

マウスならびにヒト下垂体ホルモン分泌細胞の
体外分化誘導に関する研究

(研究課題番号 : 14571531)

平成 14 年度～平成 16 年度科学研究費補助金

(基盤研究 C (2)) 研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者 田 熊 直 之

(旭川医科大学医学部助教授)

下垂体前葉ホルモン分泌細胞の体外作成の研究により、各種内分泌器官再生の基礎となる知見を提供する。本研究はマウス胚の間脳の床に接する口側外胚葉からラトケ嚢(下垂体前葉の原基)を誘導し、未分化下垂体ホルモン分泌細胞まで体外培養し、さらに *in vivo* の知見より Lhx3, Lhx4, Pit1 などの転写因子を発現させ下垂体ホルモン分泌細胞まで体外分化させることを最終目的とする。

これらにより得られた研究結果は未分化な胚葉から下垂体を形成させることを哺乳動物で可能にすることであり、さらに、これらの知見は甲状腺等其他の内分泌器官の体外発生にも応用できるものであり、今後の再生医療には欠くことのできない研究である。

研究組織

研究代表者: 田熊直之(旭川医科大学医学部助教授)

研究分担者: 千石一雄(旭川医科大学医学部教授)

研究分担者: 山下 剛(旭川医科大学医学部講師)

研究協力者: 宮本敏伸(旭川医科大学医学部助手)

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	1. 700	0	1. 700
平成 15 年度	700	0	700
平成 16 年度	700	0	700
総 計	3. 100	0	3. 100

研究発表

(1) 学会誌等

Pan B, Sengoku K, Goishi K, Takuma N, Yamashita T, Wada K, Ishikawa M. The soluble and membrane-anchored forms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor appear to play opposing roles in the survival and apoptosis of human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 2002 Aug;8(8):734-41.

Takuma N, Sengoku K, Pan B, Wada K, Yamauchi T, Miyamoto T, Ohsumi D, Ishikawa M. Laparoscopic treatment of endometrioma-associated infertility and pregnancy outcome. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;54 Suppl 1:30-4.

Miyamoto T, Sengoku K, Takuma N, Hasuike S, Hayashi H, Yamauchi T, Yamashita T, Ishikawa M. Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, STRA8, stimulated by retinoic acid gene 8. *J Assist Reprod Genet.* 2002 Nov;19(11):531-5.

Miyamoto T, Hasuike S, Sengoku K, Takuma N, Hayashi H, Sasaki Y, Yamashita T, Ishikawa M. Molecular cloning and expression analysis of the mouse Spot-2 gene in pituitary development. *Dev Genes Evol.* 2003 May;213(4):199-202.

Miyamoto T, Sengoku K, Hasuike S, Takuma N, Hayashi H, Yamashita T, Ishikawa M. Isolation and expression analysis of the human testis-specific gene, SPERGEN-1, a spermatogenic cell-specific gene-1. *J Assist Reprod Genet.* 2003 Feb;20(2):101-4.

Pan B, Kato Y, Sengoku K, Takuma N, Niizeki N, Ishikawa M. Treatment of climacteric symptoms with herbal formulas of traditional Chinese medicine. *Gynecol Obstet Invest.* 2004;57(3):144-8.

Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, Horikawa M, Ishikawa M. Integrins are not involved in the process of human sperm-oolemmal fusion. *Hum Reprod.* 2004 Mar;19(3):639-44.

Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, Yamauchi T, Ishikawa M. Nuclear Dynamics of Parthenogenesis of Human Oocytes: Effect of Oocyte Aging in vitro. *Gynecol Obstet Invest.* 2004;58(3):155-9.

田熊直之、佐々木禎仁、千石一雄：

対応に苦慮したかん入胎盤の一例

臨床婦人科産科 58: 11, 1327-1331, 2004

日高康弘、田熊直之、石川睦男：

IUGR とその対策—IUGR の診断

産婦人科治療 90: 3, 251-254, 2005

(2) 口頭発表

山内智文、千石一雄、和田恵子、田熊直之、石川睦男

[マウス未受精卵凍結保存におけるフリーラジカルスカベンジャーの有用性に関する検討]

第54回 日本産科婦人科学会学術講演会 2002, 4.8 (東京)

田熊直之、千石一雄、和田恵子、山内智文、石川睦男

[ヒト卵細胞膜と精子の結合・融合におけるインテグリンの役割]

第54回 日本産科婦人科学会学術講演会 2002, 4.8 (東京)

潘 伯臣、千石一雄、田熊直之、和田恵子、小森春美、石川睦男

[ヒト黄体細胞における HB-EGF 及びその受容体の発現と生理作用]

第54回 日本産科婦人科学会学術講演会 2002, 4.8 (東京)

田熊直之、千石一雄、和田恵子、潘 伯臣、堀川道晴、山下 剛、山内智文、宮本敏伸、石川睦男

[Laparoscopic treatment of endometriosis and infertility outcome]

第5回 Japan Conference on Endometriosis “Management of Endometriosis”2002, 5.18 (神奈川)

