

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09074

研究課題名(和文)下垂体前葉内の濾胞星細胞を用いた急性脊髄損傷の治療に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Gap junctions between folliculo-stellate cells support the intercellular communication for transplantation.

研究代表者

和田 郁雄 (Wada, Ikuo)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・名誉教授

研究者番号：70182970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：飽食因子として発見されたレプチンが濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの成熟と維持にはプラス的作用を持っていることをレプチンの受容体が機能不全を起こしているZucker ラットを対象として研究・発表した。その詳細なメカニズムは依然不明であるがレプチンが伝達するシグナルが、加齢変化が予想される2歳齢のラットにおいて、濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの維持に対して有効に作用していることが推察された。また、レプチン受容体の存在しない性腺刺激ホルモン(FSH)産生細胞の特に顕著な形態変化が見られた。濾胞星細胞は移植に際しては、ギャップジャンクションの維持が不可欠ではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプチン受容体の存在しない性腺刺激ホルモン(FSH)産生細胞の特に顕著な形態変化が見られた。Zucker-Fattyのマウスではレプチン受容体の変異によりレプチン不応性が生じている。このためレプチンの産生がレプチン受容体の存在する濾胞星状細胞間のギャップジャンクションを利用してFSH産生細胞の細胞形態の維持にかかわっているのではないかと考えられた。このことは、移植細胞としての細胞自体の恒常性の維持に濾胞星状細胞間のギャップジャンクションが効果的に働いていることを示唆しており、今後の研究に対する有効な発見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：This investigation was made that the spinal cord regeneration experiment by the transplantation using follicle stellate cells. We have reported that leptin, discovered as a satiating factor, has a positive effect on the maturation and maintenance of gap junctions between follicular astrocytes in Zucker rats with dysfunctional leptin receptors. In this study, we investigated the effects of aging on the maintenance of gap junctions in the anterior pituitary of 2-year-old Zucker fatty (fa/fa) rats by examining gap junctions between follicular astrocytes in Zucker lean (+/-) and Wistar Imamichi rats. Although the detailed mechanism remains unclear, the results suggest that leptin signaling is effective in maintaining gap junctions between follicular astrocytes in 2-year-old rats, where age-related changes are expected. These results suggest that the maintenance of gap junctions is essential for the transplantation of follicular astrocytes.

研究分野：整形外科学

キーワード：ギャップジャンクション 下垂体 濾胞性細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、世界中には何百万人も脊髄損傷で悩んでいる患者がおり、彼らにより良い生活を送って行けるような根本的な治療法が求められている。中枢神経系は再生能力が低く、一度損傷すると再生は困難であると考えられてきた。近年の基礎医学の急速な進歩により、実験的に中枢神経の解剖学的及び機能的再生も可能である事が次々と示されてきた。このうち移植による脊髄再生には従来、末梢神経の移植、培養シュワン細胞の移植、嗅神経鞘細胞移植、幹細胞移植などの方法が考えられてきた。このうち幹細胞とは自己複製能をもち、条件によっては1つまたはそれ以上の系列の細胞に分化できる能力を持った細胞の総称である。現在、再生医療には、“夢の治療”として、大きい期待が寄せられている。移植による脊髄再生には幹細胞移植などが考えられてきた。成体の種々の組織には幹細胞が存在し、一定の寿命で死滅していく細胞の補充をしている。この成体の組織中に存在している幹細胞を総称して“体性幹細胞”と呼んでいる。今回、下垂体前葉内の幹細胞(stem cell)と考えられている濾胞星細胞を用いた移植による脊髄再生実験を行う事とした。

