

氏名	高木 宏泰
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 717 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	下垂体初期発生機構についての研究
論文審査委員	委員長 教授 坂井 貴文 委員 教授 井上 金治 委員 教授 西垣 功一 委員 教授 弥益 恭 委員 准教授 小林 哲也

論文の内容の要旨

下垂体は体内のホルモン環境を調節する中枢ともいべき器官であり、その産生細胞はホルモンをマーカーとして区別でき、容易に細胞種の同定が行える器官として知られている。このことから下垂体は細胞分化研究の良いモデル系として以前から注目され、これまでにげっ歯類を中心にホルモン細胞分化に関わる多くの研究がなされてきた。鳥類胚の腺性下垂体の発生は哺乳類と同様、口腔外胚葉の陥入により生じるラトケ嚢に由来する。また、マウス由来の間脳底とニワトリ胚由来の特定の神経外胚葉とを共培養するとホルモン産生細胞が誘導されることが報告されており、鳥類下垂体は形態的な発生様式だけでなく、下垂体発生に関わる基本的な分子機構も哺乳類と同様であることが示唆されている。所属研究室では鳥類胚の発生研究における有用性に着目し、ニワトリ胚を用いて下垂体発生研究を行い、胚発生期における 5 種類のホルモン産生細胞の分化様式を明らかにしてきた。

本研究では胚発生の初期における下垂体の発生機構を詳細に検討することを目的として研究を行った。まず初めに、口腔外胚葉からの陥入がどのように起こるのかを明らかにするため、上皮細胞に分布し、細胞の接着装置、極性の形成などに働く E-cadherin と、神経組織を含む幅広い領域に発現し、接着分子として組織構築や形態形成などに主要な役割を果たす N-cadherin の時間的、空間的発現を調べ、陥入と細胞接着との関連について検討した。さらに胚発生期の下垂体における細胞増殖およびアポトーシス動態を検討するため、BrdU 法と TUNEL 法を行った。腺性下垂体原基領域における活発な細胞増殖とザーゼル嚢付近での細胞死によって、ラトケ嚢がその位置や形を変化させることを明らかにした。

このようにダイナミックに形態を変化させながら発生する下垂体の分子的なメカニズムに迫るため、初期の形態形成や分化に関わると考えられている種々の因子の時間的、空間的発現パターンを検討した。まず正中部に発現し様々な器官の誘導に重要な働きをする Shh とその受容体 Ptch の mRNA 発現について *in situ* hybridization 法により詳細に観察した。Shh はげっ歯類での報告と異なり、口腔外胚葉の陥入時には前腸、脊索、間脳予定領域にのみ発現し、口腔外胚葉には発現しないことが明らかとなった。下垂体発生の最も初期に発現することが知られている Hesx1 と Pitx2 は口腔外胚葉の陥入が起こる以前から頭部前方に発現したことから、下垂体を含む頭部領域の発生に関わることが示唆された。さらに LH、FSH、TSH の共通糖

タンパクサブユニットである α -GSU、下垂体のマーカーとして知られる Lhx3 や下垂体腹側細胞系の発生に重要な Isl-1 の各 mRNA 発現について検討したところ、これら因子の発現領域と下垂体原基領域に強い関連が示された。また、所属研究室の結果から、 α -GSU をマーカーとして、下垂体隆起部の発生過程を調べたところ、下垂体隆起部は下垂体プラコードの側方から発生することが明らかになっている。興味深いことに、水晶体のマーカーとして知られる δ -crystallin の発現分布が上述の α -GSU 発現領域とほぼ一致しており、これらは下垂体隆起部が水晶体と下垂体予定領域の境界部より発生することを示唆している。

