

平成 30 年 9 月 26 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292166

研究課題名(和文)下垂体は発生・分化と成熟後の機能維持をどのように行うのか

研究課題名(英文)Studies of performance for pituitary organogenesis and maintenance of function after tissue maturation

研究代表者

加藤 幸雄 (Kato, Yukio)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：30114177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：期間中に、以下の成果が得られた。下垂体前葉の幹・前駆細胞ニッチについて、特徴的な複数の因子の局在を明らかにした。二種のニッチのうち実質層を構成する細胞集団(塊)を酵素分散により単離することに成功し、その細胞塊の特性を解析し、培養条件によりホルモン産生細胞ならびに非ホルモン産生細胞へと分化する細胞を示した。膜抗原タンパク質CD9の抗体を使用し、幹・前駆細胞の分取を行い、その一部が血管内皮細胞様の分化をすることを明らかにした。第4の胚葉とされる神経堤細胞由来のP0タンパク質系譜とSOX10系譜の細胞が、それぞれ前葉と後葉から、胎仔期初期に外胚葉由来の下垂体に侵入することを初めて観察した。

研究成果の概要(英文)：The pituitary gland is a major endocrine organ for maintenance of vital functions. This project focuses on the characteristics of pituitary stem/progenitor cells and the roles on pituitary organogenesis and maintenance. Our studies have demonstrated following important results: 1) characteristic localizations of several specific factors, 2) isolation of one of two types of stem/progenitor cell niches, 3) demonstration of characteristic differentiation into hormone-producing and non-hormone-producing cells, 4) novel isolation of stem/progenitor cells by using anti-CD9 antibody and differentiation into vascular endothelial cell-like cells, 5) invasion of two types of the neural crest lineage cells into the anterior and posterior lobes of the pituitary gland, respectively.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体 幹細胞 生殖 分化 組織形成 転写因子 神経堤 血管形成

1. 研究開始当初の背景

脳の直下に位置する下垂体は、生体の機能維持に働く複数のホルモンを合成する主要な内分泌器官である。この組織の発生は、多数の転写因子の時空間的な発現を通じて制御されている。この組織形成過程と成熟後の組織では、存在する幹・前駆細胞が重要な役割を担っている。申請者らは、これまでに下垂体特異的転写因子 PROP1 や複数の特徴ある因子に着目して、この組織の幹・前駆細胞の特質と機能について研究を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究課題では、下垂体の幹・前駆細胞の特質を明らかにすること、その細胞の単離分化機序を調べることで、ある。また、これまでの蓄積した研究成果からは、外胚葉系譜とされる下垂体に、発生・分化過程において、血管系の細胞も含めて起源を異にする細胞群の存在が示唆されており、その解析も目的としている。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学：ラット胎仔および出生後の下垂体の組織切片を作成し、各種の因子の抗体で蛍光標識免疫組織化学を行った。

(2) 細胞塊の単離：ラット下垂体を酵素分散処理し、分散しきれない細胞塊を単離して、抽出して全 RNA を使った解析を行った。

(3) 細胞塊ならびに分画した細胞を使って、分化条件での培養を行い、培養後の細胞免疫染色ならびには遺伝子発現を分析した。

(4) 膜抗原タンパク質 CD9 の抗体を使って細

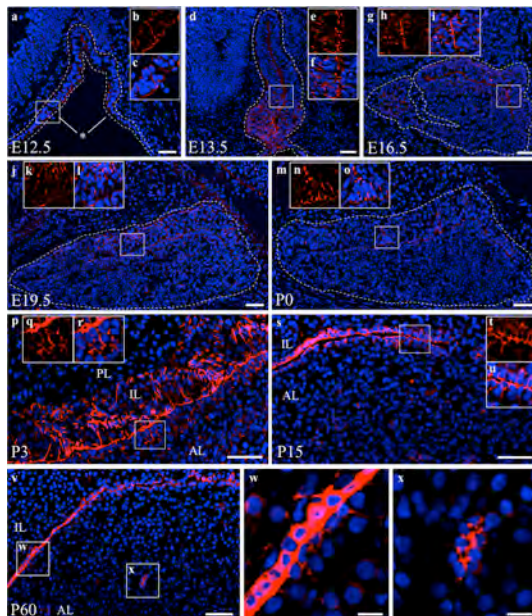


図 1. ラット胎仔期下垂体の ephrin-B2 の免疫組織化学。ephrin-B2 (赤) が主に前葉 (AL) と中葉 (IL) の接する細胞層と、中葉および前葉の実質層にも観察される。

