

の細胞種への分化に誘導ができていない。このことは、この細胞塊は強い細胞間接着によって他の細胞塊とは異なり強く未分化性を維持していることを示しており、今後のさらなる解析が待たれる。

### 【3】 遺伝子発現解析のデータベースを用いた下垂体と性腺組織の発生・分化関連遺伝子群の探索

繰り返しになるが、下垂体の発生・分化は、多数の転写因子の時空間的で階層的な発現によって制御される多数の機能分子の働きによって、初めて進行する。本プロジェクトでは、マイクロアレイ解析による2種類の遺伝子発現プロファイルに基づく研究を展開した。その一つは、ラットの胎仔期 (E) から成体 (P) まで (E13.5、E14.5、E16.5、E18.5、E20.5、P0、P5、P15、P30、P60、P600) の下垂体組織を、もう一つは、下垂体由来の数種の株化細胞 (Tpit/E、Tpit/F1、TtT/GF) を対象としたものである。プロファイル解析結果を分析中であるが、それらの一部の結果を利用して、いくつかの発現遺伝子の特徴に基づく解析を行った。

1) 下垂体胎仔期の発生過程において発現変動する遺伝子のプロファイリングをもとに行った解析

PROP1 は下垂体特異的転写因子であり、この遺伝子の発現は正常な下垂体の発生・分化に必須である。PROP1 は SOX2 陽性細胞で産生され、PROP1 陽性細胞には常に SOX2 が共存する。以前から、SOX2 を含めて転写因子による PROP1 遺伝子の転写制御に関する解析を行ってきた。発現変動する遺伝子のプロファイリングを行ってみると、下垂体発生の初期に特徴的な転写因子がいくつも確認された。そこで、およそ 40 種の転写因子の発現ベクターを作製し

た。次に、PROP1 遺伝子プロモーター上流域とレポーター遺伝子 SEAP (分泌型アルカリフォスファターゼ) を連結したベクターを作製し、発現ベクターと共に CHO 細胞に共導入して、それぞれの転写因子の効果を調べた。

その結果、16種の因子が PROP1 遺伝子発現の調節に関わることが示唆され (表1)、それらの因子と幹細胞マーカーである SOX2 との共役を調べた。その結果、複数の因子が協調的に働く可能性を確認した (表2)。

Table 3. Reporter assay of transcription factors for *Prop1* (-2993/+21)

	A	B	C	D	Function
	SOX2 only	Factor only	SOX2+Factor	C/A	
<b>SOX2-dependent stimulation</b>					
FOXJ1	9.9 ± 1.6**	0.7 ± 0.0**	15.6 ± 1.3**	1.6	Ependymal cell/astrocyte differentiation
HES1	9.0 ± 1.2**	0.8 ± 0.1	21.3 ± 1.9**	2.4	Maintain stemness of the stem cell
HEY1	7.3 ± 1.0**	1.3 ± 0.2	28.0 ± 2.9**	3.8	Maintain stemness of the stem cell
HEY2	7.3 ± 1.0**	0.8 ± 0.1	15.7 ± 1.1**	2.2	Maintain stemness of the stem cell
<b>SOX2-dependent suppression</b>					
KLF6	9.9 ± 1.6**	1.2 ± 0.2	7.3 ± 1.3	0.7	Regulator of <i>Prrx2</i> in the pituitary
MSX1	8.2 ± 0.9**	0.9 ± 0.2	3.7 ± 0.6**	0.5	Pituitary organogenesis
RUNX1	7.3 ± 1.0**	0.8 ± 0.1	2.8 ± 0.4**	0.4	Hematopoietic/hair follicle stem cells
TEAD2	9.9 ± 1.6**	1.3 ± 0.4	3.1 ± 0.2**	0.3	Vessel/neural tube/heart organogenesis
YBX2	7.6 ± 0.5**	1.4 ± 0.2**	2.8 ± 0.5**	0.4	Stability of germ cell mRNAs
ZFP36L1	7.3 ± 1.0**	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.1**	0.2	Vessel/neural tube/heart organogenesis
<b>SOX2-independent regulation</b>					
MSX2	6.6 ± 1.1**	7.7 ± 1.0**	7.5 ± 2.0	1.1	Cell survival/apoptosis
PAX6	7.3 ± 1.0**	5.8 ± 0.1**	7.9 ± 1.2	1.1	Early embryonic pituitary factor
PIT1	9.5 ± 1.9**	4.8 ± 0.5**	13.8 ± 1.7	1.5	Generate GH-, PRL- and TSH- cells
PITX1	8.3 ± 0.8**	9.6 ± 2.7**	13.0 ± 0.6**	1.6	Pan-pituitary activator
PITX2	8.3 ± 0.8**	16.6 ± 4.3**	14.4 ± 1.5**	1.7	Pituitary formation/cell specification
RPF1	9.9 ± 0.6**	3.6 ± 0.3**	13.5 ± 1.8**	1.4	Retina/pituitary transcription factor
SOX8	7.6 ± 0.5**	0.4 ± 0.1**	6.3 ± 1.1	0.8	Organogenesis
SOX11	9.3 ± 0.4**	9.2 ± 0.9**	7.2 ± 1.2	0.8	Neurogenesis and targets <i>TEAD2</i>

表1. *Prop1* 転写開始点上流について転写因子を用いた転写活性測定。全ての値は、再現性のある2-3回の独立した実験で得られた転写活性性能の代表的なものを、平均±SDとして表した。A: SOX2の転写活性性能。B: 因子の転写活性性能。C: SOX2と各因子を組み合わせた時の転写活性性能。\*\* P<0.01.

