

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09878

研究課題名(和文) 多能性幹細胞から視床下部と下垂体の機能的ユニットを作る

研究課題名(英文) Developing the method for induction of hypothalamic and pituitary unit

研究代表者

須賀 英隆 (Suga, Hidetaka)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20569818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体は生体の恒常性維持において重要な働きをしているが、その下垂体は視床下部の制御のもとで機能している。下垂体機能低下症に対する現行のホルモン補充療法では、視床下部の働きを代償することが出来ないため、きめ細かく変動するべき血中ホルモンを再現できない場合がある。ヒトES/iPS細胞を用いた再生医療でこの点を解決すべく、下垂体と、その上位制御器官である視床下部との同時誘導技術を開発した。分化誘導したひとつの細胞塊の中に視床下部組織と下垂体組織とが併存し、機能的に連携していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部と下垂体が機能的に連携する仕組みを試験管内で初めて再現可能とし、低血糖など周囲の環境に反応する機能的な組織となっていることが判明した。下垂体機能低下症の再生医療においてより精密なホルモン分泌を再現できる新しい技術になり得る。加えて、下垂体と視床下部の両方を有した組織を試験管内で再現できているため、下垂体と視床下部の関連を解明する上でのモデルとしても期待でき、下垂体疾患の発症メカニズムの解明にも役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The pituitary gland plays an important role in maintaining homeostasis in the living body. It functions under the control of the hypothalamus. In the current hormone replacement therapy for clinical hypopituitarism, it may not be possible to reproduce the blood hormone changes that should be finely tuned, because the function of the hypothalamus cannot be compensated. To solve this problem in regenerative medicine using human ES/iPS cells, we have developed a technique for simultaneous generation of the pituitary gland and the hypothalamus, which is the upper control organ to pituitary. In the induced cell-aggregate, hypothalamic tissue and pituitary tissue coexist and linked functionally.

研究分野：内分泌学

キーワード：視床下部 下垂体 ヒト多能性幹細胞 オルガノイド 低血糖 再生医学 発生学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下垂体ホルモン分泌が障害されると、副腎皮質ホルモン、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、性腺ホルモンなど、多くのホルモンの分泌低下を来す。放置すれば脱水、電解質異常、血圧低下、意識障害などが出現し、生命予後に重大な影響を与える場合がある。

現在の治療法は、不足しているホルモンを投与する補充療法であるが、適正に補充することは必ずしも容易ではない。例えば、下垂体 ACTH ホルモン欠乏症例に対しては生涯にわたって副腎皮質ホルモンを補充するが、その必要量は日内変動するばかりかストレスの度合いにより日によって 10 倍程度変動する。この変動する需要を、例えば 1 日 2 回の内服薬で過不足なく供給をぴたりと合わせるのには難しいと想像される。

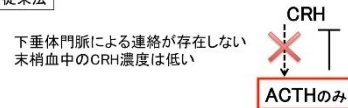
最近、幹細胞を用いた再生医療が注目されているが、糖尿病以外の内分泌疾患への再生医療の取り組みはまだ少ない。しかしながら、前述のように、生涯にわたる補充の必要性と、ホルモンの種類によっては必要量が変動する性質を考えると、失われた下垂体を再生する治療法が既存の補充療法よりも優れた治療法となる可能性があると考えられる。

申請者らはこれまでに、マウス ES 細胞を無血清浮遊培養で立体的に培養することで、下垂体前葉ホルモン産生細胞を誘導することに成功し、続いてこれをヒト ES 細胞に応用することにも成功した。申請者らの分化法は、胎児内の発生を *in vitro* で再現する点に特長がある。その中で、ヒト ES 細胞由来 ACTH 細胞は *in vitro* での検討で、上位の CRH ホルモンに反応して分泌し、下位のステロイドホルモンに反応して停止するという、内分泌細胞ならではの機能性を保持していた。*in vivo* 実験として、下垂体機能不全マウスの腎皮膜下へ異所性移植したところ、活動性と生存率とを改善する効果を示した。しかし一方でこの移植法には限界もある。分化誘導した ACTH 細胞そのものは確かに機能性を備えている。問題はその上位ホルモンである CRH で、CRH は本来視床下部ニューロンから分泌され、下垂体門脈内において有効な濃度を示し、末梢血中では ACTH 細胞を制御する濃度より低い。従って、ACTH 細胞の異所性移植のみでは、視床下部からの制御を再現できない可能性がある。

