

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590240

研究課題名(和文)下垂体のユニークな細胞死における分子発現とオルガネラ形態の時系列解析

研究課題名(英文)The chronological observation of molecular expression and morphological changes in a unique pituitary cell death processes.

研究代表者

小川 登紀子(Ogawa, Tokiko)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：30382229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：持続的ストレスを与えたラットでは、下垂体ホルモン分泌細胞の一つであるメラノトロフの一部に、ユニークな細胞死が起こる。この細胞死のメカニズムを明らかにするために、メラノトロフの細胞死の過程で、細胞内小器官の微細形態とこれに関連した分子発現がどのように変化するかを中心に、時系列に基づく解析を行った。

その結果、1)少なくとも3種類の細胞死が存在するが、2)いずれ細胞死の過程にも細胞内タンパクや小器官の分解・リサイクルシステムに異常が見られること、3)3つの細胞死像には細胞膜の破綻という共通点があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Continuous stress induces unique cell death in a population of pituitary cell, melanotroph of a rat model. Melanotroph was first hyper-activated in hormone synthesis and secretion under continuous stress, and after that fell into catastrophic cell death finally. We analyzed the process of melanotroph cell death chronologically, focused on the changes in organelle morphology and molecular expression. Resulted appeared followings, 1) there were at least three types of melanotroph cell death, 2) some disorders of intracellular protein or organelle recycling system were observed during the process toward to those cell death, 3) the common morphological feature of dying melanotrophs was ruptured plasma membrane.

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：持続的ストレス 下垂体 微細形態 細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) 疲労の蓄積や長期間に及ぶストレスは身体の不調をもたらし、時として慢性疲労症候群、突然死などの疾患の原因となることは広く知られている。しかしながら、疲労やストレスが引き起こす、細胞レベルの変化やそのメカニズムに関する知見は乏しかった。

(2) かねてより、ラットモデル(持続的ストレスラット:CSラット)を用いて、持続的なストレス負荷が生体にどのような影響を及ぼすか、とくに細胞レベルでどのような異常が起こるのか解析を行っていた。CSラットの解析により、下垂体が持続的ストレスに鋭敏に反応する器官であることを示した(Ogawa et al, J Neurochem, 2005)。その後の研究により、複数の下垂体ホルモン分泌細胞の機能に異常が生じることを明らかにした(基盤研究(C)課題番号: 20590194, 2008~2010年度)。

(3) 下垂体中間葉を構成するメラノトロフ(MT)のホルモン合成・分泌は、視床下部A14領域のドーパミン神経細胞が直接入力して分泌するドーパミンにより、負の制御を受けている。CSラットでは、制御中枢となるA14ドーパミン神経細胞のドーパミン合成が低下し、MTのホルモン合成と分泌が極度に亢進した結果、一部の細胞が細胞死に陥ることを報告した(Ogawa et al, J Neurochem, 2009)。この細胞死は、小胞体ストレスが発端となり起こると考えられたが、細胞死像はいわゆるアポトーシスではなく、ユニークな形態学的特徴を有する細胞死であった。持続的ストレス下で観察されるMTの細胞死が、どのようなメカニズムによって起こるのかを明らかにするために、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究開始前までに行った分子発現の解析や微細形態観察により、以下のことが既に明らかになっていた。持続的ストレスを受けたラットのMTは、まずホルモンの産生・分泌が極度に活性化される。これは、MTの産生ホルモンの前駆体のmRNAの発現上昇と、ゴルジ体や粗面小胞体の発達として観察される。この状態が継続することにより小胞体ストレスが生じ、これが細胞死の発端となると考えられる。実際に細胞死領域近傍では、小胞体ストレスマーカーでありアポトーシスを誘導する転写因子として知られる、C/EBP-homologous protein(CHOP)/GADD153の核への集積が観察され、この分子が細胞死に関与しているものと考えられる。しかしながら、その最終的な細胞死の像がいわゆるアポトーシスの形態は示さない点で、これまで報告されている細胞死メカニズムと一致しないユニークな細胞死と位置づけられる。

下垂体中間葉は小葉構造をとり、ホルモン分泌細胞はほぼ均一な細胞群のMTにより構成される。MTの細胞死は、この小葉の中心付近で生じ、その周囲に変性細胞が認められた。

