

平成22年 6月14日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20800051

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたホルモン産生機序の解明

研究課題名(英文) The study of hormone production mechanism in pituitary  
by using iPS cells

研究代表者

秋山 耕陽 (AKIYAMA KOUYOU)

明治大学・研究・知財戦略機構・研究員

研究者番号：20515142

研究成果の概要(和文)：下垂体前葉は脊椎動物に共通の組織であり、生命機能を維持に不可欠な6種類のホルモンを産生している。下垂体の機能低下は、様々な生体異常をきたす内分泌疾患となることから、ホルモン産生機構の解明は重要な研究課題である。本研究では、iPS細胞をホルモン産生細胞に分化誘導することで、下垂体前葉の発生機序を解明することを目指した。本研究の成果として、下垂体前葉の発生過程において重要な役割をもつ複数の遺伝子の発現が確認された。しかし、ホルモン産生には至らなかったことから、さらなる分化誘導の条件検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The pituitary gland is a critical component of the neuroendocrine system that is present in all vertebrates. The six hormones from distinct endocrine cell types in the anterior lobe of pituitary gland are essential for the maintenance of homeostasis. Since the hypopituitarism is responsible for endocrinopathy, identification of hormone-producing mechanism is one of important studies. In this study, it is intended to elucidate of developmental mechanism of the anterior lobe by differentiation of iPS cells into hormone expressing cells *in vitro*. As result, the examinations indicated the expression of genes known to essential role in pituitary development. But it is indispensable for investigation of differentiation condition of iPS cells, because hormone have not been detected in any method of this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：遺伝子・幹細胞・内分泌学・発生生物学

## 1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉は脊椎動物に共通の組織であ

り、生命機能を維持に不可欠な6種類のホル  
モンを産生している。下垂体前葉には5種類

のホルモン産生細胞と1種類の非ホルモン産生細胞が存在する。ホルモン産生に異常が起こると様々な生体異常をきたす内分泌疾患を呈することから、ホルモン産生機構を解明することは、基礎研究だけでなく臨床研究の重要な対象ともなっている。またこの機構は、多数の転写因子が時空間的に正確に制御されていることから、発生や分化の遺伝子発現制御の研究の優れたモデルとされている。研究室では、配偶子形成を促し生殖機能を制御するゴナドトロピンと総称される黄体形成ホルモン(LH)と濾胞刺激ホルモン(FSH)に焦点を当て、ホルモン産生に関わる分子機構の解明を目指した研究を進めている。特に、転写因子 Prop-1 が FSH $\beta$  鎖遺伝子を直接制御するという Prop-1 の新たな可能性を世界に先駆けて報告するとともに、もう一つの重要な遺伝子である  $\alpha$  鎖遺伝子の制御についても報告している。さらに、Prop-1 がホルモン産生細胞の出現する直前の胎仔下垂体の全ての細胞で発現することを発見している。

現在、産業動物、野生動物そして実験動物、さらにはヒトの不妊治療に広く普及している排卵誘起剤には、その効果が個体によって差があるとされていること、そして下垂体腫瘍などによるホルモン産生障害の治療には、根本的な治療法が確立されていないなどの点から、ホルモン産生細胞の発生機序に関わる遺伝子の発現制御機構を解明することで、より効率的な排卵誘起剤やホルモン産生障害の根本的な治療法の開発につながると言える。特定の細胞もしくは組織を人為的に作成する研究は、複雑な過程を経て成立する動物の各器官の発生機序を明らかにするだけでなく、再生医療などの臨床への応用を目指す重要な研究課題である。こうした研究には、多分化能をもつ細胞が必須であり、これまでに数種の多能性幹細胞が樹立されている。特に動物の身体を構成する全ての細胞に分化可能な細胞である胚性幹細胞(ES細胞)を用いた研究は、心筋細胞、神経細胞、インスリン分泌をする膵臓ベータ細胞などさまざまな細胞を作り出すことに成功しており大きな期待が寄せられている。しかしながらES細胞は、順調に発育すれば一匹の生命となる胚(受精卵)からしか得ることができない細胞であることから、倫理的に大きな問題があり、多くの議論がなされてきた。こうした状況の中で京都大学の山中伸弥教授らのグループによって世界で初めてES細胞と同じ特性をもつiPS細胞が樹立された[Takahashi *et al.* 2006. *Cell*, Takahashi *et al.* 2007. *Cell*]。iPS細胞は、成体の体細胞(主に線維芽細胞)へ数種類の転写因子を遺伝子導入により発現させることで多分化能を獲得させた細胞であり、人工多能性幹細胞ともよばれている。iPS細胞はES細胞のもつ

