

# 幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導と 細胞移植によるステロイド補充

副腎再生研究（課題番号：167005）

研究期間：平成28年 7 月27日～平成31年 3 月31日

研究代表者：柳瀬敏彦

研究員：大江賢治

## 研究成果

### 1. 研究開始当初の背景

私達は、細胞療法すなわち細胞移植によるステロイド補充の可能性を考え、幹細胞からのステロイド産生細胞の作出研究をおこない、成果をあげてきた（Endocrinology 149, 4717-25, 2008など）。

副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンは、糖代謝、炎症、電解質・水分調節に関与し、生体の恒常性維持に不可欠である。副腎不全症に対するステロイド補充療法は確立された治療法であるが、一生涯の補充が必要とされ、長期補充は視床下部－下垂体－副腎軸を抑制し、免疫や代謝に及ぼす副作用も少なくない。また、生理的な刺激に応答した補充は再現されない。

Steroidogenic factor-1/adrenal 4 binding protein (SF-1/Ad4BP、別名 Nuclear receptor 5A1 (NR5A1)) は、

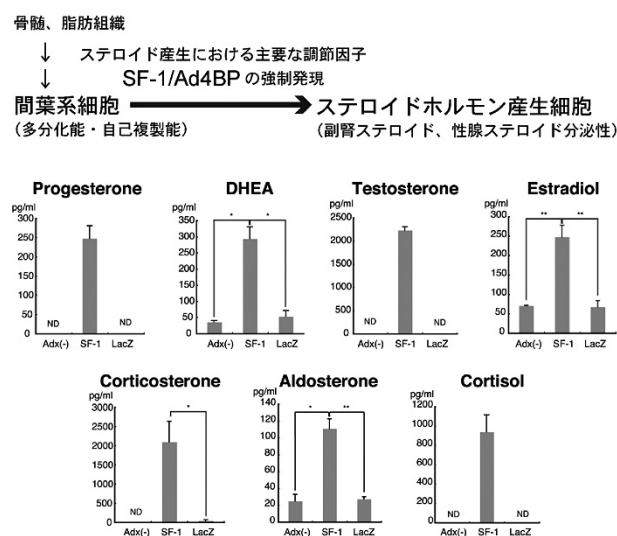


図 1) 間葉系細胞は SF-1/Ad4BP の強制発現によってステロイドホルモンを分泌する細胞に形質転換する

ステロイドホルモンの生合成に関わるすべての酵素の転写を促進させる転写因子である。また NR5A1 は、遺伝子改変マウスの表現系や、性分化疾患の遺伝子変異解析から、副腎・性腺の発生・分化に不可欠な調節因子である。

私達は、骨髄や脂肪組織に存在する間葉系細胞に SF-1/Ad4BP を強制発現させることで、ステロイド産生細胞に形質転換することを明らかにした（図 1）。

間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織などの成体組織に存在する幹細胞で、自己複製能と多分化能をもつ。脂肪由来幹細胞は、比較的侵襲が少なく、一度の採取で得られる細胞数が骨髄と比べて多いことから、分化のソースとして期待されている。

### 2. 研究の目的

これまでに、副腎不全モデル動物に不死化した副腎皮質細胞や、副腎組織の移植によって、ステロイドを補充する報告がなされている。しかし、幹細胞から作出したステロイド産生細胞を移植し、副腎不全をレスキューした報告はなされていない。本研究では、マウス間葉系細胞から作出したステロイド産生細胞を副腎不全モデルマウスに移植し、細胞移植によるステロイド補充効果を検討した。

### 3. 研究の成果

#### (1) マウス脂肪組織由来幹細胞の調整とステロイド産生細胞への形質転換

C57BL/6マウスから採取した皮下脂肪組織を、コラゲナーゼ溶液（0.2% コラゲナーゼを含む MEM alpha）にて分散後、Stromal vascular fraction (SVF) を分取した。SVF を Dexter 培地（MEM alpha、20% ウマ血清含）にて 2 週間培養し、接着細胞を Adipose tissue-derived stem/stromal cells (ADSCs) として、移植実

