

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18801

研究課題名(和文) 成体下垂体幹・前駆細胞の遺伝的追跡によるホルモン産生細胞の供給システムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of supply system of hormone-producing cells by genetic tracking of adult pituitary stem/progenitor cells

研究代表者

樋口 雅司 (Higuchi, Masashi)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：70614791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成体にもみ存在する下垂体幹・前駆細胞の起源の探索、および下垂体前葉ホルモン産生細胞への分化能の解析を行った。神経堤細胞を追跡できるマウスを用いた実験から、成体下垂体に存在する幹・前駆細胞およびホルモン産生細胞の一部が神経堤由来であることが証明された。また、S100 発現細胞(胎仔期下垂体には存在しない細胞)を蛍光標識できるラット下垂体から分離した細胞塊、および下垂体幹・前駆細胞候補の細胞株Tpit/F1の幹細胞性とホルモン産生細胞への分化能を証明した。以上のことから、成体には口腔外胚葉を起源としない幹細胞が存在すること、そして、その細胞もホルモン産生細胞の供給源であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We searched the origin of pituitary stem/progenitor cells present only in the adult and analyzed the differentiation potential into the hormone-producing cells of anterior pituitary. Experiments using mice capable of tracking neural crest cells demonstrated that some of the stem/progenitor cells and hormone-producing cells present in the adult pituitary gland originated from the neural crest. In addition, we revealed that cell clusters isolated from rat pituitary capable of fluorescently labeling S100 expressing cells, which were not present in fetal pituitary, and cell line Tpit/F1 of candidate pituitary stem/progenitor cell possess the stemness and differentiate into hormone-producing cells. These results indicate that stem cells not originating from the oral ectoderm are present in the adult, and that these stem cells are also a source of hormone-producing cells.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：下垂体 成体 幹・前駆細胞 ホルモン 発生 分化

## 1. 研究開始当初の背景

下垂体は動物の成長、繁殖や泌乳などの生命活動を制御するホルモンを合成・分泌する主要な内分泌器官である。そのうち下垂体前葉には、6種類のホルモンを産生する細胞とそれらの元となる幹細胞を含む非ホルモン産生細胞が存在しており、過不足なくホルモン産生細胞が供給されている。しかしながら、下垂体に存在する幹細胞は一種類なのか、また、どのように下垂体前葉ホルモン産生細胞へと分化するか、未解明な点が非常に多い。申請者は、下垂体で新たに見出した転写因子 PRRX1 および PRRX2 ならびに S100 をマーカーとする細胞が出生後の下垂体において幹・前駆細胞として存在すること、そして、その一部の細胞がホルモン陽性であることを明らかにしてきた。一方、これらの細胞は胎仔期には存在せず、成体独自の下垂体幹・前駆細胞であることが示唆されている。しかしながら、これまでの研究では遺伝的追跡といった視点では検討できておらず、実際に胎仔期に存在しない細胞であるか、不明であり、そして、その分化能の直接的な証明には至っていない。

## 2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、(1) 成体に存在する下垂体幹・前駆細胞の起源の探索、および、(2) それらの細胞が分化してホルモン産生細胞を供給するシステムの解明、を目的として実験を計画した。

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物: 神経堤由来細胞で Cre リコンビナーゼによる組換えが起こり EGFP を発現する遺伝子改変マウス (P0-Cre/EGFP マウス)、S100 タンパク質 (以下、S100) プロモーター下で GFP を発現する遺伝子改変ラット (S100 -GFP TG ラット) および Wistar 系ラットを用いた。下垂体前葉初代培養細胞は成体雄 (出生後 (P)60-80 日) から採取した。各発生段階の胎仔は雌雄を交配させて腔内に精子を確認した日を胎齢 0.5 日 (E0.5) とした。

(2) 成体下垂体幹・前駆細胞候補の起源の探索: P0-Cre/EGFP マウス (E9.5-P60) 下垂体の凍結切片を作製して免疫組織化学を実施した。下垂体幹・前駆細胞は転写因子 Sex-determining region Y-box 2 (SOX2) および下垂体特異的転写因子 Prophet of pit-1 (PROP1)、分化後の細胞は各種の下垂体前葉ホルモンおよびペリサイトマーカー NG2 抗体を用いて同定された。

(3) ホルモン産生細胞の供給システムの解明: 供給システムの解明には、継続的に利用できる下垂体幹細胞株が不可欠である。そこで、S100 -GFP TG ラット下垂体組織から

