

令和元年6月14日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08475

研究課題名(和文)細胞表面抗原を利用した下垂体前葉組織幹細胞の同定と単離、その分化誘導の探索

研究課題名(英文) Identification and isolation of cluster of differentiation (CD) 9-positive pituitary adult stem/progenitor cells in rats

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：組織幹細胞は多分化能を持ち、組織内における細胞供給源となっている。申請者らは、成体ラット下垂体前葉の組織幹細胞と予想されるS100⁺/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞を約86%以上の純度で分画することに成功した。単離した細胞はBMPシグナリングによって誘導される転写因子ID2の発現増加によって血管内皮細胞へと分化することを明らかにした。また血管新生の亢進が見られる下垂体腺腫モデルラットの下垂体前葉でも同様の血管新生が起こっていることも示唆した。またS100⁺/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞から3次元培養を利用することでホルモン産生細胞への分化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、成体下垂体前葉の組織幹細胞と認識されているSOX2陽性細胞で膜タンパク質CD9が発現することが明らかとなり、そのCD9に対する抗体を利用することで、簡便に組織幹細胞を純化することが可能となった。さらに純化した組織幹細胞をin vitroの実験系に供与することで、胚葉を超えた血管内皮細胞への分化に成功した。これは、下垂体前葉の組織幹細胞からの血管新生を伴う組織発生機構の解明と成体でのホルモン産生細胞の供給システム解明への一助となる。さらにプロラクチノーマという下垂体腺腫の発生メカニズム及び薬理的対処への応用にも寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：S100⁺ protein, SOX2 and CXCR4-triple positive (S100⁺/SOX2/CXCR4-positive) cells have been suggested to be adult pituitary stem/progenitor cells. We found that cluster of differentiation (CD) 9 is expressed in the majority of adult rat S100⁺/SOX2/CXCR4-positive cells, and we succeeded in isolating them using an anti-CD9 antibody with a pluriBead-cascade cell isolation system. Cultivation of these cells showed their capacity to differentiate into endothelial cells via the up-regulation of transcription factor ID2 and bone morphogenetic protein signaling, and hormone-producing cells. By using the anterior lobes of prolactinoma model rats, the localization of S100⁺/SOX2/CXCR4/CD9-positive cells was confirmed in the tumour-induced neovascularisation region. Thus, the present study should provide a better understanding of the adult tissue stem cells of the anterior lobe and further preclinical and clinical studies on tumour vascularisation.

研究分野：組織学

キーワード：下垂体 幹細胞 CD9 細胞表面抗原 分化 BMP

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

1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉は、ホルモンの合成・分泌を行い、成長、生殖、代謝、行動など多くの生体機能の制御に関与している重要な内分泌器官である。5種類のホルモン産生細胞と、非ホルモン産生細胞であるS100陽性細胞と、血管系の細胞から構成される。そして生体の生理状態に応じてホルモン産生量変動やホルモン産生細胞の割合などが調節される。このホルモン産生細胞の供給は、分化能を持つ幹・前駆細胞が担っていると考えられているものの、依然として未解明である。そして最近、S100陽性細胞が下垂体前葉の組織幹細胞として注目され始めている。S100陽性細胞は幹細胞マーカーであるSOX2陽性であり、申請者らは幹細胞マーカーCXCR4が発現することも明らかにした(Horiguchi et al. *Endocrinology*. 2012)。また申請者らは、S100、SOX2、CXCR4陽性細胞(S100/SOX2/CXCR4陽性細胞)は膜タンパク質CD9を発現すること、そのCD9抗体とビーズを利用した抗体ビーズトラップ法により、ラット下垂体前葉からS100/SOX2/CXCR4陽性細胞の単離、培養に成功している。さらにS100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞を血管内皮細胞へと分化させることに成功している。

2. 研究の目的

申請者はSOX2/CXCR4陽性細胞をCD9発現及びその抗体の利用により単離することに成功したことから、(1) S100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞の下垂体前葉組織幹細胞性を証明し、(2) S100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞から血管内皮細胞への分化過程とその制御機構の解明、さらに(3) ホルモン産生細胞への分化誘導を目指す。これら3点から幹・前駆細胞によるホルモン産生細胞の供給システム解明への一助とする。

