

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659681

研究課題名(和文)下垂体濾胞星細胞を用いたモデルラットの脊髄損傷再生治療

研究課題名(英文)Spinal cord regeneration treatment by grafting folliculo-stellate cells

研究代表者

和田 郁雄 (Wada, Ikuo)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70182970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞星細胞間のギャップジャンクションの維持には精巣・副腎の両臓器から分泌されている性ホルモンが関与していた(Microsc Res Tech. 2012)、また、テストステロンとレプチンの双方からの二重支配が存在していた(Microsc Res Tech. 2014)。ギャップジャンクションを通じた情報伝達は、性腺刺激ホルモンの放出促進作用を持っていた(Tissue Cell. 2014)。電気生理学的手法を用いてその細胞間連絡が下垂体の正常機能に不可欠なことを解明した(Endocrinology. 2013)。これらは、下垂体濾胞星細胞を用いた移植による脊髄再生を行う上で重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：The preservation of gap junctions between folliculo-stellate cells are mainly dependent on the testosterone from both testes and adrenal glands in adult male rats (Microsc Res Tech. 2012). The effects of leptin over the gap junction formation within the anterior pituitary glands was directly mediated by interaction with the functional leptin receptor over the folliculo-stellate cells (Microsc Res Tech. 2014). We investigated a detailed distribution and postnatal changes of the S-100 protein-positive/folliculo-stellate cells and their relationship with LH-RH nerve elements in the pars-tuberalis of pituitary gland and showed their participation in the function (Tissue Cell. 2014). The responsiveness to LHRH has a long-term refractoriness in adult rats, and that the physiological LHRH surge may be clocked in the morning due to the gap junction (Endocrinology. 2013). These findings are important for the spinal cord regeneration treatment by grafting folliculo-stellate cells.

研究分野：リハビリテーション学

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

現在、世界中には何百万人もの脊髄損傷で悩んでいる患者がおり、彼らがより良い生活を送って行けるような根本的な治療法が求められている。中枢神経系は再生能力が低く、一度損傷すると再生は困難であると考えられてきた。移植による脊髄再生には幹細胞移植などが考えられてきた。成体の種々の組織には幹細胞が存在し、一定の寿命で死滅していく細胞の補充をしている。この成体の組織中に存在している幹細胞を総称して“体性幹細胞”と呼んでいる。今回、下垂体前葉内の幹細胞(stem cell)と考えられている濾胞星細胞を用いた移植による脊髄再生実験を行う事とした。

2. 研究の目的

幹細胞とは自己複製能をもち、条件によっては1つまたはそれ以上の系列の細胞に分化できる能力を持った細胞の総称である。体性幹細胞については、レシピエント自身から得る場合には拒絶反応の恐れが無く、また倫理的問題もほとんど生じない利点がある。下垂体前葉内において体性幹細胞の一種と考えられているのは下垂体濾胞星細胞と呼ばれている無顆粒で神経膠細胞との共通点についても、多くの報告がある細胞種である。我々は、この下垂体濾胞星細胞を用いた移植による脊髄再生を目指した。

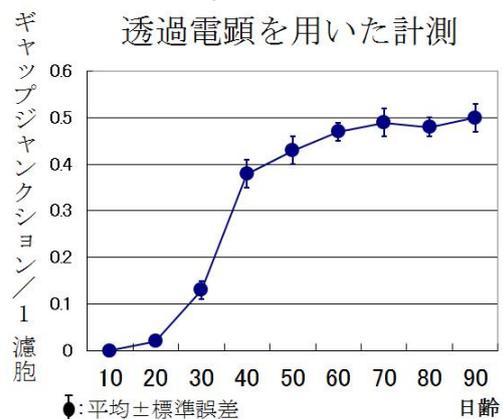
3. 研究の方法

我々は、成熟ラットにおいてギャップジャンクションは特異的に濾胞星細胞間のみ認められ顆粒細胞の細胞膜上には存在しない。ギャップジャンクションの形成不全を生じた際にギャップジャンクションを通じた細胞の機能分化に関する情報伝達の障害から濾胞星細胞が線毛の増殖等の形で機能的合胞体としての細胞間の内部環境の均一性保持の障害を引き起こす事が分かった。そして、ギャップジャンクションの形成が十分な下垂体組織が移植に適合しているのを発見した。そこで、正常雄ラットにおいては下垂体前葉濾胞星細胞間におけるギャップジャンクションは主なギャップ結合タンパク質としてコネクシン 43 が存在している事を免疫組織化学的に証明し、さらに下垂体濾胞星細胞にはレプチン受容体と CNTF 受容体が存在することを確認するため、また、このレプチン受容体を通じた細胞内のシグナル伝達がギャップジャンクションの形成にプラスに働くことを組織化学的、電気生理学的に確認することとした。