SOX2-binding site		Binding site within 50-base regions of the SOX2-binding sites				Others <sup>1)</sup>
Region	Sequence	SOX2 dependent		SOX2 independent		
		Stimulation	Repression	Stimulation	Repression	
-2950/-2945	TCAAAG	HES1, HEY1, HEY2				OTX2
-2548/-2543	CTTTGT	PITX1 <sup>2)</sup> , PITX2 <sup>2)</sup>		PITX1 <sup>2)</sup> , PITX2 <sup>2)</sup>		
-1874/-1869	ACAATG	KLF6				
-1784/-1779	CATTGA	HES1, HEY1, HEY2				
-1137/-1132	TCAAAG					

表2. *Prop1*の5'上流領域にある5つの推定SOX2結合部位の50塩基範囲内に存在する転写因子の推定結合部位。それら

の推定結合部位は、TRANSFAC (BIOBASE, Waltham, MA, USA) を用いて行った。1) これらの因子は、CHO細胞における *Prop1* 発現に対する効果を示さなかった。2) これらの因子は、それぞれ単独で *Prop1* 発現を刺激し、さらに、SOX2との共存ではその刺激効果がさらに増加した。

胎仔期に急激に発現を開始する PROP1 遺伝子であるが、エピジェネティクス制御の面からも解析した。まず、胎仔期および生後成熟期の下垂体前葉からゲノム DNA を調製して、PROP1 遺伝子の DNA メチル化部位の解析を行った。対象と

して PROP1 を発現していない肝臓のゲノム DNA を用いた。それぞれの解析結果を比較すると、いくつかの領域で非メチル化度にある程度の違いがあることが観察された (図 15)。

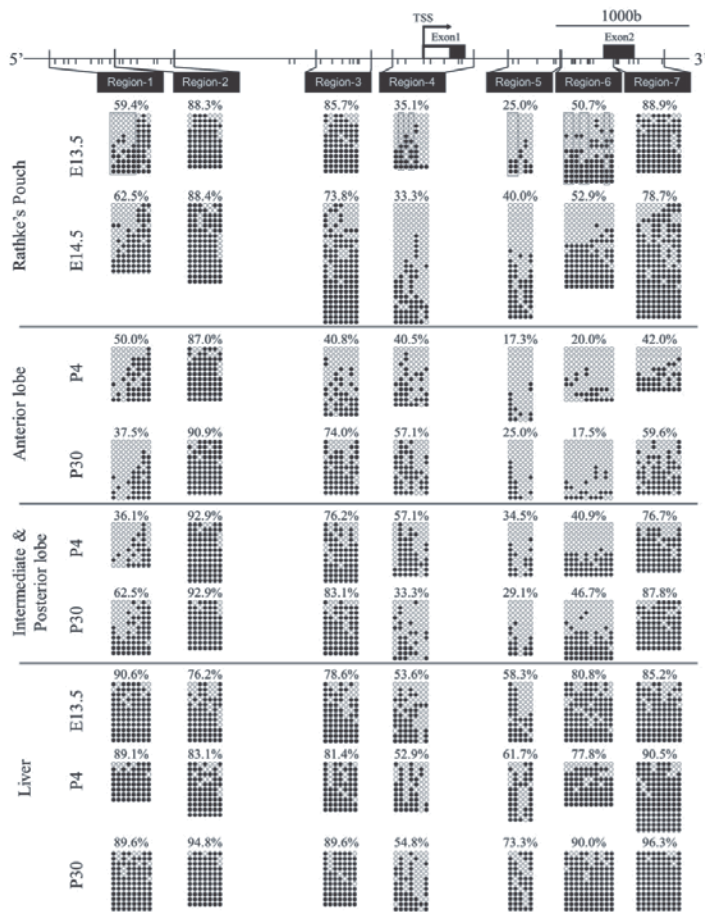


図 15. バイサルファイト法により解析したメチル化レベルの一覧。下垂体ゲノムを胎仔期や出生後の組織から調製して、バイサルファイト法により、メチル化 (黒丸の部位がメチル化を受けていた) の程度を調べた。最上段にはゲノムの模式図 (矢印が転写開始点、白枠、黒枠がエクソンで、前者は非翻訳領域)。Prop1 の非発現組織である肝臓 (Liver) のゲノム DNA を対照試料とした。調べた 7 領域のうち、3 箇所では胎仔期と較べてメチル化の程度に違いが存在した。

このことは、胎仔期において、PROP1 遺伝子は、低メチル化状態であり、その後のメチル化が起こることを示していた。しかし、メチル化は全てでは起こっておらず、メチル化のみで制御が説明できるものではなかった。さらに、既に得ていた転写因子の PROP1 遺伝子上の制御領域（図 16）とを重ね合わせると、メチル化と転写因子の結合領域とが重複している部位が見つかり、転写因子とエピジェネティクスの異なる制御のクロストークが示唆された。

