

令和 2 年 10 月 31 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 H30 年度

受付番号 201860050

氏 名 水東 弘教
(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： Ann Arbor （国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
先天性下垂体機能低下症に関する下垂体特異的転写因子
3. 派遣期間：平成 30 年 8 月 1 日 ～ 令和 2 年 10 月 11 日
4. 受入機関名及び部局名
Department of Human Genetics, University of Michigan
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

[研究の目的]

先天性下垂体機能低下症における下垂体特異的な転写因子についてその意義を各種モデルによる解析手法にて解析を行う。

[プロジェクトの遂行状況及び成果]

① 転写因子変異ゼブラフィッシュを用いた下垂体形成の解析の有用性

先天性下垂体機能低下症の診断が困難な一つの理由として、同一変異・家系であっても表現型に幅があり、incomplete penetranceである他、重篤なケースから全くの正常なケースまでが混在することがあげられる。マウスでの解析でも同様の表現型に幅がみられるが、一出産で多数の pup を得られないことがその解析を困難にしている。そのため、今回ゼブラフィッシュを用いた下垂体形成解析の有用性について検討を行うこととした。

ゼブラフィッシュは齧歯類以外の実験モデルとして神経系などの解析を中心にその有用性の為に動物モデルとして使用されることが増えている。特にマウスなど齧歯類と比較し、多産であることや世代交代が早いことなどが特徴であり、前述のように転写因子の変異に伴う先天性下垂体機能低下症のような表現型に幅があるような疾患群においては、一回の出産で多数のサンプルが得られるために表現型にバラエティーが富むサンプルが得られることや統計学的な検討を行う上で有用であるものと考えられた。加えて、embryo や larvae では体が半透明であるため、体内深部の形成を体外から窺い知ることが比較的簡単であることがあげられる。下垂体は頭部深部に存在することから、ゼブラフィッシュは下垂体の分化・形成の評価を行う上でも有益であるものと考えられた。

今回は本グループが以前からマウス・ヒトサンプルを用いて下垂体形成の意義を解析している転写因子 *otx2* について、その変異ゼブラフィッシュを用いて同転写因子のゼブラフィッシュにおける下垂体形成における意義、ゼブラフィッシュでの下垂体形成の解析における有用性について解析を行っている。加えて、同転写因子は眼球・下顎などの形成にかかわることが知られている。その為、下垂体に加えてこれらの臓器における機能異常の有無について併せて検討を行った。

ゼブラフィッシュを含めた硬骨魚はその進化の過程で 30-40% の遺伝子に Whole gene duplication が起こっており、*Otx2* においては *otx2a* と *b* が存在するが、これまでの既報で *otx2b* の knockdown がヒト・齧歯類と同様の phenotype を呈することが報告されており、今回は *otx2b* の変異を有する *otx2b^{hu3625}* を解析として用いることとした。派遣先勤務時に Zebrafish Information Network (ZFIN) より *otx2b^{hu3625}* の供与を受け、飼育を開始した。同変異ゼブラフィッシュは *otx2b* の exon2 と 3 間の essential splicing site の変異であり、*otx2b^{hu3625/hu3625}* においては RT-PCR で *otx2b* mRNA の Nonsense-mediated mRNA decay を呈することを確認した。興味深いことに *otx2b^{hu3625/hu3625}* においては 11-12dpf にすべての larvae が死亡することがみられたため、以後の検討では原則として 1,3,5,10dpf を評価対象として用いることとした。

まず OTX2 の変異症例において下垂体機能低下症がみられることから、複数の下垂体ホルモンの whole mount ISH を用いて下垂体ホルモンの発現量の評価を行った。ヒトや齧歯類など他の生物では下垂体の各種ホルモン分泌細胞が入り混じっているため、whole mount ISH での評価が困難である。しかし、他の生物とは違い、ゼブラフィッシュの下垂体の解析が比較的行い

