

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 23 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09896

研究課題名(和文) 転写制御因子Zeb1/ EF1の下垂体形成過程における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of zeb1/deltaEF1 transcription factor on posterior pituitary development in mouse

研究代表者

東 雄二郎 (Higashi, Yujiro)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・客員研究員

研究者番号：30181069

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)：転写制御因子であるzeb1/ EF1のコンベンショナルノックアウト(以下、KOと略す)マウスに観察される下垂体後葉形成不全に関して、主にHE染色、細胞増殖能標識、免疫組織染色法等を用いて解析を行った。その結果、後葉形成不全が細胞増殖に起因している可能性は低いと考えられた。一方、後葉組織に投射する神経核は形態的にも正常に形成され特異的なホルモンも産生されていることがわかった。また我々が作製したzeb1/ EF1 floxマウスを用いて、幾つかのコンディショナルKOマウスを作製し同様の表現型が再現されるか検討を行ったが、これまでのところ期待した結果は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含めた哺乳類における下垂体は、種々のホルモンを産生あるいは蓄積し、必要に応じてそれらを血中へ放出して、成体の恒常性の維持や、成長、妊娠などの重要な働きに関与している。特に下垂体後葉はオキシトシンホルモンやバソプレッシンホルモンの調節に関与しており、神経内分泌組織として重要である。本研究課題では、転写制御因子であるzeb1/deltaEF1の欠損マウスでは、下垂体後葉の形成不全を起こすことから、その分子メカニズムを明らかにすることで下垂体後葉の形成過程の分子的理解に寄与し、ひいては臨床も含めた神経内分泌医学の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Conventional knockout (KO) mice of zeb1/deltaEF1 gene show defect in development of the posterior lobe of pituitary gland, where there seems to be diminished number of the glial cell (pituicyte) bodies at the E18 stage. Using BrdU staining as well as immuno-histochemistry staining, we analyzed the defect and found that no cell division occurs once infundibulum of diencephalon involutes, and so the defect has nothing to do with cell growth of pituicyte. The surrounding neuronal nuclei seem to form normally and produce the hormonal peptides. We also tried conditional KO of the zeb1/deltaEF1 gene by mating the zeb1/deltaEF1 flox mice and several cre mice which express cre in the region of anlagen for pituitary tissue to see if the similar pituitary phenotype can be observed in these mice. We so far have not observed the phenotype in these conditional KO mice.

研究分野：分子発生生物学

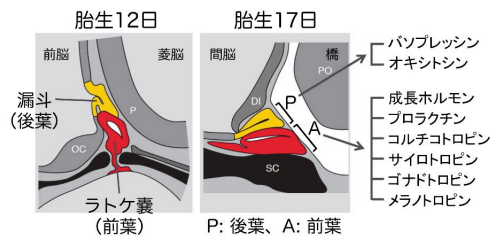
キーワード：下垂体形成 ノックアウトマウス 転写制御因子 下垂体後葉

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける内分泌器官において、視床下部-下垂体系は、個体の成長と生存さらに成体の恒常性を維持する器官としてその中心的な役割を担う重要な器官である。ヒトにおいてはその機能不全により、下垂体機能低下症や中枢性尿崩症を引き起こす。多くの場合はホルモン投与により治療が可能であるが、それらの疾病成立機序や、関与する視床下部-下垂体系の基礎医学・生物学的基盤とその分子機構はいまだ未知の部分が多い。

下垂体は、成体においては、大まかに下垂体前葉と後葉から成る。前葉は、発生学的には初期胚原口（口腔）背側外胚葉より生じるラトケ嚢に由来し、最終的（出生後）に、somatotropes, lactotropes, corticotropes, thyrotropes, gonadotropes, melanotropes の6種の、それぞれ末梢に作用する特異的な種々のホルモンを産生する細胞種を生じる。例えば、後述する somatotropes は成長ホルモン（以下、GH と略す）を、lactotropes は母乳の産生を促すプロラクチン（以下、PRL と略す）を産生、分泌する細胞に分化する。後葉は、前脳底部（将来の間脳部位）の神経外胚葉が陥入し（「漏斗」と呼ばれる）、

