

下垂体における幹細胞ニッチ形成に関わるCAR陽性細胞の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2014-09-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 陳, 黙 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/16726

明治大学大学院農学研究科

2013 年度

博士学位請求論文

下垂体における幹細胞ニッチ形成に関わる

CAR 陽性細胞の解析

Studies of Roles of CAR

in a Pituitary Stem Cell Niche

学位請求者 生命科学専攻

陳 黙

目次	
第1章 序論	5
1-1 はじめに	5
1-2 下垂体について	5
1-3 下垂体の発生	8
1-4 下垂体の幹・前駆細胞とホルモン産生細胞の供給	10
1-4-1 幹細胞と分化能	10
1-4-2 SP細胞 (The Side Population) の分離	12
1-4-3 SOX2陽性細胞群	15
1-4-4 下垂体コロニー形成細胞 (PCFCs : The Pituitary Colony-Forming Cells)	17
1-4-5 Nestin-Creを用いた下垂体幹細胞研究	17
1-4-6 濾胞星状細胞 (FS細胞 : Folliculo-Stellate Cell)	19
1-4-7 トリプシンストレス耐性細胞	22
1-4-8 下垂体における幹細胞ニッチ	23
1-5 コクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体 CARについて	27
1-5-1 CAR遺伝子の発見の経緯と応用への期待	27
1-5-2 生体におけるCARの発現	30
1-5-3 CAR遺伝子	30
1-5-4 CARタンパク質と結合様式	32
1-5-5 CARが関与する生理機能	40
1-5-5-1 CARと細胞内情報伝達系	40
1-5-5-2 CARを介する細胞間接着	40
1-5-5-3 細胞移動	41
1-5-5-4 不均等分裂	42
1-5-5-5 細胞分裂と増殖	43
1-5-6 CAR遺伝子発現の制御に関わる細胞内シグナル経路	44
1-5-6-1 NF- κ B経路とJAK-STAT経路	44

1-5-6-2	TGFβ シグナル経路	45
1-5-6-3	増殖・分化・アポトーシスのシグナル経路 (Raf/RAF/MEK/ERK 経路)	46
1-5-6-4	転写制御因子 SP1	47
1-6	これまでの CAR の研究に基づく本研究の課題	48
第 2 章 生体組織における CAR の発現		49
2-1	緒言	49
2-1-1	神経系の発生における関与	51
2-1-2	心臓の器官形成	55
2-1-3	精子形成	58
2-1-4	本章の目的	61
2-2	材料及び実験方法	62
2-2-1	実験動物	62
2-2-2	パラホルムアルデヒド固定法	62
2-2-3	免疫染色	62
2-2-4	観察	63
2-3	結果	65
2-3-1	胎仔期 12.5 の whole body を用いた CAR の局在分析	65
2-3-2	外胚葉由来組織における CAR の発現	67
2-3-3	中胚葉由来組織における CAR の発現	71
2-3-4	内胚葉由来組織における CAR の発現	74
2-4	考察	76
第 3 章 下垂体発生過程における CAR の発現と局在様式の解析		79
3-1	緒言	79
3-2	材料及び実験方法	80
3-2-1	ラット CAR 遺伝子エクソン 7 の同定	80

3-2-2	cDNA の作製	80
3-2-3	Real-time PCR	81
3-2-4	免疫組織化学	82
3-2-4-1	実験動物	82
3-2-4-2	エタノール固定法	82
3-2-4-3	パラホルムアルデヒド固定法	83
3-2-4-4	ブアン固定法	83
3-2-4-5	免疫染色	83
3-2-4-6	観察	84
3-3	結果	87
3-3-1	ラット CAR 遺伝子のアイソフォームの確認	87
3-3-2	下垂体発生過程における CAR 遺伝子の発現	91
3-3-3	ラット下垂体原基形成期における CAR の局在	93
3-3-4	下垂体胎仔期発生過程における CAR の局在	95
3-3-5	出生後における CAR の局在	98
3-3-6	CAR 陽性細胞における CAR の細胞内極性について	101
3-3-7	CAR 陽性細胞における各種マーカータンパク質の発現解析	102
3-3-7-1	CAR はホルモン産生細胞には存在しない	102
3-3-7-2	CAR 陽性細胞の一部は S100 β を発現している濾胞星状細胞 (FS 細胞) でも発現している	104
3-3-7-3	CAR は幹・前駆細胞マーカーと共存する	105
3-3-7-4	CAR 陽性細胞の分裂能	112
3-3-7-5	生後直後の CAR 陽性細胞における EMT の可能性	114
3-4	考察	116
3-4-1	CAR と幹ニッチの関係	116
3-4-2	CAR によるニッチの形成	119
3-4-3	出生後の CAR 陽性細胞の役割について	121
3-4-4	S100 β が存在する CAR 陽性細胞について	121

3-4-5	CAR のアイソフォームとその局在特性と役割について	123
3-4-6	生後直後に CAR 陽性細胞で上皮間葉転移 EMT が起こっている 可能性について	125
3-4-7	結語	126
引用文献	127
謝辞	143

第1章 序論

1-1 はじめに

本研究は、下垂体における幹細胞と幹細胞の生存する場所（幹細胞ニッチ）を主題としている。第一章では、本研究の背景となる下垂体の発生や細胞構成、現在までの幹細胞研究、または幹細胞ニッチの指標とした新規因子であるコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体（Coxsackievirus and Adenovirus Receptor, CAR）について述べる。

1-2 下垂体について

下垂体とは、脊椎動物に共通している内分泌器官である。視床下部に接して脳の直下であり、視床下部-下垂体-標的器官を制御軸とし、視床下部や標的組織から放出される各種のペプチドホルモンやステロイドホルモンのフィードバックの調節機構により調節されている。下垂体は腺下垂体（前葉と中葉）と神経下垂体（後葉）により構成され、多種のホルモンの合成・分泌することにより成長、生殖、適応、代謝、行動など多くの生体機能の制御に関与している。前葉では、6種類のホルモン、成長ホルモン(GH)、プロラクチン(PRL)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、性腺刺激ホルモン（同じ細胞で分泌される黄体形成ホルモン(LH)と卵胞刺激ホルモン(FSH)の総称）が合成され、下垂体内に張り巡らされた毛細血管を通過して全身に運ばれ、各機能を発揮することになる（図1）。成熟ラットでは、表1に示したような前葉ホルモン産生細胞の割合が報告されている(Ben-Jonathan et al. 1983)。

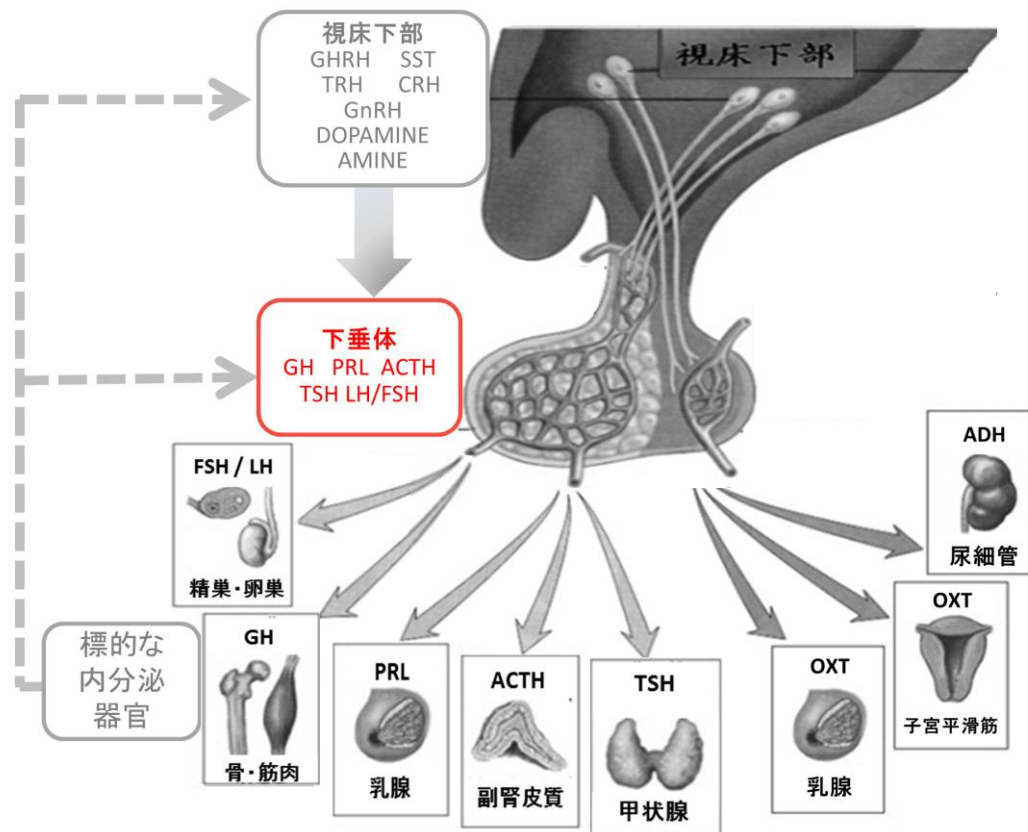


図1. 視床下部一下垂体の制御軸

下垂体は視床下部に接しており、視床下部や標的な内分泌組織から放出される各種のペプチドホルモンやステロイドホルモンによるフィードバック調節機構により、下垂体を構成する腺下垂体（前葉と中葉）と神経下垂体（後葉）は、多くのホルモンを合成・分泌し、成長、生殖、適応、代謝、行動など多くの生体機能を制御している。図はHuman Biology, Endocrine Systemを改変。

表1. ラット下垂体前葉のホルモン産生細胞の割合

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
ACTH	甲状腺摘除ラット	32-43
	200-300	3-4

表は、文献(Ben-Jonathan *et al.* 1983)を改変。

1-3 下垂体の発生

下垂体（前、中、後葉の3葉からなる）は、2つの異なる起源から発生する。胎仔発生初期の過程において、下垂体神経葉（後葉）は、神経管が前脳、中脳および菱脳の3つの部分に別れた後に、間脳視床下部の一部が腹側に折れ込んで形成される。一方、下垂体前・中葉は、咽頭後部の口腔上皮から陥入し、増殖しながら口腔上皮から離れ、腺下垂体（前・中葉）原基であるラトケ嚢（Rathke's pouch）になる。その後、活発な細胞の分裂と移動が続き、経時的に形態変化を伴いながら、ラトケ嚢の腹側から前葉が形成され、やがて中葉となる背部において間脳からなる後葉と接することで、下垂体が形成される(Kawamura and Kikuyama 1998; Kouki et al. 2001)。細胞レベルでは、未分化細胞がホルモン産生細胞へと分化しつつ、出生前には最終分化したすべてのホルモン産生細胞が出揃う。この組織発生と細胞分化の過程は、様々な転写因子やシグナル伝達因子の発現により時空間的に制御されている（図2）(Zhu et al. 2005; 加藤幸雄 et al. 2009)。出生後になると、下垂体の形状は大きく変化しないが、成長発達期を経て急速に増大し、成熟した個体の細胞数は出生直後より30倍程に増加している(Ben-Jonathan et al. 1983; Yako et al. 2013)。成熟後の下垂体では、生理状態に応じてホルモン産生細胞の増加や割合の変動も観察されている(Candolfi et al. 2006; Kominami et al. 2003; Ogasawara et al. 2009; Pawlikowski 1999)。以上の胎仔期の組織形成におけるホルモン産生細胞の分化や、生後組織の発達と細胞の更新に絶えず行われる各種細胞の補給機構において、特に注目されているのが最近話題の幹・前駆細胞である。

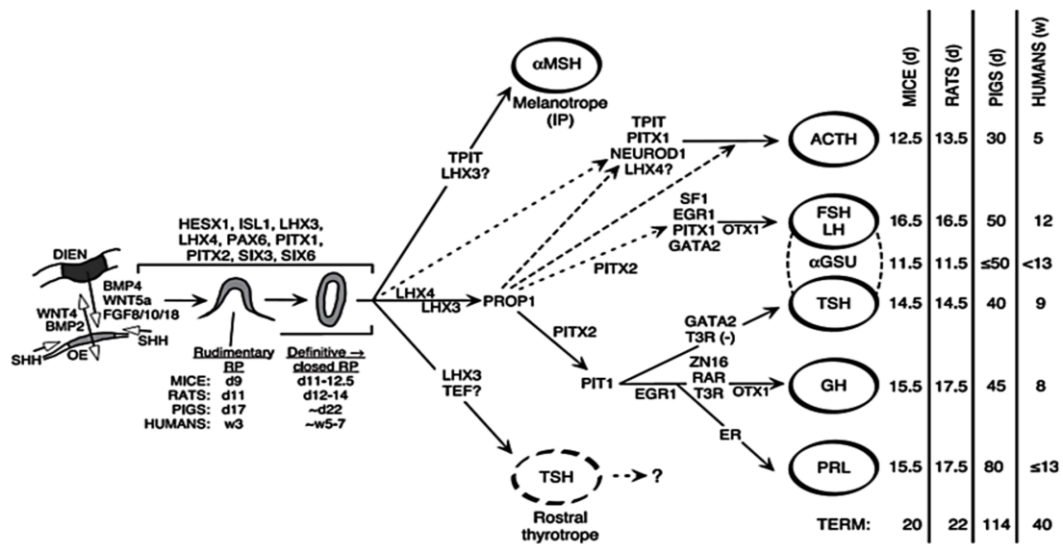


図2. 下垂体発生とホルモン産生細胞への分化制御

下垂体（前・中葉）の発生初期に口腔上皮（OE）が口窩に陥入して間脳（DIEN）に接するようになり、それらの組織から放出される種々の成長因子の働きにより、将来に前・中葉となる下垂体原基Rathke's pouch (RP) が出現する。その後、下垂体前葉内では、多数の転写因子の時空間的な発現制御により、最終的（TERM）に5種類のホルモン産生細胞が分化する(Savage et al., 2003)。図右端には、マウス、ラット、ブタ、ヒトにおけるホルモン産生細胞の出現開始の胎仔日齢が示されている。

1-4 下垂体の幹・前駆細胞とホルモン産生細胞の供給

1-4-1 幹細胞と分化能

幹細胞は多分化能を持ち、成熟した機能細胞へと分化できる細胞である。細胞の持つ分化能により胚性幹細胞と組織幹細胞に分類されている。受精卵から胚盤葉へと発生し、内部細胞塊より得られる細胞は、胚葉を超えた様々な細胞に分化できる多能性 (Pluripotency) を持つため、胚性幹細胞 (ESC: Embryonic Stem Cell) と呼ばれる。それに対して、各組織の起源となる細胞は、その組織におけるすべての機能細胞に分化できる複能性 (Multipotency) を持つため、組織幹細胞と呼ばれている (図3)。組織の形成と維持のために、幹細胞は不均等分裂を行い、一方は潜在的に分化能を持つ細胞のプールを維持し、他方は必要とされる細胞に分化するように細胞供給を行うと考えられている。

最近の10年間で幹細胞が様々な組織で発見され、組織形成と維持や損傷後の再生に機能している。下垂体においても幹細胞の研究が展開され、複数のアプローチから幾つかの幹・前駆細胞の候補が同定され、分離されている。

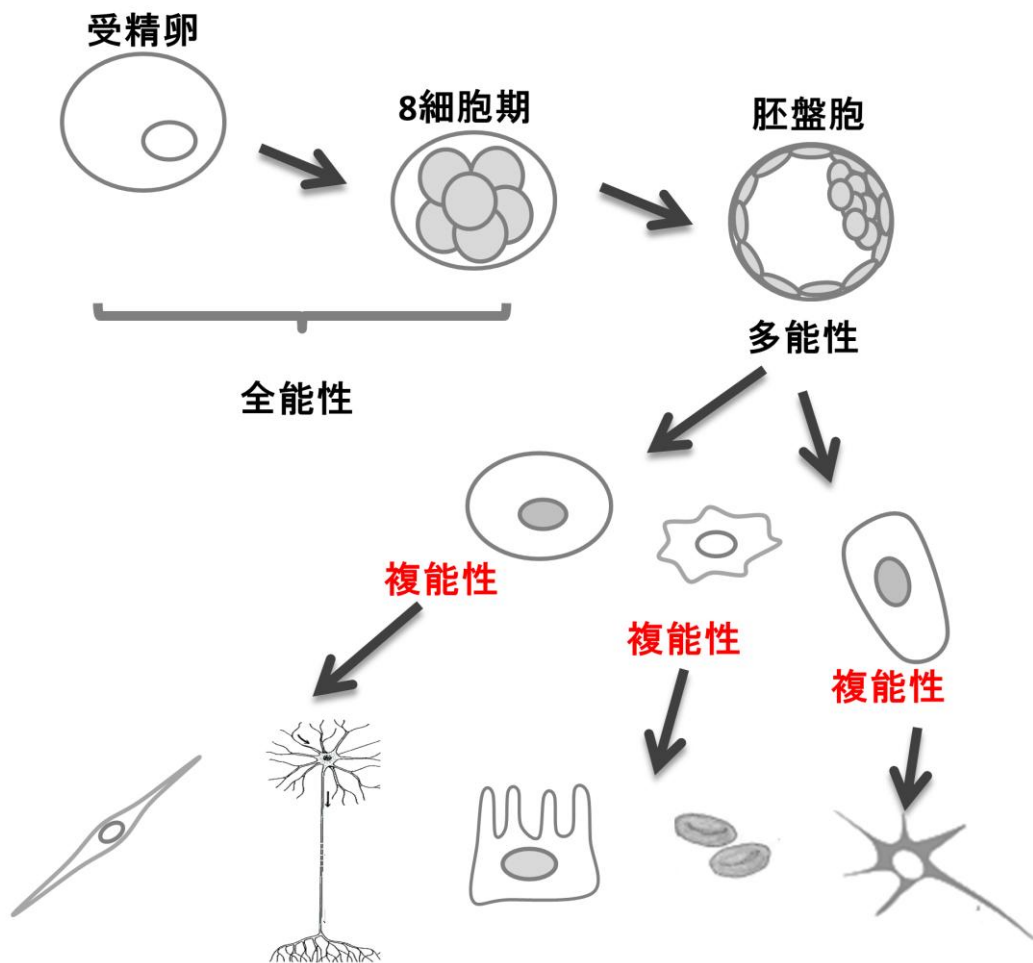


図3. 全能性細胞からの分化過程

全能性を持つ受精卵が分裂し、胚盤葉へと発生し、内部細胞塊より得られる幹細胞は、胚葉を超えた多様な細胞に分化する多能性 (Pluripotency) を持つ。それに対して、各組織における組織幹細胞はその組織におけるすべての機能細胞に分化できる複能性 (Multipotency) を持つ。

1-4-2 SP細胞 (The Side Population) の分離

1996年、細胞透過性が非常に高く、核酸との結合能を持つ蛍光色素ヘキスト (Hoechst 33342) をマウスの骨髄細胞に取り込ませて、フルオロサイトメトリーによる細胞分画を行うと、ヘキストの取り込み量の低い少量の細胞集団の存在が観察された(Goodell et al. 1996)。その細胞分画を、主たる取り込み量の多い細胞分画、MP画分 (Main Population) と区別して、SP画分 (Side Population) と命名された。その細胞分画の発現遺伝子を調べてみると、幹細胞や前駆細胞に見られる因子が多く含まれていた。その後、SP細胞は骨髄以外に、脳、肝臓、心臓などの組織やがん細胞集団にも存在していることが同定され、細胞種を超えた幹・前駆細胞共通の性質であると考えられた。さらに、このSP細胞分画は、Verapamilなどの薬剤排出阻害剤の添加後に消失することから、薬剤の排出に係わる分子によって細胞内から色素を排出することと考えられている。その中に、膜輸送体ABCファミリーであるABCG2が薬剤の排出に係わる分子の一つであることが報告されている(Zhou et al. 2001)。この分子は、幹細胞の マーカーでもある(Bunting 2002)。一方、口腔扁平上皮癌の細胞株Ho-1-N-1の培養細胞から調製したSP画分 (全体の3%を占める) に抗がん剤を加えたところ、ABCトランスポーターや抗アポトーシスタンパク質などの発現が高いために、明らかな抗がん剤抵抗性を示したとの報告がある(Yajima et al. 2009)。

その後、マウス下垂体前葉でもSP細胞の分離が行われた。全体の細胞の1.5%がSP画分に回収され、その一部の細胞 (0.02%) がsphere (細胞塊, 下垂体の場合はpituisphereと呼んでいる) 形成能を示した。発現する遺伝子を調べると、MP画分と比べて、Sca1、Sox2、Oct4、Nanog、Bmi1などの幹細胞マーカーといわれる遺伝子が高いレベルで発現していた(Chen et al. 2005; Chen et al. 2006)。この細

胞を用いてBrdUの取り込み実験を行うと、その細胞群は極端に取り込みが少なく、静止期の状態の細胞が多数を占めることが予想された(Chen et al. 2005)。つまり、幹細胞のマーカ存在と合わせて判断すると、SP画分にはあまり細胞分裂を行わない幹細胞が多く存在していると考えられる。

下垂体のSP画分をさらにStem cell antigen 1 (Scal)の発現レベルにより分画すると、Scal^{high}とnon-Scal^{high}の2群に分別された(Chen et al. 2009)。Scal^{high}では、Notchシグナル経路を構成するNotch受容体や、転写因子Hes1とHes5を高発現していた(Chen et al. 2006)。それらは、細胞の維持と増殖の機能に関与している因子である(Liu et al. 2010)。一方、non-Scal^{high}には、主に下垂体原基（ラトケ囊）でよく発現している転写因子Hesx1、Prop1、Pax6、Lhx4などが発現していた。

このSP画分の2つ細胞画分を使って、面白い実験が行われている。Scal^{high}とnon-Scal^{high}の画分を個別に培養すると、non-Scal^{high}だけがsphereを形成した。このpituisphereの培養を継続したものを調べてみると、前葉を構成するすべてのホルモン産生細胞種が出現しており、分化能を持つことが示された(Chen et al. 2009) (図4)。この実験により、成熟下垂体においても幹細胞が存在しており、それらはSP画分のnon-Scal^{high}として分離できることが明確に示された。

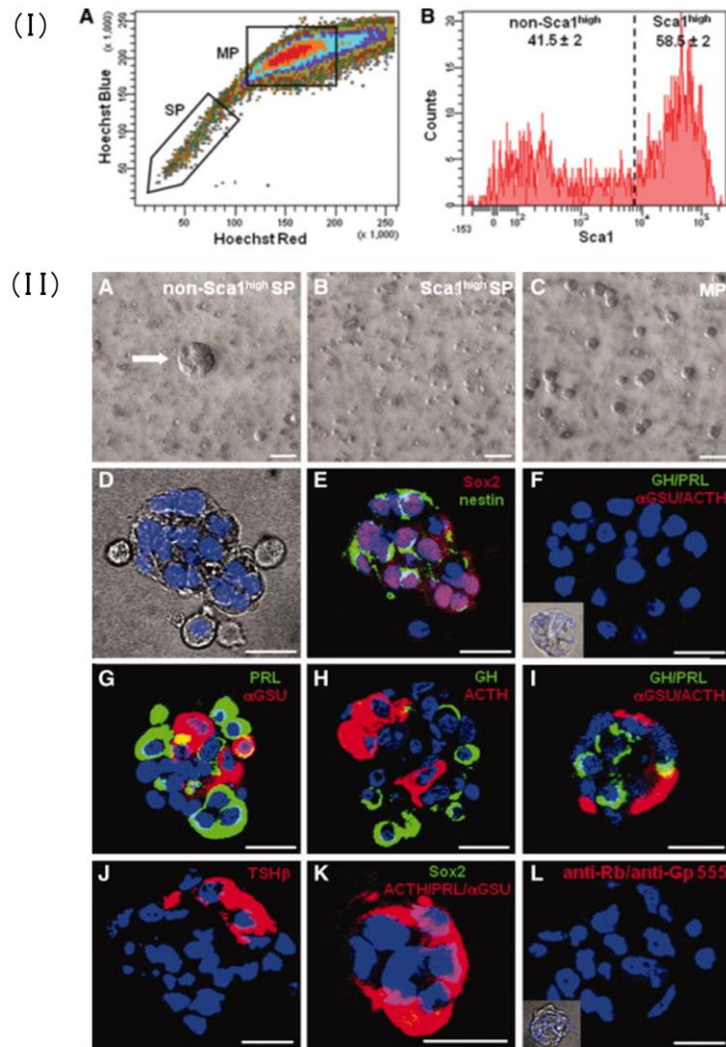


図4. 下垂体のSP細胞分画とin vivo培養

I. (A)へキストを取り込ませた分散細胞のセルソーターによる細胞分画。へキストの取り込みの少ない画分 (SP: Side Population) と取り込みの多い画分(MP : Main Population)が分離する。(B) SP画分はさらに、Sca1 (Stem cell antigen 1)の発現量により、Sca1^{high}とnon-Sca1^{high}の細胞群に分けられる。

II. SP画分の2つのサブ画分細胞を培養すると、non-Sca1^{high}のみがPituisphereを形成した。その増殖しているsphereの核染色(青)の位相差像をDに、SOX2 (赤紫)とNestin (緑)の抗体染色像をEに示した。その時期に、ホルモン抗体に陽性を示す細胞は確認されなかった(F)。分化条件下で培養すると、sphereは不揃いの塊に変化しながら各種のホルモン抗体に対して陽性の細胞となった(G-L) (Chen et al., 2009)。

1-4-3 SOX2陽性細胞群

SP画分として分離する幹細胞の研究とは別に、幹細胞特異的に発現する遺伝子群の分析が進められてきた。前述した幹細胞マーカーであるSox2、Oct4、Nanog、Bmi1などの中でも、特にSox2は神経幹細胞で発現する事で注目されている。このSox2は、Soxファミリーに属する転写因子である。Sox (Sry related HMG box; Sryは性決定遺伝子Sex-determining region Yの略語) は、High Mobility Group (HMG)box スーパーファミリーに属する転写制御因子で、現在までA~Hまでのグループに区別される21種が同定されている。Sox2は、SoxB familyに属する転写活性化因子で、初期胚では広範な組織に発現している(Avilion et al. 2003; Wegner 1999)。Sox2と他の3因子 (Oct3/4・Klf4・c-Myc) を使って、人工多能性細胞であるiPS細胞が作製されたことは記憶に新しい(Takahashi and Yamanaka 2006)。

Fauquierらは成熟下垂体前葉組織を酵素処理により細胞分散させ、浮遊状態で培養することでpituisphereを形成させた。このpituisphereを形成する細胞の98%はSOX2陽性であり、分化誘導条件下で培養を続けると、全てのホルモン産生細胞が出現した(Fauquier et al. 2008)(図5)。彼らは、さらにホルモン産生細胞の分化の過程で、SOX9、Nestin、S100 β が一過性に発現する事を見出している。BrdUの取り込みを調べると、SOX2陽性細胞の中でSOX9が存在する細胞(SOX2⁺/SOX9⁺)は増殖した。一方、SOX9陰性の細胞(SOX2⁺/SOX9⁻)はゆっくり増殖しているか、静止状態を示していた。このことから、SOX9、Nestin、S100 β を発現するSOX2陽性細胞は、分化過程の途中段階にあるtransit amplifying細胞であることが示唆された。

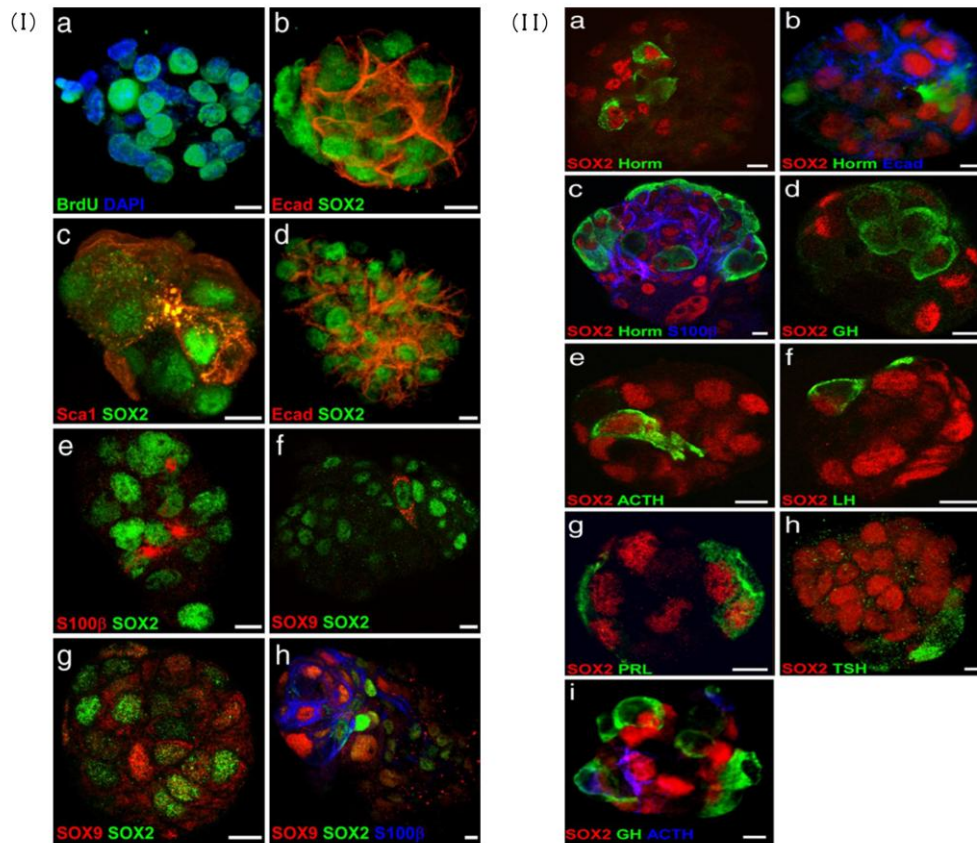


図5. 下垂体のSOX2陽性細胞の分化能

I. SOX2陽性細胞は増殖能を持ち、分裂しながらPituisphereを形成する(a)。培養初期、Pituispheresの細胞は、SOX2、Ecad、Sca1を高発現している(b-d)。培養を続けると、SOX9、S100β陽性細胞が出現する(e-h)。

II. 分化誘導培養条件によっては、SOX2の発現は減少・消失し、各種のホルモン産生細胞が出現し始め、主にsphereの表層に存在する(Fauquier et al., 2008)。

1-4-4 下垂体コロニー形成細胞 (PCFCs : The Pituitary Colony-Forming Cells)

分散した下垂体細胞を培養すると、その中の一部の細胞群がコロニーを形成した。そのコロニーをPCFCsと呼ぶ。PCFCs細胞は、下垂体前葉の0.2%を占め、濾胞星状細胞 (FS細胞) 様の形態を持ち、分裂能を持っていた(Lepore et al. 2006; Lepore et al. 2005)。PCFCs細胞の28%が、FS細胞の特徴である蛍光ジペプチド beta-Ala-Lys-NE-AMCA (AMCA) の取り込み能を持ち、Angiotensin-converting enzyme (Ace) や Sc1を発現していることも確認された(Lepore et al. 2006; Lepore et al. 2005)。培養を14日継続すると、単一のコロニーの中に、GHまたはPRL陽性細胞が確認され、分化能を持つことも明らかにされた(Lepore et al. 2005)。さらに、下垂体におけるACE陽性細胞の分布を調べると、Marginal Cell Layer (MCL)と呼ぶ細胞層と実質層に散在的に存在していた(Lepore et al. 2006)。MCLとは、下垂体の発生過程で生じるラトケ囊の遺残腔を取り囲む細胞層で、従来から幹・前駆細胞の存在する場所と予想されている。このことから、ACEを発現する細胞は、幹・前駆細胞と考えられる。

1-4-5 Nestin-Creを用いた下垂体幹細胞研究

中間径フィラメントNestinは、主に中枢神経系の形成過程で多能性幹細胞に選択的に発現する事が知られているが、この遺伝子は下垂体でも発現している(Krylyshkina et al. 2005)。このNestin遺伝子のプロモーターを蛍光タンパク質GFPに連結したキメラ遺伝子を組み込んだマウス (Cre-loxPシステムを使ったコンディショナルノックアウトマウス) が作製され、多くの神経細胞の研究に応用されてきた。Gleibermanらは、このNestin-GFPマウスを用いて、下垂体のNestin陽

性細胞を解析し、以下の結果を報告している(Gleiberman et al. 2008)。

Nestin-GFPの発現は、マウス胎仔11.5日齢 (E11.5) からラトケ囊背側の少数の細胞に始まり、その数は生後1日 (P1) までに徐々に増加するが、ほとんどが分裂をせずにMCLに局在していた。生後7日を経て、Nestin-GFP陽性細胞は分裂と移動を開始し、前葉と中葉の全体に分布するようになった。しかし、活発な移動と分裂はこの成長期にしか認められず、P21になるとMCL以外でのNestin-GFPの発現は消失していった。

次に、持続的に発現を促すプロモーターであるROSA26を付加し、Nestin-CRE/ROSA26-loxP-stop-loxP-GFPマウスを作製し、GFPの発現を追跡する実験が行われた。このトランスジェニックマウスでは、Nestinプロモーター制御下に一度GFPの発現が開始すると、その発現は細胞分化が進んでNestinの発現を消失しても持続するため、細胞の分化進行過程を追跡することができる。このマウスの新生仔の下垂体では、GFP陽性ホルモン産生細胞が前葉と中葉に散在していた(Gleiberman et al. 2008)。この時のGFP陽性細胞の割合は全下垂体細胞の2%であった。この事は、新生仔下垂体に存在するホルモン産生細胞の多くはNestin陰性の細胞から分化したことを意味している。

