

齧歯類下垂体における神経堤細胞の組織化学的解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-07-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 上春, 浩貴 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/19576

2017年度 農学研究科

博士学位請求論文（要旨）

齧歯類下垂体における神経堤細胞の組織化学的解析

The studies for neural crest cell in the rodent's pituitary gland

生命科学専攻
上春 浩貴

1. 研究の背景と目的

下垂体は脳の直下に位置し、様々なホルモンを分泌し生体の恒常性を調節する内分泌器官であり、口腔上皮に由来する腺性下垂体(前葉・中葉)と、腹側間脳に由来する後葉から構成される。下垂体前葉は、成長ホルモン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモンと卵胞刺激ホルモンが存在し、生体の状況に応じ、各ホルモン産生細胞がホルモン分泌を行う。ホルモン分泌には、視床下部からの下垂体ホルモン制御ホルモンによる制御と、下垂体ホルモン標的器官からの負のフィードバックによる制御を受けている。このとき、下垂体ホルモン産生細胞は生体の状況に応じて細胞数を変化させる。

ホルモン産生細胞は幹細胞から供給される事が知られている。幹細胞とは、未分化な状態の細胞で、分裂能を有し、最終分化細胞への分化能を有する細胞である。しかし、成体下垂体幹細胞がホルモン産生細胞を供給する、下垂体細胞新生には未だ不明な点が多い。そこで、本学位論文では、下垂体細胞新生に関与する成体下垂体幹細胞を標識する指標を見出し、細胞新生に関与するか解析を行うことを目的とした。

2. 構成および各章の要約

本学位論文は、下垂体形成とホルモン産生細胞を供給する細胞として神経堤細胞を新たに見出し、その時空間的な局在と特徴の解析を展開させたものである。本論文は4章から構成されている。

第1章は研究の背景である下垂体の発生と下垂体幹細胞研究を概説した。下垂体発生初期はホルモン産生細胞が存在せず、SRY(Sex determining region Y)-box 2(SOX2)陽性の未分化細胞のみで構成され、分化の進行に伴いホルモン産生細胞が出現する。そのため、下垂体ホルモン産生細胞はSOX2陽性細胞が分化する事で出現する。また、成体下垂体にもSOX2陽性細胞が存在しており、近年では、Sox2^{CreERT2/+}/R26^{YFP/+}マウスによる成体下垂体SOX2陽性細胞の運命追跡実験により、SOX2陽性細胞が成体下垂体ホルモン産生細胞を供給する事が示された。このことから、SOX2陽性細胞が成体下垂体幹細胞である事が示唆された。しかし、下垂体細胞新生は非常に遅い一方で、SOX2陽性細胞は成体前葉に存在する全細胞の約10%を占める。そのため、SOX2陽性細胞の多くは分化の進行した前駆・コミットメント細胞で、SOX2陽性細胞の一部が幹細胞と考えられる。そこで、下垂体細胞新生機構を解明する上で、下垂体幹細胞を標識する新たな特徴を見出す事が必要である。

下垂体発生過程で形成される遺残腔に面する第1層であるMarginal Cell Layer(MCL)には、SOX2陽性細胞が集中して存在する。このMCLに着目すると、胎仔期MCLには存在しないS100 calcium-binding

β (S100 β)陽性細胞が、成体 MCL のおよそ 74%を占めていた。このことから、SOX2/S100 β 陽性細胞は成体下垂体幹細胞として機能している事が考えられる。S100 β 陽性細胞は胎仔期下垂体血管形成に伴い下垂体に侵入し、さらに胎仔期 S100 β 陽性細胞の約 40%が神経堤細胞マーカー p75^{NTR} 陽性である事が報告されている。このことから、S100 β 陽性細胞の一部は外部から侵入した神経堤細胞である可能性が示唆された。

第 2 章は、神経堤細胞の概説と、神経堤細胞の一種である SOX10 系譜の神経堤細胞の時空間的な局在解析の結果を論じた。神経堤細胞は、神経管形成時に上皮間葉転換により移動能を獲得した細胞で、出現後は全身に大きく移動する。移動後は様々な組織に侵入し、その組織の細胞へと分化する事で組織形成に大きく関与する。さらに、神経堤細胞の一部は組織に侵入した後も多分化能を維持し、成体組織幹細胞として機能する事から、神経堤細胞が成体下垂体幹細胞として機能している可能性が考えられた。神経堤細胞は組織に侵入した後は組織細胞へ分化するため、その運命の追跡が困難な細胞である。また、全ての神経堤細胞で発現する遺伝子の報告はなく、神経堤細胞のみで発現する遺伝子も発見されていない事から、より神経堤細胞で限局的に発現する *Wnt1*, *Myelin protein zero (P0)*, *Human tissue plasminogen activator (HtPa)*, *SRY-box 10(Sox10)* が解析に利用されている。中でも *Sox10* は、神経堤由来組織でも発現している事が報告されている。そこで、神経堤細胞マーカーの一つである SOX10 に対する特異抗体を用いて、下垂体における SOX10 陽性細胞の時空間的な局在解析を行なった。

