

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 15 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380184

研究課題名（和文）下垂体前葉の分化とプロジェニター細胞における新規ホメオティック転写因子群の役割

研究課題名（英文）Studies of the roles of pituitary transcription factors for pituitary development and progenitor cells

研究代表者

加藤 幸雄（KATO YUKIO）

明治大学・農学部・教授

研究者番号：30114177

研究成果の概要（和文）：

交付期間で、新規転写因子 PROP1 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、PROP1 が発生初期の下垂体の全細胞に存在し、その後ホルモン産生細胞の出現に伴いその数を減じることを初めて明らかにした。しかも、PROP1 陽性細胞は常に細胞分化に重要な因子 SOX2 と共存する事も初めて明らかにした。さらに、新規の転写因子 PRX2 の同様な解析を行い、PROP1-PRX2-下垂体の分化細胞と言う系譜の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to understand how homeotic transcription factors develop anterior pituitary and provide abilities to produce several hormones and regenerate hormone-producing cells throughout the life. By several approaches of molecular biology, cell biology and immunohistochemistry, we demonstrated that a pituitary specific transcription factor PROP1 and novel pituitary factors PRX1/PRX2 are indispensable for the pituitary organogenesis. To clarify the molecular functions are remained to be resolved in near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・基礎獣医学基礎畜産学

キーワード：転写調節因子、ホメオティック因子、性腺刺激ホルモン、転写因子ネットワーク、相互作用、クローニング

1. 研究開始当初の背景

性腺の成熟をはじめ、雌雄における配偶子形成に重要な役割を担っているものが、下垂体で合成・分泌される性腺刺激ホルモンである。このホルモンの機能の解明は、畜産動物にとどまらず、ヒトを初めとする

全ての脊椎動物が営む繁殖・生殖にとって重要な課題の一つである。我々はこの性腺刺激ホルモンを構成するブタ FSH β 鎖遺伝子の解析の過程で、下垂体特異的転写因子 PROP1 が FSH β 鎖遺伝子の発現を制御することを、本研究の開始直前に、世界に先駆

けて報告した。

PROP1 以外の、現在解析中である複数の新規因子には神経、造血組織、そして下垂体の発生・分化に重要な役割を持つホメオティック因子のホモログが存在しており、FSH β 鎖遺伝子の発現調節機構の解明にとどまらず、下垂体機能の獲得過程において機能する転写因子についても重要な知見を提示することになる。

2. 研究の目的

(1) 性腺刺激ホルモンはサブユニット構造を持つホルモンであり、FSH β 鎖の他に α 鎖と LH β 鎖遺伝子があるが、PROP1 を含め解析中の因子群が、それらサブユニット遺伝子の転写に関与するか否かは重要かつ興味ある点で、急務の課題として取り組む。既に、PROP1 が、 α 鎖の転写調節にかかわっている実験結果を得ており、他の因子も同様に解析を展開する。さらに、FSH β 鎖上の結合部位で、これらの因子が相互作用している可能性が考えられ、結合配列の詳細な分析、および転写因子間相互作用、転写因子と転写補助因子間相互作用、また、性腺刺激ホルモン合成にかかわる情報伝達系因子との相互作用、を解析することで性腺刺激ホルモン合成を巡る転写因子間ネットワークの全容解明を目指す。

(2) クローン化した複数のホメオティック因子の中で、PROP1 は下垂体の発生・分化に深くかかわる事が報告されているが、他の因子の中には、我々によって下垂体での存在が初めて確認されたものがある。これらの因子が果たす、下垂体の発生・分化における時間的・空間的な役割を解明する目的で、発現レベルを個体発生的に解析するため、ブタ胎児期の下垂体全 RNA を用いて発現変動の分析、および免疫組織化学的分析を行う。

3. 研究の方法

(1) 組換え体タンパク質の調製：ラット PROP1 の C 末端側ペプチド部分をコードする cDNA を pET32a に組み込んで発現させ、C 末端側組換えペプチドを精製した。

(2) 抗体の作成：上記の PROP1C 末端側組換えペプチドを用いて、抗ラット PROP1 ウサギ抗体を作製した。

(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、各種のホルモン (LH β 、FSH β 、 α 鎖、GH、PRL、ACTH)、転写因子 (SOX2、PROP1、PRX)、NESTIN などの抗体で蛍光標識免疫組織化学を行った。

(4) 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 PROP1 の特異プライマーを作成して、リアルタイム PCR により PROP1 mRNA 量を定量した。

