

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007 年度 ～ 2009 年度
課題番号：19590194
研究課題名 (和文) 下垂体前葉細胞の純化と細胞間相互作用研究への応用
研究課題名 (英文) Purification of anterior pituitary cells and its apply to the study of cell to cell interaction
研究代表者
屋代 隆 (Yashiro Takashi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：80119859

研究成果の概要 (和文)：ラット下垂体前葉では、特定の細胞間に接着親和性が存在し、例えば、LH/FSH 分泌細胞とプロラクチン (PRL) 分泌細胞、GH 分泌細胞と ACTH 分泌細胞は、異種細胞間で高い接着親和性を示し、非ホルモン分泌性の濾胞星状細胞は、同種細胞間で接着親和性を示す。我々は、これまでの研究からこうした細胞間に、細胞接着を基とした情報伝達が存在すると考えている。これらの実態解明のために、下垂体前葉細胞を純化して研究を遂行することが必要であると考えた。その方法論として、レクチンを利用して、ホルモン産生細胞の細胞表面に細胞種ごとに特異的な糖鎖が存在していることを示し、これを応用して生きた細胞を蛍光標識・同定することを初めて可能とした。併せて、濾胞星状細胞特異的なプロモーター下に GFP を発現するトランスジェニック動物を用い、その下垂体からセルソーティング法により、濾胞星状細胞を純化することに成功した。これらの細胞を用いることにより、前葉内での局所的な細胞機能調節機構として、マトリクライン (細胞外基質の影響)、ジャクスタクライン (細胞接着因子の役割)、パラクライン (レチノイン酸合成酵素の局所的発現動態) の 3 つの概念をさらに具現化することが可能となった。

研究成果の概要 (英文)：This study is focused on identifying the mechanisms regulating cell-cell affinities in anterior pituitary gland. In the gland, 5 kinds of hormone-producing cells are distributed in an intriguing manner. For example, LH/FSH cells are often surrounded by prolactin cells, while ACTH cells are located adjacent to GH cells very frequently. Further, folliculostellate cells, which does not produce hormone, have a propensity to adhere each other. Based on these observations, we hypothesized that there is signal transductions between these cell types through the cell adhesions, and live cell purification and identification are crucial to decipher the precise mechanism. Recently, we have established two different methods utilizing lectin and genetically modified S100-b-GFP rats, which allow us to purify and identify live hormone producing cells and live folliculostellate cells from the mixed population of anterior pituitary cells, respectively. The data obtained from two approaches suggested that there are three local regulatory mechanisms in anterior pituitary cells; matricrine (effect of matrix), juxtacrine (effect of cell adhesion molecule), and paracrine (local expression of retinaldehyde dehydrogenases).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,060,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：組織学

1. 研究開始当初の背景

複数のホルモンを分泌する内分泌器官においては、細胞は同種好性の集団をつくる傾向が強い(Cirulli *et al.*, 1994 他)。例えば、膵臓ランゲルハンス島においては、β細胞が島の中心に、α細胞が周辺部に偏在しており、この組織構築はホルモンを同期して分泌するという機能的な意味を持つ(Malaisse-Lagae *et al.*, 1975 他)。しかし、こうした一般論に反し、ラット下垂体前葉においては、特定の異種細胞間に親和性が存在し、例えば、LH/FSH分泌細胞とプロラクチン(PRL)分泌細胞、GH分泌細胞とACTH分泌細胞が高い頻度で接着するという特徴的な組織構築がみられることが古くから指摘されてきた(Nakane, 1970 他)。系統発生学的にみると、魚類では各種の下垂体前葉ホルモン産生細胞はそれぞれ集団をなして葉内の一部を占めるが、高等になるにつれ異種の細胞が交じり合う傾向が強くなる(ラットでも、胎児期にはそれぞれの種類の細胞は葉内の特定の場所に出現し、成熟とともに分布が交じり合う Scully and Rosenfeld, 2002)。こうした異種の内分泌細胞間の親和性は恐らく他に類がなく、なぜ下垂体前葉においてこのような細胞配列がみられるのか、また、どのような機構で異種の細胞が特異的に接着するのか大変興味深い。

