

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790233

研究課題名(和文)下垂体前葉細胞を用いた3次元培養法の開発とその応用

研究課題名(英文) Establishment of 3 dimensional cell culture system using rat anterior pituitary cells and its applications

研究代表者

塚田 岳大 (Tsukada, Takehiro)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50596210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、(1)ラット下垂体前葉細胞を用いた3次元培養法の確立と(2)3次元培養法を用いた下垂体前葉細胞の新規の機能探索、である。申請者は、ハンギングドロップ3次元培養法を用いてラット下垂体前葉細胞を培養し、生体内の下垂体前葉構造を再現したin vitro実験モデルを確立することに成功した。さらに、この実験系を用いて、ホルモンを産生しない濾胞星状細胞が下垂体前葉内の細胞外マトリックス(コラーゲンやラミニン)の形成に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Aims of this project are (1) to establish 3 dimensional (3D) cell culture system using rat anterior pituitary cells and (2) to explore novel functions of anterior pituitary cells using the system. Applicant has applied a hanging drop 3D cell culture method to conventional primary cell culture of rat anterior pituitary cells and has developed a in vitro experimental model that is faithfully reproduced cell and extracellular matrix organization of in vivo anterior pituitary. Utilizing the culture system, applicant further investigated the function of folliculostellate cells that do not secrete classical anterior pituitary hormones and discovered that folliculostellate cells are essential in extracellular matrix formation, such as collagens and laminin, in the anterior pituitary gland.

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 3次元培養 組織構築 細胞外マトリックス 濾胞星状細胞

1. 研究開始当初の背景

3次元培養は、単にZ軸上に細胞層が重なっただけの培養ではない。細胞同士が重なりあうことで、i)細胞間の刺激の方向性が複雑になる、ii)2次元培養特有のプレートと細胞との接触面がなくなる、iii)細胞の足場や成長因子の貯蔵場となる細胞外マトリックスの蓄積が2次元培養より多くなるため、よりin vivoに近い状態で細胞を培養することができる。いっぽう、2次元培養と同様に、培養液や細胞集団などの培養条件を容易に変えることができるため、in vivoの実験で困難とされる遺伝子導入やRNA干渉などの分子生物学的アプローチや薬理スクリーニングなどの実験も可能となる。

2次元培養と3次元培養の違いを示したもっとも代表的な例は、胚性幹細胞(ES細胞)を使った分化誘導法である。一般的にES細胞の分化誘導は、3次元培養により細胞塊(胚様体)を形成させることが必要であり、通常の2次元培養からの分化誘導は極めて難しい。これは、ES細胞の分化に、胚を模倣した立体的な組織構築が重要であることを意味している。このような2次元培養と3次元培養の違いは、ES細胞に限らず、血管平滑筋細胞や線維芽細胞など、多くの細胞でもみられ、時に100以上もの遺伝子発現が異なる場合もある。

申請者は、米国アリゾナ大学でES細胞の開発を手がけていた経験をいかし、3次元培養法を下垂体前葉細胞の培養に応用し、下垂体前葉の立体的な組織構築をde novoで再現することを試みた。

2. 研究の目的

主要な内分泌器官である下垂体前葉は、5種類のホルモン産生細胞、ホルモンを産生しない濾胞星状(FS)細胞など、多種類の細胞で構成されている。これらの細胞は、前葉内でバラバラに存在するのではなく、細胞外マトリックスに囲まれた小葉構造の中にそれぞれの細胞が規則性をもって存在している。私達の研究グループは、このような特徴的な組織構造の保持に、液性因子、細胞接着、細胞外マトリックスなどの局所的な刺激が重要であると考えて研究を進めている。しかし、これまで下垂体研究において、この複雑な下垂体前葉の組織構築を再現した実験モデルはなかった。

本研究は、(1)ラット下垂体前葉細胞を用いた3次元培養法の確立を第一の目標としている。この3次元培養法が確立されれば、これまで主流であった2次元培養法ではわからないさまざまな生命現象を捉えることができるかと期待される。本研究の第2の目的は、(2)3次元培養法を用いた下垂体前葉細胞の新規の機能探索である。

