

分担課題：生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの  
解明とその制御法の開発

分担者：加藤 幸雄

成果の概要

生殖内分泌の組織と機能形成を制御する分子プログラムの解明とその制御法の開発として展開した本分担課題では、以下の様な成果を得ることができた。1) 転写因子の機能と標的遺伝子との関係を解析し、レチノイン酸が下垂体特異的転写因子 PROP1 遺伝子の発現制御に関与すること、下垂体の新規転写因子 POU6F2 と kruppel 型転写因子 KLF6 のクローニングや機能解析、LIM-homeodomain 型転写因子や長鎖脂肪酸によるホルモン遺伝子の発現制御領域などを報告した。2) 下垂体の発生・分化に関しては、下垂体の新規転写因子として発見した PRRX1 と PRRX2 の幹・前駆細胞での解析、幹・前駆細胞に特異的に存在する複数の細胞間接着因子や分化過程に出現する Neuronatin の解析、などを行った。また、下垂体の起源に関して、外胚葉に由来する下垂体の胎仔期に、神経堤を初めとする起源を異にする細胞が侵入し、幹・前駆細胞やホルモン産生細胞の一部を占めるという、重要な発見をした。さらに、幹・前駆細胞の大半を占める S100 $\beta$  陽性細胞からのホルモン産生細胞の分化やホルモン分泌に関する成果も得られた。3) 下垂体の幹・前駆細胞の単離に成功し、その細胞生物学的な解析に取り組み、その特性を調べるとともに、培養条件を変えることで、ホルモン産生細胞や非ホルモン産生細胞への分化誘導に成功した。4) 遺伝子発現解析のデータベースやプロテオミックス解析を利用し

て、下垂体と性腺組織の発生・分化関連遺伝子の探索を行った。その結果、PROP1 遺伝子の発現制御には下垂体胎仔期の発生過程に出現する特徴的な転写因子 16 種が関与し、そのうちのいくつかは SOX2 と共役的に働き、PROP1 のメチル化によるエピジェネティクス制御ともクロストークする可能性を示唆した。一方、3 種の下垂体由来株化細胞の発現プロファイリング比較情報からは、それらの未分化度の違いとともに、増殖因子の刺激により、ホルモン産生細胞や血管形成に関わる細胞に分化誘導できることを示した。5) 精巣発現遺伝子プロファイル解析に基づき、精子形成異常原因遺伝子の同定とその作用機序の解析を行った。ヘルペスウイルス (HHV1) のチミジンキナーゼ (HHV1-TK) が生成するトランスジェニックラット (TG ラット) が呈する雄性不妊が、組み込んだ遺伝子 (HHV1-TK) 領域による異所性の発現であること、それは円形精子細胞で始まり伸長精子細胞への過程で精子形成に異常をきたすことを明らかにした。この不妊の機序は、HHV1 感染ヒト男性で同じことを引き起こすことが考えられ、ヒトの無精子症不妊患者の生検精巣を用いて解析し、初めて mRNA およびタンパク質レベルで、HHV1-TK の存在を確認でき、ヒトにおいて HHV1 感染を原因とする不妊の可能性を初めて指摘した。

以上の様に、下垂体の分化や組織形成、雄性不妊の解析から精子形成やウイルス感染による不妊の原因を分子レベルで解析することで、分化誘導や組織形成に関わる分子の一端を明らかにし、それらを標的とした制御の開発に繋がる知見を得ることができた。

## 研究成果

### 【1】転写因子の機能と標的遺伝子の解析

下垂体は、多数の転写因子の時空間的で階層的な発現を通じて発生・分化が進

行する。そこには、下垂体特異的転写因子 PROP1 を初めとして、優に 50 種を超える因子が介在している。それら転写因子間の調節機序の解明は、下垂体の機能やその仕組みを明らかにするためにも必要である。我々は、本プロジェクトの中で、新規転写因子のクローニングや発現解析などを展開し、いくつかの重要な調節機序を明らかにしてきた。その概要を述べる。

### 1) 発生初期における PROP1 遺伝子の発現制御の解析

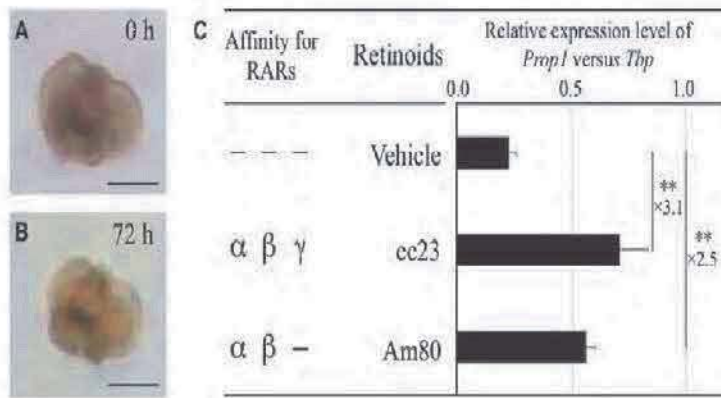


図1. 摘出した下垂体原基 (A) をレチノイド (cc23、Am80) で72時間処理すると (B) 有意に *Prop1* の発現が増加した。それらの発現の促進は RAR 受容体に依存している (C)。

せいぜい 0.5 mm の大きさの下垂体原基を取り出し (図 1 A,B)、レチノイン酸のアゴニストを作用させて PROP1 遺伝子の発現レベルを調べた。その結果、その受容体を介して、下垂体特異的転写因子 PROP1 遺伝子の発現が促進されることが確認できた (図 1

C)。

このことは、下垂体の初期の発生過程において、上部に位置する間脳が発する成長因子 FGF8 などの刺激を受けると同時に、少なくとも下垂体内で生成するレチノイン酸が下垂体の発達に必要な PROP1 遺伝子の発現を促していることを示している (図 2)。本研究によって、レチノイン酸が PROP1 遺伝子の発現調節に関与することを初めて明らかにした (1)。