しかし、5ヶ月齢では、GFP陽性細胞は約20%に増加し、全種類のホルモン産生細胞の複数にGFPの蛍光が確認された。さらに、Nestinプロモーター制御下でタモキシフェン (tamoxifen) 応答性的にCre-recombinaseが働くように、ROSA26-loxP-stop-loxP-GFP レポーターマウスと交配した5ヶ月齢のTGマウスを用いた実験が行われた(Gleiberman et al. 2008)。このマウスでは、タモキシフェンと結合したCre-recombinaseが核に移行して機能することで、その時点でNestinの発現している細胞でGFPが恒常的に発現する事になり、タモキシフェン誘導的に蛍光を標識された細胞が分化した後でも観察出来る事になる。つまり、この

場合には、Nestinの発現を経過して分化したホルモン産生細胞の可視化が可能となり、実際の観察の結果でも、GFP陽性のホルモン産生細胞が確認出来た。この事は、胎仔期のものとは異なり、生後の幹・前駆細胞が存在する事を意味している。さらに、この成熟したTGマウスから分離したNestin-GFP陽性細胞を培養すると、当初にSOX2、Cytokeratin 8、Cytokeratin 18、Lhx3、Epcamを発現していたが、時間の経過に伴って、Nestin-GFP陽性細胞から全てのホルモン産生細胞の出現が確認された。

しかし、この結果に問題がないわけではない。同様の実験が行われ、その結果では、NestinがマウスE18.5まで発現しないという結果であった(Rizzoti 2010)。Nestinには、脳特異的な発現調節領域(Tronche et al. 1999)があり、用いたプロモーター領域によっては厳密な制御が解除されてしまい、そのために異所性に発現が起きている可能性が指摘された。しかし、Nestin抗体を用いた免疫組織化学では、ラットの胎仔期下垂体にはNestin陽性細胞が観察されており、それらは分裂に伴い遷移状態にある未分化細胞であると考えられている(Yako et al. 2013; Yoshida et al. 2013)。

1-4-6 濾胞星状細胞 (FS細胞 : Folliculo-Stellate Cell)

下垂体の非ホルモン産生細胞の代表格が、FS細胞である。成熟下垂体前葉全体の細胞の5-10%を占め、成長因子やサイトカインを分泌することや、ホルモン産生細胞の制御と周囲の微小環境を維持する支持細胞であるとの報告もある(Devnath and Inoue 2008)。その他にも、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、内皮細胞成長因子 (VEGF) が存在する事から血管新生への関与や、スカンベンジャー作用など、実に多様な機能が報告されている(Devnath and Inoue 2008;

Vankelecom 2007a)。これに対して、最近、このFS細胞のマーカ―として知られるタンパク質S100 (Shirasawa et al. 1984)の存在と他の因子との共存を調べる実験から、これまで一様に扱われてきた非ホルモン産生細胞群は、幹・前駆細胞を含めた様々な細胞種で構成されることが判ってきた (図6) (Yoshida et al. 2009; Yoshida et al. 2011)。

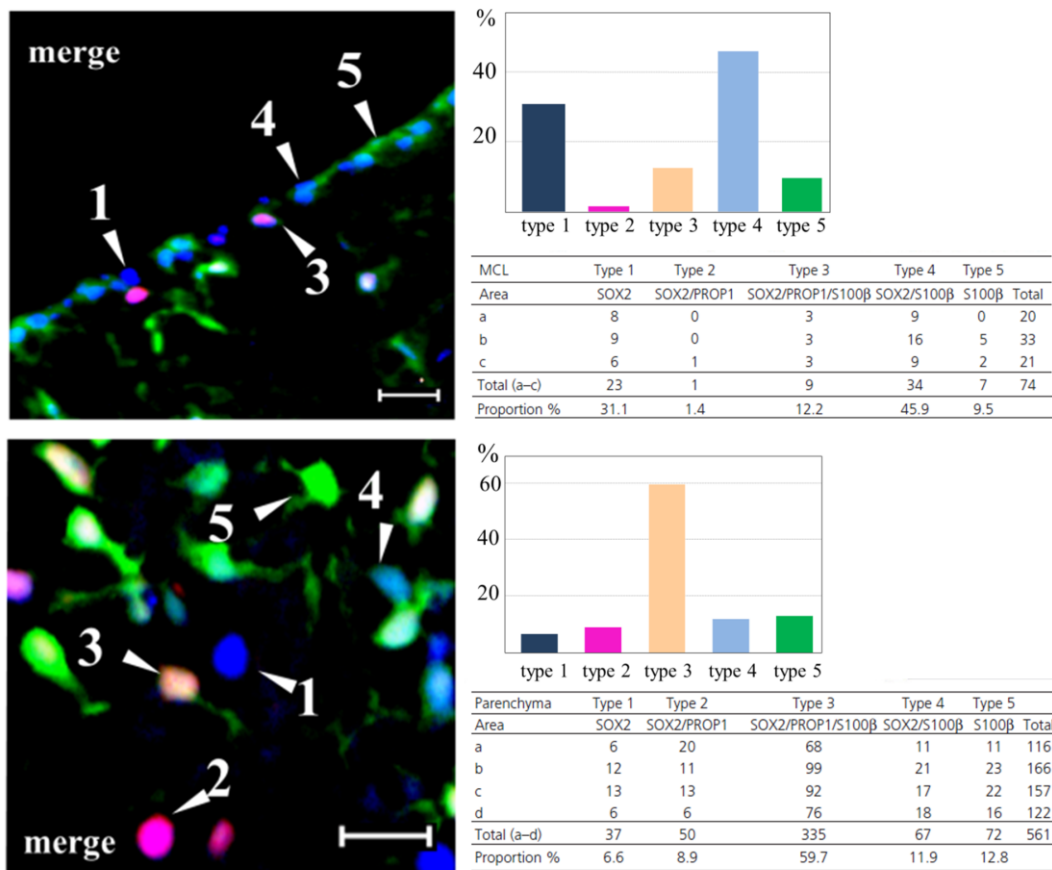


図6. ラット下垂体生後60日(P60)の免疫組織像

幹細胞マーカーSOX2（青）、下垂体特異的転写因子PROP1（赤）、非ホルモン産生細胞である濾胞星状細胞のマーカーS100β（緑）の抗体と反応させた組織像を示した。3種のタンパク質の共存関係で、5つの細胞タイプが確認された(Yoshida et al., 2011)。上段の前葉Marginal Cell Layerと、下段の前葉実質層と共に、S100β陽性である細胞の約8割以上がSOX2陽性であった(Yoshida et al. 2011)。

1-4-7 トリプシンストレス耐性細胞

2011年、Wakaoらは間葉系細胞を長時間の高濃度トリプシン処理にも耐性を示す少数の細胞（トリプシン耐性細胞）が存在することを発見し、Muse (Multilineage-differentiating stress-enduring) 細胞と名付けて発表した(Wakao et al. 2011)。Muse 細胞を分離培養し、神経系細胞、脂肪細胞、骨細胞、肝細胞へ高効率で分化誘導ができたことから、胚葉を超える多能性が確認された。また、遺伝子発現解析からも、多くの多能性幹細胞マーカーの発現が確かめられた。Muse細胞を、幹細胞の培養で用いられる浮遊培養を行うと、ES細胞の胚様体 (Embryoid Body) のような細胞塊を形成した。この点はES細胞やiPS細胞の場合に似ているが、Muse 細胞のテロメラーゼ活性は非常に低く、奇形腫を形成しないという点は大きな違いであった。テロメラーゼ活性はiPS細胞などの無限増殖能に必要であると考えられているため、Muse 細胞は無限増殖能を持たないことが示唆される。

さらに、Wakaoらの研究グループは、Muse 細胞が無限増殖能を獲得するとiPS細胞に変化することを実験的に示している(Wakao et al. 2011)。ヒト皮膚線維芽細胞をMuse 細胞とMuse 細胞以外の細胞に分離し、山中4因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を導入すると、Muse 細胞のみが効率良くiPS 細胞へと転換することが確認された。さらに、Muse 細胞とMuse 細胞由来iPS 細胞の遺伝子発現パターンを解析したところ、多能性関連遺伝子群ではその発現パターンが両者とも似ていた。つまり、4因子の導入することにより、Muse細胞が持っている多能性関連遺伝子は大きく影響されていないことが分かった。両細胞種の違いを比較すると、Muse細胞由来iPS細胞は、Muse細胞に比べて、Nanog、Oct3/4、Sox2などの幾つの多能性関連分子が高かった以外に、細胞分裂関連遺伝子群の発現

がかなり高かった。一方で、非Muse 細胞に山中4因子を導入しても、多能性関連遺伝子群発現はほとんど変化せず、細胞分裂関連遺伝子群の若干のものの発現が高かった。すなわち、山中4因子は、Muse 細胞と非Muse 細胞に共通しており、主に細胞増殖関連遺伝子群の発現を上昇させることに関与すると考えられ、iPSに変化した細胞は元々多能性を持つMuse細胞であった可能性を示唆している。こうした結果は、成体に存在している幹細胞は、ストレスや障害に強い耐性を持つことも示している。以前に報告されている組織幹細胞やガン幹細胞は、放射線、低酸素、薬剤などによるアポトーシス誘導に対して強い抵抗性を持っているとの知見と良く一致している。

我々の研究室は、下垂体初代培養をトリプシン処理を行う事で、下垂体においてもトリプシンストレス耐性細胞が存在していることを確認している (Yohida et al. 未発表)。これらの細胞が、どの様な性質を持っているのか、今後の解析結果が期待される。

1-4-8 下垂体における幹細胞ニッチ

前述した下垂体発生期に形成されるラトケ嚢では、前葉と中葉の間には腔が残り、ラトケ嚢遺残腔と呼ばれている。この構造は、生後にも残り続ける。そして、ラトケ嚢から遺残腔に沿って並ぶ単層の細胞層はMarginal Cell Layer (MCL)、またMCL以外を構成する主要部は実質層と呼ばれている (図7)。

下垂体におけるホルモン産生細胞の分化は、様々な転写因子が発現することで制御されている。胎仔期には、SOX2陽性である未分化細胞からホルモン産生細胞への分化が開始されるが、その時期の幹・前駆細胞の一部は、SOX2やその他の因子を発現しながら生存し、出生後の下垂体の発達と組織再生などの細胞

供給に機能すると考えられる。その幹・前駆細胞を維持するために機能していると考えられる転写因子群の中でも、下垂体だけで特異的に発現する転写因子として唯一同定されているのが**PRO1**であり、重要な役割を果たしていると考えられる。また、出生前後では、下垂体の幹・前駆細胞では質的な変化があり、そこでは**S100β**や転写因子**PRRX**などが**SOX2**陽性細胞で発現しており、成体下垂体の幹・前駆細胞 (Adult Stem/Progenitor Cell) を担っている事が示されている (Yoshida et al. 2009; Yoshida et al. 2011)。一方、幹・前駆細胞の維持、そして細胞分化や組織の成熟などの制御には、特定の幹細胞ニッチが大きく関わっていることが判明されている (Leatherman 2013)。幹細胞ニッチ(Niche)とは、幹・前駆細胞が存在する微小環境であり、組織幹細胞の維持や分化の調節を担っている。近年、様々の組織の解析から、幹細胞ニッチの構造は組織ごとに異なるが、一般的には、幹・前駆細胞と支持細胞からなる。最初に、支持細胞が細胞間シグナル伝達を介して幹細胞と接着することによってニッチを形成し、幹・前駆細胞の未分化状態保持や増殖への制御に存在すると提唱されていた。しかし、最近では、支持細胞の幹細胞との相互トランジション (形質転移) や機能細胞への分化などの現象が確かめられるなど、異なるメカニズムも存在していることが示唆されている (Johansson et al. 1999)。

下垂体の発生過程で注目されるのは、**MCL**のほとんどの細胞が、胎仔期から変わらずに非ホルモン産生細胞で構成されていることである (Yoshida et al. 2009; Yoshida et al. 2011)。この特殊な場所は、下垂体の幹・前駆細胞が維持されているニッチとして考えられている。表2は、出生直前の**MCL**と実質層における**SOX2**、**PRO1**と**PRRX**の陽性細胞の分布を示している (Yako et al. 2013)。こうした多様な幹・前駆細胞を育む機構がどのようなものか、今後の解明が期待される。

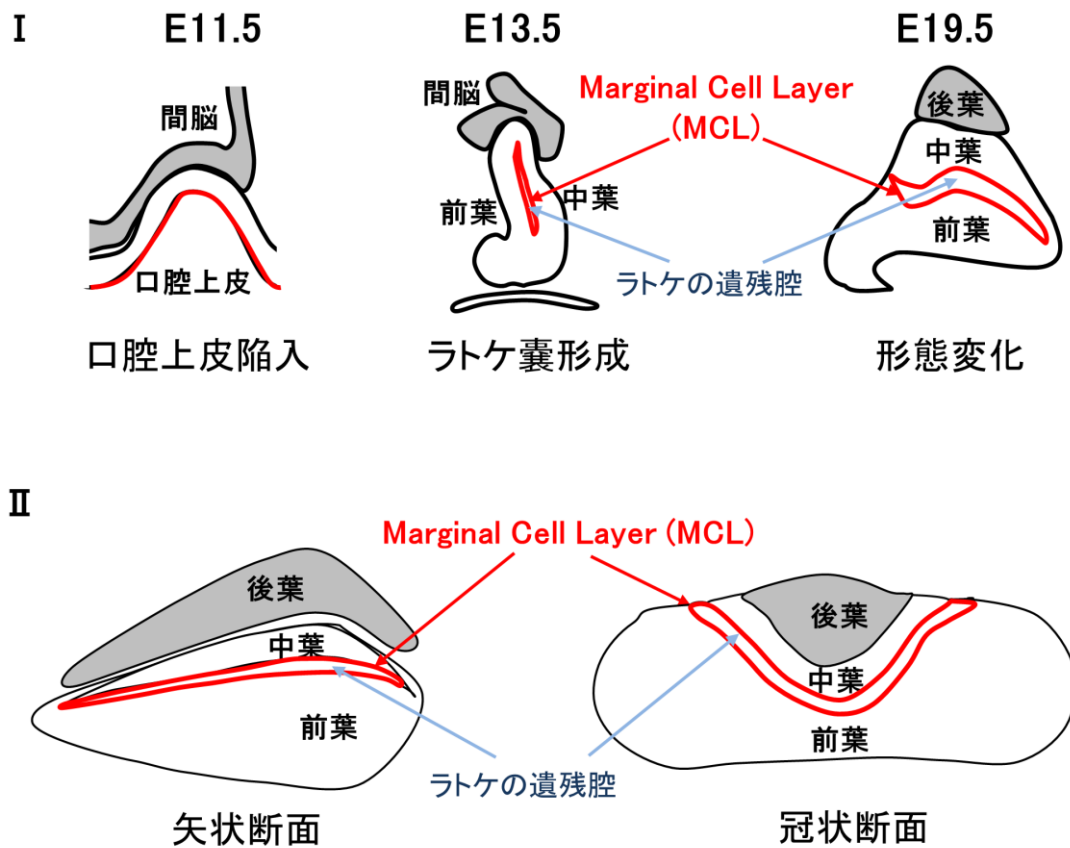


図7. ラット下垂体発生の模式図

I : 胎仔期では、口腔上皮の陥入の際に、前葉と中葉の間に腔が残り、ラトケの遺残腔である。遺残腔に面している前葉と中葉の一層の細胞がMarginal Cell Layerである。

II : 生後の下垂体では、遺残腔が残り続ける。

表2. 出生直前の下垂体におけるSOX2, PROP1, PRRX陽性細胞の分布

	Marginal Cell Layer		Parenchyma	
	subject-1	subject-2	subject-1	subject-2
Total cell numbers	3405 (4.01%)	4730 (3.73%)	96,595 (95.99%)	122,2199 (96.27%)
Negative	509 (14.94%)	700 (14.79%)	90,507 (93.70%)	112,153 (91.78%)
SOX2 positive	2,897 (85.07%)	4,030 (85.21%)	5,505 (5.70%)	7,969 (6.52%)
PROP1 positive	978 (28.71%)	1,362 (28.80%)	2,059 (2.13%)	3,572 (2.92%)
PRRX positive	1,783 (52.37%)	2,212 (46.76%)	1,437 (1.49%)	4,800 (3.93%)

表は、文献(Yako *et al.* 2013)を改変。

1-5 コクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体CARについて

1-5-1 CAR遺伝子の発見の経緯と応用への期待

1975年、Lonberg-Holmらは、Adenovirus（アデノウイルス）type 2、5とCoxsackievirus（コクサッキーウイルス）group Bは異なるウイルスファミリーにも関わらず、共通のレセプターに結合することを報告した(Lonberg-Holm et al. 1976)。一方、1985年、MapolesらはHeLa細胞（ヒト子宮頸がん細胞株）から、コクサッキーウイルスB3と結合する約49.5kDaの受容体タンパク質を単離し、Rp-aと命名した(Mapoles et al. 1985)。1988年、HsuらはRp-aタンパク質を抗原として作製したマウスモノクローナル抗体RmcBを用いた実験で、コクサッキーウイルスBに属する6種全ての感染を阻止できることを確認した(Hsu et al. 1988)。その後、1997年になって、Bergelsonらは、RmcB抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーによりHeLa細胞から受容体タンパク質を精製して、そのペプチド配列を決定し、コクサッキーウイルスB受容体タンパク質の一次構造を明らかにした。さらに、その受容体タンパク質をコードする遺伝子を同定したところ、ヒトゲノム中に同じ年に同定されていたアデノウイルス2受容体(Mayr and Freimuth 1997)と一致した。こうした経緯から、この受容体は、コクサッキーウイルスとアデノウイルスの共通受容体として、Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR、遺伝子名はCxadr) と命名され、その後、多くの研究者によってその生物学的機能の解析が進められてきた(Bergelson et al. 1997; Bowles et al. 1999)。

20世紀末には、アデノウイルス（図8）に関する研究の発展と遺伝子治療法の開発が相まって、遺伝子形質導入法としてのアデノウイルスの改良と応用開発

が相次いで進められ、Adenoviral Mediated Gene Transfer (AMGT)技術が飛躍的な発展をとげた (図9) (Kremer and Perricaudet 1995)。改良されたアデノウイルスベクターでは、遺伝子導入によって腫瘍化が起こらず、ヒトの多様な細胞種に効率よく感染するなど様々な長所が確認されている (Hemmi et al. 1998; Hemminki et al. 2003; Kremer and Perricaudet 1995; Pearson et al. 1999; Seidman et al. 2001)。特にiPS、ES細胞に高い導入効率を示される遺伝子導入法として汎用されている (Tashiro et al. 2010)。一方、このウイルスベクターが細胞に付着して細胞内に進入するために必須の細胞表面レセプターについて、より詳細に解析する重要性が増大している。ウイルスに対する感受性が低いCAR-negativeな細胞や、CARの発現が低レベルの細胞にCARを強制発現すると、導入効率が大幅に改善されることが相次いで報告されている (Li et al. 1999; Miller et al. 1998)。こうした知見は、アデノウイルスをベクターとする遺伝子治療において、CARの発現の有無が治療の成否の決め手となることを示しており、CARの解析は重要な課題となっている。

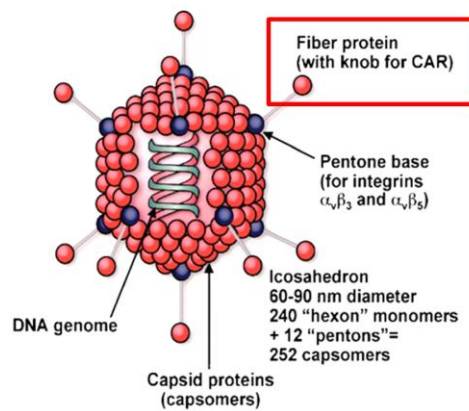


図8. アデノウイルスのビリオンの構造模式図

ウイルスDNAゲノムを覆っているカプシドの外側には、抗原決定基であるペントンベースタンパク質と、宿主細胞に存在する受容体CARに結合するFiberタンパク質が存在している (Khurana et al., 2003)。

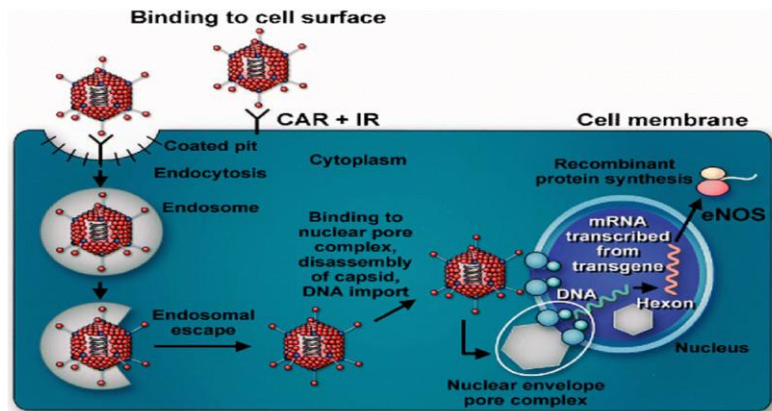


図9. Adenoviral Mediated Gene Transfer (AMGT)の原理と模式図

目的の遺伝子 (DNA、RNA) をウイルスベクターに組み込み、細胞表面に存在するCAR受容体を介して細胞に感染させて、組換えタンパク質を発現させる (Khurana et al., 2003)。

1-5-2 生体におけるCARの発現

コクサッキーウイルスとアデノウイルスは主にヒトを宿主とした一般的な感染ウイルスであり、手足口病、心筋炎、髄膜炎あるいは脳炎等を引き起こす病原体ウイルスである(Roelvink et al. 1998)。特に、幼児や小児は、易感染者として感染が頻発する。成人では、感染率が非常に低く、重症にはなることはない。この違いは、ウイルス感受性が異なると考えられる。一つの原因は、生体におけるコクサッキーウイルスとアデノウイルスに対するレセプターの発現レベルに応じている。その中でも、CARの発現レベルが重要な要因である(Sun et al. 2012)。マウスの組織におけるCARの局在解析が進められており、その発現時期は胎仔期から新生仔にかけて強く、また、広範な組織での発現が確認されている(Hotta et al. 2003)。そうしたCARの発現する各々の組織における機能が興味深い。

1-5-3 CAR遺伝子

マウスCAR遺伝子Cxadrは、16番染色体の末端に存在する。転写開始点は、翻訳開始点(ATG)上流141-1616領域に存在し、8個のエクソンから構成されている。現在までに選択的スプライシングによりCAR分子をコードする2種類のアイソフォームが存在することが報告されている(Chen et al. 2003)。マウスのアイソフォームCAR1とCAR2のmRNAは、それぞれ1.4-と6-kbの長さであり、いずれも膜貫通ドメインを含み、エクソン1-6の膜外、膜貫通ドメイン配列は同じであるが、エクソン7からの膜内ドメインは異なる。mCAR1は3'側はエクソン7近位の一部とエクソン8からなるが、mCAR2のそれは全エクソン7とその後の長い3'非

翻訳領域からなり、エクソン8を含まない（図10）（Chen et al. 2003; Tomko et al. 1997）。ヒトCAR遺伝子は、21番染色体に存在し(Bowles et al. 1999)、8つのエクソンを持つことが報告され、エクソンとイントロの構造はマウスのものと類似しているが、ヒトではスプライシングにより膜貫通領域を欠いた可溶型が生成されることが確認されている（図10）（Bowles et al. 1999; Thoelen et al. 2001）。その他、幾つかの偽遺伝子も報告されている(Bowles et al. 1999)。

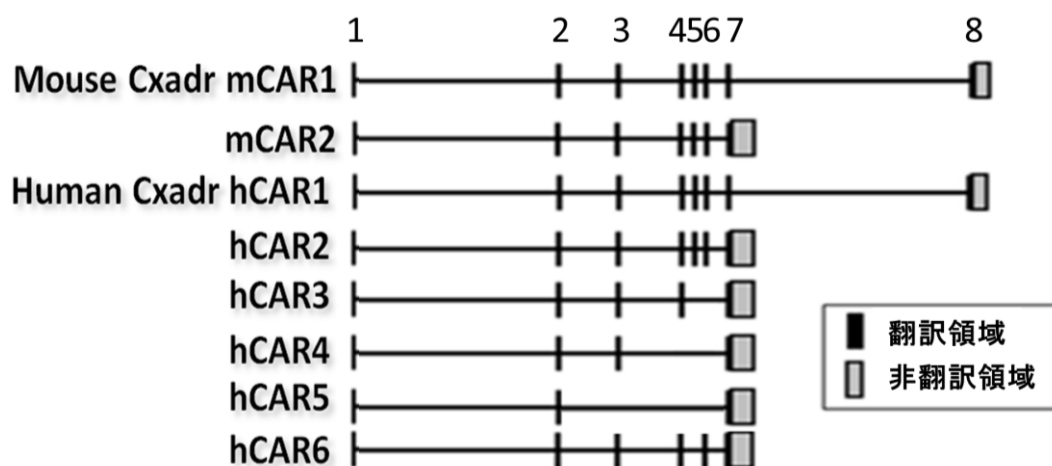


図10. マウスとヒトCAR遺伝子 (*Cxadr*) のスプライシング変異体

最長のCAR遺伝子は8エクソンからなる。スプライシングにより複数のアイソフォームをコードする。

1-5-4 CARタンパク質と結合様式

タンパク質とmRNAの両方の解析から、ヒトCAR (hCAR2) は、全長365アミノ酸で構成され、分子量が40kDa (Tomko et al. 1997) であることが判明した。分子内には2箇所、Asn106とAsn201にN-結合型糖鎖があり、実際のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では46kDaを示す。CARには、選択的スプライシングによる2分子種があることが分かった。構造図 (図11) に示すように、アミノ酸配列には、N末端側から、短いリーダー配列 (19残基)、膜外ドメイン (216残基)、膜貫通ドメイン (23残基) および膜内ドメインカルボキシル領域 (94あるいは107残基) で構成されている。さらに、最近になって、選択スプライシングにより膜貫通領域を欠いた可溶性分子の生成が報告されている (Bergelson et al. 1997)。CARは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子で、N末端側の細胞膜外には、2つのIg様構造である遠位のD1 (V-like module) と近位のD2 (C2-like module) を持っており、他分子との相互作用をする領域である (Coyne and Bergelson 2005)。また、マウスとヒトのいずれにも確認されたアイソフォームは、細胞内C末端領域のみが異なるが、いずれもPDZ結合モチーフを持っている。CAR1はITTV-COOH、CAR2はGSIV-COOHの配列を持ち、他のPDZモチーフを持つタンパク質と相互作用することが認められた。

CARのアミノ酸配列は、種間で保存性が高い。ヒト、マウス、ラット、イヌ、ブタの間で約90%の相同性を示している (Bergelson et al. 1998; Fechner et al. 1999; Tomko et al. 1997)。特に、膜外ドメインに存在するD1とD2は、それぞれ91-94%及び95%であり、膜内ドメインも約95%の高い種間の相同性がある (Fechner et al. 1999)。しかし、細胞膜貫通ドメインの相同性は低く、ヒトとマウスにおいては約77%である (Tomko et al. 1997)。

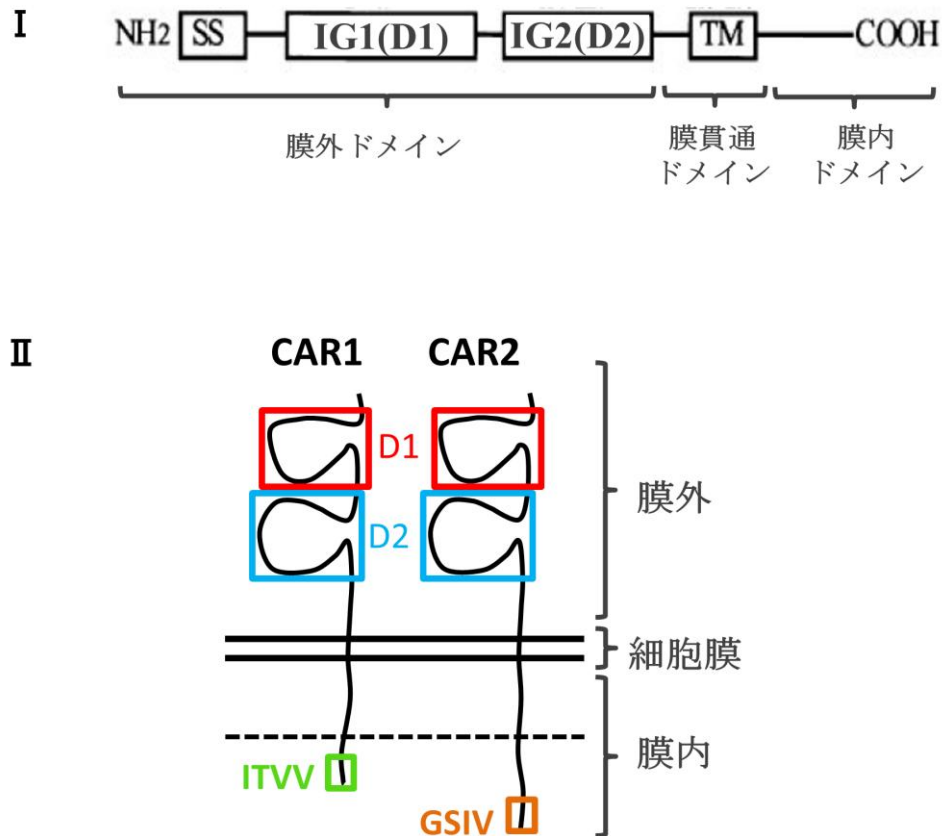


図11. CARタンパク質の構造図

I : CARのアミノ酸配列は、N末端側から、短いリーダー配列、膜外ドメイン、膜貫通ドメインおよび膜内ドメインなどの特徴的な構造で構成されている (Tomko et al., 1997)。

II : CARは、細胞膜外N末端に、2つのIg様ドメイン (遠位のD1と近位のD2) を持つ。膜貫通型アイソフォームは、細胞内C末端領域が異なるPDZ結合モチーフ (ITVVとGSIV) を持っている (Raschperger et al., 2006)。

近年、新たな膜タンパク質Xenopus laevis cortical thymocyte protein (CTX) が発見された。CTXは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、膜外にIg様VとC2型環状構造を持ち、一回膜貫通領域と細胞質領域から構成されている(Chretien et al. 1998; Chretien et al. 1996)。その後、類似する構造を持つIg様構造を持つタンパク質が幾つか発見され、これらのタンパク質が新たなサブファミリーに分類されてCTX-subfamilyと命名された(Du Pasquier et al. 1999)。これまでに、CLMP(Raschperger et al. 2004)、ESAM (Hirata et al. 2001)、A33(Heath et al. 1997)、BT-IgSF (Suzu et al. 2002)、hepaCAM (Chung Moh et al. 2005)、さらに、4つのJAMsが、CTX-subfamilyに属することが報告されている(Bazzoni 2003; Johnstone et al. 2000)。CARもタンパク質構造解析によって、CTX類似構造を持つことが判明し、CTX-subfamilyメンバーとして分類されている(図12) (Barton et al. 2001)。

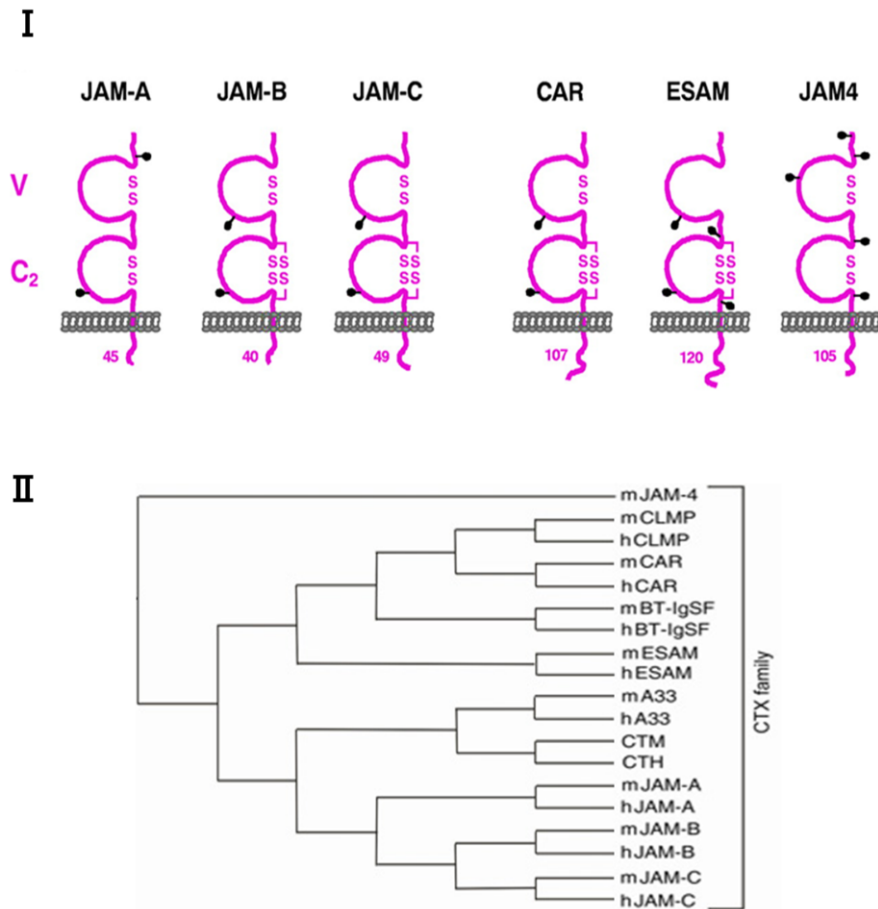


図12. CTXサブファミリーを構成する膜貫通型タンパク質

I : CTX膜タンパク質は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、膜外にIg様VとC2型の環状構造を持ち、一回膜貫通領域と細胞質領域から構成されている。CARを含む類似構造を持つ膜タンパク質はCTXと命名されたサブファミリーに分類されている (Ebnet et al., 2004)。