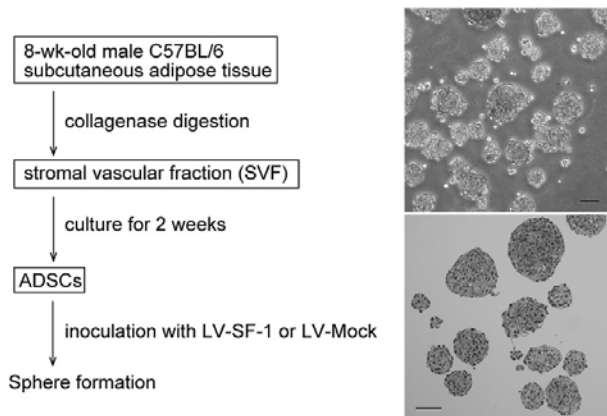


図2) 脂肪組織由来幹細胞の調整 (左)、スフェロイド形成した脂肪由来幹細胞 (右上)、HE 染色像 (右下)

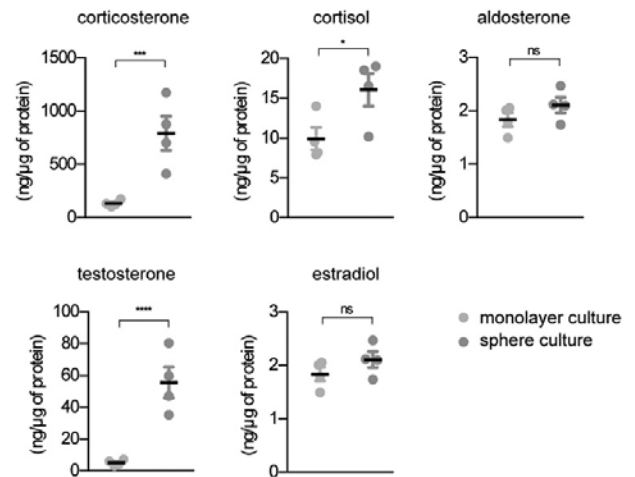


図3) 単層培養と細胞塊培養時の SF-1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞のステロイド産生量比較

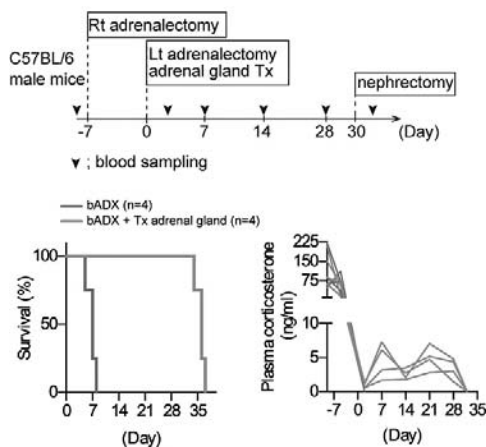
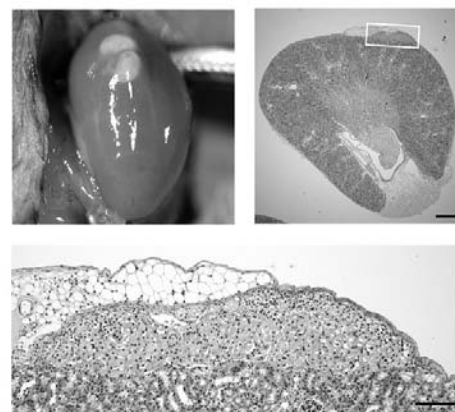


図4) 副腎摘出マウスへの副腎移植実験

左) スケジュール、生存曲線、血中コルチコステロン、右) 移植後の副腎組織像



験に使用した。ADSCs にレンチウイルスベクターを用いて、SF-1/Ad4BP または対象群として空のベクター (Mock) を感染させたのち、 $5 \times 10^5$  細胞を非接着性の 6-well ディッシュ中で 3 日間培養し、スフェロイドと呼ばれる細胞塊を形成させた (図2)。スフェロイド形成させることで、限られた移植スペースにより多くの細胞を移植することが出来る。また、スフェロイド形成させたステロイド産生細胞は、単層培養と比べて、ステロイド産生量が増加した (図3)。

## (2) 副腎不全マウスへの細胞移植によるステロイド補充効果

副腎不全モデル作製のため、C57BL/6マウスの両側副腎を二期的に摘出した。両側副腎摘出マウスは、摘出術後 5 - 8 日目に副腎不全のため死亡した。さらに、摘出した副腎組織を腎皮膜下に移植しておく、副腎不全は回避されて、マウスの生存期間が延長した (図4)。

