

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860147

研究課題名(和文)3次元培養を用いた下垂体前葉細胞の新規機能の探索とその調節機序の解明

研究課題名(英文)Deciphering novel functions and regulatory mechanisms of anterior pituitary cells using 3 dimensional cell culture

研究代表者

塚田 岳大(Tsukada, Takehiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50596210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ハンギングドロップ法を用いた下垂体前葉細胞の3次元培養と濾胞星状細胞特異的にGFPタンパクを発現するS100b-GFP遺伝子改変ラットを組み合わせ、下垂体前葉の組織構築における濾胞星状細胞の役割を解き明かすことにある。本研究は、1)濾胞星状細胞がゴナドトロフで合成される基底膜成分ラミニンの放出に重要であること、2)濾胞星状細胞から分泌されるTGFβ2が毛細血管の構成細胞である周皮細胞に作用してコラーゲン合成を調節していることを明らかにした。一連の研究により、濾胞星状細胞の新規機能が下垂体前葉の細胞外マトリックス調節であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Aim of this project is to decipher a role of folliculostellate cells in tissue formation of anterior pituitary gland. This project utilized a 3 dimensional cell culture of rat anterior pituitary cells established by our laboratory, and S100b-GFP transgenic rats that express GFP in folliculostellate cells. This project found 1) folliculostellate cells are required for release of major basement membrane component, laminin, from gonadotrophs, and 2) TGFβ2 secreted from folliculostellate cells induces collagen synthesis of microvessel mural cells, pericytes. In conclusion, this project revealed a novel function of folliculostellate cells, namely, a regulation of extracellular matrix within anterior pituitary gland.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：下垂体前葉 濾胞星状細胞 3次元培養 細胞外マトリックス コラーゲン ラミニン 組織構築 TGFβ
eta

1. 研究開始当初の背景

細胞培養は、生体内で見づらい個々の細胞の形態を観察することができるだけでなく、培養条件や遺伝子発現を容易に変えることができるため、細胞の機能解析にも有用である。主要な細胞培養法は、シャーレの底に細胞を培養するいわゆる平地培養(2次元培養)であるが、細胞はシャーレ底面に接着するため、細胞周囲の環境は生体内のものとは大きく異なっている。いっぽう、細胞を立体的に培養する3次元培養法は、シャーレへの接着がなく、上下左右に細胞どうしが重なり合うため、2次元培養と比較して、より生体に近い環境で細胞を培養することができる。

申請者は、平成23年度に採択された若手研究B(課題番号:23790233)の補助のもと、ラット下垂体前葉の初代培養細胞を用いた3次元培養法の確立を試みた。そして、平成24年にES細胞の分化に用いられるハンギングドロップ3次元培養法を応用し、簡便にラット下垂体前葉細胞を3次元で培養することに成功し、その手法論を国際誌に発表をした(論文⑨。本論文は日本組織細胞化学会より論文賞を受賞した)。この培養法を用いて形成された細胞塊を観察すると、細胞や細胞外マトリックスの組織学的な特徴が生体内の下垂体前葉で見られる構造と類似していることが確認された。申請者は、この3次元培養法を下垂体前葉の組織構築の*in vitro*モデルと位置づけ、本申請では、この手法を用いて下垂体前葉の組織構築における新規の機能の探索とその調節機序の解明を試みた。

2. 研究の目的

下垂体前葉には5種類のホルモン産生細胞、ホルモンを産生しない濾胞星状細胞、血管を構成する血管内皮細胞と周皮細胞により構成されている。ホルモン産生細胞は、下垂体前葉内にランダムに存在しているのではなく、それぞれの細胞どうしで親和性をもって存在している。これらのホルモン産生細胞の集団は、コラーゲンなどの細胞外マトリックスに囲まれており、前葉内で小葉を形成している。いっぽう、濾胞星状細胞は小葉の中心に存在し、同種間で偽濾胞を形成するほか、小葉周囲の細胞外マトリックスに細胞突起を伸ばし、その突起で小葉内のホルモン産生細胞を取り囲んでいる。これらの組織学的な知見から、濾胞星状細胞が下垂体前葉の小葉構造の維持に重要であることが示唆される。しかし、実際に濾胞星状細胞が下垂体前葉の組織構築に重要かどうかは検証されていない。

