

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460275

研究課題名(和文)細胞接着と細胞間シグナルによる腺下垂体の前駆細胞維持機構

研究課題名(英文) Maintenance mechanism of anterior pituitary progenitor cells by homophilic cell adhesion

研究代表者

菊地 元史 (Kikuchi, Motoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60332988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体前葉は複数のホルモン分泌細胞をもつが同時に元となる前駆細胞も存在して状況に応じて特定の細胞種に分化する。分化が液性因子に支配されることは知られていたが、前駆細胞が終生枯渇せずに維持される機構が不明であった。我々は以前、隣接する細胞間に働くNotchシグナルが未分化維持に重要であることを示した。本研究では、細胞接着因子Eカドヘリンが前駆細胞同士を選択的に接着させる役割を担ってNotchシグナルを働かせていることを示した。即ち前駆細胞はEカドヘリンによって集団をつくることで未分化状態を保ち、分化するとEカドヘリンを失って集団から離れる。この細胞接着機構が前駆細胞維持に働いていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The anterior pituitary is composed of types of hormone-producing cells. Progenitor cells that can differentiate into the types of cells were reported to be maintained in adult tissue. Differentiation is regulated by humoral factors, however, the mechanism to maintain progenitor cells was not understood. We previously showed Notch signaling, a regulator of progenitor cells in many organs, is activated in particular cell aggregates in rat pituitary. In this study, immunohistochemistry revealed a close relationship between Notch signaling molecules and cell adhesion molecule E-cadherin. Expression of the target HES1 decreased by E-cadherin inhibition in primary culture. Notch receptor and ligand were always co-localized within cells, suggesting homologous cells have reciprocal effects. We are further analyzing genes regulated by Notch signaling. The present study suggests that E-cadherin-mediated cell attachment is responsible for maintenance of progenitor cells through Notch signaling.

研究分野：組織学

キーワード：下垂体前葉 細胞分化 カドヘリン Notch

1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉は、5種類の主要なホルモン産生細胞を有する内分泌器官である。同時に、これらホルモン産生細胞の元となる前駆細胞も存在し、状況に応じて特定の細胞種に分化することが報告されている (Sav, 2014)。ラットを用いた研究では、ホルモンを産生しない「S100b タンパク (以下 S100) 陽性細胞」の一部が前駆細胞であると考えられている。前葉細胞の分化は、各種の液性因子によって支配されることが知られているが (Zue *et al.*, 2007)、どのようにして前駆細胞が枯渇することなく維持されるのかは不明であった。

前述の S100 陽性細胞は、ラトケ囊の遺残腔を取り囲む marginal cell layer および前葉の内部にそれぞれ同種好性の集団をつくって存在している。我々は、以前、S100 陽性細胞が特異的に細胞接着因子 E-カドヘリンを発現することで、この同種好性細胞集団を形成していることを明らかとした (Kikuchi *et al.*, 2006)。これは、個体発生的に説明することができる。即ち、胎児期下垂体原基の未分化細胞はすべてが E-カドヘリンを発現しているが、分化に伴って E-カドヘリンを失い、N-カドヘリンによる接着に移行するためであった (Kikuchi *et al.*, 2009)。

一般的に、細胞の分化にかかわる因子として細胞接着を基とした Notch シグナリングが知られている。下垂体前葉でも、胎児期の細胞が Notch 分子を発現していることが知られていた (Raetzman *et al.*, 2004)。我々は、前研究課題 (21570067) において成体の S100 陽性細胞に Notch シグナリングが働いていて、細胞分裂を支配していることを示した (Tando *et al.*, 2013)。

2. 研究の目的

我々は、下垂体前葉前駆細胞の分化は、前述したように液性因子によって支配されるが、同時に細胞接着を基とした分化抑制機構が働いて、前駆細胞を維持していると考えた。本研究課題では、以下の細目について明らかとし、この仮説を検証することを目的とした。分化抑制には複数のシグナル伝達系が働いていると想定されるが、本研究では主に Notch シグナリングを対象とした。

