

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16425

研究課題名（和文）iPS細胞由来オルガノイドによる下垂体GH産生腺腫疾患モデル

研究課題名（英文）Disease model of pituitary GH-producing adenoma using iPSC-derived organoid

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） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：成長ホルモン産生下垂体腫瘍（GHoma）はGH過剰産生に伴い、生命予後が著しく悪化する。しかし、これまで優れた研究モデルがなく、腫瘍発症機序についても十分には理解されていない。本研究では、ヒト特異的なGHoma in vitroモデルを構築するため、ヒトiPS細胞から下垂体オルガノイドを誘導し、原因遺伝子である変異型GNASを発現させた。これによってホルモン自律分泌能や細胞増殖能といったGHomaの特徴を有する下垂体オルガノイドを作製することに成功した。本モデルは新規治療開発にむけた薬剤スクリーニングや腫瘍発症機序の解析に応用できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GHomaは手術による根治切除が不可能な場合、生涯にわたる薬物療法を要するが、その奏効率は十分ではなく、新規治療の開発が望まれる。また、GHoma研究において、優れた研究モデルがないことは長らく課題となってきた。本研究で開発したGHomaオルガノイドはホルモン自律分泌能や細胞増殖能といったGHomaの特徴を有するヒト特異的なオルガノイドであり、GH産生腫瘍誘導後に変異型GNASを発現させることで、in vitroで腫瘍発生過程を再現することが可能である。これらの特性は新規治療開発や腫瘍発症機序を解析するうえで非常に有用であるとされる。

研究成果の概要（英文）：Growth hormone-producing pituitary tumors (GHoma) secrete excessive GH and significantly worsen patient prognosis. However, due to the lack of a good disease model, the tumorigenic mechanisms are not fully understood. Here, we developed a human-specific in vitro model for GHoma by introducing mutant GNAS, which is a causative gene for the tumor, in human iPSC-derived pituitary organoids. This enabled us to create pituitary organoids with characteristics of GHoma, such as autonomous GH secretion and enhanced cell proliferation potential. This model will be used for drug screening and analysis of tumorigenic mechanisms aimed at developing novel treatments.

研究分野：内分泌学

キーワード：GH産生腫瘍 iPS細胞 GNAS オルガノイド 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

成長ホルモン (GH) 産生下垂体腫瘍 (GHoma) は良性腫瘍であるものの、GH 過剰産生に伴い、生命予後が著しく悪化する。手術による根治切除が不可能な症例では生涯にわたる薬物療法を要するが、その奏効率は十分とは言えず、新規治療法の開発が望まれる。また、GHoma では約半数に刺激性 G 蛋白 サブユニット (GNAS) の恒常活性型変異を認めるが、その腫瘍発生機序については十分に明らかになっていない。このような治療開発や病態生理を研究する上で、GHoma の研究手法は限定的であることが実状といえる。これまで、GHoma のよいモデルマウスは確立しておらず、GH 産生細胞の培養細胞株は存在するが、げっ歯類から樹立されたものであり、ヒト細胞株は存在しない。臨床検体の初代培養が用いられることはあるが、比較的まれな腫瘍であることもあり、研究で日常的に用いることは現実的ではない。下垂体腫瘍の腫瘍発生においてはマウスとヒトで無視できない種差が存在し、ヒト特異的な研究モデルの確立が望まれる。

近年開発されたヒト iPS 細胞を用いた下垂体オルガノイド分化誘導法では、フィードバック機構などを備えた生理的な GH 産生細胞を無制限に誘導することが可能であり、再生医療への応用とともに、下垂体疾患に対する病態解析、治療開発についても大いに期待されている。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞由来下垂体オルガノイドを用いて、ヒト細胞特異的な GHoma の疾患モデルを構築し、新規治療開発などへ応用していくことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト GHoma の *in vitro* モデルを作成し、新規治療開発、腫瘍発生機序解明に応用するため、以下の実験を行った。

ゲノム編集による GHoma モデル iPS 細胞の樹立

GHoma の約半数では GNAS の恒常活性型変異が認められ、それに伴う cAMP 経路の恒常的活性化が腫瘍化の主要因と考えられる。そこで、GH 産生細胞において変異型 GNAS を強制発現させるため、ヒト iPS 細胞 201B7 株に対してセーフハーバー領域である AAVS1 領域に、CAG プロモーターの制御下に tet-ON システムのトランスアクチベーターを発現するカセットとともに、tet-ON システムのプロモーター制御下に変異型 GNAS を発現させるカセットを挿入した。

下垂体オルガノイド分化誘導による GHoma モデルの樹立

上記で樹立した iPS 細胞から GH 産生細胞を分化させる条件下で下垂体オルガノイドを誘導し、ドキシサイクリンで処理することで変異型 GNAS を発現させた。その後、GHoma の特徴である GH の自律分泌能と、GH 産生細胞の細胞増殖能を評価した。

ゲノム編集による ACTHoma モデル iPS 細胞の樹立

続いて、同様の手法を用いて、ACTH 産生腫瘍 (ACTHoma) の疾患モデル作成に取り組んだ。ACTHoma では約半数に脱ユビキチン化酵素 USP8 の活性型変異が認められる。そこで、ヒト iPS 細胞から誘導した ACTH 産生細胞特異的に変異型 USP8 を発現させるため、ACTH の前駆体である POMC 遺伝子の下流に tet-ON システムのトランスアクチベーターを挿入し、AAVS1 領域に tet-ON システムのプロモーター制御下に変異型 USP8 を発現するカセットを挿入した。

