

# 下垂体幹・前駆細胞を育むニッチを制御するephrin ／Ephシグナル分子の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2015-08-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉田, 彩舟 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/17504">http://hdl.handle.net/10291/17504</a>

明治大学大学院 農学研究科

2014年度

博士学位請求論文

下垂体幹・前駆細胞を育むニッチを制御する ephrin/Eph  
シグナル分子の解析

A study on ephrin/Eph signal molecules in the pituitary  
stem/progenitor cell niches

学位請求者 生命科学専攻

吉田 彩舟

## 目次

第1章 序論	5
1-1 はじめに	5
1-2 下垂体	5
1-3 下垂体の発生と成長因子	8
1-4 ホルモン産生細胞の分化と転写因子	11
1-5 生理状態の変化に伴う下垂体ホルモン産生細胞数の変化	14
1-6 下垂体の幹・前駆細胞とニッチの特徴	16
1-6-1 幹細胞	16
1-6-2 幹・前駆細胞ニッチ	18
1-6-3 下垂体の幹・前駆細胞とニッチ	23
1-6-3-1 Side Population (SP) 細胞	23
1-6-3-2 SOX2 陽性細胞群	26
1-6-3-3 濾胞星状細胞 (FS 細胞 : Folliculo-Stellate Cell)	30
1-6-3-4 <i>Nestin-Cre</i> マウス解析による胎生幹細胞と成体幹細胞説	33
1-6-3-5 Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) 陽性細胞と 2 様のニッチの形成機序	36
1-7 下垂体幹・前駆細胞の質的な変化と、細胞供給機構の変化	40
1-8 ephrin/Eph receptor (Eph) シグナル	44
1-8-1 ephrin と Eph の構造と対合性	44
1-8-2 ephrin/Eph シグナルの活性機序	47
1-8-3 ephrin/Eph シグナリング	51
1-8-4 細胞膜受容体との相互作用	54

1-8-5 ephrin/Eph シグナルと組織の領域化 .....	54
1-8-5-1 ロンボメア形成と Repulsive Guidance .....	54
1-8-5-2 血管新生と Attractive Guidance .....	57
1-8-6 ephrin-B とその対合 Eph 分子による幹細胞ニッチの制御 .....	59
1-8-6-1 腸管ニッチ .....	59
1-8-6-2 Subventricular zone (SVZ) .....	64
1-9 下垂体幹・前駆細胞ニッチに関する本研究の課題 .....	67
第 2 章 下垂体幹・前駆細胞ニッチで機能する B class ephrin/Eph シグナル分子の探索とその制御機構 .....	68
2-1 緒言 .....	68
2-2 材料および実験方法 .....	69
2-2-1 試料動物 .....	69
2-2-2 RNA 調製と cDNA Library の合成 .....	69
2-2-3 Real-time PCR .....	69
2-2-4 リコンビナント ephrin-B2 発現ベクターの構築 .....	73
2-2-5 リコンビナント ephrin-B2 タンパク質の精製と SDS-PAGE .....	73
2-2-6 抗 ephrin-B2 抗体の吸収実験 .....	76
2-2-7 蛍光免疫組織化学 .....	76
2-2-7-1 エタノール固定 .....	78
2-2-7-2 4% パラホルムアルデヒド固定 .....	78
2-2-7-3 HOPE 固定パラフィン切片 .....	78
2-2-7-4 HOPE 固定凍結切片 .....	79



2-2-7-5	蛍光免疫染色	.....	79
2-2-8	<i>in situ</i> hybridization	.....	82
2-3	結果	.....	85
2-3-1	下垂体における ephrin-B とその対合 Eph 分子の遺伝子発現解析	..	85
2-3-2	下垂体における ephrin-B1 ならびに B2 の局在解析	.....	87
2-3-3	抗 ephrin-B2 抗体の特異性評価	.....	90
2-3-4	下垂体発生過程における <i>ephrin-B2</i> 遺伝子の発現解析	.....	93
2-3-5	下垂体発生過程における ephrin-B2 タンパク質の局在解析	.....	95
2-3-6	成体下垂体における ephrin-B2 陽性細胞の特性解析	.....	98
2-3-6-1	ホルモン産生細胞ならびに S100 $\beta$ 陽性細胞における ephrin-B2 の局在解析	.....	98
2-3-6-2	幹・前駆細胞における ephrin-B2 の局在解析	.....	100
2-3-6-3	前駆細胞における ephrin-B2 の局在解析	.....	104
2-3-7	成体下垂体幹・前駆細胞ニッチで発現する ephrin-B2 対合分子 の探索	.....	106
2-3-8	成体下垂体幹・前駆細胞ニッチにおける ephrin-B2/EphB3 の存在様式	.....	111
2-3-9	生後直後の下垂体における ephrin-B2/EphB3 の存在様式	.....	113
2-3-10	生後直後の下垂体における ephrin-B2 と trans-interaction を形成する Eph の同定	.....	116
2-4	考察	.....	122
2-4-1	ephrin/Eph シグナルと下垂体の組織形成に関して	.....	122
2-4-2	下垂体幹・前駆細胞ニッチ内部における ephrin-B2 とその対合 分子 EphB3 の存在様式に関して	.....	123
2-4-3	ニッチ内部の ephrin-B2 Reverse シグナルを活性化する		

ACTH 産生細胞に関して .....	126
2-4-4 下垂体幹・前駆細胞ニッチにおける ephrin-B2 シグナルの 機能に関して .....	127
2-4-5 下垂体におけるニッチ細胞の存在の有無に関して .....	130
2-4-6 結語 .....	131
謝辞 .....	134
引用文献 .....	136

## 第1章 序論

### 1-1 はじめに

本研究は、下垂体における幹・前駆細胞を育む微小環境（ニッチ）とその制御機序の解明を主題としている。第一章では、本研究の背景となる、現在までの下垂体幹・前駆細胞に関する知見と、細胞接着を介したシグナル伝達分子である ephrin/Eph シグナルに関して述べる。

### 1-2 下垂体

下垂体は脳の直下に存在する、脊椎動物に共通の内分泌器官である。下垂体は腺性下垂体（前葉、中葉）と神経下垂体（後葉）に分かれており、複数のホルモンを産生することで、個体の恒常性維持に寄与している。中でも前葉には5種類のホルモン産生細胞が存在し、6種類のホルモンが産生されている（図1）。6種類のホルモンとは、成長ホルモン（growth hormone; GH）、プロラクチン（prolactin; PRL）、甲状腺刺激ホルモン（thyroid-stimulating hormone; TSH）、副腎皮質刺激ホルモン（adrenocorticotropic hormone; ACTH）、卵胞刺激ホルモン（follicle-stimulating hormone; FSH）、黄体形成ホルモン（luteinizing hormone; LH）である。GH は骨や筋肉に作用して、骨や筋肉のタンパク質代謝を促進する。PRL は乳腺に作用して乳汁の分泌を促進する機能や、その他にも多くの組織で異所性に発現し、多様な生理作用を持つことが知られている。TSH は甲状腺に作用して甲状腺ホルモン（チロキシン）の産生を、ACTH は副腎皮質に作用してグルココルチコイドの産生を促進する。FSH と LH は精巣や卵巣に作用してテストステロンやエストロジェンなどの性ホルモンの産生を促

進し、配偶子の減数分裂や卵の成熟と排卵を制御している。また、これら下垂体ホルモンの合成、分泌は、視床下部からのホルモンにより制御されている（図 1）。さらに、標的器官からのホルモンによっても下垂体ホルモンの産生、分泌量が調節されており、視床下部-下垂体-標的器官を軸とした、フィードバック機構により制御されている（図 1）。

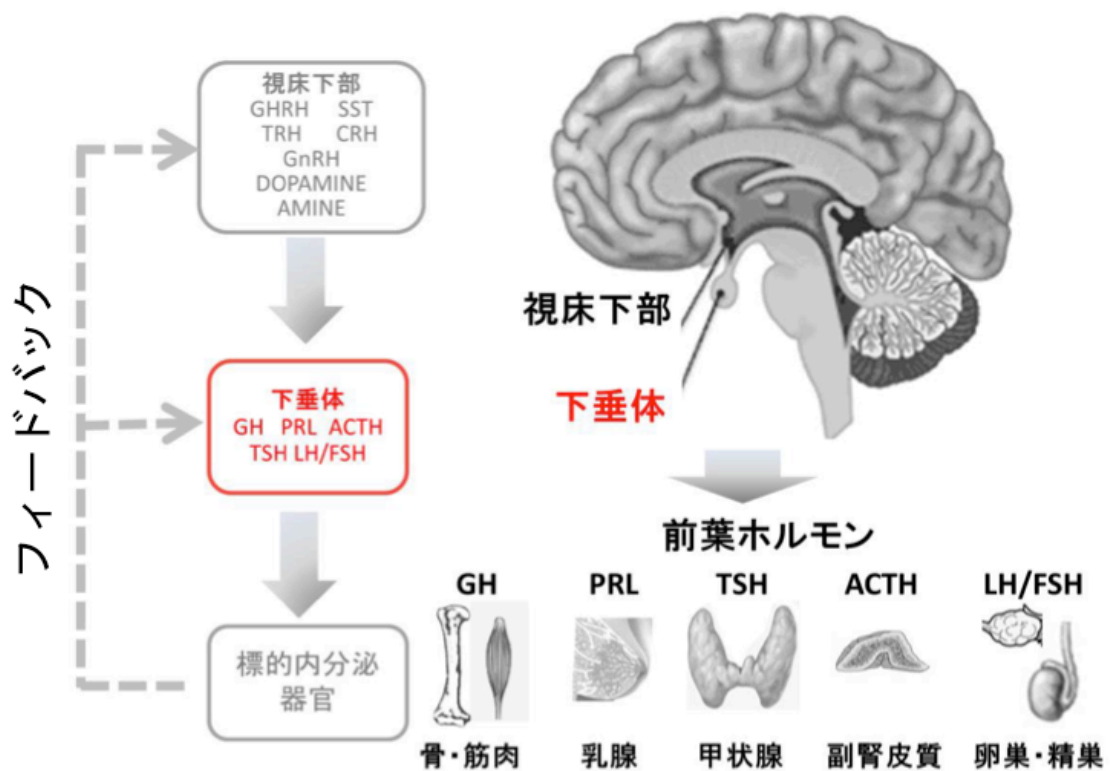


図 1. 視床下部-下垂体-標的器官軸とフィードバック機構

下垂体は視床下部の直下に位置しており、視床下部から放出されるホルモンにより、6種類の下垂体前葉ホルモンの産生、分泌量が調節されている。また、標的器官から分泌されるホルモン量によっても制御を受け、個体のホメオスタシスを維持している。当研究室で作成した図を許諾を得て掲載。

### 1-3 下垂体の発生と成長因子

下垂体は 2 つの異なる起源に由来し、その発生は胎仔発生初期（マウスでは胎齢 E 7.5 日、ラットでは E 9.5 日頃）に開始する（図 2）。下垂体神経葉（後葉）は、神経管が前脳、中脳および菱脳の 3 つの部分に分かれた後に、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、腺性下垂体は外胚葉由来である咽頭後部の口腔上皮が増殖しながら陥入し形成される。そして、ラットでは E13.5 に口腔上皮から解離することで、腺性下垂体の原基であるラトケ嚢（Rathke's pouch）が形成される。その後、ラトケ嚢の細胞が盛んに細胞増殖ならびに細胞移動を行いながら胎仔期下垂体の組織形成と分化を進行させる。また、下垂体形成は出生時には終了しておらず、生後にも進行する。生後 7 から 21 日頃に、著しい細胞分裂と細胞分化が生じる（Ward et al. 2005）。この生後 7 から 21 日頃に生じる、生後の Growth wave を経て、成体下垂体として成熟する。また、ラット E12.5 以前に口腔上皮の口腔に面したアピカル側の層として存在していた一層の細胞層は、ラトケ嚢形成後も遺残腔に接する細胞層（Marginal Cell Layer ; MCL）として成体下垂体でも維持される（図 2）。

このような下垂体の発生は、神経下垂体または腺性下垂体単独では進行せず、両組織のインタラクションと、それらの中で分泌される成長因子が重要な役割を果たしている。図 3 で示すように、陥入を開始した口腔上皮は間脳腹側と接する形で発生を進める。この際、口腔上皮と接した間脳から BMP4、FGF8/10/18、WNT5a が分泌されることで、口腔上皮の細胞増殖と陥入が誘導され、ラトケ嚢が形成される。また、口腔上皮の腹側では *Shh* が発現し、腹背軸に形成される BMP4/FGF ならびに BMP2/SHH の勾配により、後述する細胞分化に関与する転写因子の誘導パターンが決定され、下垂体発生中期（ラット E16.5）頃からホルモン産生細胞が出現し始める（Vankelecom 2012; Zhu et al. 2007）。

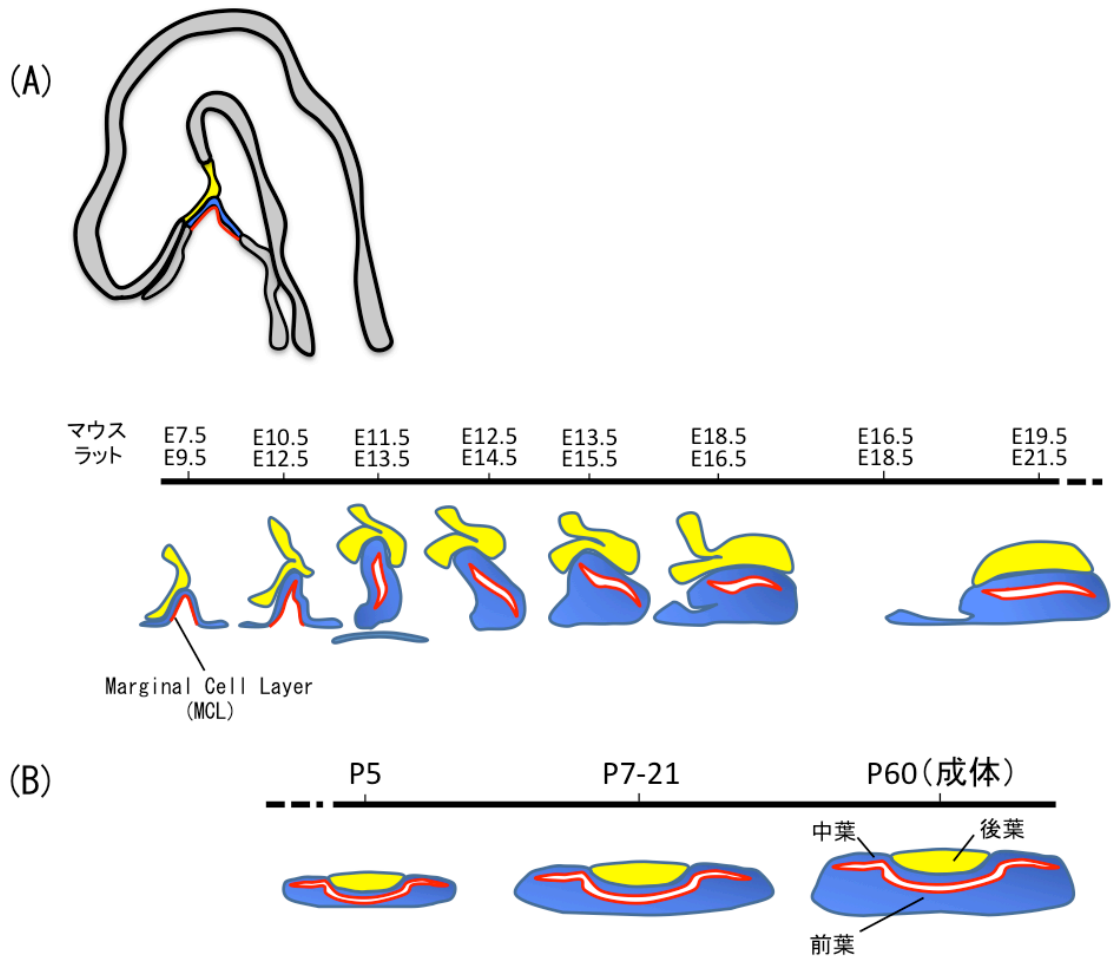


図 2. 下垂体の発生

(A) 胎仔期における下垂体の発生を矢状断面で、(B) 生後の発生を冠状断面で模式的に示す。下垂体の発生は、ラット E9.5 日頃に、将来の後葉である間脳腹側（黄色）と、将来の前葉と中葉である口腔上皮（青色）が接触することで開始する。下垂体の発生は胎仔期だけでは完了せず、細胞増殖や分化が盛んになる生後 7 から 21 日頃の Growth wave を経て、成体下垂体へと成熟する。また、赤色で示す口腔上皮のアピカル側の細胞層は、Marginal Cell Layer (MCL) であり、ラトケ嚢形成後も、遺残腔に面する細胞層として維持される。

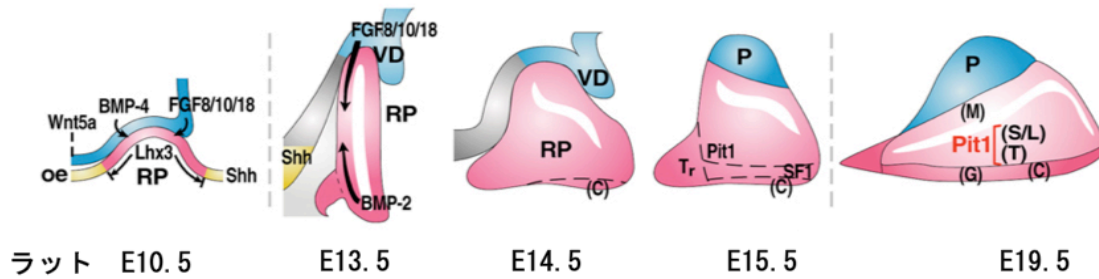


図 3. 下垂体の発生を制御する成長因子

下垂体の発生は、神経下垂体（黄色）と腺性下垂体のインタラクションと成長因子のやり取りにより発生する。ラット E12.5 では神経下垂体から分泌される BMP4、FGF、Wnt5a により、口腔上皮の増殖と陥入が誘導され、ラトケ嚢が形成される。また、腹背軸に形成される BMP4/FGF ならびに BMP2/Shh の勾配により、ホルモン産生細胞の分化とその位置が決定する。文献 (Zhu et al. 2007) より許諾を得て掲載。



#### 1-4 ホルモン産生細胞の分化と転写因子

下垂体前葉に存在する 5 種類のホルモン産生細胞は、それぞれが異なるホルモンを産生する他に、それぞれのホルモン産生細胞が特定の形態を有している。このような機能的、形態的な各ホルモン産生細胞の性質は、下垂体の発生過程において、特定の転写因子が時間的、空間的に発現することで誘導されることが知られている (Tremblay et al. 1998)。ホルモン産生細胞と転写因子群の分化系統図を図 4 のように整理すると、ホルモン産生細胞は 3 つの系譜に大別することができる。

最も初期に出現する系譜は ACTH の前駆体タンパク質である *Pomc* 遺伝子を発現するコルチコトロフ系譜である。ラットでは E14.5 から、将来中葉になる部分ならびに、前葉の腹側でその出現が認められる (Japon et al. 1994)。コルチコトロフ系譜の分化には Basic Helix Loop Helix 型転写因子である *NeuroD1* や、T-box 転写因子 *Tpit* (*Tbx19*)、オーファン核内レセプター *Nur* や bicoid ホメオドメイン転写因子の *Ptx* ファミリーの関与が報告されている (Lamolet et al. 2001; Lamonerie et al. 1996)。

2 つ目の系譜は、ソマトトロフ (GH 産生細胞)、ラクトロフ (PRL 産生細胞)、サイロトロフ (TSH 産生細胞) を含む PIT1 系譜である。*Pit1* (*Pou1f1*) は、下垂体特異的な転写因子であり、遺伝的に成長遅延を示す Snell マウスの原因遺伝子として同定された (Bodner and Karin 1987; Ingraham et al. 1988; Li et al. 1990)。ラットでは E15.5 頃から *Pit1* 遺伝子を発現するがホルモンを産生していない PIT1 コミットメント細胞の存在が観察される。その後、転写因子 *Zn-15* が発現することでソマトトロフに、エストロゲン受容体 (*Er*) が発現することでラクトロフに、転写因子 *Gata2* が発現することで、サイロトロフへと最終分化が起こる。

3 つ目の系譜は、性腺刺激ホルモン (LH, FSH) を合成するゴナドトロフである。ゴナドトロフでは他のホルモン産生細胞とは異なり、1 種類の細胞から LH と FSH の 2 種類のホルモンが合成されるという特徴を持つ。LH と FSH は共通の $\alpha$ サブユニット ( $\alpha$ GSU) と独自の $\beta$ サブユニット (LH $\beta$  と FSH $\beta$ ) から成るヘテロ 2 量体糖タンパク質である。ラットでは発生後期 E18.5~19.5 頃に、*Lh $\beta$* 鎖と *Fsh $\beta$* 鎖の順に発現が誘導される (Japon et al. 1994)。そして、ゴナドトロフの分化にはオーファン受容体転写因子である SF-1 (*Nr5a1*) や EGR1、GATA2 などの関与が知られる (Barnhart and Mellon 1994; Charles et al. 2006)。

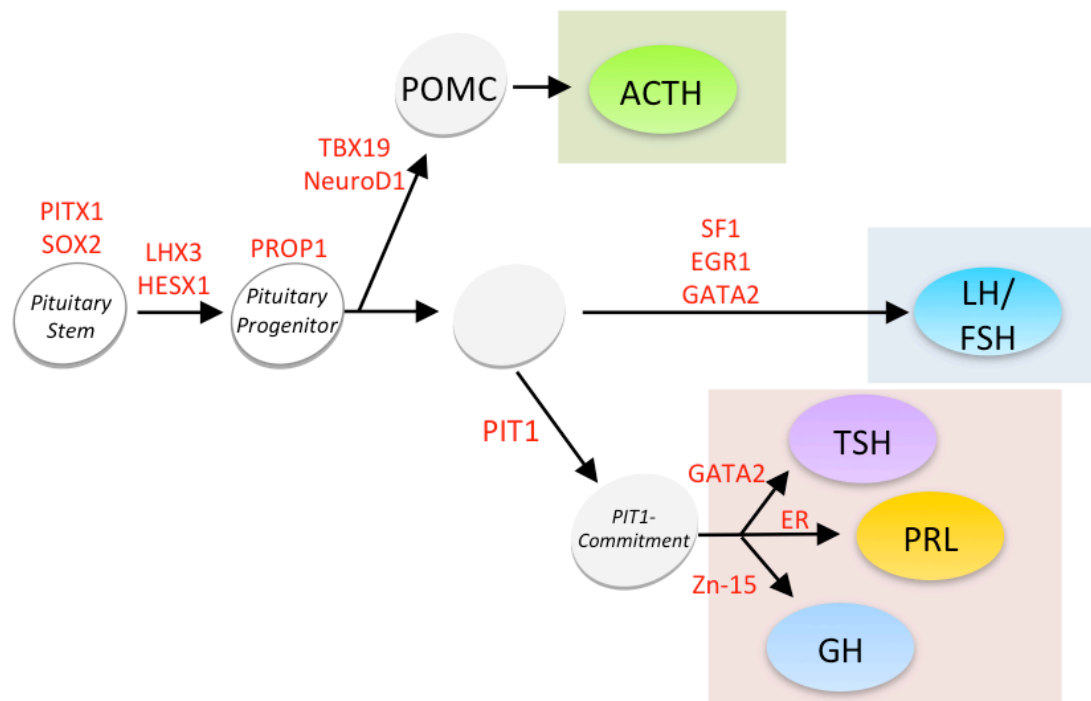


図 4. 下垂体前葉ホルモン産生細胞の分化系譜と転写因子群

下垂体細胞の分化は *Pitx1* や *Sox2* を発現する幹細胞から開始し、転写因子の時間的、空間的な発現パターンにより、ACTH 系譜（緑）、PIT1 系譜（赤）、ゴナドトロフ系譜（青）の大きく 3 種類の系譜へと分かれる。

## 1-5 生理状態の変化に伴う下垂体ホルモン産生細胞数の変化

1-2 で述べたように、個体の生理状態により、下垂体ホルモンの合成、分泌量を調整する機構が存在する。その一例として、妊娠期や泌乳期のメスでは、多量の PRL を必要とするため、ラクトロフからの PRL 合成、分泌が亢進し、血中濃度が高く維持される。しかし、こうした個体の生理状態が変化した際には、ホルモン産生、分泌量の調節に加え、特定のホルモン産生細胞数が増加することが知られている。先の例では、妊娠、泌乳期では下垂体におけるラクトロフの細胞数が増加する。また、より顕著な例として、標的器官である性腺や甲状腺を除去した動物での実験結果が知られている (Ben-Jonathan et al. 1983)。それぞれの標的器官を摘出した動物では、性腺除去ではゴナドトロフの細胞数が、甲状腺除去ではサイロトロフの細胞数が増加し、正常時には前葉の約 5-10%を構成する TSH 産生細胞が、甲状腺除去後には 30-40%前後まで増加することが報告されている (表 1)。また、非常に興味深いことに、こうした特定細胞種の増加は、最終分化したホルモン産生細胞の分裂には起因しないことが知られている (Nolan and Levy 2006)。よって、下垂体には個体の生理状態に応じながら、特定のホルモン産生細胞を供給する機構が存在すると考えられる。こうした、ホルモン産生細胞の新生機序を解明する上で、近年注目を集めているのが、成体下垂体に存在する幹・前駆細胞である。

表1. ラット下垂体前葉における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(%)
<b>GH</b>	<300	32-36
	>300	45-50
<b>PRL</b>	200-300 (メス)	35-38
	200 (オス)	25
	15 day	8
<b>LH</b>	200-300	7-10
	15 day	11-15
<b>FSH</b>	200-300 (オス)	8
	200-250 (メス)	12.0
	15 day	12-16
<b>TSH</b>	200-300	5-9
	200 (メス)	5
<b>ACTH</b>	甲状腺摘除ラット	32-43
	200-300	3-4

表は、文献 (Ben-Jonathan et al. 1983) より許諾を得て掲載。

## 1-6 下垂体の幹・前駆細胞とニッチの特徴

### 1-6-1 幹細胞

幹細胞は多種の細胞へと分化する能力（多分化能）を有する未分化な細胞である。また、その分化能の度合いにより、胚性幹細胞と組織幹細胞に分類される。胚発生時に観られる内部細胞塊から得られる細胞は、胚葉を超えた様々な細胞に分化できる多能性（Pluripotency）を有し、胚性幹細胞（ES cell : Embryonic Stem Cell）と呼ばれる。一方で、各組織の起源となる細胞は、特定の組織における全ての細胞に分化できる複能性（Multipotency）を有するため、組織幹細胞と呼ばれている。両幹細胞の共通の特徴としては、(1) 自己複製能を有すること、また、(2) 不均等分裂を行い、一方の娘細胞は幹細胞としての性質を維持し、他方は前駆細胞となる（図 5）。さらに、前駆細胞は特定の細胞種に方向付けられたコミットメント細胞を経て、最終分化細胞を供給する（図 5）。このようにして、分化細胞の供給だけでなく、自身を複製する事で、幹細胞が枯渇することを防いでいる。また、特に組織幹細胞に関しては、前駆細胞よりも増殖速度が遅く、大部分の細胞が非分裂状態であるといった特徴を有する。こうした特徴は、生体が放射線等の DNA 損傷刺激に暴露された際に、DNA 変異による幹細胞のがん化や枯渇を防ぐ仕組みであると考えられる。

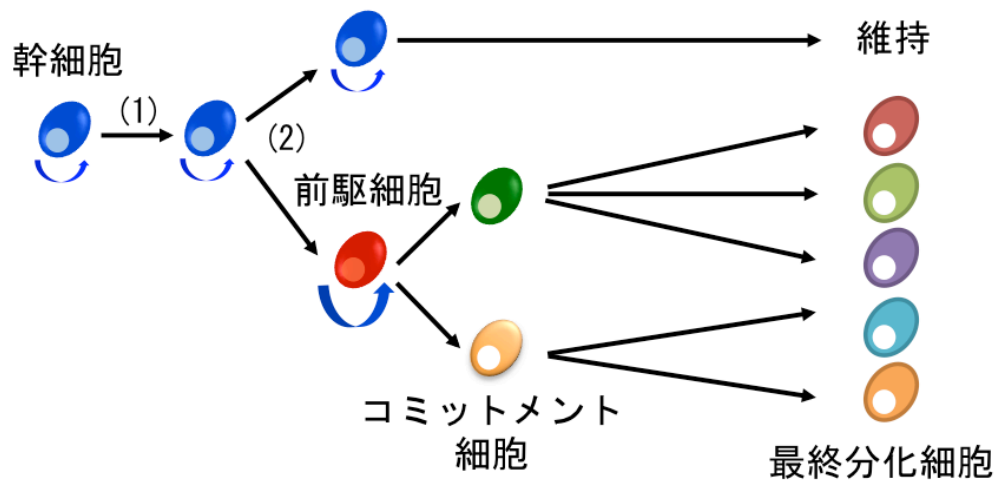


図 5. 幹細胞の性質とその分化過程

幹細胞は、(1) 自己複製、(2) 不均等分裂により、幹細胞自身の維持と、分化へと方向付けられた娘細胞を供給し、多種の分化細胞を供給する多分化能を有する。

## 1-6-2 幹・前駆細胞ニッチ

前述のように、成体組織に存在する組織幹細胞は、他の細胞とは異なる性質を有しており、それらの性質を維持するために、組織中に特別な微小環境が形成されていると考えられる。1978年に Schofield により、幹細胞の数や未分化性を維持する特別な微小環境のことを、教会や住宅の壁にあけられた小物を置くための窪みを意味するフランス語である「ニッチ (Niche)」と名付けられた (Schofield 1978)。ニッチの概念として、幹細胞の性質維持に必須であること、周囲の体液環境とは異なる限局した微小な環境を構成すること、幹細胞を支持する細胞であるニッチ細胞 (あるいは支持細胞) と接着またはその近傍に存在すること、といった特徴を合わせ持つと考えられる。従って、このような微小環境を構成する実体は幹細胞とニッチ細胞、そして、それら細胞間で行われる膜タンパク質や液性因子を介した相互作用であると考えられる (図 6)。

こうしたニッチの細胞構成が初めて同定されたのは、線虫やショウジョウバエの生殖腺である。また、ほ乳類で最も先駆的な研究は、造血幹細胞のニッチであり、2003年以降、造血幹細胞ニッチを構成する細胞が複数提唱されている。このうちの4種類の候補細胞について、その特徴を以下に述べる (図 7)。

(1) Calvi や Zhang らは、長期間 BrdU を保持する細胞である細胞増殖頻度の低い造血幹細胞が、骨表面の N-cadherin を高発現する骨芽細胞の一種 (SNO 細胞) に接着していることから、SNO 細胞がニッチを構成する細胞であると考え骨内膜ニッチ説を提唱した (Calvi et al. 2003; Zhang et al. 2003)。この説は、ショウジョウバエの生殖腺ニッチの解析結果である、Cadherin を介した組織幹細胞の維持機構と共通であることから、広く受け入れられた。しかし、その後、これら長期 BrdU 保持細胞が造血幹細胞でないこと (Kiel, 2005) や、N-cadherin 欠損マウスで異常が観察できないことから、十分な証明には至っていない。



(2) 細胞の遊走に関与する液性因子であるケモカインに着目した解析がある。ケモカイン受容体である CXCR4 が造血幹細胞で発現していることから、CXCR4 に対するリガンド (CXCL12) 発現細胞が、造血幹細胞を骨髄内のニッチに留めておく役割を果たしている可能性が推測された。*Cxcl12*-GFP ノックインマウスの解析から、CXCL12 (SDF1 : Stromal cell-Derived Factor 1) を高発現する CAR 細胞 (CXCL12-abundant reticular 細胞) が同定された (Ara et al. 2003; Sugiyama et al. 2006; Tokoyoda et al. 2004)。CAR 細胞は細網細胞の一種であり、骨髄腔内にびまん性に存在する突起をもつ細胞である。実際に、造血幹細胞分画 ( $CD150^+ CD41^- CD48^-$ ) や未分化造血細胞 ( $c\text{-Kit}^+ Sca1^+$ ) の約 94%以上が CAR 細胞に接着していた (Sugiyama et al. 2006)。また、CAR 細胞特異的な *Cxcl12* 欠損マウスでは、骨髄内の造血幹細胞数は軽度の減少であったが、B 細胞と赤血球の前駆細胞の減少が顕著であり、また、造血幹細胞分画において、分化を誘導する転写因子 PU.1 や M-CSF 受容体の発現が顕著に増加していた (Omatsu et al. 2010)。このことから、CAR 細胞が造血幹細胞の未分化性維持と、前駆細胞の増殖に必要であることが示された。

(3) 神経幹細胞マーカーの一つである *Nestin* に着目した解析結果も存在する。*Nestin*-GFP マウスを用いた解析から、骨髄腔の血管と接する NESTIN 陽性細胞が同定されている (Mendez-Ferrer et al. 2010)。造血幹細胞分画 ( $CD150^+ CD41^- CD48^-$ ) の約 60%が NESTIN 陽性細胞と接すること、さらに *Nestin*-Cre マウスを用いた *Nestin* 発現細胞特異的な欠損実験により、骨髄内の造血幹細胞が顕著に減少することが報告された (Mendez-Ferrer et al. 2010)。

