

olone/(5 β THE+5 α THE)比(以下PTL/THEs比)により、一過性高17OHP血症(TH17OHP)および対照(C)と鑑別し、【第2ステップ】でPORDに特徴的なP450c17活性低下を反映する指標である11 β -Oandrosterone(11OHA_n)により、C21OHDとPORDを鑑別する方法である。本法により、C21OHDとPORDを感度特異度100%で鑑別診断可能であった。一方、非古典型(NC)21OHDは、軽症のため新生児早期に2つの診断指標の上昇が少なく鑑別できない可能性が推測されたが未検討であった。

【目的】

我々が確立したC21OHD・PORD鑑別診断指標について、マススクリーニング陽性のNC21OHDを含む21OHDとPORDの新生児・乳児期鑑別診断における診断精度を評価する。

B. 研究方法

第1ステップ：PTL/THEsによりC21OHD+NC21OHD+PORDをTH17OHP+Cと鑑別、第2ステップ：11OHA_nによりC21OHD+NC21OHDをPORDと鑑別した場合の各ステップの感度特異度を求めた。

【対象】

表2参照。臨床症状および/あるいは17OHPマススクリーニング陽性を端緒に尿ステロイドプロフィール分析(mg/g creatinine)したC21OHD 55例, NC21OHD 9例, PORD 18例, TH17OHP 57例およびC 2473例。日齢0～149日。在胎23-41週。

【倫理面への配慮】

本研究は慶應義塾大学病院倫理委員会の承認を得ている。検体の採取に際しては、両親・あるいは両親のうちのいずれかの同意を書面で得た。すべての検体は匿名化されている。

C. 研究結果

- 1) PTL/THEs比0.02で感度98.4%、特異度99.9%、カットオフ値を0.01に下げると感度100%、特異度99.6%であった(図2)。PTL/THEs比が0.02より低かった1症例は、生後3日PORDで、生後14日再検時にはカットオフ値以上を呈した。
- 2) 11OHA_n 0.35で21OHD感度95.3%、特異度100%であった(図3)。カットオフ値0.35未満の21OHDは、生後16日C21OHD女児、生後23日NC21OHD男児、生後15日NC21OHD女児の3例で、後日再検しても0.35未満であった。カットオフ値0.35以上は全例21OHD、0.10未満は全例PORDで、0.10～0.35の間に21OHDの4.7%、PORDの22.2%が分布していた。

D. 考察

- 1) PTL/THEs比については、感度98.4%でC21OHD+NC21OHD+PORDを早産児を含むTH17OHP+Cと鑑別可能であった。しかし新生児早期のPORDを見落とさないよう、カットオフ値を0.01に設定した方がよいと考える。
- 2) 11OHA_nについては、C21OHD+NC21OHDの95.3%、PORDの77.8%を鑑別可能であった。しかし、11OHA_n単独では21OHDとPORDを感度特異度100%で鑑別できないことが明らかになったので、今後、PORDに特徴的なP450c17活性低下を反映する新たな指標を検索する必要があると考える。

E. 結論

尿PTL/THEsと11OHA_nにより、在胎週数、日齢にかかわらず、NC21OHDを含む

IV. 分担研究報告書

21OHDとPORDを高い診断精度で鑑別可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyama Y, Homma K, Miwa M, Ikeda K, Murata M, Hasegawa T. Measurement of reference intervals for urinary free adrenal steroid levels in Japanese newborn infants by using stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry Clinica Chimica Acta 415, 302-305 2013
- 2) 本間桂子, 長谷川奉延. 尿ステロイドプロフィールによる新生児副腎皮質疾患の早期診断. 小児科臨床 66(2) 199-207 2013

2. 学会発表

- 1) 本間桂子、中川利沙、小山雄平、三輪雅之、池田一成、涌井昌俊、村田満、本間誠次郎、長谷川奉延. 古典型21-水酸化酵素欠損症女児の生後第1週におけるdihydrotestosterone産生経路. 第46回日本小児内分泌学会. 大阪. 2012.9.27-29
- 2) 中川利沙、本間桂子、小山雄平、三輪雅之、池田一成、前久保仁恵、涌井昌俊、村田満、本間誠次郎、長谷川奉延. LC/MS/MSによる血中21-deoxycortisol (21DOF) を用いた新生児古典型21-水酸化酵素欠損症(C21OHD)診断 第46回日本小児内分泌学会. 大阪. 2012.9.27-29
- 3) 本間桂子、小山雄平、長崎啓祐、高澤啓、清水長子、柴田綾子、涌井昌俊、村

田満、石井智弘、長谷川奉延. 尿ステロイドプロフィールによる非古典型を含む21-hydroxylase欠損症とP450oxidoreductase欠損症との鑑別診断. 第20回日本ステロイドホルモン学会. 金沢. 2012.11.17-18

- 4) Koyama Y, Homma K, Noboru Uchida N, Hayashi M, Miwa M, Ikeda K, Ishii T, Wakui M, Murata M, Hasegawa T. Chemotype (urinary steroid concentration) - phenotype - genotype correlations in 53 Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency ENDO2012, Houston, USA, Jun. 23-26, 2012.
- 5) Koyama Y, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M Two-Step Biochemical Differential Diagnosis of Classic 21-Hydroxylase Deficiency and Cytochrome P450 oxidoreductase Deficiency in Japanese Infants by GC-MS Measurement of Urinary Pregnenetriolone / Tetrahydrocortisone Ratio and 11b-Hydroxyandrosterone 12th ASCPaLM Kyoto 2012.11.29-12.1

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1. 新生児マススクリーニング17OHP陽性を呈する可能性のあるステロイド産生異常症のまとめ