急性脊髄損傷は、軸索の断裂、神経細胞及びグリア細胞の壊死により脊髄神経組織が破壊される。その機序としては直達外力による一次損傷とその後に続く二次損傷によるものがあり、最終的に生じる反応性アストロサイトによるグリア瘢痕が大きな問題となる。そこで中枢神経内の再生阻害因子を克服して良好な機能的再生をさせるためには、(1)軸索の再生能力の修飾、(2)ミエリン内の阻害因子のブロック、(3)グリア瘢痕の形成抑制、(4)神経幹細胞などの移植による神経細胞あるいはグリアの補充再生など、様々な方法を組み合わせる必要がある。下垂体濾胞星細胞は形態的には無顆粒でしばしば濾胞を形成し微絨毛を持っている。このような特徴を示すことで同細胞の形態学的同定は極めて容易である。しかし、機能的には周辺細胞の支持・栄養、清掃細胞機能、細胞更新系としての顆粒細胞の幹細胞としての機能などが提唱されていて、未だにその役割は不明な点が多い。一方ではS-100蛋白を含有すること等、神経膠細胞との共通点についても、多くの報告がある。成熟ラットにおいてギャップジャンクションは特異的に濾胞星細胞間のみ認められ顆粒細胞の細胞膜上には存在しない。同一の濾胞に所属する濾胞星細胞間だけでなく異なる濾胞に所属する濾胞星細胞から伸展した細胞突起間にもギャップジャンクションが認められることは、ギャップジャンクションを介した細胞間連絡が下垂体前葉全域に伸展していることを示している。またギャップジャンクションの成熟遅延を生じた際にギャップジャンクションを通じた細胞の機能分化に関する情報伝達の障害から濾胞星細胞が線毛の増殖という形で機能的合胞体としての細胞間の内部環境の均一性保持の障害を引き起こす事が分かっている(Shirasawa & Wada I et al., 2007)。更にギャップジャンクションで機能的合胞体を形成した濾胞星細胞はギャップジャンクションで結合していない場合よりも周辺細胞の支持・栄養、清掃細胞機能、細胞更新系としての幹細胞機能が高い事が示唆された。我々は、ギャップジャンクションの成熟遅延を生じた際に濾胞星細胞が線毛の増殖という形で機能的合胞体としての細胞間の内部環境の均一性保持の障害を引き起こす事を発見した。さらに、下垂体茎部での濾胞星細胞間のギャップジャンクションの形成はS-100蛋白の染色性の増加と並行して15日齢から始まり30~40日齢で完成するがLH-RHニューロンの下垂体茎部への侵入はその後60日齢において生じることを免疫組織学的に証明した。併せてトランスジェニックS-100b GFPラットの下垂体培養細胞で濾胞星細胞には本質的にギャップジャンクションの形成能がある事を証明した(Wada et al., 2014a)。さらに、この濾胞星細胞間のギャップジャンクションの成熟と維持がサーカディアンリズムの正常化に貢献していることも見出した(Wada et al., 2013)。又これらの結果から、ギャップジャンクションで機能的合胞体を形成した濾胞星細胞は結合していない場合よりも周辺細胞の支持・栄養、清掃細胞機能、細胞更新系としての幹細胞機能が高い事が分かった。

我々は正常雄ラットにおいては下垂体前葉濾胞星細胞間におけるギャップジャンクションは主なギャップ結合タンパク質としてコネクシン43が存在している事を免疫組織化学的に証明した。さらに最近下垂体濾胞星細胞にはレプチン受容体とCNTF受容体が存在することが明らかになった。レプチン受容体(Ob-R)は膜1回貫通型受容体であり、IL-6、CNTFなどのサイトカイン受容体のシグナル伝達分子であるgp130と高い相同性が認められる。さらに、Ob-Rには選択的スプライシングにより、複数のアイソザイムが存在する。このうち最も長いOb-Rbの細胞内ドメインにはサイトカイン受容体と同様にレプチン作用のシグナル伝達に関与していると考えられるJAK kinaseとSTATの結合に関与するBox1,2,3配列が認められ、レプチンは、このOb-Rbを介して、その作用を発揮すると考えられている。そこで、レプチン受容体と同様にレセプターの細胞内Box1,2,3配列が認められ、機能の重複性が予想される毛様体神経栄養因子(CNTF)を用いて治療する方法について検討し、去勢した雄ラットにhuman recombinantレプチン又はrecombinant rat CNTFを腹腔内投与すると濾胞星細胞間のギャップジャンクションの形成が促進される事が分かった。一方、各種のホルモンを分泌する顆粒細胞はCNTFを腹腔内投与するとその数を減らしているのが観察され、これには濾胞星細胞からのIL-6の分泌の亢進が関与していると考えられた。