(4) また、造血幹細胞分画の約 60%が骨髄腔内の洞様毛細血管に接着しているという結果から、血管内皮細胞がニッチを構成する細胞ではないかという説もある (Kiel et al. 2005)。

このように、幹細胞ニッチを解明する方法論の一つとして、幹細胞と接着す

る細胞の同定、また、同定した細胞の特異的な欠損実験が有用な方法であると考えられる。しかし、ニッチの研究において先駆的な造血幹細胞ニッチ研究においてもなお、同定されたニッチ細胞がどのような機序により、造血幹細胞を維持しているのかは未だに不明な点が多く、細胞表面分子や液性因子とその受容体の解析が必要とされている。また、近年では造血幹細胞ニッチの他にも、ほ乳類動物において、小腸の陰窩（Crypt）や、脳室のニッチである側脳室上衣下層（subventricular zone; SVZ）ならびに皮膚の毛包幹細胞ニッチなどの研究が精力的に進められている。

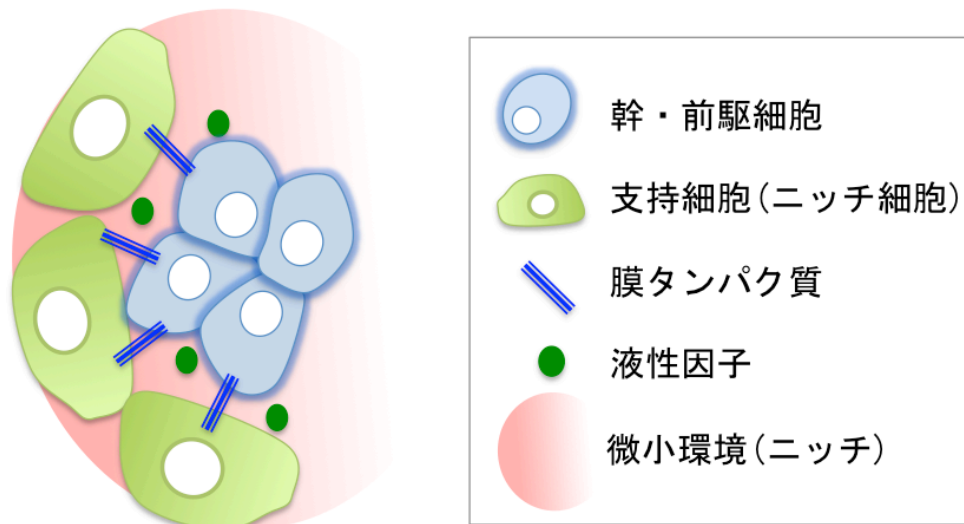


図 6. 幹細胞を制御する微小環境（ニッチ）の概念

幹細胞の微小環境であるニッチでは、幹細胞とそれと接着または近傍に存在するニッチ細胞間で行われる膜タンパク質や液性因子を介した相互作用により、幹細胞の性質が維持されている。

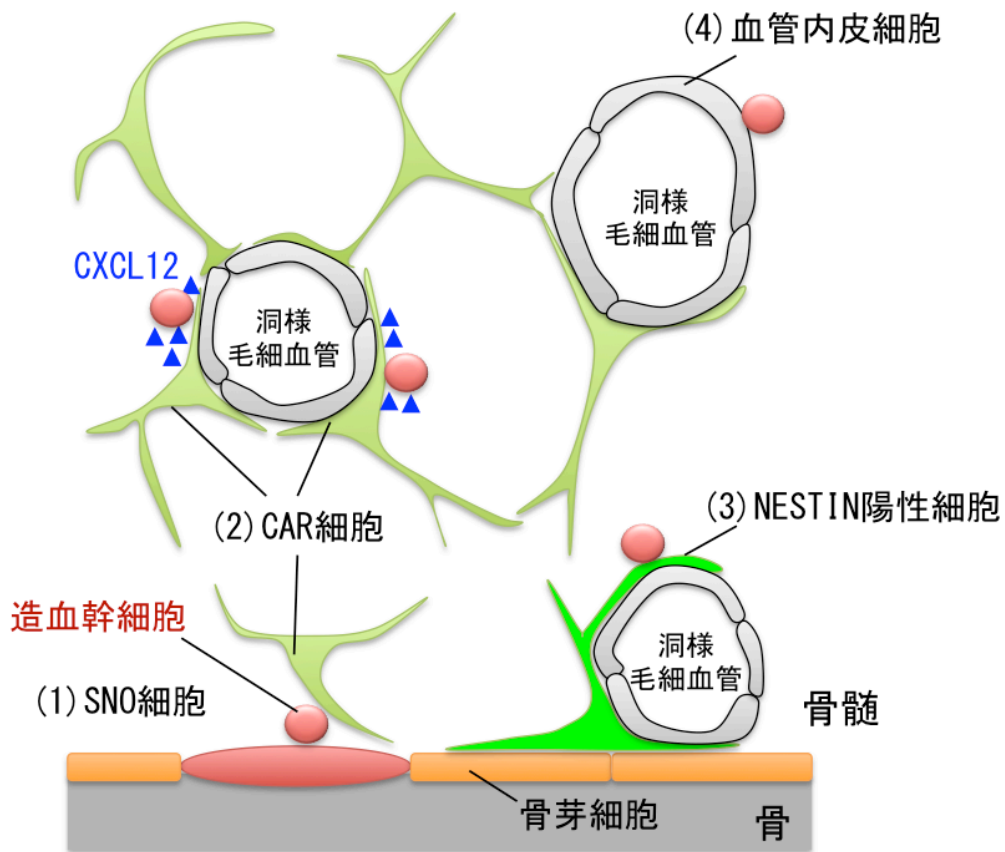


図 7. 代表的な幹細胞ニッチである造血幹細胞ニッチ

ほ乳類における先駆的なニッチである造血幹細胞のニッチを模式的に示す。(1) 骨芽細胞の一種である SNO 細胞、(2) CXCL12 を高発現する CAR (CXCL12-abundant reticular) 細胞、(3) NESTIN 陽性細胞、ならびに、(4) 血管内皮細胞などが、造血幹細胞を支持するニッチ細胞の候補であると考えられている。http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/se03/を元に作成。

### 1-6-3 下垂体の幹・前駆細胞とニッチ

他の組織同様に、成体の下垂体にも幹細胞とそのニッチが存在し、下垂体の機能を制御していると考えられていたが、その実体は不明であった。下垂体幹細胞の研究は、2005年以降、急速に進展し、下垂体幹・前駆細胞のマーカー遺伝子や細胞の候補が同定、分離され、その機能や性質が精力的に研究されている。

#### 1-6-3-1 Side Population (SP) 細胞

造血系をはじめ、脳、肝臓さらに癌組織から幹細胞を分画する代表的な方法として Side population (SP) 分画法が知られる。この方法は、高い細胞透過性と核酸との結合能を有する蛍光色素ヘキスト (Hoechst 33342) を分散細胞に取り込ませ、フローサイトメトリーにて分画を行うと、細胞内に取り込んだヘキストを細胞外に排出する能力を持ち、結果としてヘキストの取り込み量の低い細胞集団 (SP 画分) が組織中に存在することが観察された (Goodell et al. 1996)。この SP 画分と、その他の細胞画分 (MP 画分; Main Population) を比較解析した結果、SP 画分は、幹・前駆細胞で発現する遺伝子が高発現していることが確認され、幹細胞分離法としての有用性が示された。2005年に、成体マウス下垂体前葉でも SP 細胞の解析が報告された (図 8) (Chen et al. 2005)。下垂体前葉では、全細胞の約 1.7%が SP 画分として分離された。また、幹細胞の性質の一つである自己複製能を評価する方法として知られる sphere 形成能 (下垂体では pituisphere という) を bFGF、B27、N2 などのサプリメントを含む無血清培地を用いて評価すると、MP 細胞よりも SP 画分の細胞で高い頻度で pituisphere 形成能が確認された (Chen et al. 2006; Chen et al. 2005)。ま

た、SP 画分と MP 画分の遺伝子発現を比較した結果、SP 画分では、*Sox2*、*Oct4*、*Nanog*、*Bmi1* や *Sca1* といった、幹・前駆細胞マーカーと考えられる遺伝子の発現が顕著であった (Chen et al. 2006; Chen et al. 2005)。また、この SP 画分を *Sca1* の発現レベルにより、さらに分画する解析も行われた。造血幹細胞の解析では、SP 画分のなかでも *Sca1* を高発現する細胞画分 (*Sca1*<sup>high</sup>-SP) が、より幹細胞性の高い細胞であると報告されている (Wilson et al. 2007)。しかし、下垂体前葉細胞での解析結果では、造血幹細胞とは異なり、SP 画分の中でも、*Sca1* の発現量が低い non-*Sca1*<sup>high</sup>-SP において、下垂体原基 (ラトケ囊) で高発現している遺伝子 (*Hesx1*、*Prop1*、*Pax6*、*Lhx4*) が顕著に発現していた (図 8B) (Chen et al. 2009; Chen et al. 2005)。また、両者の pituisphere 形成能を比較すると、non-*Sca1*<sup>high</sup>-SP でのみ pituisphere の形成が確認された (Chen et al. 2009; Chen et al. 2005)。さらに、この pituisphere を用いて、分化誘導を行うことで、前葉を構成する全てのホルモン産生細胞ならびに、後述の S100 $\beta$  陽性細胞への分化が可能であることが示された (Chen et al. 2009)。これらの解析から、下垂体前葉の幹・前駆細胞は non-*Sca1*<sup>high</sup>-SP 画分として分離できることが、明らかとなった。

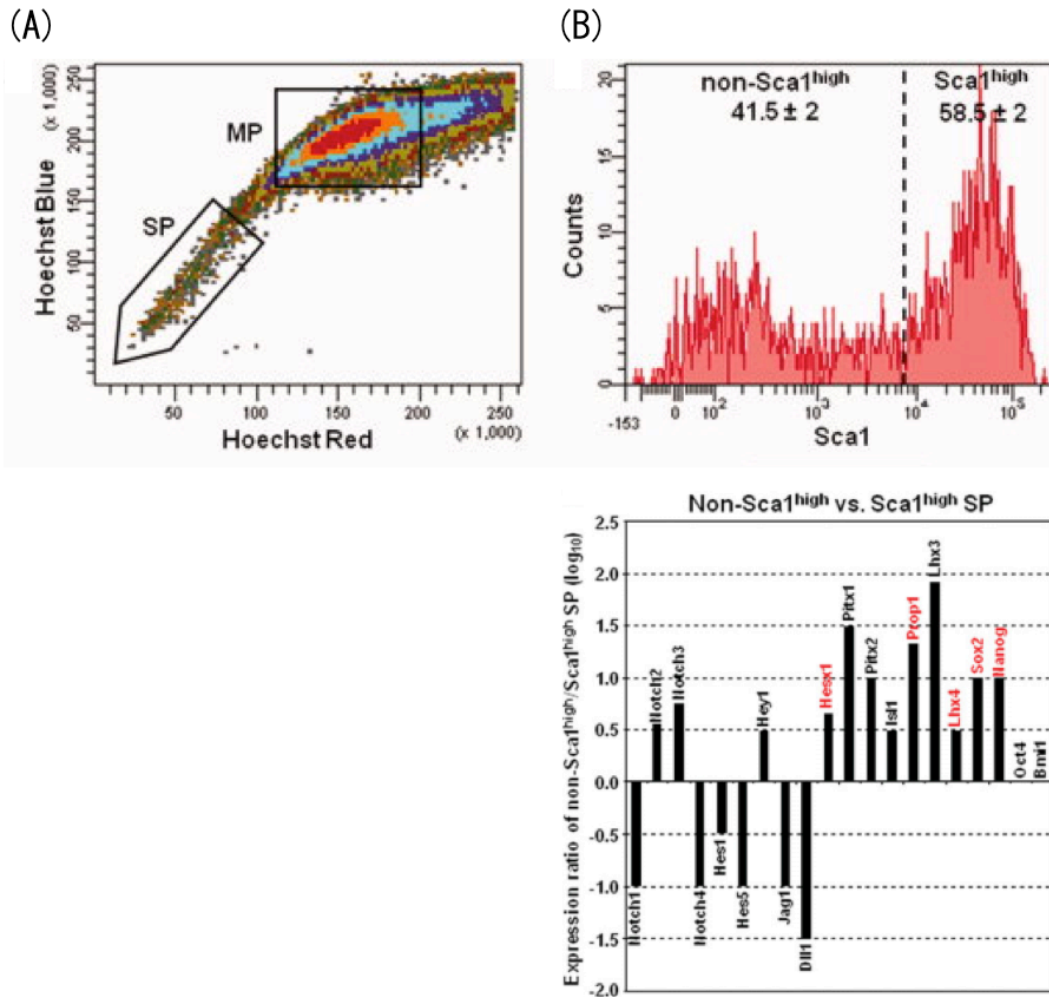


図 8. 下垂体における Side Population (SP) 画分の解析

(A) 蛍光色素である Hoechst 33342 の取り込み量を利用した、下垂体細胞の SP 画分の分離。下垂体前葉では、全細胞の約 1.7%が SP 画分として分離される。

(B) SP 画分をさらに *Sca1* を指標としたフローサイトメトリーで分離し、それぞれを解析すると、*Sca1* の発現が低い non-*Sca1*<sup>high</sup>-SP 画分に下垂体発生過程における幹・前駆細胞で特徴的に発現する遺伝子が濃縮される。文献 (Chen et al. 2009) より許諾を得て掲載。

### 1-6-3-2 SOX2 陽性細胞群

現在、下垂体の幹・前駆細胞として、最も解析が進んでいる因子は転写因子 *Sox2* を発現する未分化細胞である。*Sox* は、Sry related HMG box の略であり、High Mobility Group (HMG) box スーパーファミリー (A から H) に属する。その中で SOX2 は *SoxB family* に属し、神経外胚葉の幹・前駆細胞マーカーとして、また、iPS 化を誘導する山中因子の一つとしても知られる (Takahashi and Yamanaka 2006)。

2008 年に Fauquier らは、この *Sox2* を発現する細胞が成熟下垂体に存在し、その細胞は非ホルモン産生細胞であることを報告した (Fauquier et al. 2008)。さらに、成体下垂体前葉から調製した細胞を用いて、*pituisphere* を形成すると、*pituisphere* を構成する細胞の 98% は SOX2 陽性であることが示された (Fauquier et al. 2008)。また、この *pituisphere* は単一の SOX2 陽性細胞が自己増殖し形成された細胞塊であることが、全身性に GFP を発現するマウスと野生型のマウス由来の下垂体細胞を混合した別のグループの実験から証明された (図 9A, B) (Chen et al. 2005)。さらに、Fauquier らは、*pituisphere* に分化誘導を行うことで、全てのホルモン産生細胞ならびに S100 $\beta$ 陽性細胞に分化することを *in vitro* の系で証明し、SOX2 陽性細胞が下垂体の幹・前駆細胞であることが示唆された (図 9C) (Fauquier et al. 2008)。

また、2013 年には、*Sox2* プロモーターの制御下で Cre と変異型エストロゲン受容体を発現するマウス (*Sox2-CreERT2*) とレポーターマウス (ROSA26-flox-stop-YFP) を掛け合わせたマウス (*Sox2<sup>CreERT2/+</sup>; R26<sup>YFP/+</sup>*) を用いた、SOX2 陽性細胞の *in vivo* 運命追跡解析結果が報告された (Andoniadou et al. 2013)。この動物にタモキシフェンを投与することで、投与時に *Sox2* を発現していた細胞を継続的に YFP でラベリングし、追跡することが可能である。



まず、妊娠 11.5 日目の母体にタモキシフェンを投与し、出生 1 日目の新生仔下垂体を解析した結果、全てのタイプのホルモン産生細胞で YFP のシグナルが観察された。このことから、胎仔期の *Sox2* 発現細胞からホルモン産生細胞が分化していることが確認された。一方で、4 から 6 週齢の成体マウスに対してタモキシフェンを投与し、投与後 30 時間から 1 年間の追跡実験が行われた。その結果、投与後 30 時間では、YFP 陽性細胞のほぼ全てが SOX2 陽性細胞であり、ホルモンと共存する細胞は極めて低く、全 YFP 陽性細胞の 0.5%程度であった。一方で、投与後、9 ヶ月の下垂体を解析すると、全てのタイプのホルモン産生細胞で YFP と共存する細胞が観察された (図 10)。しかし、その割合は YFP 陽性細胞の約 30%前後であり、依然として YFP 陽性細胞の約 15%が SOX2 陽性であった (図 10B)。これらの解析結果から、(1) SOX2 陽性細胞は確かにホルモン産生細胞の供給源としての機能を有すること、(2) しかし、生理的に定常状態の下垂体において、SOX2 陽性細胞からの供給速度は非常に遅いこと、また、(3) 下垂体の SOX2 陽性細胞は短命な幹・前駆細胞ではなく、1 年以上維持される細胞であることが明らかとなった。こうした特徴は、下垂体細胞のターンオーバーが、例えば小腸などと比較すると、非常に穏やかであることを示唆していると考えられる (Barker et al. 2009; Zhu et al. 2009)。

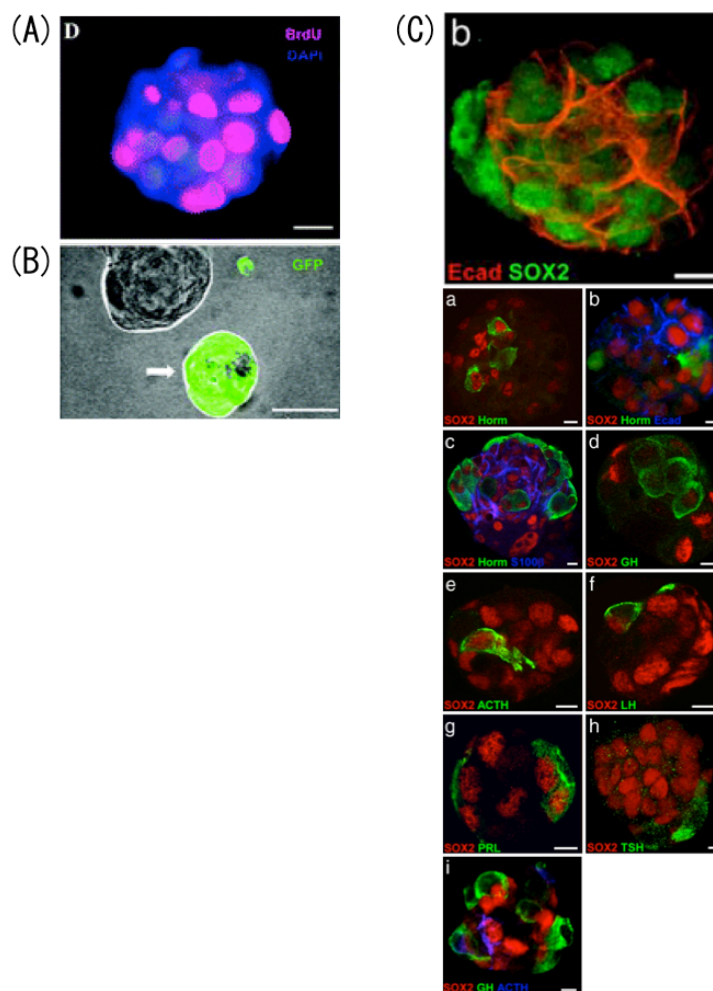


図 9. 下垂体における SOX2 陽性細胞の *in vitro* 解析

(A) 分散した下垂体前葉細胞から作製した pituisphere の BrdU 取り込み実験。Pituisphere を構成する細胞は自己増殖をしている。(B) 全身性に GFP を発現するマウスと野生型のマウス由来の下垂体前葉細胞を混合した、pituisphere 形成実験の結果。Pituisphere を構成する細胞は GFP 陽性か陰性かのどちらかであることから、pituisphere が単一の細胞由来であることが示された。文献(Chen et al. 2005) より許諾を得て掲載。(C) Pituisphere を用いた分化誘導実験。SOX2 陽性の pituisphere を分化誘導培地で培養する事で、全てのホルモンならびに S100 $\beta$ 陽性細胞へ分化する。文献 (Fauquier et al. 2008) より許諾を得て掲載。

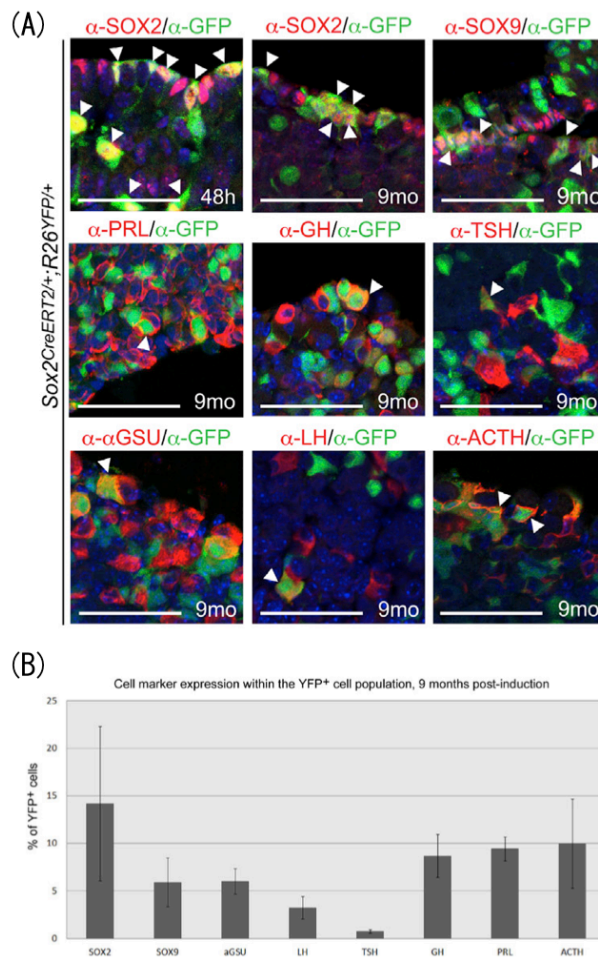


図 10. *Sox2<sup>CreERT2/+</sup>; R26<sup>YFP/+</sup>* マウスを用いた SOX2 陽性細胞の *in vivo* 運命追跡解析

(A) *Sox2-CreERT2* マウスとレポーターマウス (*ROSA26-flox-stop-YFP*) を掛け合わせて作製した *Sox2<sup>CreERT2/+</sup>; R26<sup>YFP/+</sup>* マウスを用いた、SOX2 陽性細胞の追跡実験結果。4 から 6 週齢の成体マウスへタモキシフェンを投与し、投与後 48 時間ならびに 9 ヶ月後に解析を行った。投与後 48 時間では YFP 陽性細胞はほぼ全て SOX2 陽性細胞であるが、投与後 9 ヶ月では全てのタイプのホルモン産生細胞で YFP のシグナルが検出された。(B) タモキシフェン投与後 9 ヶ月での YFP 陽性細胞の性質解析。YFP 陽性細胞の 30%前後の細胞がホルモン産生細胞へと分化している。文献 (Andoniadou et al. 2013) より許諾を得て掲載。

### 1-6-3-3 濾胞星状細胞 (FS 細胞 : Folliculo-stellate Cell)

1950年代から、下垂体前葉において、ホルモン分泌に必須である分泌顆粒を持たない非ホルモン産生細胞の存在が確認され始めている (Rinehart and Farquhar 1953)。その解析の中心であった細胞が濾胞星状細胞 (Folliculo-stellate cell) である。濾胞星状細胞の多くがカルシウム結合タンパク質である *S100 $\beta$*  を発現していることが明らかになって以降、この細胞の特徴が解析されてきた (Cocchia and Miani 1980; Kagayama 1965; Nakajima et al. 1980)。

この細胞の特徴は、(1) 成熟下垂体前葉の約 5-10% を構成し、(2) 分泌顆粒を持たず、(3) 長い突起状の細胞質を持ち、星状の形態をしている。また、(4) その突起状の細胞体でホルモン産生細胞を包み込むように存在している。さらに、(5) 濾胞星状細胞間で濾胞を形成する、などのホルモン産生細胞には無い特徴を持っている (Cocchia and Miani 1980; Kagayama 1965; Nakajima et al. 1980)。

また、この細胞の機能としては、1) 濾胞星状細胞間に濾胞を形成し、死んだホルモン産生細胞や不要な物質を食作用によって濾胞内に取り込む Scavenger 機能 (Claudius et al. 2006; Claudius et al. 2005; Inoue et al. 2002; Ogawa et al. 1997)。2) interleukin-6 (IL-6)、vascular endothelial cell growth factor (VEGF)、bFGF、leukemia inhibitory factor (LIF)、follistatin、macrophage migration inhibitory factor (MIF)、nitric oxide (NO) などを合成し、パラクラインやオートクラインにより、周辺に存在するホルモン産生細胞の機能を調節する支持機能 (Inoue et al. 1999; Inoue et al. 2002)。3) 濾胞星状細胞の持つ樹状突起間で Gap junction を形成し、細胞間の情報を速やかに伝達する細胞間コミュニケーション (Fauquier et al. 2001; Morand et al. 1996; Soji et al.

1997)。さらに、4) 筋分化誘導を行うことで筋肉細胞へと分化することから、幹細胞としての性質を持つことが報告されている (Osuna et al. 2012)。最近、我々のグループにおける、S100 $\beta$ と SOX2 をはじめとする種々の幹・前駆細胞マーカーとの共存解析結果から、S100 $\beta$ 陽性細胞の一部は幹・前駆細胞として存在していることが確認された (Yoshida et al. 2011)。さらに、S100 $\beta$ -GFP 陽性細胞の一部がホルモン産生細胞へ分化する能力があることが *in vitro* の系から確認されている (図 11) (Higuchi et al. 2014)。これらの事から、これまで一様に考えられてきた濾胞星状細胞は、幹・前駆細胞を含めた様々な細胞群によって構成され、上記のような多様な機能を担っていると考えられる。

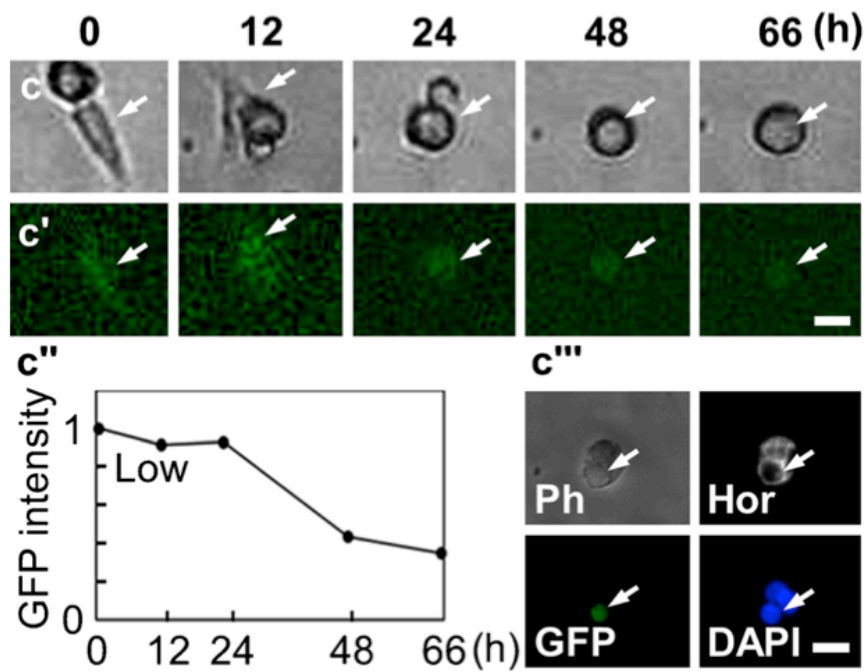


図 11. S100 $\beta$ -GFP トランスジェニックラットを用いた *in vitro* 運命追跡解析

S100 $\beta$ -GFP トランスジェニックラットの前葉細胞を初代培養し、蛍光タイムラプス観察ならびに細胞免疫染色の結果から、S100 $\beta$ -GFP 陽性細胞の一部はホルモン産生細胞へと分化する能力があることが確認された。文献 (Higuchi et al. 2014) より許諾を得て掲載。

#### 1-6-3-4 *Nestin-Cre* マウス解析による胎生幹細胞と成体幹細胞説

Gleiberman らは、下垂体の幹細胞には、主に胎仔期に機能する細胞と成体で機能する細胞が存在するという、興味深い説を報告している (Gleiberman et al. 2008)。中枢神経系の幹細胞で発現が知られる中間径フィラメント *Nestin* のプロモーター領域を GFP 遺伝子に連結したトランスジェニックマウス (*Nestin-GFP* マウス)を用いた解析から、マウス胎仔期 E11.5 では下垂体原基の少数の細胞で GFP が観察され、出生直後 (P0) までは GFP 陽性細胞はほとんど分裂せずに、MCL に存在していた。しかし、生後の Growth wave が開始する P7 では、GFP 陽性細胞の数が顕著に増加し、MCL だけでなく、実質層にも確認された。また、少数の GFP は分化マーカー PIT1 陽性の分化への遷移状態と考えられる細胞に確認され、多くの GFP 陽性細胞が分裂状態にあった。一方で、Growth wave の終期である P21 では GFP は MCL にのみ存在し、それ以外の GFP 陽性細胞は消失していた。次に *Nestin* 発現細胞を持続的に標識することが可能なプロモーター ROSA26 を付加したマウス (*Nestin-Cre/ROSA26-loxP-stop-loxP-GFP* マウス)での解析が行われた。このマウスでは、一度 GFP の発現を開始すると、その細胞の形質が変化しても GFP が持続するため、NESTIN 陽性細胞の運命を追跡できる。新生仔の下垂体では GFP 陽性細胞が前葉と中葉に散在し、GFP の割合は全下垂体の 2% 程度であった。この結果は、新生仔の下垂体に存在しているホルモン産生細胞の多くが、胎仔期に存在した NESTIN 陽性の細胞に由来しないことを示している。一方で、5 ヶ月齢の動物においては、その割合が 20%に増加し、全種類のホルモン産生細胞で GFP のしぐなるが検出された。さらに、*Nestin-CreER/ROSA26-loxP-stop-loxP-GFP* を用いて、タモキシフェン投与時にのみ *Nestin* を発現していた細胞を、GFP で継続的に標識する解析が行われ

た (Gleiberman et al. 2008)。9 ヶ月齢の動物にタモキシフェンを投与し、その 1 ヶ月後に解析した結果、GFP 陽性が全種類のホルモン産生細胞で検出され、成体下垂体に存在する NESTIN 陽性細胞からホルモン産生細胞が分化していることが示された。

これらの解析から、胎仔期から出生までは NESTIN 陰性の幹細胞（胎生幹細胞）が主要な機能を担う一方で、生後の Growth wave を含む下垂体の成熟や細胞の新生に関しては NESTIN 陽性の幹細胞が主要な機能を担うことを示しており、生後の下垂体には胎生型と成体型の 2 種類の幹細胞が混在していることを示唆している（図 12）。しかしながら、この解析結果には疑問も残っている。GFP の代わりに YFP を使用した同様のコンストラクト（*Nestin-YFP* マウス）を用いた解析では、胎仔期の下垂体において YFP のシグナルは検出されず、成体下垂体においても YFP 陽性細胞は下垂体細胞の 0.7% であり、Gleiberman らの結果とは異なっていた (Galichet et al. 2010)。これらのコンストラクトには、*Nestin* の第 2 イントロンに存在する中枢神経系特異的なエンハンサー領域を使用している (Zimmerman et al. 1994)。一方で、*Nestin* の第 1 イントロンには、血管系と筋肉組織における発現を制御するエンハンサーの存在が知られている (Aihara et al. 2004)。このように、*Nestin* 遺伝子はエンハンサー領域により厳密な制御を受ける事から、用いたエンハンサー領域の違いにより、厳密な発現制御が解除され、異所的な発現が生じている可能性が指摘されている。

一方で、1-7 で述べるように、我々は、Monoclonal (clone25) 抗体を用いた解析から、ラット E12.5 の下垂体原基の全ての細胞で NESTIN が存在しており、他の組織同様に (Sunabori et al. 2008)、下垂体においても NESTIN 陽性細胞が分裂状態の幹・前駆細胞として存在している可能性を示唆しており (Yoshida et al. 2013)、下垂体における NESTIN 陽性細胞の機能に関しては、結論には至っていない。