	21-水酸化酵素 欠損症	P450オキソレタクターゼ 欠損症	3β水酸化ステロイド 脱水素酵素 欠損症	11β-水酸化酵素 欠損症	副腎腫瘍	一過性高17OHP血症 (早産児を含む)
副腎不全	なし～あり	なし	なし～あり	なし～あり	なし	なし
外陰部 男児	正常	正常～女性化	正常～女性化	正常	正常	正常
女児	正常～男性化	正常～男性化	正常～男性化	正常～男性化	正常～男性化	正常
骨異常 (頭蓋骨癒合症等)	なし	なし～あり	なし	なし	なし	なし
マススクリーニング17OHP	陰性～陽性	陰性～陽性	陰性～陽性	陰性～陽性	陰性～陽性	陽性
診断指標候補 血中ステロイド	17OHP, 21DOF, AD	17OHP, 21DOF, Prog, P5	DHEA-S, 17OHP5	11DOF	DHEA-S, 17OHP5等	17OHP 自然低下
遺伝子解析	CYP21A2	POR	HSD3B2	CYP11B1		
尿ステロイド代謝物	Ptl高値 11OHAn高値	Ptl高値 11OHAn低値	17OHP5,PT5 生後3, 4か月 持続高値	THS高値	PT5,AT5高値 Ptl低値ほか	Ptl低値

図1 C21OHD・PORDのステロイド代謝

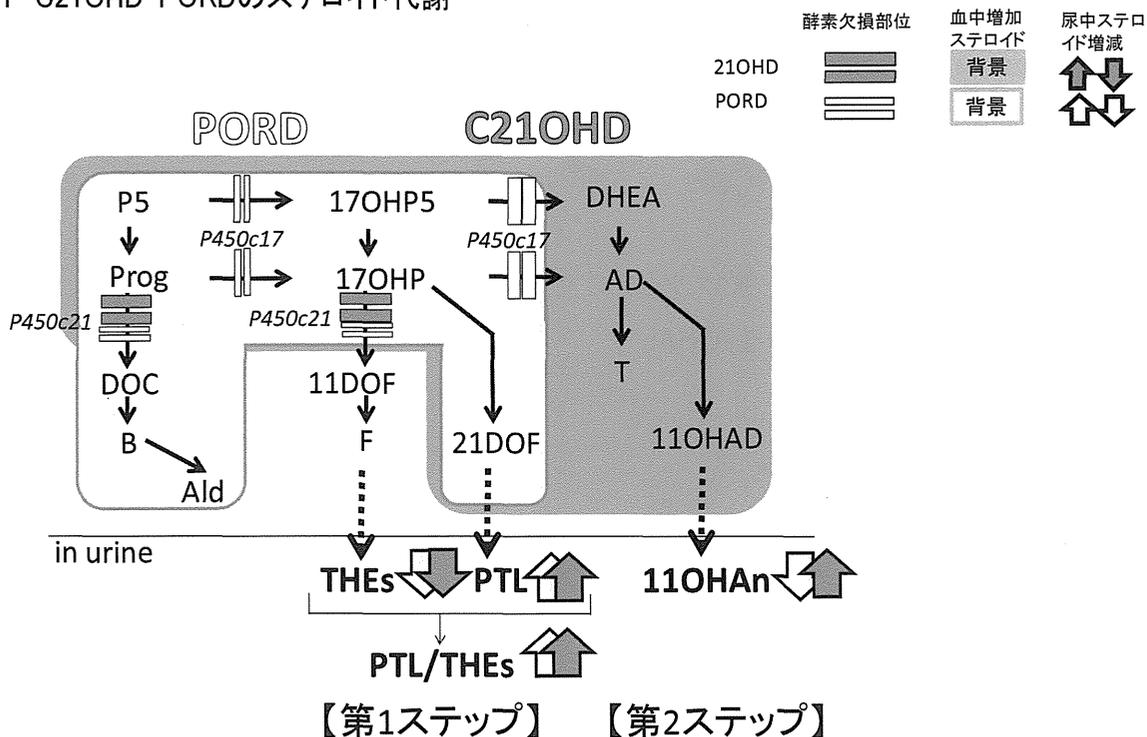


表2 対象

診断名	診断方法	例数(M/F)	在胎週数(w)	出生体重(g)	日齢
C21OHD*	遺伝子診断	55(29/26)	35-41	1658-4174	0-39
NC21OHD*	遺伝子診断	9(7 / 2)	35-40	2680-3408	15-66
PORD*	遺伝子診断	18(8 /10)	34-41	1018-3418	1-146
一過性*	臨床診断	57	37-41	2062-4980	1-145
対照	臨床診断	2473	23-41	289-4610	0-149

*マススクリーニング陽性あるいは臨床症状を端緒に尿ステロイドプロファイル分析を行った症例

図2 C21OHD・PORD鑑別診断:第1ステップの指標

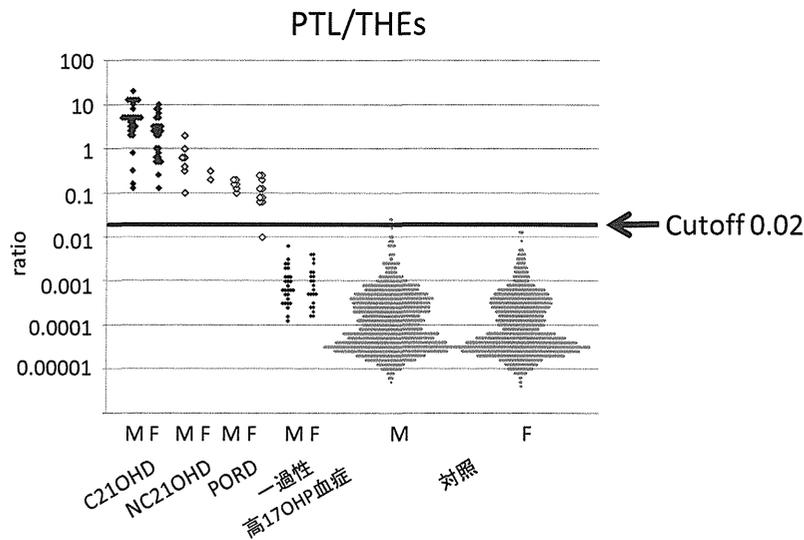
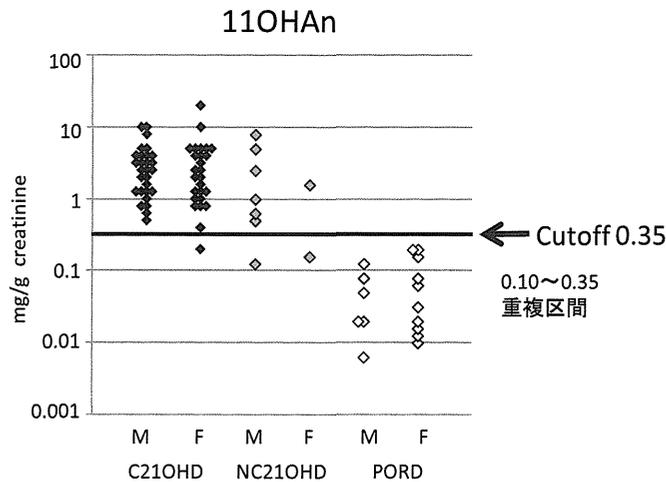


