

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20591711
研究課題名(和文) 下垂体幹細胞の分化運命決定機構の解析および下垂体再生医療への応用
研究課題名(英文) Research on the differentiation mechanism of pituitary stem cells and its application to regeneration medicine
研究代表者
北条 雅人 (HOJO MASATO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：60372588

研究成果の概要(和文)：Hes 遺伝子は、マウス下垂体の未分化な前駆細胞に発現しており、下垂体の前駆細胞を未分化な状態に維持するために必要と考えられる。下垂体発生において、腺性下垂体の発生では、Hes 遺伝子が前葉細胞と中葉細胞の分化運命決定を制御していることを示した。また、Hes 遺伝子は、後葉の前駆細胞の維持と分化制御にも必須であることも示した。以上のように、Hes 遺伝子が、下垂体前駆細胞の分化制御を行っていることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Hes genes are expressed by immature progenitor cells, but not differentiated hormonal cells in the developing mouse pituitary gland. Hes genes are essential for the maintenance of progenitors during the pituitary development. Hes genes control intermediate versus anterior lobe specification during the adenohypophysis development. Hes genes are also essential for the formation of neurohypophysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：下垂体、Hes1、Hes5、マウス、発生、前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

下垂体腫瘍は原発性脳腫瘍の約 2 割を占め、

その治療は脳神経外科領域において重要な分野といえる。本疾患に対しては放射線療法および薬物療法が発達しつつあるものの、大

部分は手術による摘出が治療の第一選択となる。下垂体を構成する細胞は、生命を維持するために不可欠な各種ホルモンを産生しており、本疾患の外科的治療において問題となるのが術後の下垂体機能不全である。この場合、ホルモンの補償療法が生涯にわたって必要となり、本疾患の治療において極めて重要な問題といえる。腫瘍以外にも、先天性、炎症による二次性、自己免疫性など様々な原因で下垂体機能不全をきたすことが知られている。現在では不足したホルモンを内服薬、注射薬などで補充しているが、生涯補充する必要があり、十分満足いく治療法とは言い難い。以上から、下垂体機能不全に対するホルモン産生細胞の再生医療の開発の意義は極めて高いと考えられるが、これに関する研究報告は皆無であった。

再生医療を実現するにあたって、幹細胞の制御機構の解析が基礎的研究として不可欠である。しかしながら、下垂体発生においては、幹細胞の制御機構の解析に関する研究は他分野に比べると遅れている。Notch-Hes 経路は、様々な器官において、幹細胞を未分化状態に維持する働きと、各種細胞へと分化する際に運命決定を制御する働きとが知られている。本機構は、中枢神経系、免疫系、造血系などで研究が進んでおり、再生医療の鍵として着目されている。内分泌系では膵臓の発生において Notch-Hes 経路が重要な機能を果たしていることが報告されているが、下垂体発生においては Notch-Hes 経路に関する研究報告は皆無であった。我々は、すでに前年度までに、Notch の下流因子の Hes1 および Hes5 の下垂体特異的ダブルノックアウトマウスを作成している。

2. 研究の目的

我々は、下垂体再生医療の基礎となる研究として、下垂体の発生において Notch-Hes 経路が下垂体幹細胞の維持および分化運命決定を制御していることを証明してきた（萌芽研究[平成 17~19 年度]）。本研究では、萌芽研究での成果を発展させ、下垂体幹細胞の制御機構の解析を続け、下垂体再生医療の基礎を築くべく、下垂体幹細胞の分化機構の解明を図るのが目的である。

3. 研究の方法

Notch の下流因子の Hes1、Hes5、Hesr1 の下垂体発生における機能に関して、ノックアウトマウスを用いて解析する。Hes1 と Hes5、Hes1 と Hesr1 とは互いに相補的に働くことが知られており、ダブルノックアウトマウスの解析が必要となる。しかし、これらは胎生早期に致死的であり、下垂体特異的コンディショナル・ダブルノックアウトマウスの解析が必要となる。

