

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791053

研究課題名（和文）

ヒト胚性幹細胞・誘導多能性幹細胞のステロイド産生細胞への分化機構の解明

研究課題名（英文）

Differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells into steroid-producing cells.

研究代表者

園山 拓洋 (SONOYAMA TAKUHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70582112

研究成果の概要（和文）：

ヒト胚性幹(ES)細胞・ヒト誘導多能性幹(iPS)細胞をステロイド産生細胞に分化誘導する方法の確立を目指して研究を行った。ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞を Wnt シグナルの活性化を介してまず中胚葉系の細胞に分化させ、そののちにステロイド産生細胞分化の主要な制御因子である steroidogenic factor-1(SF-1)を遺伝子導入することにより、コルチゾールを産生し副腎皮質に近いステロイド合成酵素発現プロファイルを有する細胞に分化誘導することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of our present study was to establish a method for inducing differentiation of human ES/iPS cells into steroid-producing cells. We showed that human ES/iPS cells can be induced to differentiate into mesodermal lineage cells by Wnt signaling pathway activation and that subsequent introduction of SF-1 can induce the mesodermal lineage cells to differentiate into steroid-producing cells with the characteristics of adrenal cortical cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3200000	960000	4160000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ヒト胚性幹細胞、ヒト誘導多能性幹細胞、副腎、ステロイドホルモン、再生

1. 研究開始当初の背景

副腎・性腺などのステロイド産生臓器の機能不全症においては、内服および注射によるステロイドホルモンの補充療法が確立しているが、多くの場合一生の補充を必要とし、副作用も皆無ではない。また、副腎機能低下症の患者の場合、補充不足による副腎不全は生命にかかわることもある。これらの問題を解

決するためには新たな治療法の開発が求められる。副腎・性腺の領域では、現在までのところ再生医療として実際の臨床の場で実用化されているものは皆無である。しかしながら、近年これらのステロイド産生臓器の発生・分化過程は急速に解明されつつあり、遺伝子治療の試みや再生研究が少しずつ報告されてきている。

このような状況の中で、胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell: ES 細胞) や誘導多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞) を用いた、副腎・性腺再生療法への期待が高まっている。特に内分泌細胞は、刺激に応答してホルモンを産生することができれば複雑な組織構造を必要としないこと、必ずしも大量の細胞を必要としないことから、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の実用化も期待し得る分野である。しかしながら、本研究開始時点において、マウス ES 細胞やマウス、及びヒト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との報告は存在していたが、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞を用いてステロイド産生細胞を誘導したという報告は存在しなかった。

2. 研究の目的

副腎皮質・性腺は中胚葉由来の副腎性腺原基から分化することが知られている。我々の研究室では、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞から、同じく中胚葉由来である血管、脂肪への分化誘導に成功していたが、本研究では、これらの技術を応用することにより、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞を用いて血管や脂肪と同様に中胚葉由来である副腎・性腺を含めたステロイド産生細胞の分化誘導を行い、ステロイドホルモン補充療法に代わる新たな副腎・性腺機能不全症の治療方法を提唱することを主眼として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞由来の胚様体 (embryoid body, EB) は、ヒトの初期発生過程を *in vitro* で模倣したものであり、3 胚葉の全てに分化しうる。申請者らは、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞から、EB 形成を介して脂

肪細胞への分化誘導に成功している。この EB 形成を介して、ステロイド産生細胞への分化誘導を試みた。

(2) また、もうひとつの方法として、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞より F1k1・PDGF-R α などの中胚葉系マーカー陽性細胞を誘導・分離し、そこからステロイド産生細胞の分化誘導を検討した。内皮細胞増殖因子 (VEGF) の受容体の一つである F1k1 は中胚葉のマーカーの一つと考えられており、実際申請者らの研究室ではヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞から分化誘導した F1k1 陽性細胞から、中胚葉系由来である血管を誘導することができることを報告してきた。これらの中胚葉系細胞に、ステロイド産生細胞分化の主要な制御因子である SF-1 を遺伝子導入することにより、副腎・性腺などのステロイド産生細胞の分化誘導を検討した。

(3) 2 種類のヒト ES 細胞ライン (H9, KhES1) と 1 種類のヒト iPS 細胞ライン (B7) を用いて検討を行った。

ステロイド産生の評価は、培養液中のコルチゾール、エストロゲン、テストステロンを含むステロイドホルモンの濃度測定、RT-PCR によるステロイド合成酵素の評価、および上記ステロイド合成酵素の免疫染色によって行った。