図3 C21OHD・PORD鑑別診断:第2ステップの指標



**(3) 副腎発生・分化・再生機構の
基礎研究**

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

ヒトiPS/ES細胞からのステロイド産生細胞の分化誘導

曽根正勝 京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 講師

【研究要旨】

本年度、我々はヒトES/iPS細胞を用いて、ステロイド産生細胞の分化誘導を試みた。最初に胚様体形成を介して分化誘導を試みたところ、StAR、 3β HSD、CYP11A1、CYP17A1などを発現するステロイド産生細胞が得られた。しかしそれらの細胞はCYP21A2は発現しておらずCYP19を発現しており、培養上清中のステロイドホルモンを測定したところプロゲステロンとhCGを産生しており、trophoblast様細胞であると考えられた。次に、中胚葉系の前駆細胞を介した分化誘導を試みた。ヒトES/iPS細胞からFlk1、PDGFR α 、Osr-1陽性細胞を分化誘導し、それらにSF-1遺伝子を導入してさらに7-14日間分化誘導を行ったところ、 3β HSD、CYP11A1、CYP17A1、CYP21A2、CYP11B1を発現している副腎皮質細胞に近いステロイド合成酵素の発現プロファイルを持つ細胞群が得られ、培養上清中にはプロゲステロン、コルチコステロン、コルチゾールの産生が認められた。

A. 研究目的

これまで、幹細胞を用いた副腎・性腺ステロイド産生細胞の分化研究は主に体性幹細胞を用いて行われてきており、間葉系幹細胞にSF-1遺伝子を導入することによりステロイド産生細胞への誘導に成功したという報告が複数なされている (Gondo S, et al. Endocrinology. 2008) (Tanaka T, et al. J Mol Endocrinology. 2007) (Yazawa T, et al. Endocrinology. 2006)。一方、胚性幹細胞を用いたステロイド産生細胞の研究についてはこれまであまり行われていなかった。そこで、我々はヒトのiPS/ES細胞を用いて、ステロイド産生細胞の分化誘導を試みた。

B. 研究方法

米国Wisconsin大学で樹立されたヒトES細胞株H9、本邦京都大学で樹立されたヒトES細胞株KhES-1、ヒト成人線維芽細胞にOct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycの4つの遺伝子を導入して作

製されたiPS細胞株201B7を用いて実験を行った。最初に、ヒトES/iPS細胞から胚様体を形成しステロイド産生細胞が分化しないかを検討した。次に、ヒトES/iPS細胞から（中間）中胚葉細胞を介したステロイド産生細胞分化誘導を行った。

（倫理面への配慮）

ヒトES細胞の培養・使用については、医の倫理委員会の承認を得て、ヒトES細胞の使用に関する指針に準拠して行った。ヒトiPS細胞の培養・使用についても同指針に準じて行った。

C. 研究結果

ヒトES/iPS細胞を14日間浮遊培養し胚様体を形成したのちゼラチンコートディッシュにて10日間接着培養にて分化誘導を試みたところ、細胞集塊の辺縁部にStAR、 3β HSD、CYP11A1、CYP17A1などを発現するステロイド産生細胞が得られた（図1）。しかしそれ

IV. 分担研究報告書

らの細胞はCYP21A2は発現しておらずCYP19を発現しており、培養上清中のステロイドホルモンを測定したところプロゲステロンとhCGを産生しており、trophoblast様細胞であると考えられた(図2、図3)。次に、中胚葉細胞を介した分化誘導を試みた。ヒトES/iPS細胞からFlk1、PDGFR α 、Osr-1陽性細胞を分化誘導し(図4)、それらにSF-1遺伝子を導入してさらに7-14日間分化誘導を行ったところ、3 β HSD、CYP11A1、CYP17A1、CYP21A2、CYP11B1を発現している細胞群が得られた。8-Br-cAMPを添加したところ、これらの遺伝子発現はさらに上昇した(図5)。培養上清中にはプロゲステロン、コルチコステロン、コルチゾールの産生が認められた(図6)。

D. 考察

ヒトES/iPS細胞の胚様体形成を介した分化誘導によりプロゲステロン、hCGを産生するtrophoblast様のステロイド産生細胞が得られた。一方、中胚葉系への誘導とSF-1の遺伝子導入を用いた系では、3 β HSD、CYP11A1、CYP17A1、CYP21A2、CYP11B1を発現し、プロゲステロン、コルチコステロン、コルチゾールを産生する細胞が得られ、これらの細胞はhCGは産生しておらず、この方法によって得られたステロイド産生細胞は胎盤系の細胞ではなく、副腎皮質のlineageの細胞であると考えられた。

E. 結論

ヒトES/iPS細胞を中胚葉系に分化させ、その後SF-1を強制発現させることにより、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群が得られた。今後は、さらに分化・成熟した副腎皮質細胞への誘導法の開発を目指すとともに、将来の再生医療への応用

のため遺伝子の強制発現を用いない系の確立を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sonoyama T, Sone M (corresponding author), et al.

Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells into Steroid-Producing Cells.

Endocrinology. 153(9):4336-45, 2012

2. 学会発表

園山拓洋、曾根正勝、他

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 京都、日本、2012年4月13日

本田恭子、曾根正勝、他

片側副腎摘除術後の副腎皮質機能の評価

第109回 日本内科学会総会 京都、日本、2012年4月13日

園山拓洋、曾根正勝、他

アルドステロン産生腺腫の診断におけるACTH負荷試験の意義

第85回 日本内分泌学会学術総会 名古屋、日本、2012年4月19日

園山拓洋、曾根正勝、他

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総会 横浜、日本、2012年6月13日

曾根正勝、他

アルドステロン産生腺腫診断におけるACTH負

荷試験の意義：原発性アルドステロン症におけるAPAとIHAの位置付け
 第35回 日本高血圧学会総会 名古屋、日本、
 2012年9月20日

胚様体 (EB) 形成を介したステロイド産生細胞分化誘導

図1 ステロイド合成酵素発現 (RT-PCR) 図2 免疫染色 (上段: 3βHSD 下段: hCG)

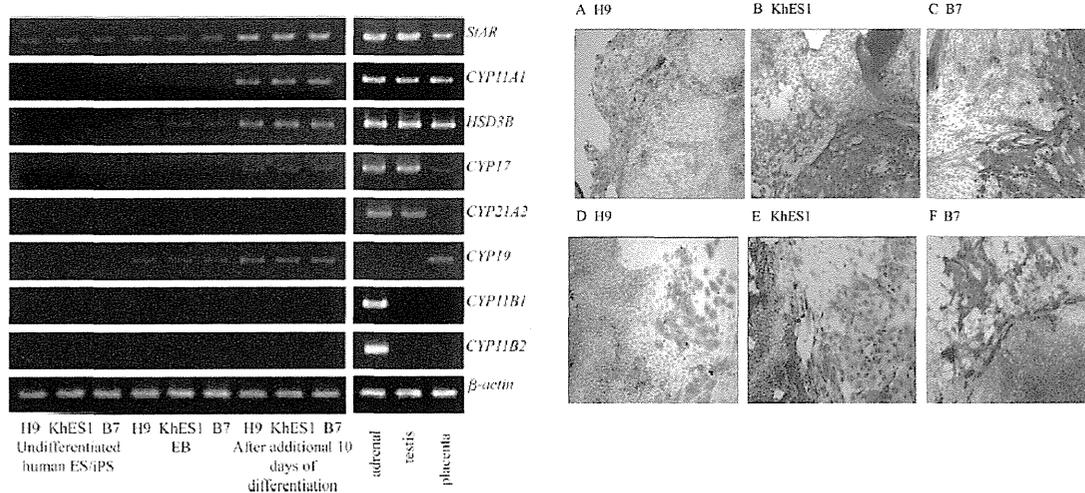


図3 培養上清中へのステロイドホルモンの分泌

	Undifferentiated			Differentiated		
	H9	KhES1	B7	H9	KhES1	B7
Progesterone (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	4320 ± 510	3450 ± 1290	10800 ± 2030
Corticosterone (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cortisol (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
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.	110 ± 30	110 ± 40	350 ± 40
hCG (mIU/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	120 ± 30	280 ± 60	1300 ± 110

Data are means ± SEM of triplicate experiments. Differentiated cells were cultured on gelatin-coated dishes for 10 d after EB formation on nonadherent dishes. N.D., Not detectable.

中胚葉系を介したステロイド産生細胞分化誘導

図4 中胚葉細胞の分化

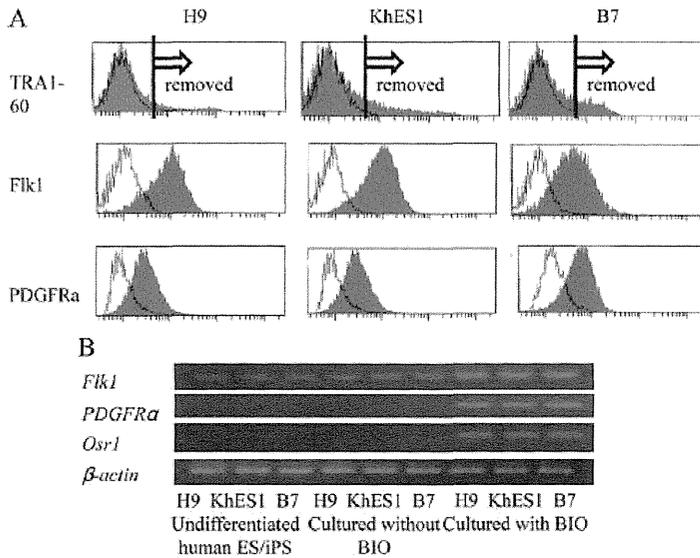


図5 ステロイド合成酵素発現 (RT-PCR)

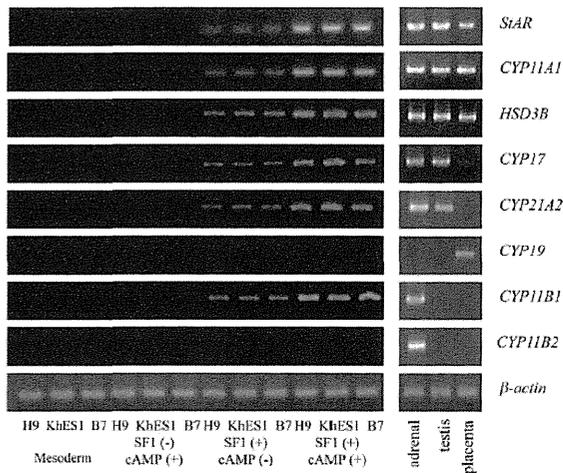


図6 培養上清中へのステロイドホルモンの分泌

	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.