大隅大介、杉村和代、山内智文、宮本敏伸、田熊直之、千石一雄、石川睦男

[当科不妊症患者における子宮筋腫核出後の生殖予後]

第50回日本産科婦人科学会 北日本連合地方部会・学術講演会 2002, 9.20 (富山)

田熊直之

[シンポジウム -内分泌攪乱物質と生殖生理- アリル炭化水素レセプター系]

第47回日本不妊学会 2002,10.4 (岐阜)

宮本敏伸、千石一雄、田熊直之、石川睦男

[ヒト RNH2 および STRA8 遺伝子の単離およびその発現様式の解析]

第47回日本不妊学会 2002,10.4 (岐阜)

田熊直之、千石一雄、宮本敏伸、山内智文、石川睦男

[Rathke's pouch の発生には間脳からの2種の信号分子による誘導が必要である]
第2回日本内分泌学会北海道地方会 2002, 10.26 (札幌)

宮本敏伸、千石一雄、田熊直之、山内智文、石川睦男

[ヒトSYCP3遺伝子の単離およびその機能解析]
第55回日本産科婦人科学会学術講演会 2003, 4.14 (福岡)

千石一雄、田熊直之、宮本敏伸、山内智文、石川睦男

[ヒト卵巣為発生における in vitro 加齢の影響]
第55回日本産科婦人科学会学術講演会 2003, 4.14 (福岡)

田熊直之、千石一雄、宮本敏伸、山内智文、石川睦男

[妊娠率向上のための卵巣チョコレート嚢腫の腹腔鏡下治療]
第55回日本産科婦人科学会学術講演会 2003, 4.14 (福岡)

佐久川直子、佐々木禎仁、日高 康弘、宮本 敏伸、小島 貴志、田熊 直之、
石川 睦男 [Johanson-Blizzard syndrome 合併妊娠の1症例]

第81回北海道産科婦人科学会 2003, 9.21 (旭川)

佐々木禎仁、佐久川直子、日高 康弘、宮本 敏伸、小島 貴志、田熊 直之、
石川 睦男

[ガレン脳動静脈奇形による動静脈瘤が原因と考えられる胎児水頭症、胎児水腫にいたった1症例]

第81回北海道産科婦人科学会 2003, 9.21 (旭川)

堀川 道晴、千石 一雄、田熊 直之、石川 睦男

[Differential Display 法による初期卵胞発育に関与する遺伝子の解析]
第48回日本不妊学会 2003, 10.1 (東京)

日高康弘、佐々木禎仁、金井麻子、小島貴志、田熊直之、千石一雄、石川睦男
[胎児両側乳糜胸の2例]

第6回北海道出生前診断研究会 2004, 2.6 (札幌)

千石一雄、横浜祐子、山内智文、堀川道晴、宮本敏伸、田熊直之、
石川睦男

[ヒト卵細胞膜と精子の結合・融合過程におけるインテグリンの関与]
第56回日本産科婦人科学会学術講演会 2004, 4.12 (東京)

宮本敏伸、千石一雄、田熊直之、石川睦男
[マウス下垂体発生に関与する遺伝子 Spot2 の単離およびその機能解析]
第56回日本産科婦人科学会学術講演会 2004, 4.12 (東京)

佐々木禎仁、日高康弘、小島貴志、田熊直之、千石一雄
[胎児腹壁破裂の出生前診断において胎児 MRI が有効であった1症例]
第27回日本産科婦人科 ME 学会 2004, 8.27 (仙台)

菊池良子、金井麻子、佐々木禎仁、日高康弘、小島貴志、吉田俊明、田熊直之、
千石一雄
[マイコプラズマによる産褥感染症の一例]
第52回北日本産科婦人科学会 2004, 9.10 (札幌)

金井麻子、菊池良子、佐々木禎仁、日高康弘、小島貴志、吉田俊明、田熊直之、
千石一雄
[胎児水腫を伴った重症胎児乳び胸に対する胎児治療]
第52回北日本産科婦人科学会 2004, 9.10 (札幌)

佐々木禎仁、宮本 敏伸、田熊 直之、千石 一雄、石川 睦男
[ヒト精巣特異的遺伝子である TISP50, TISP15, TISP43 についての解析]
第13回産婦人科分子内分泌懇話会 2004, 10.8 (兵庫県淡路島)

田熊 直之
「地域における周産期医療システムの確保」
第34回北海道母性衛生学会総会 公開市民フォーラム 2004, 11.19 (札幌)

佐々木禎仁、日高 康弘、吉田 俊明、田熊 直之、千石 一雄
[胎児消化管異常の出生前診断において胎児 3D-MRI が有用であった2症例]
第2回日本胎児治療研究会 2004, 11.26 (大阪)

佐々木禎仁、宮本敏伸、日高康弘、田熊直之、千石一雄
[孤立性心筋緻密化障害の胎児心エコーと1家系における遺伝子解析について]
第11回日本胎児心臓病研究会学術集会 2005, 2.11 (東京)

(3) 出版物

田熊直之、石川睦男

妊娠中毒症から妊娠高血圧症候群へ

過酸化ストレス：活性酸素一消去系と妊娠高血圧症候群

MEDICAL VIEW 174-177, 2005.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特記事項なし

