

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592127

研究課題名(和文) 骨髄間質細胞移植による下垂体機能再生の研究

研究課題名(英文) Pituitary regeneration by bone marrow stromal cell transplantation

研究代表者

谷口 理章 (TANIGUCHI, MASAOKI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60346195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではtetradecanoylphorbol acetate(以下TPA)をラット下垂体に塗布することで炎症を励起し、下垂体部分損傷モデルを作成した。本モデルにおける下垂体機能は主に成長ホルモン(GH)/インスリン様成長因子(IGF-1)系が障害された。組織学的検討では損傷後にKi-67陽性細胞の増加を中間葉から前葉にかけて認めた。また幹細胞マーカーであるSox2陽性細胞の増加を認め、これらはすべてS-100も陽性であったことから、濾胞星細胞が幹細胞様形質を獲得し、下垂体機能の維持・回復に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The partial pituitary injury model in the rat was established with the topical application of the tetradecanoylphorbol acetate (TPA). The pituitary function in this model was mainly impaired at the GH/IGF-1 axis. Histological investigation demonstrated increased number of Ki-67 positive cells in the intermediate and anterior lobe of the pituitary gland. The number of the Sox2 positive cells were also increased, which demonstrated co-expression of S-100. This provided some evidence that the follicle satellite cells were responsible for maintenance and recovery of pituitary function.

研究分野：医師薬学

キーワード：実験脳外科学 下垂体機能再生 動物モデル 濾胞星細胞

### 1. 研究開始当初の背景

脳下垂体はホルモン分泌の中核として個体の生理的活動に重要な役割を果たしているが、その機能は炎症や腫瘍などの様々な病態によりしばしば障害される。実臨床においても脳下垂体機能が障害された患者においては回復の程度が不十分である例も多く、長期に渡る欠損ホルモンの補充を要し、患者のQOL低下の一因となるばかりでなく、生命の危険性をも生じうる。下垂体機能の回復過程については不明な点が多く、これを十分に誘導することが可能となれば、下垂体機能の廃絶した患者にとっては長期の罹患状態から離脱できることとなる。

生態組織の再生機構を解析する上で動物モデルの利用は重要な役割を担うが、下垂体機能の回復を動物モデルで検討した研究はいまだ存在しない。また下垂体についても近年幹細胞の存在が示唆されているが、機能回復に際して既存の細胞の増殖あるいは他系統のホルモン分泌細胞からの分化転換が生じている可能性も否定できず、幹細胞がどの程度の役割を担っているかは明らかにされていない。さらに下垂体にはホルモン産生細胞以外にもその特性からいくつかに分類される細胞群が存在し、組織幹細胞の候補として挙げられているが、そのいずれが実際にその役割を担っているかも明らかにされておらず、下垂体機能の回復に関してはいまだ不明な点が多いのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では下垂体機能を前葉機能に限定し、機能回復をきたしうる程度に再現性よく障害できる動物モデルを作成する。障害の程度をGH/IGF-1系、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH) / Corticosterone系および甲状腺刺激ホルモン(TSH) / サイロキシン(T4)系の各系統のホルモン血中濃度の推移から推定し、その時間経過を明らかにする。さらに組織学的検討から下垂体幹細胞候補群の関

与の有無を検討し、機能回復に關与する細胞レベルでのメカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

雄成体ラットの前頸部を切開し、気管切開を施行して気道を確保した後、周咽頭法で下垂体を露出し、tetradecanoylphorbol acetate (以下 TPA) を塗布して炎症を励起し、下垂体機能不全を起こすラットモデルを作成した。また下垂体を露出するが TPA を塗布しない sham 手術群も作成した。手術後 1 日目、4 日目、7 日目、以降 1 週間ごとに 56 日目まで尾静脈から採血を行い、corticosterone、IGF-1、T4 の血中濃度測定を行った。Corticosterone については corticotropin-releasing hormone 負荷後 15-30 分後の採血も追加した。次にラットを手術後 1 日目、4 日目、7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に安楽死させ、下垂体を採取し、hematoxylin-eosin 染色および各種ホルモンに対する抗体で染色を行い、組織障害の程度を検討した。また Ki-67、Sox2、S-100 の抗体染色および Sox2 と S-100 に対する蛍光二重染色を施行し、下垂体再生メカニズムについて検討した。