SOX10 陽性細胞は、出生直前下垂体後葉吻部に出現し、出生後には中葉、前葉にも局在が確認された。下垂体発生に伴い、後葉・中葉では SOX10 陽性細胞数の増減と下垂体の部位による局在の偏りが確認された。中葉の SOX10 陽性細胞は核が細長く、F-actin を形成していた事から、下垂体に存在する SOX10 陽性細胞は細胞移動能を有していると考えられ、外部から侵入した SOX10 陽性細胞が細胞移動により MCL へと移動している可能性が示唆された。さらに、時空間的な SOX10 陽性細胞の特徴解析では、未成熟な状態で侵入した SOX10 陽性細胞が S100 β 陽性細胞へと分化する事が示唆された。前葉では常に少数の SOX10 陽性細胞が存在するのみだが、全ての SOX10 陽性細胞が S100 β 陽性であった。さらに、下垂体前駆細胞でのみ発現する転写因子 *Prophet of pit1(Prop1)* と共存する SOX10 陽性細胞が存在していた事から、ホルモン産生細胞への分化能を有している事が示唆された。

本章の結果より、SOX10 陽性細胞は前葉、中葉、後葉に存在し、それぞれの葉の細胞へと分化する可能性が見出された。さらにその局在を解析・考察する事で、後葉に存在する細胞が中葉・前葉へと移動する可能性が示唆された。

第 3 章では、神経堤細胞と神経堤由来細胞を追跡する事を可能にした Cre/LoxP システムを概説した後に、*P0-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウス(以降 *P0-Cre/EGFP* マウス)を用いた、P0 系譜の神経堤細胞の追跡実験を行った結果を論じた。第 2 章の SOX10 の特異抗体による局在解析の結果では、SOX10 陽性細胞が分化し *Sox10* の発現を消失させた後の細胞の解析を行う事が出来ず、下垂体ホルモン産生細胞へ分化するかは不明であった。このことから、遺伝子改変動物を用いた運命追跡実験が必要であると考えた。

近年、Davis らは、神経堤細胞を追跡する *P0-cre* マウスと *Wnt1-Cre* マウスを用いた解析によって、神経堤細胞が下垂体に侵入し下垂体血管形成に関与する事を示した。Davis らはホルモン産生細胞と神経堤細胞の関係を解析していないが、*P0-Cre* マウスの組織像を観察すると、血管形成が開始される E14.5 以前に既に神経堤細胞が侵入している事を示していた。そこで、*P0-Cre/EGFP* マウスを用いて、神経堤細胞がホルモン産生細胞へと分化するか、成体下垂体幹細胞として機能するか解析を行なった。

P0-Cre/EGFP マウスは、神経堤細胞と神経堤由来細胞を GFP で標識するマウスである。この GFP 陽性細胞の局在を確認すると、GFP 陽性細胞は下垂体の発生が開始する胎齢 9.5 日 (E9.5) で下垂体に侵入後、下垂体幹細胞へと分化転換し、後に全てのホルモン産生細胞へと分化する事が示された。さらに、下垂体胎仔期血管形成に伴い、大量の GFP 陽性細胞が下垂体に侵入し、これらの細胞の一部は血管系細胞の特徴を有していた。出生後 7-21 日 (P7-P21) の、下垂体細胞の分化と増殖が顕著な時期 “Growth Wave” では、GFP 陽性細胞の顕著な増殖は確認されず、P30 から P60 の間で GFP 陽性細胞の割合が増加していた。興味深い事に、SOX2/GFP 陽性細胞も P30 から P60 の間でその割合を増加させていた。S100 β との共存を解析すると、一部の S100 β 陽性細胞のみが GFP 陽性細胞であった。このことから、S100 β 陽性細胞は少なくとも P0 系譜の神経堤細胞でないことが示された。

本章の結果より、神経堤細胞は下垂体発生初期より下垂体形成に関与しており、侵入後には幹細胞へ分化転換し、ホルモン産生細胞を供給している事が示された。さらに SOX2 陽性神経堤細胞が成体下垂

体では割合が増加している事も非常に興味深い。今後、*P0-Cre/EGFP* マウスを用いて生体の状況を変化させた際の神経堤細胞の挙動を詳細に解析する事で、幹細胞を標識する新たな指標となり得るか明らかになる事が期待される。

第4章では、本研究の総括と今後の研究の展望について述べた。本研究により、神経堤由来 SOX2 陽性細胞が前・中・後葉に存在しており、それぞれの細胞を供給している可能性が示された。また、後葉から侵入した神経堤細胞が中葉・前葉へと移動している可能性も考えられた。従来の下垂体前葉における幹細胞研究では、中葉と後葉に焦点を当てて解析されておらず、3葉を網羅的に解析している報告はない。本学位論文の結果は、3葉を網羅的に解析する必要性を示しており、その研究の発展につながると期待するものである。

また、神経堤細胞研究においても下垂体に神経堤細胞が存在していることは有意義であると考えられる。これまで、神経堤細胞学者の間では神経堤細胞が腫瘍の原因細胞でないかと議論されてきたが、決定的な報告は未だない。それは、腫瘍を自然発生させる事の困難さが関係していると考えられる。下垂体は頻繁に腫瘍を形成する組織で、原発性脳腫瘍の約17%が下垂体腫瘍との報告がある。*P0-Cre/EGFP* マウスを用いて自然発生した下垂体腫瘍を解析する事で、下垂体腫瘍が神経堤細胞由来か解析を行う事が可能なため、神経堤細胞と腫瘍の関連の解析に下垂体は適した組織だと考えられる。

本研究を遂行する事で、神経堤細胞は成体下垂体幹細胞を標識する新たな指標となり得る可能性、神経堤細胞が下垂体細胞新生に関与する可能性、さらに神経堤細胞と腫瘍の研究が進展する事が期待され、下垂体幹細胞研究と神経堤細胞研究の両分野における研究の発展に寄与する事が期待される。