マウスモデルへの移植実験系が確立されたので、次に、両側副腎摘出マウスに、間葉系細胞から調製したコ

ントロール細胞または、SF-1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞を移植した。コントロール細胞移植群は10匹中1匹、SF-1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞移植群では、9 匹中4 匹が30日間生存した (図5)。移植後 7 日目のコルチコステロン値を測定した結果、生存マウスの血中コルチコステロンが検出された。30日間生存したマウスから、移植した細胞を含む腎臓を摘出すると、血中コルチコステロンは不検出となり、副腎不全のため 7 日以内に死亡した。これらの結果から、移植した SF-

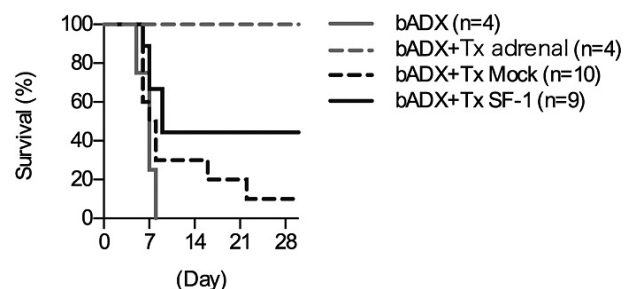


図5) SF-1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞の移植による生存期間の延長

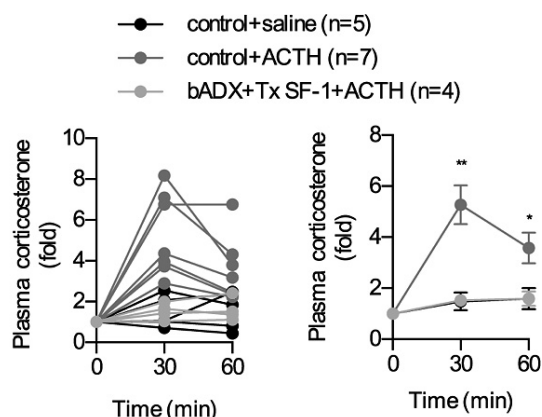


図6) SF-1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞移植マウスの ACTH 負荷試験の成績  
(左) 個体別、(右) 平均値

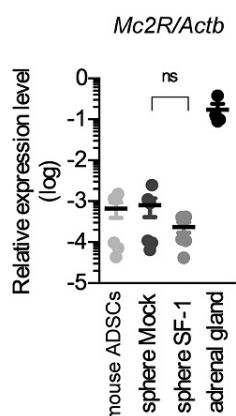


図7) マウス間葉系細胞では、SF-1/Ad4BP の強制発現によって Acth 受容体の発現は誘導されない

1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞からステロイドが補充され、副腎不全が回避されることが示された。

副腎皮質のステロイド産生は、視床下部—下垂体—副腎軸によって調節されており、下垂体が分泌する副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によって刺激される。移植後 21 日目のマウスに ACTH 負荷試験を行ったが、SF-1/Ad4BP 細胞移植マウスの、ACTH 応答性は検出されなかった (図 6)。

ACTH によるステロイド上昇が検出されなかった理由として、マウスの間葉系幹細胞は、内因性に低レベルの ACTH 受容体を発現しており、SF-1/Ad4BP を強制発現させても、ACTH 刺激に応答するレベルの ACTH 受容体の発現が誘導されない (図 7)。このために、ACTH 応答性が検出されないと考えられた。

一方、マウスの間葉系細胞とは異なり、ヒト間葉系細胞に SF-1/Ad4BP 強制発現させると、ACTH 受容体の発現が誘導され、*in vitro* では ACTH に応答してステロイド産生が増加する (Tanaka et al. 2007, JME)。このため、今後、ヒト間葉系細胞から作出したステロイド産生細胞の移植実験を行う。

近年、iPS 細胞や ES 細胞を中間胚葉に誘導したの

ちに、SF-1/Ad4BP を強制発現させると、ステロイド産生細胞へ分化誘導することが報告された。内分泌分野における再生医療への応用が期待されるが、再生ステロイド産生細胞の生体内での補充効果について検討した報告はこれまでになく、本研究によって、細胞療法によるステロイド補充の可能性が示された (論文投稿中)。

### (3) ヒト脂肪組織幹細胞由来薬剤誘導性ステロイドホルモン産生細胞

ヒト由来 NR5A1 誘導性ステロイド産生細胞を大量に調整する目的で、Tet-off SF-1/Ad4BP 発現レンチウイルスベクターを構築した。作製した組換えウイルスをヒト脂肪由来幹細胞 (Lonza 社から購入) に感染させ、遺伝子カセット (図 8) を組み込んだ。