そこで本課題では視床下部 CRH ニューロンと下垂体 ACTH 細胞とを同時誘導する方法を開発することにした。もし、視床下部 CRH ニューロンと下垂体 ACTH 細胞が機能的にリンクしたユニットを誘導できれば、異所性の移植であっても、ひとつのシステムとして、現状よりも高度な内分泌系を構築できると考えた。

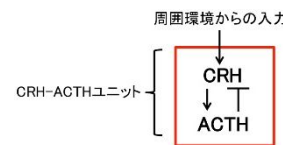
CRHとACTHとの隣接同居による効果

従来法



本課題

周囲環境からの入力にCRHニューロンが反応することで、ACTH細胞単独よりもより高い機能を持つと期待される



2. 研究の目的

申請者らが既に報告した下垂体分化法は、胎児発生を再現している点に特徴がある。発生学上、下垂体はそれのみで分化するのではなく、隣接する視床下部とシグナルを相互作用させて形成されていく。申請者らの分化法でも、視床下部前駆細胞と下垂体原基細胞とが同時に隣接して分化するように調整してある。しかし現状では、それ以降の成熟段階において、下垂体の成熟に重点を置いて培養条件を構築したため、視床下部ニューロン分化が途中で停止してしまう。この問題点を解決し、下垂体のみならず視床下部も成熟する分化条件を見出せば、視床下部と下垂体とをまとめた1つのユニットが出来上がると思った。

以上より本課題では、CRH ニューロンによる上位制御機構も組み込むことで、自律的な視床下部-下垂体複合ユニット(すなわちオルガノイド)作出を目指す。ACTH 分泌が必要な状況であるかどうかをユニット内で感知して ACTH 分泌を促すことができるようにする。

3. 研究の方法

前述の目的をふまえ、本研究課題では以下の実験テーマに沿って研究を進める。

- (1): CRH ニューロンを含んだ視床下部ニューロンが分化する条件を確立する。
 - (2): 下垂体 ACTH 細胞と視床下部 CRH ニューロンとが同時誘導される条件を確立する。
 - (3): (2) で得られた CRH-ACTH ユニットの *in vitro* 機能テストを行う。
 - (4): (2) で得られた CRH-ACTH ユニットの *in vivo* 移植テストを行う。
- (1)(2)にて分化条件を導き出し、(3)(4)にて視床下部と下垂体との相互作用・機能性を評価する。

4. 研究成果

- (1): CRH ニューロンを含んだ視床下部ニューロンが分化する条件を確立する

視床下部分化培養系でヒト iPS 細胞から CRH ニューロンを分化誘導する条件を確立した。CRH ニューロンと ACTH 細胞との共存条件探索を行う前にまず、視床下部のみの分化法で CRH ニューロンを誘導できる条件の確立を目指した。これまでに、ヒト ES 細胞から視床下部 AVP ニューロンへの分化法確立に取り組んできており、その方法で分化誘導して得られた視床下部ニューロンを詳細に検討すると、CRH が陽性に染まる細胞が含まれていることを見出した (Ogawa K et al. 2018 Scientific Reports)。この分化条件をベースにして、CRH を含む視床下部ニューロン

