

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580435

研究課題名(和文)下垂体の発生・分化と血管形成における新規下垂体転写因子PRXの機能解析

研究課題名(英文)Function of novel pituitary transcription factor PRX in the development of the pituitary gland and the vasculogenesis

研究代表者

加藤 たか子 (Kato, Takako)

明治大学・公私立大学の部局等・研究員

研究者番号：90445859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、新規転写因子PRX1とPRX2の特異抗体を作製し、下垂体の発生過程における発現変動を解析し、PRX1とPRX2が胎仔期の下垂体に出現する事を初めて示した。と同時に、何れも下垂体周辺に存在する間葉系細胞の中にそれぞれの陽性細胞が存在し、胎仔期に下垂体内に進入することを明らかにした。一方、PRX1とPRX2の機能を解析する実験系を検討する中で、下垂体腫瘍由来の株化細胞を調べることで、TtT/GF細胞がPRX1とPRX2を発現する事を、初めて同定した。その細胞を他の下垂体腫瘍由来の株化細胞と比較すると、TtT/GFを含めて、幹細胞性の特性を示すことも観察した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to understand role of the novel transcription factors, PRX1 and PRX2. Using generated specific antibodies for PRX1 and PRX2, we demonstrated their presence in the pituitary stem/progenitor cells and in the extrapituitary cells invaded from surrounding mesenchyme and suggest that PRX1 and PRX2 are involved in pituitary organogenesis and vasculogenesis. In addition, we have found that TtT / GF cell derived from pituitary tumors expresses PRX1 and PRX2 and exhibits stemness with expressing several stem cell markers, showing a useful model cell to clarify their functions in molecular level.

研究分野：分子内分泌学

キーワード：遺伝子 発現制御 内分泌学 生殖 細胞・組織 血管形成 分化

### 1. 研究開始当初の背景

下垂体は脳の直下に位置する、生体の機能維持に働くホルモンを合成する内分泌小器官であり、発達した血管網を通して、視床下部の制御を受けてホルモンの分泌を行っている。最近、申請者らは、新規下垂体転写因子 PRX が下垂体で発現し、内分泌細胞の分化のみならず、血管形成にも関与することを発見し、この PRX が下垂体の器官形成に重要な役割を担うと考えている。本研究では、分子生物学、免疫組織化学的手法により、PRX の発現制御機構の解明、標的遺伝子の探索、発現細胞の時空間的解析を行うことで、PRX の作用機序を明らかにし、下垂体の「発生—分化—再生」、さらには血管形成機構も交えた組織構築と維持の機構を解明することを目的としている。

### 2. 研究の目的

本研究では、分子生物学、免疫組織化学的手法により、PRX の発現制御機構の解明、標的遺伝子の探索、発現細胞の時空間的解析を行うことで、PRX の作用機序を明らかにし、下垂体の「発生—分化—再生」、さらには血管形成機構も交えた組織構築と維持の機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 転写物の定量的測定：ラット胎仔および生後の下垂体より全 RNA を調整して、cDNA を合成した。ラット PRX1 と PRX2 の特異プライマーを作成して、リアルタイム PCR によりそれぞれの mRNA 量を定量した。

(2) 組換え体タンパク質の調製と抗体の作製：ラット PRX1 と PRX2 の N 末端側でそれぞれ異なるアミノ酸配列を示すペプチドを抗原として設計した。ウサギに対する抗体を作製した。

(3) 免疫組織化学：ラット胎仔および生後の下垂体の組織切片を作成し、転写因子 (SOX2、PROP1、PRX)、NESTIN、各種のホルモン (LH  $\beta$ 、FSH  $\beta$ 、 $\alpha$  鎖、GH、PRL、ACTH)、などの抗体で蛍光標識免疫組織化学を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 胎仔期および生後の下垂体における PRX1 と PRX2 の発現

リアルタイム PCR の結果 (図 1) は、両者の発現量では、PRX1 が多く、胎仔期の 13.5 日で既に発現を開始していた。PRX2 の発現量は胎仔期にあまり変化は見られないが、PRX1 の発現量は増加し、生後は何れも減少を示していた。

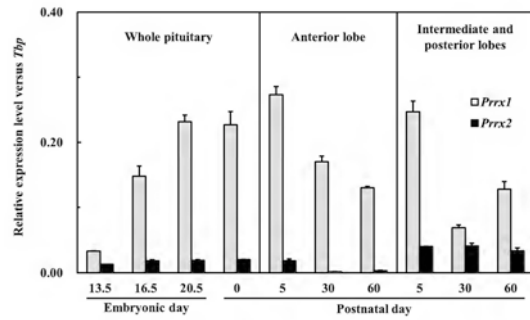


図 1. 胎仔期および生後の下垂体における PRX1 と PRX2 の発現量。胎仔期から出生時までは、前葉と中葉をあわせた発現量。出生後 5 日以降は、前葉と中・後葉の 2 つに分けて測定した。

