

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09578

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来テストステロン産生Leydig細胞の作製と臨床応用に関する実験

研究課題名(英文) Experiments on the generation of human iPS cell-derived testosterone-producing Leydig cells and their clinical application

研究代表者

藤澤 正人 (Fujisawa, Masato)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：30243314

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)：本研究では、ヒトiPS細胞由来Leydig様細胞にトリプシン処理を施して培養皿から剥がし、これをアルギン酸ビーズに包埋することで、培養皿上でテストステロンを分泌させることに成功した。つまり、移植用の免疫隔離デバイスに細胞を包んだ状態で、テストステロン分泌能が維持されていることをin vitroで確認した。次に、この細胞をポリエチレンテレフタレート(PET)製の人工膜に貼り付け、これをメスの免疫不全マウスの皮下へ移植したところ、血清テストステロン値が上昇した個体を認めた。テストステロン産生能を有するLeydig様細胞を移植することにより、モデル動物の血清テストステロン値の改善効果を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒトiPS細胞由来Leydig様細胞を免疫隔離デバイスへと包埋する技術をin vitroで確立した。さらに、免疫不全動物の皮下へと細胞を移植することで血清テストステロン値が上昇することに成功した。この技術は、加齢性男性性腺機能低下(LOH)症候群の患者への将来的な再生医療として、細胞移植治療に応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, Leydig-like cells derived from human iPS cells were detached from culture dishes by trypsin treatment and embedded in alginate beads to successfully secrete testosterone on the dishes. The function of the cells while encased in the immunosequestration device was confirmed in vitro. Next, these cells were attached to a PET artificial membrane and engraftment of the cells into the subcutis of the female immunocompromised mice resulted in individuals with elevated serum testosterone levels. This demonstrates that engraftment of the cells with testosterone-producing Leydig-like cells improves the serum testosterone level of the model animals.

研究分野：腎泌尿器科

キーワード：Leydig細胞 iPS細胞 テストステロン 分化誘導 免疫隔離 アルギン酸ビーズ LOH症候群

## 1. 研究開始当初の背景

近年、テストステロンの部分欠如による諸症状が中高年の男性の生活の質を低下させることが注目されている。アンドロゲンの低下に伴う臨床症状は身体症状としては、骨密度の低下、筋肉量の減少、脂肪の増加、認知力の低下などを認め、性機能としては性欲の低下や勃起不全との関連が指摘されており、抑うつなどの精神症状も出現する。加齢に伴いアンドロゲンが低下することが知られており、Leydig 細胞の減少や機能低下が原因の一つと考えられている。加齢に伴うアンドロゲンの低下に起因し前述の症状を認める病態を加齢性男性性腺機能低下症候群 (LOH 症候群) と呼び、アンドロゲン補充療法 (ART) による治療が行われている。2006 年に山中らにより体細胞から様々な組織や臓器の細胞に分化する能力とほぼ無限に増殖する能力を持つヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) が作成され、現在様々な細胞への分化誘導の研究が行われている。マウス ES 細胞 (Stem cells and development. 2015) やヒト iPS 細胞 (Cell Death and Disease. 2019) から Leydig 細胞の分化誘導を試みている報告があるが、我々もこれまでの研究で、ヒト iPS 細胞からテストステロン産生能を有する Leydig 細胞を誘導する系の開発に成功している)。ART による治療は注射製剤、塗布剤、内服剤があるが、注射製剤と塗布剤が主に施行されている。注射製剤は徐放性製剤であるため効果発現まで 1 週間程度要すると言われており、血中濃度が安定しない。また 2 ~ 4 週間ごとの通院治療が必要であり、中高年期の患者にとって仕事と治療の両立は大きな問題となっている。塗布剤に関しては、通院頻度は実際に低くて済むが、毎日の塗布が必要であり、接触による他者への影響も懸念されている。これに対して、Leydig 細胞による細胞移植治療が可能になれば LOH 症候群の患者に対するアンドロゲン補充療法の代替療法となり、生理的なホルモン分泌による更なる症状の改善や通院頻度の減少が見込まれるため、QOL の改善にもつながる。現在、加齢黄斑変性に対する網膜細胞の移植 (N Engl J Med. 2017) や心筋梗塞後の心機能低下に対して心筋シートの移植治療などが行われている (Sci Rep. 2017) が、これらの疾患は再生医療によって作製された細胞が実際の組織に生着し器官を形成し機能が改善することが治療の目標となる。これに対して、Leydig 細胞などの内分泌細胞による細胞移植治療に関しては、血中ホルモン値の改善による臨床症状の改善が治療目標となる。心筋や網膜細胞の移植治療においては作製した各種細胞のレシピエントによる免疫拒絶反応の影響を考慮する必要があり、移植の成否の重大な要因となるが Leydig 細胞の移植治療においては、必ずしも細胞が組織に生着することが必要では無いため、免疫隔離処置を施すことで、現方法での自家移植から分化誘導が起きるまでの時間がかかるといったデメリットを克服し、質の高い安定した細胞を供給し移植することで、免疫拒絶反応を考慮する必要が無く、かつ安定した治療モデルの樹立が考えられる。臨床応用する段階の問題点として移植した細胞が機能することが必要であるため、本研究に対する研究課題の核心をなす学術的「問い」は免疫隔離処置を施したテストステロン産生能を有する Leydig 細胞が移植により機能するか? である。

## 2. 研究の目的

多能性幹細胞を用いた移植治療では、各個人の細胞を用いて多能性幹細胞を樹立し、分化誘導するのに必要な期間やコストならびに効率が大きな問題となっているが、Leydig 細胞のような内分泌細胞の移植治療においては、分化誘導によって得られた細胞に免疫隔離処置を施す治療モデルが考えられるため、この方法が実用化できると移植治療にかかわる問題が飛躍的に進歩