やすい理由の一つとして、各ホルモン分泌細胞が細胞毎に cluster を形成しており Whole mount ISH で各ホルモンの分泌領域・面積を測定することで下垂体全体での各ホルモン発現量を明らかにしうることがあげられる。加えて、前述のように半透明であることから、深部に存在する下垂体の染色について全貌を見ることが出来ることがあげられる。特に今回は成長ホルモン(gh)とプロラクチン(prl)をその下垂体ホルモンでの評価対象とした。その理由としては 1) *OTX2*変異症例では GH 単独欠損症がみられる、2)ゼブラフィッシュの下垂体形成では 24hpf ころから prl が最も早期に発現が開始されることに加え(gh は 2dpf~)、3)前述のようにホルモン分泌細胞毎の cluster が gh, prl では各々一つの集塊を形成しているため、計測上の誤差が乏しく簡便である、4) prl が硬骨魚類では生体の恒常性に必須であるため、である。

興味深いことに、prl は 1,3 dpf でのホルモン分泌細胞面積は各 genotype 間に差は認めないが、5dpf 以降に差があることが認められた。一方 gh は 3dpf 以降、*otx2b^{hu3625/hu3625}*においてホルモン陽性細胞面積が小さいことが示された。また、*otx2b^{hu3625/hu3625}*においては下垂体の原基である *lim3*陽性細胞量が 1dpf で小さいことが示された。このことは *otx2b*が下垂体原基形成に関わっていることを示す結果と考えられた。*otx2b*が下垂体自身に発現しているかを評価する目的で *otx2b*の whole mount ISH を行ったが、1-10dpf 何れの段階においても *otx2*陽性領域と下垂体ホルモンの陽性領域は merge せず、*otx2*は下垂体自体ではなく、周囲の組織に発現し、その組織との interaction が下垂体形成に需要であることが示唆される結果と思われた。一般的に下垂体形成には視床下部からのシグナルが重要なファクターであることがマウスモデルでは知られており、次に視床下部の形成について現在検討を行った。視床下部のマーカーでもある、*fgf3*や *nkx2.4b*の発現も小さく、視床下部形成が不十分なために下垂体が低形成となったものと考えられた。硬骨魚では prl が鰓での sodium transporter の制御、浸透圧の恒常性に関わっていることが知られている。7dpf での鰓部での sodium influx test を行ったところ、*otx2b^{hu3625/hu3625}*では塩分の吸収がなされていないことが示され、prl 分泌不全による浸透圧異常が早期死亡の原因となっていることが示唆された。

その他の頭部形成として下顎形成ならびに目の形成について検討を行った。下顎については、10dpf でやや低形成であることが示されたが、明らかな変化ではなかった。一方、目については、*otx2b^{hu3625/hu3625}*ではサイズが小さいことや一部のサンプルに coloboma が存在することを明らかにした。加えて、組織的な検討では、*otx2b^{hu3625/hu3625}*では小眼球を呈するサンプルが約半数、残りの半数は眼球の著しい低分化状態であることがわかり、*otx2b^{hu3625/hu3625}*の早期死亡の原因が目の異常によるものの可能性が考えられた。そのため、蛍光色素を混ぜた乾燥飼料を用いて *otx2b^{hu3625/hu3625}*が食料を視認し、経口摂取ができているかを評価した。興味深いことに *otx2b^{hu3625/hu3625}*では腹部への蛍光色素の蓄積が認められなかった。*otx2b^{hu3625/hu3625}*の 11-12dpf における早期死亡は前述の浸透圧異常に加え、経口摂取不足に伴う低栄養に伴い、卵黄からの栄養が枯渇するためと考えられた。

最後に *otx2b^{hu3625/hu3625}*の下垂体を含めた頭部の低形成の原因について解析を行った。頭部において PCNA 陽性領域が少ない事、加えて Acridine Orange 陽性領域が多い事が認められた。これらの結果から、cell proliferation 低下、apoptosis 亢進の双方が関与していることが示された。