研究成果

1. 研究目的

動物の胚発生において各種の器官形成は信号分子、ホメオボックス遺伝子群、各種転写因子群などが時間的、空間的にある程度正しく作用、発現することが必要であり、器官毎の発生の遺伝子発現カスケードが発生生物学の分野で研究されている。しかしながらこれらの成果は現在のところヒトへの応用はいまだ実験段階にある。今回我々は哺乳動物における下垂体前葉ホルモン分泌細胞の体外作成、さらに各種内分泌器官再生の基礎となる知見を提供することを目的とする。これらの研究結果は未分化な胚葉から下垂体を形成させることをヒトで可能にすることであり、将来的には幹細胞から拒絶反応のない本人の下垂体を作ることが可能となる。また、この知見は甲状腺等他の内分泌器官の体外発生にも応用できるものであり、今後の再生医療にとって有用な研究である。

2. 研究成績

(1) マウス腹側間脳からの信号分子に関する研究

研究目的

腺性下垂体の原基であるラトケ嚢は間脳の床に接する口側外胚葉の中心部より発生する。下垂体形成の初期の間、この近接していることは発生の過程において組織間の関係があることが示唆される。以前、我々は各種のノックアウトマウスを用い、その **Signal induction** を明らかにした。つまりマウス **Embryonic day (E)8.5** 日以降の下垂体の初期発生は、まず間脳からの信号分子である **BMP4** がラトケ嚢原基の形成に必要であり、2 番目の信号分子である **FGF8** がラトケ嚢原基の発育、分化に必要であるということである。それらの **Induction** により、ラトケ嚢原基での転写因子の発現が誘導され、下垂体がさらに分化していくものと推測される。しかしながら、**In Vitro** の系では研究 (3) にて後述するが、**BMP4** と **FGF8** のみでは、マウス口側外胚葉は分化していかないことが確認された。このことは、さらなる誘導分子或いはそれらの誘導分子と協調する何らかのタンパク等が必要であることが示唆される。そこで今回我々は

E9.0 周辺の時期に下垂体形成に必要と考えられる信号分子を特定することを目的にする。

研究方法

1) マウス胚

Nkx2.1, Bmp4, Isl1, Shh, Lhx3, Lhx4 の 6 種のノックアウトマウス胚と主には野生型 B2D6F1 マウスが本研究に使用された。マウス胚年齢は plug 形成日の正午を胚年齢 0.5 日 (E0.5)、時に somites によって真の胚年齢が同定された。

2) 組織学的検討

マウス胚を 4%PFA で固定、パラフィン包埋後、5 μ m 厚で切片スライドグラスを作成し、組織学的解析はヘマトキシリン-エオジン染色、またアポトーシスの解析には、ApopTag plus in situ apoptosis detection kit (Oncor, Gaithersburg, MD, USA)を使用した。

3) RNA in situ hybridization

マウス胚切片スライドグラスは ³³P-UTP ラベル合成した RNA プローブでハイブリダイズされた。リボプローブは Isl1, Isl2, Lhx3, Lhx4, Lhx5, Nkx2.1, Nkx2.2, Nkx2.3, Nkx2.5, Nkx2.6, Nkx2.9,

Bmp4, Fgf8, Shh, Bmpr2, Fgfr2, Spot2, Ptx, Pax3, Pax6, Pax8, Prop1, Hnf3 β が用いられた。スライドガラスは現像後 bisbenzimidide で染色、UV illumination 下で投影した。また、Nkx リポプローブシリーズに関しては whole mount in situ hybridization にも使用した。

4) 材料・試薬

ノックアウトマウス、及びリポプローブは主に Westphal H. (米国 NICHD) から供与された。またノックアウトマウス胚切片を Kimura S. (米国 NCI)、Pfaff S. (The Salk Institute)、Hogan B. (Howard Hughes Medical Institute) から供与された。

研究成績

ホメオボックス遺伝子 Nkx2.1 は、マウス初期発生の間、腹側間脳、甲状腺、肺に発現する。発生期間中に Nkx2.1 は下垂体やその原基には決して発現しないが、Nkx2.1 ノックアウトマウス胚では下垂体の全欠失を引き起こす。このことは、腹側間脳からの信号分子の不足による 2 次的影響によるものであることが示唆される。

Nkx2.1 ノックアウトマウス胚、つまり間脳欠失状態について解析

したところ、FGF8 の腹側間脳における発現は E10 の Nkx2.1 ノックアウトマウス胚においては消去されたが、BMP4 および SHH の発現は保たれていた。FGF8 はラトケ嚢培養実験にて下垂体形成に必須の転写因子 Lhx3 を誘導することが確認されている。つまり腹側間脳からの信号分子である FGF8 はラトケ嚢誘導に必要であることが示唆された。

Bmp4 ノックアウトマウス胚では E10 においてですら、ラトケ嚢形成のサインのみならず、外胚葉性 pouch placode の肥厚さえ認められなかった。この結果は、BMP4 がより早い時期にラトケ嚢誘導に必須であることを示唆している。

