

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790269

研究課題名（和文）幹細胞を用いたステロイドホルモン産生細胞の作製と分化機構の解明

研究課題名（英文）Differentiation of steroidogenic cells from 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（和文）：過去の研究で、私は間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞を分化誘導することに成功している。本研究では、この方法に基づき、ES細胞からステロイドホルモン産生細胞を分化誘導することに成功した。また、これらの細胞モデルを用いることにより、転写共役因子の PGC-1 $\alpha$  が卵巣顆粒膜細胞のプロジェステロン産生に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In this study, I developed a method for differentiation of ES cells into steroidogenic cells by a tetracycline regulated gene expression system for SF-1 using ROSA-TET system. I also revealed that PGC-1 $\alpha$  is important for the progesterone production in ovarian granulosa cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

(1) 従来、ステロイドホルモン欠損症には、ホルモン補充療法が行われてきたが、頻繁な投与を必要とする上に、副作用も大きいことから、これに代わる治療法が求められている。私たちは、これらの問題を解決するべく成体から採取可能な骨髄間葉系幹細胞を用いたステロイドホルモン産生器官の再生治療法を開発した。

(2) ステロイドホルモンの産生異常や産生細胞そのものの異常による病態に関しては、

多くの症例報告がある。ノックアウトマウスの解析により、これまでに多数の遺伝子がステロイド産生細胞の形成に関わることが示唆されているものの、その詳しい作用機序には不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

## (1) 万能幹細胞をステロイドホルモン産生細胞に分化させる

過去の研究で、私は、間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞を作製する系を確立し、ステロイド産生器官を失

った患者に対する再生医療への可能性は示した。しかしながら、この系は、先天的に遺伝子異常を有するステロイド産生異常症の患者の治療には不十分である。このような患者の治療には、患者本人の体細胞から遺伝子改変が可能な iPS 細胞を作製し、ステロイドホルモン産生細胞へと分化させることが必要である。そこで、本研究では、iPS 細胞とほぼ等価で、より扱いやすい ES 細胞からステロイドホルモン産生細胞を分化させる系を確立する。

## (2) ステロイドホルモン産生細胞分化メカニズムの解明

ES 細胞で確立した細胞分化系ならびに、これまで間葉系幹細胞で確立した系を用いて、DNA マイクロアレイやノックダウンなどの分子生物学的手法により、ステロイドホルモン産生細胞分化の分子メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

(1) ES 細胞に、SF-1 や LRH-1 を導入した場合、増殖が停止して、やがて細胞は死んでしまう。そこで、テトラサイクリン依存性に目的遺伝子を発現させることができるマウス ES 細胞株・EBRTcH3 を用いて、ES 細胞を間葉系幹細胞にした後に、SF-1 を発現させることによりステロイドホルモン産生細胞への分化誘導を行った。

(2) 間葉系幹細胞による分化の違いを分子レベルで調べるために、DNA マイクロアレイを行った。すると、黄体化顆粒膜細胞へと分化する能力を有する臍帯血由来の間葉系幹細胞において、転写共役因子の PGC-1 $\alpha$  が高いレベルで発現していることが分かった。そこで、PGC-1 $\alpha$  が顆粒膜細胞におけるステロイドホルモン産生に関わるかを、過剰発現やノックダウンの系を用いることにより調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) ES 細胞からのステロイドホルモン産生細胞の誘導

コラーゲンコートしたシャーレ上で、ES 細胞を培養した後に、レチノイン酸を添加すると ES 細胞は間葉系幹細胞に分化するが、この状態でテトラサイクリンを除去して SF-1 を発現させたところ、細胞は生存して、副腎皮質束状層様のグルココルチコイド産生細胞へと分化した (図 1)。この細胞は、ACTH レセプターを発現しており、ACTH に反応して、ステロイドホルモンの産生が上昇した。これらの成果は、万能細胞から自律的にステロイ

ドホルモン産生する細胞を分化させた世界で初めての報告である (Yazawa et al., 2011)。

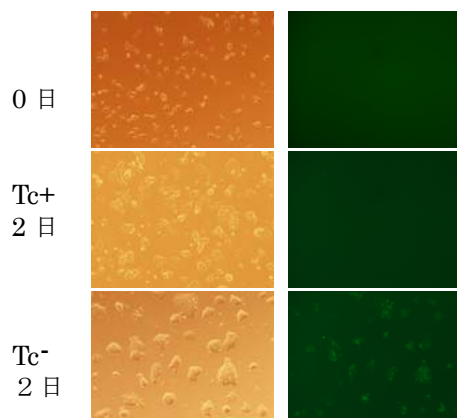


図 1 マウス ES 細胞株・EBRTcH3 におけるテトラサイクリン除去による SF-1 タンパク質の誘導

#### (2) 卵巣内における PGC-1 $\alpha$ の局在

まずは、PGC-1 $\alpha$  の卵巣における発現を、RT-PCR と免疫組織化学法により調べた。すると、PGC-1 $\alpha$  は、卵巣で比較的高いレベルで発現しており、間葉系幹細胞における発現と一致して、顆粒膜細胞に局在していた。PGC-1 $\alpha$  は、顆粒膜細胞において、私たちが間葉系幹細胞を分化させるために用いた SF-1 (顆粒膜細胞と莢膜細胞) や LRH-1 (顆粒膜細胞) と共局在していた (図 2)。

