

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790190

研究課題名（和文）下垂体前葉内濾胞星状細胞間のギャップ結合を介したネットワーク構築を実証する

研究課題名（英文）The analysis of the mechanism of gap junctional network formation between folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland

研究代表者

堀口 幸太郎（HORIGUCHI KOTARO）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10409477

研究成果の概要（和文）：下垂体前葉は、6種類のホルモンを産生する内分泌器官である。この前葉内にあるホルモンを産生しない濾胞星状細胞（FS細胞）と細胞外周囲に存在する細胞外マトリクス（ECM）との相互作用により、新たなFS細胞の性質と機能を以下の4点で明らかにした。1）ECMの一つであるラミニンが、FS細胞間に形成されるギャップ結合の形成を増加させること、2）ラミニンによるFS細胞分裂機構、3）ラミニンを分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ9を分泌すること、4）FS細胞間では、ギャップ結合を介し、電気的刺激を伝達するネットワークを形成する。そのネットワーク形成制御機構の解明である。本研究は、下垂体前葉の機能を明らかにする上で有用で、さらに、腫瘍形成機能の解明、及びその治療に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The anterior pituitary gland is composed of five types of hormone-producing cells and folliculo-stellate cells (FS cells), which do not produce classical anterior pituitary hormones. These cell aggregations form cell cords or clusters surrounded by different types of extracellular matrices (ECM), which provide the mechanical integrity, rigidity, and elasticity. The present study revealed that FS cells, under the influence of ECM, may play important functional roles as follows:

1) FS cells facilitate the gap junctional cell-to-cell communication. 2) The proliferation of FS cells is induced by a caveolin 3-mediated integrin $\beta 1$ signaling pathway, leading to activation of the MAPK pathway. 3) ECM promotes MMP-9 expression in FS cells and that MMP-9 is required for the interconnection and proliferation of FS cells. 4) FS cells secreted CXCL12, and that the CXCL12/CXCR4 axis between FS cells plays a central role in the mechanism of FS cell network formation.

It is hoped that these findings contribute to elucidating the cell function in the anterior pituitary gland, the neoplasia mechanism and tumor therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：下垂体前葉・濾胞星状細胞・細胞外マトリクス・ギャップ結合・living 観察

1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉は、5種類ホルモン産生細胞と非ホルモン産生細胞である濾胞星状細胞 (Folliculo stellate cell: FS 細胞) から構成され、生殖、代謝、ホメオスタシス維持に必須な内分泌組織である。FS 細胞は、前葉内において唯一機能が特定されていない細胞である。形態学的特徴として、分泌顆粒を持たず同種で集団を成して偽濾胞を形成するほか、ホルモン産生細胞を覆うように突起状の細胞質を伸長させ、FS 細胞同士互いに結合して存在する。

一方、ホルモン産生細胞では、視床下部因子による支配や末梢からのフィードバックによってホルモン産生が制御されることが報告されてきた。さらに、各細胞間による相互作用が非常に重要であり、オートクラインによる自己制御、パラクラインによる周辺細胞からの制御、接着因子を介したジャクスタクラインによる近接細胞からの制御の存在が報告されている。さらに、FS 細胞間では、ギャップ結合を介して黄体形成ホルモン放出ホルモンを受容しその情報伝達を行うことが報告されている。

このような細胞間相互作用に加え、最近では、細胞とその周囲の細胞外環境との相互作用、特に細胞外マトリックス (ECM) と細胞との相互作用 (マトリクライン) が注目されている。ECM は、以前から考えられてきた細胞間の構造物としてだけではなく、細胞の運命と挙動を支配する重要な細胞外環境因子として存在し、情報伝達を行うマトリクラインという新しい概念が提唱されている。しかし、下垂体においてその研究はほとんど成されておらず、特に FS 細胞のマトリクラインに限ってはこれまで皆無であった。

2. 研究の目的

下垂体前葉に存在する非ホルモン産生細胞である FS 細胞は、多様な機能が示唆されており、その一つに、同種細胞間でギャップ結合を介した情報伝達系、FS 細胞ネットワークを有することが想定されている。FS 細胞特異的に GFP を合成するトランスジェニックラットが作成されたことから、このラットの下垂体前葉細胞初代培養における FS 細胞の動態を living 観察し、ECM と親和性を示すマトリクラインにより、FS 細胞が、近隣の FS 細胞に向かって突起状の細胞質を伸長させ、互いに結合する動態を観察した。再結合した FS 細胞間にはギャップ結合も現れ、*in vitro* において、FS 細胞ネットワーク形成を初めて明らかにし報告している。本研究では、これを発展させ、マトリクラインによる FS 細胞ネットワーク形成 (制御) 機構の実証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

① マトリクラインによる FS 細胞間ギャップ結合形成増加に関する研究:

