

機関番号：36301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591104

研究課題名（和文） 神経堤細胞特異的プレセニン1欠損による成長ホルモン分泌不全症モデル動物の樹立

研究課題名（英文） Restricted growth and insulin-like growth factor-1 deficiency in mice lacking presenilin-1 in the neural crest cell lineage

研究代表者

中島 光業（NAKAJIMA MITSUNARI）

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：70311404

研究成果の概要（和文）：プレセニン1（PS1）遺伝子の欠損を神経堤由来の組織に限定したノックアウトマウス（cKO）を作製し、その表現型を組織学を中心に解析して、PS1の機能解明を試みた。その結果、PS1は下垂体後葉や視床下部での働きを介して間接的に、下垂体前葉のGH陽性細胞の成熟・維持に貢献することが示唆された。また、作製したcKOは、下垂体低形成を伴う成長ホルモン分泌不全症（下垂体性小人症）のモデル動物であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Presenilin-1 (PS1) is a transmembrane protein that is in many cases responsible for the development of early-onset familial Alzheimer's disease. PS1 is essential for neurogenesis, somitogenesis, angiogenesis, and cardiac morphogenesis. We report here that PS1 is also required for maturation and/or maintenance of the pituitary gland. We generated PS1-conditional knockout (PS1-cKO) mice by crossing floxed PS1 and Wnt1-cre mice, in which PS1 was lacking in the neural crest-derived cell lineage. Although the PS1-cKO mice exhibited no obvious phenotypic abnormalities for several days after birth, reduced body weight in the mutant was evident by the age of 3 to 5 weeks. Pituitary weight and serum insulin-like growth factor (IGF)-1 level were also reduced in the mutant. Histologic analysis revealed severe atrophy of the cytosol in the anterior and intermediate pituitary lobes of the mutant. Immunohistochemistry did not reveal clear differences in the expression levels of thyroid-stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone, or prolactin in the mutant pituitary. In contrast, growth hormone expression levels were reduced in the anterior lobe of the mutant. PS1 was defective in the posterior lobe, but not the anterior or intermediate lobes, in the mutant pituitary. These findings suggest that PS1 indirectly mediates the development and/or maintenance of the anterior and intermediate lobes in the pituitary gland via actions in other regions, such as the posterior lobe.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：プレセニン1、アルツハイマー病、神経堤、下垂体、成長ホルモン

### 1. 研究開始当初の背景

プレセニン1 (PS1) は、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として発見された。PS1 の生化学的な機能に関しては、アミロイド前駆体蛋白質やNotch等のI型膜蛋白質のプロセッシングにおいて重要な働きをすることが明らかにされている。一方PS1の生物学的機能に関しては、これまでに全身的にPS1を欠損させたノックアウトマウス(KO)の病理学的解析を通して、神経発生過程や体節形成過程への関与が報告されてきた。しかし、このKOは出生前後に死亡するため、生後におけるPS1の機能については十分に解析がなされていなかった。そこで本研究では、PS1の欠損を神経堤由来の組織に限定したKO(コンディショナルKO:cKO)を作製し、その表現型を組織学を中心に解析を行い、生後におけるPS1の機能解明を試みた。

### 2. 研究の目的

下垂体形成においてPS1が必須の働きをすることを明らかにすると同時に、その過程で作製した神経堤細胞特異的プレセニン1欠損マウス(cKO)が下垂体低形成を伴う成長ホルモン分泌不全症(下垂体性小人症)のモデル動物である可能性について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

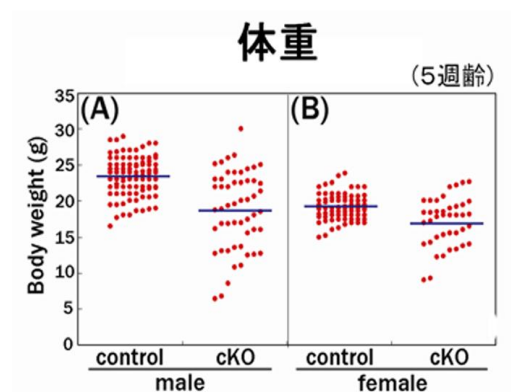
PS1 floxed マウス (Yu et al., 2001) と Wnt1-cre マウス (Danielian et al., 1998) を交配して、神経堤細胞特異的にPS1を欠損するcKOを作製した。組織学的解析には、H E染色と免疫組織染色を用いた。PS1遺伝子欠損部位の解析では、R26Rレポーターマウス (Mao et al., 1999) と Wnt1-cre マウスを交配したマウスを用い X-gal 染色を行った。血中IGF-I濃度の測定には、R&D Systems社のIGF-I ELISAキットを用いた。