かねてより、下垂体中間葉全体のみならず、変性細胞の存在する領域に的を絞って、RT-PCRや*in situ* hybridizationによる経時的な遺伝子発現解析や免疫組織染色を行い、分子動態を解析していたが、必ずしも一貫した変化が認められなかった。この原因の一つとして、CSラットの中間葉には、**細胞死に陥った細胞と細胞死に向かう細胞のみならず、細胞死を回避した細胞**が混在していることがあると考えた。

そこで、本研究課題においては、小胞体ストレスから細胞死あるいは細胞死回避に至る様々な段階にある個々のMTを、より詳細に観察すること(時系列解析)で、細胞死および細胞死回避のプロセスを、まず微細形態の変化から明らかにすることとした。さらに、この観察結果を裏付ける、分子発現やタンパクの局在を確認することにより、これを手がかりとして、MTのユニークな細胞死メカニズムを解明することを目的として実施した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

ラット(SDラット、雄、8週令)を深さ1.5cmの低水位の水を張ったケージで5日間飼育することにより、持続的ストレスを与えた(Tanaka et al, Neurosci Lett 2003)。マウスモデルは、C57BL6およびCHOPノックアウトマウス(雄、体重30~35g)を用い、ラットモデルに準じてより低水位の水を入れたケージで3ないし4日間飼育した。いずれも、ケージ交換を毎日行い、できる限り苦痛を軽減する配慮をしつつ実験を行った。

(2) ラットモデルMTの細胞死に至る時系列的解析

微細形態学的解析

ラット中間葉を透過型電子顕微鏡(電顕)により観察し、まず細胞死に陥ったMTを同定した。その細胞内小器官の形態変化を基に、前段階にある細胞を同定した。これを繰り返すことで、MT細胞死に至る変化を確認した。

分子発現に関する解析

細胞死にいたる過程で観察される細胞内小器官や微細形態学的異常から推察される分子を対象に免疫組織染色を行い、その染色性や局在を観察した。

免疫電顕による分子発現と微細形態との関連の解析

免疫組織染色により特徴的な染色像が観察された分子について、免疫反応を行った試料を電顕観察し、微細形態の確認を行った。

(3) マウスCSモデルを用いたCHOPの機能解析

野生型マウス(C57BL6)の下垂体中間葉において、CS負荷がラット同様の変化をもたらすかを確認したうえで、CHOPノックアウトマウスとの比較を行った。

マウスMTのドーパミン反応性

マウスにドーパミン D₂ 受容体アンタゴニストを投与し、MT の活性化を確認した。ホルモン前駆体の mRNA 発現上昇とゴルジ体マーカーを用いた免疫組織染色によりゴルジ体の大型化を確認することで、活性化の指標とした。

CS によるマウス MT の変化

CS を負荷したモデルを作成し、上記同様にホルモン前駆体の mRNA 発現上昇とゴルジ体の大型化を指標として確認し、その微細形態の変化をラットと比較した。

野生型マウスと CHOP ノックアウトマウスとの比較

ドーパミン D₂ 受容体アンタゴニスト投与マウスと CS 負荷マウスの双方を用いて、野生型および CHOP ノックアウトマウスそれぞれの MT の形態変化を中心に、比較検討した。

(4) ラット MT の初代培養系を用いた解析

成体の SD ラット下垂体より分離した MT を用いて、初代培養細胞を作成した。培養液中にドーパミン D₂ 受容体アンタゴニストを添加して培養することで、ホルモン合成が活性化してゴルジ体が大型化した MT (活性化 MT) を作成した。

活性化 MT を用いて、グルコース濃度を低下させる、各種インヒビターの使用、の二つの方法により、MT 細胞変性・細胞死の再現を行った。評価方法としては、MT の透過型電子顕微鏡による形態観察と PI 染色による死細胞検出を行った。

4. 研究成果

(1) CS ラットモデルの解析

微細形態による時系列的解析

細胞脱落領域に観察された MT の多くは、細胞膜に破綻が生じており、細胞死の状態と判断できるものが複数認められた。これらの中には、形態学的に相互に移行すると判断できない像が存在し、MT の細胞死形態は単一ではなく、少なくとも以下の 3 タイプの細胞死像が識別された (図 1)。

