

令和元年6月21日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18951

研究課題名(和文) 内分泌細胞における細胞内分解系制御マシナリー解明への形態学的アプローチ

研究課題名(英文) Morphological approach to understanding the intracellular degradation machinery in endocrine cells

研究代表者

暮地本 宙己 (Bochimoto, Hiroki)

帯広畜産大学・畜産学部・特任准教授

研究者番号：60632841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GnRH誘導体持続投与ラットモデルの下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造と機能分子局在を解析した。その結果、GnRH受容体の持続的刺激により性腺刺激ホルモン産生細胞が機能的に抑制され、同時にER patchが出現した。ER patchにはシャペロンやERAD関連分子が集積した。ER patchが出現した性腺刺激ホルモン産生細胞には多層膜構造物とp62の細胞内蓄積が出現した。これらの所見は、GnRHアゴニストによる刺激を受けたLH/FSH産生細胞において、ERADがオートファジーと関わっている可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞内微細構造と機能分子局在変化の正確な把握のために、光学顕微鏡、透過電顕および走査電顕技術を駆使・洗練する必要があり、本研究遂行によって確度の高い、精密な形態学的解析技術を確立することができた。また、本研究では性腺刺激ホルモン産生細胞における生理機能を形態学的側面と照合することで、同細胞における細胞内分解系に関わる新たな所見を発見でき、同細胞の生理機能の基盤解明に貢献した。これらの基盤的知見は今後、応用的に性ホルモンに関わる疾患の診断・治療に役立つ可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the ultrastructural characteristics with functional molecular localization in rat pituitary gonadotropes under continuous administration of GnRH agonist. Upon continuous stimulation on the GnRH receptor, anomalous tubuloreticular ER patches appeared concomitant with functional suppression of gonadotropes. In the ER patches that appeared in the stimulated gonadotropes, ER molecular chaperons and ERAD-related molecules were accumulated. In parallel to appearance of anomalous ER patches, the accumulation of p62 and multilamellar components as reflection of activated autophagy processes appeared in cytoplasm of the stimulated gonadotropes. These findings indicated that ERAD may be related to autophagy in gonadotropes stimulated by a GnRH agonist.

研究分野：顕微解剖学

キーワード：電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内分解系は、細胞質や細胞内小器官を隔離膜で取り囲みリソソームで分解するオートファジーと、蛋白をユビキチン化しプロテアソームで分解するユビキチン-プロテアソーム系 (Ubiquitin-proteasome system: UPS)の2系統に大別される。オートファジーについては、酵母でオートファジーに必要な遺伝子群が同定され、機能的側面についての研究の進展が目覚ましい (M. Tsukada and Y. Ohsumi, FEBS Lett., 1993.)。しかしオートファジーはもともと電顕観察で発見され、その微細構造も詳細に検討されているが、UPSに関する細胞内分解系の研究は主に生化学的手法で行われている。

研究代表者は、自身の研究過程で生体条件下でLH/FSH産生細胞の機能と形態を対比的に検討できるGnRH誘導体持続投与ラットモデルを確立した。このモデルを用いてGnRH agonistを投与後初期のラットのLH/FSH産生細胞の微細構造を検討したところ、管状構造が集積した小胞体塊 (ER patch)が一過性に出現することを発見し、さらにBap31やユビキチンE3リガーゼHRD1など、UPSにカテゴライズされる小胞体関連分解 (ER associated degradation: ERAD)関連分子が集積する所見を見出した。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、研究代表者は、主にGnRH誘導体持続投与ラットモデルのLH/FSH産生細胞に出現するER patchの微細構造と機能分子局在を詳細に解析することで、細胞内のUPSに関わる形態学的特性を明らかにしたいと考え、関連する細胞内微細構造や機能分子局在を検討することを目的として、本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

GnRH誘導体持続投与ラットモデルとして8週齢のWister系雄ラット (体重: 約200g) を用いて、酢酸リュープロレリン (Sigma Aldrich、15 µg/day)、酢酸プセレリン (Sigma Aldrich、15 µg/day)、アンチド (Sigma Aldrich、7 µg/day) を充填した浸透圧ポンプ (ALZET mini-osmotic pump model 2001) を背部皮下へ包埋した実験群を作製し解析に供した。

