

平成 30 年 9 月 26 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07771

研究課題名(和文) 転写因子PROP1とPRXsを発現する下垂体の幹・前駆細胞の機能解析

研究課題名(英文) Studies of the roles of pituitary stem/progenitor cells that express the transcription factors, PROP1 and PRXs

研究代表者

加藤 たか子 (Kato, Takako)

明治大学・研究・知財戦略機構・研究推進員

研究者番号：90445859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体は脳の直下に位置する内分泌小器官で、申請者らは、下垂体特異的転写因子PROP1と新規下垂体転写因子PRXsに着目して研究を進めてきた。本研究期間に、PROP1遺伝子の発現調節機構を解析し、1)多数の因子の作用領域がプロモーター上流にあること、2)この遺伝子のメチル化が発生初期に発現に部分的に関与していること、3)PROP1遺伝子が初期の下垂体原基でレチノイン酸の制御を受けること、4)PRX1とPRX2陽性の下垂体細胞が下垂体毛細血管形成に機能していること、5)PRXsを発現するTtT/GF細胞はTGFによりペリサイト様の遺伝子発現をする未分化性を持つこと、などの成果を挙げた。

研究成果の概要(英文)：The pituitary gland is an endocrine organ that locates beneath the brain and synthesizes hormones important for maintenance of vital functions. The development and differentiation of tissues is progressing through the spatiotemporal expression of many transcription factors. This project focuses on the role of the pituitary-specific transcription factor, PROP1, and a novel pituitary transcription factor, PRX2 involved in pituitary organogenesis. Our studies have demonstrated following important results: 1) the responsive regions of many factors are present in the upstream promoter of PROP1 gene, 2) methylation of this gene is partially involved in expression in early development, 3) retinoid regulates the expression of PROP1 in the pituitary primordium, 4) PRX1- and PRX2-positive cells in the pituitary mesenchyme are involved in the pituitary vasculogenesis, 5) TtT / GF cells, expressing PRXs, derived from pituitary tumors, change into cells that express pericyte-like genes by TGF .

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体 幹細胞 生殖 分化 組織形成 転写因子 神経堤 血管形成

1. 研究開始当初の背景

下垂体は脳の直下に位置し、生体の機能維持に働く複数のホルモンを合成する内分泌器官であり、発達した血管網を通して、視床下部の制御を受けてホルモンの分泌を行っている。この組織は、多数の転写因子の時空間的な発現を通じて発生・分化が進行している。申請者らは、下垂体特異的転写因子 PROP1 と新規下垂体転写因子として発見した Paired related homeobox proteins (PRXs; PRX1 と PRX2) に着目して、内分泌細胞と血管形成などの研究を進めている。

2. 研究の目的

下垂体の発生・分化過程における PROP1 と PRXs の役割を明らかにするとともに、PROP1 遺伝子の発現制御を行う因子や、制御機構を解析する。また、下垂体の幹・前駆細胞クラスターにおける PROP1 の発現制御の解析をおこなう。また、下垂体腫瘍化から得られた PRXs を発現する株化細胞 TtT/GF を使って、この細胞の機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) PROP1 遺伝子の転写制御因子について：PROP1 遺伝子プロモーターについて、各種の転写因子の発現ベクターを用いて、プロモーターアッセイとその作用領域の解析を行った。

(2) エピジェネティクス制御の解析：下垂体組織から抽出したゲノム DNA を用いて、バイサルファイト法による DNA メチル化解析を行った。

(3) PROP1 遺伝子のレチノイン酸の制御の解析：下垂体原基を摘出してレチノイン酸存在下で組織培養を行い、種々の因子の抗体を用いた免疫組織化学、PROP1 遺伝子の発現量の測定、などを行った。

(4) TtT/GF 細胞の未分化性の解析：PRXs を発現する下垂体腫瘍由来の TtT/GF 細胞の全 RNA を用いて、他の下垂体腫瘍由来の株化細胞と発現遺伝子の比較を行い、未分化性を分析した。

(5) TtT/GF 細胞の分化能の解析：TtT/GF 細胞を TGFβ の存在下で培養して、発現する遺伝子の変化を解析するとともに、免疫細胞染色でその変化を観察した。