図1 マウス下垂体の発生と分泌ホルモン



上述したラトケ嚢と重なる形で発生し、最終的には間脳神経組織からは突出し（視床下部神経核からの軸索投射の連絡は残る）、ラトケ嚢と合体する形で下垂体後葉組織を形成する。成熟分化した後葉組織からは、抗利尿ホルモンとして知られるバソプレッシン、分娩時子宮収縮や母乳分泌を促すオキシトシンが分泌される（図1）

## 2. 研究の目的

本研究の対象とする  $\delta$ EF1 ( $\delta$ -crystalline enhancer factor 1) は、転写制御因子の一つであり、その相同因子である SIP1 (Smad-interacting protein 1) と共に ZFHX1 (zinc finger and homeobox containing factor 1、或いは ZEB と呼ばれる) 転写制御因子ファミリーを構成する。 $\delta$ EF1 もこのファミリーに特徴的な構造をしている（図2）。申請者らのグループでは従来からこの ZFHX1 転写制御因子ファミリーに関して、発生過程を含めたマウス個体レベルでの機能解析を行ってきた。 $\delta$ EF1 は初期胚から胎生期を通じて脊索、肢芽間充織、筋細胞などの中胚葉や神経組織の一部（特に脳を含めた神経管の腹側）での発現があり、出生後においても、皮下間充織、脳、脊髄などの種々の組織で発現が見られる。この  $\delta$ EF1 転写制御因子の通常のコンベンショナル（conventional）ノックアウト（以下、KO と略す）マウスにおいては、出生までは生存、成長するが、出生直後蘇生に至らず致死となる。

最近、 $\delta$ EF1 KO マウスの詳細な解析から興味ある事実が明らかとなってきた。即ち胎生 18.5 日において、KO マウスの下垂体を調べると、その後葉に存在する細胞体（グリア細胞で pituicyte と呼ばれる）がほとんど存在せず、正常な後葉の形成が起こっていないことがわかった（図3）。また前葉の組織像は後葉ほど極度に影響を受けていないが、しかし対照とする同腹の野生型やヘテロ変異個体と比較すると、細胞構築の明らかな乱れが観察された（図3）。本研究では  $\delta$ EF1 の下垂体後葉の形成における機能を分子レベルで明らかにする。まずこの  $\delta$ EF1 KO の phenotype は胎生期のどの時期に原因があるのか、経時的な観察と検討を行う。さらにこれまで、下垂体後葉の形成に影響を及ぼす幾つかの因子 (Brn2, Sim1, Arnt2, Otp: 前葉ほど多くはなく数種類であり、これらはいずれも転写因子である) が報告されているが、それらの因子とどのような関係にあるのか、あるとすればどのように関連しているのか、あるいは全く新規の因子であり、それらとは独立して働いているのか検討する。また同時に、最近申請者らのグループで作出に成功した、組織特異的（あるいは時期特異的）コンディショナル（conditional）KO（以下、cKO と略す）を可能にする  $\delta$ EF1 flox マウスを用いて、この原因が、後葉の由来する間脳底部の神経（およびグリア細胞）にあるのか、あるいは、前葉から来るシグナル因子の欠除（あるいは過剰）によるのか、またはその両方によるのか、有効な Cre 発現マウスを用いることで明らかに出来るものと考えられる。さらに、後葉細胞は、視床下部に存在する室傍核と視索上核からの投射を受け、バソプレッシンやオキシトシンを保持しているが、そのような視床下部からの機能的な投射は存在しているのか否か、このような点に関しても種々のマーカー遺伝子の発現やホルモンの産生を指標にしなが