FS 細胞のマーカーである S100b タンパクの遺伝子プロモーター領域下に GFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックラット (S100b-GFP rat) の下垂体前葉細胞を用いて、フローサイトメトリーにより単離した FS 細胞の初代培養を ECM であるラミニンコート上で行い、同細胞の動態を living 観察した。さらに、ラミニンとの親和性により、ギャップ結合構成タンパク質であるコネクシン 43 の遺伝子発現変化をリアルタイム RT-PCR 法にて、タンパク量変化を Western blotting 法にて検討し、さらに FS 細胞間ギャップ結合を透過型電子顕微鏡にて観察した。

② マトリクラインによる FS 細胞分裂を引き起こすシグナル伝達の解析:

ECM コート上で下垂体前葉細胞初代培養を行うと、非コート上に比べ FS 細胞が細胞分裂を引き起こすことを既に報告している。本研究では、そのシグナル伝達を明らかにするために、1) ECM レセプターの FS 細胞での発現解析を RT-PCR 及び、免疫組織化学により行なった。2) 非コート、ラミニンコート上で培養した FS 細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行い、シグナル伝達にかかわる因子の網羅的発現変化を解析した。3) マイクロアレイから得られた候補遺伝子であるカベオリン 3、MAPK、サイクリン D1 のラミニンによる発現変化をリアルタイム RT-PCR、Western blotting、免疫細胞化学を行った。3) カベオリン 3 の siRNA をラミニンコート上の FS 細胞に行い、分裂が抑制されるかどうかを BrdU の取り込み、及び living 観察を行った。

③ FS 細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP9) の発現解析:

一般に、細胞は ECM を認識後、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) により、ECM を消化して、移動することができる。FS 細胞におけるマトリクラインによる移動メカニズムを明らかにするため、MMP 発現解析をリアルタイム RT-PCR、Western blotting にて行ない、さらに、ラミニンコート上で MMP9 の siRNA と MMP9 インヒビターを添加して培養することで FS 細胞の動きを living 観察した。

④ FS 細胞ネットワーク形成誘導因子の解析:

FS 細胞は、*in vitro* において、正確に周囲の FS 細胞に向かって突起状の細胞質を伸

長させ、移動、接着していく動態を示し、さらに、FS細胞間の接着面にはギャップ結合も再構築されることを報告した。この動態は、FS細胞が何らかの誘導因子を分泌し、周囲FS細胞が受容することで、引き起こされることが予想された。そこで、サイトカインであるケモカインとそのレセプターに着目し、FS細胞での発現を網羅的に解析した。さらに、ケモカインタンパクによる走化性アッセイ、浸潤性アッセイを行った。

4. 研究成果

① マトリクラインによる FS 細胞間ギャップ結合形成増加に関する研究：

ホルモン産生細胞の有無に関わらず、FS細胞はラミニンがあることで、突起状の細胞質を伸長、及び互いに接着する動態を顕著に増加させ、コネキシン 43 遺伝子発現量、タンパク量ともに増加した。また、ラミニンがあることで、FS細胞間のギャップ結合を電顕観察による多数観察でき、ラミニンによってFS細胞は、ネットワーク形成を促進することが明らかとなった。

② マトリクラインによる FS 細胞分裂を引き起こすシグナル伝達の解析：

FS細胞は、ECMレセプターであるインテグリンを発現することが明らかとなった。さらに、インテグリン B1 の細胞外ドメインを認識する抗体を用いて、ラミニンとの結合を阻害すると、FS細胞の形態変化や分裂は観察されず、MAPK のリン酸化、サイクリン D1 遺伝子発現増加も抑制された。また、カベオリン 3 の siRNA により、FS細胞の形態変化や分裂は観察されず、MAPK のリン酸化、サイクリン D1 遺伝子発現増加も抑制された。以上から、ラミニン存在下で、インテグリン B1 がそれを受容し、カベオリン 3 の発現を増加させ、それに伴い、MAPK 経路が活性化され、サイクリン D1 遺伝子発現量も増加することで分裂が誘起されるシグナル伝達を明らかにした。

③ FS 細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP9) の発現解析：

FS細胞は、ラミニンを消化する酵素である MMP9 を発現し、その発現量はラミニンによって増加した。また、MMP9 の siRNA 及び、インヒビター添加により、ラミニンによる FS細胞の移動、FS細胞同士の接着が阻害された。

④ FS 細胞ネットワーク形成誘導因子の解析：

FS細胞に CXC モチーフの一つである CXCL12 とそのレセプター CXCR4 の高い発現が見られた。さらに、CXCL12 阻害剤を添

加することで、FS細胞は、ネットワークを形成する動態を見せず、全く動かなくなることが明らかとなった。また、マトリゲルインバージョンチャンバーを用いて CXCL12 に対する走化性、浸潤性アッセイを行ったところ、FS細胞だけが走化性及び浸潤性を示した。以上から、FS細胞は、CXCL12 を発現し、パラクライン的に周囲FS細胞に作用させることで、FS細胞ネットワークを形成する、その制御機構を明らかにした。

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 4 件)

① Horiguchi K, Ilmiawati C, Fujiwara K, Tsukada T, Kikuchi M, Yashiro T: Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in folliculostellate (FS) cells of the rat anterior pituitary gland: the CXCL12/CXCR4 axis induces interconnection of FS cells. *Endocrinology*. 査読有, Vol. 153, 2012, pp. 1717-1724, DOI:10.1210/en.2011-1937