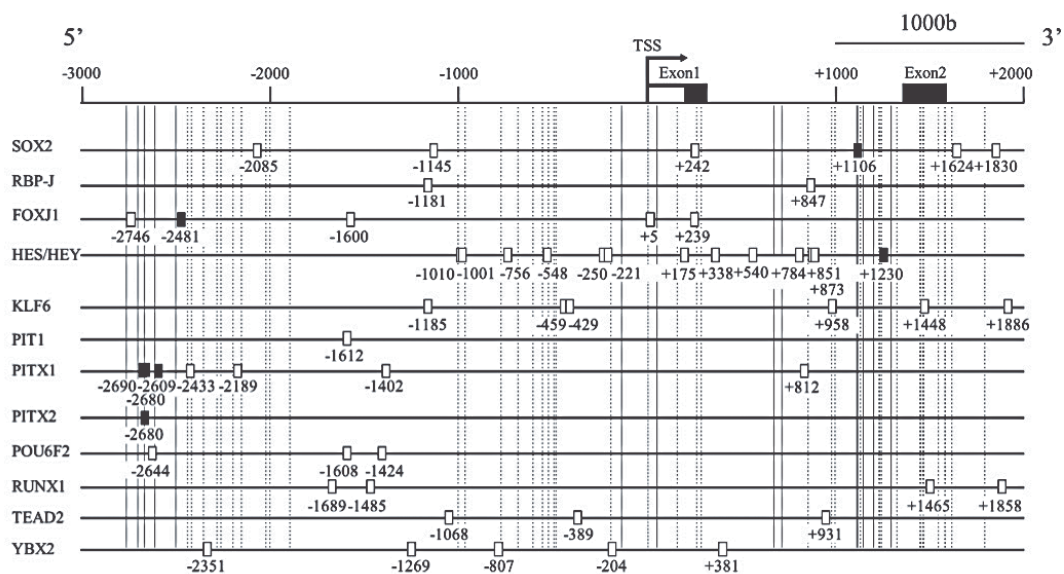


図 16. メチル化部位 CpG と作用が想定される下垂体転写因子の結合部位との相対的な位置関係。左に示す各下垂体転写因子の推定結合部位を口で示し、CpG 配列の位置を縦線で示した。黒枠で示した領域は、CpG 配列前後 20 塩基の領域で、縦線が重なる部分でメチル化と転写因子による相互の制御のクロストークの可能性が有ることが予想される。

## 2) 下垂体由来株化細胞の発現プロファイリング情報を使った解析

Tpit/E、Tpit/F1、TtT/GF は、下垂体腫瘍由来の非ホルモン産生の細胞種であるが、三種類とも異なる特徴を示したことから下垂体研究では貴重な研究材料として使われている。先ず、それらの特性の違いを分子レベルで比較するために、三種の細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法により解析した。その結果、それぞれ