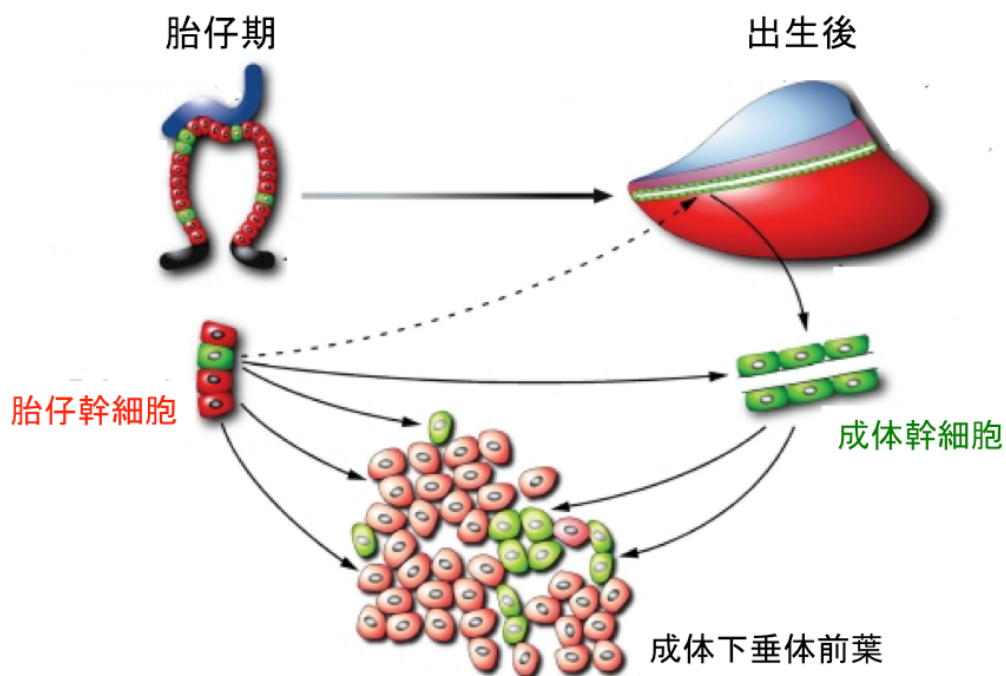


図 12. *Nestin-GFP* を指標とした、胎生幹細胞と成体幹細胞の存在を示唆する解析

胎仔期の下垂体形成には *Nestin-GFP* 陰性の幹細胞（胎生幹細胞）が主要な機能を担い、一方で生後の下垂体においては *Nestin-GFP* 陽性の幹細胞（成体幹細胞）が主要な細胞供給源を担う。よって、生後の下垂体には胎生型と成体型の 2 種類の幹細胞が混在している。文献（Gleiberman et al. 2008）より許諾を得て掲載。

### 1-6-3-5 Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) 陽性細胞と 2 様のニッチの形成機序

上述のように、下垂体の幹・前駆細胞の候補とそのマーカー分子の同定が進められている。しかし、それら幹・前駆細胞を育む場であるニッチに関しては、未解明な部分が多く残っている。最近、我々のグループでは、下垂体ニッチの同定ならびに形成過程に関する解析結果を報告している (Chen et al. 2013)。Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) は膜タンパク質であり、コクサッキーウイルスならびにアデノウイルスの感染に必要な受容体である (Bergelson et al. 1997; Bowles et al. 1999)。また、CAR はホモフィリックな Tight junction 形成因子としても知られ、胎仔の組織において広く発現していることが知られている (Raschperger et al. 2006)。興味深いことに、我々は CAR が胎仔期ならびに成体期の脳や小腸、肝臓などの組織において、胚葉を超えて、幹・前駆細胞ニッチにおいて発現していることを確認している (Chen et al. 投稿準備中)。

成体下垂体における我々の解析の結果では、CAR 陽性細胞は、ラトケ囊の遺残腔に面した一層の細胞層である MCL に局在するとともに、前葉実質内でクラスター状に散在していた (図 13A)。実際に SOX2 との共染色から、MCL ならびに実質層のクラスターともに、CAR 陽性細胞は SOX2 陽性であった (図 13B)。このことから、下垂体の幹・前駆細胞ニッチは、古くから考えられていた MCL だけでなく、2 種類存在していると考えられる。さらに、この CAR を用いて、2 種類のニッチの形成機序についても解析を行った (Chen et al. 2013)。下垂体の原基であるラトケ囊から出生直前までは、CAR は MCL のみで陽性であり (図 13C)、実質層にはほぼ存在しない。しかし、出生直後 P3 において解析を行うと、MCL の下層において CAR 陽性細胞が多層化する現象が観察された (図 13

矢頭)。それと同時に、実質層にも CAR 陽性のクラスターが観察され始め、P15 頃まで数を増加させて行った。この出生直後に観察された MCL の直下で多層化した CAR 陽性細胞の性質を調べると、一部の CAR 陽性細胞で、上皮系細胞のマーカである E-cadherin の陽性シグナルが減少し、間葉系細胞のマーカである Vimentin の陽性シグナルが新たに観察された (図 14A, 矢印)。この結果は、CAR 陽性細胞が上皮間葉転移 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) を介し、遊走能を獲得したことを示唆していると考えられる (図 14B)。したがって、この研究結果から、実質層のニッチは出生直後に MCL の細胞が migration することで形成される可能性が示唆されている。このように、出生直後に 2 種類目のニッチが形成される理由は、生後の 7 から 20 日頃に観察される、盛んな細胞増殖と分化、さらには、1-5 で記した生理状態の変化に伴う細胞供給に備え形成されると推測される。このような、他の組織では観られない 2 種類のニッチがどのように機能分担をしているのかは、興味深い研究課題である。

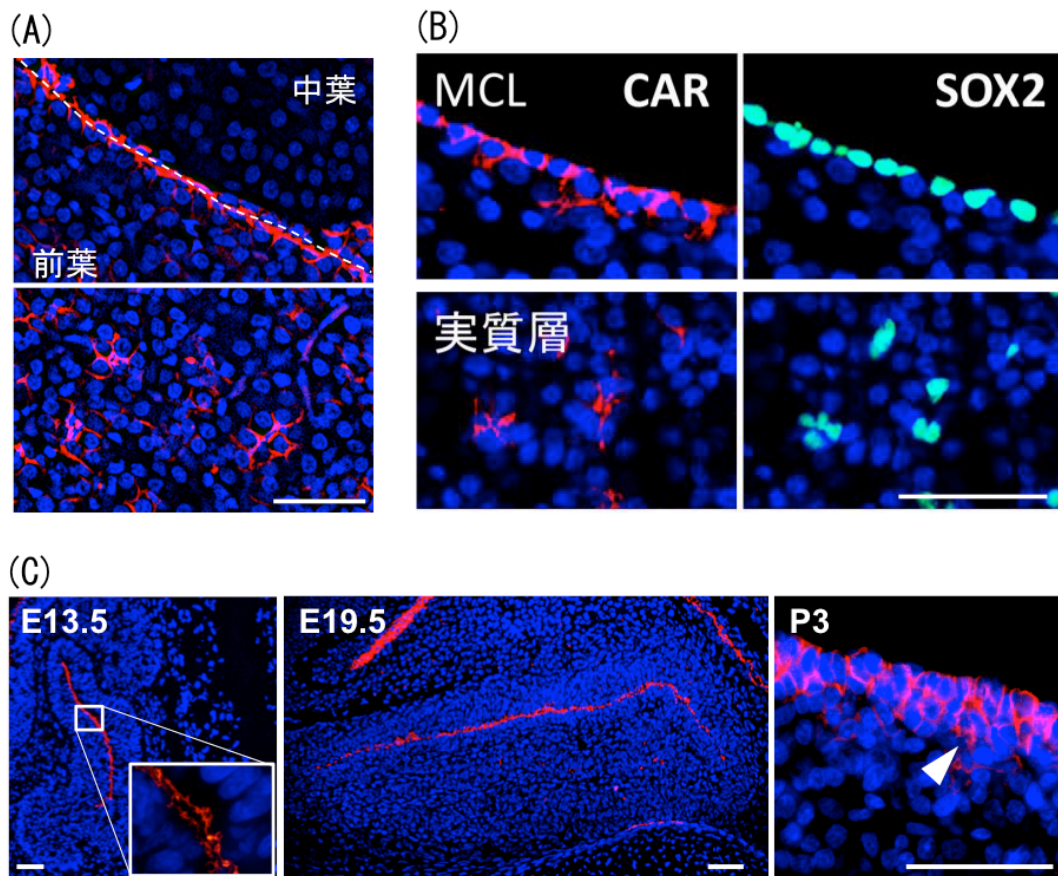
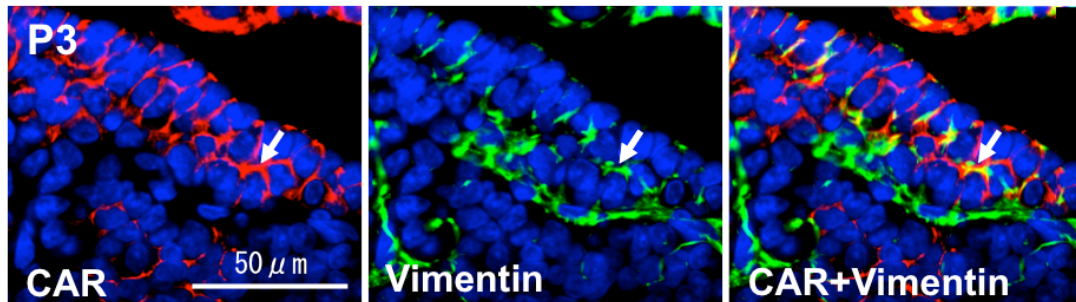


図 13. CAR を指標とした、下垂体幹・前駆細胞ニッチの同定

(A) 成体下垂体において CAR は MCL (点線) と実質層のクラスターに存在する。(B) CAR 陽性細胞は SOX2 と共存している。(C) CAR の局在を経時的に観察すると、ラット E13.5 ならびに E19.5 において、CAR は MCL のアピカル側に存在する。一方で、出生直後 (P3) では、MCL の直下に多層化したパソラテラルな CAR 陽性シグナルが出現する。Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ 。文献 (Chen et al. 2013) より許諾を得て掲載。

(A)



(B)

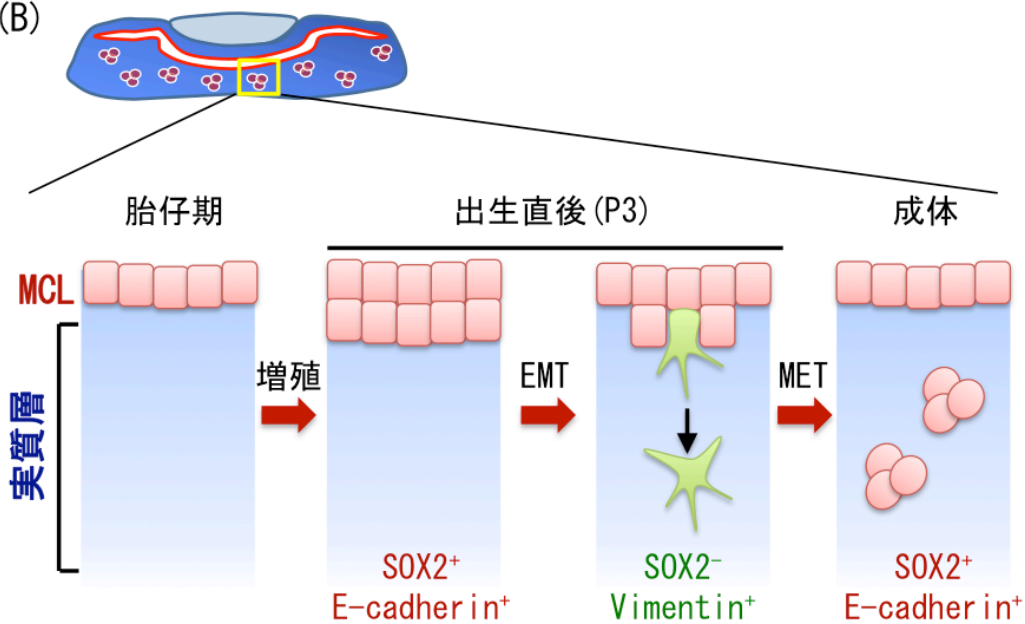


図 14. 出生直後 (P3) における CAR 陽性細胞の解析とニッチの形成機序

(A) 出生直後に MCL 直下に多層化した CAR 陽性細胞の一部で、間葉系細胞マーカーである Vimentin が新たに出現している (矢印)。(B) 下垂体幹・前駆細胞ニッチの形成機序を模式的に示す。CAR を指標とした解析から、発生過程では MCL のみがニッチとして存在しているが、出生直後に MCL の細胞が EMT を起こし遊走する事で、実質層に新たなニッチが形成される可能性が示唆されている。文献 (Chen et al. 2013) より許諾を得て掲載。

## 1-7 下垂体幹・前駆細胞の質的な変化と、細胞供給機構の変化

我々は下垂体のニッチに存在する幹・前駆細胞の質的な変化に注目した研究も報告している。転写因子に着目した解析から、下垂体特異的転写因子である PROP1 (Prophet of PIT1) と間葉系転写因子 PRRX2 は常に SOX2 陽性の下垂体幹・前駆細胞として存在している (Higuchi et al. 2013; Yoshida et al. 2011)。しかし、ニッチである MCL に着目し解析すると、PROP1 は胎仔期から生後直後の MCL では高密度に存在していたが、生後 15 日頃から陽性細胞の割合が減少し、成体期ではほぼ観察されなくなる (図 15A) (Yoshida et al. 2011)。しかし、実質層のニッチでは PROP1 陽性細胞は維持され続けている (図 15A) (Yoshida et al. 2011)。一方で、PRRX2 陽性細胞は胎仔期から生後直後 (P5) の下垂体には存在せず、P30 頃までに MCL に SOX2 陽性の細胞として出現する (図 15B) (Higuchi et al. 2013)。こうした結果は、MCL の細胞構成が生後直後に質的に変化し、主に胎仔期に機能する幹・前駆細胞と、成熟後に機能する細胞とが入れ替わる可能性を示唆しており、Gleiberman らの説を支持するものであると考えられる。

また、P15 頃を境に MCL における幹・前駆細胞の細胞構成が変化することから、時期により、細胞供給を担う幹・前駆細胞にも変化が生じている可能性が考えられた。そこで、神経系の細胞において分裂状態の幹・前駆細胞のマーカールとして報告されている NESTIN (Sunabori et al. 2008) に対する抗体を用いて解析すると、発生過程の増殖期は NESTIN 陽性細胞の多くを PROP1 陽性細胞が占めていたが、出生後では PIT1 陽性のコミットメント細胞が NESTIN 陽性細胞の大部分を占めるように変化していた (図 16) (Yoshida et al. 2013)。このことは、胎仔期下垂体の形成過程では、PROP1/NESTIN 陽性前駆細胞が、前駆細胞の増加やコミットメント細胞の供給源であるが、一方で生後の Growth

wave 前後では、PIT1/NESTIN 陽性のコミットメント細胞が細胞供給を担っており、出生前後に下垂体の細胞供給源が変化していると考えられる。

以上のように、主に胎仔期から出生期まで機能する幹・前駆細胞と、生後から成体期に機能する幹・前駆細胞に質的な違いがある可能性がある。こうした幹・前駆細胞の機能的な差異を解明するためには、*Sox2* 発現細胞の運命追跡だけでなく、*Prop1* や *Prrx2* 発現細胞の運命追跡が必要であると考えられる。一方で、CAR を用いた解析から、tight junction により維持された 2 様のニッチの存在が明らかとなり、下垂体の幹・前駆細胞の機能と細胞供給機序の解明には、個別の幹・前駆細胞を解析することに加え、ニッチという集団を解析対象とする必要があると考えられる。特に、ニッチ内部で幹細胞性を維持する機序、ならびに適切なタイミングで分化へと誘導する機序の解明には、ニッチを制御するシグナルの解明が重要であると考えられる。以下にこれらのシグナルの候補として、*ephrin/Eph receptor (Eph)* シグナルについて述べる。

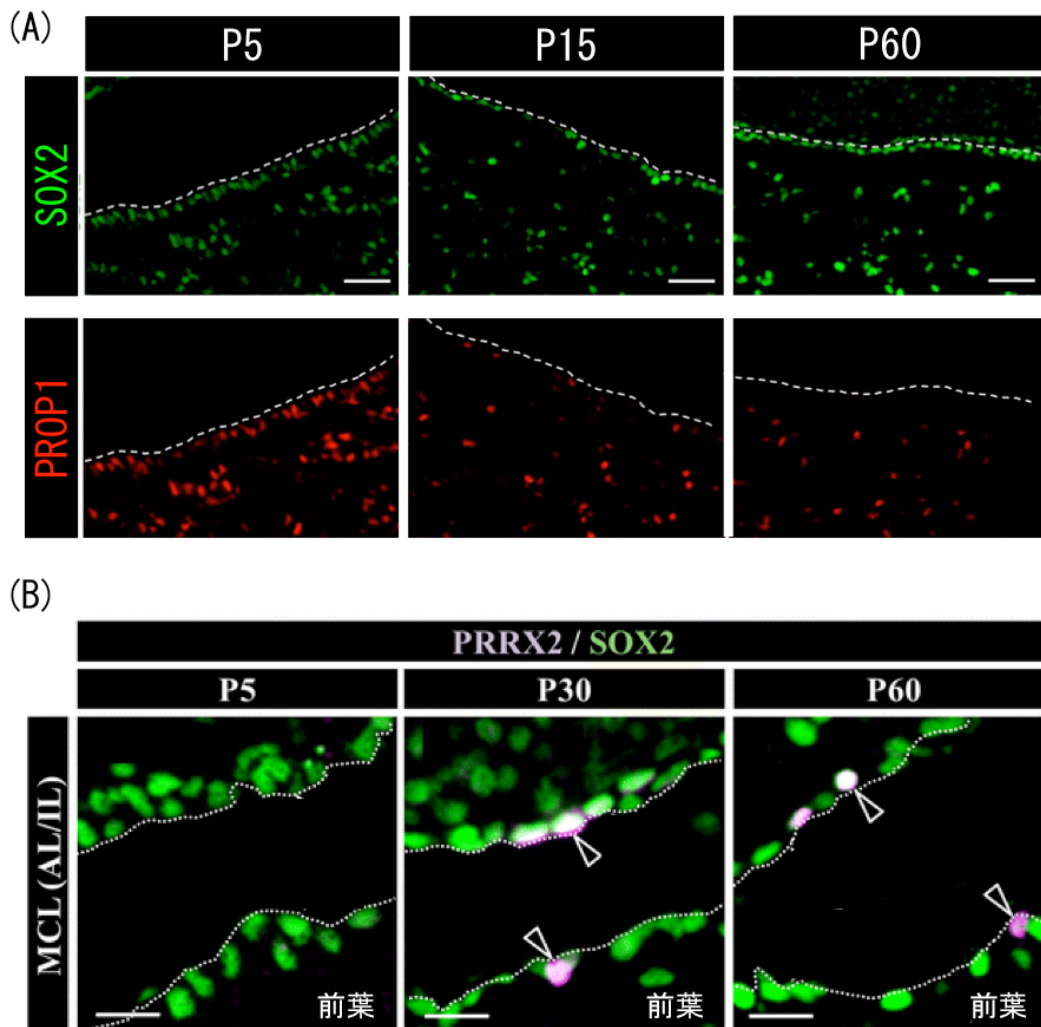


図 15. 下垂体幹・前駆細胞の質的变化

(A) 生後の下垂体における PROP1 (赤) と SOX2 (緑) の共染色像。Marginal cell layer (点線) に存在する PROP1 陽性細胞は、下垂体の成熟につれて減少しているが、実質層では維持される。Scale bar: 50  $\mu$ m。文献(Yoshida et al. 2011)より許諾を得て改変。(B) 生後の下垂体における PRRX2 (紫; 矢頭) と SOX2 (緑) の共染色像を示す。PRRX2 陽性細胞は P30 頃初めて MCL に存在し始める。Scale bar: 20  $\mu$ m。文献(Higuchi et al. 2013)より許諾を得て掲載。



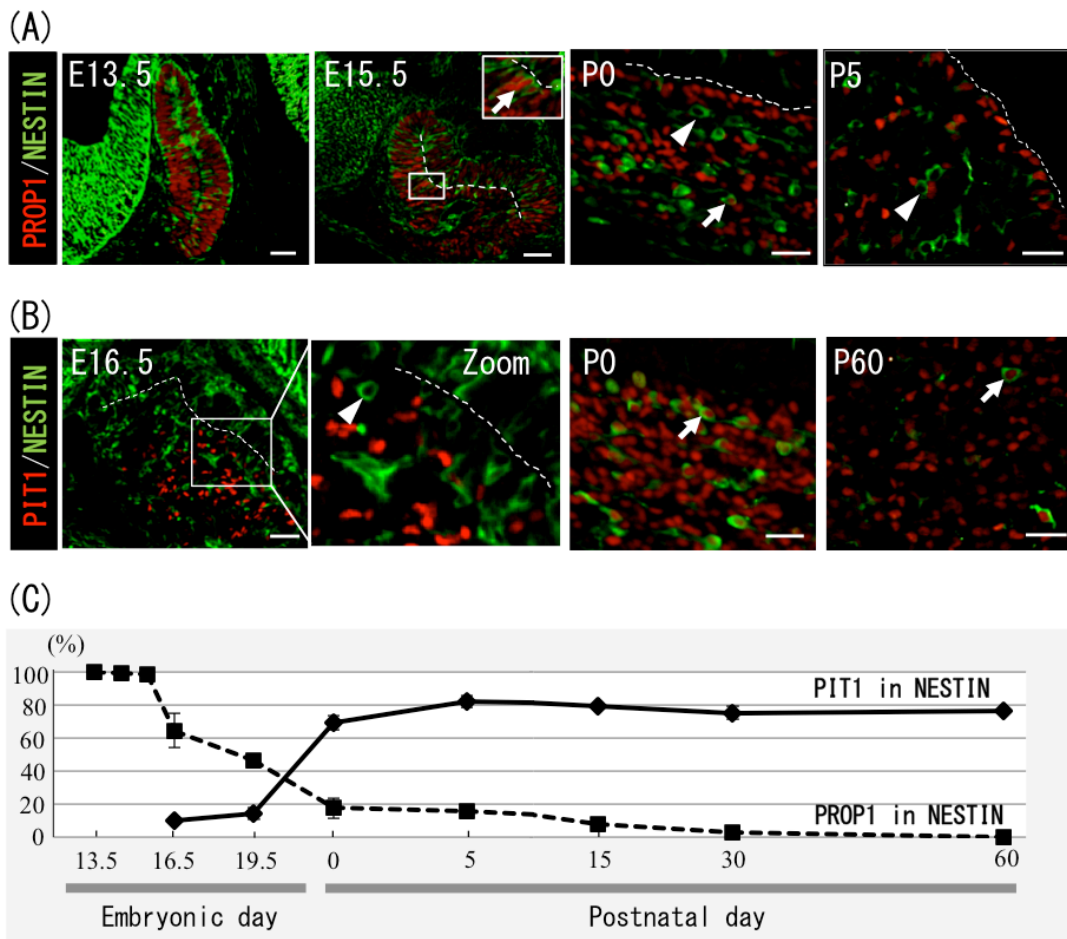


図 16. 下垂体における細胞供給源の解析

(A) NESTIN (緑) と PROP1 (赤)、(B) PIT1 (赤) との共染色像ならびに、(C) 継時的な共存割合の変化を示す。分裂状態の幹・前駆細胞マーカーである NESTIN は、発生過程では PROP1 と高頻度に共存するが、生後の下垂体では共存率が低下する。一方で、出生後では PIT1 陽性のコミットメント細胞が NESTIN 陽性細胞の大部分を占めるように変化する。このことから、細胞供給を担う主要な未分化細胞が変化していると考えられる。Scale bar: 50  $\mu$ m。文献 (Yoshida et al. 2013) より許諾を得て改変。

## 1-8 ephrin/Eph receptor (Eph) シグナル

### 1-8-1 ephrin と Eph の構造と対合性

Eph Receptor (以下、Eph) は膜貫通受容体型チロシンキナーゼファミリー (RTKs) に属し、Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma に発現する RTK をスクリーニングする過程で同定された分子である。一方で、Eph に結合する種々のリガンド分子が発見され、それらは Eph family receptor interacting proteins として、1997 年に ephrin という名称に統一された (Committee 1997; Zhou 1998)。

Eph はそのアミノ酸配列およびリガンドとの親和性により、サブクラス A (EphA) と B (EphB) に分けられ、ほ乳類では 9 種類のサブクラス A (EphA1-8,10) と、5 種類のサブクラス B (EphB1-4,6) が報告されている (Murai and Pasquale 2003) (図 17)。ephrin もその構造的な違いから、サブクラス A と B に分けられ、ほ乳類では 5 種類のサブクラス A (ephrin A1-5) と、3 種類のサブクラス B (ephrin B1-3) が報告されている (図 17) (Pasquale 2005)。基本的には同じサブクラス同士の Eph と ephrin が結合するが、図 17 で示すように、異なるサブクラス間での結合も報告されている (Pasquale 2005)。

EphA 群、ならびに EphB 群の基本構造は共通しており、どちらも一回膜貫通型であり、タンパク質の N 末端側に細胞外結合ドメインが、C 末端側に細胞内ドメインが位置している。シグナリングに関与する細胞内ドメインは tyrosine kinase domain、sterile  $\alpha$  motif (SAM) domain、PDZ-binding domain の 3 種から成る (図 18)。一方で、ephrin の構造はサブクラス間で大きく異なる。ephrin-A 群はグルコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカーを介して細胞膜上に存在している (Xi et al. 2012) (図 18)。対して、ephrin-B 群は

一回膜貫通型タンパク質であり、細胞内ドメインとして、PDZ-binding domain とリン酸化部位を持つ SH2-binding region を有している (Xi et al. 2012) (図 18)。



## 1-8-2 ephrin/Eph シグナルの活性機序

ephrin ならびに Eph を介するシグナリングの特徴は、リガンドが液性因子ではなく細胞膜上に存在する事である。よって、シグナルの活性化には、受容体を発現する細胞と、リガンドを発現する細胞同士が接触することが必要である (juxtacrine)。その結果として、受容体を発現する細胞に伝達されるシグナル (Forward シグナル) だけでなく、リガンドを発現する細胞にもシグナル (Reverse シグナル) が伝達される (図 18)。このように、細胞同士の接着や双方向にシグナルが伝達されるという特徴が、後述する組織の領域化や、ニッチという微小環境の形成、細胞移動などを可能にしている。

また、ephrin と Eph との相互作用は、1 分子間結合ではなく、それぞれがダイマーを形成し、テトラマーとして存在していることが結晶解析の結果から示されている (Himanen et al. 2001)。さらに、膜上に分散する ephrin または Eph を会合により集合化させる事が、活性化に必須であることも証明されている (Davis et al. 1994)。実際に、Eph を発現させた細胞に、可溶性の ephrin を添加しても Eph の細胞内ドメインはリン酸化されない。一方、抗体を用いて可溶性 ephrin を凝集させたものを添加すると、Eph のリン酸化が生じる (Davis et al. 1994)。この結果から、ephrin ならびに、Eph がそれぞれ会合体を形成することが、細胞内ドメインのリン酸化に必須であると考えられる。さらに、この特徴を利用し、ephrin または Eph の可溶性分子、もしくは抗体との凝集体を、生きた組織または細胞に作用させることで、特定のシグナルを活性化、抑制化する実験例が報告されている (Conover et al. 2000; Holmberg et al. 2006)。

また、両者の結合様式には、trans-ならびに cis-interaction という 2 種類の様式が存在する (図 19)。trans-interaction は上述のように、隣接する細胞がそれぞれ ephrin または Eph を発現する様式であり、両細胞へ双方向性のシグ

ナルが伝達される (図 19A)。一方で、cis-interaction は、一つの細胞に ephrin ならびに Eph の両因子を発現している場合であり、同一細胞内で ephrin と Eph の結合が生じ、隣接する細胞との相互作用が妨げられる。その結果、cis-interaction では両シグナルともに不活性化状態になる (図 19B)。

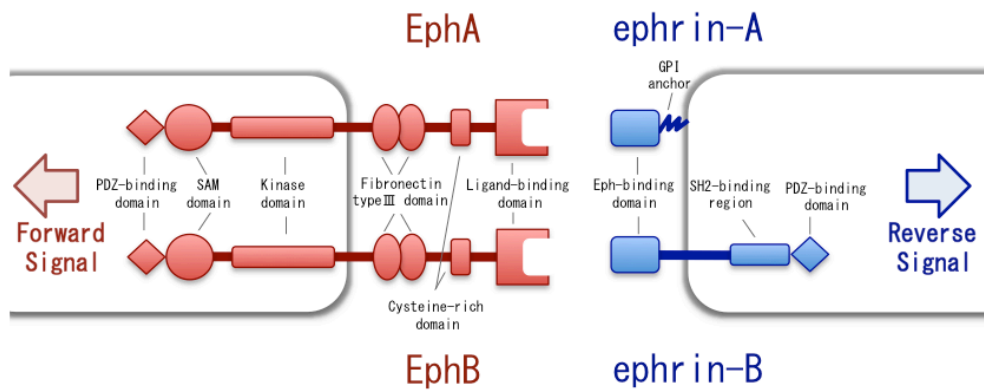


図 18. Eph ならびに ephrin のタンパク質構造

Eph ならびに ephrin のタンパク質構造を模式的に示す。Eph 群ならびに ephrin-B 群は一回膜貫通型であり、ephrin-A 群は GPI アンカーを介して、細胞膜表面に結合している。細胞間で Eph と ephrin がインタラクションすることにより、双方向性 (Forward と Reverse) のシグナルが伝達される。文献 (Xi et al. 2012) より許諾を得て、改変。

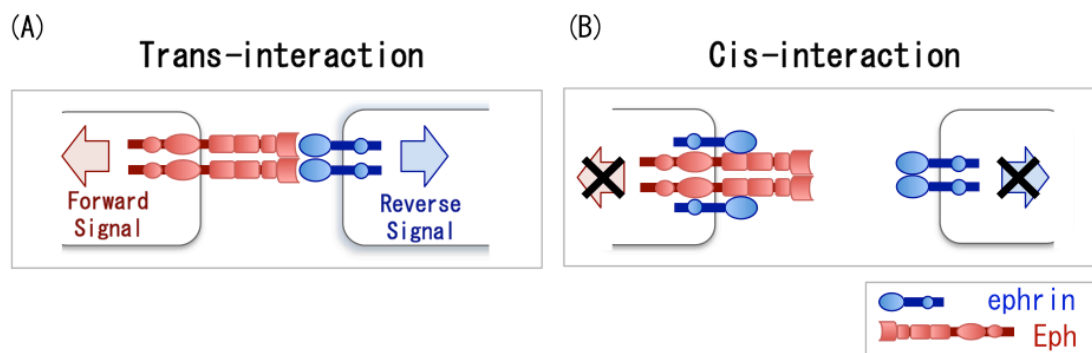


図 19. Eph ならびに ephrin の結合様式

Eph ならびに ephrin の結合様式を模式的に示す。(A) 隣接する細胞のそれぞれに Eph もしくは ephrin が存在する場合、細胞間で Eph と ephrin の trans-interaction が生じ、双方向性 (Forward ならびに Reverse) のシグナルが活性化される。(B) 一つの細胞内で両因子が存在する場合、細胞内で Eph と ephrin の cis-interaction が生じ、シグナルは双方向共に不活性である。



### 1-8-3 ephrin/Eph シグナリング

ephrin/Eph の下流には多くのシグナル分子の関与が報告されている (図 20) (Xi et al. 2012)。EphA の活性化により引き起こされる Forward シグナルでは、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の Ephexin を介して、Small GTPase である RHOA、RAC1、CDC42 が活性化し、それぞれストレスファイバー形成、葉状仮足 (lamellipodia) 形成、糸状仮足 (filopodia) 形成による細胞形態の変化や移動を制御している (図 20A) (Nobes and Hall 1995; Shamah et al. 2001)。EphB の活性化による Forward シグナルでは、GEF である Intersectin や Kalirin の活性化を介し、EphB-intersectin-CDC42 系により細胞移動 (Irie and Yamaguchi 2002) を、EphB-Kalirin-RAC1 系により細胞骨格の再構築、間充織の浸潤、細胞移動を制御することが報告されている (図 20B) (Penzes et al. 2003)。一方、Reverse シグナルの伝達は、細胞内ドメインが欠損している ephrin-A の場合、ephrin-A の集合化による膜貫通型アダプタータンパク質のリクルートにより引き起こされる。その例として、ephrin-A5 は Src-family kinase である FYN をリクルートすることが知られている (図 20C) (Stefanova et al. 1991)。一方で、Eph 同様に、細胞内ドメイン、ならびに PDZ-binding domain を有する ephrin-B 群の Reverse シグナリングは、細胞内ドメインのリン酸化から開始する (図 20D)。ephrin-B/Eph 複合体が形成されると、Src kinase family 分子により、ephrin-B の細胞内ドメインである SH2-binding region 内のチロシン残基がリン酸化される (Arvanitis and Davy 2008)。リン酸化された ephrin-B は、PDZ domain もしくは SH2 domain を有するタンパク質との相互作用が可能となる。その相互作用因子の例として、SH2 domain を有するアダプタータンパク質 Growth Factor Receptor-Bound protein 4 (GRB4) を介し、細胞形態の制御や細胞同士の反発に関与する (Cowan and Henkemeyer 2001)。

また、GTPase-activating protein である PDZ-RGS3 は、ephrin-B1 の PDZ-binding domain を介して結合し、細胞移動の制御や神経前駆細胞の維持に関与する事 (Lu et al. 2001; Qiu et al. 2008)、また、zinc finger homeodomain 型転写因子である ZHX2 の相互作用と、神経前駆細胞維持への関与が報告されている (Wu et al. 2009)。