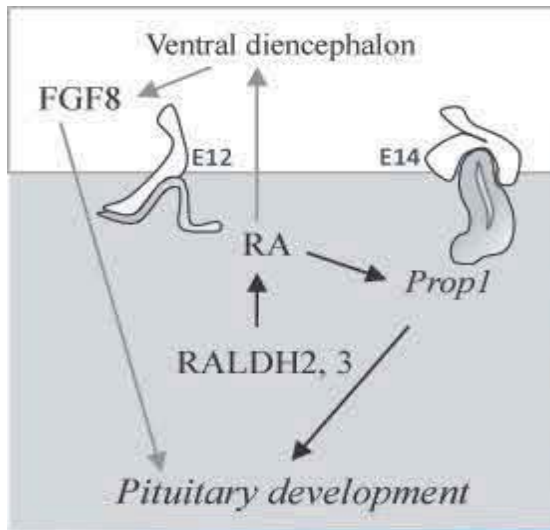


図 2. レチノイン酸は下垂体内で合成され、*Prop1* 発現を促進し、間脳(diencephalon)からの増殖因子 FGF8 などの刺激と共に、下垂体の初期の発生・分化を進行させる。

## 2) 新規転写因子のクローニングと機能解析

下垂体の cDNA ライブラリーから、酵母 One-hybrid 法により POU ドメイン型転写因子 retina-derived POU domain factor 1 (POU6F2) をクローニングした(2)。この因子は、これまで網膜の分化過程のみで発見されている因子で、下垂体では新規となる。しかも、POU6F2 の発現は、下垂体の発生の初期以降は非常に低く、初期の発生に重要であると思われる。また、目の組織は、発生の初期に下垂体と同じ領域を起源とすることから、今後、この POU6F2 の解析は重要であると考えられる。

また、kruppel 型転写因子 KLF6 が下垂体の幹・前駆細胞で機能していることを見出し、その解析結果を報告した(3)。さらに、生殖腺刺激ホルモン遺伝子を制御する LIM-homeodomain 型転写因子(4) や、長鎖脂肪酸によるホルモン遺伝子の発現制御領域などについて新知見を報告した(5)。

### 【2】下垂体の発生・分化に関わる特定因子や幹・前駆細胞の解析

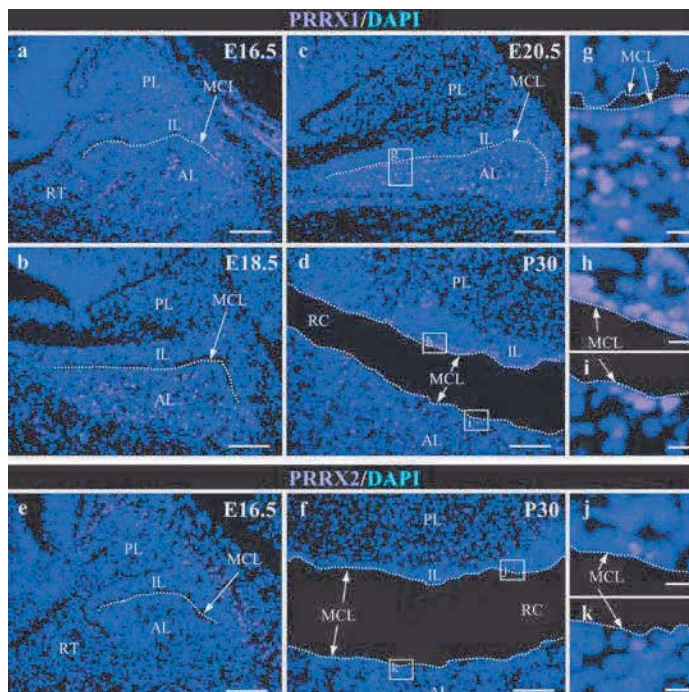
下垂体の発生・分化の分化過程を、経時的に免疫組織化学的手法で解析することや、その過程に起こる質的な変化を、種々のマーカー分子を使って追跡する

ことにより重要な知見が得られる。我々は、本プロジェクトの中で、組織化学的な解析と、下垂体組織から作製した初代分散細胞の細胞生物学的な解析を進めて、以下の様な多くの成果を挙げている。

### 1) 転写因子の免疫組織化学

プロジェクト開始以前から、我々は、下垂体に POU-homeodomain 型の新規転写因子 PRRX1 と PRRX2 を発見している。この両者の特異抗体の作製にも成功し、2つの重要な報告をしている。もともと、PRRX1 と PRRX2 は、四肢、顎、血管形成に関わる間葉系の細胞で機能する重要な転写因子として同定されていた。これらの因子が下垂体で見つかったこと自体が示唆に富むものであった。

両者は、良く似たタンパク質であるが、下垂体では分布や挙動が異なっていた。先ず明らかになったことは、両因子が下垂体の幹・前駆細胞内に確認されるものの(図3)、PRRX1シグナルが圧倒的に多く、PRRX2は極少数であった(6)。特に、ラトケの



遺残腔に接する一層の細胞 (Marginal cell layer, MCL) にある幹・前駆細胞では、そこに内在する PROP1 の減少に相反して PRRX1 が増加しており、前駆細胞の最終段階に機能していることが示唆された。

図3. PRRX1 と PRRX2 の免疫組織化学。矢印で示した MCL(marginal cell layer)に PRRX1 陽性細胞 (赤) が観察された(a-d, g-i)。一方、わずかな数の PRRX2 陽性細胞が生後 (P30) に確認された(e, f, j, k)



もう一つの予想外の観察は、胎仔期に下垂体の血管形成に伴って、両者を発現する細胞が下垂体外から侵入する細胞としても同定されたことである(7)。それらの細胞は、血管形成に関連する細胞であることが確認された(図4)。

