

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790204

研究課題名(和文)下垂体の水分バランス調節におけるアクアポリンの役割解明

研究課題名(英文)The role of aquaporin in the water regulation of the pituitary gland

研究代表者

大谷 佐知(桑原佐知)(KUWAHARA-OTANI, SACHI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40412001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：アクアポリン(AQP)は水の輸送に関与する膜タンパク質で、様々な組織に発現する。我々はこれまでの研究で下垂体にはAQP4を含むいくつかのAQPサブタイプが発現することを明らかにした。今回の研究では下垂体前葉に発現するAQP4のLPSによる内毒素血症の影響を調べた。LPS投与後2、4、8時間後にAQP4 mRNAは2倍に増加した。濾胞星状細胞におけるAQP4の免疫陽性反応も8時間後をピークとしてLPS投与により増加した。また投与8時間後にはAQP4陽性細胞で構成されるシスト様構造が観察された。これらの結果により下垂体前葉においてAQP4の発現がLPS投与により増強することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Aquaporins (AQPs) are membrane proteins involved in water transport in many types of tissues. We have reported previously that pituitary glands express some aquaporin subtypes, including AQP4. In the present study, we investigated the effects of lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia on the expression of AQP4 in the anterior pituitary gland. After intraperitoneal injection of LPS, the level of AQP4 mRNA doubled at 2, 4, and 8 hr. Immunohistochemical analysis showed an increase with in AQP4 immunostaining in folliculo-stellate cells following LPS injection; the intensity of immunoreactivity peaked at 8 hr. At the same time, some cyst-like structures, formed by AQP4-positive cells, were observed. These findings indicate the LPS induces the expression of AQP4 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 アクアポリン 濾胞星状細胞

1. 研究開始当初の背景

生命体にとって水は必須であり、生体内の水分量を制御することは極めて重要である。細胞膜は脂質二重層からなり、水の透過性が低く、多量の水を細胞内外に瞬時に透過させるためには細胞膜に特別な装置が必要となる。アクアポリン (aquaporin; AQP) は水分子を選択的に透過させる膜チャネルタンパク質で、哺乳類では 13 種類のサブタイプが報告されている。1992 年に Peter Agre が AQP を発見して以来、発現や機能に関する研究は水の移動が盛んな臓器、すなわち脳、腎臓、唾液腺、皮膚などを対象として数多くなされてきた。近年では AQP と器官の病態生理が注目されており、脳においては AQP が脳浮腫の発症あるいは治癒に関与することが示唆されている。

解剖学的・機能学的に脳(視床下部)と密接なかかわりをもつ下垂体は内分泌代謝の上流に位置し、前葉からは生命活動に必須の 6 種類のホルモンが分泌される。円滑なホルモン分泌をおこなうためには下垂体内環境を維持することが重要である。前葉細胞は発達した洞様毛細血管網により囲まれる。この毛細血管は物質の透過性が高く、さらに前葉の活発な内分泌活動により細胞内外の浸透圧は絶えず変化していると考えられる。我々は下垂体における水輸送機構の存在を確かめるために、前葉における AQP の発現について RT-PCR 法により検討した結果、複数のサブタイプの AQP が発現することが分かった。さらに免疫組織化学法により、AQP の局在について調べたところ、AQP1 は血管内皮細胞に、AQP4 は濾胞星状細胞とラトケ腔辺縁細胞に、AQP5 はラトケ腔辺縁細胞にそれぞれ発現することが明らかになった。濾胞星状細胞とラトケ腔辺縁細胞はホルモン非産生性の細胞で、脳アストロサイトと脳室上衣細胞にそれぞれ類似した生物学的特性をもつ。このことから前葉において AQP は支持

細胞系に発現し、それらの細胞が下垂体前葉の水分バランスの調節に関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまでの研究により下垂体における AQP の発現と局在は明確になったが、その発現がどのように制御され、病態といかに関連しているのかは未だ明らかになっていない。本研究では内毒素血症により全身性に炎症性浮腫が生じる敗血症モデルラットをもちいて、下垂体前葉の濾胞星状細胞における AQP4 の発現を経時的に追跡し、下垂体の炎症性浮腫の発生と AQP4 の関連性を探ることを目的とする。これにより下垂体の病態変化と AQP4 の関係が明らかになる。

