

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23592121

研究課題名(和文)下垂体幹細胞からホルモン分泌細胞への分化誘導法の開発と下垂体再生医療への応用

研究課題名(英文) Induction of hormone-secreting cells from pituitary stem cells

研究代表者

北条 雅人 (Hojo, Masato)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60372588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、下垂体前葉の発生においてNotch-Hes経路が幹細胞の分化を制御していることを証明し報告してきた。下垂体機能低下症が特定疾患に指定され、下垂体の再生医療開発への期待は高まっている。本研究では、引き続き下垂体後葉における幹細胞の制御機構の解析を行なった。後葉の幹細胞が、Notchの下流因子であるHes1およびHes5によって制御されていることを解明した。

研究成果の概要(英文)：The pituitary development requires the control of proliferation and differentiation of progenitors. Molecular mechanisms of adenohypophysis development are much better understood, but little is known about mechanisms that regulate neurohypophysis development. The aim of this study was to clarify the role of Hes genes, known as Notch effectors, in neurohypophysis development. We have found that Hes1 and Hes5 control not only maintenance of progenitor cells but also pituitary versus neuron fate specification during neurohypophysis development.

研究分野：発生

キーワード：下垂体 Notch bHLH Hes1 Hes5

## 1. 研究開始当初の背景

下垂体は生命維持のために重要な器官。特に後葉は、水分バランスの制御に必須。マウスでは、Rathke 嚢の背部が ventral diencephalon に接し、E10 から、infundibulum を形成し始め、下垂体後葉 (neurohypophysis) になる。Infundibulum は pituicyte へと分化し、これと視床下部の neuron から投射される axon とで下垂体後葉が形成される。Pituicyte は glia である。後葉の発生機序は不明の部分も多い。我々は、Notch の effector の Hes1 の関与を示唆したが、詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

Hes1 および Hes5 が pituicyte の幹細胞の分化の制御、後葉の形成をコントロールしていることを示し、再生医療の基礎を築くことが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) マウス下垂体での Hes1 の発現を詳細に検討。

(2) Hes1 ノックアウトでは Hes5 が代償している可能性があるため、Hes1;Hes5 ダブルノックアウトを解析するのが良いが、このダブルノックアウトでは神経系の変形がきつく、ほとんどが E10.5 までしか育たないため、下垂体の発生は解析できない。そこで、Haploinsufficiency のため、Hes5 による代償が低下することを期待して、Hes1K0;Hes5Ht マウスを解析することとした。このマウスは、神経系の変形は軽く、生まれる直前の E18 まで観察可能であった。

(3) E12.5 で後葉の evagination を詳細に

解析。Ki67 染色を施行。

(4) pituicyte と glia (astrocyte) のマーカーの S100 および differentiating neuron のマーカー Tuj1 の発現を検討。

(5) progenitor のマーカーの Sox2 の発現を検討。

(6) Pulse chase assay. 先に、E11.5 で IdU を投与。24 時間後に、E12.5 で BrdU を投与。1 時間後に固定。

(7) E16.5 を詳細に検討。

## 4. 研究成果

(1) Hes1 は ventral diencephalon に強く発現し、evagination した部分では発現が低下

我々は、以前、mouse の下垂体発生における Hes1 の発現を報告したが、今回、ventral diencephalon の evagination 部分をさらに解析した。Hes1 は、E10.5 では ventral diencephalon に強く発現している (Kita et al)。Rathke に接した部分が evagination するが、その evagination した部分では Hes1 の発現低下。Ventral diencephalon では、特に subventricular zone で陽性。Evagination 部分は、弱陽性で、基部は管腔側が強陽性。Hes1 ノックアウトでは、evagination が小さくなることを以前報告し、Hes1 が evagination を制御している可能性を示した (Kita et al)。今回は、このメカニズムを詳細に解析することにした。

(2) Hes1K0Hes5HT マウスの作成

Hes1 ノックアウトは、Hes5 が代償することを報告してきた。このため、ventral diencephalon での Hes5 の発現も確認。E12.5

で、wild type では、Hes5 は ventral diencephalon にはほとんど発現なかった。しかし、Hes1 ノックアウトでは、Hes5 の発現を認めた。このことから、Hes5 が Hes1 を代償していると考えられた。Hes1 ノックアウトでは Hes5 が代償している可能性があるため、Hes1;Hes5 ダブルノックアウトを解析するのが良いが、このダブルノックアウトでは神経系の変形がきつく、ほとんどが E10.5 までしか育たないため、下垂体の発生は解析できない。そこで、Haploinsufficiency のため、Hes5 による代償が低下することを期待して、Hes1K0;Hes5Ht マウスを解析することとした。このマウスは、神経系の変形は軽く、生まれる直前の E18 まで観察可能であった。以下、Hes1K0 マウスおよび Hes1K0;Hes5Ht マウスを解析することにした。

### ( 3 ) Hes1K0;Hes5HT マウスでは、後葉が形成されない

E12.5 で後葉の evagination を詳細に解析。Hes1K0 ではコントロールに比べて後葉の evagination が小さい。Hes1K0;Hes5HT では、さらにフェノタイプが強く、evagination が消失。次に、Ki67 染色を施行。コントロールでは、evagination した部分 (infundibulum) は、Ki67 の発現が低下している。この Ki67 陽性細胞が減少している部分は、Hes1 の発現が低下している部分に一致。また、ここでは、BrdU の取り込みも低下している (後述)。後葉の形成は、infundibulum の先端で細胞が分裂を続けて延長していくのではなく、むしろ infundibulum の先端は分裂が終わって分化している。Hes1K0 では、コントロールに比べて、infundibulum で、Ki67 陽性細胞が減少。BrdU 陽性細胞も減少 (後述)。Hes1K0Hes5HT では、evagination せず、この部分の管腔側に、Ki67 の陽性細胞を認めるが、外側は陰性となっている。HesK0 マウスでは、progenitor の分化が促進し、このため後葉が低形成とな

