

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860148

研究課題名(和文) プロテオグリカンによる下垂体前葉細胞の形態・機能調節機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of the mechanism for morphological changes and functions in rat anterior pituitary cells by use of proteoglycans.

## 研究代表者

堀口 幸太郎 (HORIGUCHI, KOTARO)

杏林大学・保健学部・講師

研究者番号：10409477

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)：下垂体前葉細胞の一つである濾胞星状細胞は、突起状の細胞質を伸ばした形態をもち、S100タンパクを発現することで同定される非ホルモン産生細胞である。そして細胞外マトリックス(ECM)の一種であるプロテオグリカンを発現することでも特徴づけられる。また濾胞星状細胞はheterogeneity性が高く、様々なサブタイプの細胞の総称であることが最近示唆されている。本研究では、プロテオグリカンの発現とECMに対する親和性を利用し、濾胞星状細胞の樹状細胞様サブタイプの単離に成功し、その機能を明らかにした。これはECMと細胞との関係性の観点から下垂体前葉組織構築に対して新たな知見を供与した。

研究成果の概要(英文)：S100 protein-expressing cells (folliculo-stellate cells) have a star-like appearance and are interconnected by cytoplasmic processes in the anterior pituitary gland. We reported that folliculo-stellate cells produce proteoglycans, which are components of the extracellular matrix (ECM) and are composed of a specific core protein substituted with covalently linked glycosaminoglycan chains. They also appear to possess multifunctional properties. Considering their pleiotropic features, folliculo-stellate cells are assumed to be of a heterogenous. They were classified into subtypes such as stem cells, progenitor cells, epithelial cells, astrocytes and dendritic cells. In the present study, we found a method for isolating dendritic cell-like folliculo-stellate cells by use of adherent activity to ECM and revealed their function. These findings bring a novel insight to the understanding of the mechanism of cellular arrangement in the 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 S100 タンパク陽性細胞 プロテオグリカン 樹状細胞 細胞外マトリクス

### 1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉は、5種類ホルモン産生細胞と非ホルモン産生細胞である濾胞星状細胞から構成され、生殖、代謝、ホメオスタシス維持に必須な内分泌組織である。ホルモン産生細胞は、視床下部因子による支配や末梢からのフィードバックによって機能制御を受けることが古くから報告されてきた。さらに、細胞間による相互作用も非常に重要であり、オートクライン、パラクラインによる制御、接着因子を介した近接細胞からの制御が報告されている。これらに加え、申請者は、細胞とその周囲の細胞外環境との相互作用、つまり、細胞外マトリックス (ECM) による機能制御に注目している。ECM には、基底膜を構成するラミニン、コラーゲン、細胞間に存在するプロテオグリカン (PGs) などがある。これら細胞外環境を構成する ECM とそこに組み込まれる液性因子の構成は、組織、細胞ごとに異なり、細胞はその環境に組み込まれた情報を読み取り、機能発現を行う。つまり、ECM は細胞の機能を支配する重要なパラクライン因子として存在することが予想されている。これまで内分泌組織における ECM による内分泌細胞機能調節に関する研究は驚くほど少なかった。

### 2. 研究の目的

細胞の周囲環境を形成する ECM に PGs がある。PGs は、細胞の機能や動きを調節する重要な生理活性物質として機能する。申請者は、下垂体前葉組織にも PGs が存在し、前葉内の濾胞星状細胞の一部から分泌されることを報告している。この結果は、PGs を分泌する一部の濾胞星状細胞が、前葉細胞の機能調節や細胞周囲環境構築に関わることを強く示唆した。濾胞星状細胞は、S100 タンパクを発現することで同定される非ホルモン産生細胞である。この濾胞星状細胞は heterogeneity 性が高く、申請者はその heterogeneity 性を分離する方法として ECM の基底膜成分であるラミニンとの親和性に着目した。親和性を示す濾胞星状細胞 (プロセスタイプ) と示さない細胞 (ラウンドタイプ) に分類できることを見出した。そこで本研究の目的として、濾胞星状細胞の heterogeneity 性を ECM に対する反応性により分類し、さらに PGs を分泌するもしくはしない濾胞星状細胞のサブタイプの機能を明らかにすることを試みた。

