

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790955

研究課題名(和文) マウスES細胞の試験管培養によるGH、LH/FSH細胞分化の高効率化と機能確認

研究課題名(英文) Differentiation from mouse ES cells to GH, LH and FSH producing endocrine cells

研究代表者

須賀 英隆 (SUGA, Hidetaka)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：20569818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：口腔外胚葉から下垂体原基、歯のエナメル質原基、鼻腔上皮、口腔上皮などが分化するが、マウス胚性幹細胞を口腔外胚葉に分化誘導した報告は少ない。我々の既報での分化誘導方法は効率が低かったが、物質Xを加えることで口腔外胚葉の高効率での誘導に成功した。さらに物質Yを追加することで下垂体前葉原基の誘導を確認した。本研究で開発した誘導方法はFBS(胎児ウシ血清)やKSR(knockout serum replacement)のロットに影響を受けない、安定した口腔外胚葉の分化誘導方法である。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the oral ectoderm differentiates into anterior pituitary, tooth enamel, nasal epithelium and oral epithelium. In our previous report, we showed the the oral ectoderm differentiation method from mouse ES cells, but the differentiation efficiency was still low. In this study, we succeeded in oral ectoderm induction at high rate by the addition of component X. Moreover, with component Y treatment, mouse ES-derived oral ectoderm differentiates into Rathke's pouch. We established robust differentiation method from mouse ES cells into oral ectoderm, regardless of the lot difference of FBS or KSR.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：細胞分化 口腔外胚葉 ラトケ嚢

1. 研究開始当初の背景

(1)下垂体機能低下症の患者数は比較的多いが、根治療法は未確立。

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。疫学調査によると、わが国における成人下垂体機能低下症患者の1年間の受療患者数は約7,000人(厚生労働省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班、班長:加藤謙、1996年4~2002年3月)とされているが、実際には医療機関を受診するに至らない症例も相当数あると考えられ、別の推計では脳外科手術によるものだけで年間1,200人の新規発症(成人成長ホルモン分泌不全症 診断と治療のガイドライン、平成19年、成長科学協会)を指摘するものもある。

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。補充量が不足すれば副腎不全で生命に危険を及ぼし、過多となれば数年の経過後に肥満、高血圧、糖尿病、骨粗鬆症、易感染性、精神神経疾患など重大な合併症を来す。

(2)新しい治療法としての再生医療。

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和、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。

申請者らはこれまでに、マウス ES 細胞を無血清浮遊培養(SFEBq法)で立体的に培養することで、下垂体原基であるラトケ嚢様組織を誘導することに成功した(Suga, H. et.al. Nature. 2011;480:57-62)。生体においてラトケ嚢は、視床下部神経組織と口腔外胚葉組織が相互作用した結果形成されるが、ES細胞から誘導した細胞塊においても同様に、視床下部嚢様組織と口腔外胚葉様組織とが作用しあってラトケ嚢様組織を形成することを確認した。これは器官形成のモデルとも言うことができ、多種類の細胞が複雑な立体構造をもち、細胞間の連鎖的な相互作用の結果として生み出される器官や臓器も、試験管内で形成可能であることを示している。

また、ES細胞から誘導したラトケ嚢様組織

の培養を続け、ACTHホルモン産生細胞に分化させることにも成功した。分化効率、細胞塊内部の非神経細胞のうち30~40%程度と高く、invitroでのCRH添加による刺激試験において生体と同じオーダーのACTHを分泌することを確認した。副腎皮質ホルモン添加によるネガティブフィードバック機構も保たれていた。また、下垂体除去マウスに異所性に移植し、高い内分泌機能が保たれていることを確認した。

2. 研究の目的

(1)マウスES細胞からGHおよびLH/FSH産生細胞への分化を高効率化する。

前述のマウスES細胞より分化させたラトケ嚢様組織からは、ACTH以外にも全種類の下垂体ホルモン産生細胞が低効率ながら分化していることを確認している。全ての下垂体内分泌細胞を生み出すLim3+前駆細胞は効率よく分化させることが可能となっており、本研究では、それ以後の培養方法を改良することで前駆細胞からGH、LH/FSH産生細胞への分化の効率化を目指す。

一般に、GHは、小児期の成長に必要なのみならず、成人においても重要な役割を果たすホルモンで、成人GH分泌不全症では肥満、骨量減少、心血管系疾患による死亡率の上昇、うつなどを来す。わが国においては、小児のみならず成人についてもリコンビナントGH製剤の皮下注射が保険適応となったが、それでも高額な医療費が理由で中断を余儀なくされることがある。また、性腺ホルモンであるLHやFSHの欠損では、男女共に不妊を引き起こす。

下垂体ホルモンの欠損としては他に、TSHやPRL、MSHなどがあるが、臨床的希求度の比較的低いPRL、MSHや、甲状腺ホルモン投与で安定した効果が得られるTSHに比較して、GH、LH/FSHおよびACTHの臨床医学的利用価値は高い。以上のことから、既報のACTH以外では、まずGHおよびLH/FSH分泌細胞の分化効率を上げることに大きな意義があると考えている。

