

S. Ijiri, F. Sakai, M. Matsuda, Y. Shibata, K. Okubo, K. Morohashi, and Y. Nagahama. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4BP/SF-1. *Mol. Endocrinol.* in press, 2007

7, WQ. Fan, T. Yanase, H. Morinaga, S. Gondo, T. Okabe, M. Nomura, T. Komatsu, K. Morohashi, T. B. Hayes, R. Takayanagi and H. Nawata. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1-dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspective*, in press, 2007

学会発表

(招待講演)

1, K Morohashi, Y Ishimaru, M Zubair, S Oka, K Miyabayashi, M Kusaka, Y Shima, T Baba, H Ogawa, H Yoshioka, Y Katho-Fukui, Genetic Program of Gonad Differentiation. The 52nd NIBB conference, Reproductive Strategies, Okazaki, Japan, Jan 20-23, 2006

2, K Morohashi, M Kusaka, K Miyabayashi, Y Ishimaru, Z Mohamad, H Ogawa, H Yoshioka, Y Katoh-Fukui. Transcriptional Regulation of Genes implicated in Gonad Development. Fourth International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, Hawaii, April 10-14,

2006.

3, Komatsu T, Tsuchiya M, Ogawa H, Morohashi, K. Regulation of orphan nuclear receptor, Ad4BP/SF-1, by SUMO. 17th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Austria, May 31-June 3.

4, K. Morohashi, Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development. 12th Adrenal Cortex and 5th Molecular Steroidogenesis Conference, Boston, June 20-23.

5, K. Morohashi, Function of AhR in the Ovary. International Symposium on the Environmental Risks of Chemicals, Nov. 12-14, 2006, Kushiro.

6, T. Komatsu, M. Tsuchiya, H. Ogawa, and K. Morohashi, Regulation of Ad4BP/SF-1 by SUMO. The Fourth NIBB-EMBL Symposium, Biology of Protein Conjugation - Structure and Function Dec. 3-5, Okazaki.

7, K. Morohashi, Y. Ishimaru, M. Zubair, S. Oka, K. Miyabayashi, M. Kusaka, Y. Shima, T. Baba, H. Ogawa, H. Yoshioka, Y. Katoh-Fukui. Genetic program of gonad differentiation. 16th Lake Shirakaba Conference, Dec. 6-7, Grenada.

(一般演題)

1, T Komatsu, H Ogawa, K. Morohashi. Characterization of a

factor interacting with sumoylated Ad4BP/SF-1. Keystone Symposium, Nuclear Receptors; Orphan Brothers, Steroid Sisters, Banff, Alberta, March 18-23, 2006.

2, M Zubair, S Ishihara, S Oka, K Okumura, K. Morohashi. Two step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development. Keystone Symposium, Nuclear Receptors; Orphan Brothers, Steroid Sisters, Banff, Alberta, March 18-23, 2006.

3, Y Katoh-Fukui, A Owaki, Y Kanai, A Schedl, K. Morohashi. Dual function of a polycomb component M33, in gonadal sex determination and development. The Fourth International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, April 10-14

4, T Baba, K. Morohashi. Functional analysis of non-coding RNAs encoded by regions around the transcriptional initiation sites of Ad4BP/SF-1. The Fourth International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, April 10-14

5, Y Ishimaru, K Morohashi, H Yoshioka. Mechanism of asymmetric ovarian development in the chick. The Fourth International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, April 10-14

6, Y Shima, M Zubair, S Ishihara, S Oka, K. Morohashi. VMH- and pituitary gonadotrope-specific enhancer of Ad4BP/SF-1 gene. The Fourth International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, April 10-14

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脂肪組織由来間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞の創出

柳瀬 敏彦、権藤 重喜、田中 智子、高柳 涼一、名和田 新*

九州大学大学院医学研究院病態制御内科

*九州大学大学院医学研究院

【研究要旨】

SF-1/Ad4BP はステロイド合成及び副腎・性腺分化に必須の核内レセプターである。我々は、SF-1/Ad4BP の強制発現により、マウス初代培養骨髄由来間葉系幹細胞(BMC)が ACTH 依存性に各種ステロイドを産生する細胞に形質転換されることを既に報告した。一方、脂肪組織にも間葉系幹細胞が存在することが知られている。そこで今回、我々は、マウス初代培養脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)のステロイド産生能を検証し、そのプロフィールを同一個体由来 BMC のそれと比較検討した。ASC も BMC 同様、ステロイド産生細胞へ形質転換されたが、SF-1/Ad4BP 発現の強弱・レチノイン酸の有無の影響により、BMC と ASC では全く異なったステロイド産生プロフィールを示した。このことから、間葉系幹細胞のステロイド産生細胞への分化形質はかなり早期にコミットされている可能性が示唆され、間葉系幹細胞の調整には用途に応じた組織選択の必要性が示唆された。

A. 研究目的

副腎不全や性腺機能不全に対しては、ステロイドホルモン補充療法が確立されており、患者さん達に多くの利益をもたらしている。しかし、このような治療は、特に副腎不全の場合、一生涯続けなければならず、また、感染・創傷等に起因した急性副腎不全に対応することは、患者さんにとってしばしば困難を伴う。このため、我々は再生副腎細胞移植といった新たな治療法開発を目指し、副腎細胞の再生を試みている。SF-1/Ad4BPは、殆どのステロイド産生組織に特異的な転写因子として同定され、核内レセプタースー

パーファミリーに属する (1, 2)。これまでに、我々は、SF-1/Ad4BPの強制発現により、マウス初代培養骨髄由来間葉系幹細胞(BMC)がACTH依存性に各種ステロイドを産生する細胞に形質転換されることを明らかにした(3)。しかし、この細胞は副腎系・性腺系両方のステロイドを同時に産生していることから、臨床応用のためには、副腎・性腺特異的ステロイド産生細胞へと更に分化させる必要がある。一方、脂肪組織にも間葉系幹細胞が存在することが知られている(4)。また、レチノイン酸は細胞分化に多大な影響を持つ(5)と共に、ステロイド産生細胞のステロ