特徴ある遺伝子発現のプロファイルを示していた(表3)。

Gene title	Gene symbol	Ratio per each median			Accession number
		Tpit/E	Tpit/F1	TtT/GF	
<i>Stem/progenitor cells</i>					
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	<i>Abcg2 (Bcrp1)</i>	0	0	17	NM_011920
* Cocksackie virus and adenovirus receptor	<i>Cxadr (Car)</i>	20	1	1	NM_001025192
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	<i>Cxcl12</i>	0	344	7	NM_001012477
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	<i>Cxcr4</i>	0	1	0	NM_0099113
Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2	<i>GFRa2</i>	1	1	0	NM_008115
Kruppel-like factor 4 (gut)	<i>Klf4</i>	2024	973	155	NM_010637
Nanog homeobox	<i>Nanog</i>	0	1	0	NM_028016
Nestin	<i>Nestin</i>	2	3	49	NM_016701
* Paired like homeodomain factor 1	<i>Prp1</i>	1	1	1	NM_008936
* Paired related homeobox 1	<i>Prrx1</i>	0	1	16	NM_001025570
* Paired related homeobox 2	<i>Prrx2</i>	0	10	40	NM_009116
Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	<i>Raldh1</i>	21	199	18	NM_013467
Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2	<i>Raldh2</i>	0	0	0	NM_009022
* Lymphocyte antigen 6 complex, locus A	<i>Sca1</i>	622	92	263	NM_010738
* SRY-box containing gene 2	<i>Sox2</i>	61	12	7	NM_011443
* SRY-box containing gene 9	<i>Sox9</i>	155	16	2	NM_011448
<i>Transcription factors participating in early pituitary development</i>					
Homeobox gene expressed in ES cells	<i>Hesx1</i>	0	0	0	NM_010420
ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	<i>Isl1</i>	24	25	17	NM_021459
LIM homeobox protein 3	<i>Lhx3</i>	0	0	1	NM_001039653
LIM homeobox protein 4	<i>Lhx4</i>	0	1	0	NM_010712
Homeobox, msh-like 1	<i>Msx1</i>	2	21	3	NM_010835
Orthodenticle homolog 2 (Drosophila)	<i>Otx2</i>	0	0	0	NM_144841
Paired box gene 6	<i>Pax6</i>	0	0	2	NM_013627
* Paired-like homeodomain transcription factor 1	<i>Pitx1</i>	1878	785	8	NM_011097
Paired-like homeodomain transcription factor 2	<i>Pitx2</i>	89	150	9	NM_001042502
Sine oculis-related homeobox 1	<i>Six1</i>	26	133	7	NM_009189
Sine oculis-related homeobox 6	<i>Six6</i>	0	0	0	NM_011384
<i>Committed and/or terminally differentiated pituitary cells</i>					
Pro-opiomelanocortin-alpha	<i>Ach</i>	0	0	2	NM_001278581
Follicle stimulating hormone beta	<i>Fshβ</i>	0	0	0	NM_008045
GATA binding protein 2	<i>Gata2</i>	0	19	2	NM_008090
Growth hormone	<i>Gh</i>	0	0	1	NM_008117
* Luteinizing hormone beta	<i>Lhβ</i>	10	6	0	NM_008497
Cadherin 2	<i>N-cadherin</i>	0	6	49	NM_007664
Neurogenic differentiation 1	<i>NeuroD1</i>	0	0	1	NM_010894
POU domain, class 1, transcription factor 1	<i>Pit1</i>	0	0	1	NM_008849
Prolactin	<i>Prl</i>	0	0	0	NM_001163530
* Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	<i>Sfl (Nr5a1)</i>	7	5	0	NM_139051
T-box 19	<i>Tbx19</i>	0	0	1	NM_032005
Thyroid stimulating hormone, beta subunit	<i>Tshβ</i>	0	0	1	NM_001165939
<i>Epithelial/Mesenchymal cells including EMT</i>					
* Cadherin 1	<i>Cdh1 (E-cadherin)</i>	291	1	0	NM_009864
Epithelial cell adhesion molecule	<i>EpCAM</i>	193	0	5	NM_008532
Keratin 8	<i>Krt8</i>	538	1	2	NM_031170
Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	<i>Mmp14</i>	432	1056	75	NM_008608
Snail homolog 1 (Drosophila)	<i>Snail1</i>	0	0	1	NM_011427
* Snail homolog 2 (Drosophila)	<i>Snail2 (Slug)</i>	545	548	82	NM_011415
Transforming growth factor, beta receptor II	<i>Tgfb2</i>	509	1135	47	NM_009371
Twist basic helix-loop-helix transcription factor 1	<i>Twist1</i>	5	23	8	NM_011658
Twist basic helix-loop-helix transcription factor 2	<i>Twist2</i>	0	25	12	NM_007855
* Vimentin	<i>Vimentin</i>	5	1658	713	NM_011701
<i>Angiogenesis/Endothelial cells/Pericyte</i>					
CD34 antigen	<i>CD34</i>	0	3	112	NM_133654
Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	<i>Acta2 (αSMA)</i>	1399	6362	467	NM_007392
Endoglin	<i>Eng</i>	2	4	13	NM_007932
Fibronectin I	<i>Fn1</i>	60	238	236	NM_010233
Endothelial-specific receptor tyrosine kinase	<i>Tek</i>	0	0	0	NM_013690
Kinase insert domain protein receptor	<i>Kdr (Flk1)</i>	0	2	1	NM_010612
Cadherin 5 (VE-Cadherin)	<i>Cdh5</i>	0	1	1	NM_009868
Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	<i>Pecam1</i>	0	0	0	NM_001032378
Desmin	<i>Des</i>	0	1	3	NM_010043
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	<i>Cspg4 (NG2)</i>	0	1	19	NM_139001
Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	<i>Pdgfrb</i>	0	343	96	NM_008809
Regulator of G-protein signaling 5	<i>Rgs5</i>	0	0	1	NM_009063
<i>Others</i>					
Interleukin 6	<i>IL6</i>	0	2	0	NM_031168
* S100 protein, beta polypeptide, neural	<i>S100β</i>	1	2	18	NM_009115
nitric oxide synthase 1, neuronal	<i>nNos</i>	0	4	12	NM_008712

表3. マイクロアレイによって抽出した Tpit/E、Tpit/F1、TtT/GF 細胞に特徴的な発現遺伝子の一覧。シグナル値は中央値の正規化によって補正した。\*:定量的リアルタイム PCRによって分析された遺伝子を示す。

相互の比較から、いずれも未分化性があり、未分化度は Tpit/E > Tpit/F1 > TtT/GF の順である判断した。これらのことから、いずれの株化細胞も、下垂体の発生・分化の分子機序の解明に有用であることを論文報告した(24)。

先ず、TtT/GF に注目した実験に取りかかった。この細胞は、血管系を構成する細胞に特徴的な遺伝子や、TGFβ受容体を発現していることに着目した。TGFβ刺激を行ってみると、ペリサイト様の細胞への形態変化が観察された(図17)。さらに、その際の遺伝子発現の変化を調べると、ペリサイト(周皮細胞)に特徴的な遺伝子の誘導が確認された。この変化は、TGFβのアンタゴニストによって阻害されることも確認し、論文報告した (25)。