Data are means ± SEM of triplicate experiments. Differentiated cells were cultured with 8-Br-cAMP for 7 d after transfection of SF-1 into mesodermal lineage cells derived from human ES/iPS cells. N.D., Not detectable.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

副腎皮質の発生初期過程に関する研究

諸橋 憲一郎 九州大学大学院医学研究院 教授

【研究要旨】

転写因子Ad4BP/SF-1は副腎皮質におけるステロイドホルモン産生能を制御している。一方、本遺伝子のノックアウトマウスには副腎が形成されないこと、ならびに本遺伝子の強制発現マウスでは副腎形成が促進されることを考慮すると、本因子は単にステロイドホルモン産生に関与する遺伝子の制御を行っているだけではなく、副腎皮質細胞の分裂や増殖を制御していると推測される。しかしながら、本因子がどのようなメカニズムで細胞増殖を制御しているのかは不明である。この問題を明らかにするため、2011年度から副腎皮質における本因子の標的遺伝子の全体像を明らかにすることを目的に、次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降法による解析を行ってきた。本年度においては、更に解析を押し進めた結果、解糖系酵素遺伝子がAd4BP/SF-1の標的遺伝子となっていることが示された。組織特異的転写因子がハウスキーピングなプロセスである解糖系を制御することを示した初めての例であり、組織特異的機能と解糖系のような細胞内代謝系が協調的に作動するメカニズムの一端を示すものである。

A. 研究目的

Ad4BP/SF-1は核内受容体型転写因子であり、副腎皮質細胞において種々の遺伝子の転写を制御している。本研究では次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降法による解析で、Ad4BP/SF-1が制御する標的遺伝子の全体像を明らかにするとともに、本遺伝子のノックアウトマウスから副腎や生殖腺が消失する理由を明らかにすることを目的とした。昨年までに解糖系遺伝子がAd4BP/SF-1によって制御されることが示唆されたため、本年はこのことを種々の方法で確認した。

B. 研究方法

前年度の実験ではAd4BP/SF-1に対する抗体を用いた免疫沈降を行い、本因子が核内で結合しているDNA領域を回収した。その後、増幅ならびにサイズ分画を行い、適正サイズのDNA断片につき次世代シーケンサーによる

塩基配列決定を行った。次世代シーケンサーによって得られる塩基配列情報は九州大学生体防御医学研究所の須山教授の研究グループに解析して頂いた。

(倫理面への配慮)

本実験にはトランスジェニックマウスならびに遺伝子破壊マウスを用いるが、全ての動物実験は九州大学動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は九州大学実験動物委員会の承認を得たものである。同様に組み替えDNA実験については、組み替えDNA実験委員会の承認を得たものである。

C. 研究成果

前年度までのChIP-sequence解析によって、ほとんどの解糖系酵素遺伝子の10Kb上流ならびに10Kb下流以内にAd4BP/SF-1が結合していること、ならびにAd4BP/SF-1の結合領

域が活性化遺伝子の指標となるヒストン修飾を受けていることが確認されていた。また、そこで、RNAi法にてAd4BP/SF-1をノックダウンしたところ、解糖系遺伝子の発現は期待通りに低下していた。この結果は、Ad4BP/SF-1が解糖系遺伝子の近傍に結合することで、それらの遺伝子の転写を調節していることを示唆した。

そこで、本年度はこれらの領域がAd4BP/SF-1依存的な転写活性を発揮するのかに付いて、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて検討した。その結果、Ad4BP/SF-1が結合する解糖系遺伝子上の領域は、Ad4BP/SF-1依存的にルシフェラーゼ遺伝子の転写を活性化することが分かった。

また、Ad4BP/SF-1のsiRNA阻害によって解糖系遺伝子の発現が著しく低下することが示されていたが、この条件下では解糖系の活性も低下していると考えられた。そこで、解糖系の代謝産物ならびにATP濃度を測定した。その結果、解糖系の最終産物であるピルビン酸の濃度がほぼゼロとなり、ATP濃度も減少していた。

D. 考察

昨年度の結果と本年度の結果は、Ad4BP/SF-1が解糖系酵素遺伝子を制御していることを示すものであった。解糖系酵素はグルコースの分解により細胞内のエネルギー産生を、ひいては細胞の分裂や生存そのものを制御すると考えられる。実際に、Ad4BP/SF-1をノックダウンした細胞では細胞増殖の低下も観察されている。そもそも、Ad4BP/SF-1はステロイド産生に関与する一連の遺伝子の発現制御を行う転写因子として同定された。つまり、細胞特異的な機能を担うために必要な細胞特異的転写因子と考えられている。しかしながら今回の実験では本因子が細胞特異的遺伝子の制御のみ

ならず、全ての細胞に必要な解糖系遺伝子の転写制御を行っていることを示すものであった。細胞特異的遺伝子発現によって獲得される機能的特異性を実際に発揮するには、遺伝子発現の後にステロイドホルモン合成と、多分コレステロール合成が活性化されることが必要である。この二つの経路が活発に機能するにはATPとNADPH、アセチル-CoAなどの物質が必要であることが知られているが、これらの物資の産生には解糖系が動くことが必須である。細胞特異的な機能の発揮に必要な遺伝子と解糖系遺伝子の制御をAd4BP/SF-1が行うことで、この一見無関係に見える二つの経路を協調的に制御していることが明らかになった。

E. 結論

Ad4BP/SF-1はステロイド産生細胞において解糖系遺伝子の発現を制御することで、これらの細胞の生存と細胞特異的機能の活性化を制御していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1, SF-1 expression during adrenal development and tumorigenesis.

Gardiner JR, Y Shima, Ken-ichirou Morohashi, Amanda Swain

Mol. Cell. Endocrinol. 351, 12-18, 2012
Review

2, Identification of enhancer specific for fetal Leydig cells in Ad4BP/SF-1 gene.