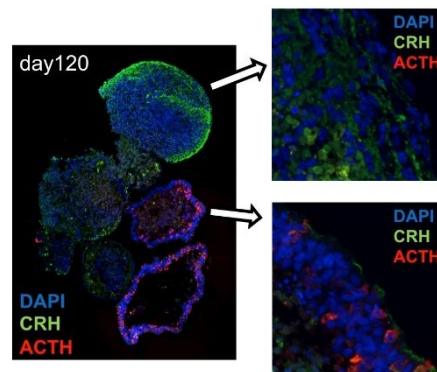
を安定して分化させる培養条件を確立した。使用する細胞としては将来の汎用性を考慮してヒト iPS 細胞とし、201B7 株・409B2 株・454E2 株など一般に広く用いられているものを複数用いることで、ロバストな分化方法へと洗練させるようにした。ストレス応答を中枢性に制御する役割を果たす視床下部 CRH ニューロンは一般に、視床下部室傍核 (PVN) の小細胞性ニューロンである。その部位の胎児での発生様式を、*in vitro* で再現できるように分化条件を調整した訳である。具体的には、視床下部前駆細胞に発現する RAX、その後、背側視床下部へと分化したことを示す PAX6 陽性かつ NKX2.1 陰性、などをマーカーとして分化ステップごとに条件を決めていった。ヒト iPS 細胞株ごとに誘導因子添加の濃度や時期に多少の違いはあるものの、最終的にはいずれの細胞株でも CRH ニューロンが分化誘導可能であることを確認した。

(2): 下垂体 ACTH 細胞と視床下部 CRH ニューロンとが同時誘導される条件を確立する

下垂体 ACTH 細胞と視床下部 CRH ニューロンとが *in vitro* で同時誘導される条件を見出した。

我々が本研究課題より以前に開発した「ヒト ES/iPS 細胞から下垂体前葉への分化法」では、分化前半は視床下部と下垂体の前駆細胞がそれぞれ共存して誘導されているが、そこから先の成熟過程では、下垂体前駆細胞は ACTH 細胞などへ最終分化を達成しているのに対して、視床下部前駆細胞は途中で分化を止めてしまい、うまく最終分化しない。そこで、(1)にて開発した「ヒト iPS 細胞から視床下部 CRH ニューロンへの分化法」の条件のうち、下垂体前葉分化法との違いを検討した上で、神経成熟に重要と想定される条件を下垂体前葉分化条件に加えた。その結果、一つの細胞塊の中に、ACTH の染まる細胞と CRH の染まる細胞とが共存する状態を作り出すことに成功した。言い換えれば、CRH ニューロンと ACTH 産生細胞とが 1 つの細胞塊内に共存したユニットが誘導できたと言える。

CRH陽性細胞とACTH陽性細胞との同時成熟

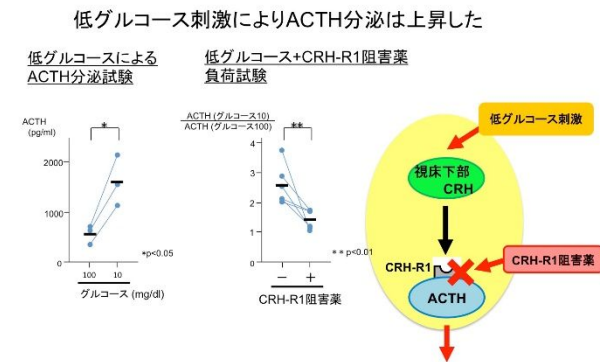


(3):(2) で得られた CRH-ACTH ユニットの *in vitro* 機能テスト

in vitro で同時誘導された CRH と ACTH とが一つのユニットとして機能することを示した。

(2)で作出した CRH-ACTH ユニットの機能的に連携しているかどうかを *in vitro* で検討した。外因性の CRH を添加しなくても培養液中の ACTH 分泌が高まる結果を得たことから、ユニット内の CRH ニューロンが機能して内因性に CRH を分泌していることが示唆された。また、低グルコース培地への暴露により ACTH 分泌が高まること、この作用は CRH レセプター阻害薬により有意に抑制されること、などから CRH のコントロール下に ACTH が置かれていることが示唆された。

ACTH陽性細胞が
同一細胞塊内の視床下部の制御を受けて機能している



(4):(2) で得られた CRH-ACTH ユニットの *in vivo* 移植テスト

ヒト iPS 細胞塊を *in vitro* で成熟させた CRH-ACTH ユニットの、下垂体機能低下マウスの腎皮膜下に移植することで、機能を示唆する結果を得た。

