



胚性幹細胞から成長ホルモン産生細胞への分化

工藤, 工

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-31

(Date of Publication)

2013-02-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3393

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003393>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



胚性幹細胞から成長ホルモン産生細胞への分化

工 藤 工

神戸大学大学院 医学系研究科 応用分子医学講座
内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科

連絡先：工藤 工

神戸大学大学院 医学系研究科 応用分子医学講座
内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科

神戸市中央区楠町7-5-1

電話：078-382-5885

FAX：078-382-5890

(平成17年1月6日受付)

要 約

胚性幹細胞 (ES) 細胞は分化の全能性を有する細胞として知られており、各種細胞への分化が報告されている。今回、下垂体細胞、特に成長ホルモン (GH) 分泌細胞への分化が誘導されるかを RT-PCR を用いて検討した。ES 細胞において Ptx1, Ptx2 など下垂体分化の初期から認められる転写因子の発現が確認されたが、GH 遺伝子の組織特異的発現を直接調節する Pit1 遺伝子の強制発現のみでは、内因性 GHmRNA の発現は認められなかった。GHmRNA の発現は胚様体 (EB) 形成の有無では影響されず、フィーダーフリーの培養により経時的に増加することを確認した。さらに、通常マウス ES 細胞は、leukemia inhibitory factor (LIF) 存在下でその多能性が維持され、LIF が不在状態では分化するとされているが、LIF 存在下で GHmRNA の発現は増強された。しかし、その GHmRNA の発現は弱く ES 細胞は不均等に分化したものであるため、全 ES 細胞を用いて性質を検討することが困難であった。そこで、GH プロモーター／エンハンサーの下流に GFP を連結したベクターを製作し ES 細胞に導入し GH 産生細胞の選択を行った。FACS を使用した解析では、RT-PCR の結果と同様に LIF 存在下で GFP 陽性細胞の割合が高く認められ、GFP 陽性細胞と陰性細胞に分離したところ、陽性細胞で GHmRNA の増加を確認した。今回われわれは、LIF の存在下で経時的に GH 産生細胞が増加すること、下垂体特異的な GH プロモーター／エンハンサーを利用することにより、GHmRNA 産生細胞を分離することが可能であることを示した。

緒 言

下垂体は、分化がよく検討されている組織であり、分化の各段階で作用する転写因子がすでに報告されている。さらに、分化と共にそれぞれの細胞が特有なホルモンを産生し、器官形成の過程を研究する上で良好なモデルとなりうる。

成長ホルモン分泌不全性低身長症 (GHD) は、成長ホルモン (GH) の分泌不全による低身長である。GHD の内、約 5% は頭蓋咽頭腫などの器質的な要因によるものであるが、残りの大部分の原因は明確ではなく特発性 GHD と呼ばれている。特発性の中には、骨盤位分娩、胎児仮死など周産期異常の既往があるもののほかに、下垂体低形成を伴うような症例も存在し、特殊な遺伝性のものであるとして、家族性 GH 欠損症¹⁾、GH 構造遺伝子異常症^{2, 3)}、GHRH 受容体異常症^{4, 5)}などが知られている。さらに、遺伝性の GH 分泌不全に以外に、TSH など他の下垂体前葉ホルモンの分泌低下を伴う複合型下垂体ホルモン欠損症 (multiple pituitary hormone deficiency; MPH) が知られており、その原因として Pit-1 異常症⁶⁾、Propl 異常症⁷⁾、Lhx3 異常症⁸⁾、HESX1 異常症⁹⁾、などの転写因子異常が報告されている。しかし、なお、病因のはっきりしない症例も多く、下垂体の器官形成を研究することは、GHD の原因を明らかにするためにも重要である。

胚性幹細胞 (ES 細胞) は分化の全能性を有する細胞として知られ、leukemia inhibitory factor (LIF) の存在下でその多能性が維持されることが知られている¹⁰⁾、近年、さまざまな方法で、各種細胞への分化が報告されており、in vitro での分化の研究は分化調節

【キーワード】成長ホルモン, 胚性幹細胞, LIF, GHプロモーター, 下垂体分化

機構の解明と共に、再生医療への応用を考える上でも重要である。

方 法

1) 細胞の維持

マウス由来の ES 細胞である ZhTc6 細胞を、ゼラチン (gelatin:Sigma) コートしたディッシュを使用し、LIF (ESGRO : GibcoBRL) 1000U/ml, 10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む Glasgow minimum essential medium (GMEM:Sigma) 中で培養した。

2) 逆転ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法による GH 発現解析

TRIzol 試薬 (Invitrogen) で抽出した total RNA から、M-MLV 逆転写酵素 (Invitrogen) を用い Random Primer 法により cDNA を合成し、Ampli Taq Gold (Roshe) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR の増幅回数は産物の量が定量可能域に入るように設定した。

3) Pit-1 の発現

flag エピトープをつけた Pit-1 発現ベクターを lipofectamin2000 (Invitrogen) により ZhTc6 細胞に導入、その蛋白の発現をウェスタンブロット法で、flag 抗体により確認した。

4) GH 産生細胞分化に及ぼす培養条件の差異

トリプシンで細胞を単離したのち、ゼラチンコートした35mm ディッシュに10000個/3ml の密度で培養した。LIF 含有、および非含有 GMEM/10%FBS を使用し、GH 発現を比較した。ES 細胞を三次元的に培養するために、DISH に細胞 (500個/15 μ l) を含む培養液小滴をディッシュに付着させた後、ディッシュを上下転倒させ3日間培養し、胚様体 (EB) を形成させた。さらに、2日間浮遊培養した後、ゼラチンコートディッシュに移し培養を継続した。

5) ソマトトロフ特異的な LCRGFP ベクター導入 ES 細胞

ソマトトロフ特異的な GH 発現に関与すると報告されている Locus control region (LCR) 404bp, および GH プロモーターと Green fluo protein (GFP) cDNA を連結した LCRGFP ベクターを作成した¹¹⁾。

(図 6 A) このベクターを lipofectamin2000 (Invitrogen) により ZhTc6 細胞に導入した。LCRGFP ベクターは同時に CMV プロモーター下で NEO 耐性因子を発現するため G418 (Promega) により選択し、LCRGFP がゲノムDNAに組み込まれた細胞株ZhTc6-LCRGFPを得た。