胞分画を行った。

(5) ラットやマウスを用いて、下垂体内における神経堤細胞を、P0 タンパク質、SOX10 に対する抗体により解析した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学

ラット胎仔および出生後の下垂体の組織切片を作成し、転写因子 SOX2 や PROP1、その他、CAR (アデノウイルス-コクサッキーウイルス共通受容体)、ニューロネチン、エフリンとその受容体など各種の因子の抗体で蛍光標識免疫組織化学を行った。その結果、幹・前駆細胞に特異的な陽性シグナル反応が得られた。それらの結果では、幹・前駆細胞に特異な分子が存在すること、細胞間には特異で強固な結合様式があることが判った。図 1 にエフリン B2 の結果を示す。

(2) 細胞塊の単離

S100β 陽性を蛍光タンパク質で標識した遺伝子組換えラットの下垂体を使って、酵素により分散処理し、分散しきれない細胞塊を単離した。単離した細胞塊を、幹・前駆細胞マーカー SOX2 の抗体を使って調べると、全てが SOX2 陽性であった (図 2)。また、S100β につ

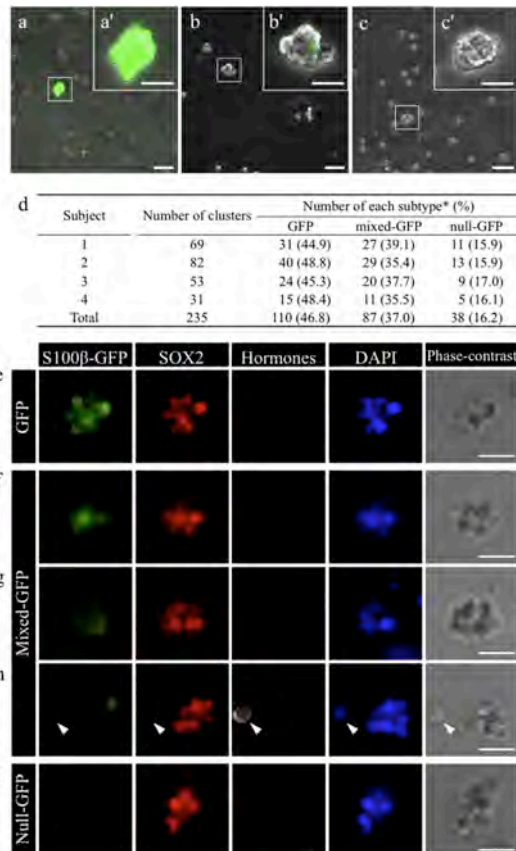


図 2. ラット下垂体を酵素処理で分散すると、S100β 陽性や陰性の細胞塊が存在する (a-d)。SOX2 の抗体を使って調べると、全てが SOX2 陽性であった (e-i)。

いては陽性のものと陰性のものが混在した。

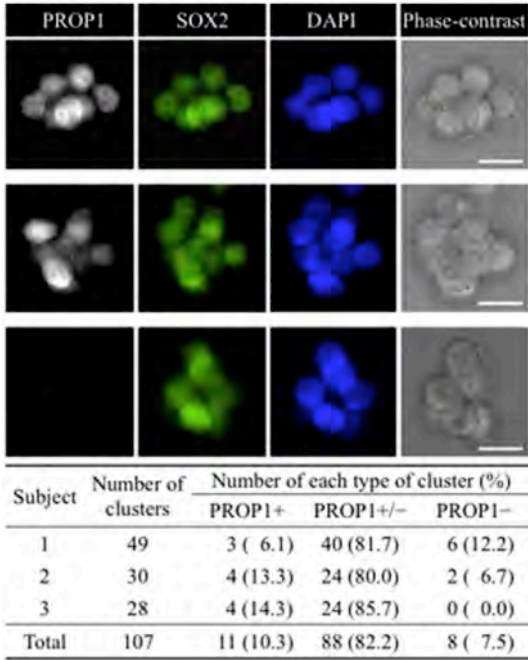


図3. ラット下垂体から分取した幹・前駆細胞塊は、全てが SOX2 陽性 (緑) であるが、下垂体特異的転写因子 PROP1 (白) では全てが陽性、一部が陰性、全てが陰性といったサブタイプがある。