#### (2) 抗体の作製

N 末端側のペプチドを作製して抗体を作製し、それぞれの特異性を確認した (図 2)。

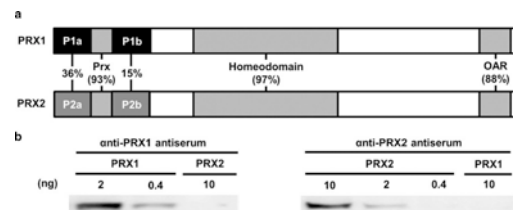


図 2. PRX1 と PRX2 の構造模式図 (a) と抗原性の特異性の評価 (b)。

#### (2) PRX1 と PRX2 の免疫組織化学

胎仔期の頭部の免疫組織化学を行うと、PRX1 と PRX2 陽性細胞は何れも下垂体外に存在していた (図 3)。

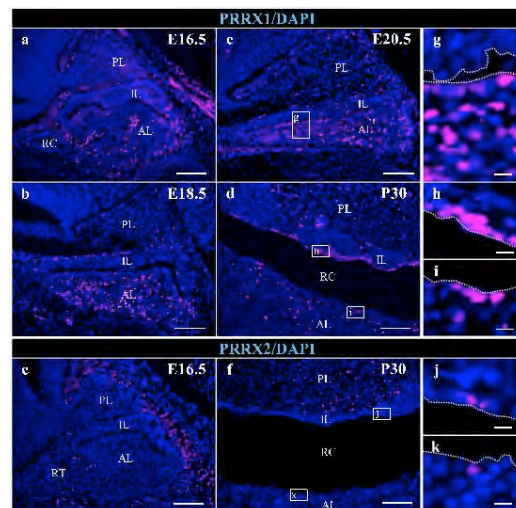


図 3. PRX1 (上、赤) と PRX2 (下、赤) の免疫組織化学像。SOX2 (緑) と核 (DAPI 染色、青) の像を重ねて示している。

胎仔期下垂体の発達期を日ごとに調べると、16.5 日では多くの PRX1 陽性細胞が PRX2 陽性

細胞は僅かに確認された(図4)。これらを詳しく観察すると、PRX1とPRX2陽性細胞には、下垂体外から侵入する細胞(間葉系細胞)と、下垂体(口腔上皮)由来の細胞が混在することが、SOX2に対する反応性から判った。

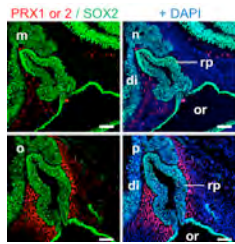
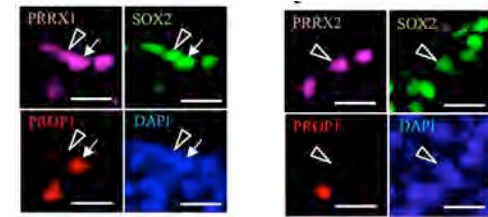


図4. PRX1(上2段)とPRX2(最下段)の免疫組織像。赤はPRX1ないしPRX2、青は核のDAPI染色を示す。

### (3) PRX1とPRX2陽性細胞とSOX2

我々は、これまでに下垂体の幹細胞の特徴を報告してきた。そのマーカーであるSOX2や下垂体特異的転写因子PROP1との共存を調べると、PRX1とPRX2陽性細胞には、幹・前駆細胞生を示すものが存在する事も判った(図5)。



b								
Subject	Cell number							
	PRX1/SOX2 (per PRX1 %)	PROP1/SOX2	PRX1/PROP1 (per PRX1 %)	PRX1/PROP1/SOX2 (per PRX1 %)	PRX1 only (per PRX1 %)	PROP1 only	SOX2 only	Total(SOX2-positive)
1	29 (90.6)	6	0 (0)	3 (9.4)	0 (0)	0	21	59
2	33 (89.2)	4	0 (0)	4 (10.8)	0 (0)	0	19	60

d								
Subject	Cell number							
	PRX2/SOX2 (per PRX2 %)	PROP1/SOX2	PRX2/PROP1 (per PRX2 %)	PRX2/PROP1/SOX2 (per PRX2 %)	PRX2 only (per PRX2 %)	PROP1 only	SOX2 only	Total(SOX2-positive)
1	1 (100)	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	51	64
2	3 (100)	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	47	55

