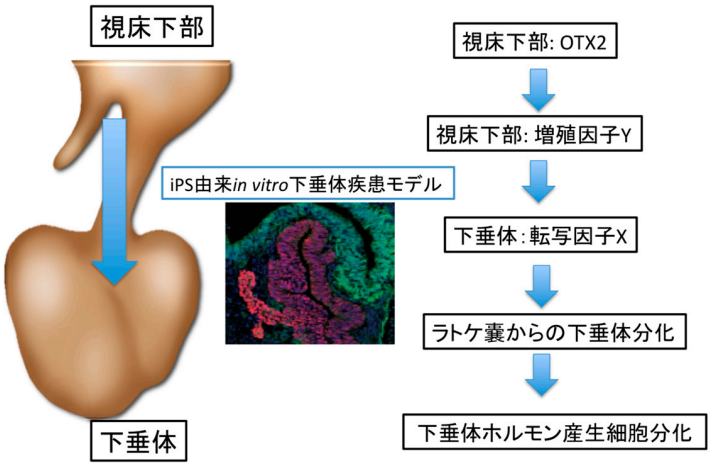
78　iPS細胞を用いた先天性下垂体形成不全の病態解明	高橋　裕

【目的】先天性下垂体形成不全は小児下垂体機能低下症の中で比較的頻度の高い疾患であり、多くは新生児期に低血糖や低 Na 血症、乳幼児期に成長障害などで診断される一方、成人期に副腎不全など重篤な病態を契機に初めて診断されることもまれではない。これまでその原因として下垂体関連転写因子である *PROP1*、*HESX1*、*LHX3*、*LHX4*、*GLI2* などの遺伝子変異が報告されているが、未だ 80〜90%の原因は不明である。今回これまで報告された先天性下垂体形成不全とは明らかに異なる先天性前葉･後葉形成不全の症例に遭遇したことが本研究のきっかけとなった。近年 iPS 細胞から様々な組織への分化誘導法が開発され、再生医療、疾患モデル作製、創薬スクリーニングなどに応用されつつある。下垂体／視床下部への分化誘導法も報告されているが、これまでに疾患モデルを作製した報告はされていない。本分化誘導法は下垂体の原基である口腔外胚葉と視床下部を試験管内で同時に分化誘導し、それらの相互作用を *in vitro* で再現し自己組織化を誘導する方法であることから胎生期の下垂体発生をよく再現しており、先天性下垂体機能低下症の疾患モデル作製に最適だと考えられる。本研究では、エクソーム解析と疾患特異的 iPS 細胞を用いた *in vitro* モデルの病態解析により先天性下垂体形成不全の原因および病態解明を目指して研究を行った。

【方法】本研究では、ヒト iPS 細胞からの下垂体分化プロトコールの確立、先天性下垂体低形成症例から疾患特異的 iPS 細胞の樹立と樹立した疾患特異的 iPS 細胞 *in vitro* 分化異常の有無と臨床的表現型の関連についての解析を行った。また下垂体分化異常を認めた場合にはその機序の詳細について解析を行った。さらに原因不明の先天性下垂体前葉、後葉機能低下症例におけるエクソーム解析による責任遺伝子の同定とその発症機序の解析を行った。

【結果】原因不明の先天性下垂体前葉、後葉機能低下症例由来の疾患 iPS 細胞の解析によって、下垂体前葉細胞分化能が著しく障害されていることが明らかになった。エクソーム解析によって視床下部下垂体に発現する転写因子 *OTX2* 遺伝子異常を同定した。さらに疾患 iPS 細胞の *in vitro* 下垂体分化モデルを用いた解析から、OTX2 は下垂体発生過程において視床下部に発現し、視床下部の増殖因子 Y のシグナルを調節し、口腔外胚葉の転写因子 X の発現を上昇させることで下垂体発生を促すことが明らかとなった。*OTX2* 遺伝子変異はこれまでも下垂体前葉低形成の原因になることが報告されていたが、今回の我々の検討から下垂体前葉だけではなく後葉形成不全もきたしうること、視床下部における OTX2 が視床下部における増殖因子を介して下垂体分化に必須の転写因子発現を調節し分化を促進するという新たな機序を明らかにした（図）。さらに本研究において、疾患特異的 iPS 細胞を下垂体疾患の病態解明に世界で初めて応用し、非常に有用な手法であることを証明した。