これらの結果は *otx2b*の下垂体形成への意義を示すのみならず、先天性下垂体機能異常・下垂体形成の研究モデルとしてゼブラフィッシュが有用であることを示したものと考えられた。これらの検討の概要について 2019 年 3 月の全米内分泌学会(ENDO2019)にて口演発表を行うとともに、同学会にて Outstanding Abstract award と Early Career Forum Travel Award を受賞した。また、本研究については遺伝・発生の専門誌である *Human Molecular Genetics*誌に掲載された。

② 新規転写因子変異による下垂体機能低下症の解析

先天性下垂体機能低下症は 4,000-10,000 出生に 1 例と比較的頻度の高い異常であるにも関わらず、約 84%が原因不明であるという報告がなされている。SIX3 の新規変異に伴う先天性下垂体機能低下症と考えられた症例に着目し、SIX の下垂体形成に関わる意義につき検討を行った。

SIX3 は前脳の形成に重要な転写因子であることが知られており、その変異では全前脳胞症を引き起こすことが知られている。しかし、その発症の penetrance は不完全であるとともに、発症症例においてもその病像に個体差が著しく大きいことが知られている。全前脳胞症は下垂体・視床下部の形成が前脳形成と合わせて障害される症例も報告がなされているが、SIX3 変異により下垂体のみの低形成・下垂体系断裂症候群を呈した症例はこれまでに報告はなされていない。今回共同研究者のフランスの一家系から得られた SIX3 P74R の新規変異の解析を行っている。同家系は明らかな全前脳胞症や頭部形成異常は呈していないのにも関わらず、先天性下垂体機能低下症を呈するとともに、下垂体基断裂症候群を呈するという興味深い病像を示した。in vitro の検討として同変異は SIX3 により活性化されるエンハンサー (SBE2) 並びにプロモーター (Foxg1) を用いた複数の Reporter assay において WT と比較し活性能が乏しいことを認める結果が得られ、同変異は病的意義があるものと考えられる結果と考えられた。

派遣先業務開始後に *Six3 flox* マウスを共同研究者より受領し、各種組織特異的な KO マウスの解析を開始した。本症例が下垂体系断裂症候群を呈するという病像を得たことから、視床下部特異的 KO (*Six3^{fl/fl}; Nkx2.1-Cre*) の解析を中心に行い、また、*Six3* は下垂体自体にも発現がみられることから下垂体特異的 KO (*Six3^{fl/fl}; Prop-Cre*) の解析を行った。

視床下部特異的 KO では E10.5 では下垂体形成の開始である口腔外胚葉の神経外胚葉側への陥入が認められた。同時期では吻側のみ口腔外胚葉が一部 LHX3 陽性となり、分化が認められるものの、大半が成熟下垂体への分化が認められなかった。また、E11.5 では約半数では陥入した口腔外胚葉が消失、残りは極小の下垂体組織 (LHX3 陽性) が認められるのみとなった。その後 E14.5 では完全に下垂体は消失していた。E10.5 での cleaved Caspase-3 を評価すると、陥入した尾側口腔外胚葉に陽性となり、そのことから細胞死が下垂体消失の原因と考えられた。

一般に下垂体茎の予定領域は神経外胚葉が分化、細胞増殖が低下することで下垂体茎に形成されていくが、視床下部特異的 *Six3* KO では神経外胚葉の細胞増殖の低下が認められず、下垂体茎への分化がなされていないものと考えられた。ISH ならびに免疫染色では視床下部からの下垂体形成の各種シグナル (Fgf8, Fgf10, Bmp4) の発現低下が認められた。FGF シグナルの消失は口腔外胚葉のアポトーシスを惹起することが知られており、FGF シグナルの濃度が不十分な尾側口腔外胚葉のを中心とした E10.5~E11.5 にかけてのアポトーシスの原因と考えられた。また、下垂体後葉形成の直接シグナルである *Lhx2* の発現低下がみられるほか、視床下部のマーカーである *Tbx3* の発現低下が認められた。これらの原因として *Otx2* の視床下部での発現を評価したところ、視床下部での *Otx2* の発現低下が認められ、このことから *Otx2* が *Six3* の直接的な下流分子の一つであることが示唆された。また、Notch シグナルの一つである、*Hes1* の発現低下も認められ、*Six3* は視床下部・下垂体後葉形成において最も上流に近い遺伝子であることが示唆された。

