

主論文の要旨

**Functional anterior pituitary generated in  
self-organizing culture of human embryonic stem cells**

〔 ヒト胚性幹細胞の自己組織化培養で作られた機能的な下垂体前葉 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

大曾根 親文

## 【緒言】

下垂体は全身のホルモン分泌を制御する中枢器官であり，副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）や成長ホルモン（GH）など 6 種類のホルモンが下垂体前葉から分泌される。下垂体は視床下部からの刺激を受けてホルモンを分泌するだけでなく，全身からのフィードバックを受けて分泌量を適切に調整している。下垂体前葉ホルモンは生体の恒常性維持に重要な役割を担っており，それゆえ，ホルモン分泌能が低下すると，意識障害や血圧低下，電解質異常，成長障害，不妊などの重篤な症状を引き起こす。下垂体機能低下症の治療法には不足するホルモンを投与する補充療法が存在するが，生涯に渡ってホルモンを投与し続ける必要があるうえに，時々刻々と変化するホルモンの必要量に対応できないなどの問題点が存在する。そのため，生体の下垂体と同様にホルモン応答能を持った下垂体ホルモン産生細胞の作製が望まれてきた。我々は SFEBq 法（図 1a）と呼ばれる多能性幹細胞の立体浮遊培養法を応用し，下垂体が発生する生体内の微小環境を *in vitro* で再現することでヒト胚性幹細胞（ES 細胞）の凝集塊から下垂体を分化誘導することを試みた。

## 【結果】

下垂体原基（ラトケ囊）は口腔外胚葉の一部が陥入して生じる。その発生には口腔外胚葉と，隣接する腹側視床下部との相互作用が重要であることが分かっている（図 1b, 2a）。我々は，まずヒト ES 細胞から腹側視床下部を分化誘導する条件を探った。マウス ES 細胞から視床下部を誘導するのに使用する gfCDM という培地を用いてヒト ES 細胞を培養したところ終脳（FOXG1 陽性）に分化することが分かった（図 2b）。胚発生において視床下部は終脳よりも腹側に位置することから（図 2a），より腹側の位置情報を与えるヘッジホッグシグナルを ES 細胞凝集塊に与えたところ，腹側視床下部上皮（RX 陽性かつ NKX2.1 陽性）が高効率に誘導された（図 2b, c）。この条件をもとに，次に腹側視床下部と口腔外胚葉が同時に誘導される条件の検討を行った。その結果，骨形成タンパク質 4（BMP4）を添加すると腹側視床下部を取り囲むように口腔外胚葉と一緒に誘導されることを見出した（図 2d-f）。培養を継続すると，分化開始 26~27 日目頃には口腔外胚葉の一部が肥厚してプラコード化し，下垂体前駆細胞のマーカーである LHX3 を発現し，内側へ陥入してラトケ囊様のパウチ状構造を形成した（図 2g-j, l）。また線維芽細胞増殖因子（FGF）を添加するとラトケ囊様構造の形成頻度が向上することも分かった（図 2k）。さらに培養を続けると，67~70 日目には，下垂体プラコードに ACTH 産生細胞が認められるようになった（図 3a, b, d）。また ACTH の上流の転写因子である TBX19 も ACTH と共発現していた（図 3e）。これら ACTH 産生細胞は LHX3 陰性，Ki67 陰性であり，細胞質内に分泌小胞が存在することから成熟したホルモン産生細胞と考えられた（図 3c, d, f, g）。分化開始 72 日目より糖質コルチコイドを作用させると，分化 84 日目には GH 分泌細胞の分化が認められ（図 3h），同時にプロラクチンや甲状腺刺激ホルモン産生細胞も見受けられた（図 3i, j）。一方，Notch シグナルを阻害すると，黄体形成ホルモン，卵胞刺激ホル

