

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：2012～2013

課題番号：24790199

研究課題名(和文)下垂体前葉細胞の機能調節に関わる濾胞星状細胞が産生する新規分泌因子の機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of folliculostellate cell-produced humoral factors in the anterior pituitary gland

研究代表者

藤原 研 (Fujiwara, Ken)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00382945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体前葉は成長、生殖、恒常性の維持に重要な6種類のホルモンを分泌する内分泌器官である。前葉にはホルモン産生細胞以外に、非ホルモン産生性の濾胞星状細胞が存在する。本研究は前葉内での濾胞星状細胞による新たな細胞機能調節を明らかにすることを目的とした。まず濾胞星状細胞で特異的に蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変ラットを使い、蛍光タンパク質を指標に濾胞星状細胞のみを純化して、この細胞で特異的に発現している遺伝子を明らかにした。そしてその中から、組織学的手法を用いて濾胞星状細胞でのみ発現する新たな成長因子を同定することに成功した。これらの因子がホルモン分泌調節に関わっていると考えた。

研究成果の概要(英文)：The anterior pituitary gland produces six types of hormones, which are crucial to control growth, reproduction, and homeostasis. A non-hormone-producing cell, folliculostellate cell, is also known to exist in the gland. The purpose of this study is to clarify the function of folliculostellate cell in the anterior pituitary gland. Folliculostellate cells were purified by fluorescence activated cell sorting from the green fluorescent protein-transgenic rats and numerous genes that were specifically expressed in the cells were identified. And then, specific growth factors were identified in folliculostellate cells by means of histological technique. These molecules may play important roles in the regulation of hormone-producing cells 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：細胞機能形態学 内分泌学 下垂体 ホルモン 成長因子 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉は成長、生殖、代謝、免疫にかかわる6種類のホルモン (ACTH, GH, PRL, TSH, LH, FSH) を産生する内分泌細胞が存在し、これら内分泌細胞の機能調節は視床下部や末梢臓器からのホルモンにより調節されている。しかし、下垂体の内分泌細胞は生体の内分泌学的な変化に伴い細胞機能の亢進や細胞分化、細胞増殖などがダイナミックに変化しつつも組織全体としての秩序が維持される。これらを制御するメカニズムは視床下部の支配、末梢臓器のフィードバック機構のみでは説明できない。すなわち下垂体の内分泌細胞のダイナミックな変化を支えるためには、葉内で産生・分泌される液性因子を介したパラクライン機構による調節が注目されている [Denef, 2008, その他]。

濾胞星状細胞は電子顕微鏡により無顆粒性細胞として同定され、アストロサイトと同様に S100b タンパク質を発現する。また、葉内に広く分布し、互いにギャップ結合を介したネットワークを形成している。さらに、この細胞は成長因子、サイトカイン (bFGF, VEGF, IL6 など) やレチノイン酸を合成・分泌することが知られている。このような特徴から、濾胞星状細胞は神経細胞にとってのグリア細胞のように、ホルモン産生細胞に対する支持細胞としての役割が想定される。その一つとして、液性因子を介した機能調節細胞の役割が考えられる [Inoue, 1999, その他]。

しかし、これまでは濾胞星状細胞を下垂体から純粋に単離することができず、その機能解析が十分には進まなかった。近年、S100 タンパク質のプロモーターを用いた GFP トランスジェニックラットが作出され [Itakura, 2007]、正常な濾胞星状細胞を生きのまま単離したり観察したりすることが可能となった。この動物は濾胞星状細胞の研究にとって画期的であり、この動物を用いることで濾胞星状細胞の機能解析が飛躍的に進むものと期待される。申請者はこのラットをいち早く導入し、最近、濾胞星状細胞をセルソーターで純化することに成功した。

2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、濾胞星状細胞による新たな細胞機能調節機構を明らかにすることを最終的な目的として研究を行った。本研究では、濾胞星状細胞で特異的に発現する分泌因子に注目し、1) 組織学的、細胞学的解析、2) 生理条件の変化での動態の解析、3) ホルモン産生細胞への作用の解析を段階を追って計画した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：Wistar 系ラット (SLC より購入) 及び S100 タンパク質 (以下、S100b) プロモーター下で GFP を発現する遺伝子改変ラット (S100b-GFP TG ラット：埼玉大学 井上金治教授より供与を受け自家繁殖) を用い