II : 複数のCTXサブファミリーに属するタンパク質の系統樹解析。連結線が近いほど相同性が高い (Gonzalez-Mariscal et al., 2009)。

生体内では、CARは膜外ドメインを介して自己会合や他のタンパク質と相互作用することで、複合体を形成することが確認されている(Patzke et al. 2010)。同一の細胞におけるCAR同士の結合様式は、主に膜外ドメインの頭部D1同士が、あるいは、尾部D2同士が向かい合って結合する形式により、U形のホモ二量体を形成する。相隣接する細胞におけるCAR同士の結合では、主に2つのCAR分子間でD1-D2の相互作用により、タイトジャンクションが形成される(図13)(Patzke et al. 2010)。一方、ヘテロフィリックな結合様式は、多様な機序と関連している。CARと細胞外マトリックスとの結合では、CARの膜外ドメインD1-D2を介してマトリックス糖タンパク質TN-R、LN-1、 agrinなどとヘテロフィリックな結合を作っている。さらに、こうした結合は細胞接着や神経突起のガイダンスに関わることが報告されている(Patzke et al. 2010)。特にフィブロネクチンフラグメントとの結合が、神経突起伸展を促進する機構に重要な機能を担っているとの報告があり(Bewley et al. 1999)、細胞移動と言う点で興味深い。ウイルス付着に関与するCARのヘテロ分子結合形式が存在しており、主にD1が関与している。アデノウイルス殻外結合部分で作製したファイバーノブにはCARのD1がヘテロダイマーを形成する能力のあることが報告されている(図13)(Bewley et al. 1999; van Raaij et al. 2000)。

また、CARの膜内ドメインはPDZ結合ドメインを含み、細胞内タンパク質との相互作用により細胞内シグナル伝達など重要な機能を担っているとの報告がある(Bruning et al. 2005; Okegawa et al. 2001)。CARはZO-1、 MUPP-1、 JAMsなど様々なタイトジャンクションタンパク質と複合体を形成し、細胞間接着に関与している。この他にも、細胞移動、分裂、増殖なタンパク質との相互作用があるが、詳細は後述の「CARが関与する生理機能」で述べる。ウイルスの感染には、CARの膜内ドメインとの関係性は確認できていない(Leon et al. 1998; Wang

and Bergelson 1999)。

細胞におけるCARの局在は、膜内ドメインが関与することが報告された (Cohen et al. 2001; van't Hof and Crystal 2002)。CARのスプライシングにより生じるアイソフォームCAR1とCAR2ではC末端アミノ酸配列が異なり、別々のPDZ結合ドメインを持つことが同定された。そのことにより、相互作用する細胞内タンパク質に差異が生じて、それぞれが異なる生理機能に繋がっている可能性がある。その局在が詳しく調べられると、CAR1は細胞のアピカル側に局在し、CAR2はバソラテラル側に局在することが明らかになった (図14) (Excoffon et al. 2010)。この細胞内局在様式の違いは、MAGI-1bタンパク質が関係している (Excoffon et al. 2010)。CAR1のPDZ結合ドメインITVVとCAR2のGSIVは共にバソラテラル側に局在するMAGI-1bタンパク質と結合できるが、CAR1の結合は不安定な分子構造を形成するために、分解されてしまいアピカル側のみに局在すると考えられる。

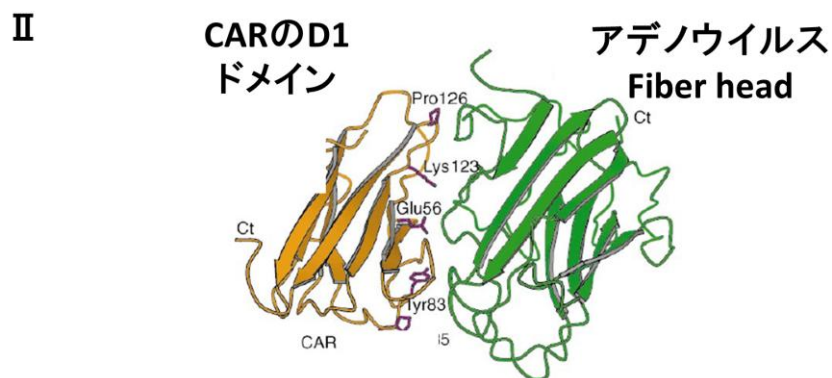
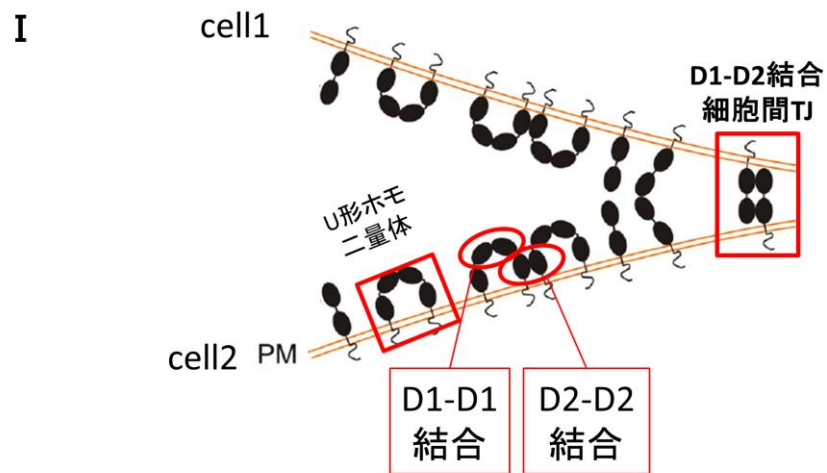


図13. CAR同士結合模式図

I : 同一の細胞におけるCAR同士はU形のホモ二量体を形成する。隣り合うD1-D1とD2-D2間の結合により二量体を形成している。細胞間にはD1-D2結合によりタイトジャンクションが形成される。(Patzke et al., 2010)。PM : 細胞膜 ; TJ : タイトジャンクション。

II : ウイルスタンパク質のFiber head部分とCARのD1ドメイン間で形成されるヘテロダイマー結合のリボンモデル (van Raaij et al., 2000)。

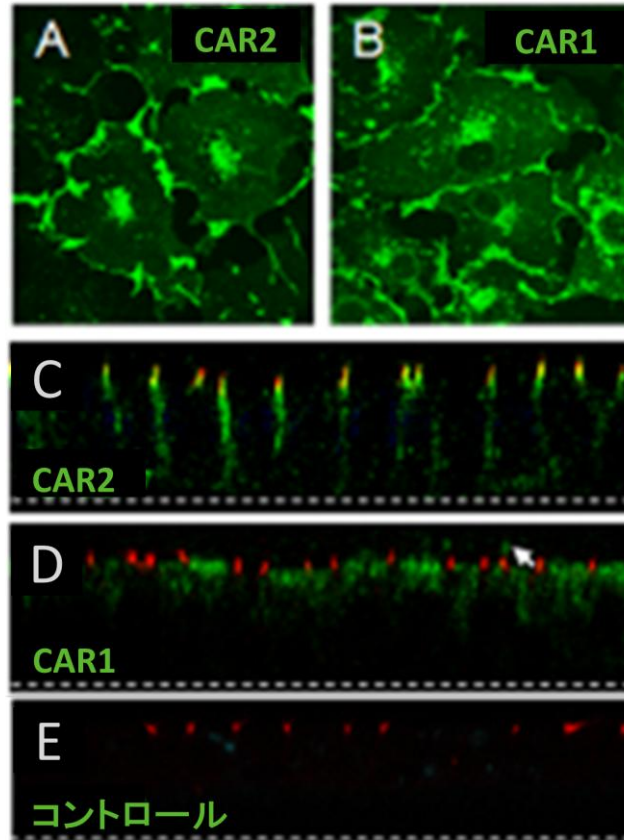


図14. CARの局在様式

膜貫通型CAR1 (Ex8)とCAR2 (Ex7)をそれぞれ強制発現して局在様式を調べたところ、CAR1は細胞のアピカル側に局在し、CAR2はバソラテラル側に局在する像が得られた(Excoffon et al., 2010)。緑:CAR ; 赤 : ZO-1 (CARと相互作用する分子)。

1-5-5 CARが関与する生理機能

1-5-5-1 CARと細胞内情報伝達系

CARは、隣接した細胞との接着を介して情報のやり取りや、細胞質内C末端部にあるPDZ結合ドメインを持つことにより、細胞内に存在するPDZ結合ドメインを持つシグナル伝達タンパク質と相互作用することで、様々な生理機能に関与していることが考えられる。

1-5-5-2 CARを介する細胞間接着

CARの機能の研究は、最初に細胞間接着分子として同定されたことに始まる(Cohen et al. 2001; Coyne and Bergelson 2005)。CHO細胞にCARを強制発現してCAR陰性の細胞と共培養すると、CARを発現する細胞同士が接着してホモフィリックな細胞集団を形成していることが確認された(Cohen et al. 2001)。また、CAR特異的な抗体を添加すると、CAR発現細胞のホモフィリックな結合が妨害された(Cohen et al. 2001; Honda et al. 2000)。そうした相互分子が相次いで同定され、それらには、zonula occludens-1 (ZO-1) (Raschperger et al. 2006), membrane-associated guanylate kinase 1b (MAGI-1b), protein interacting with protein C kinase (PICK1), postsynaptic density 95 (PSD-95) (Excoffon et al. 2004), と multi-PDZ domain protein-1 (MUPP1) (Coyne et al. 2004) などがある。それらの分子は、細胞極性の維持とともに、タイトジャンクションやギャップジャンクションなどの細胞間接着装置の形成などに関わっていることから、CARは細胞間接着に重要な役割を担っていると考えられる。

タイトジャンクションは細胞膜の障壁構造として、不必要な高分子やイオンを通過させない機能を担っている。培養細胞を用いて調べてみると、CARの強制発現により上皮細胞の密着性が強くなり、蛍光分子FITCで標識したデキストランの様な高分子や低分子イオンの透過に対する抵抗性が有意に高くなる事が確認された(Cohen et al. 2001)。その際に、CARがタイトジャンクションを形成することで、コクサッキーウイルスとアデノウイルスへの感染抵抗性も強くなっていたことは、興味深い(Cohen et al. 2001)。一方、培養液にEDTAを加えると、細胞間CARのタイトジャンクション形成を解除できることから、CARが介する同士間結合の維持には重金属が重要な事も明らかにされている。さらに、CARのタイトジャンクション形成を解除すると、膜外ドメインが暴露されることになり、CARを介する細胞へのウイルス感染率が高くなることから、ウイルスの感染には、遊離状態のCAR膜外ドメインが必要であると考えられている。逆に言うと、CARの同士間結合によるタイトジャンクションの形成は、ウイルスの細胞表面への吸着を妨害できることになる(Cohen et al. 2001)。

1-5-5-3 細胞移動

タイトジャンクションを構成するタンパク質の一つであるJAML (Junctional Adhesion Molecule-Like) は、CARの膜外ドメインと結合する分子として同定された(Zen et al. 2005)。GSTタグを融合させた組換え体JAMLを担体に固定し、CTXファミリーに属するnectin2, A33, JAM-A, JAM-C, CARなどとの結合を調べたところ、JAMLはCARとの間で最も高い結合力を示した。そのCAR/JAML複合体は、CARのD1ドメインとJAMLのD2ドメインにより形成されていることも確認された。JAMLは、新規CTXファミリーに属するタンパク質の一つであり、近年、主

に血球系細胞で発現していることが報告されている(Moog-Lutz et al. 2003; Weber et al. 2007)。さらに、JAMLは同種結合 (homophilic binding) 以外に、多数の類似構造を持つタンパク質とヘテロな結合 (heterophilic binding) を形成し、感染や外傷の刺激により引き起こされる白血球の炎症性遊走に機能していることが分かっている(Martin-Padura et al. 1998; Zen et al. 2005)。そのため、CARは白血球遊走に関与している可能性が示唆され、培養細胞を用いて、CAR/JAMLの機能解析が行われている。組換え体CARをコーティングした培養ディッシュを使って、CAR⁻/JAML⁺の多形核白血球 (PMN) を播種すると、PMNがディッシュに接着する事が確認された。一方、組換え体JAMLをコーティングした培養ディッシュに CAR⁺/JAML⁻の腸管上皮細胞株であるT84細胞を播種すると、こちらもディッシュに接着することが示された。T84細胞層に多形核白血球が経上皮遊走することが確認された。さらに、JAMLやCARの抗体を添加すると、多形核白血球の通過率が大幅に抑制されることから、CARとJAMLの結合は、タイトジャンクションが存在する上皮細胞間に白血球を通過移動させるために重要である(Guo et al. 2009; Verdino and Wilson 2011; Zen et al. 2005)。これ以外にも、CARとJAMLの結合は細胞増殖の制御やサイトカイン産生の促進などに関わることも報告されている(Witherden et al. 2010)。

1-5-5-4 不均等分裂

幹細胞は、不均等な細胞分裂を通じて自己を複製すると共に、分化が進行する前駆細胞からさらに分化を進めて娘細胞を生成する。この分化への方向に導く決定因子であり、Notchシグナル経路の膜構成要素でもある細胞運命決定因子として知られているNumbに結合する因子として、転写因子Ligand-of-Numb

protein-X (LNX)が同定されている(Dho et al. 1998; Rice et al. 2001)。この因子はユビキチン化能を持っており、Numbをユビキチン化する事でタンパク質分解系を誘導する制御を介して、Notchシグナル伝達経路の調節に関与することが考えられる。最近、CARは、LNX分子内の細胞質内に位置する第二のPDZ結合ドメインと相互作用していることが確認された(Mirza et al. 2005; Sollerbrant et al. 2003)が、その機能はまだ十分に判っていない。CARがLNXと複合体を形成して幹細胞の不均等分裂やNotchシグナル経路の制御に関与している可能性が推測されている。

1-5-5-5 細胞分裂と増殖

複数の研究から、腫瘍においては、CARの発現が正常組織と比べて低下もしくは消失していることが示されている(Anders et al. 2009; Li et al. 1999)。がんの発生、増殖、転移など各過程において、CARは何らかの役割を果たしている可能性が推測されることから、CARの機能解析は、がんの発生機序やがん治療に新たな展開をもたらす事が期待される。

腫瘍の悪性度とCARの発現レベルが関連しているようで、浸潤性がんにおいては、表在性がんと比べてCARの発現が顕著に低いとの報告がある(Asaoka et al. 2000; Hemmi et al. 1998; Miller et al. 1998)。がん細胞株を用いた解析により、CARタンパク質はがん細胞間でも接着の役を担っていることが判った(Bruning and Runnebaum 2003)。また、CARの発現量に応じて細胞集合が促進される一方で、がん細胞増殖の抑制が観察されている(Huang et al. 2005; Okegawa et al. 2001)。前立腺がんや膀胱がんなどから樹立されたがん細胞株を用いた実験からは、CARの発現が増加することにより、細胞増殖の抑制が確認された(Okegawa et al. 2000;

Okegawa et al. 2001)。この時、CARの細胞膜外ドメインに対する抗体RmcBを作
用させると、細胞増殖の抑制効果を有意に打消すことができた。しかし、抑制
効果を完全に阻止することができなかつたことから、CARの細胞成長・増殖の
抑制機能には、膜外と膜内ドメインのいずれもが必要であることが考えられる。
以上のことから、CARは、膜受容体として細胞間のシグナル伝達を通じて細胞
の成長や増殖を負に制御していることが考えられる。また、この過程で、CAR
がP21(サイクリン依存性キナーゼ阻害因子)の関与する細胞サイクルの制御に関
与していることを示唆する結果が得られている(Hall et al. 2000)。CARを過剰に発
現させると、P21のタンパク質レベルの増加が見られるとともに、細胞分裂抑制
因子であるがん抑制因子RB (Retinoblastoma) の安定型 (リン酸化型) タンパク
質の量が増加して、細胞増殖の抑制の作用が亢進された(Okegawa et al. 2001)。

1-5-6 CAR遺伝子発現の制御に関わる細胞内シグナル経路

1-5-6-1 NF- κ B経路とJAK-STAT経路

腫瘍壊死因子であるTNF- α とインターフェロンIFN- γ は、動物体内で病原体な
ど感染防御や免疫系及び炎症の調節に関与するサイトカインである。Vincentら
は、内皮細胞、気管支上皮系譜の細胞株などをTNF- α とIFN- γ の存在下で培養す
ると、CARのmRNAとタンパク質共に著しく減少することを報告している
(Vincent et al. 2004)。多くのサイトカインは細胞内シグナル伝達に関与してい
ることが知られているが、TNF- α はNF- κ B (nuclear factor-kappa B) 第一経路の活性
化因子であり、抗アポトーシス遺伝子の発現を抑制して細胞死を誘導する。一
方、IFN- γ はヤヌス・キナーゼ (JAK, Janus kinase) 活性化因子であり、JAKキナ

ーゼーシグナル伝達性転写因子(JAK-STAT)経路を調節している。STATは、Signal Transducers and Activator of Transcriptionの略で、細胞増殖、分化および生存などの過程を制御するタンパク質である。このことから、CARの発現は、JAK-STAT経路を介する細胞内シグナル伝達系を介して調節される可能性が示唆される。

1-5-6-2 TGF- β シグナル経路

上皮-間葉転移(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)は、上皮細胞から間葉系様細胞に質的な変化する現象であり、様々な組織形成およびその過程における細胞侵入に関与している。多くの研究により、Transforming Growth Factor- β (TGF- β)はEMTの誘導因子であることが証明されている。TGF- β は、Snail、SIP1、Twist、E2A(E47/E12)などの転写因子を介して上皮接着分子の転写を抑制することにより細胞の遊走を誘導する。また、様々な細胞種に対して細胞増殖、分化などに機能している。特に、上皮系細胞には、強い増殖抑制作用を示している。

従って、TGF- β が介するEMTの過程において、上皮細胞におけるタイトジャンクションの機能を担っているCARとE-cadherinがどうなるかを調べた実験がある。TGF- β によりEMTを誘導すると、CARとE-cadherinの発現は両方とも抑制され、TGF- β 下流の転写因子であるSnailは、CARとE-cadherinのプロモーターに直接結合することが示された(Battle et al. 2000; Lacher et al. 2006)。また、Snailが強力にCARとE-cadherinの転写を抑制することで、EMTを誘導していることが確認されている。このSnailの発現は、ERKやNF- κ Bの下流で調節されていることがすでに知られている。

また、EMT制御因子であるZEB1がCARの発現を抑制することが報告されている。ヒト膵臓細胞株PANC-1とヒト乳腺細胞株MDA-MB-231を用いて、ZEB1の発

現をロックダウンさせると、フィブロネクチンの発現が低下すると共に、CARとE-cadherinの発現が大幅に増加することが確認された。プロモーター解析により、ZEB1はCAR遺伝子上流のE2 boxに結合して、直接に制御していることが分かった。さらに、ZEB1発現を抑制することにより、TGF- β により誘導されたCARの発現低下が回復することも確かめられた。ところが、TGF- β はZEB1のタンパク質の量的レベルに影響しないため、CARの発現制御にはTGFとZEB1は協同的に働いていると予想されている(Lacher et al. 2011)。

これらのことから、CARは、上皮細胞において接着分子としてタイトジャンクションを形成しており、EMTの過程においてCARの発現が制御されて減少していることが明らかになった。しかし、CARの減少と細胞運動性の獲得に關与する直接的な証拠はまだ得られていない。さらに、この過程に伴い、細胞増殖や分化に關与している可能性も考えられ、今後の研究が期待される。

1-5-6-3 増殖・分化・アポトーシスのシグナル経路 (Raf /RAF/MEK/ERK経路)

Raf /RAF/MEK/ERKは、細胞の増殖・分化・アポトーシスにおいて中心的な役割を担っているシグナル伝達系である。この経路の活性化は、多くの転写因子の発現を介して、細胞増殖、分化の促進やアポトーシスの抑制などを引き起こす。さらに、過剰活性化などの異常により、細胞の癌化と關連することがよく知られており、その過程で、接着分子の発現に負制御も行っていることが示唆されている。こうした中で、CARの発現が、Raf/RAF/MEK/ERK経路によって制御されているとの報告がある(Anders et al. 2003)。MAPキナーゼキナーゼ(MEK)のインヒビターU0126とPD184352を結腸直腸癌細胞株SW480に添加すると、この細胞におけるCARの発現は有意に増加した。これに対して、マメ科ネムノキ

亜科の若葉や芽に含有されている毒性アミノ酸ミモシンを48h処理させて細胞サイクルをG1に停止させて細胞分裂を止めると、CARの発現の変化がなくなった。一方、Rafの抑制因子であるPI3Kを増加させると、同細胞でのCARの促進効果が見られた。さらに、逆にRaf-1を活性化すると、CARの発現が減少することが確認された。

以上のことから、CARの発現がRaf /RAF/MEK/ERK経路の活性化によって負の制御を受けており、細胞接着、増殖、分化などの過程に関与していることが示唆される。しかし、このシグナル経路においてCARの発現を直接制御する因子や分子機序は依然として不明であり、今後の研究が期待される。

1-5-6-4 転写制御因子SP1

最近、Chung らは、EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay) とChIP (Chromatin Immunoprecipitation) assayの実験により、転写因子SP1がCARのプロモーターの制御を担っていることを証明した(Chung et al. 2011)。SP1はDNA結合タンパク質であり、GC-rich DNAエレメント(GC box)に特異的に結合し、様々な遺伝子の転写を制御していることがよく報告されている。ヒトCARのプロモーター上流に、SP1 binding motif (-503/-498)の存在が確認されている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチンA(TSA)によるクロマチン構造の開放状態で、SP1を結合させることにより、CAR遺伝子の転写活性化が示された。CAR陰性細胞株においても、SP1を強制発現させることで、CARの発現がSP1量依存的に増加していた。

SP1の機能には未解明の点が多いが、多くのがん細胞で発現しており、細胞のがん化に関与することが示され、腫瘍マーカーのひとつとしても考えられてい

る。最近、がん細胞が劣悪な環境に適応するメカニズムの一つとして、SP1による低酸素応答が報告されている(Koizume et al. 2012)。このことは、近年報告が増加しているCARのがん細胞における発現とその機能を見ると、CARとSP1の関連性はがん細胞の解明の新しい系口になることが期待される。

1-6 これまでのCARの研究に基づく本研究の課題

これまでの研究で、CARは細胞膜受容体として細胞間の相互作用に応じて働く様々なシグナル伝達系を介して、器官形成や細胞成長、増殖など重要な生理機能に関与しているところが明らかになってきた。特に、CARの存在が幹細胞ニッチと深く関わっているとの報告は大変興味深く、その機能について分子レベルでの解明は、幹細胞のみならず、組織形成や移植組織の再生を始めとする再生医療などの重要な課題に答えることになる。

以上の背景を元に、本研究はラット発生過程におけるCARと幹細胞の関連性に着目し、特に、下垂体における未分化細胞の制御メカニズムについて解析を進めたものである。

第2章 生体組織におけるCARの発現

2-1 緒言

CARタンパク質は、多様な生物種で確認されている。哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、条鰭亜綱等の種を含めて高い保存性を持ち、特に、哺乳類であるヒト、チンパンジー、ウシ、イヌ、マウスとラットの種間では、90%以上の相同性が保持されている。こうした、進化上の高い保存性はCARが重要な役割を担っている事を示すもので、これまで、それぞれの種での生理的機能が報告されている(Coyne and Bergelson 2005)。

マウスでは初期胚が形成される時期 (E6.5) に外胚葉でのCARの発現が確認されており (図15)、以下に述べる様に、胚発生の進行に伴って、神経系を中心に生体内の数多くの組織にCARの存在が確認されるようになる。こうしたことから、多数の器官形成と関与するなどの重要な役を担っていることが予想されている。

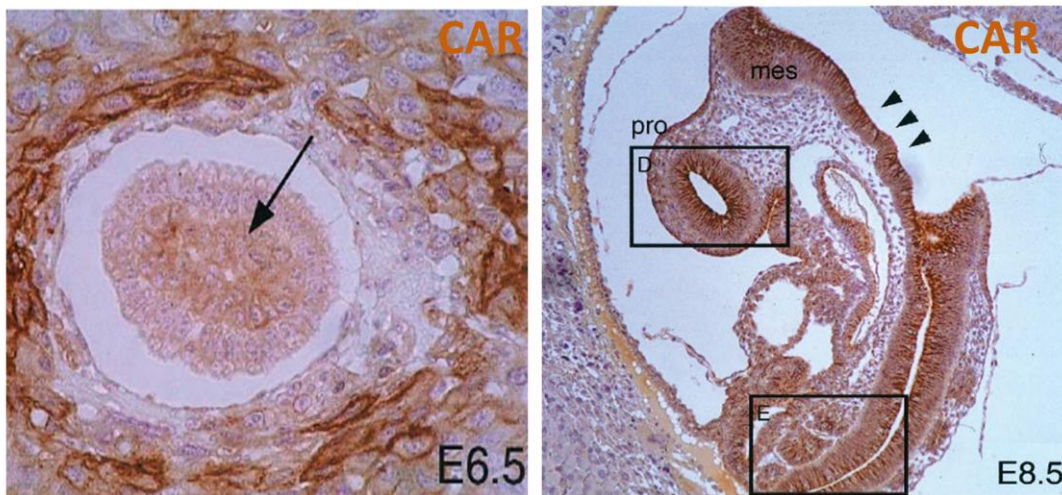


図15. マウス胚発生初期におけるCARの発現

E6.5マウス初期胚ではCARの陽性シグナルが確認されている。さらに、発生が進むE8.5では、神経管におけるCARの発現も確認されている (Hotta et al., 2010)。pro : prosencephalon ; mes: mesencephalon ; 矢頭: rhombencephalon。

2-1-1 神経系の発生における関与

胎仔期におけるCARの発現は、時空間的な変化を示している。CARは、最初に、外胚葉を起源とする神経管に強く発現する（図15）。この神経管は、前脳、脳幹と脊髄へと分化し、さらに、前脳から大脳と間脳、脳幹から中脳と菱脳が分化する。この発生過程において、CARは、未成熟の神経上皮細胞で高発現していることが確認された(Hotta et al. 2003)。Hondaらは、これらの機能解析を行い、未成熟の神経細胞におけるCARの発現は細胞間の相互作用、移動、さらに、神経線維束の形成などに関与することを示唆する結果を報告している(Honda et al. 2000)。その報告では、出生後一週間からCARの発現は著しく減少するが、海馬歯状回の顆粒細胞下層（subgranular layer: SGL）、側脳室下帯（subventricular zone: SVZ）、および、吻側移動経路（rostral migratory stream : RMS）においては、CARは、恒常的に発現が持続されていた（図16）。近年、これらのCARの発現部位は、生後の神経幹・前駆細胞の存在場所（神経幹細胞ニッチ）と同定されている(Eriksson et al. 1998; Gage 2000; Laywell et al. 2000; Lois and Alvarez-Buylla 1993; McKay 1997; Pagano et al. 2000; Rao 1999; Reynolds and Weiss 1992)。従って、CARは、神経系の新生機構の維持を行う細胞において重要な役割を果たしていると考えられる。

側脳室下帯SVZは成体の脳内で最大の幹・前駆細胞のニッチである。その部位では、上皮細胞はCAR陽性で単層を形成しており、神経幹細胞であるアストロサイト細胞とリボン状に側脳室の壁に沿って存在している（図17）。その幹細胞は前駆細胞へと分化し、吻側移動経路RMSを通過して移動し、分化しながら最終的に嗅球へと定着する。当初、CARを発現している上皮細胞は、幹細胞アストロサイトを支持するニッチ細胞と考えられていたが、最近の研究では、上皮細

胞とアストロサイトは互いにその性質を転換させて、相互に細胞量を補いつていることが示されている(Nomura et al. 2010)。Nomura らは、CAR陽性の上皮細胞がゆっくりとした細胞サイクルで自己増殖しながら、アストロサイトに変換して、成熟神経細胞へと分化することを、*in vivo*の細胞系譜の追跡実験と培養実験の両面から実証している(Nomura et al. 2010) (図17)。ところで、脳傷害による神経の新生を行うと、内因性の神経幹細胞の増殖が誘導される。また、脳虚血性脳障害や頭部外傷後の脳を調べると、海馬歯状回SGLや側脳室下帯SVZの神経幹・前駆細胞が増殖して、それらの細胞が受傷領域や梗塞部に移動して神経細胞に分化することが報告されている(Nakatomi et al. 2002; Yamashita et al. 2006)。そうした際に、上皮細胞からアストロサイトへのトランジション（形質転換）が観察されている(Johansson et al. 1999)。

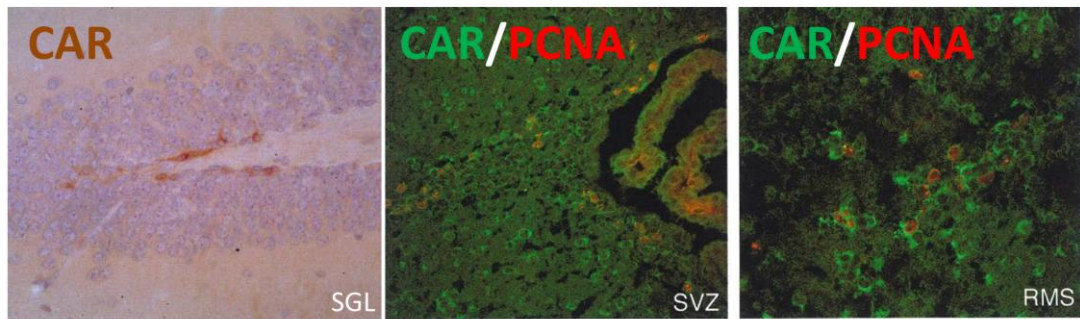


図16. 成体の神経系におけるCARの発現

成体の脳における神経幹・前駆細胞が存在している場所であるSGLとSVZでは、CAR陽性細胞が確認された。SVZで産生した前駆細胞ニューロンはRMS経路を通じて嗅球へ移動し、分裂しながら分化が進行する (Hotta et al., 2003)。SGL: subgranular layer (海馬歯状回の顆粒細胞下層); SVZ: subventricular zone (側脳室下帯); RMS: rostral migratory stream (吻側移動経路)。

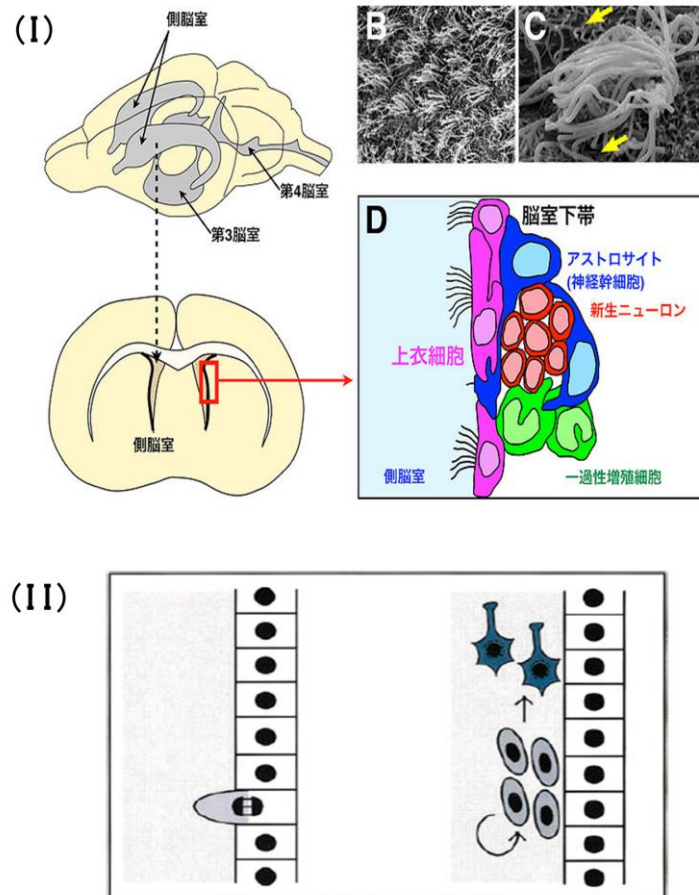


図17. 生後SVZのCAR陽性である上皮細胞の模式図

I: CAR陽性の単層の上皮細胞は神経幹細胞アストロサイト細胞とリボン状に側脳室の壁に沿って存在している。

II: 上皮細胞が分裂しながら、アストロサイトへトランジションを起こし、成熟神経細胞へと分化する (Johansson et al., 1999)。

2-1-2 心臓の器官形成

胎仔期のCARが高発現する臓器として、神経系以外では、心臓が注目されている。胎仔期の心臓におけるCARの高い発現は、出生後初期まで維持され、その後急激に減少し、成熟するとさらに低下していた(Tomko et al. 2000)。ところが、成熟した正常心臓と比べて、免疫性心筋炎(Ito et al. 2000)、拡張型心筋症(Noutsias et al. 2001)、心筋梗塞(Fechner et al. 2003)など、いずれも心疾患の多くを占める病例でCARが高発現していることが相次いで報告された。こうしたことから、心臓の組織あるいは心筋細胞の形成と修復に関するCARの役割の解明に注目が集まっている(Raschperger et al. 2006)。

生体におけるCARの機能を解析するために、CAR欠損マウス(CAR^{-/-})が作製されたが、その胎仔はE9.5-E13.5の時期で致死を示した(Dorner et al. 2005)。それは心臓形成不全が主な原因であると考えられ、透過型電子顕微鏡で心筋の超微細構造を解析すると、心筋における筋原線維の密度(線維数とその直径を含む)が顕著に減少しており、さらに、繊維の配向性も無秩序になっていた。また、心筋細胞内のミトコンドリアは拡大しており、グリコーゲンの蓄積が確認された。E11.5のCAR^{-/-}の心臓を正常型のそれと比べると、細胞分裂とアポトーシスには差が見られなかったが、正常型より発育が遅く、一つの房室管しか形成されていなかった。この心臓形成不全では、さらに、共通房室弁口にある主要な大血管の拡張に伴う心膜の水腫などの症状が見られた(Dorner et al. 2005)。その他にも、血液循環機能の不全があり、不十分な血液流量によってさらに各組織の形成に影響を与え、致死損害の原因になると推察される(Berdougo et al. 2003; Hogers et al. 1999; Huang et al. 2003)。

