

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08896

研究課題名（和文）ヒト下垂体組織からの成体幹細胞の分離同定法の開発

研究課題名（英文）Isolation of adult tissue stem cell in the human anterior pituitary

研究代表者

長崎 弘（Nagasaki, Hiroshi）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：30420384

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、下垂体腫瘍に対する術後後遺症の根治療法を目指し、手術時に摘出される新鮮なヒト下垂体前葉組織よりPSCを同定し、分離培養を行う目的で実施した。まず、免疫組織学的にヒト下垂体組織において下垂体幹細胞の存在を確認した。次に下垂体腫瘍症例20検体の組織を、幹細胞マーカーである Sox2・Sox9・s100 にて観察したところ、11検体の組織にて各幹細胞マーカーの陽性細胞を確認することができた。さらに新規の領域特異的なPSC表面抗原を発見する為、はじめに、入手が容易なラットおよび腫瘍組織から分離した細胞をsingle cell RNA-seq法にて解析し、いくつかの候補分子を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳下垂体腺腫は基本的に良性腫瘍であるが視野障害、下垂体前葉機能低下症、自律神経失調症や尿崩症などの重篤な障害を伴い、それらは術後後遺症として残存する。本研究でヒト正常下垂体組織に下垂体幹細胞が確認したことにより、組織幹細胞を用いた再生医療の道が開けた。また研究の過程で下垂体幹細胞に二つのサブクラスが存在するという齧歯類での知見をヒトで確認し、さらにそれらを区別する候補分子をssRNA-seq法により同定しつつあるという成果を得た。これらは下垂体前葉細胞の発生及び恒常性維持機構の解明にも繋がり、学術的な価値のある成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to identify and isolate and culture pituitary stem cells (PSCs) from human pituitary tumor tissue specimens removed at surgery for use in regenerative medicine for postoperative sequelae of pituitary tumors. First, the presence of pituitary stem cells was confirmed in human pituitary tissue by immunohistology. Next, tissues from 20 pituitary tumor samples were examined for the stem cell markers Sox2, Sox9, and s100, and positive cells for each stem cell marker were identified in 11 samples. To discover novel region-specific PSC surface antigens, we first analyzed cells isolated from readily available rat and tumor tissues by single cell RNA-seq and obtained several candidate molecules.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：pituitary tumor regenerative medicine pituitary stem cell

1. 研究開始当初の背景

脳下垂体腺腫は良性腫瘍が大半をしめる一方で、脳下垂体はホルモンの働きをコントロールし、生体機能維持の中枢を担う重要な器官であるため、良性腫瘍であるにも関わらず視野障害、下垂体前葉機能低下症、自律神経失調症や尿崩症などの重篤な障害を生ずる。また術後に後遺症が残る事も多い。近年、齧歯類において、この下垂体の前葉組織内に成体幹細胞 (PSC: Pituitary stem cells) が存在し、各種細胞へと分化能を有する事が示されている。その一方で、入手が困難であるヒトの下垂体組織における知見は非常に乏しい。

2. 研究の目的

本研究は、下垂体腫瘍に対する術後後遺症の根治療法を目的とし、手術時に摘出される新鮮なヒト下垂体前葉組織より PSC を同定し、分離培養を行う。この単離した PSC の未分化性を維持する条件を探索すると同時に、PSC の各種下垂体分化細胞への分化を制御できる様にする。これと同様に、下垂体腫瘍幹細胞 (PASC: Pituitary adenoma stem cells) も同定、分離培養し解析する事で、これまで十分に知見の得られていない PSC と PASC の相違点も探る。これらで得られた情報をもとに、将来的には、患者自身の細胞から作られたある特定の機能を有する下垂体細胞を、患者自身へ再び戻すための移植を試みる。これにより、通常おこなわれている術後治療に用いられていたホルモン補充療法等の生涯にわたる継続的な治療を必要とせず、日常生活に支障をきたす事ない、安全な治療を目指す。これは高性能な再生医療に繋がるだけでなく、下垂体前葉細胞の恒常性維持機構解明の一端を担う成果を得る事ができる。

3. 研究の方法

- 1) 下垂体腫瘍手術から得られたヒト下垂体組織における PSC と PASC の同定
- 2) げっ歯類及びヒト下垂体組織における PSC の新規特異的表面抗原の探索
- 2) ヒト下垂体組織における PSC の純化方法と培養法、内分泌機能確認

4. 研究成果

本研究における最初の確認事項である、『ヒト下垂体組織には PSC は本当に存在するのか。』という問いを明らかにするため、ヘマトキシレン・エオジン染色にて細胞の形態を確認しつつ、既知の幹細胞特異的分子マーカーの抗体を用いた免疫組織染色法にて、ヒトの摘出検体に付着する一部の正常下垂体領域にて観察し、『ヒト下垂体組織には PSC 本当に存在する。』という事を明らかにした(図1)。これと同様に、摘出検体の大部分を占める腫瘍領域に含まれる PASC の存在も確認している。これまでに下垂体腫瘍手術時に得られた症例 20 検体の組織を、幹細胞マーカーである Sox2・Sox9・s100 β にて観察したところ、11 検体の組織にて各幹細胞マーカーの陽性細胞を確認することができた。その際に Sox2, Sox9 は高い確率で共存しており、S100b は一部で共存していた(図2)。