Tet-off SF-1/Ad4BP 発現細胞は、テトラサイクリンの代謝物であるドキシサイクリン存在下で培養すると、SF-1/Ad4BP の発現は誘導されないため、分化誘導をストップした状態で、移植細胞を増殖させることが出来る。培地からドキシサイクリンを除くと、SF-1/Ad4BP の発現が上昇し、ステロイド合成酵素および ACTH 受容体の発現が誘導されることを確認した (図 9)。

今後、免疫不全マウスの両側副腎を摘出し、これらの

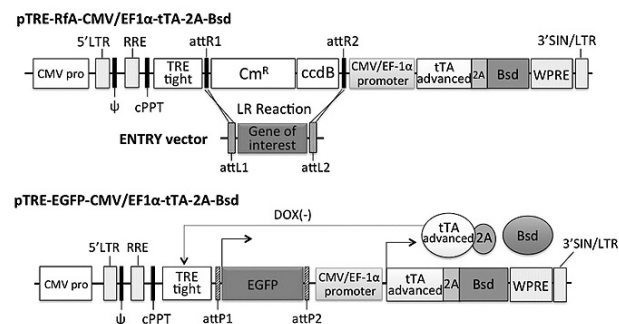


図8) Tet-off SF-1/Ad4BP 発現ベクターの構築

Gene of interest に NR5A1 cDNA を組み込み、テトラサイクリン非存在下にて NR5A1 を発現する組換えレンチウイルスを作製した。

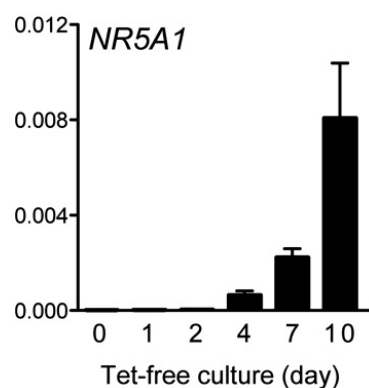


図9) Tet-OFF SF-1/Ad4BP の発現確認  
培地中からドキシサイクリンを除くと、SF-1/Ad4BP の発現が誘導される。  
縦軸は ACTB に対する相対発現量



細胞の移植実験を行い、ステロイド補充効果と、ACTH 応答性について検討を行う。

#### (4) 内因性 SF-1/Ad4BP の発現を誘導する薬剤の探索

幹細胞からステロイド産生細胞を誘導する試みは、国内外の研究グループから報告されており、ES 細胞や iPS 細胞からも中間中胚葉を経てステロイド産生の細胞が誘導可能である。いずれの報告においても、現時点では、SF-1/Ad4BP の遺伝子導入が必要である。将来的には、ステロイド産生における主要な調節因子である SF-1/Ad4BP を内因性に発現誘導させる方法の確立が必要となる。

間葉系幹細胞において SF-1/Ad4BP を発現誘導させる薬剤のスクリーニング実験を行った。ヒト脂肪由来幹細胞を、GPCR 阻害剤、キナーゼ阻害剤などを含む薬剤ライブラリー（384種、文部科学省新学術領域研究・癌支援化学療法基盤支援活動班より供与）及び薬学部松永和久教授から供与されたビタミンライブラリ（Vitamin E 類、Vitamin K 類等、32種）にて10 $\mu$ M、24時間刺激し、内因性 SF-1/Ad4BP の発現誘導をリアルタイム PCR にて検討した。しかし、内因性の SF-1/Ad4BP の発現を誘導する薬剤は得られなかった。

SF-1/Ad4BP の強制発現によって得られるステロイド産生細胞には、副腎ステロイドと性腺ステロイドとともに産生する特徴がある。副腎と性腺は、発生学的には生殖隆起の中間中胚葉という共通の原基に由来している。SF-1/Ad4BP は副腎ステロイドと性腺ステロイドとともに産生ため、未熟なステロイド産生細胞ともいえる。そこで、SF-1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞を上記薬剤にて刺激し、より副腎皮質または性腺ライディッヒに近い細胞が得られるか、検討を行った。ヒト脂肪由来幹細胞に組換えアデノウイルスを用いて SF-1/Ad4BP を強制発現させ、薬剤刺激（上記で用いたライブラリー）を行い、副腎皮質マーカーとして CYP11B1、性腺マーカーとして HSD17B3 の遺伝子発現を指標に、スクリーニングを行った。この結果、CYP11B1 や HSD17B3 の発現を増加させる薬剤が得られた。機序は不明であるが、geranylgeranyl transferase 阻害剤 GGTI-286 は、CYP11B1 の発現をコントロールに比べて増加させ、EGF 受容体阻害剤 AG1478は、HSD17B3 の発現を増加させた。また、Protein phosphatase 2 (PP2A) 阻害剤 Cantharidin は、CYP11B1 および HSD17B3 の発現とともに増加させた。