4. 研究成果

(1) 下垂体前葉ホルモンの分泌調節にはその制御のための神経の分布がない為に、従来、下垂体門脈系による血流を介した制御が唯一の物であると考えられてきた。しかし最近、下垂体門脈系以外にギャップジャンクシ

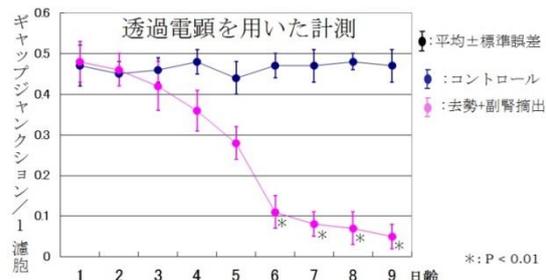
ンで機能的合胞体を形成した濾胞星細胞が性腺刺激ホルモンの放出促進作用を持っている可能性が見出され注目を集めている。我々は、1989年以來、濾胞星細胞間におけるギャップジャンクションが実験条件、生理条件の変化につれて大きく変動することを示してきた。以下に要約すると、成熟ラットにおいてギャップジャンクションは特異的に濾胞星細胞間にのみ認められ顆粒細胞の細胞膜上には存在しない。同一の濾胞に所属する濾胞星細胞間だけでなく異なる濾胞に所属する濾胞星細胞から伸展した細胞突起間にもギャップジャンクションが認められることは、ギャップジャンクションを介した細胞間連絡が下垂体前葉全域に伸展していることを示している。



グラフ1  
ギャップジャンクションの密度の日齢変化

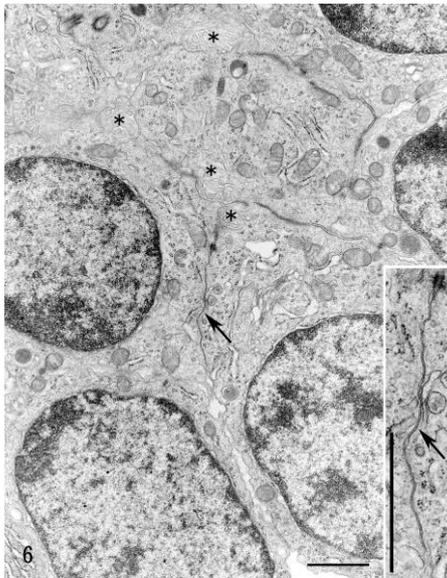
出生後のギャップジャンクションの密度の日齢変化は20日齢で初めて観察され、40日齢でほぼ完成しその後の増減はない。この増加は性成熟に一致しており、性ホルモンの影響を強く受けていた。

しかし、60日齢の雄ラットに去勢処置を単独で与えた群は減少しなかった、一方、60日齢の雄ラットに去勢+副腎摘出の処置を与えた群ではギャップジャンクションの数が減少していた。このことから、成熟ラットの下垂体濾胞星細胞間のギャップジャンクションの維持には精巣、副腎の両臓器から分泌されている性ホルモンが関与していると考えられた。



グラフ2  
去勢+副腎摘出の処置で数が減少

\*: P < 0.01



**画像1**  
去勢+副腎摘出の処置の7日後  
矢印の部分にギャップジャンクション  
を認めるが低形成である。

以上の観察から、成熟ラットの下垂体濾胞星細胞間のギャップジャンクションの維持には精巣、副腎の両臓器から分泌されている性ホルモンがごく微量存在すれば、必要な条件を満たすのかと考えた。以上をまとめて論文として発表した (Microsc Res Tech. 2012)。

(2) 違う因子の関与を調査するため、テストステロン以外に他の去勢と副腎摘出によって血中濃度が変化ししかも性成熟に参与していることが確認されている因子を調査した。その結果、テストステロンとコルチゾールによって血中濃度が変化する物質のなかでレプチンに注目した。去勢と副腎摘出によるテストステロンとレプチンの血中濃度の変化に注目して、表にまとめると以下ようになる。