1) Notch シグナリングと E-カドヘリンの関連を明らかとする。

E-カドヘリン、Notch シグナリング関連分子の組織化学的解析、E-カドヘリンの機能阻害実験を充てる。

2) Notch シグナリングが前駆細胞に与える影響を検証する。

実験的に Notch シグナリングを阻害/促進し、細胞分裂、SOX2 発現への影響を調べる。

3) Notch シグナリングによって発現が変動

する遺伝子を解析する。

DNA マイクロアレイによる網羅的発現解析と、個々の遺伝子に対する組織学的解析を行う。

3. 研究の方法

動物：8-10 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。一部の実験には、S100 プロモーター下に GFP を発現する S100b-GFP トランスジェニックラット (60 日齢) を用いた (井上金治埼玉大学教授より供与)。自治医科大学動物実験規定並びに遺伝子組換え実験等安全管理マニュアルに則って実験を行った。

免疫組織細胞化学：ラットを深麻酔下に 4% ホルムアルデヒド (50mM リン酸緩衝液) で環流した後、下垂体を摘出し、24 時間固定を行った。常法に従って、3 μ m の凍結切片を作製した。実験によっては、未固定の凍結切片を作製し、スライドガラス上で 30 分間固定を行った。単染色には DAB を基質とした ABC 法を用い、二重染色には蛍光二次抗体法を用いた。使用した抗体は、抗ヒト E-カドヘリンマウス抗体 (BD Biosciences)、抗ヒト Notch1 ウサギ抗体 (Cell Signaling)、抗ラット Notch2 ヤギ抗体 (R&D Systems)、抗ヒト jagged1 ウサギ抗体 (Rockland Immunochemicals)、抗ヒト HES1 ウサギ抗体 (Cell Signaling)、抗ヒト Sox2 ヤギ抗体 (Zenon 社 labeling kit を用い、直接蛍光標識)、抗ヒト T-カドヘリンウサギ抗体 (Bioworld Technology) であった。HES1 染色においては、直前に切片を Immunosaver (Nisshin EM) によって賦活化処理した。標本は、デジタルカメラ DP70 を装着した AX80 蛍光顕微鏡 (Olympus) で観察、撮影した。

レクチン組織化学：内皮細胞の染色のため蛍光標識 isolectin B4 (Thermo Fischer Scientific) を用いた組織化学を行った。

初代単層培養：ラットを深麻酔下に Hanks 平衡塩類溶液で環流した後、下垂体を取り出した。前葉を中後葉から分け、トリプシンとコラーゲナーゼを用いて常法によって細胞分散を行った。分散した細胞は、10% 牛胎仔血清を添加した M199 に懸濁、8 穴のチャンバースライド (Nalge Nunc) に 1×10^5 cells/400 μ l/cm² の密度で播種し、5% CO₂、95% 空気、37 °C の条件で培養した。チャンバースライドは、予め細胞外基質成分としてラミニンでコートした。

E-カドヘリン機能阻害実験：培養液中に抗 E-カドヘリンモノクローナル抗体 (DECMA-1, Genetex) を 25 μ g/ml の濃度で添加し、初代培養を行った。

Notch シグナル阻害/促進実験：培養液中に Notch シグナル阻害剤 N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT; Wako) 50 μ M または可溶化した jagged1-Fc 融合タンパク (4 μ g/ml、

R&D Systems)を加え、3日間培養を行った。

マイクロアレイ解析：上項と同様に DAPT を添加して下垂体前葉細胞を3日間培養した後、mRNA を抽出し、発現遺伝子を Agilent 社の DNA マイクロアレイシステムによって網羅的に解析した。

4. 研究成果

1) Notch シグナリングと E-カドヘリン

Notch シグナリング関連分子及び E-カドヘリンの組織学的局在を明らかとした。

・免疫組織化学的解析の結果、下垂体には、リセプター分子として、Notch1 及び Notch2、リガンド分子として、jagged1 と jagged2 が発現していた。このうち、前駆細胞とされる S100 陽性細胞に特異的なのは、Notch2 と jagged1 の組み合わせであった。特にラトケ囊の遺残腔を囲む marginal cell layer、前葉内部の特定の細胞集団、中葉の marginal cell layer に連続する細胞集団に強く発現していた。

・Notch2 と jagged1 が検出されたのは、E-カドヘリン陽性細胞の一部であった。また、Notch2 と jagged1 は、必ず同一の細胞に共存していた。