3. 研究の方法

(1) S100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞の下垂体前葉組織幹細胞性の証明

成体雄ラット下垂体前葉から、細胞表面抗原に対する抗体(抗ラットCD9モノクローナル抗体, BD Pharmingen Co.)と目的細胞を分離できるキット pluriBead® Cell Separation kit を使って、S100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞を単離する。この細胞からRNAを抽出し、様々な組織幹細胞マーカーである因子の発現量をリアルタイムPCRで解析し、その幹細胞性を証明する。

(2) 血管網様構造への分化過程とその制御機構の解明

申請者らは、単離したS100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞を細胞外マトリックスの一つであるラミニン存在下、低密度(2.0×10^4 cells/cm²)、ウシ胎児血清(FBS)添加した培養液で単層培養すると、血管新生で見られる網目様構造を形成することを明らかにしている。これは幹細胞から血管新生に観察される動きであると予想される。この分化機構がどのように制御されているかを網羅的な遺伝子発現解析により明らかにする。申請者が発見した特定の培養法により血管網様構造形成したものとしていない細胞から、RNA抽出後マイクロアレイを行う。下垂体前葉組織幹細胞から内皮細胞分化に誘導する遺伝子を抽出し、その発現促進・抑制により分化誘導、抑制を行い、形態学的観察を行う。

(3) ホルモン産生細胞への分化誘導

単離したS100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞をES細胞の培養で利用される3次元培養(ハンギングドロップ)によって培養する。そこに多種の成長因子などを投与し、ホルモン産生細胞への分化を組織学的及び電子顕微鏡により観察する。さらに遺伝子発現、ホルモン分泌を解析する。

4. 研究成果

(1) S100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞の下垂体前葉組織幹細胞性の証明

CD9抗体を用いた抗体ビーズトラップ法によりラット下垂体からS100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞の単離を試みた。その結果、CD9抗体陽性画分からは86.3%の割合でS100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞の単離に成功した。さらにCD9陽性画分と陰性画分での多種の幹細胞マーカー遺伝子発現を解析し結果、*Cd9*、*Cd13*、*Cd24*、*Cd133*、*Sox2*、*Sox9*、*Propr1*、*Cadh1*、*Ehb2*、*Cxcr4*がCD9陽性画分に優位に高い発現を示した。また単離したCD9陽性細胞がS100、SOX2陽性であることを免疫組織化学的に観察した(Horiguchi et al. *Scientific Reports*. 2018)。

(2) 血管網様構造への分化過程とその制御機構の解明

単離したS100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞を血管内皮細胞に分化させたものとさせていないものからRNAを抽出後、cDNAマイクロアレイを行い網羅的に差次的遺伝子発現を解析した。その結果、bone morphogenetic protein (BMP)のシグナルに関わる遺伝子群の発現が分化により増加していたことから、BMPシグナル阻害剤や各遺伝子のsiRNAを用いることにより、S100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞から血管内皮細胞への分化は、転写因子ID2から始まるBMPシグナリングによって誘導されることが明らかとなった。また血管新生の過剰な亢進が見られるプロラクチノーマモデルラットを用いて、CD9発現及びID2、BMPシグナリング関連遺伝子群の発現解析を行ったところ、S100/SOX2/CXCR4/CD9陽性細胞の血管内皮細胞分化と非常に似た遺伝子発現が見られることを明らかにした(Horiguchi et al. *Scientific Reports*. 2018)。

(3) ホルモン産生細胞への分化誘導

単離した S100 /SOX2/CXCR4/CD9 陽性細胞を 3 次元培養し、S100 /SOX2/CXCR4/CD9 陽性細胞凝集塊を形成させた。その凝集塊をマトリゲルコートしたウェル上で bFGF や EGF さらに Wnt シグナリング抑制剤を添加することで、成長ホルモン、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、黄体形成ホルモンという 5 種類の下垂体前葉ホルモン陽性を示す細胞を検出した。これは下垂体前葉ホルモン産生細胞が凝集塊から発生(分化)したと考えられる。特に、成長ホルモン産生細胞とプロラクチン産生細胞が多く観察された(未発表)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Tsukada T, Isowa Y, Kito K, Yoshida S, Toneri S, Horiguchi K, Fujiwara K, Yashiro T, Kato T, Kato Y: Identification of TGF β -induced proteins in non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF by SILAC-assisted quantitative mass spectrometry, Cell Tissue Research. 査読有、In press. 2019
DOI: 10.1007/s00441-018-02989-2