② Ilmiawati C, Horiguchi K, Fujiwara K, Yashiro T: Matrix metalloproteinase-9 expression in folliculostellate cells of rat anterior pituitary gland. *Journal of Endocrinology*. 査読有, Vol. 212, 2012, pp. 363-370, DOI:10.1530/JOE-11-0433

③ Horiguchi K, Fujiwara K, Ilmiawati C, Kikuchi M, Tsukada T and Yashiro T: Caveolin 3-mediated integrin $\beta 1$ signaling is required for the proliferation of folliculo-stellate cells in rat anterior pituitary gland under the influence of extracellular matrix. *Journal of Endocrinology*, 査読有, Vol. 211, 2011, pp. 29-36, DOI:10.1530/JOE-11-0103

④ Horiguchi K, Kouki M, Fujiwara K, Kikuchi M and Yashiro T: The extracellular matrix component laminin promotes gap junction formation in the rat anterior pituitary gland. *Journal of Endocrinology*, 査読有, Vol. 208, 2011, pp. 225-232, DOI:10.1677/JOE-10-0297

[Proceeding] (計 3 件)

① Horiguchi K, Kouki M, Fujiwara K, Yashiro T: Laminin promotes gap junction formation between folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland. *Proceedings of the 88th*

annual meeting of the physiological society of Japan and the 116th annual meeting of the Japanese association of anatomists. 査読無, The physiological sciences 61:224, 2011

② Ilmiawati C, Horiguchi K, Yashiro T : Matrix metalloproteinase-9 is expressed in folliculo-stellate cells of rat anterior pituitary gland. Proceedings of the 88th annual meeting of the physiological society of Japan and the 116th annual meeting of the Japanese association of anatomists. 査読無, The physiological sciences 61:224, 2011

③ Tsukada T, Fujiwara K, Horiguchi K, Mohamad R, Yashiro T : Establishment of 3-dimension primary culture method utilizing anterior pituitary cells from S-100b GFP transgenic rat. Proceedings of the 88th annual meeting of the physiological society of Japan and the 116th annual meeting of the Japanese association of anatomists. 査読無, The physiological sciences 61:224, 2011

[学会発表] (計 8 件)

シンポジウム

① 堀口 幸太郎, 屋代 隆 : 細胞外マトリックスによる濾胞星状細胞の機能調節、さらに濾胞星状細胞による下垂体前葉の機能維持. シンポジウム「下垂体の機能調節に関わる新規分子の解明」第 89 回日本生理学会大会 (松本 3 月 30 日), 2012

② 堀口 幸太郎, 屋代 隆 : 下垂体前葉における細胞外マトリックスの存在意義. シンポジウム「細胞外シグナルと下垂体細胞の発達、機能発現への形態学的アプローチ」第 117 回日本解剖学会学術総会 (甲府 3 月 26 日), 2012

③ Horiguchi K : Folliculo-stellate cell network formation and chemokine CXCL12 in anterior pituitary gland. シンポジウム「佐野メモリアルシンポジウム」第 15 回日本内分泌病理学会学術総会 (東京 11 月 23 日), 2011

④ Horiguchi K : Effect of extra-cellular matrix on anterior pituitary cell function -I-. International Symposium on A New regulatory system of Anterior pituitary cell function and its clinical impact. Faculty of Medicine Andalas University in Indonesia (Padang, Indonesia, June

14th), 2011

⑤ 堀口 幸太郎, 屋代 隆 : マトリクラインによる下垂体前葉内濾胞星状細胞の機能制御. シンポジウム「下垂体研究の新しい多面性」第 84 回 日本内分泌学会学術総会 (神戸 4 月 21 日), 2011

一般発表

① 堀口 幸太郎, Cimi Ilmiawati, 屋代 隆 : 下垂体前葉内濾胞星状細胞におけるケモカイン CXCL12 の発現とその機能. 第 26 回 日本下垂体研究会学術集会 (岡山 8 月 25 日), 2011

② 堀口 幸太郎, 藤原 研, 幸喜 富, 菊地 元史, 屋代 隆 : 下垂体前葉内濾胞星状細胞の増殖を制御するインテグリン B1 を介したシグナル伝達経路の解析 -マトリクラインによる機能制御-. 第 37 回日本神経内分泌学会学術集会 (京都 10 月 22 日), 2010

③ 堀口 幸太郎, 幸喜 富, Ilmiawati, 丹藤 由希子, 菊地 元史, 屋代 隆 : 下垂体前葉におけるマトリクライン -インテグリン B1 を介した細胞分裂に関わる濾胞星状細胞内シグナル伝達経路の解析-. 第 25 回 日本下垂体研究会学術集会 (伊良湖 8 月 20 日), 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 幸太郎 (HORIGUCHI KOTARO)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 10409477

(2) 連携研究者

屋代 隆 (YASHIRO TAKASHI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 80119859

菊地 元史 (KIKUCHI MOTOSHI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 60332988