これらの因子の中で、下垂体や眼など頭部前方の発生に主要な役割を果たすと考えられている Shh の働きについて、Shh シグナル阻害剤 Cyclopamine を用いて、その影響を検討した。低濃度の Cyclopamine 処理では、口腔外胚葉の陥入開始位置が前方にずれ、正常胚に比べて小さな下垂体様組織が観察された。Cyclopamine 濃度が高くなり、Shh 経路が強く阻害されるにつれて口腔外胚葉と間脳底との間が離れ、下垂体が消失して異所性の水晶体様構造が観察された。これらの胚において、下垂体特異的な因子 Lhx3、隆起部のマーカー α -GSU、水晶体のマーカーである δ -crystallin の発現を検討したところ、正常胚では、腺性下垂体の背側正中部に Lhx3 単独の発現領域が存在するのに対し、Shh が抑制された胚においては、Lhx3 単独の発現領域が消失し、腺性下垂体と思われる領域の全てが α -GSU と Lhx3 が共局在する隆起部原基となっていた。さらに Shh が強く抑制された胚では Lhx3、 α -GSU の発現がなく δ -crystallin を強く発現する完全な水晶体が下垂体隆起部から発生した。ゼブラフィッシュ胚でも下垂体や水晶体の分化が正中部の Shh 発現と関連することが示されている。さらにげっ歯類下垂体隆起部はメラトニン受容体を高発現することが知られるなど、隆起部は眼、松果体と同様に光刺激に対して何らかの応答を行っていると考えられている。Cyclopamine を用いた Shh 経路の阻害により形成された異所性の水晶体は下垂体隆起部由来であると考えられ、光刺激との関連からも興味深い結果となった。隆起部は発生の一時期まで δ -crystallin を発現し、水晶体への分化能を有しており、下垂体において特異な領域であることが示唆された。本研究より、ニワトリ胚発生初期の下垂体における細胞動態、口腔外胚葉からのラトケ嚢発生に関わる因子の局在変化が明らかになった。さらに、Shh が頭部正中外胚葉を水晶体とは異なる分化過程に導き、隆起部および前葉からなる成熟した下垂体の発生に重要であることを明らかにした。

論文の審査結果の要旨

当学位論文は平成 21 年 2 月 10 日に理学部 9 番教室において、公開で発表会を開催し、その後、口頭による詳細な質疑を行って論文内容を審査した。以下に、審査結果の要約を示す。

細胞の分化・増殖研究において、下垂体は良いモデル器官として以前から注目されており、多くの知見が得られている。下垂体発生の研究には、遺伝子改変動物の得やすさからマウスが多用されてきたが、近年、哺乳類胚に比べ胚発生過程の詳細な観察、胚培養や胚操作に優れている鳥類胚を用いた研究が注目を集めている。下垂体は解剖学的に腺性下垂体と神経性下垂体とに分かれているが、腺性下垂体の発生は、(1)口腔外胚葉の陥入により始まるラトケ嚢、腺性下垂体原基への形態形成過程と、(2)種々のホルモン産生細胞が出現する細胞分化過程の二つに分けることができる。本研究では、これらの発生過程の中でも、ラトケ陥入からラトケ嚢完成までの形態形成過程に着目し、その初期発生機構をニワトリ胚を用いて明らかにすることを目的として一連の研究を行っている。本論文によって詳細に論じられている主要な課題と成果は以下の通りである。

第一章ではニワトリ胚における口腔外胚葉の陥入およびラトケ嚢の形成に伴う細胞動態について述べられている。口腔外胚葉における腺性下垂体原基領域の形成と細胞増殖および細胞死の関係を明らかにするために、BrdU 取り込み細胞と TUNEL 陽性細胞の検出を行い、発生期ニワトリ胚下垂体における増殖細胞とアポトーシス細胞の局在について検討した。また、これらの細胞局在と腺性下垂体原基のマーカーとして知られる Lhx3 mRNA の発現領域とを比較し、増殖細胞が Lhx3 を発現する腺性下垂体原基領域に多く観察されるのに対し、アポトーシス細胞は陥入部後方のザーゼル嚢に多いことを明らかにした。腺性下垂体原基領域の変化とこれら増殖細胞とアポトーシス細胞の分布を考慮すると、陥入部で増加した細胞が、頭頂部方向と、細胞死によって形成された陥入部後方の隙間へ進展することにより腺性下垂体原基領域は前方から後方へと広がることが示唆された。