Ueharu H, Yoshida S, Kanno N, Horiguchi K, Nishimura N, Kato T, Kato Y: SOX10-positive cells emerge in the rat pituitary gland during late embryogenesis and start to express S100 β , Cell Tissue Research. 査読有、Vol.372, No.1, 2018, pp.77 - 90
DOI: 10.1007/s00441-017-2724-7

Horiguchi K, Fujiwara K, Yoshida S, Nakakura T, Arae K, Tsukada T, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y: Isolation and characterisation of CD9-positive pituitary adult stem/progenitor cells in rats, Scientific Reports, 査読有、Vol. 8, No.1, 2018, pp.5533
DOI: 10.1038/s41598-018-23923-0

Yoshida S, Nishimura N, Yurino H, Kobayashi M, Horiguchi K, Yano K, Hashimoto S, Kato T, Kato Y: Differentiation capacities of PS-clusters, adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchymal-niche, of the rat anterior lobe, PLoS ONE, 査読有、Vol.13, No.4, 2018, e0196029
DOI: 10.1371/journal.pone.0196029

堀口幸太郎、長谷川瑠美、瀧上周、大迫俊二: 下垂体前葉におけるケモカインおよびケモカインレセプターの発現とその機能解析、杏林医学会誌、査読有、49 巻、2 号、2018、pp.117 - 125
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/kyorinmed/-char/ja>

Tsukada T, Yoshida S, Fujiwara K, Yako H, Horiguchi K, Isowa Y, Yashiro T, Kato T, Kato Y: The non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF can possess pericyte properties in the presence of TGF β , Cell Tissue Research, 査読有、Vol.371, No.2, 2017, pp.339-350
DOI: 10.1007/s00441-017-2758-x

Yoshida S, Kato T, Kanno N, Nishimura N, Nishihara H, Horiguchi K, Kato Y: Cell type-specific localization of Ephs pairing with ephrin-B2 in the rat postnatal pituitary gland, Cell Tissue Research, 査読有、Vol.370, No.1, 2017, pp. 99 - 112
DOI: 10.1007/s00441-017-2646-4

Nakakura T, Suzuki T, Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Asano-Hoshino A, Tanaka H, Arisawa K, Nishijima Y, Nekooki-Machida Y, Kiuchi Y, Hagiwara H: Expression and localization of forkhead 1 box protein FOXJ1 in S100 β -positive multiciliated cells of the rat pituitary, Medical molecular morphology, 査読有、Vol.50, No.2, 2017, pp. 59 - 67
DOI: 10.1007/s00795-016-0148-1

Horiguchi K, Nakakura T, Yoshida S, Tsukada T, Kanno N, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Kato T, Kato Y: Identification of THY1 as a novel thyrotrope marker and THY1 antibody-mediated thyrotrope isolation in the rat anterior pituitary gland, Biochemical and biophysical research communications, 査読有、2016, Vol.480, pp. 273 - 279

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.049

Syaidah R, Tsukada T, Azuma M, Horiguchi K, Fujiwara K, Kikuchi M, Yashiro T: Fibromodulin Expression in Folliculostellate Cells and Pericytes Is Promoted by TGF Signaling in Rat Anterior Pituitary Gland, *Acta histochemica et cytochemica*, 査読有、Vol.49、No.6、2016、pp.171 - 179
DOI: 10.1267/ahc.16021

Horiguchi K[†], Yako H[†], Yoshida S, Fujiwara K, Tsukada T, Kanno N, Ueharu H, Nishihara H, Kato T, Yashiro T, Kato Y: S100 β -positive cells of mesenchymal origin reside in the anterior lobe of the embryonic pituitary gland, *PLoS ONE*, 査読有、e0163981、2016
[†]These authors contributed equally to this work
DOI: 10.1371/journal.pone.0163981

Yoshida S, Nishimura N, Ueharu H, Nishihara H, Kanno N, Higuchi M, Horiguchi K, Kato T, Kato Y: Isolation of adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchyma of the rat anterior lobe, *Stem Cell Research*, 査読有、Vol.17、2016、pp. 318 - 329
DOI: 10.1262/jrd.2015-092

Tsukada T, Azuma M, Horiguchi K, Fujiwara K, Kouki T, Kikuchi M, Yashiro T: Folliculostellate cell interacts with pericyte via TGFbeta2 in rat anterior pituitary, *The Journal of endocrinology*, 査読有、Vol.229、2016、pp. 159 - 170
DOI: 10.1530/JOE-16-0033

Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yoshida S, Higuchi M, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y: CXCL10/CXCR3 signaling mediates inhibitory action by Interferon-Gamma on CRF-stimulated adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release. *Cell Tissue Research*, 査読有、Vol.364、2016、pp.395 - 404
DOI: 10.1007/s00441-015-2317-2

〔学会発表〕(計 27 件)

招待講演

堀口幸太郎: S100 陽性細胞の多様性 . シンポジウム「下垂体の発生」第 44 回日本神経内分泌学会学術集会 (相模原 10 月 21 日) , 2017

一般口演

藤原 研、塚田岳大、堀口幸太郎、大野伸彦: ラット下垂体前葉における C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 発現細胞の同定 . 第 124 回日本解剖学会 (新潟 3 月 27 - 28 日) , 2019

中倉敬、鈴木健史、堀口幸太郎、藤原研、塚田岳大、萩原治夫: ラット下垂体 S100 陽性線毛細胞の分子形態学的特徴 . 第 43 回日本比較内分泌学会 (仙台 11 月 9 - 11 日) , 2018

吉田彩舟、西原大翔、藤原研、堀口幸太郎、加藤たか子、屋代隆、加藤幸雄: レチノイン酸シグナルは下垂体特異的転写因子 *Prop1* の発現を制御している . 第 45 回神経内分泌学会 (東京 10 月 27 - 28 日) , 2018

藤原 研、東 森生、堀口幸太郎、塚田岳大、大野伸彦、屋代 隆: BMP-6 は成体ラット下垂体前葉のゴナドトロフの機能調節に関与する . 第 45 回神経内分泌学会 (東京 10 月 27 - 28 日) , 2018

堀口幸太郎、吉田彩舟、藤原 研、塚田岳大、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代 隆、加藤たか子、加藤幸雄 . ラット上衣細胞における膜タンパク質 CD9 の発現 . 第 45 回神経内分泌学会 (東京 10 月 27 - 28 日) , 2018

吉田彩舟、藤原研、西原大翔、堀口幸太郎、加藤たか子、屋代隆、加藤幸雄: 下垂体発生過程における転写因子 *Prop1* のレチノイン酸シグナルによる発現制御解析 . 第 111 回日本繁殖生物学会大会 (上田 9 月 13 - 15 日) , 2018

吉田彩舟、藤原研、西原大翔、堀口幸太郎、加藤たか子、屋代隆、加藤幸雄: 下垂体特異的転写因子 *Prop1* の発現はレチノイン酸による制御を受ける . 第 33 回 日本下垂体研究会学術集会 (高知 8 月 17-19 日) , 2018

中倉 敬、鈴木 健史、堀口幸太郎、藤原研、塚田岳大、萩原 治夫：ラット下垂体線毛細胞における細胞生物学的性質の解析．第 33 回 日本下垂体研究会学術集会（高知 8 月 17-19 日） 2018

藤原 研、東 森生、堀口幸太郎、塚田岳大、大野伸彦、屋代 隆：ラット下垂体前葉細胞における BMP-6 の作用：DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析．第 33 回 日本下垂体研究会学術集会（高知 8 月 17-19 日） 2018

堀口幸太郎、吉田彩舟、中倉 敬、藤原 研、塚田岳大、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代 隆、加藤たか子、加藤幸雄：下垂体中葉側 Marginal Cell Layer に存在する SOX2 陽性細胞の解析．第 33 回 日本下垂体研究会学術集会（高知 8 月 17-19 日） 2018

堀口幸太郎、吉田彩舟、中倉敬、藤原研、塚田岳大、加藤たか子、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幹・前駆細胞性 S100 陽性細胞の単離と分化誘導．第 91 回日本内分泌学会学術総会（宮崎 4 月 29 日） 2018

堀口幸太郎、吉田彩舟、藤原研、塚田岳大、加藤たか子、長谷川瑠美、瀧上周、大迫俊二、屋代隆、加藤幸雄：ラット下垂体前葉の Sox2 を発現する S100 陽性細胞の単離．第 123 回日本解剖学会学術総会（東京 3 月 29 日） 2018

Ito S, Horiguchi K, Ohsako S, Tanaka K: Cloning and localization of serotonin receptor type 1 in *Marsupenaeus japonicus* 第 39 回日本比較生理生化学会（福岡 11 月 25-26 日） 2017

