

# 骨髄由来間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞の作製

矢澤 隆志<sup>1,2)</sup>, 梅澤 明弘<sup>3)</sup>, 宮本 薫<sup>1,2)</sup>

1) 福井大学医学部生命情報医学講座

2) CREST・JST

3) 国立成育医療センター研究所・生殖医療研究部

## はじめに

ヒトを含む哺乳動物の主要なステロイドホルモン産生組織は、生殖腺と副腎である。両組織は、中間中胚葉由来の生殖腺・副腎原基と呼ばれる共通の発生源を有する [1, 2]。発生が進み原基が分かれて、生殖腺と副腎となるときの、胎児型のステロイドホルモン産生細胞が出現して、ステロイドホルモンの合成が始まる。出生後、この胎児型のステロイドホルモン産生細胞は死滅し、思春期になると出現する成体型のステロイドホルモン産生細胞に置き換わっていく（メスの生殖腺では、ステロイドホルモン産生細胞は出生後に出現する）。このような複雑な変遷を辿るステロイドホルモン産生細胞の詳しい形成機構は、形態学的にも分子生物学的にも多くの謎が存在する。ステロイドホルモン産生細胞の発生学的な起源には、さまざまな説が提唱されているがはっきりとした結論は出ていない。さらに、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ホルモン産生細胞の形成に関わることが示唆されているものの、その詳しい作用機構には不明な点が多く残されている [2]。これは、生殖腺や副腎がステロイドホルモン産生細胞以外の複数の細胞系列からも形成されるため、その前駆細胞を単離することが事実上不可能であることや、これらの細胞に分化誘導できる細胞株が存在しないということによると考えられる。

このような複雑な組織の細胞分化機構を分子生物学的に調べる有効な手段となるのが幹細胞である。種々ある幹細胞のなかで、胚性幹細胞（ES細胞）は、その万能の分化能力から細胞分化のメカニズム解明に大きな役割を果たしてきた [3]。しかしながら、ES細胞は発生後期の細胞には分化しにくいという点に、分化した後の細胞は

増えにくいといった欠点がある。また、幹細胞研究の究極的な目的が再生医療であると考えれば、胎児を殺すことによって採取するES細胞は目的に全く合致するものではない。そこで近年、注目を集めているのが成体幹細胞である [4]。元来、成体幹細胞は、ES細胞などとは異なり、存在する組織の細胞にのみ分化すると考えられてきた。しかしながら、近年の研究で成体幹細胞は、由来組織以外の細胞にも分化しうること、さらには発生学的な起源である胚葉を越えた分化能力をもつ例すら報告されている。このような成体幹細胞は、臍帯血・神経・心臓・脂肪など多くの組織から単離されている [4-6] が、中でも特に注目されているのは骨髄由来の間葉系幹細胞である。この細胞は、骨髄の間質部に存在し、造血支持細胞、骨芽細胞、脂肪細胞といった細胞に分化する多能性幹細胞である [4, 7]。この細胞を骨髄から取り出して、さまざまな処理を行った場合、他の中胚葉系の細胞はもちろんのこと、内胚葉由来の肺や外胚葉由来の脳の細胞といった、非常に幅広い分化能力を発揮する。遺伝子操作も比較的容易であり、ジーンターゲットングを行うことに成功した初めての成体幹細胞でもある [8, 9]。また、成体の骨髄から容易に採取が可能であることから、再生医療も含めた幹細胞研究においてES細胞にとって代わる存在となりつつある。今回、私たちは、この幹細胞からステロイドホルモンを産生する細胞を作ることに成功した。

## 間葉系幹細胞のin vivoにおける分化

まず、初めに間葉系幹細胞がin vivoの環境により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か否かを確認するために、移植実験を行った。全身性に緑色蛍光タンパク質GFPを発現するgreenラットの骨髄から間葉系幹細胞を取り出し（図1A）、これを同系の3週齢・幼若ラット精巣に移植して、数週間経過させた。この時期のラットの精巣は成体型のライディッヒ細胞が出現する時期であることから、移植した幹細胞は、その

連絡先：宮本 薫，福井大学医学部生命情報医学講座，〒910-1104 福井県吉田郡松岡町下合月23-3  
TEL: 0776-61-8316  
FAX: 0776-61-8102  
E-mail: kmiyamot@fmsrsa.fukui-med.ac.jp

