

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

2018年 1月26日

「博士学位請求論文」審査報告書

審査委員（主査） 農学部 専任教授

氏名 加藤幸雄 印

（副査） 農学部 専任教授

氏名 渡辺寛人 印

（副査） 農学部 専任講師

氏名 乾雅史 印

1 論文提出者 上春 浩貴

2 論文題名

齧歯類下垂体における神経堤細胞の組織化学的解析

（英文題） The studies for neural crest cell in the rodent's pituitary gland

3 論文の構成

本論文は、以下の4章から構成されている。

第1章 本研究の背景と序言

第2章 下垂体に出現する神経堤細胞の一種であるSOX10系譜の時空間的な局在解析

第3章 *P0-Cre/CAG-CAT-EGFP*マウスを用いた下垂体における神経堤細胞の局在と特徴の解析

第4章 本研究の総括と今後の研究への展望

4 論文の概要

本学位論文は、生体の様々な機能を調節するホルモンを合成・分泌する下垂体について、その発生・分化と生後の組織維持の仕組みに関する研究を進めたものである。特に、外胚葉起源の口腔上皮から発生する下垂体の発生形成期に、起源を異にする細胞群、特に第4の胚葉とされる神経堤細胞系譜の細胞群が、胎仔期下垂体に侵入してこの組織の一部に定着するという新規の知見を組織化学的な手法を用いて解析した成果を述べたものである。本論文は4章から構成されている。

第1章では、本研究の背景として下垂体の発生・分化と下垂体幹・前駆細胞の過去から現在までの研究成果を概説している。特に21世紀になり、多分野の影響もあって下垂体の幹・前駆細胞研究が急速に進展している。発生初期の下垂体には、下垂体ホルモン産生細胞は存在せず、外胚葉神経組織の幹細胞の指標とされる SRY (Sex determining region Y)-box 2 (SOX2) 陽性細胞のみで構成され、その後、下垂体特異的転写因子である PROP1 が全ての SOX2 陽性細胞で発現を開始することが、先行研究で明らかにされている。分化の進行に伴い、SOX2 陽性の幹・前駆細胞からホルモン産生細胞が出現することも示されている。さらに、当該申請者も加わった研究で、下垂体の発達過程を種々の段階のマーカーとなるタンパク質（転写因子 PRRX1 及び PRRX2 や Ca 結合タンパク質である S100 β で調べると、幹・前駆細胞の種類と局在が刻々と変化することが示された。その研究過程で、外胚葉起源の下垂体組織の中に組織の周辺の細胞（間葉系やその他の細胞）が進入することを観察していた。その中に、第4の胚葉と言われる神経堤細胞系譜の細胞と思われる細胞（p75^{NTR} 陽性や一部の S100 β 陽性細胞）が存在していた。古い研究でも神経堤細胞系譜の細胞の進入が示唆されていることから、本研究で、最新の免疫染色方法や神経堤細胞を追跡できるトランスジェニックマウスを使った研究の展開が計画された経緯が述べられている。

第2章では、まず、神経堤細胞の概要を説明している。神経堤細胞は、各種の臓器に分化する三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）とは異なる細胞で、古くから神経管形成時に上皮間葉転換により移動能を獲得し、全身に大きく移動する細胞として知られていた。しかし、その重要性は必ずしも広く認知されていなかった。最近では、移動して様々な組織に侵入し、その組織の幹・前駆細胞として定住することでその組織形成・維持に貢献していることが示されている。本章では、神経堤細胞の概要と、これらが単一の細胞系譜ではなく、種々の系譜があることを文献調査に基づいてまとめている。本章では、免疫組織化学として用い得る抗体を考慮して、神経堤細胞系譜の細胞のマーカーとされる転写因子 SOX10 の解析を行った結果を述べている。

本章の研究は、SOX10 陽性細胞の下垂体における時空間的な局在を解析している。その結果、SOX10 陽性細胞は、出生直前に視床下部の正中隆起と下垂体後葉吻部をつなげる下垂体茎に初めて確認され、やがて後葉尾側にも確認されるようになる。このことから侵入経路は、視床下部であろうと考えられた。出生後には中葉、前葉にも局在が確認され、その数と局在の変動が認められた。特に、中葉の細胞は核が細長く移動能を示すことを観察している。その過程で、SOX10 陽性細胞は、S100 β に陽性となることを観察している。少数の SOX10 陽性細胞が存在する前葉では、全てが S100 β 陽性であり一部が PROP1 陽性であることを確認し、SOX10 陽性細胞が下垂体幹・前駆細胞の特徴を獲得していることを初めて確認している。