本研究の目的は、申請者自らが確立した下垂体前葉の初代培養細胞の3次元培養法を用いて、下垂体前葉の組織構築における濾胞星状細胞の新規機能を探索することにある。この3次元培養と合わせて用いる強力な実験ツールが、埼玉大学の井上金治教授らが樹立したS100b-GFP遺伝子改変ラットである。こ

のラットは、濾胞星状細胞に特異的にGFPを発現するため、濾胞星状細胞を無染色で生きたまま観察できるだけでなく、セルソーティングにより濾胞星状細胞を他の前葉細胞から単離することができる。申請者は、濾胞星状細胞の存在比を変えて3次元培養を行い、その細胞塊形成の違いから濾胞星状細胞の新規機能を見つけることを試みた。

3. 研究の方法

(1) S100b-GFP 遺伝子改変ラットの下垂体前葉を用いた3次元培養とその形態観察

本研究では、濾胞星状細胞の存在比を変えて3次元培養を行い、濾胞星状細胞が細胞塊形成に関与しているかどうか調べた。濾胞星状細胞にGFPを発現する遺伝子改変ラットの下垂体前葉から細胞を単離し、セルソーターを用いてGFP陽性細胞(濾胞星状細胞)とGFP陰性細胞(その他の細胞)に分取した。そして、濾胞星状細胞の存在比を変えて、4000個の前葉細胞をハンギングドロップ3次元培養法で培養した(図1)。培養5日目に細胞塊を回収し、顕微鏡下で細胞塊を観察した。

(2) 濾胞星状細胞のラミニンにおける作用

基底膜は、毛細血管周囲に存在するシート状の細胞外マトリックスである。我々の研究室では、これまでラット下垂体前葉に発現する基底膜主要成分のラミニンアイソフォームの同定を行い、その発現細胞がゴナドトロフ(LH・FSH細胞)と血管内皮細胞であることをみつけている(Ramdhani et al. 2012。若手研究B課題番号:23790233)。本研究では、濾胞星状細胞が基底膜の構築に関与しているかどうかを調べるため、濾胞星状細胞の存在比率を0、5、10、20%と変えて、3次元培養し、その細胞塊中のラミニンの分布を免疫染色により調べた。また、濾胞星状細胞が含まれない細胞塊に、濾胞星状細胞の培養上清を添加し、免疫染色を用いてラミニンの動態変化を調べた。realtimePCRを用いて各種遺伝子発現量を調べた。

(3) 濾胞星状細胞のコラーゲンにおける作用

コラーゲンは、下垂体前葉の主要な細胞外マトリックスで、小葉周囲に存在する。我々の研究室では、ラット下垂体前葉に発現する主要なコラーゲンがI型、III型コラーゲンであり、それらは毛細血管周囲に存在する周皮細胞で合成されることを明らかにしている(Fujiwara et al., Cell Tissue Res, 342: 491-495, 2010)。本研究では、濾胞星状細胞が前葉内のコラーゲン合成に関与しているかどうかを調べるため、濾胞星状細胞の存在比率を0、5%と変えて、3次元培養し、細胞塊中のコラーゲンの分布を電子顕微鏡観察と免疫染色で調べた。realtimePCRを用いて、各種遺伝子の発現量を調べた。また、RT-PCR、*in situ* hybridization法を用いて濾胞星状細胞から分