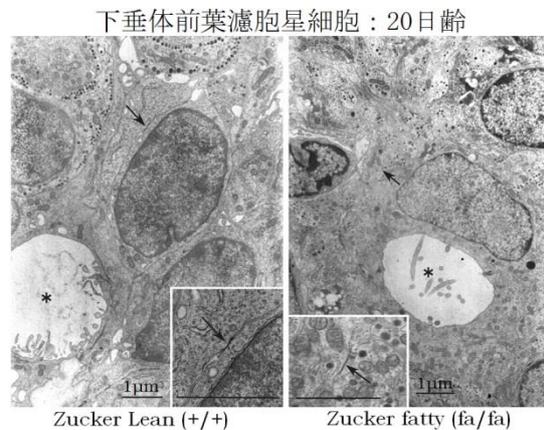
	テストステロン	レプチン
去勢	↓	↑
テストステロン	↑	↓
副腎摘出	↓	↓
コルチゾール投与	→	↑

**(表1)**  
去勢によって上昇したレプチンが  
副腎を同時に摘出すると減少する。

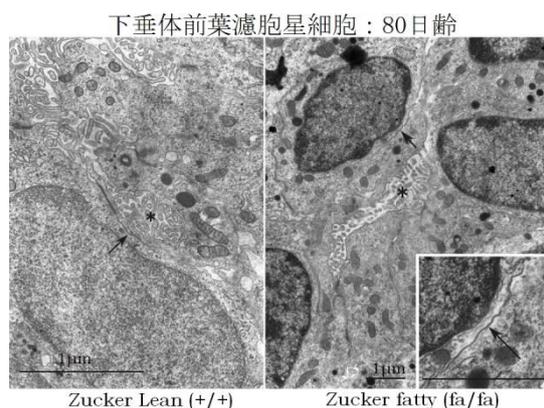
ここで、我々は、去勢によって上昇したレプチンが副腎を同時に摘出すると減少することに注目した。つまり、去勢によって低下したテストステロンの作用を上昇したレプチンが代償している可能性があると考えたのである。

さらに、下垂体濾胞星細胞にはレプチン受容体が存在することを確認し、また、このレプチン受容体を通じた細胞内のシグナル伝達がギャップジャンクションの形成にプラスに働くことを分子生物学的に確認した。そこで、次に、レプチンの受容体が機能不全を起こしている Zucker ラットに注目してみた。

Zucker ラットは、レプチン受容体の 269 番目のアミノ酸がグルタミンからプロリンに変異しており、過食による高度肥満を生じるが、テストステロンの血中濃度は正常である。この Zucker ラットの遺伝子異常を呈している Zucker fatty (fa/fa) とコントロールとして受容体の機能が正常なホモ体である Zucker lean (+/+) を用いて 20 日齢から 90 日齢と 1 才についてギャップジャンクションの形成を検査した。

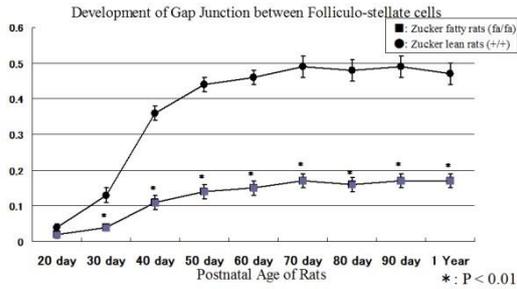


**画像2**  
Zucker ラット 20日齢



**画像3**  
Zucker ラット 80日齢

以上の結果から、ラットの生体内の下垂体前葉の濾胞星細胞間のギャップジャンクションの形成は、レプチン受容体の 269 番目のアミノ酸がグルタミンからプロリンに変異している Zucker fatty (fa/fa) では阻害されることが分かった。