イド分泌を刺激する(6)。これらに基づき、我々は、SF-1/Ad4BPの強制発現によるマウス初代培養脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)のステロイド産生能を検証し、そのプロフィールをBMCのそれと比較検討すると共に、レチノイン酸の影響についても検討した。

B. 研究方法

4月齢雄B6マウスより大腿骨及び内臓脂肪を採取し、既報(3)に従い、BMCを調整した。内臓脂肪はコラゲナーゼ処理し、遠沈後のペレットをBMCと同様に培養して、ASCを調整した。BMC、ASC共に付着細胞のみを33°C、5% CO₂の条件下、200-300日間培養し、アデノウイルスに感染させた。

フローサイトメトリー、培養液中に細胞より分泌されたステロイドの測定、定量的リアルタイムPCRは既報(3)に従い行った。

(倫理面への配慮)

in vitro研究であり、倫理的問題はない。

C. 結果

BMC・ASCの細胞表面マーカーは、共にCD11b、CD34、CD44、CD45陰性、c-kit陽性、Sca1強陽性であった。

SF-1/Ad4BPの強制発現により、ASCもBMCと同様にステロイド産生細胞に形質転換された。しかし、SF-1/Ad4BPの発現が強いほどBMCは性腺ステロイド産生傾向が強まるのに対し、ASCは副腎ステロイド産生傾向が強まった(図1)が、その一因としてP450c21の発現強度の違いが考え

られた(図2)。また、レチノイン酸添加によりBMCは更に性腺ステロイド産生傾向が強まるのに対し、ASCは更に副腎ステロイド産生傾向が強まり(図3)、その一因としてASCにおける17β-HSDの発現抑制が考えられた(図4)。なお、いずれの実験においても、内因性SF-1/Ad4BPの発現は認められなかった。

D. 考察

細胞表面マーカー解析では、単球・マクロファージのマーカーであるCD11b陰性、造血幹細胞のマーカーであるCD45陰性、未分化マーカーであるc-kit、Sca-1が陽性であった。マウス間葉系幹細胞のマーカーは完全には明らかにされておらず議論の余地もあるが(7)、これらの結果より、BMC・ASC共に間葉系幹細胞に属すると考えられる。B6マウスのBMCとASCの細胞表面マーカーの鑑別にCD34、CD44の有用性が示唆されているが、BMCとASCの採取個体が異なり、かつそれぞれの培養培地の条件にも差異が報告されている(8)。同一個体からBMCとASCを採取した本実験では両マーカーは共に発現を認めなかったことから、BMCとASCの鑑別にCD34とCD44は必ずしも重要なものではないのかもしれない。

本実験ではBMCとASC共にマーカー的には極めて類似した間葉系細胞でありながら、MSCはSF-1/Ad4BPの発現強度依存性に性腺ステロイド産生傾向が強まる一方、ASCは副腎ステロイド産生傾向が強まった。マウスではSF-1/Ad4BP発現が低いと性腺は形成されるが副腎は形成されないことが示唆されている(9)。性腺の再生に

はMSCが、副腎の再生にはASCが適しているのかもしれない。一方、組織採取の容易さやより多くの細胞数が採取可能という観点からは、ステロイド産生細胞再生のソースとしてはASCの方がより適しているのかもしれない。

レチノイン酸暴露により、MSC は性腺ステロイド産生傾向が強まる一方、ASC は副腎ステロイド産生傾向が強まった。レチノイン酸は細胞分化に影響を持つ(5)と同時に、ステロイド産生細胞のステロイド分泌を刺激する(6)が、ステロイド産生細胞の副腎系もしくは性腺系への分化方向性への影響は明らかでない。レチノイン酸はヒト乳癌細胞に於いて17 β -HSD type 1 を発現増強する(10)。MSC に於いて、レチノイン酸投与により、精巢特異的な17 β -HSD type3(11)が発現増強する一方、ASC に於いては発現抑制され、レチノイン酸がステロイド産生細胞の副腎系もしくは性腺系への分化にも影響し得ることが示唆された。その背景を探ることは、副腎・性腺分化を明らかにする一助となるかもしれない。

E. 結論

BMCとASCでは全く異なったステロイド産生プロフィールを示したことから、間葉系幹細胞のステロイド産生細胞への分化形質はかなり早期にコミットされている可能性が示唆され、間葉系幹細胞の調整には用途に応じた組織選択の必要性が示唆された。

F. 関連論文

(1) Omura T, and Morohaxhi K. :Gene

regulation of steroidogenesis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 63:19-25, 1995

(2) Parker K.L., and Schimmer B.P. : Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. Endocr. Rev. 18:61-377, 1997

(3) Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, and Nawata H. :SF-1/Ad4BP transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. Genes to Cells 9:1239-1247, 2004

(4) Zuk P. A., Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz A.J., Benhaim P, Lorenz H.P. and Hedrick M.H. : Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7:211-28, 2001

(5) Strickland S. and Mahdavi V. : The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. Cell. 15:393-403, 1978

(6) Bagavandoss P. and Midgley A. R. Jr. Lack of difference between retinoic acid and netinol in stimulating progesterone production by luteinizing granulose cells in vitro. Endocrinology. 121:420-8, 1987

(7) Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418:41-49, 2002

(8) Nakagami H, Morishita R, Maeda K,

Kikuchi Y, Ogihara T and Kaneda Y. ; Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J. Atheroscler. Thromb.* 13:77-81, 2006

(9) Fatchiyah, Zubair M, Shima Y, Oka S, Ishihara S, Fukui-Katoh Y, Morohashi K. : Differential gene dosage effect of Ad4BP/SF1 on target tissue development. *BBRC*, 341:1036-45, 2006

(10) Reed M. J., Reed D, Duncan L. J., Parker M. G. : Expression and regulation of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 52:2236-42, 1992

(11) Wayne M. G., Daphne L. D., Ling W, Karen D. B., Sushma P, Berenice B, Keith O. E., Jean D. W., David W. R. and Stefan A. : Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nature Genetics*, 7:34-9, 1994

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fan S, Goto K, Chen G, Morinaga H, Nomura M, Okabe T, Nawata H, Yanase T : Identification of the functional domains of ANT-1, a novel coactivator of the androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 341:192-201, 2006