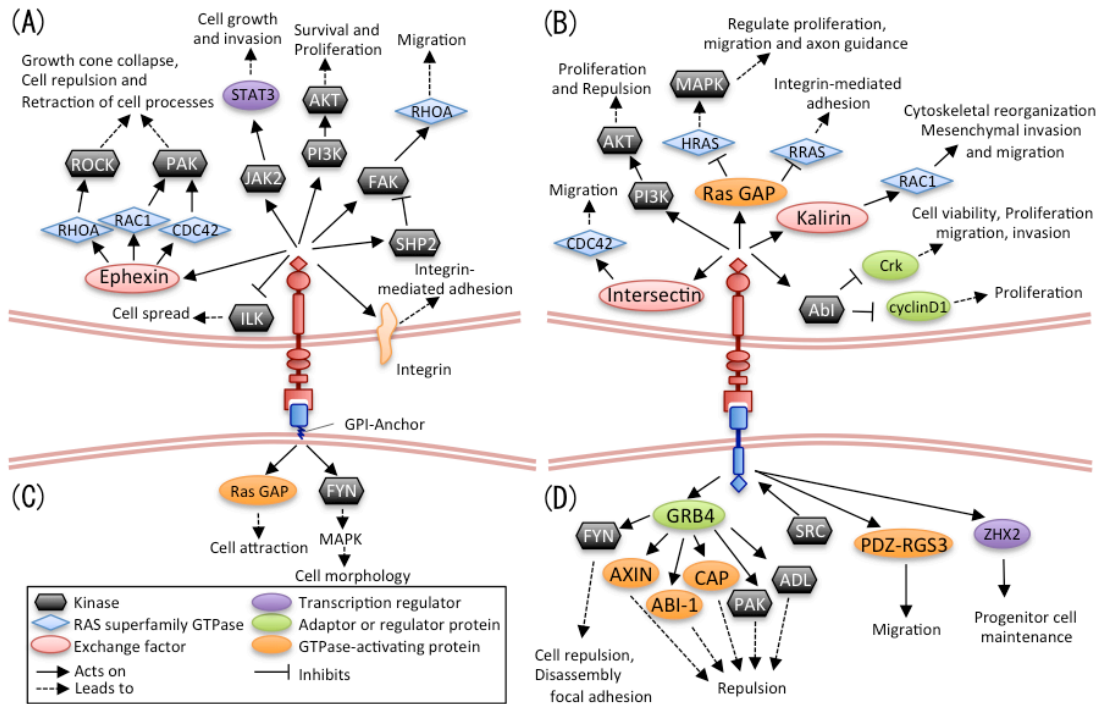


図 20. ephrin/Eph シグナリング

ephrin/Eph シグナルが活性化された際の、Forward ならびに Reverse シグナルを模式的に示す。(A) EphA 群 (赤) が活性化した際の Forward シグナル、(B) EphB 群 (赤) が活性化した際の Forward シグナル、(C) ephrin-A 群 (青) が活性化した際の Reverse シグナル、(D) ephrin-B 群 (青) が活性化した際の Reverse シグナル。文献 (Xi et al. 2012) より許諾を得て、改変。

#### 1-8-4 細胞膜受容体との相互作用

ephrin/Eph は、他の細胞膜受容体との相互作用も知られている。EphA4 は、Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1-4 とヘテロ複合体を形成し、FGFR シグナリングの促進による細胞増殖や移動を正に制御する (Fukai et al. 2008)。また、Wnt の共役受容体である RYK (Receptor-related tyrosine kinase) (Halford et al. 2000; Trivier and Ganesan 2002) や PDZ-binding domain を有し、タイトジャンクションに寄与する Claudin (Tanaka et al. 2005)、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) (Dalva et al. 2000)、メタロプロテアーゼである ADAM10 (Solanas et al. 2011) などとの直接的な相互作用が知られている (Arvanitis and Davy 2008)。

#### 1-8-5 ephrin/Eph シグナルと組織の領域化

1-8-2 に述べたように、ephrin/Eph シグナリングは、細胞接着により活性化され、そのシグナルは ephrin ならびに Eph を発現する両細胞へ伝達される。このような、双方向性のシグナル伝達様式は、発生過程において、様々な形質の細胞が特定の場所へ移動し、定着、個別の細胞集団から成る領域の形成に適した仕組みである。本項では組織の領域化や細胞の移動に着目し、組織形成における ephrin/Eph シグナリングの役割について述べる。

##### 1-8-5-1 ロンボメア形成と Repulsive Guidance

後脳領域の発生過程に生じる分節構造をロンボメアといい、一つ一つのロンボメアから将来、特定の神経細胞が分化する (Kiecker and Lumsden 2012)。従

って、各ロンボメアを構成する細胞が混ざり合う事なく、分節を形成する事が必須であり、このロンボメア形成に *ephrin/Eph* シグナリングが重要な役割を果たしている。ロンボメアにおいて *ephrin* と *Eph* はそれぞれ異なるロンボメアの細胞で発現しており、その例としてロンボメア (r) 2, 4, 6 には *ephrin-B2* が発現し、その受容体である *EphA4* は隣接する r3 と 5 で発現する (Daar 2012; Xu et al. 1995) (図 21A)。つまり、*ephrin-B2* 発現細胞と *EphA4* 発現細胞は **Repulsive Guidance** により互いに反発し合い、混ざり合う事なく、異なるロンボメア領域を形成していると考えられる。この領域化における *ephrin/Eph* の重要性は、ゼブラフィッシュを用いた実験から証明されている (Mellitzer et al. 1999)。蛍光タンパク質と融合した *ephrin-B2* または *EphA4* タンパク質を細胞に過剰発現し、両細胞を混ぜ合わせる。すると、2 種類の細胞が混じり合う事なく、細胞集団の領域が形成される (図 21B)。一方で、*ephrin-B2* または *EphA4* のどちらかの細胞内ドメインを欠損したコンストラクトを過剰発現させると、細胞同士が混ざり合い、領域は形成されない (図 21C)。この結果から、ロンボメア領域の形成には、*ephrin-B2/EphA4* を介した **Repulsive Guidance** による細胞同士の反発が必要である事、また、その際にはどちらか片方のシグナルではなく **Forward** シグナルと **Reverse** シグナルの両方が必要である事が明らかとなった。

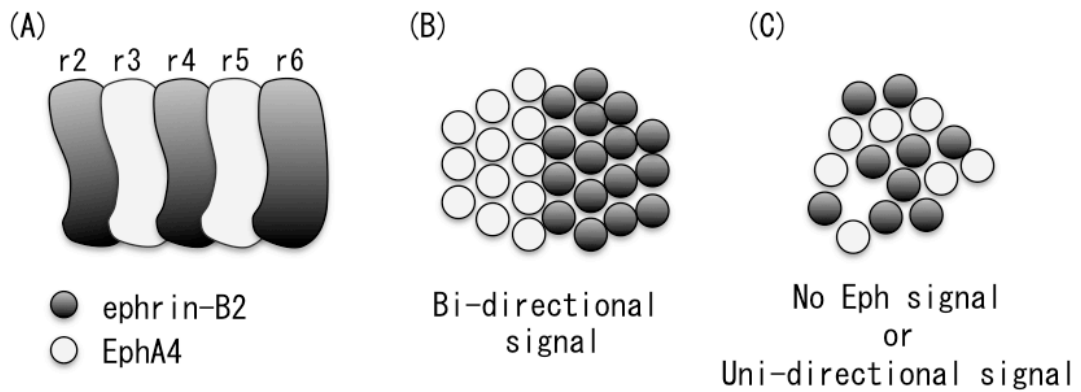


図 21. ロンボメア形成と Repulsive guidance

(A) ロンボメア形成過程における *ephrin* と *Eph* の発現様式を模式的に示す。ロンボメア (r) 2, 4, 6 に *ephrin-B2* が発現し、これらと隣接する r3 と 5 ではその受容体である *EphA4* が発現する。(B) *ephrin-B2* または *EphA4* タンパク質をそれぞれ過剰発現した両細胞を混合すると、2 種類の細胞が混じり合うことなく、細胞集団が形成される。(C) 細胞内ドメインが欠損した *ephrin-B2* または *EphA4* を過剰発現させた細胞同士では、混ざり合い、境界領域が生じない。文献 (Daar 2012) より許諾を得て、改変。

#### 1-8-5-2 血管新生と Attractive Guidance

*ephrin/Eph* シグナルは細胞同士の反発だけでなく、細胞を誘導することにも寄与している。アフリカツメガエルの発生過程において、後主静脈 (*posterior cardinal vein*) からの血管新生によって体節間へ血管が進行することが知られている (Helbling et al. 2000)。この過程において、*ephrin-B1* ならびに *-B2* が体節細胞において発現し、レセプターである *EphB4* が体節と接する後主静脈とそこから派生した体節内静脈 (*intersomitic vein*) の細胞において発現している (図 22)。体節間に血管が新生する際には、*ephrin-B1, -B2* を発現する体節の細胞が、*EphB4* を発現する血管を誘導することで、血管新生のルートが決定される。つまり、*ephrin/Eph* を発現する細胞同士の接触により、細胞の誘導が生じる (図 22) (Helbling et al. 2000)。

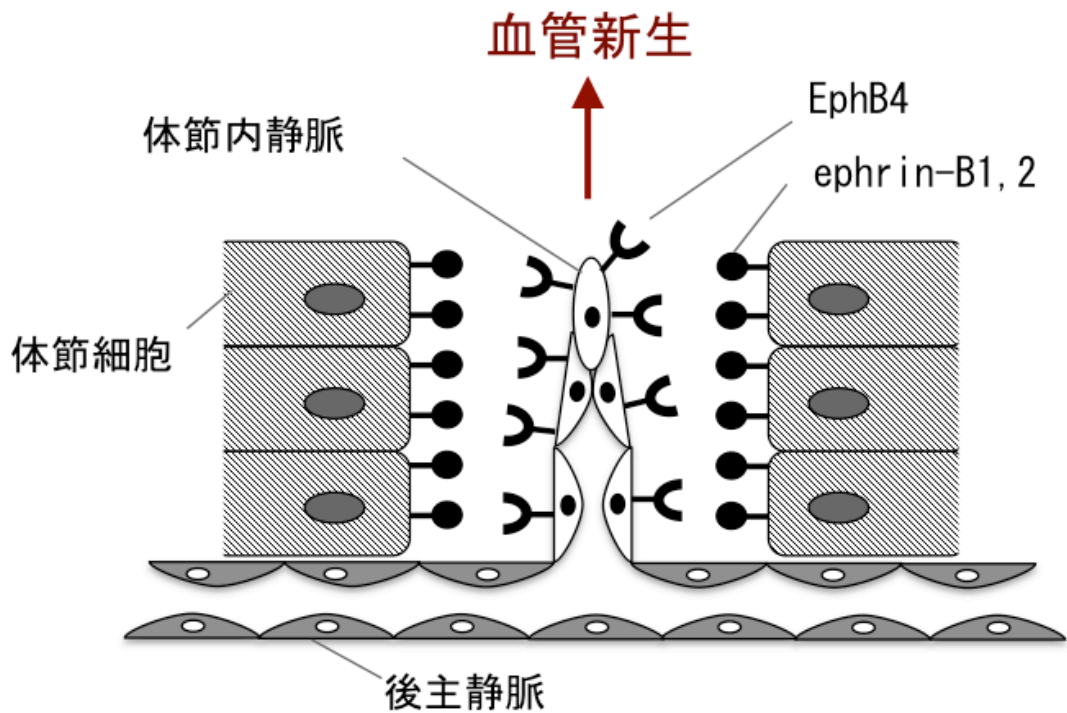


図 22. 血管新生と Attractive guidance

*Xenopus laevis* の発生過程における、後主静脈 (posterior cardinal vein) から体節内静脈 (intersomitic vein) の血管新生を模式的に記す。体節内静脈の血管新生過程において、体節細胞で発現する ephrin-B1, -B2 と、後主静脈で発現する EphB4 の相互作用により、体節の間へ血管が誘導される。



#### 1-8-6 ephrin-B とその対合 Eph 分子による幹細胞ニッチの制御

ephrin/Eph シグナルは組織発生時の領域化に加え、種々の幹細胞ニッチにおいてもその発現が報告され、ニッチという微小環境の領域化ならびに制御に寄与していることが明らかとなってきた。特に、複数のニッチにおいて、ephrin-B とその対合 Eph 分子がニッチの形成、制御に関与するという知見が報告されている。

以下に、その例として、腸管ニッチの陰窩、ならびに脳室のニッチである側脳質上衣下層 (SVZ) に関する、ephrin-B と対合 Eph シグナルの機能について概説する。

##### 1-8-6-1 腸管ニッチ

ephrin/Eph シグナリングは、小腸の幹・前駆細胞をニッチに留めておくことにも寄与している。小腸上皮の構造は、絨毛 (villus) と絨毛間の窪んだ部分 (陰窩; Crypt) に大別される。絨毛は、分化した細胞である吸収上皮細胞や杯細胞から構成され、栄養吸収を担っている。一方で、陰窩は絨毛の根元に存在する窪みであり、その底部に腸上皮を構成する全ての細胞に分化可能な幹細胞と、それを支持するニッチ細胞である Paneth 細胞が存在する (図 23A) (Pitulescu and Adams 2010)。また、現在、小腸の幹細胞は 2 種類提唱されており、一つは Paneth 細胞の間に存在し、増殖の活発な LGR5 陽性の陰窩底部円柱細胞 (CBC) であり、もう一つが、底部から 4, 5 細胞上方に存在する分裂能の低い BMI1 陽性細胞である (Sangiorgi and Capecchi 2008; Tian et al. 2011)。特に、LGR5 陽性の幹細胞の解析が進んでおり、LGR5 陽性幹細胞とニッチ細胞である Paneth 細胞が互いに高い隣接関係にあることが報告されている (Sato et al.

2011)。そして、それらの細胞から数層上方に、分裂状態の前駆細胞が存在する (図 23A)。このように小腸上皮細胞は、陰窩の底部から 2 種類の幹細胞と Paneth 細胞、分裂状態の前駆細胞、そして、分化した細胞という順に、分化度に従い規則正しく配置されている (Pitulescu and Adams 2010)。この分化度に伴う細胞の配置を制御する因子の一つが、*ephrin/Eph* シグナルであり、*ephrin* と *Eph* の発現勾配が、ニッチの維持に重要であることが明らかにされつつある (Batlle et al. 2002; Sato and Clevers 2013)。すなわち、陰窩の底部でのみ発現する Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルにより、ニッチ細胞である Paneth 細胞では *EphB3* が高発現し、幹細胞とそこから数層はなれた増殖前駆細胞では *EphB2* が高発現する (図 23A)。一方で、分化した細胞群では、これら *Eph* の発現は抑制され、代わりに *ephrin-B1* ならびに *-B2* の発現が顕著である (図 23A)。このように *EphB3* ならびに *EphB2* と *ephrin-B1, -B2* の発現量の勾配が形成され、この勾配により領域化が起こる。つまり、*EphB3* 陽性の Paneth 細胞と *EphB2* 陽性の幹細胞は、*ephrin-B1, -B2* 陽性細胞から反発する形で陰窩の底部に保持される。一方で、分化に伴い *EphB2* の発現が減少し、*ephrin-B1, -B2* の発現が上昇するため、分化の進行した細胞は、*Eph* 勾配の高い底部から反発する形で絨毛方向へと移動して行く。実際に *EphB3* ノックアウトマウスでは、ニッチ細胞である Paneth 細胞が底部から移動することや、*EphB2, B3* のダブルノックアウトでは増殖中の前駆細胞と分化細胞の境界が完全に消失し、混ざり合う事が観察されている (Batlle et al. 2002)。

また、この *ephrin/Eph* シグナルを介した細胞の反発機構とニッチの維持に関して、接着分子との関係性も明らかになってきた (Solanas et al. 2011)。小腸の上皮細胞は接着分子である *E-cadherin* をユビキタスに発現し、*E-cadherin* を介した細胞間接着を形成している。さらに、底部に存在する *EphB* 陽性細胞においては、細胞内で *EphB* とメタロプロテアーゼである ADAM10 とが結合して

いる (図 23B)。一方で、分化細胞は *ephrin-B* と *E-cadherin* を発現している。そこで、*EphB* 発現細胞と *ephrin-B* 発現細胞の境界面で、局所的に *EphB* と *ephrin-B* が結合すると、その細胞面でのみ *ADAM10* が活性化し、*E-cadherin* を切断することで、境界面でのみ局所的な細胞間接着の減弱が生じる (図 23B)。しかし、それら細胞の反対面では *E-cadherin* が維持され接着力が保持されることから、その接着力の違いにより境界面において反発が生じると考えられている (Solanas et al. 2011)。

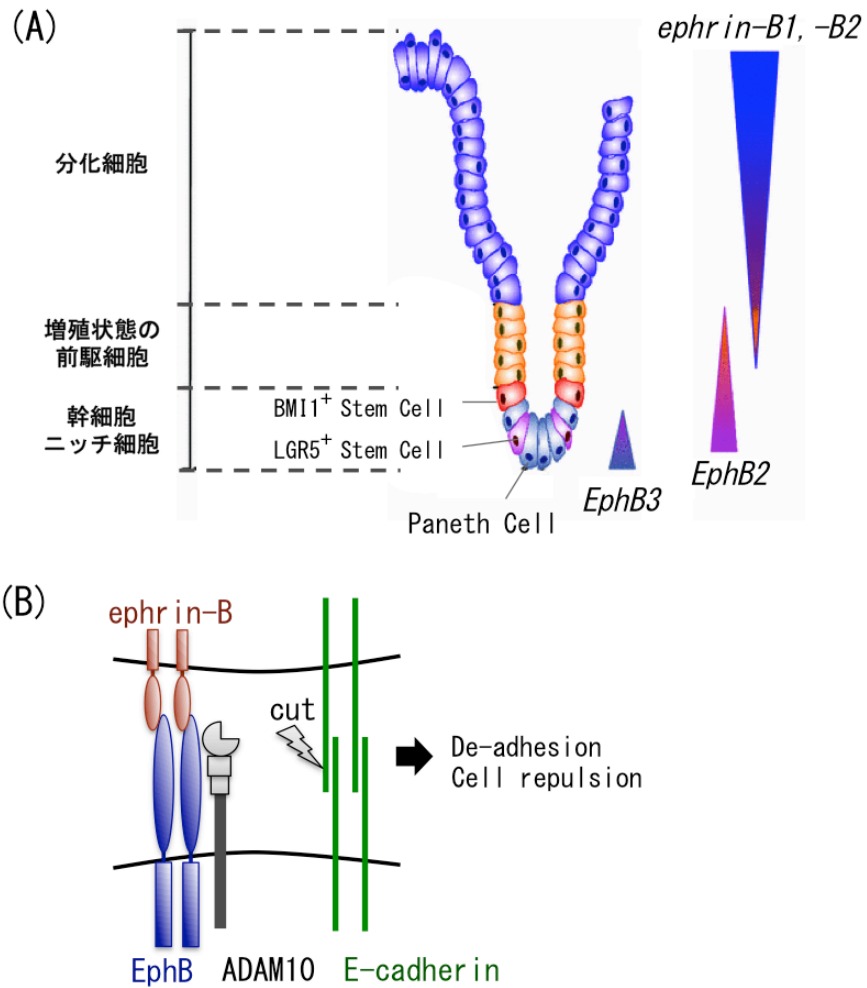


図 23. 小腸ニッチにおける ephrin-B/EphB シグナル

(A) 小腸上皮の細胞構成と、*ephrin-B* と *EphB* の発現様式を模式的に示す。絨毛の根元に存在する陰窩では、底部に 2 種類の幹細胞 (LGR5 ならびに BMI1 陽性細胞) とニッチ細胞である Paneth 細胞が存在し、そこから数層上方に分裂状態の前駆細胞が、さらに上層には分化細胞が存在する。Paneth 細胞では *EphB3* が発現し、幹細胞と前駆細胞では *EphB2* が発現する。一方で、分化細胞では *ephrin-B1, -B2* の発現が高く、*ephrin/Eph* の勾配が形成される。文献 (Genander 2012) より許諾を得て、掲載。(B) *ephrin-B/EphB* と ADAM10 の相互作用によるニッチの維持機構を模式的に示す。*ephrin-B* と *EphB* が複合

体を形成することで、メタロプロテアーゼである ADAM10 が活性化し、E-cadherin の切断ならびに細胞の反発が生じる。この反発により、幹細胞ならびに Paneth 細胞は底部に維持される。文献 (Solanas et al. 2011) より許諾を得て、掲載。

### 1-8-6-2 Subventricular zone (SVZ)

過去には脳におけるニューロンやグリア細胞の新生は、胎仔期に一過的に生じ、成体の脳では行われないと考えられてきた。しかし、現在では、生後の脳においても、側脳室上衣下層 (Subventricular zone: SVZ) ならびに海馬の顆粒細胞下帯 (Subgranular zone: SGZ) といった特定部位においては細胞新生が維持されていることが知られている (図 24A)。中でも、SVZ ニッチにおいて、*ephrin-B/EphB* シグナルと幹細胞維持機構との関わりが解明されつつある。SVZ ニッチを構成する細胞は、脳室に面する一層のニッチ細胞である上衣細胞 (Ependymal cell) と、そこに張り付くように存在する神経幹細胞 (Astrocyte) により構成されている (図 24B)。興味深いことに、組織の損傷時には、これら上衣細胞と神経幹細胞の間で、細胞形質の転換が生じることが報告された (Nomura et al. 2010)。すなわち、どちらかの細胞に損傷が生じた際には、もう一方の細胞が不足した細胞を補い、ニッチを維持する。この機構の制御に *ephrin-B/EphB* シグナルが関わっている。上衣細胞では *EphB1, B2* と *ephrin-B1, -B2* が、神経幹細胞では *ephrin-B1, -B2* が発現していることが、特異抗体ならびにレポーターマウスの解析から確認されている (Conover et al. 2000; Nomura et al. 2010)。側脳室へ可溶性の *EphB2* を注入し、内在性の *ephrin-B/EphB* シグナルを阻害すると、上衣細胞は幹細胞へ、幹細胞は上衣細胞へと運命転換が引き起こされた。また、Forward と Reverse シグナルのどちらがこの機序に関与しているかを、細胞内ドメインを欠損させたドミナントネガティブ型の *EphB* ならびに *ephrin-B* を上衣細胞に過剰発現させ解析した結果、*EphB* のドミナントネガティブ型を導入した際のみ、上衣細胞が幹細胞へと転換した (Nomura et al. 2010)。また、両者のノックアウトマウスの解析からも、*EphB2* 発現細胞内での Forward シグナルが、運命転換を抑制することに寄与

していることを見出した。さらに、正常時では維持されている EphB2 の発現が、脳室周囲の障害時では、顕著に低下することも確認された (Nomura et al. 2010)。

このように、ニッチ細胞と幹細胞は可塑性に富んでおり、どちらかの細胞が障害を受けた際には、互いに補い合う機構が存在すると考えられる。一方で、こうした可塑性は正常時には、両細胞間における ephrin-B/EphB シグナルにより抑制されており、ニッチが維持されていると考えられる。

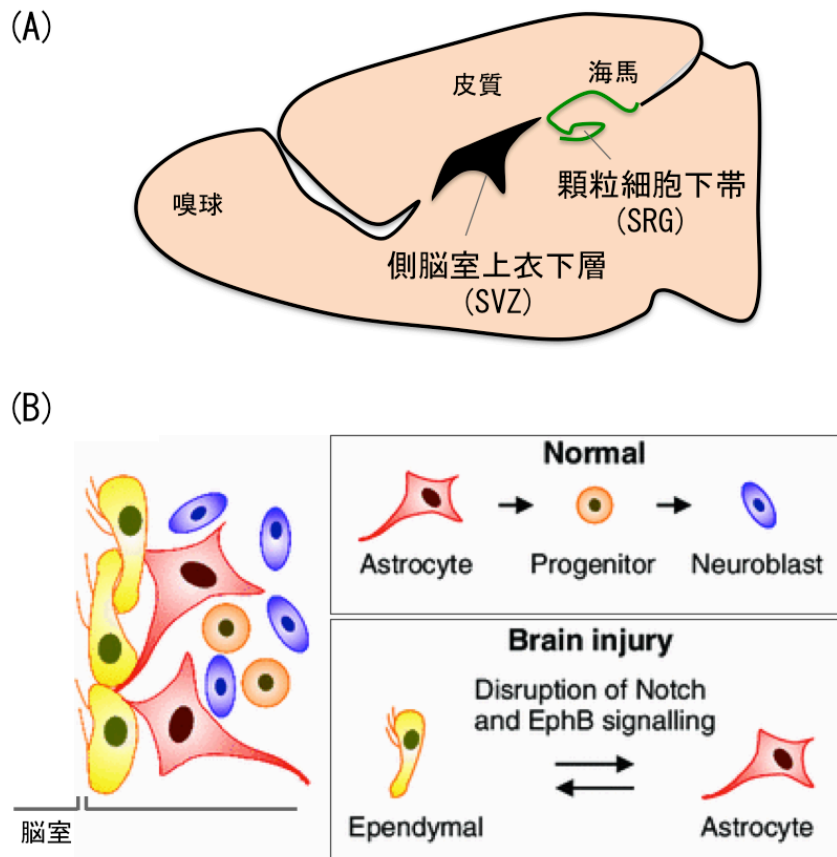


図 24. 脳室ニッチである側脳室上衣下層 (SVZ) における ephrin-B/EphB シグナル

(A) 脳の矢状断面図を模式的に示す。成体の脳には、側脳室上衣下層 (Subventricular zone: SVZ) と顆粒細胞下帯 (Subgranular zone: SGZ) の 2 種類のニッチが存在する。(B) SVZ ニッチの細胞構成を模式的に示す。SVZ ニッチは脳室に面した一層の細胞でありニッチ細胞である Ependymal 細胞と、神経幹細胞である Astrocyte によって構成される。また、どちらかの細胞に傷害が生じた際には、Ependymal 細胞と Astrocyte 間で、細胞の形質転換が生じる。正常時には、この形質転換は ephrin-B/EphB シグナルによって抑制され、ニッチが維持されている。文献 (Genander 2012) より許諾を得て、掲載。



## 1-9 下垂体幹・前駆細胞ニッチに関する本研究の課題

これまでの下垂体幹・前駆細胞の研究から、下垂体の幹・前駆細胞はその由来あるいは分化段階的に一種類ではなく複数種存在すると考えられる。さらに、それら幹・前駆細胞は、MCL と実質層の SOX2 クラスターという 2 様のニッチにおいて、Tight junction を介し維持されていると考えられる。しかしながら、これら幹・前駆細胞ニッチにおいて、その未分化性を維持し、幹・前駆細胞をニッチに留めておく機序、また反対に適切なタイミングでニッチを離脱し、分化へと方向付ける機序は不明である。また、他の多くの組織のニッチにおいて確認されている、幹・前駆細胞と隣接し、幹・前駆細胞を制御する細胞としてのニッチ細胞の下垂体における存在の有無も依然として不明なままである。こうした、下垂体幹・前駆細胞ニッチの細胞構成と制御機構を解明することは、個体の生理的な要求に応じた、幹・前駆細胞からの細胞供給機構を含めた、組織の維持、再生機構を理解する上で重要であると考えられる。

以上の背景に基づき、本研究は Juxtacrine Factor である ephrin/Eph シグナル分子に焦点を当て、ラット下垂体幹・前駆細胞ニッチの細胞構成と、その制御機構に関して解析を進めたものである。

## 第2章 下垂体幹・前駆細胞ニッチで機能する B class ephrin/Eph シグナル分子の探索とその制御機構

### 2-1 緒言

本研究は、下垂体の組織幹・前駆細胞を育む微小環境であるニッチに焦点を当てている。本章では、下垂体に存在する2様のニッチが、tight junction を形成しているという特徴に着目し、細胞間接着を介した ephrin/Eph シグナルという観点から、ニッチの制御機序を解明することを目的としている。

本実験では、Real-time PCR ならびに免疫組織化学的解析から、下垂体のニッチに存在する ephrin ならびにその対合 Eph を同定した。さらに、成体期と出生直後という細胞新生頻度の異なる時期のニッチを比較解析することで、ephrin-B2 Reverse シグナルの活性化が、細胞新生頻度に呼応して制御されていることが示唆された。機能解析など未解明な点が多く残っているが、本章の実験結果は、ephrin/Eph シグナルが下垂体ニッチを制御する可能性を初めて示した解析結果である。

## 2-2 材料および実験方法

### 2-2-1 試料動物

試料動物として雄の Wister-Imamichi 系ラット、ならびに、埼玉大学、井上金治名誉教授より供与して頂いた S100 $\beta$ -GFP Transgenic (TG) ラット (図 25) (Itakura et al. 2007) を使用した。胎齢は雌ラットの膣中に精子が確認できた朝を胎仔期 (E) 0.5 日とした。生後のサンプルは、ジエチルエーテルにより屠殺し、速やかに下垂体を採取した。また、全ての工程は、明治大学 動物実験委員会の指針に則って実施した。

### 2-2-2 RNA 調整と cDNA Library の合成

胎齢 E13.5 (n=15)、E14.5 (n=10)、E16.5 (n=14)、E18.5 (n=11)、E20.5 (n=10) ならびに出生後 (P) 0 日齢 (n=9) のラット全下垂体 (前、中、後葉)、および出生後の各日齢 P5 (n=5)、P15 (n=8)、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。DNase I 処理をした Total RNA 1  $\mu$ g から PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて、添付のプロトコルに従い cDNA Library を合成した。

### 2-2-3 Real-time PCR

Real-time PCR は SYBR Green-Real time PCR Master Mix Plus (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて行った。Template DNA は、cDNA Library 1  $\mu$ l (total

RNA 5 ng 相当) を使用し、プライマー各 0.6  $\mu$ M を含む反応液 20  $\mu$ l 中で反応を行った。PCR は Denaturation (95 °C, 15 sec)、Annealing (62 °C, 15 sec)、Extension (72 °C, 45 sec) の条件で 40 cycle の増幅反応を行った。分析には ABI prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) を使用し、比較  $C_T$  (DDC<sub>T</sub>) 法により、内部標準として TATA box binding protein (*Tbp*) に対する相対値を算出した。使用したプライマー配列を表 2 に示す。

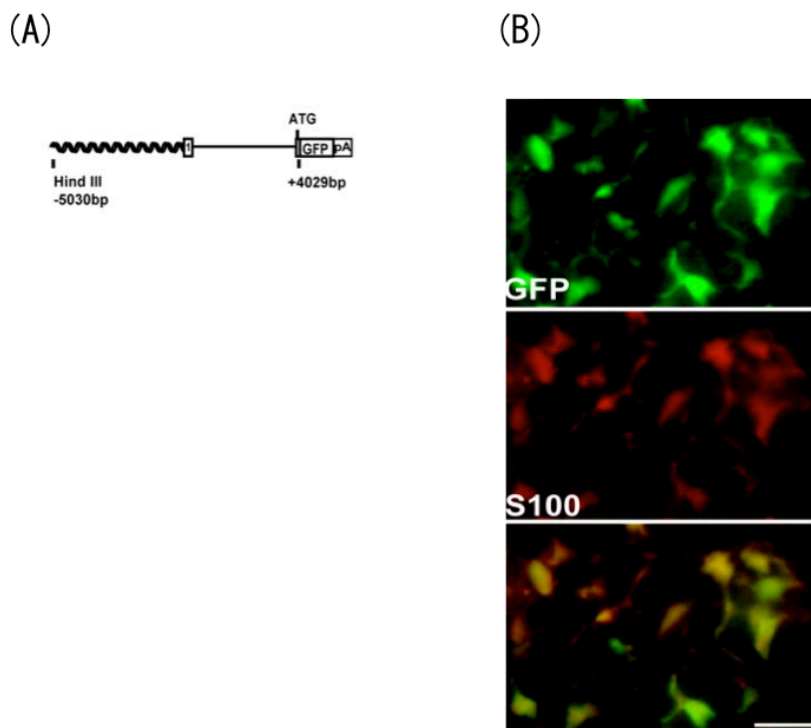


図 25. *S100β*-GFP transgenic ラットのコンストラクトと下垂体の蛍光観察像

(A) *S100β*-GFP transgenic ラットのコンストラクト

第一イントロンを含む *S100β* の promoter を enhanced GFP (EGFP) -simian virus (SV) 40 polyadenylation signal に連結したコンストラクトを用いて Transgenic ラットを作出した。

(B) *S100β*-GFP transgenic ラット下垂体前葉における抗 S100 抗体の蛍光免疫染色像 GFP のシグナル (緑) と抗 S100 抗体 (赤) の陽性シグナルが一致している。文献 (Itakura et al. 2007) より許諾を得て掲載。