急性脊髄損傷に対する初期段階での脊髄再生治療に、下垂体濾胞星細胞を応用し、さらに非開頭法(transsphenoidal approach)を用いて採取した下垂体組織を腎被膜下移植しこれに毛様体神経栄養因子(CNTF)を皮下に挿入したりザーバーから持続投与して細胞移植に適切な状態を得ることである。なおこの腎被膜下移植下垂体細胞塊を用いる実験には、ラットの皮下に埋め

込み可能な大きさの小型の浸透圧ポンプ (Mini-Osmotic Pump; Model 2001; 1.0 μ l per hour, 7 days; 米国 ALZET 社製) を用いてラットの行動を自由に保ったままおこなっている。腎被膜下移植は高度なレベルの設備や技術を必要とせずまた浸透圧ポンプの使用は実験条件での動物の行動を抑制しないメリットがある。

2. 研究の目的

成体の組織中に存在している幹細胞は“体性幹細胞”と総称されている。体性幹細胞については、レシピエント自身から得る場合には拒絶反応の恐れが無く、また倫理的問題もほとんど生じない利点がある。下垂体前葉内において体性幹細胞の一種と考えられているのは下垂体濾胞星細胞と呼ばれている無顆粒で神経膠細胞との共通点についても、多くの報告がある細胞種である。

幹細胞とは自己複製能をもち、条件によっては1つまたはそれ以上の系列の細胞に分化できる能力を持った細胞の総称である。体性幹細胞については、レシピエント自身から得る場合には拒絶反応の恐れが無く、また倫理的問題もほとんど生じない利点がある。下垂体前葉内において体性幹細胞の一種と考えられているのは下垂体濾胞星細胞と呼ばれている無顆粒で神経膠細胞との共通点についても、多くの報告がある細胞種である。我々は、この下垂体濾胞星細胞を用いた移植による脊髄再生を目指した。さらに詳しく言えば、この研究は急性脊髄損傷に対する初期段階での脊髄再生治療に、下垂体濾胞星細胞を応用し、さらに非開頭法 (transspenoidal approach) を用いて採取した下垂体組織を腎被膜下移植しこれに毛様体神経栄養因子 (CNTF) を皮下に挿入したりザーバーから持続投与して細胞移植に適切な状態を得るといふ、簡便かつ緊急手術に応用可能な方法を開発する基礎研究を行う事である。

3. 研究の方法

我々は、成熟ラットにおいてギャップジャンクションは特異的に濾胞星細胞間のみ認められ顆粒細胞の細胞膜上には存在しない。ギャップジャンクションの形成不全を生じた際にギャップジャンクションを通じた細胞の機能分化に関する情報伝達の障害から濾胞星細胞が線毛の増殖等の形で機能的合体体としての細胞間の内部環境の均一性保持の障害を引き起こす事が分かった。そして、ギャップジャンクションの形成が十分な下垂体組織が移植に適合しているのを発見した。そこで、正常雄ラットにおいては下垂体前葉濾胞星細胞間におけるギャップジャンクションは主なギャップ結合タンパク質としてコネクシン 43 が存在している事を免疫組織化学的に証明し、さらに下垂体濾胞星細胞にはレプチン受容体と CNTF 受容体が存在することを確認するため、また、このレプチン受容体を通じた細胞内のシグナル伝達がギャップジャンクションの形成にプラスに働くことを組織化学的に確認することとした。