(2) Liu W, Liu M, Fan W, Nawata H, Yanase T ; The Gly 146Ala variation in human SF-1 gene: Its association with insulin resistance and type 2

diabetes in Chinese. *Diabetes Research Clinical Practice* 73: 322-328, 2006

(3) Yanase T, Muta K, Nawata H : Serum concentrations of dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) in oldest old Japanese women correlate with cognitive activity rather than activities of daily living *Geriatrics and Gerontology International* 6: 194-198, 2006

(4) Yanase T, Nasu S, Mukuta Y, Shimizu Y, Nishihara T, Okabe T, Nomura M, Inoguchi T, Nawata H: Evaluation of a New Carotid Intimal Plus Medial Thickness (IMT) Measurement by B-mode Ultrasonography Using an Innovative Measurement Software, Intimascope. *Am J Hypertension* 19:1206-12, 2006

(5) Tanaka T, Okabe T, Gondo S, Fukuda M, Yamamoto M, Umemura T, Tani K, Nomura M, Goto K, Yanase T, Nawata H : Modification of glucocorticoid-sensitivity by MAP kinase signaling pathways in glucocorticoid-induced T-cell apoptosis. *Experimental Hematology* 34 : 1542-52, 2006

(6) Yamada Y, Sekihara H, Omura M, Yanase T, Takayanagi R, Mune T, Yasuda K, Ishizuka T, Ueshiba H, Miyachi Y, Iwasaki T, Nakajima A, Nawata H. Changes in Serum Sex Hormone Profiles after Short-term

Low-dose Administration of Dehydroepiandrosterone (DHEA) to Young and Elderly Persons. *Endocr J.* 2007 in press

- (7) Fan W, Yanase T, Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku, H, Fukamizu A, Kato S, Takayanagi R, Nawata H: IGF1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. *J Biol Chem* 2007 in press
- (8) Saito Y, Yamada N, Shirai K, Sasaki J, Ebihara Y, Yanase T, Fox JC.: Effect of rosuvastatin 5-20mg on triglycerides and other lipid parameters in Japanese patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2007 in press

2. 学会発表

- (1) 范 呉強、柳瀬 敏彦：シンポジウム7「ステロイドホルモンと癌」内分泌攪乱物質によるホルモン依存性癌の発症機構；アトラジン／シマジンによる Sf-1 依存性のアロマターゼ転写活性誘導作用 第79回日本内分泌学会(神戸) 2006年5月19日-21日
- (2) 野村 政壽、陳 光椿、森永 秀孝、大江 賢治、岡部 泰二郎、名和田 新、柳瀬 敏彦：シンポジウム7「核内受容体とコアクチベーター・コリプレッサー」S7-2 アンドロゲン受容体新規コリプレッサー：Fox H1 の機能解析 第79回日本内分泌学会学術総会(神戸) 2006年5月19日-21日
- (3) 柳瀬 敏彦：シンポジウム「核内

受容体と代謝・機能調節」アンドロゲン受容体とメタボリックシンドローム第38回日本動脈硬化学会(東京) 2006年9月13-16日

- (4) 權藤重喜、田中智子、岡部泰二郎、森永秀孝、大江賢治、野村政壽、名和田新、柳瀬 敏彦：SF-1/Ad4BP はヒト長期培養骨髄細胞及びマウス長期培養骨髄細胞をステロイドホルモン産生細胞に変化させる。第79回日本内分泌学会(神戸) 2006年5月19日-21日
- (5) Yanase T：Symposium 17 “Steroids and Metabolic Syndrome”
Androgens and Metabolic Syndrome: Lessons From Androgen Receptor (ARKO) Mice
Internatinal Congress on Hromonal Steroids and Hormones and Cancer (Athens, Greece, 2006. 9.16)