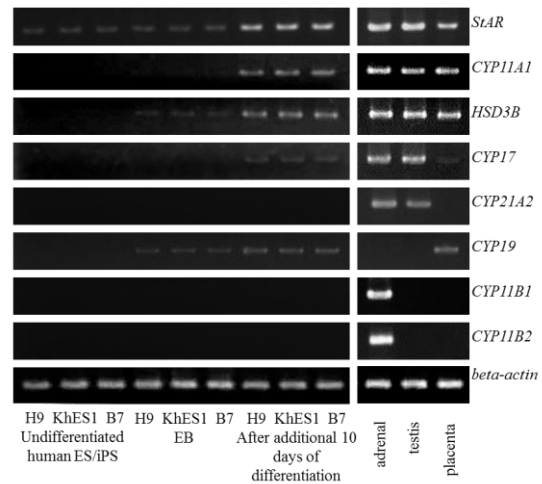
4. 研究成果

(1) ヒト ES 細胞・iPS 細胞を浮遊培養して EB 形成を行い、その後に EB を接着培養で 10 日間培養したところ、一部のステロイド合成酵素 (CYP11A1、HSD3B) の遺伝子発現を認めた (図 1)。また、培養液中にはプロゲステロンを検出することができた。しかし、培養液中には同時にヒト胎盤性ゴナドトロピン (hCG) も検出され、得られた細胞は胎盤の trophoblast に近い細胞であると考えられた。

(2) 次にヒト ES 細胞・iPS 細胞を中胚葉系細胞に分化誘導した後に SF-1 を導入する方法を試みた。ヒト ES 細胞・iPS 細胞を、GSK3β 阻害薬の存在下に分化誘導し、flow cytometry を用いて未分化な細胞を取り除いたところ、FLK1 及び PDGFRα を発現する中胚葉系の細胞が得られた(図 2)。この細胞には、中間中胚葉のマーカである *Osr-1* の発現も認めた。この細胞に、プラスミドベクターを用いて SF-1 を導入し、更に 1 週間分化誘導したところ、CYP11A1、HSD3B のみならず、CYP17A1、CYP21A2、CYP11B1 などのステロイド合成酵素の発現が認められ(図 3)、免疫染色で多くの細胞にステロイド合成酵素の一つである 3β-HSD の発現を認めた(図 4)。培養液中にはプロゲステロンのみならず、コルチコステロン、コルチゾールが検出された(図 5)。さらに、SF-1 導入後の培養過程において 8-Bromo-cAMP を添加したところ、ステロイド合成酵素の遺伝子発現は上昇を認めた(図 3)。一方、培養液中には hCG は検出されず、得られたステロイド産生細胞は trophoblast とは異なる細胞と考えられ、ステロイド合成酵素の発現プロファイルや培養液中にコルチゾールが検出されることから、副腎皮質細胞に近い細胞であると考えられた。

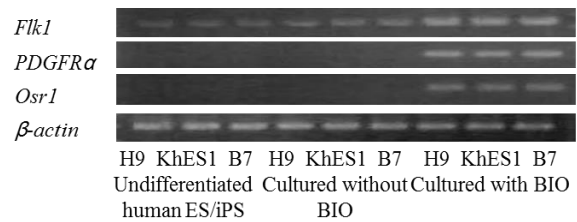
本研究成果は、ヒト ES・iPS 細胞からのステロイド産生細胞への分化誘導法を初めて確立したものである。本研究成果をさらに発展させることにより、将来的に副腎不全などの疾患の細胞治療に応用可能であると考えられるのみならず、副腎を含めたステロイド産生臓器の分化過程の解明にも応用可能であると考えられる。

(図 1) EB 形成法で誘導した細胞の RT-PCR によるステロイド合成酵素の発現の評価
StAR、CYP11A1、HSD3B、CYP17A1 の発現を認めた



(図 2) GSK3β 阻害薬添加にて分化誘導後のヒト ES 細胞、iPS 細胞の RT-PCR による中胚葉マーカーの発現の評価

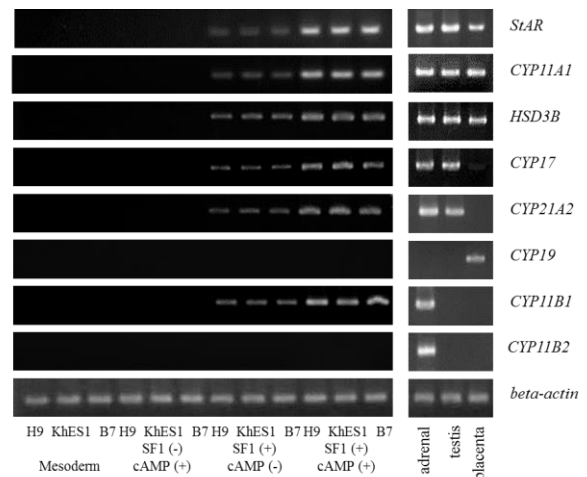
FLK1、PDGFRα、OSR-1 の発現を認めた



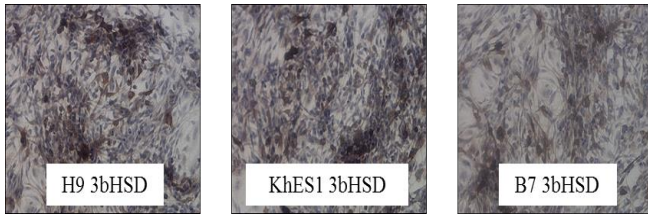
(図 3) 中胚葉系に誘導後 SF-1 を遺伝子導入して培養した細胞の RT-PCR によるステロイド合成酵素の発現の評価

