学部・助教
研究者番号：00334813

研究成果の概要：私は、ホルモン補充療法に代わりうる再生治療法の開発を目指して、幹細胞を自律的な分泌調節を持ったステロイド産生細胞に分化させることを試みている。本研究では、様々な間葉系幹細胞株から分化させ、ステロイド産生細胞を用いてステロイド産生細胞の分化メカニズムの解明を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：SF-1、LRH-1、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳動物の主要なステロイド産生器官は、生殖腺と副腎である。両器官で産生されるステロイドホルモンは、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、その産生異常による多様な疾患が報告されている。これらのステロイド代謝異常に関連した疾患の治療には、幹細胞を用いた再生医療の応用が期待されている。ステロイド代謝異常症の治療には、主にホルモン補充療法が用いられているが、副作用も少なくなく、自律的な分泌調節が可能な再生医療の開発が望まれている。

2. 研究の目的

私たちは、幹細胞からフィードバック機能を備えたステロイド産生細胞の作製を試みている。幹細胞としては、ステロイド産生器官と同じく中胚葉起源であると考えられる間葉系幹細胞を選択した。間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪や肺組織などにも存在し、成体からも比較的容易に採取可能である。また、分娩後に廃棄される臍帯血にも含まれることから、再生医療にとって格好の材料であると考えられる。本研究は、骨髄や臍帯血の間葉系幹細胞を用いてフィードバック機能を備えたステロイド産生細胞を作り出し、ステロ

イド代謝異常症に対する再生医療法の開発することを目的とする。また、分化した細胞を用いて、ステロイド産生細胞分化機構の解明を同時に行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯血由来の間葉系幹細胞株 UCB408E6E7T-33 に、レトロウイルスを用いて SF-1 を安定導入した。そして、この細胞株の培養液中に cAMP を添加して、分化誘導を行った。分化の検証は、ステロイド産生酵素群の RT-PCR による解析と、産生されたステロイドを ELISA によって検証した。

(2) ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞株 UE7T-13 や hMSC-TERT-E6/7 に、転写因子 SF-1 と LRH-1 を導入し、それぞれの安定発現細胞株を樹立した。そして、この細胞株の培養液中に cAMP を添加して、分化誘導を行った。分化の検証は、RT-PCR によるステロイド産生酵素群の発現解析と産生されたステロイドを ELISA により解析した。

(3) マウス骨髄間葉系幹細胞株・KUM9 から作製したライディッヒ細胞様の細胞とマウスの生殖腺ステロイド産生細胞の比較を行った。ステロイド産生酵素群の RT-PCR による解析と、マウスの血中ステロイドを ELISA によって検証した。さらに、アンドロゲンレセプターによるレポーターアッセイを行った。

(4) ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞株 UE7T-13 や hMSC-TERT-E6/7 に、転写因子 LRH-1 を導入し、安定発現細胞株を樹立した。そして、この細胞株の培養液中に cAMP を添加して、分化誘導を行い、ステロイド合成遺伝子の発現パターンとプロモーター領域のメチル化パターンを解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト臍帯血間葉系幹細胞株 UCB408E6E7T-33 に、SF-1 を安定導入し、培地に cAMP を添加したところ、主にプロゲステロンを産生した。この細胞は、アロマターゼや HSD17B7 の発現レベルが高く、アンドロゲンの添加によりエストラジオールを産生した。よって、UCB408E6E7T-33 は、黄体化顆粒膜細胞に近い性質を持つステロイド産生細胞に分化したことが分かった。

(2) これまでの研究により、SF-1 は間葉系幹細胞をステロイド産生細胞へと分化させることが分かっている。LRH-1 は、SF-1 と共に核内受容体の 5A ファミリーに属する転写

因子である。ヒトにおいて、LRH-1 遺伝子は、SF-1 と同様に生殖腺や副腎でその発現が検出された (図 1)。特に、生殖腺における発現レベルは非常に高く、SF-1 の発現レベルよりもはるかに高かった。LRH-1 は、ステロイド合成系遺伝子のプロモーターを量依存的に活性化することができたが、その活性は SF-1 に比べて著しく低いものであった。しかしながら、LRH-1 は、cAMP との協調作用によって、SF-1 と同様に間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化誘導することができた。ヒト精巣において免疫組織化学を行ったところ、LRH-1 タンパク質の発現は、SF-1 や CYP17 と同様にライディッヒ細胞において検出された。よって、LRH-1 は、ヒト精巣で SF-1 と共にライディッヒ細胞の CYP17 を含むステロイド合成系遺伝子の発現を制御し、ステロイド産生に関わると考えられる。