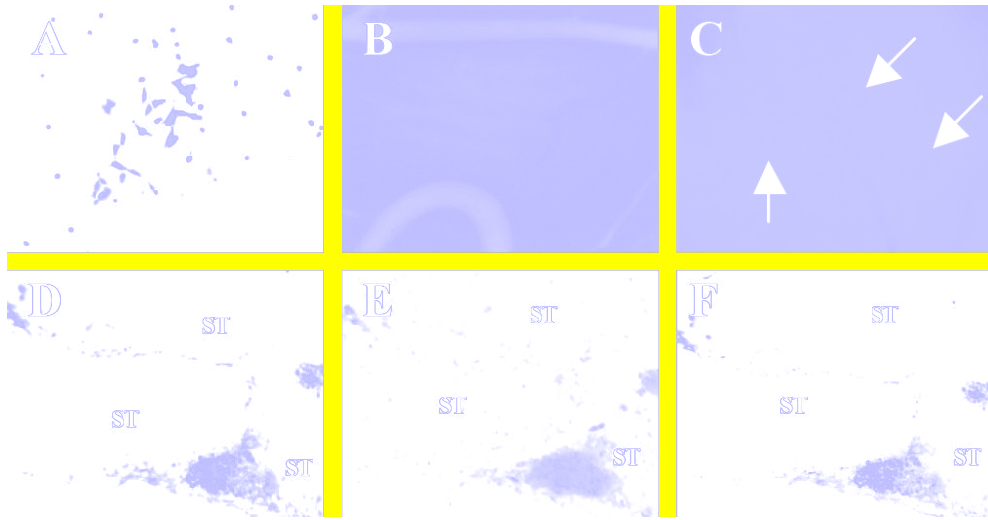


図1 間葉系幹細胞のin vivoにおける分化 (A) greenラット由来の間葉系幹細胞. (B) 細胞移植前の幼若ラット精巣. (C) 細胞移植後, 3週間経過したラット精巣. 矢印は, 生着したGFP陽性のgreenラット由来の細胞群を示す. (D) (C) で示した精巣の切片の蛍光顕微鏡写真. GFP陽性細胞を示す. (E) (D) で示した切片を抗P450scc抗体で免疫組織化学を行った像. (F) (D) と (E) の像の重ね合わせた像. ST: 精細管

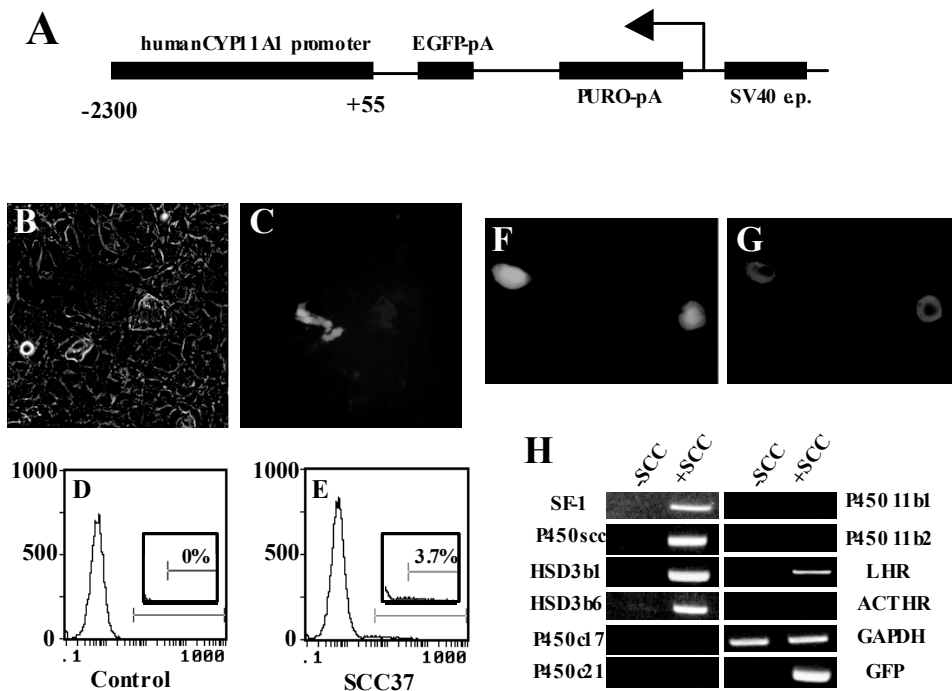


図2 間葉系幹細胞のin vitroにおける分化 (A) プロモーターソーティングに用いた, ヒトCYP11A1遺伝子5'上流域によって, ステロイドホルモン産生細胞特異的にGFPを発現するベクターの模式図. ベクター導入後, クローン選抜の過程で出現したGFP陽性の間葉系幹細胞細胞 (B, C). コントロールベクター (D) 並びに SCC-GFPベクター (E) 導入クローンにおけるGFP陽性細胞の割合をFACSによる解析した. (F) セルソーターにより分離したGFP陽性細胞と (G) その抗P450scc抗体による免疫染色の像. (H) 分離したGFP陰性 (SCC-) 並びに陽性 (SCC+) 細胞における各マーカー遺伝子の発現のRT-PCRによる解析.