倫理的な問題点を基本的に解決できることから、iPS細胞をES細胞の代替とする研究には、これまでになく大きな期待が寄せられており、全世界が注目している。

## 2. 研究の目的

下垂体細胞が特定の形質を獲得するためには、下垂体特異的に発現する転写因子が必要であることは明らかである。中でも、Prop-1 がホルモン産生細胞の出現する直前の胎仔下垂体細胞に発現するという特異的な発現パターンは、下垂体の発生に重要な遺伝子の中で非常に特徴的である、すなわち『E13.5のラット胎仔下垂体原基の全ての細胞で発現し、これを契機にホルモン産生細胞へ分化が始まる。さらにProp-1は下垂体以外では発現されない』。このことは、Prop-1が発現することが下垂体細胞分化の鍵となる因子の一つであることを強く示唆している。一方で、Prop-1の特徴的な発現パターンやProp-1を発現している細胞株が樹立されていないことが正確な機能の解明を遅らせている。

そこで本研究では、転写因子Prop-1の機能を解明し、ホルモン産生機序を明確にすることでiPS細胞をホルモン産生細胞へと分化させることを目指す。

## 3. 研究の方法

[研究 1] クロマチン免疫沈降法(ChIP assay)によるProp-1の標的遺伝子の同定  
胎齢13.5日の正常ラット(Wister Imamichi)胎仔の頭部を1%ホルムアルデヒドにより固定後、胎仔下垂体を実体顕微鏡下で摘出した。摘出した組織を破砕することで細胞分画を作製した後、抗Prop-1抗体と細胞分画を反応させ、常法に基づいてChIP assayを行なうことでProp-1と結合するDNA配列をクローニングし、得られたコロニーの塩基配列を決定した。

[研究 2] iPS細胞の培養条件および遺伝子導入法の確立

マウスiPS細胞は、ES細胞と同様に扱うことができることが知られている。しかしながらiPS細胞は、樹立されたばかりの細胞株であることから不明な部分が多いため、本研究室における培養および遺伝子導入法を検討し、確立した。

[研究 3] iPS細胞のホルモン産生細胞への分化誘導法の検討

①マウス下垂体cDNAよりPCRにてクローニングし、Prop-1発現ベクターを構築し、iPS細胞に遺伝子導入後、経時的にiPS細胞の形態を観察するとともに、各種ホルモン、転写因子、成長因子の遺伝子の発現パターン

ンの変化を RT-PCR、ウエスタンブロット解析および免疫組織化学染色により解析した。

②iPS 細胞を神経細胞に分化することが知られているレチノイン酸 (RA) および神経系細胞への分化作用のある B27 を用いてホルモン産生細胞が作製できるのか試みた。iPS 細胞の分化の度合いは、経時的に iPS 細胞の形態を観察するとともに、各種ホルモン、転写因子、成長因子の遺伝子の発現パターンの変化を RT-PCR、ウエスタンブロット解析および免疫組織化学染色により解析した。

#### 4. 研究成果

①Prop-1 の結合する塩基配列を同定するために、胎齢 13.5 日のラット胎仔の下垂体原基の細胞分画を作製した後、抗 Prop-1 抗体と反応させることでクロマチン免疫沈降を行った。Prop-1 が結合する DNA 配列をクロニングし、その塩基配列を 1000 クローン分決定した。またネガティブコントロールとして抗 Prop-1 抗体の代わりに非免疫血清を用いることで、同様の操作を行った。その結果、これまで結合することが知られていなかったゲノム配列が検出された一方で、結合することが知られている Pit1 の上流域の結合領域は検出されなかった。

②ホルモン産生細胞に分化誘導するためのまず、iPS 細胞の培養、維持する条件を検討した。マウス iPS 細胞は京都大学再生医科学研究所の山中伸弥によって樹立された iPS-MEF-Ng-20D-17 細胞を使用した。フィーダー細胞は、マイトマイシン C 処理を施した SNL76/7 細胞を使用した。iPS 細胞用培養液は、D-MEM、15% FBS、1% NEAA、1% Nucleosides、110  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol、1% Pen-Strep、1% Glutamine とし、培養は 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で行った。また、iPS 細胞の特性を維持した培養ができていないかをアルカリフォスタフェラーゼ染色、さらに幹細胞マーカーの免疫染色により適宜確認すること iPS 細胞の培養条件の確立とした。

