

令和元年6月2日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18818

研究課題名(和文)下垂体に潜り込み組織幹細胞として機能する神経堤由来細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of neural crest-derived cells in pituitary development

研究代表者

吉田 彩舟 (YOSHIDA, SAISHU)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40772744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体前葉は外胚葉に由来すると考えられてきた内分泌器官である。本研究では、第四の胚葉として注目を集める神経堤細胞が下垂体前葉の起源の一部を構成する可能性を検証した。具体的には、神経堤細胞の運命追跡が可能な遺伝子改変マウス(P0-Cre/EGFP)の下垂体を組織化学的に解析し、下垂体の発生、分化と神経堤細胞の関係を検証した。その結果、5種類の下垂体ホルモン産生細胞、ならびに幹細胞に関して、それぞれの約10%が神経堤由来細胞であることを見出した。この結果から、下垂体前葉の起源はこれまで考えられてきた外胚葉だけでなく、その一部を神経堤由来細胞が構成するという新知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、これまで外胚葉由来と考えられてきた下垂体前葉に関して、神経堤細胞がその起源の一部を構成することを見出した。同一のホルモン産生細胞種の中に、異なる起源の細胞が存在することが、下垂体の機能維持や腫瘍化に対して、どのような意義を有するのかが今後の重要な課題である。こうした知見は、脳腫瘍の約17%を占める下垂体腫瘍の発生機序に対する新知見に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The anterior lobe of the pituitary gland is a key endocrine organ which is believed to derive from the ectoderm. In this study, we attempt to clarify the role of neural crest cells (NCCs) in pituitary development using P0-Cre/EGFP reporter mice. Fate tracing of NCCs demonstrated that NCCs differentiate into all types of pituitary hormone-producing cells as well as pituitary stem/progeny cells. These results showed that NCCs contribute to pituitary organogenesis.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体 神経堤細胞 幹細胞 発生 分化

## 1. 研究開始当初の背景

脳の直下に存在する下垂体前葉は、5種類のホルモン産生細胞を有する重要な内分泌器官である。下垂体前葉の組織発生に関しては、外胚葉由来であると理解されている。一方で、下垂体前葉のプラコードと位置関係や発生様式が類似する嗅上皮では、外胚葉以外に神経堤細胞がその組織発生に関与していることが知られている。神経堤細胞は、神経管形成時に発生する多分化能を有した細胞であり、発生過程の各組織へ遊走、定着し、多種の組織へと分化する。下垂体においては、2001年に器官培養を用いた解析により、下垂体の外部から侵入する細胞が存在することを示唆する報告があるが、神経堤細胞の関与は不明である<sup>1)</sup>。これらの知見から、下垂体前葉の形成に、外胚葉だけでなく神経堤細胞が関与している可能性が推察できる。<sup>1) Kouki et al., Development (2001)</sup>

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで外胚葉由来と考えられてきた下垂体前葉に関して、神経堤細胞がその起源の一部を構成する可能性を、動物個体レベルで検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究の主要な材料として、神経堤細胞の運命追跡が可能な遺伝子改変マウス(以下、P0-Cre/EGFPマウス)を用いた。本マウスを用いることで、一度でもP0遺伝子を発現した神経堤細胞を蛍光タンパク質EGFPで標識、追跡することが可能である。P0-Cre/EGFPマウスの成体ならびに胎仔、またはラットの成体ならびに胎仔を材料に、免疫組織化学的解析を実施した。特に、(1)成体下垂体における神経堤由来細胞の有無、(2)各種ホルモン産生細胞における神経堤由来細胞の頻度、(3)下垂体発生過程における神経堤由来細胞の侵入時期と経路、(4)下垂体内に侵入する神経堤由来細胞の細胞系譜同定、また、(5)P0遺伝子以外の神経堤細胞マーカーを発現する細胞の存在、に関して解析した。

## 4. 研究成果

### (1, 2)成体下垂体における神経堤由来細胞の存在有無とその細胞構成

はじめに、成体のP0-Cre/EGFPマウス下垂体を用いて、神経堤由来細胞が下垂体前葉内に存在しているかを検証した。その結果、下垂体前葉組織内に、EGFP陽性の神経堤由来細胞が存在することを確認した。このことから、下垂体前葉の起源はこれまで考えられてきた外胚葉だけでなく、その一部を神経堤由来細胞が構成するという新知見が得られた。次に下垂体前葉を構成するホルモン産生細胞(最終分化細胞)ならびに幹・前駆細胞における、神経堤由来細胞の割合を解析した。各種抗ホルモン抗体ならびに幹・前駆細胞マーカー(SOX2)と、EGFPの多重免疫染色を行った結果、5種類の下垂体ホルモン産生細胞、ならびに幹・前駆細胞に関して、それぞれ約10%が神経堤由来細胞であることを見出した(図1)。