我々は最近、この形態学的特徴に改めて興味をもち、ラットの下垂体組織、またその初代培養細胞について、共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元的な定量解析を行なった。その結果、異種細胞間の

接着親和性が統計学的にも高度に有意であることが確認されたのみならず(Noda *et al.*, 2001)、酵素で細胞分散することで細胞間の接着を一旦完全に解除しても、初代培養において前述の細胞の配列が再構築されることが明らかとなった(Noda *et al.*, 2003)。このことは、細胞自身に接着相手を選択する機構が備わっていることを意味する。さらに、特異的細胞接着のもつ意味について考えようと、GH遺伝子発現のレポーター遺伝子を作成し、下垂体前葉初代培養細胞に導入する実験を行なった。その結果、GH遺伝子の発現が、①GH細胞にACTH細胞が接すると抑えられ、②GH細胞同士が接すると促進されることを知ることができた。ホルモン産生細胞は、隣接する細胞の種類によって自らのホルモン合成能を調節していることを強く示唆する結果である。我々は、下垂体前葉にこれまで知られていない、いわゆるジャクスタクライン型の情報伝達があると考えに至っている。ここまでの成果、仮説は2005年度の第16回国際解剖学会議においてシンポジウム発表する機会を頂き、様々な有意義な教示を得ることができた。

本研究をさらに進めるためには、分子生物学的手法を取り入れ、遺伝子発現の網羅的に解析することが最善の手段であると考えている。その場合、細胞をmassで扱わざるを得ないため、純化された細胞が必要となる。しかし、株化された下垂体前葉細胞にはいずれも正常な細胞接着をする能力が失われているため、どうしても初代培養細胞を純化する必要がある。我々は最近、下垂体前葉の各種ホルモン

産生細胞には、その細胞表面に固有の糖鎖が存在することに付き、レクチンによるスクリーニングを試みた。21種類のレクチンを蛍光色素で標識し、それぞれ初代培養細胞に作用させたところ、6種類のレクチンは細胞種特異的な結合(97%以上の一致率)をみせた。更なる解析の結果、GH細胞はスフィンゴ糖脂質GM1を特異的に発現していることをはじめとして、PRL細胞はGal β 1-3GalNAc、ACTH細胞は(GluNAc)_n、GH、PRL系譜の細胞はFuc α を含む糖鎖を特異的にもつなど、同定中のものを含めて6種類の特異的糖鎖を確認している。これらの糖鎖がどのような機能をもった分子であるのか興味深いところであるが、この結果はまた、生きた下垂体前葉細胞の細胞種を見分けることができるという全く新しい概念をもたらし、さらに、初代培養細胞の純化が技術的に可能であることを意味している。

2. 研究の目的

ラット下垂体前葉では、特定の細胞間に接着親和性が存在し、例えば、LH/FSH 分泌細胞とプロラクチン(PRL)分泌細胞、GH 分泌細胞と ACTH 分泌細胞は、異種細胞間で高い接着親和性を示し、非ホルモン分泌性の濾胞星状細胞は、同種細胞間で接着親和性を示す。我々は、これまでの研究からこうした細胞間に、細胞接着を基としたジャクスタクライン型の情報伝達が存在すると考えている。最近、我々はレクチンを利用して、ホルモン産生細胞の細胞表面に細胞種ごとに特異的な糖鎖が存在していることを示し、これを応用して生きた細胞を蛍光標識・同定することを初めて可能とした。併せて、埼玉大学井上金治教授より、濾胞星状細胞特異的なプロモーター下にGFPを発現するトランスジェニック動物の供与を受けた。これまで系統化された細胞では、正常な細胞接着が失われていることが研究上の難点であったが、本研究では、1)レクチン工学その他の技術によって下垂体前葉細胞を純化し、細胞接着が細胞機能に与える影響を解明すること、2)これまで未解明であった濾胞星状細胞と各種ホルモン産生細胞との細胞接着親和性を解明すること、3)特異的な細胞接着が作られる機構を解明することを当初の研究目的とした。