4. 研究成果

研究対象として主に注目したのは、下垂体前葉濾胞星状細胞である、一方、我々は、脊髄損傷組織内のミクログリアの増加を発見している。そこで、中枢神経内で炎症反応を起こすミクログリアについて、培養細胞を用いて、ミクログリアの活性調節における SGK1 を含む SGK のはたらきも検討している。結果としては、ミクログリア由来細胞株 BV-2 細胞を LPS 投与によりミクログリアを活性化したところ、刺激誘導型の一酸化窒素 (NO) 合成酵素 iNOS や炎症反応を惹起するサイトカイン TNF の mRNA が増加した。これらのことから、SGK の活性は炎症刺激に対するミクログリアの活性を抑制する可能性が示唆された。これについては論文発表している Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2018 20;10(2):115-123.

また、一方、下垂体前葉濾胞星状細胞についてはレプチンレセプター異常も含めて検討した。第80回中部支部学術集会:誌上開催(2020年1月開催)にて、“2歳齢の Zucker fatty (fa/fa)、Zucker lean (+/-)、Wistar Imamichi の下垂体前葉濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの透過電顕を用いた検討”の演題名にて発表をした。

以下に概要を報告する。

【研究目的】下垂体前葉濾胞星状細胞は形態的には無顆粒でしばしば濾胞を形成し微絨毛を持っている。この様な特徴を示すことで同細胞の電子顕微鏡学的な形態学的同定は極めて容易である。成熟ラットにおいてギャップジャンクションは特異的に濾胞星状細胞間のみ認められ顆粒細胞の細胞膜上には存在しない。我々は、これまでの研究発表で、飽食因子として発見されたレプチンが濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの成熟と維持にはプラスの作用を持っていることをレプチンの受容体が機能不全を起こしている Zucker ラットを対象として研究・発表してきた。今回は、生後2年の Zucker fatty (fa/fa) ラットの下垂体前葉内の構造を、Zucker lean (+/-)、Wistar Imamichi の両ラットを比較対象として、濾胞星状細胞間のギャップジャンクションについて透過電顕を用いて観察し、加齢がギャップジャンクションの維持に与える影響について研究する。

【方法:組織の固定と包埋】Zucker fatty (fa/fa)、Zucker lean (+/-)、Wistar Imamichi の雄の2歳齢を各々5匹づつ用いた。ネンブータルにて麻酔下無痛状態に、開胸し左心室から18Gの針を刺入し、生理食塩水500mlにて脱血してから、2.5%グルタルアルデヒド、2%スクロース加0.05M カコジルサンバッファー溶液(pH7.4)100mlで還流固定した。1%オスミウス酸固定液に2時間浸漬した後固定し、50% 100%エタノールにて脱水、100%プロピレンオキシドで置換、エボン812に包埋、60のオープンで72時間重合して、ビームを作成、ウルトラミクロトーム(ライカウルトラカットUTC)にて、約60nmにスライスした切片を200メッシュ

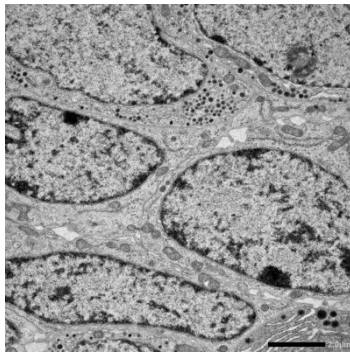
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