Yuichi Shima, Kanako Miyabayashi, Takashi Baba, Hiroyuki Otake, Sanae Oka, Mohamad Zubair, Ken-ichirou Morohashi

Endocrinology 153, 417-425, 2012

3, Cbx2, a polycomb group gene, is re-

- quired for Sry gene expression in mice.
Yuko Katoh-Fukui, Kanako Miyabayashi,
Tomoko Komatsu, Akiko Owaki, Takashi
Baba, Yuichi Shima, Tomohide Ki-
dokoro, Yoshiakira Kanai, Andreas
Schedl, Dagmar Wilhelm, Peter Koop-
man, Yasushi Okuno, Ken-ichirou Moro-
hashi
Endocrinology 153, 913-924, 2012
- 4, WNT family genes and their modulation
in the ovary-independent and persistent
vaginal epithelial cell proliferation and
keratinization induced by neonatal di-
ethylstilbesterol exposure in mice
Takeshi Nakamura, Shinichi Miyagawa,
Yoshinao Katsu, Hajime Watanabe,
Takeshi Mizutani, Tomomi Sato, Ken-
ichirou Morohashi, Takashi Takeuchi,
Taisen Iguchi
Toxicology 296, 13-19, 2012
- 5, Mamld1 deficiency significantly reduces
mRNA expression levels of multiple
genes expressed in mouse fetal Leydig
cells but permits normal genital and re-
productive development
Mami Miyado, Michiko Nakamura, Kenji
Miyado, Ken-ichirou Morohashi,
Shinichiro Sano, Eiko Nagata, Maki
Fukami, and Tsutomu Ogata
Endocrinol 153, 6033-6040, 2012
- 6, Contribution of Leydig and Sertoli cells
to testosterone production in mouse
fetal testes
Yuichi Shima, Kanako Miyabayashi,
Shogo Haraguchi, Tatsuhiko Arakawa,
Hiroyuki Otake, Takashi Baba, Sawako
Matsuzaki, Yurina Shishido, Haruhiko
Akiyama, Taro Tachibana, Kazuyoshi
Tsutsui, Ken-ichirou Morohashi
Mol Endocrinol 27, 63-73, 2013
- 7, Steroid hormones and the development
of reproductive organs
Ken-ichirou Morohashi, Takashi Baba,
Minoru Tanaka
Sexual Development 7, 61-79, 2013
Review
2. 学会発表
(招待講演)
- 1, Ken-ichirou Morohashi
Glycolytic genes as the targets of
Ad4BP/SF-1
15th Conference on the adrenal cortex,
Adrenal 2012, League city, Texas, UAS
- 2, Yuichi Shima, Kanako Miyabayashi,
Takashi Baba, Hiroyuki Otake, Kentaro
Suzuki, Shogo Haraguchi, Kazuyoshi
Tsutsui, Ken Morohashi
Functional characterization of fetal Ley-
dig cells by cell-specific disruption of
Ad4BP/SF-1 gene
Sixth International Symposium on the
Biology of Vertebrate Sex Determination
April 23-27, 2012 Kona, Hawaii
- 3, 諸橋 憲一郎
教育講演；胎仔ライディッヒ細胞と成獣
ライディッヒ細胞の異質性について
第85回日本内分泌学会
名古屋 4月19日—21日
- 3, 馬場崇、大竹博之、宮林香奈子、嶋雄一、
佐藤哲也、木村宏、大川恭行、須山幹
太、諸橋憲一郎

IV. 分担研究報告書

シンポジウム；核内受容体 Ad4BP/SF-1
の副腎皮質における新たな機能
第85回日本内分泌学会
名古屋 4月19日—21日

4. 諸橋 憲一郎

シンポジウム；性差形成と維持の機構
第44回日本動脈硬化学会
福岡 7月19-20日

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

ステロイドホルモン合成関連遺伝子群の新たな転写調節

宮本 薫 福井大学医学部分子生体情報学 教授

【研究要旨】

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。昨年度は幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導系を用いて、新たなSF-1標的遺伝子の同定を試みた。ゲノムワイドのChIP-on-chip assayおよびマイクロアレイによる網羅的発現解析により、分化誘導に伴うステロイドホルモン合成に関わると想定される新たなSF-1標的遺伝子を同定し、ヘム合成の律速酵素であるALAS1に関して報告した。本年度は、もう一つの新たなSF-1標的遺伝子として同定した、Glutathione-S-transferase A (GSTA)遺伝子ファミリーについて解析を行った。

A. 研究目的

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。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副腎皮質ホルモン産生細胞を創り出すと同時に、その分化メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。本年度は、骨髄間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導過程における、新たなSF-1標的遺伝子を検索することで、新たなステロイドホルモン合成関連遺伝子の同定し、さらにそれらの中からGlutathione-S-transferase A (GSTA)遺伝子ファミリーに着目して解析を行った。

B. 研究方法

- 1) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に転写因子SF-1を導入し、ChIP-on-chip assayによりゲノムワイドにSF-1結合部位を解析した。ヒト骨髄由来幹細胞株 hMSC-TERT-E6E7および親株にFlagタグを付けたSF-1遺伝子を導入して恒常的にSF-1を発現する細胞株を用いて、それぞれの細胞から核を単離したのちホルムアルデヒド処理を行い超音波による断片化後、Flagタグを利用した免疫沈降を行った。回収されたDNA断片を用いて、Promoter tiling arrayを行った。
- 2) 同時に上記の細胞系を用いて、転写因子SF-1により発現変動する遺伝子群をDNA microarrayによる網羅的遺伝子発現解析により明らかにした。
- 3) 上記の解析から新たなSF-1標的遺伝子として同定したhGSTA遺伝子近傍の染色体構造変化を、レポーターアッセイおよび

Chromatin conformation capture assay (3C assay)により解析した。3C assayでは、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株hMSC-TERT-E6E7および親株にSF-1を導入して恒常的にSF-1を発現させた細胞株を用いて、それぞれの細胞株から核を単離した後、ホルムアルデヒドにより染色体を固定し、制限酵素により消化を行った。消化されたDNA断片をligationしたのちPCRにより増幅を行った。染色体上で、3次元構造上近接するDNA断片は、効率よくligationされるため、PCRにより増幅が可能となる。この原理を利用して、ゲノム上で離れて存在するDNA部位が3次元構造上は近接して存在しているかどうかを検証できる。