### 3. 研究の方法

ECM に反応性を示す濾胞星状細胞と示さない濾胞星状細胞の分離法の確立：  
S100 タンパク発現細胞が GFP を発現するトランスジェニックラット (S100bGFP ラット) を使って、セルソーティングにより GFP 陽性細胞 (濾胞星状細胞) のみを分取して、ECM コート上で初代培養を 24 時間行い、ECM との接着性の強弱からラウンドタイプとプロセ

スタイプを分離する方法を開発した。そして分離した 2 つの濾胞星状細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行うことで、差次的発現を示す遺伝子を抽出し、それぞれの細胞の特徴づけを試みた。

濾胞星状細胞のラウンドタイプから分泌されるケモカイン CXCL10 の発現と機能解析：  
PGs を発現しない濾胞星状細胞 (ラウンドタイプ) からケモカインの一つである CXCL10 とそのレセプターである CXCR3 の発現を分子生物学的手法、in situ hybridization 法を用いて明らかにし、さらにラット下垂体初代培養において、CXCR3 アゴニスト、アンタゴニストを使用することでその機能を解析した。

濾胞星状細胞のラウンドタイプから発現する GPR68 の機能解析：  
PGs を発現しない濾胞星状細胞 (ラウンドタイプ) からプロトンレセプターである GPR68 が発現することを分子生物学的手法、in situ hybridization 法を用いて明らかにし、さらにラット下垂体初代培養によってその機能を解析した。

### 4. 研究成果

ECM に反応性を示す濾胞星状細胞と示さない濾胞星状細胞の分離法の確立：  
基底膜 ECM であるラミニンとの親和性に着目し、ラミニンと接着性の強い濾胞星状細胞 (プロセスタイプ) と弱い細胞 (ラウンドタイプ) に分類できることを見出して、それぞれを簡単にピペッティング操作によって単離する方法を確立した。そして単離した細胞を使い、マイクロアレイ解析を行うことで差次的遺伝子発現を網羅的に行った。そしてプロセスタイプが PGs を発現する濾胞星状細胞であることを証明した。

濾胞星状細胞のラウンドタイプから分泌されるケモカイン CXCL10 の発現と機能解析：  
PGs を発現しないラウンドタイプからケモカインの一つである CXCL10 が発現することを分子生物学的手法、初代培養、in situ hybridization 法を用いて明らかにし、ラウンドタイプの濾胞星状細胞は樹状細胞様であることを証明した。さらに CXCL10 が ACTH 産生細胞における POMC 発現及び ACTH 分泌に影響を及ぼすことを明らかにした。

濾胞星状細胞のラウンドタイプから発現する GPR68 の機能解析：  
細胞周囲酸性環境を受容することで、炎症性サイトカインであるインターロイキン 6 (IL-6) を産生すること、さらに IL-6 は ACTH 産生細胞に作用し、その ACTH の前駆遺伝子である POMC 発現の抑制を引き起こすことを明らかにした。  
以上から、PGs を発現しないラウンドタイプ

の濾胞星状細胞は周囲ストレスを受容することで ACTH 産生を局所的に調節する樹状細胞様の性質と機能を持った細胞であることを明らかにした。

#### 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 12 件)

Fujiwara K, Horiguchi K, Maliza R, Tofrizal A, Batchuluun K, Ramadhani D, Syaidah R, Tsukada T, Azuma M, Kikuchi M, Yashiro T: Expression of the heparin-binding growth factor midkine and its receptor, Ptpz1, in adult rat pituitary. *Cell and Tissue Research*. 査読有 Vol. 359, pp. 909-914, 2015. doi: 10.1007/s00441-014-2073-8.

堀口幸太郎、館野こずえ、長谷川瑠美、瀧上周、大迫俊二: 下垂体前葉内に存在する S100 タンパク陽性細胞のサブタイプの単離とその機能解析, 杏林医学会誌. 査読有 Vol. 45, No. 4 pp. 137-143, 2014.

Tsukada T, Fujiwara K, Horiguchi K, Azuma M, Ramadhani D, Tofrizal A, Batchuluun K, Maliza R, Syaidah R, Kikuchi M, Yashiro T: Folliculostellate cells are required for laminin release from gonadotrophs in rat anterior pituitary. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 査読有 Vol. 47, pp. 239-245, 2014. doi: 10.1267/ahc.14036.