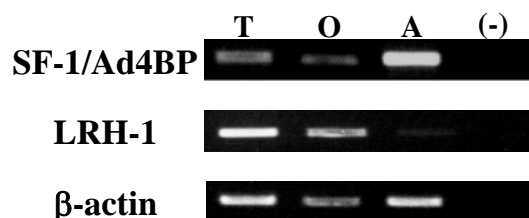


図 1 ヒトの主要ステロイドホルモン産生器官における NR5A ファミリーの発現

(3) KUM9 細胞に、SF-1 を安定導入によりテストステロンを産生するライディッヒ細胞様の細胞へと分化した。この細胞では、哺乳類において副腎特異的に発現すると考えられている Cyp11b1 が、ゴナドトロピンのセカンドメッセンジャーである cAMP により強く発現誘導された。そこで、マウスの生殖腺における Cyp11b1 の発現を調べたところ、hCG の投与によってオスではライディッヒ細胞、メスでは莢膜細胞において誘導されることが分かった (図 2)。この現象は、魚類の精巣において、テストステロンをより活性の高い 11-ケトテストステロン (11-KT) に代謝・変換する時に見られるものである。私達は、このアンドロゲン代謝経路が進化的に遠くかけ離れた哺乳類でも保存されているものと考えて、雌雄マウスに hCG 投与して、血中の 11-KT の濃度を測定した。hCG 投与後、雌雄両方の血中で 11-KT を検出することができたが、その濃度は基質のテストステロン濃度がオスの 10 分の 1 以下であるメスにおいても、ほとんど差がなかった。これは、11-KT 産生に必要な、もうひとつの酵素である 2 型の 11β-HSD の発現が、魚類とは反対に卵巣において著しく高いことによるものと考えられた。また、レポーターアッ

セイにより、11-KT は哺乳類の AR の転写活性を著明に上昇させることが分かった。

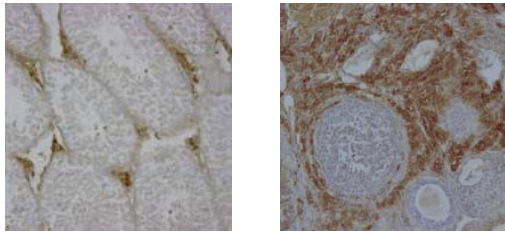


図2 hCG 投与後マウスの精巣と卵巣における Cyp11b1 免疫組織化学写真

(4) 骨髄由来の間葉系幹細胞は、SF-1 や LRH-1 を導入し、cAMP 処理することにより、多くのステロイド産生酵素を発現し、ステロイド産生細胞へと分化する。cAMP 処理後のステロイド産生酵素の発現パターンは、数時間以内に誘導される早期のものと、24時間以降に誘導されるものの二つに分かれる。どちらのパターンに分類される酵素群も、LRH-1 により転写が誘導されることから、両群の発現時間の違いを決めるメカニズムを解明するべくプロモーター領域のメチル化を調べた。すると、cAMP 処理後、早期に発現する CYP11A1 のプロモーター領域は、間葉系幹細胞においても、比較的低メチル化状態であった。このメチル化状態は、LRH-1 の導入や cAMP 処理によりステロイド産生細胞に分化した時にも、ほとんど変化がなかった。一方、cAMP 処理後、発現する CYP17 のプロモーター領域の CpG 部位は、間葉系幹細胞において完全にメチル化されていた。しかしながら、CYP11A1 と異なり、CYP17 のプロモーター領域は、LRH-1 導入後の cAMP 処理により、経時的に脱メチル化され、遺伝子発現パターンと一致していた。脱メチル化剤処理により、CYP17 は、cAMP 処理後、早期に誘導されるようになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Inaoka, Y., **Yazawa, T.**, Mizutani, T., Kokame, K., Kangawa, K., Uesaka, M., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Regulation of P450 oxidoreductase by gonadotropins in rat ovary and its effect on estrogen production. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16:6(1), 62, 2008. 査読有.
- ② **Yazawa, T.**, Uesaka, M., Inaoka, Y., Mizutani, T., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/ human

chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen metabolic pathway. *Endocrinology* 149(4), 1786-1792, 2008. 査読有.