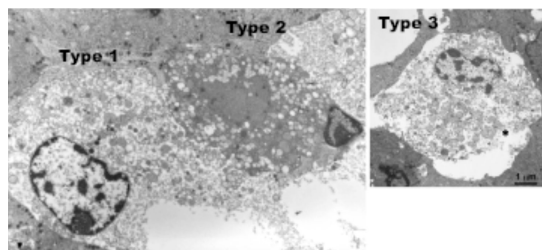


図 1. CS ラット下垂体中間葉における 3 タイプの細胞死像。

Type 1

比較的大型で、明調な細胞質に空胞状の粗面小胞体を有し、細胞質が大きく崩壊する部位で細胞膜の破綻が認められた。

Type 2

比較的小型で、核・細胞質ともに暗調、細胞

質内に多数の空胞を貯留していた。これらの空胞内には様々な内容物が確認され、これに連続した細胞膜の破綻が確かめられた。

Type 3

Type 1 に類似するが比較的小型で、明調の細胞質には多くの空胞とともに大型のミトコンドリアが認められた。細胞膜は全体に破綻が認められた。

各細胞死の周囲領域に観察された変性細胞の微細形態の特徴は以下の通りであった。

Type 1 細胞周囲の MT の特徴

小胞体は断片化と内腔の拡張が認められ、ミトコンドリアでは空胞化するものが認められた。

Type 2 細胞周囲の MT の特徴

細胞質は暗調で、多数の隔離膜、リソソームが観察された。ミトコンドリアの空胞化やゴルジ体内腔の拡張がある反面で、小胞体内腔には拡張が認められなかった。細胞内小器官の判別が困難な MT では、多数の小胞体の貯留が認められた。

Type 3 細胞周囲の MT の特徴

細胞質は暗調化が顕著で、集合した大型のミトコンドリアと、多数のリソソームが観察された。これらのミトコンドリアはクリステの構造が保たれ、正常に機能しているものと考えられた。このほか、細胞質の基質が明調で、オートファゴソームやリソソームを多数貯留する細胞が存在したが、このような細胞でも、大型のミトコンドリアが観察された。

変性細胞の微細形態では、小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官の形態異常が認められた。また、多くの MT ではタンパク凝集体、オートファジー隔離膜、オートファゴソームあるいはリソソームが、通常よりも高頻度に観察された。これらのことから、活性化した MT では、細胞内のタンパクや小器官の分解・リサイクルが活発に行われているものと考えられた。一方、変性細胞においては、これらの分解・リサイクル機構の異常が疑われた。

分子発現に関する時系列的解析

これまで、細胞死に関連して発現する特徴的な分子として、CHOP を同定していた。このほか、タンパク分解・オートファジー関連の分子 (ユビキチンとその結合分子である p62 および VCP/p97、プロテアソームマーカー、オートファジーマーカー、リソソームマーカーなど) に、染色性や局在の変化が認められた。この結果は、変性細胞における微細構造の異常を裏付けるものであったが、それぞれの変化がどのような微細形態に関連したものであるかは、より詳細な解析が必要である。

免疫電顕による分子発現と微細形態変化の解析

免疫組織染色により特徴的な染色像を示した MT が、どのような微細形態学的特徴を有するかは、今後の解析課題として残った。

本研究ではこれらのうち、核に CHOP の局在が認められた MT と、リソソームマーカー強陽性を示す MT について同定を行った。

CHOP 陽性核を有する MT は、その特徴として、粗面小胞体の内腔拡張はなく、通常のサイズのミトコンドリアを有する MT と、大型のミトコンドリアを有する MT の双方が含まれていた。また、細胞膜の破綻する最終的な細胞死像とは一致しなかった。この結果より、Type3 細胞死に至る過程で、CHOP が一過性に発現し何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

細胞脱落部周辺で、リソソームマーカー強陽性を示す MT は、Type1 あるいは Type3 に類似した特徴を有する MT に類似し、これらの細胞死にリソソームの蓄積が関与する可能性が示唆された。

(2) マウスモデルを用いた解析

ドーパミン D₂ 受容体アンタゴニスト投与による MT の変化

マウスの MT もラット同様にドーパミンによる負の制御を受けることが知られている。野生型マウスにドーパミン D₂ 受容体アンタゴニストを投与することで MT のホルモン前駆体 mRNA の発現が上昇し、ゴルジ体の発達が観察された。また、CHOP ノックアウトマウスの MT においても、同様の変化が観察された。