4. 研究成果

(1) 抗体作成

ラット PROP1 の C 末端側組換えペプチド (図 1 A) を用いて抗体を策して。その抗体は、PROP1 に対する特異性 (図 1 B) を示し、免疫組織化学で特定の核で陽性反応を示し、その細胞 (図 1 C 左) 段左) はミラー切片を用いた

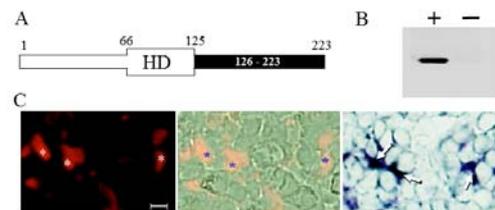


図 1. PROP1 抗体作成と免疫組織化学。

in situ ハイブリダイゼーションの陽性反応を示す細胞 (図 1, 下段右) と一致していた。

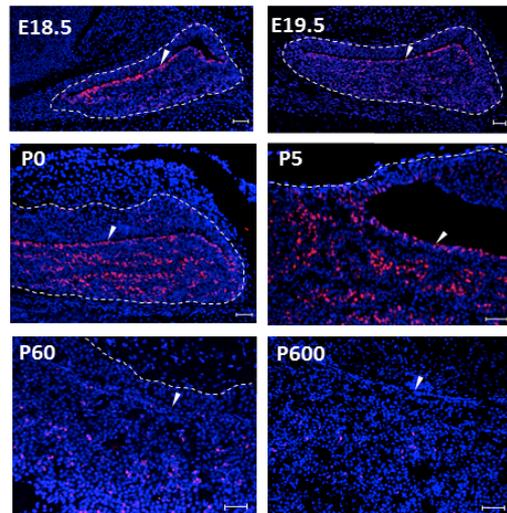


図 2. PROP1 の免疫組織化学。胎仔 18.5 日 (E18.5)、19.5 日 (E19.5)、出生日 (P0)、生後 5 日 (P5)、60 日 (P60)、600 日 (P600) の染色像。PROP1 (赤)。核 (DAPI 染色、青)。

(2) 下垂体の発達過程における PROP1 陽性細胞の局在変化

下垂体 (胎仔 18.5 日、19.5 日、出生日、生後 5 日、60 日、600 日) を用いて免疫染色を行った (図 2)。その結果、胎齢 18.5、19.5、出生日、生後 5 日では、前葉と Marginal Cell

Layer と呼ぶ一層の細胞層 (MCL, 矢頭) に PROP1 の強い陽性反応が観察された。また、前葉の実質層の分布も発達に従って増えていた。

一方、生後 60 日以降では、PROP1 陽性細胞の存在は確認されるものの、劇的にその数は減少していた。

(3) PROP1 と未分化マーカー SOX2 の共存
 ラット胎齢 13.5 日の下垂体では、PROP1 は全ての細胞に存在する事を確認している。しかも、その細胞には、幹・未分化細胞のマーカーである SOX2 が存在していることから、下垂体の細胞分化の指標として、PROP1 と SOX2

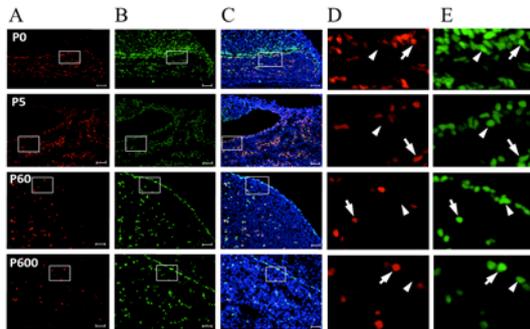


図 3. PROP1 と SOX2 の二重免疫組織化学。PROP1 (A, 赤)、SOX2 (B, 緑)、核 (C, 青)。D および E は、A-C 中の枠で囲んだ部分の拡大図。矢頭は SOX2 単独陽性細胞、矢印は PROP1 および SOX2 が共存する細胞を示す。

の共存を、下垂体の発達過程で調べた (図 3)。その結果が、全ての細胞が PROP1 および SOX2 陽性であった E13.5 と比べて、下垂体の発達が進んだ状態では、陽性細胞の減少と共に、両者の共存細胞以外に、SOX2 単独陽性細胞が存在する事が観察された。それらの割合は変化するようで、この観察結果を定量的に確認するために、下垂体の発達期の PROP1 と SOX2 陽性細胞の変化を計測した。

(4) 下垂体の発達期の PROP1 と SOX2 陽性細胞の計測
 測定結果を表 1 に示した。MCL では、胎仔 II 期に 50% を超えた PROP1 細胞は、出生後 5 日で 5% と激減した。生後 600 日では、1% 強とさらに減少していたが、PROP1 陽性細胞が確認された。実質層では、胎仔期に 20% 前後であったものが、やはり生後 5 日に 7% へと 6 割程度の減少を示したが、生後 600 日も 4% と MCL に比べて高い割合で存在していた。

一方、SOX2 陽性細胞は、MCL で胎仔期に 90% 弱の高い存在比を示し、生後 600 日も 44% と以前と高い値を示した。しかし、PROP1 が共存する細胞は、生後 5 日を境に激減し 2.8% であった。ところが、実質層では SOX2 細胞

Table 1. Temporal and Spatial Alteration in the Proportion of PROP1- and SOX2-Positive Cells.