免疫不全 SCID マウスの下垂体を除去し、CRH 負荷試験によって ACTH 自己分泌が完全枯渇したことを確認した個体をレシピエントとして用いた。腎皮膜下に、ヒト iPS 細胞由来 CRH-ACTH ユニットの移植し、効果を検討した。移植によりマウス血中 ACTH 濃度が上昇することを確認した。以上から、生着が得られたと考えられる。このマウスにインスリンを投与することで低血糖を誘発したところ、血中 ACTH が著増した。低血糖状態を、移植ユニット内のグルコース感受性神経が感知し、CRH 神経、ACTH 細胞へとシグナルが伝わった可能性がある。一方で、マウスなど生体を用いた *in vivo* 実験では、低血糖刺激は他のホルモン系も賦活化し、移植片の ACTH 細胞へ別経路で刺激が伝わる可能性がある。今後条件を詰めることで、移植片の CRH 神経が関与しているか否か詳細に検討していく。ただし、CRH-ACTH ユニットの移植は、CRH 神経を含有する視床下部組織内に分化が不十分な状態に止まった細胞も残存しており、移植によって神経系細胞を主とした良性腫瘍が生じる個体が多発した。従って今後、腫瘍化を阻止する方法の検討も必要である。副産物的な結果として、CRH 神経を含む視床下部組織と一緒に成熟させた下垂体 ACTH 細胞は、電子顕微鏡で非常に豊富な分泌顆粒を含むことが判明した (Kasai T et al. Cell Rep. 2020)

これを踏まえ、本分化法で視床下部と下垂体と一緒に成熟する点を *in vitro* モデルとして利用することで、視床下部から分泌される FGF シグナルや BMP4 シグナルが下垂体成熟に重要であることを、ヒト細胞において明確に示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ogawa K, Suga H, Ozone C, Kano M, Mitsumoto K, Kasai T, Kodani Y, Nagasaki H, Yamamoto N, Hagiwara D, Goto M, Banno R, Sugimura Y, and Arima H	4. 巻 8
2. 論文標題 Vasopressin-secreting neurons derived from human embryonic stem cells through specific induction of dorsal hypothalamic progenitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-22053-x	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 -
1. 著者名 笠井貴敏、須賀英隆	4. 巻 264
2. 論文標題 下垂体の立体組織構築	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 653-658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kano M, Suga H, Kasai T, Ozone C, Arima H	4. 巻 83
2. 論文標題 Functional Pituitary Tissue Generation from Human Embryonic Stem Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Protoc Neurosci.	6. 最初と最後の頁 e48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpns.48	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 -
1. 著者名 Suga H.	4. 巻 375
2. 論文標題 Application of pluripotent stem cells for treatment of human neuroendocrine disorders.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 267-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-018-2880-4.	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 -

