

令和元年6月20日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10334

研究課題名(和文)非機能性下垂体腺腫細胞の多ホルモン分泌機序解明 - 人工下垂体への応用を目指して

研究課題名(英文)Multihormonal secretion mechanism of nonfunctioning pituitary adenoma

研究代表者

富永 篤(Tominaga, Atsushi)

広島大学・医系科学研究科(医)・研究員

研究者番号：60274049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：手術時に採取可能な非機能性下垂体腺腫組織を用いて、腺腫細胞のホルモン分泌機序を解明することで、ホルモン分泌を制御した腺腫細胞をつくり、人工下垂体の構築を目指すことを目的とした。摘出標本の非機能性下垂体腺腫細胞を単離せず、細胞間接着を維持したままの培養を行うCTOS(cancer tissue-originated spheroid)法を用いて、細胞塊での初代培養を可能とした。培養液中の微量な下垂体前葉ホルモン分泌を詳細に測定した。すると、ほぼすべての症例で何らかの下垂体前葉ホルモンの分泌を認め、70%以上の症例で3種類以上の下垂体前葉ホルモンの分泌を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下垂体は障害を受けると、合成ホルモン剤の内服による補充療法が生涯必要となる。しかし、従来の補充療法では、日常生活での微妙な変化を反映させることができない。そこで、人工下垂体の構築が望まれる。本研究では手術時に採取可能な非機能性下垂体腺腫組織を用いて、腺腫細胞のホルモン分泌機序を解明することで、ホルモン分泌を制御した腺腫細胞をつくり、人工下垂体の構築を目指すこととした。腺腫細胞からほぼすべての症例で微量の下垂体ホルモン分泌を認めた。微量のACTH分泌例では海綿静脈洞浸潤や嚢胞形成を示す傾向にあった。形態学的特徴と非機能性下垂体腺腫が有する微量ホルモン分泌能との関連を示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the hormone secretion mechanism of adenoma cells using non-functional pituitary adenoma tissue that can be collected at the time of surgery to create adenoma cells with controlled hormone secretion lead to construct an artificial pituitary. The primary culture of cell mass was made possible using the CTOS(cancer tissue-originated spheroid) method in which non-functional pituitary adenoma cells in the isolated specimen were not isolated but cultured while maintaining intercellular adhesion. The minute amount of anterior pituitary hormone secretion in the culture solution was measured in detail. Then, almost all cases showed some anterior pituitary hormone secretion, and 70% or more cases confirmed three or more types of anterior pituitary hormone secretion.

研究分野：neurosurgery

キーワード：pituitary adenoma

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下垂体が腫瘍性病変や炎症などによって不可逆的な障害を受けると、生体のホメオスタシスが保てなくなるため、合成ホルモン剤の内服による補充療法が生涯必要となる。しかし、下垂体からのホルモン分泌は、日内変動や外的ストレスなどに反応して視床下部で生成される因子により調節されている。内服による下垂体ホルモンの補充では、そのような日常生活での微妙な変化を反映させることができず、外的ストレスへの対応や、小児期の成長、性機能などを正常に保つことが困難となることがある。

それを受け、広島大学脳神経外科では、科学研究費補助金(基盤研究(B)平成14年度~16年度)を取得し、下垂体細胞を高分子化合物ゲルで作成したカプセルに包んで体内に埋め込む方法の開発を行い、それ以降も研究が進んでいる。この方法であれば、カプセルの性状や孔の大きさを調整することにより、視床下部から分泌される因子をカプセル内に通過させて下垂体細胞を刺激させ、ホルモンをカプセル外に放出させることが可能となる。