るか消失する。

### ( 4 ) Hes1K0;Hes5HT マウスでは、後葉の progenitor が神経に分化するため後葉が形成されない

次に、pituicyte と glia (astrocyte) のマーカーの S100 および differentiating neuron のマーカー Tuj1 の発現を検討。コントロールでは、ventral diencephalon の外側 (非管腔側) と evagination した部分の特に遠位で s100 陽性。前者は astrocyte、後者は pituicyte である。コントロールでは、ventral diencephalon では Tuj1 陽性であるが (neuron の細胞体は非管腔側に位置し、axon が管腔側に向けてのびる)、evagination した部分は陰性。Hes1K0 では、infundibulum の分化が促進しているが、この部分では、s100 陽性細胞 (pituicyte) は増えない。代わりに、この部分では、Tuj1 増える。さらに、Hes1K0Hes5HT では、evagination 消失するが、この部分は、外層が s100 陰性で Tuj1 陽性であり、pituicyte および glia には分化せず、neuron に分化している。この部分は、層が分厚くなっている。なお、後述のように、この部分に、TUNEL は陽性にならず、ノックアウトでは、apoptosis を起こして後葉が消失しているのではない。

以上のように、ノックアウトマウスで後葉が出来ない理由は、Hes 遺伝子の neuron vs glia の fate decision の機能が阻害され、glia (pituicyte) になるはずの細胞が neuron に分化するため。Neuron は pituicyte のように evagination せず、その場にとどまるので、層は分厚くなる。

### ( 5 ) Infundibulum の基部に progenitor 集中し、先端ほど pituicyte は分化が進んでいる

前述のように、コントロールでは、E12.5 で、infundibulum の先端側は s100 強陽性。S100

は、可塑性は残ってはいるが、ある程度成熟した pituicyte のマーカーである。Infundibulum の基部側は、外側（非管腔側）で s100 が強陽性。これらの強陽性の部分は、mature してきた pituicyte といえる。次に、calbindin で染色。Calbindin は immature pituicyte のマーカーであり、immature pituicyte は diffuse に淡く染まる。これは一過性で、徐々に低下。なお、calbindin で neuron は強く染まる。コントロールでは、E12.5 で、infundibulum の基部側では、calbindin が diffuse に陽性。この部分が immature pituicyte である。S100 の結果もあわせると、infundibulum の先端ほど、pituicyte は分化が進んでいる。Hes1K0Hes5HT では、嵌入が無くなり、同部は非管腔側 calbindin 強陽性。この部分は Tuj1 陽性であり、pituicyte や glia でなく neuron に分化している。Tuj1 の結果に一致。次に、Sox2 で染色。Sox2 は progenitor のマーカー。コントロールでは、Sox2 は、ventral diencephalon の特に管腔側と infundibulum の全体が陽性となる。Pituicyte の progenitor と分化後の pituicyte がしばらく陽性となる。この部分は、前述の neuron に分化した部分に一致している。ノックアウトでは、分化が促進し、evagination が消失している。

以上のように、ノックアウトでは分化が促進し、glia になれずに neuron になるため、pituicyte は形成されず、後葉消失。

#### ( 6 ) Progenitor pool から pituicyte が分化し、押し出される

Pulse chase assay。先に、E11.5 で IdU を投与。24 時間後に、E12.5 で BrdU を投与。1 時間後に固定。E12.5 での BrdU の陽性細胞の分布は、Ki67 の陽性細胞の分布に矛盾しない。Infundibulum では、BrdU の取り込みなし。基部の管腔側には取り込みあり。

E11.5 で IdU を取り込んでいた細胞は、E12.5 では、infundibulum に分布。後から投与の BrdU は、infundibulum には取り込まれない。基部には取り込みあり。最初に取り込まれていた部分は、分化して分裂終了。その後は、基部のところから分裂が続いて押し出される。基部の progenitor pool で pituicyte が作られ、押し出されていく。

#### ( 7 ) E16.5 でも Hes1K0 Hes5 HT では pituicyte 形成せず

次に、E16.5 で解析。E16.5 でも、Control に比べ、Hes1K0 では後葉小さい。Hes1K0;Hes5 HT では後葉消失。E12.5 で infundibulum が小さいあるいは消失していたのは、単に分化が遅れていたのではない。次に、pituicyte を調べるため、s100 で染色。Control に比べ、Hes1K0 では pituicyte 減少。Hes1K0Hes5HT では、pituicyte 消失。

#### 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 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Goto, M., Hojo, M., Ando, M., Kita, A., Kitagawa, M., Ohtsuka, T., Kageyama, R. and Miyamoto, S., 2015. Hes1 and Hes5 are required for differentiation of pituicytes and formation of the neurohypophysis in pituitary development. Brain Res. 1625, 206-17.

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

〔図書〕(計 1 件)

北条雅人: 下垂体ホルモン・脳神経外科医が  
知っておくべきニューロサイエンスの知識・  
脳神経外科診療プラクティス 6・文光堂,  
128-129, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北条雅人 (Hojo, Masato)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号: 60372588

### (2) 研究分担者

影山龍一郎 (KAGUYAMA, Ryoichiro)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号: 80224369

宮本 享 (MIYAMOTO, Susumu)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 70239440

### (3) 連携研究者

なし