3. 研究の方法

(1)下垂体前葉細胞を用いた3次元培養法の確立

本研究では、下垂体前葉細胞の3次元培養にES細胞の分化誘導に用いられるハンギングドロップ培養法を用いた(図1)。この手法は、細胞が入った培養液を一滴ずつ培養ディッシュの上蓋に撒き、逆さ吊りの状態で細胞を培養する方法である。このため、培養液中の細胞は重力で皿の中央に集まり立体的な細胞塊を形成する。このハンギングドロップ法を用いる大きな利点は、(i)非常に簡便であること、(ii)特殊な培養装置が必要ないため安価であること、(iii)皿の中の細胞数を変え、さまざまなサイズの細胞塊を作ることができデータの再現性に優れていること、などが挙げられる。

本研究では、まず、1000~8000個のラット下垂体前葉細胞を培養し、i)目で見て扱いやすい、ii)染色時に細胞塊の内側まで染まる、iii)スライドガラスへの接着性が高い(接着面が大きい)、iv)共焦点レーザー顕微鏡を用いた3次元画像解析に必要な厚み(20-40µm)がある、などの条件を満たす細胞塊を決めた。そして、その細胞塊にあった固定法(固定液・固定時間)や染色条件(免疫染色・in situ hybridization法)を決定した。

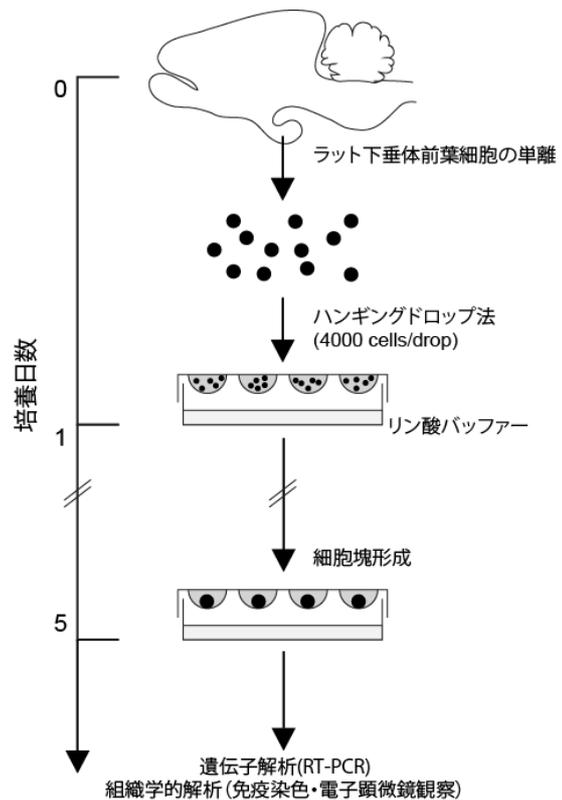


図1: ラット下垂体前葉細胞を用いたハンギングドロップ3次元培養法の手順

上記の条件が決定した後、細胞塊の組織構築が生体内の下垂体前葉と類似しているか組織学的に調べた。具体的には、i) ホルモン

産生細胞の親和性、ii)FS細胞の3次元メッシュワーク、gap junction、偽濾胞形成、iii)細胞外マトリックス産生が in vitro の条件で回復されるか調べた。

(2) 3次元培養法を用いた下垂体前葉細胞の新規の機能探索

本研究で、このユニークな3次元培養法と併せて用いる有効なツールが、前埼玉大学の井上金治教授らが作製した遺伝子組換えラット(S-100 -GFP rat)である。このラットは、下垂体前葉のホルモン非産生細胞であるFS細胞特異的にGFPタンパクを発現する。そのため、固定、染色せずに生きたFS細胞を多様な下垂体前葉細胞の中から同定、可視化することができただけでなく、蛍光標識細胞分取法を用いてFS細胞を他の細胞群から分離することができる。本研究は、まず下垂体前葉細胞からFS細胞を分取して、FS細胞を除いた下垂体前葉細胞で3次元培養を行った。そして、FS細胞の細胞塊形成における新規作用を調べた。

