



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。



【 109 】

氏 名・(本 籍) 工藤 工 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1662号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月31日

【 学位論文題目 】

胚性幹細胞から成長ホルモン産生細胞への分化

審 査 委 員

主 査 教 授 甲村 英二

教 授 岡村 均

教 授 馬場 久光

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するにいたることから、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)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、家族性 GH 欠損症、GH 構造遺伝子異常症、GHRH 受容体異常症などが知られている。さらに、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:MPHD)が知られており、その原因として Pit-1 異常症、Prop1 異常症、Lhx3 異常症、HESX1 異常症などの転写因子異常が報告されているが、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、病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、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。

方法と結果

1)逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法により ES 細胞における下垂体関連転写因子の発現を観察した。ES 細胞では、PRL、Pit-1、の発現は認められず、Ptx1、Ptx2、GH、TSH、neuroD1、POMC、IGF-I、GHR の mRNA 発現がわずかながら認められた。

2)Pit-1 強制発現における関連遺伝子の変化

flag エピトープをつけた Pit-1 発現ベクターを使用し Pit-1 蛋白を発現させた。GH、TSH、PRL、Ptx1、Ptx2、Prop1 の発現に変化は認められなかった。

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 LIF 非存在下で培養し、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。

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、胚様体 (EB) の形成においてそれぞれ GHmRNA の経時的変化を観察し、GHmRNA 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。

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。

未処理の ES 細胞での GHmRNA と β actin の発現比を 1 とし、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 GHmRNA は増加しているのに対し、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。

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。

6)ソマトトロフに特異的な 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 fluorescent protein(GFP)cDNA を連結した LCRGFP ベクターを作製し 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 により選択し、ZhTc6-LCRGFP がゲノム DNA に組み込まれた細胞株を得た。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。

7)ZhTc6-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 Ptx1, Ptx2, Hesx1, Prop1, Pit-1 などの転写因子が発現し下垂体細胞の分化、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が発現が確認され、またわずかではあるが GHmRNA の発現が認められたが、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 Pit-1 蛋白を ES 細胞で発現させた。その結果 GH、TSHmRNA の発現に変化は認められず、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が示唆された。

ES 細胞で胚様体を形成させ培養する方法を用いたが、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ず、LIF 存在下でゼラチンコートディッシュ上で ES 細胞を培養したとき、最も経時的な GHmRNA の増加が強く認められた。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、neuroD1mRNA の発現は変化を認めず、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。

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 STAT3 活性化を介し未分化な状態を維持する。一方で、さまざまな分化細胞に対しても作用し、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おり、GH 産生細胞、TSH 産生、PRL 産生、gonadotropin 産生、ホルモン非産生、ACTH 産生細胞の一部で LIF 発現を認め、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 分泌が傷害され、生理的にはストレス刺激により 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。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り、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考えられている。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、その発現はきわめ

て限定されたもので 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 細胞にパーマメントに導入した。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。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1650 号	氏 名	工藤 工
論文題目 Title of Dissertation	胚性幹細胞から成長ホルモン産生細胞への分化		
審査委員 Examiner	主 査 甲村 英二 Chief Examiner 副 査 岡村 均 Vice-examiner 副 査 馬場 久光 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 2 月 28 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

下垂体前葉は、分化の各段階で作用する転写因子が報告されており、分化と共にそれぞれの細胞が特有なホルモンを産生するにいたることから、器官形成の過程を研究する上で良好なモデルである。また、複合型下垂体ホルモン欠損症として Pit-1 異常症、Prop1 異常症、Lhx3 異常症、HESX1 異常症などの転写因子異常が報告されているが、なお病因の不明な症例も多く、病因・病態を明らかにするために下垂体の器官形成を研究することは意義がある。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、分化の研究は分化調節機構の解明と共に、再生医療への応用を考える上でも重要である。

下垂体において Ptx1、Ptx2、Hesx1、Prop1、Pit-1 などの転写因子が発現し下垂体細胞の分化、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が、申請者は、未処理の ES 細胞において、Ptx1、Ptx2 など下垂体分化の初期の転写因子の発現がみられること、またわずかではあるが GHmRNA の発現が認められることを見出した。一方 GH 遺伝子発現を直接促進する Pit-1 の発現は認められず、この欠如のために GH 発現が不十分である可能性を検証するため Pit-1 蛋白を ES 細胞で強制発現させたが、GH、TSHmRNA の発現に変化は認められず、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指摘した。

ES 細胞は leukemia inhibitory factor(LIF)の存在下でその多能性が維持され、LIF 非存在下で培養することにより分化すること、胚様体を形成させ培養する方法により、内胚葉、中胚葉、外胚葉への分化を模造し各種の分化に影響することが知られている。そのため、申請者は ZhTc6 細胞を LIF 非存在下、胚様体形成、LIF 存在下で培養し、下垂体関連の各種遺伝子発現を経時的に観察した。それぞれの状態において GH、Ptx1、Ptx2、Pit1 遺伝子発現は経時的に増加したが、GHR、TSH、neuroD1 等の発現は変化を認めなかった。しかし、GHmRNA の発現に関して、最も強く認められたのは予想に反して LIF 存在下で培養したときであった。

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、ES 細胞では、LIF の存在下で STAT3 活性化を介し未分化な状態を維持する。一方で、分化細胞に対しても作用し、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おり、GH 産生細胞、TSH 産生、PRL 産生、gonadotropin 産生、ホルモン非産生、ACTH 産生細胞

の一部で LIF 発現を認め、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 分泌が障害され、生理的にはストレス刺激により 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。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り、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。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考えられている。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されており、共通の機構が存在する可能性があるが、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 分泌抑制が報告されており、その差異の原因は不明である。この 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った。そこで申請者は、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パーマネントに導入した ES 細胞を作成したところ、LIF 存在下で GHmRNA の発現と同様に GFP の発現が増加し、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 が増加していることを見出した。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。

以上、本研究は、下垂体前葉細胞の発生・分化の機序について、胚性幹細胞（ES 細胞）から下垂体前葉細胞への分化誘導を人為的に行うことによってそれに関与する因子を明らかにする研究を行ったものであるが、従来知られていなかった「ES 細胞の GH 産生を Leukemia Inhibitory Factor(LIF)が促進する」事を初めて見出し、ES 細胞から下垂体前葉細胞への分化誘導について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。