### 4. 研究成果

作製した神経堤細胞特異的PS1欠損マウスは、出生後数日の間何ら異常を示さなかったが、3週頃までに低体重・低身長を示す個体が50%程度の頻度で認められた(図1)。成長ホルモン(GH)分泌不全症との関連性を探る目的で血中GH濃度の測定を試みたが、対照を含めて検出限界以下であった。しかし、GHの下流で発現制御を受けるIGF-Iの血中濃度を測定したところ、低体重・低身長のPS1欠損マウスではIGF-Iが対照マウスに比べ低下していた(図2)。また、低体重・低身長のPS1欠損マウスより下垂体を摘出したところ、前葉と中間葉で特異的に低形成が認められ(図3)、前葉と中間葉の

構成細胞の細胞体部分は対照マウスに比べて明らかに萎縮していた(図4)。一方、後葉部分は対照マウスとの違いは認められなかった。

図1



さらに、下垂体を免疫組織染色法で調べると、低体重・低身長のPS1欠損マウスでは前葉のGHの発現は低下していたが、ACTH、TSH、PRLでは違いがないことが明らかになった(図5)。次に、脳内でのPS1欠損部位を特定するために、PS1タンパク質に対する抗体を用いて下垂体の免疫組織化学を行った。同時に、R26Rレポーターマウスを用いて、PS1遺伝子欠損部位の特定をX-gal染色で行った。結果は予想に反して、変異マウスでは後葉特異的にPS1の遺伝子欠損とタンパク質欠損が確認された(図6)。