表2. Real-Time PCR用 Primerの配列

Gene	Forward primer	Reverse Primer
<i>ephrin-B1</i>	5'-CGTAACGCCTGAGCAGTTG-3'	5'-CCTGGGCCACTCTTCTCTT-3'
<i>ephrin-B2</i>	5'-CCAACAAGACGTCCAGAGC-3'	5'-CCTGCGAATAAGGCCACTT-3'
<i>ephrin-B3</i>	5'-TGTAACCCGAAAACCTGTGT-3'	5'-GGAGGTTGCATTGCTGTTG-3'
<i>EphA4</i>	5'-TGGGCTGAGACAATCCTGA-3'	5'-AGGAACCAAGGAGGGTGTG-3'
<i>EphB1</i>	5'-TACCACCGTGGATGACTGG-3'	5'-TCCTCCCCTAGGAACATCG-3'
<i>EphB2</i>	5'-GTCTGACTTCGGGCTCTCAC-3'	5'-TGGCTGAGGTGAATTTCCGG-3'
<i>EphB3</i>	5'-AAGGATCGGGGTCACCTTG-3'	5'-GGGGATATCACCCCCTCTT-3'
<i>EphB4</i>	5'-GCTCCTTTGAGGTGGTCAGTCA-3'	5'-CTCCTGGCTTAGCTTGGGAC-3'
<i>EphB6</i>	5'-TTCCTTGCTGGACTCTCC-3'	5'-GCTGGAGGAGCTGGATGTT-3'
<i>Tbp</i>	5'-GATCAAACCCAGAATTGTTCTCC-3'	5'-ATGTGGTCTTCCTGAATCCC-3'

#### 2-2-4 リコンビナント ephrin-B2 発現ベクターの構築

rat *ephrin-B2* の CDS 全長をコードする cDNA 配列をタンパク質発現用ベクターである pET32a (Novagen, Darmstadt, Germany) (図 26) に組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) Codon Plus RIPL (Stratagene, La Jolla, Calif., USA) に形質転換し、形質転換体をアンピシリン 50 µg/ml、ストレプトマイシン 12.5 µg/ml、クロラムフェニコール 25 µg/ml で選抜した。

#### 2-2-5 リコンビナント ephrin-B2 タンパク質の精製と SDS-PAGE

リコンビナントタンパク質の発現には、Overnight Express Autoinduction System 1 (Novagen) を使用した。アンピシリン 100 µg/ml、ストレプトマイシン 25 µg/ml、クロラムフェニコール 25 µg/ml を含む 2×YT medium 5 ml 中で 25 °C、8 時間の前培養を行った。その後、培養液 10 µl を Overnight Express Autoinduction System 1 (Novagen)、アンピシリン 100 µg/ml、ストレプトマイシン 25 µg/ml、クロラムフェニコール 25 µg/ml を含む 10 ml の 2×YT medium に継代して 25 °C、16 時間培養し、リコンビナントタンパク質を発現させた。得られた培養液を 1.5 ml チューブに 1 ml ずつ分注し、10,000 rpm、1 分の遠心で上清を除去し、ペレットを回収した。ペレットは使用するまで -20 °C で保存した。

タンパク質の精製は、Mag Extractor His tag (Toyobo) を用いて添付のプロトコルに従い、6 M 尿素を含む変性条件により精製した。精製した rat ephrin-B2-TrxA-His tag ならびに TrxA-His tag は、10 % (w/v) SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて分離後、Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad, Tokyo, Japan) にて染色し、純度ならびに分子量の確

認を行った。



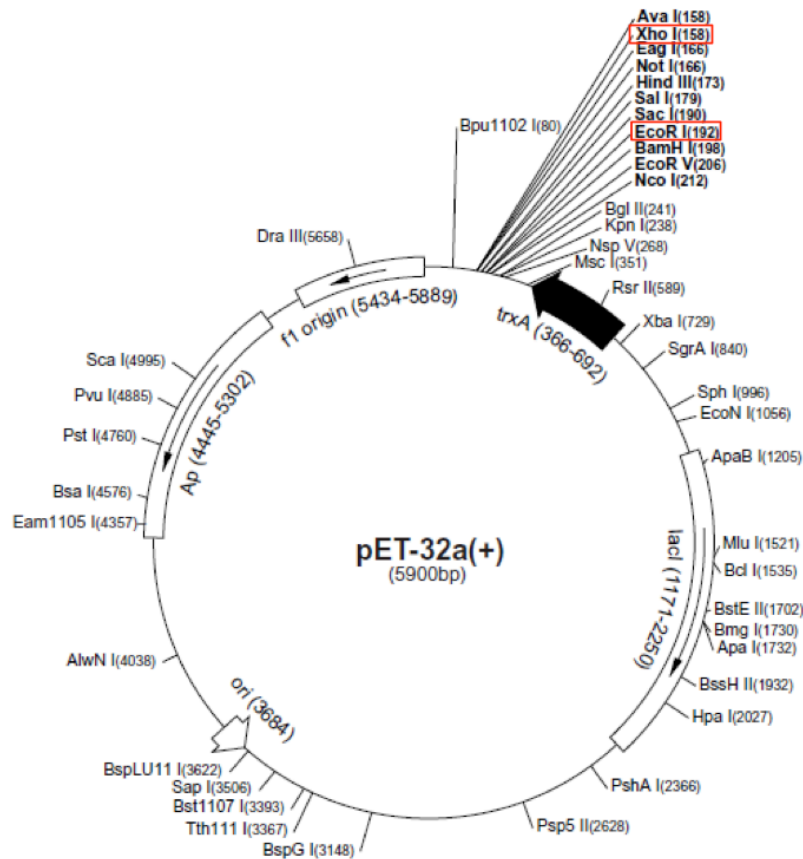


図 26. リコンビナントタンパク質発現用のベクターマップ

大腸菌発現ベクターである pET32a (+) ベクターのマルチクローニングサイト内に EcoR I と Xho I を用いて、*rat ephrin-B2* の CDS 全長を挿入した。挿入した *ephrin-B2* は TrxA tag ならびに His tag とのリコンビナントタンパク質として発現する。Novagen 社のホームページ ([http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-32a-c\\_map.pdf](http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-32a-c_map.pdf)) から転載。

#### 2-2-6 抗 ephrin-B2 抗体の吸収実験

抗 ephrin-B2 抗体 (clone EFR-163M, SIGMA, St. Louis, Mo., USA) の特異性を評価するために、ephrin-B2-TrxA-His tag タンパク質 (60 kDa) または TrxA-His tag タンパク質 (23 kDa) を用いて、mol 比で IgG : リコンビナントタンパク質 = 1 : 5 になるように添加し、室温で 1 時間反応させた。その後、複合体を Mag Extractor His tag (Toyobo) 10  $\mu$ l を用いて除去した。この 2 種類の吸収抗体を用いて、蛍光免疫染色により、抗 ephrin-B2 抗体の特異性を確認した。

#### 2-2-7 蛍光免疫組織化学

採取した下垂体ならびに胎仔は、下記の各種方法により固定し、凍結切片またはパラフィン切片を作製した。また、使用した 1 次抗体に関しては、固定法ならびに賦活化の有無ごとに表 3 に記載した。

表3. 1次抗体と染色条件

Section Type	antigen-retrieval	Antibody description	Vendor	Dilution or Final concentration
95% ethyl alcohol fixed-Cryosection	-	Mouse monoclonal IgG against human ephrin-B2	clone EFR-163M, SIGMA, St. Louis, Mo., USA	1 : 150
		Goat IgG against mouse EphB3	R&D Systems, Minneapolis, MN., USA	1 : 100
		Goat IgG against human EphB4	R&D Systems, Minneapolis, MN., USA	1 : 400
		Goat IgG against human SOX2	Neuromics, Edina, Minn., USA	1 : 500
		Rabbit IgG against human CAR	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA	1 : 500
		Guinea Pig IgG against rat PROP1	Produced by our laboratory	5 ng/ul
		Rabbit IgG against human PIT1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA	1 : 250
		Mouse monoclonal IgG against rat PECAM	BD Biosciences, San Jose, Calif., USA	1 : 30
4% Paraformaldehyde	for 1 h at 80 °C	Goat IgG against human ephrin-B1	R&D Systems, Minneapolis, MN., USA	1 : 50
		Mouse monoclonal IgG against human EphB1	Abcam, Cambridge, UK	1 : 1,000
		Goat IgG against human EphB2	R&D Systems, Minneapolis, MN., USA	1 : 400
		Mouse IgG against human E-cadherin	BD Biosciences, San Jose, Calif., USA	1 : 250
		FITC conjugated Isolectin-B4	Vector, Burlingame, Calif., USA	1 : 100
		Guinea pig antiserum against rat FSH $\beta$	kindly provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK) through the courtesy of Dr. A.F. Parlow	1 : 100,000
		Guinea pig antiserum against ovine LH $\beta$	kindly provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK) through the courtesy of Dr. A.F. Parlow	1 : 20,000
		Guinea pig antiserum against rat PRL	kindly provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK) through the courtesy of Dr. A.F. Parlow	1 : 70,000
		Guinea pig antiserum against rat TSH $\beta$	kindly provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK) through the courtesy of Dr. A.F. Parlow	1 : 100,000
		Guinea pig antiserum against human ACTH	kindly provided by Dr. S. Tanaka at Shizuoka University, Shizuoka, Japan	1 : 50,000
		Guinea pig antiserum against human GH	kindly provided by Dr. S. Tanaka at Shizuoka University, Shizuoka, Japan	1 : 50,000
HOPE fixed-Paraffin section	for 5 min at 120 °C	Mouse monoclonal IgG against human ephrin-B2	clone EFR-163M, SIGMA, St. Louis, Mo., USA	1 : 50
		Goat IgG against human EphB2	R&D Systems, Minneapolis, MN., USA	1 : 400
		Rabbit IgG against human ephrin-B2	SIGMA, St. Louis, Mo., USA	1 : 100
HOPE fixed-Paraffin section	for 1 h at 80 °C	Mouse IgG against human E-cadherin	BD Biosciences, San Jose, Calif., USA	1 : 250
		Chicken IgY against jellyfish GFP	Aves Labs, Tigard, Oreg., USA	1 : 500
HOPE fixed-frozen section	-	Mouse monoclonal IgG against human ephrin-B2	clone EFR-163M, SIGMA, St. Louis, Mo., USA	1 : 150
		Rabbit antiserum against rat PRL	kindly provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK) through the courtesy of Dr. A.F. Parlow	1 : 1,500
		Guinea pig antiserum against ovine LH $\beta$	kindly provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK) through the courtesy of Dr. A.F. Parlow	1 : 2,000
		Guinea pig antiserum against rat TSH $\beta$	kindly provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK) through the courtesy of Dr. A.F. Parlow	1 : 100,000
		Guinea pig antiserum against human ACTH	kindly provided by Dr. S. Tanaka at Shizuoka University, Shizuoka, Japan	1 : 50,000
		Guinea pig antiserum against human GH	kindly provided by Dr. S. Tanaka at Shizuoka University, Shizuoka, Japan	1 : 15,000

+ and - indicate with or without antigen-retrieval using ImmunoSaver (0.05% citraconic anhydride solution, pH 7.4), respectively.

#### 2-2-7-1 エタノール固定

採取した下垂体新鮮組織を、凍結組織用包埋剤のティッシュ・テック O.C.T コンパウンド (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) で包埋し、液体窒素で冷却したアセトン中で凍結した。その後、クリオスタットを用いて、胎仔は矢状断面、生後の下垂体は冠状断面で厚さ 7  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。作製した切片は、HEPES buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5) で洗浄し、あらかじめ -20 °C に冷却した 95% (v/v) エタノールに浸し、-20 °C で 30 分間の固定を行った。固定後の切片は HEPES buffer で洗浄後、免疫染色を行った。

#### 2-2-7-2 4% パラホルムアルデヒド固定

採取した生後の下垂体新鮮組織を、20 mM HEPES を含む 4% (w/v) パラホルムアルデヒド液 (pH7.5) (4% PFA) で、4 °C、24 時間浸漬固定を行った。固定後、20 mM HEPES を含む 30% (w/v) トレハロース溶液 (pH7.5) に置換し、4 °C で組織が沈むまで置換を行った。置換後の組織はティッシュ・テック O.C.T コンパウンドで包埋し、液体窒素で冷却したアセトン中で凍結した。その後、クリオスタットを用いて、冠状断面で厚さ 7  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。切片は HEPES buffer で洗浄後に、免疫染色を行った。また、使用抗体によっては、ImmunoSaver (0.05% citraconic anhydride solution, pH 7.4; Nisshin EM, Tokyo, Japan) を用いて、80°C で 1 時間、または 120°C で 5 分間で抗原の賦活化を行った (表 3)。

#### 2-2-7-3 HOPE 固定パラフィン切片

HOPE system は HEPES-glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect の略であり、タンパク質の架橋を生じること無く、抗原を保持する固定法である。採取した成体下垂体新鮮組織を、HOPE solution I (Polysciences, Warrington, Penn., USA) で 4 °C、24 時間浸漬固定を行った。その後、HOPE solution II を含むアセトン溶液中で、4 °C で 2 時間の処理を 3 回行った。処理後の組織は、低融点パラフィン中で 55 °C で 16 時間処理し、パラフィン包埋を行った後に、冠状断面で厚さ 6 μm に薄切した。作製した成体下垂体パラフィン切片は、脱パラフィン後、ImmunoSaver を用いて、80 °C、1 時間で抗原の賦活化処理を行った。HEPES buffer で洗浄後、免疫染色を行った。

#### 2-2-7-4 HOPE 固定凍結切片

採取した成体下垂体新鮮組織を、HOPE solution I で 4 °C、24 時間浸漬固定を行った。その後、HOPE solution II を含むアセトン溶液中で、4 °C で 2 時間の処理を 3 回行った。処理後の組織は、20 mM HEPES を含む 30% (w/v) トレハロース溶液 (pH7.5) に置換し、4 °C で組織が沈むまで置換を行った。置換後の組織はティッシュ・テック O.C.T コンパウンドで包埋し、液体窒素で冷却したアセトン中で凍結した。その後、クリオスタットを用いて、冠状断面で厚さ 7 μm の凍結切片を作製した。HEPES buffer で洗浄後、免疫染色を行った。

#### 2-2-7-5 蛍光免疫染色

HEPES buffer で洗浄後の各種切片は、10% (v/v) FBS を含む HEPES buffer (Blocking buffer) で 4 °C、1 時間処理した。その後、Blocking buffer で希釈した 1 次抗体 (表 3) を、4 °C、16 時間反応させた。HEPES buffer で洗浄後、

2次抗体（表4）を、4℃、2時間反応させた。洗浄後に HEPES buffer で5倍希釈した VECTASHIELD Mounting Medium with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector, Burlingame, Calif., USA) を用いて核染色ならびに封入を行った。観察は蛍光顕微鏡 Biozero (Keyence, Osaka, Japan) ならびに、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて行った。

表4. 2次抗体と希釈率

Antibody description	Labeling	Vendor	Dilution
Donkey IgG against Mouse IgG	Cy3	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Penn., USA	1 : 500
	Cy5		
	FITC		
Donkey IgG against Rabbit IgG	Cy3		
	Cy5		
Donkey IgG against Goat IgG	Cy3		
	Cy5		
Donkey IgG against Guinea pig IgG	Cy5		
Donkey IgG against Chicken IgY	FITC		
Donkey IgG against Chicken IgY	Cy5		

## 2-2-8 *in situ* hybridization

成体ラット (P60) の Wister Imamichi 系ラットから下垂体を摘出し、4% PFA を用いて、4 °C で 24 時間の固定を行った。固定後、20 mM HEPES を含む 30% (w/v) トレハロース溶液 (pH7.5) に置換し、4 °C で組織が沈むまで置換を行った。置換後の組織はティシュー・テック O.C.T コンパウンドで包埋し、液体窒素で冷却したアセトン中で凍結した。その後、クリオスタットを用いて、冠状断面で厚さ 7 µm の凍結切片を作製した。

RNA probe の作製は、rat *EphA4* CDS の 1 - 812 bp を T7 ならびに T3 プロモーターを持つ pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, Calif., USA) (図 27) に組み込んだプラスミドを作製した。このプラスミドを、それぞれ Xho I または HindIII で切断し 5' 突出にした後、フェノールクロロホルムならびにエタノール沈澱により精製した。次に、それぞれ制限酵素処理物 1 µg をテンプレートとし、Xho I 処理産物に対しては T3 polymerase (Roche, Penzberg, Germany) を、HindIII 処理産物に対しては T7 polymerase (Roche) を使用し、DIG RNA Labeling Mix (Roche) に添付のプロトコルを用いて *in vitro* transcription を行った。産物はエタノール沈澱にて精製し、DIG labeled RNA Probe を作製した。

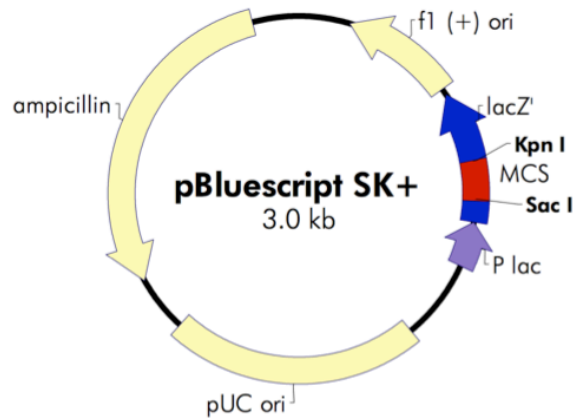
作製した凍結切片は、0.4 µg/ml ProteaseK を含む 0.1 M Tris-HCl 中で、37 °C、2 min の条件で処理した後、4% PFA 中で室温、3 分間の後固定を行った。HEPES buffer で洗浄後、0.25% (v/v) acetic anhydride を含む 0.1 M triethanolamine で室温、10 分間処理した。その後、HEPES buffer で洗浄し、Hybridization buffer : 50% (v/v) formamide、3×SSC、0.12 M PB、1x Denhardt solution、125 µg/ml tRNA、0.1 mg/ml salmon sperm DNA、10% (w/v) dextransulfate を切片に滴下し、57 °C、1 時間の条件で Pre-hybridization を行った。



次に、rat *EphA4* の CDS (1 - 812 bp) に対する Anti-sense ならびに Sense RNA probes を hybridization buffer を用いて 0.8 µg/ml に希釈し、切片上に滴下し、57 °C、16 時間の条件で Hybridization の反応を行った。

Hybridization 後、50% (v/v) formamide を含む 2×SSC 中で 57 °C、15 分、2 回の条件で安定化を行った。2×SSC を用いて 57 °C、15 分の洗浄後、0.2×SSC を用いて 57 °C、15 分、2 回の洗浄を行った。洗浄後、100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.5 (TBS) でリンスし、1.5% (w/v) Blocking reagent (Roche) を含む TBS (Blocking buffer) を滴下し、室温で 30 分間のブロッキングを行った。TBS で洗浄後、予めラット下垂体パウダーで吸収を行った Alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche) を Blocking buffer で 1,000 倍希釈後、切片上へ滴下し、室温で 1 時間反応させた。反応後、0.1% (v/v) Tween 20 を含む TBS (TBS-T) で室温、10 分で 3 回洗浄し、さらに TBS を用いて室温で 5 分、3 回の洗浄後、50 mM MgCl<sub>2</sub> を含む TBS (AP buffer) で室温、5 分間処理した。発色反応は 0.45 µg/µl Nitro blue tetrazolium chloride (NBT) (Roche)、0.175 µg/µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate (BCIP) (Roche) を含む AP buffer を切片に滴下し、4 °C、16 時間で発色させた。観察は蛍光顕微鏡 Biozero を用いて行った。

f1 (+) origin 138-444  
 β-galactosidase α-fragment 463-816  
 multiple cloning site 653-760  
 lac promoter 817-938  
 pUC origin 1158-1825  
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976-2833



**pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601-826)**

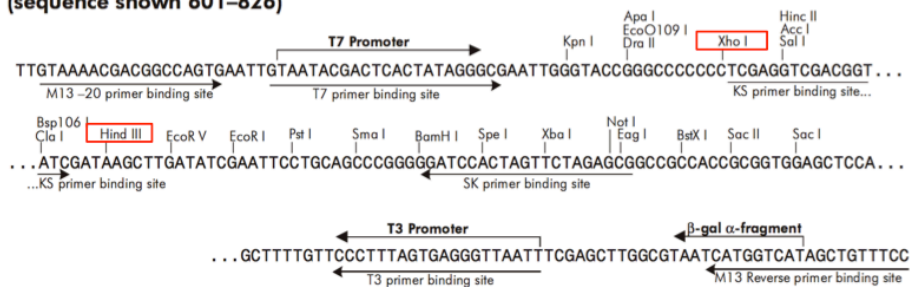


図 27. RNA probe 作製のベクターマップ

T7 ならびに T3 Promoter を持つ pBluescript SK+ に rat *EphA4* CDS の 1-812 bp を組み込み、T7 または T3 promoter を用いて、RNA probe を作製した。クローニングには MCS 中の Xho I と Hind III を用いた。  
[http://www.genomics.agilent.com/files/Vectors/Maps/pdf/pBluescript\\_SK\\_plus.pdf](http://www.genomics.agilent.com/files/Vectors/Maps/pdf/pBluescript_SK_plus.pdf) から転載。

## 2-3 結果

### 2-3-1 下垂体における ephrin-B とその対合 Eph 分子の遺伝子発現解析

小腸のニッチである Crypt や脳のニッチである SVZ では、特に ephrin-B とその対合 Eph が幹細胞の制御に機能している (Genander 2012)。そこで、それらの知見を踏まえ、下垂体における ephrin-B ならびにその対合 Eph 分子の発現を確認した。この解析では、幹細胞の存在割合が高い時期である、出生 0 日目 (P0) の全下垂体 (前、中、後葉) cDNA Library を用いて、3 種類の *ephrin-B* (*B1-3*) ならびに、それらと対合する 6 種類の *Eph* (*A4, B1-4, B6*) の発現を Real time-PCR で解析した。その結果、*ephrin-B* に関しては、下垂体において *ephrin-B1, B2* が発現していることを確認したが、*ephrin-B3* の発現は確認されなかった (図 28)。次に、それら *ephrin-B* の対合分子である 6 種類の *Eph* 発現を解析した結果、下垂体において 6 種類全ての *Eph* が発現していた (図 28)。このことから、下垂体において ephrin-B1 および B2 を介したシグナルが機能している可能性が推測された。

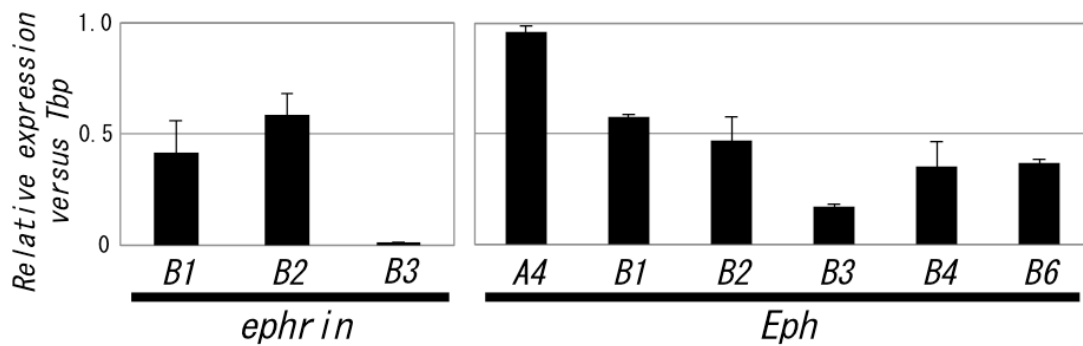


図 28. 生後 0 日目 (P0) 全下垂体における *ephrin-B* とその対合 *Eph* 分子の発現解析

生後 0 日目 (P0) の全下垂体 (前、中、後葉) の cDNA Library を用いて、Real-time PCR により *ephrin-B* とその対合 *Eph* の発現量を定量した。内部標準には *TATA box binding protein (Tbp)* を使用し、*Tbp* に対する相対値で発現量を算出した。N=2 の実験を 2 回行い、mean±SD で測定値を示した。

### 2-3-2 下垂体における ephrin-B1 ならびに B2 の局在解析

下垂体における遺伝子発現解析の結果から、2種類の *ephrin-B* ならびに対合する6種類の *Eph* 分子の発現が確認された。そこで、下垂体幹・前駆細胞ニッチの制御に関与する ephrin-B と対合 Eph 分子を絞り込むために、発現が確認された ephrin-B1 ならびに B2 に対する特異抗体を用いて、成熟下垂体（60日齢）における局在を解析した。まず、ephrin-B1 の局在に関して、小腸のニッチにおける解析(Koo et al. 2009)から、その特異性が証明されている抗体を用いて解析を行った。その結果、下垂体前葉において、円形または楕円形の比較的大きな細胞で陽性シグナルが観察された（図 29）。次に ephrin-B1 陽性細胞の同定を行うために、各種ホルモン抗体との共染色を実施した。その結果、全ての ephrin-B1 陽性細胞は LH $\beta$ 陽性のゴナドトロフであることを確認した（図 29B）。

次に、成体下垂体における ephrin-B2 の局在を解析した。その結果、ephrin-B2 陽性シグナルは下垂体の幹・前駆細胞ニッチである前葉ならびに中葉の MCL で観察された（図 30）。特に中葉の MCL でのシグナルが顕著であった。さらに、前葉の実質層においても、クラスター状の陽性シグナルが確認された（図 30）。

これらの結果から、ephrin-B1 は最終分化細胞の一つであるゴナドトロフで、ephrin-B2 は幹・前駆細胞ニッチで機能していることが推測された。よって、本研究では、下垂体の幹・前駆細胞ニッチの研究を目的とし、ephrin-B2 に焦点を当て解析を行うこととした。

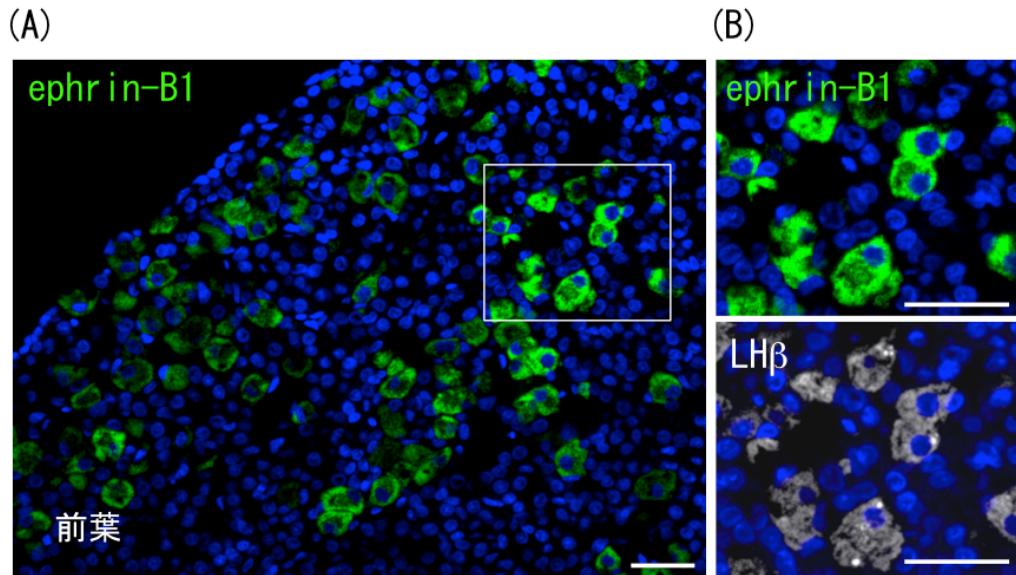


図 29. 成体下垂体 (P60) における ephrin-B1 の免疫組織化学

4% PFA で固定をした 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B1 の局在を二重蛍光免疫染色で解析した。(A): ephrin-B1 の染色像、(B): 白杵の部分拡大した視野の、LH $\beta$  との共染色像を示す。緑 (FITC) : 抗 ephrin-B1 抗体、白 (Cy5) : 抗 LH $\beta$  抗体、青 (DAPI) : 細胞核。Scale bars: 50  $\mu$ m

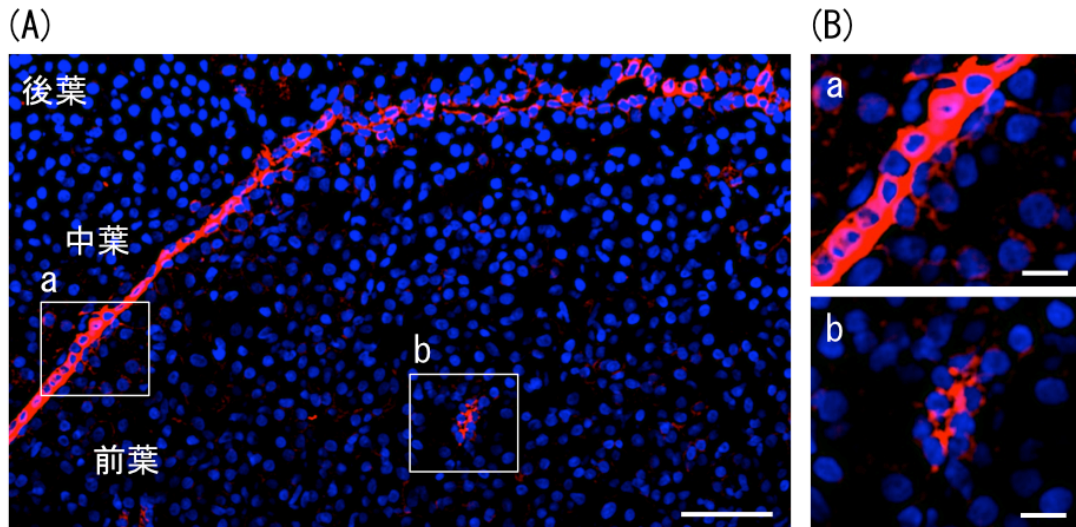


図 30. 成体下垂体 (P60) における ephrin-B2 の免疫組織化学

95% エタノールで固定をした 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 の局在を蛍光免疫染色で解析した。(A):ephrin-B2 の染色像、(B):白樫の部分 (a: MCL, b: 実質層) の拡大像を示す。赤 (Cy3) : 抗 ephrin-B2 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。Scale bars: A ; 50  $\mu$ m、B ; 10  $\mu$ m

### 2-3-3 抗 ephrin-B2 抗体の特異性評価

下垂体における ephrin-B2 の詳細な解析に先立ち、ephrin-B2 抗体の特異性をリコンビナントタンパク質 (rat ephrin-B2-TrxA-His) を用いた吸収実験にて確認した。リコンビナントタンパク質は pET32a に rat *ephrin-B2* の CDS 全長をクローニングし、大腸菌内で発現させ、タグとして付加させた His-tag を利用して精製した。SDS-PAGE の結果から、目的の分子量である 60 kDa (ephrin-B2: 37kDa + TrxA-His: 23 kDa) 付近にバンドを確認した (図 31)。この精製タンパク質 (rat ephrin-B2-TrxA-His)、またはタグのみ (TrxA-His) をあらかじめ反応させた ephrin-B2 吸収抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、TrxA-His で吸収処理を行った抗体では、無処理抗体と同様の陽性シグナルが得られた (図 32A)。一方で、rat ephrin-B2-TrxA-His で吸収処理を行った抗体では、陽性シグナルは完全に消失した (図 32B)。この結果から、本抗体が ephrin-B2 特異的であると判断した。



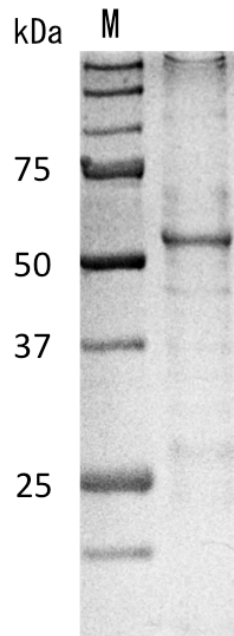


図 31. rat ephrin-B2 リコンビナントタンパク質 (rat ephrin-B2-TrxA-His) の SDS-PAGE

rat *ephrin-B2* の CDS 全長を pET32a にクローニングし、大腸菌内で発現させ、付加した His-tag を利用して精製した。精製タンパク質は 10% SDS-PAGE で分離し、目的の分子量 60 kDa (ephrin-B2: 37kDa + TrxA-His: 23 kDa) であることを確認した。M: 分子量マーカー

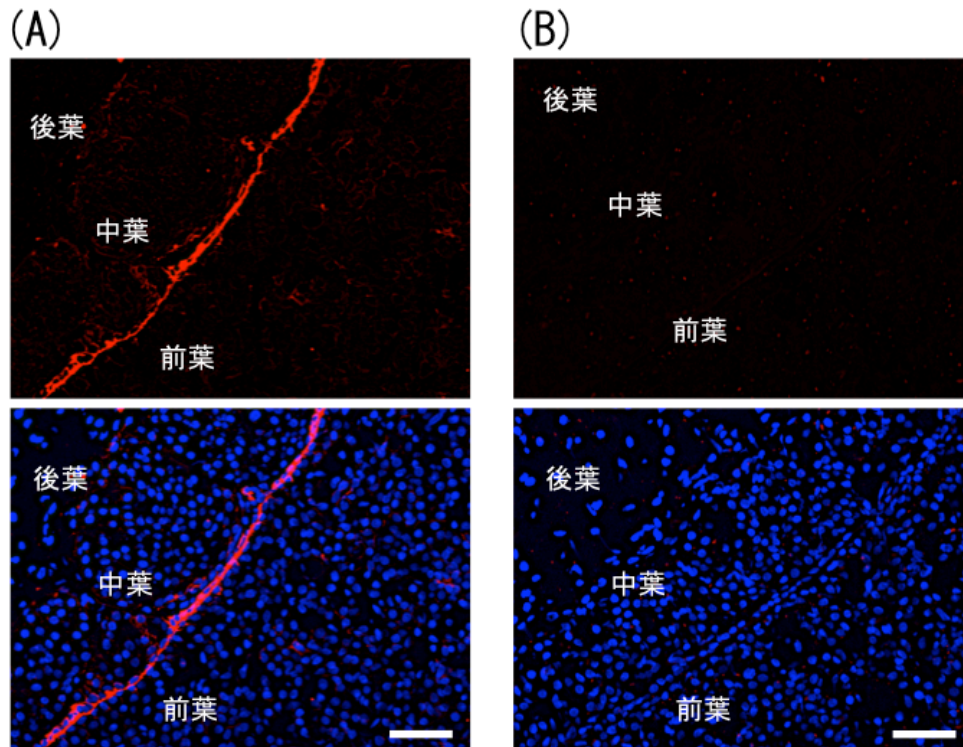


図 32. rat ephrin リコンビナントタンパク質を用いた抗 ephrin-B2 抗体の特異性評価

あらかじめ (A) TrxA-His、または (B) rat ephrin-B2-TrxA-His と反応させ、吸収処理をした抗 ephrin-B2 抗体を使用し、95% エタノールで固定した 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いて蛍光免疫染色を行った。赤 (Cy3) : 抗 ephrin-B2 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。Scale bars: 50  $\mu$ m