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

図1 SF-1/Ad4BP発現強度とステロイド産生傾向

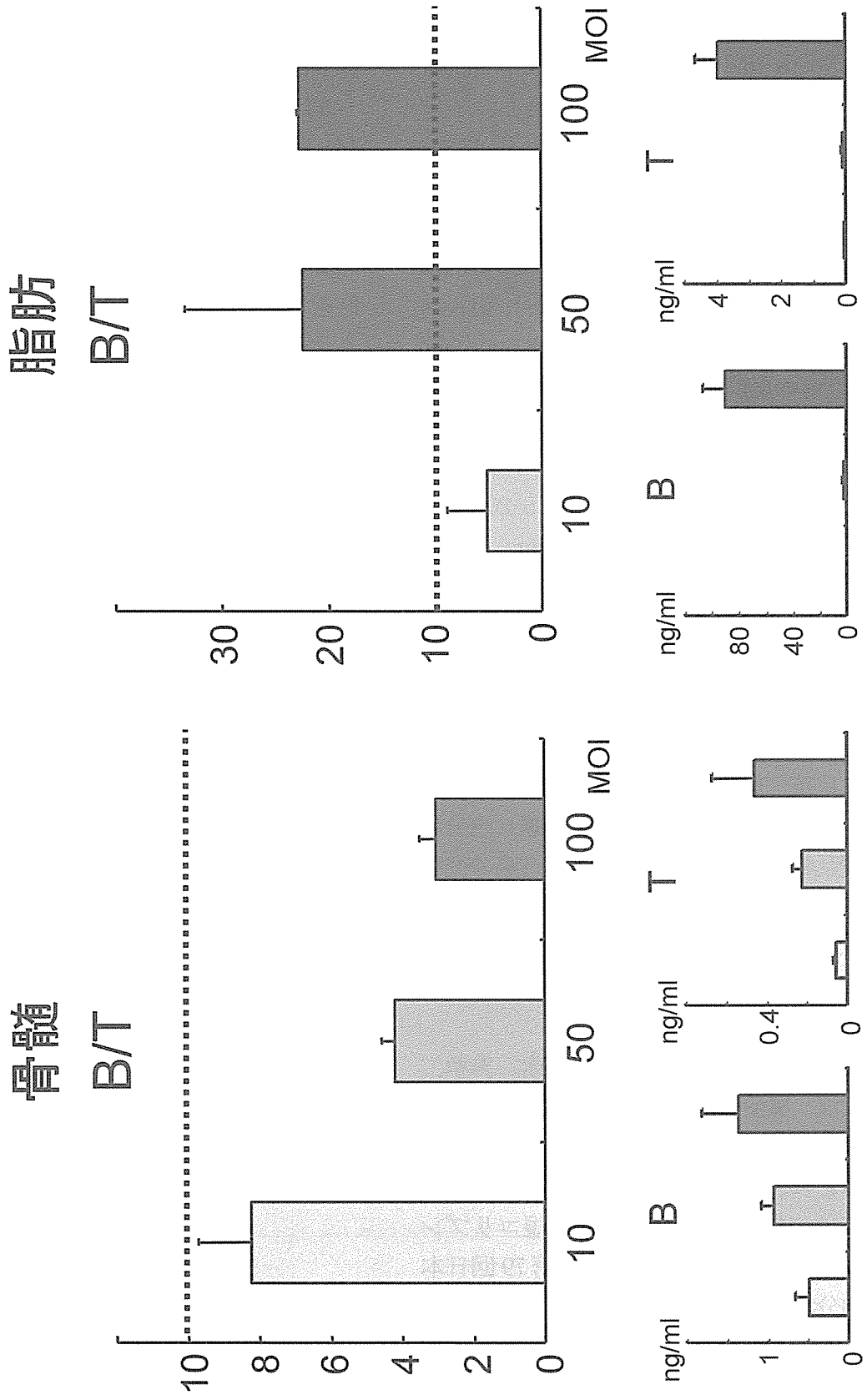
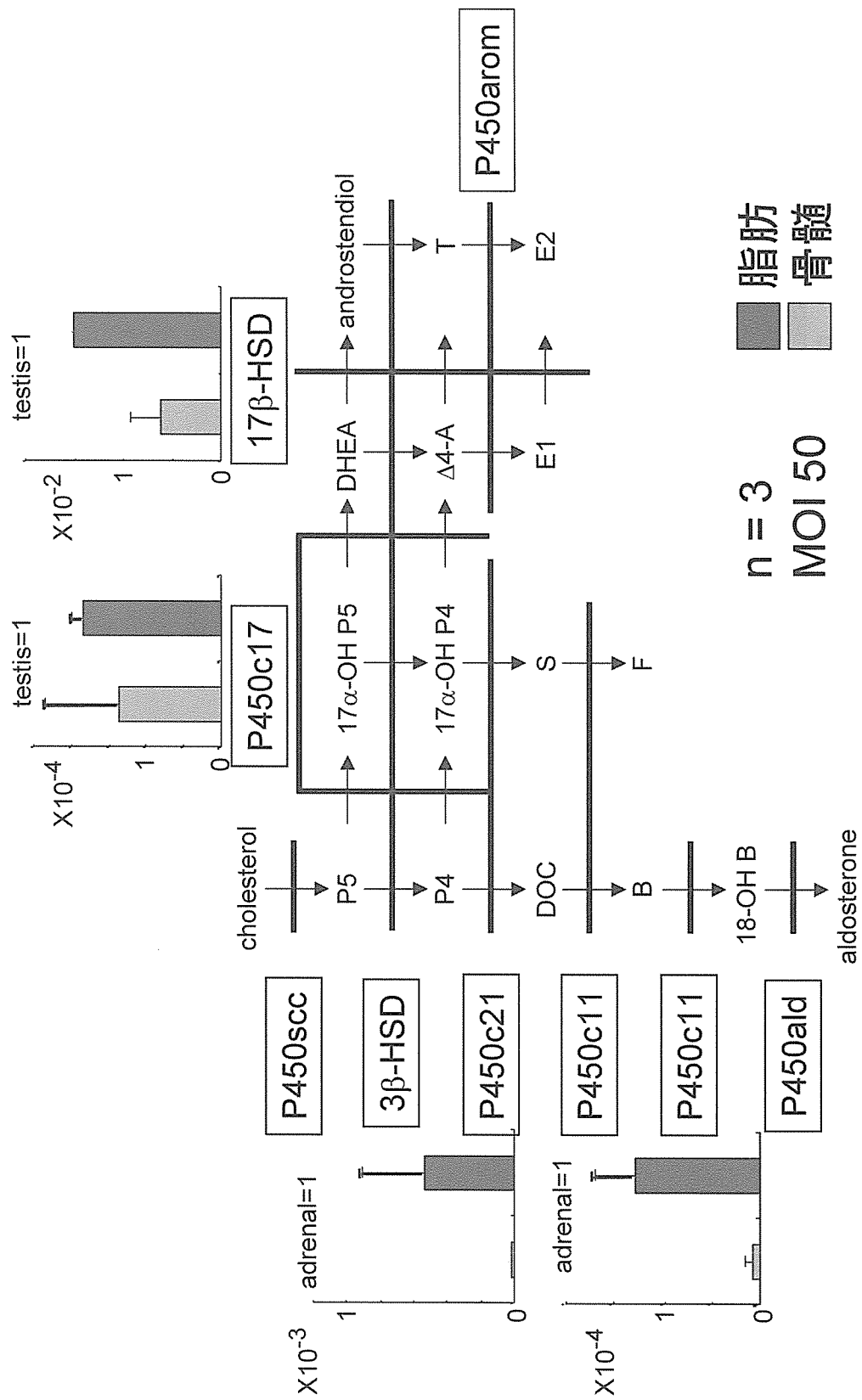