#### 4. 謝辞

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。（課題番号：167005）

#### 5. 研究業績

1. Ohe, K., Tanaka, T., Horita, Y., Harada, Y., Yamasaki, T., Abe, I., Tanabe, M., Nomiyama, T., Kobayashi, K., Enjoji, M., and Yanase, T. (2019) Circular IRE-type RNAs of the NR5A1 gene are formed in adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun* 512, 1-6
2. Muta, Y., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Hamanoue, N., Motonaga, R., Tanabe, M., Nomiyama, T., Nawata, H., and Yanase, T. (2019) Selective androgen receptor modulator, S42 has anabolic and anti-catabolic effects on cultured myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* 17, 177-181
3. Yanase, T., Oki, Y., Katabami, T., Otsuki, M., Kagayama, K., Tanaka, T., Kawate, H., Tanabe, M., Doi, M., Akehi, Y., and Ichijo, T. (2018) New diagnostic criteria of adrenal subclinical Cushing's syndrome: opinion from the Japan Endocrine Society. *Endocr J* 65, 383-393
4. Tanaka, T., Kojima, D., Mera, T., Matsumoto, M., Yasunami, Y., and Yanase, T. (2018) Expansion of transplanted islets in mice by co-transplantation with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Heliyon* 4, e00632
5. Ohe, K., Tanaka, T., Terai, H., Mori, M., Murata, Y., Enjoji, M., Akashi, M., Node, K., and Yanase, T. (2018) Asynchronous Rhythm of Ad4BP/SF-1 and Per2 Expression in Adrenal Tumors of Cushing's Syndrome. *Biomed J Sci & Tech Res*
6. Ohe, K., Miyajima, S., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Harada, Y., Horita, Y., Beppu, Y., Ito, F., Yamasaki, T., Terai, H., Mori, M., Murata, Y., Tanabe, M., Abe, I., Ashida, K., Kobayashi, K., Enjoji, M., Nomiyama, T., Yanase, T., Harada, N., Utsumi, T., and Mayeda, A. (2018) HMGA1a Induces Alternative Splicing of the Estrogen Receptor- $\alpha$  Gene by Trapping U1 snRNP to an Upstream Pseudo-5' Splice Site. *Front Mol Biosci* 5, 52
7. Ohe, K., Miyajima, S., Abe, I., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Harada, Y., Horita, Y., Beppu, Y., Ito, F., Yamasaki, T., Terai, H., Mori, M., Murata, Y., Tanabe, M., Ashida, K., Kobayashi, K., Enjoji, M., Yanase, T., Harada, N., Utsumi, T., and Mayeda, A. (2018) HMGA1a induces alternative splicing of estrogen receptor  $\alpha$  in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 182, 21-26
8. Kawanami, T., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Nomiyama, T., Nawata, H., and Yanase, T. (2018) Selective Androgen Receptor Modulator S42 Suppresses

Prostate Cancer Cell Proliferation. *Endocrinology* 159, 1774-1792

9. Yanase, T., Kawanami, T., Tanaka, T., Tanabe, M., and Nomiyama, T. (2017) Impact of metabolic disorders on prostate cancer growth: Androgen and insulin resistance perspectives. *Reprod Med Biol* 16, 252-257
10. Hamanoue, N., Tanabe, M., Tanaka, T., Akehi, Y., Murakami, J., Nomiyama, T., and Yanase, T. (2017) A higher score on the Aging Males' Symptoms scale is associated with insulin resistance in middle-aged men. *Endocr J* 64, 521-530
11. Fukuda, T., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Kawanami, T., Nomiyama, T., and Yanase, T. (2016) Augmented Growth Hormone Secretion and Stat3 Phosphorylation in an Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein (AIP)-Disrupted Somatotroph Cell Line. *PLoS One* 11, e0164131