第3章では、神経堤系譜の細胞が下垂体に侵入して幹・前駆細胞様の細胞として定着するという第2章の結果を証明するために、熊本大学の村山研一教授らによって作製さ

れた *P0-Cre/CAG-CAT-EGFP* マウス (*P0-Cre* マウス)を用いた研究を展開している。このトランスジェニックマウスでは, *P0* タンパク質プロモーター:Cre/LoxP システムにより, 神経堤由来細胞を蛍光タンパク質 (GFP 陽性) で標識した細胞として追跡可能である。

その結果, GFP 陽性細胞は下垂体の発生が開始する胎齢 9.5 日 (E9.5) でこの組織に侵入し, 下垂体幹細胞の特徴を獲得したことを観察した。その後に全種のホルモン産生細胞へと分化し, 組織像から細胞数を計測すると, それぞれの細胞種の 5-10% 程度であることを示した。これとは別に, 下垂体胎仔期血管形成に伴い, 再度 GFP 陽性細胞が下垂体に侵入していることを観察している。これらの細胞は SOX2 陰性であり, 一部は血管系細胞の特徴を持つことを確認している。出生後の GFP 陽性細胞の割合を計測し, 外胚葉起源の口腔上皮系譜の細胞と異なる変動を示す結果を示していることから, 両系譜の細胞に質的な違いがある可能性を指摘している。また, 第 2 章で扱った SOX10 陽性細胞は S100 β を発現する様になったが, *P0* 系譜の細胞では, S100 β 陽性となるものはごく僅かであることを示し, 少なくとも *P0* 陽性細胞と SOX10 陽性細胞は異なる系譜の神経堤細胞であることを初めて明らかにした。

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ている。第 2 章と第 3 章の結果は, 神経堤細胞が下垂体の幹・前駆細胞の一部として定着し, ホルモン産生細胞や血管形成に関与していることを示した初めての報告であると総括している。本研究では, 充分に実証できていない外胚葉起源の口腔上皮系譜の細胞と神経堤系譜の細胞の質的な違いの可能性に言及し, 下垂体の急激な生理状態の変化によるホルモン供給の要求や, 下垂体でしばしば発症する腫瘍との関係について考察し, 本研究の成果が突破口となる可能性を述べている。

最後に, 神経堤細胞を指標とする下垂体幹細胞の研究が下垂体研究の新展開につながることを, さらに, 神経堤細胞研究の分野へも下垂体研究が寄与することを期待して, 本学位請求論文を締め括っている。

5 論文の特質

本研究は, 組織の免疫染色と計測を時空間的に解析したものである。その結果は, 外胚葉口腔上皮を起源とする下垂体に, その発生・分化の初期から出生時にかけて起源の異なる神経堤系譜の細胞が侵入することを示している。胎仔期から出生後の下垂体組織を経時的に観察することで, 侵入する神経堤細胞が発現する因子を変えながら分化していることや, 指標となる分子を複数種使うことで, 異なる神経堤細胞が下垂体の別の箇所から侵入することなどを実証している。また, 組織像を数値化することで, 約 1 割を占める神経堤系譜の細胞と外胚葉口腔上皮系譜の細胞とが異なる変動を示すことを明らかにしている。免疫組織化学の手法を用いた解析を丹念に積み重ねて, 下垂体の発生・分化と細胞供給の機序の解明に貴重な新規の知見を引き出した点に,

本論文の特質がある。

6 論文の評価

本論文は、下垂体に起源の異なる神経堤系譜の細胞が侵入し、ホルモン産生細胞へと分化することを示した初めての論文であり、下垂体の発生・分化に関する研究として高く評価できる。また、下垂体の細胞供給機序の解明や、下垂体腫瘍の原因解明にも寄与すると思われる重要な知見を含んでいる点でも評価できるものである。本論文の研究内容の大半が、評価ある国際誌に既に発表されている。

7 論文の判定

本学位請求論文は、農学研究科において必要な研究指導を受けたうえ提出されたものであり、本学学位規程の手続きに従い、審査委員全員による所定の審査及び最終試験に合格したので、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定する。

以 上