一方で、ラット MT とは異なり、野生型マウスでは、ドーパミン D₂ 受容体アンタゴニスト投与により、CHOP 陽性核を有する MT が観察された。

CS 負荷によるマウス MT の変化

CS 負荷した野生型および CHOP ノックアウトの双方で、ホルモン前駆体 mRNA の発現が上昇し、ゴルジ体の発達が観察された。

微細形態学的解析では、ラットの MT と異なり、ストレス負荷しない通常のマウス MT でも、層状に発達した粗面小胞体が観察された。CS 負荷時には、層状のままの粗面小胞体の内腔が拡張した変性像が観察され (図 2) 細胞死に移行した (Type1 細胞死)。CHOP ノックアウトマウスにおいても、同様の細胞死の経過が確認された。

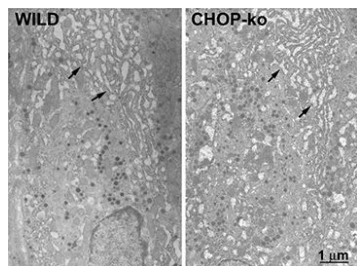


図 2. CS を負荷した野生型 (WILD) および CHOP ノックアウトマウス (CHOP-ko) の下垂体中間葉に観察された MT。内腔の拡張した粗面小胞体 (矢印) が認められ、細胞死に移行した。

これらの結果から、マウスでも CS により MT の細胞死が起こるが、少なくとも Type1 様細胞死に CHOP は関与していないものと考えられた。CS 負荷により、MT に CHOP の核集積が生じることから、この系を用いた細胞死と CHOP の関わり、あるいは CHOP の機能解析を行う対象となりうると思われるが、その実験系の確立にはさらに工夫が必要であると考ええる。

(3) 培養 MT を用いた細胞変性・細胞死の再現

成体の SD ラットより分離した MT の初代培養系を用い、活性化 MT の維持できる培養条件を決定した。その上で、以下に示す二つの方法により細胞死の再現を試みた。

グルコース濃度低下による細胞死再現

CS ラット MT の細胞死は、血管から最も遠い部位で生じること、ミトコンドリアの形態異常が観察されることから、栄養状態の低下した MT が細胞変性を起こす可能性がある。そこで、活性化状態にある MT の培養液中のグルコース濃度を下げること、細胞変性が引き起こせるのではないかと考えた。あらかじめ活性化状態にした MT を、通常の培養液よりも低い 3 段階のグルコース濃度に設定した培養液に交換し、PI 陽性細胞の発現頻度と、電顕観察により確認した。この結果、PI 陽性細胞数とグルコース濃度に相関が認められなかった。微細形態観察においては、活性化 MT において、細胞質の色調変化やタンパク凝集体の形成、リソソームの増加 (図 3 左図、矢頭) が観察された。低グルコースの培養条件では、大型化したミトコンドリアの集合する像が観察された (図 3 右図、矢印)。このことから、少なくとも細胞環境におけるグルコース濃度の低下のみでは、CS ラット MT の細胞死を再現することはできないが、大型化したミトコンドリアの集合は、MT の栄養状態の変化と関連があるものと推察された。

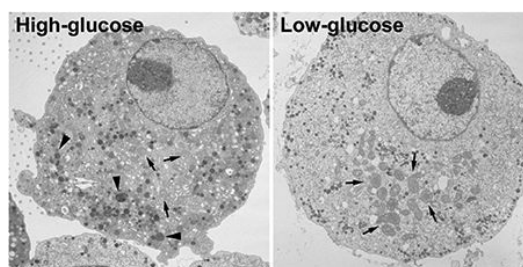


図 3. 活性化した初代培養 MT を通常 (左) と低グルコース濃度 (右) の培養液で維持した際の電子顕微鏡像。矢頭はリソソーム、矢印はミトコンドリアを示す。

タンパク分解・オートファジー阻害剤による細胞死再現

CS ラットの MT 細胞死の過程には、タンパクや細胞内小器官の分解や再生過程に様々な異常が起こっていることが伺われた。そこで、これらの過程に関連する分子の機能を阻