Marginal cell layer							
Postnatal day	n†	Cell number			Cell population (%)		
		DAPI	PROP1	SOX2	PROP1/DAPI	SOX2/DAPI	PROP1 + SOX2/SOX2
5	4	264	181	296	68.6 ± 8.1	78.0 ± 8.1	87.9 ± 3.0
5	4	332	132	NC	51.2 ± 6.6	NC	NC
15	4	386	77	337	20.0 ± 7.1	82.8 ± 2.8	33.5 ± 8.4
60	3	115	6	102	5.2 ± 2.5	89.6 ± 1.8	5.8 ± 2.7
120	6	626	36	286	7.1 ± 2.6	53.5 ± 6.1	13.9 ± 6.2
600	6	488	6	314	1.2 ± 1.2	43.8 ± 10.1	2.8 ± 3.6

Parenchyma							
Postnatal day	n†	Cell number			Cell population (%)		
		DAPI	PROP1	SOX2	PROP1/DAPI	SOX2/DAPI	PROP1 + SOX2/SOX2
5	23	2027	418	548	35.8 ± 5.3	27.2 ± 6.3	76.2 ± 10.0
5	22	1822	207	NC	16.8 ± 2.2	NC	NC
15	23	2658	238	526	11.1 ± 3.3	17.5 ± 3.8	43.1 ± 14.6
60	48	2641	262	526	7.4 ± 4.0	14.9 ± 7.3	49.6 ± 26.4
120	44	4381	181	480	4.3 ± 2.6	10.9 ± 3.8	29.8 ± 22.9
600	25	4855	187	549	3.9 ± 2.5	11.2 ± 4.4	34.1 ± 23.9

表 1. PROP1 および SOX2 陽性細胞の計測。細胞数は、DAPI 染色された核の数で測定した。

は、生後 600 日でも 11% と高い値を示し、そのうちの 34% は PROP1 が存在していた。PROP1 から見ると、全ての PROP1 細胞には、胎仔期および生後を通じて必ず SOX2 が存在していた。

また、下垂体ホルモンとの共存を調べると、PROP1 細胞は、胎仔期と同じく何れのホルモンとも共存しなかった。従って、PROP1 細胞は、非ホルモン産生細胞に区分される。

(5) 濾胞星状細胞マーカータンパク質 S100 との共存の解析
 S100 は、下垂体の非ホルモン産生細胞の大豊的な細胞である濾胞星状細胞のマーカーとして知られている。そこで、PROP1、SOX2 に加えて、S100 の共存を調べた。

その結果、MCL の SOX2 細胞は、主に SOX2 単独か、S100 共存細胞であった (合計約 77%、図 4)。これに対して実質層では、ほとんどが PROP1 に SOX2 と S100 が共存する細胞 (約 60%) であり、MCL と実質層では異なる細胞構成であった。

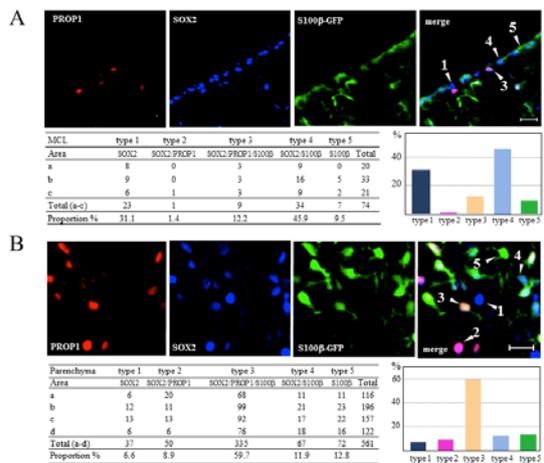
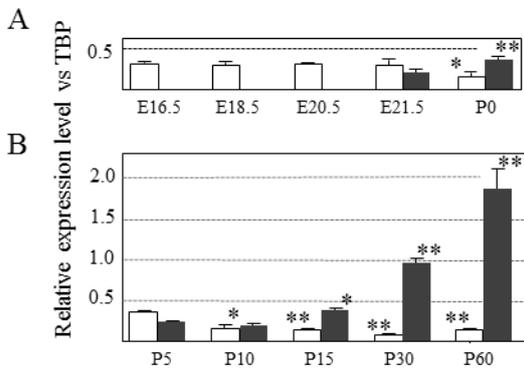