第二章では、胚発生の初期で下垂体の発生に関わると考えられる種々の因子の時間的、空間的発現について述べられている。発生初期に様々な構造の構築に重要な働きをする Shh に着目し、*in situ hybridization* 法により下垂体における発現を詳細に検討し、ニワトリ初期胚では、Shh mRNA は口腔外胚葉には見られず、予定陥入部に近接する前腸、脊索、間脳予定領域に発現することを明らかにした。マウス腺性下垂体発生モデルでは、口腔外胚葉に発現した Shh が間脳からのシグナルによって抑制を受け、陥入が始まると考えられているが、本論文より、陥入は口腔外胚葉に発現する Shh とは独立して起きていることが示された。また、Shh の受容体である Ptch、Lhx3 や最も初期に発現するホルモンサブユニットである α -GSU などの腺性下垂体のマーカー因子の発現パターンと Shh 発現とを比較し、腺性下垂体原基領域は口腔外胚葉の陥入後に形成される Shh 発現領域に囲まれて発生することを明らかにした。同時に、腺性下垂体予定領域は、発生初期から Lhx3 mRNA と α -GSU mRNA を発現する下垂体隆起部予定領域と Lhx3 mRNA のみが発現する下垂体主部予定領域に二分されていることを報告し、下垂体主部と隆起部はその起源が異なる可能性について述べている。

第三章では、口腔外胚葉からの腺性下垂体の誘導における Shh の役割について詳細に検討するため、Shh シグナルを阻害剤 Cyclopamine によって抑制し、影響を調べている。その結果、Shh シグナル経路が阻害さ

れるにつれて口腔外胚葉と間脳底との間が離れ、下垂体が消失して異所性の水晶体様構造が出現するのが示された。これらの胚において、腺性下垂体特異的な因子 Lhx3、隆起部の初期マーカー α -GSU、水晶体のマーカーである δ -crystallin の発現を検討したところ、正常胚では、腺性下垂体原基の背側正中部に Lhx3 単独の発現領域が存在するのに対し、Shh が抑制された胚においては、Lhx3 を単独で発現する下垂体主部予定領域が消失し、 α -GSU と Lhx3 が共局在する隆起部原基のみの発生となることが明らかとなった。さらに Shh が強く抑制された胚では Lhx3、 α -GSU の発現が見られず、 δ -crystallin を高発現する完全な異所性水晶体が下垂体隆起部から発生することが明らかとなった。これらの知見は、間脳予定領域、前腸からの Shh が口腔外胚葉からの適切な位置での陥入に関わり、頭部外胚葉組織を腺性下垂体へと分化誘導するのに重要であることを示唆している。また、正常胚ラトケ囊の隆起部原基には Lhx3、 α -GSU および δ -crystallin が発現することと Cyclopamine 処理の結果から、隆起部は発生の一時期まで水晶体への分化能を有することが強く示唆された。

以上、本論文では(1)腺性下垂体原基領域における活発な細胞増殖とザーゼル囊付近での細胞死によって、ラトケ囊がその位置や形を変化させること、(2) Shh が口腔外胚葉を領域化して腺性下垂体原基との境界を形成すること、また(3) Shh が頭部外胚葉からの適切な腺性下垂体発生の誘導に関わり、Shh 阻害により出現する異所性の水晶体は隆起部由来であることを明らかにした。これらの結果は下垂体の発生研究に対して新しい知見を加えるものであり、高い意義を有すると言える。また、高木宏泰氏は本論文の内容の一部をすでに査読制のある外国専門誌に1編、関連論文を1編(いずれも英文)発表した。なお、本論文の内容の一部は第31回鳥類内分泌研究会、第22回日本下垂体研究会学術集会にて発表され、若手研究奨励賞および特別優秀発表賞を受賞したことを付記しておく。これらの成果から、本審査委員会は、本学位論文を博士(理学)の学位を授与するに値するものと判断した。