4. 研究成果

(1) 下垂体前葉細胞を用いた3次元培養法の確立

1000、2000、4000、8000個の下垂体前葉細胞を25 μlの培養液で5日間培養し、細胞塊形成を観察したところ、培養3日目ですくの中央にゆるい細胞塊を形成した。そして、培養5日目には、細胞同士がまとまり、コンパクトな細胞塊を形成した(図2)。細胞数を増やしていくと、細胞塊のサイズは大きくなったが、細胞塊形成はどれも同じであった。以後の実験では、4000個の細胞を用いて3次元培養を行った。

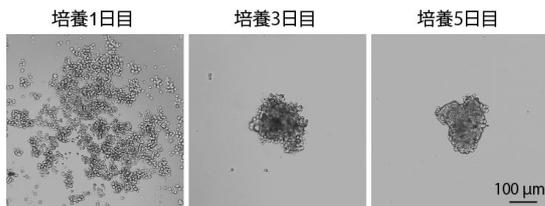


図2：下垂体前葉細胞の細胞塊形成。

培養条件が決定したため、次に、これらの細胞塊の組織構成を調べた。下垂体前葉に存在する5種類のホルモン産生細胞は細胞間で親和性(細胞のくっつきやすさ)がある。例えばGH細胞とACTH細胞、GH細胞とTSH細胞、LH細胞とPRL細胞の親和性が高く、LH細胞とACTH細胞は親和性が低い。二重免疫染色法を用いてこれらの細胞を染色したところ、3次元培養で、ホルモン産生細胞間に見られる親和性が回復していることがわかった(図3)。また、FS細胞は、同種間で結合して、偽濾胞形成やgap junctionを介した細胞間ネットワークを形成することが知られているが、これらのFS細胞特有の

構造も3次元培養で再構築された(図4)。生体内で見られるようなFS細胞の立体的なネットワーク形成を再現したのは本研究が初めてである。また、3次元培養中では、細胞だけでなく、生体内で見られる多種多様な細胞外マトリックスも細胞外に沈着していることが確認された。このように、3次元培養法を用いると生体で見られる細胞や細胞外マトリックスの構造が in vitro で再現することができたことから、下垂体研究における有効なツールであることが示された。これらのデータは、2013年にActa Histochemica et Cytochemicaに掲載された。

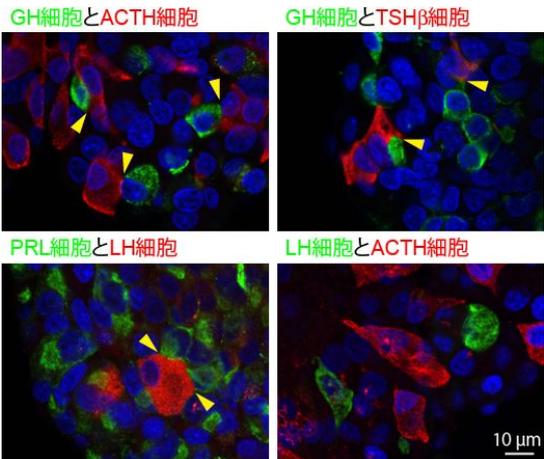


図3：ホルモン産生細胞間の親和性の回復。

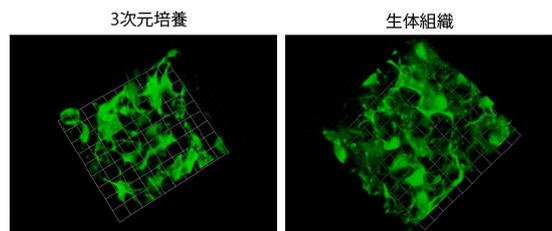


図4：FS細胞メッシュワーク構造の比較。

(2) 3次元培養法を用いた下垂体前葉細胞の新規の機能探索

下垂体前葉細胞からFS細胞を取り除いて細胞培養すると、FS細胞を含んだ細胞塊と比べて大型でいびつな形の細胞塊を形成した(図5)。このことからFS細胞が下垂体前葉細胞同士の結合を強めることが強く示唆された。