た。下垂体前葉初代培養細胞は成体雄 (60 日齢) から採取した。また、様々な下垂体前葉機能亢進モデルを作成するために、成体雄または雌を用いて生殖腺、副腎、または甲状腺の摘出手術を行った。各種性周期は膣スメアにより確定した。また、各発生段階の胎仔は雌雄を交配させて膣内に精子を確認した日を胎生 0.5 日 (E0.5d) とした。

(2) 分泌因子遺伝子の同定：ラット下垂体前葉から RNA を抽出し、オリゴ(dT)₂₀ プライマーと逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。cDNA を鋳型にして RT-PCR 法により濾胞星状細胞で特異的に発現している遺伝子群の中から、分泌因子を同定した。PCR 産物をベクターに組み込み、大腸菌に形質転換し、クローニングした。得られたプラスミドから *in vitro* transcription により DIG ラベルした特異的アンチセンスまたはセンス cRNA プロープを作製した。4% パラフォルムアルデヒド固定したラット下垂体凍結切片で、作製した DIG ラベル cRNA プロープを用いて *in situ* hybridization 法を行った。さらに合成ペプチドから抗体を作成した。

(3) 分泌因子の動態解析：生殖腺摘出、副腎摘出、甲状腺摘出、エストロゲン投与などにより下垂体機能亢進状態となったラットを作成した。これらの動物を用い、分泌因子発現の動態を *in situ* hybridization、免疫組織化学を用いて明らかにした。また、mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により定量解析した。定量 PCR には特異的 PCR プライマーを設計し、SyberGreen を用いた。タンパク質の定量にはケミルミを用いた Western Blotting 法を用いた。

4. 研究成果

(1) 濾胞星状細胞特異的分泌因子の同定

これまでの本研究代表者の研究で、S100b-GFP TG ラット下垂体前葉からセルソーティングを利用して GFP 発現の有無により濾胞星状細胞を純化し、濾胞星状細胞で発現している遺伝子を DNA マイクロアレイ解析により明らかにした。この発現遺伝子プロファイルを利用し、近傍のホルモン産生細胞に作用する因子を探索することを目指し、特に濾胞星状細胞で特異的に発現する分泌因子遺伝子をスクリーニングした。そして、成長因子やサイトカインなど 63 遺伝子を同定した。この中には、既に濾胞星状細胞で発現が知られている bFgf、Tgfb、Vegf が含まれていたが、多くは未同定の因子であった。次に、リアルタイム PCR 法を用いて、セルソーティングにより分取した濾胞星状細胞分画とそれ以外の細胞分画 (ホルモン産生細胞、血管系細胞など) との発現量の比較を行い、特異的で且つ高発現している 10 遺伝子を絞り込むことができた。

(2) 分泌因子の組織化学的解析

発現遺伝子プロファイルから同定した分泌因子を発現している細胞を同定するために *in situ* hybridization を行った。まず、各遺伝子を PCR で増幅し、遺伝子断片をクローニングした。遺伝子断片を鋳型とし、*in vitro* transcription により digoxigenin ラベルした cRNA プローブを作成した。作成した cRNA プローブを用いて正常成獣ラット下垂体前葉の凍結切片で *in situ* hybridization を行ったところ、midkine と pleiotrophin が下垂体前葉で発現していることが明らかとなった。そのうち midkine mRNA 発現細胞は下垂体前葉内で広く分布し、下垂体後葉でも観察された。次に各ホルモンに対する抗体を用いて二重染色法により細胞同定を行ったところ、midkine mRNA シグナルは如何なる前葉ホルモン免疫陽性反応と共存しなかった。すなわち midkine は非ホルモン産生細胞で発現していることが分かった。さらに濾胞星状細胞のマーカーである S100 タンパク質に対する免疫二重染色を行い、midkine が濾胞星状細胞で発現していることを明らかにした。さらに特異的抗体を用いてタンパク質の同定を試みたところ、Western blotting 法により下垂体前葉で予想されたサイズのバンドが確認された。しかし、免疫組織化学による細胞同定までは至っていない。一方、midkine の受容体である Ptpz の発現を解析したところ、ホルモン産生細胞で発現していることが分かった。

(3) 分泌因子の発現動態

次に、midkine の機能を明らかにするために、下垂体形成過程、生殖腺摘出、副腎摘出、甲状腺摘出、ステロイド投与、の下垂体を用いて遺伝子発現の動態を解析した。この中で、特に下垂体形成過程で著しく高い発現が観察された。MK は E12.5 よりラトケ囊および間脳に強く発現が見られた。間脳より派生した後葉には発生過程を通して midkine 発現細胞が観察された。一方、E14.5 の前葉では前葉主部、中間部で発現が維持されたが、隆起部では観察されなかった。さらに発生が進むにつれ、前葉主部、中間部での発現細胞は減少した。下垂体形成時に midkine が成長因子として働くことが示唆された。