#### 2-3-4 下垂体発生過程における *ephrin-B2* 遺伝子の発現解析

2-3-2 から、下垂体幹・前駆細胞と *ephrin-B2* の関係が示唆された。そこで、下垂体形成過程から成体下垂体までの *ephrin-B2* の局在変動を解析するに先立ち、下垂体の発生初期 (E13.5) から成体期 (P60) までの下垂体 cDNA Library を用いて、*ephrin-B2* 遺伝子の発現推移を Real-time PCR で解析した。その結果、*ephrin-B2* は下垂体の原基であるラトケ嚢が形成されるラット E13.5 で既に発現が確認され、発生の進行とともに減少して行く傾向にあった (図 33)。また、生後の下垂体について、前葉と中・後葉で比較してみると、中・後葉で高い傾向を示し、免疫染色の結果と一致した。

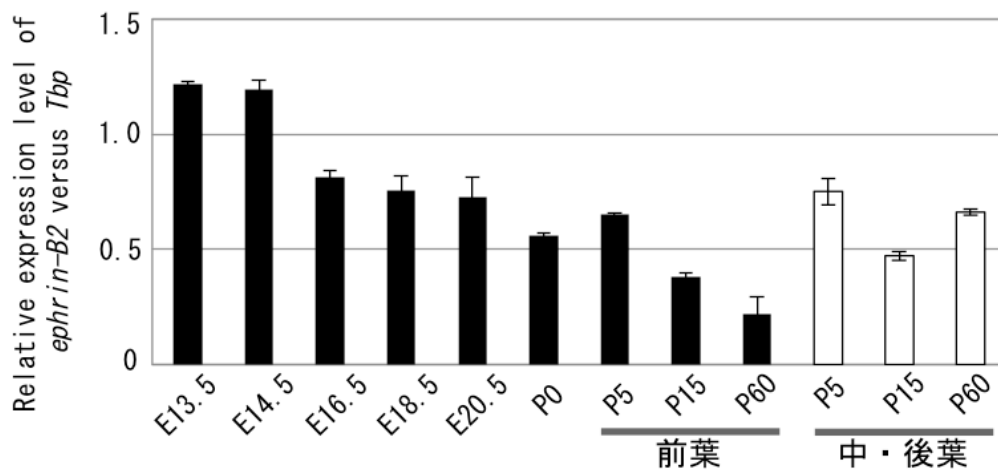


図 33. 発生過程から成体までのラット下垂体における *ephrin-B2* の発現解析

胎仔期から出生直後 (E13.5-P0) の全下垂体 (前、中、後葉)、ならびに生後 (P5、15、60) の前葉または中後葉の cDNA Library を用いて、*ephrin-B2* の発現量を Real-time PCR により定量した。内部標準には *TATA box binding protein* (*Tbp*) を使用し、*Tbp* に対する相対値で発現量を算出した。N=2 の実験を 2 回行い、mean±SD で測定値を示した。

### 2-3-5 下垂体発生過程における ephrin-B2 タンパク質の局在解析

2-3-4 の結果より、*ephrin-B2* は下垂体の発生初期から成体期まで継続的に発現していることから、下垂体形成過程から機能している可能性が示唆された。そこで、下垂体の発生初期から成体期にかけての *ephrin-B2* の局在推移を免疫染色にて解析した (図 34)。

まず、下垂体形成の初期段階である口腔上皮の陥入時期 (ラット E12.5) では、*ephrin-B2* の陽性シグナルは、腹側口腔に面している下層の細胞で強陽性であった (図 34A)。また、細胞内の局在様式には 2 種類存在し、陥入部の先端側 (背側) ではアピカルに局在しているが、陥入部の根元側 (腹側) ではバソラテラルに局在していた (図 34A)。E13.5 では、陥入する底部が閉じて口腔上皮から解離することでラトケ嚢が形成される。E13.5 における局在を観てみると (図 34B)、*ephrin-B2* は下垂体の幹・前駆細胞ニッチであり、CAR が特異的に局在する MCL で陽性であった。加えて、将来の隆起葉となるロストラルチップ (RT) でも陽性であった。また、MCL とロストラルチップでは、細胞内局在に違いがあり、MCL では極性を持ち、主に腔に面したアピカル側に存在していた。一方で、ロストラルチップでは、極性を示さなかった (図 34B)。次に、前葉部において最終分化細胞である ACTH 産生細胞や、PIT1 系譜へと方向付けられたコミットメント細胞が出現する下垂体発生中期の E16.5 では、E13.5 で観察されたロストラルチップでの *ephrin-B2* 陽性シグナルは顕著に減少していたが (図 34C)、MCL のシグナルは維持されていた (図 34C)。さらに発生が進行し、全ての系譜のホルモン産生細胞が観察される E19.5 ならびに生後直後 (P0) では、*ephrin-B2* 陽性シグナルは、MCL ならびに中葉の小葉 (ACTH 陽性細胞で構成される) の間に収束した (図 34D, E)。この中葉における小葉の間は、SOX2 陽性の幹・前駆細胞が密集している部位である (Data not shown)。

次に、生後の下垂体に関して、P3 ならびに P15 の下垂体を解析した。P3 は 1-6-3-5 で述べた CAR の解析結果から、MCL に一層に存在していた幹・前駆細胞が、MCL の直下に多層化した MCL zone を形成し、その後、EMT と MET により、実質層へと移動することが示唆されている時期である (Chen et al. 2013) (図 14)。その時期における ephrin-B2 の局在を解析すると、ephrin-B2 の細胞内局在がアピカルからバソラテラルに変化し、MCL の直下に ephrin-B2 陽性細胞が多層化し MCL zone を形成する様子が観察された (図 34F)。さらに、生後の Growth wave が生じている時期である P15 では、P3 で観察された多層化した極性を示さない ephrin-B2 陽性シグナルは消失し、一方で、実質層にクラスター状の陽性シグナルが観察された (図 34G)。この P15 の陽性シグナルは、図 30 で示した、成体下垂体 (P60) における局在様式とほぼ同様であり、MCL に加え、前葉実質層にクラスター状に存在した。

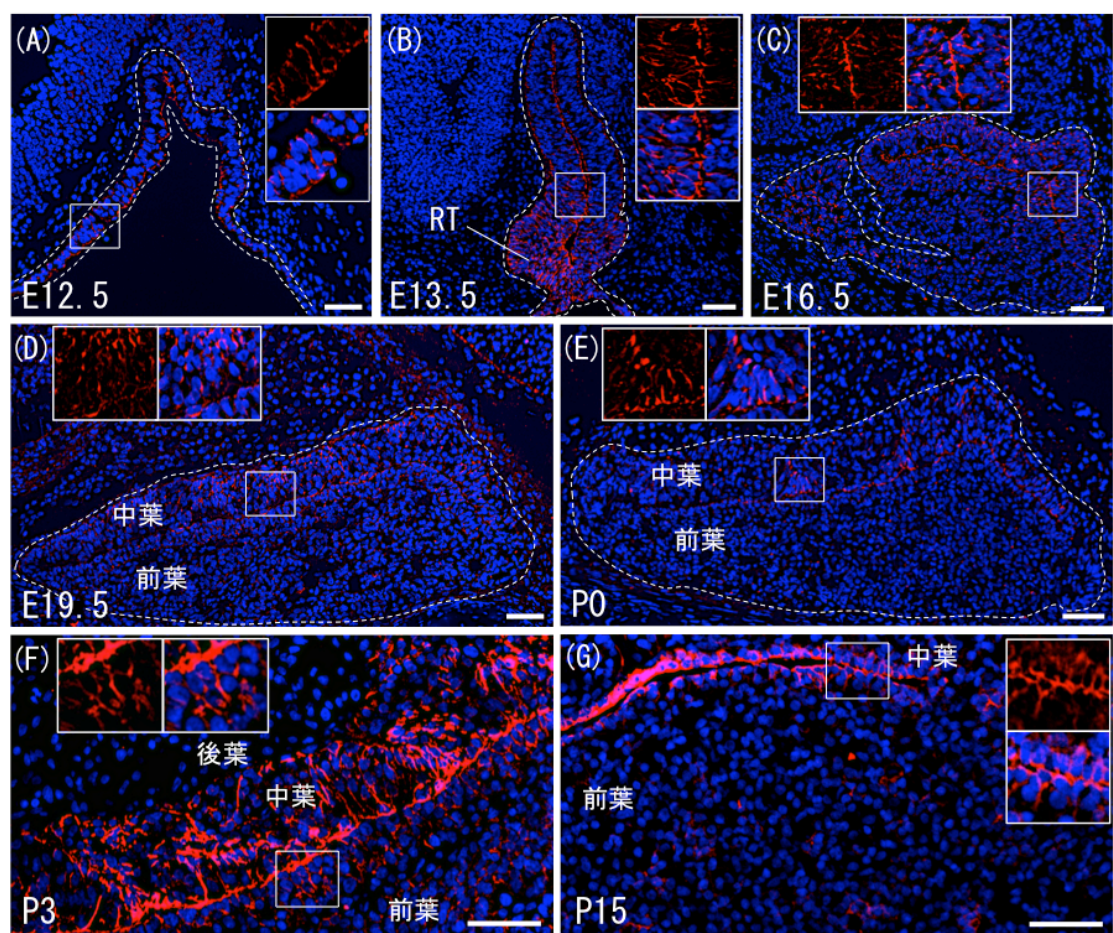


図 34. 下垂体形成過程における ephrin-B2 の免疫組織化学

95% エタノールで固定をした発生過程から生後 15 日までの下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 の局在を蛍光免疫染色で解析した。(A)E12.5, (B)E13.5, (C)E16.5, (D)E19.5, (E)P0, (F)P3, (G)P15。白枠の部分は各時期の拡大像を示す。赤 (Cy3) : 抗 ephrin-B2 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。RT : ロストラルチップ。

Scale bars: 50  $\mu$ m

### 2-3-6 成体下垂体における ephrin-B2 陽性細胞の特性解析

2-3-5 で述べたように、下垂体の発生過程を通じ ephrin-B2 の局在は変化しながら、最終的には幹・前駆細胞ニッチと考えられる MCL と実質層に存在するクラスターに収束していた。この結果から、ephrin-B2 と幹・前駆細胞ニッチの関与が強く推測された。そこで、成体下垂体における ephrin-B2 陽性細胞の特性解析を目的に、最終分化細胞マーカー（各種ホルモン）、濾胞星状細胞マーカーである S100 $\beta$ 、下垂体幹・前駆細胞マーカー SOX2、E-cadherin、CAR ならびに下垂体特異的転写因子 PROP1 抗体を用いた共染色を行った。

#### 2-3-6-1 ホルモン産生細胞ならびに S100 $\beta$ 陽性細胞における ephrin-B2 の局在解析

まず、成体下垂体（P60）を用いて、ephrin-B2 と各種ホルモン抗体との共染色を行った。結果、下垂体前葉において、ephrin-B2 は、いずれのホルモン産生細胞においても陰性であった（図 35）。

次に、非ホルモン陽性細胞の多くを占める S100 $\beta$ 陽性濾胞星状細胞における局在を解析するために、S100 $\beta$ -GFP TG ラット (Itakura et al. 2007) を用いて解析を行った。S100 $\beta$ 陽性細胞群は複数のポピュレーションを有し、その一部には SOX2 陽性の幹・前駆細胞を含んでいる (Yoshida et al. 2011)。S100 $\beta$ -GFP TG ラットを用いた解析の結果、多くの ephrin-B2 陽性シグナルと GFP との共存が確認された（図 35）。特に、実質層にクラスター状に存在する ephrin-B2 陽性シグナルは、高頻度に S100 $\beta$ -GFP と共存していた。



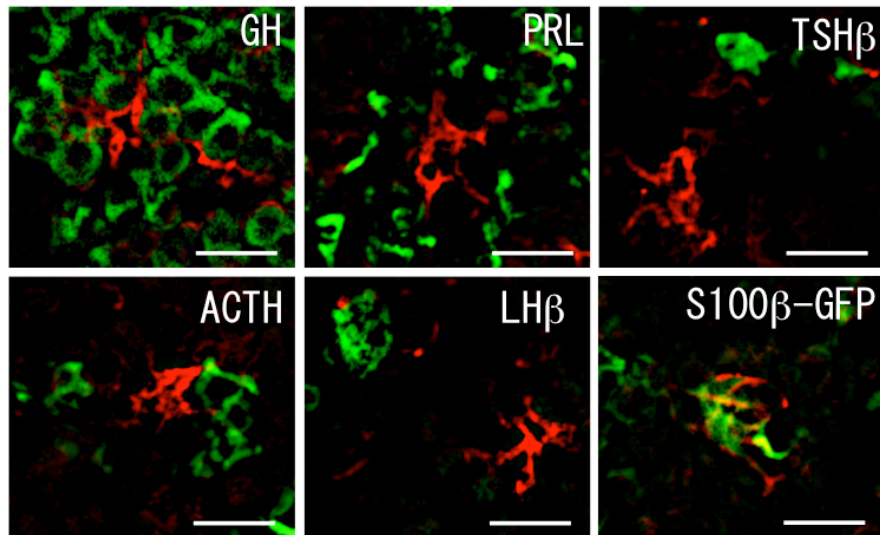


図 35. ホルモン産生細胞ならびに S100 $\beta$ 陽性細胞における ephrin-B2 の免疫組織化学

HOPE で固定をした 60 日齢の正常ラットまたは S100 $\beta$ -GFP トランスジェニックラット成体下垂体凍結切片またはパラフィン切片を用いて、ephrin-B2 と各種ホルモンまたは GFP との局在を二重蛍光免疫染色で解析した。赤 (Cy3)：抗 ephrin-B2 抗体、緑 (Cy5)：各種抗下垂体ホルモン抗体または抗 GFP 抗体、青 (DAPI)：細胞核。Scale bars: 20  $\mu$ m

### 2-3-6-2 幹・前駆細胞における ephrin-B2 の局在解析

ephrin-B2 陽性細胞の多くは非ホルモン産生の S100 $\beta$ 陽性細胞であること、また、S100 $\beta$ 陽性細胞の一部は、下垂体の幹・前駆細胞であること (Yoshida et al. 2011) から、次に幹・前駆細胞マーカーとの共染色を行った。まず、下垂体の幹・前駆細胞での発現が確認されている転写因子 SOX2 との共染色の結果、MCL において ephrin-B2 陽性細胞のほぼ全てが SOX2 陽性であった (図 36)。また、実質層においてクラスター状に存在する ephrin-B2 陽性細胞も SOX2 陽性であった (図 36)。一方で、少数ではあるが、実質層において SOX2 陰性の ephrin-B2 細胞も確認された (図 36 矢印)。また、SOX2 単独陽性シグナルも確認されたが、その多くがクラスター状に集合している SOX2 陽性細胞ではなく、実質層内に散在する傾向にあった (図 36 矢頭)。

次に、上皮細胞マーカーであり、下垂体において SOX2 との共存が確認されている接着分子 E-cadherin (Fauquier et al. 2008) との共染色を行った。その結果、MCL ならびに実質層のクラスターに局在する ephrin-B2 陽性シグナルは、E-cadherin と共存することを確認した (図 37)。

また、陳らの報告 (Chen et al. 2013) から下垂体の幹・前駆細胞ニッチのマーカーと考えられる CAR と ephrin-B2 の局在を解析した結果、ephrin-B2 陽性シグナルは CAR とも共存することを確認した (図 38)。

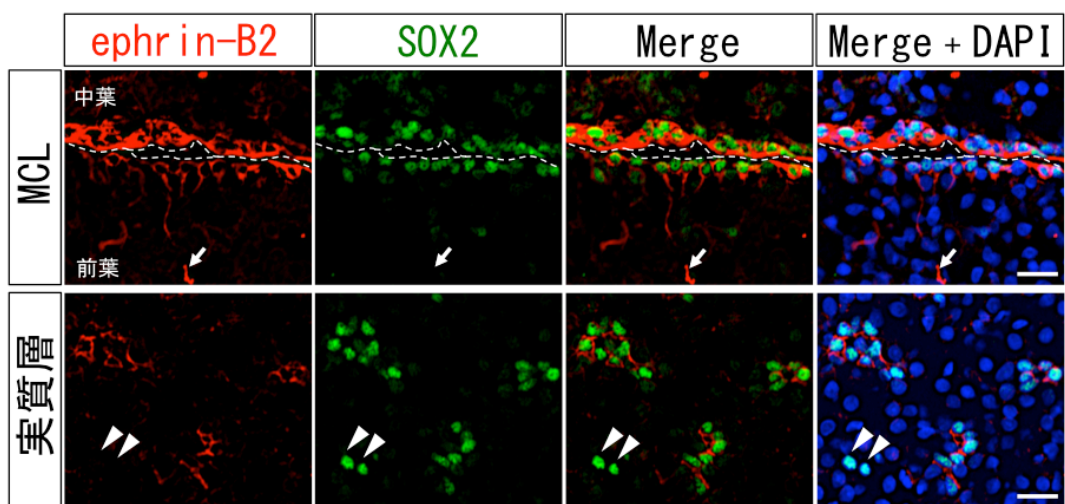


図 36. SOX2 陽性幹・前駆細胞における ephrin-B2 の免疫組織化学

95% エタノールで固定をした 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 と SOX2 との局在を二重蛍光免疫染色で解析した。赤 (Cy3) : 抗 ephrin-B2 抗体、緑 (Cy5) : 抗 SOX2 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。矢印 : ephrin-B2 単独陽性細胞、矢頭 : SOX2 単独陽性細胞。点線 : MCL (Marginal cell layer)。

Scale bars: 20  $\mu$ m

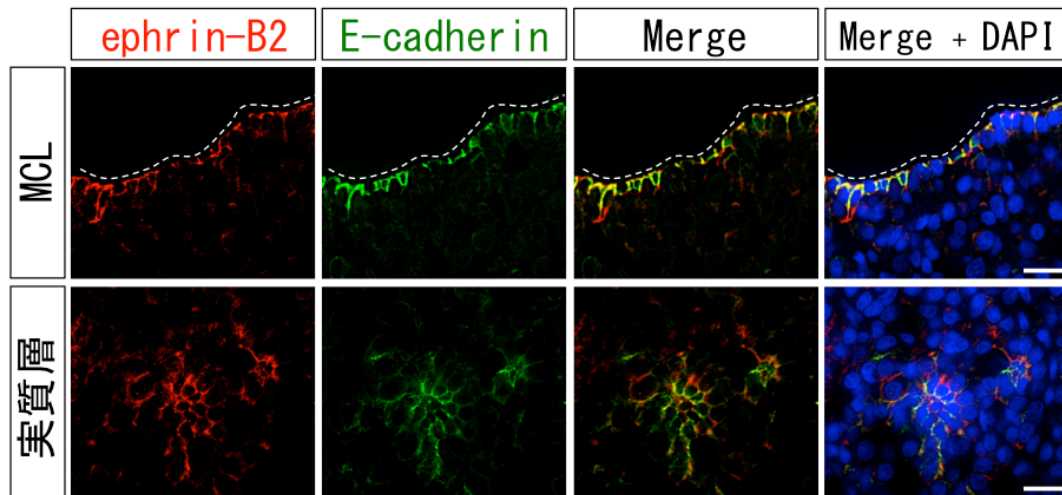


図 37. E-cadherin 陽性幹・前駆細胞における ephrin-B2 の免疫組織化学

HOPE で固定をした 60 日齢の成体下垂体パラフィン切片を用いて、ephrin-B2 と E-cadherin との局在を二重蛍光免疫染色で解析した。赤 (Cy3)：抗 ephrin-B2 抗体、緑 (Cy5)：抗 E-cadherin 抗体、青 (DAPI)：細胞核。点線：MCL (Marginal cell layer)。Scale bars: 20  $\mu$ m

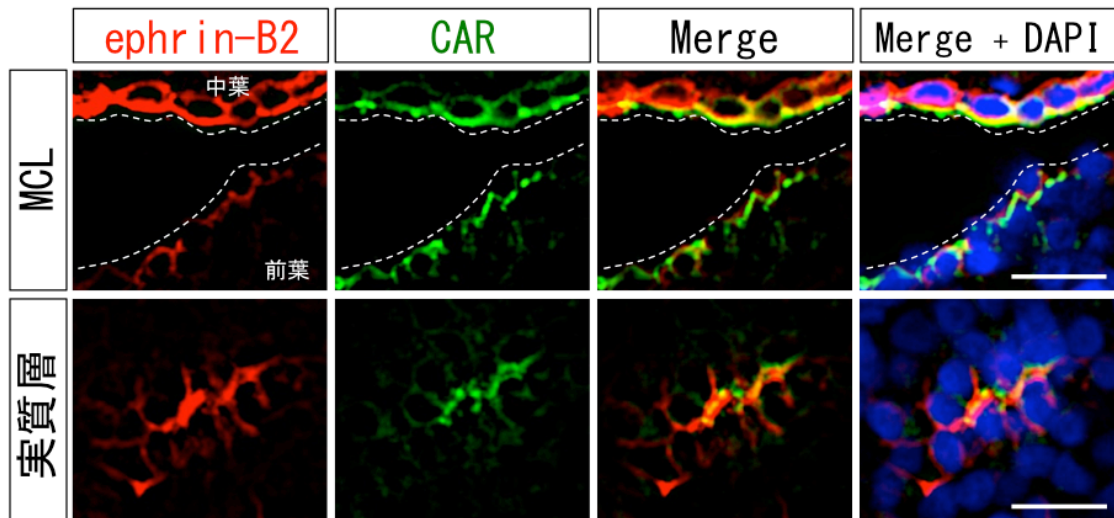


図 38. CAR 陽性幹・前駆細胞における ephrin-B2 の免疫組織化学

95% エタノールで固定をした 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 と CAR との局在を二重蛍光免疫染色で解析した。赤 (Cy3) : 抗 ephrin-B2 抗体、緑 (Cy5) : 抗 CAR 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。点線: MCL (Marginal cell layer)。Scale bars: 20  $\mu$ m

### 2-3-6-3 前駆細胞における ephrin-B2 の局在解析

これまでの我々の研究結果から、下垂体幹・前駆細胞は均一な細胞集団ではなく、種々の転写因子の発現パターンにより、質的あるいは分化段階の異なる集団である可能性が示唆されている (Higuchi et al. 2013; Yoshida et al. 2011)。なかでも、下垂体特異的転写因子である PROP1 陽性の幹・前駆細胞は、主として胎仔期の幹・前駆細胞として機能していると考えている (Yoshida et al. 2011)。また、*Prop1* は SOX2 陽性の幹細胞において発現が開始することから、PROP1/SOX2 両陽性細胞は、SOX2 単独陽性細胞よりも、分化段階的に進行した前駆細胞とも考えられる (Yoshida et al. 2009)。そこで、実質層における ephrin-B2 陽性の幹・前駆細胞を、PROP1 の存在の有無により分類することを試みた。ephrin-B2、SOX2 ならびに PROP1 の三重染色から、ephrin-B2 陽性の幹・前駆細胞ニッチには、Type A: ニッチを構成する細胞の一部が PROP1 陽性の集団、Type B: 構成する全ての細胞が PROP1 陽性の集団、ならびに Type C: 構成する全ての細胞が PROP1 陰性の集団の 3 種類に分類された (図 39A)。また、それら 3 種類の実質層ニッチにおける存在割合を計測した結果、Type A:  $66.6 \pm 3.3\%$ 、Type B:  $24.2 \pm 5.2\%$ 、Type C:  $9.2 \pm 2.0\%$  であり、実質層に存在する ephrin-B2 陽性のニッチは、PROP1 陽性細胞を含む Type A と B で約 90% を占めることが明らかとなった (図 39B)。

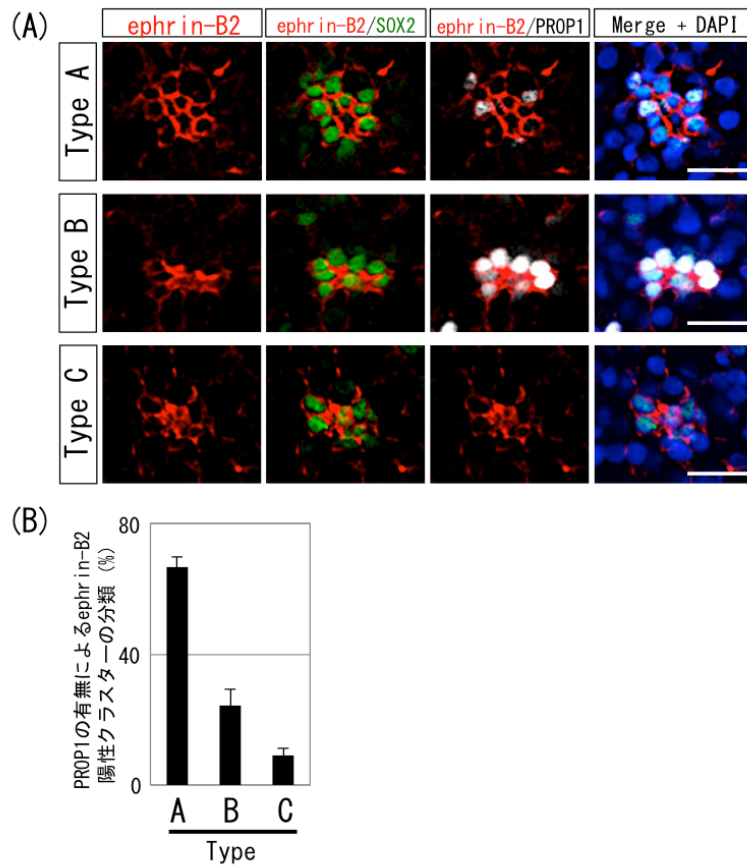


図 39. PROP1 陽性前駆細胞における ephrin-B2 の免疫組織化学

(A) 95% エタノールで固定をした 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 と SOX2 ならびに PROP1 との局在を多重蛍光免疫染色で解析した。赤 (Cy3) : 抗 ephrin-B2 抗体、緑 (FITC) : 抗 SOX2 抗体、白 (Cy5) : 抗 PROP1 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。Type A : 一部に PROP1 陽性細胞を含む ephrin-B2 クラスター、Type B : 全細胞が PROP1 陽性細胞で構成される ephrin-B2 クラスター、Type C : PROP1 陽性細胞を含まない ephrin-B2 クラスター。Scale bars: 20  $\mu$ m

(B) PROP1 陽性細胞の有無により ephrin-B2 クラスターを分類し、その割合を計測した。3 個体から作製した切片を 3-6 枚 (それぞれ 1.1-1.4 mm<sup>2</sup>) を計測し、mean  $\pm$  SD で測定値を示した。

### 2-3-7 成体下垂体幹・前駆細胞ニッチで発現する ephrin-B2 対合分子の探索

これまでの解析結果から、**ephrin-B2** 陽性細胞は、**MCL** ならびに前葉実質層のクラスターといった 2 様の下垂体幹・前駆細胞ニッチに存在し、質的に異なる幹・前駆細胞で発現していることが示唆された。この結果は、**ephrin-B2** が下垂体の幹・前駆細胞やそのニッチの機能調節に関与している可能性を示唆していると考えられる。背景でも述べたように、**ephrin** シグナル分子は、隣接細胞が発現する対合分子 **Eph** との相互作用によって活性化される。下垂体のニッチにおいては、幹・前駆細胞で **ephrin-B2** が発現していることから、その対合分子発現細胞は、幹・前駆細胞の機能を調節するニッチ細胞である可能性が考えられる。

そこで、次に成体下垂体における **ephrin-B2** の対合分子ならびにその発現細胞の同定を目的に、免疫染色ならびに *in situ* hybridization を試みた。**ephrin-B2** の対合分子としては **EphA4, B1, B2, B3, B4** ならびに **B6** の 6 分子が知られている (図 17)。この中で、**EphB6** は細胞内のキナーゼドメインを欠損しているため、Forward シグナルは誘導されないことが報告されている (Truitt and Freywald 2011)。本研究では、下垂体のニッチにおける、Forward ならびに Reverse シグナルの両者を解析することを最終目的としていることから、**EphB6** を除く、**EphA4, B1, B2, B3** ならびに **B4** の計 5 因子を解析対象とした。

まず、*in situ* hybridization により **EphA4 mRNA** の局在を解析した。その結果、**EphA4** は後葉で顕著なシグナルが確認され、前葉ならびに中葉ではシグナルは得られなかった (図 40A)。また、成体下垂体 (P60) の前葉ならびに中・後葉の cDNA Library を用いた **EphA4** の遺伝子発現の解析結果からも、同様の結果が得られた (図 40B)。

次に、免疫染色にて **EphB1, B2, B3** ならびに **B4** の局在を解析した。結果、



EphB1 陽性シグナルは前葉において LH $\beta$ 陽性細胞で特異的に存在していた (図 40C, D)。

EphB2 陽性シグナルは、前葉と中葉に存在していた (図 40E)。ホルモンとの共染色の結果、前、中葉共に ACTH 陽性細胞に特異的に局在していた (図 40F)。

次に EphB4 陽性シグナルは、前、中、後葉で確認された (図 40G)。また、前葉において陽性細胞の特徴付けを行った結果、血管内皮細胞マーカーである PECAM 陽性細胞の一部に存在していた (図 40H)。

最後に EphB3 の局在を解析した結果、興味深い事に、EphB3 陽性細胞は、前、中葉の MCL に加え、前葉実質層にクラスター状に存在し、ephrin-B2 や CAR と非常に類似した局在様式を示した (図 41)。

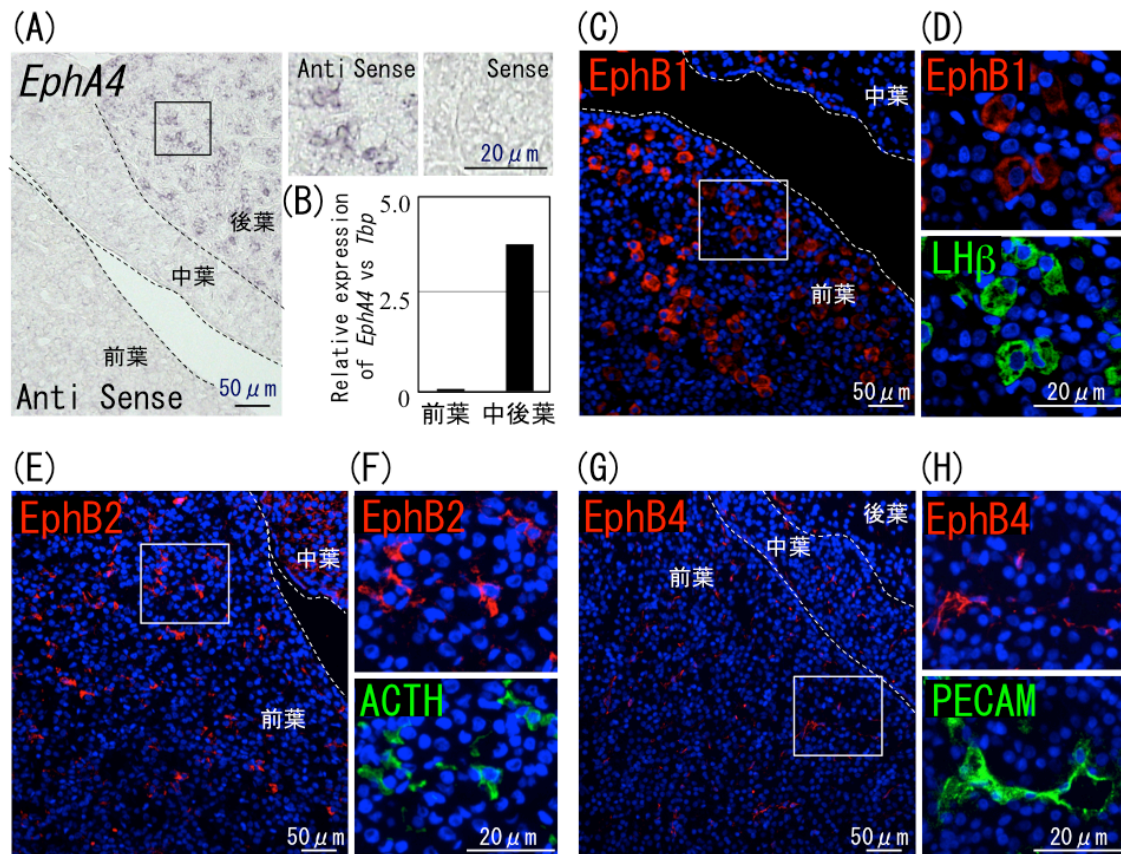


図 40. 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いた ephrin-B2 対合分子 (*EphA4*, *B1*, *B2*, *B4*) の *in situ* hybridization または免疫組織化学

