

京都大学	博士（医学）	氏名	後藤正憲
論文題目	<p><i>Hes1</i> and <i>Hes5</i> are required for differentiation of pituicytes and formation of the neurohypophysis in pituitary development  (<i>Hes1</i>および<i>Hes5</i>遺伝子は下垂体発生において下垂体後葉細胞への分化と神経性下垂体形成に必須である)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p><b>【背景と目的】</b>下垂体は腺性下垂体（前葉および中葉）と神経性下垂体（後葉）からなる。神経性下垂体は腺性下垂体と発生母地や構成細胞が異なり、グリア細胞である下垂体後葉細胞（pituicyte）と視床下部からの神経軸索が含まれる。腺性下垂体は発生機構や前駆細胞分化についての研究報告があるが、神経性下垂体は前駆細胞の存在やその分化機構は未解明である。Notch シグナルの重要なエフェクターである <i>Hes</i> 遺伝子は多くの組織で前駆細胞の維持や細胞分化決定に作用しており、ノックアウトマウスで腺性下垂体に形成異常を来す。神経性下垂体発生における <i>Hes</i> 遺伝子の役割を明らかにすることを本研究の目的とした。</p> <p><b>【方法】</b>マウス胎児間脳腹側（ventral diencephalon, VD）の <i>Hes</i> 遺伝子発現を <i>in situ</i> hybridization で確認した。<i>Hes1</i> ホモ欠損 <i>Hes5</i> ヘテロ欠損（<i>Hes1</i><sup>-/-</sup>;<i>Hes5</i><sup>+/-</sup>）マウスを作成し、抗 Ki67 抗体、pituicyte およびグリア細胞マーカーの抗 S100β 抗体、神経細胞マーカーの抗 Tuj1 抗体、未熟 pituicyte および神経細胞マーカーの抗 calbindin 抗体と幹細胞マーカーの抗 Sox2 抗体、成熟 pituicyte マーカーの抗 CRABP2 抗体を用いて、マウス胎児切片の免疫染色を行った。さらに、IdU および BrdU の母体投与を用いたパルスチェイス解析を行った。</p> <p><b>【結果】</b>野生型で神経性下垂体の発生母地である VD に <i>Hes1</i> は広く発現し、<i>Hes5</i> の発現は認めないが、<i>Hes1</i><sup>-/-</sup>マウスでは <i>Hes5</i> の発現を認めた。<i>Hes1</i> は <i>Hes5</i> による代償があるが、<i>Hes1</i><sup>-/-</sup>;<i>Hes5</i><sup>-/-</sup>マウスは下垂体発生前に致死となるため、<i>Hes1</i><sup>-/-</sup>;<i>Hes5</i><sup>+/-</sup>マウスを作成して解析を行うこととした。</p> <p>神経性下垂体発生母地となる VD から漏斗の形成が見られる胎生 12.5 日で <i>Hes1</i><sup>-/-</sup>マウスの漏斗は低形成となり、<i>Hes1</i><sup>-/-</sup>;<i>Hes5</i><sup>+/-</sup>マウスでは漏斗は完全に欠損した。S100β、Tuj1、Calbindin と Sox2 に対する免疫染色の解析結果から <i>Hes</i> 遺伝子欠損では神経性下垂体前駆細胞が pituicyte の代わりに神経細胞へと分化していることが示された。</p> <p>Ki67 免疫染色とパルスチェイス解析の結果、漏斗の先端部では分裂細胞が突出の基部よりも有意に少なく、分化がより進んでおり、神経性下垂体前駆細胞は VD から突出する漏斗の基部に存在する可能性が示された。</p> <p>神経性下垂体が形成される胎生 16.5 日の S100β、CRABP2、Tuj1 と vasopressin に対する免疫染色の解析結果から <i>Hes1</i><sup>-/-</sup>;<i>Hes5</i><sup>+/-</sup>マウスでは視床下部の神経細胞は形成されるが、下垂体柄と神経性下垂体の構造が欠損していることが示された。</p> <p><b>【考察】</b>神経発生において <i>Hes</i> 遺伝子は神経前駆細胞維持と分化決定に作用し、グリア形成を促進している。パルスチェイス解析で神経性下垂体の前駆細胞は</p>			

VD から突出する漏斗の基部に存在しており、その前駆細胞は *Hes* 遺伝子欠損でグリア細胞である pituicyte より神経細胞への分化が増加し、神経性下垂体が欠損していたことから、神経発生と同様、*Hes* 遺伝子が神経性下垂体前駆細胞の分化発生に関与していると考えられた。

**【結論】**VD から突出する漏斗の基部に神経性下垂体の前駆細胞が存在し、その維持と分化を *Hes1* および *Hes5* が制御していることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

神経性下垂体はグリア細胞である下垂体後葉細胞（pituicyte）と視床下部からの神経軸索で構成され、その分化機構は未解明である。Notch シグナルのエフェクターである *Hes* 遺伝子は多くの組織で前駆細胞維持や細胞分化決定を制御しており、神経性下垂体発生における *Hes* 遺伝子の役割を明らかにすることを本研究の目的とした。

まず *Hes1* が神経性下垂体発生母地に発現し、代償性に *Hes5* が発現することを確認した。*Hes1*;*Hes5* ダブルノックアウトマウスは下垂体発生前に致死となるため、*Hes1* ホモ欠損 *Hes5* ヘテロ欠損マウスを作成し、解析することとした。神経性下垂体発生初期形態の漏斗が *Hes* 変異マウスで欠損していた。同部では、細胞の増殖性は低下していたがアポトーシスの関与はなく、pituicyte に代わり野生型で見られない神経細胞への分化を認めた。漏斗近位側に未熟な pituicyte が存在し、漏斗基部の間脳腹側に前駆細胞の存在が示唆された。発生後期で *Hes* 変異マウスでは視床下部のバソプレシン産生神経細胞は認めたが、後葉は欠損していた。

これらの結果から、神経性下垂体の前駆細胞が漏斗基部の間脳腹側に存在し、*Hes* 遺伝子はその維持と分化を制御していると考えられた。

以上の研究は神経性下垂体発生における *Hes* 遺伝子の機能の解明に貢献し、後葉が関連する疾患の病態解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和2年6月10日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降