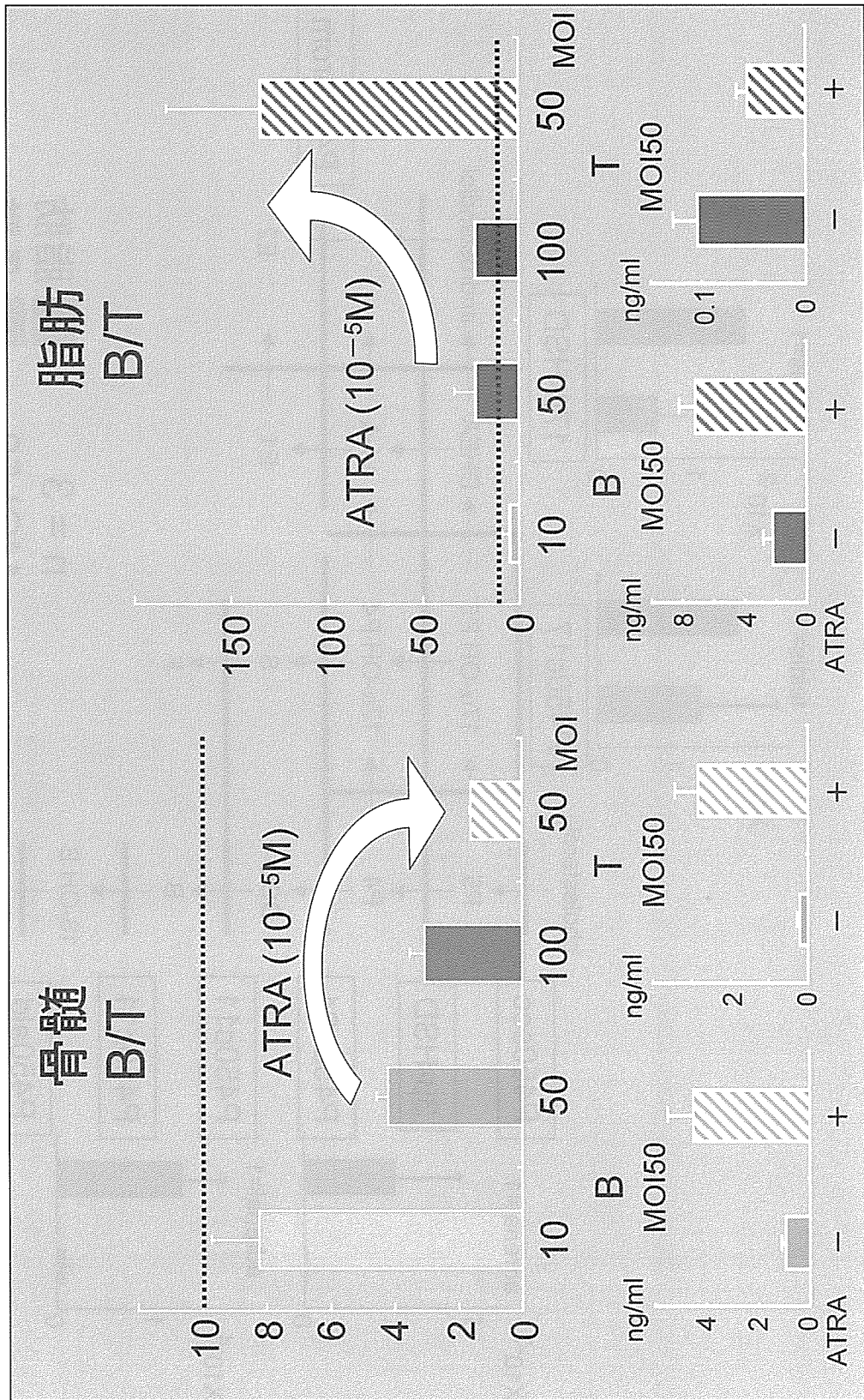
图2 酵素発現状況 (real time PCR)



