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

明治大学大学院農学研究科

2017 年度

博士学位請求論文

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

学位請求者 生命科学専攻

上春 浩貴

目次

第1章	章 7	本研究	究の言	背景と	: 序言				•••••		•••••	•••••		· 5
1-1		はじ	めに								•••••	•••••		· 5
1-2		下垂	体と	は		•••••					•••••	•••••		• 5
1-3		下垂	体の	起源	と発生	-					•••••	•••••		• 8
1-4		ホル	モン	産生活	細胞の	系譜と	- 転写因-	₹•		•••••	•••••	•••••		·12
1-5		ホル	モン	産生活	細胞を	:供給す	トる細胞			•••••	•••••	•••••		·15
1-6		下垂	体の	幹・i	前駆糾	胞				•••••	•••••	•••••	•••••	·16
	1-6-	1 車	全細席	包とは	t	••••				•••••	•••••	•••••		·16
	1-6-	2 S	ide	popu	latio	n (SP)	細胞	•••••		•••••	•••••	•••••		·18
	1-6-	-3 S	OX2	陽性絲	田胞群						•••••	•••••		$\cdot 21$
	1-6-	4 7	「垂体	本幹維	胞の	性質の	変化				•••••	•••••		$\cdot 25$
		1-6-	4-1	S100	β陽性	E細胞	•••••				•••••	•••••		$\cdot 25$
		1-	6-4-	1-1	S100	3陽性約	細胞とは				•••••	•••••	•••••	$\cdot 25$
		1-	6-4-	1-2	下垂	体発生	過程での	S100	3陽性	細胞の	の局在	Ē		$\cdot 28$
		1-6-	4-2	MCL	の性質	質の変合	化				•••••	•••••		$\cdot 32$
1-7		下垂	体幹	細胞	におけ	る本研	肝究の課題	顉			•••••	•••••	•••••	·34

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 ………35

2-2	神	経堤細胞
	2-2-1	神経堤細胞とは
	2-2-2	神経堤細胞の歴史
	2-2-3	神経堤細胞の様々な組織への関与
	2-2-4	神経堤細胞の出現とプラコード由来組織40
	2-2-5	神経堤幹細胞
2-3	本	章での課題
2-4	材	料及び実験方法45
	2-4-1	用いた神経堤細胞マーカー
	2-4-2	試料動物
	2-4-3	RNA 抽出と cDNA Library の合成
	2-4-4	Real-time PCR
	2-4-5	蛍光免疫組織化学
	2-4-6	抗 SOX10 抗体の吸収実験
2-5	結	果53
	2-5-1	下垂体における Sox10 遺伝子の発現量の解析
	2-5-2	抗 SOX10 抗体の評価
	2-5-3	S0X10 陽性細胞の時空間的局在解析
	2-5-4	SOX10 陽性細胞の移動能の解析
	2-5-5	SOX10 陽性細胞と S100βの共存
	2-5-6	出現直後の SOX10 陽性細胞の未分化能の解析
2-6	考	察

第3章 PO-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	
-----------------------	--

3-1	第	3章の概要 ······82
3-2	Cr	e/LoxP システムを用いた運命追跡実験83
	3-2-1	Cre/LoxP システムとは83
	3-2-2	下垂体における Cre/LoxP システムを用いた
		神経堤細胞の解析86
3-3	生	理状態の変化に伴う下垂体細胞構成の変化
3-4	本	章での課題
3-5	材	料及び実験方法
	3-5-1	試料動物
	3-5-2	蛍光免疫組織化学 ····································
	3-5-3	マウス副腎除去 ·····95
	3-5-4	RNA 抽出と cDNA Library の合成
	3-5-5	Real-time PCR95
	3-5-6	細胞計測、統計処理96
3-6	結	果
	3-6-1	胎仔期に下垂体に侵入する GFP 陽性細胞
	3-	6-1-1 胎仔期に侵入した GFP 陽性細胞と下垂体幹細胞 …100
	3-	6-1-2 胎児期に侵入した GFP 陽性細胞と
		下垂体ホルモン産生細胞102
	3-	6-1-3 胎児期に侵入した GFP 陽性細胞と血管系細胞 …104
	3-6-2	出生後の下垂体における GFP 陽性細胞の局在106

3-6-2-2 ホルモン/GFP 2 重陽性細胞の局在解析	111
3-6-2-3 出生後下垂体における GFP 陽性細胞の分裂能の解	硚 …114
3-6-3 S100β/GFP 2 重陽性細胞の解析	117
3-6-4 生体の状況を変化させた際の下垂体における	
GFP 陽性細胞の解析	119
3-7 考察	121

第4章	本研究の	総括と今	後の研究	への展望		 126
結語					 	 128
謝辞					 •••••	 129
引用文南	ť				 	 131

第1章 本研究の背景と序言

1-1 はじめに

本学位論文は、下垂体を構成する細胞として新たに明らかとなった神経堤細 胞について述べている。下垂体発生過程では、神経堤細胞が複数回に亘って下 垂体に侵入しており、前葉・中葉・後葉を構成する細胞の一部へと分化してい ることを見出した結果である。第1章では本研究の主題となる下垂体の発生と 幹・前駆細胞からホルモン産生細胞の供給に関する知見について論じた。

1-2 下垂体とは

下垂体は間脳視床下部の直下に位置する内分泌器官であり、腺性下垂体 (前 葉・中葉)と神経性下垂体 (後葉)から構成されている。下垂体前葉は、骨 や筋肉に作用してタンパク質代謝を促進させる成長ホルモン (Growth Hormone; GH)、乳腺に作用して乳汁分泌を促進させるプロラクチン (Prolactin; PRL)、副腎皮質に作用してグルココルチコイドの産出を促す副腎 皮質刺激ホルモン (Adrenocorticotropic Hormone; ACTH)、甲状腺に作用して 甲状腺ホルモン (チロキシン)の産出を促進する甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating Hormone; TSH)、卵巣や精巣に作用してテストステロンやエストロ ジェンなどの性ホルモンの産出を促進する黄体形成ホルモン (Luteinizing Hormone; LH)と卵胞刺激ホルモン (Follicle-stimulating Hormone; FSH)をそ れぞれ分泌することで生体機能の調節を行っている。中葉は、メラニン細胞刺 激ホルモン (Melanocyte-stimulating Hormone; MSH)を分泌することで体色の 変化や色素洗着を調節している。これらのホルモンは、GH 産生細胞、PRL 産生 細胞、ACTH 産生細胞、TSH 産生細胞、LH/FSH 産生細胞、MSH 産生細胞からそれ ぞれ分泌されている。一方で、後葉にはホルモンを産生する細胞が存在せず、 アストロサイトの一種である Pituicyte が全細胞の 87%を占める(Wei et al. 2009)。後葉の機能は、視床下部に存在する神経細胞が分泌顆粒を持つ神経終末 を後葉へ伸ばし、ペプチドホルモンであるオキシトシン (Oxytocin; OXT) と バソプレシン (Vasopressin; VT)を放出する。オキシトシンは子宮の収縮を 促し、バソプレシンは抗利尿ホルモンとしてそれぞれ機能している。

前葉ホルモンは、視床下部からの様々な刺激によりホルモンの合成・分泌が 制御され、さらに、前葉ホルモンの標的器官が産出するホルモンや生理活性物 質による視床下部と下垂体への負のフィードバック機構が存在する。このこと で、視床下部-下垂体-標的器官軸による制御系(調節系)が形成されている(図 1-1)。



図 1-1. 視床下部-下垂体-標的器官軸

下垂体は視床下部からの下垂体ホルモン放出ホルモンを受容することで下垂体 ホルモンを分泌する。分泌されたホルモンはそれぞれの標的器官へと血管を通 じて輸送される。下垂体ホルモンを受容した標的器官によって生成された末梢 物質は、視床下部と下垂体へ負のフィードバックを働きかけることで、過剰な ホルモン生成を抑制する。

図は明治大学農学部生命科学科遺伝情報制御学研究室で作成。

1-3 下垂体の起源と発生

下垂体の発生は、発生初期(マウス E9.5; ラット; E11.5)に、腺性下垂体と 神経性下垂体でそれぞれ異なる起源に由来する組織によって開始される。腺性 下垂体は、下垂体プラコードと呼ばれる、肥厚化した表皮外胚葉を起源とする 口腔上皮が背側へ陥入することで発生が開始する。一方、神経性下垂体では、 神経管が閉塞し、前脳、中脳、菱脳に別れた後に、間脳視床下部の一部(腹側間 脳)が腹側に折れ込むことで発生が開始される。口腔上皮は陥入後に下垂体原基 である Rathke's Pouch(ラトケ嚢)を形成し、盛んな細胞分裂と細胞移動を繰 り返すことで腹側に前葉、背側に中葉を形成する。ラトケ嚢形成に際して、ロ 腔上皮の腹側第一層の細胞集団は、ラトケ嚢の遺残腔に面した第一層(Marginal Cell layer;MCL)に定着し、成体下垂体にも存在している。後葉は、ラトケ嚢に 覆いかぶさるように折れ込み、中葉背側と接するように形成される。下垂体は 出生後にも形成が進むことが知られており、特に出生後7-21 日までの(P7-P21)、 盛んな細胞分裂と細胞分化による下垂体組織の拡張が行われる期間のことを下 垂体 Growth Wave と呼ぶ(図1-2)(Davis et al. 2010; Gremeaux et al. 2012; Vankelecom and Chen 2014; Ward et al. 2006; Zhu et al. 2007)。

下垂体の形成は、腺性下垂体と神経性下垂体がそれぞれ独立して発生するの ではなく、両組織の接触や成長因子、それによって誘導される転写因子による 時空間的な制御が重要であることが明らかとなっている。口腔上皮が陥入しラ トケ嚢を形成する際には、Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)、Fibroblast Growth Factor 8/10 (FGF8/10)、Wnt5a が間脳から分泌され、腹側への濃度勾配 を生じることで、細胞分裂と口腔上皮の陥入を促進させる。また、口腔上皮の 腹側では Sonic hedgehog (Shh)が発現し、BMP4/FGF ならびに BMP2/SHH の勾配 により細胞分化に関与する転写因子の発現パターンが決定し、それぞれのホル モン産生細胞への分化へ誘導する(図1-3)。



図 1-2. 下垂体発生

(A)マウス胎齢9.5日(マウスE9.5;ラットE11.5)の矢状面での模式図。(B)下垂体発生の模式図。マウスE9.5からE19.5(ラットE11.5からE21.5)は矢状面、 P7以降は冠状面の模式図を示した。将来の前葉・中葉となる口腔上皮を青色で、 将来の後葉となる神経上皮を黄色で示した。出生後7日から21日までの期間に、 下垂体は著しい細胞分裂と細胞分化によって拡張される。この期間のことを下 垂体 Growth Wave と呼ぶ。口腔上皮の腹側第1層の細胞層は、ラトケ嚢形成時 に遺残腔に面するように成熟後まで存在しており、この細胞層を Marginal Cell layer (MCL)と呼ぶ。MCL は赤色で示した。図は明治大学農学部生命科学科遺伝情 報制御学研究室で作成。



図 1-3. 下垂体発生に関連する遺伝子群

下垂体の発生は、赤で示す下垂体プラコードを起源とする口腔上皮と青で示す 神経上皮がそれぞれ発現する成長因子や接触による Interaction によって制御 されている。マウス E8.5 (ラット E10.5)では、神経上皮より分泌される BMP-4 やWnt5a、FGF8/10/18 を受容した口腔上皮は細胞増殖の増加と陥入が誘導され、 ラトケ嚢が形成される。文献(Zhu et al. 2007)より許諾を得て掲載。 1-4 ホルモン産生細胞の系譜と転写因子

下垂体前葉は 6 種類のホルモンを分泌し生体の機能を調節しているが、これ らホルモンを産生する細胞は 5 種類存在している。この 5 種類のホルモン産生 細胞は大きく分けて 3 つの系譜に分類されている(図 1-4)。

最初に出現する系譜は、ACTH を産生するコルチコトロフ系譜である。この細 胞系譜は最も早く出現するホルモン産生細胞で、ラット E14.5(マウス E12.5)に 前・中葉で ACTH の前駆体である *Pre-opiome1anocatrin (Pomc)*の発現が開始され る。翻訳された POMC が切断されることにより、ACTH や MSH が産出される (Bicknell 2008)。 *Pomc* の発現には、Basic helix loop helix 型転写因子 *NeuroD1(BETA2*)や、T-box 転写因子 *Tpit (Tbx19)*、bicoid ホメオドメイン転写 因子 *Ptx* ファミリーの関与が明らかとなっており、いずれもホルモン産生細胞 への分化に寄与している。

二つ目の系譜は、GH を産生するソマトトロフ、PRL を産生するラクトトロフ、 TSH を産生するサイロトロフである。この3種類のホルモン産生細胞は分化過程 で *Pit1(Pou1f1)*を発現することから Pit1 系譜と呼ばれる。*Pit1* は下垂体特異 的転写因子で、成長遅延を示す *Sne11* マウス (*Pit1 変異マウス*)の原因遺伝子 として同定され、このマウスではソマトトロフ、ラクトトロフ、サイロトロフ が欠損することから、細胞分化に *Pit1* が必須であることが示されている(Li et al. 1990; Lin et al. 1994)。*Pit1* はラット E15.5 より発現が開始され、*Zn-15* を発現することでソマトトロフへ、エストロジェンレセプター (*ER*)を発現する ことでラクトトロフへ、*Gata2*を発現することでサイロトロフへそれぞれ分化誘 導される。TSH はサイロトロフが産生する TSHβ鎖サブユニットと、サイロトロ フと後述するゴナドトロフがそれぞれ産生するα鎖サブユニットによって構成 されている。 三つ目の系譜は、LH・FSH を産生するゴナドトロフである。ゴナドトロフは、 LHβ鎖サブユニット、FSHβ鎖サブユニット、α鎖サブユニットをそれぞれ産生し ており、α鎖サブユニットと LHβ鎖サブユニットが融合して LH を、α鎖サブユ ニットと FSHβ鎖サブユニットが融合して FSH をそれぞれ産生する、一つの細胞 から LH、FSH の 2 種類のホルモンを分泌する唯一の下垂体ホルモン産生細胞で ある。ラットでは、E18.5-E19.5 でその局在が開始される。ゴナドトロフは SF-1 (NR5A1)や GATA2 などによって分化が誘導されていることが知られている。



図 1-4. 下垂体ホルモン産生細胞とその系譜

下垂体は、Pitx1や Sox2を発現している細胞が下垂体幹細胞とされており、前 駆細胞では下垂体でのみ発現する転写因子 Prop1を発現する。その後、Tbx19や NeuroD1を発現する細胞はコルチコトロフ系譜、Pit1を発現する細胞は Pit1系 譜、Sf1などを発現する細胞はゴナドトロフ系譜へと分化する。図は明治大学農 学部生命科学科遺伝情報制御学研究室で作成したものを改変した。

1-5 ホルモン産生細胞を供給する細胞

ロ腔上皮陥入時には、下垂体ホルモン産生細胞は存在しておらず、全てのロ 腔上皮細胞が SRY (Sex determining region Y)-box2 (SOX2) 陽性である。ラトケ 嚢形成に伴い、将来の隆起葉を除く全ての細胞で、下垂体でのみ発現する転写 因子 Prophet of Pit1 (Prop1)を発現するようになり、その後、各ホルモン産生 細胞が出現する (Yoshida et al. 2009)。すなわち、未分化な状態の SOX2 陽性 細胞がホルモン産生細胞へと分化している (Andoniadou et al. 2013)。このよ うな、未分化な状態にあり、必要な時に最終分化細胞を供給する細胞を幹細胞 と呼び、近年では、発生や成体組織における細胞新生に幹細胞が大きく寄与し ていることが示されている (Barker et al. 2007)。

1-6 下垂体の幹・前駆細胞

1-6-1 幹細胞とは

幹細胞とは未分化な状態の細胞で、自己と同じ性質を持った細胞を分裂によ って生み出す能力(自己複製能)と、多種の細胞へ分化する能力(多分化能)を 有している細胞である(図 1-5)。発生の段階に応じて胚性幹細胞と成体幹細胞 に分類される。胚性幹細胞(ES 細胞; Embryonic Stem Cell)は胚発生初期に形 成される胚盤胞期の一部の細胞群、内部細胞塊より形成される幹細胞である。 ES 細胞は様々な成長因子や転写因子によって分化の方向性が決定付けられ、 内・中・外胚葉へと分類され、それぞれの組織を形成する。発生の進行に伴い その多能性を失っていくため、分類後には胚葉を超えた分化は行うことはない。 一方で、各組織を形成する過程で組織の起源となる細胞が成体にも残っている ことが知られており、この細胞を成体幹細胞と呼ぶ(Adult Stem Cell)。しか し、ES 細胞は胚葉を超えて分化する多能性(Pluripotency)を有しているが、成 体幹細胞は各組織に存在する特定の複数種に分化する能力(Multipotency)を 有しているのみで、ES 細胞のように、胚葉を超えた分化能は失っている。成体 幹細胞は組織細胞の代謝や組織が損傷した際の組織再生に大きく関与している ことが知られており、成体個体の生存に必要な細胞である(Barker et al. 2007)。



図 1-5. 幹細胞の性質とその分化機構

多分化能をもつ幹細胞は、不均等分裂を行うことによってその数を維持しつつ 前駆細胞を産出する。前駆細胞は更に分裂し、分化が方向付けられたコミット メント細胞、最終分化細胞へと分化する。図は明治大学農学部生命科学科遺伝 情報制御学研究室で作成した。

造血系や癌組織に代表されるように、組織から幹細胞を分画する代表的な実 験手法として Side population (SP) 分画法が知られている。この分画法は、高 い細胞透過性と DNA 結合能をもつ Hoechest33342 で処理した後にフローサイト メトリーを用いて解析を行うと、主集団 (Main population: MP) のほかに、 Hoechest33342 取り込み量の低い集団 (Side population: SP) が存在していた (Goodell et al. 1996)。MP 細胞群と SP 細胞群を比較して解析すると、SP 細胞 群は幹細胞で発現している遺伝子の発現量が高く、幹細胞様の性質を有してい ることが明らかとなった。この SP 細胞群は下垂体でも存在していることが報告 されており(Chen et al. 2005)、成体下垂体全分散細胞の 1.7 % が SP 細胞群で あった (図 1-6 A)。続いて Chen らは、SP 細胞における、幹細胞の性質の一つ である自己分裂能を解析した。単一細胞が分裂して形成される Sphere は幹細胞 の分裂能の解析に用いられており、この Sphere 形成アッセイによって解析した ところ、SP 細胞群は高い分裂能を有していた。加えて、MP 細胞群と SP 細胞群 を比較して遺伝子解析を行ったところ、SP 細胞群で Sox2、Homeobox Transcription Factor Nanog (Nanog), Spinocerebellar Ataxia Typel Protein (Scal)などの幹・前駆細胞マーカーと考えられる遺伝子の発現が顕著であった (Chen et al. 2005; Chen et al. 2006)。造血幹細胞の SP 細胞群では、さらに Scalの発現レベルによってもう一段階分画することが可能であり、Scalを高発 現している Scal high SP 細胞群が幹細胞性の高い細胞群であると報告されている (Wilson et al. 2007)。下垂体分散細胞では SP 細胞のおよそ 60%が Scalhigh であ った(図 1-6 B)。しかし、造血幹細胞とは異なり、Scalの発現量が低い SP 細胞 群(non-Scal^{high} SP 細胞群)が下垂体発生初期で高発現している遺伝子である Sox2, Prop1, HESX Homeobox 1(Hesx1), Paired Box 6 (Pax6), LIM Homeobox 4(Lhx4)を顕著に発現していた。Sca1^{high} SP 細胞群と non-Sca1^{high} SP 細胞群をそ れぞれ分画し Sphere 形成能を解析したところ、non-Sca1^{high} SP 細胞群でのみ Sphere 形成が認められた。さらにこの Sphere を用いてホルモン産生細胞への分 化誘導を行う事で、下垂体ホルモン産生細胞の全てに分化することが示唆され た (図 1- 6 C) (Chen et al. 2009)。以上の解析から、下垂体前葉の幹細胞を分 画する手法の一つとして、non Sca1^{high} SP 細胞群をフローサイトメトリーによ って分画することが有用であることが示された。



図 1-6. 下垂体における SP 細胞

(A)下垂体分散細胞に Hoechst33342 を取り込ませ、その取り込み量を測定すると、Hoechst33342 を多く取り込んでいる Main Population (MP)とあまり取り込んでいない Side Population (SP)が存在する。(B)下垂体 SP 細胞を更に Scalを指標に、Scal^{high}と non-Scal^{high}に分けることが可能である。(C) non-Scal^{high}細胞群は Sphere 形成後、ホルモン産生細胞へと分化する能力をもつ。図は文献(Chen et al. 2009)より許諾を得て、改変して掲載。