塚田岳大、磯和幸延、吉田彩舟、舎人勢奈、紀藤圭治、堀口幸太郎、藤原研、屋代隆、加藤たか子、加藤幸雄：TtT/GF 細胞における TGF β の作用：SILAC を用いた大規模プロテオーム解析．第 44 回日本神経内分泌学会学術集会（相模原 10 月 21 日） 2017

Horiguchi K, Nakakura T, Tsukada T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Kato T, Kato Y: Analysis of a novel gene expressed by S100 β -positive cells in rat anterior lobe of the pituitary. Fourth World Congress of Reproductive Biology (Okinawa, 28 Sept.), 2017

磯和幸延、塚田岳大、吉田彩舟、舎人勢奈、紀藤圭治、堀口幸太郎、藤原研、屋代隆、加藤たか子、加藤幸雄：マウス下垂体由来の TtT/GF 細胞における TGF β の作用：SILAC 解析法を用いたタンパク質の網羅的な比較定量解析．第 32 回 日本下垂体研究会学術集会（鬼怒川 8 月 2-4 日） 2017

堀口幸太郎、吉田彩舟、藤原研、塚田岳大、加藤たか子、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代 隆、加藤幸雄：下垂体前葉の S100 陽性細胞が発現する CD 抗原の解析．第 32 回 日本下垂体研究会学術集会（鬼怒川 8 月 2-4 日） 2017

堀口幸太郎、吉田彩舟、藤原研、塚田岳大、加藤たか子、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代 隆、加藤幸雄：下垂体前葉内濾胞星状細胞の新規マーカーの探索．第 90 回日本内分泌学会学術総会（京都 4 月 21 日） 2017

堀口幸太郎、吉田彩舟、藤原研、塚田岳大、加藤たか子、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二、屋代 隆、加藤幸雄：下垂体前葉内濾胞星状細胞が発現する CD 抗原の探索．第 122 回日本解剖学会学術総会（長崎 3 月 29 日） 2017

②1 塚田岳大、吉田彩舟、紀藤圭治、藤原研、八子英司、堀口幸太郎、屋代隆、加藤たか子、加藤幸雄：TGF β は下垂体由来株化細胞 TtT/GF をペリサイトに誘導する．第 16 回日本再生医療学会総会（仙台 3 月 7 日） 2017

②2 塚田岳大、吉田彩舟、紀藤圭治、藤原研、八子英司、堀口幸太郎、屋代隆、加藤たか子、加藤幸雄：下垂体由来株化細胞 TtT/GF の分化能の検討と TGF β の関与．第 41 回日本比較内分泌学会大会（相模原 12 月 9 日） 2016

②3 堀口幸太郎、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二：下垂体前葉内濾胞星状細胞で発現するケモカイン CXCL10 の機能解析．第 45 回杏林医学会総会（東京 11 月 19 日） 2016

②4 堀口幸太郎、中倉敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上周、大迫俊二、加藤たか子、加藤幸雄：ラット下垂体前葉内 TSH 産生細胞における細胞表面抗原 CD90 の発現．第 109 回日本繁殖生

物学会（神奈川 9 月 12 日）、2016

- ②5 堀口幸太郎、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二：ラット下垂体前葉におけるケモカインおよびケモカインレセプターの発現解析．第 57 回日本組織細胞化学会総会学術集会（東京 9 月 3 日）、2016
- ②6 藤原 研、塚田岳大、堀口幸太郎、菊地元史、Khongorzul Batchuluun、屋代 隆：下垂体前葉の機能的組織構築と幹細胞の維持に関わる細胞間相互作用．第 89 回日本内分泌学会学術総会（京都 4 月 22 日）、2016
- ②7 堀口幸太郎、吉田彩舟、菅野尚子、上春浩貴、陳黙、長谷川瑠美、加藤たか子、瀧上 周、大迫俊二、加藤幸雄：細胞表面抗原 CD90 を利用したラット下垂体前葉からの TSH 産生細胞の単離．第 89 回日本内分泌学会学術総会（京都 4 月 21 日）、2016

〔図書〕（計 2 件）

堀口幸太郎、北隆館、細胞表面抗原 CD9 を発現する下垂体前葉組織幹細胞の単離とその分化誘導、月刊「アグリバイオ」、8 月号、2018、pp. 87 - 92
http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/book_category/x01/

堀口幸太郎、北隆館、CD9 陽性下垂体前葉組織幹細胞の分画と分化誘導、月刊「細胞」、6 月号、2018、pp.41 - 45
<http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/cell.html>

〔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/education/staff/detail.php?id=hea40212>

6 . 研究組織

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。