4. 研究成果

(1) PROP1 遺伝子の転写制御因子について：下垂体の発生初期に発現が知られている複数の転写因子の発現ベクターを、PROP1 遺伝

子を連結したレポーターベクターと CHO 細胞に共導入して、発現レベルを調べた。その結果ら、16種の因子が発現の調節に関わることが示唆された(図1)。また、それらの因子と幹細胞マーカーである SOX2 との共役を調べ、幾つかの因子が協調的に働く可能性を

Table 5. Putative binding site for transcription factors present within 50-base regions of the five putative SOX2-binding sites in the 5'-upstream region of Prop1

SOX2-binding site	Sequence	Binding site within 50-base regions of the SOX2-binding sites				Others ¹⁾
		SOX2-dependent		SOX2-independent		
		Stimulation	Repression	Stimulation	Repression	
-2950~-2945	TCAAG	HES1, HEY1, HEY2				
-2548~-2543	CTTTGT	PITX1 ²⁾ , PITX2 ²⁾	MSX1	PITX1 ²⁾ , PITX2 ²⁾	MSX2, SOX11	OTX2
-1874~-1869	ACAATG		KLF6			
-1784~-1779	CATTGA	HES1, HEY1, HEY2				
-1137~-1132	TCAAG					RBP-J

図1. PROP1 遺伝子転写開始点上流に作用する種々の転写因子

示した。

(2) PROP1 遺伝子のエピジェネティクス制御：胎仔期および生後成熟期の下垂体前葉からゲノム DNA を調製して、PROP1 遺伝子の DNA メチル化部位の解析結果を比較すると、非メチル化度がある程度に違うことが幾つかの領域で観察された(図2)。このことから、胎仔期において、PROP1 遺伝子は、低メチル化状態であることが判明した。



図2. 下垂体ゲノムを胎仔期や出生後の組織から調製して、バイサルファイト法により、メチル化(黒丸の部位がメチル化を受けていた)の程度を調べた。最上段にはゲノムの模式図(矢印が転写開始点、白枠、黒枠がエクソンで、前者は非翻訳領域)・調べた7領域のうち、3箇所(胎仔期と較べてメチル化の程度に違いが存在した)。

(3) PROP1 遺伝子のレチノイン酸の制御：組織化学的にレチノイン酸合成酵素と受容体が、初期の下垂体原基に存在する事を確認した。その後、摘出した下垂体原基をレチノイン酸存在下で培養して PROP1 遺伝子の発現レベルを解析すると有意にそのレベルが増加していた (図 3)

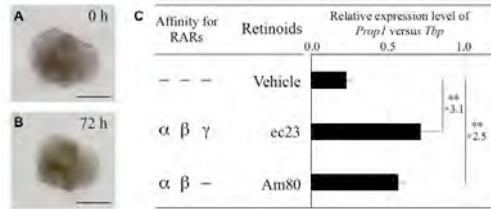


図 3. 摘出した下垂体原基 (A) をレチノイド (ec23, Am80) で 72 時間処理する (B) と有意に *Prop1* の発現が増加した。

(4) 下垂体毛細血管形成：下垂体の PRX1 と PRX2 陽性細胞について免疫組織化学を行い、両者が幹・前駆細胞としての性質を持つこと、そして、下垂体内に張り巡らされた血管網の形成に関わることを明らかにした (図 4)。

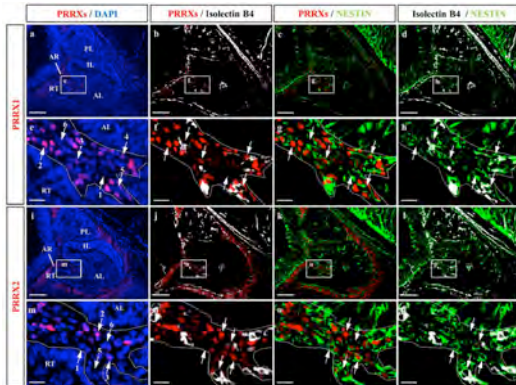


図 4. ラット胎仔期下垂体の免疫組織化学。PRRX1 および PRRX2 の陽性細胞 (赤) には Isolectin (白) や NESTIN (緑) に陽性 (矢印) のものがある。

(5) TtT/GF 細胞の分化能：TtT/GF 細胞の未分化性と発現遺伝子の特徴に注目して、TGF β の存在下で培養すると、形態変化を示した。その際の遺伝子の発現変化を調べると、ペリサイト様の遺伝子発現をする細胞に変化することが示された。その特徴から、マーカーとして NG2 などの抗体で細胞染色を行うと、ペリサイト (血管周皮細胞) などに特異的な分子が確認できた (図 5)。