泌されるコラーゲン合成に関与する因子の探索を行い、薬理的な手法を用いて同定因子の作用機序を調べた。

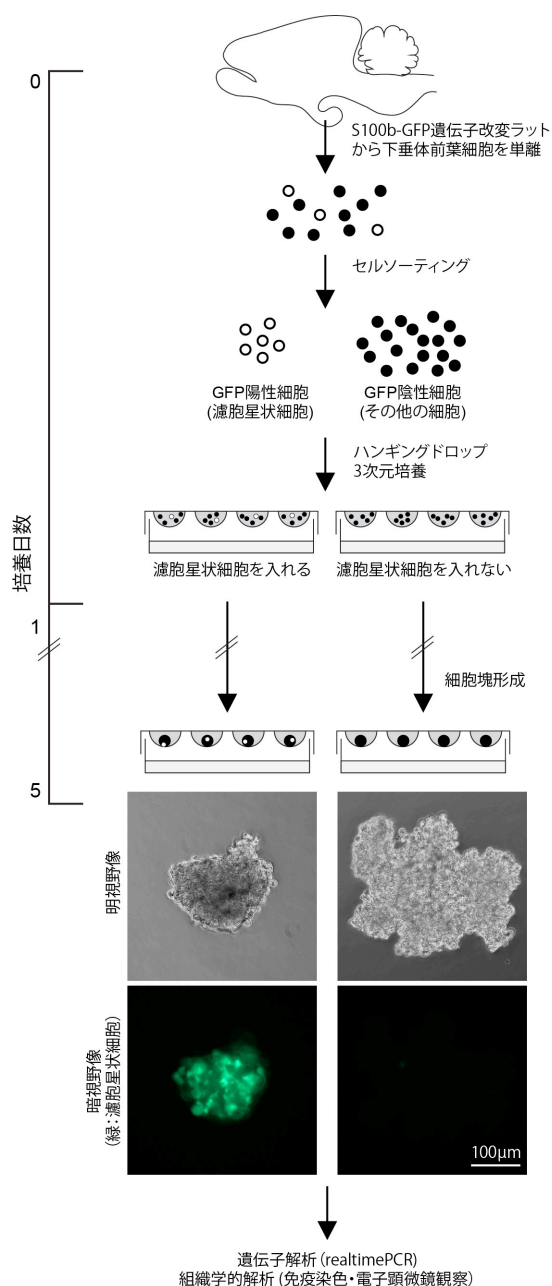


図1：S100b-GFP 遺伝子改変ラットの下垂体前葉細胞を用いたハンギングドロップ3次元培養法の手順

4. 研究成果

(1) S100b-GFP 遺伝子改変ラットの下垂体前葉を用いた3次元培養とその形態観察

セルソーターにより濾胞星状細胞を分取し、濾胞星状細胞を入れた前葉細胞と濾胞星状細胞を入れない前葉細胞で3次元培養を行い、細胞塊形成を比較した。その結果、濾胞星状細胞を入れた細胞塊は、非常にコンパクトで、球形の細胞塊を形成し、濾胞星状細胞を入れない細胞塊は、細胞密度が低く、いびつで大型の細胞塊を形成した(図1)。このことから、濾胞星状細胞が下垂体前葉細胞どう

しを接着させるのに重要であることが示唆された。下記の実験では、濾胞星状細胞が接着因子である各種細胞外マトリックスの合成・放出に関与しているかどうか調べた。

(2) 濾胞星状細胞のラミニンにおける作用

濾胞星状細胞の存在比を0、5、10、20%と変えて下垂体前葉細胞を3次元培養し、基底膜主成分であるラミニンの分布を免疫染色を用いて調べた。その結果、濾胞星状細胞の存在比が増えるに従い、細胞外のラミニン沈着が増えることがわかった。また、大変興味深いことに、濾胞星状細胞の存在比が減るとともに、ラミニン免疫陽性細胞が出現することも明らかとなった。免疫染色を用いて、ラミニン免疫陽性細胞を同定したところ、前葉ホルモンを産生するゴナドトロフであることがわかった。これまで、濾胞星状細胞とゴナドトロフ間の相互作用を示唆する報告はあったが、濾胞星状細胞がゴナドトロフで合成されるラミニンの放出に関与するという報告は初めてである。また、ゴナドトロフで合成されるラミニンの遺伝子発現を調べたところ、濾胞星状細胞の有無に関わらず、ラミニンの発現は変化していなかった。このことから、濾胞星状細胞はゴナドトロフのラミニン合成に関与していないことがわかった。次に、ゴナドトロフのラミニン放出における作用を調べるため、濾胞星状細胞の培養上清を通常培養液に添加し、濾胞星状細胞を入れない前葉細胞を培養した。すると、濾胞星状細胞の培養上清を加えていない細胞塊と比べて有意にラミニン免疫陽性細胞の数が減少することがわかった。これらの結果から、濾胞星状細胞から分布される液性因子がゴナドトロフのラミニン放出に重要であることが示唆された。これらのデータは、2014年に国際誌に発表している(論文③)。