### (2) 形態解析

#### 標本作製

光顕免疫組織化学用の組織標本は4% パラフォルムアルデヒド (PFA) と4% スクロースを含む0.1M リン酸緩衝液 (PB、pH7.4) で灌流あるいは浸漬固定後、組織の一部はエタノール系列で脱水し、プロピレンオキサイドを仲介剤としてEpon812樹脂を浸透させた後、24時間、60 °Cの条件で重合し包埋した。また一部はパラフィンやO.C.T compoundに包埋した。

微細構造解析のための透過電顕観察用標本は2% グルタルアルデヒド (GA) 単独あるいは2% PFAを含む0.1M PBで灌流あるいは灌流固定後、組織を1% 四酸化オスミウム (OsO<sub>4</sub>) を含む0.1M PB溶液で2時間、4 °Cで後固定し、Epon812樹脂やL.R.White樹脂に包埋した。

特に、免疫組織化学用の透過電顕用標本は0.5% GAと0.5% PFAを含む0.1M PBで灌流あるいは灌流固定後、組織を速やかに0.5% OsO<sub>4</sub>を含む0.1M PB溶液で1時間、4 °Cで後固定した後、1% 燐タングステン酸を含む70% エタノールで20分×3、4 °Cで脱水し、L.R.White樹脂を浸透させ、24時間、60 °Cの条件で重合し包埋した。

走査電顕観察用の組織標本は0.5% GAと0.5% PFAを含む0.1M PBで灌流あるいは灌流固定後、組織を速やかに1% OsO<sub>4</sub>を含む0.1M PB溶液で2時間、4 °Cで後固定した後、25%および50% DMSO溶液に30分ずつ浸漬して氷晶防止処理を行った。その後試料を液体窒素中で凍結割断

し0.1M PBで洗浄し、0.1% OsO<sub>4</sub>を含む0.1M PB溶液に移動して点灯した蛍光灯下で72時間、20 で浸軟処理を施した。浸軟後試料は1% OsO<sub>4</sub>を含む0.1M PB溶液で1時間、4 で再固定後に0.1M PBで洗浄し、1% タンニン酸-1% OsO<sub>4</sub>による導電染色後、エタノール系列および酢酸イソペンチルで脱水し臨界点乾燥機で乾燥した。

#### 光顕免疫組織化学

Epon標本から作製した準超薄切片や、パラフィンあるいはO.C.T compound包埋標本から作製した切片を用いて、標的機能分子を標識した。切片は1.5% 正常ウマ血清による非特異的吸着のブロッキング後に一次抗体を12時間、20 で結合させ、緩衝液(0.5M NaCl - 0.01M PB)で洗浄し、さらに一次抗体の動物種に対応した二次抗体を3時間、20 で結合させた後抗原局在部位を可視化し観察した。

#### 電顕免疫組織化学

EponおよびL.R.White包埋標本から90-100nm厚の超薄切片を作製し、5% 正常ウマ血清による非特異的吸着のブロッキング後に一次抗体を12時間、20 で結合させ、緩衝液(0.1% BSA含有0.5M NaCl - 0.02M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.2)で良く洗浄し、一次抗体の動物種に対応した金コロイド標識IgG抗体(金コロイド径 5-15nm)を1時間、20 で結合させる事で抗原局在部位を可視化した。金コロイド標識した切片は電子染色を行い観察した。

#### 走査電顕観察

オスミウム浸軟試料をアルミニウム台にマウントした後、イオン Sputter でPt-Pdコーティングを施し、電解放射型走査型電子顕微鏡を用いて高倍観察した。

### (3) 機能解析

GnRH誘導体持続投与ラットモデルについて、実験群から血漿を調整し、また下垂体組織からの蛋白およびmRNA抽出を行い、血中LH濃度の測定やWestern blotting による蛋白発現解析、qPCR法を用いた遺伝子発現解析を実施した。