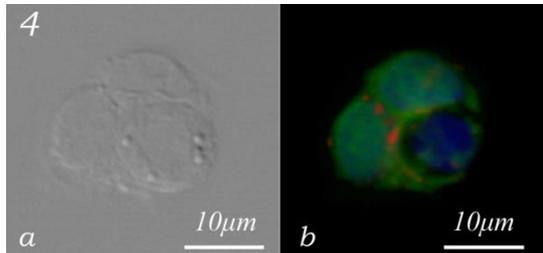


グラフ 3

Zucker fatty (fa/fa)はZucker lean (+/+)に比べてギャップジャンクションが低形成。

そこから、濾胞星細胞間のギャップジャンクションの形成と維持にはテストステロンとレプチンの双方からの二重支配が存在していると考察した (Microsc Res Tech. 2014)。

(3) 正常雄ラットにおいては下垂体前葉濾胞星細胞間におけるギャップジャンクションは主なギャップ結合タンパク質としてコネクシン 43 が存在している事を分子生物学的・免疫組織化学的に証明した。特に、GFP が濾胞星細胞で自動発光するように外部移入の S100b 遺伝子のプロモーター部への導入を行った Transgenic S100b-GFP ラットから下垂体細胞の分離培養をして蛍光顕微鏡視下にこれを確認した。



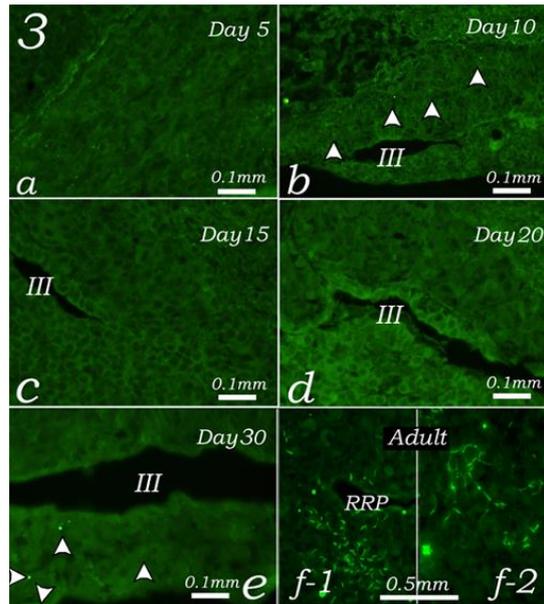
画像 4

S100b-GFP ラット下垂体培養細胞 オレンジの部分コネクシン 43

ギャップジャンクションは下垂体基部も含めて密度の日齢変化は20日齢で初めて観察され、40日齢でほぼ完成しその後の増減はない。これは蛍光免疫染色にて確認した。

ギャップジャンクションは顆粒細胞の細胞膜上には存在しない。ギャップジャンクションの形成不全を生じた際にギャップジャンクションを通じた細胞の機能分化に関する情報伝達の障害から機能的合胞体としての細胞間の内部環境の均一性保持の障害を引き起こす事も分かった。

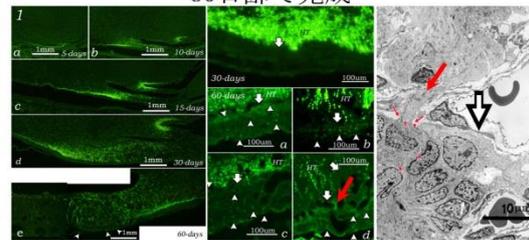
さらに、そのギャップジャンクションを通じた情報伝達が下垂体の基部からの電気信号の伝達を利用して下垂体前葉のホルモン分泌に作用しているのを発見し、LH-RH ニューロンが下垂体基部に侵入していく所を免疫染色と透過型電子顕微鏡にて確認した。



画像 5

ラット下垂体基部のコネクシン 43 グリーンの部分がコネクシン 43

LH-RHニューロンの隆起部への侵入 60日齢で完成



LH-RH蛍光免疫染色 30日齢&60日齢 透過電顕像  
隆起部に侵入しているLH-RHニューロンを蛍光免疫染色と透過電顕で確認

画像 6

ラット下垂体基部の LH-RH の侵入

こうした発見から、下垂体門脈系以外にギャップジャンクションで機能的合胞体を形成した濾胞星細胞が性腺刺激ホルモンの放出促進作用を持っている可能性をさらに明確にして行けた。

こうした一連の結果から濾胞星細胞間のギャップジャンクションの形成とその維持が濾胞星細胞の正常機能の保全に重要な意味を持っている事が判明した (Tissue Cell. 2014)。