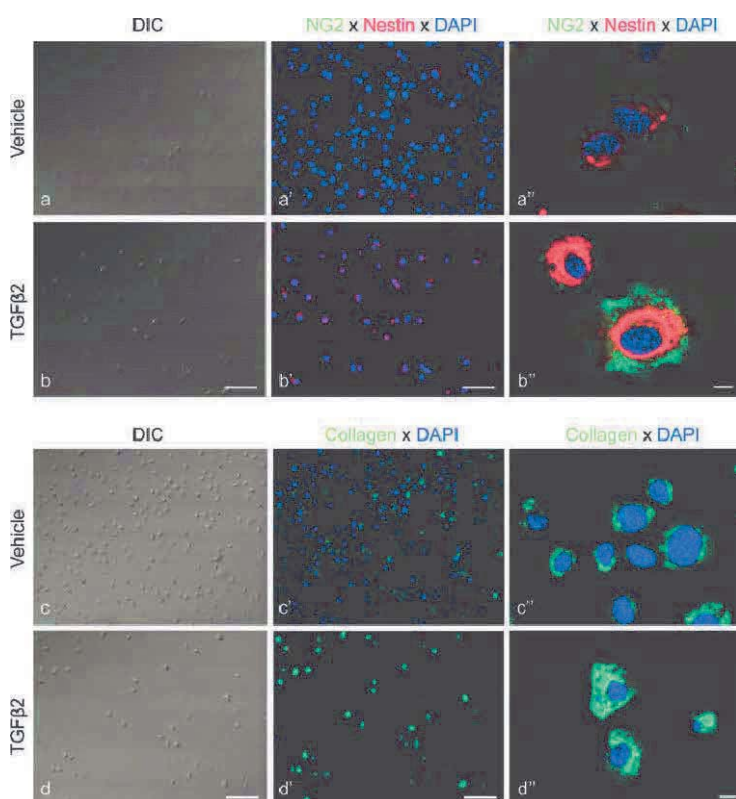


図 17. シグナル因子 TGF β の TtT/GF 細胞への作用。TtT/GF 細胞を TGF β で処理すると細胞の形状が変わることから、発現する遺伝子とその産物であるタンパク質の変化が推測できる。網羅的なタンパク質の解析を行い、幾つかのマーカートンパク質を細胞免疫染色で調べた。その結果、ペリサイト(周皮細胞)に特徴的な NG2、Nestin、Collagen などが TGF β 処理によって著明に増加している事が判った。

この実験を、さらにプロテオミクスによる解析を進めた。実験には、本プロジェクトのメンバーである紀藤圭治准教授が開発を進めている、タンパク質の安定同位体標識法を用いた、タンパク質合成変化の網羅的解析(SILAC)法を適用した。安定同位体を含む培養液中で、TGF $\beta$ の刺激と未刺激の TtT/GF 細胞群から抽出したタンパク質を質量分析計で分析した。それぞれの標識率を比較し、TGF $\beta$ の刺激によって変動するタンパク質を絞り込んだ。その結果は、多くの周皮細胞マーカー(CSPG4、NES、ACTA、TAGLN、COL1A1、THBS1、TIMP3、および FLNA)が増加していた。つまり、TGF $\beta$ が周皮細胞への分化を誘導するという我々の仮説を支持したものであった。また、いくつかの下垂体腺腫において誘導されるCTSB、EZR、およびLGALS3が減少することを見いだした。SILAC法を用いた今回のデータは、下垂体腺腫および周皮細胞への分化における、病理学的プロセスに関する貴重な情報提供となることが期待できる(投稿中、図18)。

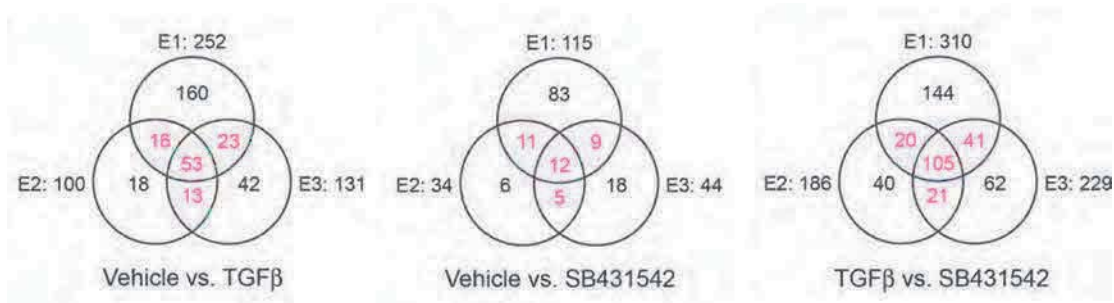


図18. TGF $\beta$  および SB431542 処理によって変化したタンパク質の解析。未処理を加えた3の実験 (E1、E2、E3) で有意な変化を伴うタンパク質の重複を示すベン図を示した。各円の重なった部分が2回以上の実験で有意な量的変化を示したタンパク質 (その数を赤の数字で示してある) で、中央が3回の実験の全てで共通して変動したタンパク質数である。

もう一つの細胞株、Tpit/F1 を用いた分化誘導実験も行った。この細胞株は、培養条件によって、血管平滑筋様の細胞に分化することが知られている。一方、正常な神経幹細胞の培養方法として確立された条件(上皮細胞が接着しない条件で、無血清培

地に成長因子(EGF)と塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)のみを加える)で培養すると、細胞が clump ないし sphere を形成することが判った。数日間の培養後に、その中の clump に、成長ホルモン(GH)産生細胞が出現することが確認された(26)。しかも、GH 産生細胞の分化に必要とされる転写因子 PIT1 が発現せずに分化することが判った。この PIT1 に依存しない GH 産生細胞の分化は下垂体内でも観察されており、この結果は PIT1 非依存性の分化を解析する有用な実験系であることが判る。こうして、Tpit/F1 が、ホルモン産生細胞と非ホルモン産生細胞にも分化する能力を持っていることが初めて明らかになった。さらに条件を変えることで、他の細胞種への分化誘導が可能と考えられる。

残る Tpit/E については、上記の様な分化誘導条件の培養を行っても変化が見られず、分化度が少なく未分化性が強く維持されている細胞株であり、今後のさらなる検討は、下垂体の幹細胞の研究に重要であると考えている。