すると期待される。免疫隔離機構を用いた細胞移植に関しては糖尿病に対する膵島移植や人工膵島移植の研究 (World J Gastrointest Pathophysiol. 2012) が進められているが、細胞を長期にわたり維持し内分泌細胞としての機能を保持するものは得られていない。また、本研究の研究対象である Leydig 細胞に関しては免疫隔離処置を施した細胞移植の報告は無い。このため免疫隔離処置の Leydig 細胞に与える影響は明らかでなく、また免疫隔離処置を施した細胞移植が可能かどうか不明である。本研究の目的は分化誘導によって作製したヒト iPS 細胞由来 Leydig 細胞の免疫隔離処置による影響を評価し、より自家移植によらない最適な分化誘導や培養の条件を検討すること、ならびに免疫隔離処置細胞の移植が可能であることを調べることである。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず免疫隔離系の確立と最適な免疫隔離処置細胞の培養方法を明らかにする。免疫隔離処置の方法としてはアルギン酸に包埋する方法や半透膜を利用したデバイスを用いることを検討する。次に、ヒト iPS 細胞由来 Leydig 細胞を去勢した免疫不全マウスに移植し低テストステロン血症が改善するかを明らかにする。去勢した雄の免疫不全動物 (ヌードマウスや NOG マウス) は去勢により血清テストステロン値が検出感度以下に低下していると考えられるが、テストステロン産生能を有する Leydig 細胞を移植することによりモデル動物の血清テストステロン値の改善効果を測定する。次に薬剤去勢モデル動物に同 Leydig 細胞を移植し低テストステロン血症が改善するかを明らかにする。精巣には免疫寛容があることが知られており、同種間のみならず異種間でも精巣内への細胞移植により細胞が生着することが知られている。低テストステロン血症モデルとして ethylene dimethanesulfonate (EDS) を投与することで一過性にテストステロン産性能の低下を認めるため、この精巣にヒト iPS 細胞由来 Leydig 細胞を移植する。最後に、免疫隔離処置を施した Leydig 細胞を免疫系に異常のない SD ラットに移植し低テストステロン血症が改善するかを明らかにする。去勢した雄の SD ラットに免疫隔離処置を施した Leydig 細胞を移植し、血清テストステロン値が改善しているかどうかを測定する。

### 4. 研究成果

本研究では、ヒト iPS 細胞由来 Leydig 様細胞をトリプシン処理で培養皿から剥がし、これをアルギン酸ビーズに包埋することで、培養皿上でテストステロンを分泌させることに成功した。免疫隔離デバイスに包んだ状態での機能を、in vitro で確認した。次に、この細胞を PET 製の人工膜に貼り付け、これをメスの免疫不全マウスの皮下へ移植したところ、血清テストステロン値が上昇した個体を認めた。テストステロン産生能を有する Leydig 様細胞を移植することによりモデル動物の血清テストステロン値の改善効果を証明した。次に、薬剤去勢モデル動物に同 Leydig 細胞を移植し低テストステロン血症が改善するかを調べた。薬剤去勢モデル動物としては Ethylene Dimethane Sulfonate(EDS) を投与することで一過性にテストステロン産性能の低下を引き起こしたオスの SD ラットを採用した。このラットの精巣に Leydig 様細胞の細胞懸濁液を注入し移植したが、血清テストステロン値の上昇は見られなかった。また、この細胞を免疫隔離デバイスであるアルギン酸ビーズに包埋し、これを EDS で去勢したラットの腹腔内や腎周囲脂肪織、皮下脂肪、陰嚢内へと移植したが、血清テストステロン値は上昇しなかった。まとめると本研究では、ヒト iPS 細胞由来 Leydig 細胞を in vitro で免疫隔離処置を施すことに成功し、さらにこの細胞が免疫不全マウスの皮下で機能することも証明したが、免疫機能が

正常である動物への移植に関しては未だ成功していない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ishida Takaki, Koyanagi-Aoi Michiyo, Yamamiya Daisuke, Onishi Atsushi, Sato Katsuya, Uehara Keiichiro, Fujisawa Masato, Aoi Takashi	4. 巻 162
2. 論文標題 Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Into Testosterone-Producing Leydig-like Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab202	査読の有無 有
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katsuya Sato
2. 発表標題 Generation of human iPS cell-derived Leydig cells
3. 学会等名 The International Society for Stem Cell Research (ISSCR)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 克哉
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来Leydig細胞の作製
3. 学会等名 第109回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 克哉
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来Leydig細胞の作製法の改良と、分化過程の解明
3. 学会等名 第66回 日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 克哉
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来Leydig細胞の作製法の改良と、分化過程の解明
3. 学会等名 第71回 日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 克哉
2. 発表標題 Generation of human iPS cell-derived Leydig cells
3. 学会等名 第73回 西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト多能性幹細胞由来ライディッヒ様細胞の作製方法及びヒト多能性幹細胞由来ライディッヒ様細胞集団	発明者 青井 貴之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-021533	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔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	重村 克巳 (Shigemura Katsumi) (00457102)	神戸大学・保健学研究科・准教授  (14501)	
研究分担者	青井 貴之 (Aoi Takashi) (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授  (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石田 貴樹  (Ishida Takaki)  (10771850)	神戸大学・医学部附属病院・特定助教    (14501)	
研究分担者	千葉 公嗣  (Chiba Koji)  (40533766)	神戸大学・医学部附属病院・講師    (14501)	
研究分担者	佐藤 克哉  (Sato Katsuya)  (10961766)	神戸大学・医学部附属病院・医員    (14501)	

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