1-6-3 SOX2 陽性細胞群

下垂体 SOX2 陽性細胞は、下垂体発生に伴い、MCL には線上に、実質層では点 在して局在するようになる(図1-7)(Yoshida et al. 2009; Yoshida et al. 2011)。 Fauquir らは、成体下垂体 SOX2 陽性細胞は非ホルモン産生細胞であることを報 告しており、加えて、成体下垂体分散細胞より形成した Sphere の 98%は SOX2 陽 性であること、分化誘導することによって全ての下垂体ホルモン産生細胞へと 分化することから、SOX2 陽性細胞は成体下垂体の幹・前駆細胞であることを *in vitro* の実験で示した (Fauquir et al. 2008)。また、SOX2 陽性細胞が集中し て局在する MCL は、幹細胞の分化と維持を調整する場である幹細胞ニッチであ ると考えられている。

近年、Andoniadou らによって Sox2^{CretERT2+}/R26^{FPP-+}マウスを用いた成体下垂体 SOX2 陽性細胞の遺伝的運命追跡実験が行われた(図 1-8)(Andoniadou et al. 2013)。このマウスは Sox2 プロモーター下に Cre リコンビナーゼと変異エスト ロゲン受容体の融合タンパク質を結合させたマウス(Sox2^{CretERT2+})と、 Rosa26-LoxP-Stop-LoxP-YFPマウス(R26^{VPP-/})を交配させたマウスで、タモキシフ エンを投与した時に Sox2を発現している細胞でのみ、永久的に Yfpを発現する マウスである。マウス E11.5 でタモキシフェンを投与し P0 で YFP の局在を免疫 組織化学により解析を行うと、全てのタイプの下垂体ホルモン産生細胞の一部 が YFP を発現していた。このことから、 SOX2 陽性細胞はホルモン産生細胞へと 分化することが *in vivo* で初めて示された。続いて、4-6 週齢のマウスにタモキ シフェンを投与し 48 時間から 1 年間の追跡実験を行なった。すると、投与後 48 時間では YFP 陽性細胞のほとんどが SOX2 陽性細胞のままで、YFP 陽性細胞の0.5% がホルモンと共存するのみであった(図 1-8 A)。一方、投与後 9 ヶ月で解析を行 うと、約 30%の YFP 陽性細胞はホルモンと共存していた。このことから、成体下

垂体 SOX2 陽性細胞よりホルモン産生細胞が供給されていることが示された。しかし、15%は依然として SOX2 陽性細胞のままであった(図 1-8 B-J)。小腸は 4-5 日で全ての細胞が入れかわる、ターンオーバーの早い組織だが (van der Flier and Clevers 2009)、下垂体では 9 ヶ月経過しても 15%は SOX2 陽性のままであったことから、定常状態における下垂体はターンオーバーの遅い組織であると考えられる。



図 1-7. 下垂体における SOX2 陽性細胞の時空間的局在

ラット下垂体における SOX2 陽性細胞の時空間的な局在。赤で SOX2、青で細胞核 を標識してその Merge 像を示した。E13.5 のラトケ嚢形成時では全ての細胞が SOX2 陽性であるが、発生を経ることでその局在は矢印で示す Marginal Cell Layer (MCL) に集中して局在するようになる。矢頭で示すように、実質層にも SOX2 陽性細胞は点在している。AL; Anterior lobe (前葉)、IL; Intermediate lobe (中 葉)、PL; Posterior lobe (後葉)、RT; Rostral Tip (将来の隆起葉)、VD; Ventral Diencephalon (腹側間脳)。Scale bars: 50 μm。図は文献 (Yoshida et al. 2016) より許諾を得て掲載。



図 1-8. 成体下垂体 SOX2 陽性細胞の in vivo での運命追跡実験

Sox2^{CreERT2/+}/R26^{VFP/+}マウスを用いた成体下垂体 SOX2 陽性細胞の運命追跡実験。(A) タモキシフェン投与後 48 時間での YFP 陽性細胞の局在。YFP 陽性細胞のほとん どが SOX2 陽性だった。(B-I) タモキシフェン投与後 9 ヶ月での YFP 陽性細胞の 局在。YFP 陽性細胞は SOX2、SOX9、全ホルモン産生細胞として局在していた。 (J) タモキシフェン投与後 9 ヶ月での YFP 陽性細胞の特徴を解析した結果(% of YFP+ cells)。図は(Andoniadou et al. 2013)より許諾を得て掲載。

1-6-4 下垂体幹細胞の性質の変化

前項より、下垂体幹細胞は SOX2 陽性細胞であることが示された。しかし、SOX2 陽性細胞は成体下垂体前葉の 10%程度存在している(Yoshida et al. 2011)。加 えて、下垂体はターンオーバーが遅いことが考えられる。これらのことから、 すべての SOX2 陽性細胞が幹細胞として機能しているのではなく、多くは前駆細 胞やコミットメント細胞であり、SOX2 陽性細胞の一部が幹細胞であると考えら れる。そこで、SOX2 の他に下垂体幹細胞を標識する新たな指標を見出すことが、 下垂体細胞新生のメカニズムを解明する一助となることが期待される。本項で では、これまでの解析により下垂体 SOX2 陽性細胞がどのような特徴を有してい るかを述べた。

1-6-4-1 S100β陽性細胞

1-6-4-1-1 S100β陽性細胞とは

成体下垂体前葉に存在する S100 calcium-binding protein β (S100β)陽性細 胞は、ホルモン分泌に必須な分泌顆粒を持たない非ホルモン産生細胞である。 MCL に局在する S0X2 陽性細胞のおよそ 74%、実質層に局在する S0X2 陽性細胞の およそ 82%が S100βと共存しており、S100β陽性細胞を培養することで下垂体ホ ルモン産生細胞へと分化させることが可能であることから(図 1-9)(Higuchi et al. 2014; Yoshida et al. 2011 and 2016)、S100β陽性細胞は成体下垂体幹細 胞として機能している可能性が示唆されている。

また、中葉は、MSH 産生細胞によって構成される小さな細胞集団である小葉構造が集まって構成されているが、この小葉構造を覆うように、未分化な状態の S1006陽性細胞が局在している。後葉のおよそ 87%はアストロサイトの一種であ

る Pituicyte であり、S100βはアストロサイトマーカーでもあるため、後葉細胞のほとんどが S100β陽性細胞である(Wei et al. 2009)。

これらのように、下垂体を構成する3葉全てにS100β陽性細胞が存在している ことが知られている。



図 1-9. 下垂体 S100β陽性細胞の in vitro での追跡実験

S100β-GFP トランスジェニックラットの成体下垂体前葉を酵素によって分散し、 蛍光タイムラプス観察と細胞免疫染色を行なった結果。S100β陽性細胞の一部は ホルモン産生細胞へと分化する能力を有していた。Ph;明視野、Hor;下垂体ホ ルモン。図は文献(Higuchi et al. 2014)より許諾を得て掲載。 1-6-4-1-2 下垂体発生過程での S100B 陽性細胞の局在

従来の S100βの解析では、S100β陽性細胞は出生後 10 日程度の前葉で出現する とされてきた(Soji et al. 1994)。しかし、近年 Horiguchi らによって、後葉・ 中葉・前葉の胎仔期下垂体における S100β陽性細胞の局在解析が行われた (Horiguchi et al. 2016a)。以下にその結果を述べる。

S100β陽性細胞は、ラット E15.5(マウス E13.5)より後葉で出現が確認された (図 1-10 A)。また、ラット E15.5 は胎仔期下垂体血管形成が開始されるが、こ の下垂体血管形成に伴い、S100β陽性細胞が前葉に侵入している可能性を示唆す る組織像を報告している(図 1-10 A)。このことから、前葉に存在する S100β陽 性細胞の一部は周囲の間葉細胞に由来するものと考えられた。

発生後期の E18.5 になると、後葉では S100β陽性細胞の数が増加し、その局在 は、より吻側へと広がり、E19.5 になるとほとんどの後葉の細胞が S100β陽性細 胞であった。E18.5 の前葉に存在する S100β陽性細胞の局在は 2.5%であった。こ の時、興味深いことに、S100β陽性細胞の約 41%が神経堤細胞マーカーの一つで ある Nerve growth factor receptor ($p75^{NTR}$)陽性であった(図 1–10 B)。このこ とから、S100β陽性細胞の一部は神経堤細胞である可能性が示唆された。神経堤 細胞については第 2 章で詳しく解説する。中葉では、発生後期の E18.5-E20.5 で局在が確認された。

Horiguchi らは、生後の解析も行なっており、P5、P10、P60 での下垂体にお ける S100β陽性細胞の局在を報告している (Horiguchi et al. 2016b)。後葉では、 胎児期後期よりほとんどの細胞が S100β陽性であったが、その傾向は P60 まで変 わらなかった。中葉では P5 の時点で中葉側 MCL に強い S100β陽性シグナルが観 察され、発生に伴い、小葉構造を囲むような局在様式をとった。前葉では、P5 に存在する前葉細胞の 17.8%が S100β陽性細胞であった。E18.5 では 2.5%であっ たことから、出生前後で S100β陽性細胞は顕著に増加していることが考えられる。 P60 では 10.3%へとその割合が減少していた (Horiguchi et al. 2016b)。興味深 いことに、胎仔期の S100β陽性細胞は MCL に局在しないが、生後では前葉の MCL に存在する SOX2 陽性細胞のおよそ 74%が S100β陽性であった (図 1-11) (Yoshida et al. 2011)。



図 1-10. 外部から侵入する S100β陽性細胞とその特徴

S100β-GFP トランスジェニックラットを用いた胎仔期下垂体発生過程における S100β陽性細胞の局在解析。(A)胎仔期下垂体血管形成に伴い、S100β陽性細胞 (GFP)が下垂体に侵入していることを示唆している。(B)胎仔期下垂体における S100β陽性細胞の特徴付け。S100β陽性細胞の一部は神経堤細胞マーカーである p75^{NTR} と共存することを示した。AL; Anterior Lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)、AR; Atwell's Recess。図は文献 (Horiguchi et al. 2016a)より許諾を得て掲載。



図 1-11. 成体下垂体 MCL における S100βの局在

成体下垂体 MCL における PROP1(赤)、SOX2(青)、S100 β (緑)と Merge 像をそれぞ れ示した。胎仔期下垂体の前葉 MCL には S100 β 陽性細胞は局在しない一方で(図 1-10 B)、成体下垂体の前葉 MCL のおよそ 74%が S100 β 陽性であった。Scale bars; 20 μ m。図は文献(Yoshida et al. 2011)より許諾を得て掲載。 続いて、下垂体特異的転写因子 PROP1 と MCL に着目した解析について述べる。 PROP1 は、下垂体前駆細胞でのみ局在する転写因子である。この PROP1 は常に SOX2 と共存することが報告されており(Yoshida et al. 2009)、胎仔期下垂体の 前葉 MCL のほとんどの細胞が PROP1 陽性細胞である(Yoshida et al. 2009)。し かし、下垂体発生と共に MCL における PROP1 陽性細胞の数は減少し、P60 ではお よそ 5%の MCL 細胞のみが PROP1 陽性であった(Yoshida et al. 2011)。

前項より、成体下垂体では MCL に S100β陽性細胞が出現するようになることが 明らかになっており、PROP1の局在と合わせて考察すると、MCL の細胞は、胎仔 期は PROP1/SOX2 陽性細胞であるのに対し、成体では S100β/SOX2 へとその性質 を変化させていることが示唆された(図 1-12) (Yoshida et al. 2011)。



図 1-12. 下垂体発生過程における MCL の性質の変化

胎仔期下垂体は SOX2 陽性、もしくは SOX2/PROP1 二重陽性の幹・前駆細胞が存 在している。出生を経ることによって、MCL では S100β陽性シグナルが確認され る一方で、PROP1 陽性細胞が消失していた。実質層では、*S100β*を発現している 細胞と発現していない細胞が確認された。このことから、出生を経ることで、 PROP1 陽性細胞の消失と S100β発現細胞の出現という質的な変化が生じているこ とを提唱している。図は文献(Yoshida et al. 2011)より許諾を得て掲載。

1-7 下垂体幹細胞における本研究の課題

成体下垂体は、生体の状況に応じて細胞構成を変化させていることが知られ ているが、その細胞新生のメカニズムは未だ不明な点が多い。下垂体では SOX2 陽性細胞が成体幹細胞として機能していることが 2013 年に Andoniadou らによ って報告された。しかし、下垂体の細胞新生の速度は遅いと考えられる一方で、 成体下垂体前葉に存在する全細胞の 10%を SOX2 陽性細胞が占めている。このこ とから、SOX2 陽性細胞の全てが幹細胞として機能しているとは考えづらく、SOX2 陽性細胞の多くは前駆細胞やコミットメント細胞で、SOX2 陽性細胞の一部が幹 細胞である可能性が考えられる。そこで下垂体幹細胞を選別する新たな指標を 見出すことが必要であり、そのことで下垂体の細胞新生メカニズムの解明に繋 がることが期待される。

これまでの下垂体 SOX2 陽性細胞の研究から、下垂体の幹細胞は発生過程で SOX2/PROP1 陽性細胞から SOX2/S100β陽性細胞へとその性質を変化させている事 が示唆されている。さらに、S100β陽性細胞の一部は外部から侵入する可能性が 示唆されており、S100βは成体下垂体 MCL で発現している事から、発生過程で外 部から侵入した細胞が下垂体幹細胞に置き換わっている可能性が示唆された。 そこで、この外部から侵入した細胞の特徴とその運命を追跡することで、下垂 体幹細胞の新たな指標となるか明らかにすることを本学位論文の目的とした。 S100βの解析では、胎仔期 S100β陽性細胞のおよそ半数は神経堤細胞の特徴を有 していたことから、外部から侵入した細胞を神経堤細胞と推測し、下垂体にお ける神経堤細胞の解析を展開した。
- 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
- 2-1 第2章の概要

前章で述べたように、下垂体は胎仔期と成体で幹細胞の質的な転換が生じて おり、この質的な転換には外部から侵入した細胞が関与している可能性を考え た。外部から侵入した細胞を神経堤細胞と推測したが、これまでに、下垂体幹 細胞における神経堤細胞の解析は行われていない。本章は、神経堤細胞につい ての概説と、神経堤細胞マーカーである SOX10 に対する特異抗体を用いた時空 間的な局在解析の結果について述べたものである。

2-2 神経堤細胞

2-2-1 神経堤細胞とは

神経堤細胞 (Neural Crest Cells)は脊椎動物にのみ見られる細胞集団で、そ の重要性から進化の過程で脊椎動物が獲得した"第4の胚葉"と形容されてい る。神経堤細胞は神経管形成時に出現する細胞群のことである。出現後は体内 を大きく移動し、様々な組織に侵入した後に、各組織の細胞へと分化する。神 経堤細胞は、神経細胞、シュワン細胞、アストロサイト、メラノサイト、歯髄 細胞、心臓平滑筋、頭蓋顔面の骨や軟骨などに分化するなど、胚葉を超えた分 化能を有している(図 2-1)(Kaltschmidt et al. 2012)。このことから、万能細 胞として再生医療への応用も期待されている細胞である(Achilleos and Trainor 2012)。その特徴として、Myelin Protein zero(PO)や Wnt family member 1(Wnt1), Human Tissue Plasminogen activator(HtPa), SRY-box 10(Sox10), Early growth responce 2(Egr2 もしくは Krox20)、p75^{WTR}、Nestinなどの遺伝子 を発現していることが知られている(Shibata et al. 2010; Nieto et al. 1995; Lo and Anderson 1995)。しかし、これらの遺伝子は全ての神経堤細胞で発現し ているわけではなく、また、神経堤細胞でのみ発現している遺伝子は未だ見つ かっていない。現在では、より神経堤細胞で限局的に発現している PO、Wnt、HtPa、 Sox10、Krox20などのプロモーター下にレポーター遺伝子を結合させた神経堤細 胞の標識や、Cre リコンビナーゼを結合させて Cre/LoxP システムを用いた遺伝 的運命追跡法による神経堤細胞と神経堤由来細胞の運命追跡実験が多く行われ ている(Yamauchi et al. 1999; Jiang et al. 2000; Pietri et al. 2003; Matsuoka et al. 2005; Maro et al. $2004)_{\circ}$



図 2-1. 神経堤細胞とは

神経堤細胞は、神経管形成時に神経板の一部の細胞が上皮-間葉転換により脱上 皮化した細胞群である。その後は体内を大きく移動し、胚葉を超えた様々な細 胞へと分化することが知られている。

図は文献(Kaltschmidt et al. 2012)より許諾を得て掲載。

2-2-2 神経堤細胞の歴史

神経堤細胞は、組織に侵入した後は各組織細胞へと分化するため解析が困難 であったことから、1940年代までは、神経堤細胞はメラノサイトや脊髄神経節 を構成する細胞として両生類胚を用いた研究が行われてきた。しかし、Douarin らによって、ニワトリとウズラのヘテロクロマチンの凝集の違いを応用したニ ワトリーウズラキメラ胚による神経堤細胞の追跡法が編み出された(Couly and Douarin 1985)。この技術により、神経堤細胞が発生の過程で体内を大きく移動 し様々な組織に侵入していることが明らかとなり、神経堤細胞の研究は飛躍的 な進歩を遂げた。その後、蛍光物質 DiI や Di0 による細胞標識と全胚培養法を 用いた神経堤細胞の追跡によって、鳥類に加えて齧歯類の解析が可能となった (Eto et al. 1985; Matsuo et al. 1993)。近年では、Cre/LoxPシステムを用い た遺伝的な神経堤細胞と神経堤由来細胞の追跡法が確立されたことで、より網 羅的な解析が行われるようになった。これらの技術を用いることで、後述する ように、神経堤細胞と顔面プラコード由来組織は発生初期より密接な関係にあ ることが明らかとなっている。 2-2-3 神経堤細胞の様々な組織への関与

神経堤細胞は、形成された箇所によって、頭部神経堤細胞、心臓神経堤細胞、体幹神経堤細胞、迷走神経堤細胞、仙骨神経堤細胞へとそれぞれ分類される。

頭部神経堤細胞は顔面の骨、軟骨、を形成し、神経細胞、グリア、歯髄など に分化する。また、プラコード由来組織であるレンズ、嗅上皮、内耳にも侵入 し、組織形成に大きく関与する。心臓神経堤細胞はメラノサイト、神経細胞、 軟骨、咽頭弓の結合組織に分化する。また、心臓の大動脈(流出路)の全ての筋 肉-結合組織壁を作る。体幹神経堤細胞はメラノサイト、後根神経節、副腎髄質 の形成に大きく関与する。迷走神経堤細胞と仙骨神経堤細胞は腸の副交感神経 節、あるいは腸神経節を形成する。

神経堤細胞が出現時した時には既に、分類された神経堤細胞はそれぞれ異な る性質を有している。例えば、頭部神経堤細胞は軟骨、骨、筋肉に分化する能 力を有しているが体幹神経堤細胞はこれらの細胞へと分化しない(Noden 1978; Nakamura and Ayer-Le Lievre 1982; Lwigale et al. 2004)。これは体幹神経 堤細胞で発現している *Hox* 遺伝子による影響が強いと考えられている。一方、 頭部神経堤細胞を体幹神経堤領域に移植した際には、感覚神経や副腎髄質を形 成する(Noden 1978; Schweizer 1983)。

Douarin らは、多分化能を有していた神経堤細胞が発生過程においてその "Developmental Potential"が徐々に限定されていくモデルを提唱している (Douarin et al., 2008a and 2008b)。そのため、神経堤細胞の多くは出現後に はその予定運命がある程度方向付けられている可能性があり、後述する神経堤 幹細胞は、運命が方向付けられていない特別な神経堤細胞なのかもしれない。