3. 研究の方法

GH、ACTH、PRL産生細胞については、細胞種特異的に(>97%)結合するレクチン等(それぞれコレラトキシン、S-WGA、PNA)をすでに選定しているので、これらを利用して初代培養細胞の純化を行なう。細胞の純化には、組織からの細胞分散後、標識したレクチンを細胞に結合させ、セルソーターで分離する方

法、または、レクチンを磁気ビーズに固相化して細胞をバッチ法で分離する方法を用いる。LH/FSH、TSH産生細胞については、分取に用い得るほどの特異性を示すレクチンがみつかっていない。このため、さらに特異的糖鎖の解析を進める。併せて、現有の情報に基づいて多重標識することで、両細胞の細胞分取が可能であるか試みる予定である。一方、濾胞星状細胞については、トランスジェニック動物より、GFP蛍光を標的としてセルソーターで単離する。

各種の下垂体前葉細胞が単離できれば、特定の細胞種間の接着をmassで解析することができるようになる。一般的に細胞接着因子は要時にその発現が起こる。DNAアレイで網羅的解析を行ない、特異的接着因子を絞り込む。DNAアレイの解析は業者委託を考えている。

細胞接着因子によって活性化される細胞内情報伝達系については、一般に各種のキナーゼが関与するとされる。まずは抗体アレイの手法を用いて、生化学的にシグナル伝達系の概要を調べる。その際、標識したphosphotyrosine抗体等を準備しておき、アレイに補足されたタンパクのリン酸化の有無を同時に調べられるような工夫を考えている。この結果を踏まえ、酵素組織化学の手法で、情報伝達系の動態を*in situ*で確認する。

濾胞星状細胞はこれまで、ホルモン産生細胞に対し、種々の影響を与えていることが示唆されているが、初代培養系での検出が困難なことから、各種ホルモン産生細胞との接着親和性については、未解明であった。我々は、名古屋市立大学曾爾彊教授との共同で、門脈系以外に濾胞星状細胞のネットワークを介した視床下部・下垂体前葉系制御機構が存在するという概念を提言している(Shirasawa *et al.*, 2004)。GFP発現濾胞星状細胞を用いることにより、*in vivo*、*in vitro*で各種ホルモン産生細胞と各種ホルモン産生細胞の細胞接着について共焦点レーザー顕微鏡での解析を行なう。

下垂体前葉の細胞接着因子の解析を行ない、最近ホルモン産生細胞にはN-カドヘリンが、濾胞星状細胞には、E-カドヘリンがそれぞれ特異的に発現していることを報告した(Kikuchi *et al.*, 2006)。カドヘリンの種類の違いが細胞の接着親和性、細胞の形質にどのような意味をもつのか、上記の計画に平行してknockdown および遺伝子導入の手法で明らかにすることを予定した。

