

主論文の要旨

**Subcutaneous transplantation of human embryonic
stem cells-derived pituitary organoids**

〔 ヒト胚性幹細胞由来下垂体オルガノイドの皮下移植 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：齋藤 竜太 教授)

佐々木 博勇

【緒言】

下垂体は様々なホルモンを分泌して内分泌系を統合的に制御する組織である。下垂体ホルモンは生体内で様々な機能を果たすが、その分泌が障害されると中には生命に関わる症状が出ることもある。例えば ACTH 分泌不全は重症になると意識障害、電解質異常、低血圧、易感染性を起こし、最悪の場合死に至る。下垂体機能低下症の治療は稀な例外を除いてホルモン補充に限られる。投与量の調整が難しく、服薬コンプライアンスなどの問題もある。そこで多能性幹細胞を用いた下垂体オルガノイドが臨床応用されれば、ホルモン補充療法に伴うこれらの合併症が解消される可能性がある。

これまで我々はマウス胚性幹細胞 (ESC) を用いた三次元分化法から、ヒト ESC (hESC) およびヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) を *in vitro* で下垂体オルガノイド (PO) への効率の良い分化方法を確立した。さらに hESC 由来 PO を下垂体機能低下マウスの腎被膜下に移植することで活動量と死亡率が改善することを示した。しかしヒトへ臨床応用するにはいくつか課題がある。その一つが移植部位と方法の決定である。これまで行ってきた腎被膜下移植は侵襲性が高い。また幹細胞由来であるため、万が一腫瘍化すると摘出が困難である。そこで本研究は比較的侵襲性が低く、摘出も容易な皮下移植法の検討を目的とした。

【方法】

hESC と分化誘導

本研究では hES 細胞 (KhES-1) を使用した。下垂体分化誘導法は既報より改訂された方法により分化誘導を行った。

マウスと下垂体摘出

重度免疫不全マウス (SCID) を使用した。下垂体摘出は外耳道経由、針で穿刺し吸引摘出を行った。

採血と ACTH 測定

下垂体機能評価として ACTH を対象とした。CRH 負荷前と負荷後 1 時間に採血を行った。この検査を下垂体摘出後 1 週間とその後のフォローアップ毎に行なった (図 1A)。

移植方法

マウスの左鼠径部に 4mm ほどの縦切開を置いた。皮膚の直下に脂肪組織を確認できるため、この脂肪組織にハサミで切開を入れた。脂肪切開部からハサミを脂肪内に入れて鈍的剥離をしてポケットを作成した。ポケット内に視床下部下垂体オルガノイドを内径が 1.58mm の先太チップを用いて 5 個注入した。脂肪および皮膚を閉創した (図 1B-G)。処置後は dexamethasone 0.2mg を筋注した。

組織学分析

移植した細胞、皮膚、脂肪ごと摘出した。hematoxylin and eosin (HE) 染色、蛍光免疫染色では ACTH、下垂体分化マーカーである LHX3、抗ヒト核抗体、口腔外胚葉マーカーである E-cadherin、血管平滑筋マーカーの SMA を染色した。

統計解析

IBM SPSS を用いた。

【結果】

鼠径部皮下脂肪内 (ISWAT) 移植群と無血管野 (AR) 移植群と Sham 群との比較

ISWAT 群 (n=6)、Sham 群 (n=6)、AR 群 (n=5) について 6 ヶ月間血漿 ACTH 値を追跡した。移植前の基礎 ACTH 値および CRH 負荷後 ACTH 値は 3 群の間で有意差はなかった (ISWAT vs. 偽手術 vs. AR、基礎値、CRH 負荷後 ACTH 値、ISWAT vs. sham vs. AR、基礎値 ; 4.6 ± 1.8 pg/ml vs. 2.3 ± 1.6 pg/ml vs. 2.5 ± 1.1 pg/ml, $p = 0.27 - 0.92$, 刺激 ; 1.7 ± 0.8 pg/ml vs. 1.7 ± 2.3 pg/ml vs. 7.2 ± 2.1 pg/ml, $p = 0.06 - 0.72$)。移植後、基礎 ACTH 値 (basal、図 2A) は一貫して ISWAT 群の方が Sham 群より高かった。移植後 2、4、8、17 週では、ACTH 値は群間で有意差を認めた ($p < 0.001 - 0.05$ 、図 2A)。CRH 負荷値 (stimulated、図 2A) も ISWAT 群で Sham 群より高く、2、4、8、21、26 週目に群間で統計的に有意差があった ($p < 0.001 - 0.005$ 、図 2A)。