Horiguchi K, Higuchi M, Yoshida S, Nakakura T, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Kato T, Kato Y: Proton receptor GPR68 expression in dendritic cell-like S100 -positive cells of rat anterior pituitary gland: GPR68 induces interleukin-6 gene expression in extracellular acidification. *Cell and Tissue Research*. 査読有 Vol. 358, pp. 515-525, 2014. doi: 10.1007/s00441-014-1958-x.

Yoshida S, Ueharu H, Higuchi M, Horiguchi K, Nishimura N, Shibuya S, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y: Molecular Cloning of Rat and Porcine Retina-Derived POU Domain Factor 1 (POU6F2) from Pituitary cDNA Library *Journal of Reproduction and Development*. 査読有 Vol. 60, pp. 288-294, 2014. doi:10.1262/jrd.2014-023

Horiguchi K, Fujiwara K, Higuchi M, Yoshida S, Tsukada T, Ueharu H, Hasegawa

R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y: Expression of chemokine CXCL10 in dendritic cell-like S100 -positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell and Tissue Research*. 査読有 Vol. 357, pp. 757-765, 2014. doi: 10.1007/s00441-014-1864-2.

Fujiwara K, Maliza R, Tofrizal A, Batchuluun K, Ramadhani D, Tsukada T, Horiguchi K, Kikuchi M, Yashiro T: In situ hybridization analysis of the temporospatial 1 expression of the midkine/pleiotrophin family in rat embryonic pituitary gland. *Cell and Tissue Research*. 査読有 Vol. 357, pp. 337-344, 2014. doi: 10.1007/s00441-014-1875-z.

Horiguchi K, Fujiwara K, Yoshida S, Higuchi M, Tsukada T, Kanno N, Yashiro T, Tateno K, Ohsako S, Kato T, Kato Y: Isolation of dendritic cell-like S100 -positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell and Tissue Research*. 査読有 Vol. 357, pp. 301-308, 2014. doi: 10.1007/s00441-014-1817-9.

Tsukada T, Kouki T, Fujiwara K, Dini Ramadhani, Horiguchi K, Kikuchi M, Yashiro T: Reassembly of anterior pituitary organization by hanging drop three-dimensional cell culture. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 査読有 Vol. 46, pp. 121-127, 2013. doi: 10.1267/ahc.13015.

Syaidah R, Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Kikuchi M, Yashiro T: Laminin and collagen modulate expression of the small leucine-rich proteoglycan fibromodulin in rat anterior pituitary gland. *Cell and Tissue Research*. 査読有 Vol. 354, pp. 633-638, 2013. doi: 10.1007/s00441-013-1698-3

Jindatip D, Fujiwara K, Horiguchi K, Tsukada T, Kouki T, Yashiro T: Changes in fine structure of pericytes and novel desmin-immunopositive perivascular cells during postnatal development in rat anterior pituitary gland. *Anatomical Science International*. 査読有 Vol. 88, pp. 196-203, 2013. doi: 10.1007/s12565-013-0180-3.

Horiguchi K, Syaidah R, Fujiwara K, Tsukada T, Ramadhani D, Jindatip D, Kikuchi M, Yashiro T: Expression of the cell-surface heparan sulfate

proteoglycan syndecan-2 in developing rat anterior pituitary gland. *Cell and Tissue Research*. 査読有 Vol. 353, pp. 473-481, 2013. doi: 10.1007/s00441-013-1641-7.

〔学会発表〕(計 16 件)

招待講演

堀口幸太郎：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。明治大学生田研究知財ワークショップシンポジウム 第 2 回生殖内分泌セミナー(明治大学生田校舎 11 月 15 日), 2013.

一般口演

西村直人, 上春浩貴, 西原大翔, 渋谷汐里, 吉田彩舟, 樋口雅司, 堀口幸太郎, 加藤たか子, 加藤幸雄：下垂体特異的転写因子 PROP1 のプロモーター活性とその制御。第 119 回日本畜産学会(宇都宮 3 月 29 日), 2015.

上春浩貴, 吉田彩舟, 西村直人, 樋口雅司, 堀口幸太郎, 加藤たか子, 加藤幸雄：下垂体における神経堤由来細胞と S100 の発現。第 119 回日本畜産学会(宇都宮 3 月 28 日), 2015.