6) フローサイトメトリーによる ZhTc6-LCRGFP細

胞の分離

ゼラチンコートした100mm ディッシュに50000個/10ml の密度で ZhTc6-LCRGFP 細胞をまき、5日間培養した細胞を、トリプシンで単離した。FACS Vantage (Becton and Dickinson) を使用し、GFP 陽性細胞と陰性細胞をソーティングした。

結 果

1) ES 細胞における下垂体関連転写因子の発現

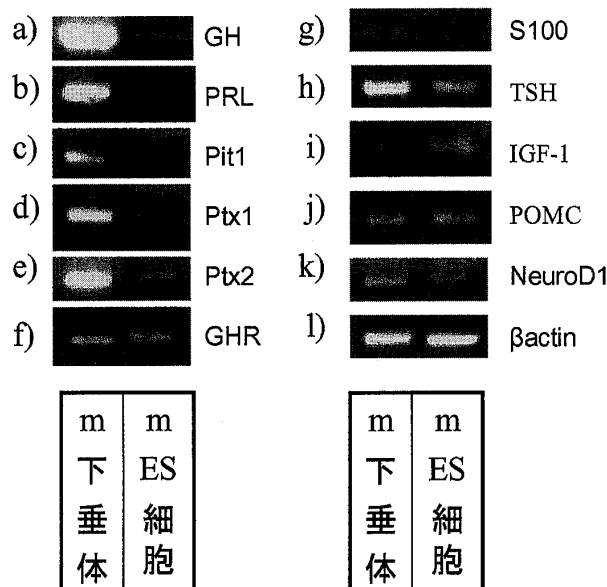
RT-PCR により ES 細胞の下垂体関連遺伝子の発現を観察した。ES 細胞では、PRL, Pit-1, S100m RNA の発現は認められず、Ptx1, Ptx2, GH, TSH, neuroD1, POMC, IGF-1, GHR の mRNA 発現が認められた。(図. 1)

2) Pit-1 強制発現における関連遺伝子の変化

Pit-1 発現ベクターの導入により、Pit-1 蛋白の発現を認めるものの、GH, TSH, PRL, Ptx1, Ptx2, Prop1 の発現に変化は認められなかった。(図. 2, A, B)