分離した初代培養下垂体幹・前駆細胞、および、下垂体由来の不死化細胞から選抜した候補細胞株である Tpit/F1 細胞、を用いてそれぞれ分化能を解析した。前者では酵素処理等を最適化することにより前葉実質層に存在する幹・前駆細胞塊の単離を試みた。未分化維持や分化誘導のための細胞培養では、basic fibroblast growth factor (bFGF) や B27 supplement 等の ES 細胞や iPS 細胞の培養で利用されている成長因子等を用いた。

また、幹細胞で発現する新たな因子を同定してその機能を明らかにすることも供給システムの解明には不可欠である。そこで、その候補因子として、水チャネル分子アキュアポリン 4 (AQP4) および、Neuronatin の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 成体下垂体幹・前駆細胞候補の起源の同定

研究代表者のこれまでの研究から、転写因子 PRRX1/PRRX2 陽性細胞の局在が神経堤由来細胞が定着する組織のそれと極めて類似していること、そして、下垂体における PRRX1/PRRX2 陽性細胞は主にラトケ嚢形成後に出現して幹・前駆細胞として存在することが明らかになっていた。これらの結果は、成体下垂体幹・前駆細胞の起源 (の一つ) が神経堤細胞であることを示唆していた。そこで、神経堤由来細胞を標識できるマウス (P0-Cre/EGFP マウス) を用いた追跡実験により、P0-EGFP 陽性細胞の下垂体への侵入とホルモン産生細胞への分化能の解析を行った。その結果、P0-EGFP 陽性細胞は口腔上皮が陥入してラトケ嚢が形成される時期 (E9.5) と脈管形成期 (E14.5) に下垂体に侵入し、定着することが明らかになった。また、免疫組織化学的に解析すると、SOX2 および PROP1 陽性の神経堤由来細胞や、各種の前葉ホルモン陽性の神経堤由来細胞が存在していた。興味深いことに、成体マウス (P60) の下垂体前葉ホルモン産生細胞のうち神経堤由来の占める割合はおよそ 10% であった。一方、ペリサイトマーカー NG2 に陽性の神経堤由来細胞も存在しており、下垂体に侵入する神経堤細胞は多分化能をもつことが示唆された。

### (2) 成体下垂体幹・前駆細胞候補の分離法の確立と分化能の証明

酵素処理等の最適化により、S100 -GFP TG ラット下垂体に存在する 2 つの幹細胞ニッチのうち、前葉実質層に存在する幹・前駆細胞塊 (以下、parenchymal stem/progenitor cell-cluster; PS クラスタ) の分離に成功した。そして、PS クラスタはほぼ全て幹細胞マーカー SOX2 陽性であった。一方、下垂体特異的前駆細胞マーカー PROP1 は陽性あるいは陰性どちらのタイプも存在していた。次に、S100 -GFP を指標とすると PS クラスタは

3つのタイプに分類され、全ての細胞が S100 -GFP 陽性のもの、全ての細胞が S100 -GFP 陰性のもの、および陽性と陰性が混じったものが観察された。PS クラスターの分化能を解析したところ、既存の pituisphere の分化誘導法ではホルモン陽性の細胞は検出されなかった。しかしながら、bFGF、EGF (Epidermal growth factor)、KSR (knockout serum replacement) および GSK3 インヒビター-BI0 (6-bromoindirubin-3'-oxime) の存在下で培養したところ、S100 -GFP 陽性細胞を含む PS クラスターにおいてホルモン陽性の細胞が検出された。S100 -GFP 陽性細胞は胎仔期の下垂体前葉には存在せず、出生後に出現してくることから、本研究で分離した PS クラスターは、ホルモン産生細胞への分化能をもつ成体下垂体幹・前駆細胞であることが証明された。

一方、現在のところ PS クラスターは初代培養系で調製する必要があり、簡便に利用できない。そこで、既存の下垂体由来細胞株の中から幹・前駆細胞の候補となる細胞株として Tpit/F1 細胞の分化能を解析した。その結果、Tpit/F1 細胞は成長因子などの添加培養により前葉実質層の PS クラスターのような細胞塊を形成すること、そして、その細胞塊を構成する細胞の全てが SOX2 陽性であることが明らかになった。また、さらに培養を進めると一部が成長ホルモン産生細胞へと分化した。以上のことから、Tpit/F1 細胞は下垂体幹・前駆細胞株として有用であることが示唆された。