さらに、下垂体特異的転写因子 PROP1 の抗体と SOX2 との二重染色を行うと、S100β 同様に、幾つかのタイプが存在した (図3)。

(3) 細胞塊の分析

単離した細胞塊を三次元培養の条件で培養

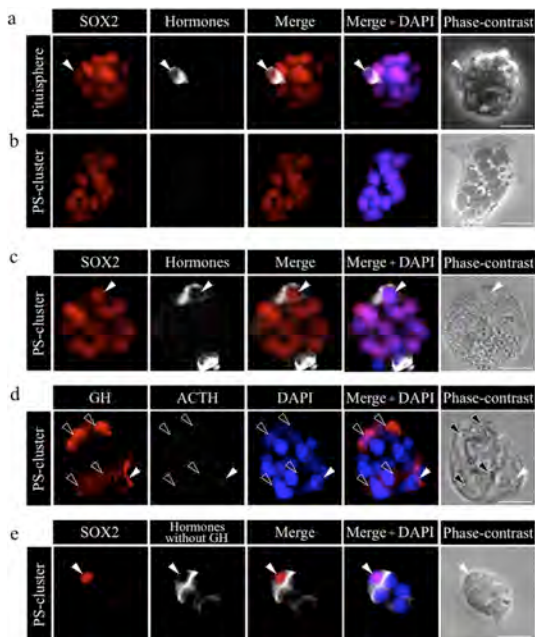


図4. 細胞塊の分析。単離した細胞塊を三次元培養で培養し、細胞免疫染色を行った。SOX2 陽性 (赤) 以外にホルモンないし成長ホルモン (白; 白矢頭) の細胞がある。白線矢頭は ACTH 陰性。

を継続し、その後、細胞免疫染色を行ってみると、一部の細胞がホルモン産生細胞 (少なくとも成長ホルモン産生細胞) に分化していた (図4)。

(4) CD9 の抗体を使った細胞分画

CD9 の抗体を使って幹・前駆細胞の分画を試みた。その結果、ほぼ CD9 陽性である幹・前駆細胞画分が得られた。

分画した細胞を骨形成因子 (BMP) 存在下で培養すると、図5のような細胞間のつながりができ、対照の培養結果と異なっていた。培養後の細胞免疫染色では、Isolectin B4 に陽性の細胞が観察され、血管内皮細胞様の細胞へと分化していることが示唆された。

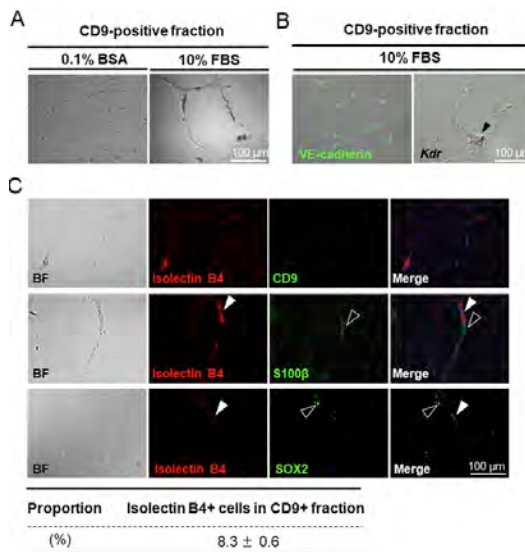


図5: 分画したラット下垂体前葉の CD9 陽性細胞は、血清 (FBS) の存在下では細胞間のネットワークを形成するようになり (A)、内皮細胞のマーカー V-cadherin 陽性であり (B)、内皮細胞と結合する Isolectin B4 に 8.3% が陽性であった (C)。

(5) 神経堤細胞の解析

ラットの下垂体にたいして、神経堤細胞のマーカーとされる SOX10 の抗体を使った免疫組織化学を行った。その結果は、出生直前から SOX10 陽性のシグナルが、下垂体後葉に観察された。日齢を追って調べてみるとその細胞は S100β 陽性ともなり、数を増していた (図6)。さらに中葉にも出現し、前葉にも移動していた。前葉では数は少ないものの、PROP1 にも陽性となり、多様な変化を見せた (図7)。