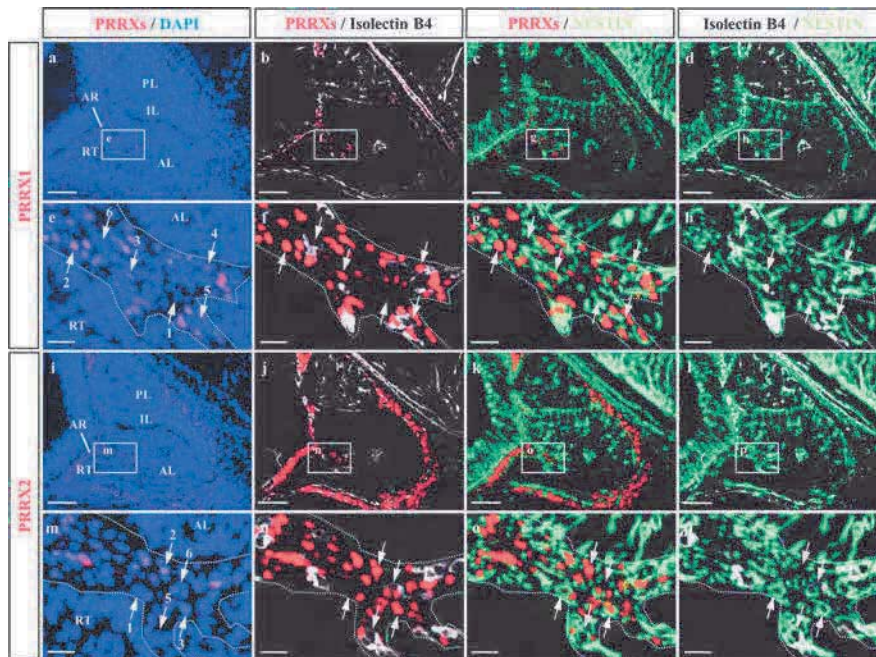
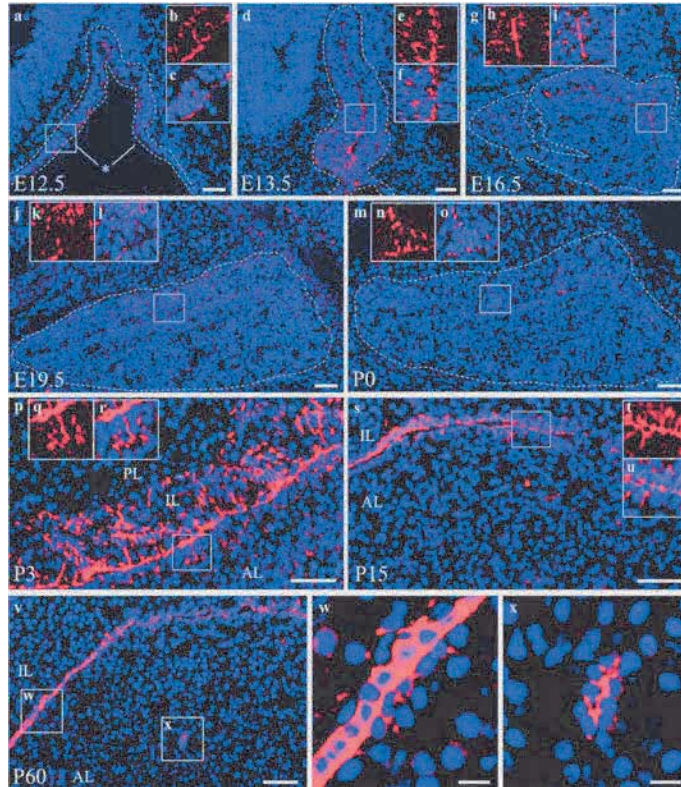


図4. 血管形成時に外部から侵入する PRRX1 と PRRX2 の陽性細胞。PRRX1 と PRRX2 陽性細胞 (赤) が、Atwell's recess から侵入することが観察できる。いずれも、血管内皮細胞 (isolectin B4 : 白) や間葉系細胞 (nestin : 緑) のマーカーに陽性であることがわかる。

## 2) 幹・前駆細胞における特異的細胞間接着因子の局在と機能の解析

下垂体の幹・前駆細胞は、MCL 以外にお、実質層において cluster を形成していることが多く、これまでも CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) の様な特異的分子が細胞膜上に存在し、細胞の移動や分化に密接に関与していることを報告している(8)。ephrin ならびにその受容体はそれぞれを発現する細胞間の接着を介して、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、細胞移動、神経軸索ガイダンス、などの現象に関与する分子として注目されている。

本プロジェクトにおいて、我々は、下垂体の幹・前駆細胞の維持や細胞供給の機序を解析することを目指し、これらの分子に着目した組織化学的な解析を行った。その結果、**ephrin-B2** が一生を通じて幹・前駆細胞に存在することを



観察し(図5)、この接着因子が幹・前駆細胞の維持に重要な役割を持つことを報告した(9)。**ephrin-B2** の受容体の発現は細胞種ごとに異なること、また、幹・前駆細胞とホルモン産生細胞との間に密接な関連(分化?)があることを観察した(10)。

図5. 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 MCL と、それぞれの実質層に観察される。

### 3) 下垂体の分化過程に出現する分子の解析

さらに、下垂体の分化過程の特徴を捉えた研究成果も報告している。**Neuronatin** は、新生仔の脳で発現する分子として同定され、下垂体でも高い発現レベルを示す低分子タンパク質であり、分化や増殖との関連で注目を浴びている。我々は、この分子が、下垂体のホルモン産生細胞の分化に関連するか否かを明らかにするために、ラット下垂体の組織化学的な観察を行った。その結果、**Neuronatin** は、下垂体において