図5. PRX1(左上)とPRX2(右上)の免疫組織像とPRX1(上表)ないしPRX2(下表)陽性細胞における幹細胞マーカーSOX2の共存。

### (4) PRX1とPRX2陽性細胞と血管形成

下垂体は、組織内に形成される多数の毛細血管にホルモンを分泌することで、生体の恒常性維持に機能している。その血管がどの様に形成されるかは重要な問題である。PRX1とPRX2はしばしば血管形成に関わる細胞の分化への関与が指摘されている。

胎仔期下垂体の染色像を見ると、血管形成が始まるとされる前葉の吻部にできる窪み(Atwell's recess)にPRX1とPRX2陽性細胞が確認できる(図6)。それらは、血管内皮細胞に特異的に結合するIsolectinB4にたいして陽性を示す細胞やNESTIN陽性の細胞もあることから、血管形成に関わる事が示唆

された。こうした、下垂体外から侵入する細胞は、下垂体上皮系譜の細胞が示すSOX2陽性を示さなかった。

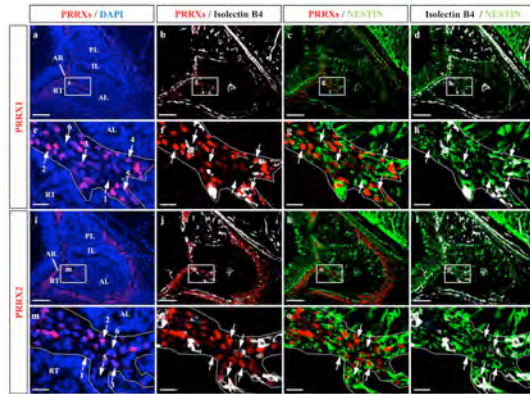


図6. PRX1(赤、上2段)とPRX2(赤、下2段)。IsolectinB4(白)、NESTIN(緑)、核(DAPI染色、青)の染色像も示す。

### (5) PRX1とPRX2を発現する下垂体由来株化細胞の同定

下垂体におけるPRX1とPRX2の機能を解明するには、両者を発現する株化細胞は有用なツールである。各種の下垂体由来株化細胞を調べると、TtT/GF株が両遺伝子を発現していることが判明した。

この細胞は、幹細胞性を持つ細胞にはトランスポーターABCG2の存在が知られており、各種の薬剤に対して強い排出能を持つ。その機能の阻害剤を使って調べてみると、TtT/GFでABCG2が機能している事を示しており、PRX1とPRX2の発現能とともに、この細胞の幹細胞性を示した。

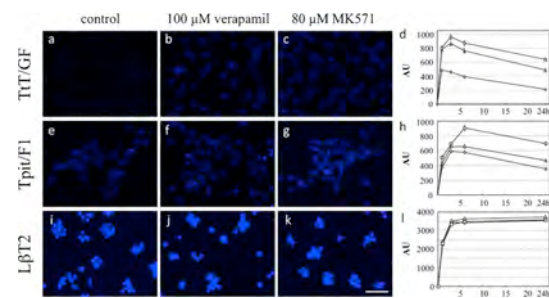


図7. TtT/GF(上)のHoechst 33342(青)の排出能。トランスポーターABCG2の阻害剤、verapamilとMK571を使って、ABCG2の有無を調べた。

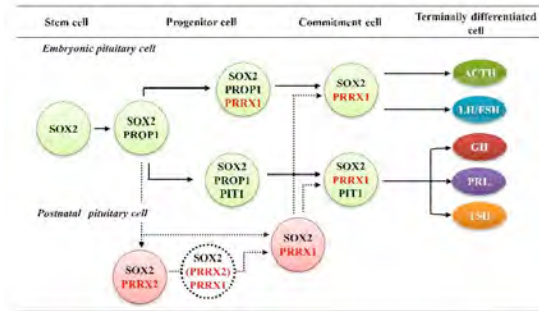
本細胞を使ったPRX1とPRX2遺伝子のプロモーターアッセイで、両者の発現を制御する複数の転写因子を同定した。同時に、PRX2のみを制御するKLF6を同定した。さらに免疫組織化学を行って、KLF6がPRX2陽性細胞に共存することを論文報告した。

## 5. 研究成果の意義と考察

以上の結果から、PRX1 と PRX2 は、①下垂体系譜の細胞群と、②下垂体外から侵入する間葉系細胞が存在し、前者は下垂体ホルモン産生細胞を供給する幹・未分化細胞として、後者は下垂体組織の血管形成を担っている、ことが判明した。

