

機関番号 : 32612

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591305

研究課題名 (和文)

胎児副腎の構造的・機能的リモデリングにおける神経細胞接着因子 NCAM の役割

研究課題名 (英文)

Role of neural cell adhesion molecules in structural and functional remodeling of fetal adrenal glands

研究代表者

峰岸 一宏 (MINEGISHI KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 30276331

研究成果の概要 (和文) :

本研究で、免疫組織化学検査で NCAM mRNA・蛋白が胎児副腎の外層 (DZ) に限局していることが判明した。siRNA 遺伝子導入による NCAM mRNA 発現抑制により、FZ 特異的マーカーの P450c17、LDLR、SPARC mRNA 発現が増加したことから、DZ 細胞に限局する NCAM は、胎児副腎の組織リモデリングにおいて FZ 細胞への分化を抑制している可能性が示唆された。さらに、胎児副腎での成長因子である FGF2 の補受容体として知られ、成人脳・副腎に強く発現するヘパリン結合性硫酸ヘパランプロテオグリカンの Syndecan-3 (SDC3) の胎児副腎リモデリングにおける役割を検討した。SDC3 は、NCAM と同様に胎児副腎の外層 DZ に強く発現しており、さらに胎児副腎皮質細胞の細胞モデルである NCI-H295A 細胞株を用いて、SDC3-siRNA 導入による発現抑制での FGF2 やヘパリン誘導の細胞増殖への影響を検討した。SDC3 発現抑制による FGF2 やヘパリン細胞増殖の抑制、FZ 特異的マーカー mRNA の発現増強、DHEAS 産生増加の結果から、SDC3 は胎児副腎層形成過程での細胞増殖や分化抑制に関与することが判明した。

研究成果の概要 (英文) : We examined expression and localization of NCAM and SDC3 in the HFA, and investigated whether NCAM and SDC3 are implicated in HFA zonal development. Immunoreactive NCAM and SDC3 were limited to the DZ. LCM/qPCR showed a similar zonal differential SDC3 expression at the mRNA level. SDC3 knockdown attenuated FGF2-induced cell proliferation while increased cAMP-induced DHEAS production and mRNA levels of FZ-cell markers. Addition of ACTH or FGF2 did not change SDC3 mRNA in isolated DZ and NCI-H295A cells. These results suggest that NCAM and SDC3 may play a role in development of functional zonation of the HFA, at least partly through maintaining some aspects of the DZ phenotype.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：胎児副腎、NCAM、Syndecan-3

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト胎児副腎は、妊娠の維持、肺を含む胎児諸臓器の成熟、分娩の発来に關与する重要な臓器であるが、その發育や機能の制御機構については未だ不明な点が多い。ヒト胎児副腎皮質は成体で見られる球状帯、束状帯、網状帯の3層構造とは異なり、主として外層のdefinitive zone (DZ) および内層のfetal zone (FZ) の2つの層構造を成し、髄質は胎児では明らかな構造をとらない。DZは妊娠末期に至るまでステロイド産生能を示さず、その役割は主に前駆細胞のプールにあると考えられている。つまり、ここで増殖した細胞の一部が内側に遊走しFZ細胞へと分化成熟し、最奥部に進むにつれ老化、アポトーシスにより除去されると考えられる。この仮説を基に、我々は細胞層形成機構を解明するため、DZ・FZに特異的な細胞表面マーカーを網羅的に検索し、NCAM (neuronal cell adhesion molecule) がDZ特異的マーカーであることを突き止めた (J Clin Endocrinol Metab 88: 3921-3930, 2003)。NCAMは、細胞間や細胞外マトリックス (ECM) とのコミュニケーションに關わる。初期神経冠細胞におけるNCAM発現は遊走と共に下方制御され、またグリオーマ細胞ではNCAMが細胞遊走や浸潤を抑制するとされてい

る。

さらにNCAMに加えて、ヒト胎児副腎における主要な成長因子 FGF-2 (FGF2) の共役受容体である細胞膜関連プロテオグリカンの一種のsyndecan-3 (SDC3) が、成人副腎において多く発現しており、SDC3がヒト胎児副腎において *in vivo* で認められるDZ主体の細胞増殖機構に、NCAMと共にその一端を担っている可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、胎児副腎の組織リモデリングにおけるNCAMの意義を明らかにすることとともに、SDC3の意義についても検討することを目的とする。具体的には、胎児副腎 *in vitro* モデルとしてNCI-295A細胞株を用いて、NCAMやSDC3の細胞増殖、遊走、分化の制御機構およびステロイド産生機構への関与について解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 胎児副腎におけるNCAM蛋白の免疫染色による局在の検討

(2) Laser-captured microdissection (LCM) により獲得したDZ、FZ細胞におけるNCAM mRNAの発現をRT-PCRを用いて検討

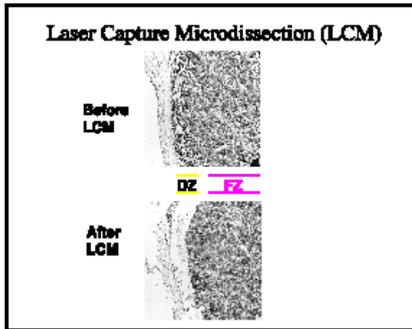


図1 LCM

(3) 胎児副腎 in vitro モデルの NCI-H295A 細胞における NCAM mRNA の発現および siRNA 遺伝子導入による発現抑制を定量的 RT-PCR で検討