SHH (Sonic hedgehog)は脊椎動物の発生初期において神経管の背腹形成、四肢形成、腹側正中構造の形成などに重要な役割を担っている信号分子である。SHH はマウス胚 E8.5 の時期に、口側外胚葉に発現を認めた。つまりラトケ嚢形成に関し何らかの役割を担っていることが示唆される。そこで SHH ノックアウトマウス胚における Nkx 遺伝子群の発現を whole mount in situ hybridization にて検討したところ、Nkx2.1, Nkx2.2, Nkx2.9 の発現は消去された。つまり SHH シグナルは神経外胚葉に発現する Nkx 遺伝子群の転写を誘導し、神

経管や前脳形成に必須であることが確認された。しかしながら中・内胚葉に発現する Nkx2.3, Nkx2.5, Nkx2.6 は SHH シグナルに非依存的であった。

考案

以上の研究成績により口側外胚葉からのラトケ囊の誘導にはマウス胚 E8 から E10 までに信号分子 SHH、BMP4、FGF8 が必須である可能性が示唆された。また SHH は口側外胚葉に発現を認めるため、Nkx2.1 の腹側間脳における発現制御のみならずオートクライン、パラクライン的にも下垂体形成に関与することが示唆された。

以上の成績・結果の詳細に関しては次ページからの欧文を参照されたい。

Multi-induction is required for pituitary gland formation

Abstract

T/ebp (*Nkx2.1*, *Ttf1*, *Titf1*) is a homeobox gene expressed in the ventral diencephalon during forebrain formation that is not expressed in Rathke's pouch or in the pituitary gland at any time of embryogenesis. However, targeted mutation of this gene in mice results in ablation of the pituitary. Examination of pituitary development in *T/ebp* homozygous null mutant embryos revealed that a pouch rudiment is initially formed, but is eliminated before formation of a definitive pouch. In the diencephalon of the mutant, *Bmp4* expression is maintained, whereas *Fgf8* expression is not detectable. These data, together with previously published genetic and molecular observations, suggest that Rathke's pouch develops in a two step process that requires at least two sequential inductive signals from the diencephalon. BMP4 is required for induction and formation of the pouch rudiment, a role confirmed by analysis of *Bmp4* homozygous null mutant embryos. FGF8 is necessary for activation of the key regulatory gene *Lhx3* and subsequent development of the pouch rudiment into a definitive pouch. This study provides the first molecular genetic evidence that both formation and morphogenesis of the pituitary organ primordium is induced by signals from the adjacent diencephalon.

Introduction

The primordium of the anterior and intermediate lobes of the pituitary gland, Rathke's pouch, initially arises from a portion of the midline oral ectoderm that lies in direct contact with the floor of the diencephalon. Subsequently, a portion of the adjacent neuroectoderm evaginates to form the posterior or neural lobe of the pituitary (Schwind 1928; Kaufman 1992). The close apposition of Rathke's pouch and the diencephalon is maintained throughout the early stages of pituitary organogenesis, and has long

suggested that inductive tissue interactions are involved in this process. Experimental manipulations of amphibian and chick embryos (Etkin 1967; Ferrand 1972; Kawamura and Kikuyama 1995), as well as tissue recombination explants in rat (Watanabe 1982a, b; Daikoku et al. 1982) have shown that signals from the diencephalon are essential for the proper differentiation and expansion of certain pituitary cell lineages. However, the molecular mechanism involved in initial determination and morphogenesis of the Rathke's pouch primordium has not been determined.

In wild type mouse embryos, the first visible sign of Rathke's pouch formation appears at E8.5 when a portion of the oral epithelium thickens and invaginates (Kusakabe et al. 1984). At the same time, BMP4, a potent signaling molecule of the TGF β family, is expressed in the ventral diencephalon that lies adjacent to Rathke's pouch and the expression continues until approximately E10.5 (Jones et al. 1991; Ericson et al. 1998). By E9.5, expression of another signaling molecule, *Fgf8*, is initiated in the vicinity of Rathke's pouch (Crossley and Martin 1995; Ericson et al. 1998). At E10.5, the *Fgf8* expression domain shifts to the infundibulum, the portion of the diencephalon immediately above and adjacent to the pouch. It has recently been shown that these two signaling molecules have differential and integrated effects on Rathke's pouch ectoderm in explant culture (Ericson et al. 1998). BMP4 can maintain expression *in vitro* of one of the earliest marker genes expressed in the pituitary primordium, the LIM-homeobox gene *Isl1* (Ericson et al. 1998). In contrast, FGF8 extinguishes *Isl1* expression and activates another LIM-homeobox gene, *Lhx3*, which has been shown to be essential for pituitary organogenesis and cell-type specific gene expression (Bach et al. 1995; Sheng et al. 1996).

The homeobox gene *Tebp* (also known as *Ttf1*, *Nkx2.1*, and *Titf1*) (Lazzaro et al. 1991) is expressed in the ventral diencephalon, thyroid, and lung during early development. Targeted deletion of *Tebp* resulted in mice that die at birth with multiple defects in these organs. Interestingly, the pituitary gland of the null mutant was missing

at birth. *T/ebp* is never expressed in the pituitary or its primordium, suggesting this phenotype is a secondary effect due to lack of signaling from *T/ebp* -expressing neuroectoderm (Kimura et al. 1996).