・Notch シグナリングの直接の標的である HES1 は、E-カドヘリン陽性細胞の一部に発現していた(S100 陽性細胞以外にも少数の発現細胞がみられたが、それらは血管内皮細胞であった)。

前葉細胞の初代培養で、モノクローナル抗体による E-カドヘリン特異的な機能阻害を行ない、E-カドヘリンによる細胞接着と Notch シグナリングとの関連を明らかとした。

E-カドヘリンの機能阻害により、Notch2 の発現は、有意な影響を受けなかったが、Notch2 陽性細胞のうち、HES1 陽性となる細胞の割合は、約 50%から 20%へと減少した。

2) Notch シグナリングが前駆細胞に与える影響

S100b-GFP ラットより GFP 陽性細胞分画(即ち S100 陽性細胞)をセルソーターによって調整し、初代培養を行った。培養液中に Notch シグナリング阻害剤 DAPT を加えた実験群、Fc と融合させて可溶化した jagged1 タンパクを加えた実験群を用意し、3日間の培養後、細胞分裂能を BrdU 取り込みによって、また、未分化状態の指標として Sox2 発現をそれぞれ組織化学的に検出した。

DAPT 添加によって、BrdU 陽性細胞は対照群に対して 0.65、Sox2 発現細胞の割合は 0.75 といずれも有意に減少した。また、jagged1 添加によって、それぞれ 1.3、1.2 と有意に上昇した。

一方、予備的な段階ながら、胎生期と成体

で Notch シグナリング阻害/促進の効果を比較した。細胞分裂能については、胎生期と成体とで差が認められなかったが、Sox2 発現については、胎生期の方が効果が大きかった。分化抑制に関しては、Notch シグナリングの役割が胎生期と成体で異なることが考えられた。

3) Notch シグナリングによって発現が変動する遺伝子

前項と同様、S100b-GFP ラットより S100 陽性細胞分画を調整し、3日間の初代培養を行った。培養液に DAPT を添加した群及び対照群より mRNA を抽出し、発現遺伝子を網羅的に比較した。

Notch シグナリングを阻害した条件では、108 プローブに対して発現の有意な上昇がみられ、481 プローブに対して発現の有意な減少がみられた。

上記の遺伝子群について生物学的な意味付けを行い、real time PCR による発現解析及び組織学的な解析を行った。

この項目は、現在解析中である。解析が進んでいるタンパク質に T-カドヘリンがある。このタンパク質は、カドヘリンファミリーに含まれる細胞膜タンパクであるが、細胞内ドメインを欠く特異な分子である。細胞接着因子としてではなく、受容体として隣接する細胞の情報を細胞内に伝える役割があると考えられている。下垂体では初めての報告となるが、S100 陽性細胞に局限して発現し、細胞分裂能と高い相関を示した。新規の細胞分裂関連タンパクと考えられる。

4) 結論

以上の結果から、結論として E-カドヘリンを礎とした付図のような未分化細胞維持機構が示唆される (Batchuluun *et al.*, 投稿中)。

即ち、前駆細胞は、E-カドヘリンを発現することによって、同種好性の細胞集団をつくる。細胞間には、細胞接着を基とした juxtacrine 及び paracrine シグナル伝達系が活性化し細胞分化抑制に働く。本研究で対象としたのは Notch シグナリング系であるが、他に、我々が以前報告した CXCL12-CXCR4 系 (Horiguchi *et al.*, 2012)、明治大学加藤幸雄教授のグループによって最近報告された Ephrin-Eph 系 (Yoshida *et al.*, 2015) など複数のシグナル伝達系によって未分化状態が維持されていると考えられる。

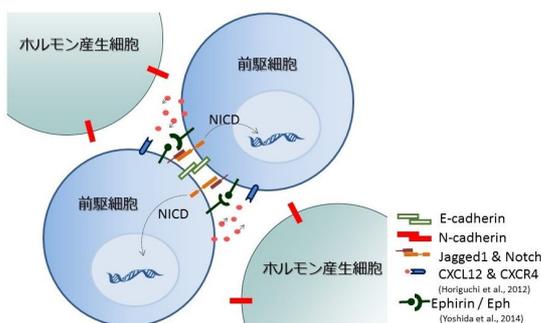
他器官では、幹細胞ニッチとよばれる細胞集団内に前駆細胞とその支持細胞が存在する。下垂体前葉の前駆細胞は、シグナル送信細胞と受容細胞の区別がなく、未分化細胞同士が対称的に働いて互いに分化抑制を行う。同種好性の細胞接着自体がニッチとして作用するというユニークな前駆細胞維持機構