## 4. 研究成果

まず、お互いに分子構造の異なるGnRHアゴニストである酢酸リュープロレリンあるいは酢酸ブセレリン、またはGnRHアンタゴニストであるアンチドの持続投与実験モデルラットに対して、血中LH濃度測定や、ER patchについての光顕免疫組織化学によるCNXおよびBiP集積の確認、あるいは電顕による微細構造の観察を行うことで、LH/FSH産生細胞に出現するER patchがGnRHアゴニストによるシグナル伝達刺激を介して生じていることを確認した。その後、酢酸リュープロレリン持続投与モデルラットを主に用いてER patchに関連する細胞内微細構造の検討を行った。ER patchが出現したLH/FSH産生細胞の微細構造を詳細に電顕で観察したところ、細胞質を分画しER patchとは異なる形態をとった多層膜構造体が、ER patchに隣接して出現しており、さらに一部のER patchが多層膜構造体によって隔離されることを発見した。そこでオートファジーの指標となる特異的分解蛋白質p62と、ER patchマーカーとなるCNXおよび細胞標識のためのLHに対する一次抗体を用いた多重蛍光標識観察を実施したところ、ER patchが出現したLH/FSH産生細胞でのみ特異的にp62の細胞内蓄積がみられた。さらに実験群を酢酸リュープロレリン投与後1、4、12、24、48、96、168時間の時系列に細分し、ER patchの出現とp62蓄積の時間的特性について解析したところ、ER patchは同剤持続投与12~48時間後に、p62の細胞内蓄積も24~48時間後に出現することから、時間的相関性があることも明らかとなった。UPSがオートファジーと関係をもつ可能性はこれまでも指摘されており(S. A. Houck, et al. Mol. Cell, 2014.)、上記所見はER patchとオートファジーが統合的に制御さ

れている可能性を示すものと考えられた。このような現象が生じる原因として、一過性のホルモン生成亢進による不良品蛋白質の増加が想定されたため、同様の時系列における血清LH濃度およびLH mRNAの下垂体発現量を検討した。しかし、予想に反して、血清LH濃度は同剤持続投与後4時間後からピークアウトするにも関わらずLH mRNA発現は薬剤投与後持続的に低下した。このことはGnRHアゴニスト刺激を受けたLH放出・枯渇後も、LH/FSH産生細胞内に代償性のLH 生合成亢進に伴う不良品蛋白質増加を生じないことを示し、GnRHアゴニストのGnRH受容体へのdesensitization作用が薬剤投与後早期から出現することを示している。そこで下垂体のGnRH受容体mRNA発現とGnRH受容体量を検討したところ、いずれも薬剤投与後12-24時間以降に低下し、ER patchやp62の細胞内蓄積との時間的相関性を示した。以上のことから、GnRHアゴニストによるシグナル刺激を受けたLH/FSH産生細胞において、GnRHアゴニストのdesensitization作用と関連したGnRH受容体の量的制御に、ER patchとオートファジーが統合的に関わっている可能性が示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

- [1] H. Bochimoto, D. Kondoh, R. Nagata, Y. Ishihara, J. Tomiyasu, K. Han, K. Shimada, M. Sasaki, N. Kitamura, M. Fukushima, **Ultrastructural changes in colonic epithelial cells in a rat model of inflammatory bowel disease.**, *Microsc. Res. Tech.* (2019) jemt.23285. doi:10.1002/jemt.23285. 査読あり
- [2] Y. Bando, Y. Hagiwara, Y. Suzuki, K. Yoshida, Y. Aburakawa, T. Kimura, C. Murakami, M. Ono, T. Tanaka, Y.-P. Jiang, B. Mitrovi, H. Bochimoto, O. Yahara, S. Yoshida, **Kallikrein 6 secreted by oligodendrocytes regulates the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis.**, *Glia*. 66 (2018) 359–378. doi:10.1002/glia.23249. 査読あり
- [3] Y. Maeda, S. Kudo, K. Tsushima, E. Sato, C. Kubota, A. Kayamori, H. Bochimoto, D. Koga, S. Torii, H. Gomi, T. Watanabe, M. Hosaka, **Impaired Processing of Prohormones in Secretogranin III-Null Mice Causes Maladaptation to an Inadequate Diet and Stress.**, *Endocrinology*. 159 (2018) 1213–1227. doi:10.1210/en.2017-00636. 査読あり
- [4] D. Koga, H. Bochimoto, S. Kusumi, T. Ushiki, T. Watanabe, **Changes in the three-dimensional ultrastructure of membranous organelles in male rat pituitary gonadotropes after castration.**, *Biomed. Res.* 38 (2017) 1–18. doi:10.2220/biomedres.38.1. 査読あり
- [5] H. Bochimoto, N. Matsuno, Y. Ishihara, T. Shonaka, D. Koga, Y. Hira, Y. Nishikawa, H. Furukawa, T. Watanabe, **The ultrastructural characteristics of porcine hepatocytes donated after cardiac death and preserved with warm machine perfusion preservation.**, *PLoS One*. 12 (2017) e0186352. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186352. 査読あり
- [6] R. Nozaki, T. Kono, H. Bochimoto, T. Watanabe, K. Oketani, Y. Sakamaki, N. Okubo, K. Nakagawa, H. Takeda, **Zanthoxylum fruit extract from Japanese pepper promotes autophagic cell death in cancer cells.**, *Oncotarget*. 7 (2016) 70437–70446. doi:10.18632/oncotarget.11926. 査読あり