移植前 in vitro での PO からの ACTH 分泌量は、ISWAT 群と AR 群の間で有意差はなかった (ISWAT vs AR、 44416 ± 8435 pg/ml vs 45800 ± 17291 pg/ml、 $p=0.876$)。正常マウスの基礎 ACTH 値は 182 ± 40.7 pg/ml、CRH 負荷後 ACTH 値は 278.6 ± 43.2 pg/ml であった (n=6、図 2B)。移植後、基礎 ACTH 値および CRH 負荷 ACTH 値は AR 群で Sham 群より高く、ISWAT 群より低かった。ISWAT 基礎 ACTH 値は 2 週後で AR 値より有意に高く ($p = 0.009$)、ISWAT CRH 負荷 ACTH 値は 2、8 および 21 週後で AR 値より有意に高くなった ($p < 0.001 \sim 0.013$)。これらの結果は、皮下に移植された PO は、脂肪組織のような血管の発達した部位に移植された場合、血管の発達していない部位よりも効率的に ACTH を放出することを示唆した。

運動量テストでは、ISWAT 群の方が Sham 群よりも高い活動性を示したが、ISWAT 群は正常群よりもわずかに低い活動性であった (図 2C)。ISWAT 群の体重減少率は、Sham 群と比較して控えめであったが、それでも 10%以上低下した (図 2D)。

皮下移植後の肉眼的所見および組織学的所見

ISWAT 移植後 4 週間の肉眼的所見では移植片への新生血管が認められた (図 3A)。21 週後の所見でも移植片を確認できた (図 3B)。これを回収し組織染色を行った。HE 染色では皮下に細胞の凝集体を確認した (図 3C,G)。蛍光免疫染色では ACTH 陽性細胞、口腔外胚葉マーカーである E-カドヘリン、下垂体分化マーカーである LHX3 および抗ヒト核抗体の発現を認めた (図 3D,E,H,I)。さらに血管内皮マーカーである SMA が

移植片周囲および内部に発現していた(図 3F,J)。

hESC 由来 PO の血管新生の促進

PO が血管新生因子を発現しているかどうか qPCR で評価した。脂肪内移植後の PO の血管新生因子発現量に変化があるか検討した。*VEGFA*、*VEGFB*、*VEGFC*、*ANGPT2* は PO において未分化 ESC と比較して有意に高く発現していた。さらに *VEGFC* と *ANGPT2* は脂肪内移植後に発現増強することが確認された(図 4A-E)。最後に PO の皮下移植における血管新生の重要性を評価するために VEGF 阻害剤であるベバシズマブを移植後のマウスに投与し、ACTH を測定した。結果は生食投与群と比較してベバシズマブ投与群で CRH 負荷後 ACTH 値が有意に低下した(4.6 ± 3.0 pg/ml vs. 34.5 ± 11.7 pg/ml、 $p=0.035$ 、図 4F)。

【考察】

本研究により hESC 由来 PO を下垂体機能低下 SCID マウスの皮下組織に移植しても機能することが示された。移植されたマウスは CRH に反応し、ACTH が血液中に放出されたことから、注入された CRH が移植された ACTH 産生細胞を刺激していることが示された。ISWAT 移植と AR 移植の比較から血管の豊富な脂肪組織に移植する方が血管の乏しい部位に移植するより効果的であることが示唆された。PO は血管新生因子を発現しており、自律的に血管新生と生着を促す可能性を示した。VEGF を阻害することで ACTH 分泌能が低下したことから血管新生が生着に重要であることが示された。

hESC 由来 PO の皮下移植の機能を実証することは今後ヒトへの臨床応用をするにあたり重要なステップである。ヒトで皮下移植が実現できれば、移植手術は局所麻酔で可能である。入院も不要であるかもしれない。皮下移植であれば仮に PO が腫瘍化しても容易に摘出が可能である。

本研究では ACTH は改善できたが、運動量の正常化や体重減少を完全に食い止めることができなかった。ACTH 産生細胞の細胞数の問題がある、他の下垂体ホルモンの欠乏も関わっているなどの問題が考えられる。また免疫応答の問題もある。これらの問題を解決することでヒトへの臨床応用へ近づくことができる。

【結論】

ヒト ES 細胞由来下垂体オルガノイドがマウス皮下移植で機能することを証明した。皮下の移植先としては血流の豊富な脂肪内が妥当である。ヒト ES 細胞由来下垂体オルガノイドの皮下生着には血管新生が重要である。