下垂体オルガノイド分化誘導による ACTHoma モデルの樹立

上記で樹立した iPS 細胞から ACTH 産生細胞を分化させる条件下で下垂体オルガノイドを誘導し、ドキシサイクリンで処理することで ACTH 産生細胞特異的に変異型 USP8 を発現させた。その後、ACTHoma の特徴である ACTH の自律分泌能と、ACTH 産生細胞の細胞増殖能を評価した。

4. 研究成果

GHoma *in vitro* モデルの構築

樹立した GHoma モデル iPS 細胞は、ドキシサイクリン存在下で変異型 GNAS の発現量が内在性の GNAS 発現と比較して 7-8 倍程度に増加することが確認できた。この iPS 細胞から GH 産生細胞を誘導する条件下で、下垂体オルガノイドの形成を行った。GH 産生細胞が出現し始める時期から培養上清中に vehicle あるいはドキシサイクリンを添加し、約 60 日間培養を行った。次に、誘導したオルガノイドに対して、GH と Ki67 の蛍光免疫染色を行い、GH 産生細胞への分化と細胞

増殖能を評価した。GH 産生細胞の数には明らかな違いは認められなかったが、vehicle 群では GH 産生細胞の Ki67 陽性率がほぼ 0%であったのに対して、ドキシサイクリン投与群では GH 産生細胞の Ki67 陽性率が 5-10%程度に上昇しており、変異型 GNAS 発現により、細胞増殖能を獲得したものと考えられた。続いて、培養上清中の GH 濃度を測定することで、GH 分泌能や分泌調節能を評価した。GH の基礎分泌能に明らかな違いは認められなかったものの、GH の抑制物質であるソマトスタチンに対する分泌抑制反応が減弱しており、GH の自律分泌能を獲得しているものと考えられた。以上の結果から、ヒト iPS 細胞から誘導した GH 産生細胞に変異型 GNAS を発現させることで、細胞増殖能と GH 自律分泌能という GHoma の特徴を備えたヒト GH 産生細胞を得られたと考えられた。本モデルはヒト GHoma の治療開発、腫瘍発生機構研究への応用が期待される。

ACTHoma in vitro モデルの構築

上記の GHoma に対するアプローチが有用であることが示されたため、同様の手法で ACTHoma のモデル構築を試みた。ゲノム編集によって樹立した iPS 細胞株はトランスアクチベーターとドキシサイクリンの存在下で変異型 USP8 の発現が増加することが確認できた。次に、この iPS 細胞から ACTH 産生細胞が出現する条件下で下垂体オルガノイドの分化誘導を行い、ACTH 産生細胞が出現する時期から、vehicle あるいはドキシサイクリンを培養上清に添加し、約 60 日間培養した。次に、ACTH と Ki67 の蛍光免疫染色を行い、ACTH 産生細胞の形態と細胞増殖能を評価した。Vehicle 群では ACTH 産生細胞が散在性に誘導され、Ki67 陽性率はほぼ 0%であったのに対して、ドキシサイクリン投与群では、ACTH 産生細胞がクラスターを形成し、Ki67 の陽性率が 5-10%程度に上昇していた。培養上清中の ACTH 濃度を測定すると、vehicle 投与群と比較して、ドキシサイクリン投与群で、経時的に ACTH 濃度が上昇していた。続いて、誘導したオルガノイドをステロイドホルモンであるデキサメサゾンで処理することで、ネガティブフィードバックによる ACTH 分泌調整能を評価した。Vehicle 群では、デキサメサゾン処理により前値の半分程度に ACTH 濃度が減少したのに対して、ドキシサイクリン投与群では濃度低下が 25%程度に減弱していた。さらに誘導したオルガノイドのシングルセル RNA シークエンスを行うことで、変異型 USP8 発現による ACTH 産生細胞における変化を検討した。オルガノイドに含まれる細胞種を検討すると、ドキシサイクリン投与群では ACTH 産生細胞の割合が増加する傾向にあった。Vehicle 投与群とドキシサイクリン投与群の遺伝子発現を比較すると、ドキシサイクリン投与群では細胞増殖関連遺伝子の発現が上昇するとともに、collagen type 4 に代表される細胞外基質に関連した遺伝子が上昇していた。

以上の結果から、ACTHoma に対しても、細胞増殖能と ACTH の自律分泌能という ACTHoma の特徴を持ったヒト ACTH 産生細胞を作成することができ、ACTHoma の in vitro モデルとして応用できると考えられる。また、本 ACTH 細胞の解析から、細胞外基質に関連する遺伝子の発現が変化していることが示唆された。細胞外基質を含む微小環境は、腫瘍発生や治療抵抗性といった表現型の修飾において大きな役割を担っていることが近年明らかとなっており、ACTHoma においても腫瘍発生と関わっている可能性が考えられる。現在、これらの細胞外基質について、ヒト検体での確認を行うとともに、本研究で樹立した ACTHoma モデルを用いて細胞外基質関連因子を含め、腫瘍発生機構の解析を進めている。

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 Ryusaku Matsumoto, Hidetaka Suga, Hiroshi Arima, Takuya Yamamoto	4. 巻 27
2. 論文標題 Disease Modeling of Pituitary Adenoma Using Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14153660	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 隆作、須賀 英隆、青井 貴之、高橋 裕、山本 拓也
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた GH産生腫瘍in vitroモデル構築
3. 学会等名 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 隆作
2. 発表標題 iPS細胞を用いたACTH産生下垂体腺腫in vitroモデルの構築
3. 学会等名 間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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