次に、やはり神経堤細胞マーカーである P0 タンパク質のプロモーターを使って P0 発現細胞を蛍光タンパク質で標識した P0-Cre マウスを使って、P0 系譜の細胞を解析した。その結果、下垂体の発生の初期の口腔上皮が陥入する時期の下垂体原基 (ラトケ嚢) に P0 系譜のシグナルが観察された (図8)。それらの細胞は、PROP1 を発現し下垂体幹・前駆細胞

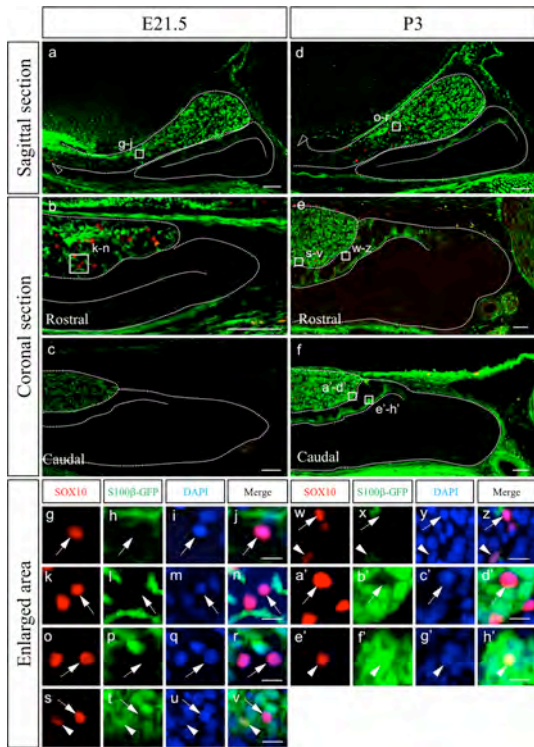


図6. 下垂体の発達過程での非ホルモン産生細胞・幹・未分化細胞の推移。PROP1、SOX2、S100 陽性細胞は、胎仔期から生後まで MCL や実質層 (Parenchyma) で存在場所を変えながら、下垂体の細胞を供給する幹細胞を担っている

様の性質を獲得していた (図9)。それらの細胞が、ホルモン産生細胞に分化することも確認され、神経堤由来のホルモン産生細胞は全体の5-10%を占めていた。原基が形成された以降に、再度 P0 系譜の細胞が侵入している事も観察され、それは血管形成に関わる細胞であることが示された。

(6) 研究成果の意義と考察

以上の結果から、以下のことが明らかとなった。それらは、①下垂体前葉に存在する二様のニッチはエフリンや CAR などの特徴的な膜タンパク質が存在して、その特異な構造が維

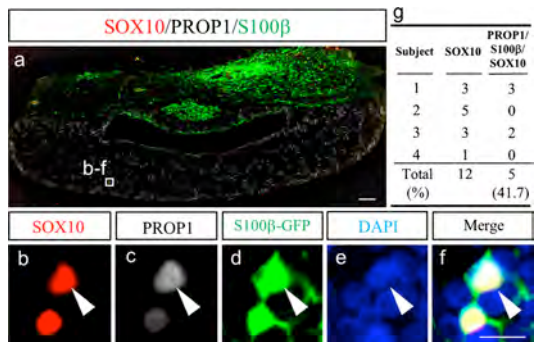


図7. ラット胎仔期下垂体の免疫組織化学。SOX10 陽性は、前葉で下垂体特異的転写因子 PROP1 (白) を発現する様に分化している。

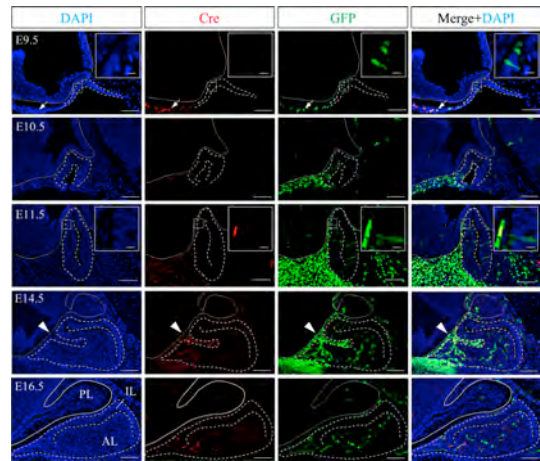


図8. マウス胎仔期下垂体の免疫組織化学。赤は神経提細胞を、緑は神経堤細胞のマーカーとなる P0 ミエリンタンパク質プロモーター依存的に蛍光タンパク質で標識された神経提系譜の細胞で、経時的に下垂体内に進入している。