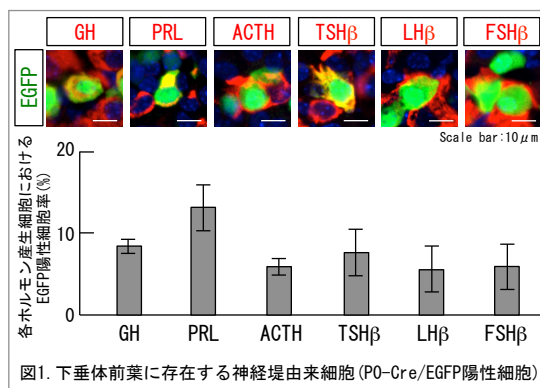


図1. 下垂体前葉に存在する神経堤由来細胞(P0-Cre/EGFP陽性細胞)

### (3)下垂体発生過程における神経堤由来細胞の侵入時期と経路

次に、これら神経堤由来細胞が、発生過程のどの時期に下垂体内へ侵入してくるのかをP0-Cre/EGFPマウスの胎仔を用いて検証した。その結果、神経堤由来細胞は少なくとも2回に分け、下垂体内に侵入していることを確認した。1度目は、下垂体発生の初期(マウス E9.5)に陥入する口腔上皮の細胞として侵入していた。また、2度目は、下垂体発生の中期(マウス E14.5前後)に、Atwell's recess から下垂体内へ侵入することを見出した。

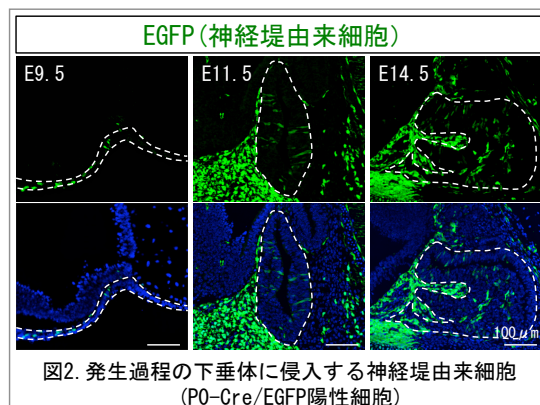


図2. 発生過程の下垂体に侵入する神経堤由来細胞(P0-Cre/EGFP陽性細胞)

#### (4)下垂体内に侵入する神経堤由来細胞の細胞系譜同定

さらに、それぞれの時期に侵入する EGFP 陽性細胞の性質を、各種抗体を用いた多重免疫染色で検証した。その結果、1 度目 (E9.5 頃) に下垂体内へ侵入する EGFP 陽性細胞は、幹・前駆細胞マーカーである SOX2 陽性の未分化細胞として侵入していた。一方で、2 度目 (E14.5 頃) に侵入する EGFP 陽性細胞は、血管系を構成する細胞であるペリサイトマーカー NG2 陽性細胞として侵入していた。これらの結果から、神経堤細胞は下垂体発生過程において、時空間的に少なくとも 2 回に分けて下垂体内へ侵入しており、また、異なる細胞種として、下垂体内に定着していることが明らかとなった。

#### (5) P0 以外の神経堤細胞マーカーを発現する細胞の存在

神経堤細胞は P0 遺伝子が普遍的なマーカー遺伝子ではなく、その他にも複数の特徴的な遺伝子が報告されている。本研究ではその中でも、SOX10 に関し、ラット下垂体の組織を用いた免疫組織化学的解析を実施した。その結果、SOX10 陽性細胞は、発生後期または出生後に、下垂体後葉から侵入し、中葉を経由しながら前葉部へ移動することを推察させる観察結果が得られた。この結果から、P0 系譜の神経堤由来細胞以外にも、別系譜の神経堤由来細胞が、時空間的に異なるパターンで下垂体に侵入している可能性を見出した。