39

2-2-4 神経堤細胞の出現とプラコード由来組織

神経堤細胞は、神経板が神経管を形成する際に、神経外胚葉と非神経外胚葉 の境界に存在する細胞が上皮-間葉転換を起こして移動能を獲得する(図 2-1)。 神経堤細胞へと転換する領域(神経堤領域)が形成される際に、神経堤領域の非 神経外胚葉側の領域にプレプラコード領域が形成される(図 2-2)。そのため、背 側から観察したときに、胚の中心部から側面に向けて神経管を形成する神経外 胚葉領域、神経堤細胞を形成する神経堤領域、プラコード由来組織を形成する プレプラコード領域、そして非神経外胚葉領域がそれぞれ形成される。これら の領域化は、Wnt シグナル、BMP シグナル、FGF シグナル、レチノイン酸シグナ ルに代表されるような、成長因子の組み合わせと濃度勾配によって形成される ことが明らかとなっている(図 2-3 A)(Singh and Groves, 2016)。神経堤領域に 近接するように形成されたプレプラコード領域は、さらに成長因子の組み合わ せと濃度勾配により、頭蓋顔面領域では、下垂体プラコード、嗅上皮プラコー ド、レンズプラコード、三叉神経プラコード、内耳プラコード、上鰓プラコー ドへ分類化され、それぞれの組織の発生予定領域へと細胞移動する(図 2-3 B)。 このように、神経堤細胞とプラコード由来組織は、神経板が神経管を形成する 際に隣接するように生じる細胞群であり、その起源は非常に近いことが明らか となっている。さらに、プラコード由来組織は共通のプレプラコード領域から 別れていくことから(Streit 2004)、発生過程で共通の遺伝子プロファイルを有 していることや、嗅上皮・内耳・レンズ・下垂体は神経細胞と融合した組織形 態を持つという点で、非常に似た組織形成を行うと考えられる。

40



図 2-2. 神経堤細胞とプラコード領域

(A)マウス E7-8 の模式図。(B)A の赤枠の領域を拡大した。神経堤細胞が形成される神経堤領域に隣接するようにプラコード細胞は形成される。その位置は、 全方から、下垂体、嗅上皮、レンズ、内耳プラコードのように形成される。図 は明治大学農学部生命科学科遺伝情報制御学研究室で作成した。



図 2-3. 成長因子の組み合わせによる外胚葉の分類化

(A) エピブラスト(Epiblast)が各成長因子の組み合わせによって、胚の中心側 (Medial) に神経上皮(Neural Ectoderm)、胚の横側(Lateral)に非神経上皮 (Non-Neural Ectoderm)が形成される。神経上皮は神経板(Neural Plate)に、非 神経上皮は上皮や皮膚(Epidermis)へと分化する。また、その境界の領域(Neural border)はさらに成長因子の組み合わせによって神経堤領域(NC; Neural crest) とプレプラコード領域(PPR; Pre Placodal Region)へと分化する。(B) プレプラ コード領域はさらに成長因子の組み合わせによって、頭部前方(Anterior)から 後方(Posterior)にかけて、Adeno(Adenohypophyseal placode; 下垂体プラコー ド)、01factory(嗅上皮プラコード)、Lens(レンズプラコード)、Trigeminal(三 叉神経節プラコード)、0tic(内耳プラコード)、Epibranchial(上鰓プラコード) へとそれぞれ分類化される。図は文献(Singh and Groves 2016)より許諾を得て 掲載。

2-2-5 神経堤幹細胞

Stemple と Anderson は、ラットE 10.5 の神経管から p75[™]抗体を用いて神経 堤細胞をソーティングすることに成功した(Stemple and Anderson 1992)。この 細胞を解析すると、神経細胞、シュワン細胞、平滑筋様繊維芽細胞へと分化す る多分化能と、さらに自己分裂能を有していることから、神経堤幹細胞が存在 していることを初めて明らかにした(Morrison et al. 1999)。その後、神経堤 幹細胞では、Wnt シグナル、BMP シグナルが神経新生と自己分裂の制御に重要で あること(Kleber et al 2005)、SOX10 が多分化能の維持と神経分化の抑制を行 なっていることなど(Kim et al. 2003)、神経堤幹細胞の解析が進められている。 さらに、Cre/LoxP システムを用いた神経堤細胞の運命追跡実験を行うことで、 後根神経節、骨髄、心臓、網膜、虹彩、歯髄、口腔粘膜、嗅上皮などの神経堤 由来組織と神経堤細胞が侵入している組織で、成体幹細胞として機能している ことが明らかとなっている(図 2-4)(Dupin et al. 2013; Suzuki et al. 2013)。

また、Niederländer and Lumsden は、 Boundary Cap 神経堤細胞という新し い神経堤細胞を提唱している(Niederländer and Lumsden 1996)。この細胞は、 中枢神経系と抹消神経系の境界領域で一過性に出現する。PO 系譜の神経堤細胞 は E8.0-9.5 に出現し細胞移動を行う比較的早期に出現する神経堤細胞だが (Chen et al. 2017)、Boundary Cap 神経堤細胞は E11-E13.5 で細胞移動が確認 されることから(Gresset et al. 2015)、出現が比較的遅い神経堤細胞と言える。 近年では、この Boundary Cap 神経堤細胞は後根神経節やその他の組織において 成体幹細胞として機能することが報告されている(Zujovic et al. 2011; Gresset et al. 2015)。これらのことから、神経堤細胞は発生過程で組織に侵 入し組織細胞へと分化するのみでなく、一部は多分化能と自己分裂能を維持し た状態で存在し、組織幹細胞として機能していることが明らかとなった。

43



図 2-4. 嗅上皮の成体幹細胞として機能する神経堤細胞

嗅上皮細胞を細胞死させるメチマゾール (Methimazole) を PO-Cre/CAG-CAT-EGFP マウスに投与し、未投与 (Unlesion)、1 日後 (1dpi; 1 day per injection)、3 日後、30 日後での嗅上皮の様子を観察した。その結果、未投与では嗅上皮の一 部が EGFP 陽性だったのに対し、30 日後の嗅上皮は多くの EGFP 由来の細胞で構 成されていた。このことから、神経堤細胞が嗅上皮の成体幹細胞として機能し ていることが示された。図は文献 (Suzuki et al. 2013)より許諾を得て掲載。

2-3 本章での課題

以上の神経堤細胞の性質を考察することで、下垂体幹細胞の質的な転換に神 経堤細胞が関与している可能性が見出された。しかし、下垂体での神経堤細胞 の解析は未だ進んでおらず、1987年にDouarinらが行ったニワトリーウズラのキ メラ胚の研究で間質細胞へ分化していることが報告しており(Couly and Douarin 1987)、その他には全胚培養法を用いた解析が 2001年に行われている が(Kouki et al. 2001)、その後の解析は進んでいない。Davisらが 2016年にト ランスジェニックマウスを用いた下垂体血管形成と神経堤細胞の解析を報告し たことにより、下垂体発生に神経堤細胞が関与していることが証明されたが、 これらの解析の中で、神経堤細胞が下垂体幹細胞とホルモン産生細胞へと分化 していることを明らかにした報告はない(Davis et al. 2016a)。そこで本章で は、下垂体に神経堤細胞が侵入し幹細胞様の性質を有しているか解析を行った。

2-4 材料及び実験方法

2-4-1 用いた神経堤細胞マーカー

神経堤細胞は発生の過程で一過性に出現する細胞で、組織に侵入した後は組 織細胞へと分化する。そのため、神経堤細胞で発現している遺伝子も分化と共 に発現を消失させることから、組織に侵入した後の解析を行うことが難しい細 胞である。神経堤細胞マーカーの一つである *Sox10*は、図 2-5 で示すように、 組織に侵入した後にもその発現を持続させることが知られている(Shibata et al. 2010)。このことから、本研究では、SOX10 に対する特異抗体を用いた時空 間的な局在解析を行った。以降、神経堤細胞マーカーを発現している細胞を神 経堤細胞、神経堤細胞マーカーの発現を消失させた後の細胞を神経堤由来細胞 とする。

Tissues	① Sox10-Venus	② Sox10-Cre	③ <i>P0</i> -Cre	④ Wnt1-Cre	5 Ht-Pa-Cre
Dorsal root ganglia	+	+	+	+	+
Sympathetic ganglia	+	+	+	+	+
Melanoblasts	+	+	-	+	+
Enteric nervous system	+	+	+	+	+
Superior/jugular ganglion	+	+	+	+	+
Aortae	+	+	+	+	+
Craniofacial mesenchyme	+	+	+	+	+
Otic vessicle	+	+	+	+	+
Oligodendroglia	+	+	-	-	-
Ventral neural tube	+	+	-	-	-
Developing limb	+	+	-	-	-

図 2-5. 神経堤細胞マーカー遺伝子とそのトランスジェニック動物

神経堤細胞で発現している遺伝子のうち、Sox10、P0、Wnt1、HtPaのプロモータ ーを用いたトランスジェニックマウス(TG)による局在解析の結果。陽性組織 (+)と陰性組織(-)をそれぞれ示した。①Sox10のプロモーター下で蛍光タンパ ク質 Venus を発現する TG。Sox10を発現している細胞でのみ Venus を発現する。 ②-⑤各遺伝子のプロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現する TG。それぞれ の遺伝子を発現している、もしくは発現したことのある細胞全てを標識する。 赤枠は各 TG で共通して陽性細胞が存在する組織で、つまりは神経堤細胞由来の 組織を示す。青枠は Sox10TG のみで陽性細胞が存在する組織で、つまり、非神 経堤由来の組織を示した。この図から、Sox10は神経堤由来組織でもその発現を 維持していることがわかる。図は文献(Shibata et al. 2010)より許諾を得て掲 載。

2-4-2 試料動物

試料動物として埼玉大学 井上金治名誉教授より供与して頂いた *S100β-GFP* ラット (図 2-6) (Itakura et al. 2007)を使用した。ラット胎齢は、雌ラットの 膣に精子が確認出来た朝を胎齢 0.5 日 (E0.5)とした。ソムノペンチル (Kyoritsu seiyaku, Tokyo, Japan)によって麻酔をかけ、頚椎脱臼により屠殺した後に、 E13.5、E16.5 は胎仔全身を、E19.5、E21.5、生後 3 日 (P3) は頭部を、P15、P30、 P60 は速やかに下垂体を採取した。



図 2-6. S100β-GFP ラットの概要

(A) *S100p*遺伝子上流 5030b と第一イントロンの下流に GFP、Poly-A (pA) を結合さ せたコンストラクトを作製し、このコンストラクトを用いてトランスジェニッ クラットを作出した。(B) *S100β-GFP* ラット下垂体の GFP を、蛍光免疫組織化学 により検出した。緑で GFP を示す。(C) *S100β-GFP* ラット下垂体の GFP と S100β を、蛍光免疫組織化学により検出した。GFP (FITC:緑) と S100β (Cy3:赤)の陽性 シグナルが重なることが示された。AL; Anterior lobe (前葉)、IL; Intermediate lobe (中葉)、PL; Posterior lobe (後葉)。文献 (Itakura et al. 2007) より許諾 を得て掲載。

2-4-3 RNA 抽出と cDNA の合成

ラット E18.5 下垂体全体、P0 下垂体全体、P15 から P60 の下垂体前葉、中後 葉をそれぞれ、ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて Total RNA を抽 出した。DNase I 処理した Total RNA 1 μg から PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio, Otsu, Japan)を用いて、添付のプロトコルに従い cDNA Library を作製した。

2-4-4 Real-time PCR

Real-time PCR は、KOD SYBR qPCR mix (Toyobo, Osaka, Japan)を用いた。Template cDNA は、cDNA Library 1µg (Total RNA 5ng 相当)を使用し、プライマー(0.4 µM)を含む反応液 20µ1 中で反応を行った。PCR は、Denaturation (95℃、15秒)、 Annealing (62℃、15秒)、Extension (68℃、45秒)の条件で、40 Cycle の増幅 反応を行なった。分析には、ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA)を用い、比較 C_T (DDC_T)法により、内部標準 として *TATA binding protein* (*Tbp*)に対する相対値を算出した。使用した Primer はそれぞれ以下の通り、*Tbp* Forward:5'-gatcaaacccagaattgttctcc-3'、*Tbp* Reverse: 5'-atgtggtcttcctgaatccc-3'、*Sox10* Forward:5'-caagagtgcccaccggacc-3'。

49

2-4-5 蛍光免疫組織化学

採取したサンプルは、4%(W/V) パラホルムアルデヒド, 20mM HEPES 溶液 (pH 7.5)で 4℃、24 時間浸漬固定を行なった。固定後、30 % (W/V)トレハロース溶 液に置換し、Tissue Tek O.C.T Compound (Sakura, Japan)で凍結ブロックを作 製した。作製した凍結ブロックは、クリオスタットを用いて 10μm厚(胎仔期初 期~中期)、7µm厚(胎仔期後期~出生後全てのサンプル)の凍結切片を作製した。 作製した切片は、10mM HEPES 100mM NaCl (HEPES Buffer)による洗浄を 3 回繰 り返し、0.5% (v/v) Bovine Serum Albmin(BSA)を含む HEPES Buffer (Blocking Buffer)による Blocking を室温で 1 時間行なった。使用する抗体によっては抗 原賦活化が必要なため、HEPES Buffer 洗浄の前に ImmunoSaver (Nisshin EM, Tokyo, Japan)を用いて 80℃、1 時間反応させた。Blocking 後に、Blocking Buffer で希釈した一次抗体を添加し、一次抗体反応を行なった(図 2-7)。反応後、HEPES Buffer による洗浄を 3 回行い、Blocking Buffer で希釈した二次抗体(図 2-8) を添加し、室温で一時間二次抗体反応を行なった。反応後に HEPES Buffer によ る洗浄を3回行い、HEPES Buffer で5倍希釈した VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector, Burlingame, CA., USA)を用いて核染色並びに封入を行な った。観察は蛍光顕微鏡 BZX-700 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて行なった。

抗原	宿主動物	アイソタイプ	希釈率または濃度	会社
SOX10	ヤギ	IgG	1:250	Santa Cruz(Dallas, TX, USA)
p75NTR	ウサギ	IgG	1:200	Advantech Targeting Systems(San Diego, CA, USA)
ACTH	モルモット	IgG	1:10000	NIDDK (Bethesda, MD, USA)
GFP	チキン	IgY	1:500	Aves Labs (Tigard, OR, USA)
SOX2	ウサギ	IgG	1:1000	Millipore (Darmstadt, Germany)
Ki 67	ウサギ	IgG	1:250	Abcam (Cambridge, UK)
PR0P1	モルモット	IgG	2.5ng/ul	研究室で作製(Yoshida et al. 2009)

図 2-7. 使用した一次抗体の一覧

抗原	宿主動物	アイソタイプ	蛍光標識	希釈率	会社
抗ヤギIgG	ロバ	IgG	Cy3	1:500	
抗ウサギIgG	ロバ	IgG	Cy5	1:500	Jackson ImmunoResearch
抗モルモットIgG	ロバ	IgG	СуЗ, Су5	1:500	(West Grove, PA, USA)
抗チキンIgY	ロバ	IgG	FITC	1:500	

図 2-8. 使用した二次抗体の一覧

2-4-6 抗 SOX10 抗体の吸収実験

抗 SOX10 抗体が SOX10 を特異的に認識しているか明らかにするため、抗原で ある SOX10 ペプチド(sc-17342-P, Santa Cruz)を用いて、IgG とペプチドのモル 比が等量になるように添加し、室温で 1 時間反応させた。遠心後の上清を用い た蛍光免疫組織化学によって抗 SOX10 抗体の評価を行なった。 2-5 結果

2 章で提示するデータはすべて文献(Ueharu et al. 2017a)より許諾を得て掲載した。

2-5-1 下垂体における Sox10 遺伝子の発現量の解析

はじめに、下垂体で Sox10 が発現しているのか明らかとするべく、下垂体発 生過程の cDNA を用いた発現量の測定を行なった(図 2-9)。その結果、E18.5 で は Sox10の発現は Tbp 比で 0.1 の値が検出された。P0 では Tbp 比で 0.5 程度ま で上昇した。その後、中後葉では Tbp 比で、P15 で 0.88、P30 で 0.69、P60 で 0.68 の値だった。前葉で解析を行うと、Tbp 比で、P15 で 0.009、P30 で 0.007、 P60 で 0.004 と非常に低い値であった。これらの結果から、Sox10 発現細胞は出 生前後で下垂体に存在しており、その局在は前葉よりも、中後葉に多く局在し ていることが示唆された。



図 2-9. 下垂体における Sox10の発現量の解析

下垂体形成過程における *Sox10*の発現量の測定を行なった。E18.5、P0 は下垂体 全体、P15-P60 は前葉と中葉後葉を分離した組織から抽出した cDNA を用いた。 内部標準には *TATA-Binding Protein(Tbp)*を用いた。 下垂体における SOX10 陽性細胞の局在解析に先立ち、抗 SOX10 抗体の特異性の評価を行なった。

はじめに、SOX10 陽性細胞が存在することが報告されている背側後根神経節 (Dorsal root ganglion; DRG)における抗 SOX10 抗体を用いた染色を行なった。 サンプルには、ラット E13.5 正中矢状面の切片を使用した。その結果、DRG にお いて SOX10 陽性シグナルが検出された(図 2-10 A-C)。このとき、ラトケ嚢とそ の周辺の間葉細胞では SOX10 陽性細胞は存在していなかった(図 2-10 D、E)。

続いて、下垂体における SOX10 陽性シグナルの検出を行なった。サンプルに は、高い発現が検出された P30 下垂体を用いた。その結果、下垂体中葉に多く の SOX10 陽性シグナルが得られた(図 2-11 A-C)。この結果は、Sox10 の発現量 の測定で得られた、前葉に比べて中後葉での発現が高いという結果と一致して いる。次に、抗 SOX10 抗体に SOX10 ペプチドを加えて反応させた溶液を用いて 蛍光免疫組織化学を行うと、SOX10 陽性シグナルは消失していた(図 2-11 D-F)。 これらのことから、抗 SOX10 抗体は SOX10 陽性細胞を特異的に認識しているこ とがわかった。

最後に、下垂体に存在する SOX10 陽性細胞が神経堤細胞なのか解析を行った。 Sox10は主に神経堤細胞で発現する遺伝子だが、オリゴデンドロサイトや内耳細 胞などの非神経堤由来細胞でも Sox10 が発現していることが報告されている (Shibata et al. 2010; Wakaoka et al. 2013)。2-2-4 で述べたように、内耳細 胞の起源である内耳プラコードと下垂体プラコードは同一組織より分類化され ており、プラコード由来の組織はその発生過程で類似した遺伝子の発現プロフ ァイルを持つことが知られている (Singh and Groves, 2016)。そのため、下垂 体で確認された SOX10 陽性シグナルも、内耳細胞と同様に、下垂体プラコード

55

由来細胞が発現している可能性も考えられる。解析には、神経堤細胞マーカーの一つである p75^{NTR} との共染色を行なった(図 2-12)。その結果、下垂体中後葉に存在する SOX10 陽性細胞は p75^{NTR} と共存していた(図 2-12 A-C)。加えて、数は非常に少ないが、前葉にも SOX10 陽性細胞がわずかに存在しており、この前葉 SOX10 陽性細胞も p75^{NTR} と共存していた(図 2-12 D)。以上のことから、本研究で使用する抗 SOX10 抗体は SOX10 タンパク質を特異的に認識している事がわかった。さらに SOX10 は p75^{NTR} と共存する事から、下垂体に存在する SOX10 陽性細胞は神経堤細胞であることが示唆された。



図 2-10. ラット E13.5 における SOX10 陽性細胞の局在

矢状面で作製したラット E13.5 の正中切片を用いて蛍光免疫組織化学を行なった。(A) ラット E13.5 における SOX10 (Cy3:赤)、細胞核 (DAPI:青)の Merge 像を示した。白枠 (DRG、ラトケ嚢) はそれぞれの領域を拡大し、SOX10 と細胞核の marge 像 (B, D)、SOX10 のみ (C, E) をそれぞれ示した。点線はラトケ嚢を示した。Scale Bars:1000 μm(A)、100 μm(B-E)



図 2-11. 吸収実験による抗 SOX10 抗体の特異性の評価

P30 下垂体組織切片を用いて蛍光免疫組織化学を行なった。(A)抗 SOX10 抗体を 用いた蛍光免疫組織化学の結果と、(D)抗 SOX10 抗体に SOX10 ペプチドを混ぜて 反応させた溶液の上清を用いた蛍光免疫組織化学の結果。SOX10(Cy3:赤)、細胞 核(DAPI:青)の Merge 像を示した。白枠の領域を拡大し、SOX10 と細胞核の Marge 像(B, E)と SOX10 のみ(C, F)をそれぞれ示した。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。Scale bars: $100 \mu m$ (A, D)、 $20 \mu m$ (B, C, E, F)