In this study, we have examined pituitary ontogeny in *T/ebp* mutant embryos. Combined with analyses of three other pituitary mutants; *Lhx3*, *Bmp4*, and *Isl1* null embryos, we have delineated molecular mechanisms for the Rathke's pouch formation. Here we demonstrate first time that the inductive signals from the adjacent diencephalon is essential for the pituitary morphogenesis.

Results and Discussion

Histological analysis of the *T/ebp* null mutant embryos revealed that a rudimentary Rathke's pouch was initially formed during embryogenesis. The wall of the pouch is composed of densely packed columnar cells. The *T/ebp*^{-/-} pouch, however, fails to differentiate further. It remains single layered, and is subsequently eliminated through programmed cell death.

Genetic dissection of pituitary development through the analysis of mice mutant for *Lhx3* (Sheng et al. 1996) and the closely related LIM-homeobox gene *Lhx4* (*Gsh4*) (Li et al. 1994) has demonstrated that Rathke's pouch forms in two steps: a slightly invaginated pouch rudiment is formed initially, followed by further cell proliferation and invagination to form the definitive pouch (Sheng et al. 1997). While the invaginating pouch rudiment expresses *Isl1*, but not *Lhx3* or *Lhx4*, the nascent definitive pouch expresses all three LIM-homeobox genes, followed by downregulation of *Isl1* in most of the pouch by E11.5 (Sheng et al. 1997; Ericson et al. 1998). We examined expression of these and other pituitary marker genes in the *T/ebp* null mutant to ascertain the stage where developmental arrest in pouch formation occurred. In the *T/ebp*^{-/-} pouch, expression of *Isl1* was maintained. *Ptx1* (P-OTX), a homeobox gene

expressed in all stomodeal derivatives, including Rathke's pouch (Szeto et al. 1996; Lanctot et al. 1997), was also expressed, although at a decreased level. Transcripts of *Lhx3* or *Lhx4*, however, were not detected. Thus, both morphological and marker gene analyses indicated that in the absence of *T/ebp* function, pouch development arrests after formation of a rudimentary pouch but before formation of a definitive pouch, similar to the arrest seen in *Lhx3*^{-/-};*Lhx4*^{-/-} double mutants (Sheng et al. 1997).

In order to understand how the ventral forebrain influences development of Rathke's pouch, we analyzed diencephalic defects in the *T/ebp* homozygous null mutant. In the *T/ebp*^{-/-} mutant, the expression domain of *Bmp4* is maintained at E9.5. The result, in accordance with data derived from organ culture, explains the observation that *Isl1* is induced in the *T/ebp*^{-/-} mutant pouch. *Fgf8* expression was detected in three domains in the developing brain of wild type E10.5 embryos: the midbrain-hindbrain junction, the commissural plate of the forebrain, and in the ventral diencephalon / infundibulum (Takuma et al. 1998). Transcripts for the receptor of *Fgf8* (*Fgfr2*) are detected in Rathke's pouch adjacent to the domain of *Fgf8* expression. The ventral diencephalic domain of *Fgf8* expression overlaps with and is included within the *T/ebp* expression domain (Takuma et al. 1998). This domain of *Fgf8* expression is deleted in the *T/ebp* null mutant. Lack of *Fgf8* expression in the mutant diencephalon in the domain directly in contact with the developing Rathke's pouch can explain the failure to activate *Lhx3* and *Lhx4* expression in the pouch, and thus the failure to form a definitive pouch.

To ascertain if BMP4 is responsible not only for *Isl1* expression in the pouch, but also actual formation of the pouch itself, we examined pituitary development in the *Bmp4*^{tm1} homozygous null mutant (Winnier et al. 1995). At E9.0, formation of a rudimentary pouch is already apparent in the wild type mouse (Takuma et al. 1998). Most homozygous *Bmp4*^{-/-} embryos die before this stage. However, on some genetic backgrounds, a proportion survive to E9.5-10.0, and a few of these develop relatively

normal anterior structures (Y. Furuta and B. Hogan unpublished data). Histological examination of pouch development in such mutants revealed no sign of a Rathke's pouch, nor even of a thickened ectodermal pouch placode (Takuma et al. 1998). This result demonstrates that BMP4 signaling from the diencephalon is absolutely necessary for the initial induction and formation of a pouch rudiment.

In the wild type mouse, *Isl1* is specifically expressed in the pouch rudiment upon BMP4 induction, and its expression precedes that of *Lhx3* and *Lhx4* (Ericson et al. 1998). We therefore analyzed *Isl1* function in pouch formation by histological examination of the *Isl1*^{-/-} targeted mutant (Pfaff et al. 1996). *Isl1* homozygous null mutants die at approximately E10, but analysis at E9.5 revealed that the oral ectoderm of the mutant had invaginated to form a rudimentary pouch (Takuma et al. 1998). However, the *Isl1*^{-/-} pouch remains small and primitive. Its wall is obviously thinner and appears as a flat, undifferentiated epithelium, indicating that, in the absence of *Isl1*, differentiation of the pouch epithelium is blocked at an early stage.

