

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16232

研究課題名（和文）視床下部下垂体相互作用におけるFGFシグナルの病態生理学的意義の解明

研究課題名（英文）The functional role of FGF signal in the interaction between hypothalamus and pituitary

研究代表者

松本 隆作（MATSUMOTO, Ryusaku）

京都大学・iPS細胞研究所・特別研究員（PD）

研究者番号：20801088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞から視床下部-下垂体オルガノイドを誘導する技術を用いて、発生期の視床下部に発現するFGFシグナルの下垂体発生における役割を検討した。ノックアウトiPS細胞を用いた検討から、FGF8は隣接する口腔外胚葉の維持に関わっており、FGF10はLHX3陽性の下垂体前駆細胞分化に重要であった。FGF受容体阻害薬を用いて下垂体発生の時期におけるFGFシグナルの役割を検討したところ、FGFシグナルは発生初期には口腔外胚葉の維持に関わっているが、下垂体ホルモン産生細胞への分化には明らかな影響はなかった。しかし後期にはホルモン産生細胞の分泌能獲得といった機能的成熟に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒトiPS細胞の分化誘導系を用いることで、これまで解析が困難であったヒトの下垂体発生をin vitroで再現し経時的に解析可能であることを示した。それによって、視床下部に発現するFGFシグナルが下垂体発生にどのように関わっており、それが実際に下垂体疾患の発症に関わっていることを示すことができた。本モデルはヒトの下垂体発生・疾患モデルとして非常に有用であり、今後更なるヒト発生学の知見を生み出すとともに、ヒト下垂体疾患における病態の解明や治療法の開発に資するものとして大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the role of hypothalamic FGF signals in pituitary development using iPSC-based hypothalamus-pituitary organoid. Knockout of FGF in iPSCs demonstrated that FGF8 was important for survival of oral ectoderm cells and FGF10 regulated LHX3+ pituitary progenitor cell differentiation. Treatment of FGFR inhibitor experiments showed that hypothalamic FGF signals have essential role in maintenance of oral ectoderm cells but no significant effect on pituitary hormone-producing cell differentiation. Interestingly, in later stage of differentiation, FGF signals are important for functional maturation of pituitary hormone-producing cells.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体 視床下部 線維芽細胞増殖因子（FGF） 口腔外胚葉 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

下垂体は様々なホルモン分泌を介して生体の恒常性を維持する内分泌器官の指令中枢である。下垂体は発生期において隣接する視床下部からのシグナルを受けて口腔外胚葉から発生分化する。その際、視床下部に **FGF8/10/18**、**BMP4**、**WNT5a** などのシグナル因子が発現し口腔外胚葉に作用することで転写因子が発現が制御され下垂体前駆細胞へと運命決定され、その後細胞増殖を経てそれぞれのホルモン分泌細胞へと分化していく。しかしこの過程において、視床下部が発現するシグナルがどういった機序でどの転写因子を調節し、どのような作用をもたらすかについては十分明らかにはされていない。また成体においては、視床下部は上位ホルモン分泌や神経入力を介して下垂体ホルモンを調整する上位器官として働くが、発生期に作用していた視床下部からのシグナルが成体においても下垂体細胞の維持や疾患発症に関わっているかは全く不明である。ノックアウトマウスの解析などからも **FGF** シグナルが下垂体発生に関して必須な働きをしていることは確かであるが、その機序の詳細についてはこれまで明らかでなかった。また、ヒトにおける下垂体発生実験モデルは存在しなかったためヒトにおける知見も存在しなかった。近年、ヒト多能性幹細胞からの視床下部-下垂体系を分化することが可能となったことで、ヒト下垂体発生機構についての知見が得られることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究ではヒト多能性幹細胞を用いて下垂体発生期の異なる時相における視床下部からの **FGF** シグナルの役割を明らかとし、成体においても疾患発症に関わっているかを明らかにすることが目的である。発生期の視床下部には **FGF8**、**10**、**18** などいくつかの **FGF** ファミリーが発現することが知られており、それぞれ結合する **FGF** 受容体のサブタイプが異なる。本研究では、下垂体発生過程をいくつかのステージに分け、それぞれの時期に **FGF** シグナルがどのように作用しているのか、**FGF** ファミリーのそれぞれがどのような役割を担っているかを明らかにすることを検討した。