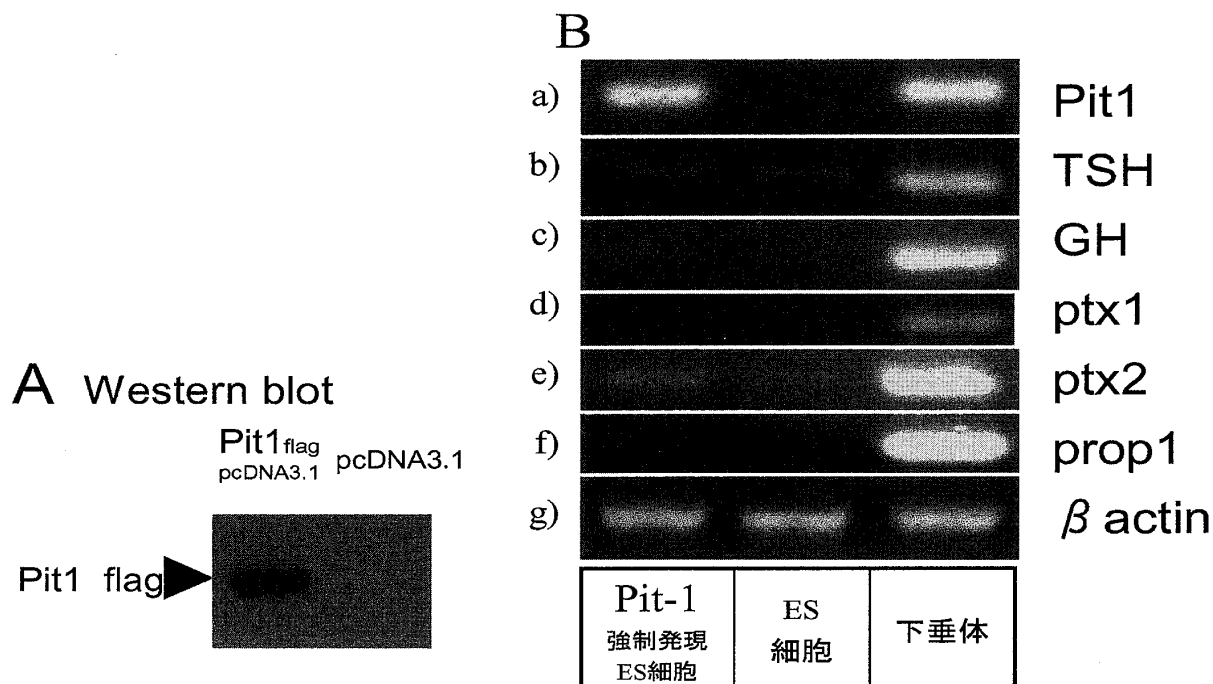
3) 各種 mRNA 発現量の経時的変動

LIF 非存在下で培養することにより ES 細胞は分化することが知られているので、ZhTc6 細胞をこの条



(図 1) RT-PCR によるマウス下垂体, ES 細胞の発現遺伝子の比較

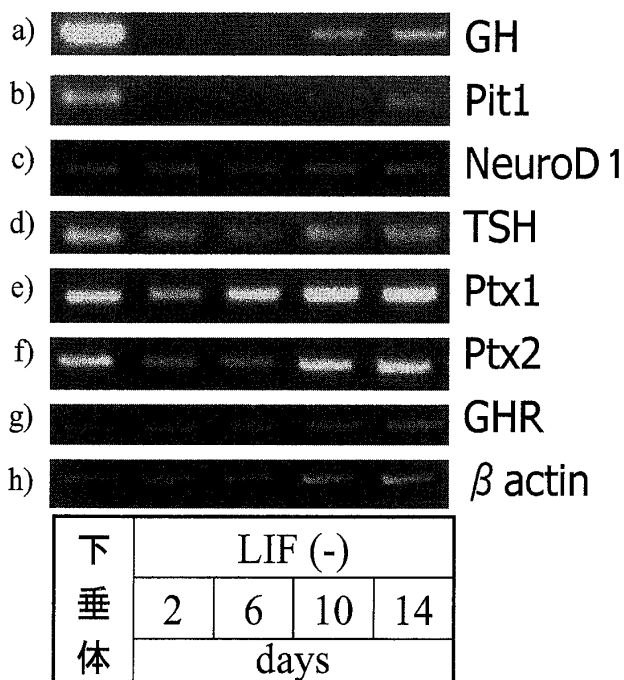
マウス下垂体, ES 細胞より RNA を抽出、2.5 μ g の total RNA を使用し RT-PCR を行った。左側マウス下垂体, 右側マウス ES 細胞。a) GH, b) PRL, c) Pit-1, d) Ptx1, e) Ptx2, f) GHR, g) S100, h) TSH, i) IGF-1, j) POMC, k) NeuroD1, l) β -actin 遺伝子の発現を PCR 法により比較した。



(図2) ES細胞におけるPit-1強制発現により効果

A) lipofectamin2000により, human Pit-1flag発現ベクターのtransfectionを行い, flag抗体を用いたWestern blot法でPit-1flagの蛋白発現を確認した。

B) Pit-1発現ES細胞, ES細胞, マウス下垂体よりRNAを抽出。2.5 μ g total RNAを用いRT-PCRを行った。左側より, Pit-1発現ES細胞, ES細胞, 下垂体, a) Pit-1, b) TSH, c) GH, d) Ptx1, e) Ptx2, f) Prop1, g) β actin遺伝子の発現をPCR法により比較した。



(図3) LIF非存在下ゼラチンコートディッシュで培養したES細胞における遺伝子発現

ES細胞を, LIF非存在下に, ゼラチンコートディッシュで培養, 2, 6, 10, 14日に, それぞれ, RNAを抽出, 2.5 μ gのtotalRNAを用いRT-PCRを行った。a) GH, b) Pit-1, c) NeuroD1, d) TSH, e) Ptx1, f) Ptx2, g) GHR, h) β actin遺伝子の発現をPCR法により比較した。

件で培養し, 下垂体関連の各種遺伝子発現を経時的に観察した。GH, Ptx1, Ptx2, Pit1 の遺伝子発現が経時的に増加することを確認したが, GHR, TSH, neuroD1 の発現は変化を認めなかった。(図. 3)

4) 各種培養条件における GH 遺伝子の発現変化

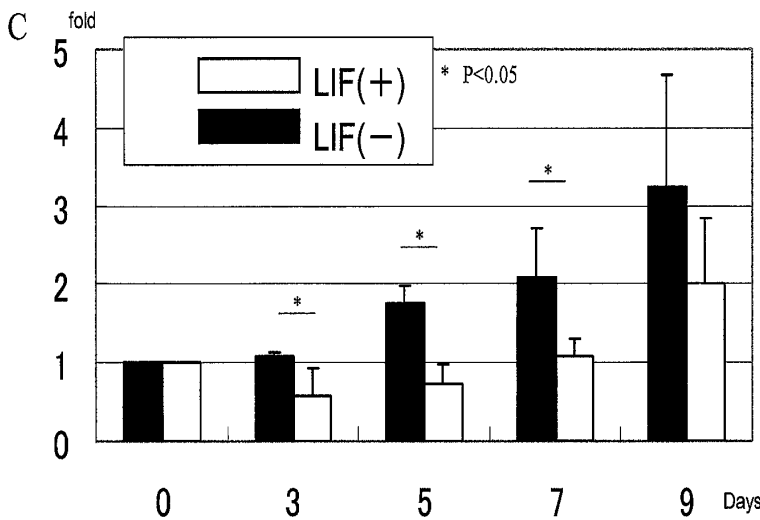
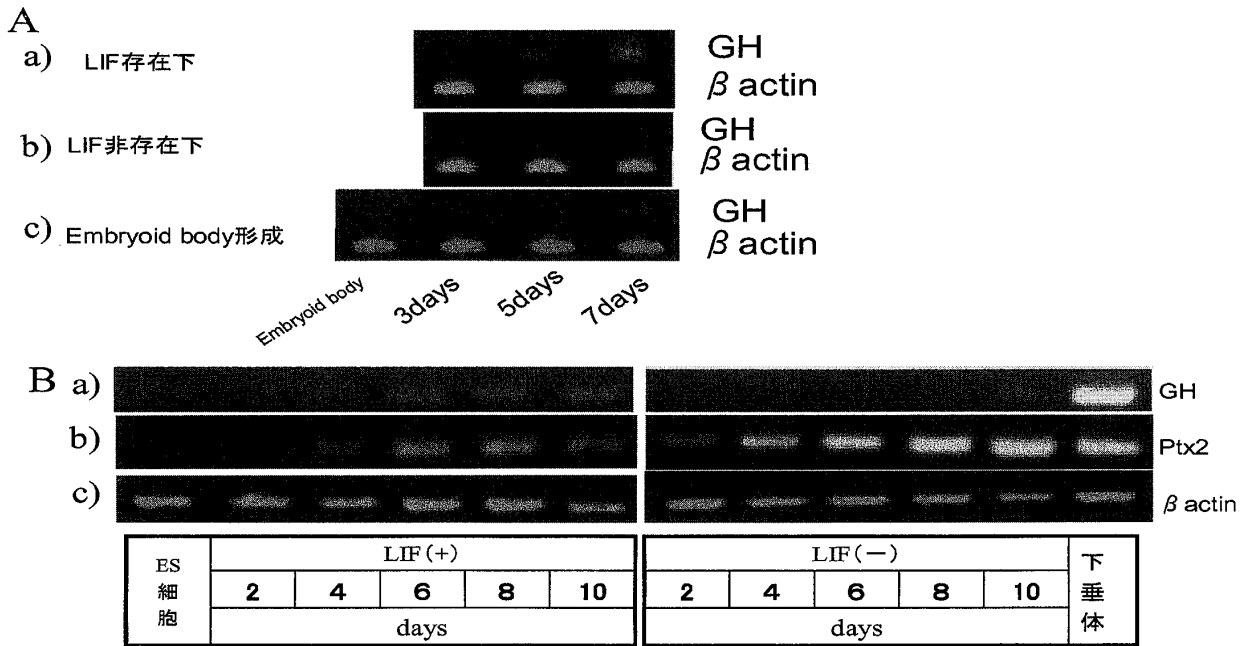
LIF 存在下, 非存在下, EB の形成においてそれぞれ GHm RNA の経時的変化を観察し, いずれにおいても, GHm RNA が経時的に増加することを確認した。そのなかで, 特に, LIF 存在下で培養した場合に最も GHmRNA が増加することを確認した。(図. 4A)

