

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670459

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた機能性下垂体腫瘍の病態解明と創薬

研究課題名(英文) The clarification of pathogenesis and medical treatment of functional pituitary adenoma using iPS cells

研究代表者

高橋 裕 (Takahashi, Yutaka)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70301281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体腫瘍の成因解明、創薬を目的とした本研究において以下の内容を行った。まず機能性下垂体腫瘍のデータベース、サンプルのライブラリーを構築した。先端巨大症については、既知の原因遺伝子変異の有無を日本人症例において包括的に解析し、その特徴について論文で報告した。クッシング病については、腫瘍のマイクロアレイ解析とともに初代培養系を用いて分子標的薬のスクリーニングを行った。また機能性下垂体腫瘍症例における病態解析の臨床研究を行い論文で報告した。さらにヒトiPS細胞から下垂体分化へのプロトコルを確立した。本研究期間中に15の英文論文、13の和文論文を報告した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the pathogenesis and medical treatment of functional pituitary adenoma, we have performed a comprehensive genetic analysis of the GH-producing pituitary adenoma. Regarding Cushing's disease, we performed a microarray analysis and screened molecular targeted therapy using primary culture tumor cells. We have further established a protocol for the differentiation from human iPS cells into pituitary in vitro. We have published 15 English papers and 13 Japanese papers.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体 腫瘍 原因 疾患特異的iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

機能性下垂体腫瘍の中で、特に GH 産生腫瘍による先端巨大症、ACTH 産生腫瘍によるクッシング病においては多くの合併症を引き起こし QOL と生命予後が悪化する。ミクロアデノーマの場合には手術による完治が期待できるが、浸潤性マクロアデノーマの場合には手術だけで完治することが難しい場合が多い。その場合に薬物療法は合併症、予後を改善するために極めて重要である。先端巨大症においては、ソマトスタチン誘導体が約 60% の IGF-I を正常化する標準薬物療法とされているが、効果不十分な場合があるとともに、有効であっても生涯継続する必要がある。クッシング病に至っては明らかに有効な薬物療法は樹立されていない。このような状況の要因のひとつはその発症機序、ホルモン過剰や腫瘍化の原因が十分に明らかにされていないことである。GH 産生腫瘍においては未だ約半数の発症機序は不明で、クッシング病に至ってはほとんど不明な状況である。下垂体腫瘍を含むいわゆる神経内分泌腫瘍は高分化型、機能性である場合が多く、発症機序を明らかにすることが、腫瘍増殖のみならずホルモン分泌抑制に有効な薬物療法の開発に結びつく可能性が高い。一方でそのような創薬を阻む大きな要因のひとつは手術によって得られる腫瘍組織が微量であること、病因の解析、創薬スクリーニングを困難にしている。

私たちはこれまで内分泌代謝疾患の病態の解明と新規疾患概念の発見(NEJM 1996, JCI1997,2011, JBC 2007, Gastroenterology 2007, BBRC 2012, Eur J Endocrinol 2012, JCI 2011)、サイトカイン、ホルモンシグナル分子の調節機構と生理的意義(EMBOJ 2003, Nat Immunol 2003, Immunity 2004, JBC 2006, Mol Endocrinol 2008, PNAS 2013 in press)、新規ホルモンの同定とその機能解析(FEBS letters 2008, Sci Reports 2011)、先端巨大症の病態の解明(Horm Res 2008, Endocrinology 2011, BBRC 2012)、クッシング病、プロラクチン産生腫瘍の分子標的療法の開発(Mol Endocrinol 2011, 2011, JCI 2011)のプロジェクトを進めてきた。また先端巨大症、クッシング病、プロラクチン産生腫瘍など機能性下垂体腫瘍について全国でも有数の規模の症例を集積し、その原因遺伝子についての包括的な解析をすることが出来る体制を整えすでに解析を始めている。今回このようなバックグラウンドを活かして本研究課題に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