1. 著者名 須賀英隆、有馬寛	4. 巻 51
2. 論文標題 視床下部と下垂体とのハイブリッド	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 20-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加納麻弓子、須賀英隆	4. 巻 -
2. 論文標題 下垂体・視床下部オルガノイド	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学別冊 決定版オルガノイド実験スタンダード：開発者直伝！珠玉のプロトコール集	6. 最初と最後の頁 66-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasai T, Suga H, Sakakibara M, Ozone C, Matsumoto R, Kano M, Mitsumoto K, Ogawa K, Kodani Y, Nagasaki H, Inoshita N, Sugiyama M, Onoue T, Tsunekawa T, Ito Y, Takagi H, Hagiwara D, Iwama S, Goto M, Banno R, Takahashi J, Arima H.	4. 巻 30
2. 論文標題 Hypothalamic contribution to pituitary functions recapitulated in vitro using 3D-culture of human iPS cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 18-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.12.009	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24件(うち招待講演 13件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大曾根 親文, 須賀 英隆, 辻 孝, 笹井 芳樹, 有馬 寛
2. 発表標題 ヒトES/iPS細胞から機能的な下垂体前葉の試験管内誘導
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須賀英隆、有馬寛
2. 発表標題 立体培養による視床下部・下垂体の誘導
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須賀英隆、有馬寛
2. 発表標題 試験管で作る下垂体
3. 学会等名 第3回Young Rising Seminar（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須賀 英隆、大曾根 親文、小川 晃一郎、笠井 貴敏、有馬 寛
2. 発表標題 In vitroで挑戦する視床下部・下垂体の発生と分化再現
3. 学会等名 第35回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須賀 英隆
2. 発表標題 視床下部・下垂体の再生医療および病態研究
3. 学会等名 京都大学ウイルス・再生医科学研究所セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須賀 英隆、笠井 貴敏、有馬 寛
2. 発表標題 下垂体分化における視床下部隣接の意義
3. 学会等名 第32回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須賀 英隆
2. 発表標題 in vitro下垂体分化法を生体により近づける試み
3. 学会等名 第44回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 ES細胞・iPS細胞を用いた再生医療最前線
3. 学会等名 「国民との科学技術対話」に基づくアウトリーチ活動
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 視床下部・下垂体の再生医療および病態研究
3. 学会等名 第1回若手下垂体医師の会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 隆作、須賀 英隆、井口 元三、福岡 秀規、長谷川 奉延、六車 恵子、小川 渉、青井 貴之、高橋 裕
2. 発表標題 転写因子OTX2は視床下部からのFGFシグナルを介して下垂体を分化させる
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須賀英隆、杉浦慎治、長崎玲子、田村磨聖、佐藤琢、長崎晃、金森敏幸
2. 発表標題 多能性幹細胞の極性発現のための濃度勾配培養チャンパーの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 下垂体の再生医療に向けて
3. 学会等名 第6回下垂体スキルアップカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須賀英隆、有馬寛
2. 発表標題 試験管内で再現する下垂体発生
3. 学会等名 第33回日本下垂体研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidetaka Suga, Chikafumi Ozone, Koichiro Ogawa, Takatoshi Kasai, Kazuki Mistsumoto, Hiroshi Arima
2. 発表標題 Functional hypothalamus and pituitary induction in vitro from human pluripotent stem cells.
3. 学会等名 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 下垂体の再生医療
3. 学会等名 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業)間脳下垂体機能障害に関する調査研究班市民公開講座
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 間脳下垂体における再生医療
3. 学会等名 第29回日本間脳下垂体腫瘍学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀英隆、有馬寛
2. 発表標題 視床下部・下垂体疾患に対する再生医療
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井下尚子、須賀英隆
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞由来3次元培養視床下部/下垂体組織の形態学的検討 第1報
3. 学会等名 第34回下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を利用した視床下部・下垂体難病研究
3. 学会等名 中部幹細胞クラブシンポジウム2019「幹細胞人類学 幹細胞でヒトの発生・生理・疾患・進化を理解する」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀英隆、松本隆作、有馬寛
2. 発表標題 ES/iPS細胞を用いた視床下部・下垂体再生医療と病理への展開
3. 学会等名 第23回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 iPS細胞を利用した視床下部 下垂体の医療
3. 学会等名 あいちサイエンスフェスティバルサイエンストーク
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞を用いた視床下部・下垂体研究
3. 学会等名 第4回NLS(ナノライフシステム)セミナー(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidetaka Suga
2. 発表標題 Towards the Regenerative Medicine for Pituitary Using iPS Cells.
3. 学会等名 The 8th Pituitary Experts Meeting in Asia (PEMA)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須賀英隆
2. 発表標題 iPS細胞を利用した糖尿病・内分泌疾患研究
3. 学会等名 第8回名古屋大学糖尿病医療連携フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Chikafumi Ozone, Hidetaka Suga.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 248(57-65)
3. 書名 Organ Regeneration 3D Stem Cell Culture & Manipulation	

1. 著者名 Hidetaka Suga, Chikafumi Ozone.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 257(41-56)
3. 書名 Organ Regeneration Based on Developmental Biology	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養容器および細胞培養方法	発明者 須賀英隆, 有馬寛, 榊原真弓, 杉浦慎治, 田村磨聖, 佐藤琢, 長崎	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-006810	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ホームページ等 : https://www.med.nagoya-u.ac.jp/endodm/

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	有馬 寛 (Arima Hiroshi) (50422770)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	