銅グリッドに載せて、酢酸ウラニル水溶液(20min) 鉛染色液(5min)で電子染色後に、透過型電子顕微鏡 (JEM-1400Plus) にて観察した。

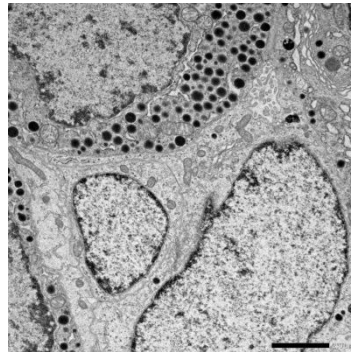
【結果】レプチン受容体の 269 番目のアミノ酸がグルタミンからプロリンに変異して、レプチンの受容体が機能不全を起こしている Zucker fatty (fa/fa) では 2 歳齢では濾胞星状細胞間のギャップジャンクションはほとんど観察できなかった。一方、以前から我々が研究対象としてきた Wistar Imamichi では以前に観察した 60 日齢から 1 歳齢と同様の結果となる 2 濾胞当たり 1 の割合でギャップジャンクションが観察できた。しかし、以前の実験では 1 歳齢までは、Wistar Imamichi と同様の存在比率でギャップジャンクションが観察された Zucker lean (+/-) では (Microsc Res Tech. 2014) 少数のギャップジャンクションしか観察できなかった。

さらに、下垂体前葉では、さまざまなホルモンが産生されている。ホルモン産生細胞はそれぞれの分泌顆粒の大きさと形状が異なっており、透過型電子顕微鏡で観察した際には明調細胞と暗調細胞との区別ができる。そこで、下垂体前葉におけるホルモン分泌細胞との相互反応にも注目し、2 歳齢の高齢ラットを用いて観察して追加で報告した。

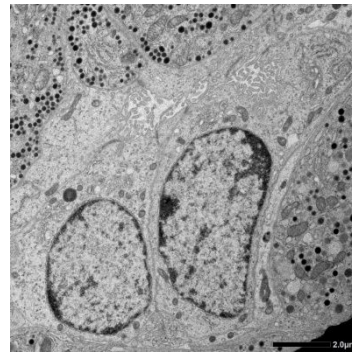
【画像】



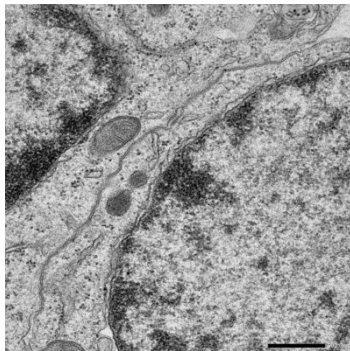
Wistar Imamichi
画像の中央部に大きな
ギャップジャンクション
を観察できる (X3,000)。



Zucker lean (+/-)
画像の中央やや上方に
ギャップジャンクションが
観察できる (X3,000)。



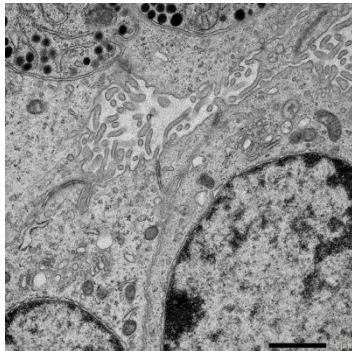
Zucker fatty (fa/fa)
画像は中央やや左上に
濾胞を形成している無顆粒
の細胞を認める (X3,000)。