さらに, 他の下垂体関連遺伝子の増減を観察したが, GH と反して Ptx2 の発現が LIF 存在下で抑制されていた。(図. 4B)

未処理の ES 細胞での GHmRNA と β actin の発現比を 1 として, 3, 5, 7, 9日 で GHmRNA の経時的変化を比較した。LIF 存在下では 5 日目から RNA は増加しているの対し, LIF 非存在下では一度減少の傾向となりその後 7 から 9 日目から増加した。(図. 4C)

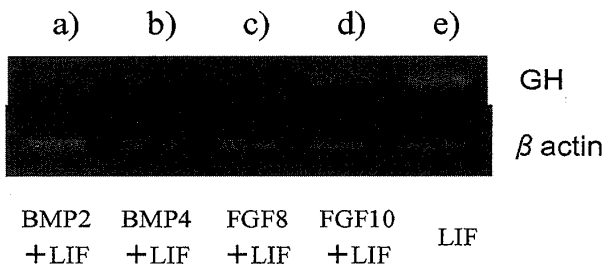
5) 各種サイトカインの添加による GH の発現

BMP2, BMP4, FGF8, FGF10は下垂体の初期分化に関連したサイトカインである。LIF 存在下でそれぞれを投与し観察したが, 明らかな GHmRNA の増加は認められなかった。(図. 5)



(図4) 各種培養条件下のGHmRNA発現

A)a) LIF 存在下, b) LIF非存在下, c) Embryoid body形成による, GHmRNAの発現量の比較。a), b) では, それぞれ, 3, 5, 7日にRNAを抽出。c) では5日間でEmbryoid bodyを形成, それを0日とし, 3, 5, 7日にRNAを抽出, RT-PCR法によりGH mRNAの発現を比較した。
B) 左側LIF存在下, 右側LIF非存在下で, それぞれ2, 4, 6, 8, 10日でRNAを抽出し, a) GH, b) Ptx2, c) β actin発現をRT-PCRにより比較した。
C) 未処理のES細胞でのGH mRNAと β actinの発現の比を1として, 3, 5, 7, 9日でGH mRNA発現量の経時的変化を比較した。



(図5) サイトカイン添加後のGH mRNAの発現
a) BMP1+LIF, b) BMP4+LIF, c) FGF8+LIF, d) FGF10+LIF, e) LIFを培養液に添加後5日目にRNAを抽出しRT-PCRにより比較した。

6) LCRGFPベクターの細胞特異的活性化

GH, PRLを分泌するラット下垂体腫瘍株であるGH3細胞, 繊維芽細胞であるCOS細胞に, lipofecamin2000によりLCRGFPベクターを導入した。GH3細胞で特異的にGFPが誘導されることを確

認した。(図. 6B)

7) LCRGFPプラスミド導入細胞

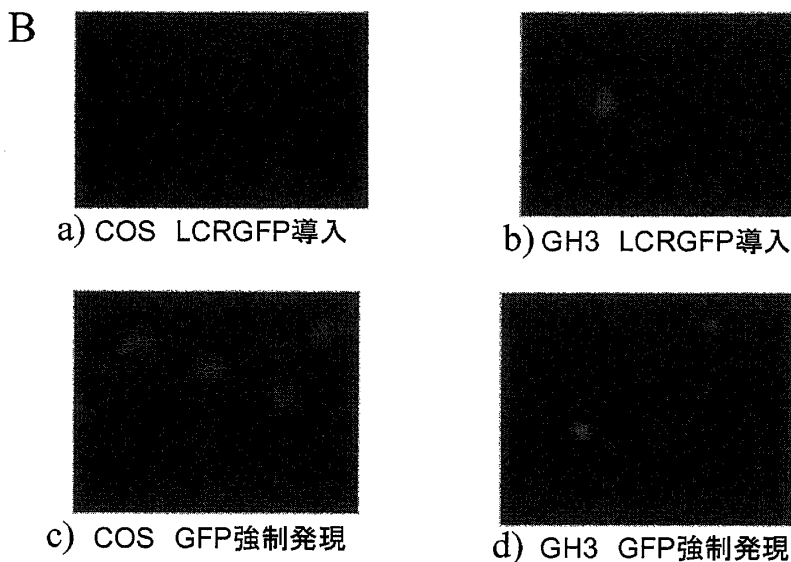
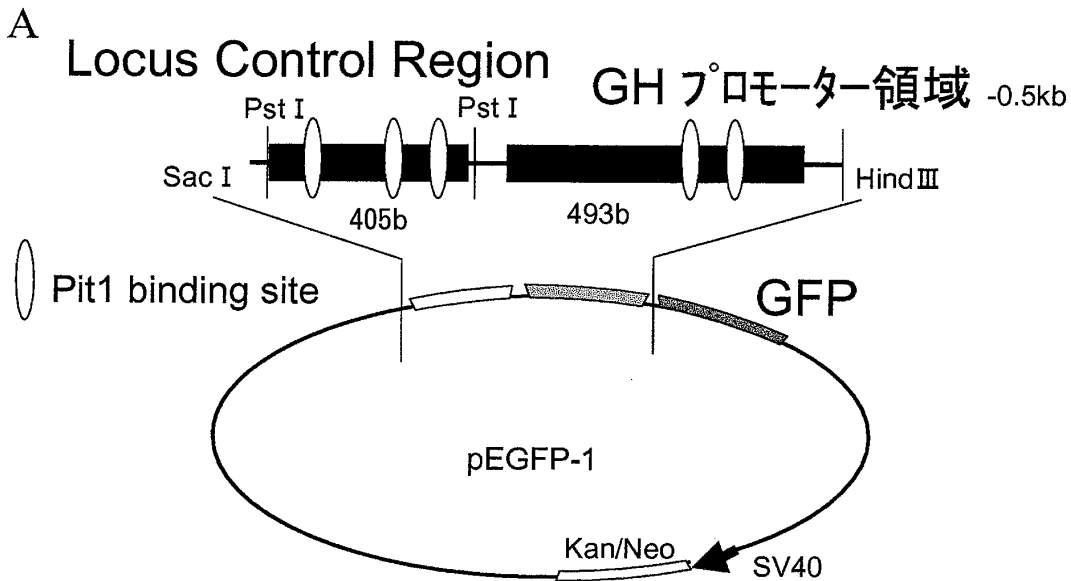
LCRGFPベクターをZhTC6細胞に導入, PCR法によりLCRGFP遺伝子の導入を確認した。(図7a) 得られたZhTc6-LCRGFP16細胞をフローサイトメトリーにより観察し, LIF添加時にGFP陽性細胞が増加しているのを確認した。(図. 7b, c)