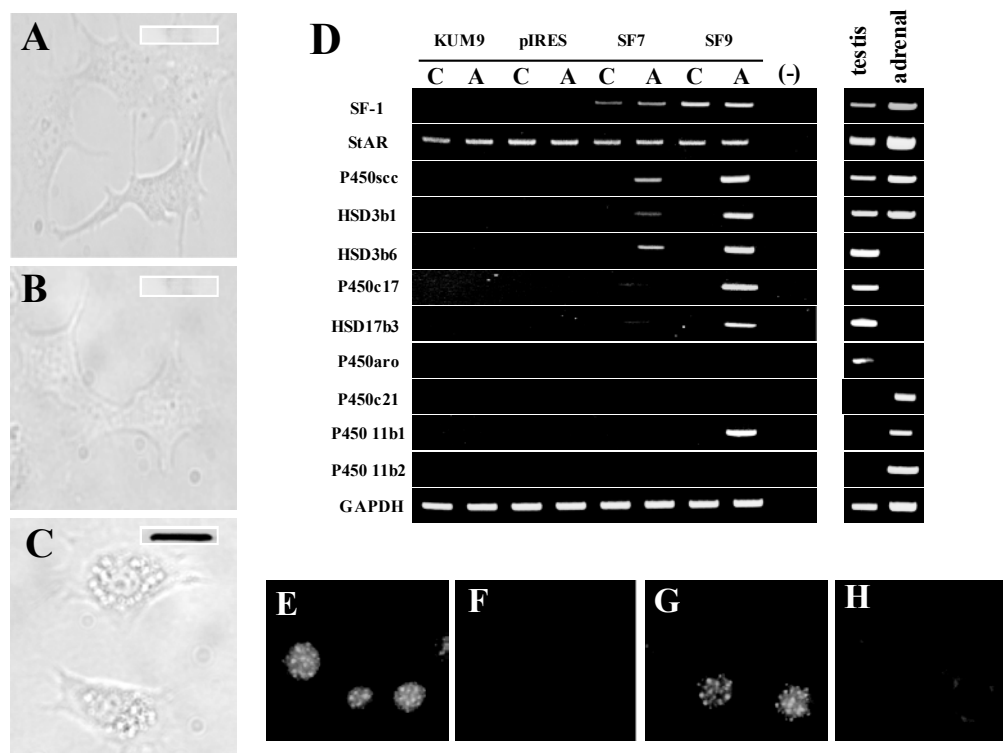


図3 間葉系幹細胞へのSF-1の安定導入による分化 (A) ベクター未導入並びに、(B) コントロールベクターあるいは (C) SF-1発現ベクターを導入した間葉系幹細胞の顕微鏡写真。切り込みは、SF-1のウエスタンブローディングの像。(D) 間葉系幹細胞由来の各細胞株並びに精巣・副腎におけるステロイドホルモン産生酵素遺伝子群のRT-PCRによる発現解析。cAMP未処理群 (C) と処理した (A) 細胞群。SF-1導入後、cAMP未処理 (E, F) 並びに処理後7日 (G, H) の間葉系幹細胞のDAPI (E, G) と抗P450scc抗体による免疫染色 (F, H) の像

分化環境の下に置くことができるものと考えられる。移植後、3週間が経過すると、GFP陽性細胞がrecipientの精巣内で生着し、間質にのみ存在した (図1 C, D)。この細胞は、ステロイドホルモン合成の律速酵素であるP450sccを発現していた (図1 F) ことから、移植した細胞はライディッヒ細胞に分化していると考えられる。しかしながら、この方法では、プラスチックシャーレに付着するという基準で間葉系幹細胞を濃縮していることから、ライディッヒ細胞に分化したと考えられる細胞が血球由来である可能性、ならびにcell fusionが起きている可能性が否定できない。

### 間葉系幹細胞のin vitroにおける分化

そこで次に、マウスの骨髄から単離・株化した間葉系幹細胞であるKUM9 [10] が、in vitroでステロイドホルモン産生細胞に分化するか否かをプロモーターソーティング法により調べた (図2)。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ヒトCYP11A1プロモーター [10] をGFP遺伝子の上流に組

