

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390350

研究課題名(和文) 微小重力環境を用いた下垂体幹細胞の培養技術の開発 人工下垂体への応用を目指して

研究課題名(英文) The development of culture technology of pituitary stem cells using the microgravity environment - with the aim of application to artificial pituitary

研究代表者

栗栖 薫 (Kurusu, kaoru)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70201473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体腫瘍幹細胞の分離培養、機能の解析を目的に研究をおこなった。非機能性下垂体腺腫60例を確保し、解離処理後に凍結保存し、サンプルの同時測定を可能とした。非機能性下垂体腺腫のホルモン分泌能を詳細に検討すると、70%以上で少量ではあるが、2つ以上の下垂体前葉ホルモンを産生していることが判明した。フローサイトメトリーにより、幹細胞マーカーであるnestinを解析し、多くの細胞で発現していることが判明した。下垂体腺腫細胞の多分泌能は、幹細胞としての性格の可能性も示唆された。今後、下垂体腫瘍細胞の多分泌能の機序を調べることで、腫瘍幹細胞につながる糸口が判明するかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The aim of our research was to reveal the way of isolation culture and the function of pituitary tumor stem cells. 60 cases non-functional pituitary adenomas were frozen and stored after the dissociation process, allowed the establishing uniform conditions for measurement of the sample. It was found that more than 70% of non-functional pituitary adenomas secreted two or more anterior pituitary hormones. Flow cytometric analyzes of nestin, a stem cell marker, was found to be expressed in non-functional pituitary adenoma cells. Multi-secretory function of the pituitary adenoma cells has also been suggested the possibility as a stem cell. In the future, by examining the mechanism of multi-secretory function of the pituitary tumor cells, a clue to tumor stem cells might be found.

研究分野：neurosurgery

キーワード：pituitary primary culture stem cell

1. 研究開始当初の背景

下垂体幹細胞は、正常下垂体のホルモン非産生細胞で、何らかの刺激(視床下部ホルモンなど)によって分化誘導され、下垂体ホルモンの恒常性維持の一役を担っている可能性が報告されている。一方、下垂体幹細胞から腫瘍化することによって下垂体腺腫になる、とする報告もあり、下垂体幹細胞には不明な点が多い。下垂体幹細胞の研究はラットを用いて行われることが多く、ヒトでの研究は進んでいない。それは、下垂体腺腫自体が良性腫瘍で増殖能が比較的弱いことから分かるように、幹細胞自体の増殖性も低く、また、正常下垂体を用いることが制限されることもある。そこで、下垂体腺腫の手術を通して得られる、腫瘍細胞から非常に少ない下垂体幹細胞を分離し、効果的に増殖させることが必要となってくる。

研究分担者の弓削類は、人工無重力装置(三次元重力分散型模擬微小重力発生装置:3D-クリノスタット:以下3D-クリノ) (右図)を用い、その医学的、生物学的利用についての世界初の研究開発に直接関わっている。宇宙環境の無重力状態では、細胞の分化が抑制されることに着目し、地球上で人工無重力環境を造り出す装置(3D-クリノ)を使い、細胞培養できる独自の技術を開発している。この細胞の分化抑制現象は、弓削類らにより3D-クリノを使った研究で検証され、未分化な多能性幹細胞の大量培養が可能となる知見を得ている。



研究により、無重力状態で効果的に下垂体幹細胞を分離し、高密度培養が可能となれば、視床下部ホルモン等を併用し、必要なホルモンを産生する下垂体細胞に分化・誘導することが可能となる。そうなれば、今まで開発を進めてきたゲルカプセル内に、分化・誘導した下垂体ホルモン分泌細胞を封入し、人工下垂体を作製することが可能となる。

2. 研究の目的

広島大学脳神経外科では工学部と共同で、人工下垂体の開発を目指したゲルカプセルの開発を進めてきた。近年、下垂体幹細胞が注目されているが、その分離・培養には様々な障壁があり、ヒトでの研究は進んでいない。しかし、人工無重力装置を用いることによって、未分化幹細胞の高密度培養を行うことができることが報告され、本研究では、この装置を用い、人工的に無重力状態を作ることによって、従来よりも効率的に、下垂体幹細胞の分離・培養を行い、下垂体における幹細胞の機能を解析し、人工下垂体の構築を目指すことにす