8) ZhT6-LCRGFP16細胞のGFP陽性細胞と陰性細胞におけるGHmRNA発現量の比較

ZhTc6-LCRGFP16細胞のGFP陽性細胞においてGHmRNA発現は陰性細胞と比較して増加していた。

考 察

下垂体においてPtx1¹²⁾, Ptx2¹³⁾, Hesx1¹⁴⁾, Prop1¹⁵⁾, Pit-1¹⁶⁾などの転写因子が発現しており, 下垂体細胞の



(図6) GHプロモーター下にGFP発現するレポータープラスミド (LCR-GFP) の作製

A) pEGFP-1プラスミドのGFP上流に、humanのGH転写開始点から上流493bpとlocus control region約405bpを組み込んだプラスミドを製作しLCR-GFPとした。

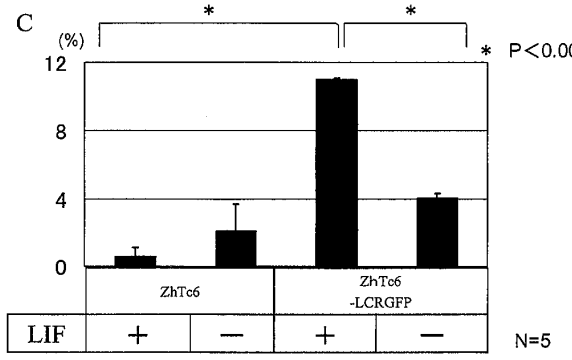
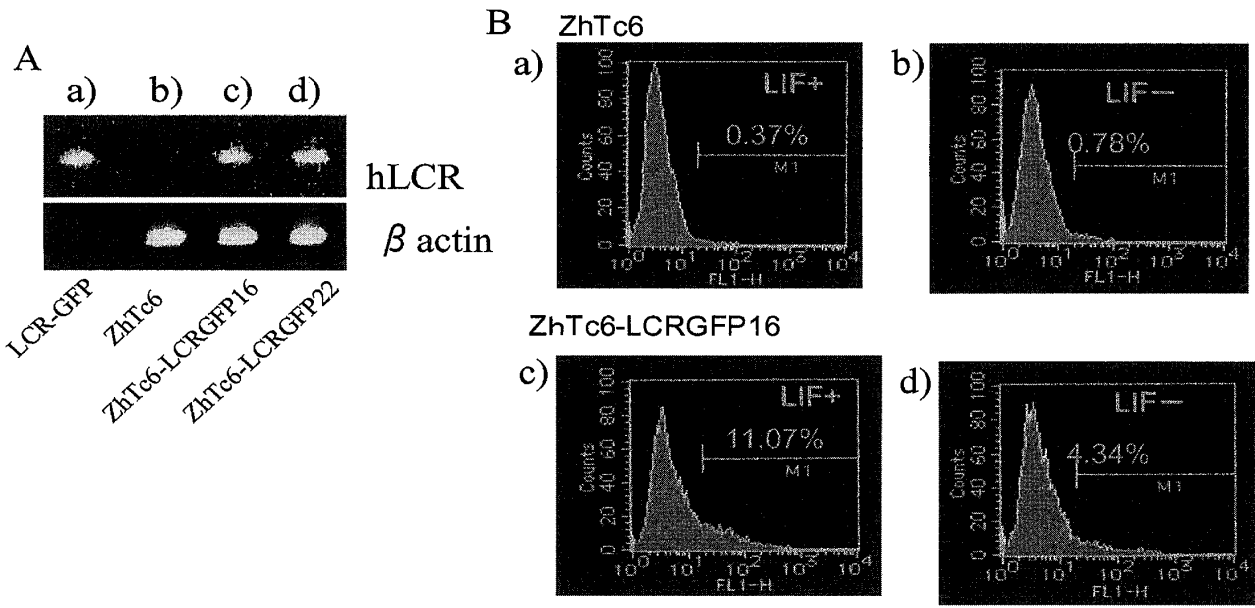
B) LCR-GFPをCOS細胞にlipofectamin 2000により導入したときGFPの発現が認められなかった (a)。同様にGH3細胞に導入しGFPの発現を確認した (b)。COS細胞, GH3細胞いずれにおいてもプラスミドの導入が行われていることCMVプロモーター下にGFPを発現するプラスミドを利用し確認した (c, d)。

分化, 下垂体ホルモンの発現に関与していることが報告されている。未処理のES細胞において, Ptx1, Ptx2など下垂体分化の初期から認められる転写因子の発現が確認され, またわずかではあるが GHmRNA の発現が認められたため一部のES細胞はGH産生細胞の方向に分化している可能性が想定された。しかし, GH遺伝子発現を直接促進する Pit-1 の発現は認められず, この欠如のためGH発現が不十分である可能性も考えられた。この点を明確にするため, Pit-1 蛋白をES細胞で発現させた。GH, TSHmRNA の発現は増加しなかった。この成績は, 単に Pit-1 発現が欠けているためにGH発現が不十分であると言う事ではなく, Pit-1 以外の因子による Pit-1 が作用する場の形成が不十分である可能性を示唆する。そこで種々の方法によってES細胞をGH産生細胞の方法に分化させることを試みた。

