

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390078

研究課題名（和文） 骨髄幹細胞から性腺系細胞の創出とその分化誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of stem cell differentiation into steroidogenic cells

研究代表者

宮本 薫 (MIYAMOTO KAORU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：30125877

研究成果の概要(和文):ステロイドホルモン産生細胞への分化メカニズムを明らかにするため、ステロイドホルモン合成関連遺伝子のマスター転写制御因子である SF-1 による分化誘導の詳細を、ゲノムワイドな ChIP-on-chip assay や SF-1 転写複合体の同定により明らかにした。その結果、新たな SF-1 標的遺伝子群が同定され、それらのステロイドホルモン合成における関与が示唆された。また C/EBP $\beta$  のステロイドホルモン合成への関与が明らかとなった。

研究成果の概要(英文): We investigated differentiation process of stem cells by introduction of a master transcription factor SF-1 into steroidogenic cells. A genome-wide analysis of ChIP-on-chip assay along with characterization of a nuclear SF-1 protein complex revealed many novel SF-1 target genes and SF-1 interacting proteins including C/EBP $\beta$ , suggesting a novel process of steroid hormone biosynthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

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：再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

私どもはマウス及びヒト骨髄間葉系幹細胞に Ad4BP/SF-1 を恒常的に発現させることで、ステロイドホルモン産生細胞に分化する幹細胞株の樹立に成功した。間葉系幹細胞からステロイド産生細胞へと分化誘導は、ステロイドホルモン異常症に対する新たな治療法の可能性を示すものである。しかしそのステロイド産生パターンは、性腺アンドロゲンを中心に産生する細胞株や副腎皮質グルココルチコイドを主として産生する細胞株、ある

いはその中間的なステロイドパターンを示す細胞株など様々であった。幹細胞ごとに分化の方向性が異なるのは、それぞれの細胞株で SF-1 及び cAMP による遺伝子発現調節が異なるためと推察される。そこで、それぞれの幹細胞株の分化過程での SF-1 及び cAMP の役割を、遺伝子発現の網羅的解析などを通して明らかにできれば、目的とするステロイドホルモン産生細胞の分化誘導が可能になると予想された。

## 2. 研究の目的

本研究では、私どもが樹立した幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導系を用いて、そのメカニズムを分子レベルで明らかにする。本研究により新たなSF-1標的遺伝子やSF-1転写複合体が同定されれば、その分化誘導メカニズムが明らかになるのみならず、治療や診断への応用、さらには遺伝子変異によるステロイドホルモン産生異常疾患の治療や骨粗しょう症を含めた更年期障害に対するステロイド産生細胞による治療など、幹細胞を用いた再生医療の実現に向け大きく前進すると考えられる。

### 3. 研究の方法

- 1) DNA マイクロアレイ及び ChIP-on-chip による幹細胞株での SF-1 標的遺伝子群の網羅的解析  
間葉系幹細胞への SF-1 導入及び cAMP 刺激による遺伝子発現の変化および染色体上への SF-1 の結合を DNA マイクロアレイ及び ChIP on chip により解析した。これらの解析により、SF-1 の支配下にある新たな SF-1 標的遺伝子群を同定した。
- 2) 免疫沈降MALDI-TOF MS (IP-MALDI-TOF MS)によるSF-1導入幹細胞での選択的分化誘導因子の同定  
転写因子SF-1に対する抗体により転写複合体を免疫沈降させ、2次元電気泳動により複合体構成因子を分離し、高分解能のMALDI-TOF MSにより複合体構成因子タンパク質を同定した。
- 3) 3C(Chromatin Conformation Capture) assayによる染色体構造変化の解析  
3C assayにより、SF-1標的遺伝子発現調節における染色体構造変化を検証した。標的遺伝子としては、StARおよび新たなSF-1標的遺伝子として同定したGSTA3を中心に解析を行った。