図2

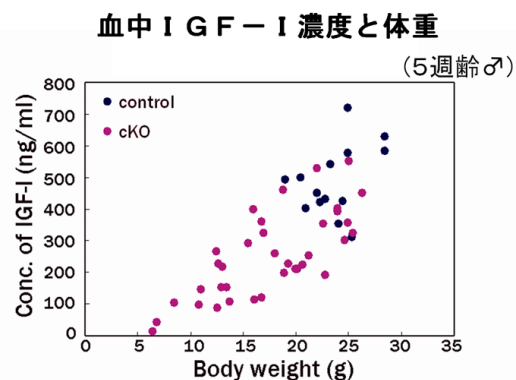


図3  
下垂体

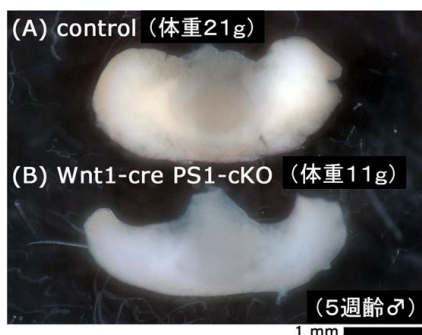


図4  
下垂体のH E染色

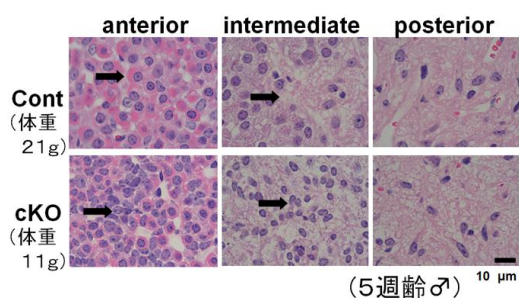


図5

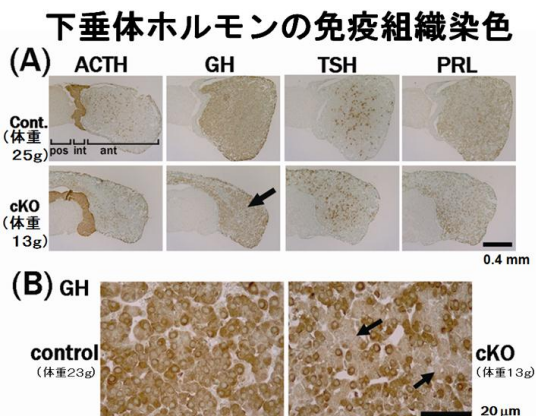
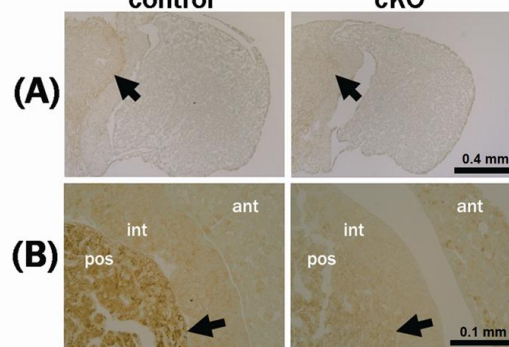


図6

下垂体のPS1免疫組織染色



以上より、PS1は下垂体後葉や視床下部での働きを介して間接的に、下垂体前葉のGH陽性細胞の成熟維持に必須であることが示唆された。また、本研究で作製したcKOは、下垂体低形成を伴う成長ホルモン分泌不全症（下垂体性小人症）のモデル動物であることが示唆された。

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5件）

- ① Nakajima M, Matsuda K, Miyauchi N, Fukunaga Y, Watanabe S, Okuyama S, Pérez J, Fernández-Llebrez P, Shen J, Furukawa Y. Hydrocephalus and abnormal subcommissural organ in mice lacking presenilin-1 in Wnt1 cell lineages. Brain Res. 査読有 1382 巻 2011、275-281.
- ② Okada M, Makino A, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa S, Furukawa Y. Estrogen Stimulates Proliferation and Differentiation of Neural Stem/Progenitor Cells through Different Signal Transduction Pathways. Int J Mol Sci. 査読有 11 巻 2010、4114-4123.
- ③ Nakajima M, Watanabe S, Okuyama S, Shen J, Furukawa Y. Restricted growth and insulin-like growth factor-1 deficiency in mice lacking

presenilin-1 in the neural crest cell lineage. Int J Dev Neurosci. 査読有 27 巻 2009, 837-843.

- ④ Furukawa Y, Urano T, Minamimura M, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa S. 4-Methylcatechol-induced heme oxygenase-1 exerts a protective effect against oxidative stress in cultured neural stem/progenitor cells via PI3 kinase/Akt pathway. Biomed Res. 査読有 31 巻 2010, 45-52.

- ⑤ Okada M, Murase K, Makino A, Nakajima M, Kaku T, Furukawa S, Furukawa Y. Effects of estrogens on proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells. Biomed Res. 査読有 29 巻 2008, 163-170.

[学会発表] (計 3 件)

① 古川美子、浦野友美、南村美里、中島光業、奥山聡、古川昭栄 4-メチルカテコールはHO-1 発現誘導により神経幹/前駆細胞を酸化ストレスから保護する 日本薬学会 2010 年 3 月 30 日 岡山市

② 中島光業、奥山聡、渡辺苑、古川美子 下垂体成長ホルモン産生細胞の成熟・維持におけるプレセニリン1の働き 日本薬理学会西南部会 2009 年 11 月 27 日 松山市

③ 中島光業、渡辺苑、加来鉄平、古川美子 神経堤細胞特異的プレセニリン1欠損による成長ホルモン分泌不全症モデルマウスの作製 日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 9-12 日 神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等:

<http://ghp01.matsuyama-u.ac.jp/~yakugaku/laboratory/labopharmacology.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 光業 (NAKAJIMA MITSUNARI)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号: 70311404

### (2) 研究分担者

古川美子 (FURUKAWA YOSHIKO)  
松山大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20219108

奥山 聡 (OKUYAMA SATOSHI)  
松山大学・薬学部・助教  
研究者番号: 40550380