

令和 4 年 4 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07255

研究課題名(和文)純化に成功したラット下垂体幹細胞を利用したホルモン産生細胞の発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)The analysis of differentiation into hormone-producing cells from stem/progenitor cells in rat anterior pituitary gland.

研究代表者

堀口 幸太郎 (Horiguchi, Kotaro)

杏林大学・保健学部・准教授

研究者番号：10409477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体前葉には、ラトケの遺残腔に接する中葉と前葉に跨る一層の細胞群Marginal Cell Layer (MCL) に転写因子SOX2陽性の細胞が存在する。我々は、ラット下垂体MCLのSOX2陽性細胞がCD9、CD81を発現することを見出した。CD9抗体を利用したSOX2陽性細胞の分画に成功し、増殖機能を同定後、CD9陽性細胞のホルモン産生細胞への分化に成功した。さらにCd9/Cd81 DKOマウスでは、プロラクチン産生細胞数の著しい減少が見られた。以上から、成体下垂体では、MCLのCD9/SOX2陽性細胞が組織幹細胞として存在し、ホルモン産生細胞の供給源として機能することが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ラット下垂体前葉の組織幹細胞がSOX2陽性細胞であることをCD9抗体を利用したビーズトラップ法によりCD9/SOX2陽性細胞の純化に成功し、様々な解析を行うことで証明した。そしてCD9/SOX2陽性細胞がin vitroにおいてホルモン産生細胞、及び血管内皮細胞への分化に成功した。さらに、血管内皮細胞への分化トリガーがケモカインであることを明らかにした。以上の結果は、下垂体前葉幹細胞からの細胞供給メカニズムの解明の一端となり、分化誘導した細胞塊を用いることで、臨床的に下垂体癌を治療する新たな方法への端緒になると考える。

研究成果の概要(英文)：In the adenohypophysis composing the anterior and intermediate lobe (AL and IL), SOX2-positive cells located along the AL- and IL-side marginal cell layer (MCL) facing Rathke's cleft, and the SOX2-positive cell clusters scattered throughout the parenchyma are proposed to act as the primary and secondary stem/progenitor cell niches, respectively. We identified the novel markers cluster of differentiation (CD) 9 and CD81 for the identification of SOX2-positive cells. Here, we first isolated pure CD9/SOX2-positive cells from the MCL of the IL-side. The CD9/SOX2-positive cells had a pituitary sphere forming capacity. They could differentiate into all types of adenohypophyseal hormone-producing cells. Consistently, dysgenesis of the MCL and a lower population of prolactin cells were observed in the pituitary gland of CD9/CD81 double knockout mice. These results suggest that the CD9/SOX2-positive cells in the MCL of the IL-side are potential suppliers of adult core stem cells in the AL.

研究分野：組織学

キーワード：下垂体前葉 CD9 SOX2 組織幹細胞 CD81 細胞表面抗原

## 1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞はある程度の多分化能を持ち、発生過程や細胞死、損傷組織の再生において、新しい細胞を供給する役割を持つと考えられている。組織幹細胞の状態はニッチと呼ばれる周囲環境によって制御され、ニッチは、組織幹細胞の静止状態と増殖・分化を調節する場である。

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、支持細胞である濾胞星状細胞、血管系の細胞、そしてこれらの供給源となる転写因子 Sox2を発現する SOX2 陽性細胞 (= 組織幹細胞) から構成される。生体の生理状態に応じてホルモン産生細胞の割合は調節され、前葉細胞の供給源は、組織幹細胞からの増殖・分化であると想定されているものの、依然として未解明である。下垂体前葉は、口腔外胚葉から発生する。口腔上皮の陥入の際に中葉と前葉の間に、ラトケ嚢という腔が形成され、それが成体まで残り「ラトケの遺残腔」と呼ばれる。この「ラトケの遺残腔」周囲の前葉と中葉に面する側の一層の細胞層が「Marginal cell layer, マージナルセルレイヤー」と呼ばれ、幹細胞が高頻度で存在し、下垂体前葉の Primary ニッチとされている。そこから、前葉の実質層の Secondary ニッチ (実質層ニッチ) へ移動した SOX2 陽性細胞は前駆細胞となり、ホルモン産生細胞や内皮細胞へと分化すると想定されている (Gremeaux et al. *Stem Cells Dev.* 2012)。

臨床面から下垂体前葉を俯瞰すると、下垂体前葉に発生する腫瘍性病変を下垂体腺腫と呼ぶ。幹細胞の腫瘍化も報告され、短期間に再発を繰り返し、血管新生を引き起こすことで転移性をもち、下垂体癌となる。従来の治療方法に抵抗性であることが指摘されており、幹細胞からの腫瘍形成、血管形成など癌化ステップの解明が急務となっている。