ら検討する。

図2 ZFHX1 転写制御因子ファミリー

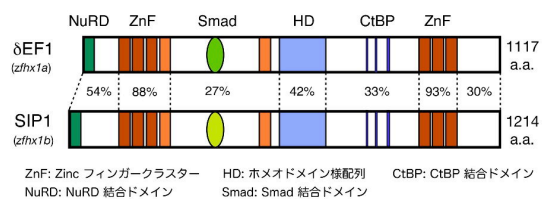
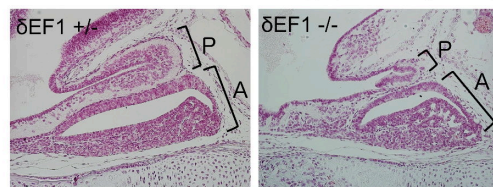


図3  $\delta$ EF1 KO マウスの下垂体形成不全 (E18.5)



P: 後葉、A: 前葉、特に後葉の形成が阻害されている

## 3. 研究の方法

(1)  $\delta$ EF1KO マウスに観察された下垂体後葉形成異常の形態学的解析 前頁、図3に示したように、 $\delta$ EF1KO マウスでは、下垂体後葉の形成が少なくとも胎生 18.5 日で観察した場合阻害されていた (n=5, 全 KO 個体で同様の症状を呈しており、ヘテロ、野生型個体では正常であった)。①まず、この表現型が胎生期のどの時期から見られるのか、発生段階 (胎生 10、12、14、16、18 日) を追って詳細な観察を H.E. 染色等を用いて行う。胎生 18.5 日の形態から、おそらくは、前脳底部の漏斗の形成 (陥入) は起こっているが、その後の後葉の pituicyte の増殖あるいはその後の維持が阻害されていると予想される。この点に関して、②後葉での pituicyte の増殖が正常におこなっているのか、あるいは逆に細胞死が高くなっているのか、BrdU の取り込みや細胞死のマーカー等で染色を行い検討する。一方、下垂体後葉は、視床下部の底部に位置する室傍核と視索上核からの軸索投射を受け、バソプレッシンやオキシトシンを保有しているが、図3ではその軸索投射も薄弱化している形態を示している。また  $\delta$ EF1 は図5に示すように、漏斗と将来視床下部を生じる間脳腹側に発現が高い。このことから視床下部の神経核の発生に関与している可能性は高い。そこで、③胎生 18 日の段階で、視床下部の室傍核と視索上核は正常に形成され、それらの軸索投射も正常に起こっているのか、バソプレッシンやオキシトシンの発現を、免疫染色や RNA in situ hybridization 等を用いて解析する。

(2)  $\delta$ EF1 flox マウスと、後葉あるいは前葉特異的に Cre を発現するマウスを用いた、後葉と前葉の関連性に関する解析 前述したように申請者らのグループでは、最近  $\delta$ EF1 遺伝子を組織特異的、あるいは時期特異的に欠損させることが出来る  $\delta$ EF1flox マウスの作製に成功した。これを用いると、間脳の漏斗、その後の下垂体後葉組織で cre を発現する Six3-cre、あるいはラトケ囊、その後の下垂体前葉組織で cre を発現する Pitx1-cre と交配することにより、 $\delta$ EF1 の後葉あるいは前葉特異的な cKO を行う事が可能である。これらの下垂体における表現型と、単純なコンベンショナルな  $\delta$ EF1KO の表現型を比較検討する。このことにより、申請者らが観察した後葉形成の異常が予想通り間脳 (神経) 側によるものか、あるいは、図3でも観察されたように、前葉の組織構築も完全ではないことを考慮すると、前葉では  $\delta$ EF1 の発現が低いにも関わらず、何らかの前葉側の  $\delta$ EF1KO が原因で、non cell-autonomous に後葉の形成に影響を与えたのか、明らかに出来ると思われる。また、逆の場合では、間脳 (神経) 側の原因で前葉形成の不完全性を招いたと考えられる。