#### 【4】精巣発現遺伝子プロファイル解析に基づく精子形成異常原因遺伝子の同定とその作用機序の解析

ブタ FSH $\beta$  鎖遺伝子上流領域の下流に、ヘルペスウイルス(HHV1)が持つチミジンキナーゼ(HHV1-TK)を繋いだキメラ遺伝子を導入したトランスジェニックラット(TGラット)は、雄性不妊であることから、本研究が開始された。1)何故雄性不妊になるのか、2)雄性不妊の機序は、また、3)ラットではなく、ヘルペスウイルスが感染したヒトではどうなのか、という疑問が出てきた。

##### 1) 不妊の原因



TG ラットの精巣の解析を進めると、HHV1-TK が円形精子細胞で発現を開始し (図 19)、生後 3 ヶ月頃から成熟精子に形態異常が観察された。6 ヶ月を過ぎる頃から、精細管内全体に異常な精子や精原細胞が観察され、最終的には Sertoli cell only の状態になってしまうことまで明らかにした (図 20)。

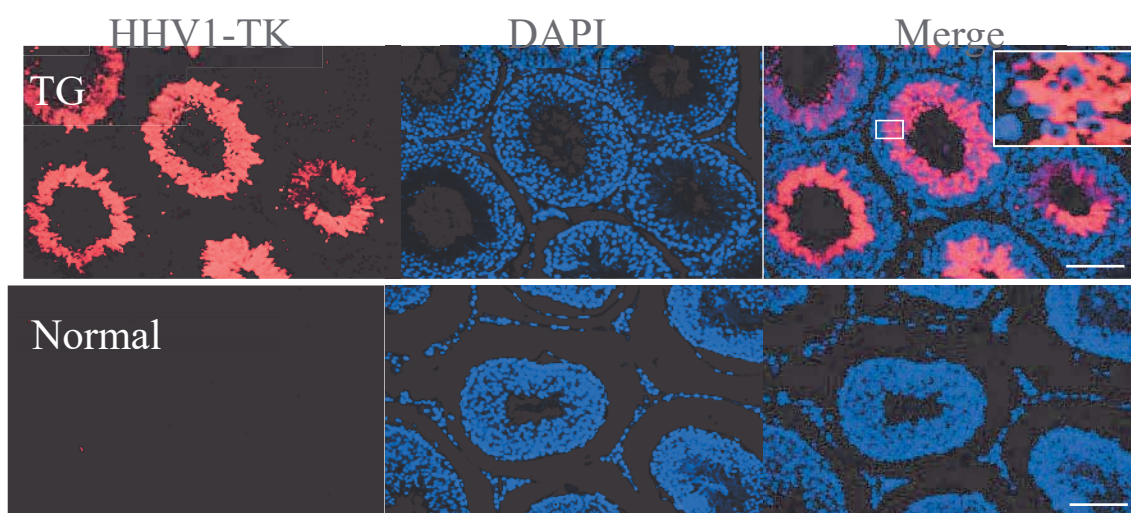


図 19. トランスジェニック (TG) および正常ラット (Normal) 精巣における HHV1-TK の免疫組織化学。上パネルおよび下パネルは、それぞれ TG および正常ラットの画像である。左、中央および右のパネルは、それぞれ HHV1-TK 染色 (赤色)、DAPI 染色 (青色) および併合画像を示している。右上のパネル内の枠で囲まれた精細管の一部を、拡大して挿入図として示した。バー：100  $\mu$ m

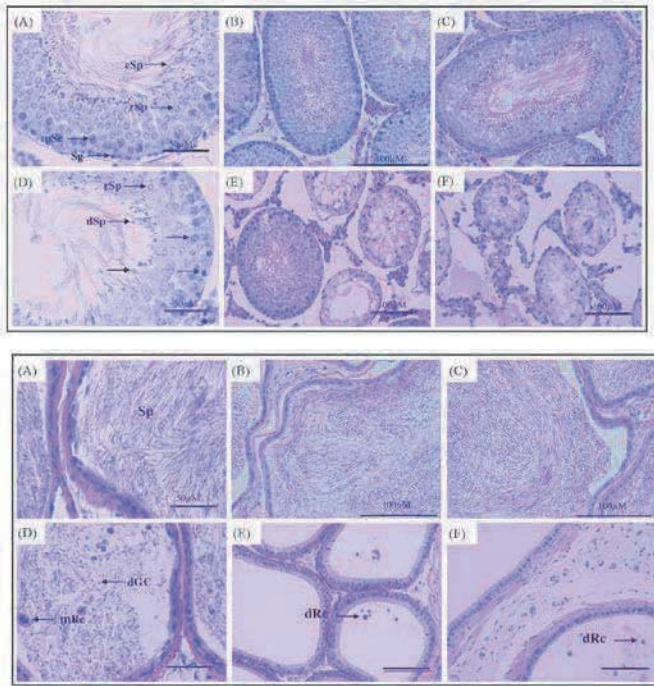


図 20. 正常および TG ラットにおける精巣および精巣上体の組織化学。上段には 3 ヶ月、6 ヶ月および 12 ヶ月齢の正常 (A-C) および TG (D-F) ラット精巣の切片のヘマトキシリン/エオシン(HE)染色像を示した。3 ヶ月、6 ヶ月および 12 ヶ月齢の正常 (G-I) および TG ラット (J-L) 精巣上体の HE 染色像を示した。略語：精原細胞(Sg)、パキテン精母細胞(pSc)、精子(Sp)、円形精子(rSp)、伸長精子細胞(eSp)、成熟多核円形精子細胞(mRc)、変形円形精子細胞(dRc)が含まれる。