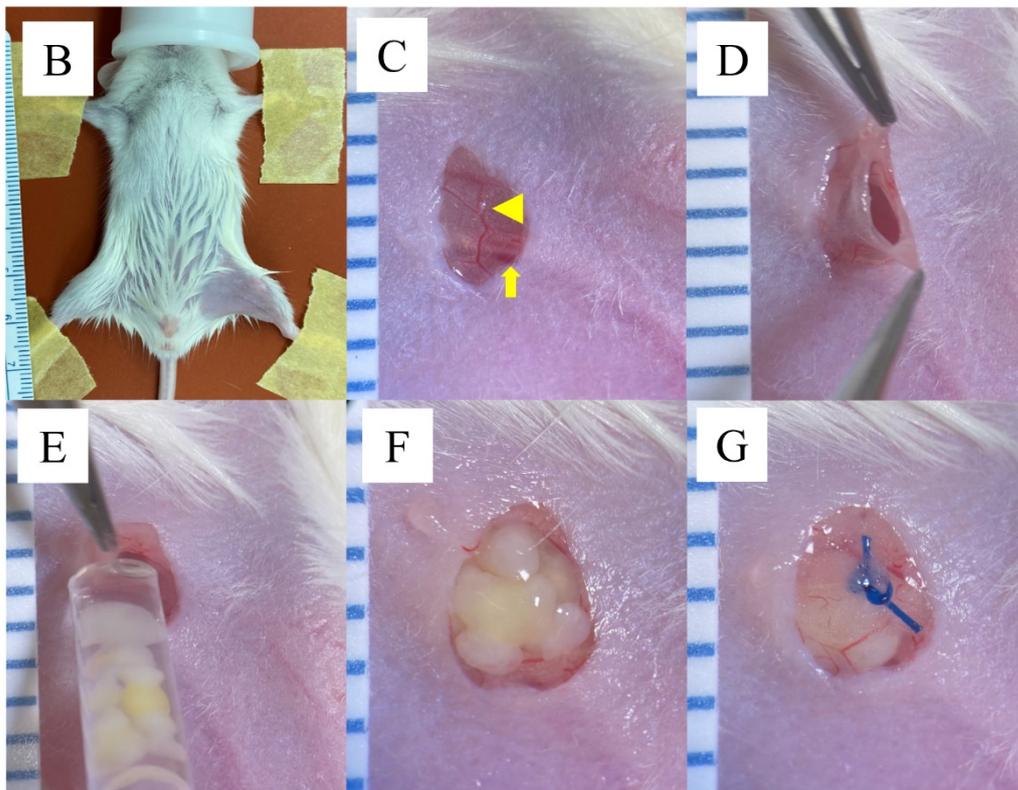
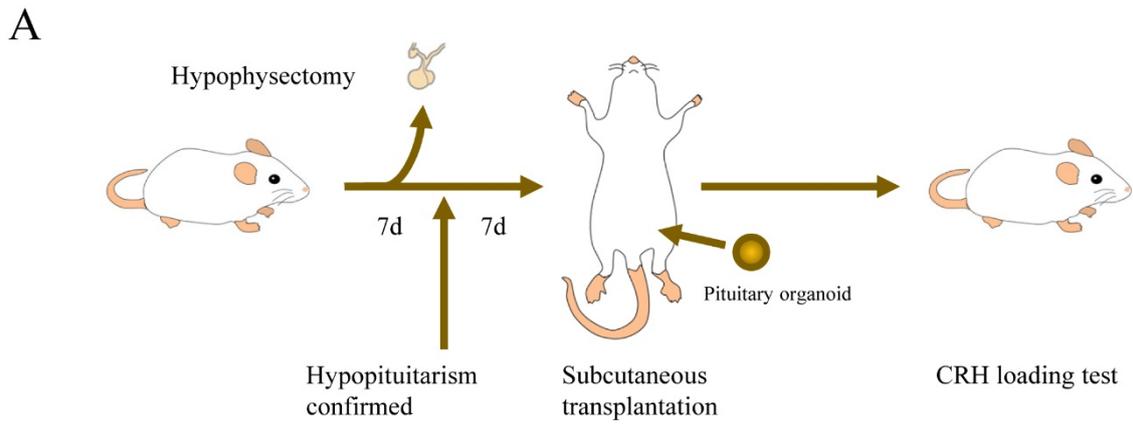


