

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05982

研究課題名(和文) マイクロRNAが関与する下垂体細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of microRNA-mediated regulation of pituitary cell differentiation

研究代表者

中村 和昭 (Nakamura, Kazuaki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・室長

研究者番号：80392356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、下垂体ホルモン産生細胞分化におけるmicroRNA(miRNA)の関与を明らかにし、これまで明らかにされている転写因子カスケードによる下垂体細胞分化に対してmiRNAがファインチューナーとして機能している可能性を検討することを目的とした。本研究を通じて、マウス下垂体発生過程におけるmiRNA発現の変動を明らかにし、GH発現細胞におけるmiRNAの欠損はGH/TSH産生細胞の分化方向性を乱す可能性があること、GH産生細胞の分化誘導にmiR-200Cが関与している可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、マイクロRNA(miRNA)による遺伝子発現・翻訳制御機構と細胞分化・発生、疾患発症との関連が注目されている。本研究では、miRNAによる下垂体細胞分化調節機構の解明ならびにmiRNAのiPS細胞由来下垂体細胞分化誘導系への応用を目的とした。本研究の成果は、miRNAが関与する下垂体細胞分化調節機構に迫り、下垂体発生機構の理解をより進めるとともに、再生医療分野における下垂体細胞分化誘導法を考察する上でも意義がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the involvement of microRNAs (miRNAs) in the differentiation of pituitary hormone-producing cells and to examine the possibility that miRNAs act as fine-tuners for pituitary cell differentiation through the previously identified transcription factor cascade. Through this study, we clarified the variation of miRNA expression during mouse pituitary development and found that the loss of miRNAs in GH-expressing cells may disrupt the differentiation direction of GH/TSH-producing cells and that miR-200C may be involved in the induction of GH-producing cell differentiation.

研究分野：実験薬理学、細胞生物学、内分泌学

キーワード：マイクロRNA 下垂体 発生 細胞分化 下垂体前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

下垂体は間脳視床下部底に位置する内分泌器官であり、前葉、中葉、後葉(神経葉)から構成される。下垂体前葉は主に5種類のホルモン産生細胞と非ホルモン産生細胞である濾胞星状細胞および血管から構成される。5種類のホルモン産生細胞からはそれぞれ、成長ホルモン(GH)、プロラクチン(PRL)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、性腺刺激ホルモン(黄体形成ホルモン(LH)/濾胞刺激ホルモン(FSH))の6種類のホルモンが、視床下部因子および末梢器官からのフィードバック制御の下に分泌制御され、肝臓や骨、乳腺、甲状腺、副腎、生殖腺といった末梢の標的器官の機能を制御している。従って、下垂体は内分泌系において中枢神経系と末梢標的器官をつなぐインタフェースとして働き、生体内の恒常性を維持する上で重要な器官である。

上述のように、下垂体前葉は5種類のホルモン産生細胞を有し、各ホルモン産生細胞の最終分化が産生するホルモンにより明確に区別できることから、古くより細胞分化研究の良いモデル器官として研究が進められてきた。近年、下垂体の細胞分化及びホルモン遺伝子発現に関わる転写調節因子群が同定され、また視床下部に由来する繊維芽細胞成長因子(FGF)や骨形成タンパク質(BMP)のような液性因子が発生期の下垂体誘導に作用することが明らかにされ、下垂体発生・細胞分化機構の分子基盤の理解が進んできた。一方、従来下垂体前葉ホルモンの産生・分泌は視床下部で産生され正中隆起外層から下垂体門脈系へ放出される向下垂体性刺激ホルモンにより制御されると考えられてきたが、近年、プロラクチン放出ペプチド等の下垂体前葉のホルモン分泌を制御するにもかかわらず下垂体門脈系を介さない視床下部因子や、グレリン等の末梢器官で産生される下垂体刺激ホルモンが同定され、下垂体ホルモン分泌は下垂体門脈系へ放出される視床下部因子により制御されるという従来の概念が変わりつつある。このように下垂体においてはその形成からホルモン分泌制御に至るまでの知見が蓄積されつつあるが、これらを司る分子機構に関しては未解明の部分も多く残されており、下垂体形成・細胞分化機構およびホルモン産生・分泌制御機構の解明には、未同定の因子の関与やこれまでに提示されていない概念の導入が必要だと考えられる。

内分泌系の司令塔である下垂体の機能不全は、下垂体機能低下症に伴うQOLの低下を引き起こす。下垂体機能低下症は、先天性では下垂体形成に必須の転写因子の遺伝子異常による下垂体形成不全が原因となり、後天性では下垂体あるいはその周辺の腫瘍・嚢胞や視床下部下垂体周辺の外科的手術などが原因となり発症する。障害されるホルモンが1つの場合は単独下垂体ホルモン欠損と呼び、複数のホルモンの分泌が低下している場合は複合型下垂体機能低下症と呼ぶ。従って、下垂体機能低下症は、分泌が低下するホルモンの組み合わせにより、多彩な症状を呈する。下垂体は、先天性はもとより、後天性の障害後の自立的な再生は見込めない。従って、下垂体機能低下症の治療としては、障害されている下垂体ホルモンの補充療法等の対処療法が行われる。しかし、ホルモン補充療法では、患者は日々自身でホルモン注射を行う必要があり、また障害されているホルモンに対してホルモン分泌の日内変動やストレス下における分泌応答を再現することは難しく、成長期や思春期の成長段階に応じた投与量調整が必要となるなど、根治療法とはならない。従って、ホルモン補充療法に代わる根治的な治療法が求められている。このような状況の中、下垂体機能低下症の再生医療に対する期待が高まっている。