未分化細胞に強く発現しており、分化に伴って消失すること、一部の未分化な前駆細胞に生後も存在することを明らかにした(図6)(11)。

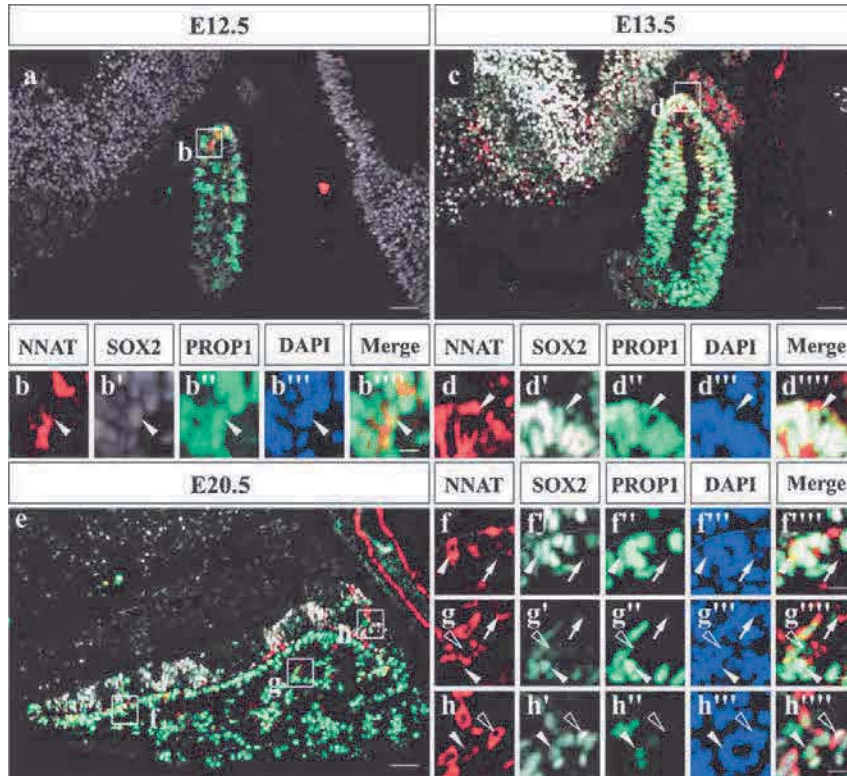


図 6. ラット胎仔期下垂体の免疫組織化学。Neuronatin (NNAT,赤) が胎仔期 (E) 12.5 日の下垂体原基の SOX2 (白) /PROP1 (緑) 二重陽性細胞 (白矢頭) に出現し、その細胞の割合は増加する。その後、E20.5 日までに NNAT 陽性細胞数は、激減するが、それらの細胞は SOX2 (白) /PROP1 (緑) 二重陽性 (白矢頭)、SOX2 陽性 (白枠矢頭)、そして両者に陰性(矢印)である。

また、endoplasmic reticulum(ER、小胞体)に存在して Ca イオンの調節に関与するとされていたが、下垂体の細胞内では、ER 以外の細胞内顆粒にも存在することを明らかにした。この分子については、下垂体以外の組織での特異的な発現も観察しており、多様な役割が示唆された。



#### 4) 下垂体幹・前駆細胞とその起源に関する研究

本プロジェクトの中で、下垂体幹・前駆細胞とその起源に関して、重要な発見をした。下垂体は、外胚葉に由来する下垂体プラコードを起源としているが、上述の様に、胎仔期の発生途中に外部から細胞の侵入がある。起源の異なる細胞種が下垂体に棲みついていることは、しばしば指摘されてきていた。こうした細胞を追跡する中で、S100 $\beta$ タンパク質遺伝子のプロモーターを GFP に連結させて作製された S100 $\beta$ -トランスジェニック (TG) ラットの解析から、これまでになかったことが明らかになった。

発生初期の神経管が閉塞すると同時に、神経板と外胚葉上皮との間に生じる神経堤領域から脱上皮化して神経堤細胞が全身へと遊走し、様々な組織の形成に関わっていることが知られている。この神経堤細胞は、第 4 の胚葉とも言われる。我々は、その様な一群の細胞のマーカータンパク質の一つである p75 の抗体に陽性な細胞が下垂体に侵入する像を確認している。この観察をさらに確認するために、別のマーカーである SOX10 の抗体を使って調べて見た。

その結果、出生直前・直後の下垂体後葉に SOX10 陽性細胞が侵入することが確認され(図7)、さらに経時的観察では、その細胞は S100 $\beta$  陽性となり、さらに、中葉にも移動し、その後に前葉まで移動していることが判明した (12)。驚くことに、前葉の SOX10 陽性細胞は、PROP1 抗体にも陽性になっていた。つまり、下垂体後葉から侵入した SOX10 陽性の神経堤系譜の細胞は、中葉を経て前葉に侵入し、一部が前葉の幹・前駆細胞の性質を獲得していたことになる(図8)。