図 1. hESC 由来下垂体オルガノイド(PO)の鼠径部皮下白色脂肪組織(ISWAT)移植
 (A) PO 移植実験の概要図(下垂体摘出、下垂体機能の確認、皮下移植、CRH 負荷試験)
 (B) 左鼠径部の剃毛し、吸入麻酔、仰臥位で固定
 (C) 4mm の縦縦切開を行うと脂肪内血管(矢頭)と大腿動静脈(矢印)が確認できる
 (D) 脂肪を切開し、ポケットを作製
 (E) ワイドボアチップで脂肪ポケット内に PO を注入する
 (F) 留置した PL
 (G) PO を固定するように脂肪をナイロン糸で縫合して閉創する
 スケールバー : 1mm

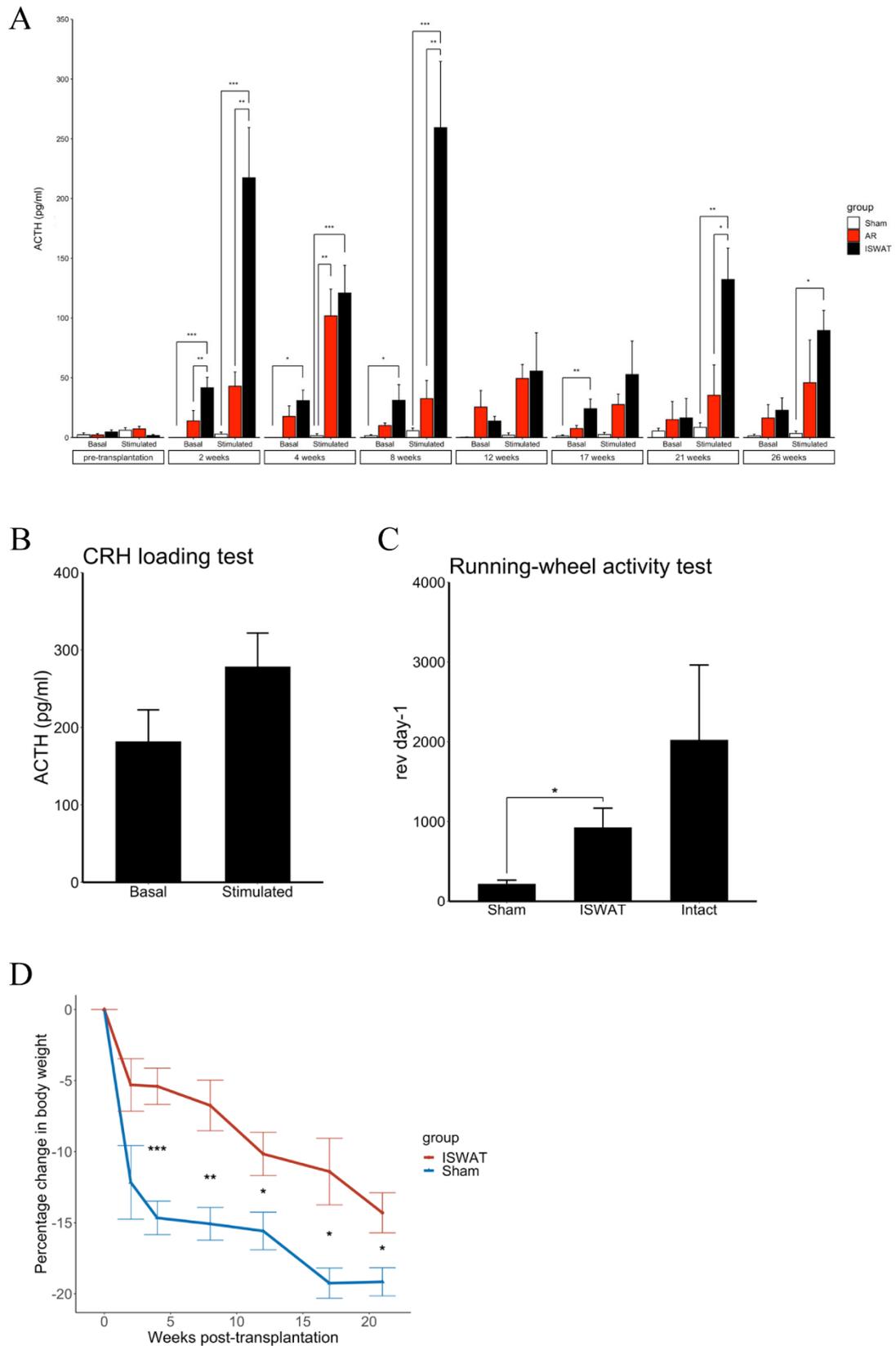


図 2. PO を移植したマウスの評価

全てのデータは平均値±SEM で表記。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

(A) PO 移植を受けたマウスの基礎値および CRH 負荷値を示す。Sham 群と AR 群と ISWAT 群の 3 群比較。それぞれ $n=6$, $n=5$, $n=6$ 。