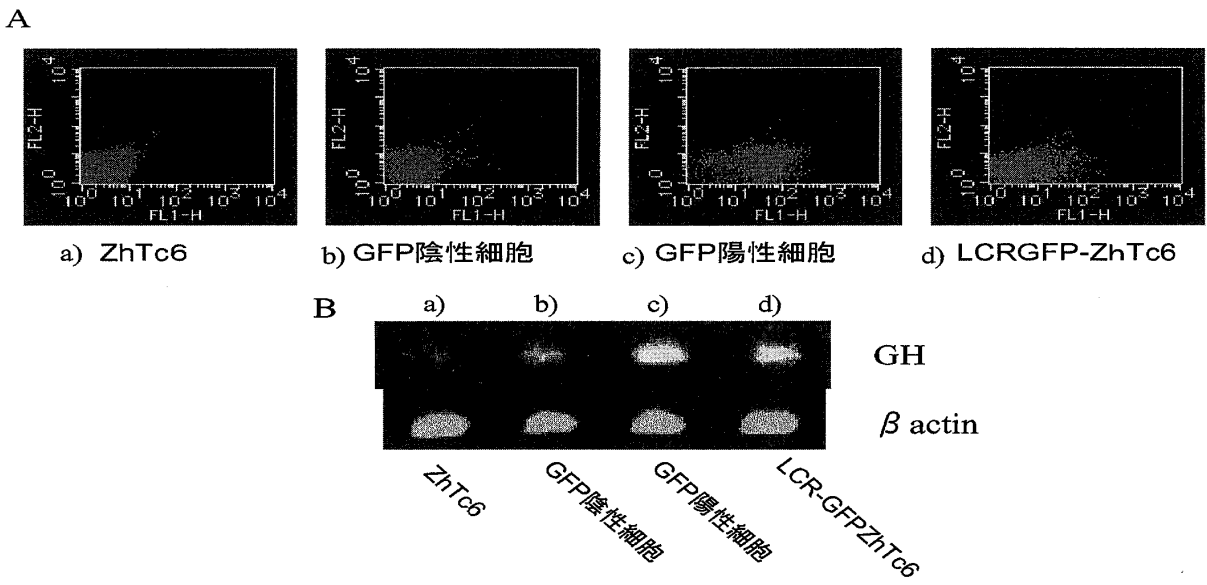
ES細胞は, 1つの固体を形成するあらゆる種類の

細胞へと分化しうる能力をもっている。in vitro で分化させるための一般的な方法として胚様体を形成させる手法がある¹⁹⁾。その方法は個体発生を模倣したもので, 培養初期の胚様体は胚盤葉上層細胞からなる芯を原始内胚葉の皮が包み込む構造を持っているが, その後, 羊膜腔に相当する大きな内腔が生じると外側の原始内胚葉は近位内胚葉に, 内側の胚盤葉上層は胚体外胚葉に分化し, その間に中胚葉が形成される。今回の実験の結果では, 胚様体形成という方法がGHの発現に関して促進的には働かなかったが, もともと下垂体組織が外胚葉に由来するものであり, 内胚葉, 中胚葉の形成といったものを必要としないためかもしれない。

一方, ゼラチンコートディッシュ上でES細胞を培養したとき, 経時的にGHmRNAの発現は増加した。GHmRNAと同様に, Ptx1, Ptx2, Pit-1の遺伝子が経時的に増加する一方で, GHR, TSH,



(図7) LCR-GFPプラスミドのES細胞への導入
 A) LCR-GFPプラスミドを制限酵素sac Iにより直線化し ZhTc6細胞に導入し、G418により選択、LCR-GFP導入細胞株(ZhTc6LCR-GFP16, および22)を得た。a) LCR-GFPプラスミドをテンプレートとし、b) ZhTc6, c) ZhTc6LCR-GFP16, d) ZhTc6LCR-GFP22からそれぞれゲノムDNAを抽出し、hLCRを認識するプライマーにより、LCR-GFPの配列がゲノムDNA導入されているのを確認した。
 B) ZhTc6, ZhTc6LCR-GFP16をLIF存在下、非存在下で5日間培養し、フローサイトメトリーにより、GFP陽性細胞の割合を比較した。a) ZhTc6細胞LIF存在下、b) ZhTc6LIF非存在下、c) ZhTc6LCR-GFP16細胞LIF存在下、d) ZhTc6LCR-GFP16細胞 LIF 非存在下
 C) ZhTc6細胞, ZhTc6LCR-GFP16細胞をそれぞれLIF存在下、非存在下で5日間培養しGFPの陽性細胞数の割合を比較した。



(図8) ZhTc6LCR-GFP16, GFP陽性細胞と陰性細胞におけるGH発現量
 A) ZhTc6LCR-GFP16細胞をLIF存在下で5日間培養し、フローサイトメトリーによりGFP陽性細胞と陰性細胞を分離した。a) 未分化 ZhTc6細胞, b) GFP陰性細胞, c) GFP陽性細胞, d) 分離前のZhTc6LCR-GFP16細胞のフローサイトメトリーパターン(プロフィール)を示す。
 B)a) 未分化ZhTc6細胞, b) GFP陰性細胞, c)GFP陽性細胞, d) 分離前のZhTc6LCR-GFP16細胞からRNAを抽出、RT-PCRによりGHm RNA量を比較した。上段GH, 下段β actin(control)でGFP陽性細胞群においてGHm RNAの増加が認められた。

neuroD1mRNA の発現は変化を認めなかった。また、いずれの場合においても、ES 由来の細胞からは、PRLmRNA の発現は認められなかった。下垂体の発生において、PRL 分泌細胞は GH 分泌細胞がさらに分化した後、出現する細胞であるためかもしれない。下垂体に関連した一部の遺伝子では、その発現に変化がない中で、GH 発現に関連した遺伝子群の経時的増加が観察されたことは、下垂体分化を考える上で興味深い。

