

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18981

研究課題名(和文)下垂体前葉の基底膜成分ラミニンによる新たな性腺刺激ホルモン分泌調節機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the mechanism of gonadotropin secretion by laminin in the anterior pituitary gland

研究代表者

東 森生 (Azuma, Morio)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90709643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：基底膜や線維性コラーゲンに代表される細胞外マトリックスは、特異的受容体を介して細胞機能を調節する。下垂体前葉内の細胞周囲には多量の細胞外マトリックスが蓄積している。本研究は前葉内に存在する基底膜成分ラミニンを介した新しい性腺刺激ホルモン分泌機構を明らかにすることを目的とした。免疫組織科学的手法により、ラット下垂体前葉組織内の基底膜に存在するラミニン鎖の種類を同定した。前葉内に存在したラミニンに対して、性腺刺激ホルモン産生細胞を含む全ての内分泌細胞が反応することがわかった。また、下垂体前葉に発現するラミニン受容体を組織科学的手法により同定し、ラミニンが前葉ホルモン分泌に関わることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The basement membrane is an extracellular scaffold for cells and aids in structural support of and barriers between tissues. It is known that the basement membrane components affect cell activity via their receptors. In the anterior pituitary gland, hormone-secreting cells are surrounded by various extracellular matrix including the basement membrane. The purpose of this study is to clarify the mechanism of gonadotropin secretion via laminin, a major basement membrane protein, in the gland. Immunohistochemistry showed that types of laminin chain in rat anterior pituitary gland. Endocrine cells including gonadotrophs responded to laminins which exist in the gland. In addition, histological technique revealed localization of laminin receptors in the gland. Laminin may contribute to the regulation of hormone-secreting cells in the gland.

研究分野：組織学

キーワード：下垂体前葉 細胞外マトリックス 基底膜 ラミニン ホルモン分泌

## 1. 研究開始当初の背景

組織の構築や形態維持に関わる細胞外マトリックスは細胞周囲に存在する蛋白質と多糖類の複合体で、基底膜や線維性コラーゲンに代表される。これらの分子は、特異的受容体のインテグリンを介して細胞の生存や増殖、移動、分化を調節する主要な情報伝達分子として広く知られている。さらに近年、膵島のβ細胞が基底膜成分に反応してインスリン分泌を亢進する報告があり [Kaido et al., 2004]、細胞外マトリックスは内分泌細胞の機能にも重要な役割を担う可能性が指摘されている。

下垂体前葉は成長、生殖、ストレス応答に関わる6種の前葉ホルモン (GH、PRL、ACTH、TSH、LH、FSH) を産生する内分泌器官である。前葉ホルモンの分泌は視床下部や末梢臓器が産生するホルモンにより調節されている。しかし、下垂体前葉組織内で内分泌細胞は他の細胞と協調し、または細胞周囲の基質の影響を受けることではじめて正常な機能を発揮すると考えられる。例えば、性腺刺激ホルモンである LH と FSH は、視床下部ホルモンである生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の刺激により同一の細胞から分泌されるが、培養した個々の細胞の GnRH への応答性は異なる [Deneff et al., 1978]。それにもかかわらず、下垂体前葉からの LH と FSH の分泌は GnRH 分泌のリズムに同調する。このような現象は、視床下部の支配や末梢臓器からのフィードバック機構のみでは説明できない。一方で、古くより下垂体前葉内には多量の細胞外マトリックスが蓄積していること、前葉細胞は基底膜に接することが免疫組織化学的解析や電子顕微鏡観察により示されている [Soji and Herbert 1989]。このような形態学的な所見より、下垂体前葉内の細胞外マトリックスは情報伝達分子として前葉細胞に働きかけ、細胞機能を調節する可能性が考えられてきた。

このような状況のなか、申請者は前葉細胞の培養実験で基底膜成分ラミニンが、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの情報伝達系とは異なる独自の機構で性腺刺激ホルモンの分泌を促す現象を見出した。しかしながら、その機序は未解明である。