(A) 4% PFA 固定切片を用いて、*EphA4* の局在を *in situ* hybridization で解析した。(B) 60 日齢の成体下垂体前葉ならびに中後葉 cDNA を用いた *EphA4* の Real-time PCR。内部標準には *TATA box binding protein (Tbp)* を使用し、*Tbp* に対する相対値で発現量を算出した。N=2 の実験を 2 回行い、mean  $\pm$  SD で測定値を示した。(C、D) 4% PFA 固定切片を用いて、*EphB1* の局在を二重蛍光免疫染色で解析した。(C): *EphB1* の染色像、(D): 白枠の部分拡大した視野の、LHb との共染色像を示す。赤 (Cy3) : 抗 *EphB1* 抗体、緑 (Cy5) : 抗 LHb 抗体。(E、F) 4% PFA 固定切片を用いて、*EphB2* の局在を二重蛍光免疫

染色で解析した。(E): EphB2 の染色像、(F): 白枠の部分を拡大した視野の、ACTH との共染色像を示す。赤 (Cy3) : 抗 EphB2 抗体、緑 (Cy5) : 抗 ACTH 抗体。(G、H) 95% エタノール固定切片を用いて、EphB4 の局在を二重蛍光免疫染色で解析した。(G): EphB4 の染色像、(H): 白枠の部分を拡大した視野の、PECAM との共染色像を示す。赤 (Cy3) : 抗 EphB4 抗体、緑 (Cy5) : 抗 PECAM 抗体。青 (DAPI) : 細胞核。

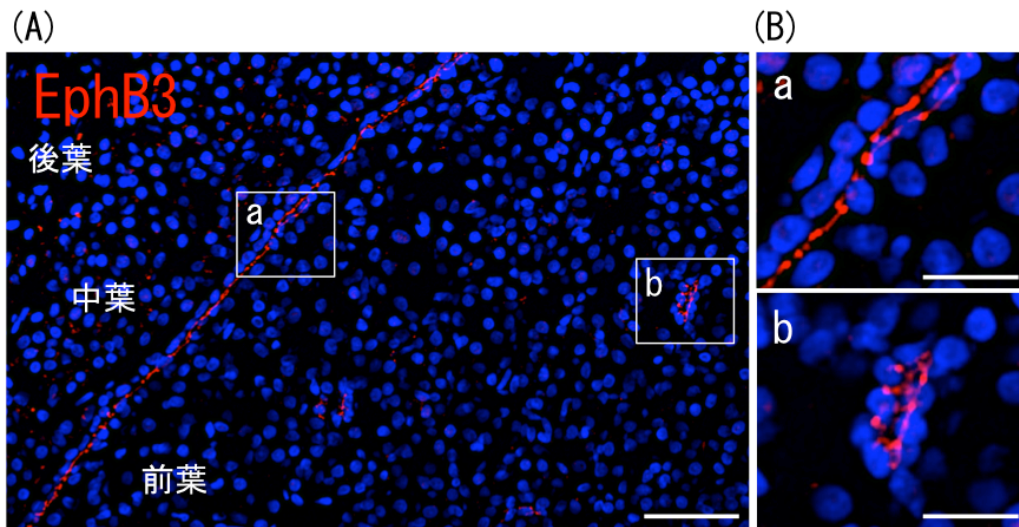


図 41. ephrin-B2 対合分子 EphB3 の免疫組織化学

95% エタノールで固定をした 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いて、EphB3 との局在を蛍光免疫染色で解析した。(B): 白樫の部分 (a: MCL, b: 実質層) の拡大像を示す。赤 (Cy3) : 抗 EphB3 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。Scale bars: A ; 50  $\mu$ m、B ; 20  $\mu$ m。

### 2-3-8 成体下垂体幹・前駆細胞ニッチにおける ephrin-B2/EphB3 の存在様式

先の ephrin-B2 対合分子の局在解析から、EphB3 が ephrin-B2 と類似の局在を示すことが明らかとなり、両者の下垂体幹・前駆細胞ニッチへの関与が推測された。そこで、ephrin-B2 と EphB3 それぞれが隣接する細胞に局在しているのか、それとも同一細胞に存在するのかを解析するために、成体下垂体を用いた ephrin-B2 と EphB3 の共染色を行った（図 42）。成体下垂体において ephrin-B2 と EphB3 の共染色の結果、両者の陽性シグナルは、MCL ならびに実質層のクラスターともに同一細胞の同一面上に存在し、共存していることが確認された。この結果から、成体下垂体のニッチにおいて、ephrin-B2 と EphB3 の存在様式は cis-interaction（図 19）を形成していると考えられる。

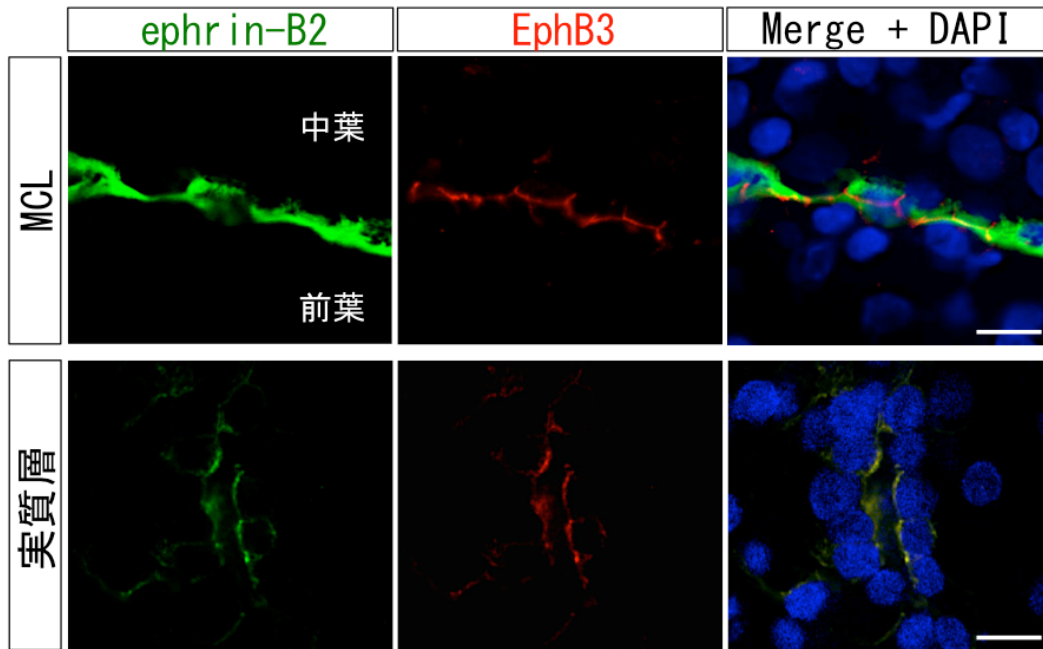


図 42. 成体下垂体幹・前駆細胞ニッチにおける ephrin-B2/EphB3 の免疫組織化学

95% エタノールで固定をした 60 日齢の成体下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 と EphB3 の局在を二重蛍光免疫染色で解析した。緑 (Cy5) : 抗 ephrin-B2 抗体、赤 (Cy3) : 抗 EphB3 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。MCL: Marginal cell layer。Scale bars: 10  $\mu$ m

### 2-3-9 生後直後の下垂体における ephrin-B2/EphB3 の存在様式

2-3-8 の結果から成体下垂体では ephrin-B2/EphB3 シグナルは cis 型であると考えられた。この点に関して、1-6-3-2 で述べたように、生理的に定常状態の成体下垂体においては、幹・前駆細胞からの細胞供給頻度は非常に低いことが、細胞系譜追跡実験の結果から示されている (Andoniadou et al. 2013)。そこで、より細胞分化や細胞移動が盛んな時期である、出生直後 (P5) の下垂体を用いた ephrin-B2/EphB3 の存在様式の解析を行った (図 43)。その結果、MCL において、EphB3 は成体下垂体と同様に MCL のアピカル側に局在していた。一方で ephrin-B2 陽性細胞の一部は、MCL の直下に多層化し、細胞膜上の極性を失っており、EphB3 とは共存しなかった (図 43 矢頭)。また、実質層のクラスターにおいても、EphB3 の局在は成体下垂体と同様にクラスターの内側にのみ存在していた (図 43)。しかし、ephrin-B2 陽性シグナルの一部はクラスターを構成する細胞のバソラテラル側で出現しており、これは MCL 同様に ephrin-B2 単独陽性のシグナルであった (図 43 矢頭)。これらの結果から、細胞分化や細胞移動が盛んな出生直後の下垂体においては、一部のニッチにおいて ephrin-B2/EphB3 間の cis-interaction から解除された ephrin-B2 単独陽性シグナルが、両ニッチの周囲に存在していると解釈された。

次に、MCL の直下、ならびに実質層のクラスター周囲に存在する ephrin-B2 単独陽性シグナルを持つ細胞の特性を GH<sup>-</sup>、PRL<sup>-</sup>、TSH $\beta$ -産生細胞のコミットメントマーカーである転写因子 PIT1 を用いて解析した。その結果、ephrin-B2 単独陽性のシグナルを持つ細胞の一部で、PIT1 陽性シグナルを確認した (図 44 矢頭)。この結果から、幹・前駆細胞の細胞内で形成される ephrin-B2 と EphB3 間の cis-interaction が解除された細胞の一部は、PIT1 陽性のコミットメント細胞であることが確認された。

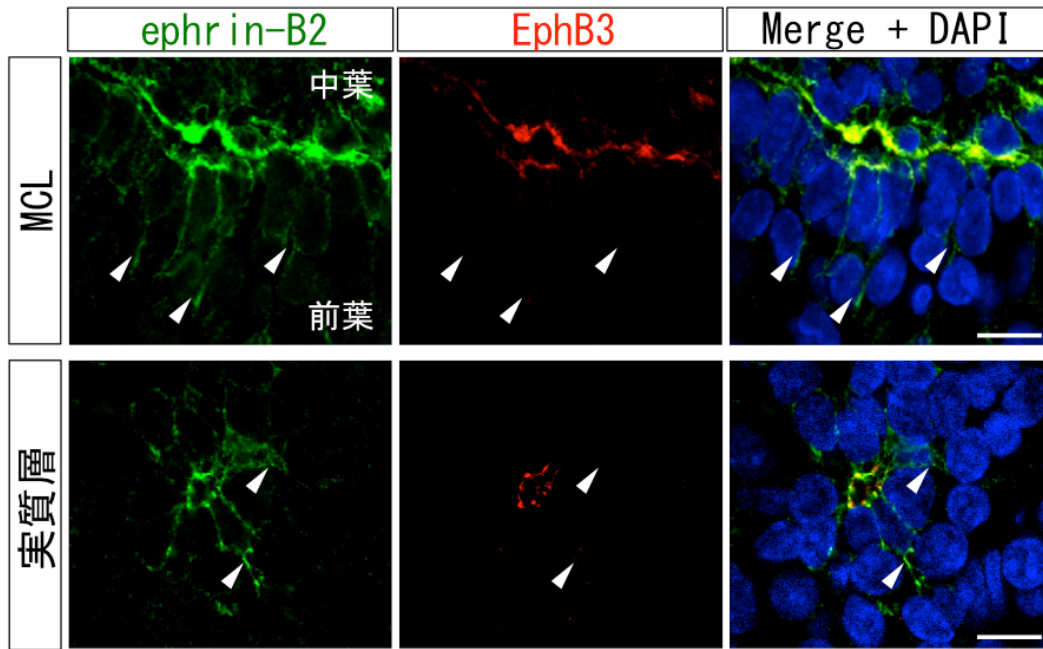


図 43. 出生直後下垂体幹・前駆細胞ニッチにおける ephrin-B2/EphB3 の免疫組織化学

95% エタノールで固定をした 5 日齢の下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 と EphB3 の局在を二重蛍光免疫染色で解析した。緑 (Cy5) : 抗 ephrin-B2 抗体、赤 (Cy3) : 抗 EphB3 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。矢頭 : ephrin-B2 単独陽性シグナル。MCL : Marginal cell layer。Scale bars: 10  $\mu$ m



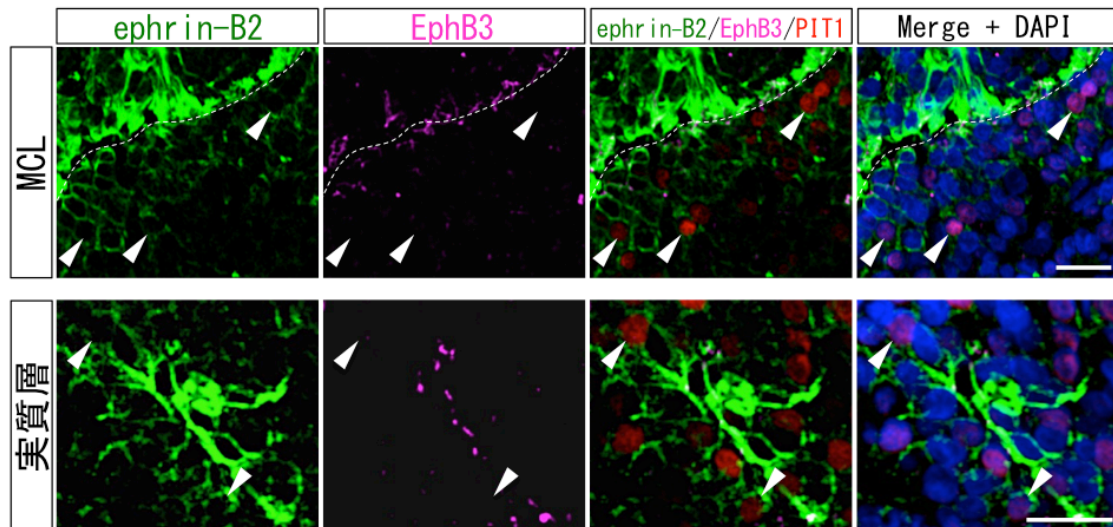


図 44. 出生直後下垂体における ephrin-B2/EphB3/PIT1 の免疫組織化学

95% エタノールで固定をした 5 日齢の下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2、EphB3 ならびに PIT1 の局在を多重蛍光免疫染色で解析した。緑 (FITC) : 抗 ephrin-B2 抗体、紫 (Cy5) : 抗 EphB3 抗体、赤 (Cy3) : 抗 PIT1 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。矢頭 : ephrin-B2/PIT1 両陽性細胞。MCL : Marginal cell layer。Scale bars: 20  $\mu$ m

### 2-3-10 生後直後の下垂体における ephrin-B2 と trans-interaction する Eph の同定

2-3-9 の結果から、成体下垂体では ephrin-B2 が EphB3 と cis-interaction していること、一方で、出生直後ではその cis-interaction が解除され、単独陽性の ephrin-B2 陽性シグナルが観察された。この結果は、出生直後の下垂体において ephrin-B2 と trans-interaction する Eph 発現細胞が存在する可能性を示唆していると考えられる。そこで、出生直後の下垂体において幹・前駆細胞で発現する ephrin-B2 と trans-interaction する Eph の同定を試みた。まず、ephrin-B2 が MCL と実質層のニッチで発現することから、それらニッチと隣接頻度の高い細胞の同定を試みた(図 45)。MCL ならびに実質層のニッチを SOX2 と E-cadherin 抗体を用いて可視化し、各種ホルモン抗体、または血管内皮細胞の糖鎖と特異的に結合する Isolectin B4 を用いて解析した。その結果、両ニッチと接触頻度が高い細胞は、ACTH 産生細胞と GH 産生細胞であった(図 45)。一方で、PRL、THS $\beta$  ならびに LH $\beta$ /FSH $\beta$ 産生細胞とニッチとの接触は低頻度であった(図 45)。また、Isolectin B4 陽性の血管内皮細胞とニッチとの接触も低頻度であった(図 45)。一方で、成体下垂体(P60)では、両ニッチと接触頻度が高い細胞種は主に GH と PRL 産生細胞へと変化していた(図 46)。

図 40 で示したように、EphB3 以外の ephrin-B2 対合分子はそれぞれ、EphA4 が後葉で、EphB1 がゴナドトロピン産生細胞で、EphB2 が ACTH 産生細胞で、EphB4 が血管内皮細胞で発現していることを確認している。そこで、出生直後のニッチに対して接触頻度が高い細胞種の一つである ACTH 産生細胞に注目し、その細胞で発現する EphB2 と ephrin-B2 との共染色を行った。ephrin-B2 陽性細胞が MCL の直下に多層化する出生後 5 日(P5)の下垂体を用いて解析した結果、MCL 下層の ephrin-B2 陽性細胞に隣接する細胞で EphB2 の局在が確認

された (図 47)。また、EphB1 との関係は未解析だが、血管内皮細胞で発現する EphB4 陽性シグナルと ephrin-B2 陽性シグナルは隣接しないことを確認した (図 48)。

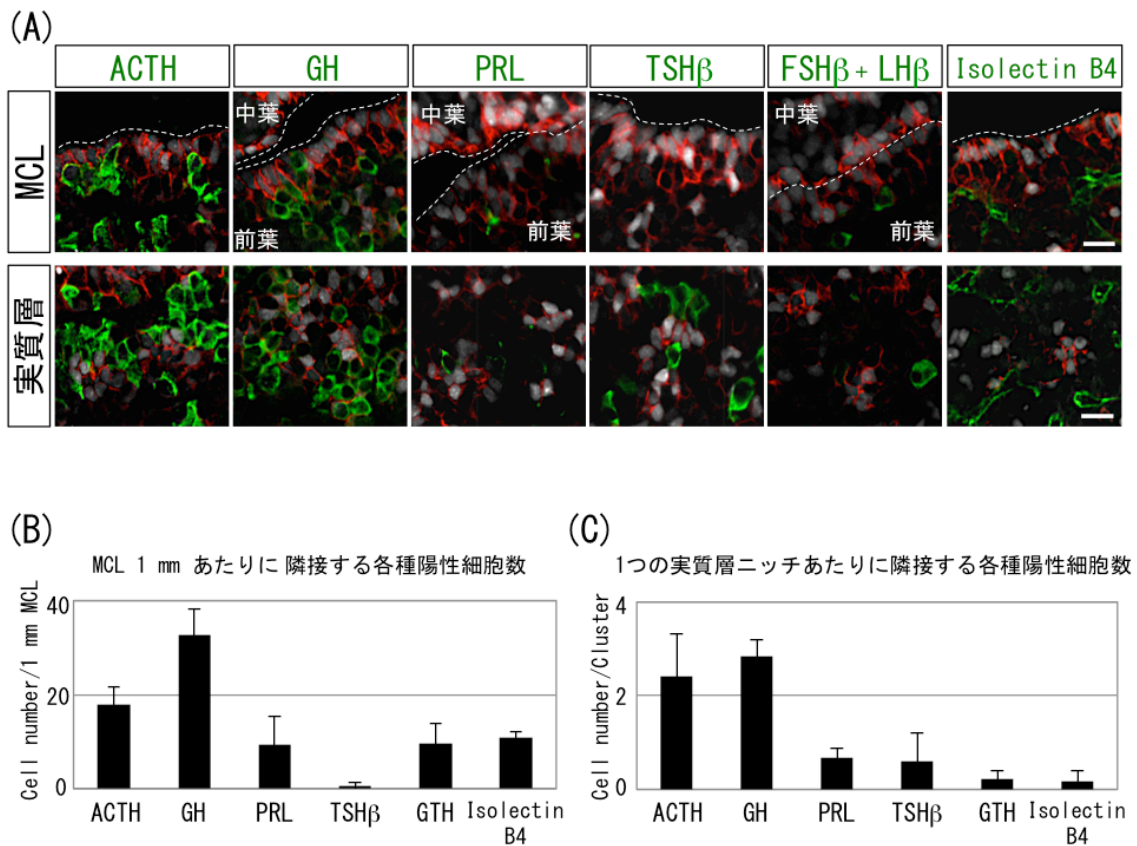


図 45. 出生直後 (P5) 下垂体における幹・前駆細胞ニッチ周囲に存在する細胞種の同定

(A) 4% PFA で固定をした 5 日齢の下垂体凍結切片を用いて、E-cadherin、SOX2 と各種抗下垂体ホルモン抗体ならびに FITC 標識 Isolectin-B4 との多重蛍光免疫染色を行った。赤 (Cy3) : 抗 E-cadherin 抗体、白 (Cy5) : 抗 SOX2 抗体、緑 (FITC) : 抗下垂体ホルモン抗体または FITC 標識 Isolectin-B4、青 (DAPI) : 細胞核。点線: MCL (Marginal cell layer)。Scale bars: 20  $\mu$ m。(B) MCL 1 mm あたりに SOX2 陽性の E-cadherin 陽性シグナルと隣接する各種陽性細胞の数を示す。測定値は mean  $\pm$  SD で示した。(C) 实质層に存在する SOX2 陽性のクラスター 1 つあたりに隣接する各種陽性細胞の数を示す。測定値は mean  $\pm$  SD で示した。

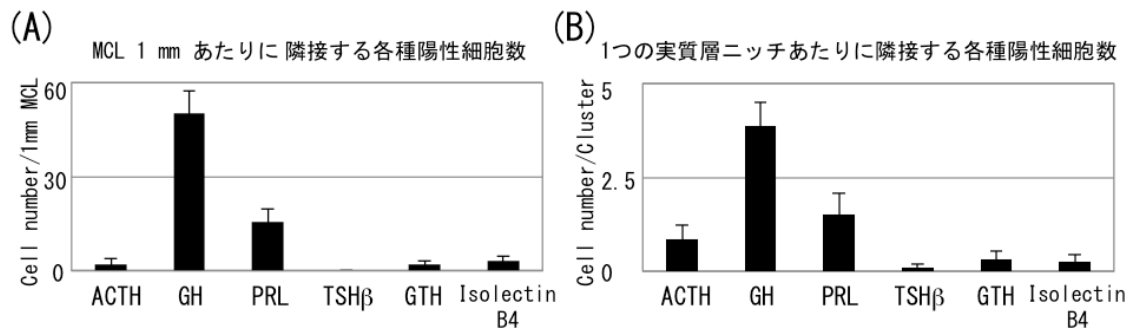


図 46. 成体 (P60) 下垂体における幹・前駆細胞ニッチ周囲に存在する細胞種の割合

(A) MCL 1 mm あたりに SOX2 陽性の E-cadherin 陽性シグナルと隣接する各種陽性細胞の数を示す。測定値は mean±SD で示した。(B) 実質層に存在する SOX2 陽性のクラスター1 つあたりに隣接する各種陽性細胞の数を示す。測定値は mean±SD で示した。

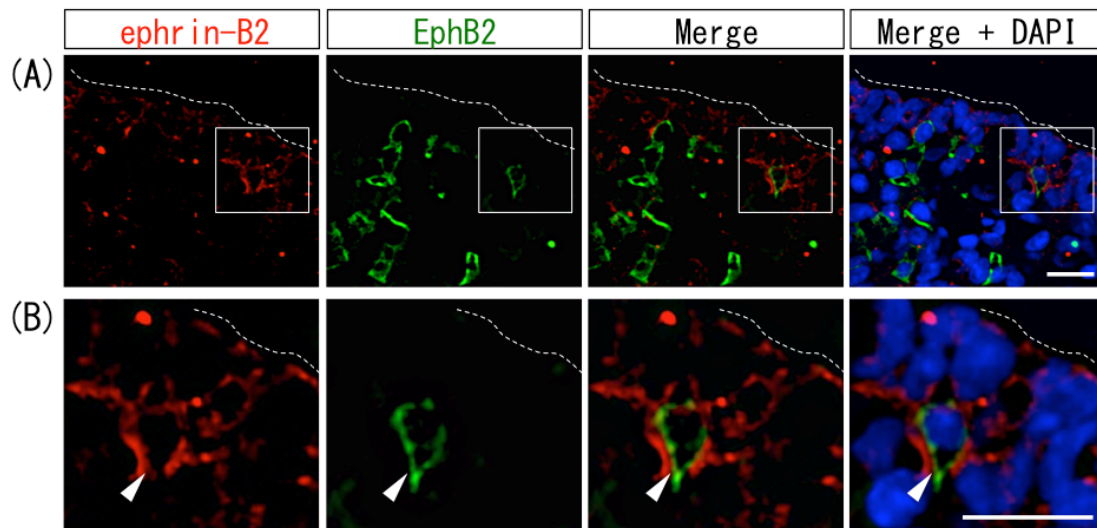


図 47. 出生直後下垂体における ephrin-B2 と EphB2 の免疫組織化学

(A) 4% PFA で固定をした 5 日齢の下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 と EphB2 との二重蛍光免疫染色を行った。(B) 白枠の部分の拡大像を示す。赤 (Cy3) : 抗 ephrin-B2 抗体、緑 (Cy5) : 抗 EphB2 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。矢頭 : ephrin-B2 陽性シグナルと EphB2 陽性シグナルが隣接する部分。点線 : Marginal cell layer。Scale bars: 20  $\mu$ m

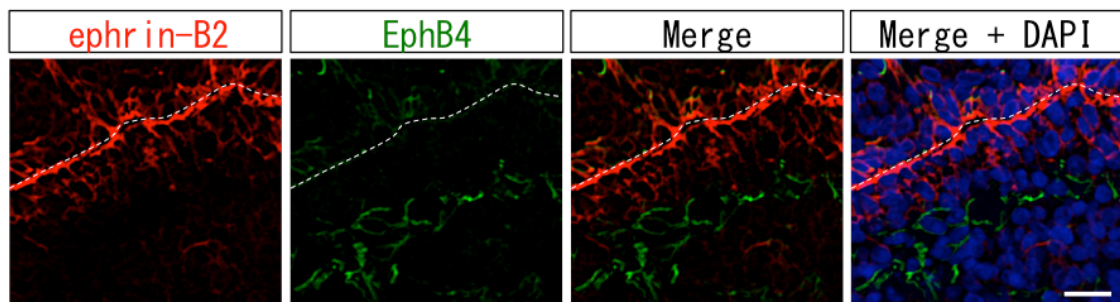


図 48. 出生直後下垂体における ephrin-B2 と EphB4 の免疫組織化学

(A) 95% エタノールで固定をした 5 日齢の下垂体凍結切片を用いて、ephrin-B2 と EphB4 の二重蛍光免疫染色を行った。赤 (Cy3) : 抗 ephrin-B2 抗体、緑 (Cy5) : 抗 EphB4 抗体、青 (DAPI) : 細胞核。点線 : Marginal cell layer。Scale bars: 20  $\mu$ m

## 2-4 考察

### 2-4-1 ephrin/Eph シグナルと下垂体の組織形成に関して

これまで、下垂体における ephrin ならびに Eph に関する報告は、*in situ* hybridization によるマウス発生過程の後葉における *EphA5* 発現 (Zarbalis and Wurst 2000) と、下垂体幹・前駆細胞の濃縮画分である non-Sca1<sup>high</sup>-SP において、数種類の ephrin-B と EphB が濃縮されているという RT-PCR のデータのみである (Vankelecom 2010)。したがって、下垂体の発生ならびに幹細胞ニッチにおける、ephrin/Eph シグナルの寄与は不明であった。本研究による、下垂体における ephrin-B ならびにその対合 Eph に焦点を当てた解析から、下垂体において ephrin-B1, -B2 ならびにそれらの対合 Eph の発現が確認された (図 28)。このことは、下垂体の組織形成ならびに機能維持に ephrin-B シグナルが関与している可能性を示唆している。

特に ephrin-B2 の局在は、生後の下垂体では、幹細胞ニッチのマーカーである CAR とほぼ同様の局在を示した (図 13C、図 34)。しかし、下垂体形成過程において、ephrin-B2 は発生とともにその局在を大きく変化させていた (図 34B)。このことから、ephrin-B2 はニッチにおける機能以外に、下垂体の組織形成にも寄与していることが考えられる。実際に ephrin/Eph シグナルは種々の組織において、組織発生過程の領域化に寄与する分子であることが知られている (背景 1-8-5)。本研究では、ephrin-B2 は E13.5 の下垂体において、MCL に加え、隆起葉の原基であるロストラルチップにおいて、バソラテラルな陽性シグナルを観察した (図 34)。一方で、我々は ephrin-B2 の対合分子の一つである EphB2 がロストラルチップと MCL を除く、ラトケ囊主部に発現していることを確認している (data not shown; 投稿準備中)。この結果は、ephrin-B2 陽性細胞と



EphB2 を始めとする Eph 陽性細胞が反発を起こし、領域化に寄与する可能性を示唆している。これまで、BMP や SHH、FGF などの成長因子の勾配が、ラトケ囊の背腹軸の決定に寄与していることが証明されているが (Dasen and Rosenfeld 2001; Treier et al. 1998)、ロストラルチップの領域決定機序はほぼ未解明である。我々の結果は、発生初期の下垂体において ephrin-B2 がロストラルチップの領域決定に寄与している可能性を示唆する初めての知見であると考えられる。

#### 2-4-2 下垂体幹・前駆細胞ニッチ内部における ephrin-B2 とその対合分子 EphB3 の存在様式に関して

細胞のターンオーバー速度は組織ごとに異なることから、幹細胞からの細胞新生速度、ならびに、それらを制御するニッチの形態も組織ごとに異なる。消化管表層にある腸上皮細胞のターンオーバーは非常に速く、3 から 5 日で全ての腸上皮が新しい細胞に入れ替わる (van der Flier and Clevers 2009)。一方で Andoniadou らは、SOX2 陽性細胞の運命追跡実験から、定常状態の成体下垂体における幹細胞からの細胞供給頻度は他の組織と比較し、非常に遅いこと (Andoniadou et al. 2013) や、Nolan らは細胞新生の頻度は 1 日に 1.5% 程度であると報告している (Nolan et al. 1998)。すなわち、定常状態の成体下垂体ニッチでは、腸管ニッチで観られるような分化を促進する機構よりも、分化を抑制する機構が強く寄与していると考えられる。本研究における ephrin-B ならびにその対合 Eph の組織化学的解析から、下垂体のニッチにおいては、ephrin-B2 と EphB3 の組み合わせが存在していることが見出された。また、成体期と出生直後のニッチ間で、ephrin-B2 と EphB3 の存在様式を比較すると、成体期のニッチでは不活性状態の cis-型である一方で、出生直後では、周囲の

*Eph* 発現細胞と trans-interaction が可能な ephrin-B2 単独陽性シグナルが観察された (図 49)。すなわち、細胞新生の非常に穏やかな成体下垂体ニッチでは、ephrin-B2/EphB3 が互いに活性化を妨げるように、ニッチ内部で抑制的に制御をしていると考えられる。

一方で、細胞新生の盛んな出生直後では、同一細胞内で ephrin-B2/EphB3 が発現しているが、細胞内でバソラテラルに ephrin-B2 単独の陽性シグナルが生じていた (図 43)。EphB3 は常にニッチのアピカル側に存在していることから、ephrin-B2 の細胞内局在がアピカルからバソラテラルに変化することによって、cis-interaction が制御されていると考えられる。ephrin-B ならびに *Eph* の発現制御に関しては、腸管ニッチでは Wnt シグナリングの  $\beta$ -catenin/TCF の複合体が *EphB* の遺伝子発現を誘導すること (Batlle et al. 2002; Scoville et al. 2008)、また、腸管上皮特異的な Notch シグナルリングの不活性化マウスの解析から、Notch シグナリングが ephrin-B1 の発現を促進する一方で、*EphB2* を抑制することが報告されている (Koo et al. 2009)。また、SVZ では、Notch シグナリングのメディエーターである *Rbp-j* の上皮細胞特異的な欠損解析から、*EphB* が Notch シグナリングによって制御されていることが報告されている (Nomura et al. 2010)。しかし、それら ephrin/Eph の細胞内局在を制御する仕組みに関しては、解明されていない。このような、ephrin-B2 のアピカルからバソラテラルへの細胞内局在変化を制御する機序、ならびに、どのような刺激により細胞内局在の変化が誘導されるのかに興味をもたれる。

また、本研究では細胞新生の盛んな状態のモデルとして、出生直後のニッチを用いた。しかし、出生直後に観られた cis-interaction の解除が、出生直後に限られたニッチの制御機序なのかは非常に重要な点である。この課題に関しては、性腺や甲状腺など標的器官を除去し、成体下垂体における特定細胞種の新生を亢進させた際に、cis-interaction の解除が生じるのかを確認する必要がある。