LisewskiらはCre-loxシステムを使って、心臓特異的プロモーターの制御下で、

CARの発現を時間特異的にノックダウンさせて、成熟個体におけるCARの機能を解析している(Lisewski et al. 2008)。その結果、タモキシフェンによるCre発現の誘導により、心臓でのCAR発現をノックダウンすると、10日後のCARタンパク質の減少が確認される時期と一致するように、不整脈などが発症し始めた。心電図ではQRS群とQT間隔の異常は見られないが、心房から心室への房室伝導が阻害され、PR間隔延長を呈していた(図18)。このことは、成体期にCARを欠損した心臓では大きな構造的な異常が観察されず、心筋細胞は正常な脱分極と再分極を起こすことができるが、房室ブロック(Atrio Ventricular Block)という心房と心室との間で起こる調律異常が存在することを示している。さらに、房室結節細胞における刺激伝導系に関与する分子と相互作用する分子を調べたところ、アダプタータンパク質であるconnexin 43とconnexin 45の発現が大きく減少していた(Lisewski et al. 2008)。どちらも、細胞接着や細胞内情報伝達の機能を担っていることから、CARは細胞間接着や情報伝達に関与していると考えられる。

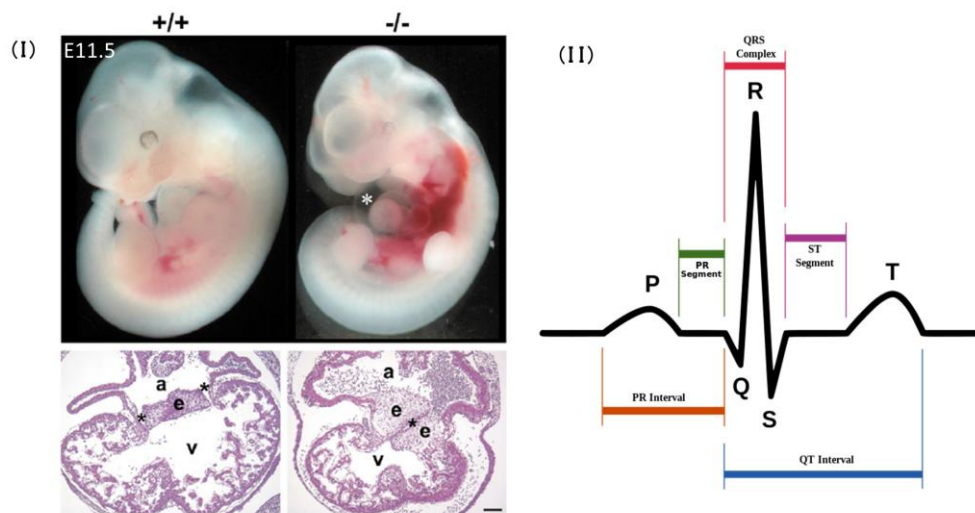


図18. $CAR^{-/-}$ マウスにおける心臓の欠損と心電図

I : E11.5 CAR 欠損マウス ($CAR^{-/-}$) では、正常型より発育が遅く、心臓形成不全が示されていた。心内膜拡張水腫、房室管の一部欠損などの症状により、血液循環機能不全を起こしている (Dorner et al., 2005)。

II : 成体期マウスに CAR を欠損した心臓では、不整脈が発症する。心電図ではQRS群とQT間隔の異常が見られずPR間隔延長を呈していた。房室ブロックとの調律異常が存在することを示している。a, atrium (心房) ; v, ventricle (心室) ; e, endocardial cushion (心内膜床) ; *, atrioventricular canal (房室管) . P波：心房電気伝導波； QRS群波：心室電気伝導波； PR間隔：心房から心室まで電気伝導時間。T波：心室筋の再分極。

2-1-3 精子形成

CARの発現は精巣にも観察され、精上皮の細胞間接着分子として示されている(Cheng and Mruk 2009)。精子の発生は、精細管の内側にある精原細胞が減数分裂を経て、成熟した精子となり、管を通過して精巣上体へと運ばれる。他の上皮組織と異なり、精上皮では、セルトリ細胞間に形成されるタイトジャンクションにより血液精巣関門 (Blood-Testis Barrier; BTB) が存在する。精原細胞を基底側から管腔側へと移動させるため、その関門を通過する必要があり、周期的な精巣関門の再構築が重要である(図19)。この特徴のある組織で、CARはどの役割を担っているかが注目されている(Mirza et al. 2007)。

CARの発現は、マウスE18.5の発達中の精細管内のセルトリ細胞と生殖細胞の両方に強い発現が確認される。この発現状態は生後初期まで維持されているが、生後一週間から、生殖幹細胞である始原生殖細胞は、発達中の精細管の中心位置から基底膜に遊走して精原細胞となる。生後12日には精原細胞の遊走が終わるとともに、CARの発現が弱くなることが観察された。その後、基底膜とセルトリ細胞との間に血液精巣関門が形成され、精原細胞が管腔側と仕切られ、免疫学的には生殖細胞を非自己として存在させることになる(Chihara et al. 2010)。タイトジャンクションのマーカであるoccludinとの共存関係を調べると、精細管のCARは、occludinとほぼ類似の分布をしていることが観察された(Raschperger et al. 2006)。このことから、CARは、接着分子の一つとして、精子形成時の血液精巣関門の構成に関与することが予想された。生殖細胞の管腔側への移動に多くの細胞表面分子が関与することが知られているが、それら分子が生殖細胞の遊走障害による不妊を引き起こす原因の一つとなることは、CARの役割を考える上で注目に値する。

精巣の分化と成熟に伴って、CARの発現様式は徐々に変化する。成熟すると、全体の発現量は大幅に減少し、発現部位がさらに限局化した組織像が見られた。また、発現している細胞を調べるとセルトリ細胞での発現が消失し、生殖細胞のみに局在するようになり、精子形成のステージ依存的であった。CARの発現は、ステージVII、VIII（前細糸期）で最も強く、ステージVからIX（細糸期）で弱い発現が確認されるが、ステージIやXIではCARの発現が観察されなかった。精母細胞は、精細管ステージVIII～IX（プレレプトテン期およびレプトテン期）において血液精巣関門を通過して基底区画から内腔へと移動する。このことから、CARは精上皮における主要なタイトジャンクション構成成分ではなく、生殖細胞が血液精巣関門を通り抜けて遊走することに関与すると考えられた。ところで、以前に同定されている生殖細胞の遊走に関与する分子であるclaudin-3のステージ依存的な発現も、CARと良く似た発現パターンを示しており(Meng et al. 2005)、両者の間にどのような関連があるか興味深い。その他、精巣におけるCARは、Notchシグナル系の制御に関係するLNX、および、LNX2と相互作用することや、精細胞のアクロソームで発現している分子で分化に必要であるJAM-Cと複合体を形成することが報告されており(Mirza et al. 2006)、CARの発現は精細胞の遊走や精子形成などの過程にも不可欠な役割を担っている可能性が示唆されている。

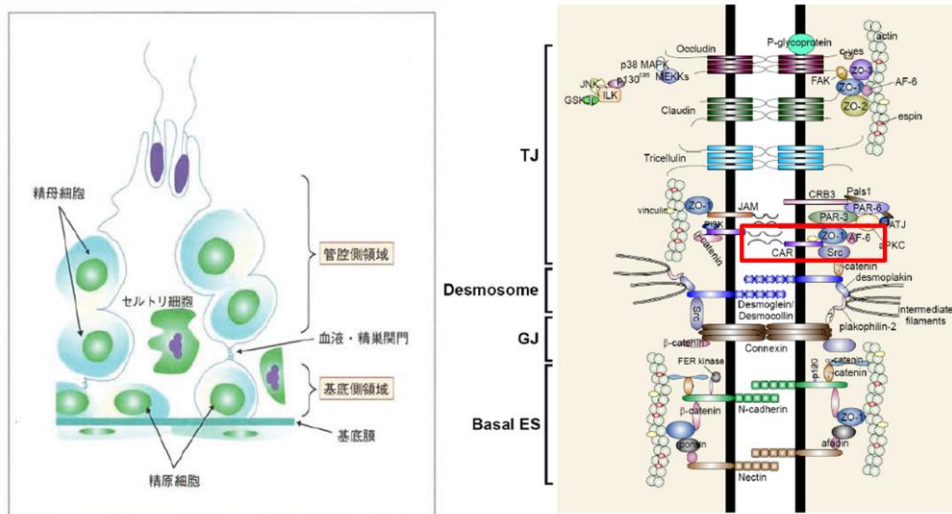


図19. 精細管における血液精巣関門模式図とCARの発現

血液精巣関門は精上皮基底側に多くの接着分子の結合により密着帯を構築し（右図）、精原細胞がいる基底側領域と半数体となった精細胞がいる管腔側領域に仕切り、免疫学的障壁としている (Cheng et al., 2009)。

2-1-4 本章の研究目的

以上の様な各組織におけるCARの発現と局在の結果を考慮すると、CARの生体形成・維持に関わる機構は、その解明の端緒についたところであり、多くが未知であるが、生命現象の探索にとって重要であることが示唆されている。さらに、各組織の発生初期過程にCARが高発現していることから、幹細胞における役割を担っている可能性が考えられる。そこで、本章では、幹細胞マーカーとの関連性について分析を行い、各組織に存在している幹細胞維持メカニズムの解明への手掛かりになることを期待した。

2-2 材料及び実験方法

2-2-1 実験動物

動物実験は、明治大学動物実験委員会による承認を受けて実施された。胎齢は、雌ラットのスメア像に精子を確認した午前中を胎仔期 (E) 0.5日齢とした。胎齢E12.5のWistar-Imamichi妊娠ラットをジエチルエーテルにより麻酔し安楽死した。その後、子宮から胎仔を取り出し、パラホルムアルデヒド固定を行った。

2-2-2 パラホルムアルデヒド固定法

採取した胎仔を、20 mM HEPESを含む4% (w/v) パラホルムアルデヒド固定液(pH7.5) に4°C一晩、浸漬固定した。固定後、HEPES buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH7.5)を含む30% (w/v) トレハロース溶液 (pH7.5) に移し、組織が溶液中に沈むまで置換を行った。置換後の組織をO.C.T-compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)に包埋し、液体窒素で冷却したアセトンで凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。クリオスタット (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて10 μ m 厚の凍結切片を作製した。切片乾燥後、免疫染色を行った。

2-2-3 免疫染色

染色前に、組織切片を、ImmunoSaver (Nissin EM, Tokyo, Japan)を用いて115°Cで5分抗原修復処理を行った。HEPES bufferで3回洗浄後、切片周辺をImmunoedge penでマークし、10% FBS、0.4% TritonX-100 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.,

Osaka, Japan) を含むHEPES bufferで室温1時間ブロッキングを行った。1次抗体 (表3) を室温で一晩反応させ、HEPES bufferでの洗浄後、2次抗体 (表4) は室温で2時間の反応を行った。染色後、遮光下でHEPES bufferで洗浄後、4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)を HEPES bufferで5倍希釈した溶液で封入し、細胞の核を染色した。

2-2-4 観察

染色後の切片は、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Olympus Co., Tokyo, Japan) で観察を行った。各蛍光タンパク質の観察には、DAPI (励起波長320-400nm、吸収波長410-510 nm)、 FITC / GFP (励起波長442-497 nm、吸収波長485-545 nm)、Cy3 (励起波長521-568 nm、吸収波長553-618 nm)、そして、Cy5 (励起波長560-680 nm、吸収波長625-775 nm) に適した各フィルターを使用した。

表 3 : 使用した一次抗体

	Species	Isotype	Working dilution	Vendor (Area)
CAR	Rabbit	IgG	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tex., USA)
SOX2	Goat	IgG	1:400	Neuromics (Edina, Minn., USA)
E-cadherin	Mouse	IgG	1:200	BD Biosciences (San Jose, Calif., USA)

表 4 : 使用した二次抗体

	Species	Isotype	Label	Working dilution	Vendor (Area)
Anti-rabbit IgG	Donkey	IgG	Cy3	1:500	Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pa., USA)
Anti-goat IgG	Donkey	IgG	FITC	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-mouse IgG	Donkey	IgG	Cy5	1:400	Jackson ImmunoResearch

2-3 結果

2-3-1 胎仔期 E12.5 の whole body を用いた CAR の局在分析

CAR は、背景でも述べたように多種の組織で発現している。本研究では、CAR と幹・前駆細胞との関係の観点から、ラット胎仔期 E12.5 の whole body 凍結切片に対して、CAR に加えて幹・前駆細胞マーカーである SOX2 と上皮幹細胞マーカーである E-cadherin の抗体を用いて 3 重免疫組織化学を行った (図 20)。本章では、次章で詳述する下垂体の結果以外の他の組織の結果について述べる。Whole body の染色像の概要は、以下の様であった。以前から報告された CAR が強発現している神経系では、確かに抗体陽性反応が確認された。また、最初に CAR の発現が確認された組織である心臓においても、CAR の陽性反応が確認された。以上の結果は、用いた CAR 抗体の有効性を示している。さらに、全体的な局在を観察すると、CAR は、主に中枢神経系である脳と脊髄の発現以外に、心臓、腸、腎臓などでも強く発現していた。これらと、同時に行った SOX2 および E-cadherin の染色とを合わせた観察結果を、由来する胚葉順に述べる。

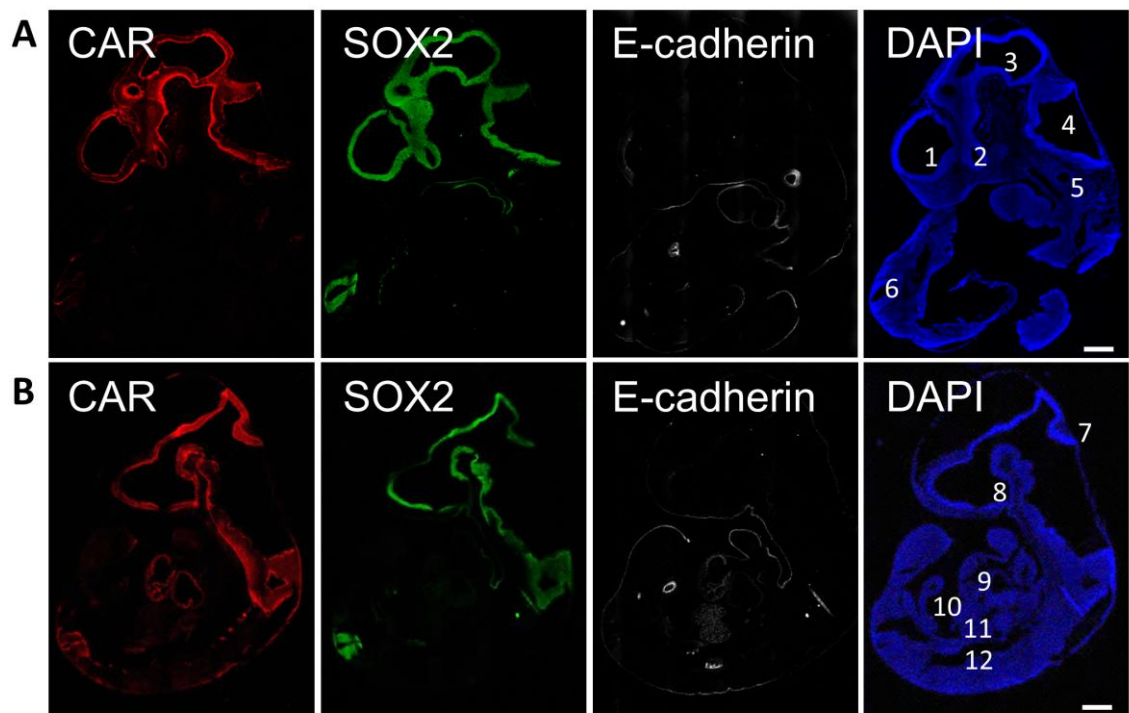


図20. ラット胎仔期におけるCARとSOX2及びE-cadherin抗体による三重蛍光免疫組織化学

胎仔E12.5のwhole bodyを用いてCARとSOX2、E-cadherin陽性細胞の局在を調べた。赤（Cy3）：CAR抗体、緑（FITC）：SOX2抗体、白（Cy5）：E-cadherin抗体、青（DAPI）：細胞核。胎仔期において多くの細胞はSOX2陽性を示す未分化細胞であった。CARとSOX2の分布はよく一致している。A: 側部切片、B: 正中切片; 1: 終脳, 2: 視神経, 3: 中脳, 4: 菱脳, 5: 内耳, 6: 神経管, 7: 小脳原基, 8: 間脳, 9: 心臓, 10: 中腸, 11: 肝臓, 12: 腎臓。スケールバー=300 μ m。

2-3-2 外胚葉由来組織における CAR の発現

脳と脊髄を含む中枢神経系、末梢神経系、感覚器などは外胚葉から発生する組織である。ラット胎仔期 E12.5 においては、神経管の分化が進み、前脳、中脳、菱脳、脊髄が形成されていく。この時期に、幹・前駆細胞マーカー SOX2 の免疫組織化学を見ると、SOX2 陽性細胞は各脳胞に広く存在し、ほとんどの細胞は未成熟な状態の神経細胞であることが示唆された (図 21)。しかし、各脳室帯における脳腔に面した内側から多くの細胞が強い SOX2 陽性反応を示していたが、脳室帯外側の辺縁領域の少数細胞は、SOX2 陰性であった。図 21 に見るように、終脳、中脳、第四脳室などの脳腔から離れた外側には、SOX2 陰性の細胞が観察された。一方、上皮幹細胞マーカー E-cadherin の染色結果を見ると、初期の神経系でほぼ発現が見られず、終脳の脳室帯内側の一部の細胞にのみ陽性反応が確認された。こうした染色像を CAR の免疫組織化学像と重ねて確認したところ、ほぼ全ての脳室帯で CAR の陽性反応が存在しており、SOX2 のそれとよく重なることが確認された。しかし、前述の脳室帯外側の辺縁領域においては、CAR の発現が脳室帯中央部より強い陽性反応を示していた。これら細胞は、SOX2 陰性であった。

ラットの内耳の発生は、菱脳両側が陥入して耳胞が形成されることから始まる。E12.5 の時期になると、内耳の原基である耳胞が形成され、菱脳に近い耳胞の背側は将来の半規管および内リンパ管になる卵形嚢を形成し、腹側はラセン器を含む蝸牛管となる球形嚢を形成する。この時期の SOX2 と E-cadherin の免疫組織染色を観察すると、多くの細胞は SOX2 と E-cadherin に両陽性であったが、それらの中でもシグナルの強弱が見られたが、強弱の一致は認められなかった (図 22)。SOX2 は、球形嚢の両側に将来感覚領域になる場所に強く発現し、卵

形嚢では弱い陽性反応を示していた。一方、E-cadherin 陽性反応は、SOX2 のそれと異なる局在が示され、特に卵形嚢で強く発現しており、球形嚢でも卵形嚢付近の場所と最内側の細胞層に強く発現しているものの、腹側にはわずかな陽性反応を示す細胞が存在するのみであった。さらに、CAR の染色結果を合わせて見ると、CAR は球形嚢のほぼ全ての細胞で発現しているものの、卵形嚢ではわずかな細胞にしか発現してなかった。球形嚢の細部では、CAR は内側の細胞層に強く発現し、特に腔内に面したアピカル側でその発現が強かった。この CAR の陽性反応の特徴は、E-cadherin のそれと類似していた。一方、球形嚢における CAR と SOX2 の局在はよく重複していたが、SOX2 発現量との関連で見ると、両者が一定の量比を保って存在しているようではなかった。

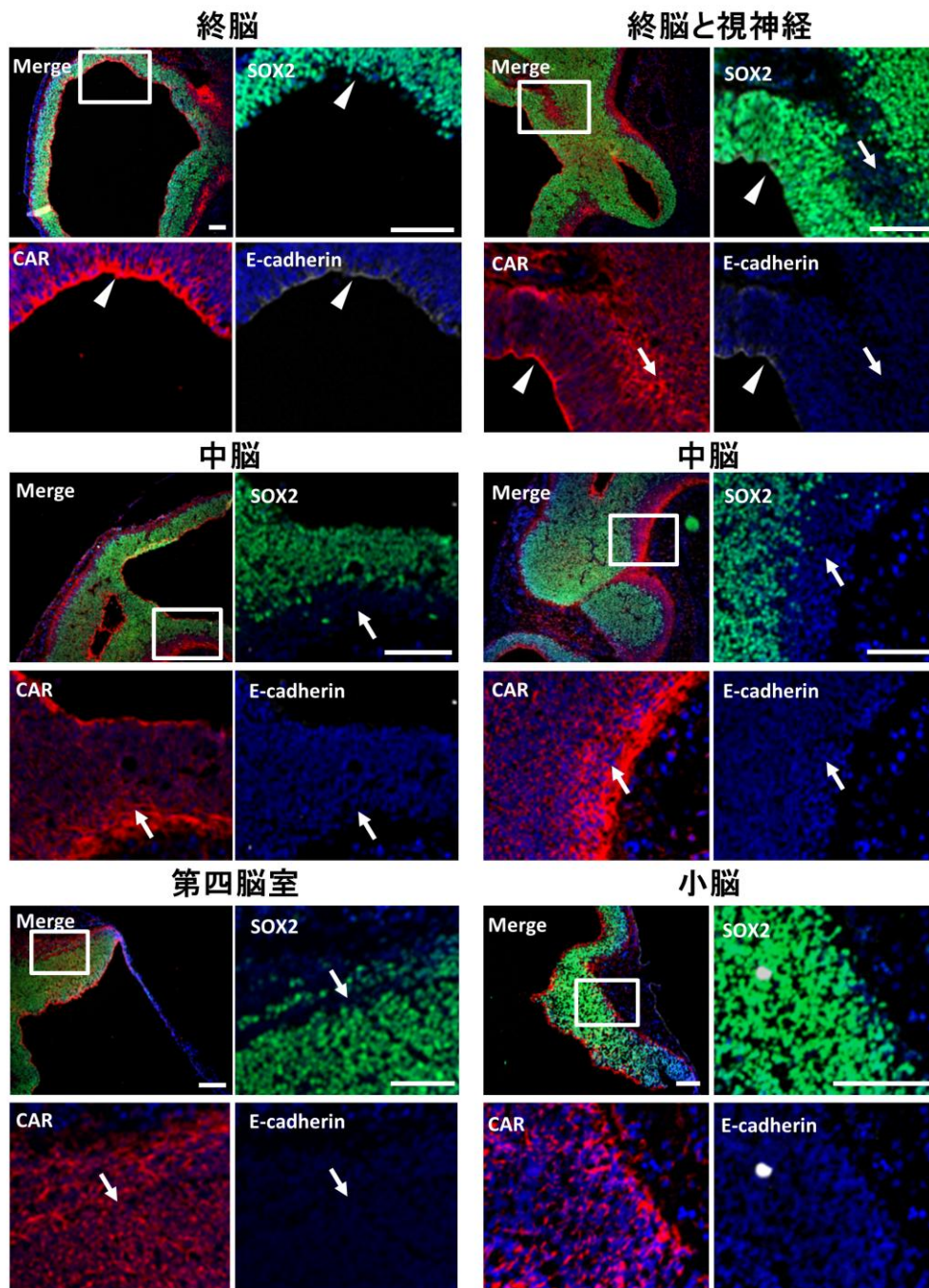


図21. 神経系におけるCARの発現

CAR陽性細胞は神経系における未成熟神経細胞で広く発現し、SOX2とよく共存していた。脳室辺縁帯のCAR陽性細胞ではSOX2の発現が減少・消失していた（矢印）。一方、E-cadherinは端脳の一部CAR陽性細胞で発現していた（矢頭）。赤（Cy3）：CAR抗体、緑（FITC）：SOX2抗体、白（Cy5）：E-cadherin抗体、青（DAPI）：細胞核。スケールバー=50 μ m。

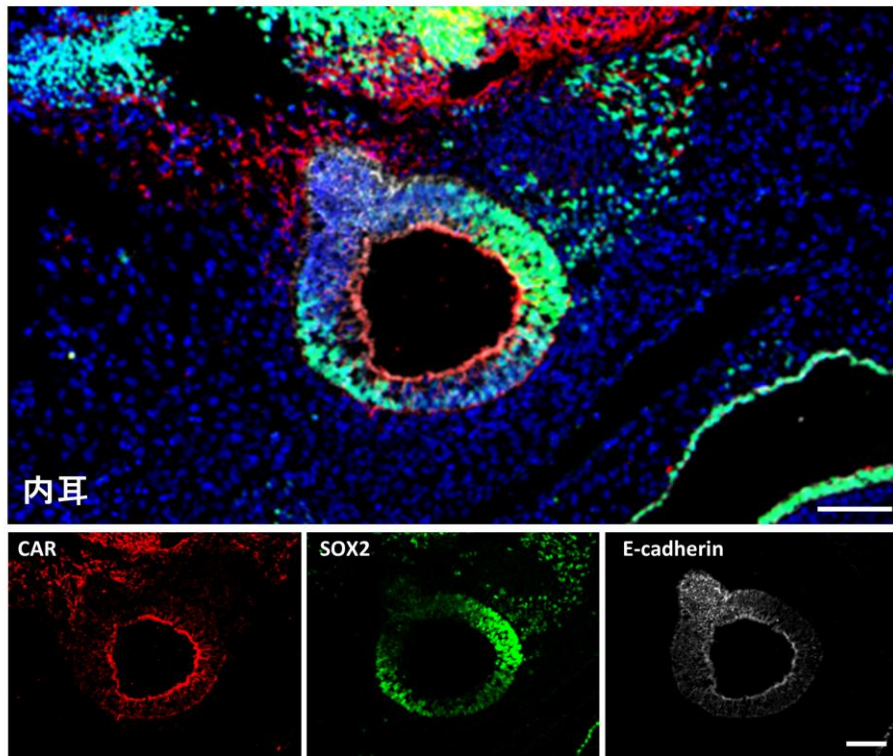


図22. 内耳におけるCARの発現

内耳の発生初期において、多くの細胞はCAR、SOX2、E-cadherin陽性であった。しかし、各因子の強弱陽性細胞の分布が一致していなかった。赤 (Cy3) : CAR抗体、緑 (FITC) : SOX2抗体、白 (Cy5) : E-cadherin抗体、青 (DAPI) : 細胞核。スケールバー=50 μ m。

2-2-3 中胚葉由来組織における CAR の発現

中胚葉からは、主に骨、結合組織、筋肉、血液などの支持組織と生殖器が発生する。中胚葉由来の心臓は、最初に完成する臓器であり、胎仔発生中期に血液を循環させるために重要である。胎仔期 E12.5 においては、初期段階である原始心臓が完成されるが、そこでは将来心臓の上皮、筋肉や血管を形成する始原細胞が集められる。その時期の SOX2、E-cadherin と CAR の三重染色の観察では、原始心臓における SOX2 の発現は殆ど確認出来なかったが、一方で、E-cadherin と CAR は同じ様な局在を示しており、心房と心室の何れにおいても内外心膜とその中に挟んでいる心筋細胞層に強い陽性を示していた (図 23)。

腎臓は中胚葉の腎節から発生する。E12.5 では、腎臓原基である造腎索において、暫定的腎臓 (中腎) が出現する。その後、中腎は雄性生殖腺へ分化する一部を除き、ほかは徐々に退行する。中腎管は数十の単層細胞が並んでいるネフロンからなり、造腎索の内部に折れ曲がっている。SOX2 と E-cadherin の染色像を見ると、SOX2 の陽性反応が見あたらなかったが、E-cadherin の発現は多数のネフロンに存在し、単層に並んでいるネフロン細胞を囲むように細胞膜全体に強く陽性反応が観察された (図 24)。さらに、E-cadherin の発現様式を観察すると、中腎前端のネフロンではほぼすべての細胞が E-cadherin に陽性であったが、中端から後端に向けて陽性細胞が減少している傾向が見られ、後端になると E-cadherin 陽性細胞が認められなかった。さらに、CAR の発現を見てみると、ほぼすべてのネフロンの細胞は、ルーメンに面するアピカル側に CAR を発現していた (図 24)。しかし、CAR と E-cadherin の陽性細胞の局在を比較すると、互いの共存はよく見られたが、発現パターンは異なっており、中腎の中後端では CAR の陽性反応が強かった。

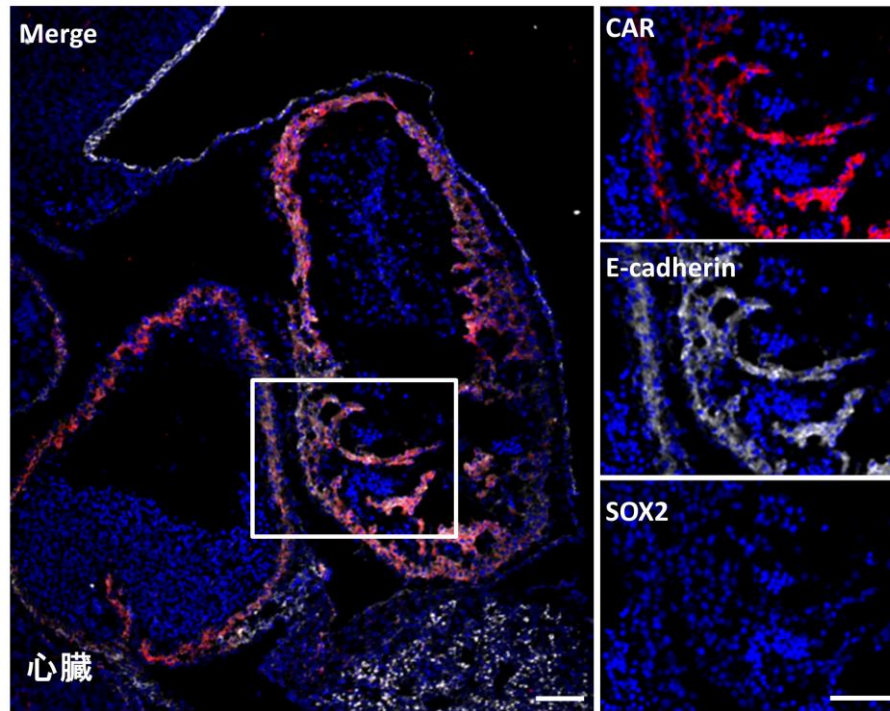


図23. 心臓におけるCARの発現

中胚葉由来の原始心臓では、SOX2の発現は確認されなかった。E-cadherinとCARは同じ様な局在を示しており、心房と心室共に内外心膜と心筋細胞層に強い陽性を示していた。赤 (Cy3) : CAR抗体、緑 (FITC) : SOX2抗体、白 (Cy5) : E-cadherin抗体、青 (DAPI) : 細胞核。スケールバー=50 μ m。

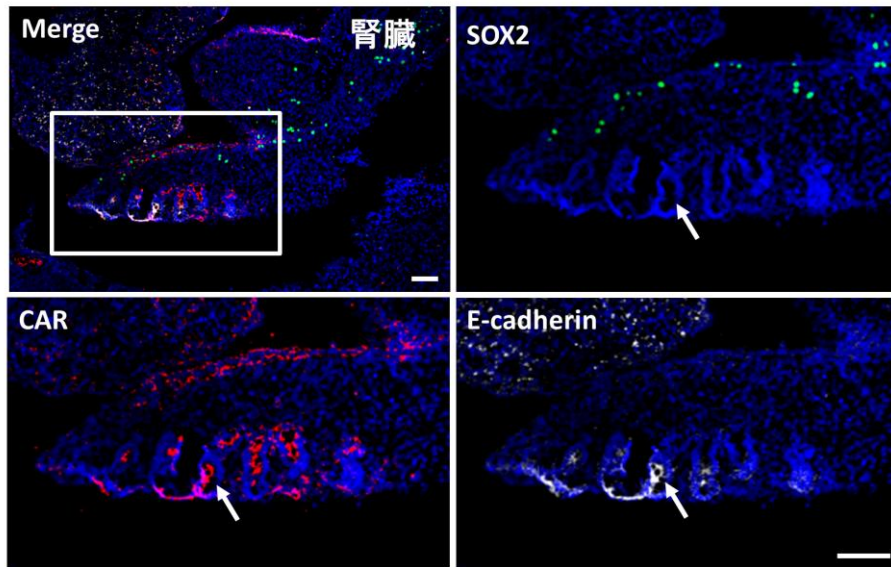


図24. 腎臓におけるCARの発現

E12.5の造腎索では、CARとE-cadherinの発現は多数のネフロンで確認された（矢印）。両者は異なる発現様式を示していた。赤（Cy3）：CAR抗体、緑（FITC）：SOX2抗体、白（Cy5）：E-cadherin抗体、青（DAPI）：細胞核。スケールバー＝50 μ m。

2-3-4 内胚葉由来組織における CAR の発現

内胚葉からは、主に消化器と呼吸器系組織が発生する。E12.5 では、3つの部分、前腸、中腸、後腸に分けられる原始消化管が存在する。前腸からは原始咽頭から十二指腸近位部まで、下部呼吸器と外分泌腺である肝臓、膵臓を含む消化器が発生し、中腸からは主に腸管が発生する。この時期における SOX2 と E-cadherin の免疫組織像を観察すると、消化管と呼吸器と共に、ほぼ SOX2 の発現は見られなかったが、E-cadherin は肺、肝臓、中腸などの組織に確認された。CAR の局在を調べると、これらの組織における CAR の発現はわずかに認められ、以下の様であった。