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 13 件)

Fujiwara K, 他 9 名 *In situ* hybridization analysis of the temporospatial expression of the midkine/pleiotrophin family in rat embryonic pituitary gland. *Cell Tissue*

Res. 査読有 2014 DOI:
10.1007/s00441-014-1875-z

Horiguchi K, Fujiwara K, 他 11 名. Expression of chemokine CXCL10 in dendritic-cell-like S100 β -positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 査読有 2014. DOI:
10.1007/s00441-014-1864-2

Horiguchi K, Fujiwara K, 他 9 名 Isolation of dendritic-cell-like S100 β -positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 査読有 2014 DOI:
10.1007/s00441-014-1817-9

Maekawa F, Fujiwara K, 他 7 名 Brain-derived neurotrophic factor in VMH as the causal factor for and therapeutic tool to treat visceral adiposity and hyperleptinemia in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Front Synaptic Neurosci.* 査読有 5: 7: 1-13, 2013. doi: 10.3389/fnsyn.2013.00007

Syaidah R, Horiguchi K, Fujiwara K, 他 3 名 Laminin and collagen modulate expression of the small leucine-rich proteoglycan fibromodulin in rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 査読有 354: 633-638, 2013. DOI:
10.1007/s00441-013-1698-3

Jindatip D, Fujiwara K, 他 4 名. 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 88: 196-203, 2013. DOI:
10.1007/s12565-013-0180-3

Horiguchi K, Syaidah R, Fujiwara K, 他 5 名. Expression of the cell-surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 in developing rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 査読有 353: 473-481, 2013. DOI: 10.1007/s00441-013-1641-7

Tsukada T, Kouki T, Fujiwara K, 他 4 名 Reassembly of anterior pituitary organization by hanging drop three-dimensional cell culture. *Acta Histochem Cytochem.* 査読有 46:121-127, 2013. DOI: 10.1267/ahc.13015

Tando Y, Fujiwara K, 他 2 名 Localization of Notch signaling molecules and their effect on cellular proliferation in adult rat pituitary. *Cell Tissue Res.* 査読有 351:511-519, 2013. DOI: 10.1007/s00441-012-1532-3

Horiguchi K, Syaidah R, Fujiwara K, 他 5 名 Expression of small leucine-rich proteoglycans in rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 査読有 351: 207-212, 2013. DOI: 10.1007/s00441-012-1513-6

Ramadhani D, Tsukada T, Fujiwara K, 他 3 名 Laminin isoforms and laminin-producing cells in rat anterior pituitary. *Acta Histochem Cytochem.* 査読有 45: 309-315, 2012. DOI: 10.1267/ahc.12028

Jindatip D, Fujiwara K, 他 2 名 Transmission and scanning electron microscopy study of the characteristics and morphology of pericytes and novel

desmin-immunopositive perivascular cells before and after castration in rat anterior pituitary gland. *Anat Sci Int.* 査読有 87: 165-173, 2012. DOI: 10.1007/s12565-012-0144-z

Horiguchi K, Kouki T, Fujiwara K, 他 4 名 Expression of the proteoglycan syndecan-4 and the mechanism by which it mediates stress fiber formation in folliculostellate cells in the rat anterior pituitary gland. *J Endocrinol.* 査読有 214: 199-206, 2012. DOI: 10.1530/JOE-12-0156

〔学会発表〕(計 32 件)

屋代 隆、他、藤原 研、ラット下垂体前葉における周皮細胞と新規 Desmin-immunopositive Perivascular (DIP) Cell の微細形態の特徴、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 29 日(栃木県下野市)

藤原 研、他、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 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 29 日(栃木県下野市)

塚田岳大、藤原 研、他、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 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 29 日(栃木県下野市)

藤原 研、脳下垂体前葉における細胞間コミュニケーション、第 47 回埼玉大学脳科学セミナー、2013 年 11 月 11 日(埼玉県さいたま市)

藤原 研、他、ヘパリン結合性成長因子 midkine の胎生ラット下垂体における in situ hybridization 法による発現様式の検討、第 38 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2013 年 10 月 25 日(宮崎県宮崎市)