## 2. 研究の目的

どのように下垂体前葉組織が細胞のターンオーバーを繰り返し、組織を維持しているのか、幹細胞がその供給源として想定されているものの確証はない。また臨床面からも、下垂体癌における完治性の難しさは有名であり、幹細胞からの細胞分化メカニズムを解明することで、癌化ステップの解明へと繋がる。本研究の目的は、申請者が成功したラット下垂体前葉組織幹細胞の純化法を利用して、1) Primary ニッチであるマージナルセルレイヤーから幹細胞を単離し、5種類のホルモン産生細胞、濾胞星状細胞、内皮細胞へ分化させること、そして 2) CD9/CD81 ダブルノックアウトマウス下垂体前葉組織構築を観察するという2点であった。

## 3. 研究の方法

本研究では、ラット下垂体前葉のマージナルセルレイヤーから、申請者が開発した CD9 抗体ビーズトラップ法により、幹細胞のみを高純度で単離し、それを浮遊培養することで、Sphere 形成を行う。Sphere は幹細胞の細胞塊であり、分化誘導を行うことで様々な細胞へと分化できることが実証されている。申請者は既にこの Sphere の形成に成功している。2019、2020 年度において、Sphere のマトリゲル 3 次元培養から、様々な成長因子の投与、抑制を加えることで、ホルモン産生細胞、濾胞星状細胞、内皮細胞へと分化させる。そして、2021 年度に、分化した細胞群を用いて細胞塊を再度形成させることで、下垂体前葉様の細胞塊の形成を目指す。CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスは、すでに他の研究グループが作成し (Jin et al. *Scientific Reports*, 2018)、申請者らは下垂体組織を供与されている。このマウスは、下垂体の大きさ、重さ、さらに身長、体重がコントロールに比べて小さい。これは下垂体前葉ホルモン産生細胞の供給不全が疑われる。2019、2020 年度にこの下垂体前葉を組織学的に観察し、どのホルモン産生細胞がどのように分化、増殖不全にあるかを証明する。

## 4. 研究成果

### (1) ラット下垂体前葉からの組織幹細胞の単離とホルモン産生細胞への分化

下垂体前葉の組織幹細胞である SOX2 陽性細胞が膜タンパク質である細胞表面抗原 (CD) 9 を発現すること (CD9/SOX2 陽性細胞 = 組織幹細胞) を利用し、CD9 抗体を利用したビーズトラップ法により下垂体前葉の Primary ニッチであるマージナルセルレイヤーに存在する CD9/SOX2 陽性細胞の純化に成功した。そして、ホルモン産生細胞 (成長ホルモン GH、プロラクチン PRL、甲状腺刺激ホルモン TSH 細胞という転写因子 Pit1 の発現から分化が始まる同じ系統の細胞) の分化、及び血管内皮細胞、濾胞星状細胞へ分化させることに成功した。

### (2) ラット下垂体前葉組織幹細胞の Primary ニッチから前葉実質層への移動メカニズムの解明

下垂体前葉の Primary ニッチであるマージナルセルレイヤーに存在する CD9/SOX2 陽性細胞が膜タンパク質のテトラスパニンファミリーの一つであるテトラスパニン 1 (TSPAN1) を発現することで、細胞外マトリクスを利用して移動を制御する転写因子 Slug の発現を誘導することを

明らかにした。そして、上皮間葉移行によって移動するメカニズムを明らかにした。

(3) ラット下垂体前葉からの組織幹細胞の内皮細胞分化トリガーの解明

下垂体前葉の Secondary ニッチである前葉実質層に存在する CD9/SOX2 陽性細胞が、ケモカイン CX3CL1 を発現することを明らかにした。そして、その CX3CL1 の発現の減少が分化トリガーとなり、細胞外マトリクスとの接着を有した CD9/SOX2 陽性細胞が CX3CL1 のレセプターである CX3CR1 の発現を増加させ、内皮細胞への分化となることを明らかにした。