StAR、CYP11A1、HSD3B、CYP17A1、CYP21A2、CYP11B1 の発現を認めた。

8-Bromo-cAMP 添加によりこれらの遺伝子の発現はさらに上昇を認めた



(図4) 抗ヒト3β-HSD抗体による免疫染色
中胚葉系細胞に分化誘導後 SF-1 を遺伝子導入した細胞で3β-HSDの染色を認めた。



(図5) 培養上清中のステロイドホルモン測定

中胚葉系細胞に分化誘導後 SF-1 を遺伝子導入した細胞の培養上清にプロゲステロン、コルチコステロン、コルチゾールを検出した。

	Undifferentiated			Differentiated		
	H9	KhES1	B7	H9	KhES1	B7
Progesterone (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	1730 ± 460	3080 ± 1180	2480 ± 590
Corticosterone (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	460 ± 57	605 ± 55	661 ± 59
Cortisol (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	10510 ± 1530	10030 ± 1650	8540 ± 820
Aldosterone (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DHEA (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Estradiol (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
hCG (mIU/mL)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

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2件)

1) Sonoyama T, Sone M, Honda K, Taura D, Kojima K, Inuzuka M, Kanamoto N, Tamura N, Nakao K. Differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells into steroid-producing cells. *Endocrinology*. 153:4336-45, 2012. (査読有)

DOI 10.1210/en.2012-1060

2) Inuzuka M, Tamura N, Sone M, Taura D,

Sonoyama T, Honda K, Kojima K, Fukuda Y, Ueda Y, Yamashita Y, Kondo E, Yamada G, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Yasoda A, Arai H, Mikami Y, Sasano H, Nakao K. A case of myelolipoma with bilateral adrenal hyperaldosteronism cured after unilateral adrenalectomy. *Intern Med*. 51:479-85, 2012.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/51/5/51_5_479/_article

[学会発表] (計6件)

1) 園山拓洋、曾根正勝、本田恭子、田浦大輔、小嶋勝利、犬塚恵、金本巨哲、田村尚久、中尾一和

ヒト ES 細胞/iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導法の開発

第30回 内分泌代謝学サマーセミナー

2012.7.13 (渋川市)

2) 園山拓洋、曾根正勝、本田恭子、田浦大輔、小嶋勝利、犬塚恵、金本巨哲、田村尚久、中尾一和

ヒト ES 細胞/iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導法の開発

第11回 日本再生医療学会学術総会

2012.6.12 (横浜市)

3) 田浦大輔、曾根正勝、小嶋勝利、長船健二、園山拓洋、本田恭子、福田賢英、錦見俊雄、中尾一和

ヒト ES 細胞からの血管細胞分化過程における各種血管

ホルモンの発現、作用機序の検討

第85回 日本内分泌学会学術総会

2012.4.21 (名古屋市)

4) 園山拓洋、曾根正勝、本田恭子、田浦大輔、小嶋勝利、犬塚恵、金本巨哲、田村尚久、中尾一和

ヒト胚性幹細胞、ヒト誘導多能性幹細胞から

のステロイド産生細胞の分化誘導

第 49 回 日本臨床分子医学会学術総会

2012. 4. 14 (京都市)

5) 園山拓洋、曾根正勝、本田恭子、田浦大輔、
小嶋勝利、犬塚 恵、金本巨哲、田村尚久、
中尾一和

ヒト ES 細胞、iPS 細胞を用いた副腎皮質の再
生の試み

第 109 回 日本内科学会総会

2012. 4. 13 (京都市)

6) 田浦大輔、小嶋勝利、曾根正勝、長船健二、
錦見俊雄、園山拓洋、本田恭子、本間康一郎、
荒井宏司、田村尚久、中尾一和

ヒト ES/iPS 細胞からの血管細胞分化誘導シ
ステムの血管生理機構解明への応用

第 84 回日本内分泌学会学術総会

2011. 4. 23 (神戸市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園山 拓洋 (SONOYAMA TAKUHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70582112

(2) 研究協力者

曾根 正勝 (SONE MASAKATSU)

京都大学・医学研究科・講師

田浦 大輔 (TAURA DAISUKE)

日本学術振興会 特別研究員 (PD)

本田 恭子 (HONDA KYOKO)

京都大学・医学研究科・大学院生

小嶋 勝利 (KOJIMA KATSUTOSHI)

京都大学・医学研究科・大学院生