図 4. PROP1 および SOX2 陽性細胞の分布。

(6) PROP1 および S100 の発現の推移
 PROP1 は濾胞星状細胞での発現が強く示唆さ

れたため、PROP1 および S100 の下垂体の発達過程での発現変動を、リアルタイムPCR法を用いて定量的解析を行った。その結果、PROP1 は出生後10日には有意な減少を示した。一方、S100 は出生直前から発現を開始し、タ



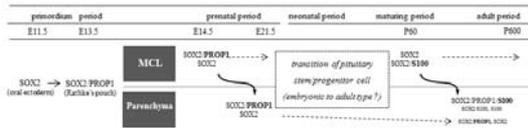
ンパク質レベルでは存在が確認出来る生後15日から増加する事が明らかとなった。

図 5. PROP1(白抜き)および S100(黒塗り)の発現レベル。TBP に対する相対値で示した。

(6) 研究成果の意義と考察

以上の結果から、PROP1 は、①非ホルモン産生細胞を構成すること、②幹・未分化細胞マーカーと共存する事で、下垂体の細胞供給を行う機能を担っている、③MCL と実質層で異なる性質を持つ幹・未分化細胞で機能する事などが明らかとなった。

今回、下垂体の発達過程での定量的な細胞構成の変化を調べた事で、図6に示した様な仮説が提唱出来た。即ち、PROP1 は胎仔期に下垂体としての性質を特徴付ける胎仔期



幹・未分化細胞で発現を開始し、出生前後で存在場所を大きく変化させると共に、S100 の発現の中で成熟幹細胞 (Adlt stem cell) の構成因子として重要な役割を担っていると考えられる。

S

図6. 下垂体の発達過程での非ホルモン産生細胞・幹・未分化細胞の推移。PROP1、SOX2、S100 陽性細胞は、胎仔期から生後まで MCL や実質層 (Parenchyma) で存在場所を変えながら、下垂体の細胞を供給する幹細胞を担っている

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1. Kato T, Ishikawa A, Yoshida S, Sano Y, Kitahara K, Nakayama M, Susa T, Kato

Y. Molecular cloning of LIM homeodomain transcription factor Lhx2 as a transcription factor of porcine follicle-stimulating hormone beta subunit (FSHb) gene. *J Reprod Dev* 2012; 58: 146-154.

2. Yoshida S, Kato T, Yako H, Susa T, Cai L-Y, Osuna M, Inoue K, Kato Y. Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem/progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary. *J Neuroendocrinol* 2011; 23: 933-943.

3. Yako H, Kato T, Yoshida S, Inoue K, Kato Y. Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary primordium of Rathke's pouch. *Cell Tissue Res* 2011; 346: 339-346.

4. Osuna M, Sonobe Y, Itakura E, Devnath S, Kato T, Kato Y, Inoue K 2012 Transdermal differentiation capacity of pituitary folliculo-stellate cells and brain astrocytes. *Journal of Endocrinology* in press.

5. Cai LY, Kato T, Chen M, Wang H, Sekine E-I, Izumi SI, Kato Y 2012 Accumulated HSV1-TK Proteins Interfere with Spermatogenesis Through a Disruption of Integrity of Sertoli-Germ Cell Junctions. *Journal of Reproduction and Development* in press.

6. Susa T, Kato T, Yoshida S, Yako H, Higuchi M, Kato Y. Paired-related homeodomain proteins *Prx1* and *Prx2* are expressed in embryonic pituitary stem/progenitor cells and may be involved in the early stage of pituitary differentiation. *J Neuroendocrinol* 2012,

in press

〔学会発表〕(計81件) : <原著論文>

<国際学会>

1. Akio Ishikawa, Hideo Mituishi, Takao Susa, Takako Kato, Yukio Kato. Analysis of promoter region of a novel pituitary transcription factor Prx2 in TtT/GF which is of folliculo-stellate cell-lineage. The 93rd Annual Meeting of American Endocrinology, Boston, 2011.6.4-7
2. Marumi Osuna, Saishu Yoshida, Yukiko Sonobe, Kinji Inoue, Takako Kato, Yukio Kato. S100b-expressing folliculo-stellate cells are found in SOX2-positive population in the anterior pituitary gland and show multiple differentiation capacities in the defined culture conditions. The 93rd Annual Meeting of American Endocrinology, Boston, 2011.6.4-7