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究は、性腺刺激ホルモン産生細胞に発現するラミニン受容体とその細胞内情報伝達経路を組織学的、分子生物学的、薬理学的な手法により特定し、ラミニンを介した新しい性腺刺激ホルモン分泌機構を解明することを目的として遂行された。

## 3. 研究の方法

下垂体前葉に存在するラミニン分子の同定  
実験動物には、Wistar 系ラット (SLC より購

入)を用いた。4%パラホルムアルデヒド固定したラット下垂体切片やメタノール固定した新鮮凍結切片に、5種類のラミニンα鎖(α1、α2、α3、α4、α5)それぞれに対する特異的抗体を用いて免疫染色を施した。基底膜への局在を示すため、基底膜成分である4型コラーゲンとの蛍光二重染色を施し、観察した。

### ラミニン受容体の同定

細胞外マトリックス受容体であるインテグリン、ラミニン受容体として知られる basal cell adhesion molecule (BCAM) を免疫組織化学や in situ hybridization 法により調べた。下垂体前葉細胞の初代培養細胞系で、モノクローナル抗体によるラミニンとインテグリンの結合阻害実験、RNA 干渉によるインテグリンの発現抑制実験を行い、ホルモン分泌に関わるインテグリンの特定を試みた。

### ラミニンにより惹起される細胞内情報伝達経路の解析

細胞と細胞外基質との接着により惹起される細胞内情報伝達経路をリン酸化タンパク質の免疫細胞化学的手法、薬理学的的手法により解析した。

### ラミニンの性腺刺激ホルモン分泌促進機構に及ぼす生殖腺のフィードバック機構の影響

生殖腺を摘出した動物を用いて、性腺刺激ホルモン産生細胞のインテグリンや細胞内情報伝達分子、下垂体前葉内のラミニンの発現動態を、組織学的、分子生物学的な手法で探った。

## 4. 研究成果

本研究課題を遂行する過程で、性腺刺激ホルモン産生細胞を含む下垂体前葉の内分泌細胞が特定のラミニンに反応することを新たに見出した。また、下垂体の発生過程における BCAM の発現を明らかにした。これらの結果を含めて報告する。

### ラット下垂体前葉組織における基底膜の組成

ラミニンはα、βおよびγの3鎖から構成される。3鎖の中で、α鎖はラミニン受容体との結合に必須であり、5種(α1、α2、α3、α4、α5)存在する。免疫組織化学的手法により、ラット下垂体前葉にはラミニンα1鎖、α3鎖、α4鎖、α5鎖が検出された。前葉組織には血管内皮細胞直下の基底膜と実質細胞側の基底膜とが存在する。そこで、4型コラーゲン(基底膜のマーカーとして使用)との蛍光二重染色により2層の基底膜におけるラミニンα鎖の違いを精査した。その結果、血管内皮細胞直下の基底膜はラミニンα4鎖とα5鎖を含むことがわかった。一方、実質細胞側の基底膜にはラミニン1鎖、3鎖および5鎖が存在することがわかった。従って、ラット

下垂体前葉組織内における2層の基底膜の組成は異なることが初めて明らかとなった。

下垂体前葉に発現するラミニン受容体免疫組織化学的手法により、ラット下垂体前葉にはインテグリン  $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$  の各サブユニットが存在することがわかった。免疫細胞化学により前葉の内分泌細胞はインテグリン  $\alpha 3$  と  $\beta 1$  を発現することが明らかとなった。前葉細胞の初代培養実験から、ラミニン  $\alpha 3$  鎖や  $\alpha 5$  鎖に内分泌細胞が強く接着することがわかった。インテグリン  $\beta 1$  抗体により、接着が阻害されることから、下垂体前葉の内分泌細胞において、インテグリンがラミニン受容体として働く可能性が示唆された。また、ラミニン  $\alpha 5$  鎖特異的受容体である BCAM が下垂体原基であるラトケ囊から発現し、下垂体形成過程を通じてラミニン  $\alpha 5$  鎖と共局在することを示した。

細胞内情報伝達経路の解析  
免疫細胞化学により、接着した内分泌細胞に局所接着部位が形成されていることがわかった。局所接着部位キナーゼのリン酸化を検出し、ホルモン分泌に関わる可能性を示した。