いっぽう、下垂体の組織形成にはFS細胞だけでなく、細胞外マトリックスも重要な役割を果たしている。FS細胞を除いた細胞塊で細胞外マトリックスはどのようになっているのか?それを調べるため、免疫染色法を用いて、細胞塊中の細胞外マトリックス(コラーゲンとラミニン)を調べた。すると、大変興味深いことに、FS細胞を除いた細胞塊にコラーゲンやラミニンの細胞塊沈着はみられなかった(図6)。コラーゲンにおいては、下垂体前葉では血管周囲に存在する周皮

細胞で合成されることがわかっている。この細胞の遺伝子マーカーを調べたところ、FS細胞を除いた細胞塊で有意に減少していた。つまり、FS細胞が血管周囲の周皮細胞とinteractionしていることが明らかとなった。

また、ラミニンにおいては、ホルモンを産生するLH細胞の細胞質内にラミニンが蓄積されていれ、FS細胞から放出される液性因子によりラミニンが細胞外へ放出されることがわかった。これまで、FS細胞は基底膜を含む細胞外マトリックスに仮足を伸ばし、足場として利用していることが知られていたが、FS細胞が下垂体前葉内の細胞外マトリックスの合成や放出に関与しているという報告は本研究が初めてである。現在、これらのデータをまとめて論文を作成している。

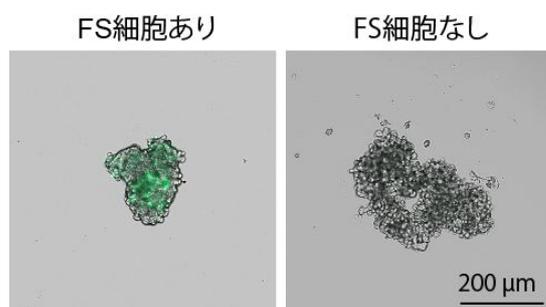


図5：FS細胞の細胞塊形成への作用。

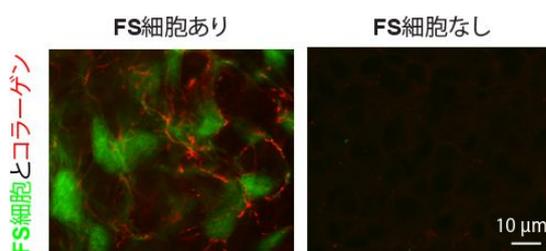


図6：FS細胞のコラーゲン沈着への作用。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9件)

Tsukada T, Kouki T, Fujiwara K, Ramadhani D, Horiguchi K, Kikuchi M, and Yashiro T. Reassembly of anterior pituitary organization by hanging drop three-dimensional cell culture. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol. 46, 2013, 121-127. (論文賞受賞)

DOI: 10.1267/ahc.13015

Syaidah R, Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Kikuchi M, and Yashiro T. Laminin and collagen modulate expression of the small leucine-rich proteoglycan fibromodulin in rat anterior pituitary gland. *Cell Tiss Res*, 査読有, Vol. 354, 2013, 633-638.

DOI: 10.1007/s00441-013-1698-3

Jindatip D, Fujiwara K, Horiguchi K,

Tsukada T, Kouki T, and Yashiro T. Changes in fine structure of pericytes and novel desmin-immunopositive perivascular cells during postnatal development in rat anterior pituitary gland. *Anat Sci Int*, 査読有, Vol. 88, 2013, 196-203.

DOI: 10.1007/s12565-013-0180-3

Horiguchi K, Syaidah R, Fujiwara K, Tsukada T, Ramadhani D, Jindatip D, Kikuchi M and Yashiro T. Expression of the cell-surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 in developing rat anterior pituitary gland. *Cell Tiss Res*, 査読有, Vol. 353, 2013, 473-481.