<国内学会>

1. 八子英司、加藤たか子、石川晶雄、吉田彩舟、加藤幸雄. ラトケ囊におけるPROP1 陽性細胞の3次元解析. 日本下垂体研究会第26回学術集会案内、2011.8.25-27, 倉敷市
2. 渋谷汐里、石川晶雄、津田光芳、関田雅世、吉田彩舟、諏佐崇生、加藤たか子、加藤幸雄. Prop1 上流域およびイントロン1 に対するSOX2 の作用解析. 日本下垂体研究会第26回学術集会案内、2011.8.25-27, 倉敷市
3. 寺島涼太、米澤智洋、久留主志朗、加藤たか子、加藤幸雄、汾陽 光盛. インターフェロン”(IFN”)によるmyxovirus

resistance 1 (Mx1) 偽遺伝子のゴナドトロフ細胞株 (LβT2) における転写調節. 日本下垂体研究会第26回学術集会案内、2011.8.25-27, 倉敷市

4. 近藤朱音、陳黙、蔡立義、加藤たか子、和泉俊一郎、樋口雅司、加藤幸雄. ヒト男性不妊とヘルペスウイルス感染との関係. 日本下垂体研究会第26回学術集会案内、2011.8.25-27, 倉敷市
5. 菅野尚子、大砂まるみ、諏佐崇生、加藤たか子、加藤幸雄. 下垂体濾胞星状細胞はホルモン産生細胞に分化する. 日本下垂体研究会第26回学術集会案内、2011.8.25-27, 倉敷市
6. 陳黙、八子英司、大砂まるみ、諏佐崇生、加藤たか子、加藤幸雄. ラット成体下垂体におけるCAR 陽性細胞の局在様式. 日本下垂体研究会第26回学術集会案内、2011.8.25-27, 倉敷市
7. 陳黙、蔡立義、加藤たか子、和泉俊一郎、樋口雅司、加藤幸雄. ヒト男性不妊におけるヘルペスウイルス感染の解析. 第104回日本繁殖生物学会大会、盛岡、2011.9.15-17
8. 大砂まるみ、菅野尚子、諏佐崇生、加藤たか子、加藤幸雄. ラット下垂体前葉濾胞星状細胞の一部はホルモン産生細胞へと分化する. 第38回日本神経内分泌学会学術集会、東京、2011.11.25-26
9. 八子英司、吉田彩舟、加藤たか子、加藤幸雄. 立体構築によるラット胎仔下垂体の分化と血管形成の解析. 第38回日本神経内分泌学会学術集会、東京、2011.11.25-26
10. 三ッ石英生、加藤たか子、加藤幸雄. 下垂体由来株化細胞 TtT/GF はABC トランスポーターによる排出能を持つ. 第38回日本神経内分泌学会学術集会、東京、2011.11.25-26
11. 高橋千果、蔡立義、加藤たか子、加藤幸

雄、小野昌美、和泉俊一郎. ヒト末梢血細胞における性ホルモン受容体発現の性差について. 第38回日本神経内分泌学会学術集会、東京、2011. 11. 25-26

(2) 研究分担者
なし

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

<シンポジウム (招待講演) >

1. 加藤 幸雄・加藤 たか子. 下垂体の発生・分化と再生に係わる転写因子ネットワーク. シンポジウム「下垂体前葉の細胞分化機構の新展開」日本下垂体研究会第26回学術集会案内、2011. 8. 25-27, 倉敷市
2. 大砂 まるみ・加藤幸雄. 佐野メモリアルシンポジウム. Differentiation capacity of Folliculo-stellate cells. 第15回日本内分泌病理学会学術総会, 東京、2011. 11. 24-25
3. 吉田彩舟、加藤幸雄. ホメオドメイン型転写因子 PROP1 と PRX は下垂体の発生・分化と再生を担っている. 第89回日本生理学会大会、松本、2012. 3. 29-31

2011年以前は、演題数のみを記す.

2010年 18件
2009年 18件
2008年 17件
2007年 30件
2006年 16件

<受賞>

1. 日本下垂体研究会優秀発表賞. 陳黙. ラット成体下垂体における CAR 陽性細胞の局在様式. 第26回日本下垂体研究会、岡山、2011年8月25日-27日
2. 日本神経内分泌学会若手研究奨励賞. 大砂まるみ. ラット下垂体前葉濾胞星状細胞の一部はホルモン産生細胞へと分化する. 第38回日本神経内分泌学会学術集会、東京、2011年11月25日-26日

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