## 2) 雄性不妊の原因機序

TG ラットの精巣において、組み込んだ遺伝子 (HHV1-TK) の発現物を解析すると、HHV1-TK のエクソン部分に存在する領域がプロモーターとなって、その下流からの転写が起こり (異所性の発現)、N 末端部分の一部を欠損した HHV1-TK タンパク質が生成することを明らかにした。その後、TG ラットの精巣で起こる分子的な変化の解析を含めて、機序不明の部分もあるが、以下の様に推定した。①円形精子細胞で、異所性に HHV1-TK タンパク質が生成し、②精子形成において頭部や尾部などの形成不全となり、③このことで不妊を呈し、④さらに HHV1-TK の影響により、細胞間接着に関わる因子の発現レベル

に異常をもたらさら、⑤精細管は、最終的に精原細胞までもが消失し Sertoli cell のみが残る (図 20) ことになる。

3) ヒト男性におけるヘルペスウイルス感染者ではどうなのか：ヘルペスウイルス (HHV) の DNA が存在するのかどうかの解析が世界各地で行われている。HHV 感染と不妊との関連を疑っている研究者達がいるということである。我々は、中国の研究者と協力して、同じような実験を行った。その結果、ヒト雄性不妊患者の半数以上の精液に HHV の DNA を検出することができた。しかし、これだけでは、仮説の証明にはならない。HHV1-TK の転写物 (mRNA) とその翻訳物 (タンパク質) が実際の HHV1 感染者に見つかれば、より強い証拠になる。

そこで、両者の確認を行った。その結果、30 人の感染者のうち、22 人について HHV1-TK の mRNA とタンパク質の両者を確認することができ、仮説の検証をさらに進めることができた (論文投稿中、図 21)。TG ラットは全ての精細管内で HHV1-TK 陽性であったが (ゲノム上に組み込まれているため)、ヒト HHV1 感染者を見ると、一部の精細管でのみ陽性シグナルを示しており、体外受精による人工妊娠の成功例も認められた。

M6 (Johnsen's score: 10)

M8 (Johnsen's score: 5)

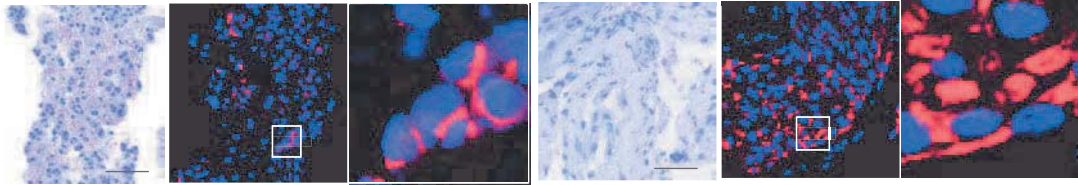


図 21. 生検したヒト無精子症患者精巢の組織学および免疫染色。ヘマトキシリンおよびエオシン染色（左パネル）、ヘルペスウイルス 1-チミジンキナーゼ（HHV1-TK、中および右パネル）の免疫染色。赤、HHV1-TK 染色；青、核、DAPI 染色。代表的な画像とそれぞれの Johnsen のスコア値（Johnsen' s score）を示した。右側のパネルは、それぞれの中央のパネルの白枠の部分を拡大したもの。バー：100  $\mu$ m。

このことは、HHV1 感染男性における不妊との因果関係に決着をつけるものではない。しかし、TG ラットのそれとを比較すると、このヒトでの結果は、感染者における HHV1-TK 合成が十分でない時期には、受精能を持つ精子の生存がまだあるためとも考えられる。

こうした HHV1 感染と雄性不妊との因果関係に決着をつけるには、HHV1-TK の精巢における標的分子を同定すること、さらにその分子と精子形成との関連を明らかにすることである。現在、組換え体 HHV1-TK を発現するプラスミドの作製を終え、酵素活性の測定系も準備している。活性のある組換え体の調製を始めているところで、この酵素標品を使って、精巢の可溶性画分を用いた標的分子探索を展開する予定である。

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. *Journal of Neuroendocrinology*: DOI: 10.1111/jne.12570; . 2018.

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29356182>
2. Yoshida S, Ueharu H, Higuchi M, Horiguchi K, Nishimura N, Shibuya S, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y.  
Molecular cloning of rat and porcine retina-derived POU domain factor 1 (POU6F2) from pituitary cDNA library. *Journal of Reproduction and Development*, 60: 288-294. 2014.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/4/60\\_2014-023/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/4/60_2014-023/_pdf)
  3. Ueharu H, Higuchi M, Nishimura N, Yoshida S, Shibuya S, Sensui K, Kato T, Kato Y.  
Expression of kruppel-like factor 6, KLF6, in rat pituitary stem/progenitor cells and its regulation of the PRRX2 gene. *Journal of Reproduction and Development*, 60: 304-311. 2014.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/4/60\\_2014-037/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/4/60_2014-037/_pdf)
  4. Yoshida S, Kato T, Nishimura N, Kanno N, Chen M, Ueharu H, Nishihara H, Kato Y.  
Transcription of follicle-stimulating hormone subunit genes is modulated by porcine LIM homeobox transcription factors, LHX2 and LHX3. *Journal of Reproduction and Development*, 62: 241-248. 2016.
  5. Moriyama R, Yamazaki T, Kato T, Kato Y.  
Long-chain unsaturated fatty acids reduce the transcriptional activity of the rat follicle-stimulating hormone  $\beta$ -subunit gene. *Journal of Reproduction and Development*, 62: 195-199. 2016.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853521>
  6. Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T, Kato Y.