(4) 続いて、この濾胞星細胞間のギャップジャンクションの通じた情報伝達が下垂体の基部からの電気信号の伝達を利用している事を電気生理学的に証明した。実際にはガラス電極を用いた観測と Fura4 を用いた Ca 発光の観測を用いて実験している。

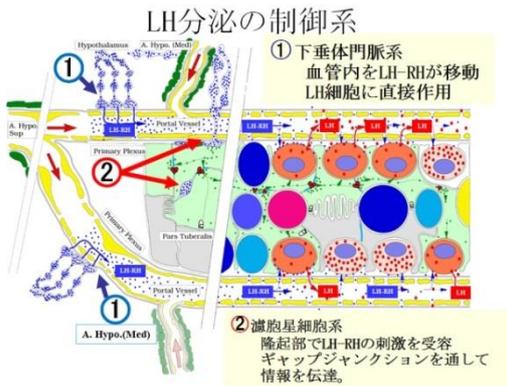
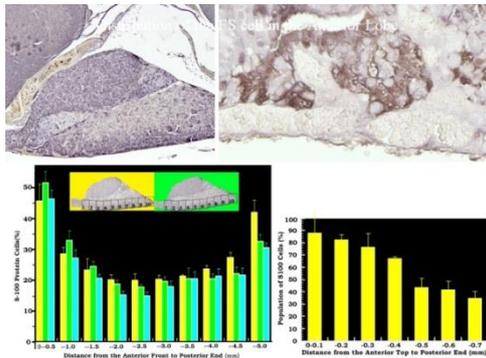


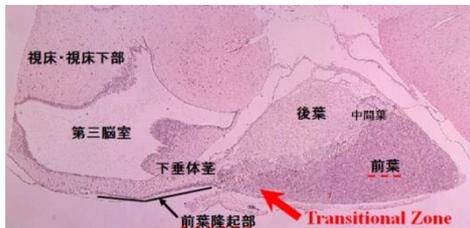
図1

性腺刺激ホルモンの放出促進作用  
2つの情報伝達方法が考えられる。



画像7

移行部先端(0.2mm)では、S-100 蛋白陽性細胞(濾胞星細胞)が70%以上を占める



画像8

この移行部先端は Transitional Zone と呼ばれている。

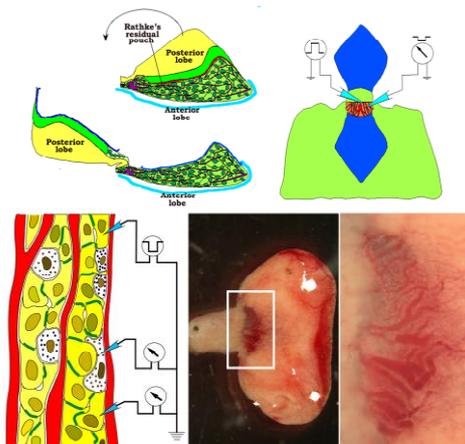
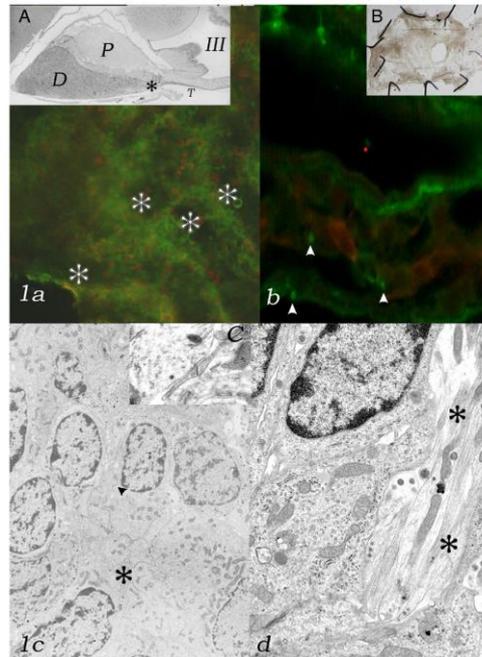


図2

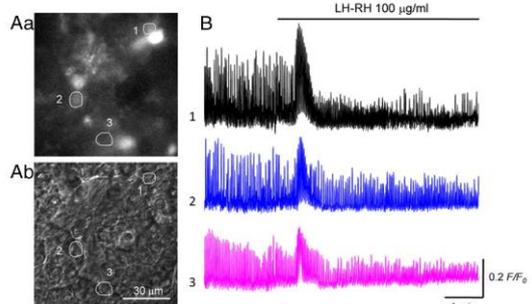
Transitional Zone にガラス電極を刺入する様子の模式図と実体顕微鏡写真