図 2-12. ラット P30 における SOX10 陽性細胞と p75^{NTR}の局在

ラット P30 の組織切片を用いて SOX10 と p75^{NTR}の蛍光免疫組織化学を行なった。 (A) SOX10(Cy3:赤)、p75^{NTR}(Cy5:白)、細胞核(DAPI:青)の Merge 像を示した。白枠 はそれぞれの領域を拡大し、下段に SOX10、p75^{NTR}、細胞核、SOX10 と p75^{NTR} と細 胞核の Merge 像をそれぞれ示した (B-D)。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。Scale Bars:100 μ m(A)、 10 μ m(B-D) 続いて、SOX10 陽性細胞がいつから下垂体に出現するか解析を行った。前項で 記述したように、SOX10 陽性細胞は E13.5 ラトケ嚢とその周囲の間葉細胞では存 在していなかった(図 2-10 D、E)。さらに、発生が進行した E16.5 下垂体切片 を用いて解析を行なうと、三叉神経(Trigeminal ganglion)など、下垂体周囲の 神経堤由来組織では SOX10 陽性細胞が存在する一方で、下垂体内には SOX10 陽 性細胞が存在しなかった(図 2-13)。胎仔期後期になると、後葉で初めて SOX10 陽性細胞の出現が観察された(図 2-14)。この時期に、SOX10 陽性細胞は視床下 部と後葉の繋ぎ目である正中隆起(Pituitary Stalk:PS、図 2-14 A:矢頭)と後葉 吻部にのみ存在し、尾側には局在していなかった(図 2-15 A、C)。しかし、P3 になると、SOX10 陽性細胞は尾側にも局在していた(図 2-15 A、C)。このこと から、SOX10 陽性細胞は出生直前から出生後にかけて吻側から尾側へその局在を 広げていることが明らかとなった。この時期に、中葉にも SOX10 陽性細胞が存 在していた(図 2-15 B、C)。0.1%未満とわずかな数ではあるが、前葉にも SOX10 陽性細胞が存在していた(未提示データ)。これらのことから、SOX10 陽性細胞は 出生直前・直後に下垂体に出現することが明らかとなった。

後葉での SOX10 陽性細胞の時空間的局在解析を行うと(図 2-16、表 1、表 3)、 P15 における後葉の全細胞における SOX10 の割合は、吻側が 4.0%、中間部が 3.6%、 尾側が 3.6%であった。SOX10 陽性細胞は E21.5 では吻側のみに局在していた一 方で、P15 ではそれぞれの部位で同様の割合を示していた。このときに、吻側、 中間部、尾側の値を平均化すると、3.7%の割合であった。P30、P60 でも吻側、 中間部、尾側のそれぞれに局在しており、P30 での吻側、中間部、尾側の平均値 が 3.2%、P60 では 3.3%であった。このことから、生後の後葉の 3-4%の細胞は SOX10 陽性細胞であることが示された。

60

中葉における SOX10 陽性細胞の時空間的局在解析を行うと(図 2-16、表 1、表 3)、P15 では吻側が 1.0%、中間部が 1.4%、尾側が 2.5%の割合で、尾側の割合が 高い傾向にあった。P30 では吻側が 1.6%、中間部が 3.4%、尾側が 6.1%と、尾側 の割合が高い傾向がより顕著であった。P60 では吻側が 1.7%、中間部が 2.1%、 尾側が 2.4%と、尾側の割合が高い傾向にはあるが、その差は小さくなっていた。 吻側から尾側までの平均値では、P15 が 1.6%、P30 が 3.7%、P60 が 2.1%と、P30 での割合が高かった。その局在は、中葉と後葉の間、中葉の小葉構造の間、中 葉側 MCL に局在しており、小葉構造の内部には局在していなかった(図 2-16 C'、 F'、I'、I 内の赤枠)。興味深いことに、小葉構造の間で観察された SOX10 陽性 細胞は、核が細長い形状をしていた(2-16 C'、C'、F'、F'、I'、I'、I'、)。前葉 では、出生直後から成熟下垂体まで、0.1%未満とごくわずかな細胞が確認され るのみであった(表 2、表 3)。

以上より、下垂体には出生前後にかけて、3 葉全てに SOX10 陽性細胞が出現し ていることが明らかとなった。また、出生後下垂体における時空間的局在解析 を行うと、後葉では 3-4%の割合で存在していた。一方の中葉では、どのステー ジでも尾側で多くの SOX10 陽性細胞が局在している傾向にあり、P30 での割合が 3.7%と一番高かった。前葉では常に 0.1%未満のごくわずかな SOX10 陽性細胞が 局在するのみであった。

61



図 2-13. ラットE16.5におけるSOX10陽性細胞の局在

ラットE16.5の下垂体を矢状面(A、B)と冠状面(C、D)でそれぞれ作製し蛍光免疫 組織化学を行なった。SOX10(Cy3;赤)と細胞核(DAPI;青)のMerge像(A、C)、SOX10 のみ(B、D)をそれぞれ示した。点線で下垂体の領域を囲った。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。Scale Bars:100μm



図 2-14. ラットE 21.5におけるSOX10陽性細胞の局在

ラットE 21.5の下垂体を正中の矢状面(A)と冠状面(吻側;B、尾側;C)でそれぞれ 蛍光免疫組織化学を行なった。SOX10(Cy3;赤)と細胞核(DAPI;青)のMerge像(A、 B、C)を示した。白枠の領域を拡大して右にSOX10と細胞核のMerge像(上段)、 SOX10のみ(下段)をそれぞれ示した(A'、B'、C')。点線で下垂体の領域を囲 った。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)、PS; Pituitary Stalk(正中隆起)。Scale Bars:100μm、10μm



図 2-15. ラットP3におけるSOX10陽性細胞の局在

ラットP3の下垂体を正中の矢状面(A)と冠状面(吻側;B、尾側;C)でそれぞれ蛍光 免疫組織化学を行なった。SOX10(Cy3;赤)と細胞核(DAPI;青)のMerge像(A、B、 C)を示した。白枠の領域を拡大して右にSOX10と細胞核のMerge像(上段)、SOX10 のみ(下段)をそれぞれ示した(A'、A',、B'、B', C'、C',)。点線で 下垂体の領域を囲った。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中 葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。Scale Bars:100μm、10μm



図 2-16. 出生後のSOX10陽性細胞の時空間的な局在

SOX10(Cy3;赤)と細胞核(DAPI;青)のMerge像を、P15(吻側:A、中間部:B、尾側:C)、 P 30(吻側:D、中間部:E、尾側:F)、P60(吻側:G、中間部:H、尾側:I)でそれぞれ 示した。C、F、Iの白枠の領域を拡大し、下段に示した(C'、F'、I')。C'、 F'、I'の黄色枠を、SOX10、細胞核、SOX10と細胞核のMerge像でそれぞれ示した(C''、F''、I'')。Iの赤枠は、右にSOX10、細胞核、SOX10と細胞核の Merge像をそれぞれ拡大して示した。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。Scale Bars:100µm(A-I)、10µm(C'' -I''、赤枠図)

A. 後葉

		SOX10+/DA	PIの平均値	SOX10	SOX10+S100β+/SOX10+の平均値								
	吻側	中間部	尾側	全体	吻側	中間部	尾側	全体					
E21.5 (S1, S2)	9.4 (9.2, 9.6)	0	0	3.1	0	-	-	0					
P15 (S1, S2)	4 (3.3, 4.6)	3.6 (3.8, 3.4)	3.6 (3.8, 3.4)	3.7	5.3 (6.0, 4.6)	3.7 (2.6, 4.8)	22.6 (17.6, 27.5)	10.5					
P30 (S1, S2)	3.8 (4.3, 3.2)	2.7 (2.9, 2.5)	3.1 (2.2, 3.9)	3.2	9.6 (9.7, 9.5)	9.3 (9.7, 8.8)	25.8 (20.6, 31.0)	14.9					
P60 (S1, S2	1.9 (2.1, 1.7)	2.5 (2.5, 2.4)	5.6 (4.3, 4.8)	3.3	8.4 (11.1, 5.6)	7.5 (8.5, 6.5)	14.5 (15.9, 13.1)	10.1					

B. 中葉

		SOX10+/D	APIの平均値	SOX	SOX10+S100β+/SOX10+の平均値							
	吻側	中間部	尾側	全体	吻側	中間部	尾側	全体				
E21.5 (S1, S2)	0	0	0	0	-	-	-	-				
P15 (S1, S2)	1 (0.8, 1.1)	1.4 (1.2, 1.6)	2.5 (2.7, 2.2)	1.6	50.8 (54.5, 47.0)	33.4 (16.7, 50.0)	49.3 (31.8, 66.7)	44.5				
P30 (S1, S2)	1.6 (1.4, 1.8)	3.4 (2.2, 4.5)	6.1 (4.9, 7.3)	3.7	90.3 (92.0, 88.5)	94.5 (94.7, 94.2)	100 (100, 100)	94.9				
P60 (S1, S2)	1.7 (1.5, 1.8)	2.1 (2.0, 2.1)	2.4 (2.0, 2.7)	2.1	95.4 (93.6, 97.1)	94.3 (93.8, 94.7)	100 (100, 100)	96.6				

表1. 発生過程の後葉、中葉におけるSOX10陽性細胞の割合

発生過程における後葉(A)、中葉(B)に存在するSOX10陽性細胞の数を全細胞で割 った値(SOX10+/DAPI)と、S100βと共存するSOX10陽性細胞の数(SOX10+S100β)を 全SOX10陽性細胞の数で割った値(SOX10+S100β+/SOX10+)をそれぞれ示した。計 測には、吻側、中間部、尾側をそれぞれ2個体(S1、S2)ずつ計測し、その平均を 示した。全体の値は、平均化した吻側、中間部、尾側のそれぞれの値をさらに 平均化して算出した。"ハイフン"は分母が0だった場合(解なし)を示す。

		SOX10+/DAP	SOX1	SOX10+S100β+/SOX10+の平均値								
	吻側	中間部	尾側	全体	吻側	中間部	尾側	全体				
E21.5 (S1, S2)	0	0	0	0	-	-	-	-				
P15 (S1, S2)	0.023 (0.009, 0.037)	0.019 (0.028, 0.010)	0.034 (0.028, 0.041)	0.025	100 (100, 100)	100 (100, 100)	100 (100, 100)	100				
P30 (S1, S2)	0.007 (0.015, 0.000)	0.009 (0.007, 0.011)	0.012 (0.015, 0.010)	0.009	-	100 (100, 100)	100 (100, 100)	100				
P60 (S1, S2)	0	0.004 (0.000, 0.007)	0.016 (0.007, 0.025)	0.006	-	100 (-,100)	100 (100, 100)	100				

表2. 発生過程の前葉におけるSOX10陽性細胞の割合

発生過程の前葉におけるSOX10陽性細胞の数を全細胞で割った値(SOX10+/DAPI) と、S100βと共存するSOX10陽性細胞の数を全SOX10陽性細胞の数で割った値 (SOX10+S100β+/SOX10+)をそれぞれ示した。計測には、吻側、中間部、尾側をそ れぞれ2個体(S1、S2)ずつ計測し、その平均を示した。全体の値は、平均化した 吻側、中間部、尾側のそれぞれの値をさらに平均化して算出した。"ハイフン" は、分母が0だった場合(解なし)を示す。

			吻	側					中	間部			尾側						
		S1			S2					S2			S1			S2			
	а	Ъ	с	а	b	с	a	b	с	а	b	с	а	b	с	a	b	с	
Cell Type Stage	Total SOX (a/c)	SOX S100 (b/a)	DAPI																
E21.5	11 (9.2)	0	120	7 (9.6)	0	73	0	-	N.C.										
P15	50 (3.3)	3 (6.0)	1503	65 (4.6)	3 (4.6)	1413	78 (3.8)	2 (2.6)	2038	63 (3.4)	3 (4.8)	1846	85 (3.2)	15 (17.6)	2668	40 (1.9)	11 (27.5)	2121	
P30	31 (4.3)	3 (9.7)	720	42 (3.2)	4 (9.5)	1307	62 (2.9)	6 (9.7)	2114	57 (2.5)	5 (8.8)	2280	63 (2.2)	13 (20.6)	2797	58 (3.9)	18 (31.0)	1500	
P60	27 (2.1)	3 (11.1)	1280	18 (1.7)	1 (5.6)	1030	47 (2.5)	4 (8.5)	1901	62 (2.4)	4 (6.5)	2626	107 (6.3)	17 (15.9)	1708	76 (4.8)	10 (13.1)	1570	

B. 中葉

			败	側					中	間部		尾側							
		S1			S2			S1			S2			S1			S2		
	а	Ъ	с	а	b	c	a	b	с	a	Ъ	с	а	b	с	а	b	с	
Cell Type Stage	Total SOX (a/c)	SOX S100 (b/a)	DAPI																
E21.5	0	-	N.C.	0	0	N.C.	0	-	N.C.										
P15	11 (0.8)	6 (54.5)	1385	17 (1.1)	8 (47.0)	1494	18 (1.2)	3 (16.7)	1526	26 (1.6)	13 (50.0)	1639	44 (2.7)	14 (31.8)	1659	39 (2.2)	26 (66.7)	1811	
P30	25 (1.4)	23 (92.0)	1845	26 (1.8)	23 (88.5)	1462	38 (2.2)	36 (94.7)	1753	69 (4.5)	68 (94.2)	1525	101 (4.9)	101 (100)	2070	100 (7.3)	100 (100)	1366	
P60	47 (1.5)	44 (93.6)	3149	35 (1.8)	34 (97.1)	1919	89 (2.0)	76 (93.8)	3975	57 (2.1)	54 (94.7)	2773	65 (2.0)	65 (100)	3288	54 (2.7)	54 (100)	1987	

C. 前葉

			败	側					中	間部			尾側						
		S1			S2			S 1			S2			S1		S2			
	а	b	с	а	b	c	a	b	с	а	b	с	а	b	c	а	b	с	
Cell Type Stage	Total SOX (a/c)	SOX S100 (b/a)	DAPI																
E21.5	0		N.C.																
P15	1 (0.009)	1 (100)	10565	3 (0.037)	3 (100)	8085	3 (0.028)	3 (100)	10700	1 (0.010)	1 (100)	9497	3 (0.028)	3 (100)	10659	4 (0.041)	4 (100)	9583	
P30	1 (0.015)	0	6636	0		13068	1 (0.007)	1 (100)	13350	2 (0.011)	2 (100)	18000	3 (0.015)	3 (100)	19008	2 (0.010)	2 (100)	18900	
P60	0	-	29992	0	-	21000	0	-	21240	2 (0.007)	2 (100)	26980	2 (0.007)	2 (100)	26676	7 (0.025)	7 (100)	26978	

表3. 発生過程におけるSOX10陽性細胞、SOX10/S100β二重陽性細胞、細胞核の数
発生過程の後葉(A)、中葉(B)、前葉(C)におけるSOX10陽性細胞(Total SOX:a)、
SOX10/S100β二重陽性細胞(SOX S100:b)、細胞核(DAPI:c)の数をそれぞれ示した。
括弧内はそれぞれSOX10+/DAPI(a/c)、SOX10+S100β+/SOX10+(b/a)の割合をそれ

ぞれ示した。各ステージにつき2個体の計測を行った(S1、S2)。"ハイフン"は 分母が0だった場合(解なし)を示す。N.C.は未計測を示す。
2-5-4 SOX10 陽性細胞の移動能の解析

これまでの解析で SOX10 陽性細胞が出生前後より下垂体に出現することを示 した。特に、後葉では発生の過程で吻側から尾側にその局在様式を広げている こと、中葉では細胞核の細長い SOX10 陽性細胞や MCL に SOX10 陽性細胞が存在 していたことは興味深い。神経堤細胞は細胞移動能を有しているという特徴と 合わせて考えると、SOX10 陽性細胞は下垂体の中を移動し、MCL へと向かってい る可能性が考えられる。そこで、SOX10 陽性細胞が細胞移動能を有しているのか 解析を行った。細胞が移動する際には F-アクチンを形成し、F-アクチンを進行 方向へと伸長させることが知られている。そこで解析には、F-アクチンと特異 的に結合する Phalloidin を用いて F-アクチンと SOX10 の 2 重染色を用いた。

その結果、中葉の小葉構造の間に強い Phalloidin 陽性シグナルが観察され、 SOX10 陽性細胞は Phalloidin 陽性であった(図 2-17 A:白矢印)。さらに、 Phalloidin 陽性シグナルは MCL に向かって伸長しているような観察像が得られ たことから(図 2-17 D:黄色矢印)、SOX10 陽性細胞は MCL に向かって細胞移動し ている可能性が示唆された。



図 2-17. ラットP60におけるSOX10陽性細胞の移動能の解析

(A) ラットP60下垂体切片を用いて、SOX10(Cy3;赤)、Phalloidin(FITC;緑)、細胞核(DAPI;青)のMerge像を示した。白枠の領域を拡大して下段に、細胞核(B)、 SOX10と細胞核のMerge像(C)、SOX10とPhalloidinのMerge像(D)をそれぞれ示し た。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。点線と矢頭でMCLを示した。矢印で代表的なPhalloidin陽性のSOX10 陽性細胞を示した。黄色矢印でPhalloidinシグナルがMCLへ伸長している様子を 示した。Scale Bars:100 µm(A)、20 µm(B-D) 2-5-5 SOX10 陽性細胞と S100βの共存

続いて、下垂体に SOX10 陽性細胞が出現する出生直前から、SOX10 と S100βの 時空間的な局在解析を行った。

後葉に SOX10 陽性細胞が出現する E21.5 では、SOX10 陽性細胞は S100β陰性で あった(図 2-18:矢印)。しかし P3 では、後葉・中葉共に、S100β陰性の SOX10 陽性細胞が存在する一方で(図 2-19 A、B、C:矢印)、S100βと共存する SOX10 陽 性細胞が出現していた(図 2-19 B、C:矢頭)。その後、後葉では、常に一部の SOX10 陽性細胞が S100βと共存していた。中葉では、P30 以降、ほぼ全ての SOX10 陽性 細胞は S100β陽性であった(図 2-20 A-A''、B-B''、C-C'')。後葉、中葉で S100β と共存する SOX10 陽性細胞の割合を計測したところ、後葉では全体の平均を算 出すると常に 10%程度の SOX10 陽性細胞が S100β陽性であった(表 1)。E21.5 で は全ての SOX10 陽性細胞が S100β陰性であったことから、後葉の SOX10 陽性細胞 は下垂体発生の過程で *S100β*を発現していることが明らかとなった。

中葉では、P15 ではおよそ半数の SOX10 陽性細胞が S100β陽性であったが、P30 ではほぼ全ての SOX10 陽性細胞が S100β陽性であった(吻側:90.3%、中間 部:94.5%、尾側:100.0%;表 1)。P60 でも同様にほぼ全ての SOX10 陽性細胞は S100β陽性であった(表 1)。このことから、中葉のほぼ全ての SOX10 陽性細胞は、 P15 から P30 の間に *S100β*を発現していることが示された。



図 2-18. ラット E21.5におけるSOX10とS100β-GFPの局在

ラットE 21.5の下垂体を正中の矢状面(A)と尾側の冠状面(B)で切片を作製し、SOX10(Cy3;赤)、S100β-GFP(FITC;緑)のMerge像をそれぞれ示した。白枠の領域を下段に拡大してSOX10、S100β-GFP、細胞核、SOX10とS100β-GFPと細胞核のMerge像をそれぞれ示した(A'、B')。矢印で、SOX10陽性S100β-GFP陰性細胞を示した。Scale Bars:100 μ m(A、B)、10 μ m(A'、B')

図 2-19. ラットP3におけるSOX10とS100β-GFPの局在

ラットP3の下垂体を矢状面(A)と冠状面(吻側;B、尾側;C)で切片を作製し、SOX10(Cy3;赤)、S100β-GFP(FITC;緑)のMerge像をそれぞれ示した。白枠の領域を下段拡大してにSOX10、S100β-GFP、細胞核、SOX10とS100β-GFPと細胞核のMerge像をそれぞれ示した(A'、B'、B'、C'、C'')。矢印で、SOX10陽性S100β-GFP陰性細胞を、矢頭でSOX10/S100β-GFP陽性細胞で示した。Scale Bars:100 μ m、10 μ m





図 2-20. 出生後のSOX10とS100β-GFPの時空間的な局在

SOX10(Cy3;赤)とS100β-GFP(FITC;緑)のMerge像を、P15(A)、P 30(B)、P60(C)で それぞれ示した。A、B、Cの白枠の領域を拡大し、下段に示した(A'-A''、 B'-B''、C'-C''')。矢印はSOX10陽性S100β陰性細胞を、矢頭はSOX10/S100β 二重陽性細胞をそれぞれ示した。Scale Bars:100μm、10μm 2-5-6 出現直後の SOX10 陽性細胞の未分化能の解析

これまでの解析で、SOX10 陽性細胞は下垂体に出現した後に、S100βを発現す るようになる可能性が示唆された。アストロサイトの研究では、SOX10 は未分化 の状態を維持する機能を持っており、分化が進行すると S100βを発現するように なることが示されている(Glasgow et al. 2014)。このことから、下垂体に出現 した SOX10 陽性細胞は S100β陽性へと分化する未分化な状態の細胞であること が考えられる。神経堤細胞は、SOX2/SOX10 二重陽性細胞の状態では未分化な神 経堤由来細胞とされており(Aquino et al. 2006)、出現前後の SOX10 陽性細胞 が SOX2 と共存するかを解析することで、未分化な状態の神経堤細胞かどうかが 明らかになることが期待できる。そこで、出生直後の下垂体を用いて、SOX10 と SOX2 の共存を解析した。