先端巨大症やクッシング病などの機能性下垂体腫瘍においては、腫瘍の局所効果および合併症によって QOL と生命予後を著しく損ねる。しかし発症機序は十分解明されておらず、その治療法においても先端巨大症におけるソマトスタチンアナログやプロラクチノームにおけるドーパミンアゴニストなど一部を除いて明らかな有効性を示す薬物療法は見出されていない。本研究においては腫瘍組織のエクソームおよびプロテオーム解析という網羅的手法と iPS 細胞を用いたユニークな方法で機能性下垂体腫瘍の原因を解明し、その発症機序に基づいた分子標的療法の開発、iPS 細胞由来腫瘍細胞を用いた創薬スクリーニングと臨床応用に向けた基礎的検討を行った。

## 3. 研究の方法

本研究課題においては、下記の方法によって「iPS 細胞を用いた機能性下垂体腫瘍の病態解明と創薬」の達成を目指した。申請者は厚生労働省難治性疾患研究事業間脳下垂体機能障害調査研究班研究分担者として日本における本分野の主要な研究者との連携体制を構築し、手術サンプルについても虎の門病院間脳下垂体外科との共同研究体制を整えた。また基礎研究については、文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究事業・共同研究拠点」のメンバーの一員として ES 細胞からの下垂体細胞分化を報告した笹井研との共同研究を行った。

- 機能性下垂体腫瘍症例データベースおよびゲノム、腫瘍サンプルライブラリーの作成
- エクソーム、プロテオームなど網羅的解析による病因の解明
- 腫瘍特異的 iPS 細胞の樹立と下垂体細胞への効率的分化手法の確立
- 腫瘍特異的 iPS 細胞由来腫瘍細胞を用いた効率的な低分子化合物スクリーニング系の樹立
- モデル動物を用いた病態解析と臨床応用を目指した基礎的研究

## 4. 研究成果

私たちはまず、共同研究によって機能性下垂体腫瘍症例データベースおよびゲノム、腫瘍サンプルライブラリーの作成を行った。先端巨大症については 100 例以上のサンプルとデータベースをクッシング病については 15 例のものを構築した。基礎研究としてヒト iPS 細胞からの下垂体分化プロトコル樹立を

試みた。これまでにスフェロイド形成を用いた3次元培養によってマウスES細胞から下垂体前葉細胞への分化誘導方法が共同研究者の須賀より報告されており(Suga H et al. Nature 2011;480:57)、私たちの検討によりヒトES、iPS細胞においても同様の方法で分化誘導が可能であることが明らかになった(未発表データ)。しかしながら、ヒトとマウス間の種差は明らかに存在しており、誘導因子の内容、刺激のタイミングなどについての詳細な検討が必要であった。私たちが確立した自己組織化を用いた本法は先天性下垂体機能低下症の発生過程における *in vitro* の病態再現に非常に有用であると考えられる。実際この方法で視床下部ホルモンに反応する機能性下垂体前葉細胞への分化誘導が可能となっているが、まだ分化誘導効率には十分ではないため、より高効率に下垂体細胞への分化誘導が可能となるプロトコルの確立を目指している。現在このプロトコルを元に腫瘍由来iPS細胞からの分化について、さらに工夫を行っている。

同時に、下垂体腫瘍の成因解明、創薬につながる目的で下記の実験を行った。先端巨大症については、既知の原因遺伝子変異の有無について日本人症例において包括的に解析し、その特徴について論文で報告した。クッシング病については、最近報告された USP8 陽性、陰性の腫瘍についてマイクロアレイを用いて比較し、その特性について、解析を行った。またヒトクッシング病下垂体腺腫組織初代培養系を用い、pan-ErbB 阻害剤である Neratinib, Canertinib を処理し、腫瘍細胞からのホルモン発現プロファイルを mRNA 発現測定、培地中への分泌ホルモンレベルの ELISA 法での測定を行い、ErbB1 & ErbB2 dual 阻害剤である Lapatinib 処理と比較することにより、ErbB3, ErbB4 の腫瘍細胞における機能を解析した。同時に ErbB3, ErbB4 の腫瘍での発現パターンを確認し、下垂体細胞株を用いてホルモン分泌調節機能を有しているか、細胞増殖に影響を与えているかを確認した。さらに機能性下垂体腫瘍の病態を明らかにするための臨床研究を行い、その合併症の頻度、特徴、病態との関連についての論文発表を行った。