4. 研究成果

平成19年度においては、下垂体前葉細胞純化の準備を行うとともに、下垂体前葉における

パラクライン、ジャクスタクライン、マトリクラインの3様式の細胞間相互作用の実態を解析した。1、各種下垂体前葉細胞を単離するための特異的プローブとして、レクチンPNA(プロラクチン細胞)、S-WGA(ACTH細胞)及びコレラトキシンβ鎖(GH細胞)を確認し、セルソーターによる精製を開始した。また、濾胞星状細胞の単離に、埼玉大学井上金治教授より供与を受けたトランスジェニックラットが有用であることを確認した。2、下垂体前葉細胞の初代培養系で細胞接着の頻度を実験的に変え、発現の変化する遺伝子をDNAアレイにより選別した。各種シグナル伝達関連タンパクについて情報が得られたほか、インテグリンをはじめとする細胞-細胞外マトリクス接着因子に興味深い変化が見出された。3、ジャクスタクライン型の細胞間相互作用を担うカドヘリンタンパクについて組織学的解析を行ない、下垂体原基に特徴的にE-、N-の2型が共発現していること、その後、E-カドヘリンが失われることが、ホルモン産生細胞の発生・決定に密接にかかわっていることが明らかとなった。4、上記トランスジェニックラットを用いて濾胞星状細胞の動態に関する研究をはじめ、同細胞がギャップジャンクションを介して前葉内広域の信号伝達を担っていること、また、予想された域を超えて下垂体の組織構築に関与していることが示唆された。5、パラクライン因子として重要視されているレチノイン酸の合成酵素の局在について観察を行い、下垂体発生・性周期に伴い酵素の種類、発現細胞に顕著な変動があることが明らかとなった。6、下垂体前葉細胞への刺激伝達をモニターする手段として、c-fosの発現を観察することが有効であることがわかった。

平成20年度においては、これまでの成果を踏まえ、下垂体前葉細胞の細胞間相互作用を局所ホルモン様物質によるパラクライン、細胞外基質との結合によるマトリクライン、細胞同士の結合によるジャクスタクラインの3つの概念に分類して研究を進めた。また、トランスジェニックラット(S100b-GFP)を用いて、濾胞星状細胞とホルモン産生細胞それぞれを純粋培養する技術を確認した。パラクライン調節について、腺下垂体発生におけるレチノアルデヒド脱水素酵素1,2,3それぞれの時空間的な発現パターンを解析し、レチノイン酸が局所因子として腺下垂体の初期発生・分化の調節に働いているという新しい概念を示唆することができた。また、成体の下垂体においても同酵素1型が、エストロゲンの支配下に細胞間相互作用を担っているとの仮説を立てることができた。マトリクライン調節については、in vitroでのliving観察により、腺下垂体で濾胞星状細胞のみが細胞外基質に対して特異的な親和性を示し、細胞接着性、増殖能に顕著な影

響を受けることが明らかとなった。また、in vitroで濾胞星状細胞は、細胞突起を伸縮させてホルモン産生細胞を取り囲み、クラスター化させる動きを示すが、細胞外基質存在下ではこの働きはみられなくなり、替わって濾胞星状細胞同士の接着が増え、その細胞間には多くのギャップ結合が形成されることも明らかとなった。下垂体前葉細胞におけるマトリクライン調節の存在を初めて具現化することができたと考えている。ジャクスタクライン調節については、ホルモン産生細胞の分化・成熟に、細胞接着因子の変化、すなわちcadherin switchingが深く関わっていることを形態学的に示すことができた。また、カドヘリンの発現パターンを人為的に変えることによって、ホルモン合成・分泌に特徴的な変化が起こることを確認した。