害する数種類の薬剤を、活性化させた MT に添加した後、PI 染色を行い細胞死の有無を確認した。この結果、ユビキチン結合分子 (VCP/p97) の阻害剤とオートファジーの阻害剤の双方で、PI 陽性細胞死が高率に生じることが明らかになった。また電顕観察により、これらの阻害剤を添加した MT は CS ラットの MT 細胞死像の一つと類似し、細胞膜の破綻も確認された。以上の結果より、ホルモン合成の活性化した MT では、**タンパクや細胞内小器官の分解・リサイクル過程の異常が、細胞膜の破綻を伴う細胞死の原因となりうる**ことが明らかになった。

(4) 総括

本研究に用いた、時系列的な微細形態解析の手法により、細胞死の形態学的な経過を明らかにすることができた。この結果、CS ラット MT に観察された 3 つの細胞死は、次のように特徴づけられた。

Type1: 小胞体の内腔拡張により生じる細胞死。

Type2: オートファジーの異常により生じる細胞死。

Type3: ミトコンドリアの大型化を伴う細胞死。

これらの細胞死はストレスの持続により、ストレス回避反応の異なる段階で異常を生じ、これが形態学的に異なる細胞死を引き起こしていると考えられた(図4)。一方でいずれの細胞死も、**タンパクや細胞内小器官の分解・リサイクルに関わる異常**を生じており、どの細胞死像にも**細胞膜の破綻**という共通点が見られた。

持続的ストレスにより、なぜタンパクや細胞内小器官の分解・リサイクル機構の働きが妨げられるのかを明らかにすることが今後の課題となる。

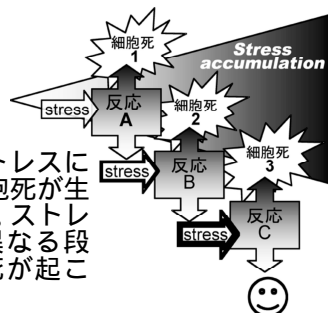


図 4. 持続的ストレスにより、多様な細胞死が生じるメカニズム。ストレス回避反応の異なる段階から、細胞死が起こる。

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 3 件)

Ogawa T., Konishi H., Kiyama H. (2013) Dysfunction in the hypothalamo-hypophyseal system under chronic stress and fatigue. *Advance in Neuroimmune Biology* 4: 219-228, 査読あり
DOI: 10.3233/NIB-130070

Tokizane K., Konishi H., Yasui M., Ogawa T., Sasaki K., Minamino N., Kiyama H. (2013) Continuous stress promotes expression of VGF in melanotroph via suppression of dopamine. *Mol Cell Endocrinol* 372 (1-2): 49-56, 査読あり
DOI: 10.1016/j.mce.2013.03.012. Epub 2013 Mar 26.

Ogawa T., Sei H., Konishi H. Shishioh-Ikejima N., Kiyama H. (2012) The absence of somatotroph proliferation during continuous stress is a result of the lack of Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. *J Neuroendocrinol* 24: 1335-1345, 査読あり
DOI: 10.1111/j.1365-2826.2012.02338.x.

[学会発表](計 6 件)

小川登紀子、渡辺恭良、木山博資、持続的ストレス負荷ラットに起こる下垂体メラノトロフ細胞死の多様性。第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014.3.29 栃木

小川登紀子 他、疲労モデルラット縫線核におけるセロトニン合成酵素の発現変化。第 9 回日本疲労学会総会・学術集会、2013. 6. 8 秋田

小川登紀子 他、慢性的小胞体ストレスによる下垂体メラノトロフの運命と CHOP (C/EBP homologous protein) 発現。第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013. 3. 28 香川

小川登紀子、木山博資、持続的ストレス負荷による下垂体細胞の形態変化と機能変調。第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012. 3. 26 山梨

小川登紀子、持続的ストレスラットにおける下垂体ホメオスタシスの破綻。第 64 回日本自律神経学会総会、2011.10. 28 秋田

小川登紀子 他、ラット過労モデルの自発行動に対する抑肝散の効果。第 7 回日本疲労学会総会・学術集会、2011.5.22 愛知

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/physiol/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 登紀子 (OGAWA, Tokiko)

大阪市立大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号: 30382229