本研究において、当初予想しなかったことであるが、LIF は ES における GH 発現を増加させる方向に作用した。LIF は IL-6 サイトカインファミリーに属する種々の機能を有するサイトカインであり、ES 細胞では、LIF の存在下で未分化な状態を維持することが知られている¹⁸⁾。その機序として、STAT3 の活性化が非常に重要であり、STAT3 活性化のみで未分化な状態が維持できることが報告されている¹⁹⁾。一方で、LIF 受容体と二量体を形成し、そのシグナルを伝える gp130 は、JAK-STAT 系のほかに、Ras-Erk 系などの調節を行っていることも知られている²⁰⁾。分化細胞に対しても作用し、M1 マウスの myeloblastic leukemia cell line のマクロファージへの分化促進²¹⁾、myeloma cells 増殖促進²²⁾、肝の急性蛋白活性化²³⁾、破骨細胞形成の刺激²⁴⁾、心筋の過形成促進²⁵⁾、交感神経のコリン作動性細胞への分化促進²⁶⁾、胚盤胞の着床促進、卵巣機能の調節¹⁸⁾など、標的細胞の種類によって、細胞分化の促進、或いは抑制の役割を担っている。

LIF とその受容体は胎児、成人の下垂体においても発現が確認されている²⁷⁾。GH 産生細胞の 20-30%、TSH 産生、PRL 産生、gonadotropin 産生、ホルモン非産生、ACTH 産生細胞の 10-15% で LIF 発現を認め、folliculostellate cells でも発現が確認されている。LIF 遺伝子のノックアウトマウスではストレスに対する ACTH 分泌が傷害²⁸⁾されており、生理的にはストレス刺激により POMC 遺伝子、ACTH 遺伝子の発現が増加する環境下では、視床下部の CRH と共同して ACTH 分泌に対して促進的に働いていると考えられている²⁹⁾。一方、下垂体特異的な LIF の過剰発現マウスでは、クッシング様の身体所見となり、基礎コルチゾール分泌の上昇、デキサメサゾンでの抑制が不十分となる³⁰⁾。さらに、GH 分泌は低下し体長の短縮が認められる。その下垂体では ACTH 分泌細胞の増加、ラトケ嚢包の形成、その他の GH、TSH、PRL 分泌細胞の減少が認められる。つまり、下垂体分化において LIF が、ACTH 分泌細胞や、繊毛上皮系（ラトケ）細胞へ分化を誘導する因子として働き、GH 産生細胞、TSH 産生細胞には抑制的に働く可能性が示唆³¹⁾され

ている。しかし、高コルチゾール血症は GH 分泌を抑制するので、GH 産生細胞数の減少が LIF の直接作用であるか間接的な作用であるかは判断することは困難である。

また、下垂体腫瘍から得られた細胞株である GH3 細胞においても、今回の ES 細胞と同様に、LIF の添加により Ptx2 の発現が抑制されることが報告³²⁾されており、共通の機構が存在する可能性がある。しかし、本研究では LIF により Ptx2 発現抑制以外に GHmRNA 発現増強が観察されたが、GH3 細胞では GH 分泌抑制が報告^{33, 34)}されており、その差異の原因は不明である。

今回の研究により、LIF 存在下に培養することによって ES 細胞から GH 産生細胞への分化を促進しうることが明らかとなったが、その方向に分化した細胞数の割合はきわめて限定されたものであった。GH 産生細胞に分化した細胞の特性をさらに明確にするためには、GH 産生細胞を濃縮することが必要である。そこで、下垂体 GH 産生細胞特異的な GH 発現に必須である GH 遺伝子 5' 上流側の locus control region (LCR) と GH プロモーター、GFP を連結し、さらに、CMV プロモーター下に NEO 耐性因子を組み込んだプラスミドを ES 細胞にパーマネントに導入した¹¹⁾。その観察においても、LIF 存在下で GHmRNA の発現と同様に GFP の発現が増加しており、さらにフローサイトメトリーによりソーティングした GFP 陽性細胞において、GFP 陰性細胞に比較して GHmRNA が増加していた。この成績は、ES 細胞から GH 産生細胞への分化を研究する上で LCR-GFP マーカー遺伝子が非常に有用なツールとなることを示唆する。今後、この方法の応用が期待される。

謝 辞

本研究に当たり、ご指導賜りました神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科学の千原和夫教授、保健学科の置村康彦助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Phillips, J.A. III, Hjelle, B.L., Seeburg, P.H., Zachmann, M.: Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency, *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6372-6375, 1981.
- 2) Cogan, J.D., Phillips, J.A. III, Sakati, N., Frisch, H., Schober, E., Milner, R.D.: Heterogeneous

- growth hormone (GH) gene mutations in familial GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1224-1228, 1993.
- 3) Cogan, J.D., Phillips, J.A., III, Schenkman, S.S., Milner, R.D., Sakati, N.: Familial growth hormone deficiency: a model of dominant and recessive mutations affecting a monomeric protein. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1261-1265, 1994.
 - 4) Wajnrach, M.P., Gertner, J.M., Harbison, M.D., Chua, S.C., Jr., Leibel, R.L.: Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat Genet* 12:88-90, 1996.
 - 5) Netchine, I., Talon, P., Dastot, F., Vitaux, F., Goossens, M., Amselem, S.: Extensive phenotypic analysis of a family with growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 83:432-436, 1998.
 - 6) Ohta, K., Nobukuni, Y., Mitsubuchi, H., Ohta, T., Tohma, T., Jinno, Y., Endo, F., Matsuda I: Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1. *Gene* 122:387-388, 1992.
 - 7) Duquesnoy, P., Roy, A., Dastot, F., Ghali, I., Teinturier, C., Netchine, I., Cacheux, V., Hafez, M., Salah, N., Chaussain, J.L., Goossens, M., Bougneres, P., Amselem, S.: Human Prop-1: cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency, *FEBS Lett* 437:216-220, 1998.
 - 8) Sloop, K.W., Parker, G.E., Hanna, K.R., Wright, H.A., Rhodes, S.J.: LHX3 transcription factor mutations associated with combined pituitary hormone deficiency impair the activation of pituitary target genes. *Gene* 265:61-69, 2001.
 - 9) Dattani, M.T., Robinson, I.C.: The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man. *Clin Genet* 57:337-346, 2000.
 - 10) Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M.: Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684-687, 1988.
 - 11) Shewchuk, B.M., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E.: Specification of unique Pit-1 activity in the hGH locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11784-11789, 2002.
 - 12) Lamonerie, T., Tremblay, J.J., Lanctot, C., Therrien, M., Gauthier, Y., Drouin, J.: Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin *Genes Dev* 10:1284-1295, 1996.
 - 13) Gage, P.J., Camper, S.A.: Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum Mol Genet* 6:457-464, 1997.
 - 14) Dattani, M.T., Martinez-Barbera, J.P., Thomas, P.Q., Brickman, J.M., Gupta, R., Martensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JK, Hindmarsh PC, Krauss S, Beddington RS, Robinson IC: Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet* 19:125-133, 1998.
 - 15) Wu, W., Cogan, J.D., Pfaffle, R.W., Dasen, J.S., Frisch, H., O'Connell, S.M., Flynn, S.E., Brown, M.R., Mullis, P.E., Parks, J.S., Phillips, J.A., III, Rosenfeld, M.G.: Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* 18:147-149, 1998.
 - 16) Castrillo, J.L., Theill, L.E., Karin, M.: Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* 253:197-199, 1991.
 - 17) Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Hescheler, J., Wobus, A.M.: Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44:41-50, 1993.
 - 18) Shen, M.M., Leder, P.: Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8240-8244, 1992.
 - 19) Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., Smith, A.: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells mediated via activation of STAT3. *Genes*