#### 4. 研究成果

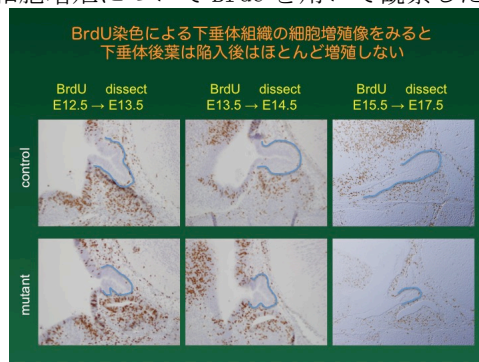
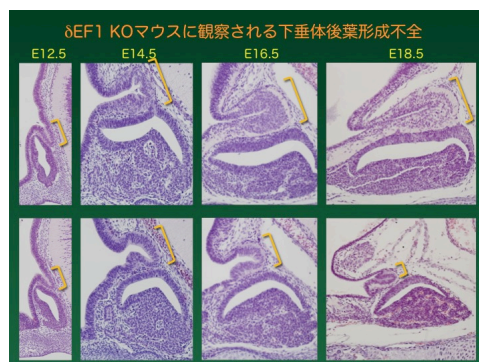
##### (1) $\delta$ EF1KO マウスに観察された下垂体後葉形成異常の形態学的解析

$\delta$ EF1KO の表現型が、胎生期のどの時期から見られるのか、発生段階 (胎生 12.5、14.5、16.5、18.5 日) を追って詳細な観察を H.E. 染色等を用いて行った物を右図に示す。前脳底部の漏斗の形成 (陥入) は起こっているが、その後の後葉の pituicyte の増殖あるいはその後の維持が阻害されていることが明らかとなった。この表現型が実際に pituicyte の増殖によるものかどうかを検討するために、以下の検討を行った。

##### (2) 下垂体後葉の形成過程における細胞増殖能の検討 zeb1/ $\delta$ EF1KO マウスにおける、下垂体後葉形成不全に関して、後葉の組織形成時における細胞増殖について BrdU を用いて観察した

(右図)。その結果、野生型においても、下垂体後葉は胎生 11 日から 12 日に infundibulum として間脳底部から陥入すると、その細胞増殖は殆ど消失することがわかった。このことから、zeb1/ $\delta$ EF1KO マウスにおける後葉形成不全が細胞増殖に起因している可能性は低いと考えられた。この結果をもとに、下垂体後葉に投射する室傍核や視索上核が正常に形成されているかどうかという点に関して、形態的、および免疫組織化学染色を用いて検討した。その結果、形態的にも各神経核が形成されていること、またバソプレッシン抗体による染色においても、それらの神経核で産生されていることがわかった。これらのことは、後葉組織に投射する神経核は正常に形成されていることを示している。

上記の結果より、zeb1/ $\delta$ EF1KO マウスに観察された下垂体後葉形成不全は、少なくともそれに投射する神経核側が原因ではないことが明らかとなった。一方、後葉を形成する pituicyte (グリア細胞の一種) は、間脳底部の正中中部が漏斗として陥入し発生するが、陥入直後の未熟な pituicyte では E-cadherin が弱く発現しているが、後葉形成が進んだ成熟した pituicyte では E-cadherin の発現は全く消失することがわかっている。zeb1/ $\delta$ EF1 転写因子は E-cadherin の発現を制御し、上皮-間充織転移過程に強く関わっていることが知られていることから、pituicyte での E-cadherin の発現にも zeb1/ $\delta$ EF1 転写因子が関わっている可能性は高い。即ち、zeb1/ $\delta$ EF1 欠損マウスでは、E-cadherin の発現が下がらずに恒常的に続くことで pituicyte