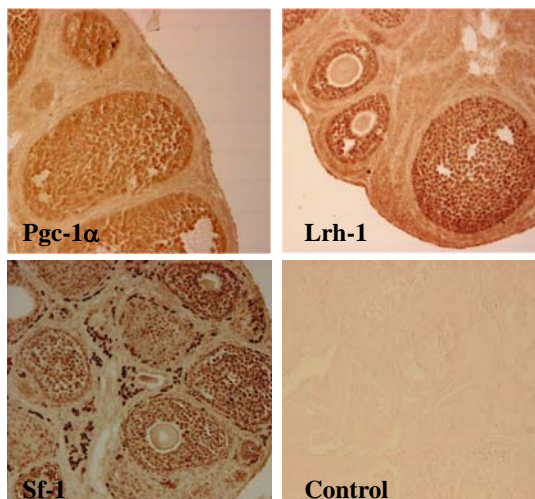


図 2 免疫組織化学法による卵巣での各タンパク質の検出

#### (3) PGC-1 $\alpha$ は、NR5Aファミリーの転写共役因子として働く

(2)の結果は、PGC-1 $\alpha$  がこれらの転写因子の共役因子として機能する可能性が強く示唆される。そこで、mammalian one hybrid を

使ったレポーターアッセイを行ったところ、PGC-1 $\alpha$ は、導入するプラスミド量に依存して、SF-1とLRH-1の転写活性を上げることが分かった。PGC-1 $\alpha$ のコアクチベーターとしての能力は、既知のSF-1やLRH-1のコアクチベーター(SRC-1, p300)に比べて、著しく強いものであった。この活性は、SF-1やLRH-1の標的であるStAR、CYP11A1、HSD3B2やInhibin- $\alpha$ 遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイにおいても観察された。よって、PGC-1 $\alpha$ はNR5Aファミリー(SF-1とLRH-1)の強力なコアクチベーターとして働くことが分かった。

#### (4) 顆粒膜細胞における PGC-1 $\alpha$ の過剰発現とノックダウン

レポーターアッセイの結果が、細胞内の遺伝子上で実際に起こるかどうかを調べるために、ヒト顆粒膜細胞腫由来のKGN細胞に、アデノウイルスを用いてPGC-1 $\alpha$ を過剰発現させた。すると、レポーターアッセイの結果を支持するように、PGC-1 $\alpha$ により、StAR、CYP11A1、HSD3B2 mRNAの発現が誘導され、細胞はプロジェステロンを産生するようになった。また、PGC-1 $\alpha$ の導入は、SF-1とLRH-1の発現も誘導した。よって、PGC-1 $\alpha$ は、単にSF-1やLRH-1のコアクチベーターとして働くだけではなく、これらの転写因子そのものを誘導することにより、プロジェステロン産生を誘導するものと考えられる。また、このKGN細胞における結果が生理的であることを、未成熟ラット由来の初代培養・顆粒膜細胞においてPGC-1 $\alpha$ をノックダウンすることにより証明した。

#### (5) DAX-1 による PGC-1 $\alpha$ の機能阻害

核内レセプターのリプレッサーであるDAX-1は、ゴナドトロピン刺激前の顆粒膜細胞において、プロジェステロン合成を阻害している。初代培養の顆粒膜細胞において、DAX-1は、FSH刺激により急激に発現が低下し、ステロイドホルモン産生酵素を含む、SF-1やLRH-1の標的遺伝子の転写が誘導されることが私たちの過去の研究で分かっている。DAX-1とPGC-1 $\alpha$ の関係を調べるために、レポーターアッセイを行ったところ、DAX-1は、PGC-1 $\alpha$ のSF-1やLRH-1に対するコアクチベーターとしての能力をほぼ完全に抑制した。よって、DAX-1は、ゴナドトロピン非存在下では、PGC-1 $\alpha$ の活性を抑制することにより、プロジェステロン産生を抑制するものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9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-1 $\alpha$  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.

#### 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. Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., **Yazawa, T.**, Hirai, T., Kamei, Y., Kitano, T.: High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol level. *Mol. Reprod. Dev.*, 査読有, 77(8), 679-686, 2010.
4. Yamaguchi, T., Yoshinaga, N., **Yazawa, T.**, Gen, K., Kitano, T.: Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinol.*, 査読有, 151(8), 3900-3908, 2010.
5. **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.

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.

[学会発表] (計 22 件)

1. **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.
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**: 卵巣ステロイドホルモン合成に関連する遺伝子発現調節機構の新知見. 第 15 回日本生殖内分泌学会学術集会. **卵巣機能調節における新知見**. 2010,11,20-21, 千里.
4. **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.
5. **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.
6. 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.
7. **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.
8. **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.
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. 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.
11. 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. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. 2010,3,27-30, Kyoto.
12. **Yazawa, T.**, Miyamoto, K.: PGC-1alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. 2010,3,27-30, Kyoto.
13. 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.

14. **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.
15. **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.
16. 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.
17. **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.
18. **矢澤隆志**: 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 27 回内分泌代謝学サマーセミナー. シンポジウム 幹細胞研究の最前線. 2009,7,16-17, 福井. 抄録集 30,2009.
19. 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.
20. **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.
21. **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.
22. 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.

## 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