### 4. 研究成果

- 1) ステロイドホルモン合成のマスター転写因子である SF-1 の新たな標的遺伝子として、グルタチオントランスフェラーゼの一種である GSTA1 及び GSTA3 を同定した。GSTA1 及び GSTA3 は従来解毒酵素として働いていると考えられてきたが、私どもはこれらがステロイドホルモン産生細胞に特異的に発現している事、組み換え発現させた GSTA1 及び GSTA3 が黄体ホルモンや男性ホルモン合成酵素として機能していることを証明した。これらの結果は、GSTA1 及び GSTA3 がステロイドホルモン合成に必須の遺伝子であり、先天性副腎・性器症候群の原因遺伝子の候補であることを示している。
- 2) GSTA ファミリーは、GSTA1 から A4 ま

での4種の相同性の高い遺伝子群により構成され、ヒト染色体6p12にクラスターを形成して存在している。私どもは、これら4種のGSTAファミリーが、クラスター全体としてSF-1により発現制御されていると考えた。本研究では、GSTA1及びGSTA3両方の遺伝子発現が、GSTA3プロモーター上に存在する一か所のSF-1結合部位により同時に制御されていることを、染色体上の遠距離相互作用を解析できる3Cアッセイにより明らかにした。これは、染色体構造変化による全く新たな転写調節機構が存在することを示したものであり、クラスターを構成する遺伝子群における新たな協調的転写調節機構の存在を実証したものである。

- 3) SF-1 転写複合体を単離精製し、20種類以上の複合体構成タンパク質を同定した。それらの中にC/EBPβが含まれており、SF-1との直接相互作用していることが確認された。またcAMP刺激により、SF-1との結合が強化されることも明らかとなった。C/EBPβを用いたChIP-on-chip assayにより、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子上流には、SF-1結合領域と重複する形で、C/EBPβも結合していることが明らかとなった。以上の検討により、SF-1標的遺伝子の転写は、C/EBPβとSF-1の協調作用により活性化されることが明らかとなった。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計15件)

### 総説

1. Miyamoto, K., Yazawa, T., Mizutani, T., Imamichi, Y., Kawabe, S., Ju, Y., Umezawa, A.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 査読有, 336, 123-126, 2011.
2. 矢澤隆志, 梅澤明弘, 宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞における転写共役因子 PGC-1α の役割. *日本生殖内分泌学会雑誌*, 査読無, 15, 29-34, 2010.
3. 矢澤隆志, 梅澤明弘, 宮本 薫: 間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞. 特集・再生医療の将来と産婦人科. 産科と婦人科, 査読無, 76(10), 1189-1194, 2009.
4. 安部由美子, 宮本 薫: インヒビン/アクチビン. *ホルモン病態異常と検査* 8. 生殖関連. *臨床検査*, 査読無, 52(11), 1276-1280, 2008.

原著

1. **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. Endocrinol.* , 査読有, 336, 127-132, 2011.
2. **Mizutani, T., Yazawa, T.,** Ju, Y., **Imamichi, Y.,** Uesaka, M., Inaoka, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Oki, M., Umezawa, A., **Miyamoto, K. :** Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J. Biol. Chem.* , 査読有, 285(36), 28240-28251, 2010.
3. **Yazawa, T.,** Inaoka, Y., **Okada, R., Mizutani, T.,** Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Orisaka, M., Umezawa, A., **Miyamoto, K.:** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Endocrinol.* , 査読有, 24(3), 485-496, 2010.
4. Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., Kagawa, N., Takagi, K., Asano, K., Haneishi, A., **Miyamoto, K.:** ZHX2 and ZHX3 repress cancer markers in normal hepatocytes. *Front. Biosci.* , 査読有, 14 (10), 3724-3732, 2009.
5. Shou, Z., Zhou, Q., Cai, J., Chen, J., Yamada, K., **Miyamoto, K.:** PI-3 kinase pathway can mediate the effect of TGF- $\beta$  1 in inducing the expression of SHARP-2 in LLC-PK1 cells. *J. Zhejiang Univ. SCIENCE B*, 査読無, 10(9), 702-706, 2009.
6. **Yazawa, T.,** Inaoka, Y., **Mizutani, T.,** Kuribayashi, M., Umezawa, A., **Miyamoto, K. :** Liver Receptor Homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology*, 査読有, 150(8), 3885-3893, 2009.
7. Shou, Z., Xiao, H., Xu, Y., Wang, Y., Yang, Y., Jiang, H., Chen, J., Yamada, K., **Miyamoto, K.:** SHARP-2 gene silencing by lentiviral-based short hairpin RNA interference prolonged rat kidney transplant recipients' survival time. *J. International medical Research* , 査読有, 37, 766-778, 2009.
8. 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.* , 査読有, 75(5), 931-939, 2008.
9. Ikeda, S., Nakamura, K., Kogure, K., Omori, Y., Yamashita, S., Kubota, K., **Mizutani, T., Miyamoto, K.,** Minegishi, T.: Effect of Estrogen on the Expression of Luteinizing Hormone-Human Chorionic Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Cultured Rat Granulosa Cells. *Endocrinology*, 査読有, 149(4), 1524-1533, 2008.
10. **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*, 査読有, 149(4), 1786-1792, 2008.
11. 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.* , 査読有, 16:6(1),62, 2008.