となっていると思われる。

我々は、以前、下垂体前葉の前駆細胞は、分化に伴って E-カドヘリンの発現を失い N-カドヘリンを主体とした細胞接着に移行することを示した (Kikuchi *et al.*, 2009)。いわゆるカドヘリンスイッチング現象である。カドヘリンスイッチングは、差次的細胞接着を導くため、分化した細胞は速やかに未分化細胞集団から除かれることとなる。このことが、分化した細胞によって分化抑制機構が妨げられて分化の連鎖が起こることへの抑制機構となっていると考えられる。

S100 陽性細胞は、古くから濾胞星状細胞と称されてきた細胞を含め、多様な表現型をもつ細胞の集まりであると考えられる。本研究でも、Notch シグナリングが認められるのは、E-カドヘリン陽性細胞のサブセットであった。S100 陽性細胞を分類することが今後の課題のひとつである。

Zue *et al.* (2007) の報告以来、下垂体前葉細胞の分化機構は、専ら液性因子で説明されてきた。本研究は、その過程に細胞接着因子を起点とした分化抑制機構がかかわっていることを示すものである。



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 9 件)

Effects of retinoic acid on growth hormone-releasing hormone receptor, growth hormone secretagogue receptor gene expression and growth hormone secretion in rat anterior pituitary cells.

Maliza R, Fujiwara K, Tsukada T, Azuma M, Kikuchi M, Yashiro T.

Endocr J. 2016. [Epub ahead of print] 査読有

Folliculostellate cell interacts with pericyte via TGF 2 in rat anterior pituitary.

Tsukada T, Azuma M, Horiguchi K, Fujiwara K, Kouki T, Kikuchi M, Yashiro T.

J Endocrinol. 2016; 229:159-170. doi: 10.1530/JOE-16-0033. 査読有

Maintenance of the Extracellular Matrix in Rat Anterior Pituitary Gland: Identification of Cells Expressing Tissue Inhibitors of Metalloproteinases.

Azuma M, Tofrizal A, Maliza R, Batchuluun K, Ramadhani D, Syaidah R, Tsukada T, Fujiwara K, Kikuchi M, Horiguchi K, Yashiro T.

Acta Histochem Cytochem. 2015; 48:185-192. doi: 10.1267/ahc.15020. 査読有

Expression of the heparin-binding growth factor midkine and its receptor, Ptpcrz1, in adult rat pituitary.

Fujiwara K, Horiguchi K, Maliza R, Tofrizal A, Batchuluun K, Ramadhani D, Syaidah R, Tsukada T, Azuma M, Kikuchi M, Yashiro T.

Cell Tissue Res. 2015; 359:909-914. doi: 10.1007/s00441-014-2073-8. 査読有

In situ hybridization analysis of the temporospatial expression of the midkine/pleiotrophin family in rat embryonic pituitary gland.

Fujiwara K, Maliza R, Tofrizal A, Batchuluun K, Ramadhani D, Tsukada T, Azuma M, Horiguchi K, Kikuchi M, Yashiro T.

Cell Tissue Res. 2014; 357:337-344. doi: 10.1007/s00441-014-1875-z. 査読有

Folliculostellate cells are required for laminin release from gonadotrophs in rat anterior pituitary.

Tsukada T, Fujiwara K, Horiguchi K, Azuma M, Ramadhani D, Tofrizal A, Batchuluun K, Maliza R, Syaidah R, Kikuchi M, Yashiro T.

Acta Histochem Cytochem. 2014; 47:239-245. doi: 10.1267/ahc.14036. 査読有

Changes in laminin chain expression in pre- and postnatal rat pituitary gland.

Ramadhani D, Tsukada T, Fujiwara K, Azuma M, Kikuchi M, Yashiro T.