以上の解析結果から、これまで外胚葉由来と考えられてきた下垂体前葉に関して、神経堤細胞がその起源の一部を構成することを見出した。本研究から、下垂体に存在する各種ホルモン産生細胞ならびに未分化細胞は、それぞれ外胚葉由来 (約 90%) と神経堤由来 (約 10%) から構成されていることが明らかになった。同一細胞種に異なる起源が存在することが、下垂体の機能維持において、どのような意義をもつのか興味深い課題である。特に、成体下垂体のホメオスタシスに寄与する幹・前駆細胞に関して、その多様な起源と生理機能に関し解析することが今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1. **Yoshida S**, Fujiwara K, Inoue T, Sasaki E, Kametani Y, Takekoshi S, Inoshita N, Kato T, Kato Y. “Localization of SOX2-positive stem/progenitor cells in the anterior lobe of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) pituitary.” *J Reprod Dev.* 64: 417-422 (2018). 査読あり. DOI: 10.1262/jrd.2018-043.
2. **Yoshida S**, Nishimura N, Yurino H, Kobayashi M, Horiguchi K, Yano K, Hashimoto SI, Kato T, Kato Y. “Differentiation capacities of PS-clusters, adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchymal-niche, of the rat anterior lobe.” *PLOS ONE* 13: e0196029 (2018). 査読あり. DOI: 10.1371/journal.pone.0196029.
3. **Yoshida S**, Fujiwara K, Nishihara H, Kato T, Yashiro T, Kato Y. “Retinoic acid signalling is a candidate regulator of the expression of pituitary-specific transcription factor *Prop1* in the developing rodent pituitary.” *J Neuroendocrinol.* 30:e12570 (2018). 査読あり. DOI: 10.1111/jne.12570.
4. Ueharu H, **Yoshida S**, Kanno N, Horiguchi K, Nishimura N, Kato T, Kato Y. “SOX10-positive cells emerge in the rat pituitary gland during late embryogenesis and start to express S100B.” *Cell and Tissue Res.* 372: 77-90 (2017). 査読あり. DOI: doi: 10.1007/s00441-017-2724-7.
5. **Yoshida S**, Kato T, Kanno N, Nishimura N, Nishihara H, Horiguchi K, Kato Y. “Cell type-specific localization of Ephs pairing with ephrin-B2 in the rat postnatal pituitary gland.” *Cell and Tissue Res.* 370: 99-112 (2017). 査読あり. DOI: 10.1007/s00441-017-2646-4.

6. Ueharu H, **Yoshida S**, Kikkawa T, Kanno N, Higuchi M, Kato T, Osumi N, Kato Y “Gene tracing analysis reveals the contribution of neural crest-derived cells in pituitary development.” *Journal of anatomy* 230: 373-380 (2017). 査読あり. DOI: 10.1111/joa.12572.
7. **Yoshida S**, Nishimura N, Ueharu H, Kanno N, Higuchi M, Horiguchi K, Kato T, Kato K. “Isolation of adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchyma of the rat anterior lobe.” *Stem Cell Research*, 22: 318-329 (2016). 査読あり. DOI: 10.1016/j.scr.2016.08.016.

そのほか共著論文 12 報 (すべて査読あり)

[学会発表] (計 37 件)

1. **吉田彩舟**、藤原研、西原大翔、堀口幸太郎、加藤たか子、屋代隆、加藤幸雄. 「下垂体特異的転写因子 *Prop1* の発現はレチノイン酸による制御を受ける」、第 30 回日本下垂体研究会学術集会、2018 年 8 月、高知
2. **吉田彩舟**. 「下垂体の組織幹・前駆細胞の多様性」、第 44 回 日本神経内分泌学会学術集会 (シンポジウム講演)、2017 年 10 月、神奈川
3. **吉田彩舟**、加藤たか子、加藤幸雄. 「成体下垂体における組織幹細胞の解析 (Analysis of tissue stem/progenitor cells in the adult pituitary)」、日本動物学会第 88 回大会 (シンポジウム講演)、2017 年 9 月、富山
4. **S Yoshida**, H Yurino, M Kabayashi, N Nishinura, N Kanno, K Yano, SI Hashimoto, T Kato, Y Kato. “Analysis of the differentiation capacity of adult stem/progenitor cells in the parenchymal-niche of the rodent pituitary gland.” *International Society for Stem Cell Research 2017 Annual meeting*, 2017 年 6 月, Boston, USA
5. **吉田彩舟**、加藤たか子、加藤幸雄. 「成体下垂体に存在する幹・前駆細胞ニッチの単離と制御機構の解析」、第 89 回日本内分泌学会 (シンポジウム講演)、2016 年 4 月、京都

その他、筆頭発表 10 件、共同発表 22 件

[図書] (計 0 件)

[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：  
 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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※ 科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。