肝臓では、CAR と E-cadherin の共存が確認された。E-cadherin 陽性細胞は、形成したばかりの肝臓原基に多く存在していた。その分布は、散在的であり、細胞のアピカル側に存在する像が観察された (図 25)。CAR 陽性細胞も散在的な分布が認められ、細胞内発現様式は E-cadherin と同じようにアピカル側に存在していた。すべての CAR 陽性細胞には、E-cadherin の共存が確認されていた。

一方、中腸でも検出された CAR 陽性シグナルは、腸管腔に接している細胞層のみに存在していた。しかも、細胞内の局在を見ると、腔に面したアピカル側に存在していた (図 25)。E-cadherin はすべての腸管の上皮細胞で発現し、内層の細胞のみに CAR と E-cadherin の共存が確認された。

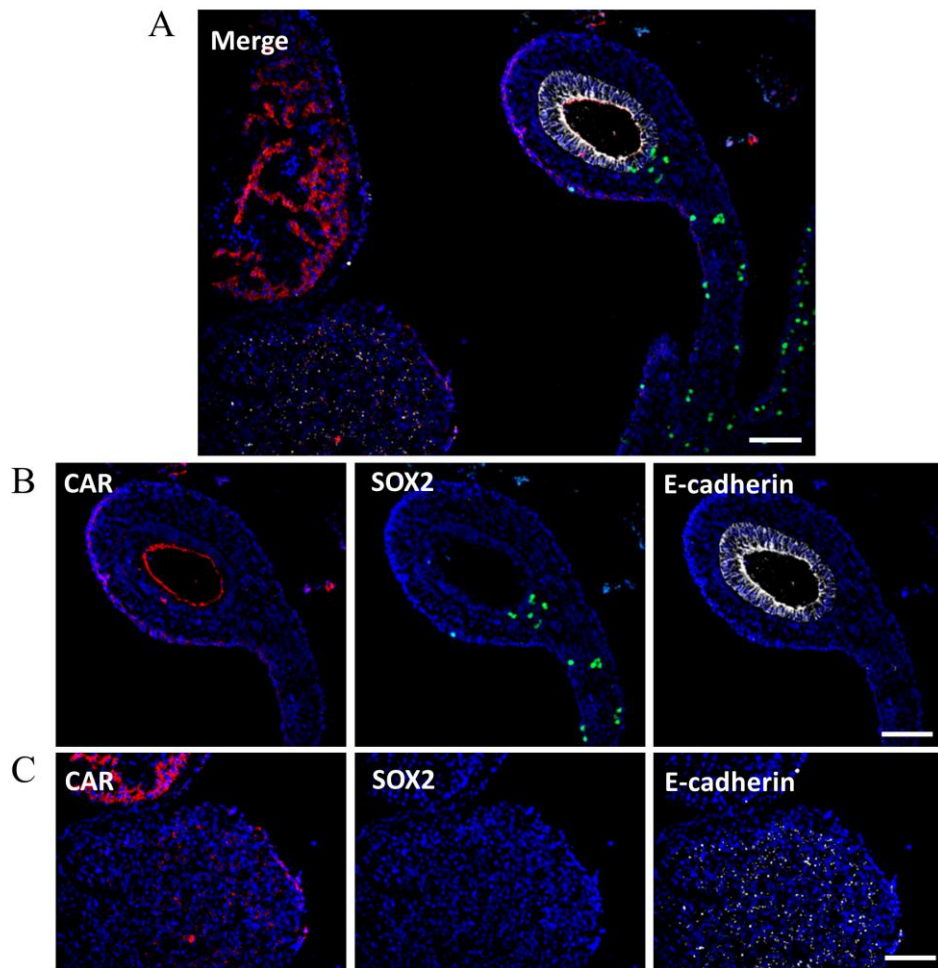


図25. 腸と肝臓におけるCARの発現

内胚葉由来の腸(B)と肝臓(C)ではSOX2を殆ど発現していなかった。CAR陽性細胞ではほぼE-cadherinの発現が確認された。赤(Cy3)：CAR抗体、緑(FITC)：SOX2抗体、白(Cy5)：E-cadherin抗体、青(DAPI)：細胞核。スケールバー＝50 μ m。

2-4. 考察

幹細胞は、個体発生や組織維持において種々の細胞を供給できる分化能を持つ細胞である。近年、幹細胞は様々な組織で発見されており、生体組織の恒常性維持に役割を果たしている。受精卵は一つの細胞から体を構成する全種類の細胞へ分化できる全能性を持っているが、個体成熟後、各組織においては何種類かの細胞に限定される多能性を持つ成体幹細胞や単能性を持つ前駆細胞が存在している。成体における幹・前駆細胞は、個体発生初期における全能性を持つ幹細胞の一部が分化能を維持され続けて成体に残ったと考えられている。それらの成体幹細胞が成立する仕組みや幹細胞維持に関わる多くの制御機構が精力的に解明されつつあるが、その全容解明はまだ端緒である。

本実験は、幹細胞維持機構において **CAR** の担っている役割を解析する事を目的としており、**CAR** と、幹細胞マーカーである **SOX2** と **E-cadherin** との共存関係を調べる事で、胎仔期における各組織に存在している幹細胞について新たな視点を示す事ができた。**SOX2** は、個体の発生における未分化の維持などに関わる **HMG box** 型転写因子であり、初期胚の内部細胞塊で分化全能性の維持に重要である。その後、主に原始外胚葉で神経系や感覚器（視神経、内耳など）の発生過程に幹細胞性の維持制御に役割を果たしているため、特に神経系組織の幹・前駆細胞マーカーとされている。ラット胎仔 **E12.5** では、外胚葉由来の中樞神経系、末梢神経系、感覚器などにおいて、多くの細胞は **SOX2** 陽性を示す未分化状態の細胞として観察される。**CAR** の局在を **SOX2** と比較すると、両者でよく一致した分布が示され、**CAR** が幹・前駆細胞で機能している事を示している。しかし、その一方で、脳室辺縁帯に **SOX2** 陰性細胞が観察されるが、これらの細胞は **CAR** 強陽性であることが確認された。これら細胞の存在は何を意味

しているのか、さらに詳しい解析が必要である。

E-cadherin は Ca^{2+} 依存性の同種結合接着分子であり、組織の形態形成、主に上皮組織に関与する重要な分子として確認されている(Damsky et al. 1983; Hyafil et al. 1981; Hyafil et al. 1980; Shirayoshi et al. 1983)。さらに詳しい機能を調べると、E-cadherin は細胞間接着を介して幹細胞の多能性維持制御に関与していることが認められている(Chen et al. 2010; Chou et al. 2008)。外胚葉では、神経管を形成する部分が次第に N-cadherin を発現するようになり E-cadherin の発現が消失するが、中、内胚葉では発現し続ける。原腸胚期以後、中胚葉領域の形成に際して移動する細胞群では SOX2 の発現が抑制されるため(Kiernan et al. 2005)、心臓、腎臓など各中胚葉組織では SOX2 は発現していない。さらに、胎仔期発生初期の E12.5 には、これらの中胚葉組織における CAR と E-cadherin の共存が頻繁に観察された。心臓原基では SOX2 陰性であるが、その代わりに、心臓幹・前駆細胞に発現している因子 cKit、Sca1 などの時空間的な分布(Chong 2012; Milgrom-Hoffman et al. 2011; Serradifalco et al. 2011)と比較すると、本実験で初期の心臓で観察された CAR と E-cadherin 陽性細胞は分化能を持つ幹・前駆細胞であると考えらる。腎臓の中腎では、CAR と E-cadherin の共存も確認された。この発現様式が何を意味しているかはまだ未解明である。

一方、内胚葉である肝臓、腸などの組織において、CAR と E-cadherin を共発現している細胞も多く存在していた。現在でも、肝臓における幹細胞のメカニズムがまだ不明であるが、胎仔期において、胚性前駆細胞である肝芽細胞(Hepatoblast) の存在が知られているが(Sigal et al. 1994)、この細胞種は E-cadherin を特異的に発現していることが明らかになった(Nitou et al. 2000; Nitou et al. 2002)。肝芽細胞が肝臓の成熟過程において、肝実質細胞または胆管上皮細胞へと分化しているの報告がある(Germain et al. 1988; Van Eyken et al. 1988)。一方、

E-cadherin を利用して免疫磁気ビーズ法により、胎仔の肝臓から分離した陽性細胞を体外培養すると、尿素回路酵素（カルバミルリン酸合成酵素 I、CPSI）を発現する肝細胞、または、デスミンを発現している肝星細胞が出現することが示された(Nitou et al. 2002)。これらのことを含めて考えると、胎仔期の肝臓における CAR 陽性細胞は、幹・前駆細胞であり、成体においても幹細胞性を維持する機能を担っている可能性がある。また、腸原基の上皮細胞では、すべての細胞が E-cadherin を発現していたが、その中の特定の細胞だけが CAR を発現しており、経時的な観察を行うことで、この CAR 陽性細胞がどのような機能を担っているのか調べる必要がある。

以上の結果から、CAR は胎仔期から三胚葉に由来する多くの組織に発現し、種々の未分化細胞マーカーとの共存が頻繁に観察される。さらに、由来する胚葉を超えて形質転換をするような細胞にも CAR が発現しているなど、CAR は多様な発現様式をしながら各組織の形成過程における幹・前駆細胞の機能維持に関与していると考えられる。本研究以外にも、同じようなことを示唆する研究が増加しており、今後、CAR の機能解析を通じて幹・前駆細胞研究の新展開が期待される。次章では、CAR の局在の詳細を下垂体で解析した研究を述べる。

第3章 下垂体発生過程における CAR の発現と局在様式の解析

3-1 緒言

本研究は、下垂体に存在する組織幹・前駆細胞、または幹細胞ニッチに焦点を当てている。新規因子 CAR を指標として、新たな視点から下垂体幹細胞ニッチのメカニズムの解析を展開している。

本実験では、ラット CAR 遺伝子を既報のマウスと比較し、種間で保存性のある遺伝子配列からエクソンとイントロンの位置を推測した。その結果に基づき、特異的なプライマーを作製し、確認したところ、マウスと同じように、ラットでも少なくとも二つアイソフォームが発現している事が分かった。次に、Real-time PCR 法により、胎仔期から成体期までの下垂体で CAR 遺伝子の発現を測定した。また、特異的な抗体を用いて CAR 陽性細胞を同定し、下垂体の発生過程における局在変化を観察した。さらに CAR 陽性細胞の性質を各マーカー因子と多重蛍光免疫組織化学法により検討した。以上の結果、CAR 陽性細胞は、下垂体の発生前期から出現し、未分化細胞の一つとして胎仔期から成体までその存在を維持し続けることが明らかになった。詳しい機能やまだ未解明な点が多く残っているが、本章の実験結果は、CAR が下垂体原基形成と幹細胞ニッチ形成・維持に非常に重要な因子であることを初めて示したものである。

3-2 材料及び実験方法

3-2-1 ラット CAR 遺伝子エクソン7の同定

ラットの CAR 遺伝子では、エクソン7の全長をコードする配列が定かではない。そこで、ラットとマウスの CAR 遺伝子情報を National Center for Biotechnology Information (NCBI) 遺伝子データベースから取得し、Vector NTI Sequence analysis software を用いて、DNA の相同性解析を行った。その情報に基づき、ラットのエクソンとイントロンの部位を推定し (図 26)、特異的なプライマーを作製し、CAR 遺伝子エクソン7の同定と後述するラット CAR のアイソフォームの確認に利用した。

3-2-2 cDNA の作製

ラットの各胎仔期 E13.5 (n=15), E14.5 (n=10), E15.5 (n=17), E16.5 (n=14), E18.5 (n=11), E20.5 (n=10), P0 (n=9) の全下垂体、及び出生後各日齢 P5 (n=5), P15 (n=8), P30 (n=6), P60 (n=3) の下垂体前葉と中後葉から ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて total RNA を抽出した。RQ1 RNase-free DNase I (Promega, Madison, Wis., USA) 処理により混入する DNA を分解した。抽出した RNA 1 µg を用いて、Prime Script Reverse Transcriptase (Takara Bio, Otsu, Japan) により逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

3-2-3 Real-time PCR

Real-time PCR は SYBR Green (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて行い、ABI prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) をで分析を行った。比較 Ct 法により、内部標準である Tbp (TATA-box binding protein) に対する相対的な値を算出している。アニーリング温度は 62°C、用いたプライマーの配列は以下の通りである。

PCR のサイクル条件

Rat CAR1/CAREx8 (CAR1) :

Forward 5'-AACCAAGTCCCCAGTGAAGA-3'

Reverse 5'-AATGCCATCGGTCAGGTAAG-3'

Rat CAR2/CAREx7 (CAR2) :

Forward 5'-GGAAGTGCATCACGACATCAG-3'

Reverse 5'-ACCGCTCCCATTCTGACTTAG-3'

Rat TATA box binding protein (Tbp) :

Forward 5'-GATCAAACCCAGAATTGTTCTCC-3'

Reverse 5'-ATGTGGTCTTCCTGAATCCC-3'

PCR 産物の DNA 配列は、電気泳動後磁性シリカビーズ MagExtractor (TOYOBO) を用いてゲルから抽出し、シーケンス反応を行った後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析し、NCBI Gene データベースにある塩基配列と比較し、目的の遺伝子産物であることを確認した。

3-2-4 免疫組織化学

3-2-4-1 実験動物

Wistar-crlj S100-GFP トランスジェニックラットは、埼玉大学理工学部 井上金治教授によって作製されたものを供与された(Itakura et al. 2007)。また、Wistar-Imamichi ラットも併用した。胎仔サンプルは、各胎齢の妊娠ラットをジエチルエーテルにより麻酔し安楽死した。その後、子宮から胎仔を取り出し、組織の固定を行った。胎齢は、雌ラットのスメア像に精子を確認した午前中を胎仔期 (E) 0.5 日齢とした。

生後サンプルは、各日齢ラットをジエチルエーテルにより麻酔し安楽死した後、速やかに下垂体を採取した。採取した下垂体は、各種固定法により固定し、組織ブロックを作製した。

3-2-4-2 エタノール固定法

採取した新鮮組織を、O.C.T-compound を用いて包埋し、液体窒素で冷却したアセトン中で凍結した。組織ブロックを-80℃で保存し、使用時に-20℃に冷却したクリオスタットを用いて、10μm 厚の切片を作製し、スライドガラスに貼り付けて乾燥した。胎仔は矢状断面、生後下垂体では冠状断面の切片を作製した。切片を予め-20℃に冷やしたエタノールに浸し、-20℃で 20 分固定を行った。固定後の下垂体は、HEPES buffer で洗浄し、免疫染色を行った。

3-2-4-3 パラホルムアルデヒド固定法

採取した新鮮組織を、20 mM HEPES を含む 4% (w/v) パラホルムアルデヒド固定液(pH7.5) に 4°C 一晩で浸漬固定を行った。固定後、HEPES buffer を含む 30% (w/v) トレハロース溶液 (pH7.5) に移し、組織が溶液中に沈むまで置換を行った。置換後の組織を O.C.T-compound に包埋し、液体窒素で冷却したアセトンで凍結し、-80°C で保存した。クリオスタットで 10 μ m 厚の凍結切片を作製した。切片乾燥後、免疫染色を行った。

3-2-4-4 ブアン固定法

採取した新鮮組織を、ブアン固定液 (ピクリン酸飽和水溶液 15 : ホルマリン 5 : 酢酸 1) に 4°C、数時間の浸漬固定を行った。固定後、70%、80%、90%、100% エタノールの順に 1 時間浸し、組織内の水分を徐々に除去した。脱水後、キシレンで組織を 1 時間 x2 回透徹した後、パラフィンに包埋した。組織ブロックからマイクロトームで 6 μ m 厚のパラフィン切片を作製した。切片を脱パラフィン処理後、免疫染色を行った。

3-2-4-5 免疫染色

染色前、組織切片を、ImmunoSaver を用いて 115°C で 5 分間の抗原賦活化処理を行った。HEPES buffer で 3 回洗浄後、10% FBS、0.4% TritonX-100 を含む HEPES buffer で室温 1 時間ブロッキングを行った。1 次抗体 (表 5) は室温で一晩反応させ、HEPES buffer での洗浄後、2 次抗体 (表 6) は室温で 2 時間反応を行った。染色後、DAPI を HEPES buffer で 5 倍希釈した溶液で封入し、細胞の核を染色する。

3-2-4-6 観察

共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察を行った。各蛍光タンパク質の観察には、DAPI: 励起波長 320-400 nm、吸収波長 410-510 nm ; FITC / GFP : 励起波長 442-497 nm、吸収波長 485-545 nm; Cy3: 励起波長 521-568 nm 、吸収波長 553-618 nm; Cy5: 励起波長 560-680 nm、吸収波長 625-775 nm のフィルターを使用した。Alexa Flour 488 蛍光は FITC フィルターで検出した。

表 5：使用した一次抗体

Primary antibody	Species	Isotype	Label	Working dilution	Vendor (Area)
CAR	Rabbit	IgG		1:500	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tex., USA)
GFP	Chicken	IgY		1:500	Aves labs (Tigard, Ore., USA)
SOX2	Goat	IgG		1:400	Neuromics (Edina, Minn., USA)
E-cadherin	Mouse	IgG		1:200	BD Biosciences (San Jose, Calif., USA)
KI67	Mouse	IgG		1:250	BD Biosciences
Vimentin	Mouse	IgG		1:10000	Sigma (Saint Louis, Mo., USA)
Isolectin B4			Alexa Fluor 488	1:100	Vector (Burlingame, CA., USA)
TSH β	Guinea pig	IgG		1:5000	NIDDK(Bethesda, Md., USA)
FSH β	Guinea pig	IgG		1:5000	NIDDK
ACTH	Guinea pig	IgG		1:5000	NIDDK
PRL	Guinea pig	IgG		1:5000	NIDDK
GH	Guinea pig	IgG		1:2000	Shizuoka University (Shizuoka, Japan)
Cocktail of anti-hormone antibodies					
TSH β	Guinea pig	IgG		1:5000	NIDDK
FSH β	Guinea pig	IgG		1:5000	NIDDK
GH	Guinea pig	IgG		1:5000	Shizuoka University
ACTH	Guinea pig	IgG		1:2000	NIDDK
PRL	Guinea pig	IgG		1:2000	NIDDK

表 6 : 使用した二次抗体

Secondary antibody	Species	Isotype	Label	Working dilution	Vendor (Area)
Anti-rabbit IgG	Donkey	IgG	Cy3	1:500	Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pa., USA)
Anti-goat IgG	Donkey	IgG	FITC	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-guinea pig IgG	Donkey	IgG	FITC	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-chicken IgY	Donkey	IgG	FITC	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-mouse IgG	Donkey	IgG	Cy5	1:400	Jackson ImmunoResearch
Anti-mouse IgG	Donkey	IgG	FITC	1:500	Jackson ImmunoResearch

3-3 結果

3-3-1 ラット CAR 遺伝子のアイソフォームの確認

CAR 遺伝子の DNA 配列は既に決定されていたが、選択スプライシングによるアイソフォームの生成機序の解析は依然として続いている。現在まで、確認されたアイソフォームは、ヒト CAR で 6 種、マウスでは 2 種が NCBI に登録されている (図 10) が、ラットについては、Ex8 をコードする CAR1 の情報しか登録されていない。CAR の遺伝子は、種間で良くその塩基配列が保存性されているため、ラットにおいても、アイソフォームの存在が予想できる。そこで、ヒトとマウスで確認された二つ膜貫通型 CAR1 と CAR2 を比較したところ、最初に CAR1 で確認したエクソン 7 と 8 の間に長い転写領域が存在し、CAR2 のエクソン 7 ではその領域を長いエクソン 7 として転写されている。ラットにおける CAR 遺伝子のエクソンとイントロンの構造はマウスと相同性が高いため、Vector NTI Sequence analysis software を用いて、ラットとマウス DNA と cDNA 情報を入力して相同性検索を行った。その結果、ラット CAR の遺伝子において、マウス CAR2 のエクソン 7 と相同性の高い配列が確認された (図 26)。この結果に基づいて、ラット CAR1 と予測した CAR2 に対して、それぞれ特異的なプライマーを設計し、ラット下垂体 cDNA プライマーを用いて、PCR を行った。CAR1 と CAR2 で設計したプライマーの増幅配列位置とゲル電気泳動図を図 27 に示した。ゲルから回収した増幅産物 DNA をシーケンスで確認したところ、ラット下垂体においても CAR2 が存在することが明らかになった (図 28)。

```

mCAR1 1(Ex1)          184    23467(Ex2)          23633    27264(Ex3)          27468
      tgccgagctg.....gggatcgcgg — attcaccag.....ggatcaagtg — atcattttgt.....accgttcttg
mCAR2 -----
rCAR1 1(Ex1)          114    22242(Ex2)          22408    26296(Ex3)          26500
      ccaggctctg.....ggtgtcgcgg — attcaccag.....ggatcaagtg — atcattttgt.....acagttcttg
rCAR2 -----

mCAR1 31672(Ex4)      31827    32479(Ex5)          32601    33132(Ex6)          33270
      ttaagccttc.....tggctgacag — aaatgacgtc.....gttgcccac — cctccaaccg.....atgatatcag
mCAR2 -----
rCAR1 30546(Ex4)      30701    31393(Ex5)          31515    32051(Ex6)          32189
      ttaagccttc.....tggctagcag — aaatgacttc.....gttgcccac — cctccaaccg.....acgacatcag
rCAR2 -----

mCAR1 34498(Ex7)      34681          57521(Ex8)          58095
      ggaagatgtg.....acccgctaag ————— ttcaagtacg.....ttaaatgaa
mCAR2 34498(Ex7)      39061
      ggaagatgtg.....tgaagaaagc
rCAR1 33233(Ex7)      33416          46639(Ex8)          47166
      ggaagatgtg.....acccgctaag ————— ttcaagtacg.....ttaaaggaa
rCAR2 33233(Ex7)      37704
      ggaagatgtg.....cgaagaaagt

```

図26. ラットCAR遺伝子アイソフォームの推測

ラットCAR遺伝子をマウスの配列と比較し、保存性の比較によりrCAR2エクソン7の位置を推測した。赤い枠内は推測した領域を示している。

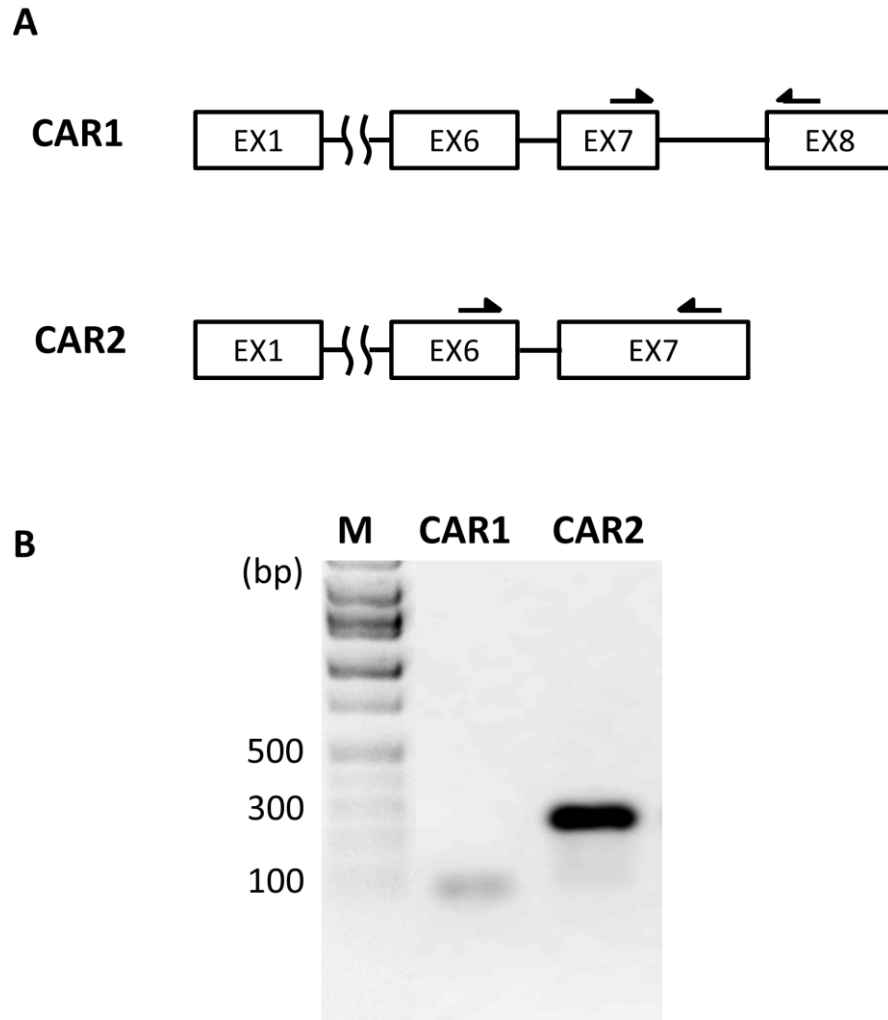
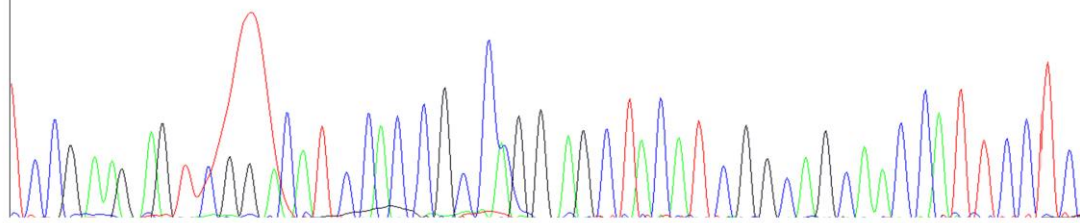


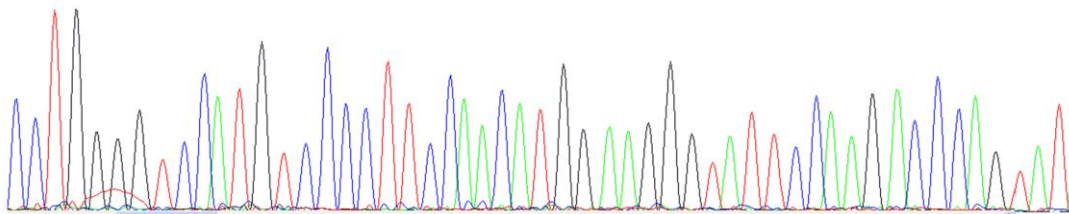
図27. PCR法によるCAR1 (Ex8) とCAR2 (Ex7) の検出

ラット下垂体RNAより合成したcDNAプライマーを鋳型とし、特異プライマー (A) により増幅した後、エチジウムブロマイドを含むアガロースゲル電気泳動を行った (B)。分離したPCR産物をゲルからDNAを抽出し、塩基配列を解析し、CAR 1 およびCAR2の選択的スプライシング部位 (A)を確認した。

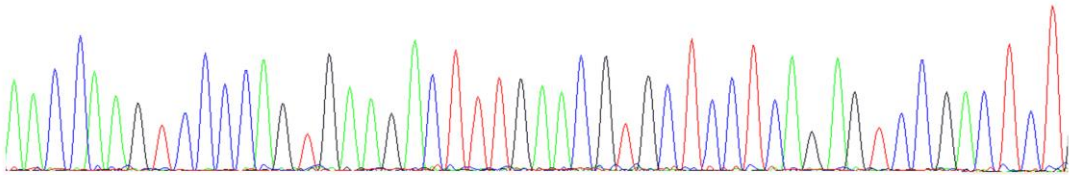
5'-TCCGAAGAGTCGGACATCCACCGCCAGGAGCTACATCGGCAGCAACCATTCTC-3'



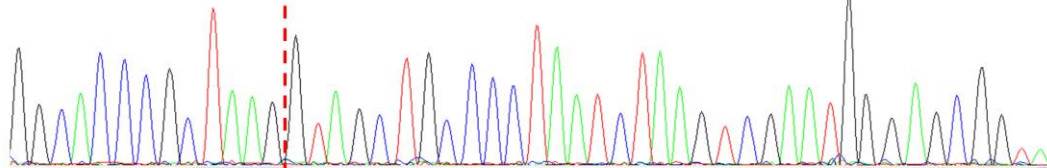
5'-CCTGGGGTCCATGTCCCCTTCCAACATGGAAGGGTATTCCAAGACCCAGTAT-3'



5'-AACCAAGTCCCCAGTGAAGACTTTGAACGTGCTCCTCAGAGTCCGACTCT-3'



5'-GGCACCCGCTAAGGTAGCTGCCCTAATCTAAGTCGAATGGGAGCGGT-3'



CAR1 Ex7終結点!