(B) 正常マウスにおける基礎値および CRH 負荷値

(C) ランニングホイールテスト Sham $n=3$, ISWAT $n=3$, intact $n=3$ 。

(D) 体重変化率、ISWAT と Sham マウス。

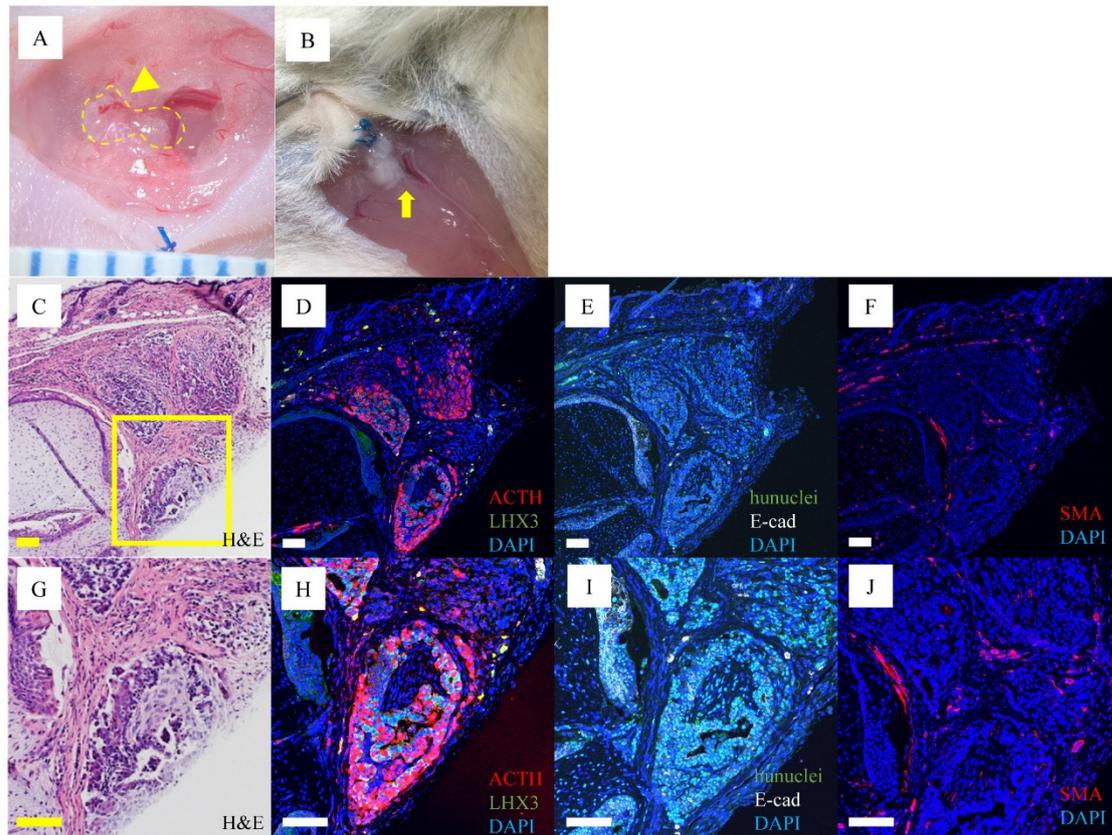


図 3. ISWAT 移植後の肉眼的所見と組織学的所見

(A) 移植 4 週間後の肉眼的所見。点線は移植された PO。矢頭は移植片に付随する新生血管。

(B) 移植 21 週間後の肉眼的所見。移植された PO が確認できる(矢印)

(C,G) 皮下組織内に移植した細胞塊を認める (H&E 染色)

(D,H) 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH, 赤) および下垂体分化マーカーである LIM-homeobox protein (LHX3, 緑)

(E,I) ヒト核抗体 (hunuclei, 緑) および口腔外胚葉マーカーである E-カドヘリン (E-cad, 白)