- ③ Inaoka, Y., **Yazawa, T.**, Uesaka, M., Mizutani, T., Yamada, K., Miyamoto, K. : Regulation of Nur77/NGFI-B gene expression in the rat ovary and in Leydig tumor cells MA-10. *Mol. Reprod. Dev.* 75(5), 931-939, 2008. 査読有.
- ④ 稲岡齊彦, **矢澤隆志**, 上坂美紀, 水谷哲也, 山田一哉, 宮本 薫: ラット卵巣および MA-10 細胞での NGFI-B/nur77 遺伝子の発現調節機構. 日本生殖内分泌学会雑誌 12, 5-8, 2007. 査読無.

[学会発表] (計14件)

- ① 稲岡齊彦, **矢澤隆志**, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase ゴナドトロピンによる発現制御とエストロゲン産生に及ぼす影響. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 2008, 12, 9-12, 神戸.
- ② **矢澤隆志**, 稲岡齊彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: 間葉系幹細胞のステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 2008, 12, 9-12, 神戸.
- ③ 稲岡齊彦, **矢澤隆志**, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ゴナドトロピンによるラット卵巣での P450 oxidoreductase の発現調節とアロマターゼ活性への影響. 第13回日本生殖内分泌学会学術集会 2008, 11, 29, 大阪.
- ④ **矢澤隆志**, 稲岡齊彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. 第13回日本生殖内分泌学会学術集会 2008, 11, 29, 大阪.
- ⑤ **矢澤隆志**, 宮本 薫: 間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 第16回日本ステロイドホルモン学会学術集会. シンポジウム 2008, 11, 22, 福井.
- ⑥ **矢澤隆志**, 稲岡齊彦, 水谷哲也, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. 日本動物学会第79回大会 2008, 9, 5-7, 福岡.
- ⑦ 稲岡齊彦, **矢澤隆志**, 水谷哲也, 上坂

美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase ギナドトロピンによる発現誘導と aromatase 活性に及ぼす影響. 第 26 回内分泌代謝学サマーセミナー 2008, 7, 11-12, 愛知. 抄録集, 29.

- ⑧ 稲岡齊彦, **矢澤隆志**, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣における P450 oxidoreductase(POR) のホルモンによる発現誘導と aromatase 活性に及ぼす影響. 第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008, 5, 16-18, 青森. 日本内分泌学会雑誌 84(1), 208, 2008.
- ⑨ **矢澤隆志**, 稲岡齊彦, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞分化における LRH-1 の役割. 第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008, 5, 16-18, 青森. 日本内分泌学会雑誌 84(1), 208, 2008.
- ⑩ **Yazawa, T.**, Miyamoto, K. : Differentiation of Adult Stem Cells into Steroidogenic Cells. Fourth Canada-Japan Bilateral Workshop on Human Reproduction & Reproductive Biology. 2007, 7/31-8/2, Hirosaki. 抄録集, 34.
- ⑪ **Yazawa, T.**, Mizutani, T., Yoshino, M., Inaoka, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Differentiation of Adult Stem Cells derived from Bone Marrow Stroma into Leydig or Adrenocortical Cells. 第 25 回内分泌・代謝学サマーセミナー. 2007, 7, 17-18, 淡路. 抄録集, 30.
- ⑫ Inaoka, Y., **Yazawa, T.**, Uesaka, M., Mizutani, T., Yamada, K., Miyamoto, K. : Regulation of NGFI-B/Nur77 gene expression in the rat ovary and transcriptional regulation in Leydig tumor cells MA-10. 第 25 回内分泌・代謝学サマーセミナー. 2007, 7, 17-18, 淡路. 抄録集, 29.
- ⑬ **矢澤隆志**, 水谷哲也, 稲岡齊彦, 上坂美紀, 山田一哉, 梅澤明弘, 宮本 薫: 骨髄間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞の作製. 第 80 回日本内分泌学会学術総会. 2007, 6, 14-16, 東京.
- ⑭ 稲岡齊彦, **矢澤隆志**, 水谷哲也, 上坂美紀, 山田一哉, 宮本 薫: 性腺系での NGFI-B/ Nur77 の発現調節機構. 第 80 回日本内分泌学会学術総会. 2007, 6, 14-16, 東京.

[その他]

ホームページ等

<http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKA2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢澤 隆志 (YAZAWA TAKASHI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 00334813