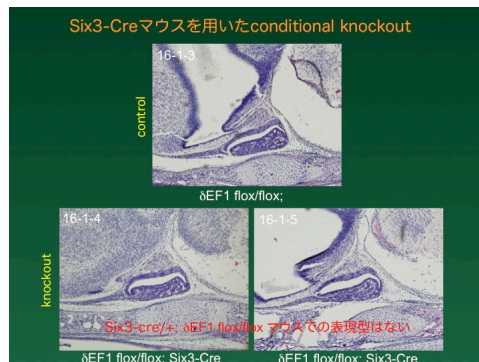


の成熟と後葉の正常な形成過程が抑えられていると推測出来る。そこで今後はこの点も検討するために、ノックアウトマウスの下垂体後葉における E-cadherin の発現を、免疫組織化学的手法で解析する必要がある。

### (3) zeb1/δEF1 コンディショナル KO を用いた下垂体後葉の形成過程の検討

① まず Foxa2-creERT2 マウスと、我々が作製した zeb1/δEF1 flox マウスを用いたコンディショナル KO の検討を行った。Foxa2 は初期胚の endoderm と神経管の腹側正中部に発現することが知られていた。そこで、この Foxa2 のプロモーター下でドライブされ、タモキシフェンによる誘導で cre 活性を発現する Foxa2-creERT2 マウス系統を zeb1/δEF1 flox マウスと交配し解析を行った。しかしながら、Foxa2-creERT2/+; zeb1/δEF1 flox/flox のマウスにおいても、zeb1/δEF1 のコンベンショナル KO で観察されたような下垂体後葉の表現型は観察されなかった。

② 上記と同様に、Six3-Cre マウスを用いて、zeb1/δEF1 flox のコンディショナル KO の検討を行った。Six3 の初期胚での発現は視床下部と間脳の腹側に発現しており、間脳底部の漏斗発生部位まで発現している可能性があった。そこで Six3-Cre マウスと zeb1/δEF1 flox マウスを交配することで、zeb1/δEF1 flox マウスを用いたコンディショナル KO の検討を行った。Six3-Cre/+; zeb1/δEF1 flox/flox のマウスにおいて、zeb1/δEF1 のコンベンショナル KO の表現型が観察されるかどうか検討した。その結果、この場合もコンディショナル KO マウスにおいて、同様の表現型は観察されなかった(右図)。



上記 2 例の結果は、次のような原因が考えられ、

さらに検討が必要である。第一の可能性は、それぞれの遺伝子のプロモーターによってドライブされる cre の発現領域が間脳底部の漏斗の発生部位に正確には重なっていない、あるいは細胞レベルでは cre と zeb1/δEF1 が同じ細胞で発現していないために、zeb1/δEF1 の欠失が起こらない。第二は、欠失が起こっていたとしても、その効率が悪いために表現型が出るまでには至らないという可能性である。第一の点に関しては、今後それぞれの発現場所(あるいは細胞)を詳細に観察することが必要である。また第二の可能性については、我々の別の研究において、protamine-cre マウスと zeb1/δEF1 flox マウスを交配し、その産仔の遺伝型を調べた場合に、およそ半数の flox アレルのみが欠失を受けているだけで、残りは正常であったことを観察しており、少なくとも同一細胞内の cre 発現によって全ての flox アレルが欠失状態になるという可能性は低いと考えられる。特に上記の第二の可能性については、我々が作製した zeb1/δEF1 flox マウスを使用する実験においては、常に問題となるところであり、今後さらに詳細な検討が必要である。

本研究課題によって、zeb1/δEF1 転写因子が神経下垂体(後葉)の形成に必須の因子であることは明らかとなったが、その分子メカニズムについては、今後の研究においてさらに詳細な解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東雄二郎、高木豪、水谷友香、浅井真人
2. 発表標題 63. zeb1 flox マウスの作製とそのzeb1およびzeb2 double floxマウスを用いたマウス発生過程におけるZEB転写制御因子ファミリーの機能解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----