その結果、視床下部と後葉を繋ぐ正中隆起(PS)に局在する SOX10 陽性細胞は SOX2 陽性であった(図 2-21 A、A':矢頭)。さらに後葉、中葉に存在する SOX10 陽性細胞も同様に SOX2 陽性であった(図 2-21 A、A''、A ''':矢頭)。このこと から、出現前後の SOX10 陽性細胞は SOX2 陽性の未分化な状態の神経堤細胞であ ることが示唆された。続いて、分裂細胞マーカーである Marker of proliferation Ki67 (Ki67)との共存を解析したところ、一部の SOX10 陽性細胞は Ki67 陽性で あったが(図 2-21 B、B'':矢頭)、多くの SOX10 陽性細胞は Ki67 陰性であった(図 2-21 B、B'、B''':矢印)。

最後に、前葉における SOX10 陽性細胞の未分化能の解析を行った。前葉では SOX10 陽性細胞の局在が非常に少ないが、その全てが S100β陽性であった(図 2-22 A'''、B'''、C'''、表 2、表 3)。加えて、41.7%の SOX10 陽性細胞は下垂 体でのみ発現する前駆細胞マーカーPROP1 と共存していた(図 2-22)。



図 2-21. ラットP3におけるSOX10陽性細胞の特徴づけ

ラットP3の下垂体を用いて、SOX10(Cy3;赤)とSOX2(Cy5;緑、A)もしくは Ki67(Cy5;緑、B)のMerge像を示した。A、Bの白枠は拡大をして、SOX10、SOX2も しくはKi67、細胞核(DAPI;青)、Merge像と細胞核を重ねた像(A'-A''、B' -B'')を示した。白枠の領域を拡大して右にSOX10と細胞核のMerge像(上段)、 SOX10のみ(下段)をそれぞれ示した。AL; Anterior lobe (AL;前葉)、IL; Intermediate lobe (IL;中葉)、PL; Posterior lobe (PL;後葉)、PS; Pituitary Stalk(PS;視床下部)。Scale Bars:100μm、10μm



図 2-22. ラットP3前葉におけるSOX10、PROP1、S100β-GFPの局在

(A) ラットP3前葉を用いてSOX10 (Cy3;赤)、PROP1 (Cy5;白)、S100β-GFP (FITC;緑) のMerge像を示した。白枠は拡大して、SOX10、PROP1、S100β-GFP、細胞核 (DAPI; 青)、Merge像と細胞核を重ねた像をそれぞれ下段に示した (A')。 (B) 4個体のラ ット切片を染色し、全てのSOX10陽性細胞の数 (SOX10) と、PROP1、S100β-GFPと 共存するSOX10陽性細胞の数 (PROP1+S100β+SOX10+)の数をそれぞれ示した。括弧 内は、三重陽性細胞の数を全てのSOX10陽性細胞の数で割った値を示した (PROP1+S100β+SOX10+/SOX10+)。AL;前葉、IL;中葉、PL;後葉。Scale Bars:100 μ m、10 μ m

2-6 考察

本章の解析により、SOX10 陽性細胞が下垂体に存在していることが示され、その局在は主に後葉と中葉で、前葉ではごく稀に存在していた。下垂体における SOX10 陽性細胞局在解析は本研究が初で、下垂体前葉のみならず、中葉・後葉の 発生にも関与している事が明らかとなった。

後葉の発生過程における SOX10 陽性細胞は、E21.5 に出現した後に一部が S100β陽性細胞へと分化していた。しかし、後葉の S100β陽性細胞は E15.5 です でに存在していた(Horiguchi et al. 2016a)。E16.5 における SOX10 陽性細胞の 局在を解析すると、SOX10陽性細胞は視床下部周辺には存在しておらず(図2-13)、 後葉の Pituicyte(S100β陽性細胞)の出現には S0X10 系譜の神経堤細胞が関与し ていない、もしくはすでに SOX10 の発現を消失させた神経堤細胞が関与してい る可能性が考えられる。成体下垂体では、およそ87%の後葉細胞はアストロサイ トの一種である Pituicyte (S100β陽性細胞) であることが明らかとなっている (Wei et al. 2009)。残りのおよそ 10%は、少数の Microglia と未解明な細胞と されていた。本研究により、未解明な細胞の一部は SOX10 陽性細胞であること が示された。SOX10はアストロサイトへの分化を制御しており、Sox10-Creマウ スを用いて運命追跡をすると SOX10 陽性細胞はアストロサイトへと分化するこ とが示されている(Glasgow et al. 2014)。本研究でも、後葉の一部の SOX10 陽 性細胞は S100Bと共存していることを示しており(図 2-19、表 1)、このことから、 SOX10 陽性細胞は成体下垂体後葉の Pituicyte(S100β陽性細胞)を供給する幹細 胞として機能するために侵入してきたのかもしれない。これらを明らかにする には、Sox10-CreERT2トランスジェニックマウスを用いて、成体下垂体に存在す る SOX10 陽性細胞のみの運命を追跡することで明らかになることが期待される。 中葉の SOX10 陽性細胞は、発生過程で下垂体内部を細胞移動し、MCL へと移動

している可能性が示された(図 2-17)。中葉の SOX2 陽性細胞は MSH 産生細胞へと 分化することが示されているが(Budry et al. 2012)、本解析によって SOX10 陽 性細胞は SOX2 陽性であることが示唆された。このことから、中葉の SOX10 陽性 細胞は MSH 産生細胞へと分化していることが考えられる。

また、中葉に存在する SOX10 陽性細胞のほとんどが、下垂体発生に伴い S100β を発現するようになることを本研究で初めて示した。このことから、中葉の S100β陽性細胞の一部は SOX10 由来であることが考えられる。SOX10 陰性 S100β 陽性細胞は中葉に多く存在しているが、Sox10の発現を消失させた細胞である可 能性も考えられ、Sox10-Creマウスを用いることで、SOX10 陰性 S100β陽性細胞 は Sox10の発現を消失させた後の細胞なのか明らかになることが期待される。

中葉の研究で幾つか興味深い報告がされている。*Pax7*は神経堤細胞のマーカ ーの一つだが、下垂体では中葉の前駆細胞、MSH 産生細胞で発現しており、前葉・ 後葉では発現していない。Hosoyama らは、*Pax7-CreERT2*マウスを用いて中葉細 胞の時期特異的な運命追跡を行なった結果、Pax7 由来細胞が下垂体前葉に存在 しており、その一部は ACTH 産生細胞へと分化していることが証明された (Hosoyama et al. 2010)。このことから、中葉に存在する細胞が確かに前葉に 移動していることが示された。加えて、Vankelecom らのグループは、*Gh-Cre/iDTR* マウスを用いた GH 産生細胞特異的な細胞死を誘導する解析で、MCL の前葉と中 葉のつなぎ目である Wedge 領域の細胞が活性化し、前葉細胞を供給する可能性 を示唆する結果を示している(Gremeaux et al. 2012; Willems et al. 2016)。 これらのことから、中葉の SOX10 陽性細胞は、成体下垂体前葉の細胞供給源で ある可能性を提唱したい。これを明らかにするには *Sox10-CreERT2*マウスを用 いた時期特異的な運命追跡が必要となる。

前葉の S0X10 陽性細胞は常に少数のみが局在していた。Sox10の発現は、同じ 神経堤細胞マーカーである p75^{VTR}と比べても、分化の進行に伴い速やかに消失す

ることが知られている(weber et al. 2015)。つまり、未分化度の高い神経堤細 胞でのみ *Sox10* は発現していると考えられる。前葉の SOX10 陽性細胞は約半数 が PROP1 と共存しており、さらに個体によって PROP1 と共存する SOX10 陽性細 胞の割合は大きく異なっていた(図 2-22)。このことは、*Prop1* を発現すること で下垂体前駆細胞へと分化転換するともに *Sox10* の発現が速やかに消失してお り、そのため個体によって SOX10 と PROP1 が共存する細胞の数がバラついてい るのかもしれない。

近年、Davis らは、*Prop1-Cre*マウスを用いた PROP1 陽性細胞の運命追跡実験 を行なった。その結果、PROP1 陽性細胞は前葉の全てのホルモン陽性細胞へと分 化しており、血管系の細胞へは分化しないことを明らかにした (Davis et al. 2016b)。これより、SOX10/PROP1/S100β陽性細胞は血管系細胞へは分化せず、ホ ルモン産生細胞への分化能を有していると考えられる。しかし、本章でも述べ てきたように、前葉に存在する SOX10 陽性細胞は 0.1%未満とごくわずかな数し か存在していない。このわずかな SOX10 陽性細胞が下垂体ホルモン産生細胞を 供給しているのか、生体の恒常性維持に関与しているのかは非常に興味深い。 *SOX10-Cre*マウスや *SOX10-CreERT2*マウスを用いた運命追跡実験により、前葉に おける SOX10 陽性細胞の寄与が明らかになることが期待される。

本解析により、下垂体には SOX10 系譜の神経堤細胞が存在していることが示 唆された。しかし、本考察でも何度か述べたように、SOX10 タンパク質の標識に よる神経堤細胞の局在解析のみではその後の運命と機能を解析できない。より 詳細な解析を行うためには、Cre/LoxP システムを用いた遺伝的な運命追跡実験 が必要となる。

第3章 PO-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

3-1 第3章の概要

前章によって、下垂体に SOX10 陽性細胞が局在していることから、神経堤細胞が存在している可能性が示唆されたが、同時に遺伝的運命の追跡実験の必要性も示された。そこで、本章では Cre/LoxP システムを用いた遺伝的運命追跡実験による解析結果を述べたものである。PROP1 や S100βなどに着目した解析はラットで行われてきているものが多いため、前章ではラットを用いて解析を展開した。しかし、神経堤細胞を追跡するトランスジェニック動物はマウスであることから、本章では PO-Cre/CAG-CAT-EGFPマウスを用いた解析を行った。

3-2 Cre/LoxP システムを用いた運命追跡実験

3-2-1 Cre/LoxP システムとは

従来の抗体を用いた細胞を標識する解析では、例えば未分化細胞でのみ発現 する遺伝子を標識した場合、分化の進行によりその発現を消失させるため、未 分化細胞がどのような細胞へと分化したのか解析することが難しかった。フロ ーサイトメトリーを用いて抗体によって標識した細胞のみを回収して培養する ことで、分化能を調べることは可能だが、培養 Dish のコーティング条件や血清、 成長因子の有無など外的要因が多く、実際に生体内で生じている現象かわから ない。

バクテリオファージ由来 DNA リコンビナーゼである Cre は、LoxP 配列を認識 することで、LoxP 配列間で DNA リコンビネーションを生じさせる (Abremski and Hoess 1984; Feil et al. 1997)。そのため、目的遺伝子の発現プロモーター下 に Cre を結合させたマウスと、恒常的なプロモーター活性を示す CAG や Rosa26 の下流に LoxP-CAT-LoxP-レポーター遺伝子 (*Gfp、Yfp、tdTomato* など)を結合さ せたマウスをそれぞれ作製し、交配させると、目的遺伝子を発現した細胞は *Cre* を発現し、LoxP 配列内の CAT カセットを抜き取ることで、永久的なレポーター 遺伝子の発現を誘導する (図 3-1)。

神経堤細胞と神経堤由来細胞を追跡する際には、PO-Cre、Wnt1-Cre、HtPa-Cre、 SOX10-Cre マウスが主に使用される。また、神経堤細胞の一種である Boundary Cap 神経堤細胞を追跡する際には Krox20-Cre マウスが使用される。これは、全 ての神経堤細胞で発現している遺伝子が発見されていない事、また、神経堤細 胞のみで発現している遺伝子も明らかになっていない事から、より神経堤細胞 で限局的に発現しているこれらの遺伝子を用いた解析が行われている

(Yamauchi et al. 1999; Jiang et al. 2000; Pietri et al. 2003; Matsuoka et al. 2005; Maro et al. 2004) $_{\circ}$



図 3-1. Cre/LoxP システムの概要図

(A) Cre/LoxP システムを用いたトランスジェニック動物の概要を、 PO-Cre/CAG-LoxP-STOP-LoxP-GFPマウスを用いて説明した。

①P0 遺伝子の発現状況下で Cre が発現・翻訳され、②核内へ移行した Cre によって LoxP 配列に挟まれた領域が欠損し、③その結果、永続的に GFP を発現するようになる。

(B) PO-Cre/CAG-LoxP-STOP-LoxP-GFPマウスにおける、PO発現細胞とその娘細胞 における GFP 発現細胞を示した。一度 PO 遺伝子を発現した細胞は、その後に PO 遺伝子の発現を消失させても恒常的に GFP を発現する。PO+は PO 遺伝子を発現 している細胞、PO-は PO 遺伝子を発現していない細胞を示した。緑で GFP 陽性 細胞を示した。図は明治大学農学部生命科学科遺伝情報制御学研究室で作成し た。

3-2-2 下垂体における Cre/LoxP システムを用いた神経堤細胞の解析

下垂体における神経堤細胞の解析はほとんど進んでおらず、近年までは Douarin らが報告したニワトリとウズラのキメラ胚の網羅的解析と(Couly and Douarin 1987)、蛍光色素による細胞標識と全胚培養法による追跡実験(Kouki et al. 2001)が報告されているのみであった。2016 年に Davis らが行なった PO-Cre マウスと Wnt1-Creマウスを用いた遺伝的運命追跡解析によって、下垂体に神経 堤細胞が存在することが示されたが(Davis et al. 2016a)、下垂体幹細胞とホ ルモン産生細胞については解析されておらず、その関係は未だ不明のままであ る。しかし、PO-Creマウスでの解析を観察すると、胎仔期下垂体血管形成が開 始される前の、E12.5 ですでに PO 系譜の神経堤細胞が侵入している事を示して いる(図 3-2)。E12.5 では、ラトケ嚢を形成するほぼ全ての細胞が SOX2 陽性で あり(Yoshida et al. 2009)、PO 系譜の神経堤細胞が SOX2 陽性細胞として存在 している可能性を見出した。



図 3-2. PO-Cre/Rosa^{stopLacZ}マウスにおける E12.5 下垂体の結果

Davis らによって、P0 系譜の神経堤細胞が下垂体に存在している事が示された。 特に、E12.5 は下垂体血管形成開始前で、ほぼ全てのラトケ嚢細胞が SOX2 陽性 であることから、P0 系譜の神経堤細胞は SOX2 陽性細胞である可能性が考えられ る。文献(Davis et al. 2016a)より許諾を得て掲載。 3-3 生理状態の変化に伴う下垂体細胞構成の変化

成体下垂体には各ホルモン産生細胞が一定の割合で存在している(図 3-3)。し かし、1-2 で述べたように、下垂体は下垂体ホルモン標的器官からの負のフィー ドバック機構によって制御されており、生体の状況に応じて下垂体細胞構成を 変化させている。例えば、妊娠期や泌乳期のメスでは、血中 PRL 濃度を高く維 持するため、PRL の転写・翻訳量、PRL の分泌量、そして PRL 産生細胞の数をそ れぞれ増加させている。

また、Levy らのグループは、下垂体ホルモンの標的器官である副腎、性腺、 甲状腺をそれぞれ摘出した際の下垂体の細胞構成を解析する実験を行なった。 その結果、摘出した標的器官に対応するホルモン産生細胞の数が増加している 事が示されている(Nolan and Levy 2006a and 2006b; Nolan et al. 2007)。こ れは、本来下垂体ホルモンを受容した標的器官が分泌する抹消物質から受ける 負のフィードバックがないために、下垂体がホルモンを分泌し続けることが原 因と考えられている。この時、ホルモン産生細胞の増加にはホルモン産生細胞 の分裂には依存しないことが示唆されている。

以上のように、下垂体は生理状態に合わせてその細胞構成を変化させており、 その解析手段として妊娠期や下垂体ホルモン標的器官の除去が有用である事が 示されている。

細胞	ラットの体重(g) など	ホルモン産生細胞 の割合(%)
GH	<300	32-36
	>300	45-50
PRL	200-300 (メス)	35-38
	200 (オス)	25
	15 day	8
LH	200-300	7-10
	15 day	11-15
FSH	200-300 (オス)	8
	200-250 (メス)	12.0
	15 day	12-16
TSH	200-300	5-9
	200 (メス)	5
	甲状腺摘除ラット	32-43
ACTH	200-300	3-4

図 3-3. 下垂体に存在するホルモン産生細胞の割合

正常状態並びに下垂体ホルモンの標的器官を除去した際の下垂体に存在する各 種ホルモン産生細胞の割合。図は文献(Ben-Jonathan et al. 1983)より許諾を 得て掲載。

3-4 本章での課題

本章では、Cre/LoxP システムを用いた神経堤細胞と神経堤由来細胞を追跡す ることによって、下垂体に侵入した神経堤細胞が下垂体幹細胞へと分化転換し た後にホルモン産生細胞へと分化しているのか、下垂体を構成する細胞のうち 何%の細胞が神経堤由来細胞であるのか、さらに、成体下垂体幹細胞として神 経堤細胞がホルモン産生細胞の供給を行っているのか明らかにすることを目的 とした。

3-5 材料及び実験方法

3-5-1 試料動物

使用する動物は、Davis らが下垂体に侵入していることを明らかにしている 2 種類の遺伝子改変動物のうち、より下垂体幹細胞へと分化している事が期待さ れる PO-creマウスを用いた (Davis et al. 2016a)。*PO-Creマウスと CAG-CAT-EGFP* マウスは、熊本大学 山村研一教授、大阪大学 宮崎純一教授によってそれぞれ 作製された。共同研究者の東北大学 大隅典子教授が系統維持されていた *PO-Cre/CAG-CAT-EGFP*マウス(以降 *PO-Cre/EGFP*マウス; 図 3-4) (Kanakubo et al. 2006)を分与して頂き、解析に使用した。マウス胎齢は、雌マウスの膣口に膣栓 が確認できた朝を胎齢 0.5 日 (E0.5)とした。マウスは、700 µ 1/kg 体重の量のソ ムノペンチル (Kyoritsu seiyaku, Tokyo, Japan)により麻酔をかけ、頚椎脱臼 により屠殺した後に、E9.5、E10.5、E11.5、E14.5、E16.5 は胎仔全身を、E18.5 は脳を取り除いた頭部を採取した。生後 0 日 (PO)では脳を取り除いた頭部を、 P15、P30、P60 は速やかに下垂体を採取した。全ての工程は、明治大学 動物実 験委員会の指針に則って実施した。



図 3-4. PO-Cre/EGFPマウスの概要

PO-Promoter(PO-P)の下流にrabbit b-globin intron、Cre、Poly-Aを結合させ たコンストラクトを用いて PO-Creマウスを作出した。また、 CAG-Promoter(CAG-P)の下流にLoxP、CAT、LoxP、EGFP、Poly-Aを結合させたコ ンストラクトを用いて CAG-CAT-EGFPマウスを作出した。両マウスを交配させ PO-Cre/CAG-CAT-EGFP マウスを作出した。文献(Kanakubo et al. 2006)より許 諾を得て掲載。

3-5-2 蛍光免疫組織化学

採取したサンプルは、4%(W/V) パラホルムアルデヒド, 20mM HEPES 溶液 (pH 7.5)で 4℃、24 時間浸漬固定を行なった。固定後、30 % (W/V)トレハロース溶 液に置換し、Tissue Tek O.C.T Compound (Sakura, Tokyo, Japan)で凍結ブロ ックを作製した。作製した凍結ブロックは、クリオスタットを用いて 10µm 厚 (E9.5-E18.5)、7μm 厚(P0-P60)の凍結切片を作製した。作製した切片は、10mM HEPES 100mM NaC1 (HEPES Buffer)による洗浄を3回繰り返し、10% (v/v) FBS を含む HEPES Buffer (Blocking Buffer)による Blocking を室温で1時間行なっ た。使用する抗体によっては抗原賦活化が必要なため、HEPES Buffer 洗浄の前 に ImmunoSaver (Nisshin EM, Tokyo, Japan)を用いて 80℃、1 時間反応させた。 Blocking 後に、Blocking Buffer で希釈した一次抗体を添加し、一次抗体反応 を 4℃-16 時間行なった (図 3-5)。 反応後、HEPES Buffer による洗浄を 3 回行い、 Blocking Buffer で希釈した二次抗体(図 3-6)を添加し、二次抗体反応を室温で 1時間行なった。反応後に HEPES Buffer による洗浄を 3 回行い、HEPES Buffer で5倍希釈した VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector, Burlingame, CA, USA)を用いて核染色並びに封入を行なった。観察は蛍光顕微鏡 BZX-700(Keyence, Osaka, Japan)を用いて行なった。