持されていること、②そのうちの実質層を構成する細胞集団 (塊) を単離して分析すると、培養条件によって異なる細胞種へと分化できる細胞が存在すること、③膜抗原タンパク質 CD9 が幹・前駆細胞のマーカーとなり細胞分離のツールとなること、④その一部が血管内皮細胞様の分化をすること、⑤第4の胚葉と言われる神経堤細胞系譜の二種の細胞 (P0 タンパク質系譜と SOX10 系譜の細胞) が下垂体に侵入して一部が幹・前駆細胞として定着すると共に、ホルモン産生細胞や血管系の細胞の一部に分化していること、などである。

本研究の成果は、これまでの下垂体研究にとって新しい知見であり、下垂体の発生・分化とこの組織の機能維持機構に重要な情報を与えている。中でも、下垂体に起源を異にしたつも幹・前駆細胞の一部して存在しているという、神経堤細胞の存在を証明した成果は、この組織で発生する腫瘍や、生理状態に応じて適正なホルモン産生細胞数を変化させるといった、増殖異常や細胞供給などの機序の解

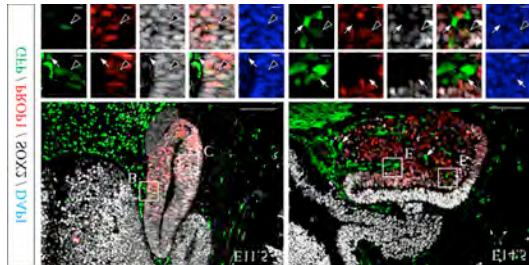


図9. 下垂体原基ラトケ囊の免疫組織化学。それぞれ神経堤細胞系譜 (緑)、PROP1 (赤)、SOX2 (白) を示す。下垂体に侵入した神経堤細胞が、未分化性 (SOX2 陽性) であるとともに、下垂体特異的転写因子 PROP1 を発現する様に分化している。

明に新たな突破口となると期待出来る。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計23編)