図28. 増幅したCAR2の塩基配列解析結果

ゲルから回収した増幅産物DNAをシーケンス解析を行い、NCBI Geneデータベースにある塩基配列と比較したところ、ラット下垂体において、CAR2が存在することが明らかになった。

3-3-2 下垂体発生過程における CAR 遺伝子の発現

本実験では、下垂体発生から成熟段階にわたる CAR 遺伝子の発現を確認するために下垂体の原基であるラトケ嚢形成期 (E13.5) から、生後 60 日齢までの下垂体組織の全 RNA を調製し、それらから cDNA を合成した。それらを用いて、CAR 遺伝子の二つアイソフォーム CAR1 と CAR2 (図 29) の発現量を定量的 Real-time PCR で測定した。その結果、ラトケ嚢が形成される E13.5 から、CAR1 と CAR2 二つアイソフォームの遺伝子発現は共に確認された。それらの量を、内部標準として用いた Tbp の量に対する相対量として算出すると、CAR1 の発現量は 0.14/Tbp、CAR2 は 2.0/Tbp であった。CAR1 と CAR2 の量比で見ると、CAR2 が CAR1 の 14 倍と高い値を示した。その後の発達の過程で両者の発現を見ると、下垂体における CAR 遺伝子の発現は成体まで維持し続け、CAR1 と CAR2 の発現変動パターンは類似していた。アイソフォーム間の量的関係でみると、CAR2 は一貫して CAR1 より高い発現で推移していた。胎仔期において、CAR1 と CAR2 の発現パターンには顕著な変化がなく、小さい範囲で変動していた。ところが、生後直後から、両者の発現は徐々に低下していた。生後直後の P5 では、前葉における CAR1 の発現量は 0.20/Tbp であり、CAR2 では 1.95/Tbp であった。ところが、成体 P60 になると、前葉における CAR1 は 0.13/Tbp であり、CAR2 は 0.97/Tbp となり、P5 に比べて CAR2 の減少がやや目立った。中・後葉では、P15 における CAR の発現がピークとなり (CAR1 は 0.65/Tbp, CAR2 は 4.16/Tbp)、その後減少しつつも、成体の P60 では、CAR1 が 0.36/Tbp、CAR2 は 1.80/Tbp となっており、前葉よりも高い発現レベルを示していた。

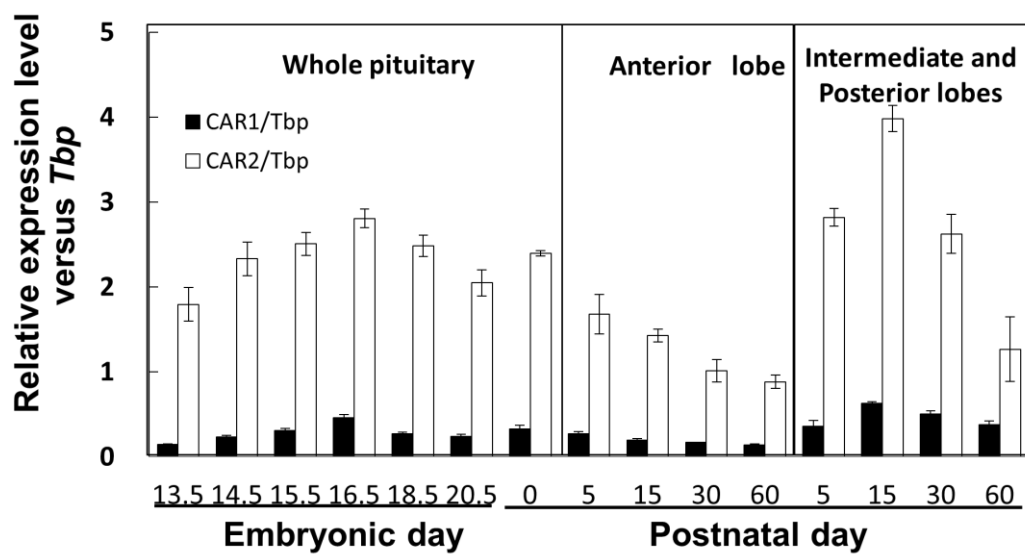


図29. ラット下垂体の発生過程におけるCAR1とCAR2の発現

SYBR greenを用いたReal-time PCRにより増幅したCAR cDNA量を測定し、同時に増幅したTbp遺伝子量を内部標準とした相対値を計算した。

3-3-3 ラット下垂体原基形成期における CAR の局在

本項では、下垂体組織における CAR の陽性細胞の局在と特定を目的として、免疫組織化学を用いた実験を行った。前章で述べたように、ラット下垂体を含む E12.5 の胎仔の whole body 凍結切片を用いて、CAR と幹・前駆細胞マーカー SOX2 抗体の 2 重免疫組織化学を確認したところ、外胚葉由来と考えられている腺下垂体において CAR の陽性シグナルが確認された (図 30)。この時期の将来腺下垂体原基となる陥入しつつある口腔上皮は、活発な細胞分裂により肥厚している。この口腔上皮のすべての細胞は SOX2 陽性であり、未分化な状態の細胞である。驚くべき事に、CAR の免疫シグナルは、将来 MCL になる口腔に面した一層細胞にのみに陽性であった (図 30)。CAR 陽性細胞が位置する MCL は、下垂体の発生成熟過程と生後の生涯を通じて多数の幹・前駆細胞マーカーが消失せずに発現し続けでおり、幹・前駆細胞が存在するニッチと考えられている。従って、ラトケ囊の形成前期に、CAR 陽性細胞は将来 MCL を形成する細胞層で限局していることが確認された。このことは、CAR 陽性細胞は下垂体の幹細胞あるいは、ニッチを形成する細胞である可能性を示唆している。

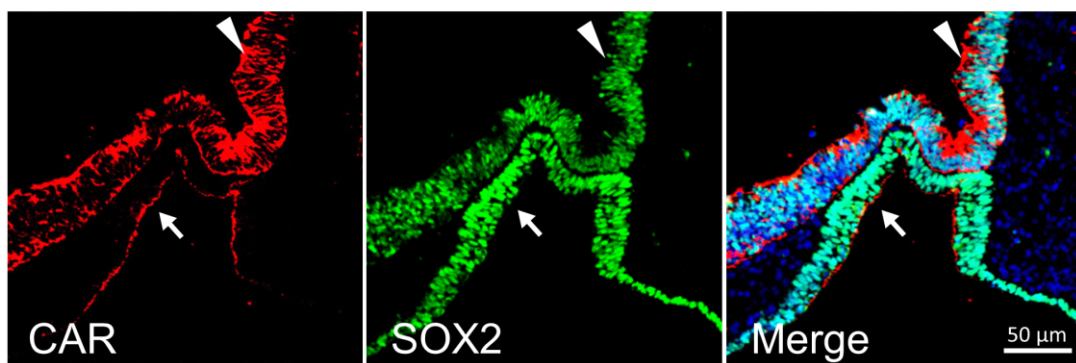


図30. 間脳と口腔上皮におけるCAR（赤）とSOX2（緑）の二重免疫組織化学

間脳では、すべての細胞はSOX2陽性で、それらはほぼCAR陽性を示している。将来、下垂体原基を形成する口腔上皮の陥入部分では、すべての細胞がSOX2陽性であるが、将来のMarginal Cell Layer (MCL)になる口腔に面する一層の細胞のみがCAR陽性である。矢頭：間脳、矢印：口腔上皮、赤（Cy3）：CAR抗体、緑（FITC）：SOX2抗体、青（DAPI）：細胞核。スケールバー=50μm。

3-3-4 下垂体胎仔期発生過程における CAR の局在

ラット胎仔期における下垂体 CAR 陽性細胞の局在分布の変化を調べるために、下垂体発生初期 (E11.5) から後期の E19.5 までの CAR の局在を組織化学的に解析した。口腔上皮が上方の脳側に陥入し始める E11.5 (図 31) では、CAR 陽性のシグナルは、腹側口腔に面している下層の細胞にしか観察されなかった。E13.5 になると、陥入する底部が閉じて口腔上皮から離脱することでラトケ嚢が出来上がる。その際に、将来に前葉となる部分と中葉となる部分の間に残る遺残腔に面している MCL の細胞にのみが CAR 陽性であった (図 31)。この時期では、すべての細胞は SOX2 を発現する未分化性を持つ細胞である。CAR の発現を重ねて考えると、図 31 の結果は、これら幹・前駆細胞はヘテロな細胞集団であり、局在場所によって異なる役割を担っている可能性を示唆している。ラトケ嚢はその後、未分化細胞の分化が進み、E16.5 頃から、ACTH を産生するホルモン細胞が出現し始める。さらに、この時期には Rostral tip と前葉の間の Atwell's recess (Daikoku et al. 1981; Nakakura et al. 2006) と呼ばれる位置に、下垂体の門脈形成が開始し、ラトケ嚢周辺に存在する間葉系細胞が、血管形成に伴いラトケ嚢内部に侵入することが確認されている (Yako et al. 未発表)。これに対して、MCL においては、CAR 陽性細胞の局在は維持されていた。さらに、前葉の実質層に、わずかではあるが、CAR 陽性反応が観察されるようになった (図 32)。その後、胎仔発生後期の E19.5 になると、全ての種類のホルモン産生細胞がほぼ揃い、下垂体の基本的な形態形成がほぼ完了する。この時期にあっても、MCL における CAR の局在は変わらずに存在していた (図 32)。前葉実質層の CAR 陽性細胞の散在も同様に確認された。

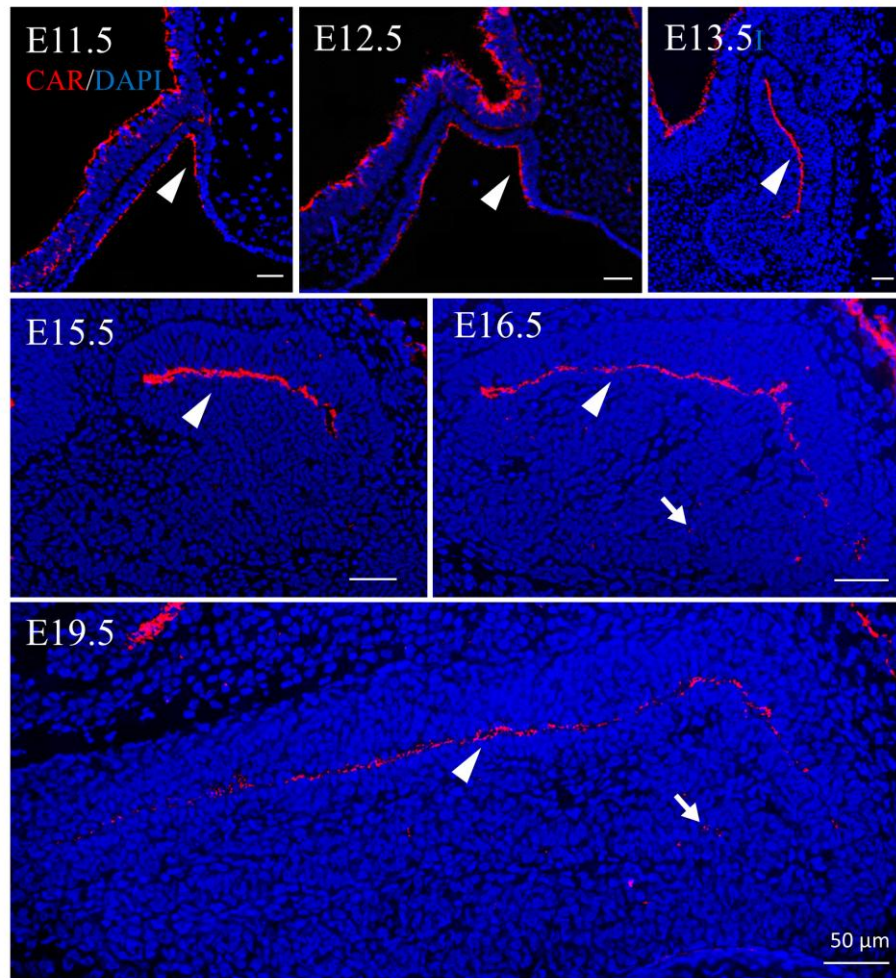


図31. 下垂体胎仔期発生過程におけるCARの局在

下垂体原基形成期(E11.5-E13.5)を始め、胎仔期発生過程(E13.5-E19.5)でも、CAR陽性細胞はMCLに局在(矢頭)している。E16.5から、実質層にもわずかにCAR陽性細胞が存在していることが確認される(矢印)。赤(Cy3)：CAR抗体、青(DAPI)：細胞核。スケールバー=50 μ m。

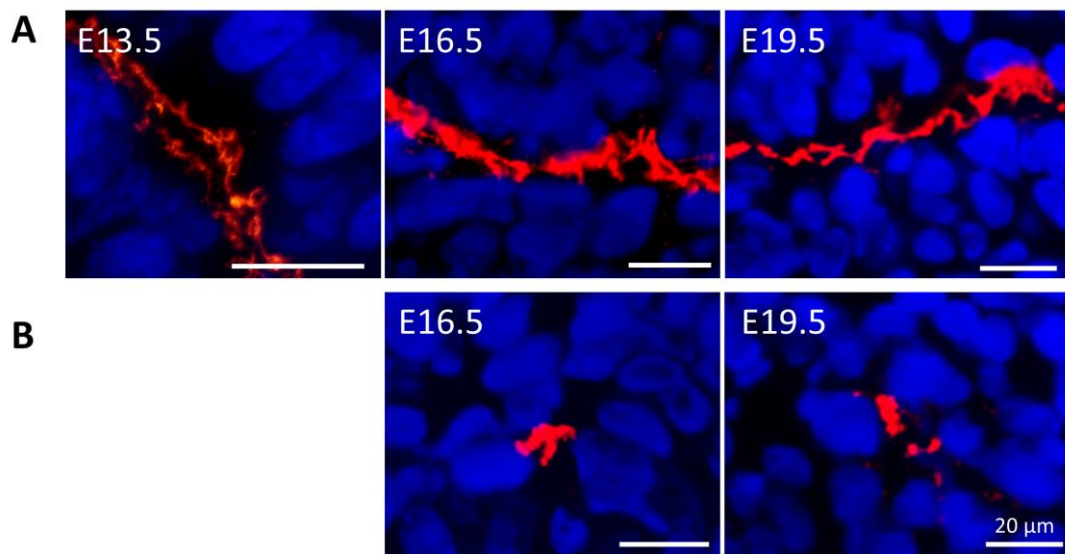


図32. 胎仔期下垂体におけるCARの細胞内局在

胎仔期下垂体のMCL(A)におけるCARは、ルーメンに面しているアピカル側にのみ局在している。実質層(B)にも、同じような極性を示し、クラスターの内側に向かってアピカル側（シスト側）に局在している。赤（Cy3）：CAR抗体、青（DAPI）：細胞核。スケールバー=20μm。

3-3-5 出生後における CAR の局在

生後の成長に従い、下垂体は著しい細胞増殖と分化の進行により成熟した組織となる。生後の下垂体を経時的に観察すると、生後直後から成体になるまで MCL における CAR の発現は胎仔期と変わらずに維持されていた。しかし、前葉側の CAR 陽性細胞の様相は、成長に伴い変化を見せていた。特に、注目されるのは、生後直前まで、MCL における単層の CAR 陽性細胞は、複層の CAR 陽性細胞からなる MCL zone を形成していたことである (図 33)。実質層に散在する CAR 陽性細胞のクラスターでは、その数が増加していた (図 33)。P15 になると、MCL zone の CAR 陽性細胞が徐々に減少する一方で、実質層の CAR 陽性細胞クラスターの数はさらに増加していた (図 33)。細胞内局在を見ると、アピカル側からバソラテラル側へと変化していた。その後、MCL zone と実質層の CAR 陽性細胞は共に減少し、成熟後下垂体 P60 では、実質層のクラスターの数が減少して、複層の MCL zone は消失してほぼ単層に戻り、同時に細胞内局在もアピカル側へと変化を示した (図 34)。

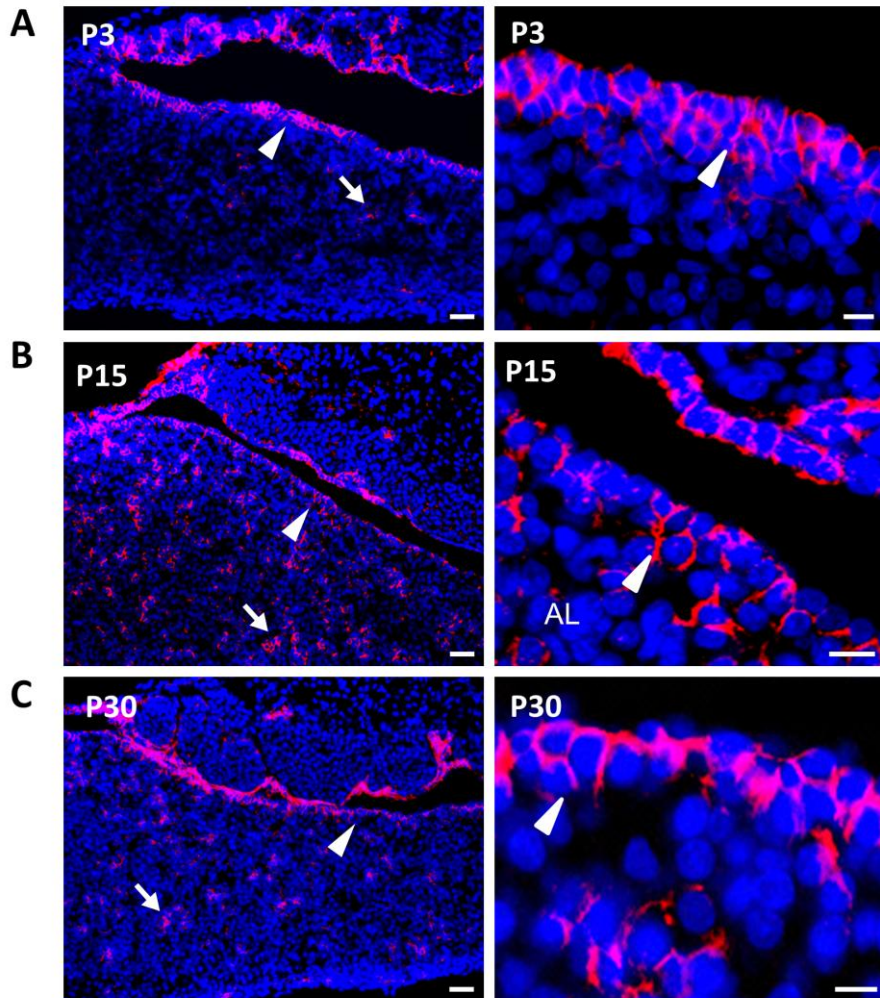


図33. 出生後下垂体発達過程におけるCARの局在

出生直後のMCLにおけるCAR陽性細胞は増加し、MCL zone(矢頭)を形成した。P15では、実質層のCAR陽性細胞クラスター(矢印)の数が増加し、細胞内における局在ではバソラテラル側に発現が観察された。その後、MCL zoneのCAR陽性細胞は徐々に減少した。P30以降、実質層のCAR陽性細胞も減少していた。A : P3、B : P15、C : P30(それぞれの右には拡大図を示した)。赤(Cy3) : CAR抗体、青(DAPI) : 細胞核。スケールバー=20 μ m。

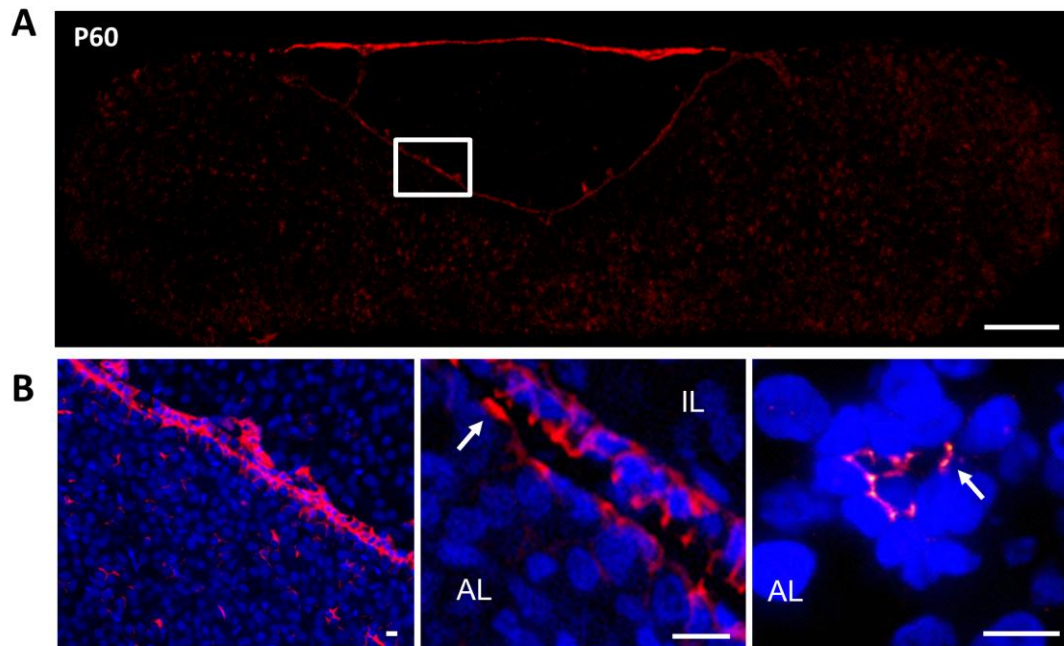


図34. 生後60日齢 (P60)におけるCARの局在

成熟後の下垂体P60では、実質層のCAR陽性細胞クラスターの数も減少した。複層になっていたMCL zoneは消失して、ほぼ単層になり、さらに、MCLと実質層の一部で局在様式はアピカル側に戻った(矢印) A : P60の全体像、 B : P60の拡大像。赤 (Cy3) : CAR抗体、青 (DAPI) : 細胞核。 A : スケールバー=300 μ m; B:スケールバー=20 μ m。

3-3-6 CAR 陽性細胞における CAR の細胞内極性について

第1章で述べたように、CAR1 と CAR2 の C 末端は異なる PDZ 結合ドメインを持つことが確認され、さらに、CAR の細胞局在様式にも関わっていることが報告されている。膜貫通型 CAR1 と CAR2 では、いずれも細胞膜に均一な分布ではなく、CAR1 は細胞のアピカル側に局在し、CAR2 はバソラテラルに局在するような極性があるとされている。下垂体における CAR の局在を観察すると、胎仔期では、MCL と実質層共に細胞のアピカル側に存在していた (図 32)。この細胞内局在様式は胎仔期を通じて変わらなかった。しかし、生後では、その局在は変化していた。生後直後では、CAR の局在はアピカル側とともにバソラテラル側にも確認された (図 33)。ところが、成熟すると、一部の細胞では CAR の局在様式が再びアピカル側に戻ったことが観察された (図 34)。しかし、下垂体における CAR1 と CAR2 の発現比は生涯を通じてほぼ一定であり、常に CAR2 が優位であった (図 29)。

3-3-7 CAR 陽性細胞における各種マーカータンパク質の発現解析

下垂体の幹・前駆細胞には、各種の特徴的タンパク質の発現が知られている。CAR 陽性細胞はの特性を解析するために、各ホルモン抗体、濾胞星状細胞マーカーである S100 β -GFP (トランスジェニックラットを使用)、幹・前駆細胞マーカーSOX2、上皮幹・前駆細胞マーカーE-cadherin、下垂体特異的転写因子 PROP1、分裂マーカーKI67 を用いて検討を行った。

3-3-7-1 CAR はホルモン産生細胞には存在しない

胎仔期後期 (E20.5) においては、ほぼすべてのホルモン産生細胞種が最終分化している。CAR と全種ホルモンの抗体カクテルとの共染色を行ったところ、すべてのホルモン産生細胞では、CAR の陽性反応は認められなかった。CAR の細胞内局在様式が変わった出生後 P3 で観察される各ホルモン産生細胞でも、CAR 陽性反応は存在しなかった。さらに、成体下垂体の免疫染色においても、CAR とホルモンは共存しないことが確認された (図 35)。

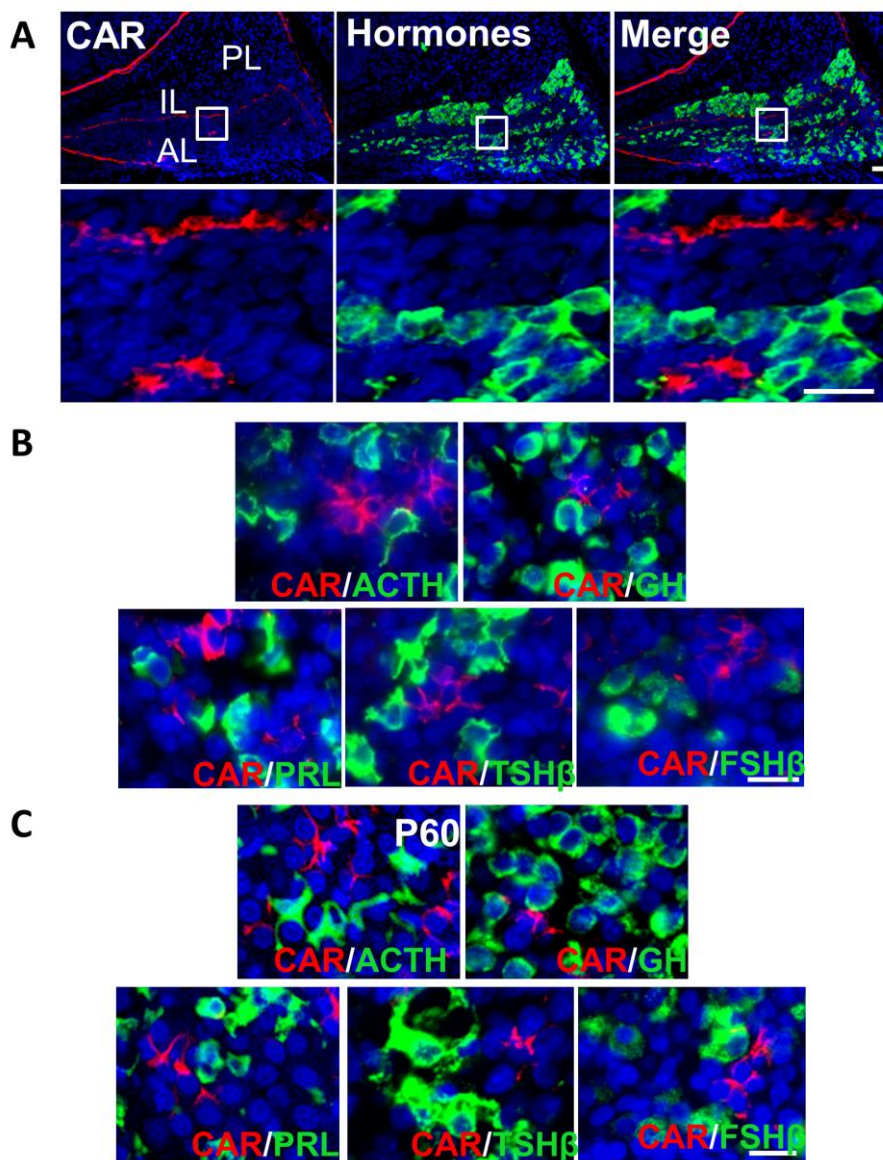


図35. CARと各種ホルモンの二重染色像

胎仔期から成熟期までのCARと各種ホルモンの二重染色を行うと、CARはホルモン産生細胞には存在していない。A：胎仔期後期20.5、B：出生後P3、C：成熟期P60。赤（Cy3）：CAR抗体、緑（FITC）：各ホルモン抗体、青（DAPI）：細胞核。スケールバー＝20 μ m。

3-3-7-2 CAR 陽性細胞の一部は S100 β を発現している濾胞星状細胞 (FS 細胞) でも発現している

S100 β は濾胞星状細胞マーカーとして知られている。S100 β -GFP トランスジェニックラットの下垂体を用いて、CAR と S100 β との共存を調べた。その結果、MCL の CAR 陽性細胞の一部に GFP の蛍光が確認された。一方、実質層では、クラスター状の S100 β -GFP 陽性細胞の一部で CAR の存在が確認された (図 36)。CAR 陽性細胞の一部は FS 細胞であることが明らかになった。

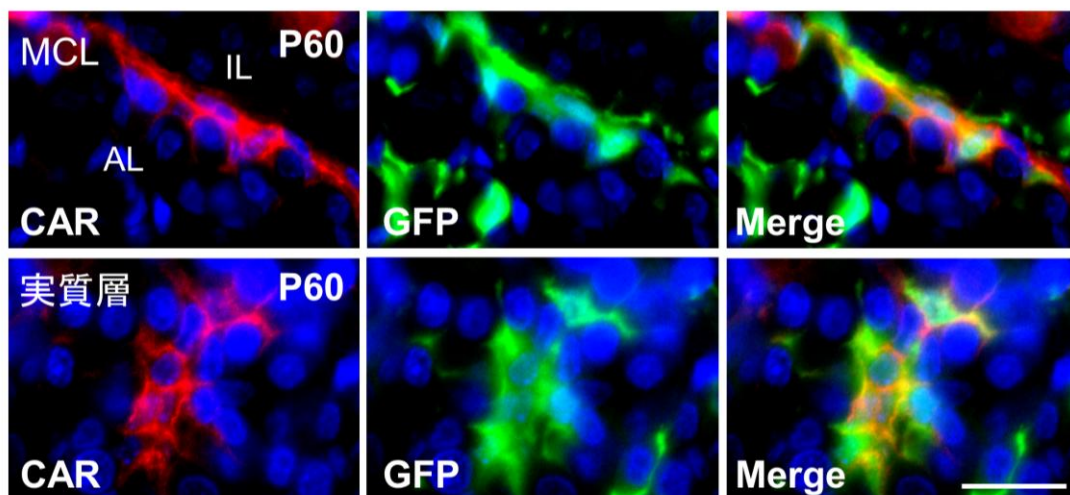


図36. 成熟下垂体におけるCARとS100 β -GFPの二重染色像

MCLと実質層におけるCAR陽性細胞の一部はS100 β を発現している濾胞星状細胞 (FS細胞) である。赤 (Cy3) : CAR抗体、緑 (FITC) : GFP抗体、青 (DAPI) : 細胞核。スケールバー=20 μ m。

3-3-7-3 CAR は幹・前駆細胞マーカーと共存する

CAR はホルモン産生細胞で発現しないことから、CAR 陽性細胞は幹・前駆細胞である可能性を念頭に、幹・前駆細胞マーカーである SOX2、上皮幹・前駆細胞マーカーである E-cadherin、下垂体特異的転写因子 PROP1 (Prophet of PIT1) の抗体を用いて免疫組織化学を行った。胎仔期 E11.5 の脳室方向へ陥入している口腔上皮は二層の細胞からなり、すべての細胞は SOX2 に陽性の幹・前駆細胞であった (図 37)。CAR の免疫組織化学では、陽性反応は口腔に面した下層の細胞層にのみ存在していた。従って、この時期の CAR 陽性細胞には、SOX2 が共存していることになる。E12.5 でも染色像は同様であり、複層になった口腔上皮の単層の細胞のみが CAR 陽性細胞であった (図 30)。E13.5 になると陥入した上皮の底部が閉じて将来の前葉と中葉となる部分がラトケ遺残腔を挟む様に位置するラトケ嚢となる。この時点で Rostral tip(将来の隆起葉)を含めてラトケ嚢を構成する全ての細胞は SOX2 陽性であり、さらに、E11.5 から発現を開始した下垂体特異的転写因子 PROP1 は Rostral tip を除くラトケ嚢の全ての細胞で陽性反応が確認された (Yoshida et al. 2009)。CAR は遺残腔に接する一層の細胞層 (MCL) のみに限局した陽性反応を示していた (図 38)。従って、この時期には全ての CAR 陽性細胞は、SOX2 と PROP1 を発現している特異な幹・前駆細胞とすることになる。この共存関係は E15.5 まで変わることはなかった。E16.5 以後は、MCL での存在とはべつに、わずかではあるが、実質層においても CAR 陽性細胞が確認され、胎仔後期 E20.5 でも同様であった (図 31、32)。この実質層における CAR 陽性細胞における SOX2 と E-cadherin の共存を確認したところ、MCL と同様の結果が観察された (図 37、38)。

生後直後の下垂体を観察すると、MCL 付近に CAR 陽性細胞の数が大幅に増

加し、これまでの一層の細胞が多層の構造、MCL zone を形成していた。SOX2、E-cadherin との共存を調べると、MCL の一層の CAR 陽性細胞層は胎仔期と変わらず SOX2 と E-cadherin に陽性であった (図 39、40)。しかし、MCL 以外の MCL zone の細胞は SOX2 陰性で CAR のみが陽性であった (図 39)。E-cadherin とは異なる共存関係が観察された。MCL zone の CAR 陽性細胞は E-cadherin とは一部を除いて共存関係をほぼ維持していた。しかし、一部で観察された E-cadherin の消失は、MCL zone 下層部の CAR 陽性細胞に特徴的であるとの傾向が見られた (図 40)。また、CAR 陽性細胞において PROP1 の消失が確認された細胞が存在した (図 39)。その後は、成熟に伴い、MCL zone の CAR 陽性細胞は減少し、P60 になると、ほぼ元の状態に戻って MCL の単層のみに存在するようになり、その細胞は SOX2 および E-cadherin とが共存していた (図 39、40)。一方、生後の実質層にも、クラスターを形成した CAR 陽性細胞が観察されたが、それらはほぼ SOX2 および E-cadherin のいずれも陽性であった (図 39、40)。

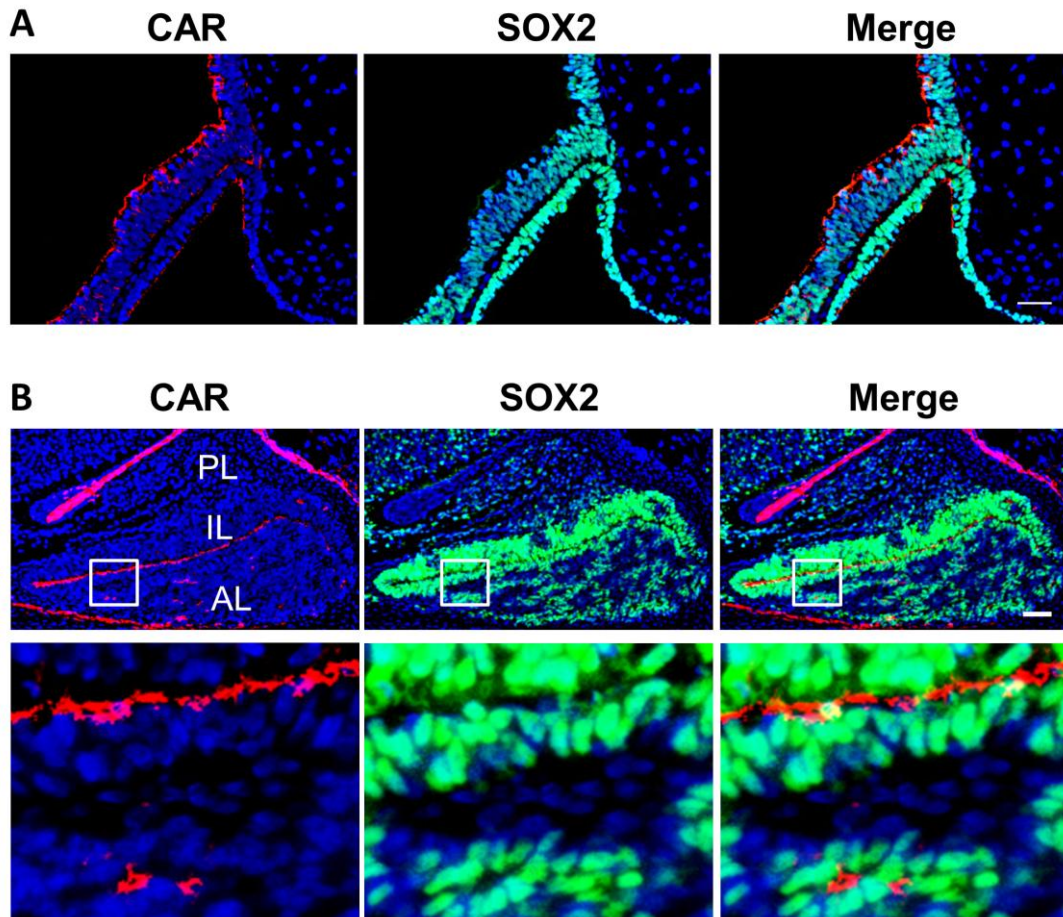
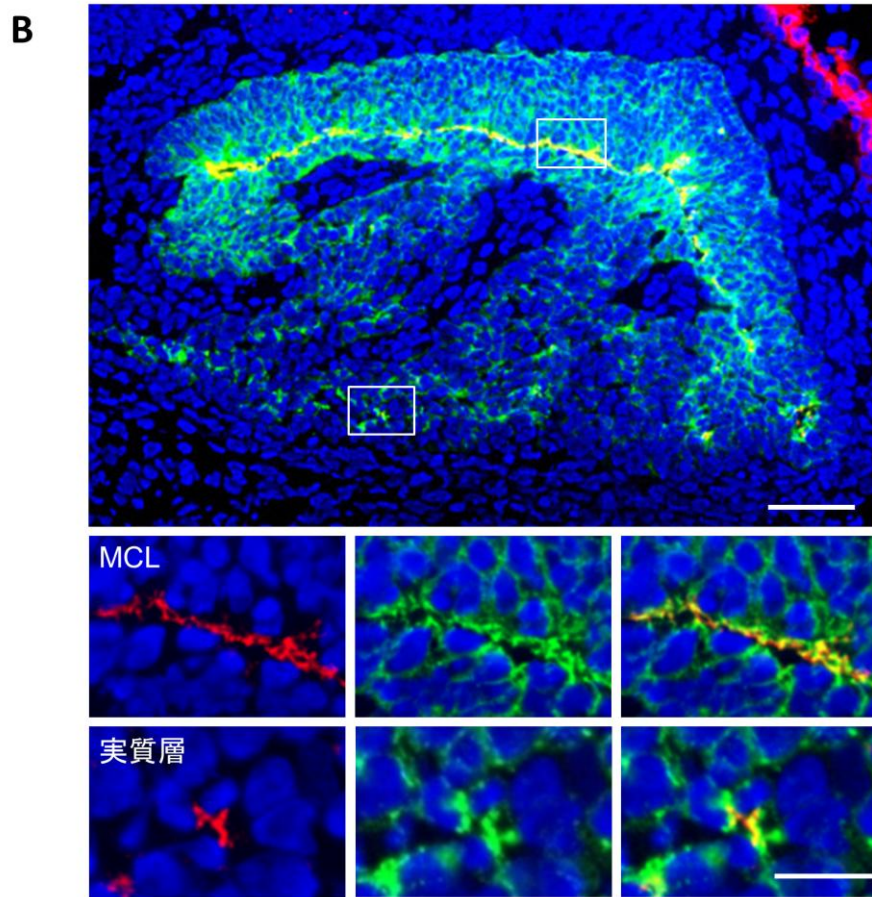
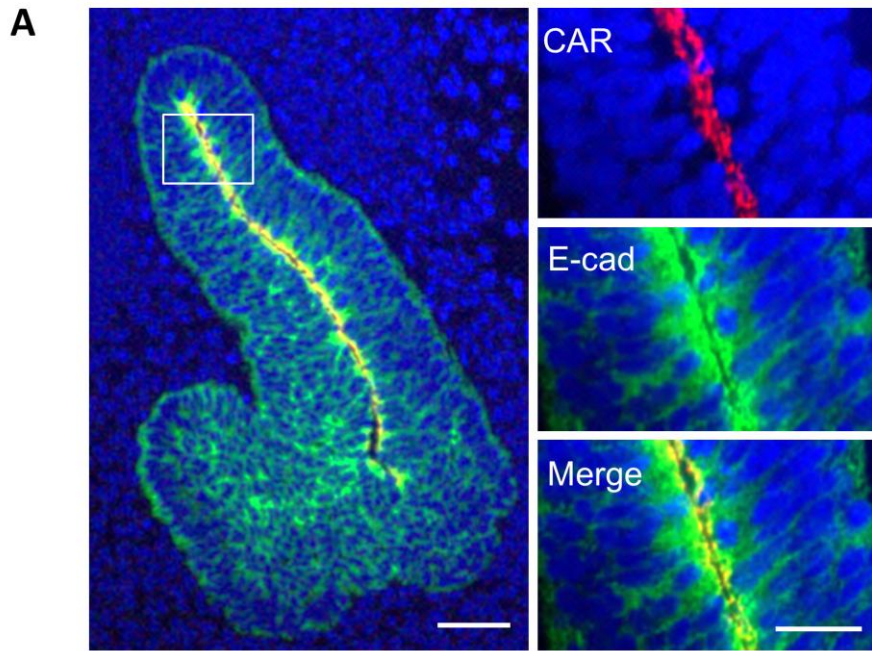