3. 研究の方法

(1) 本実験には雄の SD ラット (6~7 週齢) を用いた。ラット腹腔内にリポポリサッカライド (LPS; 2.5mg/kg/BW) を投与し、2、4、8、12、24 時間後に下垂体を採取し、以下の実験に用いた。コントロール群には等量の生理食塩水を投与した。

下垂体前葉に発現する AQP4 の発現量を経時的に観察するために、下垂体前葉のみを取り出し、RNA を抽出後、cDNA を合成してリアルタイム PCR 法により定量解析を行った。

下垂体における AQP4 の発現を組織学的に検討するために、下垂体を 10%ホルマリンで固定後、パラフィン切片を作製し、AQP4 に対する抗体を用いて免疫染色をおこなった。また下垂体を 2.5%グルタルアルデヒドで固定し、エボン包埋後、超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡にて前葉の微細形態の観察をおこなった。

(2) 濾胞星状細胞における浸透圧変化あるいは LPS による影響を検討するために、培

養実験をおこなった。培養系として、濾胞星状細胞様株である TtT/GF 細胞とラット下垂体前葉の初代培養を用いた。それぞれ培地にマンニトールあるいは LPS を添加して、細胞の形態あるいは AQP4 の発現を観察した。

4. 研究成果

(1) 下垂体前葉における AQP4 mRNA の発現量は LPS 投与 2、4、8 時間後にコントロール群の約 2 倍に増加した。発現量は 12 時間後には低下しはじめ、24 時間後にはコントロール群と同等の値になった。また下垂体における AQP4 抗体を用いた免疫染色の結果、濾胞星状細胞における免疫陽性反応が、LPS 投与により増加し、その反応は投与 8 時間後が最も強くなっていた。AQP4 mRNA の発現量の変化と同様、陽性反応はその後低下し、24 時間後の組織像はコントロール群と顕著な差がみられなかった。濾胞星状細胞のマーカーである S100 蛋白の発現には組織学的な変化はみられなかった。また LPS 投与 8 時間後の前葉実質中には cyst 様構造が観察され、これらは AQP4 強陽性細胞により構成されていた。この構造はコントロール群や他の実験群では観察されなかった。LPS 投与ラットの下垂体前葉を電子顕微鏡にて、より詳細に観察した結果、投与 8 時間後の前葉において細胞間隙の拡張が実質全体にみられ、その拡張は cyst 様構造の周辺がより顕著であった。また cyst 様構造を構成する濾胞星状細胞は、コントロール群でみられる濾胞星状細胞よりも扁平のものが多く、管腔側に多数の微絨毛が観察された。

以上の結果から、LPS 投与により下垂体前葉における AQP4 の発現が増強し、前葉実質には細胞間隙の拡張と cyst 様構造が生じることが明らかとなった。これらの現象には経時的变化が認められたことから、AQP4 は下垂体前葉組織の炎症性浮腫の発生や進行、回

復過程に関与し、前葉内の恒常性の維持に積極的に関係する可能性が示唆された。

(2) 濾胞星状細胞様株である TtT/GF 細胞において AQP4 の発現を確認したところ、発現量はマウス下垂体前葉に比べると非常に少ないことが分かった。マンニトールあるいは LPS を培地に添加して TtT/GF 細胞の培養をおこなったが、AQP4 の発現量に顕著な変化はみられなかった。このことから TtT/GF 細胞は濾胞星状細胞のモデル細胞として広く利用されているが、AQP4 の研究に関してはモデルとして利用することが難しいと考えられた。また下垂体前葉初代培養細胞においても同様の実験をおこなったが、こちらにも顕著な変化がみられなかった。このことから下垂体前葉における AQP4 の発現には足場となるアンカーリングタンパクなどの発現が必要である可能性が示唆された。今後、ディッシュのコーティングなど培養条件のさらなる検討を行い、引き続き実験をおこなっていく予定である。

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1件)

Kuwahara-Otani S., Maeda S., Tanaka K., Hayakawa T. and Seki M. Systemic administration of lipopolysaccharide increases the expression of aquaporin-4 in the rat anterior pituitary gland. *J Vet Med Sci* 75:1081-1084, 2013. 査読有
DOI: 10.1292/jvms.13-0083

6. 研究組織

(1)研究代表者

大谷 佐知 (桑原 佐知)

(KUWAHARA-OTANI SACHI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40412001

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：