まず、Hes1 および Hes5 の下垂体特異的コンディショナル・ダブルノックアウトマウスを作成・解析する。さらに、新たに Hesr1 の下垂体発生における機能解析を行う。予備実験で Hesr1 は胎児下垂体に強く発現していることを確認できている。さらに、Hes1 ノックアウトマウスの下垂体では Hesr1 の発現は著しく上昇する事も確認できており、相補的に機能していると予想される。この働きは、Hes5 よりも極めて強力であると予測される。Hesr1 のシングルノックアウトマウスはすでに作成できており、解析を開始したが、下垂体のフェノタイプは微細であった。よって、ダブルノックアウトマウスの解析が必要であるが、胎生早期に致死的であることが予

想され、今までに確立してきたシステムを用いて、Hes1 と Hesr1 の下垂体特異的コンディショナル・ダブルノックアウトマウスを作成・解析する予定である。これは、Cre-LoxP システムを用いており、Emx1-Cre マウスを用いることによって、胎生後期まで Hes1、Hesr1 の両因子をノックアウトした状態で下垂体を解析することが可能となる。初年度に、まず必要なマウス (Floxed Hes1;Hesr1 マウス) を作成する。

続いて、Floxed Hes1;Hesr1 マウスと Emx1-Cre マウスとのかけあわせで、Hes1 と Hesr1 の下垂体特異的コンディショナル・ダブルノックアウトマウスを得ることができる。このマウスの E12.5、E14.5、E17.5 の胎児の下垂体の解析を行う。各前葉ホルモンマーカ、PC2(中葉のマーカ)、Ki67 などの抗体での免疫染色、BrdU の取り込み実験、TUNEL 法等で解析する。さらに、Hes1 の下流因子の NeuroD, Mash1, Math3 の発現を in situ hybridization 法にて解析する。また、上流因子の Notch および Dll, Jagged に関しても in situ hybridization 法にて解析する。

4. 研究成果

まず、マウス胎児下垂体での Hes1,Hes5 の発現パターンを詳細に検討したところ、未分化な前駆細胞で相補的に発現していることが分かった。

続いて、ノックアウトマウスの解析では、Hes1 と Hes5 の間脳下垂体特異的ダブルノックアウトマウスでは、下垂体前葉細胞の分化が促進されていた。同マウスでは、下垂体中葉細胞は消失し、全て下垂体前葉細胞へと分

化していた。このことから、Hes1 と Hes5 は相補的に機能し、下垂体前駆細胞を制御していることが示された。さらに、Hes1 と Hes5 は、下垂体前葉細胞を中葉と前葉とに分化運命決定していることが示された。

さらに、同ノックアウトマウスでは、下垂体後葉が消失していることが示された。さらに詳細に解析すると、下垂体後葉の前駆細胞は、後葉が陥入後葉して形成する際に、その基部に存在することが示された。Hes1 と Hes5 は、下垂体後葉の前駆細胞も制御していることが示された。

以上より、Hes 遺伝子が、下垂体前駆細胞の分化を制御していることが示された。

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 2 件)

- ① 後藤正憲、北条雅人ら、bHLH 型転写因子 Hes による下垂体後葉発生機構の解析、日本内分泌学会雑誌、査読無し、86 巻 supplement、2010、16-17
- ② 北条雅人、Notch-Hes pathway 下垂体発生における Hes 因子の働き、脳神経外科速報、査読無し、18 巻、2008 年、586-591

[学会発表] (計 3 件)

- ① 後藤正憲、北条雅人、bHLH 型転写因子 Hes による下垂体後葉発生機構の解析 (シンポジウム)、社団法人日本脳神経外科学会第 69 回学術総会、2010 年 10 月 28 日、福岡国際会議場 (福岡県)
- ② 後藤正憲、北条雅人、bHLH 型転写因子 Hes による下垂体後葉発生機構の解析、第 20 回日本間脳下垂体腫瘍学会、2010 年 2

月 19 日、兵庫医科大学平成記念会館（兵庫
県）

- ③ 北条雅人、下垂体発生における Hes 遺伝子
の機能解析、第 9 回日本分子脳神経外科学
会、2008 年 8 月 30 日、京都大学医学部芝
蘭会館（京都府）

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・講師
研究者番号：60372588

(2) 研究分担者

影山 龍一郎 (KAGEYAMA RYOICHIRO)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：80224369

(3) 連携研究者

橋本 信夫 (HASHIMOTO NOBUO)
国立循環器病研究センター・理事長
研究者番号：40135570