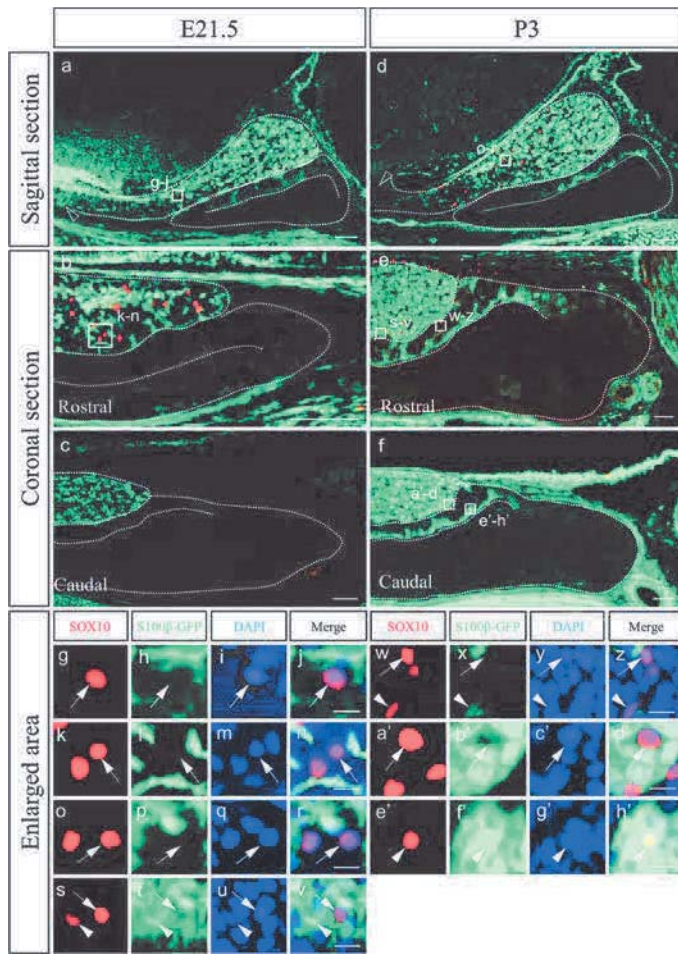


図7. ラット出生前後の下垂体における SOX10 陽性細胞の出現。SOX10 陽性細胞が後葉の正中隆起に近接する部位 (a, 白枠矢頭) から rostral 領域(a,b)に確認される。E20.5 において、多くの SOX10 陽性細胞は S100β 陰性であるが(g-v)、P3 では S100β 陽性になることが判る(w-h')。

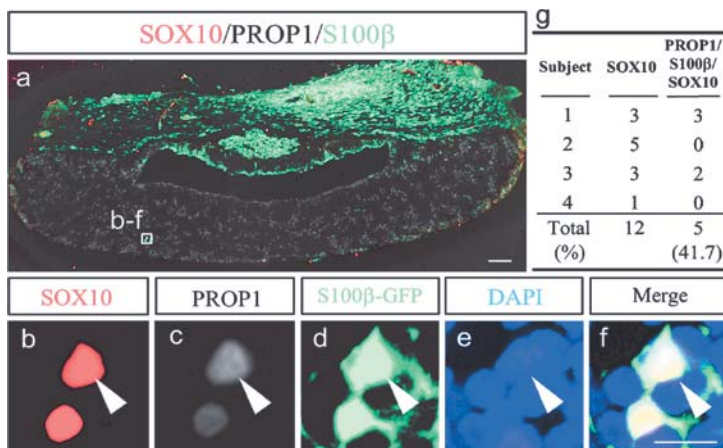
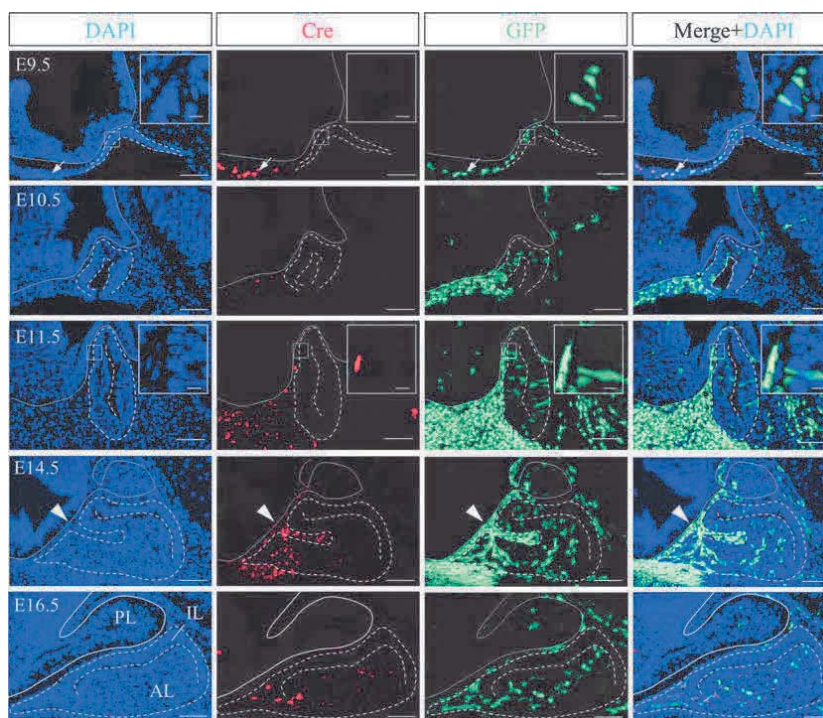


図8. ラット下垂体(P)の免疫組織化学。SOX10 陽性細胞は、前葉において S100β (緑)に加え、下垂体特異的転写因子 PROP1 (白)にも陽性となる。

そこで神経堤系譜の細胞を解析することを試みた。神経堤細胞の研究でよく使われ

ている動物材料に、P0 タンパク質遺伝子のプロモーター制御下に Cre レコンビナーゼを使って蛍光タンパク質 (EGFP) を恒常的に発現させる P0-Cre マウスが、熊本大学の山村研一先生によって作出されている。東北大学の太田典子先生との共同で、Gene-tracing 法による神経堤由来の細胞の解析を開始した。このマウスでは、CRE レコンビナーゼと GFP の両者に陽性であれば P0 陽性の神経堤細胞、CRE 陰性 / GFP 陽性であれば神経堤系譜の細胞と、判断できることになる。



その結果、衝撃的な結果が得られた(13)。既にマウス E9.5 で、CRE 陰性で EGFP 陽性の細胞、いわゆる神経堤系譜で分化の進んだ細胞が下垂体原基へと侵入していることが観察された。一方、周囲