下垂体低形成疾患特異的 iPS 細胞解析から明らかになった新たなヒト下垂体分化の機序



78. iPS 細胞を用いた先天性下垂体形成不全の病態解明

高橋　裕

神戸大学 大学院医学研究科 糖尿病内分泌内科学

Key words：疾患 iPS 細胞，先天性下垂体形成不全，下垂体分化異常

緒　言

先天性下垂体形成不全は小児下垂体機能低下症の中で比較的頻度の高い疾患であり、多くは新生児期に低血糖や低 Na 血症、乳幼児期に成長障害などで診断される一方、成人期に副腎不全など重篤な病態を契機に初めて診断されることもまれではない。これまでその原因として下垂体関連転写因子である *PROP1*、*HESX1*、*LHX3*、*LHX4*、*GLI2* などの遺伝子変異が報告されているが、未だ 80～90%の原因は不明である。さらにこれらの遺伝子のノックアウトマウスは必ずしもヒトの表現型と合致しないこと、同じ変異を持っていても浸透率が低いことがその病態解明を困難にしている。

今回これまで報告された先天性下垂体形成不全とは明らかに異なる先天性前葉･後葉形成不全の症例に遭遇したことが本研究のきっかけとなった。近年 iPS 細胞から様々な組織への分化誘導法が開発され、再生医療、疾患モデル作製、創薬スクリーニングなどに応用されつつある。下垂体／視床下部への分化誘導法も報告されているが［1～3］、これまでに疾患モデルを作製した報告はされていない。本分化誘導法は下垂体の原基である口腔外胚葉と視床下部を試験管内で同時に分化誘導し、それらの相互作用を *in vitro* で再現し自己組織化を誘導する方法であることから胎生期の下垂体発生をよく再現しており、先天性下垂体機能低下症の疾患モデル作製に最適だと考えられる。本研究では、エクソーム解析と疾患特異的iPS 細胞を用いた *in vitro* モデルの病態解析により先天性下垂体形成不全の原因および病態解明を目指して研究を行った。

方　法

1. ヒト iPS 細胞からの下垂体分化プロトコールの確立

これまでヒト ES 細胞からの下垂体分化プロトコールはほぼ確立されているが、ヒト iPS 細胞を用いる場合には最適化が必要であることが明らかになった。培養条件、増殖分化因子のよる刺激条件の最適化を行った結果、ヒト iPS 細胞から下垂体前葉細胞（ACTH, GH）、後葉細胞への分化が可能になった。

2. 先天性下垂体低形成症例から疾患特異的 iPS 細胞の樹立

原因不明症例、*LHX4*、*GLI2* 異常症患者の末梢血単核球にエピソーマルベクターを用いて OCT4、SOX2、KLF4、L-MYC、shP53 を導入することにより疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。

3. 原因不明の先天性下垂体前葉、後葉機能低下症、*LHX4*、*GLI2* 異常による先天性下垂体低形成症例疾患特異的 iPS 細胞の病態解析

樹立した疾患特異的iPS 細胞 *in vitro* 分化の過程における分化異常の有無と臨床的表現型の関連についての解析を行った。また下垂体分化異常を認めた場合にはその機序の詳細について、解析を行った。

4. 原因不明の先天性下垂体前葉、後葉機能低下症例におけるエクソーム解析、責任遺伝子の同定とその証明

原因不明の症例については、エクソーム解析（本人、両親のトリオ解析）によって候補遺伝子を同定し、疾患特異的 iPS 細胞において Crisper/CAS9 法による遺伝子修復を行い *in vitro* の表現型がレスキューされるかどうかの検討を行った。