ラット正常下垂体における下垂体分化モデルは下垂体細胞が分化する過程で、様々な因子が発現し、各々、単一のホルモンを分泌する細胞に分化すると知られている。この分化モデルをもとに、下垂体腺腫で研究され、新たな知見が散見されるものの、ヒトの正常下垂体の分化、および下垂体腺腫の腫瘍化の機序には、まだ分かっていない点も多い。下垂体のホルモン産生細胞への分化の過程が明らかにできれば、分泌能の調節も可能となり、人工下垂体の作成にも近づけるものと考えられる。

従来の研究では、下垂体腺腫細胞において、各種調節因子の発現を、RNA、蛋白レベルで解析することが主流であった。しかし、本来、ホルモン産生細胞は、細胞外からの調節因子が細胞膜上のレセプターに結合することで、ホルモン分泌を調整している。そのレセプター、あるいは、細胞外にある何らかの構造物に、分泌調整のための鍵があるとも考えられる。しかし、細胞外の構造物は多岐におよび、通常の方法では、網羅的な解析は行えなかった。そこで、我々は、下垂体腺腫細胞の細胞外構造物を網羅的に検索する手法として、国立がん研究センター研究所で開発されたアデノウイルスライブラリーに着目した。通常のアデノウイルスベクターは、細胞表面のCAR(コクサッキー・アデノウイルスレセプター)に結合して細胞内に侵入する。そこで、ウイルスを改変してCARに結合できなくして自然感染域を抑制し、代わりに標的リガンドを挿入し、特定の細胞のみに感染する標的アデノウイルスベクターを構築する。様々なリガンド配列ペプチド(2x10⁵種類以上)をアデノウイルスライブラリーとして作成し、特定の腺腫細胞に感染させ、特異的感染が成立したものを回収する。HIループの挿入配列を解析することで対象の腺腫細胞の特異抗原が同定でき、同時に、腺腫細胞に特異的に感染できるウイルスベクターも作成できる(Miura et al. Gene Therapy 2007; Nishimoto et al. Gene Therapy 2009)。

下垂体腺腫細胞に対してライブラリーによるスクリーニングを行い、ホルモン産生能の違いによって異なる下垂体腺腫細胞の表面構造を解析し、ホルモン分泌能を調節する機序の解明を目指す。

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。しかし、ヒトでの下垂体幹細胞は分離、培養が難しく、正常下垂体を用いた人工下垂体への応用は現実的ではない。一方、非機能性下垂体腺腫は、臨床上、ホルモン分泌過剰の症状は認めないが、*in vitro*では腺腫細胞から極少量ではあるが多種の下垂体ホルモンを分泌していることが知られている。そこで、手術時に採取可能な非機能性下垂体腺腫組織を用いて、腺腫細胞のホルモン分泌機序を解明することで、ホルモン分泌を制御した腺腫細胞をつくり、人工下垂体の構築を目指すこととする。

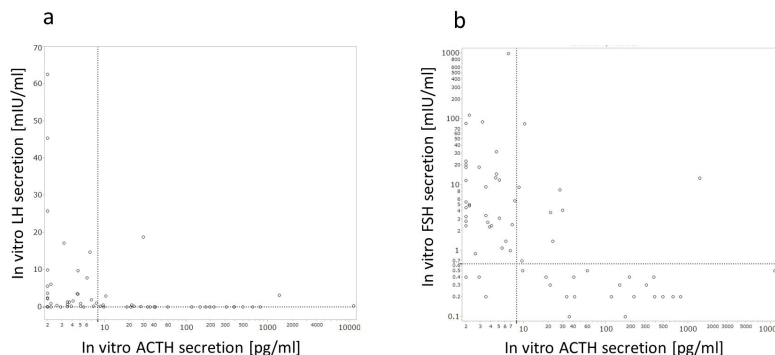
3. 研究の方法

- (1) 下垂体腺腫細胞のホルモン分泌能を細胞培養にて測定する。
- (2) ホルモン分泌能の違いに関わる因子の発現を評価する。
- (3) 下垂体分化因子のsnRNAを作成して発現を抑制し、ホルモン分泌能の変化を確認する。
- (4) アデノウイルスライブラリーを使って、ヒト下垂体培養細胞の表面特異抗原を探索する。
- (5) ホルモン分泌能と、細胞内の因子の発現パターン、表面特異抗原のパターンを比較し、下垂体腺腫におけるホルモン分泌を規定する因子の同定を試みる。
- (6) 培養細胞をゲル内に入れて、ホルモン分泌能が保たれているかどうかのチェックも行う