(3) 濾胞星状細胞のコラーゲンにおける作用

濾胞星状細胞の存在比を0、5%と変えて下垂体前葉細胞を3次元培養し、その細胞塊の微細構造を電子顕微鏡で観察した。すると、濾胞星状細胞を入れない細胞塊で、細胞外の線維性コラーゲンが確認されなかった。次に、I型、III型コラーゲンの分布を免疫染色で調べたところ、電子顕微鏡観察の結果と同様に、細胞外のコラーゲン沈着が見られなかった。realtimePCRによりI型、III型コラーゲンの発現量を調べてみると、濾胞星状細胞を入れない細胞塊で、両コラーゲンの発現量が著しく減少していることがわかった。コラーゲン産生細胞である周皮細胞のマーカー遺伝子(desmin)の発現量も減少していたことから、濾胞星状細胞が周皮細胞に作用し、コラーゲン合成を抑制していることが示唆された。濾胞星状細胞が周皮細胞で合成されるコラーゲンの調節に関与しているという報告は初めてである。

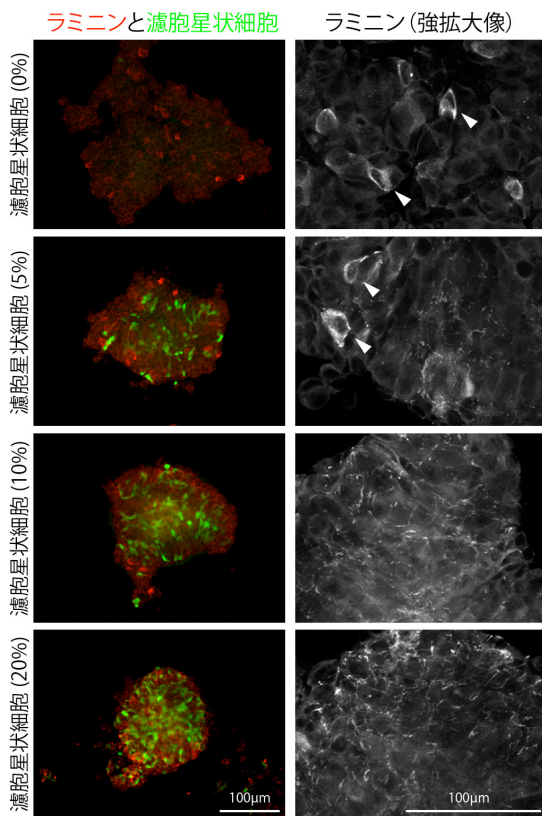


図 2 : 濾胞星状細胞の存在比が異なる細胞塊のラミニンの免疫染色。矢頭はラミニン免疫陽性細胞。

次に、濾胞星状細胞から分泌されるコラーゲン調節因子の同定を行った。申請者はまず、線維化サイトカインとして知られている Transforming growth factor beta (TGFβ) に着目した。RT-PCR 法と *in situ* hybridization 法により、濾胞星状細胞に TGFβ2 が、周皮細胞にその受容体である TGFβR-II が発現していることがわかった。また、3 次元培養したラット下垂体前葉細胞に TGFβ2 添加したところ、コラーゲン発現量が増加し、TGFβ 受容体の阻害剤でその発現量が抑えられることも明らかにした。さらに、TGFβ2 の細胞内シグナル分子である Smad2 が TGFβ2 投与直後に周皮細胞の核内に移行することも確認した。これらの結果から、周皮細胞のコラーゲン合成に濾胞星状細胞で合成される TGFβ2 が関与することが示唆された。現在、これらのデータをまとめ、論文を作成している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Ramadhani D, Tofrizal A, Tsukada T, and Yashiro T. Histochemical analysis of laminin α chains in diethylstilbestrol-induced prolactinoma in rats. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol. 48, 2015, 69–73. DOI: 10.1267/ahc.14067