図37. 胎仔期下垂体におけるCARとSOX2の二重染色像

胎仔期MCLと実質層におけるCAR陽性細胞はすべてSOX2陽性である。A：下垂体原基形成期E11.5、B：胎仔後期E20.5。赤（Cy3）：CAR抗体、緑（FITC）：SOX2抗体、青（DAPI）：細胞核。スケールバー=50 μ m。



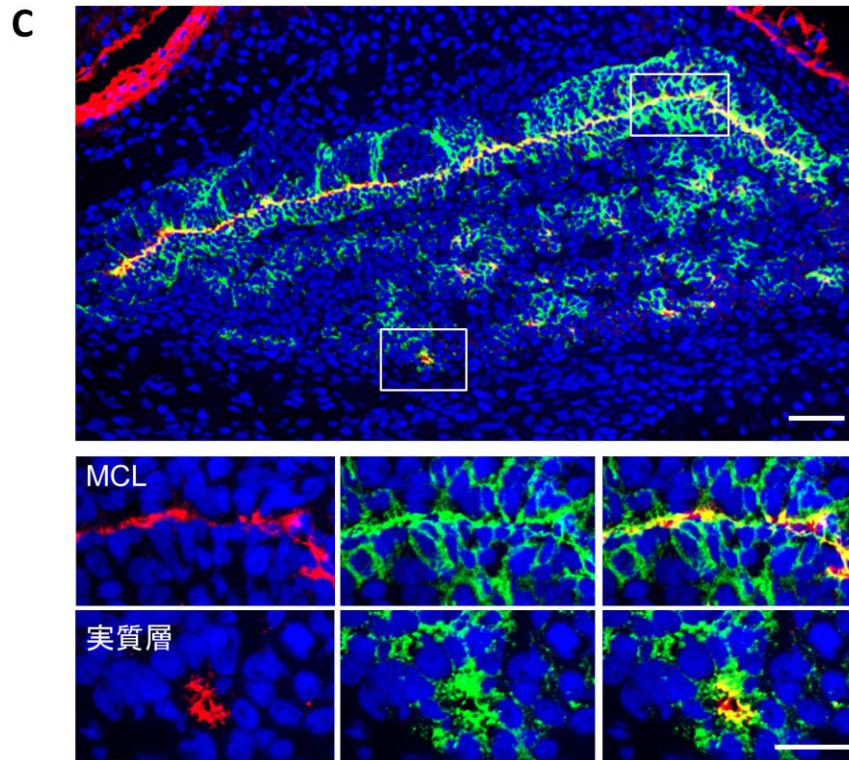


図38. 胎仔期下垂体におけるCARとE-cadherinの二重染色像

胎仔期のすべてのCAR陽性細胞はE-cadherinを発現している。A : 胎仔期E14.5、
 B : 胎仔期E16.5、C : 胎仔期E20.5。赤 (Cy3) : CAR抗体、緑 (FITC) : E-
 cadherin抗体、青 (DAPI) : 細胞核。スケールバー=20 μ m。

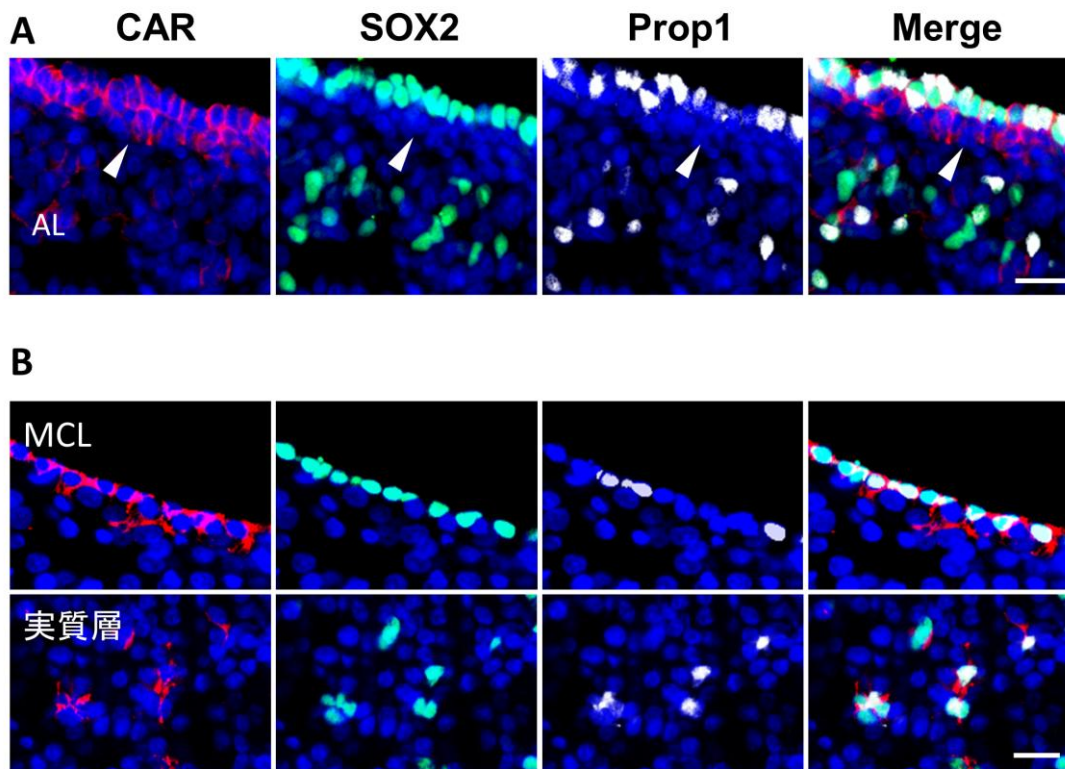


図39. 生後下垂体におけるCAR、SOX2とPROP1の三重染色像

生後MCLにおけるCAR陽性細胞はSOX2を発現し続ける。CAR陽性細胞には常にSOX2が共存し、その一部はPROP1陽性である。しかし、出生直後にMCL zoneに増加したCAR陽性細胞はSOX2とPROP1に陰性となった。A：出生直後P3、B：成熟期P60。赤（Cy3）：CAR抗体、緑（FITC）：SOX2抗体、白（Cy5）：PROP1抗体、青（DAPI）：細胞核。スケールバー=20 μ m。

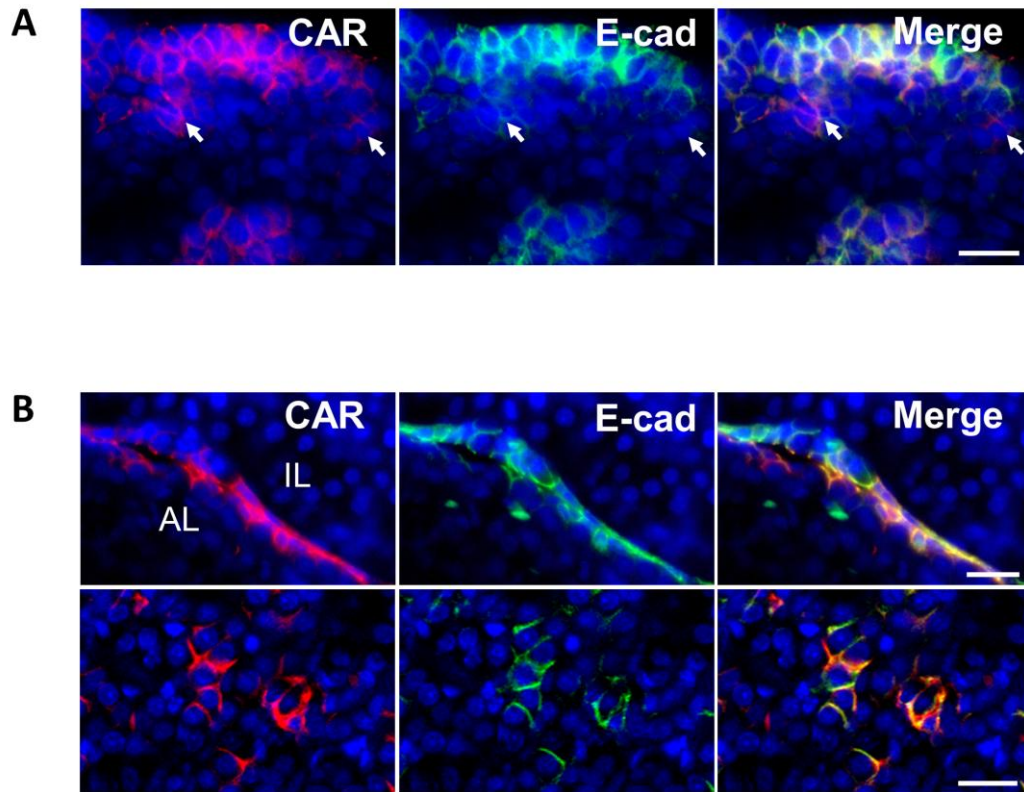


図40. 生後下垂体におけるCARとE-cadherinの二重染色像

生後、CARは、ほぼE-cadherinと共存している。しかし、出生直後のMCL zoneのCAR陽性細胞の下層部分ではE-cadherinが減少あるいは消失している(矢印)。A : 出生直後P3、B : 成熟期P60。赤 (Cy3) : CAR抗体、緑 (FITC) : E-cadherin抗体、青 (DAPI) : 細胞核。スケールバー=20 μ m。

3-3-7-4 CAR 陽性細胞の分裂能

CAR 陽性細胞の分裂能を調べるために、分裂マーカーKI67 を用いて共染色を行った。KI67 は細胞周期関連核タンパク質であり、分裂周期中のすべての細胞（G1、S、G2、M 期を含む）が陽性である。しかし、その存在量は M 期に最も高い。幹・前駆細胞は、生体内において長期間にわたり、未分化細胞のプールを維持するために自己複製能を持つことが知られている。一方、分化して成熟した体細胞は、主に生理機能を担っており、自己分裂は限定的であるとされている。

免疫組織化学の結果、E12.5 では複層の細胞層からなる口腔上皮におけるすべての細胞は KI67 陽性であり分裂サイクルにあると判断される (図 41)。つまり、CAR 陽性細胞も KI67 陽性であり、分裂サイクルにある事が分かった。成熟が進むと、胎仔後期 E20.5 には、分裂細胞の割合は減少していたが、MCL に存在する多くの細胞は KI67 陽性であった (図 41)。生後の P15 になると、MCL と実質層クラスターを形成した CAR 陽性細胞の一部は、KI67 陽性であることが確認され (図 41)、生後においても一部 CAR 陽性細胞は分裂能を持つことが明らかになった。

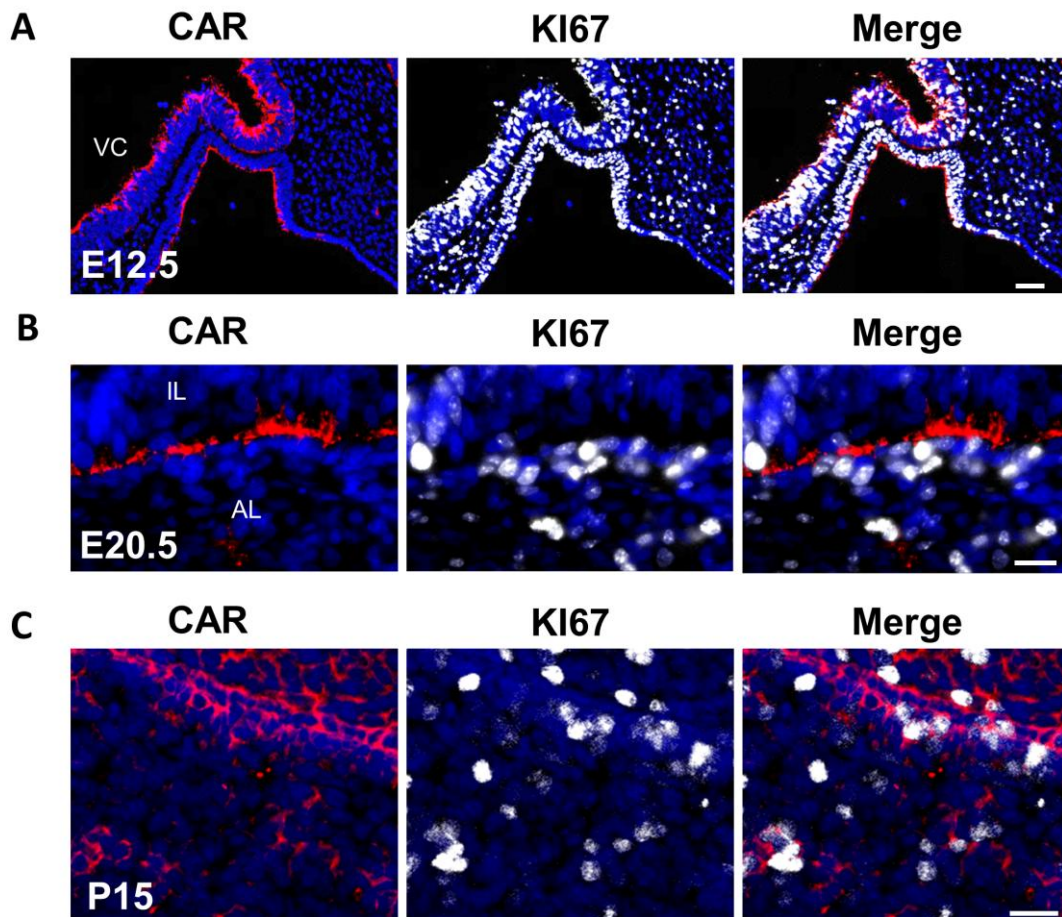


図41. 下垂体発生過程におけるCARとKI67の二重染色像

下垂体形成初期におけるCAR陽性細胞はすべてKI67を発現している分裂能を持つ細胞であった。胎仔期後期から生後にかけても分裂能を持つCAR陽性細胞が存在している。A : 下垂体原基形成期E12.5、B : 胎仔期後期E20.5、C : 幼仔期P15。赤 (Cy3) : CAR抗体、白 (Cy5) : KI67抗体、青 (DAPI) : 細胞核。スケールバー = 50 μ m。

3-3-7-5 生後直後の CAR 陽性細胞における EMT の可能性

胎仔期と生後における CAR 陽性細胞の極性と局在様式が変化し、さらに MCL zone では SOX2 と E-cadherin が減少・消失する CAR 陽性細胞が出現したことから、生後直後では、これらの CAR 陽性細胞で細胞形質のトランジション（形質転換）が起こっている可能性がある。間葉系幹・前駆細胞では、ほぼ SOX2 を発現してないため、こうした細胞形質のトランジションが上皮 - 間葉転移 EMT によるものかどうかを、間葉系細胞マーカーであるとともに EMT マーカーでもある Vimentin (Ivaska 2011) について共染色を行った。血管内皮細胞も Vimentin 陽性であるため、この血管内皮細胞に結合するマーカーとして用いられている Isolectin B4 を同時に使って EMT 細胞と区別した。

図 42 中に中空の矢頭（open arrowhead）で示した細胞は、Vimentin と Isolectin B4 両方に陽性であり血管内皮細胞と判定できるが、その細胞は CAR 陰性であった。矢頭で示したように、MCL における CAR 陽性細胞の中には、Vimentin 陽性の細胞がわずかに存在していた。一方、MCL zone に存在する CAR 陽性細胞の多くは Vimentin 陽性であり、Isolectin B4 陰性であることが確認された（図 42、矢印）。このことは MCL zone の CAR 陽性細胞は EMT の状態にある細胞と考えられる。MCL zone とは別に、実質層に観察された CAR 陽性細胞は Vimentin 陰性である細胞が多いことから（図 42）、実質層の CAR 陽性細胞は EMT が終了したものと考えられる。

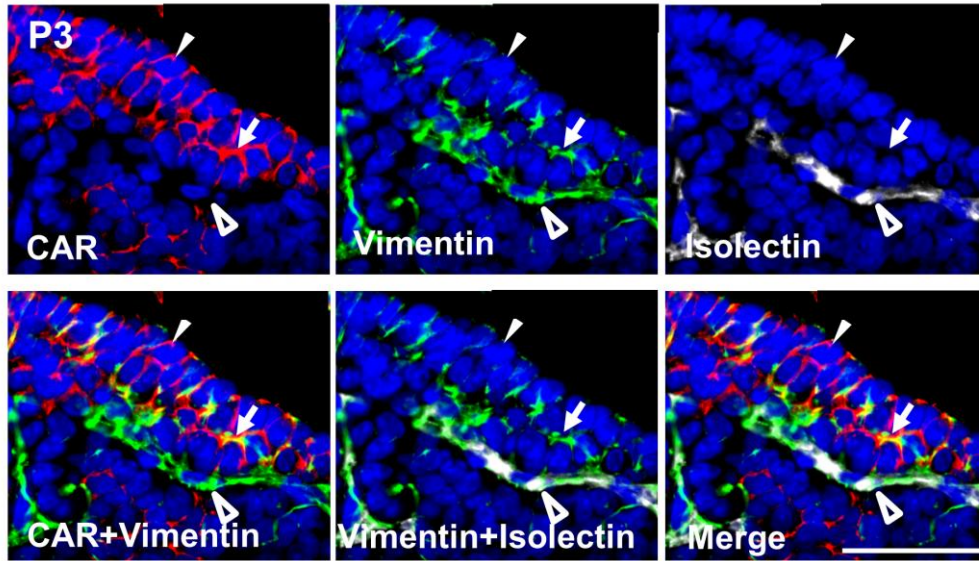


図42. 生後直後におけるCAR、VimentinとIsolectin B4の三重染色像

MCLにおけるCAR陽性細胞(矢頭)の一部はVimentinが陽性であるが、MCL zoneのCAR陽性細胞の多くはVimentin陽性である(矢印)。Vimentinを発現しているCAR陽性細胞はすべてIsolectin B4陰性である。Vimentin⁺/Isolectin B4⁺である内皮細胞(中空の矢頭)はCARを発現していない。赤(Cy3) : CAR抗体、白(Cy5) : Vimentin抗体、緑(Alexa Fluor 488) : Isolectin B4、青(DAPI) : 細胞核。スケールバー=50 μ m。

3-4 考察

3-4-1 CAR と幹細胞ニッチの関係

本研究は、下垂体の幹・前駆細胞とそれらの細胞を育む場であるニッチについて、膜受容体であり、幹・前駆細胞における存在が注目されつつあるウイルス受容体として同定された分子、CAR を指標として取り組んだ研究である。主として免疫組織化学を行って、下垂体における CAR の局在様式を解析したところ、CAR は下垂体の起源である口腔上皮 (E11.5) で既に発現しており、ラトケの遺残腔に面する一層の細胞層のみに局在していた。こうした実験結果から、CAR は下垂体の中で特異な場所に位置する細胞群で発現して、この組織の形成に機能していることが明らかになった。

発生初期の下垂体原基ラトケ嚢の特定の場所である MCL に局在する CAR 陽性細胞は、その後もその局在様式を持続していた。MCL は、以前から下垂体の幹・前駆細胞が存在する場所 (ニッチ) とされており、多数の幹・前駆細胞のマーカーに対する陽性反応を示す細胞の存在が報告されている (Yoshida et al. 2009; Yoshida et al. 2011)。特に、胎仔期初期 (E13.5) では、ホルモン産生細胞はまだ出現しておらず、全ての細胞は SOX2 と PROP1 に陽性を示す幹・前駆細胞であるが、CAR は MCL に存在する細胞のみに局在して存在していた。その後の発達期間でも、MCL における CAR 陽性細胞の局在は変わらず維持されていた。このことは、この時期の幹・前駆細胞群は、既に異なる細胞集団で構成されている事を示している。従って、組織形成において、幹・前駆細胞には、それぞれが局在する場所で、それぞれの細胞に課せられ、特定の役割を果たしていると解釈できる。

各ホルモン抗体との共染色では、下垂体の発生・成熟段階を通じて、CAR は最終分化したホルモン産生細胞には検出されず、SOX2、E-cadherin、PROP1 などに陽性を示す幹・前駆細胞に存在していた。このことから、CAR 陽性細胞は下垂体における幹・前駆細胞に属する細胞種であると判断できる。これらの幹・前駆細胞マーカーに対する染色像を注意深く観察すると、前葉と中葉のそれぞれの MCL では、CAR 陽性幹・前駆細胞が一層に並んで局在しており、一方の実質層においては、多数のクラスターを形成して散在していた。これらの 2 様の局在を示す CAR 陽性細胞は、種々の幹・前駆細胞マーカーとの共染色を行うと、複数種の共存関係が観察されることから、幹・前駆細胞としての形質が異なる細胞群が存在すると判断される。つまり、MCL に局在する細胞は自己増殖によりその細胞数を維持すると共に、一部は形式を転換させる EMT を介して実質層に CAR 陽性細胞を供給しながら、実質層のニッチの数を増やし、下垂体成長期のホルモン産生細胞の供給を行っていると推察される。今回、CAR を指標とする幹・前駆細胞の観察結果から、下垂体における幹・前駆細胞の維持と供給や、ホルモン産生細胞の補給についての機序の一端が明らかになった (図 43)。

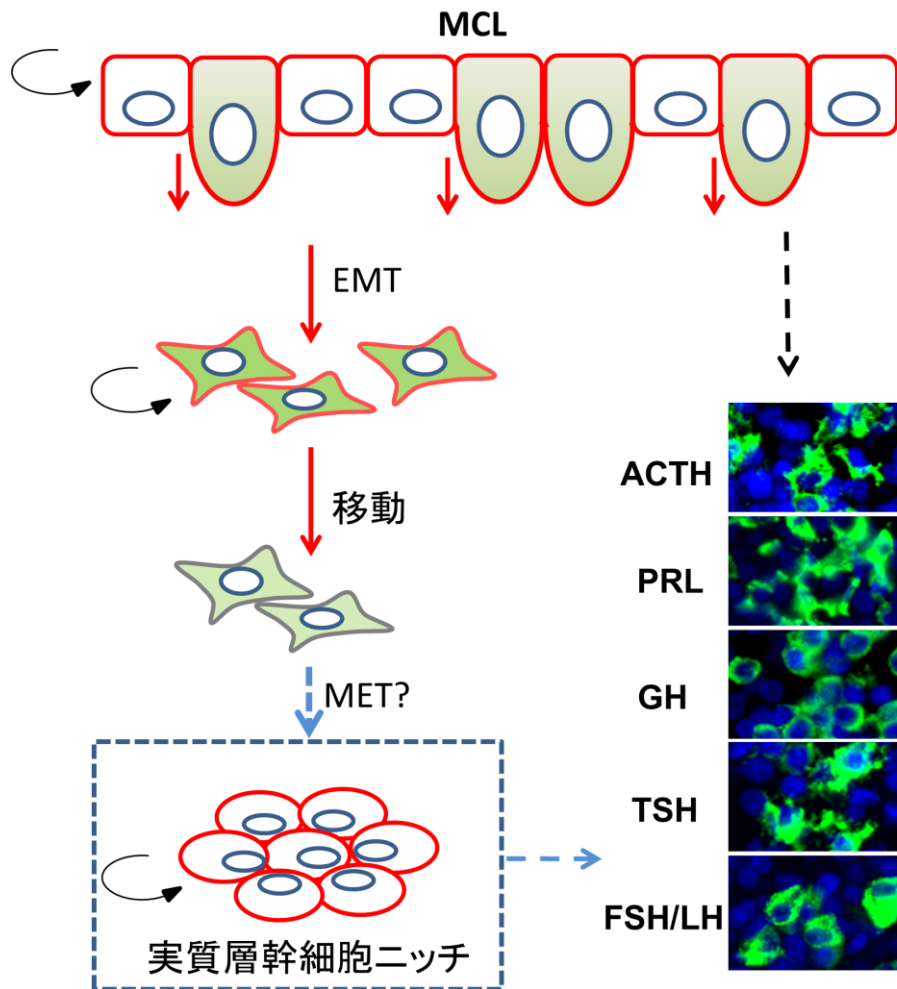


図43. CARと幹・未分化細胞、ニッチの関係の模式図

胎仔期MCLにおけるCAR陽性細胞は幹細胞性を維持しながら増殖している。生後直後には、自己複製と共に、上皮-間葉転移（Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT）により実質層に移行し、今度は間葉-上皮転移（Mesenchymal-Epithelial Transition, MET）により、新たな実質層幹細胞ニッチを形成する。

3-4-2 CAR によるニッチの形成

上皮組織では、組織固有の形態が、多くの細胞接着分子により形成されていることが知られている（図 44）。それらの細胞接着分子の結合様式には、ホモフィリック同一分子間結合、ヘテロフィリック異種分子間結合、リガンド架橋型結合という結合様式がある。上皮組織においては、主にホモフィリック結合が細胞間接着を担っている。上皮組織由来である下垂体では、接着はホモフィリック結合様式を介して、類似の性質を示す細胞の集団を形成することを示唆する報告がある(Kikuchi et al. 2007)。本研究の結果は、CAR が、ホモフィリック結合を介して幹・前駆細胞層やクラスターを形成し、分化能を持つ細胞を育むニッチ形成に機能していることを示唆している。特に興味深いことは、後述の EMT にも関連するが、単層の MCL を形成している CAR 陽性細胞ではアピカル側（ルーメン側）に CAR が局在しているが（図 32）、MCL zone の多層の細胞ではパララテラル（細胞の側面）にも CAR が観察された（図 33）。このことは、CAR 陽性細胞が多層を形成したり、細胞が移動するときに CAR が重要な働きをしている事を示している。MCL における単層の形成と多層の形成において CAR がどのような分子機序を介して機能しているのか、また、どのような細胞接着分子が関係しているかは、今後の検討課題である。

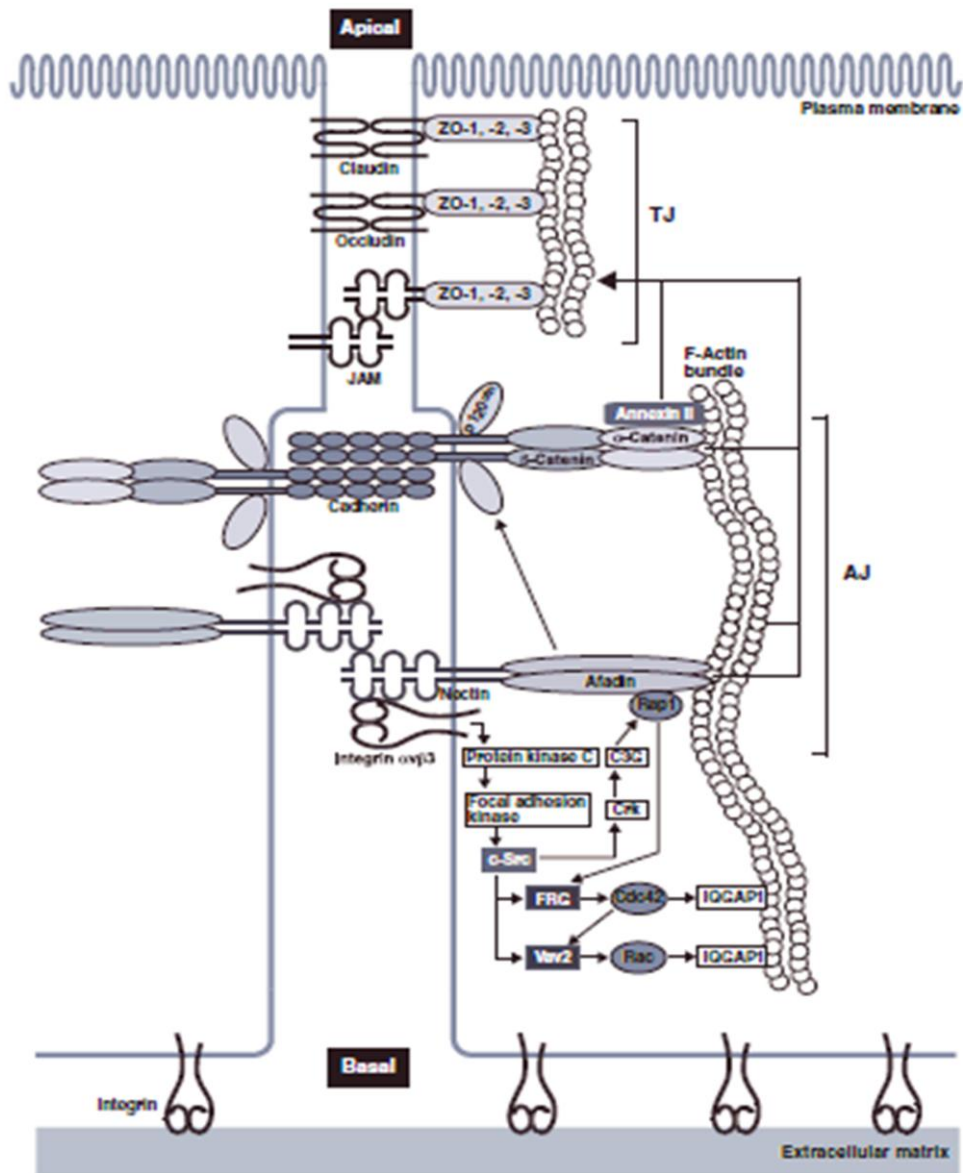


図44. 上皮組織の細胞接着機構

上皮組織では多くの接着分子が、細胞間接着、細胞基質間接着、あるいは細胞運動を制御している (Ogita et al., 2010)。

3-4-3 出生後の CAR 陽性細胞の役割について

CAR 陽性細胞の局在変化を見ると、胎仔期では CAR 陽性細胞はほぼ MCL に限局して存在していたが、出生後では陽性細胞の数は大幅に増加し、局在様式も変化していた。生後では、MCL 単層の局在が、複層からなる MCL zone を形成するように増殖し、さらに実質層ではクラスターの数が増加していた (図 33)。下垂体の発達の速度は一定ではなく、丁度この時期の下垂体は、出生後 7 日頃から起こす急激な発達期の前期にあることから、CAR 陽性細胞の MCL zone の形成や実質層のクラスター数の増加は生後の下垂体発達 (postnatal growth wave) に備えた、幹・前駆細胞ニッチの増殖と考えられる。その後、成体となり組織の形成が完成すると、CAR 陽性細胞数は減少し単層の MCL に戻り、同時に、実質層におけるクラスターの数も減少した。このことは、ホルモン産生細胞などへの分化・供給の需要の低下に応じていたと考えられる。以上の事は、CAR 陽性細胞が胎仔期と生後における分化や細胞供給の役割を担っている幹・前駆細胞であり、他の幹・前駆細胞マーカーに陽性を示す細胞とは異なる状態の細胞集団であると考えられる。

3-4-4 S100β が存在する CAR 陽性細胞について

本研究で、CAR 陽性細胞の一部の S100β 陽性を示す細胞が存在することが確認された (図 36)。下垂体には S100β と呼ぶタンパク質が存在する細胞が知られている。S100β は S100 ファミリーの 1 つであり、Ca²⁺結合タンパク質である。下垂体以外にも、大脳皮質のアストロサイト、脂肪細胞、軟骨細胞、精巣ライディッヒ細胞などでの発現が確認されている。多くの腫瘍にも見つかることか