1. 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* 2018; DOI: 10.1111/jne.12570; .
2. 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 Tissue Res* 2017; 370: 99–112.
3. 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. *J Anat* 2017; 230: 373–380.
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 S100beta. *Cell Tissue Res* 2017; doi: 10.1007/s00441-017-2724-7.
5. Tsukada T, Yoshida S, Kito K, Fujiwara K, Yako H, Horiguchi K, Isowa Y, Yashiro T, Kato T, Kato Y. TGFbeta signaling reinforces pericyte properties of the non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF. *Cell Tissue Res* 2017; 371: 339-350.
6. Satou K, Mochimaru Y, Nakakura T, Kusada T, Negishi J, Musha S, Yoshimura N, Kato Y, Tomura H. Easy detection of hormone secretion from LbetaT2 cells by using Gaussia luciferase. *J Reprod Dev* 2017; 63: 199-204.
7. Ohta A, Tsunoda Y, Tamura Y, Iino K, Nishimura N, Nishihara H, Takanashi H, Yoshida S, Kato T, Kato Y. Construction and expression of vectors encoding biologically active rodent gonadotropins. *J Reprod Dev* 2017; 63: 605-609.
8. Nishihara H, Yoshida S, Kanno N, Nishimura N, Ueharu H, Ohgane J, Kato T, Kato Y. Involvement of DNA methylation in regulating rat Prop1 gene expression during pituitary organogenesis. *J Reprod Dev* 2017; 63: 37-44.
9. Higuchi M, Yoshida S, Kanno N, Mitsuishi H, Ueharu H, Chen M, Nishimura N, Kato T, Kato Y. Clump formation in mouse pituitary-derived non-endocrine cell line Tpit/F1 promotes differentiation into growth-hormone-producing cells. *Cell Tissue Res* 2017; 369: 353-368.
10. Yoshida S, Nishimura N, Ueharu H, Kanno N, Higuchi M, Horiguchi K, Kato T, Kato Y. Isolation of adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchyma of the rat anterior lobe. *Stem Cell Res* 2016; 17: 318-329.
11. Yoshida S, Kato T, Nishimura N, Kanno N, Chen M, Ueharu H, Nishihara H, Kato Y. Porcine LIM homeobox transcription factors, LHX2 and LHX3, and transcription of follicle-stimulating hormone subunit genes. *J Reprod Dev* 2016; 62: 241-248.
12. Yoshida S, Kato T, Kato Y. EMT involved in migration of stem/progenitor cells for pituitary development and regeneration. *J Clin Med* 2016; 5: 43.
13. Yoshida S, Kato T, Kato Y. Regulatory system for stem/progenitor cell niches in the adult rodent pituitary. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 75.
14. Nishimura N, Ueharu H, Shibuya S, Nishihara H, Yoshida S, Higuchi M, Kanno N, Horiguchi K, Kato T, Kato Y. Search for regulatory factors of pituitary-specific transcription factor PROP1 gene. *J Reprod Dev* 2016; 62: 93-102.
15. Moriyama R, Yamazaki T, Kato T, Kato Y. Long-chain unsaturated fatty acids reduce the transcriptional activity of the rat follicle-stimulating hormone β -subunit gene. *J Reprod Dev* 2016; 62: 195-199.
16. Kanno N, Higuchi M, Yoshida S, Yako H, Chen M, Ueharu H, Nishimura N, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y. Expression studies of Neuronatin in the prenatal and postnatal rat pituitary. *Cell Tissue Res* 2016; 364: 273-288.
17. Horiguchi K, Yako H, Yoshida S, Fujiwara K, Tsukada T, Kanno N, Ueharu H, Nishihara H, Kato T, Yashiro T, Kato Y. S100 β -positive cells of mesenchymal origin reside in the anterior lobe of the embryonic pituitary gland. *PLoS One* 2016; 11: e0163981.
18. Horiguchi K, Nakakura T, Yoshida S, Tsukada T, Kanno N, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Kato T, Kato Y. Identification of THY1 as a novel thyrotrope marker and THY1 antibody-mediated thyrotrope isolation in the rat anterior pituitary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 480: 273-279.
19. Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yoshida S, Higuchi M, Tatenos K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y. CXCL10/CXCR3 signaling mediates inhibitory action by Interferon-Gamma on CRF-stimulated adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release. *Cell Tissue Res* 2016; 364: 395-404.

20. Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yako H, Tateno K, Hasegawa R, Takegami S, Osako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y. Expression of Slug in S100 β protein-positive cells of the postnatal developing rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res* 2016; 363: 513-524.
21. Chen M, Cai L-Y, Kato T, Kato Y. Ectopic Expression of Human Herpesvirus 1 Thymidine Kinase Induces Male Infertility. In: Ongradi J, ed. *Herpesviridae* 2016: 75-101.
22. Yoshida S, Kato T, Chen M, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Kato Y. Localization of juxtacrine factor ephrin-B2 in pituitary stem/progenitor cell niches throughout life. *Cell Tissue Res* 2015; 359: 755-766.
23. Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T, Kato Y. PRRX1- and PRRX2-positive mesenchymal stem/pro- genitor cells are involved in vasculogenesis during rat embryonic pituitary development. *Cell Tissue Res* 2015; 361: 557-565.

[研究ノート]

1. 加藤幸雄, 上春浩貴, 後藤哲平, 吉田彩舟, 加藤たか子, 平林真澄. レコンビナーゼ CreERT2 導入BAC クローンによって作製したトランスジェニックラットの組織化学・細胞生物学的研究. 明治大学農学部研究報告 2017; 67: 69-75.

<国際学会> (計 10 件)

2017年度 3 件
2016年度 4 件
2015年度 3 件
2014年度 3 件

<国内学会> (計 5 4 件)

2017年度 8 件
2016年度 10 件
2015年度 23 件
2014年度 3 件

[その他]

なし

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

(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・知財戦略機構・研究推進員
研究者番号: 90445859