- ② Fujiwara K, Horiguchi K, Maliza R, Tofrizal A, Batchuluun K, Ramadhani D, Syaidah R, Tsukada T, Azuma M, Kikuchi M, and Yashiro T. Expression of the heparin-binding growth factor midkine and its receptor, Ptpcrz1, in adult rat pituitary. *Cell Tissue Res*, 査読有, Vol. 359, 2015, 909-914. DOI: 10.1007/s00441-014-2073-8
- ③ Tsukada T, Fujiwara K, Horiguchi K, Azuma M, Ramadhani D, Tofrizal A, Batchuluun K, Maliza R, Syaidah R, Kikuchi M, and Yashiro T. Folliculostellate cells are required for laminin release from gonadotrophs in rat anterior pituitary. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol. 47, 2014, 239–245. DOI: 10.1267/ahc.14036
- ④ Ramadhani D, Tsukada T, Fujiwara K, Azuma M, Kikuchi M, and Yashiro T. Changes in laminin chain expression in pre- and postnatal rat pituitary gland. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol. 47, 2014, 231–237. DOI: 10.1267/ahc.14031
- ⑤ Tsukada T, Kouki T, Fujiwara K, Ramadhani D, Horiguchi K, Kikuchi M, and Yashiro T. Reassembly of anterior pituitary organization by hanging drop three-dimensional cell culture. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol. 46, 2013, 121-127. (論文賞) DOI: 10.1267/ahc.13015

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① Tsukada T, Ramadhani D, Syaidah R, Yashiro T. Transforming growth factor beta 2 from folliculostellate cells induces collagen synthesis in pericytes of rat anterior pituitary gland. 第 120 回日本解剖学会、兵庫、2015 年 3 月 21-23 日
- ② Ramadhani D, Tsukada T, Syaidah R, Yashiro T. Immunohistochemical analysis of laminin isoform expression in diethylstilbestrol (DES)-treated rat as prolactinoma model. 第 18 回日本内分泌病理学会、東京、2014 年 11 月 1-2 日
- ③ 塚田岳大、藤原研、屋代隆。ラット下垂体前葉における TGFβ2 の作用と TGFβ 受容体の組織内局在。第 55 回日本組織細胞化学会、長野、2014 年 9 月 27-28 日
- ④ 塚田岳大、Ramadhani Dini、藤原研、矢田部恵、喜幸富、屋代隆。ラット下垂体前葉における濾胞星状細胞と周皮細胞の相互作用：Transforming growth factor beta2 を介したコラーゲン合成。第 29 回日本下垂体研究会、東京、2014 年 8 月 8-10 日
- ⑤ Ramadhani D, Tsukada T, and Yashiro T. Alteration of laminin isoform expression in pituitary adenoma of diethylstilbestrol

- (DES)-treated rat. 第 29 回日本下垂体研究会、東京、2014 年 8 月 8-10 日
- ⑥ Tsukada T, Azuma M, Ramadhani D, Batchuluun K, and Yashiro T. Folliculostellate Cells Are Required for Laminin Release from Gonadotrophs in Rat Anterior Pituitary Gland. 16th International Congress of Endocrinology and The Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo. Chicago, IL, USA, 2014 年 6 月 21-24 日
- ⑦ 塚田岳大、屋代隆 (招待講演)。下垂体前葉細胞のクロストーク—三次元培養法を用いた新たなアプローチ。第 87 回日本内分泌学会、福岡、2014 年 4 月 24-26 日
- ⑧ 塚田岳大、藤原研、Ramadhani Dini、矢田部恵、屋代隆。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、栃木、2014 年 3 月 27-29 日
- ⑨ 塚田岳大、堀口幸太郎、菊地元史、屋代隆。ラット下垂体前葉における TGFb2 の発現とその作用。第 38 回日本比較内分泌学会、宮崎、2013 年 10 月 24-26 日
- ⑩ Ramadhani D, Tsukada T, Azuma M, Tofrizal A, Maliza R, Batchuluun K, Syaidah R, and Yashiro T. Spatio-temporal expression of laminin isoforms in rat anterior pituitary gland during the postnatal development. 第 17 回日本内分泌病理学会、神奈川、2013 年 10 月 4-5 日
- ⑪ Tsukada T, Fujiwara K, Ramadhani D, Kouki T, Kikuchi M, and Yashiro T. Folliculostellate cells interact with microvessel mural cell 'pericyte' to maintain collagen arrangement in rat anterior pituitary. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo. San Francisco, CA, USA, 2013 年 6 月 15-18 日
- ⑫ Ramadhani D, Tsukada T, and Yashiro T. Laminin isoform expression during the anterior pituitary development of rat. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo. San Francisco, CA, USA, 2013 年 6 月 15-18 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚田 岳大 (TSUKADA, Takehiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 50596210