- Dev* 12:2048-2060, 1998.
- 20) Park, J.I., Strock, C.J., Ball, D.W., Nelkin, B.D.: The Ras/Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 23:543-554, 2003.
 - 21) Liebermann, D.A., Hoffman, B.: Differentiation primary response genes and proto-oncogenes as positive and negative regulators of terminal hematopoietic cell differentiation. *Stem Cells* 12:352-369, 1994.
 - 22) Zhang, X.G., Gu, J.J., Lu, Z.Y., Yasukawa, K., Yancopoulos, G.D., Turner, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., Bataille, R.: Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J Exp Med* 179:1337-1342, 1994.
 - 23) Baumann, H., Wong, G.G.: Hepatocyte stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor, *J Immunol* 143:1163-1167, 1989.
 - 24) Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., Abbondanzo, S.J.: Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76-79, 1992.
 - 25) Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Makino, S., Baba, A., Hori, S., Ogawa, S.: Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 81:656-663, 1997.
 - 26) Bamber, B.A., Masters, B.A., Hoyle, G.W., Brinster, R.L., Palmiter, R.D.: Leukemia inhibitory factor induces neurotransmitter switching in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7839-7843, 1994.
 - 27) Akita, S., Webster, J., Ren, S.G., Takino, H., Said, J., Zand, O., Melmed, S.: Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* 95:1288-1298, 1995.
 - 28) Akita, S., Malkin, J., Melmed, S.: Disrupted murine leukemia inhibitory factor (LIF) gene attenuates adrenocorticotropin hormone (ACTH) secretion. *Endocrinology* 137:3140-3143, 1996.
 - 29) Stefana, B., Ray, D. W., Melmed, S.: Leukemia inhibitory factor induces differentiation of pituitary corticotroph function: an immunoneuroendocrine phenotypic switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12502-12506, 1996.
 - 30) Yano, H., Readhead C., Nakashima, M., Ren, S.G., Melmed, S.: Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol* 12:1708-1720, 1998.
 - 31) Akita, S., Readhead, C., Stefanescu, L., Fine, J., Tampanaru-Sarmesiu, A., Kovacs, K., Melmed, S.: Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene forms Rathke's cleft cysts and impairs adult pituitary function. A model for human pituitary Rathke's cysts. *J Clin Invest* 99:2462-2469, 1997.
 - 32) Abbud, R.A., Kelleher, R., Melmed, S.: Cell-specific pituitary gene expression profiles after treatment with leukemia inhibitory factor reveal novel modulators for proopiomelanocortin expression. *Endocrinology* 145:867-880, 2004.
 - 33) Ben-Shlomo, A., Miklofsky, I., Ren, S.G., Yong, W.H., Heaney, A.P., Culler, M.D., Melmed, S.: Leukemia inhibitory factor regulates prolactin secretion in prolactinoma and lactotroph cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:858-863, 2003.
 - 34) Tomida, M., Yoshida, U., Mogi, C., Maruyama, M., Goda, H., Hatta, Y., Inoue, K.: Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 inhibit secretion of prolactin and growth hormone by rat pituitary MtT/SM cells. *Cytokine* 14:202-207, 2001.

Differentiation to growth hormone-producing cells from embryonic stem cells

Takumi Kudo

Division of Endocrinology/Metabolism, Neurology, and Hematology/Oncology,
Department of Clinical Molecular Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

Embryonic stem (ES) cells are known as a cell that has a potency of differentiation to various types of cells. In this study we examined using RT-PCR whether ES cells can differentiate to pituitary cells, especially to growth hormone (GH)-producing cells. GH mRNA was not increased by the expression of Pit-1 that is a specific transcription factor for the GH gene expression in the pituitary, although mRNAs of transcription factors in the early stages of pituitary development, such as Ptx1 and Ptx2, were present in ES cells. The amount of GH mRNA was not influenced by embryoid body (EB) formation, but gradually increased in the course of the culture on gelatin-coated dishes. Furthermore, the increase in GH mRNA was enhanced by leukemia inhibitory factor (LIF), which in general arrests ES cell differentiation and maintains full potency for differentiation. However the increased expression of GH mRNA by LIF was not so much and not all the ES cells were able to differentiate to GH-producing cells, which made it difficult to characterize GH-producing cells. To circumvent this problem, reporter-gene expressing green fluorescence protein (GFP) under the control of GH promoter and locus control region, which is important for somatotrope-specific expression of GH gene, was constructed. The reporter gene was introduced into the genome of ES cells and GFP-positive cells were sorted from all the ES cells by FACS. In accordance with our data using RT-PCR for the determination of GH mRNA, LIF increased the numbers of GFP-positive cells. The content of both mRNA and protein of GH were higher in GFP-positive cells than in GFP-negative cells. These findings show that the cell sorting system using somatotrope-specific reporter gene is a good tool to separate GH-producing cells from ES cells and that LIF may enhance the differentiation of ES cells to GH-producing cells.