DOI: 10.1007/s00441-013-1641-7

Horiguchi K, Syaidah R, Fujiwara K, Tsukada T, Ramadhani D, Jindatip D, Kikuchi M and Yashiro T. Expression of small leucine-rich proteoglycans in rat anterior pituitary gland. *Cell Tiss Res*, 査読有, Vol. 315, 2012, 207-212.

DOI: 10.1007/s00441-012-1513-6

Ramadhani D, Tsukada T, Fujiwara K, Horiguchi K, Kikuchi M, and Yashiro T. Laminin isoforms and laminin-producing cells in rat anterior pituitary. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol. 45, 2012, 309-315.

DOI: 10.1267/ahc.12028

Horiguchi K, Kouki T, Fujiwara K, Tsukada T, Ly F, Kikuchi M, and Yashiro T. Expression of the proteoglycan syndecan-4 and the mechanism by which it mediates stress fiber formation in folliculostellate cells in rat anterior pituitary gland. *J Endocrinol*, 査読有, Vol. 214, 2012, 199-206.

DOI: 10.1530/JOE-12-0156

Horiguchi K, Ilmiawati C, Fujiwara K, Tsukada T, Kikuchi M, and 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, 1717-1724.

DOI: 10.1210/en.2011-1937

Horiguchi K, Fujiwara K, Ilmiawati C, Kikuchi M, Tsukada T, Kouki T, and Yashiro T. Caveolin 3-mediated integrin beta1 signaling is required for the proliferation of folliculostellate cells in rat anterior pituitary gland under the influence of extracellular matrix. *J*

Endocrinol, 査読有, Vol. 210, 2011, 29-36.

DOI: 10.1530/JOE-11-0103

〔学会発表〕(計 23 件)

塚田岳大、藤原研、Ramadhani Dini、矢田部恵、屋代隆。ラット下垂体前葉における TGFbeta2 を介した濾胞星状細胞と周皮細胞の新規細胞間相互作用。第 119 回日本解剖学会、栃木、2014 年 3 月 27-29 日

藤原研、塚田岳大、Tofrizal bin Alimuddin、Rita Maliza、Khongorzul Batchuluun、菊地元史、屋代隆。ラット下垂体前葉におけるエンケファリン前駆体遺伝子発現細胞の同定。第 119 回日本解剖学会、栃木、2014 年 3 月 27-29 日

塚田岳大、堀口幸太郎、菊地元史、屋代隆。ラット下垂体前葉における TGFb2 の発現とその作用。第 38 回日本比較内分泌学会、宮崎、2013 年 10 月 24-26 日

Ramadhani D, Tsukada T, Azuma M, Tofrizal A, Maliza R, Batchuluun K, Syaidah R, and Yashiro T. Spatio-temporal expression of laminin isoforms in rat anterior pituitary gland during the postnatal development. 第 17 回日本内分泌病理学会、神奈川、2013 年 10 月 4-5 日

藤原研、Rita Maliza、Khongorzul Batchuluun、Dini Ramadhani、矢田部恵、塚田岳大、屋代隆。胎生ラット下垂体におけるミッドカインの発現。第 28 回日本下垂体研究会、岩手、2013 年 8 月 7-9 日
Tsukada T, Fujiwara K, Ramadhani D, Kouki T, Kikuchi M, and Yashiro T. Folliculostellate cells interact with microvessel mural cell 'pericyte' to maintain collagen arrangement in rat anterior pituitary. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo. San Francisco, CA, USA, 2013 年 6 月 15-18 日

Ramadhani D, Tsukada T, and Yashiro T. Laminin isoform expression during the anterior pituitary development of rat. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo. San Francisco, CA, USA, 2013 年 6 月 15-18 日

塚田岳大、屋代隆。下垂体前葉の組織構築における濾胞星状細胞の役割□3 次元培養法を用いた解析。第 118 回日本解剖学会(シンポジウム:内分泌細胞の発生・分化・機能調節)香川、2013 年 3 月 28-30 日