み込んだレポーターベクターを作製し (図2 A)、KUM9にトランスフェクションを行った。すると、クローン選抜の過程でKUM9中には、GFP陽性の細胞がわずかながら現れた (図2 B-E)。これらの細胞をソーティングにより分離し、P450sccの抗体染色を行ったところ、陽性のシグナルが検出された (図2 F, G)。さらに、さまざまなステロイドホルモン産生細胞のマーカー遺伝子の発現をRT-PCRで調べたところ、HSD3b6やLHRといったライディッヒ細胞のマーカーが検出された (図2 H)。よって、in vivoと同様に間葉系幹細胞はステロイドホルモン産生細胞 (ライディッヒ細胞) に分化する能力を有することが分かった。

注目したい点は、この細胞が核内レセプターのAd4BP/SF-1を発現している点である。この分子は、ステロイドホルモン合成酵素群の発現を調節する転写因子であり、ステロイドホルモン合成細胞のマスタージーンではないかと考えられている [2]。そこでKUM9に、Ad4BP/SF-1の安定導入を行った (図3)。すると、ステロイドホルモン産生細胞の形態的指標である脂肪滴を細胞内に蓄積するようになった (図3 C)。しかしながら、

表 8 br-cAMP添加 (+) または非添加 (-) で培養したコントロールベクター (p IRES) ならびに、SF-1発現ベクター (SF9) 導入間葉系幹細胞が培養液中に産生するステロイドホルモン濃度 (ng/ml)

Cell (cAMP)	progesterone	testosterone	estradiol	glucocorticoid	Aldosterone
pIRES-KUM9(-)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
pIRES-KUM9(+)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
SF9-KUM9(-)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
SF9-KUM9(+)	24.3 ± 4.25	1.6 ± 0.29	N.D	N.D	N.D

1. N.D means for no detectable

2. Data are means and SEM values of at least duplicate assays.

これらの細胞はP450scc陰性であったことから、ゴナドトロピンのセカンドメッセンジャーであるcAMPを培養液に添加したところ、SF-1を導入した間葉系幹細胞はすべてがP450scc陽性となった (図3 E-H)。RT-PCRによりP450scc遺伝子の発現をみたところ、やはりSF-1を導入し、cAMPを培養液に添加したときのみシグナルが検出できた (図3 D)。さらに、その他のステロイドホルモン合成酵素の発現は、大方、精巣タイプ、つまりライディッヒ細胞に近かった。これらの結果から、間葉系幹細胞は、Ad4BP/SF-1の導入とcAMPの添加によってもライディッヒ細胞様の細胞に分化することが分かった。これは、これらの細胞が産生するステロイドホルモンが、プロジェステロンならびにテストステロンであったことから支持されると考えられる (表)。

同様の実験をマウスのES細胞 [11] を含む他の細胞群で行ったところ、StARやSR-BIといったコレステロールの輸送系を発現せずステロイドホルモンを作る細胞に分化しなかったが、ヒトの間葉系幹細胞 [12] のみがステロイドホルモン産生細胞に分化した。ただし、これはラットやマウスの場合と異なり、コーチゾールを作る副腎皮質の細胞になった。

## おわりに

このように、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することが分かった。ES細胞を初めとする他の細胞では、この能力がなかったことから間葉系幹細胞はステロイドホルモン産生細胞の研究のよいモデルであり、将来的にはステロイドホルモン産生組織の疾患に

おける再生医療への応用が期待される。

## 謝辞

ヒト間葉系幹細胞を提供していただいた京都大学医学部の戸口田淳也先生に厚く御礼を申し上げます。

## 文献

- Hatano O, Takakusa A, Nomura M, Morohashi K (1996) Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells* 1, 663-671.
- Morohashi K (1997) The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes Cells* 2, 95-106.
- Smith AG (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-462.
- Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL (2003) One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (Suppl) 1, 11917-11923.
- D'Amour KA, Gage FH (2003) Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100 (Suppl) 1, 11866-11872.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.
- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata, RK, Hankenson KD, Pace JM, Underwood RA, Song KM, Sussman M, Byers PH, Russell DW (2004) Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* 303, 1198-1201.
- Prockop DJ (2004) Targeting gene therapy for osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 350, 2302-2304.
- Hu MC, Chou SJ, Huang YY, Hsu NC, Li H, Chung BC (1999) Tissue-specific, hormonal, and developmental regulation of SCC-LacZ expression in transgenic mice leads to adrenocortical zone characterization. *Endocrinology* 140, 5609-5618.
- Crawford PA, Sadvisky Y, Milbrandt J (1997) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 directs embryonic stem cells toward the steroidogenic lineage. *Mol Cell Biol* 17, 3997-4006.
- Okamoto T, Aoyama T, Nakayama T, Nakamata T, Hosaka T, Nishijo K, Nakamura T, Kiyono T, Toguchida J (2002) Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 354-361.