### 4. 研究成果

(1) 実験開始当初は手術後の喉頭浮腫によるラットの死亡率が高く、術中の気道牽引を軽減すること、気管切開部に筋膜パッチを当てて修復することで減少した。下垂体損傷ラットモデルにおいて CRH 負荷前および負荷 15-30 分後の corticosterone 血中濃度は、絶対値および反応の程度のそれぞれについて個体間また同一固体内でも経時的なばらつきが大きく、手術群・sham 群で一定の傾向を見出せなかった(図1)。同様にサイロキシンについても術前後で一定した変化は認めなかった。一方で IGF-1 については手術群において術後 4 日から 7 日目に血中濃度の低下が認められ、その後回復する傾向が明らかと

なった(図2)。このことから本モデルが主に成長ホルモン系を障害することが明らかとなった。以上より成体ラットにおいて下垂体機能の部分的障害を励起し、回復過程を追跡する動物モデルが確立された。

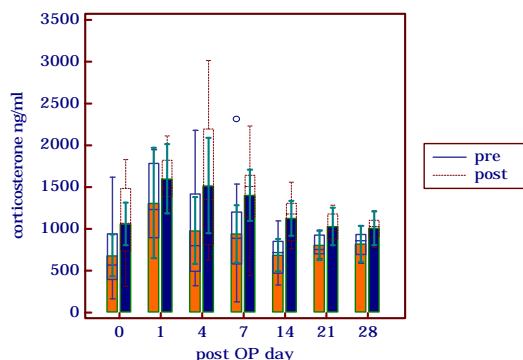


図1: CRH 負荷前後の血中 corticosterone 濃度の推移

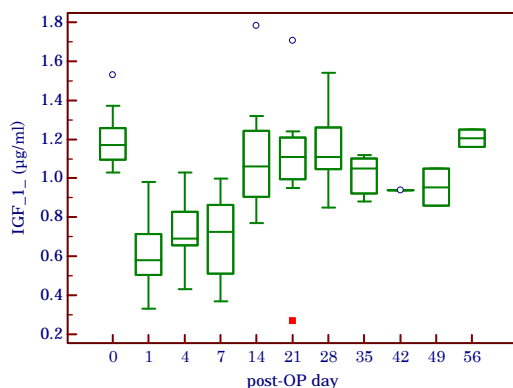


図2: 血中 IGF-1 濃度の推移

(2) 組織学的検討では炎症励起群では下垂体前葉での一部壊死脱落およびリンパ球浸潤を認め、ACTH 陽性細胞の減少を認めた。Ki-67 染色では下垂体中間葉から一部前葉にかけて陽性細胞の増加を認めた。これは TPA により下垂体前葉が障害され、その回復のために中間葉から分裂細胞の誘導が生じたことを示すものと考えられた。Sox2 染色では非手術群の固体では陽性細胞は前葉にまばらにしか存在しなかったが、手術群では比較的広範囲に、一部でクラスターを形成する陽性細胞を認めた。この細胞種の起源を検討すべく、下垂体組織前駆細胞の候補のひとつとし

て考えられている濾胞星細胞のマーカである S100 との二重染色を行った結果、S100 陽性細胞の一部において Sox2 の発現を確認した。逆に Sox2 陽性細胞はほとんどが S100 陽性であり、これより濾胞星細胞の一部が幹細胞様形質を獲得し、機能維持・回復に寄与していることが示唆された。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 理章 (TANIGUCHI MASAOKI)  
神戸大学・医学部付属病院・講師  
研究者番号: 60346195

### (2) 研究分担者

甲村 英二 (KOHMURA EIJI)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 30225388

細田 弘吉 (HOSODA KOHKICHI)  
神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90403261

近藤 威 (KONDOH TAKESHI)  
神戸大学・医学研究科・医学研究員  
研究者番号：50273769

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：