図9. P0-Cre トランスジェニックマウスの胎仔期下垂体の免疫組織化学。神経堤細胞と神経堤系譜の細胞は、神経堤細胞のマーカである P0 ミエリンタンパク質遺伝子のプロモーター依存的に CRE を発現し、恒常的に蛍光タンパク質 (GFP) で標識できる。CRE 陽性細胞(赤)は神経堤細胞、CRE 陰性・GFP 陽性細胞(緑)の細胞は神経堤系譜の細胞で、経時的に下垂体内に侵入している。この時でも、依然として CRE/EGFP 陽性細胞は、見事にラトケ囊の外側で堰き止められていた(図9)。しかし、さらに発生が進むと、Cre を発現する神経堤細胞が、Atwell's recess(14)から下垂体に侵入している。つまり、初期に下垂体に侵



入する第一波に加えて、その後の血管形成時の第二波として、神経堤由来細胞は、少なくとも2度の侵入を起こしていることになる。

もう一つ、驚いたことは、第一波で進入する神経堤細胞は、下垂体原基の中でPROP1陽性になっていた(図10)。

つまり、神経堤系譜の細胞が下垂体の幹・前駆細胞の特徴を獲得していたことになる。

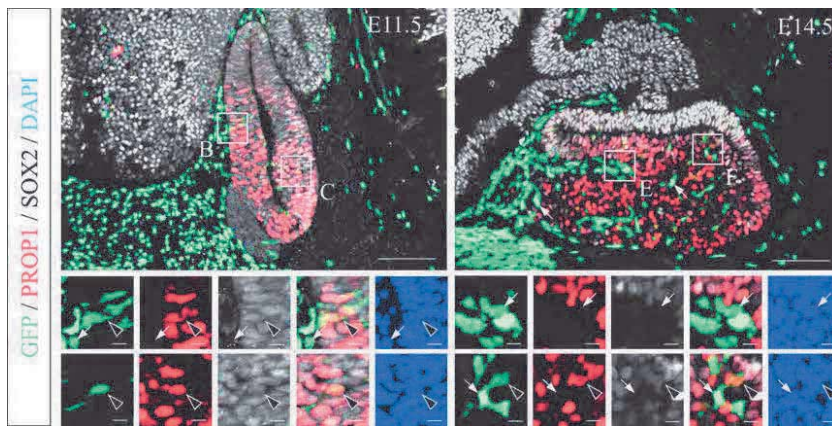


図10. 下垂体原基ラトケ囊の免疫組織化学。神経堤細胞系譜のGFP(緑)、PROP1(赤)、SOX2(白)の三重染色像を示す。下垂体に侵入した神経堤細胞が、SOX2/PROP1陽性の下垂体幹・前駆細胞へと転移している。

さらに、ホルモン産生細胞を調べると、下垂体前葉の全てのホルモン産生細胞に分化していることも確認された。その割合は、成熟期下垂体で調べると、細胞種で異なるものの5-10%であった。また、SOX2陽性細胞(未分化細胞)では、約5%が神経堤系譜であることも判明した。第二波で進入する細胞群は、血管形成に関わる細胞で、少なくともペリサイトであることが強く示唆された。ラットの胎仔期後期下垂体で観察した結果と合わせて考えると、第三波の侵入も考えられる。

嗅上皮では、組織に人為的に損傷を与えた後に神経堤系譜の幹・前駆細胞が急激に増殖し、組織再生の細胞供給に主たる役割を果たすことが知られている。下垂体にとって、この神経堤細胞がどのような意味があるのかを解き明かすことは重要な問題である。現在、下垂体の成長に伴って、下垂体プラコードと神経堤のそれぞれの系譜



の細胞割合の測定を進めているが、その推移には個体ごとにある程度の差がある様である。しかし、嗅上皮の損傷時の様な著明な差はない。今後到下垂体における神経堤系譜の細胞の役割をさらに解析する必要がある。

### 5) S100 $\beta$ 陽性細胞を用いた解析

S100 $\beta$ -TG ラットを用いた研究は、下垂体の発生・分化に貴重な情報をもたらしている。これまでの我々の組織化学的解析は、「S100 $\beta$ 陽性細胞は濾胞星状細胞である」とすることに重大な問題を提起している。S100 $\beta$ 陽性細胞は不均一な細胞集団であり、その約85%が未分化性を持つ細胞であることを明らかにしている(15)。このS100 $\beta$ -TG ラットの下垂体から調製した細胞分散液中のGFP陽性細胞を経時的に追跡すると、一部の細胞がGHやプロラクチン細胞へと分化することが確認でき、S100 $\beta$ 陽性細胞の一部は分化能を有するというを示した(図11)(16)。