#### 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28件)

1. Suda K, Matsumoto R, Fukuoka H, Iguchi G, Hirota Y, Nishizawa H, Bando H, Yoshida K, Odake Y,

Takahashi M, Sakaguchi K, Ogawa W, Takahashi Y The influence of type 2 diabetes on serum GH and IGF-I levels in hospitalized Japanese patients. **Growth Hormone and IGF-I Research**. 2016 29 4-10.

2. Yamamoto M, Matsumoto R, Fukuoka H, Iguchi G, Takahashi M, Nishizawa H, Suda K, Bando H, Takahashi Y. The prevalence of renal cyst in acromegaly. **Internal Med**. 2016 in press

3. Suda K, Fukuoka H, Iguchi G, Hirota Y, Nishizawa H, Bando H, Matsumoto R, Takahashi M, Sakaguchi K, Takahashi Y. The prevalence of acromegaly in hospitalized patients with type 2 diabetes. **Endocrine J**. 2015 62:53-9.

4. Taniguchi M, Hosoda K, Akutsu N, Takahashi Y, Kohmura E Endoscopic endonasal transsellar approach for laterally extended pituitary adenomas -Volumetric analysis of cavernous sinus invasion. **Pituitary**. 2015 18:518-24.

5. Yamamoto M, Fukuoka H, Iguchi G, Matsumoto R, Takahashi M, Nishizawa H, Suda K, Bando H, Takahashi Y. The prevalence and associated factors of colorectal neoplasms in acromegaly: a single center based study. **Pituitary**. 2015 18 343-351.

6. Bando H, Iguchi G, Fukuoka H, Taniguchi M, Kawano S, Saitoh M, Yoshida K, Matsumoto R, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Morinobu A, Kohmura E, Ogawa W, Takahashi Y. A diagnostic pitfall in IgG4-related hypophysitis: Infiltration of IgG4-positive cells in the pituitary of granulomatosis with polyangiitis. **Pituitary**. 2015 18 722-730.

7. Nagai H, Fujiwara S, Takahashi Y, Nishigori C. Ameliorating effect of the novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitor teneligliptin on psoriasis: A report of two cases **J Dermatology**. 2015 42: 1-4.

8. Hirata Y, Fukuoka H, Iguchi G, Iwahashi Y, Fujita Y, Hari Y, Iga M, Nakajima S, Nishimoto Y, Mukai M, Hirota Y, Sakaguchi K, Ogawa W, Takahashi Y. Median-lower normal levels of serum thyroxine are associated with low triiodothyronine levels and body temperature in patients with central hypothyroidism. **Eur J Endocrinol**. 2015 173(2): 247-56.