[学会発表] (計 34 件)

1. **宮本 薫:**卵巣:ステロイド・転写調節. 岡山大学研究開発委員会 第4ワーキング主催シンポジウム 分野・領域を超えた内分科学・生殖内分科学の研究ネットワーク. 2010,12,11, 岡山.
2. **水谷哲也, 具 云峰, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 尾崎 司, 南野直人, 宮本 薫:**クロマチン構造変換

- を介した StAR の新たな転写調節メカニズム. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010. 2010,12,7-10, 神戸.
3. 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, 河邊真也, 水谷哲也, 今道力敬, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: PGC-1 $\alpha$  は SF-1 と LRH-1 のコアクチベーターとしてプロジェステロン産生を促進する. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010. 2010,12,7-10, 神戸.
  4. 水谷哲也, 宮本 薫: 卵巣における転写制御とエピジェネティクス. 第 55 回日本生殖医学会. 卵巣機能に関する基礎研究の進歩. 最近の知見から. 2010,11,11-12, 徳島.
  5. 矢澤隆志, 河邊真也, 稲岡齊彦, 岡田令子, 水谷哲也, 今道力敬, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: 卵巣・顆粒膜細胞におけるアンドロジェンの作用. 日本動物学会第 81 回大会. 2010,9,23-25, 東京.
  6. 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, 水谷哲也, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞における転写共役因子・PGC-1 $\alpha$  の機能. 日本動物学会中部支部大会 2010. 2010,7,25, 岐阜.
  7. Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Imamichi, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Regulation of SF-1-mediated transcription of the human steroidogenic acute regulatory protein gene by chromatin-loop formation. The 92th Annual Meeting & Expo 2010,6,19-22, San Diego.
  8. Yazawa, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. The 92th Annual Meeting & Expo 2010,6,19-22, San Diego.
  9. Miyamoto, K., Mizutani, T., Yazawa, T.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. XIV Adrenal Cortex Conference and the Keith Parker Memorial Symposium. Adrenal growth and development. 2010,6,16-18, San Diego.
  10. Yazawa, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: LRH-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. XIV Adrenal Cortex Conference and the Keith Parker Memorial Symposium 2010,6,16-18, San Diego.
  11. 水谷哲也, 矢澤隆志, 具 云峰, 今道力敬, 松村健大, 河邊真也, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 宮本 薫: ヒト StAR 遺伝子の新たな転写調節機構. 日本生化学会北陸支部第 28 回大会. 2010,5,29, 福井.
  12. Miyamoto, K.: Mechanism of stem cell differentiation into steroidogenic lineage. 14th International Congress of Endocrinology. 2010,3,27-30, Kyoto.
  13. Mizutani, T., Yazawa, T., Uesaka, M., Inaoka, Y., Ju, Y., Okada, R., Matsuura, K., Kamiki, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of a novel enhancer region in the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. 14th International Congress of Endocrinology. 2010,3,27-30, Kyoto.
  14. Yazawa, T., Miyamoto, K.: PGC-1alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. 14th International Congress of Endocrinology. 2010,3,27-30, Kyoto.
  15. 水谷哲也, 矢澤隆志, 上坂美紀, 稲岡齊彦, 具 云峰, 岡田令子, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 宮本 薫: ヒト Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) 遺伝子における新たな SF-1/Ad4BP 結合領域の同定. 第 14 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2009,11,28, 東京.
  16. 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, 水谷哲也, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞における転写共役因子 PGC-1 $\alpha$  の機能. 第 14 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2009,11,28, 東京.
  17. 安部由美子, 小松原麻紀, 齋藤恵美, 戸田麻友穂, 平石 光, 田村友宏, 笠原慶充, 定方久延, 勝俣祐介, 峯岸 敬, 水谷哲也, 宮本 薫: 羊膜上皮細胞におけるダイオキシンの matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 発現に対する作用. 第 14 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2009,11,28, 東京.
  18. 矢澤隆志, 宮本 薫: マウス生殖腺における魚類アンドロゲン・11-KT 産生. 第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会 合同大会 (CompBiol2009). 2009,10,22-24, 千里.