結果および考察

原因不明の先天性下垂体前葉、後葉機能低下症より樹立した疾患特異的 iPS 細胞を既報［2］に従い、下垂体-視床下部組織に *in vitro* における分化誘導を行い、健常人由来コントロール iPS 細胞株（201B7、409B2、HC01#1）と比較を行ったところ、三次元培養により、疾患 iPS 細胞株（OTX2-iPSC）、コントロールともに口腔外胚葉-視床下部の二重構造を持つ組織に分化誘導が可能であった。しかしさらに長期間の培養による分化誘導を行うと、コントロール株では視床下部ホルモンに反応して ACTH や GH といった下垂体前葉ホルモンを分泌する機能的なホルモン産生細胞を誘導可能であったが、OTX2-iPSC ではこれらのホルモン産生細胞への分化が著しく障害されていた（図 1）。

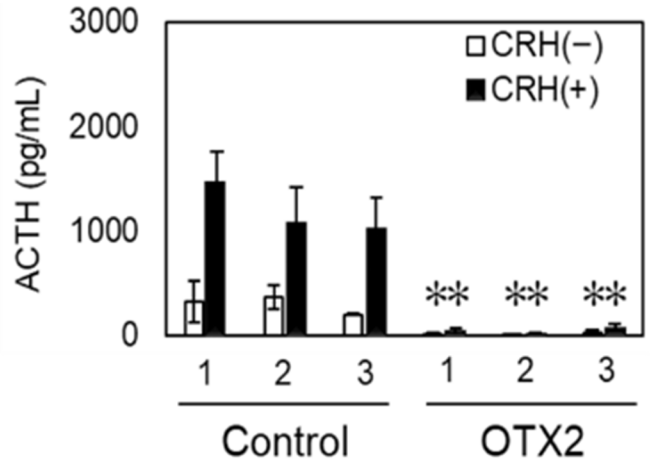


図 1. 疾患特異的 iPS 細胞からの ACTH 産生細胞分化誘導と患者 iPS 細胞における産生細胞分化異常
コントロール株由来の下垂体細胞は ACTH 産生細胞に分化し、視床下部ホルモンである CRH に反応するが、患者 iPS 細胞（OTX2）では、ACTH はほとんど産生分泌されなかった。検定は ANOVA を用いた。**P < 0 .01

次に下垂体発生のどの過程が障害されているのか、分化誘導過程を継時的に解析したところ、PITX1、E-cadherin などを発現する口腔外胚葉への分化まではコントロールと明らかな違いはないものの、その後の分化過程において口腔外胚葉から発生する下垂体の原基であるラトケ嚢のマーカーである転写因子 X の発現が著明に低下していることが明らかとなった。この転写因子 X はラトケ嚢の細胞増殖・維持に重要であることが報告されている。そこで分化誘導組織の細胞増殖およびアポトーシスを評価したところ、細胞増殖は変化していないものの、アポトーシス細胞が増加しており、これによって下垂体分化異常が生じているものと考えられた。

また同時に行ったエクソーム解析によって、下垂体、視床下部において発生過程で発現する転写因子 *OTX2* 遺伝子において de novo のヘテロのミスセンス変異を同定した。*in vitro* における OTX2 変異体の機能解析では、核内に移行することができず、機能を喪失していることが明らかになった。*OTX2* 遺伝子は下垂体発生過程において口腔外胚葉に発現し下垂体発生に関わる HESX1 などの転写因子を直接制御する一方で、視床下部にも発現している可能性があることからコントロール分化誘導組織において OTX2 の発現を調べたところ、口腔外胚葉よりもむしろ視床下部に強く発現していた。

そこで視床下部から口腔外胚葉へ作用する分泌分子に着目して発現を調べたところ、視床下部（口腔外胚葉）から分泌され下垂体に作用する増殖因子 Y の発現が低下していた。この増殖因子シグナルの低下が *OTX2* 異常症の発症に関わっているのかを明らかにするために、分化誘導培地にその増殖因子 Y を添加したところ、下垂体における転写因子 X の発現がレスキューされた。さらに *OTX2* 変異がこれらの表現型の原因であるかを確かめるため、CRISPR/Cas9 システムを用い、OTX2-iPSC の変異修復株を樹立し、下垂体-視床下部への分化誘導を行った。変異修復株では視床下部組織での増殖因子 Y 発現が回復しており、同時に転写因子 X の発現も回復していたことより、この変異が原因であることを証明することができた。