(4) CD9 ノックアウトマウス

ラット下垂体前葉の組織幹細胞は、CD9 及び CD81 を発現することを申請者らは明らかにした。CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスは、すでに他の研究グループが作成し (Jin et al. *Scientific Reports*, 2018) 申請者らは下垂体組織を供与されていた。そこでこのダブルノックアウトマウス下垂体を詳細に観察すると、下垂体前葉の Primary ニッチであるマージナルセルレイヤーの CD9/SOX2 陽性細胞が消失し、結合組織に置換されていた。さらに野生型に比べて、前葉の実質層においてプロラクチン産生細胞の減少を明らかにした。これは、CD9/CD81 発現が抑制されることで、Primary ニッチの組織幹細胞が増殖不全に陥り、その結果、下垂体前葉の実質層のプロラクチン産生細胞供給不全に陥ることを予想させた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Yoshida S, Tsukada T, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y	4. 巻 153
2. 論文標題 CX3CL1/CX3CR1-signaling in the CD9/S100 /SOX2-positive adult pituitary stem/progenitor cells modulates differentiation into endothelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 385-396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01862-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horiguchi K, Yoshida S, Tsukada T, Fujiwara K, Nakakura T, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 66
2. 論文標題 Expression and functions of cluster of differentiation 9 and 81 in rat mammary epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 515-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-082.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Horiguchi K, Yoshida S, Tsukada T, Fujiwara K, Nakakura T, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 155
2. 論文標題 Cluster of differentiation (CD) 9-positive mouse pituitary cells are adult stem/progenitor cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol	6. 最初と最後の頁 391-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01943-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Takeda Y, Nakakura T, Tsukada T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 385
2. 論文標題 CD9-positive cells in the intermediate lobe of the pituitary gland are important supplier for prolactin-producing cells in the anterior lobe.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 713-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-021-03460-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi K, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y	4. 巻 379
2. 論文標題 Isolation and characterization of cluster of differentiation 9-positive ependymal cells as potential adult neural stem/progenitor cells in the third ventricle of adult rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 497-509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-019-03132-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakakura T, Suzuki T, Horiguchi K, Tanaka H, Arisawa K, Miyashita T, Nekooki-Machida Y, Hagiwara H	4. 巻 384
2. 論文標題 Fibronectin-integrin signaling controls the localization of PLVAP at endothelial fenestrae by stabilizing the microtubule cytoskeleton.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 449-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03326-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima R, Horiguchi K, Mochimaru Y, Musha S, Murakami S, Deai M, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H	4. 巻 517
2. 論文標題 Characterization of molecular mechanisms of extracellular acidification-induced intracellular Ca <sup>2+</sup> increase in LbetaT2 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 636-641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.083.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara K, Yatabe M, Tsukada T, Horiguchi K, Fujiwara Y, Takemoto K, Nio-Kobayashi J, Ohno N, and Inoue K	4. 巻 381
2. 論文標題 Aldolase C is a novel molecular marker for folliculo-stellate cells in rodent pituitary.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 273-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03200-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arae K, Ikutani M, Horiguchi K, Yamaguchi S, Okada Y, Sugiyama H, Orimo K, Morita H, Suto H, Okumura K, Taguchi H, Matsumoto K, Saito H, Sudo K, Nakae S	4. 巻 11
2. 論文標題 Interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin, but not interleukin-25, are crucial for development of airway eosinophilia induced by chitin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 5913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85277-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Nakakura T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S	4. 巻 In press
2. 論文標題 The multiciliated cells in Rathke's cleft express CYP26A1 and respond to retinoic acid in the pituitary.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-022-03614-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Nakakura T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 156
2. 論文標題 CD9-positive cells in the intermediate lobe migrate into the anterior lobe to supply endocrine cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 301-313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-02009-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、吉田彩舟、中倉 敬、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
2. 発表標題 ラット下垂体におけるラトケ遺残腔の観察 .
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口幸太郎, 吉田彩舟, 中倉 敬, 塚田岳大, 藤原 研, 長谷川瑠美, 瀧上 周, 大迫俊二
2. 発表標題 ラット乳腺における膜タンパク質CD9の発現解析.
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口幸太郎
2. 発表標題 Cluster of differentiation (CD) 9-positive pituitary cells are adult stem/progenitor cells.
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回 日本生理学会大会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 ラット下垂体中葉Marginal Cell Layerに存在するSOX2陽性細胞の単離と分化誘導.
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 マウス下垂体前葉におけるCD9/CD81陽性細胞の観察.
3. 学会等名 第34回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、吉田彩舟、中倉 敬、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
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell Layer細胞の解析.
3. 学会等名 第45回神経内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口幸太郎
2. 発表標題 下垂体前葉におけるS100 陽性細胞の多様性.
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、吉田彩舟、中倉 敬、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
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell Layerの観察.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周、大迫俊二
2. 発表標題 マウス下垂体前葉におけるCD9/CD81/SOX2陽性細胞の同定と幹細胞性の解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell LayerにおけるCD9/CD81/S100 /SOX2陽性細胞の機能 .
3. 学会等名 第34回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原研、塚田岳大、中倉敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上周
2. 発表標題 妊娠、泌乳期におけるラット下垂体前葉内プロラクチン産生細胞の増殖機構の解明 .
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell Layer細胞からのホルモン産生細胞供給の可能性 .
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口幸太郎、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 マウス下垂体前葉におけるCD9/CD81/SOX2陽性細胞の組織幹細胞性 .
3. 学会等名 第50回杏林医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell Layerの組織幹細胞は前葉側へ移動し、ホルモン産生細胞供給を担う。
3. 学会等名 第127回日本解剖学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/health/education/staff/detail.php?id=hea40212>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------