一方、近年マイクロRNA(miRNA)による遺伝子発現・翻訳制御機構と細胞分化・発生、疾患発症との関連が注目されている。miRNAは18-25塩基長の小さな一本鎖RNAで、塩基配列の相補性を示すmRNAを標的とし、その分解を導くか、あるいは翻訳を抑制し、標的遺伝子の発現を抑制する。一つのmiRNAは多数のmRNAを標的とすることができ、一つのmiRNAが平均200個のmRNAを標的にしていると試算されている。逆に、一つのmRNAは複数のmiRNAの影響を受けている。このことは、miRNAが遺伝子発現を巧妙に制御し、遺伝子機能発現のファインチューナーとして機能していることを示している。したがって、miRNAの機能を理解することは、細胞分化・発生並びに疾患発症機構を理解するための新たな知見をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、上述の研究背景から下垂体細胞分化を調節するmiRNAを同定し、その機能を明らかにするとともに、得られた知見をiPS細胞由来下垂体細胞分化誘導系に応用し、再生医療にもつながる下垂体細胞分化機構をmiRNA機能の視点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)下垂体細胞分化に関与するmiRNAを同定するため、マウス下垂体発生過程におけるmiRNA発現をアレイ解析により網羅的に解析し、下垂体発生過程を通じてi)発現が上昇するmiRNA、ii)発現が減少するmiRNA、iii)発現が一過性に上昇するmiRNA、発現が一過性に減少するmiRNA等に分類する。さらに、In situ hybridization法によりこれらmiRNAの発現動態を明らかにし、下垂体ホルモン産生細胞分化と比較することにより、各下垂体ホルモン産生細胞分化に関与

する可能性のある miRNA を同定する。

(2) 下垂体ホルモン産生細胞分化における miRNA の機能を同定するため、下垂体原基に発現する転写因子 Ptx1 や GH、Prl、TSH 産生細胞系譜に発現する転写因子 Pit1、あるいは GH などのホルモンの下流で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Ptx1-cre、Pit1-cre、GH-cre 等) と Dgcr8-flox マウスを交配させ、下垂体発生時期/細胞種特異的に miRNA を欠損するマウスを作成し、下垂体ホルモン産生細胞分化を検討する。申請者はすでに GH-cre/Dgcr8-flox マウス (GH 産生細胞から Dgcr8 を欠損したマウス) を作成し、このマウスは野生型マウスに比べ、体長が短く、低体重であることを見出している (図 1)。さらに、上記で同定した miRNA を特異的に欠損あるいは抑制したマウスをゲノム編集技術により作成し、下垂体ホルモン産生細胞分化を検証し、特定の miRNA の下垂体ホルモン産生細胞分化における機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 下垂体発生過程における miRNA の発現変動および下垂体ホルモン産生細胞株を用いた分化・成熟化過程における miRNA の発現変動を検討し、マウス胎生 13 日より miR-200c の発現が亢進し、下垂体 pit-1 細胞系譜 (成長ホルモン産生細胞、プロラクチン産生細胞、甲状腺刺激ホルモン産生細胞の前駆細胞) への miR-200c の導入により、GH 産生細胞への分化が誘導されることを見出した。miR-200c の標的遺伝子の一つである Zeb1 は GH 遺伝子発現を抑制することが知られているが、下垂体 pit-1 細胞系譜への miR-200c の導入は Zeb1 発現量を抑制することを明らかにした。さらに、下垂体原器が出現するマウス胎生 11 日目以降に miR-200c を含む 27miRNA の発現が亢進し、4miRNA の発現が減少することを見出した。

(2) これまでの検討から、成長ホルモン (GH) 発現細胞において、miRNA のみのプロセッシングを行う酵素である DGCR8 を欠損させた GH-cre/Dgcr8-flox マウス (GH 産生細胞から Dgcr8 を欠損したマウス) を作成しているが、本マウスにおける GH 産生細胞の減少と甲状腺刺激ホルモン (TSH) 産生細胞の増加を見出した。この結果は前駆細胞が共通と考えられる GH 産生細胞と TSH 産生細胞の分化方向性を miRNA が制御している可能性を示すものである。本現象に関わる miRNA の同定とその制御機構を明らかにするため、野生型マウスと GH-cre/Dgcr8-flox マウスの下垂体における miRNA 発現を比較したが、有意な miRNA 発現の差はみられなかった。しかし、下垂体全体を対象としたことから、GH/TSH 産生細胞の分化に寄与する miRNA の検出ができなかったと考えられる。現在、GH-cre/Dgcr8-flox マウスにおいて GH 産生細胞を蛍光標識可能なレポーターマウスの掛け合わせを行っており、野生型および GH-cre/Dgcr8-flox マウスの GH 産生細胞での miRNA 発現変動の解析を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立成育医療研究センター研究所薬剤治療研究部オリジナルホームページ
<http://nrichd.ncchd.go.jp/pharmac/concept.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------