抗原	抗原 宿主動物 アイソタイプ 希釈率ま		希釈率または濃度	度 会社(地域)		
CREリコンビナーゼ	ウサギ	IgG	1:100	Cell Signaling(Danvers, CA, USA)		
GFP	チキン	IgY	1:500	Aves Labs(Tigard, OR, USA)		
PROP1	モルモット	IgG	2. 5ng/μl	研究室で作製(Yoshida et al. 2009)		
SOX2	ヤギ	IgG	1:400	Neuromics (Edina, MN, USA)		
GH	モルモット	IgG	1:5000	静岡大学田中先生より提供		
PRL	ウサギ	IgG	1:10000	NIDDK (Bethesda, MD, USA)		
ACTH	モルモット	IgG	1:10000	NIDDK (Bethesda, MD, USA)		
TSH	モルモット	IgG	1:500000	NIDDK (Bethesda, MD, USA)		
LH	モルモット	IgG	1:3000	NIDDK (Bethesda, MD, USA)		
FSH	モルモット	IgG	1:3000	NIDDK (Bethesda, MD, USA)		
NG2	ウサギ	IgG	1:400	Millipore (Darmstadt, Germany)		
Ki 67	ウサギ	IgG	1:250	Abcam (Cambridge, UK)		
S100 β	ウサギ	IgG	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)		

図 3-5. 使用した一次抗体の一覧

抗原	宿主動物	アイソタイプ	蛍光標識	希釈率	会社
抗ウサギIgG	ロバ	IgG	Cy3	1:500	
抗チキンIgY	ロバ	IgG	FITC	1:500	Jackson ImmunoResearch
抗モルモットIgG	ロバ	IgG	Cy3	1:500	(West Grove, PA, USA)
抗ヤギIgG	ロバ	IgG	Cy3, Cy5	1:500, 1:500	

図 3-6. 使用した二次抗体の一覧

3-5-3 マウス副腎除去

P60 マウスに 700 μ 1/kg 体重の量のソムノペンチル (Kyoritsu seiyaku, Tokyo, Japan)を投与することで麻酔にかけ、開腹のみ (Sham) と副腎除去 (Adx) をそれぞ れ3個体ずつ作製した。その後 Adx マウスは 0.9% (w/v) 食塩水を与えて飼育した。 手術後1週間で、Sham と Adx マウスをジエチルエーテルにより速やかに屠殺し、 下垂体を回収した。

3-5-4 RNA 抽出と cDNA の合成

手術後1週間の Sham、Adx マウスから下垂体を摘出し、ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いてそれぞれ Total RNA を抽出した。DNase I 処理した Total RNA 1µg から PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて、添付のプロトコルに従い cDNA Library を作製した。

3-5-5 Real-time PCR

Real-time PCR は、SYBR Green-Real time PCR Master Mix Plus (Toyobo, Osaka, Japan)を用いた。Template cDNA は、cDNA Library 1µ1 (Total RNA 5ng 相当) を使用し、プライマー(0.6µM)を含む反応液 20µ1 中で反応を行った。PCR は、 Denaturation(95℃、15 秒)、Annealing (62℃、15 秒)、Extension (72℃、45 秒)の条件で、40 Cycle の増幅反応を行った。分析には、ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA)を用い、 比較 C_T(DDC_T)法により、内部標準として *TATA binding protein* (*Tbp*)に対する 相対値を算出した。使用した Primer はそれぞれ以下の通り、*Tbp*

Forward:5'-gatcaaacccagaattgttctcc-3', *Tbp* Reverse: 5'-atgtggtcttcctgaatccc-3', *Pomc*Forward:5'-caagagtgcccaccggacc-3', *Pomc* Reverse:5'-gatctgccttgccggactgc-3'.

3-5-6 細胞計測、統計処理

細胞数の計測は、1個体当たり2切片を計測後にその平均値を算出し、3個体 分の平均値より統計処理を行なった。DAPI、GH、PRLは10000 μ m²当たりの細胞 数を計測し、面積当たりの細胞数を算出した。統計処理は、Student's t-test、 もしくは One-Way ANOVA with Tukey test を行なった。

3-6 結果

3 章で提示するデータは文献(Ueharu et al. 2017b)と、未発表の解析データ を用いた。文献(Ueharu et al. 2017b)は許諾を得て掲載した。

3-6-1 胎仔期に下垂体に侵入する GFP 陽性細胞

本研究で使用する PO-Cre/EGFP マウスは、Cre/LoxP システムを利用したトラ ンスジェニックマウスである。PO 遺伝子の発現のほとんどは神経堤細胞と神経 堤由来細胞であるミエリンであることから、神経堤細胞と神経堤由来細胞のみ を特異的に EGFP で標識するマウスである。加えて、Cre に対する特異抗体を用 いて局在を確認する事で、Cre/EGFP 二重陽性細胞は PO遺伝子を発現している神 経堤細胞、Cre 陰性 EGFP 陽性細胞は PO遺伝子の発現を消失させた神経堤由来細 胞と判断する事が可能となる。そこで、下垂体発生が開始されるマウス E9.5 を 解析の起点とし、下垂体血管形成開始後の E16.5 までの Cre と EGFP の局在を、 Cre リコンビナーゼを特異的に認識する抗 Cre 抗体と EGFP を特異的に認識する 抗 GFP 抗体を用いて解析を行った。

その結果、口腔上皮が陥入する E9.5 で GFP 陽性細胞は侵入していた(図 3-7 A; 拡大図)。この GFP 陽性細胞は Cre 陰性であった事から、既に P0 遺伝子の発現 を消失させている神経堤由来細胞であった。下垂体原基であるラトケ嚢が形成 される E11.5 では、ラトケ嚢を囲む周囲の間葉細胞は GFP/Cre2 重陽性の神経堤 細胞であるのに対し、拡大図で示すように、下垂体に侵入した全ての GFP 陽性 細胞は Cre 陰性の神経堤由来細胞であった (図 3-7 C)。このとき、興味深い事 に、下垂体吻側に存在する間葉細胞のほとんどが GFP 細胞で構成されているの に対し、下垂体尾側に存在する間葉細胞のほとんどが GFP 陰性であった (図 3-7

C)。下垂体血管形成が開始される E14.5 では、大量の GFP 陽性細胞が血管形成 の起点である Atwell's Recess から侵入していることが明らかとなった。この GFP 陽性細胞群は Cre 陽性であることから、神経堤細胞であると推測できる(図 3-7 D)。これらの結果から、GFP 陽性細胞は胎仔期下垂体に少なくとも 2 回侵入 しており、1 回目の E9.5 は神経堤由来細胞、E14.5 では神経堤細胞が侵入して いることから、その性質も異なっている可能性が考えられた。



図 3-7. 発生過程におけるGFP陽性細胞の局在

下垂体発生過程におけるCreとEGFPの局在を蛍光免疫組織化学により解析をした。(A)E9.5、(B)E10.5、(C)E11.5、(D)E14.5、(E)E16.5の細胞核(DAPI;青)、Cre(Cy3;赤)、GFP(FITC;緑)、CreとGFPを重ねた像(Merge)に細胞核を重ねた像(Merge+DAPI)をそれぞれ示す。白枠の領域は拡大して右上に示した。矢頭はAtwell's Recess、矢印は口腔上皮の上層の間葉細胞を示した。点線で前中葉、白線で後葉をそれぞれ囲った。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)、Scale bars: 100µm、10µm

3-6-1-1 胎仔期に侵入した GFP 陽性細胞と下垂体幹細胞

続いて、侵入後の神経堤細胞が下垂体を構成するどの細胞へと分化している のか解析を行なった。初めに、下垂体幹細胞が発現している Sox2、下垂体前駆 細胞でのみ発現している下垂体特異的転写因子 Prop1 を下垂体幹・前駆細胞の 指標とし、SOX2/PROP1/GFP の3 重染色を行った(図 3-8)。その結果、ラトケ嚢 が形成された E11.5 に存在する全ての GFP 陽性細胞は、SOX2/PROP1 陽性であっ た(図 3-8 A-A'')。このとき、下垂体周囲に存在する間葉細胞の状態の GFP 陽 性細胞は SOX2/PROP1 陰性であったことから、GFP 陽性細胞は下垂体に侵入後す ぐに下垂体幹・前駆細胞としての特徴を得ていることが示された。E14.5 では、 SOX2/PROP1 の2 重陽性細胞(図 3-8 B、B'':矢頭)の他に、SOX2/PROP1 陰性の GFP 陽性細胞が存在していた(図 3-8 B、B'':矢頭)。このことは、GFP 陽性細 胞が下垂体幹・前駆細胞以外の性質を獲得している可能性を示している。



図 3-8. 胎仔期下垂体における下垂体幹・前駆細胞とGFPの局在

下垂体幹・前駆細胞でのGFPの局在を解析した。PROP1(Cy3:赤)、SOX2(Cy5:白)、 GFP(FITC:緑)のMerge像を、(A)E11.5、(B)E14.5で示した。A、Bの白枠は下段に 拡大して示した(A'、A'、B'、B'、)。拡大像はGFP、PROP1、SOX2、GFPと PROP1とSOX2のMerge像、細胞核(DAPI;青)をそれぞれ示した。矢頭は GFP/PROP1/SOX2の三重陽性細胞を、矢印はGFP単独陽性細胞を示した。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後 葉)。Scale bars: $100 \mu m(A, B)$ 、 $10 \mu m(A', A'', B', B'')$ 3-6-1-2 胎仔期に侵入した GFP 陽性細胞と下垂体ホルモン陽性細胞

3-6-1-1より、侵入した GFP 陽性細胞は、下垂体幹・前駆細胞としての特徴を 獲得しており、発生が進行すると幹・前駆細胞以外の特徴を更に獲得している 細胞が存在していることがわかった。そこで、下垂体幹細胞の最終分化細胞で あるホルモン陽性細胞に分化していると推測し、生後より出現する PRL, FSH を 除く、胎仔期に下垂体に出現するホルモン産生細胞4 種類と GFP の2 重染色を それぞれ行なった。はじめに、下垂体ホルモン抗体の全てを設定した濃度に希 釈した溶液(ホルモン抗体カクテル)と GFP 抗体を用いた2 重染色を行ったと ころ、いくつかの GFP 陽性細胞は下垂体ホルモン陽性細胞に局在していた(図 3-9 A:矢頭)。続いて、それぞれのホルモン抗体と GFP 抗体の2 重染色を行うこ とで、GFP 陽性細胞は GH 産生細胞、ACTH 産生細胞、TSH 産生細胞、LH 産生細胞 のそれぞれに分化していることを明らかにした(図 3-9 B-E)。このことから、 下垂体発生初期に侵入した GFP 陽性細胞は、口腔上皮由来細胞と同じ時期に、 下垂体ホルモン産生細胞へと分化していることが示された。



図 3-9. 胎仔期下垂体における下垂体ホルモンとGFPの局在

(A) E16.5におけるホルモン抗体のカクテル(Cy3;赤)とGFP(FITC;緑)のMerge像 を示した。矢頭はホルモンと共存するGFPを示した。(B-E)それぞれのホルモン (Cy3;赤)と共存するGFP(FITC;緑)を、細胞核(DAPI;青)とのMerge像でそれぞれ 示した。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。Scale bars: $100 \mu m(A)$ 、 $10 \mu m(B-E)$
3-6-1-3 胎仔期に侵入した GFP 陽性細胞と血管系細胞

また、下垂体に存在する血管系細胞は、マウス E14.5 に生じる胎仔期下垂体 血管形成伴い出現が確認される。神経堤細胞は血管系細胞の中でも周皮細胞(ペ リサイト) へ分化することが知られており、Davis らの解析では、神経堤細胞特 異的に *b-catenin をノックアウトし、*神経堤細胞特異的にを細胞死を生じさせ たマウス(*PO-Cre/b-catenin^{flox/flox}*)では、下垂体内のペリサイトが消失するこ とを報告している(Davis et al. 2016a)。そこで、下垂体に存在する GFP 陽性 細胞がペリサイトに分化しているのか追試を行った。解析にはペリサイトのマ ーカーである Neuron-glia antigen 2 (NG2) と GFP の 2 重染色を行った。その結 果、E14.5 で新たに侵入する GFP 陽性細胞群と下垂体実質層に NG2/GFP 2 重陽性 細胞が存在していた(図 3-10;矢頭)。このとき、NG2 陽性細胞は GFP 陽性の他に GFP 陰性も存在していたことより(図 3-10;矢印)、下垂体に存在するペリサイ トは P0 系譜の神経堤由来細胞の他にも由来が存在していることが考えられる。

以上のことより、E9.5 で侵入した GFP 陽性細胞は下垂体幹・前駆細胞へと速 やかに分化し、ホルモン産生細胞を供給していること、E14.5 で侵入した GFP 陽 性細胞の一部は NG2 陽性のペリサイトへと分化していることが示された。



図 3-10. 胎仔期下垂体におけるペリサイトマーカーNG2とGFPの局在

(A) 14.5におけるNG2(Cy3:赤)、GFP(FITC:緑)、細胞核(DAPI;青)のMerge像を示した。白枠は下段に拡大して示す。ペリサイトマーカーとしてNG2を染色することで、NG2陽性細胞をペリサイトと判断した。(B-D) 拡大像はGFP、NG2、Merge像、細胞核、細胞核を加えたMerge像をそれぞれ示す。矢頭はNG2/GFP二重陽性細胞を、矢印はNG2単独陽性細胞をそれぞれ示した。AL; Anterior lobe(前葉)、IL;

Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。Scale bars: 100µm(A)、 10µm(B'C'D'E') 3-6-2 出生後の下垂体における GFP 陽性細胞の局在

これまでの解析で、GFP 陽性細胞がいつ下垂体に侵入し、どのような特徴を獲得するのかを示した。その中でも GFP 陽性細胞が SOX2/PROP1 陽性細胞へと分化 していることは興味深く、神経堤由来細胞が成体下垂体幹細胞として機能して いる可能性が見出された。そこで、出生後の下垂体における GFP 陽性細胞の局 在とその特徴を解析することで、出生後の神経堤由来細胞の機能の一端を推測 できるのではないかと仮説を立て、はじめに出生後の GFP 陽性細胞の下垂体発 生過程における解析を行った(図 3-11)。

出生後0日(P0)では18.4%のGFP 陽性細胞が下垂体細胞を占めていたが、P15 でのGFP 陽性細胞の割合は5.5%へと有意に減少していた。P30のGFP 陽性細胞 の割合もP15と同様に5.8%であったが、P60で解析を行うと、GFP 陽性細胞の割 合が12.3%へと有意に増加していた(図3-11E)。このことから、GFP 陽性細胞は、 出生後すぐでは下垂体を占める割合が高い一方で、出生後2週間でその割合を 減少させるが、下垂体成熟に伴い再び割合を増加させていることが示唆された。



図 3-11. 下垂体発生におけるGFP陽性細胞の局在解析

(A-D)出生後の下垂体におけるGFP(FITC:緑)と細胞核(DAPI:青)のMerge像をそ れぞれ示した。(E)下垂体に存在するGFP陽性細胞の数を細胞核の数で割った割 合を示した(GFP+/DAPI)。統計処理はOne-Way ANOVA with Tukey testを行なっ た。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。*:p<0.05、**:p<0.01、Scale bars: 100µm 3-6-2-1 SOX2/GFP 2 重陽性細胞の局在解析

続いて、出生後下垂体における SOX2/GFP 陽性細胞の局在解析と、その割合を 測定した(図 3-12、図 3-13)。はじめに、下垂体全細胞中に存在する SOX2 陽性 細胞の割合(SOX2+/DAPI)を測定したところ、E18.5 では 43.5%、P0 では 37.9%の 割合で SOX2 陽性細胞が存在していたが、P15 では 22.0%の割合に有意に減少し ていた。その後も下垂体成熟に伴い下垂体に存在する SOX2 陽性細胞の割合は減 少していき、P60 では 11.6%の割合であった(図 3-13 A)。

続いて、全 SOX2 陽性細胞中の GFP 陽性細胞の割合 (SOX2+GFP+/SOX2)を測定し たところ、E18.5 で 5.2%であったが、P0 では 18.2%へと割合が有意に上昇して いた。その後は、SOX2+/DAPI の割合と同様に、P15 では 1.0 %、P30 では 0.6% と、生後 2 週間でその割合を有意に減少させた。しかし、P60 では 7.5%とその 割合を増加させていた (図 3-13 A)。面積あたりの SOX2/GFP 陽性細胞の数を計測 しても、P30 では 3 細胞/mm² であったのに対し、P60 では 35 細胞/mm²と有意にそ の数を増加させていた (図 3-13 B)。このことから、SOX2/GFP 2 重陽性細胞は、 出生後すぐに下垂体 SOX2 陽性細胞を占める割合が一番高い一方で、その後の 2 週間でその割合を激減させる。しかし、下垂体発生に伴いその割合を再び上昇 させていることが示された。

続いて、SOX2 陽性細胞が集中して局在する MCL に着目して、SOX2 陽性細胞に 局在する GFP の割合 (SOX2+GFP+/SOX2+ in MCL)を解析すると、E18.5 では MCL に 存在する SOX2 陽性細胞の 6.5%が GFP 陽性であった。P0 になると、その割合は 22.2%と有意にその割合を増加させていた。続いて、P15 で 2.3%、P30 で 0.8%と その割合を著しく減少するが、P60 では 16.1%に有意に上昇しており、下垂体全 体で解析した結果と同様の傾向が得られた (図 3-13 C)。



図 3-10. 出生後下垂体におけるSOX2とGFPの免疫組織化学

出生後の下垂体におけるSOX2とGFPの局在解析。(A)PO、(B)P30、(C)P60におけるSOX2(Cy3:赤)とGFP(FITC:緑)のMerge像を示した。白枠はそれぞれ拡大して右に示した(A'-C')。矢頭はSOX2とGFPが共存している細胞を全て示した。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL; Posterior lobe(後葉)。MCL: Marginal Cell Layer、Scale bars:100µm



図 3-13. 下垂体発生におけるGFPとSOX2の共存細胞の量的経時的変化

出生後の下垂体における GFP 陽性細胞の局在解析。(A)下垂体全細胞中に存在す る全ての SOX2 陽性細胞の割合(SOX2+/DAPI:黒)と、全ての SOX2 陽性細胞中に存 在する GFP 陽性細胞の割合(SOX2+GFP/SOX2+:赤)をそれぞれ示した。(B)P30 と P60 における 1mm² あたりに存在する SOX2 陽性細胞の数を示した。白で P30、グ レーで P60 における GFP 陰性、GFP 陽性の SOX2 陽性細胞数をそれぞれ示した。 (C) MCL に存在する SOX2 と共存する GFP 陽性細胞の数を MCL に存在する SOX2 陽 性細胞の数で割った値(SOX2+GFP+/SOX2+ in MCL)を示した。統計処理は、 (A, C) One-Way ANOVA with Tukey test、(B) Student's T-test をそれぞれ行な った。*:p<0.05、**:p<0.01。

3-6-2-2 ホルモン/GFP 2 重陽性細胞の局在解析

続いて、ホルモン/GFP 2 重陽性細胞の局在解析を行った(図 3-14)。はじめに、 下垂体全細胞に存在する全ホルモン産生細胞の割合(Horms+/DAPI)を、ホルモン 抗体カクテル溶液を用いて測定したところ、E18.5 で 30.2%(±2.7)、P0 で 39.5%、 P15 で 72.1%と有意に増加しており、その後も割合は増加の傾向で、P60 で 78.1% の割合であった(図 3-14 E)。続いて、全ホルモン産生細胞に存在する GFP 陽性 細胞の割合(Horms+GFP+/Horms+)を測定したところ、E18.5 では 7.3%、P0 で 17.0% と、Horms+/DAPI の結果と同様に割合が有意に増加していた。しかし、P15 では 5.6%、P30 では 5.4% へと有意に減少していた。その後、P60 では Horms+GFP+/Horms+の割合が 13.8% へと増加していた(図 3-14 E)。このことから、 ホルモン/GFP 2 重陽性細胞は P0-P30 では増加せず、P30 から P60 の間に増加し ていることがわかる。