まずガラス電極を用いた電気生理学的計測を行うためにその手法を開発した。下垂体前葉の中で最も濾胞星細胞が密集している部分を免疫組織学的に検索した。



画像9

移行部の Transitional Zone への実際の  
蛍光免疫染色と電子顕微鏡画像  
右上の画像にはガラス電極の刺入した穴が認められる(B)。



画像10

LH-RH を還流液に入れると  
濾胞星細胞間の興奮状態が観察できる。

電気生理学的手法を用いてそのギャップジャンクションと通じた細胞間連絡がホルモンの正常分泌と、特にサーカディアンリズムの正常化に不可欠なことを解明した (Endocrinology, 2013)。

これらの発見は全て下垂体濾胞星細胞を用いた移植による脊髄再生を目指すうえで重要な基礎医学的発見である。

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 4 件)

1: The changes of gap junctions between pituitary folliculo-stellate cells during

the postnatal development of Zucker fatty and lean rats.

Sakuma E, Wada I, Soji T, Wakabayashi K, Otsuka T, Herbert DC.

Microsc Res Tech. 査読あり

2014 77(1):31-6. PMID: 24738148

<http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22309>

2: Intercellular communications within the rat anterior pituitary. XVI: postnatal changes of distribution of S-100 protein positive cells, connexin 43 and LH-RH positive sites in the pars tuberalis of the rat pituitary gland. An immunohistochemical and electron microscopic study.

Wada I, Sakuma E, Shirasawa N, Wakabayashi K, Otsuka T, Hattori K, Yashiro T, Herbert DC, Soji T.

Tissue Cell. 査読あり

2014 46(1):33-9. PMID: 24216131

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2013.10.001>

3: Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. XV. Properties of spontaneous and

LHRH-induced Ca<sup>2+</sup> transients in the transitional zone of the rat anterior pituitary in situ.

Hattori K, Shirasawa N, Suzuki H, Otsuka T, Wada I, Yashiro T, Herbert DC, Soji T, Hashitani H.

Endocrinology. 査読あり

2013 154(1):400-9. PMID: 23132744

<http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-1501>

4: Involvement of the adrenal glands and testis in gap junction formation via testosterone within the male rat anterior pituitary gland.

Sakuma E, Wada I, Otsuka T, Wakabayashi K, Ito K, Soji T, Herbert DC.

Microsc Res Tech. 査読あり

2012 75(12):1632-8. PMID: 23180755

<http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22108>

[学会発表] (計 3 件)

1: 2015年3月22日

第120回日本解剖学会全国学術集会・第92回生理学会大会・合同大会 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Postnatal Changes of Distribution of S-100 Protein Positive Cells, Connexin 43 and LH-RH Positive Sites in the Pars Tuberalis of the Rat Pituitary Gland

名古屋市立大学大学院 医学研究科 統合解剖学分野

佐久間英輔、和田郁雄、白澤信行、若林健二郎、大塚隆信、植木孝俊

2: 2014年3月27日

第119回日本解剖学会全国学術集会

自治医科大学 (栃木県・下野市)

遺伝性肥満ラット Zucker fatty に見いだされた濾胞星細胞間のギャップジャンクションの形成不全

名古屋市立大学大学院 医学研究科 機能解剖学分野・リハビリテーション科

佐久間英輔、和田郁雄、曾爾彊

3: 2013年3月30日

第118回日本解剖学会全国学術集会 シンポジウム (内分泌) サポートホール高松

(香川県・高松)

下垂体前葉内における濾胞星細胞を介した新たな情報伝達系

名古屋市立大学大学院 医学研究科 機能解剖学分野・リハビリテーション科

佐久間英輔、馬淵良生、曾爾彊、和田郁雄、大塚隆信

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/lab/rehabilitation.dir/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 郁雄 (WADA, Ikuo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 70182970

### (2) 研究分担者

若林 健二郎 (WAKABAYASHI, Kenjiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 20418867

佐久間 英輔 (SAKUMA, Eisuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 90295585

### (3) 連携研究者

なし