9. Yoshida K, Fukuoka H, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H,

- Iguchi G, Ogawa W, Webb SM, Takahashi Y. The quality of life in acromegalic patients with biochemical remission by surgery alone is superior to that in those with pharmaceutical therapy without radiotherapy, using the newly developed Japanese version of the AcroQoL. **Pituitary**. 2015 18(6): 876-883.
10. Matsumoto R, Fukuoka H, Iguchi G, Odake Y, Yoshida K, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Yamada S, Ogawa W, Takahashi Y. Accelerated telomere shortening in Acromegaly; IGF-I induces telomere shortening and cellular senescence. **PLoS One**. 10 (10): e0140189 2015.
  11. Yamamoto M, Iguchi G, Bando H, Fukuoka H, Suda K, Takahashi M, Nishizawa H, Matsumoto R, Tojo K, Mokubo A, Ogata T, Takahashi Y. A missense single-nucleotide polymorphism in the sialic acid acetyl esterase gene is associated with anti-PIT-1 antibody syndrome. **Endocrine J**. 2014 61: 641-4.
  12. Bando H, Iguchi G, Fukuoka H, Yamamoto M, Matsumoto R, Hidaka-Takeno R, Okimura Y, Matsumoto R, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Toji K, Takahashi Y. Involvement of PIT-1-reactive cytotoxic T lymphocytes in anti-PIT-1 antibody syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**. 2014 99 E1744-9.
  13. Fukuoka H, Takeuchi T, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Hirota Y, Iguchi G, Takahashi Y. D-dimer as a significant marker of DVT in Patients with Subclinical or Overt Cushing's Syndrome. **Endocrine J**. 2014 61:1003-10.
  14. Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Mori M, Hamada Y, Nishida M, Minami Y, Haraguchi R, Takahashi Y, Kitazawa S. Diabetic Osteopenia by Decreased  $\beta$ -Catenin Signaling Is Partly Induced by Epigenetic Derepression of sFRP-4 Gene. **PLoS One**. 2014 9(7):e102797. doi: 10.1371/journal.pone.0102797.
  15. Matsumoto R, Fukuoka H, Iguchi G, Nishizawa H, Bando H, Suda K, Takahashi M, Takahashi Y. Long-term effects of growth hormone replacement therapy on liver function in adult patients with growth hormone deficiency. **Growth Hormone and IGF-I Research**. 2014 24: 174-9.
  16. 高橋 裕 ホルモン測定系の問題と疾患 GH/IGF-I **ホルモンと臨床**, 61 43-47 2015
  17. 高橋 裕 新たな自己免疫病の発見「抗 PIT-1 抗体症候群」 **臨床病理**, 4 491-497 2015
  18. 高橋 裕 内分泌マスタークリニシャン:患者への説明のこつ プロラクチノーマ **ホルモンと臨床**, 2016 in press
  19. 高橋 裕 内分泌性高血圧 先端巨大症における高血圧と心血管リスク **最新医学**, 2016 71, 5, in press
  20. 坂東弘教, 井口元三, 高橋 裕 トピックス 新たな疾患概念 抗 PIT-1 抗体症候群 **医学の歩み**, 2016 in press
  21. 高橋 裕 老化に伴う内分泌系の変化と栄養・代謝 **基礎老化研究**, 40, 31-36, 2016
  22. 高橋 裕 内分泌疾患におけるアンメットメディカルニーズ 下垂体前葉疾患 **ホルモンと臨床**, 2016 in press
  23. 高橋 裕 下垂体疾患~新しい治療薬への期待 **Medical Practice**, 2016 in press
  24. 高橋 裕 内分泌疾患 診断と治療の進歩:先端巨大症(総説) **日本内科学会雑誌**, 103 巻, 825-831, 2014
  25. 高橋 裕 成人 GH 分泌不全症の新たな合併症: NAFLD/NASH **成長・代謝**, 5 1-4 2014
  26. 高橋 裕 加齢と GH/IGF-I (総説) **最新医学**, 69 巻 19-23, 2014
  27. 高橋 裕 内分泌疾患と CKD GH/PRL **ホルモンと臨床**, 61 35-39 2014
  28. 高橋 裕 内分泌疾患診療における負荷試験: その目的, 実施から評価まで 成人成長ホルモン分泌不全症 **内分泌・糖尿病・代謝内科**, 39 282-285 2014
- [学会発表](計 21 件)
1. The usefulness of salivary cortisol for a marker of therapy evaluation in patients with Cushing's syndrome Yoshida K, Fukuoka H, Odake Y, Ito J, Yamada T, Miura H, Suematsu N, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Iguchi G, Ogawa W, Takahashi Y The 97th Annual Meeting of the Endocrine Society 2016.4.2
  2. Anti-PIT-1 antibody syndrome as a novel thymoma-associated endocrinopathy. Bando H, Iguchi G, Fukuoka H, Odake Y,