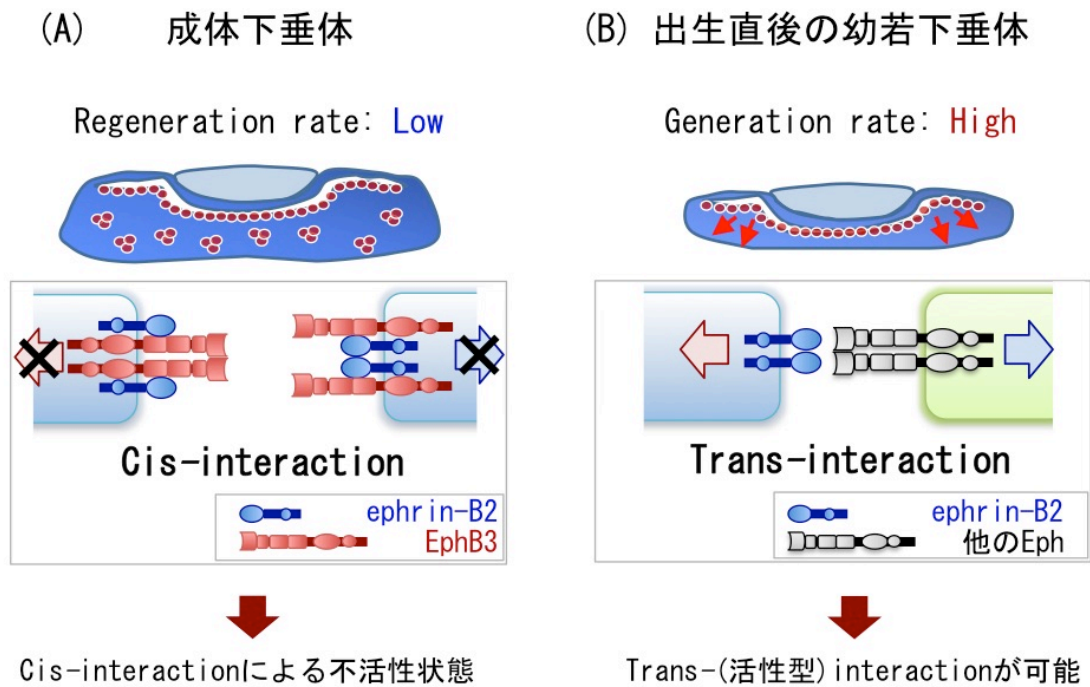


図 49. 成体期ならびに出生直後の下垂体ニッチにおける ephrin-B2/EphB3 の存在様式

(A) 成体期のニッチにおける、ephrin-B2/EphB3 の存在様式を模式的に示す。両因子は同一細胞の同一面上に存在し、不活性型の cis-interaction を形成する。

(B) 出生直後のニッチにおける、ephrin-B2/EphB3 の存在様式を模式的に示す。ephrin-B2 単独の免疫陽性シグナルが観察されることから、周囲に存在する EphB3 以外の対合 Eph との trans-interaction が可能な状態である。

### 2-4-3 ニッチ内部の ephrin-B2 Reverse シグナルを活性化する ACTH 産生細胞に関して

SVZ では脳室に面する上皮細胞が、腸管ニッチでは抗菌物質を産生し、免疫に関与する Paneth 細胞が、幹細胞を制御するニッチ細胞として機能している。このようなニッチ細胞の共通な特徴として、幹細胞との隣接頻度が高いことや、幹細胞を制御する細胞接着分子 *ephein/Eph* や *Wnt* シグナル分子など液性因子を発現していることが挙げられる。

本研究の解析から、出生直後の *cis-interaction* が解除された ephrin-B2 単独陽性シグナルを活性化するパートナーとして、EphB2 陽性の ACTH 産生細胞が候補に挙げられた (図 47)。ACTH 産生細胞はラトケ囊主部において最初に出現するホルモン産生細胞である (Japon et al. 1994)。このように、他の細胞種に先立ち出現する ACTH 産生細胞には、ホルモンを分泌する以外にも、周囲の細胞に作用し、下垂体の発生を正常に進めることに寄与している可能性が考えられる。実際に、ラット発生中期 (E15.5) 頃において、下垂体の吻部から、血管系を構築する間葉系細胞が侵入するが、これら下垂体に侵入する細胞のうち、血管内皮細胞を誘導する VEGF-A を ACTH 産生細胞が分泌していることが報告されている (Nakakura et al. 2006)。こうした知見を踏まえると、ACTH 産生細胞は液性因子だけでなく、膜表面の分子を利用し、周囲に存在する細胞の発生、分化を制御する機序が存在する可能性は十分に考えられる。

本研究では、細胞分化が盛んな出生直後 (P5) のニッチに注目し、解析結果として、GH 産生細胞と ACTH 産生細胞がニッチとの隣接頻度が高い傾向にあることを見出した (図 45B)。一方で、成体期のニッチに対する ACTH 産生細胞の隣接頻度は、非常に低かった (図 46)。この 2 つの時期に関して、ラット前葉に占める ACTH 産生細胞の存在割合を比較すると、P5 では約 20%であり、

P60 では約 7%程度である。これらのことを踏まえると、出生直後のニッチ周囲において ACTH 産生細胞が高頻度に存在することは、ACTH 産生細胞が能動的にニッチの周囲に移動したという可能性以外にも、下垂体前葉において ACTH 産生細胞が占める存在割合が高いことに起因するとも考えられる。現時点では、ニッチが ACTH 産生細胞をケモカインなどにより誘導する機序が存在するかは不明である。しかし、いずれの機序においても、出生直後の細胞分化の亢進時では、ニッチと隣接頻度の高い ACTH 産生細胞に ephrin-B2 の活性化分子である *EphB2* が発現することで、ニッチ内部での Reverse シグナルを活性化する機構があると考えられる。

一方で、細胞新生が抑制されている成体期では、ニッチの周囲には ephrin-B2 と対合可能な *Eph* を発現していない GH 産生細胞が主である (図 46)。このことから、成体期の下垂体では、ニッチ内部の cis-interaction に加え、ニッチ周囲の細胞構成という観点からも、ニッチ内部の ephrin-B2 シグナルを不活性化状態に維持する機構があると考えられる。今後、標的器官除去を施した動物の成体下垂体において、前述の cis-interaction の解除に加え、ケモカインなどを介し、ACTH 産生細胞がニッチ周囲へ移動するのか、検討すべき課題であると考えられる。

#### 2-4-4 下垂体幹・前駆細胞ニッチにおける ephrin-B2 Reverse シグナルの機能に関して

我々は CAR を用いた解析から、MCL と実質層に存在する 2 様のニッチのうち、後者の形成機序に関して、出生直後に MCL から幹・前駆細胞が、EMT により遊走能を獲得し、移動、定着することで形成される可能性を報告している (Chen et al. 2013)。一方で、出生直後において、ephrin-B2 単独陽性シグナル

も CAR 同様に MCL zone を形成すること、また、その一部では EphB2 免疫陽性シグナルと隣接する像が確認された (図 47)。

これまでの glioma や melanoma、腸上皮由来の株化細胞を用いた解析から、ephrin-B 群の Reverse シグナルは、細胞の形態変化と接着、細胞移動を制御することが報告されている (Hafner et al. 2005; Meyer et al. 2005; Nakada et al. 2010)。また、Cowan と Henkemeyer (2001) は、trans-interaction により ephrin-B の細胞内ドメインがリン酸化されると、アダプタータンパク質である GRB4 がリクルートされること、さらに、その下流では PAXILLIN や FAK などを紹介し、細胞の形態や細胞移動が制御されると報告している。こうした報告を踏まえると、MCL zone で ephrin-B2 が活性化されることにより、幹・前駆細胞の移動を制御することに寄与している可能性が推測される。また、興味深いことに MCL zone において、一部の ephrin-B2 単独陽性の幹・前駆細胞は、分化マーカーである転写因子 PIT1 が陽性であった (図 44)。これらの結果から、幹細胞ニッチにおける ephrin-B2 シグナルの活性化は、ニッチからの細胞移動と分化を促進的に制御している可能性が推測される。最近、我々は下垂体由来株化細胞である Tpit/E 細胞が、下垂体幹・前駆細胞マーカーである Sox2, Sox9, E-cadherin, Cxadr (CAR) を発現することを見出している (図 50) (Yoshida et al. 2014)。興味深いことに、この Tpit/E 細胞は ephrin-B2 を発現していること、さらに、ACTH 産生腫瘍株である AtT20 細胞は EphB2 を発現していることを確認している (data not shown; 投稿準備中)。これらの細胞を用いることで、幹・前駆細胞ニッチにおける ephrin-B2 Reverse シグナル、ならびに ACTH 産生細胞内で活性化される Forward シグナルの機能が解明できる可能性が期待できる。

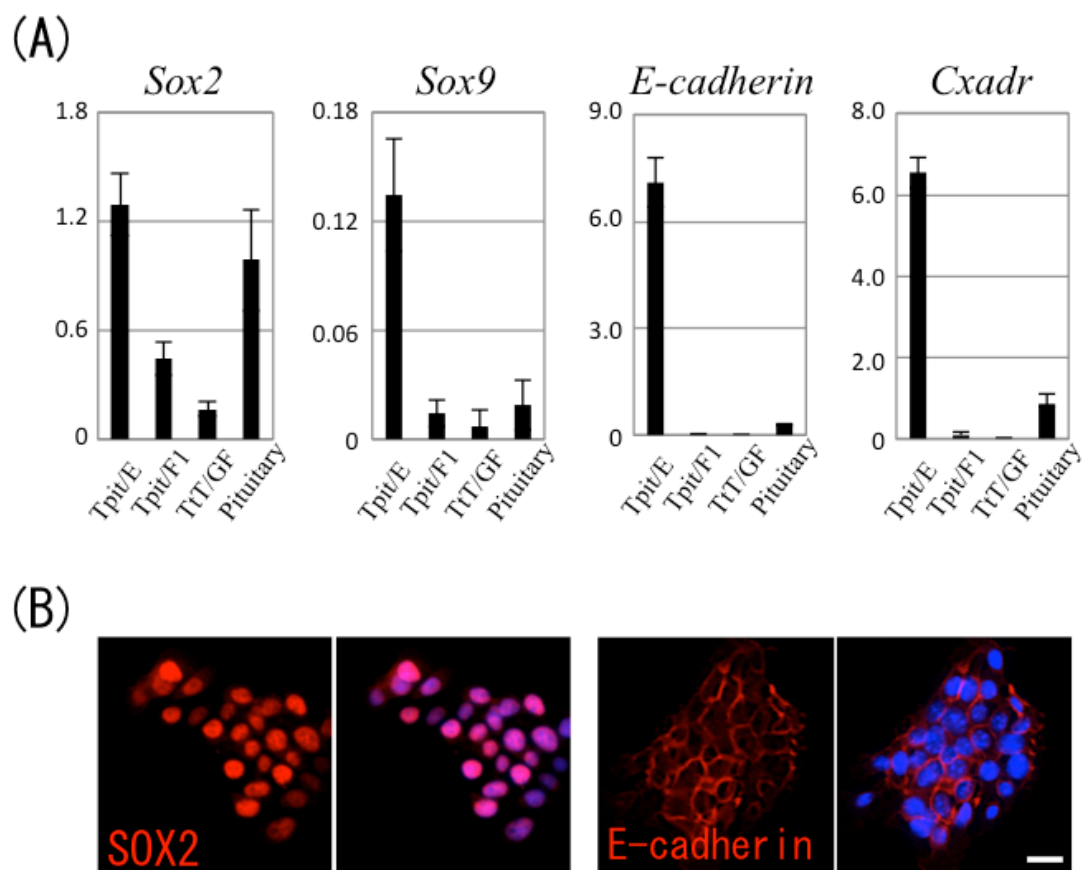


図 50. 下垂体幹・前駆細胞のモデル細胞株 Tpit/E

(A) Tpit/E 細胞は下垂体幹・前駆細胞特異的因子を発現している。(B) Tpit/E 細胞における SOX2 ならびに E-cadherin の細胞免疫染色像。Scale bar: 20  $\mu$ m。

(日本繁殖生物学会の許諾のもと、Yoshida et al.: Characterization of murine pituitary-derived cell lines Tpit/F1, Tpit/E and TtT/GF. J Reprod Dev 2014; 60: 295-303.より転載)

#### 2-4-5 下垂体におけるニッチ細胞の存在の有無に関して

上述のように、EphB2 陽性の ACTH 産生細胞は、時期特異的ではあるが、高頻度にニッチと隣接し、また、ニッチ内部の ephrin-B2 Reverse シグナルを活性化する主要な細胞であると考えられる。しかし、常に幹・前駆細胞と隣接しているわけではなく、出生直後の分化亢進時のみ観察され、成体下垂体では観察されない。他の組織におけるニッチ細胞は、常に幹細胞と接触しており、幹細胞性の維持やニッチに幹細胞を留めておくことに寄与している。こうした他の組織におけるニッチ細胞に関する知見を踏まえると、幼若期下垂体で観察された EphB2 陽性の ACTH 産生細胞は、この概念には当てはまらない。では、定常状態の成体下垂体のニッチにおいて、幹・前駆細胞の未分化性を維持する、いわゆるニッチ細胞は存在するのか。候補となる細胞として、(1) GH 産生細胞、(2) 質的に異なる SOX2 陽性の幹・前駆細胞、が挙げられる。まず、前者の GH 産生細胞に関しては、出生後の時期に左右されずにニッチと高頻度に隣接するという点で、ニッチ細胞としての特徴を満たしている (図 46)。しかし、GH、PRL、TSH 産生細胞の分化異常を引き起こす、*Pit1* の変異マウス (Snell マウス) の解析からは、PIT1 系譜以外の ACTH ならびに LH/FSH 産生細胞の分化異常は報告されていない (Pfaffle et al. 1999; Ward et al. 2006)。この結果を踏まえると、GH 産生細胞が幹細胞を制御している可能性は低いと考えられる。一方で、後者の説は、tight junction を介しニッチを構成する SOX2 陽性細胞の中に、質的に異なる細胞が存在し、その細胞がニッチ内部の幹細胞性を維持するという考えである。現時点で、下垂体においてこの説を示唆するデータは存在しないが、脳室ニッチである SVZ においては、神経幹細胞とニッチ細胞 (Ependymal 細胞) 間で、組織損傷時に形質転換することが実験的に報告されている (Nomura et al. 2010)。また、我々は少なくともニッチを構成する SOX2



陽性細胞において、PROP1、PRRX1、PRRX2、S100 $\beta$ などとの共存解析から複数の種類が存在することを報告している (Higuchi et al. 2013; Yoshida et al. 2011)。こうした知見は、分化度の違いだけでなく、SOX2 陽性細胞の質的な違いを示唆している可能性も考えられる。これらの知見から、ニッチ内部に存在する SOX2 陽性細胞の一部が、液性因子や ephrin-B 以外の細胞表面分子を介し、ニッチを制御する可能性は否定できないと考えられる。今後、ニッチの単離法の確立、ニッチで高発現する液性因子と受容体の同定、ならびに、それら因子のニッチ内部における局在解析を行うことで、ニッチ内部の SOX2 陽性細胞の中に、幹・前駆細胞の機能を支持する細胞が存在する可能性に関して結論が出せると考えられる。

#### 2-4-6 結語

ニッチの制御機構に関しては、腸管や造血組織、毛包、側脳室上衣下層など、細胞新生が盛んな組織のニッチに関する研究が先行しており、下垂体前葉のように、細胞新生頻度が低いニッチの解析例は少ない。このような特徴を有する下垂体のニッチに関する本研究から、下垂体のニッチでは、cis-interaction を利用したニッチ内部における第一次的な制御と、周囲の分化細胞を利用した第二次的な制御が存在することが示唆された (図 51)。こうした cis-interaction を利用した制御機序は、他のニッチでは報告されておらず、新たなニッチの制御機序であり、細胞新生頻度の低い組織特有の制御機序である可能性が考えられる。

一方で、cis-interaction の解除機序、さらに EphB2 陽性の ACTH 産生細胞をニッチ周囲へ呼び込む機序の有無など、未解明な点が多い。こうした機序の解明には、ephrin/Eph などの細胞表面分子だけでなく、成長因子やケモカイン

を含めた液性因子の解析が不可欠である。さらに、ニッチが生理状態の変化を感知する機序を解明するためには、**ephrin-B2** 陽性であるニッチのソーティングなどを行い、ニッチにおいて特徴的に発現する受容体や液性因子の解析が必要であると考えられる。今後は、ニッチの単離、モデル細胞を用いた **ephrin-B2** シグナルの機能解析ならびに、標的器官除去動物を用いた実験を行うことにより、下垂体ニッチの制御機構が解明できると考えられる。そして、この **ephrin/Eph** に焦点を当てた下垂体幹・前駆細胞ニッチの研究が、下垂体だけでなく、他の組織におけるニッチの研究の一助になることを期待している。

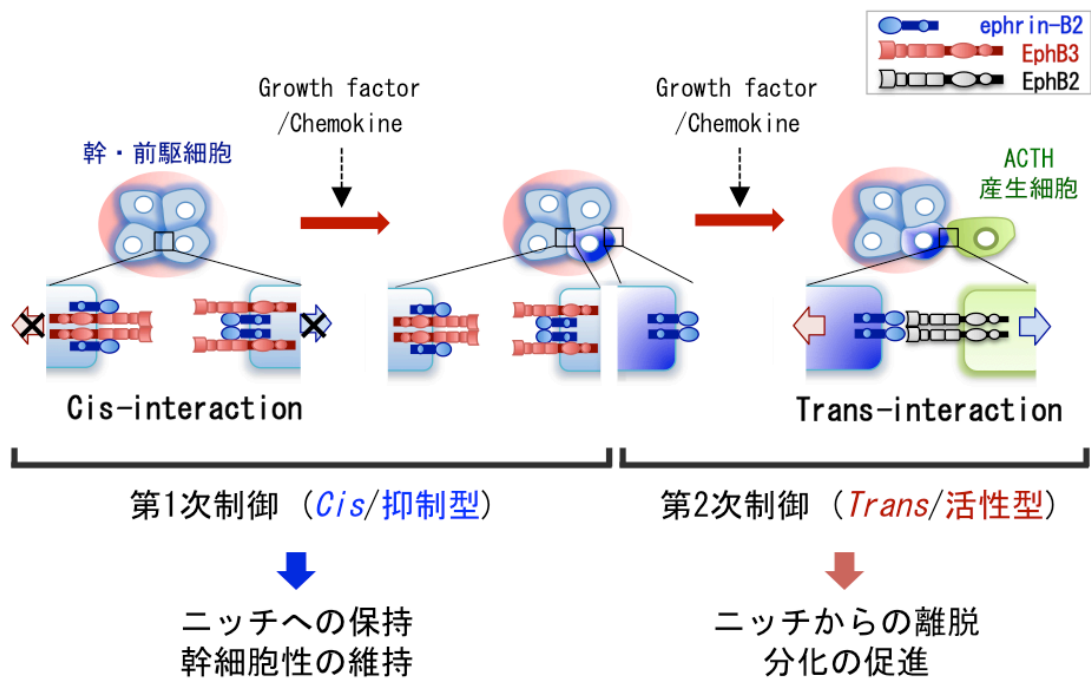


図 51. ephrin-B2 シグナルによる下垂体幹・前駆細胞ニッチの制御機構のモデル

下垂体幹・前駆細胞ニッチにおける ephrin-B2 シグナルの制御機構を模式的に示す。(A) 定常状態の成体下垂体では、ephrin-B2 と EphB3 の cis-interaction により、シグナルは不活性状態である。(B) 出生直後など細胞新生の亢進時には、一部の幹・前駆細胞において cis-interaction が解除された ephrin-B2 単独陽性シグナルが出現する。(C) Cis-interaction が解除された ephrin-B2 は、ニッチ周囲に存在する ACTH 産生細胞が発現する EphB2 と、trans-interaction を形成し、ニッチ内部のシグナルが活性化される。

## 謝辞

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

本研究に用いた S100 $\beta$ -GFP トランスジェニック動物を提供して頂いた、元埼玉大学理学部生体制御学科・細胞制御学研究室の井上金治名誉教授に感謝申し上げます。

また、明治大学在籍中に、研究に関するご助言、ご指導を頂きました、動物生理学研究室の故太田昭彦准教授、細胞情報制御学研究室の戸村秀明教授をはじめ、所属研究室の皆様に感謝申し上げます。

*in situ* hybridization の技術指導をはじめ、多くのご助言を頂きました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に深く感謝申し上げます。

組織化学的手法の技術指導をはじめ、多くのご助言、ならび抗ホルモン抗体を供与して頂きました帝京大学医学部・解剖学講座の中倉敬助教に深く感謝申し上げます。

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

実験試料の供与や多くのご助言を頂きました、自治医科大学医学部・解剖講座の屋代隆教授、菊池元史教授、藤原研講師、塚田岳大助教、東森生助教、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学・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・生殖科学研究室の東村博子教授、上野山賀久助教、美辺詩織氏と研究室の皆様、帝京大学医学部・生化学講座の諏佐崇生助教に深く感謝申し上げます。

学位論文審査において、ご指導とご鞭撻を頂きました明治大学・ゲノム機能工学研究室の大鐘潤准教授ならびに自治医科大学医学部・解剖講座の藤原研講師に感謝申し上げます。

そして、実験のご指導、ご助言を下さいました樋口雅司博士、陳黙博士、八子英司氏、三ツ石英生氏、菅野尚子氏、津田光芳氏、渋谷汐里氏、関田雅世氏、上春浩貴氏、河合航平氏、高梨遥氏、西村直人氏、西原大翔氏をはじめ、遺伝情報制御学研究室でお世話になりました皆様へ、心から感謝申し上げます。

## 引用文献

- Aihara M, Sugawara K, Torii S, Hosaka M, Kurihara H, Saito N, Takeuchi T (2004) Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest* 84:1581-1592
- Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, Gaston-Massuet C, Mollard P, Jacques TS, Le Tissier P, Dattani MT, Pevny LH, Martinez-Barbera JP (2013) Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. *Cell Stem Cell* 13:433-445
- Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T (2003) Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* 19:257-267
- Arvanitis D, Davy A (2008) Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev* 22:416-429
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457:608-611
- Barnhart KM, Mellon PL (1994) The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol* 8:878-885
- Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G,

- Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111:251-263
- Ben-Jonathan N, Peleg E, Hoefler MT (1983) Optimization of culture conditions for short-term pituitary cell culture. *Methods Enzymol* 103:249-257
- 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
- Bodner M, Karin M (1987) A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cell. *Cell* 50:267-275
- 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
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425:841-846
- Charles MA, Saunders TL, Wood WM, Owens K, Parlow AF, Camper SA, Ridgway EC, Gordon DF (2006) Pituitary-specific Gata2 knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function. *Mol Endocrinol* 20:1366-1377

- 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, Deneef C, Vankelecom H (2005) The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* 146:3985-3998
- Chen M, Kato T, Higuchi M, Yoshida S, Yako H, Kanno N, Kato Y (2013) Coxsackievirus and adenovirus receptor-positive cells compose the putative stem/progenitor cell niches in the marginal cell layer and parenchyma of the rat anterior pituitary. *Cell Tissue Res* 354:823-836
- Claudius L, Yoshimi Y, Yoichiro H, Gabriel M, Koichi M (2006) Phagocytotic removal of apoptotic endocrine cells by folliculostellate cells and its functional implications in clusterin accumulation in pituitary colloids in helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*). *Acta Histochem* 108:69-80
- Claudius L, Yoshimi Y, Yoichiro H, Rudovick K, Koichi M (2005) Molecular cloning, expression profile and functional implications of clusterin in the pituitary gland of helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell Biol Int* 29:675-686
- Cocchia D, Miani N (1980) Immunocytochemical localization of the



- brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J Neurocytol* 9:771-782
- Committee EN (1997) Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell* 90:403-404
- Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3:1091-1097
- Cowan CA, Henkemeyer M (2001) The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 413:174-179
- Daar IO (2012) Non-SH2/PDZ reverse signaling by ephrins. *Semin Cell Dev Biol* 23:65-74
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945-956
- Dasen JS, Rosenfeld MG (2001) Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* 24:327-355
- Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M, Yancopoulos GD (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266:816-819
- Fauquier T, Guerineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P (2001) Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8891-8896

- 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 USA* 105:2907-2912
- Fukai J, Yokote H, Yamanaka R, Arao T, Nishio K, Itakura T (2008) EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. *Mol Cancer Ther* 7:2768-2778
- Galichet C, Lovell-Badge R, Rizzoti K (2010) Nestin-Cre mice are affected by hypopituitarism, which is not due to significant activity of the transgene in the pituitary gland. *PLoS One* 5:e11443
- Genander M (2012) Eph and ephrins in epithelial stem cell niches and cancer. *Cell Adh Migr* 6:126-130
- 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 USA* 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
- Hafner C, Meyer S, Hagen I, Becker B, Roesch A, Landthaler M, Vogt T (2005) Ephrin-B reverse signaling induces expression of wound healing associated genes in IEC-6 intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 11:4511-4518
- Halford MM, Armes J, Buchert M, Meskenaite V, Grail D, Hibbs ML, Wilks

- AF, Farlie PG, Newgreen DF, Hovens CM, Stacker SA (2000) Ryk-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed Eph receptor crosstalk. *Nat Genet* 25:414-418
- Helbling PM, Saulnier DM, Brandli AW (2000) The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development* 127:269-278
- Higuchi M, Kanno N, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Yako H, Shibuya S, Sekita M, Tsuda M, Mitsuishi H, Nishimura N, Kato T, Kato Y (2014) GFP-expressing S100  $\beta$  -positive cells of the rat anterior pituitary differentiate into hormone-producing cells. *Cell Tissue Res* 357:767-779
- Higuchi M, Kato T, Chen M, Yako H, Yoshida S, Kanno N, Kato Y (2013) Temporospatial gene expression of Prx1 and Prx2 is involved in morphogenesis of cranial placode-derived tissues through epithelio-mesenchymal interaction during rat embryogenesis. *Cell Tissue Res* 353:27-40
- Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T, Kato Y (2014) PRRX1 and PRRX2 distinctively participate in pituitary organogenesis and cell supply system. *Cell Tissue Res* 357:323-335
- Himanen JP, Rajashankar KR, Lackmann M, Cowan CA, Henkemeyer M, Nikolov DB (2001) Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 414:933-938
- Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M, Chumley MJ, Silvany RE, Henkemeyer M, Frisen J (2006) EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche.

Cell 125:1151-1163

Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz H, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG (1988) A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529

Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S (1999) The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol* 62:205-218

Inoue K, Mogi C, Ogawa S, Tomida M, Miyai S (2002) Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? *Arch Physiol Biochem* 110:50-53

Irie F, Yamaguchi Y (2002) EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci* 5:1117-1118

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

Japon MA, Rubinstein M, Low MJ (1994) In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125

Jensen PL (2000) Eph Receptors and Ephrins. *Stem Cells* 18:63-64

Kagayama M (1965) The follicular cell in the pars distalis of the dog pituitary gland: an electron microscope study. *Endocrinology* 77:1053-1060

- Kiecker C, Lumsden A (2012) The role of organizers in patterning the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 35:347-367
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121:1109-1121
- Koo BK, Lim HS, Chang HJ, Yoon MJ, Choi Y, Kong MP, Kim CH, Kim JM, Park JG, Kong YY (2009) Notch signaling promotes the generation of EphrinB1-positive intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 137:145-155, 155 e141-143
- Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J (2001) A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-859
- Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J (1996) Ptx1, a *bicoid*-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* 10:1284-1295
- Li S, Crenshaw EB, III, Rawson W, Simmons D, Swanson L, Rosenfeld M (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347:528-533
- Lu Q, Sun EE, Klein RS, Flanagan JG (2001) Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* 105:69-79
- Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG (1999) Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400:77-81

- Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466:829-834
- Meyer S, Hafner C, Guba M, Flegel S, Geissler EK, Becker B, Koehl GE, Orso E, Landthaler M, Vogt T (2005) Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM-attachment and migration of B16 melanoma cells. *Int J Oncol* 27:1197-1206
- Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y (1996) Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology* 137:3356-3367
- Murai KK, Pasquale EB (2003) 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116:2823-2832
- Nakada M, Anderson EM, Demuth T, Nakada S, Reavie LB, Drake KL, Hoelzinger DB, Berens ME (2010) The phosphorylation of ephrin-B2 ligand promotes glioma cell migration and invasion. *Int J Cancer* 126:1155-1165
- Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K (1980) S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 191:523-531
- 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
- Nobes CD, Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62
- Nolan LA, Kavanagh E, Lightman SL, Levy A (1998) Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. *J Neuroendocrinol* 10: 207-215
- Nolan LA, Levy A (2006) A population of non-luteinising hormone/non-adrenocorticotrophic hormone-positive cells in the male rat anterior pituitary responds mitotically to both gonadectomy and adrenalectomy. *J Neuroendocrinol* 18:655-661
- 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
- Ogawa S, Ishibashi Y, Sakamoto Y, Kitamura K, Kubo M, Sakai T, Inoue K (1997) The glycoproteins that occur in the colloids of senescent porcine pituitary glands are clusterin and glycosylated albumin fragments. *Biochem Biophys Res Commun* 234:712-718
- Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T (2010) The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33:387-399
- 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

- Pasquale EB (2005) Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:462-475
- Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Huganir RL (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37:263-274
- Pfaffle RW, Blankenstein O, Wuller S, Kentrup H (1999) Combined pituitary hormone deficiency: role of Pit-1 and Prop-1. *Acta Paediatr Suppl* 88:33-41
- Pitulescu ME, Adams RH (2010) Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev* 24:2480-2492
- Qiu R, Wang X, Davy A, Wu C, Murai K, Zhang H, Flanagan JG, Soriano P, Lu Q (2008) Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B. *J Cell Biol* 181:973-983
- 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. *Exp Cell Res* 312:1566-1580
- Rinehart JF, Farquhar MG (1953) Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* 1:93-113
- Sangiorgi E, Capecchi MR (2008) Bmi1 is expressed *in vivo* in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40:915-920
- Sato T, Clevers H (2013) Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*



340:1190-1194

Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H (2011) Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469:415-418

Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4:7-25

Scoville DH, Sato T, He XC, Li L (2008) Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 134:849-864

Shamah SM, Lin MZ, Goldberg JL, Estrach S, Sahin M, Hu L, Bazalakova M, Neve RL, Corfas G, Debant A, Greenberg ME (2001) EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105:233-244

Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert DC (1997) Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech* 39:138-149

Solanas G, Cortina C, Sevillano M, Batlle E (2011) Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling. *Nat Cell Biol* 13:1100-1107.

Stefanova I, Horejsi V, Ansoategui IJ, Knapp W, Stockinger H (1991) GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 254:1016-1019

Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25:977-988

- Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, Matsuzaki Y, Miyata T, Okano H (2008) Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J Cell Sci* 121:1204-1212
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676
- Tanaka M, Kamata R, Sakai R (2005) EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J Biol Chem* 280:42375-42382
- Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD, de Sauvage FJ (2011) A reserve stem cell population in small intestine renders *Lgr5*-positive cells dispensable. *Nature* 478:255-259
- Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T (2004) Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20:707-718
- Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeton DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG (1998) Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 12:1691-1704
- Tremblay JJ, Lanctot C, Drouin J (1998) The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit-1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene *Lim3/Lhx3*. *Mol Endocrinol* 12:428-441
- Trivier E, Ganesan TS (2002) RYK, a catalytically inactive receptor tyrosine kinase, associates with EphB2 and EphB3 but does not interact with

- AF-6. *J Biol Chem* 277:23037-23043
- Truitt L, Freywald A (2011) Dancing with the dead: Eph receptors and their kinase-null partners. *Biochem Cell Biol* 89:115-129
- van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71:241-260
- Vankelecom H (2010) Pituitary stem/progenitor cells: embryonic players in the adult gland? *Eur J Neurosci* 32:2063-2081
- Vankelecom H (2012) Pituitary stem cells drop their mask. *Curr Stem Cell Res Ther* 7:36-71
- Ward RD, Raetzman LT, Suh H, Stone BM, Nasonkin IO, Camper SA (2005) Role of PROP1 in pituitary gland growth. *Mol Endocrinol* 19:698-710
- Ward RD, Stone BM, Raetzman LT, Camper SA (2006) Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. *Mol Endocrinol* 20:1378-1390
- Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Macdonald HR, Trumpp A (2007) Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci* 1106:64-75
- Wu C, Qiu R, Wang J, Zhang H, Murai K, Lu Q (2009) ZHX2 Interacts with Ephrin-B and regulates neural progenitor maintenance in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 29:7404-7412.
- Xi HQ, Wu XS, Wei B, Chen L (2012) Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy. *J Cell Mol Med* 16:2894-2909
- Xu Q, Allodus G, Holder N, Wilkinson DG (1995) Expression of truncated

- Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development* 121:4005-4016.
- Yoshida S, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Tsuda M, Nishihara H, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y (2014) Characterization of murine pituitary-derived cell lines Tpit/F1, Tpit/E and TtT/GF. *J Reprod Dev* 60:295-303
- Yoshida S, Kato T, Higuchi M, Yako H, Chen M, Kanno N, Ueharu H, Kato Y (2013) Rapid transition of NESTIN-expressing dividing cells from PROP1-positive to PIT1-positive advances prenatal pituitary development. *J Neuroendocrinol* 25:779-791
- 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
- Zarbalis K, Wurst W (2000) Expression domains of murine ephrin-A5 in the pituitary and hypothalamus. *Mech Dev* 93:165-168
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425:836-841
- Zhou R (1998) The Eph family receptors and ligands. *Pharmacol Ther*

77:151-181

Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, Poppleton H, Zakharenko S, Ellison DW, Gilbertson RJ (2009) Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457:603-607

Zhu X, Wang J, Ju BG, Rosenfeld MG (2008) Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. *Curr Opin Cell Biol* 19:605-611

Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12:11-24