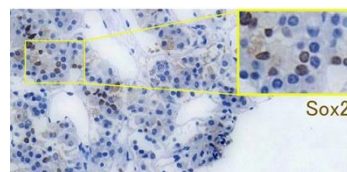


図1 下垂体成体幹細胞の同定

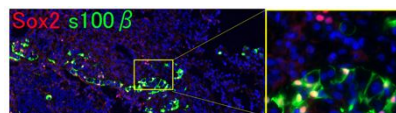


図2 腫瘍幹細胞の同定

さらに下垂体前葉内で、領域によって異なる特徴を示すと考えられている幹細胞、(1)境界PSC(下垂体中葉と前葉との境界にあるPSC)と(2)実質PSC(前葉実質にあるPSC)(図3)、それぞれの特有の性質の探索及び、新規の領域特異的なPSC表面抗原を発見する為、はじめに、入手が容易なラットを用い各組織から分離した細胞をsingle cell RNA-seq法にて解析し、結果を得つつある。

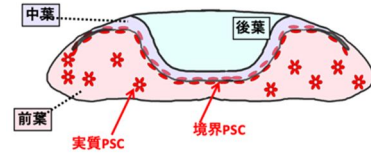


図3 下垂体成体幹細胞(PSC)模式図

次に、存在が確認できたPSC及びPASCを単離、培養するため、同様にラットを用い条件検討を行った。まず、ラット下垂体組織からPSCのみを単離するために、PSCに対し特異的な表面抗原として知られるCD9抗体を用い、MACS法によりPSCの単離を行い、これを数日培養するとsphere形成をすることが確認できた。さらに、GSK3B阻害剤(細胞増殖抑制剤)等を加え、引き続き培養することで神経細胞特異的分子マーカー

tubulin陽性細胞を確認する事ができた。また、最近、報告された論文

『下垂体組織から分離した細胞を平面培養にするとPPRX1/Sox2陽性のMPSCが増殖する(Shintani & Higuchi, 2021)』より、ヒトの摘出検体から分離した細胞においても同様の現象が観察されるか確認し、ヒト手術検体からの(1)境界PSCの単離を試み、PASCの培養もおこなったのちに、sphere形成させ、下垂体ホルモン分泌細胞への分化誘導をおこなっている(図4)。

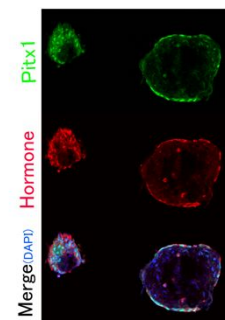


図4 腫瘍幹細胞培養(3D)

さらに、下垂体非機能性腺腫やラトケ嚢腫瘍の病理検体を用いてsingle cell RNA解析もおこなっており、ラット下垂体のsingle cell RNA解析データとの比較や、病態の異なる検体間でのPASCの差異を見出す事を目指している。

これらラットでの実験はヒト検体組織の解析の準備実験という意味だけではなく、下垂体前葉細胞の発生及び恒常性維持の解明にも繋がる。また、人の摘出検体においても同様の解析をし、ラットの結果と比較する事で、臨床的な意義も得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yu Kodani, Miho Kawata, Hidetaka Suga, Yoko S. Kaneko, Akira Nakashima, Toshiki Kameyama, Kanako Saito and Hiroshi Nagasaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of Hypothalamic MCH Neuron Development in a 3D Differentiation System of Mouse Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0442-21.2022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0442-21.2022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 目良義也、塚本舜也、鈴木つくし、河田美穂、小谷 侑、齋藤加奈子、中島 昭、亀山俊樹、長崎 弘
2. 発表標題 Differentiation of hypothalamic paraventricular neurons from direct reprogramming by gene transfer using mouse ES cells.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚本舜也、目良義也、鈴木つくし、河田美穂、小谷 侑、齋藤加奈子、中島 昭、亀山俊樹、長崎 弘
2. 発表標題 Induction of mouse ES cells into hypothalamic ventral medial nucleus and arcuate nucleus nerves by gene transfer of transcription factors.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀山俊樹、目良義也、塚本舜也、鈴木つくし、河田美穂、小谷 侑、齋藤加奈子、中島 昭、長崎 弘
2. 発表標題 Induction of hypothalamic paraventricular nucleus and supraoptic nucleus neuron by direct reprogramming.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤加奈子、西山悠也、武藤淳、河田美穂、小谷侑、亀山俊樹、長崎弘
2. 発表標題 下垂体腺腫摘出検体からのヒト下垂体幹細胞の同定
3. 学会等名 第67回 中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞表面マーカーを用いた下垂体細胞及び視床下部細胞の分離法	発明者 小谷 侑、河田美穂、 長崎 弘、須賀英隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-158406	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小谷 侑 (Kodani Yu) (60644622)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究分担者	河田 美穂 (Kawata Miho) (90761601)	藤田医科大学・医学部・助教 (33916)	
研究分担者	金子 葉子 (Kaneko Yoko) (20319263)	岐阜医療科学大学・薬学部・教授 (33708)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	田崎 加奈子 (Tasaki Kanako) (50746906)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------