堀口幸太郎, 吉田彩舟, 藤原研, 樋口雅司, 塚田岳大, 加藤たか子, 館野こずえ, 長谷川瑠美, 瀧上 周, 大迫俊二, 屋代 隆, 加藤幸雄：下垂体前葉内 S100 タンパク質陽性細胞から分泌されるケモカイン CXCL10 の IFN- $\gamma$  による制御。第 41 回日本神経内分泌学会学術集会(東京 11 月 1 日), 2014.

東 森生, Khongorzul Batchuluun, 堀口幸太郎, 屋代 隆：ラット下垂体前葉における tissue inhibitor of metalloproteinase 発現細胞の同定。第 29 回日本下垂体研究会学術集会(八王子 8 月 9-11 日), 2014.

堀口幸太郎, 吉田彩舟, 藤原研, 樋口雅司, 塚田岳大, 加藤たか子, 館野こずえ, 長谷川瑠美, 瀧上 周, 大迫俊二, 屋代 隆, 加藤幸雄：樹状細胞様 S100 タンパク質陽性細胞から分泌されるケモカイン CXCL10 の機能解析。第 29 回日本下垂体研究会学術集会(八王子 8 月 9-11 日), 2014.

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 TGF $\beta$ 2 の発現とその作用。第 38 回日本比較内分泌学会大会(宮崎 10 月 25 日), 2013.

堀口幸太郎, 吉田彩舟, 藤原研, 樋口雅司, 加藤たか子, 館野こずえ, 長谷川瑠美, 瀧上 周, 大迫俊二, 屋代 隆, 加藤幸雄：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(宮崎 10 月 25 日), 2013.

八子英司, 堀口幸太郎, 樋口雅司, 藤原研, 吉田彩舟, 陳黙, 菅野尚子, 加藤たか子, 屋代隆, 加藤幸雄：ラット胎仔期下垂体に侵入する S100b-GFP 陽性細胞は血管形成に関与する。第 106 回日本繁殖生物学会大会(東京 9 月 12-14 日), 2013.

堀口幸太郎, 吉田彩舟, 樋口雅司, 長谷川瑠美, 瀧上 周, 加藤たか子, 大迫俊二, 加藤幸雄：ラット下垂体前葉におけるケモカイン CXCL10 の発現。第 106 回日本繁殖生物学会大会(東京 9 月 12-14 日), 2013.

八子英司, 堀口幸太郎, 樋口雅司, 藤原研, 吉田彩舟, 陳黙, 菅野尚子, 加藤たか子, 屋代隆, 加藤幸雄：ラット胎仔期に濾胞星状細胞様細胞が下垂体に侵入する。第 28 回日本下垂体研究会学術集会(花巻 8 月 10 日), 2013.

堀口幸太郎, 吉田彩舟, 藤原研, 樋口雅司, 加藤たか子, 大迫俊二, 屋代隆, 加藤幸雄：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(花巻 8 月 10 日), 2013.

屋代 隆, Depicha Jindatip, Alimuddin Tofryzal, 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。第 28 回日本下垂体研究会学術集会(花巻 8 月 10 日), 2013.

Yako H, Higuchi M, Yoshida S, Horiguchi K, Fujiwara K, Kanno N, Chen M, Ueharu H, Tsuda M, Kato T, Yashiro Y and Kato Y: S100b-positive cells (follicle satellite cell) drove from two different origins in the rat pituitary. THE ENDOCRINE SOCIETY 'S 95<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING (San Francisco 15 June), 2013.

Syaidah I, Horiguchi K, Fujiwara K, Yashiro T: Laminin and collagen type-I modulate fibromodulin expression in FS cells of anterior pituitary gland. THE ENDOCRINE SOCIETY 'S 95<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING (San Francisco 15 June), 2013.

Fujiwara K, Horiguchi K, Jindatip D, Ly F, Yashiro T: Identification of midkine-expressing cells in the anterior pituitary gland of adult rats. THE ENDOCRINE SOCIETY 'S 95<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING (San Francisco 15 June), 2013.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/  
health/staff/detail.php?id=hea40212](http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/health/staff/detail.php?id=hea40212)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀口 幸太郎 (HORIGUCHI KOTARO)

杏林大学・保健学部・講師

研究者番号：10409477