生殖腺摘出個体の解析  
精巣を摘出した雄ラットの下垂体前葉組織において、ラミニン  $\alpha 1$  鎖が多量に蓄積することを免疫組織化学的手法により明らかにした。ラミニン  $\alpha 1$  鎖は、性腺刺激ホルモン産生細胞が作るラミニンであり、前葉内における細胞活動の状態により組織内ラミニン量が変化することが示唆された。

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 7 件)

Batchuluun K, Azuma M, 他 3 名 Notch Signaling and Maintenance of SOX2 Expression in Rat Anterior Pituitary Cells. *Acta Histochem Cytochem*. 査読有 2017 DOI: 10.1267/ahc.17002

Maliza R, Azuma M, 他 3 名 Effect of retinoic acid on midkine gene expression in rat anterior pituitary cells. 査読有 2017 *Endocr J*. DOI: 10.1507/endoerj.EJ17-0006

Tofrizal A, Azuma M, 他 3 名 Tissue inhibitors of metalloproteinase-expressing cells in human anterior pituitary and pituitary adenoma. 査読有 2017 *Med Mol Morphol*. DOI: 10.1007/s00795-017-0155-x

Batchuluun K, Azuma M, 他 2 名 Notch signaling-mediated cell-to-cell interaction is dependent on E-cadherin adhesion in adult rat

anterior pituitary. 査読有 2017 *Cell Tissue Res*. DOI: 10.1007/s00441-016-2540-5

Syaidah R, Azuma M, 他 5 名 Fibromodulin Expression in Folliculostellate Cells and Pericytes Is Promoted by TGF $\beta$  Signaling in Rat Anterior Pituitary Gland. 査読有 2016 *Acta Histochem Cytochem*. DOI: 10.1267/ahc.16021.

Maliza R, Azuma M, 他 4 名 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. 査読有 2016 *Endocr J*. DOI: 10.1507/endoerj.EJ16-0086.

Tsukada T, Azuma M, 他 5 名 Folliculostellate cell interacts with pericyte via TGF $\beta$ 2 in rat anterior pituitary. 査読有 2016 *J Endocrinol*. DOI: 10.1530/JOE-16-0033.

〔学会発表〕(計 9 件)

東 森生, 他 ラット下垂体前葉には構成成分の異なる2層の基底膜が存在する 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018年3月29日(東京都武蔵野市)

東 森生, 他 下垂体前葉組織における基底膜成分ラミニンを構成する5種類の $\alpha$ 鎖の機能的差異に関する基礎的研究 第21回日本臨床内分泌病理学会学術総会 2017年10月27日(東京都中央区)

東 森生, 他 ラット下垂体前葉の内分泌細胞が反応するラミニンに関する研究 第32回日本下垂体研究会学術集会 2017年8月3日(栃木県日光市)

Khongorzul Batchuluun, Morio Azuma, 他 Identification of T-cadherin as a possible regulator of progenitor cells in the rat anterior pituitary gland 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年3月29日(長崎県長崎市)

東 森生, 他 胎生ラット下垂体におけるbasal cell adhesion molecule (BCAM) の発現 第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム 2016年12月10日(神奈川県相模原市)

Morio Azuma, 他 Expression of basal cell adhesion molecule (BCAM), a specific receptor for the laminin  $\alpha 5$  chain, in rat embryonic pituitary gland, International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems (ISPGRS2016) 2016年8月6日(ア

メリカ、ハワイ州)

Ken Fujiwara, Morio Azuma, 他  
Identification of bone morphogenetic protein  
6-expressing cells in the anterior pituitary  
gland of adult rats, International Symposium  
on Pituitary Gland and Related Systems  
(ISPGRS2016) 2016年8月6日(アメリカ、  
ハワイ州)

Rita Maliza, Morio Azuma, 他  
Retinoic acid stimulates expression of midkine in the  
anterior pituitary gland of rat, International  
Symposium on Pituitary Gland and Related  
Systems (ISPGRS2016) 2016年8月6日(ア  
メリカ、ハワイ州)

Khongorzul Batchuluun, Morio Azuma, 他  
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30日(福島県郡山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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