n = 3
MOI 50

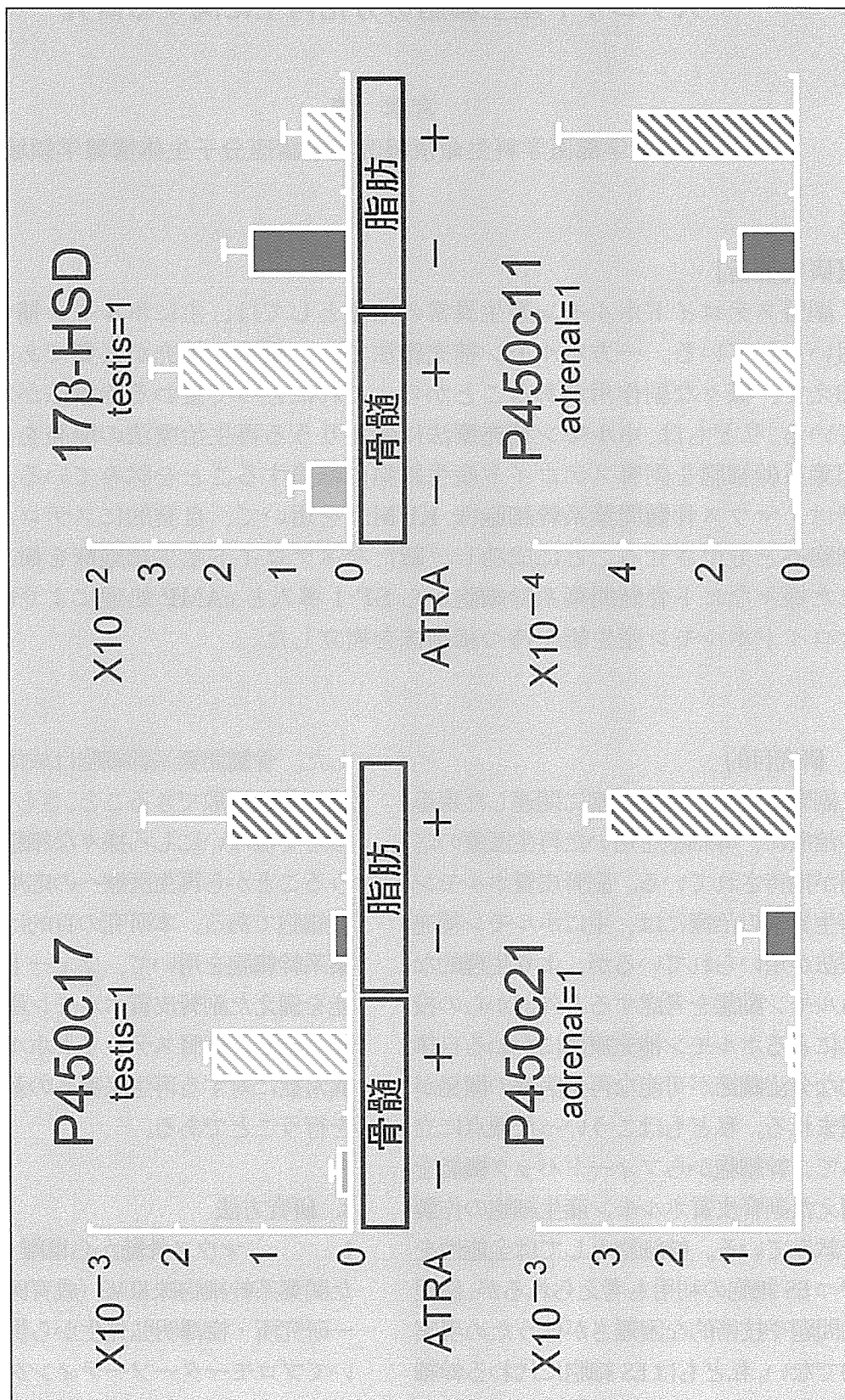
脂肪
骨髓

図3 レチノイン酸とステロイド産生傾向



B, corticosterone; T, testosterone

図4 酵素発現状況 (real time PCR)



ステロイド産生細胞の分化再生に関する研究

宮本 薫

福井大学医学部医学科生命情報医科学講座分子生体情報学領域

【研究要旨】

副腎ステロイドホルモン産生異常の治療としては、主にホルモン補充療法が用いられている。一方ホルモン補充療法では、頻繁な補充が必要であることに加えて、様々な副作用があることから、これにとって変わる治療法が求められている。私どもは、ホルモン補充療法に変わりうる再生治療法の開発を目指し、間葉系幹細胞を副腎ステロイド産生細胞に転換することを試みている。本研究では、マウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 を用いて、自発的にステロイド産生細胞へと分化させることに成功し、新たなステロイド産生細胞株を樹立した。また様々なヒト骨髄間葉系幹細胞から SF-1 導入と cAMP 処理により様々なステロイドホルモン産生能を持つ細胞株を樹立した。

A. 研究目的

副腎ホルモン産生異常に関連した疾患の治療に、幹細胞を用いた再生医療の応用が期待されている。副腎皮質ホルモン産生異常の治療には、主にホルモン補充療法が用いられているが、より生理的なホルモン動態を考慮すると外部からの投与によるホルモン補充療法にかわる自律的な分泌調節が可能な再生医療の開発が望まれる。私どもはこういった観点に立って、幹細胞からフィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞の作製を試みている。幹細胞としては全能性を持つ ES 細胞の利用も考えられるが、倫理的問題や技術的な困難さが伴うため現実的でない。私どもは ES 細胞に代わる幹細胞として骨髄由来の間葉系幹細胞に注目

した。骨髄間葉系幹細胞は成体から比較的容易に採取できること、さらに ES 細胞ほどではないにしろ様々な細胞に分化しうることから再生医療への応用に適した幹細胞である。本研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞を用いて、フィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞を作り出し、副腎ステロイドホルモン産生異常症に対する再生医療への基礎的検討を行うことである。

B. 研究方法

1. マウス骨髄から単離・株化された間葉系幹細胞株 KUM9 (成育医療センター研究所・梅澤明弘先生から供与) を用いてプロモーターソーティング法により、*in vitro* で KUM9 細胞のステロイド産生

細胞への分化能を検討した。生殖腺と副腎のステロイドホルモン産生細胞特異的な遺伝子発現を司る CYP11A1 プロモーターを GFP 遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを作製し KUM9 細胞にトランスフェクトした。17年度は、出現してきた GFP 陽性の細胞をソーティングにより分離し、P450scc 抗体による免疫染色を行い、さまざまなステロイドホルモン産生細胞のマーカージェン子の発現を RT-PCR により解析したが、18年度はさらに、出現してきた GFP 陽性細胞のクローニングを行い、安定的にステロイドホルモンの産生を行う細胞株の樹立を試みた。

2. 17年度はマウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 細胞に、転写因子でオファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 をトランスフェクトし、SF-1 恒常発現細胞株を樹立した。18年度はさらに SF-1 導入に際して Tet-off の系を用いて必要ときに SF-1 を発現できる細胞株の樹立を行った。分化誘導の検証には、ステロイド産生細胞特異的な分子マーカーである P450scc をはじめとする特異的な遺伝子群の発現を RT-PCR により解析した。また、これらのタンパク質としての発現を、それぞれの特異的な抗体を用いてウエスタンブロットにより解析した。さらに分化過程での遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。

3. 様々なヒト骨髄間葉系幹細胞株を用いて上述と同様に転写因子でオファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 をトランスフェクトし、SF-1 恒常発現細胞株を樹立した。18年度はさらに SF-1 導入に際して Tet-off の系を用い、必要

なときに SF-1 を発現できる細胞株の樹立を行った。これらの SF-1 恒常発現細胞株を dibutyl-cAMP 存在下に7日間培養し、分化誘導を行った。分化誘導の検証には、ステロイド産生細胞特異的な分子マーカーである P450scc をはじめとする特異的な遺伝子群の発現を RT-PCR により解析した。また、これらのタンパク質としての発現を、それぞれの特異的な抗体を用いてウエスタンブロットにより解析した。さらに分化過程での遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。

C. 研究結果

1. マウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 にヒト CYP11A1 遺伝子プロモーターを GFP 遺伝子上流に組み込んだレポーターを導入し、KUM9 細胞が自発的にステロイドホルモン産生細胞に分化しうるかどうかを検証した。その結果、極一部ではあったが、KUM9 細胞は自発的にステロイドホルモン産生細胞へと分化していた。17年度は GFP 陽性のこの細胞をソーティングにより分離し、P450scc 抗体により免疫染色を行ったところ、たんぱく質レベルでもこの細胞がステロイドホルモン合成酵素を発現していることが確認された。さらに、この細胞の遺伝子発現を RT-PCR で検証したところ、HSD3b1 や LHR といった Leydig 細胞特異的な遺伝子の発現が確認された。18年度は、自発的にステロイドホルモン産生細胞に分化した KUM9 細胞株をクローニングすることに成功した。これは間葉系幹細胞から特別な操作を行わずにステロイド産生細胞株