る。

3. 研究の方法

(1)下垂体培養細胞(GH3細胞、AtT-20細胞)を用いて、無重力化において、下垂体細胞が生物学的にどのように変化するかをホルモン産生能で確認。

(2)ヒト下垂体腺腫細胞の初代継代化。下垂体腫瘍細胞の幹細胞の性格の一つとして、ホルモンの多分泌能の有無に着目して調べた。まず、手術組織の一部を初代継代する手法の確立を図る。

(3)下垂体腺腫幹細胞の分離・誘導を細胞塊(sphere)形成、幹細胞マーカー、Side population法などで確認。

4. 研究成果

(1)下垂体培養細胞の無重力下での検討
成長ホルモン産生ラット下垂体腫瘍細胞(GH3細胞)については無重力下での変化に一定の傾向は認められなかった。ACTH産生ラット下垂体腫瘍細胞(AtT-20細胞)は腫瘍の増殖能は無重力下と重力下とで変化なく、ともに著しい増加を示し、ホルモンの値の変化を詳細に検討できなかった。いずれにしても、無重力環境下において、今回の検討方法では、明らかな変化は得られなかった。下垂体癌を用いることに限界があるとも考えられ、ヒト下垂体腺腫細胞を用いた検討が必要と思われた。

(2)下垂体腺腫細胞の初代継代に際して、いくつかの問題点が発生した。実験条件を均一化するために、採取後から測定までの間、凍結させる必要があり、その条件設定を行った。腫瘍組織を採取後、血球を除去し、組織を解離させ、凍結保存した。凍結の有無でホルモン産生能に大きな違いが無いことを確認できた。次に、腺腫細胞を培養すると、時間経過にしたがってホルモン分泌能が低下した。そこで、培養開始後120分での測定に一定させて下垂体腺腫細胞からのホルモン分泌能を比較するのが、妥当と判断された。

次に下垂体腺腫細胞から分泌される各種下垂体前葉ホルモンの測定検出下限を決めた。これは、使用する培養液のみを用いて測定し、得られた結果から、平均値に3.29 S.D.(標準偏差)を加える方法(*J. Radioanal. Nucl. Chem.* 245(1), 145-156 (2000))によって行うこととした。そこで、実際の測定を行い、検出下限を以下に設定した。LH = 0 mIU/ml, FSH = 0.63 mIU/ml, PRL = 0 ng/ml, GH = 0 ng/ml, TSH = 0.010 μ U/ml, and ACTH = 8.3 pg/ml.

(3)下垂体腺腫幹細胞の検討

手術摘出標本から下垂体腺腫細胞を採取し、下垂体腫瘍幹細胞の分離培養、機能の解析をおこなった。まず非機能性下垂体腺腫60例、

機能性下垂体腺腫 24 例のサンプルを確保し、すべて解離処理後に凍結保存した。

非機能性下垂体腺腫の多系統にわたるホルモン分泌能を詳細に検討すると、70%以上で少量ではあるが、2 つ以上の下垂体前葉ホルモンを産生していることが判明した。

フローサイトメトリーにより、幹細胞マーカーの1つである nestin の解析をおこなったところ、ほとんどの細胞で発現していることが判明した(下図)。下垂体細胞の多分泌能は、幹細胞としての性格の可能性も示唆された。

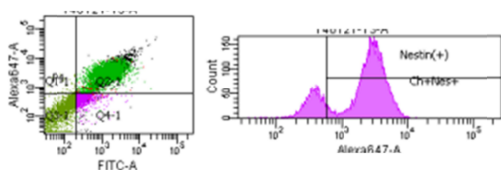


図 非機能性下垂体腺腫のフローサイトメトリー。多くの細胞で nestin 陽性を示した。

今後、下垂体腫瘍細胞の多分泌能の機序を詳しく調べることで、幹細胞につながる糸口が判明するかもしれない。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