19. 水谷哲也, 矢澤隆志, 上坂美紀, 稲岡齊彦, 具 云峰, 岡田令子, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 宮本 薫: Identification of a novel enhancer region in the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. 第 82 回日本生化学会大会. 2009,10,21-24,神戸.
20. 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, 水谷哲也, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: PGC-1 $\alpha$  は卵巣顆粒膜細胞のプロジェステロン合成を亢進させる. 日本動物学会第 80 回大会. 2009,9,17-20,静岡.
21. 安部由美子, 小松原麻紀, 齋藤恵美, 戸田麻友穂, 水流奈己, 丸川りさ, 水谷哲也, 宮本 薫: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin のヒト羊膜上皮細胞における matrix metalloproteinase-9 発現誘導作用. 日本下垂体研究会第 24 回学術集会. 2009,8,27-29,青森.
22. 稲岡齊彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣におけるゴナドトロピンによる P450 oxidoreductase の発現調節とエストロゲン産生への影響. 日本生化学会北陸支部第 27 回大会. 2009,5,23, 福井. 要旨集 26,2009.
23. 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 水谷哲也, 岡田令子, 山崎由希子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫: PGC-1 $\alpha$  のステロイドホルモン合成に対する作用. 日本生化学会北陸支部第 27 回大会. 2009,5,23, 福井. 要旨集 27,2009.
24. 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 水谷哲也, 宮本 薫: 転写共役因子 PGC-1 $\alpha$  の卵巣機能における役割. 第 82 回日本内分泌学会学術総会 公開シンポジウム 4 間脳下垂体性腺系の分子機構の新知識. 2009,4,23-25,前橋. 日本内分泌学会雑誌 85(1), 213, 2009.
25. 稲岡齊彦, 矢澤隆志, 水谷哲也, 上坂美紀, 梅澤明弘, 宮本 薫: ラット卵巣でのゴナドトロピンによる P450 oxidoreductase の発現調節とエストロゲン産生に及ぼす効果. 第 82 回日本内分泌学会学術総会. 2009,4,23-25,前橋. 日本内分泌学会雑誌 85(1), 348, 2009.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 宮本 薫 (MIYAMOTO KAORU)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 30125877
- (2) 研究分担者
- 水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)  
福井大学・医学部・准教授

研究者番号：90322734

矢澤 隆志 (YAZAWA TAKASHI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号：00334813

岡田 令子 (OKADA REIKO)  
福井大学・医学部・特命助教  
研究者番号：50386554  
(H21)

今道 力敬 (IMAMICHI YOSHITAKA)  
福井大学・医学部・特命助教  
研究者番号：00570194  
(H21～H22)

河邊 真也 (KAWABE SHINYA)  
福井大学・医学部・特命助教  
研究者番号：60579415  
(H22)