3. 研究の方法

実験系としてヒト **iPS** 細胞から視床下部-下垂体系を一つの細胞塊の中に同時に誘導する分化法を採用した。本手法では下垂体発生過程における視床下部と下垂体間の組織間相互作用を *in vitro* で再現可能であり、本研究の目的を達成する上で優れたモデルである。この組織間相互作用における **FGF** シグナルの役割を明らかにするため、以下の実験を行った。

(1) **FGF** ファミリーのリガンドにおける役割の違いに関する検討

発生期の視床下部には **FGF8**、**FGF10**、**FGF18** が発現することが知られている。これらのファミリーにおける役割の違いを検討するため、ヒト **iPS** 細胞 **201B7** 株を用いて **FGF8**、**FGF10**、**FGF18** のノックアウト **iPS** 細胞を樹立し、視床下部-下垂体オルガノイドへ分化誘導することでその表現型を解析した。

(2) 視床下部 **FGF** シグナルの下垂体発生過程における時期に関する検討

ヒト **iPS** 細胞から視床下部-下垂体オルガノイドを分化誘導する過程を、口腔外胚葉から下垂体前駆細胞へ分化する前駆細胞分化期、前駆細胞から下垂体ホルモン産生細胞が出現してくるホルモン産生細胞分化期、ホルモン産生細胞の分泌能が成熟してくるホルモン産生細胞成熟期の

3つの分化ステージに分けて、それぞれの過程で **FGF** 受容体 1 型阻害薬である **PD173074** を投与することでそれぞれの時期における **FGF** シグナルの役割について検討した。

(3) 疾患発症における視床下部 **FGF** シグナルの役割についての検討

視床下部 **FGF** シグナルが実際に下垂体疾患の発症に関わっているかを検討するため、**OTX2** 変異を有する先天性下垂体機能低下症の疾患特異的 **iPS** 細胞から視床下部-下垂体オルガノイドを分化誘導し、**FGF8**、**FGF10** の発現などを検討した。

4. 研究成果

(1) **FGF** ファミリーのリガンドにおける役割の違いに関する検討

FGF8、**FGF10**、**FGF18** のホモノックアウト **iPS** 細胞を樹立し、視床下部-下垂体オルガノイドへと分化誘導を行った。**FGF8**、**FGF10** のノックアウト **iPS** 細胞で下垂体ホルモン産生細胞への分化が障害されていたが、**FGF18** のノックアウト **iPS** 細胞では明らかな表現型を認めなかった (図 1)。**FGF8**、**FGF10** ノックアウト **iPS** 細胞の分化過程における表現型を解析したところ、**FGF8** ノックアウト **iPS** 細胞では **Day20** までに一旦形成された口腔外胚葉上皮 (**PITX1**⁺/**E-cadherin**⁺) がアポトーシス亢進により **Day40** には脱落する様子が確認された。**FGF10** のノックアウト **iPS** 細胞では口腔外胚葉上皮は維持されるものの、**LHX3**⁺ の下垂体前駆細胞への分化が障害されていることが明らかとなった (図 2)。