モン産生細胞が誘導された (図 3k, l)。これらの結果から、ヒト ES 細胞から下垂体原基を経て、下垂体前葉の各種内分泌細胞が分化することが明らかになった。次に、ACTH 産生細胞の *in vitro* でのホルモン応答性を調べた。その結果、生体内と同様に、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) に特異的に応答して ACTH を分泌すること、さらに糖質コルチコイドを作用させると ACTH 分泌が抑制されることが分かった (図 4a-c)。また、ヒト ES 細胞由来の GH 産生細胞に関しても同様に成長ホルモン放出ホルモンの刺激を受けて GH が分泌され、ソマトスタチンにより GH 分泌が抑制されることも確認された (図 4d-f)。最後に、ヒト ES 細胞由来の下垂体組織が生体内で機能し得るかどうかを評価した。通常、マウス下垂体を摘出すると、ACTH の欠乏による糖質コルチコイド欠乏が生じ、数週間で死に至る。我々は下垂体を外科的に摘出した免疫不全マウスの腎被膜下にヒト ES 細胞由来の下垂体組織を移植したところ、移植 10 日後には ACTH 産生細胞が生着していることが明らかとなった (図 5a-c)。また移植マウスに CRH を投与すると血中 ACTH 値が上昇し、その標的ホルモンである糖質コルチコイドの血中濃度も上昇した (図 5d-g)。移植したマウスでは移植しなかったマウスと比較して、糖質コルチコイド欠乏時に見られる活動量の低下が回復することや、体重が維持されること、生存率が向上することも明らかになった (図 5h-k)。さらに、移植後 12~16 週間経っても、移植片は血管を伴って生着しており、CRH に応答して ACTH を分泌する能力も維持されていた (図 5d, l)。

### 【考察】

我々は本研究において、機能的な下垂体前葉をヒト ES 細胞から分化誘導する方法を確立した。ヒト ES 細胞にヘッジホッグシグナル、BMP シグナルを与えることにより視床下部と口腔外胚葉との異なる 2 つの組織が同一凝集塊内に誘導され、続いて視床下部と接した口腔外胚葉が陥入し、ラトケ嚢様下垂体原基が自己形成された。また、FGF を作用させると下垂体原基の自己組織化が促進された。これまで、ヒト下垂体発生メカニズムには不明な点が多かったが、こうしたヒト ES 細胞を用いた結果から、ヒト下垂体原基の発生にはマウスの発生と同様にヘッジホッグ、BMP、FGF シグナルが関与している可能性が示唆された。既に Dincer らは、ヒト多能性幹細胞から下垂体ホルモン産生細胞を分化させる方法を報告している。しかし、それらの細胞は動物体内で成熟させなければホルモンを分泌しない点や内分泌系に特徴的な上流・下流ホルモンへの応答性を示していない点、移植による治療的効果が示されていない点など、未達成の問題点が多く存在した。我々は、幹細胞の自己組織化を利用した立体培養法によりヒト網膜を高効率に誘導することを最近報告した (副論文 [Nat Commun, 2015] 参照)。この基盤技術を元に、本研究では生体内の下垂体と同様のホルモン応答性を有したヒト下垂体内分泌細胞を *in vitro* のみで誘導することに成功し、さらに動物移植により下垂体機能不全症に対する治療的効果を示した。こうした成果は、Dincer らが成し遂げられなかった課題を克服するものであり、分化誘導した下垂体組織の臨床応用実現へ向けた重要なステップとなるものである。

**【結語】**

我々は本研究で、ヒト ES 細胞から機能的な下垂体前葉を分化誘導する方法を確立し、それらをマウスに移植することで下垂体機能低下症に対する治療効果を実証した。ヒト多能性幹細胞から誘導した下垂体組織は今後、下垂体機能不全に対する再生医療への応用だけでなく、ヒトの下垂体発生モデルとしての利用や、疾患特異的人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を用いた下垂体疾患モデルとしての応用も見込め、新規薬剤の開発にも役立つと考えられる。