4. 研究成果

非機能性下垂体腺腫77症例の手術標本を集積した。Neural Tissue Dissociation Kits(Miltenyi Biotec)を用いて細胞を単離後Cell Banker(Takara Bio)内に凍結保存を行い、実験地に融解することで、同一条件下での測定を可能にした。腺腫細胞混濁液を一定の濃度で培養することで、培養液中の微量な下垂体前葉ホルモン(ACTH、LH、FSH、GH、PRL、TSH)分泌を詳細に測定した。すると、ほぼすべての症例で何らかの下垂体前葉ホルモンの分泌を認め、70%以上の症例で3種類以上の下垂体前葉ホルモンの分泌を確認した。ゴナトロピン(LH、FSH)とACTH分泌の関係性を図に示す。ACTH分泌を認める症例では、MRI上、海綿静脈洞浸潤を示す症例や嚢胞形成

を認める症例が多い傾向にあった。MRI での形態学的特徴と非機能性下垂体腺腫が有する微量ホルモン分泌能との関連を示唆する結果であった。また、単離した腫瘍細胞は長期にわたる培養に不利であることが判明したため、細胞を単離せず、細胞間接着を維持したままの培養を行う CTOS (cancer tissue-originated spheroid) 法を用いて、細胞塊での初代培養を可能とした。この技術の確立により、今後はより生体内の環境に近い状況での再現が可能となった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Nonfunctioning pituitary adenomas in elderly patients. Kinoshita Y, Kurusu K, Arita K. *J Clin Neurosci*. 2018 Jul;53:127-131. doi: 10.1016/j.jocn.2018.04.054. Epub 2018 May 5. Review. (査読有り)
2. Pitfalls of Neuroendoscopic Biopsy of Intraventricular Germ Cell Tumors. Kinoshita Y, Yamasaki F, Tominaga A, Saito T, Sakoguchi T, Takayasu T, Usui S, Sugiyama K, Arita K, Kurusu K. *World Neurosurg*. 2017 Oct;106:430-434. doi: 10.1016/j.wneu.2017.07.013. Epub 2017 Jul 12. (査読有り)
3. Transsphenoidal Posterior Pituitary Lobe Biopsy in Patients with Neurohypophysial Lesions. Kinoshita Y, Yamasaki F, Tominaga A, Usui S, Arita K, Sakoguchi T, Sugiyama K, Kurusu K. *World Neurosurg*. 2017 Mar;99:543-547. doi: 10.1016/j.wneu.2016.12.080. Epub 2016 Dec 27. (査読有り)
4. Effect of Gonadotropin and Adrenocorticotrophic Hormone Secretion on Invasiveness of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas: A Cell Culture Study. Usui S, Hama S, Tominaga A, Kinoshita Y, Kurusu K. *World Neurosurg*. 2016 Dec;96:578-584.e1. doi: 10.1016/j.wneu.2016.08.113. Epub 2016 Sep 4. (査読有り)
5. The Surgical Side Effects of Pseudocapsular Resection in Nonfunctioning Pituitary Adenomas. Kinoshita Y, Tominaga A, Usui S, Arita K, Sakoguchi T, Sugiyama K, Kurusu K. *World Neurosurg*. 2016 Sep;93:430-435.e1. doi: 10.1016/j.wneu.2016.07.036. Epub 2016 Jul 19. (査読有り)
6. 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 adenomectomy. Kinoshita Y, Tominaga A, Usui S, Arita K, Sakoguchi T, Sugiyama K, Kurusu K. *Neurosurg Rev*. 2016 Apr;39(2):313-8; discussion 318-9. doi: 10.1007/s10143-015-0692-5. Epub 2016 Jan 20. (査読有り)
7. The long-term recurrence of Rathke's cleft cysts as predicted by histology but not by surgical procedure. Kinoshita Y, Tominaga A, Usui S, Arita K, Sakoguchi T, Sugiyama K, Kurusu K. *J Neurosurg*. 2016 Oct;125(4):1002-1007. Epub 2016 Jan 15. (査読有り)
8. Diffusion-weighted imaging and the apparent diffusion coefficient on 3T MR imaging in the differentiation of craniopharyngiomas and germ cell tumors. Kinoshita Y, Yamasaki F, Tominaga A, Ohtaki M, Usui S, Arita K, Sugiyama K, Kurusu K. *Neurosurg Rev*. 2016 Apr;39(2):207-13; discussion 213. doi: 10.1007/s10143-015-0660-0. Epub 2015 Aug 18. (査読有り)
9. Solitary Langerhans cell histiocytosis located in the neurohypophysis with a positive titer HCG- β in the cerebrospinal fluid. Kinoshita Y, Yamasaki F, Usui S, Amatya VJ, Tominaga A, Sugiyama K, Kurusu K. *Childs Nerv Syst*. 2016 May;32(5):901-4. doi: 10.1007/s00381-015-2949-2. Epub 2015 Nov 2. (査読有り)