(6) 研究成果の意義と考察

以上の結果により、①下垂体の発生初期には、下垂体特異的転写因子 PROP1 は、時空間的発現する多数の転写因子の制御を受けると共に、②エピジェネティックなメチル化の制御も受け、さらに、③レチノイン酸シグナルによる調節も受けることが初めて判った。また、PRXs を発現する TtT/GF 細胞の解析から、④

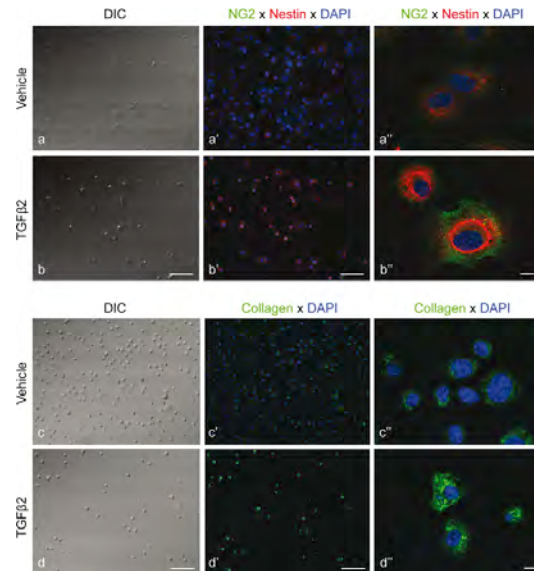


図 5. TtT/GF 細胞を TGF β で処理すると細胞の形状が変わることから、発現する遺伝子とその産物であるタンパク質の変化が推測できる。網羅的なタンパク質の解析を行い、幾つかのマーカータンパク質を細胞免疫染色で調べた。その結果、ペリサイト (周皮細胞) に特徴的な NG2、Nestin、Collagen などが TGF β 処理によって著明に増加していることが判った。

PRXs を発現する細胞の一部は未分化性を持っていること、⑤TGF β シグナルにより血管形成に関わるペリサイトへと分化することが示唆された。

本研究により、未解明の多かった下垂体発生初期の分子機序の解明がかなり進展した。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 23 編)

1. Yoshida S, Fujiwara K, Nishihara H, Kato T, Yashiro T, Kato Y. Retinoic acid signalling is a candidate regulator of the expression of pituitary-specific transcription factor *Prop1* in the developing rodent pituitary. *J Neuroendocrinol* 2018; DOI: 10.1111/jne.12570; .
2. Yoshida S, Kato T, Kanno N, Nishimura N, Nishihara H, Horiguchi K, Kato Y. Cell type-specific localization of Ephs pairing with ephrin-B2 in the rat postnatal pituitary gland. *Cell Tissue Res* 2017; 370: 99–112.
3. Ueharu H, Yoshida S, Kikkawa T, Kanno N, Higuchi M, Kato T, Osumi N, Kato Y. Gene tracing analysis reveals the contribution of neural crest-derived cells in pituitary development. *J Anat* 2017; 230: 373–380.
4. Ueharu H, Yoshida S, Kanno N, Horiguchi K, Nishimura N, Kato T, Kato Y. SOX10-positive cells emerge in the rat pituitary gland during late embryogenesis and