Acta Histochem Cytochem. 2014; 47:231-237. doi: 10.1267/ahc.14031. 査読有

Reassembly of anterior pituitary organization by hanging drop three-dimensional cell culture.

Tsukada T, Kouki T, Fujiwara K, Ramadhani D, Horiguchi K, Kikuchi M, Yashiro T.

Acta Histochem Cytochem. 2013; 46:121-127. doi: 10.1267/ahc.13015. 査読有

Laminin and collagen modulate expression of the small leucine-rich proteoglycan fibromodulin in rat anterior pituitary gland.

Syaidah R, Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Kikuchi M, Yashiro T. Cell Tissue Res. 2013; 354:633-638. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

Khongorzul Batchuluun, Morio Azuma, Takashi Yashiro, Motoshi Kikuchi. Identification of T-cadherin as a novel proliferation associated protein on folliculo-stellate cells in rat anterior pituitary. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016 年 3 月 28 日~30 日 福島県郡山市

Rita Maliza, Ken Fujiwara, Khongorzul Batchuluun, Motoshi Kikuchi, Takashi Yashiro, Tsuyoshi Soji. Gene expression analysis of folliculostellate cells in 'transitional zone' of anterior pituitary gland of rat - special relevance to circadian rhythm - 第 30 回日本下垂体研究会学術集会 2015 年 8 月 5 日~7 日 富山県黒部市

Khongorzul Batchuluun, Morio Azuma, Takashi Yashiro, Motoshi Kikuchi. E-cadherin mediates Notch signaling in the rat anterior pituitary. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015 年 3 月 21 日~23 日 兵庫県神戸市

Morio Azuma, Khongorzul Batchuluun, Ken Fujiwara, Takahiro Tsukada, Motoshi Kikuchi, Takashi Yashiro. Identification of tissue inhibitors of metalloproteinase-expressing cells in rat anterior pituitary gland. The 8th international Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology. 2014 年 11 月 7 日~9 日 愛知県岡崎市

菊地 元史 細胞接着因子カドヘリンから腺下垂体前駆細胞を考える 第 18 回日本内分泌病理学会学術総会(招待講演) 2014 年 11 月 1 日~2 日 東京都千代田区

Khongorzul Batchuluun, Morio Azuma, Takashi Yashiro, Motoshi Kikuchi. Histological and functional characterization of Notch signaling in the adult rat pituitary gland. 第 41 回日本神経内分泌学会学術集会 2014 年 10 月 31 日~11 月 2 日 東京都千代田区

Khongorzul Batchuluun, Morio Azuma, Takashi Yashiro, Motoshi Kikuchi. Effect of Notch2 signaling on cell proliferation and Sox2 expression in S100b-positive cells in the rat pituitary gland. 第 29

回日本下垂体研究会学術集会 2014 年 8 月 8 日~10 日 東京都八王子市

藤原 研, 塚田 岳大, 東 森生, Dini Ramadhani, 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 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 27 日~29 日 栃木県下野市

塚田 岳大, 堀口 幸太郎, 菊地 元史, 屋代 隆 ラット下垂体における TGFB2 の発現とその作用 第 38 回日本比較内分泌学会大会 2013 年 10 月 24 日~26 日 宮崎県宮崎市

屋代 隆, Depicha Jindatip, Alimuddin Tofrizal, 幸喜 富, 東 森生, 菊地 元史, 堀口 幸太郎 ラット下垂体前葉における新規細胞種の発見 -Desmin-immunopositive Perivascular Cell- 日本下垂体研究会第 28 回学術集会 2013 年 8 月 7 日~9 日 岩手県花巻市

Tsukada T, Fujiwara K, Ramadhani D, Kouki T, Kikuchi M, Yashiro T. Folliculostellate cells interact with microvessel mural cell 'pericyte' to maintain collagen arrangement in anterior pituitary development of rat. The Endocrine Society's Annual Meeting & Expo. 2013 年 6 月 15 日~18 日 (San Francisco)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.jichi.ac.jp/histology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 元史 (KIKUCHI, Motoshi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60332988

(2) 研究分担者

東 森生 (AZUMA, Morio)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90709643

屋代 隆 (YASHIRO, Takashi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80119859