[学会発表](計 11 件)

1. 富永篤 手術後正常化した女性プロラクチノーマの長期転帰、第 29 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2019
2. 木下康之 間脳下垂体腫瘍術後の成長ホルモン分泌不全症、第 29 回日本間脳下垂体腫

- 瘍学会（招待講演） 2019
3. 碓井 智 小児、AYA 世代の悪性脳腫瘍サバイバーにおける甲状腺機能低下と補充療法 第 29 回日本間脳下垂体腫瘍学会（招待講演） 2019
 4. 富永篤 先端巨大症における手術前後の耐糖能の変化 日本内分泌学会総会 2017
 5. 木下康之 高齢者における下垂体腺腫 -最近 20 年間の論文レビュー、第 30 回 日本老年脳神経外科学会 2017
 6. 碓井 智 非機能性下垂体腺腫の浸潤性に対するゴナドトロピンと ACTH 分泌の影響：細胞培養研 第 27 回 日本間脳下垂体腫瘍学会 2017
 7. 木下康之 先端巨大症の早期発見、間脳下垂体腫瘍学会 2016
 8. 木下康之 成長ホルモン産生下垂体腺腫の術後治癒基準における 75gOGTT GH 底値の意義 日本内分泌学会総会 2016
 9. 富永篤 incidental pituitary adenoma に対する手術治療成績 間脳下垂体腫瘍学会 2016
 10. 木下康之 神経下垂体病変に対する下垂体後葉生検術の有用性 第 75 回 日本脳神経外科学会総会 2016
 11. 木下康之 非機能性下垂体腺腫に対する被膜外腫瘍摘出が下垂体機能へ及ぼす影響 第 89 回 日本内分泌学会学術総会 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：栗栖 薫

ローマ字氏名：Kurisu Kaoru

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究院（医）

職名：教授

研究者番号（8桁）：70201473

研究分担者氏名：濱 聖司

ローマ字氏名：Hama Seiji

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究院（医）

職名：研究員

研究者番号（8桁）：40397980

研究分担者氏名：木下 康之

ローマ字氏名：Kinoshita Yasuyuki

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究院（医）

職名：助教

研究者番号（8桁）：90750993

研究分担者氏名：碓井 智

ローマ字氏名：Usui Satoshi

所属研究機関名：広島大学

部局名：病院（医）

職名：医科診療医

研究者番号（8桁）：00571803

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。