を作り出した初めての研究である。

2. マウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 細胞に、転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 をトランスフェクトし、SF-1 恒常発現細胞株を樹立した。17年度は、この SF-1 恒常発現細胞株に dibutyl-cAMP を加え、全ての細胞が抗 P450_{scc} 抗体で陽性となり、ステロイドホルモン産生細胞へと分化したことを確認した。18年度は SF-1 導入に際して Tet-off の系を用いて必要なときに SF-1 を発現できる細胞株を樹立した。現在そのステロイド産生能等を解析している。

3. 様々なヒト骨髄間葉系幹細胞株に、レトロウィルスの系を用いて核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 を導入し、SF-1 恒常発現細胞株を数多く樹立した。これらの細胞株は全てステロイドホルモンを産生していたが、そのパターンは様々であった。マウス骨髄間葉系幹細胞株の場合とは異なり、ヒト骨髄間葉系幹細胞株では、ACTH 受容体遺伝子を発現すると共に、主にコーチゾルを産生するステロイドホルモン産生細胞を作り出すことができた。また ACTH 受容体と共に LH 受容体も同時に発現する細胞株も得られており、それらの解析を DNA マイクロアレイを中心に進めている。

D. 考察

前回、Green ラットを用いた移植実験から、骨髄間葉系幹細胞がステロイドホルモン産生細胞へと分化しうる可能性を示すことができたが、in vivo での移植実験では幹細胞と局所のステロイドホル

モン産生細胞とが細胞融合した可能性を否定できない。またマウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 は、極わずかではあるが自発的にステロイドホルモン産生細胞に分化できることが確認された。今回さらに、これらの自発的にステロイド産生能を獲得した KUM9 細胞株の樹立に成功した。これは間葉系幹細胞から特別な操作を行わずにステロイド産生細胞を作り出すことができることを示した点で画期的である。一方、転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 を導入することで、ヒト骨髄間葉系幹細胞株から、副腎皮質ホルモン、主にコーチゾルを産生する細胞を作り出すことに成功すると共に、様々なステロイド合成パターンを示す細胞が得られることが明らかとなった。これらの結果は、副腎ステロイドホルモン産生異常症に対する再生医療に向けての基礎的な知見を提供するものである。

E. 結論

本研究により、骨髄由来の間葉系幹細胞は in vivo ならびに in vitro でステロイドホルモン産生細胞に分化する能力を有していることが示された。また間葉系幹細胞から特別な操作を行わずにステロイド産生細胞を作り出すことができることを示した点で、将来的な副腎ホルモン産生異常に関わる疾患への再生医療の可能性を示すものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yazawa, T., Mizutani, T., Yamada, K., Kawata, H., Sekiguchi, T.,

Yoshino, M., Kajitani, T., Shou, Z., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology* 147, 4104-4111, 2006.

2. 学会発表

1) 矢澤隆志、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79回日本内分泌学会学術総会. メインシンポジウム3 骨髄細胞を利用した再生医療. 2006, 5, 神戸. 日本内分泌学雑誌. 82(1), 31, 2006.

2) 宮本 薫：性腺ステロイドホルモン産生細胞の分化とその創出. 第11回日本生殖内分泌学会. シンポジウム「視床下部—下垂体—性腺」. 2006, 11, 東京. 日本内分泌学会雑誌. 82(2), 453, 2006.

3) 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創出. 再生医学. 第24回内分泌代謝学サマーセミナー. 2006, 7, 湘南. 講演要旨集, 14.

4) 宮本 薫：性腺ステロイドホルモン産生細胞の分化とその創出. The Ninth Lilly International Symposium. 2006, 10, 札幌.

5) 宮本 薫：幹細胞からのステロイド産生細胞への分化誘導. 北里大学獣医畜産学部 ハイテク・リサーチ・センター報告会. 招待講演. 2006, 9-10, 三沢.

6) Miyamoto, K., Yazawa, T.: Differentiation of Adult Stem Cells into Steroidogenic Cells. *New Aspects in Oocyte and Endocrine Research*. 6th

Sapporo International Symposium on Ovarian Function. 2006, 8, 小樽. 抄録集.

7) 宮本 薫：骨髄間葉系幹細胞からの性腺ステロイドホルモン産生細胞の創出. 第14回日本ステロイドホルモン学会. シンポジウム「性とステロイド」. 2006, 12, 千里. 日本内分泌学会雑誌. 82(2), 408, 2006.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

NR5A1 遺伝子異常 (Ad4/BP) による精巣形成不全の 1 例

田島 敏広

北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野

【研究要旨】

Ad4BP/SF-1 異常を有する症例は現在 7 例が報告されている。そのうち精巣形成不全は共通所見としてあるが、副腎不全に関しては異常を示すものと、正常なものがあることが明らかにされている。副腎不全が認められず、精巣の形成障害を起こした 46, XY 性分化異常症の患者において Ad4BP/SF1 遺伝子を解析した。その結果エクソン 2 で T 塩基から G 塩基への置換をヘテロで同定した。この置換により 41 番目の Val が Gly へと変異するものであった。この変異は DNA 結合に重要な第 1 番目の Zn フィンガー領域、P-Box 近傍に位置し、またマウス、ラット、牛、ヒトで保存されているアミノ酸である。このことからこのアミノ酸置換は DNA 結合に影響を与えると推察される。現在この変異体を構築し、その機能について検討を行っている。

A. 研究目的

NR5A1 (Ad4/BP) はステロイド合成、副腎発生、性腺の発生などさまざまな遺伝子の転写を制御するオーファン核内受容体である。

現在までに 7 名の患者においてこの遺伝子の異常が報告されている。副腎不全を示し、精巣の形成異常を示す場合、また予想外ではあるが副腎は正常で、精巣の形成不全のみを呈する患者が報告されている。