- start to express S100beta. *Cell Tissue Res* 2017; doi: 10.1007/s00441-017-2724-7.
5. Tsukada T, Yoshida S, Kito K, Fujiwara K, Yako H, Horiguchi K, Isowa Y, Yashiro T, Kato T, Kato T. TGFbeta signaling reinforces pericyte properties of the non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF. *Cell Tissue Res* 2017; 371: 339-350.
 6. Ohta A, Tsunoda Y, Tamura Y, Iino K, Nishimura N, Nishihara H, Takanashi H, Yoshida S, Kato T, Kato Y. Construction and expression of vectors encoding biologically active rodent gonadotropins. *J Reprod Dev* 2017; 63: 605-609.
 7. Nishihara H, Yoshida S, Kanno N, Nishimura N, Ueharu H, Ohgane J, Kato T, Kato Y. Involvement of DNA methylation in regulating rat Prop1 gene expression during pituitary organogenesis. *J Reprod Dev* 2017; 63: 37-44.
 8. Higuchi M, Yoshida S, Kanno N, Mitsuishi H, Ueharu H, Chen M, Nishimura N, Kato T, Kato Y. Clump formation in mouse pituitary-derived non-endocrine cell line Tpit/F1 promotes differentiation into growth-hormone-producing cells. *Cell Tissue Res* 2017; 369: 353-368.
 9. Yoshida S, Nishimura N, Ueharu H, Kanno N, Higuchi M, Horiguchi K, Kato T, Kato Y. Isolation of adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchyma of the rat anterior lobe. *Stem Cell Res* 2016; 17: 318-329.
 10. Yoshida S, Kato T, Nishimura N, Kanno N, Chen M, Ueharu H, Nishihara H, Kato Y. Porcine LIM homeobox transcription factors, LHX2 and LHX3, and transcription of follicle-stimulating hormone subunit genes. *J Reprod Dev* 2016; 62: 241-248.
 11. Yoshida S, Kato T, Kato Y. EMT involved in migration of stem/progenitor cells for pituitary development and regeneration. *J Clin Med* 2016; 5: 43.
 12. Yoshida S, Kato T, Kato Y. Regulatory system for stem/progenitor cell niches in the adult rodent pituitary. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 75.
 13. Nishimura N, Ueharu H, Shibuya S, Nishihara H, Yoshida S, Higuchi M, Kanno N, Horiguchi K, Kato T, Kato Y. Search for regulatory factors of pituitary-specific transcription factor PROP1 gene. *J Reprod Dev* 2016; 62: 93-102.
 14. Moriyama R, Yamazaki T, Kato T, Kato Y. Long-chain unsaturated fatty acids reduce the transcriptional activity of the rat follicle-stimulating hormone β -subunit gene. *J Reprod Dev* 2016; 62: 195-199.
 15. Kanno N, Higuchi M, Yoshida S, Yako H, Chen M, Ueharu H, Nishimura N, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y. Expression studies of Neuronatin in the prenatal and postnatal rat pituitary. *Cell Tissue Res* 2016; 364: 273-288.
 16. Horiguchi K, Yako H, Yoshida S, Fujiwara K, Tsukada T, Kanno N, Ueharu H, Nishihara H, Kato T, Yashiro T, Kato Y. S100 β -positive cells of mesenchymal origin reside in the anterior lobe of the embryonic pituitary gland. *PLoS One* 2016; 11: e0163981.
 17. Horiguchi K, Nakakura T, Yoshida S, Tsukada T, Kanno N, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Kato T, Kato Y. Identification of THY1 as a novel thyrotrope marker and THY1 antibody-mediated thyrotrope isolation in the rat anterior pituitary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 480: 273-279.
 18. Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yoshida S, Higuchi M, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y. CXCL10/CXCR3 signaling mediates inhibitory action by Interferon-Gamma on CRF-stimulated adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release. *Cell Tissue Res* 2016; 364: 395-404.
 19. Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yako H, Tateno K, Hasegawa R, Takegami S, Osako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y. Expression of Slug in S100 β protein-positive cells of the postnatal developing rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res* 2016; 363: 513-524.
 20. Chen M, Cai L-Y, Kato T, Kato Y. Ectopic expression of human herpesvirus 1 thymidine kinase induces male infertility. In: *Ongradi J, ed. Herpesviridae* 2016: 75-101.
 21. Yoshida S, Kato T, Chen M, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Kato Y. Localization of juxtacrine factor ephrin-B2 in pituitary stem/progenitor cell niches throughout life. *Cell Tissue Res* 2015; 359: 755-766.
 22. Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T, Kato Y. PRRX1- and PRRX2-positive mesenchymal stem/progenitor cells are involved in vasculogenesis during rat embryonic pituitary development. *Cell Tissue Res* 2015; 361: 557-565.
- [研究ノート]
1. 加藤幸雄, 上春浩貴, 後藤哲平, 吉田彩舟, 加藤たか子, 平林真澄. レコンビナーゼ CreERT2 導入BAC クローンによって作製したトランスジェニックラットの組織化学・細胞生物学的研究. *明治大学農学部研究報告* 2017; 67: 69-75.

<国際学会> (計 10 件)

2017年度 3 件

2016年度 4 件

2015年度 3 件

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 たか子 (KATO TAKAKO)

明治大学・研究・知財戦略機構・研究推進員

研究者番号：90445859

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

加藤 幸雄 (KATO YUKIO)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：30114177