平成21年度においては、1)昨年度確立した濾胞星状細胞の純化手法を応用することで、ホルモン産生細胞を細胞化学的に特異染色・純化すること、2)前葉内での局所的な細胞機能調節機構として、マトリクライン(細胞外基質の影響)、ジャクスタクライン(細胞接着因子の役割)、パラクライン(レチノイン酸合成酵素の局所的発現動態)の3つの概念をさらに具現化することを目標とした。1)について、GH細胞が特異的に細胞膜上にガングリオシドGM1を発現していることが明らかとなり、この糖脂質をターゲットとするコレラトキシンBをプローブにFACS法で分画する手法を確認した。純度は95%を超え、これまでの前葉ホルモン産生細胞純化の報告の中で唯一、ほぼ純粋と呼べる培養が可能となった。2)について、マトリクライン:ラミニンとの接着によって、濾胞星状細胞が細胞突起を伸長させ、細胞増殖を活性化し、細胞間にギャップ結合を形成することが明らかとなった。アレイ解析の結果より、細胞増殖はインテグリンを受容体とした信号伝達に依存していることが推察され、さらに細胞内情報伝達系を部分的に証明することができた。また、前葉内で細胞外基質を合成している細胞の同定も行った。ジャクスタクライン:細胞接着因子カドヘリンの型の変化(スイッチング)がホルモン産生細胞の最終分化に深く関わっていることを明らかとしてきたが、その機構が差次的細胞選別とそれに起因する特異的Notchシグナリングに基づいているという仮説に発展させることができた。パラクライン:レチノイン酸合成酵素が細胞特異的に発現していること、発生期にダイナミックな動態をみせること、エストロゲンα受容体を介して調節を受けることを明らかとした。以上の結果を昨年度までの成果と合わせ、視床下部-下垂体-末梢系による調節とは全く別次元の局所的な細胞間相互作用が前葉内に存在していることを提言したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Horiguchi et al. Living-cell imaging of transgenic rat anterior pituitary sells in primary culture reveals novel characteristics of folliculo-stellate cells. *J Endocrinol.* 査読有, 204: 115-123, 2010.
- ② Kusumoto et al. Effect of E-cadherin Expression on hormone production in rat anterior pituitary lactotrophs in vitro. *Act. Histo.* 査読有, 43: 83-88, 2010
- ③ Fujiwara et al. Estrogen receptor alpha regulates retinaldehyde dehydrogenase 1 expression in rat anterior pituitary cells. *Endocr J.* 査読有, 56:963-973, 2009.
- ④ Kikuchi et al. Spatio-temporal relation between cadherin switching and cytogenesis of hormone-producing cell in the developing rat adenohypophysis. *Anat Sci Int.* 査読有, 84: 155-160, 2009.
- ⑤ Fujiwara K., Davaadash B., Kikuchi M., Takigam S., Yashiro I. Estrogen suppresses retinaldehyde dehydrogenase 1 expression in the anterior pituitary glands of female rats. 査読有, 55: 91-96, 2008.
- ⑥ Fujiwara K., Davaadash B., Yatabe M., Kikuchi M., Horiguchi K., Kusumoto K., Kouki T., Yashiro I. Reduction of retinaldehydedehydrogenase1 expression and production in estrogen-induced prolactinoma of rat. *Med Mol Morphol.* 査読有, 41: 126-131, 2008.
- ⑦ Horiguchi K., Fujiwara K., Kouki T., Kikuchi M., Yashiro I. Immunohistochemistry of connexin 43 throughout anterior pituitary gland in a transgenic rat with green fluorescent protein-expressing folliculo-stellate cells. *Anatomical Science International.* 査読有, 83: 256-260, 2008.
- ⑧ 藤原研. Estrogen suppresses retinaldehydedehydrogenase 1 expression in the anterior pituitary glands of female rats. *Endocrine Journal.* 査読有, 55:91-96, 2008.
- ⑨ 瀧上周. In vivo correlation between

c-Fos expression and corticotroph stimulation by adrenocorticotrophic hormone secretagogues in rat anterior pituitary gland. *Cell and Tissue Research.* 査読有, 331: 589-594, 2008.