C. 研究結果

- 1) ヒト骨髄間葉系幹細胞株hMSC-TERT-E6E7および親株にSF-1を導入して恒常的にSF-1を発現させた細胞株を用いて、ChIP-on-chipを行った結果、hGSTAファミリー遺伝子クラスター近傍ではhGSTA3遺伝子プロモーター付近にSF-1が強く結合していることが明らかとなった。これに呼応してhGSTA3遺伝子発現は完全にSF-1に依存していた。
- 2) hGSTA3遺伝子近傍のSF-1結合をさらにconventional ChIP assayにより検討したところ、プロモーター付近に存在する3か所のSF-1結合サイトが重要であることが明らかとなった。このサイトを含むレポーターアッセイを行ったところ、SF-1依存的に転写活性化が起これり、これらのサイトにmutationを導入することで、SF-1依存的転写活性化が抑制されることから、hGSTA3遺伝子発現は主としてプロモーター領域に存在するSF-1サイトへの転写因子の結合により制御されていることが明らかとなった。
- 3) hGSTAファミリーは、hGSTA1からhGSTA4までの遺伝子がクラスターを形成して染色体上に存在している。ChIP-on-chipの解析では、これらの遺伝子のうちhGSTA3プロモーター付近にのみSF-1は結合し、他のhGSTAファミリー遺伝子群のプロモーター領域にはSF-1は結合しない。また、それぞれのhGSTA遺伝子プロモーターを含むレポーターアッセイを行うと、hGSTA3遺伝子プロモーターを含むレポーターだけでSF-1依存的な転写活性化が見られ、その他のレポーターではSF-1による活性化は生じなかった。一方、RT-PCRによる遺伝子発現解析では、hGSTA1からhGSTA4に至るすべてのhGSTAファミリー遺伝子群においてSF-1による遺伝子発現の誘導が観察された。これは、レポーターアッセイの結果と矛盾するが、hGSTAファミリーがクラスターを形成していることから、おそらく染色体上でこれらの遺伝子が分化誘導に伴い3次的に近接することで、SF-1により共通の転写制御を受けていることを示唆するものと考えられる。
- 4) そこで具体的にこれらhGSTAファミリー遺伝子群が染色体上で3次的に近接して存在するかどうかを3C assayにより検証した。hGSTA1プロモーター近傍で設定したプライマーを用いて3C assayを行うと、hGSTA3プロモーター近傍との間で定量的にコントロールと比較して4倍以上

PCRによる増幅が観察された。この結果は、hGSTA1とhGSTA3とが100kb以上離れているにも関わらず、分化誘導に伴い、3次元的に極めて近接して存在することが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、間葉系幹細胞に転写因子SF-1を導入して細胞分化を誘導し、その際の染色体構造の変化を解析した。まずChIP-on-chip assayによりゲノムワイドにSF-1結合サイトを検索し2000か所以上の結合サイトを同定した。さらにDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、新たなSF-1標的遺伝子を同定した。さらに新たな標的遺伝子の転写調節機構をレポーターアッセイにより確認することができる。本研究においても新たなSF-1標的遺伝子であるhGSTA3の転写がその遺伝子プロモーター領域に存在するSF-1結合サイト依存的に調節されていることを明らかにすることができた。さらにhGSTA3遺伝子は遺伝子ファミリーを形成し、染色体上でクラスターを形成して存在している。本研究では、これら遺伝子ファミリーが染色体上で3次元的に近接して存在することを3C assayにより証明した。これは、クラスターを形成するファミリー遺伝子群が共通の転写調節を受けることを可能にする新たな機構である。

E. 結論

以上のことから、GSTA familyはステロイドホルモン産生細胞において、SF-1によるクロマチン構造の変化を介して転写制御され、ステロイド合成に関与する重要なメンバーであることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ju, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Kangawa, K., Miyamoto, K.: Nuclear receptor 5A(NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1(ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology* 153, 5522-5534, 2012.

2. 総説

- 1) 水谷哲也, 今道力敬, 河邊真也, 矢澤隆志, 宮本 薫: 卵巣における遺伝子発現とその調節メカニズム. *日本生殖内分泌学会雑誌*. 17, 11-16, 2012.
- 2) 深見真紀, 曾根田 瞬, 矢澤隆志, 宮本 薫, 緒方 勤: チトクロームP450オキシドレダクターゼ(POR)異常症の分子基盤: POR遺伝子発現制御機構. *日本生殖内分泌学会雑誌*. 17, 17-20, 2012.

3. 学会発表

(シンポジウム)

- 1) 矢澤隆志: 幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の分化誘導. シンポジウム4 再生医療と内分泌代謝疾患. 第85回日本内分泌学会学術総会. 愛知, 2012,4,19-21.
- 2) 宮本 薫: 幹細胞を用いたステロイドホルモン合成関連遺伝子の転写制御と再生医療. 日本生化学会北陸支部第30回大会記念シンポジウム. 金沢, 2012,5,26.
- 3) Miyamoto, K., Yazawa, T., Mizutani, T.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineage by NR5A family transcription factors. *Breast cancer. The 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Can-*

cer. 金沢, 2012,11.15-17.

