

主論文の要旨

**Vasopressin-secreting neurons derived from human  
embryonic stem cells through specific induction of  
dorsal hypothalamic progenitors**

〔 ヒト ES 細胞から背側視床下部への特異的な誘導による  
バソプレシン分泌ニューロンの分化法の確立 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
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)

小川 晃一郎

## 【緒言】

視床下部・下垂体系は、様々なホルモンを制御する司令塔とも言うべき中心的な働きをしており、視床下部は体温・睡眠・食欲など、多岐にわたる生命現象をコントロールするのに重要な役割を担っている。

生体において視床下部は腹側と背側に大きく分けられ、それぞれ異なるホルモン産生ニューロンが存在している。そのうち、バソプレシン (AVP) というホルモンは、主に背側視床下部で産生され下垂体後葉から分泌されて血液中に拡がるホルモンで、尿量を精密に制御し、身体の浸透圧を一定の範囲内に保つ働きをしている。視床下部や下垂体後葉の機能が低下して AVP 分泌が不足すると、1日に数リットルもの尿が出るようになり (中枢性尿崩症)、場合によっては高度の脱水から生命の危機に陥ることもある。

現在、根治療法は存在せず、不足している AVP を注射や点鼻あるいは内服薬で補う補充療法が行われている。しかしながら、生涯に渡ってホルモンを投与し続けなくてはならない、時々刻々と変動するホルモン必要量に対して現行の補充療法では細やかに対応できない、といった問題点がある。もし生体と同じように、必要に応じてホルモンを分泌したり止めたりできる性質を持った細胞を作り出して再生医療に用いることが出来れば、これまでの補充療法よりも優れた治療法となる可能性がある。本研究ではその第一歩として、ヒト ES 細胞から機能的な AVP ニューロンを作ることを目指した。

## 【方法・結果】

胎児内の視床下部発生過程を、ヒト ES 細胞を用いた試験管内培養で再現することを目指した。既報にあったマウス ES 細胞からの視床下部ニューロンへの分化誘導法を参考に、3次元浮遊培養 (SFEBq/gfCDM 法 : serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation / growth factor free chemically defined medium 法。コロニーを形成している未分化ヒト ES 細胞を single cell に解離させ、低接着性プレートにまき、血清や成長因子を含まない培地にて凝集塊を形成して立体培養を行う方法) を行った (Fig. 1A)。しかし、マウス ES 細胞と異なり、無血清培地では細胞がうまく凝集塊を形成しなかった (Fig. 1B)。栄養不足と考え、血清代替物 (KSR) を少量混ぜたところ、凝集塊はできたものの、FOXG1 陽性の終脳へと位置情報がずれてしまった (Fig. 1C)。そこで、背-腹軸の位置決めに必要な役割を果たす骨形成タンパク質 (BMP) とヘッジホッグシグナル作動薬 (SAG) とを作用させて RAX 陽性の視床下部前駆細胞に分化させた (Fig. 1F-H)。RAX 陽性率は 80-90% と高率であった (Fig. 1L)。さらにその濃度や添加期間を調節し、背側 (PAX6 陽性) と腹側 (NKX2.1 陽性) の視床下部前駆細胞を作り分けることに成功した (Fig. 2C, E)。

この背側視床下部の条件で浮遊培養を進めたが、AVP の前駆マーカーである OTP および BRN2 の陽性化はわずかであったため、半透膜を用いた平面培養を試した (Fig. 3A-C)。その結果、OTP および BRN2 陽性細胞を多数確認できたが、長期培養にて AVP

発現はごくわずかであった。そこで、神経発生に有利とされる分散培養を試した。浮遊凝集塊を細かく砕き、ラミニン、PDL、Matrigel でコーティングしたディッシュにまいて2次元培養を行った (Fig. 4B)。長期培養にて視床下部前駆細胞を成熟させ、浮遊培養と比べ高効率に AVP ニューロンが発現していることを day150 で確認した。また、これらの細胞のサイズは  $40 \times 20 \mu\text{m}$  程度で、vivo の大細胞性ニューロンの細胞体とほぼ同等のサイズであった (Fig. 4C)。

背側視床下部では AVP 以外にオキシトシン、CRH、TRH、NPY も産生されるが、これらのニューロンも免疫染色で確認した (Fig. 4F-I)。さらに、外側野に特徴的な MCH や OREXIN、弓状核に特徴的な AGRP や POMC といったその他の視床下部ホルモンもわずかながら認められた (Fig. 4J-M)。AVP の分化効率は他のニューロンと比べて明らかに高くなっており、既報と比べて10倍以上と高効率に分化誘導できた (Fig. 4Q)。さらに、RIA にて AVP の分泌を確認し、KCl 投与による刺激にて AVP 分泌の増加を確認した (Fig. 4R, S)。

また、腹側視床下部条件では、背側視床下部条件よりも MCH が多く発現していた (Fig. 4N)。

なお、統計学的処理については、各数値は  $\text{mean} \pm \text{SE}$  で表し、2群間の比較には Student の t 検定、多群間の比較には one-way ANOVA を用いて解析した。また、危険率 5%未満をもって有意差ありとした。

## 【考察】

本研究では、ヒト ES 細胞から機能的な視床下部バソプレシンニューロンを作り出すことに成功した。尿崩症に対する再生医療の基盤技術として第一歩を踏み出したと言える。今後、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) へ技術展開していく予定である。本研究において高効率な AVP ニューロンへの分化方法を確立できたポイントは、胎児の発生過程を再現し、視床下部ニューロンへ分化するまでの各段階において特徴的な転写因子が発現する最適な培養条件を検討し、背側視床下部へ特異的に誘導した点であると考えられる。

本研究では2つの問題が課題として挙げられる。1点目は分泌刺激試験である。本研究では KCl で刺激し AVP 分泌の増加を確認したが、KCl は非特異的な刺激であるため、今後は背側視床下部に特異的な刺激試験を考える必要がある。2点目は使用したヒト ES 細胞のセルラインが少ないことである。今回は2種類を用いたが、一般的には3種類以上が望ましいとされる。日本では使用できるヒト ES 細胞の種類が少ないため、今後はヒト iPS 細胞での検討が必要である。

本研究では、背側視床下部への誘導のために、背-腹軸の位置決定に重要な BMP4 と SAG、そして吻側化(視床下部は神経管の最も吻側から分化する)を目的として Akt-inhibitor を用いて培養条件を最適化した。しかしながら、位置情報を決めるシグナルとして神経管の分化において WNT、レチノイン酸、FGF、TGF 等が知られており、これらについても検討の必要性がある可能性がある。

視床下部はヒトの脳でも非常に小さな領域であり、なおかつ生命維持に直結した働きをしているため、ヒトから直接細胞を採取してくることが難しい領域である。本分化法ではヒト胎児の視床下部発生を再現していることから、ヒトの視床下部を試験管内で再現したモデルとしての利用や、疾患の発生メカニズムを探求するモデルとして応用も見込め、また、中枢性尿崩症や他の視床下部疾患への再生医療の第一歩としても期待できる。

#### **【結語】**

ヒト ES 細胞から背側視床下部への誘導により、機能的な AVP ニューロンへと分化させる方法確立した。