- ⑩ 藤原研. Expression of retinaldehyde dehydrogenase (RALDH)2 and RALDH3 but not RALDH1 in the developing anterior pituitary glands of rats. *Cell and Tissue Research.* 査読有, 328: 129-135, 2007.
- ⑪ 菊地元史. Changes in E- and N-cadherin expression in developing rat adenohypophysis. *Anatomical Record.* 査読有, 290: 486-490, 2007.
- ⑫ 藤原研. Expression of retinaldehyde dehydrogenase1 in the anterior pituitary glands of adult rats. *Cell and Tissue Research* 査読有, 329: 305-310, 2007.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 藤原研. 成体ラット下垂体前葉細胞におけるレチノイン酸合成酵素の発現. 第34回日本神経内分泌学会, 2007年8月4日, 前橋.
- ② 藤原研. 下垂体前葉における新たなパラクライン調節機構—成体ラット下垂体前葉でのレチノイン酸合成の存在—第23回日本下垂体研究会, 2007年8月24日, 葉山.
- ③ 堀口幸太郎. トランスジェニックラットを用いた下垂体濾胞星状細胞間 Gap junction の共焦点レーザー顕微鏡による観察. 第23回日本下垂体研究会, 2007年8月24日, 葉山.
- ④ 藤原研. 正常下垂体前葉細胞とプロラクチン産生腫瘍におけるレチノイン酸合成酵素の発現. 第48回日本組織細胞化学会総会、第39回日本臨床分子形態学会総会合同学術集会 (ワークショップ), 2007年9月29日, 甲府.
- ⑤ 堀口幸太郎. 下垂体隆起部における濾胞星状細胞間Gap junction 及びLHRHニューロンの共焦点レーザー顕微鏡による観察. 第32回日本比較内分泌学会大会, 2007年10月12日, 日光.
- ⑥ 藤原研. エストロゲンはラット下垂体前葉での retinaldehyde dehydrogenase 1(RALDH1)の発現を抑制する. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008年3月29日, 大分.
- ⑦ 堀口幸太郎. 下垂体前葉初代培養における濾胞星状細胞の動態観察と各種ホルモン産生細胞との位置的親和性の解析. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008年3月29日, 大分.

- ⑧ 屋代 隆. パラクライン、ジャクスタクライン、マトリクラインによる新たな下垂体前葉細胞の機能調節機構の解明. 日本解剖学会 第114回全国学術集会. 2009年3月29日, 日岡山.
- ⑨ 菊地元史. ラット成体の腺下垂体にみられる E-カドヘリン陽性細胞の性質. 第115回日本解剖学会・学術集会, 2010年3月28日, 盛岡.
- ⑩ 藤原研. 発生過程のラット腺下垂体におけるレチノイン酸合成酵素 (RALDH) 発現細胞の同定. 第115回日本解剖学会・学術集会, 2010年3月28日, 盛岡.
- ⑪ 堀口幸太郎. ラミニンとの接着が下垂体専用内濾胞星状細胞に与える影響. 第115回日本解剖学会・学術集会, 2010年3月28日, 盛岡.
- ⑫ 藤原研. ラット下垂体前葉細胞のホルモンと各種受容体遺伝子発現に対するレチノイン酸の作用. 第24回日本下垂体研究学術集会, 2009年8月28日, 青森.
- ⑬ 堀口幸太郎. 下垂体現用細胞初代培養の living 観察によって示唆される濾胞星状細胞の新たな機能-特に細胞外マトリックスに注目して. 第24回日本下垂体研究学術集会, 2009年8月28日, 青森.
- ⑭ 菊地元史. 細胞接着因子カドヘリンからみた腺下垂体細胞の発生・分化. 第82回日本内分泌学会学術集会, 2009年4月24日, 前橋.
- ⑮ 藤原研. ラット下垂体前葉で発現するレチノアルデヒド脱水素酵素1はエストロゲンによりエストロゲン受容体 α を介して抑制される. 第82回日本内分泌学会学術集会, 2009年4月25日, 前橋.
- ⑯ 堀口幸太郎. 下垂体前葉組織構築に対する濾胞星状細胞の関与-インテグリンを介した細胞外マトリックスとの特異的親和性-. 第82回日本内分泌学会学術集会, 2009年4月24日, 前橋.

[その他]

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/histology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

屋代隆 (Yashiro Takashi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：80119859

(2) 研究分担者

菊地元史 (Kikuchi Motoshi)

研究者番号：60332988

自治医科大学・医学部・准教授

滝上周 (Takigami syu)

研究者番号：60333366

自治医科大学・医学部・講師 (H19)

藤原研 (Fujiwara ken)

研究者番号：00382945

自治医科大学・医学部・助教

堀口幸太郎 (Horiguchi Kotaro)

研究者番号：10409477

自治医科大学・医学部・助教

(3) 連携研究者

()

研究者番号：