Wistar Imamichi
強拡大 (X12,000) では
ギャップジャンクション
の 3 層構造を観察できる。



Zucker lean (+/-)
強拡大 (X30,000) では
ギャップジャンクション
の 3 層構造を観察できる。



Zucker fatty (fa/fa)
拡大画像 (X6,000) では
濾胞周囲の無顆粒細胞の
間には何も発見出来ない。

【追加の結果・考察】

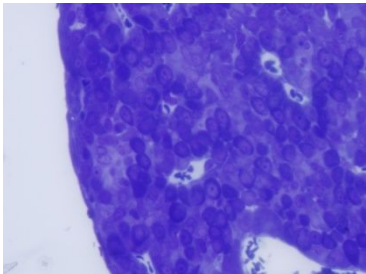
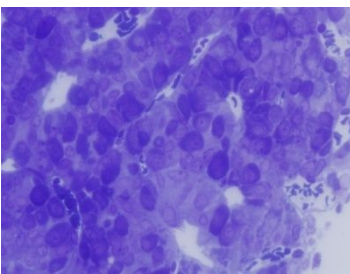
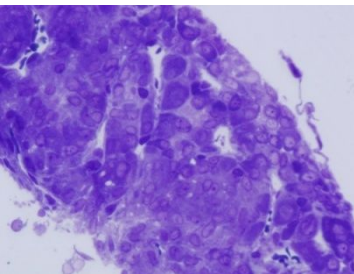
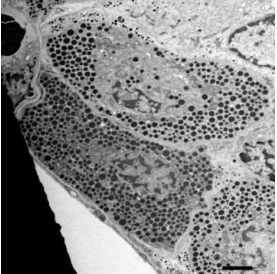
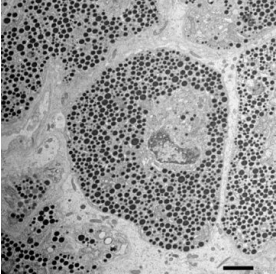
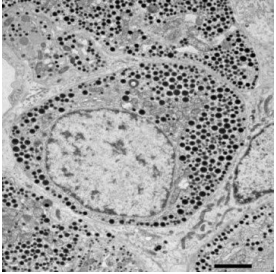
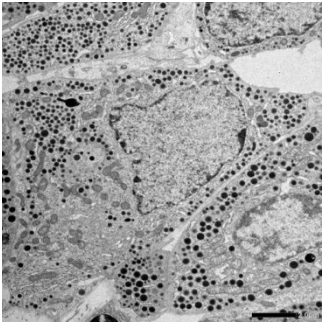
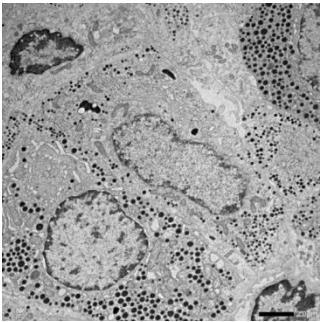
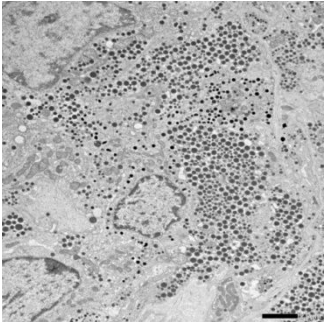
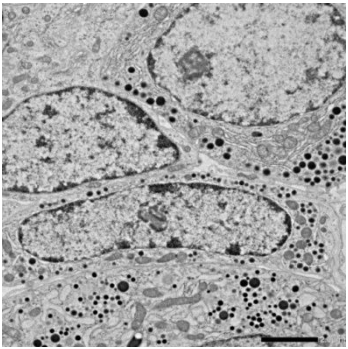
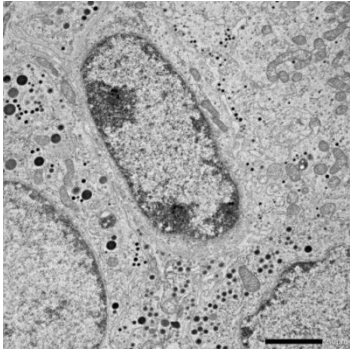
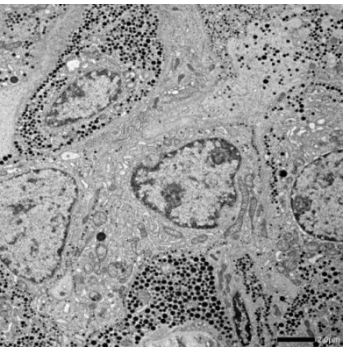
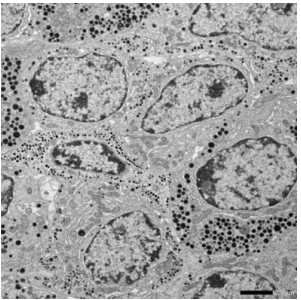
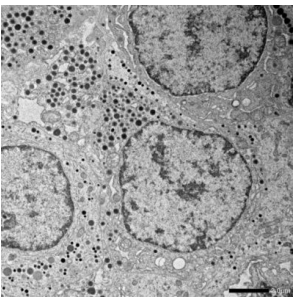
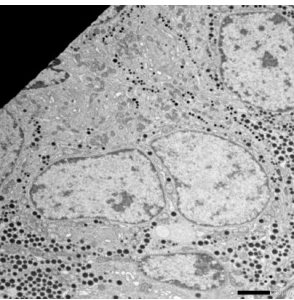
今回主に研究対象としている下垂体前葉濾胞星状細胞は無顆粒で多数の長い突起を持った細胞で分泌顆粒を持たず、ホルモンは分泌していないと考えられている。