### (3) ホルモン産生細胞の供給を制御する候補因子の発見

下垂体幹・前駆細胞の分化能に関しては一定の成果を得てきたが、幹細胞ニッチに存在する幹・前駆細胞が生理状態の変化等必要に応じてホルモン産生細胞へと分化するメカニズムの詳細は不明である。そこで、その候補因子として、下垂体幹細胞ニッチと想定されている Marginal cell layer において特徴的な発現が報告されている水チャネル分子 AQP4、および、下垂体のマイクロアレイ解析等で発現量が多い因子として報告されている Neuronatin の解析を行った。

ラット下垂体の発生過程において定量 PCR および免疫組織化学的解析を行ったところ、AQP4 は出生後に中後葉から発現が始まり、その後段階的に前葉へと広がっていくことが明らかになった。また、これは下垂体に存在する幹細胞ニッチの一つである実質層ニッチの前葉への広がりと同様であった。さらに幹細胞マーカー SOX2 との関係性を調べてみると、AQP4 は下垂体において SOX2 陽性の幹・前駆細胞に主に発現することが明らかになった。AQP4 は細胞移動に関与することが他の組織において報告されていることから、下垂体幹・前駆細胞の移動に水輸送が関与することが示唆された。しかしながら、機能の解明

にまでは至らなかったため、さらなる研究が必要である。

ラット下垂体の発生過程において定量 PCR および免疫組織化学的解析を行ったところ、Neuronatin は胎仔期に非常に発現量が多いが、成長するにつれてその発現量が激減していた。各種マーカーとの多重免疫染色を行うと、幹細胞マーカー SOX2 陽性の細胞から最終分化細胞である各種ホルモン陽性の細胞まで広く Neuronatin 陽性であった。以上より、幹細胞で発現を開始し、ホルモン産生細胞への分化の過程で機能することが示唆されたが、機能解明には至らなかった。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

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 and Tissue Research*, 369 (2): 353-368, 2017, 査読有.  
DOI: 10.1007/s00441-017-2603-2

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. *Journal of Anatomy*, 230 (3): 373-380, 2017, 査読有.  
DOI: 10.1111/joa.12572

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 Research*, 17 (2): 318-329, 2016, 査読有.  
DOI: 10.1016/j.scr.2016.08.016

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 and Tissue Research*, 364 (2): 395-404, 2016, 査読有.  
DOI: 10.1007/s00441-015-2317-2

Kanno N, Higuchi M, Yoshida S, Yako H,

Chen M, Ueharu H, Nishimura N, Kato T, Kato Y. Expression studies of neuronatin in the prenatal and postnatal rat pituitary. *Cell and Tissue Research*, 364 (2): 273-288, 2016, 査読有.  
DOI: 10.1007/s00441-015-2325-2

Nishimura N, Ueharu H, Nishihara H, Shibuya S, Yoshida S, Higuchi M, Kanno N, Horiguchi K, Kato T, Kato Y. Search for regulatory factors of pituitary-specific transcription factor PROP1 gene. *Journal of Reproduction and Development*, 62 (1): 92-102, 2016, 査読有.  
DOI: 10.1262/jrd.2015-092

〔学会発表〕(計4件)

Kanno N, Higuchi M, Yoshida S, Yako H, Chen M, Ueharu H, Nishimura N, Nishihara H, Kato T, Kato Y. Neuronatin emerges in the rat pituitary stem/progenitor cells and terminates its role in the terminally differentiating cells. Society for Endocrinology BES 2015, 2015年11月2日-4日(Edinburgh, UK)

菅野尚子、樋口雅司、吉田彩舟、八子英司、陳黙、上春浩貴、西村直人、西原大翔、加藤たか子、加藤幸雄、ラット下垂体ならびに生殖器における Neuronatin の局在解析、第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月17日-20日、宮崎大学(宮崎県宮崎市)

樋口雅司、菅野尚子、加藤たか子、加藤幸雄、成体下垂体幹細胞における AQP5 の発現と運動性繊毛の形成、日本畜産学会第120回大会、2015年9月11日-12日、酪農学園大学(北海道江別市)

菅野尚子、樋口雅司、吉田彩舟、八子英司、陳黙、上春浩貴、西村直人、西原大翔、加藤たか子、加藤幸雄、Neuronatin は  $Ca^{2+}$ 濃度を調節する細胞内小器官に局在し下垂体の分化に寄与する、日本下垂体研究会第30回学術集会、2015年8月5日-7日、黒部市宇奈月国際会館セレネ・ホテル黒部(富山県黒部市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口 雅司(HIGUCHI, Masashi)  
鳥取大学・農学部・講師  
研究者番号: 70614791