下垂体のホルモン産生細胞は、胎仔期から出現するが、それらは個体が消滅するまで絶えず補給される。そのために下垂体に存在する幹・前駆細胞がその役割を果たしている。これまでの研究で、SOX2 の発現する下垂体幹細胞に、この組織の特異的転写因子 PROP1 が発現する事で、ホルモン産生細胞への分化が開始されることを明らかにしている。その道筋を支える細胞は必ずしも一様ではない事も報告している。今回、PRX1 と PRX2 の発見により、下垂体の組織形成を担う細胞系譜は複雑であることが示された。こうした複雑な過程について、図 8 の様にまとめた。

今後、こうした幹・前駆細胞群を取り出して、in vitro で



下垂体構成細胞の分化誘導実験や、下垂体様細胞塊の作製、といった課題に取り組む計画である。

図 8. 下垂体幹・前駆細胞の多様性。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 20 編)

- Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T, Kato Y (2015) PRRX1- and PRRX2-positive mesenchymal stem/progenitor cells are involved in vasculogenesis during rat embryonic pituitary development. *Cell Tissue Res* 358, 10.1007/s00441-015-2128-5.
- Yoshida S, Kato T, Chen M, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Kato Y (2014) Localization of a juxtacrine

factor ephrin-B2 in the pituitary stem/progenitor cell niches throughout life. *Cell Tissue Res* 359, 755-766.

- Horiguchi K, Higuchi M, Yoshida S, Nakakura T, Tateno K, Hasegawa R, Osako S, Kato T, Kato Y (2014) Proton receptor GPR68 expression in dendritic cell-like S100 $\beta$ -positive cells of rat anterior pituitary gland: GPR68 induces interleukin-6 gene expression in extracellular acidification. *Cell Tissue Res* 358, 515-525.
- Yoshida S, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Tsuda M, Nishihara H, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y (2014) Characterization of murine pituitary-derived cell lines Tpit/F1, Tpit/E and TtT/GF. *J Reprod Dev* 60, 295-303.
- Yoshida S, Ueharu H, Higuchi M, Horiguchi K, Nishimura N, Shibuya S, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y (2014) Molecular cloning of rat and porcine retina-derived POU domain factor 1 (POU6F2) from pituitary cDNA library. *J Reprod Dev* 60, 288-294.
- Higuchi M, Kanno N, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Yako H, Shibuya S, Sekita M, Tsuda M, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y (2014) GFP-expressing S100 $\beta$ -positive cells of the rat anterior pituitary differentiate into hormone-producing cells. *Cell Tissue Res* 357, 767-779.
- Ueharu H, Higuchi M, Nishimura N, Yoshida S, Shibuya S, Sensui K, Kato

- T, Kato Y (2014) Expression of kruppel-like factor 6, KLF6, in rat pituitary stem/progenitor cells and its regulation of the PRRX2 gene. *J Reprod Dev* 60, 304-311.
8. Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T, Kato Y (2014) PRRX1 and PRRX2 distinctively participate in pituitary organogenesis and cell supply system. *Cell Tissue Res* 357, 323-335.
9. Horiguchi K, Fujiwara K, Higuchi M, Yoshida S, Tsukada T, Ueharu H, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y (2014) Expression of chemokine CXCL10 in dendritic cell-like S100 $\beta$ -positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res* 357, 757-765.
10. Horiguchi K, Fujiwara K, Yoshida S, Higuchi M, Tsukada T, Kanno N, Yashiro T, Tateno K, Osako S, Kato T, Kato Y (2014) Isolation of dendritic cell-like S100 $\beta$ -positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res* 357, 301-308.

上記以外に

2013年度 6編  
2012年度 4編

[総説] (計7編)

1. 陳黙, 加藤たか子, 加藤幸雄 (2014) コクサッキウイルス・アデノウイルスの共通受容体CARについて. 明治大学農学部研究報告 64, 29-39.
2. 上春浩貴, 加藤たか子, 加藤幸雄 (2014) 下垂体幹・前駆細胞にも発現している腫瘍抑制と分化に機能する

Kruppel-like型転写因子KLF6について. 明治大学農学部研究報告 64, 10-20.

3. 吉田彩舟, 加藤たか子, 加藤幸雄 (2014) 組織形成と領域化における ephrin/Eph Receptorの役割. 明治大学農学部研究報告 64, 1-9.

上記以外に

2013年度 2編  
2012年度 2編

<国際学会> (計54件)

2013年度 7件  
2013年度 6件  
2012年度 5件

<国内学会> (計54件)

2013年度 19件  
2013年度 20件  
2012年度 14件

[その他]

ホームページ

<http://www.isc.meiji.ac.jp/~kasuitai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 たか子 (KATO TAKAKO)  
明治大学・研究知財・共同研究員  
研究者番号: 90445859

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

加藤 幸雄 (KATO YUKIO)  
明治大学・農学部・教授  
研究者番号: 30114177