- PRRX1 and PRRX2 distinctively participate in pituitary organogenesis and cell supply system. *Cell and Tissue Research*, 357: 323-335. 2014.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770895>
7. Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T, Kato Y.  
PRRX1- and PRRX2-positive mesenchymal stem/progenitor cells are involved in vasculogenesis during rat embryonic pituitary development. *Cell and Tissue Research*, 361: 557-565. 2015.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795141>
  8. Chen M, Kato T, Higuchi M, Yoshida S, Yako H, Kanno N, Kato Y.  
Coxsackievirus and adenovirus receptor-positive cells compose the putative stem/progenitor cell niches in the marginal cell layer and parenchyma of the rat anterior pituitary. *Cell and Tissue Research*, 354: 823-836. 2013.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24057874>
  9. 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 and Tissue Research*, 359: 755-766. 2015.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25480420>
  10. 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 Research*, 370: 99–112.

2017.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28660300>

11. 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 and Tissue Research*, 364: 273-288. 2016.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26613603>

12. 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 and Tissue Research*, 372: 77-90. 2018.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29130118>

13. 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.

<http://dx.doi.org/10.1111/joa.12572>

14. Daikoku S, Kawano H, Abe K, Yoshinaga K.

Topographical appearance of adenohypophysial cells with special reference to the development of the portal system. *Archivum histologicum Japonicum*, 44: 103-116. 1981.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6797381](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6797381)

15. Yoshida S, Kato T, Yako H, Susa T, Cai LY, Osuna M, Inoue K, Kato Y. Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem/progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary. *Journal of Neuroendocrinology*, 23: 933-43. 2011.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21815952>
16. Higuchi M, Kanno N, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Yako H, Shibuya S, Sekita M, Tsuda M, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y. GFP-expressing S100 $\beta$ -positive cells of the rat anterior pituitary differentiate into hormone-producing cells. *Cell and Tissue Research*, 357: 767-779. 2014.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24842050>
17. Horiguchi K, Higuchi M, Yoshida S, Nakakura T, Tateno K, Hasegawa R, Osako S, Kato T, Kato Y. Proton receptor GPR68 expression in dendritic cell-like S100 $\beta$ -positive cells of rat anterior pituitary gland: GPR68 induces interleukin-6 gene expression in extracellular acidification. *Cell and Tissue Research*, 358: 515-525. 2014.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129106>
18. Horiguchi K, Fujiwara K, Yoshida S, Higuchi M, Tsukada T, Kanno N, Yashiro T, Tateno K, Osako S, Kato T, Kato Y. Isolation of dendritic cell-like S100 $\beta$ -positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell and Tissue Research*, 357: 301-308. 2014.
19. Horiguchi K, Fujiwara K, Higuchi M, Yoshida S, Tsukada T, Ueharu H, Chen M, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T,



Kato Y.

Expression of chemokine CXCL10 in dendritic cell-like S100 $\beta$ -positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell and Tissue Research*, 357: 757-765. 2014.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770897>

20. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 480: 273-279. 2016.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765629>

21. Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yoshida S, Higuchi M, Tateno 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 and Tissue Research*, 364: 395-404. 2016.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26572542>

22. 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 Research*, 17: 318-329. 2016.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596959>

23. 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.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29684040>
24. Yoshida S, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Tsuda M, Nishihara H, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y.  
Characterization of murine pituitary-derived cell lines Tpit/F1, Tpit/E and TtT/GF. *Journal of Reproduction and Development*, 60: 295-303. 2014.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24881870>
25. 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 and Tissue Research*, 371: 339-350. 2017.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29274061>
26. 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 and Tissue Research*, 369: 353-368. 2017.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28364143>

分担課題：エピジェネティクスを利用した有用細胞の同定法および  
樹立法の確立

分担者：大鐘 潤

成果の概要

脳下垂体および下垂体ホルモン標的組織での DNA メチル化を中心としたエピゲノム解析・改変により、脳下垂体および関連組織の DNA メチル化プロファイルを取得し、下垂体ホルモン標的組織でのエピゲノム改変により以下の知見が得られた。1) 脳下垂体での幹前駆細胞およびホルモン産生細胞の主要遺伝子について、バイサルファイト法による DNA メチル化解析を行い、細胞種特異的 DNA メチル化パターンを同定した。2) 脳下垂体で発現する主要遺伝子について、脳下垂体とその他の組織を比較することで DNA メチル化プロファイルを作成し、脳下垂体およびその構成細胞を他の細胞と区別する方法を確立した。3) 下垂体ホルモンの標的組織の一つである骨格筋において、筋分化を抑制するミオスタチン(*MSTN*) 遺伝子のプロモーター上流に同定した長鎖非コード(linc)RNA をアンチセンスオリゴ DNA によって阻害することでエピジェネティックなプロモーター活性阻害が起きることを同定した。

以上、脳下垂体の発生および機能に関わる遺伝子群の DNA メチル化プロファイルを取得して他の組織と比較することで脳下垂体に存在する各細胞種の同定法を確立し、下垂体ホルモンの標的組織の一つである骨格筋においては lincRNA を介したエピゲノム制御により筋分化関連遺伝子の転写調節を行うことができることを見出した。これによりエピゲノム改変による有用細胞樹立の