胎仔期では、GH 産生細胞、ACTH 産生細胞、TSH 産生細胞、LH 産生細胞へと分 化していたが(図 3-9)、PRL 産生細胞、FSH 産生細胞は胎仔期には存在していな いため解析ができなかった。そこで、成体下垂体における各ホルモン産生細胞 と GFP の共存を解析すると共に、その割合を測定した。その結果、成体下垂体 では、下垂体前葉に存在するすべてのホルモン(GH、PRL、ACTH、TSH、LH、FSH) と共存していることが明らかとなった(図 3-15 A-F)。各ホルモン産生細胞に局 在する GFP の割合(Hormone+GFP+/Hormone+)を測定したところ、GH で 8.5%、PRL で 13.2%、ACTH で 5.9%、TSH で 7.7%、LH で 5.7%、FSH で%6.0 であった(図 3-15 G)。GFP 陽性細胞は GH 産生細胞、PRL 産生細胞と多く共存する傾向があるが、 GFP 陽性細胞はすべてのホルモン産生細胞とおよそ 10.0%(±5.0)程度の割合で 分化していることが明らかとなった。



図 3-14. 下垂体発生におけるホルモン産生細胞とGFP陽性細胞の局在解析

出生後の下垂体におけるホルモン産生細胞とGFPの時空間的な局在を解析した。 (A)P0、(B)P15、(C)P30、(D)P60におけるホルモンカクテル(Cy3:赤)とGFP(FITC: 緑)のMarge像をそれぞれ示した。(E)出生後下垂体における全ホルモン産生細胞 の数を全細胞核で割った割合(Horms+/DAPI:黒)と、GFPと共存するホルモン産生 細胞の数を全ホルモン産生細胞数で割った割合(Horms+GFP+/Horms+:赤)をそれ ぞれ示した。AL; Anterior lobe(前葉)、IL; Intermediate lobe(中葉)、PL;



Posterior lobe (後葉)。統計処理はOne-way ANOVA with Tukey testを行なった。*:p<0.05、**:p<0.01、Scale bars:100μm

図 3-15. 成体下垂体における各ホルモン産生細胞におけるGFPの割合

P60下垂体組織切片を用いて各ホルモン産生細胞に局在するGFPを解析した。 GH(A)、PRL(B)、ACTH(C)、TSH(D)、LH(E)、FSH(F)をそれぞれ赤(Cy3)、GFPを緑 (FITC)、細胞核を青(DAPI)でそれぞれ染色し、Marge像を示した。(G)各ホルモ ン産生細胞中に存在するGFPの割合(Hormone+GFP+/Hormone+)を測定した。Scale bars: 10µm 3-6-2-3 出生後下垂体における GFP 陽性細胞の分裂能の解析

これまでの解析で、GFP 陽性細胞の割合は E18.5 から P0 の間にその細胞数を 増加させた後に、生後 2 週間でその割合を有意に減少させるが、下垂体成熟に 伴い再びその割合を増加させていることが示唆された。そこで、この神経堤細 胞の増加が細胞分裂によるものなのか解析するべく、細胞分裂マーカーKi67 と GFP の共存の解析を行なった(図 3-16)。はじめに、全下垂体細胞中に存在する Ki67 陽性細胞の割合(Ki67+/DAPI)の計測を行った。その結果、Ki67+/DAPI の割 合はE18.5 で 31.4%と一番高く、その後は下垂体の成熟に伴い現象の傾向にあり、 P60 では 2.0%だった。

続いて、全分裂細胞中に存在する GFP の割合を測定した。E18.5 では 6.2%で あったのに対し、P0 では 12.3%とその割合を有意に上昇させていた。その後、 P15 では 3.8%、P30 では 2.7%へと有意に減少させていた。この結果は、これま での結果で示している、E18.5 から P0 にかけて GFP 陽性細胞の割合が増加した 後に減少する現象をフォローする結果であると考えられる。しかし、P60 では 3.3%とその割合は P30 と有意な差は得られなかった。そのため、P30 から P60 に かけての GFP 陽性細胞は分裂に依存していない増加をしている可能性が示唆さ れた。

続いて、SOX2+GFP+/SOX2+ in MCL が P30 から P60 で増加する事に着目し、 SOX2/GFP 2 重陽性細胞が分裂によって増加している可能性を考えた。そこで、 P15、P30、P60 における Ki67/SOX2/GFP 3 重染色を行った(図 3-17)。その結果、 P15-P60 にかけて、Ki67/SOX2/GFP 3 重陽性細胞はほとんど下垂体に存在しない 事が示された。



図 3-16. 下垂体発生におけるGFP陽性細胞と分裂細胞マーカーKi67の共存

出生後下垂体におけるGFP陽性細胞の分裂能を、分裂細胞マーカーKi67とGFPの2 重染色によって時空間的に解析した。全Ki67陽性細胞の数を全細胞核で割った 割合(Ki67+/DAPI:黒)と、GFPと共存するKi67陽性細胞の数を全Ki67陽性細胞の 数で割った割合(Ki67+GFP+/Ki67:赤)をそれぞれ示した。統計処理はOne-Way ANOVA with Tukey testを行なった。*:p<0.05、**:p<0.01



図 3-17. 下垂体発生におけるGFP陽性細胞と分裂細胞マーカーKi67の共存

P30(A)、P60(B)下垂体における Ki67/SOX2/GFP 3 重染色の結果。Ki67(Cy3;赤)、 SOX2(Cy5;白)、GFP(FITC;緑)の Merge 像を示した。(B-E、G-J)白枠は右に拡大 し、それぞれの染色結果と、Merge 像に細胞核(DAPI;青)を重ねた像を示した。 (K)P15、P30、P60 における全 Ki67 陽性細胞数(Total Ki67+)、Ki67/SOX2 2 重 陽性細胞数(Ki67+SOX2+)、Ki67/SOX2+GFP 3 重陽性細胞数(Ki67+SOX2+GFP+)をそ れぞれ示した。計測値は、1 個体あたり 2 切片計測し、3 個体分計測した数の和 を示した。Scale bars; 100μm

3-6-3 S100β/GFP 2 重陽性細胞の解析

続いて、S100βとGFPの2重染色を行った(図 3-18)。はじめに、S100β陽性細胞数が多い成体下垂体を用いてS100βとGFPの二重染色を行なったが、その結果、 一部のS100β陽性細胞がGFPと共存するのみで、ほとんどのS100β陽性細胞はGFP 陰性であった。このことから、前葉に存在するS100β陽性細胞の多くはP0系譜 の神経堤細胞ではない事が明らかとなった。



図 3-18. 成体下垂体におけるS100β、S0X2、GFPの局在

成体下垂体におけるS100^β、SOX2、GFPの局在解析。(A)成熟下垂体におけるS100^β(Cy3:赤)、SOX2(Cy5:白)、GFP(FITC:緑)のMerge像を示した。白枠の領域を拡大し、S100^β(B)、SOX2(C)、GFP(D)、S100^β、SOX2、GFP、細胞核のMerge像(E)をそれぞれ示した。矢頭はS100^β、SOX2、GFPの3重陽性細胞を示した。AL;Anterior lobe(前葉)、IL;Intermediate lobe(中葉)、PL;Posterior lobe(後葉)。Scale bars: $100 \mu m$ (A)、 $10 \mu m$ (B-D)

3-6-4 生体の状況を変化させた際の下垂体における GFP 陽性細胞の解析

神経堤細胞は、発生の過程で様々な組織に侵入し組織細胞へと分化する一方 で、一部の神経堤細胞は未分化な状態を維持したまま組織に残り成体幹細胞と して機能していることが明らかとなっている (Dupin et al. 2013; Suzuki et al. 2013)。下垂体では、生体の状況に応じてその細胞構成を変化させていることが 知られており、その解析手段として、妊娠期の解析や標的器官除去が多く用い られている。そこで、*PO-Cre/EGFP*マウスを用いて、生理的変化を起こした際の 神経堤由来細胞の挙動を解析することで、神経堤細胞が細胞供給に関与してい るか解析することができると考え、本研究では *PO-Cre/EGFP*マウスの副腎を除 去し1週間後の下垂体細胞構成の解析を行なった。

副腎除去後 1 週間(Adx)で ACTH 産生細胞の供給が行われているか測定したと ころ、全下垂体細胞中の ACTH 産生細胞の割合(ACTH+/DAPI)が開腹手術のみ (Sham)に比べて有意に増加しており(図 3-19 C)、下垂体前葉における Pomc の発 現量も有意に増加していた(図 3-19 D)。ACTH と GFP の二重染色を行うと、ACTH 産生細胞中の GFP の割合(ACTH+GFP+/ACTH+)は、Sham では 7.7 %なのに対し Adx では 16.5 %と有意に増加していた(図 3-19 E)。面積あたりの GFP 陽性 ACTH 産 生細胞の数を計測しても、Sham では 14 細胞/mm²であったのに対し Adx では 41 細胞/mm² と有意に増加していた(図 3-19 F)。しかし、面積あたりの非神経堤由 来 ACTH 産生細胞の数は、Sham では 176 細胞/mm2、Adx では 207 細胞/mm2 と、有 意な差はつかないものの、増加していた。このことから、副腎除去を行う事で、 神経堤由来 ACTH 産生細胞は、非神経堤細胞に比べ、増加の割合が大きいことが 示唆された。



図 3-19. 副腎除去後1週間の下垂体での神経堤由来ACTH産生細胞の挙動

開腹手術のみ(Sham)と副腎除去(Adx)を行った後、1週間での成体下垂体におけ るGFP陽性細胞の挙動の解析を行った。(A)Sham、(B)Adxでの成熟下垂体におけ るACTH(Cy3:赤)、GFP(FITC:緑)のMerge像を示した。(C)全ACTH産生細胞の数を 全細胞核の数で割った割合(ACTH+/DAPI)。(D)ShamとAdx におけるActhの前駆体 であるPomcの発現量を下垂体前葉から抽出したcDNAより測定した。内部標準に はTATA-Binding Protein(Tbp)を用いた。(E)GFPと共存するACTH産生細胞の数を 全ACTH産生細胞の数で割った割合(ACTH+GFP+/ACTH+)を、ShamとAdxでそれぞれ 計測した。(F)1mm²あたりのGFPと共存するACTH産生細胞の数を、ShamとAdxでそ れぞれ計測した。統計処理はすべてStudent's t-testを行なった。*;p<0.05、 **;p<0.01。Scale bars: 100 μ m

3-7 考察

本章の解析において、Cre/LoxP システムを用いた遺伝的運命追跡実験によっ て、下垂体幹細胞、ホルモン産生細胞の一部は P0 系譜の神経堤細胞である事が 初めて示された。さらに発生過程の局在を解析する事で、ユニークな局在様式 を取っている事が明らかとなった。

GFP 陽性細胞は口腔上皮が陥入する E9.5 ですでに侵入していることが示され た。加えて、口腔上皮の吻側では、間葉細胞の状態の GFP 陽性細胞が口腔上皮 の上層に沿うように存在していた(図 3-7 A;矢印)。プラコード由来組織の発生 初期では、プレプラコード領域から各組織の予定発生領域へ細胞移動する際に おいて、"Chase and Run"という興味深いモデルが提唱されている (Steventon et al. 2014)。プラコード細胞が SDF-1(CXCL12)を分泌し、SDF-1 の受容体である CXCR4 をもつ神経堤細胞がシグナルを受容し、SDF-1 の濃度が濃い方向(つまり はプラコード細胞)へと神経堤細胞は細胞移動をする。しかし、プラコード細胞 と神経堤細胞は Planar cell polarity (PCP)/N-cadherin (NCAD)依存的な細胞 接触の阻害を受けるため、プラコード細胞は神経堤細胞から逃げるように細胞 移動を行う。Chase and Run とは、このようにしてプラコード細胞が神経堤細胞 によって予定発生領域へと"追い込まれる"モデルのことである。このときに、 神経堤細胞の一部はプラコード細胞集団に混ざり込むとされている(Steventon et al. 2014)。E9.5 での下垂体プラコード細胞と神経堤細胞は、この Chase and Run によって、神経堤細胞が下垂体プラコード細胞を予定発生領域に誘導してい る可能性を示している。プラコード由来の咽頭弓は神経堤細胞との Chase and Run によらない形成を行うという点より、下垂体プラコード細胞が神経堤細胞と の Chase and Run によって予定発生領域へと追いやられていることを証明する には、下垂体プラコードが SDF-1 を分泌し、神経堤細胞がそれを受容している

かなどの更なる追試が必要だが、本研究により、下垂体発生初期における下垂 体プラコード細胞は、他のプラコード由来組織と同様に、神経堤細胞と密接な 関係を有していることが示唆された。

また、興味深いことに、PO-Cre/EGFPマウスを用いて解析を行うとマウス E14.5 でも下垂体血管形成の起点である Atwell's Recess から GFP 陽性細胞が大量に 侵入していることが示された(図 3-7 D)。この時、GFP 陽性細胞は Cre を発現し ている細胞が多いが、PO遺伝子の発現はE8.0-E12.5の細胞移動中の神経堤細胞 で確認され、発生中期以降では消失するとされている(Wang et al. 2011; Liu et al. 2012; Chen et al. 2017)。加えて、PO遺伝子は神経堤細胞の他に内在性血 管内皮細胞でも発現していることが網膜での研究で示唆されていることから (Kubota et al. 2011)、これらの GFP 陽性細胞は神経堤細胞でない可能性も考 えられる。しかし、Davis らは、PO-Creマウスに加えて Wnt1-Creマウスを用い て下垂体における神経堤細胞を追跡した結果、Wnt1 系譜の神経堤細胞も Atwell's Recess から侵入していることを報告した。加えて、神経堤細胞特異 的に *b-catenin* 遺伝子を欠損させ神経堤細胞特異的に細胞死を誘導したマウス (PO-Cre/B-catenin^{flox/flox})を解析することで、神経堤細胞が消失すると下垂体の 血管系細胞の一つである周皮細胞(ペリサイト)が消失することを示している (Davis et al. 2016a)。本研究においても、GFP 陽性細胞がペリサイトの特徴を 有していることを示しており(図 3-10; 矢頭)、これらのことから、神経堤細胞 がAtwell's Recess より侵入し下垂体血管形成に関与していることが示唆され、 下垂体には少なくとも2回に分けてGFP陽性細胞が侵入していると考えられる。 この複数回に分けて侵入する現象は他の顔面プラコード由来組織では確認され ていないユニークな特徴である。しかし、神経堤細胞は系譜によって出現時期 と機能が異なるということが知られている。例えば、2-5-2 で述べたように、P0 系譜の神経堤細胞は E8.0 に出現する神経堤細胞だが、この神経堤細胞はメラノ

サイトや、後根神経節、頭蓋顔面の形成に大きく貢献する(Yamauchi et al. 1999)。 また、Boundary Cap 神経堤細胞は E11.5-E13.5 で細胞移動を開始する神経堤細 胞で、P0 系譜ではないと考えられる。近年では、この Boundary Cap 神経堤細胞 は後根神経節やその他の組織において組織幹細胞として機能することが報告さ れている(Zujovic et al. 2011; Gresset et al. 2015)。これらを考慮すると、 神経堤細胞が同一組織に複数回侵入していることは特別な現象ではないのかも しれない。感覚器官である嗅上皮・レンズ・内耳などと異なり、内分泌器官で ある下垂体は周囲の間葉細胞を取り込んだ大規模な血管網の形成を必要とする ため(Daikoku et al. 1981)、第2波である E14.5 での侵入が他の組織に比べて 可視化し易かった可能性も考えられる。例えば CreERT2 を用いた時期特異的な 神経堤細胞の解析や、Boundary Cap 神経堤細胞を追跡する *Krox20-Cre*マウスを 用いて解析を行えば、下垂体も含めた顔面プラコード由来組織への更なる神経 堤細胞の侵入が観察できることが期待できる。

出生後 2 週間は下垂体 Growth Wave と呼ばれる下垂体細胞の増殖と組織の拡 張が行われる重要な期間である。この Growth Wave の期間では、GFP+/DAPI、 SOX2+GFP+/SOX2+、Horms+GFP+/Horms+の割合が激減していた(図 3-11 E、図 3-13 A、図 3-14 E)。このことから、Growth Wave における下垂体細胞の増殖と組織 の拡張は口腔上皮由来細胞による影響が大きいと考えられる。興味深いことに、 P0 では MCL に存在する SOX2 陽性幹細胞の 20-30%が神経堤由来幹細胞であった のに対し、P15 ではほぼ全ての MCL の SOX2 陽性細胞が口腔上皮由来細胞であっ た(図 3-13 C)。下垂体幹細胞ニッチを制御する機構として、膜タンパク質 CAR や Ephrin/Eph に注目した解析結果により、出生直後の MCL の SOX2 陽性細胞は 上皮-間葉転換により実質層に移動していることを示唆する結果が報告されて いる(Chen et al. 2013;Yoshida et al. 2015 and 2017)。このことから、出生 直後の MCL に存在する神経堤由来 SOX2 陽性細胞は上皮-間葉転換によって実質

層へと移動している可能性が示唆された。しかし、本研究では、P30からP60に かけてMCLにSOX2/GFP2重陽性細胞が再び出現することをさらに示している(図 3-13 C)。加えて、その期間ではSOX2/GFP2重陽性細胞の顕著な分裂能の増加 が認められないことから(図 3-17)、分裂による増加の他に神経堤細胞が供給さ れている可能性が考えられる。第2章の考察で述べたように、中葉に存在する PAX7陽性細胞が前葉に移動してきている可能性が示唆されている事から、中葉 のGFP陽性細胞が前葉へと移動してきている可能性が考えられる。また、下垂 体の周囲には神経堤由来間葉細胞が多数存在しているため(図 2-5)、この細胞が 新たに侵入している可能性も否定はできない。

S1008陽性細胞は、出生後10日程度に前葉と中葉の結合部より出現するとさ れてきた(Soji et al. 1997)。しかし近年の解析で、S100β陽性細胞が出生直後 に下垂体に存在していること(Horiguchi et al. 2016b)、さらに、胎仔期下垂 体血管形成に伴い S100β陽性細胞が下垂体に侵入していることを示唆する結果 を報告している(Horiguchi et al. 2016a)。また胎仔期の S100B陽性細胞のおよ そ 40%は p75^{NR}と共存することから、我々は、S100β陽性細胞の一部は神経堤由 来細胞であると推測した。そこで、S100β陽性細胞が下垂体に多く局在している 成体下垂体で解析を行うと、予想に反して多くの S100B陽性細胞は GFP 陰性であ った(図 3-18)。このことから、下垂体の S100B陽性細胞の多くは、少なくとも P0 系譜の神経堤細胞ではないと考えられる。しかし、S100Bはアストロサイト、 脂肪細胞、軟骨細胞、間葉細胞などで発現しており(Itakura et al. 2007)、こ れらの細胞の多くは神経堤細胞由来である事が知られている(Kaltschmidt et al. 2012)。PO-Cre/EGFPマウスで標識できない神経堤細胞も存在することから、 下垂体に存在する全ての S100β陽性細胞が神経堤細胞由来である可能性も十分 に考えられる。 残りの S100β陽性細胞の起源が神経堤細胞であるか、 下垂体プラ コード細胞であるかは更なる追試、例えば Wnt1-Cre や HtPa-Cre、SOX10-Cre、

Krox20-Cre などのその他の神経堤細胞マーカーを用いたトランスジェニック動物を用いた解析、が必要である。

以上の解析から、GFP 陽性細胞が下垂体に複数回に分けて侵入し、下垂体幹細胞としてホルモン産生細胞を供給していることを初めて示した。加えて、成体 PO-Cre/GFP マウスの副腎除去を行うことで生理的変化を生じさせた際の下垂体 では、ACTH/GFP 2 重陽性細胞が増加していたことも非常に興味深い(図 3-19)。 他の組織では成体幹細胞として神経堤細胞が機能していることが報告されてい るが(Gresset et al. 2015; Suzuki et al. 2013; Zujovic et al. 2011)、本 解析は、神経堤細胞が成体下垂体幹細胞として機能する可能性を初めて示唆す る結果である。しかし、本解析では、増加した ACTH 産生細胞が SOX2/GFP 2 重 陽性細胞から供給されているかどうかが明らかになっていない。今後、抗体の 問題で実施が不可能であった BrdU を用いた分裂細胞の標識や副腎除去後の日数 を変化させた際の下垂体を SOX2 や ACTH との共染色により解析を行うことで、 生理的な変化が生じた際に供給されるホルモン産生細胞の起源が SOX2 陽性 GFP 陰性細胞なのか、SOX2/GFP 2 重陽性細胞なのか明らかとなることが期待される。 第4章 本研究の総括と今後の研究への展望

2章、3章の解析によって、下垂体に神経堤細胞が侵入していることが明らか となった。*PO-Cre/EGFP*マウス下垂体切片を用いて SOX10 の染色を行なうと、 SOX10 と GFP は共存していなかったことから(未提示データ)、SOX10 陽性細胞は PO 系譜でない可能性が考えられ、下垂体には SOX10 系譜と PO 系譜の少なくとも 2 種類の神経堤細胞が存在していることが示唆された。