1. Kinoshita Y., Yamasaki F., Usui S., Amatya V. J., Tominaga A., Sugiyama K., Kurisu K. Solitary Langerhans cell histiocytosis located in the neurohypophysis with a positive titer HCG-beta in the cerebrospinal fluid. Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery. 2016;32(5):901-4. (査読有)
2. Kinoshita Y., Yamasaki F., Tominaga A., Ohtaki M., Usui S., Arita K., Sugiyama K., Kurisu K. Diffusion-weighted imaging and the apparent diffusion coefficient on 3T MR imaging in the differentiation of craniopharyngiomas and germ cell tumors. Neurosurgical review. 2016;39(2):207-13. (査読有)
3. Kinoshita Y., Tominaga A., Usui S., Arita K., Sakoguchi T., Sugiyama K., Kurisu K. The long-term recurrence of Rathke's cleft cysts as predicted by histology but not by surgical procedure. Journal of neurosurgery. 2016;1-6.(査読有)
4. Kinoshita Y., Tominaga A., Usui S., Arita K., Sakoguchi T., Sugiyama K.,

Kurisu K. Clinical features and natural course of acromegaly in patients with discordance in the nadir GH level on the oral glucose test and the IGF-1 value at 3 months after adenectomy. Neurosurgical review. 2016;39(2):313-9.(査読有)

5. Shinagawa K., Mitsuhashi T., Okazaki T., Takeda M., Yamaguchi S., Magaki T., Okura Y., Uwatoko H., Kawahara Y., Yuge L., Kurisu K. The characteristics of human cranial bone marrow mesenchymal stem cells. Neuroscience letters. 2015;606:161-6.(査読有)

6. Miyamura S., Yamaguchi S., Tominaga A., Kinoshita Y., Takeda M., Usui S., Morishige M., Sugiyama K., Kurisu K. A case of petrous apex cholesterol granuloma successfully treated with endoscopic endonasal surgery. Hiroshima journal of medical sciences. 2014;63(4):39-42. (査読有)

7. Kinoshita Y., Tominaga A., Usui S., Kurisu K. A craniopharyngioma with spontaneous involution of a gadolinium-enhanced region on magnetic resonance imaging. Surgical neurology international. 2014;5:128. (査読有)

8. Kinoshita Y., Tominaga A., Usui S., Arita K., Sugiyama K., Kurisu K. Impact of subclinical haemorrhage on the pituitary gland in patients with pituitary adenomas. Clinical endocrinology. 2014;80(5):720-5. (査読有)

9. Kinoshita Y., Tominaga A., Usui S., Arita K., Sakoguchi T., Sugiyama K., Kurisu K. Pituitary adenomas in childhood and adolescence with a focus on intratumoral hemorrhage. Pituitary. 2014;17(1):1-6. (査読有)

10. Shimizu K., Tominaga A., Kinoshita Y., Usui S., Sugiyama K., Kurisu K. [A case of solitary fibrous tumor in the sella turcica]. No shinkei geka Neurological surgery. 2013;41(10):883-9. (査読有)

11. Kinoshita Y., Tominaga A., Usui S., Kurisu K. A Rathke's cleft cyst located entirely in the anterior pituitary lobe. Acta neurochirurgica. 2013;155(6):1085-6. (査読有)

12. Kinoshita Y., Tominaga A., Usui S., Arita K., Sakoguchi T., Sugiyama K., Kurisu K. The arginine and GHRP-2 tests as alternatives to the insulin tolerance test for the diagnosis of adult GH deficiency in Japanese patients: a comparison. Endocrine journal. 2013;60(1):97-105.(査読有)