ヒトでの臨床応用を目指すには、ヒトES細胞やヒトiPS細胞での研究が不可欠であるが、これらヒト幹細胞は分化に長期間を要するため、当初は分化の速いマウスES細胞で実験し、得られた知見をヒト幹細胞に応用する戦略が効率的である。本研究で得られる成果を、ヒト細胞での分化誘導法に適用できるものとする。

(2)下垂体機能不全マウスへの移植法を検討する。

前述のACTH分泌細胞は、下垂体除去マウスの腎被膜下に異所性移植した。移植1週間

後から自発活動性の改善がみられ、2ヶ月後の生存率を有意に改善した。本研究では、生着率の改善および長期生着の向上などのため、マウスにて多様な移植方法を検討し、効果的な細胞投与法を確立する。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞から GH および LH/FSH 産生細胞への高効率分化

研究を開始するにあたり、前述の先行研究で確立した分化法を用いても、Lim3+ラトケ嚢様組織を効率よく誘導できない事態が発生した。

そこでまず、

既報の口腔外胚葉への誘導方法の再現性を複数のロットの KSR(knockout serum replacement)を用いて評価した。

次に、

既報の口腔外胚葉の誘導方法に、発生学的に口腔外胚葉の分化に重要なシグナルを追加することや、分化培養液の栄養成分の組成の最適化を行い、口腔外胚葉の誘導効率を上昇させた。

前項目で開発された口腔外胚葉の誘導方法に、再び発生学上の見地から、次の発生ステップで重要と考えられるシグナルを追加することで、口腔外胚葉から下垂体前葉原基への誘導効率を上昇させた。

前項目で開発された誘導方法が、異なるロットの KSR や胎児ウシ血清(FBS)を用いた分化誘導培養でも、口腔外胚葉や下垂体前葉原基を安定して誘導できることを確認した。

その上で、

新たに確立した高効率の下垂体前葉原基誘導法をもとに、GH 細胞系列のマーカーとしての Prop1 や Pit1 発現を上昇させる分化法を検討した。

(2) 下垂体機能不全マウスへの移植法検討

本来、下垂体は血管の豊富に発達した臓器であることを踏まえ、異所性移植の対象箇所としては、血流が豊富な箇所を中心に検討した。具体的には、腎被膜下、皮下、胃大網、腸間膜への移植を行った。また、正所性移植として、定位脳装置誘導下で下垂体内への移植も施行した。

4. 研究成果

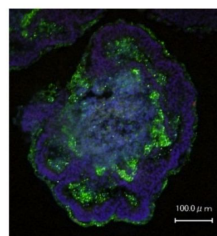
(1) マウス ES 細胞から GH および LH/FSH 産

生細胞への高効率分化

マウス胚性幹細胞(EB5)を、異なる3種類のロットの KSR を使用した培養液で 14-18 日間継代を行って馴化した後、既報の誘導方法を用いて口腔外胚葉へ分化培養した。分化誘導後 12 日目の凝集体を口腔外胚葉のマーカー(Pitx1、E-cadherin)や視床下部マーカー(Rax)などを用いた免疫染色法で評価することで、口腔外胚葉への誘導の再現性を確認した。

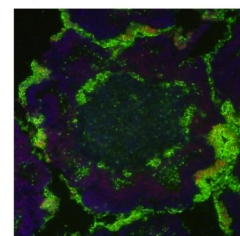
分化後 12 日目の凝集体を免疫染色で検討したところ、3 種類のロット(既報とは別のロット)の KSR すべてにおいて、Pitx1 陽性の口腔外胚葉はほとんど認められなかった。多くの凝集体は表面に上皮様の構造物を形成していたものの、その上皮構造を免疫染色で検討すると、E-cadherin 陽性ではあるものの Pitx1 は陰性であった。従って、上皮構造が完全には成熟していない、不完全な状態で分化が停止していることが推察された(図1)。内層に関しては Rax 陽性の神経層であることを免疫染色で確認した。内層の分化には問題がないものと考えた。

図1



E-cad Pitx1

図2



E-cad Pitx1

口腔外胚葉への分化誘導効率を上昇させる目的で、条件検討を行った。具体的には、既報の分化培養方法を基本としつつ、そこに新たな外因性シグナル(物質 X、物質 Y、ソニックヘッジホッグシグナル)を加えたり、分化培養液中の栄養成分(FBS 濃度、KSR 濃度、脂質濃縮液濃度)を変化させたりすることで、最適化を試みた。各種条件で分化誘導し、分化後 7 日目の凝集体を口腔外胚葉のマーカー(Pitx1、E-cadherin) や視床下部マーカー(Rax)を用いた免疫染色法や半定量 PCR 法にて評価した。