- [7] D. Koga, H. Bochimoto, T. Watanabe, T. Ushiki, **Backscattered electron image of osmium-impregnated/macerated tissues as a novel technique for identifying the cis-face of the Golgi apparatus by high-resolution scanning electron microscopy.**, *J. Microsc.* 263 (2016) 87–96. doi:10.1111/jmi.12379. 査読あり
- [8] L. Meng, N. Matsuno, K. Watanabe, M. Furukori, H. Obara, H. Bochimoto, T. Watanabe, H. Fukukawa, **Scanning Electron Microscopy Findings of Machine Perfused Liver Graft After Warm Ischemia Between Hypothermic and Rewarming Machine Perfusion in Pigs.**, *Transplant. Proc.* 48 (2016) 2467–2470. doi:10.1016/j.transproceed.2016.03.059. 査読あり
- [9] Y. Minami, T. Sasaki, H. Bochimoto, J.-I. J. Kawabe, S. Endo, Y. Hira, T. Watanabe, S. Okumura, N. Hasebe, Y. Ohsaki, **Prostaglandin I2 analog suppresses lung metastasis by recruiting pericytes in tumor angiogenesis.**, *Int. J. Oncol.* 46 (2015) 548–54. doi:10.3892/ijo.2014.2783. 査読あり
- [10] N. Matsuno, M. Furukori, K. Watanabe, T. Syonaka, L. Meng, K. Imai, H. Bochimoto, T. Watanabe, Y. Tazaki, Y. Nishikawa, H. Obara, S. Enosawa, H. Furukawa, **Multipronged strategy of purposeful use of organs from non-heart beating donors current status and future aspects of machine perfusion preservation in liver transplantation.**, *Organ Biol.* 22 (2015) 121–127. doi:10.11378/organbio.22.121. 査読あり
- [11] D. Koga, S. Kusumi, H. Bochimoto, T. Watanabe, T. Ushiki, **Correlative Light and Scanning Electron Microscopy for Observing the Three-Dimensional Ultrastructure of Membranous Cell Organelles in Relation to Their Molecular Components.**, *J. Histochem. Cytochem.* 63 (2015) 968–79. doi:10.1369/0022155415609099. 査読あり
- [12] T. Suzuki, T. Kono, H. Bochimoto, Y. Hira, T. Watanabe, H. Furukawa, **An injured tissue affects the opposite intact peritoneum during postoperative adhesion formation.**, *Sci. Rep.* 5 (2015) 7668. doi:10.1038/srep07668. 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

暮地本 宙己、甲賀 大輔、板東 良雄、穂坂 正博、牛木 辰男、渡部 剛「**持続的なGnRH刺激を受けたラットLH/FSH産生細胞における細胞内膜系の変化と細胞内分解システムの関係**」、『日本解剖学会第61回解剖学会東北・北海道連合支部学術集会』、盛岡、2015年8月

暮地本 宙己、甲賀 大輔、渡部 剛「**プロピルチオウラシル(PTU)投与後のラット下垂体前葉甲状腺刺激ホルモン(TSH)産生細胞における細胞内小器官の変化**」、『平成27年度公益社団法人日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会』、札幌、2015年12月

暮地本 宙己「**持続的なGnRH刺激を受けたラットLH/FSH産生細胞における細胞内膜系の変化**」、『第22回グリアクラブ』、小樽、2017年1月

暮地本 宙己「形態学的手法を用いた生命現象解明へのアプローチ～内分泌細胞における内  
膜系小器官の応答の解析を中心に～」、『第35回北海道三大学獣医解剖学合同セミナー』、夕  
張、2017年1月（招待講演）

〔その他〕

研究代表者ホームページ

<http://researchmap.jp/bochimoto/>

## 6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実  
施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する  
見解や責任は、研究者個人に帰属されます。