Although a rudimentary pouch is initially formed and subsequently developmentally arrested in both the *T/ebp*^{-/-} and *Isl1*^{-/-} mutants and the *Lhx3*^{-/-};*Lhx4*^{-/-} double mutants (Sheng et al. 1997), the basis for the developmental arrest in these mice is very different. ISL1 is a transcription factor intrinsically expressed in the pouch rudiment. Null mutation of *Isl1* could directly lead to developmental arrest of the pouch precursor cells, as is the case for the motor neurons (Pfaff et al. 1996). Inactivation of *T/ebp*, on the other hand, causes a deletion of the *Fgf8* expression domain in the diencephalon. It, in turn, leads to developmental arrest of the pouch presumably through failed induction of *Lhx3* and *Lhx4* expression.

We suggest that formation of Rathke's pouch requires dual inductive signals from the diencephalon. This conclusion is based on the analysis of pouch development in several mutant mice, including the *T/ebp*^{-/-}, *Bmp4*^{-/-}, and *Isl1*^{-/-} mutants described in this paper, and the *Lhx3*^{-/-};*Lhx4*^{-/-} double mutant described previously (Sheng et al.

1997). This model is built on several observations. First, morphogenesis of Rathke's pouch is a two-step event: a pouch rudiment is formed first, and then a definitive pouch. We have demonstrated this primarily by genetic analysis of the *Lhx3*^{-/-};*Lhx4*^{-/-} double mutant (Sheng et al. 1997). This contention is supported by evidence from the *T/ebp* as well as *Isl1* null mutants in which only a rudimentary pouch is formed. Second, BMP4 is responsible for induction of the initial invagination of the oral ectoderm and formation of the pouch rudiment, since these events do not occur in the *Bmp4*^{-/-} mutant. On the contrary, in the *T/ebp*^{-/-} mutant, *Bmp4* expression in the diencephalon persists and both events occur. Third, FGF8 is responsible for induction of *Lhx3*, and presumably *Lhx4*. This has been shown *in vitro* by organ culture experiments (Ericson et al. 1998), and confirmed *in vivo* by analysis of the *T/ebp*^{-/-} mutant. When *Fgf8* is absent, neither *Lhx3* nor *Lhx4* is expressed. Fourth, *Lhx3* and *Lhx4* are genes intrinsically expressed in the pouch and are absolutely required for the pouch rudiment to develop into a definitive pouch. This has been demonstrated by similar growth arrest of the pouch rudiment in both the *Lhx3*^{-/-};*Lhx4*^{-/-} double mutant (Sheng et al. 1997), and in the *T/ebp*^{-/-} mutant, which fails to express *Lhx3* or *Lhx4*. Fifth, formation of a pouch rudiment does not spontaneously lead to formation of a definitive pouch. In the absence of FGF8 signaling from the diencephalon, as in the *T/ebp*^{-/-} mutant (Takuma et al. 1998), a definitive pouch does not form. Collectively, these data indicate that after formation of the pouch rudiment, which requires BMP4 signaling, a second signal from the diencephalon, specifically FGF8, is essential for further development and proliferation of the pouch. In the absence of this second inductive signal, the rudimentary pouch is eliminated through programmed cell death. The exact mechanism driving apoptosis in this case is not known. However, FGFs promote proliferation of pouch cells *in vitro* (Ericson et al. 1998) and may also be important for pouch cell survival *in vivo*.

This study demonstrates for the first time that the ectodermal primordium of

Rathke's pouch is induced by signals emanating from the juxtaposed neural tissue. Previous studies on manipulated embryos and explant cultures have focused primarily on the role of the brain in eliciting cell-type specific gene or pituitary hormone expression. We provide direct *in vivo* evidence that Rathke's pouch is induced from an ectodermal placode by neural contact in a manner analogous to induction of the lens placode by the optic cup. While the signals involved in lens induction remain elusive, we have delineated the molecular mechanisms underlying the initial inductive events in pituitary morphogenesis.

Materials and Methods

Mouse embryos

T/ebp (Kimura et al. 1996), *Bmp4*^{*tm1*} (Winnier et al. 1995), and *Isl1* (Pfaff et al. 1996) homozygous null mutants have previously been described. Nominal embryonic age was designated as embryonic day 0.5 (E0.5) on noon of the day in which the copulatory plug was detected. On some occasions, somite number was counted to determine the exact embryonic day.

Histological analyses and immunohistochemistry

A solution of 4% paraformaldehyde in PBS (pH7.2) was used to fix embryos for 2-4 hr. Embryos were embedded in paraffin, sectioned at five μ m, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological examinations. Apoptotic cells were detected immunohistochemically using the ApopTag Plus *In situ* Apoptosis Detection Kit (Oncor, Gaithersburg, MD).