- Yoshida K, Matsumoto R, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Mokubo A, Tojo K, Ogawa W, Takahashi Y The 97th Annual Meeting of the Endocrine Society 2016.4.2 (**Oral presentation**)
3. Increased prevalence of pancreatic cystic neoplasms in patients with acromegaly Odake Y, Fukuoka H, Arisaka Y, Konishi J, Yoshida K, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Iguchi G, Yamada S, Ogawa W, Takahashi Y The 97th Annual Meeting of the Endocrine Society 2016.4.2
  4. A novel action of IGF-I: IGF-I ameliorates hepatic fibrosis by inducing cellular senescence of hepatic stellate cells. Nishizawa H, Iguchi G, Fukuoka H, Takahashi M, Suda K, Bando H, Matsumoto R, Yoshida K, Odake Y, Ogawa W, Takahashi Y The 97th Annual Meeting of the Endocrine Society 2016.4.2
  5. Factors associated with quality of life in Japanese patients with acromegaly. Yoshida K, Fukuoka H, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Iguchi G, Ogawa W, Webb SM, Takahashi Y. The 96th Annual Meeting of the Endocrine Society 2015.3.6
  6. The association of serum IGF-I levels between micro- and macro-angiopathies in patients with type 2 diabetes. Suda K, Fukuoka H, Iguchi G, Hirota Y, Yoshida K, Matsumoto R, Bando H, Nishizawa H, Takahashi M, Sakaguchi K, Ogawa W, Takahashi Y. The 96th Annual Meeting of the Endocrine Society 2015.3.6
  7. Prevalence of *AIP* gene mutations in Japanese patients with sporadic acromegaly and the efficacy of cabergoline therapy. Matsumoto R, Fukuoka H, Iguchi G, Bando H, Kentaro S, Nishizawa H, Yoshida K, Takahashi M, Yamada S, Izawa M, Inoshita N, Ogawa W, Takahashi Y. The 96th Annual Meeting of the Endocrine Society 2015.3.6
  8. Oxidative stress, telomere, and cellular senescence: New pathophysiological insights in acromegaly. Takahashi Y. (Invited speaker) The 3rd Pituitary Expert Meeting in Asia 2014.9.5
  9. GH resistance under fasting conditions: the role of SIRT1 in endocrine adaptation. Takahashi Y. (Invited speaker) FASEB Scientific Research Conference Colorado 2015.7.16
  10. The essential role of GH/IGF-I in liver. Takahashi Y. (Invited speaker) the 6th Annual European Meeting on the Management of Acromegaly Istanbul 2015.9.25
  11. A case of androgen- and fibroblast growth factor 23-producing ovarian tumor. Iguchi G, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Fukuoka H, Takahashi Y. The 96th Annual Meeting of the Endocrine Society 2014.6.22
  12. The characteristics of IgG4-related hypophysitis; a comparison with autoimmune hypophysitis. Bando H, Iguchi G, Fukuoka H, Matsumoto R, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Takahashi Y. The 96th Annual Meeting of the Endocrine Society 2014.6.22
  13. ErbB mediate ACTH suppression by canertinib in human pituitary corticotroph adenoma cells. Fukuoka H, Iguchi G, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Inoshita N, Ren NG, Melmed S, Yamada S, Takahashi Y. The 96th Annual Meeting of the Endocrine Society 2014.6.22
- 〔図書〕(計 27 件)
1. 最新肥満症学 新規のアディポサイトカイン ケマリン 高橋 裕, 高橋路子 日本臨床 72 巻増刊号 160-163 2014
  2. 内科外来基本処方 Navi 下垂体前葉機能低下症 井口元三, 高橋 裕 中外医学社 2014 121
  3. 内科外来基本処方 Navi プロラクチノーマ 福岡秀規, 高橋 裕 中外医学社 2014 122
  4. 内科外来基本処方 Navi 先端巨大症 高橋 裕 中外医学社 2014 120
  5. 内分泌代謝クリニカルクエスチョン 先端巨大症の診断基準のポイントは? 高橋 裕 診断と治療社 2-3 2014
  6. 内分泌代謝クリニカルクエスチョン 先端巨大症の薬物療法を具体的に教えてください 高橋 裕 診断と治療社 4-5 2014
  7. 内分泌代謝クリニカルクエスチョン クッシング病と偽性、異所性 ACTH 症候群の鑑別診断法は? 福岡秀規, 高橋 裕 診断と治療社 6-7 2014

