氏名	國分 優子
学位の種類	博　士（理学）
学位記番号	博　甲　第　7732　号
学位授与年月日	平成　28年　3月　25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Differentiation and Culture Method for Pituitary Cells (脳下垂体前葉細胞の分化誘導法とその培養条件の検討)
主査	筑波大学准教授（連携大学院）　博士（理学）　栗崎 晃
副査	筑波大学教授　博士（理学）　石田 健一郎
副査	筑波大学教授　博士（理学）　中田 和人
副査	筑波大学教授　工学博士　王 碧昭

論　文　の　要　旨

脳下垂体は脳視床下部下に存在する小器官であり、視床下部からの刺激により全身にホルモンを分泌し生体の恒常性を維持する内分泌中枢である。脳下垂体前葉は甲状腺刺激ホルモン、性腺刺激ホルモン、乳汁分泌ホルモン、成長ホルモン、副腎皮質刺激ホルモンの５種類のホルモン産生細胞から構成される。下垂体機能低下症は主に前葉の機能不全により引き起こされる、ホルモン補充療法で対処するしかない難病である。下垂体細胞は、実験動物から調製できる細胞量も少量でほとんど増殖しないなど、その細胞生物学的解析も容易ではなく、下垂体細胞の分化機構もあまり分かっていない。そこで本研究では、下垂体細胞を分化させる基礎的方法、及び、下垂体細胞の培養方法の検討を行った。下垂体細胞の分化は、細胞に下垂体特異的な遺伝子を導入して細胞の運命を転換させる直接分化法を試みた。また、下垂体細胞の培養法に関しては、初代培養細胞の性状を長期に維持すると報告されている不死化遺伝子 TERT、E6、E7 をマウス下垂体細胞へ導入して樹立した新規下垂体前葉細胞株を利用して、その最適な培養条件を検討した。これらの検討を通して下垂体研究の更なる発展に貢献することを目的とした。

脳下垂体前葉の発生過程で発現している転写因子と、それに関連すると考えられる転写因子計 33 種類の発現ウイルスベクターを構築し、さらにヒト転写因子ライブラリーを同時に間葉系幹細胞に導入することで脳下垂体前葉細胞を作製する因子を検索した。複数回のスクリーニングの結果、前葉で発現する Lhx3 や Pit1 遺伝子の発現誘導が定量的 PCR により観察されたため、これらの細胞のゲノム DNA 上に挿入された cDNA を同定する作業を行ったところ、4 つの遺伝子を同定した。これら因子の導入により、Lhx3 や Pit1 遺伝子の発現誘導と甲状腺刺激ホルモン Tshb 遺伝子の僅かな上昇が確認されたことから、今回発見した 4 つの因子は、脳下垂体前葉細胞への分化を促進する可能性が示唆された。しかし、現在のところ各種下垂体前葉マーカーを

タンパク質レベルで検出することができておらず、ホルモン産生能の確認は取れていない。その原因として、作製した下垂体細胞を長期間培養することが困難であり、徐々に細胞状態が悪化して死滅することが原因と考えられた。

そこで、作製した下垂体細胞を長期に培養するため、下垂体細胞の培養条件の最適化を検討した。下垂体の初代培養細胞は、短期間しか培養できずほとんど増殖しないため、本目的には上述の TERT、E6、E7 の不死化遺伝子を用いてマウス下垂体細胞の不死化細胞を新たに樹立し、この細胞株を用いて下垂体細胞の培養条件の最適化を試みた。基礎培地として DMEM、DMEM/F12、F10 培地、添加物として FBS、HS、N2、B27 サプリメント、細胞増殖因子として EGF、FGF を用いて比較検討を行った結果、DMEM/F12 培地に N2、B27 サプリメントと細胞増殖因である EGF、FGF を添加することにより不死化細胞を効率よく培養できることが確認できた。この培地条件を用いて限界希釈法により樹立した 22 種類の不死化細胞株の中から、ホルモンの遺伝子発現と増殖性を指標に 2 つの細胞株を選定した。さらに、これらの細胞株を用いた培養条件検討から、不死化細胞を浮遊状態で培養すると接着培養条件よりもホルモンの発現が上昇することを見出した。また、この条件で培養すると先行研究で報告された PKC や PKA アクティベーターに応答し、ホルモンの発現量が増加することを確認した。

以上の検討から、DMEM/F12 に N2/B27/EGF/FGF を添加した培地で浮遊培養することで、本不死化下垂体細胞株がその形態をほぼ維持して増殖させることが可能であることを確認した。また、長期に培養すると、本不死化細胞のホルモン発現量がマウス脳下垂体組織のホルモン発現量と比べてかなり低下することが確認されたが、不死化細胞をマウス腎被膜下や皮下へ移植するとホルモン発現量が大幅に増加することから、本培養条件はある程度の期間下垂体細胞の性状を保持しながら in vitro で下垂体細胞を培養する条件として使用可能であると考えられた。本研究により確認した培養条件を利用することで、今後脳下垂体細胞分化法の更なる検討が可能になると期待される。

審　査　の　要　旨

近年、生体の失われた機能を補うための再生医療を目指して、様々な臓器や器官を構成する細胞の分化誘導研究がおこなわれている。脳下垂体細胞はごく最近 ES 細胞から分化させる方法が報告されたが、その分化制御のしくみについてはまだよくわからないことが多い。本研究は、先行研究とは異なるアプローチから下垂体細胞を作製する方法を検討し、実際に分化因子を同定し、その有効性を確認した。さらに、この分化研究で明らかとなった成体の下垂体細胞の長期培養方法についても条件検討を進め、ユニークな細胞株を新たに樹立し、その培養方法を多角的視点から最適化を行うなど、機能的な下垂体の内分泌細胞研究を可能にするための研究基盤に大きな貢献をしたものと評価された。

平成２８年２月２日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。