③iPS 細胞への遺伝子導入の条件を検討し、トランスフェクション条件を決定した。マウス *Prop1*cDNA を組み込んだ発現ベクター mProp1/pcDNA3.1 Zeo (+) およびネガティブコントロールとして pcDNA3.1 Zeo (+) を iPS 細胞にそれぞれトランスフェクションした後、Embryoid Body (EB) を DMEM-15%FBS LIF(-) 中にて 4 日間培養することで作成した。作成した EB を DMEM FBS(-) LIF(-) 中にて 12 日間接着培養した。その後、cDNA を作成し、

Real-time PCR 法もしくは蛍光免疫染色によりホルモン産生細胞形成に重要な遺伝子群の発現を調べた。その結果、Oct4、Nanog や SSEA-1 といった未分化のマーカー遺伝子の発現は著しく低下していたが、*Pit-1*、*Hesx1*、*Lhx3*、*SFI*、*Egr1*、*Gata2* などの下垂体の発生に必須な遺伝子の発現パターンには変化が無く、各種ホルモンの発現も認められなかった。

④神経細胞に分化することが知られているレチノイン酸 (RA) および神経系細胞への分化作用のある B27 を用いてホルモン産生細胞が作製できるのか試みた。まず、iPS 細胞を DMEM-15%FBS LIF(-) 中にて 24 時間浮遊培養することで Embryoid Body (EB) を作製した。その後、EB を DMEM-15%FBS LIF(-) に 10<sup>-7</sup>M の RA を加えた区そして無添加の区に分け、72 時間浮遊培養を行い、これらを EB4dayRA+もしくは EB4dayRA-とした。その後、これらを接着培養により分化誘導を試みた。接着培養は、DMEM FBS(-) LIF(-) 中に 10<sup>-8</sup>M RA、1xB27 と 10<sup>-8</sup>M RA、そして無添加の 3 区に分け 8 日間行った。解析は経時的に cDNA を作成し、ホルモン産生細胞形成に重要な遺伝子群の発現を Real-time PCR 法もしくは蛍光免疫染色により調べた。その結果、下垂体においても強く発現している Nestin および s100 が発現していることが明らかになったが、その他のホルモン産生細胞の特徴を示す遺伝子の発現は確認できなかった。

⑤口腔上皮に由来する下垂体は神経系細胞群との複雑な相互作用を経て形成される。④では明らかに EB4dayRA+において Nestin が強く発現していたことから神経系細胞の前駆体が含まれている一方で、EB4dayRA-では特定の分化が起きていないと考えた。そこで、EB4dayRA+と EB4dayRA-の間で起こる相互作用によりホルモン産生細胞を含む細胞群が分化誘導できるのか試みた。④の方法に従って EB4dayRA+もしくは EB4dayRA-を作製し、これらを同数程度混和させ、接着培養を行うことで分化誘導を試みた。コントロールとして EB4dayRA+および EB4dayRA-をそれぞれ用意した。接着培養は、DMEM FBS(-) LIF(-) 中に 1xB27 および 10<sup>-8</sup>MRA、そして無添加の 2 区に分け 8 日間行った。解析は各区について経時的に cDNA を作成し、ホルモン産生細胞形成に重要な遺伝子群の発現を Real-time PCR 法もしくは蛍光免疫染色により調べた。その結果、EB4dayRA+と EB4dayRA-を混和させた区では、Nestin および s100 に加え、下垂体の発生に重要な *Lhx3*、*E-Cadherin* が発現していることが確認された。一方でその他のホルモン産生細胞に分化している特徴を示す *Prop-1*、*Pit-1*、*SFI*、*Egr1*、*Ptx1*、*Ptx2*、*Bmp2*、

*Bmp4*, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Fgf8*, *Fgf10*, *Fgf18*,  
*Fgfr2*, *Sox3*, *Shh* 遺伝子の発現は下垂体の特  
徴を示す発現パターンではなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 耕陽 (AKIYAMA KOUYOU)

明治大学・研究・知財戦略機構・研究員

研究者番号：20515142