ら腫瘍マーカーとされ、その機能が注目されている。しかし、S100 β ノックアウトマウスは顕著な欠損を見せず、機能の確定には至っていない(Nishiyama et al. 2002)。下垂体では、ホルモンを産生しない濾胞星状細胞にその存在が確認されたことで、以前からその機能が注目されてきた (Devnath and Inoue 2008; Vankelecom 2007a)。S100 β 陽性細胞には、支持細胞や貪食細胞といった様々な性質が報告されており (Devnath and Inoue 2008; Vankelecom 2007b)、現在では S100 β 陽性の細胞は複数の細胞種からなると考えるのが妥当であろう。我々の研究では、S100 β 陽性の細胞は、複数のマーカーを使った免疫組織化学により濾胞星状細胞の様な突起を持つ細胞ばかりでなく、幾つかのポピュレーションが存在している事を観察している(Yoshida et al. 2009; Yoshida et al. 2011)。一方、近年、S100 β 陽性の分化能に焦点を当てた研究が行われており、骨格筋細胞やホルモン産生細胞へと分化する事が報告されている(Mogi et al. 2004; Osuna et al. 2012)。また、幹・前駆細胞が持つ蛍光色素ヘキストを排出する能力を使って、幹・前駆細胞と他の分化の進んだ細胞をセルソーターで分離する技術が開発されている。その結果、ヘキスト量の少ない画分 Side Population (SP)が分離された(Goodell et al. 1996)。その細胞画分に発現する遺伝子を調べてみると、S100 β が高い発現を示していた。また、さらに SP 画分を細かく分画して得られた Non-Sca1^{high} 画分 (内皮系幹・前駆細胞で発現する stem cell antigen1(Sca1)の発現が低い細胞集団)には、S100 β が高発現していることが判った。Garcia-Lavandeira らは、GDNF family receptor alpha-2 (GFRA2 ; glycosylphosphatidylinositol(GPI)-linked cell surface receptor)に着目して下垂体の幹・前駆細胞を調べている(Garcia-Lavandeira et al. 2009)。この受容体は、神経細胞の生存と分化に機能しており、構造的も似ている、2 つの神経栄養因子、Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)と neurturin (NTN) の受容体である。この GFRA2 陽性細胞を計測してみると、その

43%は S100 陽性であった。また、S100 β 遺伝子プロモーターを蛍光タンパク質 GFP に連結したキメラ遺伝子を導入して作成したトランスジェニックラットが作製されている(Itakura et al. 2007)。この S100 β -GFP TG ラットを用いて解析したところ、S100 β 陽性細胞の約 85%が、SOX2 陽性或いは SOX2、PROP1 両方陽性であった(Yoshida et al. 2009; Yoshida et al. 2011)。さらに、下垂体の初代分散細胞の in vitro 培養を行い、S100 β 陽性細胞をリアルタイムに追跡観察すると、S100 β 陽性細胞の中にホルモンの産生が確認され、下垂体における幹・前駆細胞からホルモン産生細胞へと分化する機序の一部が確認された(Higuchi et al. 未発表)。こうした研究結果を総合して考察すると、S100 β 陽性細胞の一部は分化能を持つ細胞であり、しかも、S100 β 陽性細胞は主に出生後から観察されることから(Itakura et al. 2007)、この細胞の一部は成体下垂体における幹・前駆細胞であると考えられる。

3-4-5 CAR のアイソフォームとその局在特性と役割について

CAR 遺伝子(Cxadr)の転写産物からは、選択スプライシングにより生じる 2 種の mRNA から、CAR1 (Ex8 も持つ CAR^{Ex8}) と CAR2 (Ex7 で終わっている CAR^{Ex7}) というアイソフォームが生成する。いずれも、細胞膜内に PDZ 結合ドメインとよぶドメイン構造を持つが、そのアミノ酸配列は CAR1 と CAR2 で異なることが確認されている(図: 11)。その細胞内 PDZ 結合ドメインは、CAR の細胞膜上の局在様式と関連することが報告されている(Excoffon et al. 2010)。その報告によると、CAR1 は細胞のアピカル側に局在し、CAR2 は細胞のバソラテラル側に存在している。CAR1 については、分化した気道上皮細胞に低レベルであるが発現していることが報告されている(Excoffon et al. 2010)。CAR1 と CAR2 には、そ

それぞれ2つの細胞外ドメインを持つため、ホモフィリックな結合であっても、2つの細胞外の相互ドメイン間の組み合わせにより異なる細胞間結合が生成する (Bewley et al. 1999; Guo et al. 2009; Patzke et al. 2010; Verdino and Wilson 2011; Zen et al. 2005)。こうした結合部位の多様な組み合わせや細胞膜局在の特性により多様な機能を担っていることが考えられる。

Real-time PCR の結果から、下垂体においては、CAR1 と CAR2 両方が E13.5 から生後までに発現しているものの、CAR2 の発現が優勢であることが判った。しかも、生後における CAR2 mRNA の著しい変化は認められない。一方、免疫組織化学の結果は、胎仔期においては、CAR のシグナルは MCL と実質層のいずれの場所でも、細胞のアピカル側にしか検出されなかった。これに対してバソラテラルにおける局在は、生後の一時期でのみに発現が確認された。従って、上述した、CAR1 は細胞のアピカル側に局在し、CAR2 は細胞のバソラテラル側に存在しているとの報告(Excoffon et al. 2010)は、下垂体には当てはまらず、細胞や組織によって異なる局在の制御機構が存在している可能性がある。

上述したように本研究の結果は、生後直後に、CAR 陽性細胞の増加による多層からなる MCL zone 形成が起こると同時に、CAR 分子の局在変化が起きている事が判る。この変化が起こる時に、MCL zone における CAR 陽性細胞内では SOX2 と E-cadherin が減少あるいは消失する (図 39、40)。SOX2 の消失は分化の進行を、E-cadherin のそれは運動性の獲得を意味する。幹・前駆細胞が特定の場所で増殖し、組織全体に分布するためには、その過程で移動をする運動能を獲得する事が必要である。そのためには形態的、機能的変化を遂げて、運動能を示す間葉系様細胞になることが起こっており、上皮間葉転移 EMT が鍵となる。この転移過程では、細胞極性の消失や上皮細胞接着分子の減少、さらに間葉系マーカーの出現が見られる事が知られている(Mendez et al. 2010)。

3-4-6 生後直後に CAR 陽性細胞で上皮間葉転移 EMT が起こっている可能性について

生後直後の下垂体には MCL zone が形成され、その zone における CAR 陽性細胞は CAR の極性を変化させた上で、上皮接着分子である E-cadherin を減少させ、さらに、間葉系幹細胞では存在しない SOX2 も減少・消失している。その一方で、間葉細胞フィラメントである Vimentin が出現し始めることから、正に、CAR 陽性細胞が EMT を起こしていると判断出来る。このような時期においても、MCL を形成する一層の細胞層において Vimentin 陽性を示す細胞は極わずかであり（図 42）、MCL の CAR 陽性細胞は幹・前駆細胞のプール（ニッチ）を維持している。従って、MCL zone の Vimentin 陽性となった CAR 陽性細胞の多くは移動性を獲得して、前葉の実質層に移行して実質層の前葉の幹・前駆細胞ニッチを形成し、その場が維持されながら、ホルモン産生細胞の供給を行うことが考えられる。実質層の CAR 陽性細胞では、Vimentin 陽性細胞が大幅に減少していることから、実質層に定着する細胞は再び上皮様の細胞に変換している可能性がある。また、生後直後と幼仔期 P15 を比較すると、MCL zone の CAR 陽性細胞の増加は生後直後で顕著に観察されたが、実質層のクラスターの増加は P15 でピークになっており、MCL と実質層で示す変化の時期には差があることが判る（図 33）。実質層の増加時期が MCL zone の形成と比べて遅く観察されることは、実質層における CAR 陽性細胞とクラスターの増加は、MCL zone から移行することによる時間差と考えられる。その後も含めて MCL のニッチの幹・前駆細胞によって、実質層の幹・前駆細胞のプールが維持されていると考えられる。今後、MCL と実質層の幹・前駆細胞の違いや、それぞれの細胞の維持の仕組みの解明が待たれる。

3-4-7 結語

近年、新たなアプローチの開発と様々な新規因子の発見により、下垂体幹・前駆細胞による組織形成・維持機構の研究が多様な視点から積極的に解明されつつある。本論文では、新規因子 CAR の局在解析から、胎仔期から成体に存在する幹・前駆細胞の維持と幹細胞ニッチ形成機序の予想を展開した。下垂体における CAR 陽性細胞は、幹・前駆細胞の中でも特異な位置を占める細胞であると考えられ、発生過程で幹細胞のニッチ形成に関与している。さらに、CAR 陽性細胞は幹細胞性を維持しながら、成体の成長過程の要求に応じて細胞形質転換を起こすことにより前葉実質層に移行し、実質層における前葉の幹・前駆細胞ニッチを形成することで、成長速度に見合ったホルモン産生細胞の需要に対応すると予想される。今後は、こうした知見に基づいて、CAR 陽性細胞の特性を解析したり、ホルモン産生細胞への分化誘導実験を行うことによって、下垂体における幹・前駆細胞の正体を明らかにできるのではないだろうか。そして、この CAR を巡る研究から、幹細胞研究に新たな展開をもたらすことを期待している。

引用文献

- Anders M, Christian C, McMahon M, McCormick F, Korn WM (2003) Inhibition of the Raf/MEK/ERK pathway up-regulates expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cancer cells. *Cancer Res* 63:2088-2095
- Anders M, Vieth M, Rocken C, Ebert M, Pross M, Gretschel S, Schlag PM, Wiedenmann B, Kemmner W, Hocker M (2009) Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression. *Br J Cancer* 100:352-359
- Asaoka K, Tada M, Sawamura Y, Ikeda J, Abe H (2000) Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Neurosurg* 92:1002-1008
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17:126-140
- Barton ES, Forrest JC, Connolly JL, Chappell JD, Liu Y, Schnell FJ, Nusrat A, Parkos CA, Dermody TS (2001) Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104:441-451
- Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2:84-89
- Bazzoni G (2003) The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15:525-530
- Ben-Jonathan N, Peleg E, Hoefler MT (1983) Optimization of culture conditions for short-term pituitary cell culture. *Methods Enzymol* 103:249-257
- Berdougo E, Coleman H, Lee DH, Stainier DY, Yelon D (2003) Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development* 130:6121-6129
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997) Isolation of a

- common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323
- Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, Droguett G, Horwitz MS, Wickham T, Crowell RL, Finberg RW (1998) The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* 72:415-419
- Bewley MC, Springer K, Zhang YB, Freimuth P, Flanagan JM (1999) Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286:1579-1583
- Bowles KR, Gibson J, Wu J, Shaffer LG, Towbin JA, Bowles NE (1999) Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. *Hum Genet* 105:354-359
- Bruning A, Runnebaum IB (2003) CAR is a cell-cell adhesion protein in human cancer cells and is expressionally modulated by dexamethasone, TNFalpha, and TGFbeta. *Gene Ther* 10:198-205
- Bruning A, Stickeler E, Diederich D, Walz L, Rohleder H, Friese K, Runnebaum IB (2005) Coxsackie and adenovirus receptor promotes adenocarcinoma cell survival and is expressionally activated after transition from preneoplastic precursor lesions to invasive adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 11:4316-4320
- Bunting KD (2002) ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 20:11-20
- Candolfi M, Zaldivar V, Jaita G, Seilicovich A (2006) Anterior pituitary cell renewal during the estrous cycle. *Front Horm Res* 35:9-21
- 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* 20:3293-3307
- 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* 27:1182-1195
- 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* 146:3985-3998
- Chen JW, Ghosh R, Finberg RW, Bergelson JM (2003) Structure and chromosomal localization of the murine coxsackievirus and adenovirus

- receptor gene. *DNA Cell Biol* 22:253-259
- Chen T, Yuan D, Wei B, Jiang J, Kang J, Ling K, Gu Y, Li J, Xiao L, Pei G (2010) E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* 28:1315-1325
- Cheng CY, Mruk DD (2009) An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44:245-263
- Chihara M, Otsuka S, Ichii O, Hashimoto Y, Kon Y (2010) Molecular dynamics of the blood-testis barrier components during murine spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 77:630-639
- Chong JJ (2012) Cell therapy for left ventricular dysfunction: an overview for cardiac clinicians. *Heart Lung Circ* 21:532-542
- Chou YF, Chen HH, Eijpe M, Yabuuchi A, Chenoweth JG, Tesar P, Lu J, McKay RD, Geijsen N (2008) The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 135:449-461
- Chretien I, Marcuz A, Courtet M, Katevuo K, Vainio O, Heath JK, White SJ, Du Pasquier L (1998) CTX, a *Xenopus* thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. *Eur J Immunol* 28:4094-4104
- Chretien I, Robert J, Marcuz A, Garcia-Sanz JA, Courtet M, Du Pasquier L (1996) CTX, a novel molecule specifically expressed on the surface of cortical thymocytes in *Xenopus*. *Eur J Immunol* 26:780-791
- Chung Moh M, Hoon Lee L, Shen S (2005) Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 42:833-841
- Chung SK, Kim JY, Lim JY, Park YM, Hwang HY, Nam JH, Park SI (2011) Transcription factor Sp1 is involved in expressional regulation of coxsackie and adenovirus receptor in cancer cells. *J Biomed Biotechnol* 2011:636497
- Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15191-15196
- Coyne CB, Bergelson JM (2005) CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 57:869-882

- Coyne CB, Voelker T, Pichla SL, Bergelson JM (2004) The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J Biol Chem* 279:48079-48084
- 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* 44:103-116
- Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA (1983) Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 34:455-466
- Devnath S, Inoue K (2008) An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol* 20:687-691
- Dho SE, Jacob S, Wolting CD, French MB, Rohrschneider LR, McGlade CJ (1998) The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX. *J Biol Chem* 273:9179-9187
- Dorner AA, Wegmann F, Butz S, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Mack A, Nasdala I, August B, Westermann J, Rathjen FG, Vestweber D (2005) Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J of Cell Science* 118:3509-3521
- Du Pasquier L, Courtet M, Chretien I (1999) Duplication and MHC linkage of the CTX family of genes in *Xenopus* and in mammals. *Eur J Immunol* 29:1729-1739
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317
- Excoffon KJ, Gansemer ND, Mobily ME, Karp PH, Parekh KR, Zabner J (2010) Isoform-specific regulation and localization of the coxsackie and adenovirus receptor in human airway epithelia. *PLoS One* 5:e9909
- Excoffon KJ, Hruska-Hageman A, Klotz M, Traver GL, Zabner J (2004) A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J Cell Sci* 117:4401-4409
- 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* 105:2907-2912
- Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M,

- Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J, Poller W (1999) Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene therapy* 6:1520-1535
- Fechner H, Noutsias M, Tschoepe C, Hinze K, Wang X, Escher F, Pauschinger M, Dekkers D, Vetter R, Paul M, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W (2003) Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism. *Circulation* 107:876-882
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438
- Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Japon MA, Ryan AK, Blasco MA, Dieguez C, Malumbres M, Alvarez CV (2009) A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS One* 4:e4815
- Germain L, Blouin MJ, Marceau N (1988) Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res* 48:4909-18
- Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, Balordi F, Fishell G, Rosenfeld MG, Enikolopov G (2008) Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6332-6337
- 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* 183:1797-1806
- Guo YL, Bai R, Chen CX, Liu DQ, Liu Y, Zhang CY, Zen K (2009) Role of junctional adhesion molecule-like protein in mediating monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:75-83
- Hall MC, Li Y, Pong RC, Ely B, Sagalowsky AI, Hsieh JT (2000) The growth inhibitory effect of p21 adenovirus on human bladder cancer cells. *J Urol* 163:1033-1038
- Heath JK, White SJ, Johnstone CN, Catimel B, Simpson RJ, Moritz RL, Tu GF, Ji H, Whitehead RH, Groenen LC, Scott AM, Ritter G, Cohen L, Welt S, Old LJ, Nice EC, Burgess AW (1997) The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:469-474

- Hemmi S, Geertsen R, Mezzacasa A, Peter I, Dummer R (1998) The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther* 9:2363-2373
- Hemminki A, Kanerva A, Liu B, Wang M, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT (2003) Modulation of coxsackie-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression. *Cancer Res* 63:847-853
- Hirata K, Ishida T, Penta K, Rezaee M, Yang E, Wohlgemuth J, Quertermous T (2001) Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 276:16223-16231
- Hogers B, DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE (1999) Extraembryonic venous obstructions lead to cardiovascular malformations and can be embryolethal. *Cardiovasc Res* 41:87-99
- Honda T, Saitoh H, Masuko M, Katagiri-Abe T, Tominaga K, Kozakai I, Kobayashi K, Kumanishi T, Watanabe YG, Odani S, Kuwano R (2000) The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 77:19-28
- Hotta Y, Honda T, Naito M, Kuwano R (2003) Developmental distribution of coxsackie virus and adenovirus receptor localized in the nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 143:1-13
- Hsu KH, Lonberg-Holm K, Alstein B, Crowell RL (1988) A monoclonal antibody specific for the cellular receptor for the group B coxsackieviruses. *J Virol* 62:1647-1652
- Huang C, Sheikh F, Hollander M, Cai C, Becker D, Chu PH, Evans S, Chen J (2003) Embryonic atrial function is essential for mouse embryogenesis, cardiac morphogenesis and angiogenesis. *Development* 130:6111-6119
- Huang KC, Altinoz M, Wosik K, Larochelle N, Koty Z, Zhu L, Holland PC, Nalbantoglu J (2005) Impact of the coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on glioma cell growth and invasion: requirement for the C-terminal domain. *Int J Cancer* 113:738-745
- Hyafil F, Babinet C, Jacob F (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26:447-454
- Hyafil F, Morello D, Babinet C, Jacob F (1980) A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage

- stage embryos. *Cell* 21:927-934
- 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* 148:1518-1523
- Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, Hirono S, Okura Y, Kato K, Hotta Y, Honda T, Kuwano R, Aizawa Y (2000) Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 86:275-280
- Ivaska J (2011) Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small GTPases* 2:51-53
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34
- Johnstone CN, Tebbutt NC, Abud HE, White SJ, Stenvers KL, Hall NE, Cody SH, Whitehead RH, Catimel B, Nice EC, Burgess AW, Heath JK (2000) Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G500-510
- Kawamura K, Kikuyama S (1998) Morphogenesis of the hypothalamus and hypophysis: their association, dissociation and reassociation before and after "Rathke". *Arch Histol Cytol* 61:189-198
- Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, Lovell-Badge R, Steel KP, Cheah KS (2005) Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 434:1031-1035
- Kikuchi M, Yatabe M, Kouki T, Fujiwara K, Takigami S, Sakamoto A, Yashiro T (2007) Changes in E- and N-cadherin expression in developing rat adenohypophysis. *Anat Rec (Hoboken)* 290:486-490
- Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, Osaka H, Takano Y, Ruf W, Miyagi Y (2012) HIF2alpha-Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII-gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells. *Nucleic Acids Res* 40:5389-5401
- Kominami R, Yasutaka S, Taniguchi Y, Shinohara H (2003) Proliferating cells in the rat anterior pituitary during the postnatal period: immunoelectron microscopic observations using monoclonal anti-bromodeoxyuridine antibody. *Histochem Cell Biol* 120:223-233

- 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* 128:959-963
- Kremer EJ, Perricaudet M (1995) Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer. *Br Med Bull* 51:31-44
- Krylyshkina O, Chen J, Mebis L, Deneff C, Vankelecom H (2005) Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 146:2376-2387
- Lacher MD, Shiina M, Chang P, Keller D, Tiirikainen MI, Korn WM (2011) ZEB1 limits adenoviral infectability by transcriptionally repressing the coxsackie virus and adenovirus receptor. *Mol Cancer* 10:91
- Lacher MD, Tiirikainen MI, Saunier EF, Christian C, Anders M, Oft M, Balmain A, Akhurst RJ, Korn WM (2006) Transforming growth factor-beta receptor inhibition enhances adenoviral infectability of carcinoma cells via up-regulation of coxsackie and adenovirus receptor in conjunction with reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 66:1648-1657
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13883-13888
- Leatherman J (2013) Stem cells supporting other stem cells. *Front Genet* 4:257
- Leon RP, Hedlund T, Meech SJ, Li S, Schaack J, Hunger SP, Duke RC, DeGregori J (1998) Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13159-13164
- Lepore DA, Jokubaitis VJ, Simmons PJ, Roeszler KN, Rossi R, Bauer K, Thomas PQ (2006) A role for angiotensin-converting enzyme in the characterization, enrichment, and proliferation potential of adult murine pituitary colony-forming cells. *Stem Cells* 24:2382-2390
- Lepore DA, Roeszler K, Wagner J, Ross SA, Bauer K, Thomas PQ (2005) Identification and enrichment of colony-forming cells from the adult murine pituitary. *Exp Cell Res* 308:166-176
- Li D, Duan L, Freimuth P, O'Malley BW, Jr. (1999) Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5:4175-4181
- Lisewski U, Shi Y, Wrackmeyer U, Fischer R, Chen C, Schirdewan A, Juttner

- R, Rathjen F, Poller W, Radke MH, Gotthardt M (2008) The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J Exp Med* 205:2369-2379
- Liu J, Lu WG, Ye F, Cheng XD, Hong D, Hu Y, Chen HZ, Xie X (2010) Hes1/Hes5 gene inhibits differentiation via down-regulating Hash1 and promotes proliferation in cervical carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer* 20:1109-1016
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074-2077
- Lonberg-Holm K, Crowell RL, Philipson L (1976) Unrelated animal viruses share receptors. *Nature* 259:679-681
- Mapoles JE, Krah DL, Crowell RL (1985) Purification of a HeLa cell receptor protein for group B coxsackieviruses. *J Virol* 55:560-566
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127
- Mayr GA, Freimuth P (1997) A single locus on human chromosome 21 directs the expression of a receptor for adenovirus type 2 in mouse A9 cells. *J Virol* 71:412-418
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71
- Mendez MG, Kojima S, Goldman RD (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 24:1838-1851
- Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE (2005) Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16696-16700
- Milgrom-Hoffman M, Harrelson Z, Ferrara N, Zelzer E, Evans SM, Tzahor E (2011) The heart endocardium is derived from vascular endothelial progenitors. *Development* 138:4777-4787
- Miller CR, Buchsbaum DJ, Reynolds PN, Douglas JT, Gillespie GY, Mayo MS, Raben D, Curiel DT (1998) Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent

- gene transfer. *Cancer Res* 58:5738-5748
- Mirza M, Hreinsson J, Strand ML, Hovatta O, Soder O, Philipson L, Pettersson RF, Sollerbrant K (2006) Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is expressed in male germ cells and forms a complex with the differentiation factor JAM-C in mouse testis. *Exp Cell Res* 312:817-830
- Mirza M, Petersen C, Nordqvist K, Sollerbrant K (2007) Coxsackievirus and adenovirus receptor is up-regulated in migratory germ cells during passage of the blood-testis barrier. *Endocrinology* 148:5459-5469
- Mirza M, Raschperger E, Philipson L, Pettersson RF, Sollerbrant K (2005) The cell surface protein coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) directly associates with the Ligand-of-Numb Protein-X2 (LNx2). *Exp Cell Res* 309:110-120
- Mogi C, Miyai S, Nishimura Y, Fukuro H, Yokoyama K, Takaki A, Inoue K (2004) Differentiation of skeletal muscle from pituitary folliculo-stellate cells and endocrine progenitor cells. *Exp Cell Res* 292:288-294
- Moog-Lutz C, Cave-Riant F, Guibal FC, Breau MA, Di Gioia Y, Couraud PO, Cayre YE, Bourdoulous S, Lutz PG (2003) JAML, a novel protein with characteristics of a junctional adhesion molecule, is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Blood* 102:3371-3378
- Nakakura T, Yoshida M, Dohra H, Suzuki M, Tanaka S (2006) Gene expression of vascular endothelial growth factor-A in the pituitary during formation of the vascular system in the hypothalamic-pituitary axis of the rat. *Cell Tissue Res* 324:87-95
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441
- Nishiyama H, Takemura M, Takeda T, Itohara S (2002) Normal development of serotonergic neurons in mice lacking S100B. *Neurosci Lett* 321:49-52
- Nitou M, Ishikawa K, Shiojiri N (2000) Immunohistochemical analysis of development of desmin-positive hepatic stellate cells in mouse liver. *J Anat* 4:635-46.
- Nitou M, Sugiyama Y, Ishikawa K, Shiojiri N (2002) Purification of fetal mouse hepatoblasts by magnetic beads coated with monoclonal anti-e-cadherin antibodies and their in vitro culture. *Exp Cell Res*

279:330-343

- Nomura T, Goritz C, Catchpole T, Henkemeyer M, Frisen J (2010) EphB signaling controls lineage plasticity of adult neural stem cell niche cells. *Cell Stem Cell* 7:730-473
- Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W (2001) Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 104:275-280
- Ogasawara K, Nogami H, Tsuda MC, Gustafsson JA, Korach KS, Ogawa S, Harigaya T, Hisano S (2009) Hormonal regulation of prolactin cell development in the fetal pituitary gland of the mouse. *Endocrinology* 150:1061-1068
- Ogita H, Rikitake Y, Miyoshi J, Takai Y (2010) Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86:621-629
- Okegawa T, Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Zhou J, Hsieh JT (2000) The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res* 60:5031-5036
- Okegawa T, Pong RC, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI, Hsieh JT (2001) The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 61:6592-6600
- Osuna M, Sonobe Y, Itakura E, Devnath S, Kato T, Kato Y, Inoue K (2012) Differentiation capacity of native pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *J Endocrinol* 213:231-237
- Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA (2000) Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* 18:295-300
- Patzke C, Max KE, Behlke J, Schreiber J, Schmidt H, Dorner AA, Kroger S, Henning M, Otto A, Heinemann U, Rathjen FG (2010) The coxsackievirus-adenovirus receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:2897-2910

- Pawlikowski M (1999) Endocrine/paracrine control of pituitary cell proliferation and its involvement in pituitary tumorigenesis. *Pituitary* 1:251-256
- Pearson AS, Koch PE, Atkinson N, Xiong M, Finberg RW, Roth JA, Fang B (1999) Factors limiting adenovirus-mediated gene transfer into human lung and pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 5:4208-4213
- Rao MS (1999) Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat Rec* 257:137-148
- Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxe J (2004) CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 279:796-804
- Raschperger E, Thyberg J, Pettersson S, Philipson L, Fuxe J, Pettersson RF (2006) The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an *in vivo* marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Cell* 127:1566-1580
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710
- Rice DS, Northcutt GM, Kurschner C (2001) The Lnx family proteins function as molecular scaffolds for Numb family proteins. *Mol Cell Neurosci* 18:525-540
- Rizzoti K (2010) Adult pituitary progenitors/stem cells: from *in vitro* characterization to *in vivo* function. *Eur J Neurosci* 32:2053-2062
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ (1998) The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 72:7909-7915
- Seidman MA, Hogan SM, Wendland RL, Worgall S, Crystal RG, Leopold PL (2001) Variation in adenovirus receptor expression and adenovirus vector-mediated transgene expression at defined stages of the cell cycle. *Mol Ther* 4:13-21
- Serradifalco C, Catanese P, Rizzuto L, Cappello F, Puleio R, Barresi V, Nunnari CM, Zummo G, Di Felice V (2011) Embryonic and foetal Islet-1 positive cells in human hearts are also positive to c-Kit. *Eur J Histochem* 55:e41

- Shirasawa N, Yamaguchi S, Yoshimura F (1984) Granulated folliculo-stellate cells and growth hormone cells immunostained with anti-S 100 protein serum in the pituitary glands of the goat. *Cell Tissue Res* 237:7-14
- Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M (1983) The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35:631-638
- Sigal SH, Brill S, Reid LM, Zvibel I, Gupta S, Hixson D, Faris R, Holst PA (1994) Characterization and enrichment of fetal rat hepatoblasts by immunoadsorption ("panning") and fluorescence-activated cell sorting. *Hepatology*. 19:999-1006
- Sollerbrant K, Raschperger E, Mirza M, Engstrom U, Philipson L, Ljungdahl PO, Pettersson RF (2003) The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-numb protein-X (LNX). *J Biol Chem* 278:7439-7444
- Sun F, Li Y, Jia T, Ling Y, Liang L, Liu G, Chen H, Chen S (2012) Differential expression of coxsackievirus and adenovirus receptor on alveolar epithelial cells between fetal and adult mice determines their different susceptibility to coxsackievirus B infection. *Arch Virol* 157:1101-1111
- Suzu S, Hayashi Y, Harumi T, Nomaguchi K, Yamada M, Hayasawa H, Motoyoshi K (2002) Molecular cloning of a novel immunoglobulin superfamily gene preferentially expressed by brain and testis. *Biochem Biophys Res Commun* 296:1215-1221
- Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M (2002) Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol* 17:994-1000
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676
- Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T, Miyajima A (2003) Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 116:1775-1786
- Tashiro K, Kawabata K, Inamura M, Takayama K, Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H (2010) Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* 12:501-507

- Thoelen I, Magnusson C, Tagerud S, Polacek C, Lindberg M, Van Ranst M (2001) Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 287:216-222
- Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, Abagyan R, Frisen J, Philipson L (2000) Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res* 255:47-55
- Tomko RP, Xu R, Philipson L (1997) HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3352-3356
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99-103
- Van Eyken P, Sciot R, Desmet V (1988) Intrahepatic bile duct development in the rat: a cytokeratin-immunohistochemical study. *Lab Invest* 59:52-9.
- van Raaij MJ, Chouin E, van der Zandt H, Bergelson JM, Cusack S (2000) Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure* 8:1147-1155
- van't Hof W, Crystal RG (2002) Fatty acid modification of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Virol* 76:6382-6386
- Vankelecom H (2007a) Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell. *Semin Cell Dev Biol* 18:559-570
- Vankelecom H (2007b) Stem cells in the postnatal pituitary? *Neuroendocrinology* 85:110-130
- Verdino P, Wilson IA (2011) JAML and CAR: Two more players in T-cell activation. *Cell Cycle* 10:1341-1342
- Vincent T, Pettersson RF, Crystal RG, Leopold PL (2004) cdownregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells. *J Virol* 78:8047-8058
- Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, Tanimura Y, Tsuchiyama K, Kikuchi T, Goda M, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Dezawa M (2011) Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:9875-9880
- Wang X, Bergelson JM (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor

- cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol* 73:2559-2562
- Weber C, Fraemohs L, Dejana E (2007) The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:467-477
- Wegner M (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27:1409-1420
- Witherden DA, Verdino P, Rieder SE, Garijo O, Mills RE, Teyton L, Fischer WH, Wilson IA, Havran WL (2010) The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gammadelta T cell activation. *Science* 329:1205-1210
- Yajima T, Ochiai H, Uchiyama T, Takano N, Shibahara T, Azuma T (2009) Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho-1-N-1. *Int J Oncol* 35:273-280
- Yako H, Kato T, Yoshida S, Higuchi M, Chen M, Kanno N, Cai L-Y, Hiroki U, Kato Y (2013) Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary just before birth. *Cell Tissue Res* 354:837-847
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-6636
- Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai L-Y, Nakayama M, Kato Y (2009) PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochem Biophys Res Commun* 385:11-15
- Yoshida S, Kato T, Yako H, Susa T, Cai L-Y, 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* 23:933-943.
- Zen K, Liu Y, McCall IC, Wu T, Lee W, Babbin BA, Nusrat A, Parkos CA (2005) Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. *Mol Biol Cell* 16:2694-2703
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP (2001)

The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7:1028-1034

Zhu X, Lin CR, Prefontaine GG, Tollkuhn J, Rosenfeld MG (2005) Genetic control of pituitary development and hypopituitarism. *Curr Opin Genet Dev* 15:332-340

加藤幸雄, 石川晶雄, 加藤たか子 (2009) 下垂体の発生分化とホルモン遺伝子制御のシグナル・転写因子ネットワーク. *明治大学農学部研究報告* 59:21-30

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導教授を担当して頂いた明治大学農学部生命科学科・遺伝情報制御研究室の加藤幸雄教授と加藤たか子博士から、終始懇篤なご指導と激励を賜りましたこと、心より深く感謝申し上げます。

本研究に用いた S100 β トランスジェニックラットを提供していただ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埼玉大学名誉教授に感謝致します。また、明治大学に在籍中、研究に関するご助言、実験に関するご指導、および実験機材の協力を頂いた、細胞情報制御学研究室の戸村秀明教授、動物生理学研究室の故太田昭彦准教授、プロテオミクス研究室紀藤圭治講師をはじめ、所属研究室の皆様に感謝致します。

さらに、自治医科大学医学部・解剖学講座屋代隆教授、菊池元史教授、藤原研講師、塚田岳大助教、杏林大学保健学部解剖学・細胞生物学研究室の堀口幸太郎講師、東京大学獣医学・獣医繁殖育種学の前多敬一郎教授、名古屋大学生命農学研究科の東村博子教授と研究室の皆様、帝京大学医学部・解剖学講座の中倉敬助教、をはじめ多くの方々の御援助・御協力に深く御礼申し上げます。

学位論文審査において、ご指導とご助言を頂いた渡辺寛人教授、堀口幸太郎講師に感謝申し上げます。

所属研究室の先輩であり、現中国・無錫婦幼保険病因生殖センター・副センター長の蔡立義博士には、日本への留学の機会と研究の開始において多大のご尽力をいただいたこと、さらに、研究を進める過程においても生活面も含めて種々のご協力、ご支援や有益なご助言を頂き、深く感謝の意を表します。また、生活面で終始、励まし支えて頂いた呂紅氏に感謝申しあげます。

そして、実験技術、知識をご指導してくださいました諸先輩と後輩の方々、

樋口雅司氏博士、諏佐崇生博士、吉田彩舟氏、八子英司氏、三ッ石英司氏、菅野尚子氏、津田光芳氏、関田雅世氏、渋谷汐里氏、上春浩貴氏をはじめ遺伝情報制御研究室のご協力を頂いた皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げ、謝辞にかえさせていただきます。

最後に、日本にいる長い間に、研究から生活面まで支えて頂いた加藤幸雄先生と加藤たか子先生に深く御礼申し上げます。