RNA in situ hybridization

Five μ m paraffin sections of mouse embryos were processed for *in situ* hybridization with ³³P-UTP labeled RNA synthesized from linearized riboprobe vectors as described (ref. 24). After exposure and development, slides were stained with

bis-benzimide and photographed under simultaneous darkfield and UV illumination.

References

Bach, I., S.J. Rhodes, R.V.II Pearse, B. Gloss, K.M. Scully, P.E. Sawchenko, and M.G. Rosenfeld. 1995. P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with *Pit-1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 2720-2724.

Crossley, P.H. and G.R. Martin. 1995. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**: 439-451.

Daikoku S., M. Chikamori, T. Adachi, and Y. Maki. 1982. Effect of basal diencephalon on the development of Rathke's pouch in rats: A study in combined organ culture. *Dev. Biol.* **90**: 198-202.

Ericson J., S. Norlin, T. M. Jessell, and T. Edlund. 1998. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* **125**: 1005-1015.

Etkin, W. 1967. In *Neuroendocrinology*, (ed. L. Martini and W.F. Ganong), pp.261-268. Academic Press, New York, NY.

Ferrand, R. 1972. Experimental study of the factors in cytological differentiation of the adenohypophysis in the chick embryo. *Arch. Biol.* **83**: 293-371.

Jones C.M., K.M. Lyons, and B.L.M. Hogan. 1991. Involvement of *bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)* and *Vgr-1* in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* **111**: 531-542.

Kaufman, M.H. 1992. *The Atlas of Mouse Development* Academic Press, San Diego, CA.

Kawamura, K. and S. Kikuyama. 1995. Induction from posterior hypothalamus is essential for the development of the pituitary proopiomelanocortin (POMC) cells of the toad (*Bufo japonicus*). *Cell Tiss. Res.* **279**: 233-239.

Kimura, S., Y. Hara, T. Pineau, P.F. Salguero, C.H. Fox, J.M. Ward, and F.J. Gonzalez. 1996. The *T/ebp* null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes & Dev.* **10**: 60-69.

Kusakabe, M., T. Sakakura, M. Sano, and Y. Nishizuka. 1984. Early development of mouse anterior pituitary: role of mesenchyme. *Develop. Growth Differ.* **26**: 263-271.

Lanctot, C., B. Lamolet, and J. Drouin. 1997. The bicoid-related homeoprotein *Ptx1* defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**: 2807-2817.

Lazzaro, D., M. Price, M. De Felice, and R. Di Lauro. 1991. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* **113**: 1093-1104.

Li, H., D.P. Witte, W.W. Branford, B.J. Aronow, M. Weinstein, S. Kaur, S. Wert, G.

Singh, C.M. Schreiner, J.A. Whitsett, W.J. Scott, and S.S. Potter. 1994. *Gsh-4* encodes a LIM-type homeodomain, is expressed in the developing central nervous system and is required for early postnatal survival. *EMBO J.* **13**: 2876-2885.

Pfaff, S.L., M. Mendelsohn, C. L. Stewart, T. Edlund, and E.M. Jessell. 1996. Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**: 309-320.

Robinson, G.W., S. Wray, and K.A. Mahon. 1991. Spatially restricted expression of a member of a new family of murine *Distal-less* homeobox genes in the developing forebrain. *New Biol.* **3**: 1183-1194.

Schwind, J.L. 1928. The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am. J. Anat.* **41**: 295-315.

Sheng, H.Z., A.B. Zhadanov, B. Mosinger, T. Fujii, S. Bertuzzi, A. Grinberg, E.J. Lee, S.P. Huang, K.A. Mahon, and H. Westphal. 1996. Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* **272**: 1004-1007.

Sheng, H.Z., K. Moriyama, T. Yamashita, H. Li, S.S. Potter, K.A. Mahon, and H. Westphal. 1997. Multistep Control of Pituitary Organogenesis. *Science* **278**: 1809-1812.

Szeto, D.P., A.K. Ryan, S.M. O'Connell, and M.G. Rosenfeld. 1996. P-OTX: a *Pit-1*-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 7706-7710.

Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H,

Kimura S, Mahon KA. 1998. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalons. *Development*. 125(23):4835-40.

Watanabe, Y.G. 1982a. Effects of brain and mesenchyme upon the cytogenesis of rat adenohypophysis in vitro. Differentiation of adrenocorticotropes. *Cell Tiss. Res.* **227**: 257-266.

Watanabe, Y.G. 1982b. An organ culture study of the site of determination of ACTH and LH cells in the rat adenohypophysis. *Cell Tiss. Res.* **227**: 267-275.

Winnier, G., M. Blessing, P.A. Labosky, B.L.M. Hogan. 1995. *Bone morphogenetic protein-4* is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & Dev.* **9**: 2105-2116.