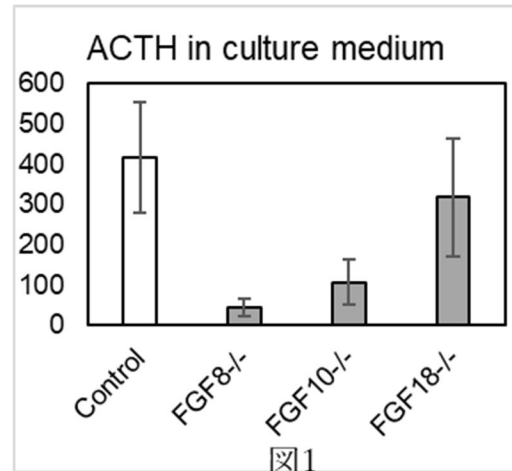


図1

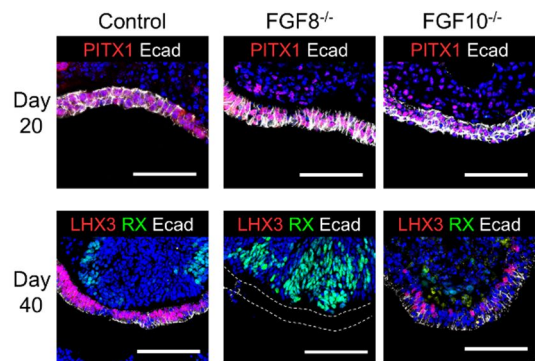


図2

(2) 視床下部 **FGF** シグナルの下垂体発生過程における時期に関する検討

健常人由来 **iPS** 細胞から誘導した視床下部-下垂体オルガノイドを用いて、前駆細胞分化期 (**day20-40**) に **PD173074** を用いて **FGF** シグナルを阻害した結果、**day20** で形成された口腔外胚葉上皮が **day40** には脱落した (図 3)。ホルモン産生細胞分化期 (**day40-60**) に **PD173074** を加えても上皮細胞は保たれており、**ACTH** 陽性のホルモン産生細胞への分化にも明らかな違いは認めなかった (図 4)。ホルモン産生細胞成熟期 (**day60-100**) に **PD173074** を加えたところ、**ACTH** 産生細胞自体の維持には明らかな影響は認めなかったものの、濃度依存的にホルモン産生細胞の **ACTH** 分泌が低

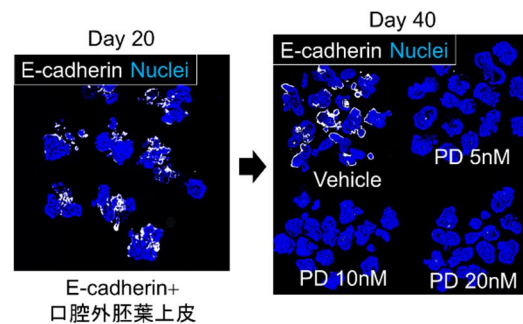


図3

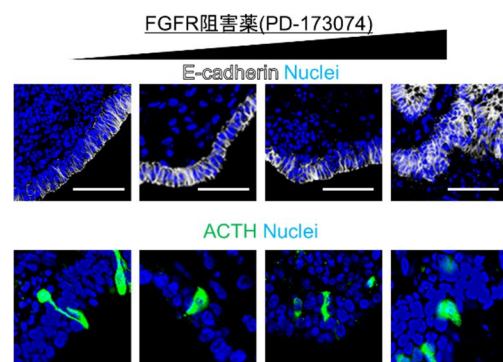


図4

下することが明らかとなった (図 5)。以上の結果から、**FGF** シグナルは下垂体発生初期には口腔外胚葉の維持に関わっているが、中期にはその作用は明らかではなく、ホルモン産生細胞への分化に対しても明らかな影響を及ぼさなかった。発生後期にはホルモン産生細胞の機能成熟に関わっており、ホルモン分泌能獲得に重要であることが示唆された。

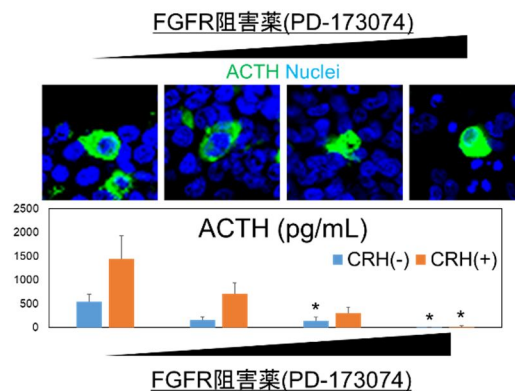


図5

(3) 疾患発症における視床下部 **FGF** シグナルの役割についての検討

先天性下垂体機能低下症の原因遺伝子のひとつである **OTX2** 変異を有する先天性下垂体機能低下症症例から樹立した疾患特異的 **iPS** 細胞を用いた検討において、疾患株では視床下部に発現する **FGF8**、**FGF10** の発現が低下し、下垂体前駆細胞への分化が障害されていることを見出した (図 6)。疾患株から誘導したオルガノイドに **FGF8** を添加すると口腔外胚葉の厚みが増加し、**FGF10** を添加すると **LHX3** 陽性下垂体前駆細胞への分化がレスキューされたことから、**OTX2** は視床下部での **FGF8**、**FGF10** の発現を制御し、隣接する口腔外胚葉の維持、下垂体前駆細胞への分化に関わっていることを見出した。