Ramadhani Dini, 塚田岳大、幸喜富、菊地元史、屋代隆。Alteration of laminin isoform expression during the anterior pituitary development of rats. 第 118 回日本解剖学会、香川、2013 年 3 月 28-30 日

Syaidah Rahimi、堀口幸太郎、Ramadhani Dini、塚田岳大、屋代隆。Laminin and

collagen modulate expression of fibromodulin in folliculo-stellate cells of anterior pituitary gland. 第118回日本解剖学会、香川、2013年3月28-30日

塚田岳大、Ramadhani Dini、藤原研、幸喜富、堀口幸太郎、屋代隆。ラット下垂体前葉における濾胞星状細胞とLH細胞の細胞間相互作用:基底膜構築への関与。第37回日本比較内分泌学会、福井、2012年11月29-12月1日

Ramadhani Dini, 塚田岳大、藤原研、屋代隆。Changes in laminin isoforms during the development of rat anterior pituitary. 第16回日本内分泌病理学会、宮城、2012年10月11-12日

Pappas CT, Tsukada T, Moroz N, Antin PB, Kostyukova AS, and Gregorio CC. Leiomodin2 is an Antagonist of Tropomodulin1 at the Pointed End of the Thin Filaments in Cardiac Muscle. 41st European Muscle Conference. Rhodes, Greece, 2012年9月1-5日

塚田岳大、Ramadhani Dini、幸喜富、藤原研、屋代隆。下垂体前葉LH細胞のラミニン分泌に対する濾胞星状細胞の関与。第27回日本下垂体研究会、山形、2012年8月9-11日

藤原研、Depicha Jindatip、堀口幸太郎、塚田岳大、屋代隆。マイクロアレイを用いたラット濾胞星状細胞における遺伝子発現解析—新規傍分泌因子ミッドカインの同定—。第27回日本下垂体研究会、山形、2012年8月9-11日

Ramadhani Dini, 塚田岳大、菊地元史、屋代隆。Expression of laminin isoforms in rat anterior pituitary gland during the prenatal and postnatal development. 第27回日本下垂体研究会、山形、2012年8月9-11日

塚田岳大。下垂体研究における三次元培養法の導入。第14回下垂体形態学ミーティング、山梨、2012年3月26日

Ramadhani Dini, 塚田岳大、屋代隆。Expression of laminin isoforms during anterior pituitary development in the rat. 第117回日本解剖学会、山梨、2012年3月26-28日

塚田岳大、Ramadhani Dini, Jindatip Depicha, 幸喜富、屋代隆。周皮細胞のコラーゲン産生における下垂体濾胞星状細胞の役割。第117回日本解剖学会、山梨、2012年3月26-28日

塚田岳大、Ramadhani Dini、幸喜富、藤原研、屋代隆。下垂体前葉のコラーゲン合成における濾胞星状細胞の役割。第36回日本比較内分泌学会、東京、2011年11月23-25日

② 塚田岳大、Ramadhani Dini、幸喜富、Reza Mohamad、屋代隆。下垂体前葉細胞の3次元培養法を用いた細胞外マトリックス構築メカニズムの解析。第26回日本下垂体研

研究会、岡山、2011年8月25-27日

- ② Tsukada T and Yashiro T. Workshop On Immunohistochemical Method as An Important Basic Diagnostic Tool in Medical Science. Padang, Indonesia, 2011年6月15日
- ③ Tsukada T. Introduction of the 3 dimensional cell culture system into pituitary research. International Symposium on A New Regulatory System of Anterior Pituitary Cell Function and Its Clinical Impact. Padang, Indonesia, 2011年6月14日

〔図書〕(計 1 件)

Tsukada T, Wong MK, Ogoshi M, and Yuge S (2013). Endocrine control of osmoregulation. In F. Trischitta, Y. Takei, and P. Sebert (Eds.), *Endocrine Physiology* (pp. 178-224). CRC Press, Boca Raton, FL.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

塚田 岳大 (TSUKADA, Takehiro)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：50596210