8. 内分泌代謝クリニカルクエスチョン 高プロラクチン血症の鑑別診断法は？ 福岡秀規、高橋 裕 診断と治療社 12-14 2014
9. 内分泌代謝クリニカルクエスチョン リンパ球性下垂体炎の病型と治療は？ 井口元三、高橋 裕 診断と治療社 25-27 2014
10. 内分泌代謝クリニカルクエスチョン 成人成長ホルモン分泌不全症の診断と治療は？ 高橋 裕 診断と治療社 22-24 2014
11. 医学大事典 成長ホルモン 高橋 裕 南山堂 1351 2015
12. 医学大事典 インスリン様成長因子 高橋 裕 南山堂 159 2015
13. 医学大事典 増殖因子 高橋 裕 南山堂 1461-62 2015
14. 医学大事典 成人成長ホルモン分泌不全症 高橋 裕 南山堂 1337 2015
15. 医学大事典 成長ホルモン単独欠損症 高橋 裕 南山堂 1352 2015
16. 医学大事典 下垂体前葉ホルモン単独欠損症 高橋 裕 南山堂 367 2015
17. 医学大事典 ラローン型低身長症 高橋 裕 南山堂 2521 2015
18. 今日の小児治療指針 下垂体性巨人症と先端巨大症 高橋 裕 医学書院 236-237 2015
19. 第3版アンチエイジング医学の基礎と臨床 ホルモンとアンチエイジング 視床下部・下垂体ホルモン 高橋 裕 日本抗加齢医学学会 メジカルビュー社 104-105 2015
20. 内科学第11版 成長ホルモン分泌不全性低身長症 高橋 裕 朝倉書店 2015 in press
21. 内科学第11版 成人成長ホルモン分泌不全症 高橋 裕 朝倉書店 2015 in press
22. 難治性内分泌代謝疾患 Update 下垂体成長ホルモン分泌亢進症 高橋 裕 診断と治療社 2015 in press
23. 高橋 裕 脳神経外科診療プラクティス 脳神経外科医が知っておきたい薬物療法の考え方と実際 ホルモン補充薬 文光堂 2015 in press
24. 高橋 裕 糖尿病 医師・医療スタッフのための臨床総合誌 別冊プラクティス「糖尿病検査マニュアル」成長ホルモン関連(GH・IGF-I) 医歯薬出版株式会社 2016 in press
25. 高橋 裕 内分泌代謝専門医ガイドブック 視床下部下垂体ホルモンの基礎知識 診断と治療社 2016 in press
26. 高橋 裕 内分泌代謝専門医ガイドブック 原因不明の中枢性甲状腺機能低下症を見たら「抗PIT-1抗体症候群」の鑑別を 診断と治療社 2016 in press
27. 高橋 裕 今日の治療指針 2017年度版 成長ホルモン分泌不全症 医学書籍社 2016 in press
- 〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im2/doctor/activity/acti-04.html>
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
高橋 裕 (TAKAHASHI Yutaka)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：70301281
- (2)研究分担者  
福岡秀規 (FUKUOKA Hidenori)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80622068