

多能性幹細胞から副腎性腺原基 (Adreno-gonadal primordium) への分化誘導条件の探索

LI JINGYUE (筑波大学 生物学類)

指導教員: 久武 幸司 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

副腎は人体においてホルモン分泌に重要な役割を果たしており、その機能異常はアジソン病 (原発性慢性副腎不全) などの疾患を引き起こす。副腎機能不全症に対してステロイド補充療法が行われているが、多くの場合一生の補充が必要とし、副作用の問題も少なからず存在する。そのため、ステロイドホルモンを必要としない根本的治療法として多能性幹細胞から副腎を誘導し、移植する再生医療が期待されている。しかし、多能性幹細胞から副腎が作製された報告例はない。

副腎は 2 層構造をしており、中胚葉由来の副腎皮質および外胚葉由来の副腎髄質から構成される。副腎皮質は性腺と同様、中胚葉由来の生殖隆起より発生する副腎性腺原基 (Adrenogonadal primordium, AGP) に由来する。すなわち、副腎皮質、性腺は同じ副腎性腺原基から発生し、後に将来成人副腎皮質に分化する副腎原基 (Adrenal primordium) と性腺原基 (Gonadal primordium) に分離する。AGP の発生・分化の過程において、NR5A1 (Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1; steroidogenic factor-1, SF-1 と呼ばれる)、WT1 (Wilms' tumor-related gene 1) などの転写因子が重要な働きをしている。中でも NR5A1 は当初、ステロイド合成酵素遺伝子に対する転写因子として同定されたが、その遺伝子欠損マウスでは副腎、性腺ともに形成されないことから、AGP の発生・分化の必須因子として考えられている。副腎原基にはのちに外胚葉由来の神経堤細胞が侵入し、髄質を形成する[1,2]。多能性幹細胞から副腎髄質となる神経堤細胞への分化誘導の条件はすでに報告されているが、副腎皮質の起原である副腎性腺原基への分化誘導の条件はまだ確定されていない。

本研究では、AGP 発生の構成的理解と将来的な再生医学応用を目指し、哺乳類多能性幹細胞から AGP を誘導することを目的とする。多能性幹細胞から中胚葉への分化誘導系はすでに確立されている[3]。そのため、本研究では NR5A1 などの発現を指標としながら、中胚葉から副腎性腺原基細胞への分化誘導条件を探索する。

【方法】

(1) 副腎性腺原基の発生に関連する候補因子の選出

副腎発生に関わる因子やシグナル伝達経路について解明されてきた先行研究を参照に、AGP の発生に関連する候補因子を選出した。

(2) 多能性幹細胞との培養

ヒト iPS 細胞 (WTC11) を StemFit AK02N 培地 (+supB, supC; Ajinomoto) に Rock Inhibitor (Y-27632, 和光) と Recombinant Human Laminin 511 (iMatrix-511, Nippi) を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 日間培養した後、Day 1 から 6 日間 Stemsure DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地 (+2% B-27 supplement, 1% N-2 supplement, 1% Nonessential Amino Acids, 1% L-alanyl-L-glutamine, 1%

Monothioglycerol, 1% Penicillin/streptomycin) に候補因子を添加して、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を続けた。

ポジティブコントロールとして用いた NR5A1 の高発現が知られている副腎がん細胞株 NCI-H295R (ATCC® CRL-2128™) を Stemsure DMEM 培地 (+2% B-27 supplement, 1% N-2 supplement, 1% Nonessential Amino Acids, 1% L-alanyl-L-glutamine, 1% Monothioglycerol, 1% Penicillin/streptomycin, 2.5% Fetal Bovine Serum)、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を続けた。

(3) 目標遺伝子発現量の評価

・定量的 PCR

細胞から RNA 抽出後、逆転写により cDNA を作成し、TaqMan Assay を用いて AGP マーカー遺伝子に対する定量的 PCR を行った。

・免疫染色

細胞を 4% Paraformaldehyde で固定後、PBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄し、AGP マーカー遺伝子である NR5A1 に対する 1 次抗体 (STF-1 (D1Z2A) XP Rabbit mAB antibody, Cell Signaling TECHNOLOGY) を希釈率 1:100 で加え、続いてそれらの 1 次抗体に対する 2 次抗体を希釈率 1:200 で添加した。さらに核染色のため DAPI を加え、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果・考察】

定量的 PCR および免疫染色の結果より、未分化ヒト iPS 細胞に比べ、Retinoic Acid 添加により NR5A1 の発現量に増加が見られた。これらの結果により、Retinoic Acid は直接的または間接的に NR5A1 の発現制御に関係している可能性があると考えられる。しかし、ポジティブコントロールである NCI-H295R に比べ、非常に低い発現レベルにとどまっていた。そのため、現在の条件では、完全な AGP が誘導されたとは考えられない。

そこで、今後は公共の遺伝子発現プロファイルのデータベースなどを用いて、さらに候補因子を選出する予定である。また、培養期間について、ヒト AGP の発生に必要な期間に比べ、7 日間の培養は短いと考えられる。そこで、今後は長期培養による分化誘導実験を計画している。

【参考文献】

- [1]. Ikeda Y. *et al.*, Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol*, 7, 852-60 (1993)
- [2] Luo, X. *et al.*, A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77, 481-490 (1994)
- [3]. Sumi, T. *et al.*, Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*, 35, 2969-79. (2008)