(一般演題)

- 1) 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, 宮本 薫: クロマチン構造の変化を介した Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) の転写調節メカニズム. 第23回 間脳・下垂体・副腎系研究会. 東京, 2012,3,31.
- 2) 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 梅澤明弘, 宮本 薫: ES細胞からの副腎ステロイドホルモン産生細胞の分化誘導. 第23回 間脳・下垂体・副腎系研究会. 東京, 2012,3,31.
- 3) 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 矢澤隆志, 菅野真史, 河邊真也, 梅澤明弘, 稲谷 大, 赤木好男, 宮本 薫: GSTA3の転写調節とステロイドホルモン産生に対する役割. 第85回日本内分泌学会学術総会. 愛知, 2012,4,19-21.
- 4) 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: SF-1複合体 C/EBP β によるHSD3B2の転写調節機構の解明. 第85回日本内分泌学会学術総会. 愛知, 2012,4,19-21.
- 5) 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野真史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 宮本 薫: 顆粒膜細胞における転写因子LRH-1の転写活性化領域の同定. 第85回日本内分泌学会学術総会. 愛知, 2012,4,19-21.
- 6) 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞におけるFDX1およびFDXRのプロモーター解析. 第85回日本内分泌学会学術総会. 愛知, 2012,4,19-21.
- 7) 具 云峰, 水谷哲也, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 宮本 薫: 卵巣におけるALAS1の発現調節メカニズムの解明. 第85回日本内分泌学会学術総会. 愛知, 2012,4,19-21.
- 8) 菅野真史, 矢澤隆志, 河邊真也, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 藤枝重治, 宮本 薫: マウスES細胞特異的LRH1プロモーター解析. 第85回日本内分泌学会学術総会. 愛知, 2012,4,19-21.
- 9) 具 云峰, 水谷哲也, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 宮本 薫: 卵巣におけるNR5A family (SF-1/LRH-1) によるヘム合成律速因子 Delta-aminolevulinate synthase 1 (ALAS1) の転写調節機構. 日本生化学会北陸支部第30回記念大会. 金沢, 2012,5,26.
- 10) Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Miyamoto, K.: Identification of a novel ovarian specific isoform promoter of liver receptor homolog-1 in ovarian granulosa cells. The 94th Annual Meeting & Expo (ENDO 2012). Houston, TEXAS, 2012,6,23-26.
- 11) Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human FDXR gene by the transcription factor SF-1. The 94th Annual Meeting & Expo (ENDO 2012). Houston, TEXAS, 2012,6,23-26.
- 12) Mizutani, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe,

- S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human 5-aminolevulinate synthase 1 (ALAS1) gene in steroidogenic cells. The 94th Annual Meeting & Expo (ENDO 2012). Houston, TEXAS, 2012,6,23-26.
- 13) 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 梅澤明弘, 宮本 薫: 幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 第30回内分泌代謝学サマーセミナー, 伊香保, 2012,7,12-14.
- 14) 矢澤隆志, 河邊真也, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 宮本 薫: ES細胞由来のステロイドホルモン産生細胞の分化誘導. 日本動物学会 第83回大会, 豊中, 2012,9,13-15.
- 15) Mizutani, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Osaki, T., Minamino, N., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Steroidogenic factor 1 (SF-1) and C/EBP β cooperatively regulate human HSD3B2 gene expression. The 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. 金沢, 2012,11.15-17.
- 16) Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Miyamoto, K.: A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and specificity protein (Sp) family in ovarian granulosa cells. The 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. 金沢, 2012,11.15-17.
- 17) Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using SF-1 and LRH-1. The 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. 金沢, 2012,11.15-17.
- 18) Ju, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: SF-1/LRH-1 regulate a heme biosynthetic-related gene in steroidogenic cells. The 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. 金沢, 2012,11.15-17.
- 19) Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of ferredoxin reductase in steroidogenic cells. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. 金沢, 2012,11.15-17.
- 20) 矢澤隆志, 河邊真也, 宇佐美陽子, 菅野真史, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 宮本 薫: 生殖腺におけるCox-2 の発現制御機構. 平成24年度日本動物学会中部支部大会. 松本, 2012,11,17-18.
- 21) 河邊真也: 転写因子LRH-1の卵巣特異的アイソフォームの転写制御機構. 第3回ペプチド・ホルモン研究会. 福井, 2012,11,29.
- 22) 矢澤隆志: 失敗の連続の比較内分泌学. 日本比較内分泌学会 若手研究者交流会. 福井, 2012,11,29.
- 23) 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野真史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健

IV. 分担研究報告書

- 大, 宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞における転写因子SpファミリーおよびSF-1によるLRH-1の転写制御. 第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 福井, 2012,11,29-12,1.
- 24) 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, 尾崎 司, 南野直人, 宮本 薫: SF-1複合体の同定とその機能解析. 第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 福井市, 2012,11,29-12,1.
- 25) 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 矢澤隆志, 菅野真史, 河邊真也, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞におけるヒトGST3の転写制御と機能. 第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 福井市, 2012,11,29-12,1.
- 26) 具 云峰, 水谷哲也, 今道力敬, 矢澤隆志, 松村健大, 河邊真也, 菅野真史, 宮本 薫: ステロイド産生細胞におけるALAS1の転写調節機構及び機能解析. 第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 福井市, 2012,11,29-12,1.
- 27) 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 宮本 薫: Ferredoxin reductase 遺伝子の転写調節機構の解析. 第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 福井市, 2012,11,29-12,1.
- 28) 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 宮本 薫: ES細胞からのステロイドホルモン産生細胞. 第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 福井市, 2012,11,29-12,1.
- 29) 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野真史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞におけるSF-1を介した新規LRH-1アイソフォームの転写制御. 第35回日本分子生物学会年会. 神戸, 2012,12,11-14.
- 30) 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞におけるadrenodoxin reductase の転写解析. 第35回日本分子生物学会年会. 神戸, 2012,12,11-14.
- 31) Ju Yunfeng, 水谷哲也, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 宮本 薫: ステロイド産生細胞におけるNR5A family によるへム合成因子ALAS1の転写調節機構. 第35回日本分子生物学会年会. 神戸, 2012,12,11-14.

4. 書籍

- 1) Yazawa, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of pluripotent stem cells into steroidogenic cells: role of SF-1 regulator. *Stem Cells and Cancer Stem Cells* Vol.8, 169-177, 2012. Springer Netherlands.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

(国際出願) PCT/JP2012/74486

体外受精におけるヒト成熟卵子マーカー及びその使用

(4) PA 診断基準の再評価