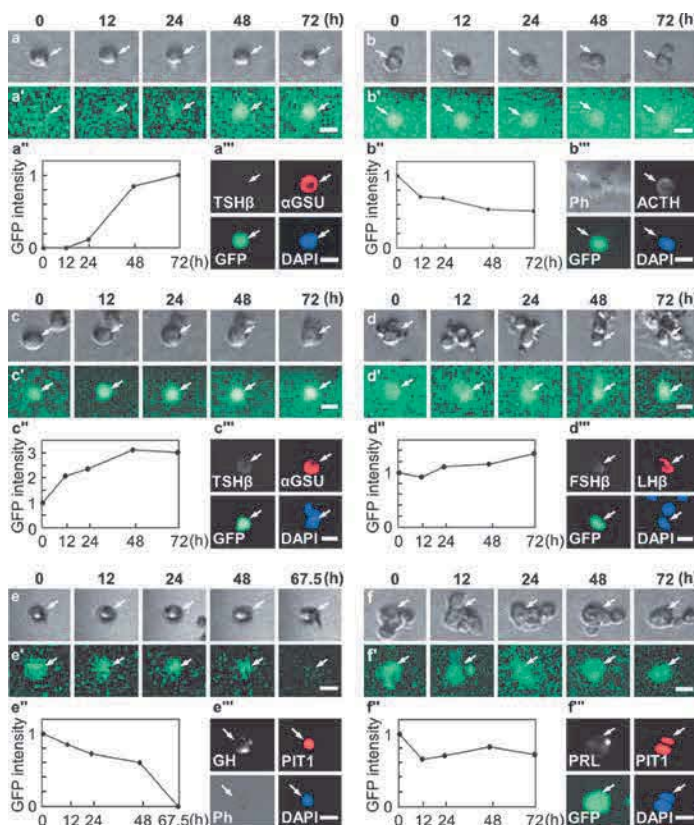


図11. S100 $\beta$ -TG ラット下垂体の分散初代培養におけるS100 $\beta$ 陽性細胞の経時的観察。S100 $\beta$ 陽性細胞(緑)を経時的に観察すると、徐々に蛍光が減少するものや、余り変化を示さないものがあった。3日間の培養後に、ホルモン抗体などで染色してみると、それら抗体の陽性細胞(白あるいは赤)が観察されるとともに、さらに、GHやPRL細胞の分化に必須の転写因子PIT1陽性細胞(赤)も観察された。S100 $\beta$ 陽性細胞が、下垂体のホルモン産生細胞への分化能を持っていることが判る。

その他、S100β陽性細胞が、様々なサイトカインとその受容体を合成、分泌して、ホルモン産生細胞からのホルモン分泌に関与していることも報告した(17; 18; 19; 20; 21)。

#### 6) 下垂体幹・前駆細胞の単離と細胞生物学的な解析

下垂体幹・前駆細胞を直接細胞レベルで解析する研究にも取り組んで、いくつかの成果を挙げた。下垂体をコラーゲンやトリプシンで分散して、種々の細胞を分画することは以前から行われてきたが、我々は、あることに着目した。強い酵素処理を行っても、またそれを繰り返しても、また、さらにピペットによる激しい物理的な分散を追加しても、依然として細胞塊をなす細胞群があった。恐らくこれらは、これまで不十分な未分散物として途中で除去されていたのであろう。しかし、我々は、S100β-TG ラットを用いたために、その細胞塊の中に GFP 陽性の細胞だけで構成されるものが多くあったことから、これら細胞の存在を容易に確認できた。この細胞塊を分散液の中から、キャピラリーを使って丹念に取りだして、その性質を調べた。

その細胞塊は全細胞の1%弱であり、GFP 陽性だけ(47%)、GFP 陽性と陰性の混合したもの(37%)、GFP 陰性だけのもの(16%)の三種類に分けられた(図12)。

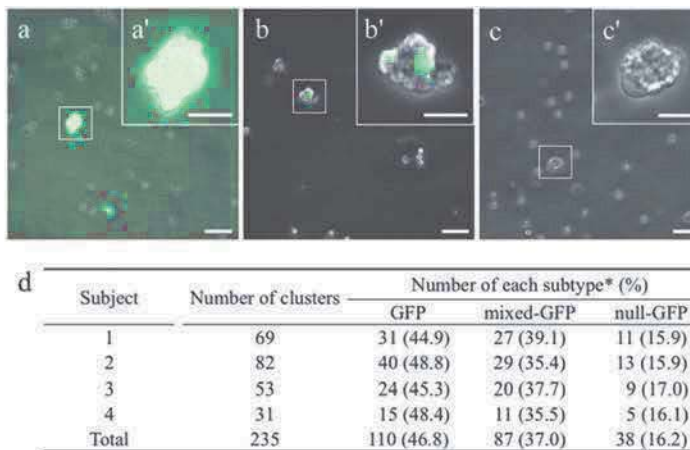


図12. 酵素処理によるラット下垂体からの細胞塊の分画。S100β陽性(緑)や陰性の細胞塊が存在する(a-d)。SOX2の抗体を使って調べると、全てがSOX2陽性(白)であった(e-i)。