今回精巣の形成不全の患者において NR5A1 (Ad4/BP) 遺伝子を解析したので報告する。

B. 研究方法

症例

患者は 11 歳、女性。出生時より軽度陰核肥大に母が気づいていた。10 歳時陰核の大きさが増大してきたことで近医受診し、11 歳時精査目的にて入院となる。

家族歴に特記すべきことなし。

現症は身長 143.5 cm、体重 34.7 kg、皮膚色素沈着なし。血圧 100/67 と正常であった。二次性徴は認められなかった。陰核は肥大 2.0 cm、膣、尿道口はそれぞれ別に開口していた。左鼠径部に 2cm の腫瘍を触知した。右鼠径部には腫瘍は認められなかった。既往歴では副腎不全

をおもわせるものはなかった。

染色体核型は 46, XY。内分泌学的検査では LH、FSH それぞれ 14.35 mIU/ml, 41.1 mIU/ml と上昇していた。テストステロンは基礎値で 1.28 と上昇していた。ACTH は正常、コルチゾール、17-β-ヒドロキシプロゲステロンは基礎値、ACTH 負荷試験とも正常であった。MRI 検査にては陰は盲端におわり、子宮、卵巣は認められなかった。左鼠径部の腫瘍は精巣と考えられた。また右腹腔内にも精巣様腫瘍が認められ、両側精巣摘出術を行った。

倫理委員会で承認を得た後、両親よりインフォームドコンセントを得た。既報の報告より NR5A1 (Ad4/BP) 遺伝子にプライマーを設定し、各エクソン、イントロンについて PCR-ダイレクトシーケンス法にて解析をおこなった。

C. 研究結果

その結果エクソン 2 で T 塩基から G 塩基への置換をヘテロで同定した。この置換により 41 番目の Val が Gly へと変異するものであった(図 1)。

D. 考案

今回副腎不全が認められず、精巣の形成障害を起こした 46, XY 性分化異常症において NR5A1 (Ad4/BP) の V41G の変異を同定した。図 2 に示したが、この変異は DNA 結合に重要な第 1 番目の Zn フィンガー領域、P-Box 近傍に位置し、またマウ

ス、ラット、牛、ヒトで保存されているアミノ酸である。このことからこのアミノ酸置換は DNA 結合に影響を与えると推察される。現在この変異体を構築し、その機能について検討を行っている。

いままで 7 例の NR5A1 (Ad4/BP) 異常症が報告されているが、3 例は重篤な副腎不全を示し、このうち 2 例は 46, XY 核型で精巣が認められなかった。一方 4 例は 46, XY 核型で、副腎不全は発症しておらず、精巣の形成障害を起こしている。今後精巣の形成障害患者において NR5A1 (Ad4/BP) の異常の頻度をあきらかにしてゆく必要がある。

E. 結論

NR5A1 (Ad4/BP) 異常による精巣形成障害の症例を報告した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tajima, T, Nawate M, Takahashi Y, Mizoguchi Y, Sugihara S, Yoshimoto M, Murakami M, Adachi M, Tachibana K, Mochizuki H, Fujieda K. Molecular analysis of the *CLCNKB* gene in Japanese patients with classic Bartter syndrome *Endocr J* 53, 647-652, 2006

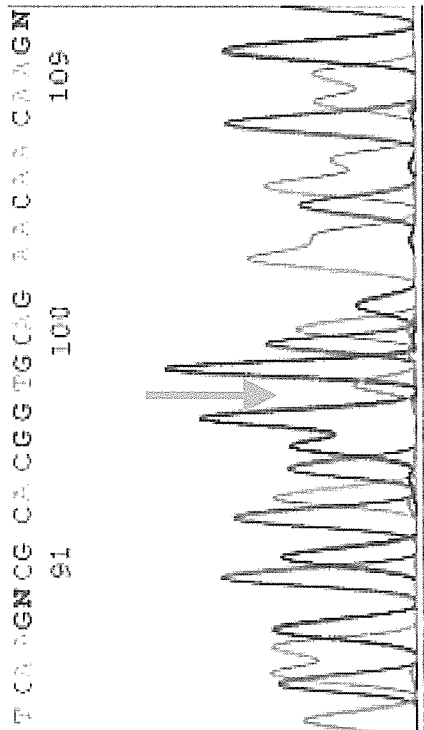
2. 学会発表

- 1) 田島敏広. 副腎疾患のマススクリーニング、今後の展望. 第40回日本小児内分泌学会, 浜松. 2006
- 2) Tajima, T. and Fujieda, K. A new disease in CAH screening. The 6th meeting of the International Society for Neonatal Screening. Japan. 2006

図 1 NR5A1 遺伝子解析

GTG (Val)

WT



GTG(Val)/GGG (Gly) V41G

Patient

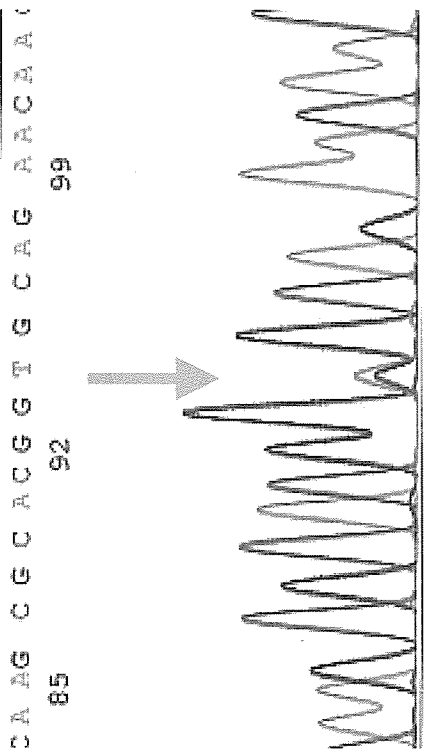


图 2

Murine NR5A1	CECKGFFKRTVQNNHY
Bovine NR5A1	CECKGFFKRTVQNNHY
Human NR5A1	CECKGFFKRTVQNNHY
Rat NR5A1	CECKGFFKRTVQNNHY