(2) マウス口側外胚葉における転写因子の発現に関する研究

研究目的

ラトケ囊原基およびラトケ囊形成中に発現する転写因子群はかなりの遺伝子が既知となっている。そのなかでもマウス胚 E11-13 では Lhx3 が最も重要であり、マウス胚 E15 以降では Pit1 が下垂体細胞系譜の最終分化に必須である。しかしながらマウス胚 E13-15 における下垂体形成の分子遺伝学的検討は今だ充分明らかになっていない。そこで我々はマウス胚 E13-15 において下垂体形成に決定的な役割を演じる遺伝子を検討した。

研究方法・研究成績・研究結果

以上の成績・結果に関しては添付した以下の別冊を参照されたい。

(資料 1)

Molecular cloning and expression analysis of the mouse Spot-2 gene in pituitary development. *Dev Genes Evol.* 2003 May;213(4):199-202.

考案

我々は Spot-1 ファミリーに属すると考えられる新たな下垂体特異的遺伝子をクローニングし、Spot-2 と命名した。この遺伝子が下垂

体形成に重要な役割をしていることは示唆されるが、そのメカニズムはまだ検討中である。またこの遺伝子は p53 とインターラクトする His-Thr ドメインを有しているため、下垂体形成のみならず、下垂体腫瘍の発症にも関与している可能性も示唆される。

(3) マウス口側外胚葉の体外単独培養に関する研究

研究目的

下垂体前葉ホルモン分泌細胞の体外作成、さらに各種内分泌器官再生の基礎となる知見を提供するために、前述の研究 (1) (2) の結果を基にマウス胚の口側外胚葉からラトケ嚢を誘導し、未分化下垂体ホルモン分泌細胞まで体外培養し、さらに *in vivo* の知見より Lhx3, Lhx4 (Sheng et al.,1997), Pit1 (Treier et al.,1998)などの転写因子を発現させ下垂体ホルモン分泌細胞まで体外分化させることを目的とする。以上の研究結果は未分化な胚葉から下垂体を形成させることを哺乳動物で可能にすることであり、将来的には全能性体性幹細胞などから拒絶反応のないヒトの下垂体を作ることが可能となる。また、この知見は甲状腺等他の内分泌器官の体外発生にも応用できるものである。

研究方法

胎齢 8.5 日 (E8.5)の B2D6F1 マウス胚より体外培養のための口側外胚葉部分を取り出す。これに前述の研究 (1) で予想されたシグナ

ル分子(BMP4, FGF8, SHH)を時間的に一致させ作用させる (Takuma, et al., Development, 1998, Ericson et al., Development, 1998)。これにより口側外胚葉部分での転写因子の発現が誘導されてラトケ嚢原基への分化を開始させる。胎齢 12 日 (体外培養 5 日目) においてラトケ嚢での転写因子 Lhx3, Lhx4 の発現が予想どおりに進んだ場合、さらに研究 (2) で我々が同定した Spot-2 の発現を確認する。

材料・試薬・培養

室温、実体顕微鏡下にて PBS 中で E8.5 および E9.5 のマウス胚より口側外胚葉部分を摘出した (E8.5 胚の場合は周辺組織も多少含む)。誘導因子はマウス FGF8b, FGF8c, SHH, ヒト FGF10, ヒト BMP4 (全て SIGMA) を使用した。培地は N-2 Supplement (GIBCO) 添加 Opti-MEM (GIBCO) 或いは、GlutaMax Supplement 1 添加 Opti-MEM 1 Reduced-Serum Medium (GIBCO) を使用した。それぞれの培地に誘導因子を各種順番 (12 時間単位) で添加した。

研究成績

マウス胚 E8.5 および E9.5 共に最大 E12.5 までの観察が可能であった。最も形態的に増殖・分化した培養条件は E8.5 胚において、

GlutaMax Supplement 1 添加 Opti-MEM 1 Reduced-Serum Medium (GIBCO)を使用し、E8.5 で BMP4 (0.1 μ g / ml), SHH(0.1 μ g / ml)同時添加後、E10.0 で FGF8c (0.1 μ g / ml)添加群であった。この条件下に E12.5 まで培養した組織を、4%PFA で固定、パラフィン包埋後、5 μ m 厚で切片スライドガラスを作成し、H-E 染色および RNA in situ hybridization に使用した。結果として E11.5 の培養組織において、Lhx3 の転写因子発現までは確認された。しかしながら E12.5 ではアポトーシスを引き起こし、それ以降に発現する転写因子の確認は不能であった (図 1)。

考案)

現在の段階で確認されている下垂体発生の遺伝子カスケードは図 2 のように考えられる。本研究において E12.5 にアポトーシスを引き起こした原因として考えられるのは、以下の 2 点が示唆される。第 1 に、BMP4 および FGF8 はある一定の時期にしか発現しないという研究 (1) での結果と文献的には BMP4 のインヒビターとしての noggin の存在が考えられる。つまり、BMP4 と noggin のある程度の均衡発現が正常な分化に必要である可能性がある。第 2 に、誘導因子だけでは正常な分化が進行しないということは、誘導分子を

補佐するタンパク、あるいは共に組織中に存在していなければなら
ない何らかの物質が必要であると考えられる。今後、In vivo での誘
導因子の存在状態を詳細に検討する必要があると思われる。

図1

マウスE12.5 ラトケ嚢



H-E



Apoptosis

マウスE11.5 ラトケ嚢



In Situ Hybridization
Lhx3 probe

図2

下垂体の分子生物学的発生カスケード