13. Kinoshita Y., Tominaga A., Saitoh T., Usui S., Takayasu T., Arita K., Sakoguchi T., Sugiyama K., Kurisu K. Postoperative fever specific to neuroendoscopic procedures. Neurosurgical review. Neurosurgical review. 2014;37(1):99-104. (査読有)
14. Sakoguchi T., Hama S., Tominaga A., Kinoshita Y., Sugiyama K., Arita K., Kurisu K. Growth hormone receptor expression in brain tumors. Hiroshima journal of medical sciences. 2012;61(1):1-6. (査読有)
15. Kinoshita Y., Hama S., Tominaga A., Arita K., Sugiyama K., Sakoguchi T., Usui S., Kurisu K. Masked hyperprolactinemia: tumor-derived factors inhibiting prolactin secretion caused by pituitary-stalk damage. Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia. 2011;18(12):1651-5. (査読有)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 富永篤, Endoscopic transsphenoidal surgery for pituitary adenomas and craniopharyngioma. The 4th Japan Russia Neurosurgical Symposium. 2014.10.12 Hiroshima.
2. 富永篤, Short-term and long-term results of surgery for acromegaly. Pituitary Expert Meeting in Asia. 2014.10.3 Tokyo.
3. 碓井智, 下垂体腫瘍にともなう高プロラクチン血症における GHRP 負荷試験と TRH 負荷試験との比較, 第 24 回 間脳下垂体腫瘍学会. 2014.2.21 福岡.
4. 木下康之. 頭蓋咽頭腫と胚細胞腫瘍の鑑別における拡散係数の有用性, 第 37 回 日本脳神経 CI 学会総会. 2014.2.28 大宮.
5. 木下康之. 下垂体腺腫内の無症候性出血が下垂体機能へ及ぼす影響. 第 87 回 日本内分泌学会学術総会. 2014.4.24 福岡.
6. 富永篤, 2010 年の治癒基準における先端巨大症の手術治療成績. 第 73 回 日本脳神経外科学会総会. 2014.10.9 東京.
7. 富永篤, 下垂体腫瘍の治療前後の下垂体機能の管理 - 外科の立場から -. 第 87 回 日本内分泌学会学術総会. 2014.4.24 福岡.
8. 栗栖薫, Three dimensional and 4 dimensional MDCT for spinal vascular lesions - its usefulness and efficacy of these expression, 世界脳神経外科連盟教育コース, 2013.7.23 ベレム, ブラジル
9. 栗栖薫, Advanced MRI to evaluate pathophysiology of brain tumors - especially on histologic differential diagnosis and prognosis of the patients, 世界脳神経外科連盟教育コース, 2013.7.23 ベレム, ブラジル
10. 栗栖薫, Transition and Development of Transsphenoidal Surgery to Pituitary Adenoma and Craniopharyngioma at Hiroshima University Hospital during over 30 Years, 台北国際脳神経外科シンポジウム 2013.9.14 台北, 台湾
11. 栗栖薫, Surgery for craniopharyngioma Transsphenoidal surgery, 世界脳神経外科学会学術総会, 2013.9.8 ソウル, 韓国
12. 木下康之, 下垂体腺腫の治療最前線, 第 5 回下垂体ホルモン低下症って何? 2013.3.10 広島
13. 栗栖薫, Human cranial bone derived stem cells have the remarkable capacity to differentiate into neural lineages, 第 3 回国際再建脳神経外科会議, 2012.6.10 キール, ドイツ
14. 栗栖薫, Microscopic and endoscopic removal of craniopharyngioma, ドイツ脳神経外科アカデミー招待講演, 2012.6.15 ジュネーブ, スイス
15. 栗栖薫, Microscopic and endoscopic TSS for pituitary adenoma and craniopharyngioma, special emphasis on combined use of both modality, 第 3 回日本ロシア脳神経外科シンポジウム, 2012.6.19 ノボシビルスク, ロシア
16. 富永篤, 無症候性下垂体腺腫に対する手術治療成績, 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012.4.19 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗栖 薫 (KURISU KAORU)
 広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
 研究者番号：70201473

(2) 研究分担者

弓削 類 (YUGE RUI)
 広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
 研究者番号：20263676

濱 聖司 (HAMA SEIJI)
 広島大学・医歯薬保健学研究院・研究員
 研究者番号：40397980

富永 篤 (TOMINAGA ATSUSHI)
 広島大学・医歯薬保健学研究院・研究員
 研究者番号：60274049

西本 武史 (NISHIMOTO TAKESHI)
広島大学・医歯薬保健学研究院・研究員
研究者番号： 40450580
(平成 23 年度のみ)