堀口幸太郎、吉田彩舟、藤原 研、他、ラット下垂体前葉に存在する樹状細胞様 S100 タンパク陽性細胞の単離、第 40

回日本神経内分泌学会学術集会、2013年10月25日(宮崎県宮崎市)
藤原 研、他、ラット下垂体前葉におけるプロレニン受容体の免疫組織化学と in situ hybridization による検出、第17回日本内分泌病理学会学術総会、2013年10月4日(神奈川県横浜市)
藤原 研、屋代 隆、レチノイン酸と下垂体前葉細胞、第84回日本動物学会大会、2013年9月26日(岡山県岡山市)
堀口幸太郎、吉田彩舟、藤原 研、他、下垂体前葉に存在する S100 タンパク陽性細胞の不均一性の探求、第28回日本下垂体研究会学術集会、2013年8月7日(岩手県花巻市)
藤原 研、他、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学術集会、2013年8月7日(岩手県花巻市)
Ken Fujiwara、他、Identification of midkine-expressing cells in the anterior pituitary gland of adult rats. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, ENDO2013, 2013年6月17日(San Francisco, USA)
Rahimi Syaidah, Kotaro Horiguchi, Ken Fujiwara, Takashi Yashiro, Laminin and collagen type-I modulate fibromodulin expression in FS cells of anterior pituitary gland. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, ENDO2013, 2013年6月15日(San Francisco, USA)
Takehiro Tsukada, Ken Fujiwara、他、Folliculostellate cells interact with microvessel mural cell 'pericyte' to maintain collagen arrangement in rat anterior pituitary. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, ENDO2013, 2013年6月15日(San Francisco, USA)
菊地元史、丹藤由希子、藤原 研、屋代 隆、Notch シグナリングによる下垂体前葉 S100 陽性細胞の増殖制御、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月30日(香川県高松市)
藤原 研、他、ラット下垂体前葉濾胞星状細胞で産生されるヘパリン結合性成

長因子ミッドカインはレチノイン酸により誘導される、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月30日(香川県高松市)

堀口幸太郎、Rahimi Syaidah、Floren Ly、藤原 研、屋代 隆、下垂体発生段階における細胞膜型プロテオグリカン発現細胞の観察。第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月30日(香川県高松市)

Depicha Jindatip, Ken Fujiwara, Takashi Yashiro, Characteristics of pericytes and novel desmin-immunopositive perivascular cells in rat anterior pituitary gland. 2nd International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference, 2012年12月7日(Chiang Mai, Thailand)

塚田岳大、Ramadhani Dini、藤原 研、他、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大会及びシンポジウム、2012年11月31日(福井県福井市)

菊地元史、丹藤由希子、藤原 研、屋代 隆、ラット腺下垂体 S100 タンパク陽性細胞にみられる Notch シグナリング、第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2012年11月31日(福井県福井市)

藤原 研、他、ラット下垂体前葉の S100 タンパク陽性細胞が産生する分泌性細胞成長因子の解析、第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2012年11月31日(福井県福井市)

Dini Ramadhani、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学術総会、2012年10月12日(宮城県仙台市)

②1 屋代 隆、他、藤原 研、ラット下垂体前葉にみられる新規 Desmin-immunopositive Perivascular Cell、第16回日本内分泌病理学会学術総会2012年10月12日(宮城県仙台市)

②2 堀口幸太郎、Rahimi Syaidah、藤原 研、屋代 隆、下垂体前葉におけるシンデカ

ン遺伝子発現細胞の同定とその機能、第
39 回日本神経内分泌学会学術集会 2012
年 9 月 28 日 (福岡県北九州市)

- ⑳ 菊地元史、丹藤由希子、藤原 研、屋代 隆、
成体ラット下垂体における Notch シグ
ナリング、第 27 回日本下垂体研究会学
術集会、2012 年 8 月 10 日 (山形県天童
市)
- ㉑ 藤原 研、他、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学
術集会、2012 年 8 月 10 日 (山形県天童
市)
- ㉒ Depicha Jindatip, Ken Fujiwara, 他、
Morphological characteristics of
pericytes and new
desmin-immunopositive perivascular
cells in the anterior pituitary gland of
postnatal rats. 第 27 回日本下垂体研究
会学術集会、2012 年 8 月 9 日 (山形県
天童市)
- ㉓ 塚田岳大、Dini Ramadhani、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学術
集会、2012 年 8 月 9 日 (山形県天童市)
- ㉔ Rahimi Syaidah, Kotaro Horiguchi,
Dini Ramadhani, Ken Fujiwara,
Takashi Yashiro、Laminin
up-regulates fibromodulin expression
in folliculo-stellate cells of rat anterior
pituitary gland. 第 27 回日本下垂体研
究会学術集会、2012 年 8 月 9 日 (山形
県天童市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤原 研 (Fujiwara Ken)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：00382945