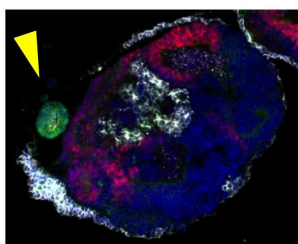
その結果、物質 X を加えることで、分化後 7 日目のほぼ全ての凝集体で Pitx1 陽性の口腔外胚葉を誘導することに成功した(図 2)。一般に、KSR にはロットチェックが必要とされているが、その主な理由は、KSR 内に含まれる血清由来成分の違いによるものだと考えられている。今回発見した誘導物質 X は、その血清由来成分に含まれるものと考えられており、従来は KSR のロット次第であった分化誘導効率を、コントロール下に置くことが出来る可能性を見出した。

前述の方法で分化誘導した口腔外胚葉

を下垂体前葉原基へ分化誘導させる目的で、発生学的に口腔外胚葉から下垂体前葉原基への分化に重要とされるシグナルを加えて条件検討を行った。分化後 14 日目の凝集体を下垂体前葉原基のマーカ- (Lim3、Pitx1、E-cadherin) や口腔外胚葉のマーカ- (Pitx1、E-cadherin)、視床下部マーカ- (Rax) を用いた免疫染色法にて評価した。

その結果、物質 Y を加えることにより、分化後 14 日目の凝集体において Lim3 陽性、Pitx1 陽性、E-cadherin 陽性の下垂体前葉原基構造を誘導できることが判明した(図 3、黄色矢頭参照)。

図3

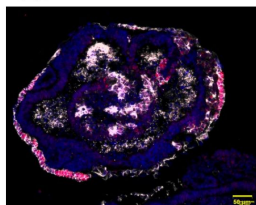


Lim3 Rax E-cad(白色)

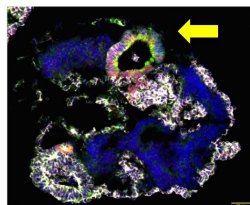
それぞれ3種類のロットのKSRおよびFBSを用いた培養液で12-16日間維持継代を行って馴化させた後、で判明した誘導方法で分化し、分化開始後10日目、14日目、18日目の凝集体における口腔外胚葉や下垂体前葉原基の誘導効率の再現性を評価した。免疫染色法で下垂体前葉原基のマーカ- (Lim3、Pitx1、E-cadherin) や口腔外胚葉のマーカ- (Pitx1、E-cadherin)、視床下部マーカ- (Rax) の発現を確認した。

分化後10日目において、ほぼ全ての凝集体でPitx1陽性の口腔外胚葉が分化誘導された(図4左)。また、分化後14日目においてLim3陽性、Pitx1陽性、E-cadherin陽性の下垂体前葉原基が誘導された(図4右、黄色矢印参照)。これらの結果から、KSRやFBSのロットに影響されない安定した口腔外胚葉への分化誘導方法を本研究で確立したと考えられる。

図4



Pitx1 E-cad(白色)



Lim3 Pitx1 E-cad(白色)

前述の方法を用いて、DLL1やDLL4、Jagged2などを用いて、GH細胞系列のマーカ-であるProp1やPit1の発現量をPCRにて検討したところ、それらの処理にて発現量が増加することを確認した。その結果、分化方法の更なる改良の可能性を見出した。

(2) 下垂体機能不全マウスへの移植法検討

異所性、正所性ともに、移植後2週間での生着率を免疫染色で検討した。その結果、腎皮膜下の生着率が最も高いことが判明した。生着の良い移植片には、ホスト側から血管が侵入している像を認めた。移植手技が簡便な皮下移植では生着率が低かったが、今後、血流を確保する工夫を追加すれば皮下移植の生着率を上昇しうる可能性を見出した。

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1件)

須賀英隆、大磯ユタカ、多能性幹細胞から視床下部・下垂体への分化、現代医学、査読無、61巻、2013年、191-199。

[学会発表](計4件)

須賀英隆、大磯ユタカ、水野正明、マウスES細胞から視床下部・下垂体への分化とその応用、第13回日本再生医療学会総会(招待講演)、2014年3月4日-6日、国立京都国際会館(京都府京都市)。

須賀英隆、大磯ユタカ、水野正明、マウスES細胞から視床下部・下垂体への分化とヒト細胞への応用、第58回人類遺伝学会(招待講演)、2013年11月20日-23日、江陽グランドホテル(宮城県仙台市)。

須賀英隆、マウスES細胞から視床下部・下垂体への分化とヒト細胞への応用、日本神経内分泌学会第40回学術集会(招待講演)、2013年10月25日-26日、宮崎市民プラザ(宮城県宮崎市)。

須賀英隆、大曾根親文、落合啓史、大磯ユタカ、マウスES細胞から視床下部・下垂体への分化誘導、第31回内分泌サマーセミナー(招待講演)、2013年7月11日-13日、ゆふいん山水館(大分県由布市)。

[図書](計1件)

須賀英隆、大磯ユタカ、科学評論社、内分泌・糖尿病・代謝内科、2013年、166(147-154)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 英隆 (SUGA, Hidetaka)

名古屋大学、医学部附属病院、病院助教
研究者番号: 20569818

(2) 研究分担者

該当者なし