Wistar の下垂体では暗調細胞である GH、PRL、TSH の産生細胞と明調細胞である ACTH、FSH の産生細胞、濾胞星状細胞 (FSC) が観察された。

一方 Zucker-Lean、Zucker-fatty においても同様の細胞が観察されたが、Wistar では球形に近い形状で見られた FSH 産生細胞が Zucker では一方方向に細胞質を伸ばした細長い形態で観察された。実験結果から、その詳細なメカニズムは依然不明であるがレプチンが伝達するシグナルが、加齢変化が予想される 2 歳齢のラットにおいて、濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの維持に対して有効に作用していることが推察された。

FSH 産生細胞には通常レプチン遺伝子が発現していない、レプチン受容体の存在しない性腺刺激ホルモン FSH 産生細胞に Zucker-Fatty の場合に顕著な形態変化が見られた。Zucker-Fatty のマウスではレプチン受容体の変異によりレプチン不応性が生じている。このためレプチンの産生が濾胞星状細胞間のギャップジャンクションを利用して FSH 産生細胞の細胞形態の維持にかかわっているのではないかと考えられた。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

Wistar Imamichi 2 Ys Old	Zucker lean (+/-) 2 Ys Old	Zucker fatty (fa/fa) 2 Ys Old
厚切り切片 	厚切り切片 	厚切り切片 
GH 産生細胞 	GH 産生細胞 	GH 産生細胞 
PRL 産生細胞 	PRL 産生細胞 	PRL 産生細胞 
FSH 産生細胞 	FSH 産生細胞 	FSH 産生細胞 
ACTH 産生細胞 	ACTH 産生細胞 	ACTH 産生細胞 

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asai H, Inoue K, Sakuma E, Shinohara Y, Ueki T.	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Potential implication of SGK1-dependent activity change in BV-2 microglial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 115-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐久間英輔、和田郁雄、若林健二郎、河 命守、福田俊嗣、浅井勇人、植木孝俊、 村上英樹
2. 発表標題 酸感受性イオンチャンネル1a、2aのラット小脳形成期における発現様式
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上浩一、森本浩之、佐久間英輔、和田郁雄、植木隆俊
2. 発表標題 ミクログリアの活性に与えるフラクタルカインシグナルの影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 扇谷昌宏、井上浩一、佐久間 英輔、神庭重信、植木孝俊、加藤隆弘
2. 発表標題 急性ストレスによって海馬ミクログリアから産生されるTNF- α はワーキングメモリを 障害する 形態変化を伴わないミクログリアの活性化
3. 学会等名 第125回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子絹恵、和田郁雄、高瀬弘嗣、佐久間英輔、大曽根史織、扇谷昌宏、井上浩一、植木孝俊
2. 発表標題 2歳齡のZucker fatty (fa/fa)、Zucker lean (+/-)、Wistar Imamichiの下垂体前葉濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの透過電顕を用いた検討
3. 学会等名 第80回中部支部学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	若林 健二郎 (Wakabayashi Kenjirou) (20418867)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	佐久間 英輔 (Sakuma Eisuke) (90295585)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	村上 里奈 (Murakami Satona) (10535818)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	青山 公紀 (Aoyama Kiminori) (10597818)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------