(F,J) 血管内皮マーカーである SMA, 赤

スケールバー : 100 μ m

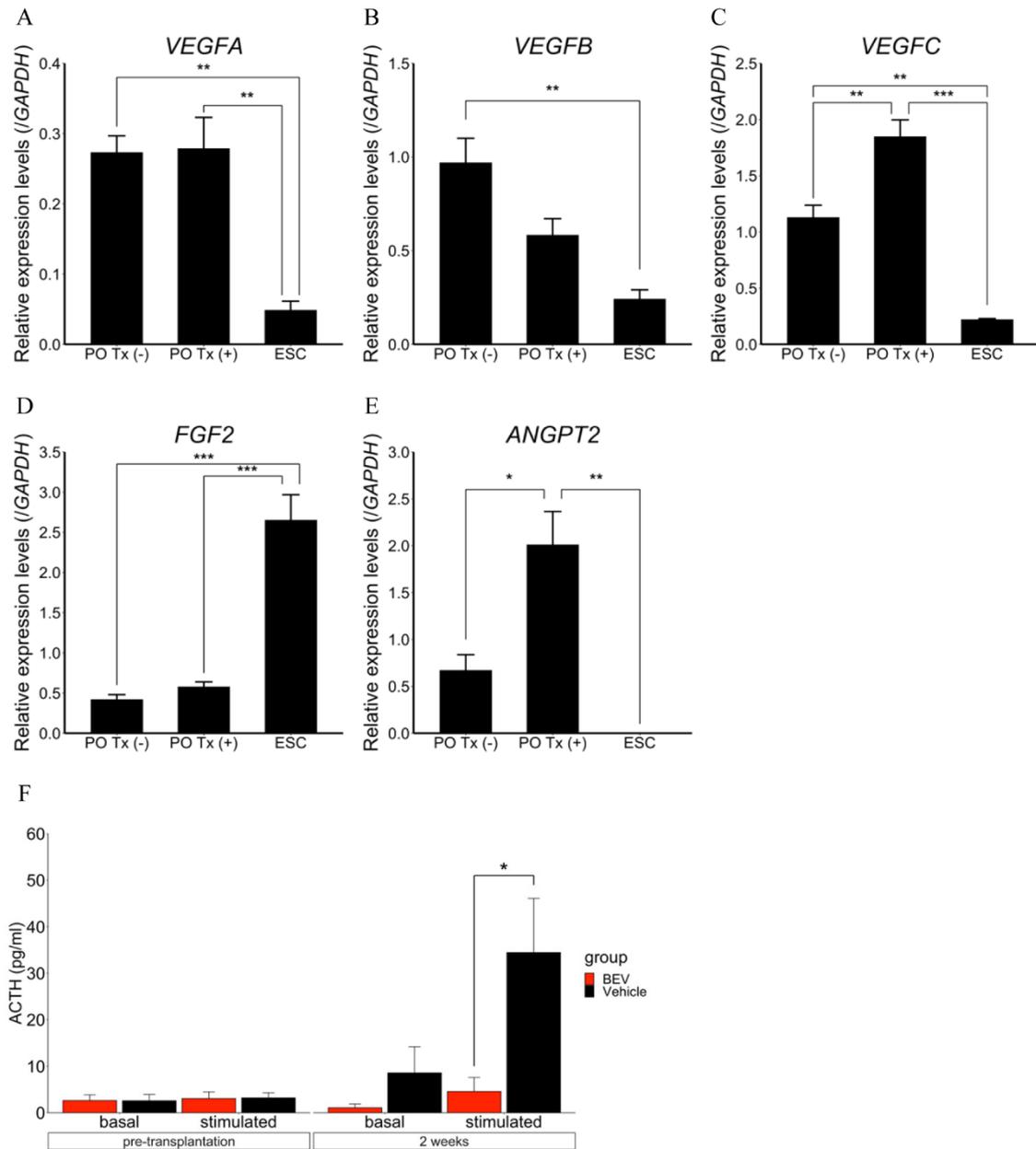


図 4. hESC 由来 PO における血管新生因子の発現と効果

全てのデータは平均値±SEM で表記。 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

PO Tx (-): 移植をしていない PO, PO Tx (+): 移植をした PO, 未分化 ESC の *VEGFA* (A), *VEGFB* (B), *VEGFC* (C), *FGF2* (D), *ANGPT2* (E) の発現を示す。発現量は *GAPDH* で正規化した。

(F) ベバシズマブ (BEV) あるいは生食投与による基礎値および CRH 負荷値 ACTH レベルの比較。BEV, $n=9$, vehicle, $n=9$ 。