以上の結果から、OTX2 は下垂体発生過程において視床下部に発現し、視床下部から口腔外胚葉への増殖因子 Y シグナルを調節し、転写因子 X の発現を上昇させることで下垂体発生に関わっていることが明らかとなった。*OTX2* 遺伝子変異はこれまでも下垂体前葉低形成の原因になることが報告されていたが、今回の我々の検討から下垂体前葉だけではなく後葉形成不全もきたしうること、そして視床下部における OTX2 が視床下部における増殖因子 Y の発現を調節することによって下垂体分化に必須の転写因子 X を発現させ、下垂体分化を進めるという新たな機序を明らかにした（図 2）。さらに本研究は疾患特異的 iPS 細胞を下垂体疾患の病態解析に初めて応用し、有用な手法であることを示した。

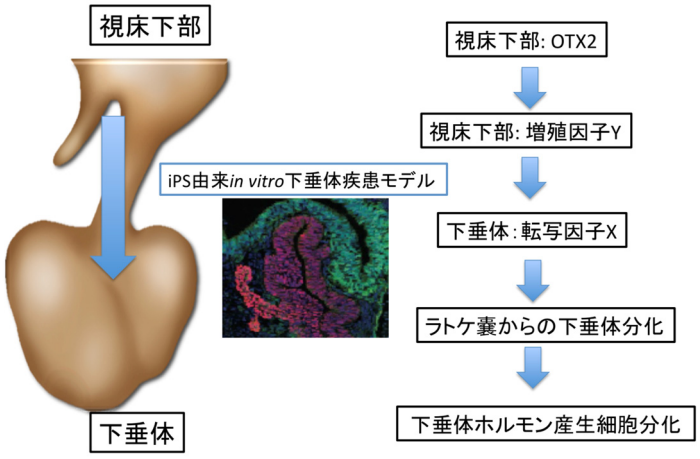


図 2. 下垂体低形成疾患特異的 iPS 細胞解析から明らかになった新たなヒト下垂体分化の機序
転写因子 OTX2 は視床下部における増殖因子 Y 発現を促進し、下垂体における転写因子 X の発現を調節する。
OTX2 の変異により下垂体転写因子 X 発現が障害され、下垂体分化異常をきたした。

本研究で用いた *in vitro* の下垂体分化法は、視床下部と下垂体を同時に分化させることができることから、両組織の相互作用を再現しながらのヒト下垂体発生の詳細な機序の解明や、ノックアウトマウスでは再現困難な先天性下垂体低形成のモデルとしても応用可能であると考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究は、神戸大学大学院医学研究科糖尿病内分泌内科学医学研究員の松本隆作博士の尽力の賜物であり、共同研究者は、神戸大学大学院科学イノベーション研究科幹細胞生物学の青井貴之博士、慶應義塾大学小児内分泌学の長谷川奉延博士、名古屋大学糖尿病内分泌内科学の須賀秀隆博士、理化学研究所の六車恵子博士である。この場をお借りして深謝申し上げます。

文　献

1） Suga H, Kadoshima T, Minaguchi M, Ohgushi M, Soen M, Nakano T, Takata N, Wataya T, Muguruma K, Miyoshi H, Yonemura S, Oiso Y, Sasai Y. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. Nature. 2011 Nov 9;480(7375):57-62. doi: 10.1038/nature10637.

2） Ozone C, Suga H, Eiraku M, Kadoshima T, Yonemura S, Takata N, Oiso Y, Tsuji T, Sasai Y. Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. Nat Commun. 2016 Jan 14;7:10351. doi: 10.1038/ncomms10351.

3) Ogawa K, Suga H, Ozone C, Sakakibara M, Yamada T, Kano M, Mitsumoto K, Kasai T, Kodani Y, Nagasaki H, Yamamoto N, Hagiwara D, Goto M, Banno R, Sugimura Y, Arima H. Vasopressin-secreting neurons derived from human embryonic stem cells through specific induction of dorsal hypothalamic progenitors. Sci Rep. 2018 Feb 26;8(1):3615. doi: 10.1038/s41598-018-22053-x.