SOX10の解析では、胎仔期後期に後葉で初めて SOX10 陽性細胞が観察され、そ の後に、侵入経路は不明だが、中葉にも出現するようになる。中葉と後葉の間 には多くの SOX10 陽性細胞が存在している事から、後葉に存在する SOX10 陽性 細胞は、Pituicyte (S100β陽性細胞)を供給するのみでなく、中葉へ移動してい る可能性も考えられる。考察で述べてきたように、中葉の細胞は前葉へ移動す ることが示唆されていることから、もしかしたら、後葉に出現する SOX10 陽性 細胞は前葉まで移動してきているのもしれない。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。本学位論文によって、3 葉を網羅的に解析する必要性を 示し、その研究の発展につながると期待している。

本解析結果により、下垂体 SOX2 陽性細胞の一部は神経堤細胞であることが示 唆された。さらに、*PO-Cre/EGFP*マウスを用いる事で、SOX2/GFP 2 重陽性細胞 がホルモン産生細胞へと分化していることを示した。SOX2/GFP 2 重陽性細胞が P30 から P60 にかけてその割合を再び増加させていることは、成体下垂体におい て SOX2/GFP 2 重陽性細胞が何らかの機能を担うために増加している可能性が考 えられる。下垂体と同じくプラコードを発生の起源とする嗅上皮では、神経堤 由来細胞が成体幹細胞として機能していることが報告されている(Suzuki et al. 2013)。このことを考慮すると、下垂体に存在する SOX2/GFP 2 重陽性細胞が成

体幹細胞として機能しているかもしれないという可能性が示された。これは、 本研究が目的としていた、下垂体幹細胞を選別する新たな指標となり得る可能 性を有している。これを明らかにするには、第3章の考察で述べた、下垂体ホ ルモン標的器官除去の追試に加えて、酵素によって下垂体を分散した後に、フ ローサイトメトリーによって GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞をそれぞれ分取した 後に、1-6-2 で述べた Sphere 形成アッセイとホルモン産生細胞への分化効率を 解析することによって、GFP 陽性細胞が下垂体幹細胞として機能しているかが明 らかになることが期待される。 本解析によって、下垂体に神経堤細胞が侵入しており、下垂体を構成する全 ての細胞の一部へと分化していることが示された。中でも、下垂体幹細胞の性 質を獲得していることは非常に興味深く、本学位論文の目的である、新たな下 垂体幹細胞を標識する指標となり得る可能性を有している。成体下垂体には口 腔上皮由来の幹細胞も多く残っていることから、口腔上皮由来幹細胞と神経堤 由来幹細胞は同じ機能を有しているのか、それとも起源によって異なる機能を 有しているのかは、非常に興味深い。例えば、下垂体は頻繁に腫瘍を形成する 組織として知られているが、この腫瘍形成に神経堤細胞がどの程度関与してい るのかを PO-Cre/EGFP マウスで下垂体腫瘍を形成することで解析することで、 起源による腫瘍形成の有無が明らかとなる事が期待される。また、神経堤細胞 研究の分野においても、プラコード由来組織と神経堤細胞についての関連性を もたらす事を示した。さらに、神経堤細胞が腫瘍の原因細胞の一つではないか 神経堤細胞研究者では仮説が立てられているが、下垂体は神経堤細胞と腫瘍研 究に有用なツールである。このように、下垂体研究のみではなく神経堤細胞研 究においてもその研究の発展につながると期待される。

本研究を遂行するにあたり、親切かつ熱心なご指導を賜りました明治大学農 学部生命科学科・遺伝情報制御学研究室の加藤幸雄教授ならに加藤たか子博士 に、心より深く感謝いたします。

第2章を遂行するにあたり用いた *S100β-GFP*トランスジェニックラットを快 く提供して頂いた元埼玉大学理学部生体制御学科・細胞制御学研究室の井上金 治教授に深く感謝申し上げます。

第3章を遂行するにあたり用いた PO-Cre/CAG-CAT-EGFP トランスジェニック マウスを快く提供して頂き、研究に関するご助言、ご指導を賜りました東北大 学大学院医学系研究科・発生発達神経科学分野の大隅典子教授、吉川貴子助教 に深く感謝申し上げます。

第3章を遂行するにあたり用いた PO-Creマウス、CAG-CAT-EGFPマウスをそれ ぞれ作成し、快く提供して頂いた、熊本大学生命資源研究・支援センター山村 プロジェクト研究室の山村研一教授、大阪大学大学院医学系研究科・幹細胞制 御学の宮崎純一教授に深く感謝申し上げます。

抗ホルモン抗体を提供して頂きました元静岡大学創造科学技術大学院・研究 部総合バイオサイエンス部門 故田中滋康教授に深く感謝申し上げます。

遺伝子改変動物についてのご指導、ご助言を下さいました自然科学研究機構 生理学研究所、行動・代謝分子解析センター遺伝子改変動物作製室 平林真澄准 教授、後藤哲平博士に深く感謝申し上げます。

学位論文審査において、ご指導とご鞭撻を頂きました明治大学農学部・生体機 能物質学研究室の渡辺寛人教授、並びに明治大学農学部・動物再生システム学 研究室の乾雅史講師に深く感謝申し上げます。

実験のご指導、ご助言を下さいました諏佐崇生博士、樋口雅司博士、陳默博

土、吉田彩舟博士、八子英司博士、菅野尚子博士、三ツ石英生修士、高梨遥修
 土、河合航平学士、西村直人修士、西原大翔修士、岡本和弘学士、小林由希学
 土、鈴木明里学士、瀬倉隆平学士、龍華良典学士、菅野紘氏、田村祐介氏をは
 じめとする、お世話になりました遺伝情報制御学研究室のみなさまへ、心から
 深く感謝申し上げます。

- Abremski K, Hoess R (1984) Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. J Biol Chem. 259:1509-14
- Achilleos A, Trainor PA (2012) Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. Cell Res. 22:288-304
- Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, Gaston-Massuet C, Mollard P, Jacques TS, Le Tissier P, Dattani MT, Pevny LH, Martinez-Barbera JP (2013) Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. Cell Stem Cell. 13:433-45
- Aquino JB, Hjerling-Leffler J, Koltzenburg M, Edlund T, Villar MJ, Ernfors P (2006) In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. Exp Neurol. 198:438-49
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5.Nature. 449:1003-7
- Ben-Jonathan N, Peleg E, Hoefer MT (1983) Optimization of culture conditions for short-term pituitary cell culture. Methods Enzymol. 103:249-57
- Bicknell AB (2008) The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. J Neuroendocrinol. 20:692-9
- Bouchoucha YX, Charnay P, Gilardi-Hebenstreit P (2013) Ablation of Egr2-positive cells in male mouse anterior pituitary leads to atypical isolated GH deficiency. Endocrinology. 154:270-82
- Budry L, Balsalobre A, Gauthier Y, Khetchoumian K, L'honoré A, Vallette S, Brue T, Figarella-Branger D, Meij B, Drouin J (2012) The selector gene Pax7 dictates alternate pituitary cell fates through its pioneer action on chromatin remodeling. Genes Dev. 26:2299-310
- Chen G, Ishan M, Yang J, Kishigami S, Fukuda T, Scott G, Ray MK, Sun C, Chen SY, Komatsu Y, Mishina Y, Liu HX (2017) Specific and spatial

labeling of P0-Cre versus Wnt1-Cre in cranial neural crest in early mouse embryos. Genesis. 55. doi: 10.1002/dvg.23034.

- Chen J, Crabbe A, Van Duppen V, Vankelecom H (2006) The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population. Mol Endocrinol. 20:3293-307
- Chen J, Gremeaux L, Fu Q, Liekens D, Van Laere S, Vankelecom H (2009) Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. Stem Cells. 27:1182-95
- Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Denef C, Vankelecom H (2005) The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. Endocrinology. 146:3985-98
- Chen M, Kato T, Higuchi M, Yoshida S, Yako H, Kanno N, Kato Y (2013) 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 Tissue Res. 354:823-36
- Couly GF, Le Douarin NM (1985) Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. Dev Biol. 110:422-39
- Couly GF, Le Douarin NM (1987) Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. Dev Biol. 120:198-214
- Daikoku S, Kawano H, Abe K, Yoshinaga K (1981) Topographical appearance of adenohypophysial cells with special reference to the development of the portal system. Arch Histol Jpn. 44:103-16
- Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Carninci P, Mortensen AH, Hayashizaki Y, Arnhold IJ, Mendonça BB, Brue T, Camper SA (2010) Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: In search of novel regulatory genes. Mol Cell Endocrinol. 323:4-19
- Davis SW, Keisler JL, Pérez-Millán MI, Schade V, Camper SA (2016b) All Hormone-Producing Cell Types of the Pituitary Intermediate and Anterior

LobesDeriveFromProp1-ExpressingProgenitors.Endocrinology. 157:1385-96

- Davis SW, Mortensen AH, Keisler JL, Zacharias AL, Gage PJ, Yamamura K, Camper SA (2016a) β-catenin is required in the neural crest and mesencephalon for pituitary gland organogenesis. BMC Dev Biol. 16:16
- Dupin E, Coelho-Aguiar JM (2013) Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. Cytometry A. 83:38-47
- Eto K, Takakubo F (1985) Improved development of rat embryos in culture during the period of craniofacial morphogenesis. J Craniofac Genet Dev Biol. 5:351-5
- Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC (2008) SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2907-12
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. Biochem Biophys Res Commun. 237:752-7
- Glasgow SM, Zhu W, Stolt CC, Huang TW, Chen F, LoTurco JJ, Neul JL, Wegner M, Mohila C, Deneen B (2014) Mutual antagonism between Sox10 and NFIA regulates diversification of glial lineages and glioma subtypes. Nat Neurosci. 17:1322-9
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med.183:1797-806
- Gremeaux L, Fu Q, Chen J, Vankelecom H (2012) Activated phenotype of the pituitary stem/progenitor cell compartment during the early-postnatal maturation phase of the gland. Stem Cells Dev. 21:801-13
- Gresset A, Coulpier F, Gerschenfeld G, Jourdon A, Matesic G, Richard L, Vallat JM, Charnay P, Topilko P (2015) Boundary Caps Give Rise to Neurogenic Stem Cells and Terminal Glia in the Skin. Stem Cell Reports. 5:278-90
- Higuchi M, Kanno N, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Yako H, Shibuya S, Sekita M, Tsuda M, Mitsuishi H, Nishimura N, Kato T, Kato Y (2014)
 GFP-expressing S100β-positive cells of the rat anterior pituitary differentiate into hormone-producing cells. Cell Tissue Res. 357(3):767-79

- Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yako H, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y (2016b) Expression of Slug in S100β-protein-positive cells of postnatal developing rat anterior pituitary gland. Cell Tissue Res. 363:513-24
- Horiguchi K, Yako H, Yoshida S, Fujiwara K, Tsukada T, Kanno N, Ueharu H, Nishihara H, Kato T, Yashiro T, Kato Y (2016a) S100β-Positive Cells of Mesenchymal Origin Reside in the Anterior Lobe of the Embryonic Pituitary Gland. PLoS One. 11(10): e0163981
- Hosoyama T, Nishijo K, Garcia MM, Schaffer BS, Ohshima-Hosoyama S, Prajapati SI, Davis MD, Grant WF, Scheithauer BW, Marks DL, Rubin BP, Keller C (2010) A Postnatal Pax7 Progenitor Gives Rise to Pituitary Adenomas. Genes Cancer. 1:388-402
- Itakura E, Odaira K, Yokoyama K, Osuna M, Hara T, Inoue K (2007) Generation of transgenic rats expressing green fluorescent protein in S-100beta-producing pituitary folliculo-stellate cells and brain astrocytes. Endocrinology.148:1518-23
- Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000) Fate of the mammalian cardiac neural crest. Development. 127:1607-16
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Widera D (2012) Adult craniofacial stem cells: sources and relation to the neural crest. Stem Cell Rev. 8:658-71
- Kanakubo S, Nomura T, Yamamura K, Miyazaki J, Tamai M, Osumi N (2006) Abnormal migration and distribution of neural crest cells in Pax6 heterozygous mutant eye, a model for human eye diseases. Genes Cells. 11:919-33
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ (2003) SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. Neuron. 38:17-31
- Kléber M, Lee HY, Wurdak H, Buchstaller J, Riccomagno MM, Ittner LM, Suter U, Epstein DJ, Sommer L (2005) Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. J Cell Biol. 169:309-20
- Kouki T, Imai H, Aoto K, Eto K, Shioda S, Kawamura K, Kikuyama S (2001) Developmental origin of the rat adenohypophysis prior to the formation of Rathke's pouch. Development. 128:959-63

- Kubota Y, Takubo K, Hirashima M, Nagoshi N, Kishi K, Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Sano K, Murakami M, Ema M, Omatsu Y, Takahashi S, Nagasawa T, Shibuya M, Okano H, Suda T (2011) Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. J Exp Med. 208:949-60
- Le Douarin NM (2008a) Developmental patterning deciphered in avian chimeras. Dev Growth Differ. S11-28.
- Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E (2008b) The stem cells of the neural crest. Cell Cycle. 7:1013-9
- Li S, Crenshaw EB, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature. 347:528-33
- Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG (1994) Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. Development. 120:515-22
- Liu HX, Komatsu Y, Mishina Y, Mistretta CM (2012) Neural crest contribution to lingual mesenchyme, epithelium and developing taste papillae and taste buds. Dev Biol. 368:294-303.
- Lo L, Anderson DJ (1995) Postmigratory neural crest cells expressing c-RET display restricted developmental and proliferative capacities. Neuron. 15:527-39
- Lwigale PY, Conrad GW, Bronner-Fraser M (2004) Graded potential of neural crest to form cornea, sensory neurons and cartilage along the rostrocaudal axis. Development. 131:1979-91
- Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P (2004) Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. Nat Neurosci. 7:930-8
- Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E, Myokai F, Matsuo N, Taniguchi S, Doi H, Iseki S, Ninomiya Y, Fujiwara M, Watanabe T, Eto K (1993) A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. Nat Genet. 3:299-304
- Matsuoka T, Ahlberg PE, Kessaris N, Iannarelli P, Dennehy U, Richardson WD, McMahon AP, Koentges G (2005) Neural crest origins of the neck and shoulder. Nature. 436:347-55
- Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ (1999) Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. Cell. 96(5):737-49
- Nakamura H, Ayer-le Lievre CS (1982) Mesectodermal capabilities of the trunk neural crest of birds. J Embryol Exp Morphol. 70:1-18
- Niederländer C, Lumsden A (1996) Late emigrating neural crest cells migrate specifically to the exit points of cranial branchiomotor nerves. Development. 122:2367-74
- Nieto MA, Sechrist J, Wilkinson DG, Bronner-Fraser M (1995) Relationship between spatially restricted Krox-20 gene expression in branchial neural crest and segmentation in the chick embryo hindbrain. EMBO J. 14:1697-710
- Noden DM (1978) The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. Dev Biol. 67:296-312
- Noden DM (1978) The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. II. Neural tissues. Dev Biol. 67:313-29
- Nolan LA, Levy A (2006a) The effects of testosterone and oestrogen on gonadectomised and intact male rat anterior pituitary mitotic and apoptotic activity. J Endocrinol. 188(3):387-96
- Nolan LA, Levy A (2006b) A population of non-luteinising hormone/non-adrenocorticotrophic hormone-positive cells in the male rat anterior pituitary responds mitotically to both gonadectomy and adrenalectomy. J Neuroendocrinol. 18:655-61
- Nolan LA, Schmid HA, Levy A (2007) Octreotide and the novel multireceptor ligand somatostatin receptor agonist pasireotide (SOM230) block the adrenalectomy-induced increase in mitotic activity in male rat anterior pituitary. Endocrinology. 148:2821-7
- Pietri T, Eder O, Blanche M, Thiery JP, Dufour S (2003) The human tissue plasminogen activator-Cre mouse: a new tool for targeting specifically neural crest cells and their derivatives in vivo. Dev Biol. 259:176-87
- Schweizer G, Ayer-Le Lièvre C, Le Douarin NM (1983) Restrictions of developmental capacities in the dorsal root ganglia during the course of development. Cell Differ. 13:191-200

- Shibata S, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H (2010)
 Sox10-Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes. Mol Brain. 3:31
- Singh S, Groves AK (2016) The molecular basis of craniofacial placode development. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 5:363-76
- Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert DC (1997) Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. Microsc Res Tech. 39:138-49
- Soji T, Sirasawa N, Kurono C, Yashiro T, Herbert DC (1994) Immunohistochemical study of the post-natal development of the folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland. Tissue Cell. 26:1-8
- Stemple DL, Anderson DJ (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. Cell. 71:973-85
- Steventon B, Mayor R, Streit A (2014) Neural crest and placode interaction during the development of the cranial sensory system. Dev Biol. 389:28-38
- Streit A (2004) Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. Dev Biol. 276(1):1-15
- Suzuki J, Yoshizaki K, Kobayashi T, Osumi N (2013) Neural crest-derived horizontal basal cells as tissue stem cells in the adult olfactory epithelium. Neurosci Res. 75:112-20
- Ueharu H, Yoshida S, Kanno N, Horiguchi K, Nishimura N, Kato T, Kato Y (2017a) SOX10-positive cells emerge in the rat pituitary gland during late embryogenesis and start to express S100β. Cell Tissue Res. in press. doi: 10.1007/s00441-017-2724-7
- Ueharu H, Yoshida S, Kikkawa T, Kanno N, Higuchi M, Kato T, Osumi N, Kato Y (2017b) Gene tracing analysis reveals the contribution of neural crest-derived cells in pituitary development. J Anat. 230:373-380
- Van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. Annu Rev Physiol. 71:241-60
- Vankelecom H, Chen J (2014) Pituitary stem cells: where do we stand? Mol Cell Endocrinol. 385:2-17

- Wakaoka T, Motohashi T, Hayashi H, Kuze B, Aoki M, Mizuta K, Kunisada T, Ito Y (2013) Tracing Sox10-expressing cells elucidates the dynamic development of the mouse inner ear. Hear Res. 302:17-25
- Wang SK, Komatsu Y, Mishina Y (2011) Potential contribution of neural crest cells to dental enamel formation. Biochem Biophys Res Commun. 415:114-9.
- Ward RD, Stone BM, Raetzman LT, Camper SA (2006) Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. Mol Endocrinol. 20:1378-90
- Weber M, Apostolova G, Widera D, Mittelbronn M, Dechant G, Kaltschmidt B, Rohrer H (2015) Alternative generation of CNS neural stem cells and PNS derivatives from neural crest-derived peripheral stem cells. Stem Cells. 33:574-88
- Wei XY, Zhao CH, Liu YY, Wang YZ, Ju G (2009) Immuohistochemical markers for pituicyte. Neurosci lett. 465:27-30
- Willems C, Fu Q, Roose H, Mertens F, Cox B, Chen J, Vankelecom H (2016)Regeneration in the Pituitary After Cell-Ablation Injury: Time-RelatedAspects and Molecular Analysis. Endocrinology. 157:705-21
- Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Macdonald HR, Trumpp A (2007) Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. Ann N Y Acad Sci. 1106:64-75
- Yamauchi Y, Abe K, Mantani A, Hitoshi Y, Suzuki M, Osuzu F, Kuratani S, Yamamura K (1999) A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice. Dev Biol. 212:191-203
- Yoshida S, Kato T, Higuchi M, Chen M, Ueharu H, Nishimura N, Kato Y (2015) Localization of juxtacrine factor ephrin-B2 in pituitary stem/progenitor cell niches throughout life. Cell Tissue Res. 359:755-66
- Yoshida S, Kato T, Kanno N, Nishimura N, Nishihara H, Horiguchi K, Kato Y (2017) Cell type-specific localization of Ephs pairing with ephrin-B2 in the rat postnatal pituitary gland. Cell Tissue Res. 370:99-112
- Yoshida S, Kato T, Kato Y (2016) EMT Involved in Migration of Stem/Progenitor Cells for Pituitary Development and Regeneration. J Clin Med. doi:10.3390/jcm5040043

- Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai LY, Nakayama M, Kato Y (2009) PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. Biochem Biophys Res Commun. 385:11-5
- Yoshida S, Kato T, Yako H, Susa T, Cai LY, Osuna M, Inoue K, Kato Y (2011) Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem/progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary. J Neuroendocrinol. 23:933-43
- Yoshida S, Nishimura N, Ueharu H, Kanno N, Higuchi M, Horiguchi K, Kato T, Kato Y (2016) Isolation of adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchyma of the rat anterior lobe. Stem Cell Research. 17:318-329
- Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG (2007) Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. Physiol Rev. 87:933-63
- Zujovic V, Thibaud J, Bachelin C, Vidal M, Deboux C, Coulpier F, Stadler N, Charnay P, Topilko P, Baron-Van Evercooren A (2011) Boundary cap cells are peripheral nervous system stem cells that can be redirected into central nervous system lineages. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:10714-9