いずれも、全ての細胞がSOX2陽性であり、幹・前駆細胞であることが判明した(22)。

この GFP 陽性塊の一部の細胞は、三次元培養条件では、ホルモン産生細胞に分化する能力を持っていることも判った(図13)。

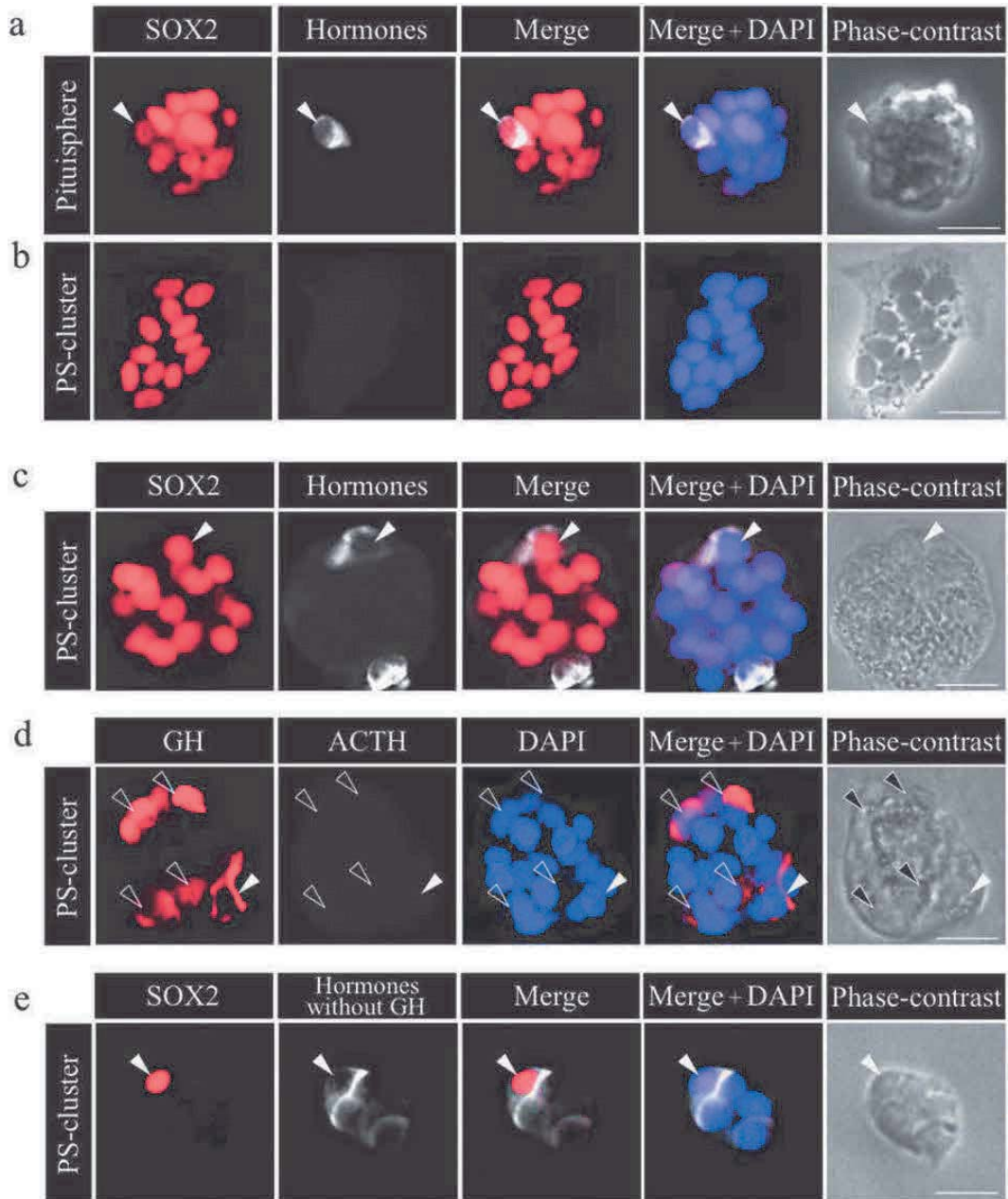


図 13. 細胞塊の分析。単離した細胞塊を三次元培養で培養し、細胞免疫染色を行った。SOX2 陽性 (赤) に加えホルモンないし成長ホルモン (白; 白矢頭) に陽性の細胞がある。白線矢頭は ACTH 陰性。

さらに二次元培養条件に変えて培養すと、GFP 陽性塊の一部は、非ホルモン産生細胞で、血管を形成する内皮細胞などに分化することが判った(図14)(23)。

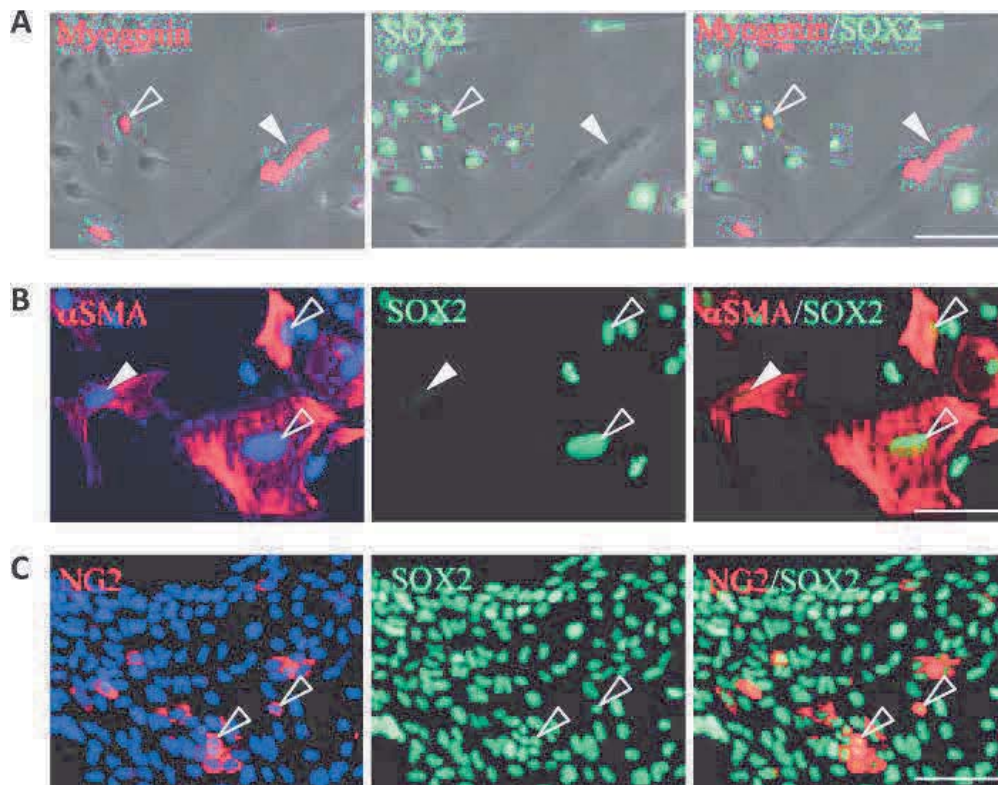


図 14. ラット下垂体から調製した細胞塊 (PS クラスター) 二次元培養による非内分泌系細胞への分化。成長因子などを含む二次元培養液で7日間培養した後 SOX2 (緑色) および非内分泌細胞系列マーカーMyogenin (A)、 $\alpha$ SMA (B)、NG2 (C) の免疫染色 (いずれも赤) を行った。また、核は DAPI (青色) で染色した。白矢印および黒矢印は、それぞれ SOX2 陽性および陰性を示す非内分泌細胞系列マーカー陽性の典型的な細胞を示す。

バー : 50  $\mu$ m

分化条件を検討することで各種の下垂体を構成する細胞に分化させることができる可能性がある。一方、16%を占める GFP 陰性だけの細胞塊は、これまでのところ他