E11.5 では通常下垂体後葉 (infundibulum) 形成部位では神経外胚葉が分化するため、細胞増殖が低下することが知られている。*Six3^{fl/fl}; Nkx2.1-Cre* においては Ki-67 陽性細胞が infundibulum 形成予定部位でも他神経外胚葉同様に認められ、infundibulum への分化が認め

られないことが示された。同部位では CyclinD1, Mycn の cell cycle marker の発現亢進が認められた。これらの cell cycle marker は Wnt/b-catenin signal で発現が亢進されるマーカーであり、Wnt/b-catenin signal の下流である Axin2 の発現につき検討したところ、Six3^{fl/fl}; Nkx2.1-Cre の視床下部においては通常よりも頭側へと発現領域が進展していることが分かり、Six3 が Wnt/b-catenin signal を抑制することが infundibulum 形成に重要であることが示された。

これらの結果は SIX3 が視床下部を介して下垂体形成を促す因子であることを証明する結果であるとともに、新たな先天性下垂体機能低下症の原因遺伝子の提唱に繋がる結果と考えられる。(概要を全米内分泌学会 2020(ENDO2020)で発表予定であったが、新型コロナウイルスの影響の為中止となった。) 現在論文投稿準備中であり、来年度の全米内分泌学会 2021(ENDO2021)での発表予定としている。

③ ラトケ嚢胞の診断としての新規転写因子 FOXA1, FOXJ1 の可能性

現在のラポで以前から行っている Isl1 KO の変異マウスの解析につき参画した。同マウスは下垂体原基であるラトケ嚢胞の同様の嚢胞状構造物を下垂体前葉部内に複数形成することがみられている。また RNA-seq などの解析で複数の転写因子(Foxa1, Foxj1)が同構造で発現がみられ、正常マウスの下垂体原基であるラトケ嚢胞でも同様に免疫染色で発現が認められることが明らかとなっている。本来ラトケ嚢胞は胎生期～小児期に下垂体を形成する原基であるが、その後消失することが一般である。しかし、成人症例においても下垂体内に遺残ラトケ嚢胞が存在し、嚢胞内出血・炎症などで下垂体機能低下症などの症状を引き起こすことや近接する視神経を圧排することによる市や障害が起きる事が知られている。しかし、一部の症例では同様の部位から発生する頭蓋咽頭腫との鑑別が難しいことが診断上の問題となっている。同プロジェクト内の担当として、ヒトラトケ嚢胞における FOXA1, FOXJ1 の診断上の有益性につき検討を行った。日本国内の間脳下垂体外科(鹿児島大学 藤尾信吾医師)との共同研究とし、22 例のヒトラトケ嚢胞サンプル、並びに対象として典型例の頭蓋咽頭腫の染色を行った。これまでに用いられてきた Acetylated tubulin や Cytokeratin 8 と同様にこれらの転写因子がラトケ嚢胞に陽性になること、頭蓋咽頭腫では陰性となることが示され、新規診断マーカーとなりうるものと考えられ。なお、同プロジェクトは 2019 年 3 月の全米内分泌学会にて概要の発表を行った。また、同研究は *Journal of Clinical Investigation* 誌に掲載された。

海外特別研究員に採用頂き、ミシガン大学 Human Genetics (Prof. Sally Camper lab)という素晴らしい環境・指導者の下で学ぶ機会を頂戴したことを心よりお礼申し上げます。今後帰国後は得られた学びを次の世代に繋げていけるように微力ながら貢献できるように尽力していく所存です。今後ともこの海外特別研究員の制度が本邦の若手研究者にとって素晴らしい機会のきっかけになることを祈念致します。