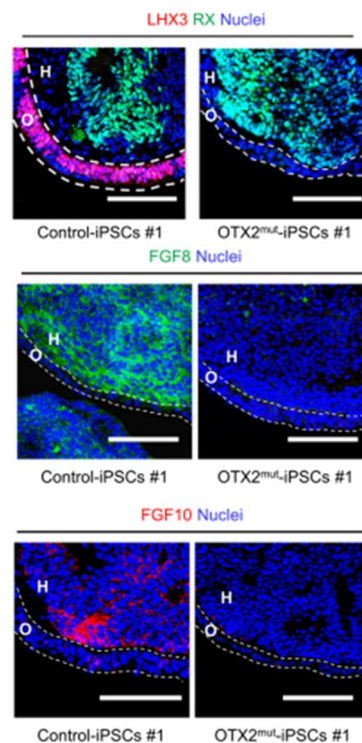


図6

以上の成果から、発生期に視床下部に発現する **FGF** シグナルはリガンドごとに異なった役割を担っており、**FGF8** は隣接する口腔外胚葉の維持に重要であり、**FGF10** は下垂体前駆細胞への分化に関わっていた。さらに、発生の時期ごとにも異なった役割を有しており、初期には口腔外胚葉の維持、後期にはホルモン産生細胞の機能成熟に関わっていると考えられた。また、疾患特異的 **iPS** 細胞を用いた解析から、視床下部に発現する **FGF** シグナルが実際の下垂体疾患の発症に関わり得ることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto Ryusaku, Takahashi Yutaka	4. 巻 78
2. 論文標題 Human pituitary development and application of iPSCs for pituitary disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 2069 ~ 2079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-020-03692-8	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Ryusaku Matsumoto, Hidetaka Suga, Takashi Aoi, Hironori Bando, Hidenori Fukuoka, Genzo Iguchi, Satoshi Narumi, Tomonobu Hasegawa, Keiko Muguruma, Wataru Ogawa, Yutaka Takahashi	4. 巻 130
2. 論文標題 Congenital pituitary hypoplasia model demonstrates hypothalamic OTX2 regulation of pituitary progenitor cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 641-654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI127378	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 該当する
1. 著者名 Takatoshi Kasai, Hidetaka Suga, Mayu Sakakibara, Chikafumi Ozone, Ryusaku Matsumoto, . . . , Hiroshi Arima	4. 巻 30
2. 論文標題 Hypothalamic Contribution to Pituitary Functions Is Recapitulated In Vitro Using 3D-Cultured Human iPSC 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 該当する
1. 著者名 Matsumoto R, Yamamoto T, Takahashi Y	4. 巻 22
2. 論文標題 Complex Organ Construction from Human Pluripotent Stem Cells for Biological Research and Disease Modeling with New Emerging Techniques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910184	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryusaku Matsumoto, Mio Kabata, Hidetaka Suga, Takuya Yamamoto
2. 発表標題 Spatial Transcriptomics for the Analysis of Human Pituitary Development
3. 学会等名 ENDO 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本隆作, 青井貴之, 小柳三千代, 須賀英隆, 福岡秀規, 井口元三, 小川渉, 高橋裕
2. 発表標題 下垂体発生における視床下部-口腔外胚葉間FGFの役割
3. 学会等名 第92回内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019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 日本内分泌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 隆作、須賀 英隆、小柳 三千代、鳴海 覚志、長谷川 奉延、六車 恵子、青井 貴之、高橋 裕
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を用いた先天性下垂体形成不全病態モデル作成
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 隆作、須賀 英隆、高橋 裕、山本 拓也
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた下垂体発生・疾患研究
3. 学会等名 第39回 内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryusaku Matsumoto, Takuya Yamamoto
2. 発表標題 ANALYSIS OF HYPOTHALAMUS-PITUITARY DEVELOPMENT USING SPATIAL TRANSCRIPTOME
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 隆作、山本 拓也
2. 発表標題 空間的トランスクリプトーム解析による下垂体発生機構の解析
3. 学会等名 第44回分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ：
https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2019_12_18_01.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------