

主論文の要旨

**Hypothalamic Contribution to Pituitary Functions Is
Recapitulated *In Vitro* Using 3D-Cultured Human iPS Cells**

ヒトiPS細胞の立体培養を用いた*In Vitro*での
視床下部の下垂体への影響の再現

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)

笠井 貴敏

【背景】

下垂体は視床下部の制御を受けさまざまなホルモンを分泌している。下垂体ホルモン産生細胞の機能が低下するとさまざまな症状が出現する。特に下垂体ホルモンの一つである副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）が低下すると副腎不全を起こし生命の危機に陥ることもある。下垂体機能低下症に対する現在の治療は不足しているホルモンの補充療法であるが、変動するホルモン必要量に対して適切な量を補充することは困難である。補充の不足による副腎不全や補充の過剰による糖尿病や高血圧などの発生リスクが存在している。周囲の環境に適切に応答できる下垂体ホルモン産生細胞が作製できれば、補充療法よりも優れた治療法になる可能性がある。多能性幹細胞から下垂体ホルモン産生細胞への分化誘導方法はこれまでに複数報告されており、我々はこれまでに立体培養法を用いマウスとヒトの胚性幹細胞（ES細胞）から下垂体ホルモン産生細胞を作製することに成功していた。今回この培養方法を用い、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）からの分化誘導を試みた。

【結果】

まずはヒト ES細胞の分化誘導方法と同じ方法でヒト iPS細胞 201B7株を培養した。培養40日目で下垂体の初期のマーカーであるLHX3が陽性の細胞を確認出来た。60日目と100日目にACTH陽性細胞を確認出来、201B7株から下垂体へ分化誘導することが出来たと考えられた。次に誘導効率を上げるため培養条件を変更した。培養開始時の細胞数、試薬の濃度、試薬の添加時期の条件を変更し検討した。その結果、変更した条件で培養した時、ヒトES細胞での条件と比較し、100日目の免疫染色でのACTH陽性細胞の割合、100日目の培養液中のACTH濃度が高値であった。その他の2種類のヒトiPS細胞（409B2株、454E2株）でも同様の検討を行った。ヒトES細胞での条件で培養したところ、免疫染色でACTH陽性細胞を確認出来た。誘導効率を上げることを目指して条件を変更し培養を行ったところ、有意ではないもののACTH陽性細胞の割合が上がる傾向にあった。ばらつきの大きさは課題として残るものの、3種類のヒトiPS細胞から下垂体へ分化誘導することに成功したと考えられた。

発生の過程において下垂体への分化には視床下部との相互作用が重要と考えられている。ヒトiPS細胞からの下垂体分化培養の初期段階で同じ凝集体内に視床下部原基も存在していた。下垂体と視床下部原基を隣接させた状態で200日程度の長期培養を行ったところ、CRH陽性細胞が確認できた。AVPやNPYなど他の視床下部ホルモン陽性細胞も存在していた。下垂体と視床下部が共存している組織が誘導出来ていると考えられ、さらに長期に培養すると300日程度までACTH分泌能力が上昇した。電子顕微鏡で観察すると多くのACTH顆粒を含んだ細胞が確認され、成熟したACTH細胞が誘導出来ていることが示唆された。長期培養において視床下部が下垂体の成熟に与える影響を評価するため70日目に凝集体内の下垂体と視床下部を分離し150日目に培養液中のACTH値を測定した。下垂体のみ分離し培養した場合のACTH値は低値であったが、分離した視床下部部位を再度下垂体と隣接して培養すると培養液中

の ACTH 値は高値となった。下垂体のみの培養に視床下部因子である FGF や BMP4 を加えた場合も ACTH 値は高値となった。これにより視床下部の存在が下垂体分化の初期段階のみではなく成熟の段階においても重要であることが示唆された。1 細胞あたりの ACTH 分泌量を測定したところ、成体マウスの下垂体細胞と同程度の分泌能力を示した。

次に ACTH 細胞の機能性を評価した。誘導した組織に CRH を負荷したところ ACTH は 2 倍程度に上昇した。デキサメサゾン投与すると ACTH は低下しネガティブフィードバック機能を有していることが確認された。CRH レセプター1 阻害薬を投与すると ACTH 値は低下した。低グルコース刺激を加えたところ ACTH の分泌は 3 倍程度に上昇した。低グルコース刺激による ACTH の上昇は CRH レセプター1 阻害薬の存在下では減弱した。これらの結果から ACTH 産生細胞が同じ凝集体内の視床下部の制御を受けて機能していることが示唆された。

【考察】

ヒト多能性幹細胞から 2 次元培養を用いて下垂体を分化誘導する方法も報告されているが、我々は立体培養法を用いて分化誘導を行っている。生体内の発生過程で視床下部は下垂体の分化と成熟に重要とされており、立体培養法は生体内と同じように下垂体と視床下部を隣接させ培養出来るという利点がある。今回の研究でも長期に下垂体と視床下部を隣接させ培養することで ACTH 分泌能力は上昇し、誘導された ACTH 産生細胞のホルモン分泌能力は成体マウスの下垂体細胞と同程度の能力を有していた。また、誘導された ACTH 細胞は CRH 刺激、グルココルチコイド刺激に適切に反応した。CRH レセプター1 阻害薬負荷と低グルコース刺激の結果から ACTH 細胞が同じ凝集体内の CRH 細胞の制御を受けて機能していることが示唆された。誘導された組織が生体と同じように周囲の環境に反応する能力を有した成熟した組織（視床下部-下垂体ユニット）であると考えられた。

【結語】

視床下部と下垂体の発生過程を再現し両方の組織を同時に分化誘導することで、ヒト iPS 細胞から成熟した視床下部-下垂体ユニットを作成することに成功した。