(4) NCI-H295A 細胞での NCAM 発現抑制による FZ 細胞特異的のマーカである P450c17, Low Density Lipoprotein receptor (LDL-R), Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) の発現変化を定量的 RT-PCR で検討

(5) 免疫染色による胎児副腎での SDC3 蛋白の局在の検討

(6) Laser-captured microdissection (LCM) により獲得した DZ, FZ 細胞における SDC3 mRNA 発現を RT-PCR を用いて検討

(7) NCI-H295A 細胞における SDC3 mRNA の発現および膜蛋白の局在

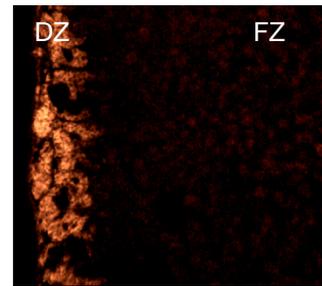
(8) NCI-H295A 細胞を用いて, SDC3 siRNA 導入による発現抑制における, FGF-2 やヘパリンに誘導される細胞増殖への影響

(9) NCI-H295A 細胞での SDC3 発現抑制による FZ 細胞特異的の分子マーカーである P450c17, Low Density Lipoprotein receptor (LDL-R), Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) の発現変化を定量的 RT-PCR で検討

(10) NCI-H295A 細胞において, SDC3 発現抑制によるステロイド産生(コルチゾール, DHEAS) への影響について検討

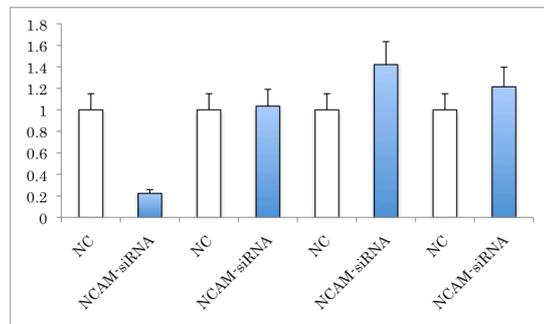
#### 4. 研究成果

(1) NCAM 蛋白は胎児副腎の外層 DZ に限局し、LCM により得た DZ 細胞に NCAM mRNA が強く発現していた (図2)。



<図2 NCAM 蛋白の局在>

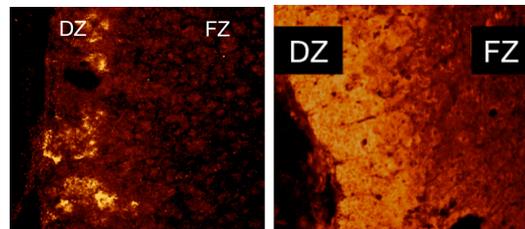
(2) siRNA 遺伝子導入による NCAM mRNA 発現抑制効果は 70-80% であり、NCAM 発現抑制により P450c17、LDL-R、SPARC mRNA 発現は 1.1-1.4 倍に増加した (図3)。



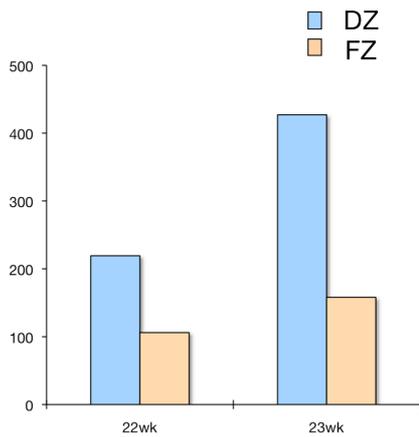
<図3 NCAM の発現抑制による各遺伝子変化>

(左から NCAM, SPARC, P450c17, LDL-R)

(3) SDC3 蛋白は胎児副腎の外層である DZ にした (図4)。また、FGF-2 蛋白も FZ より DZ に多く発現していた (図4)。LCM により獲得された DZ 細胞においても、FZ 細胞に比べて SDC3 mRNA が強く発現していた (図5)。

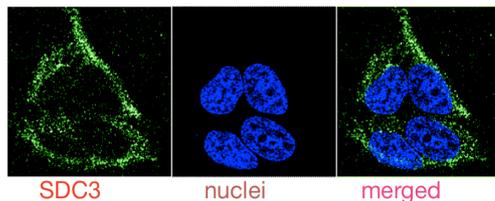


<図4 SDC3 (左), FGF-2 蛋白 (右) の局在>



<図5 LCMで獲得されたDZ、FZ細胞におけるSDC3 mRNAの発現>

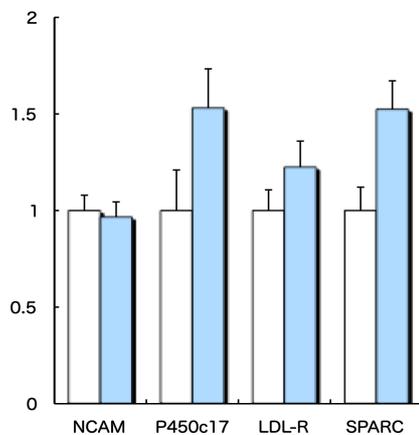
(4) SDC3のNCI-H295A細胞の細胞膜に局在していた(図6)。



<図6 NCI-H295A細胞におけるSDC3の局在>

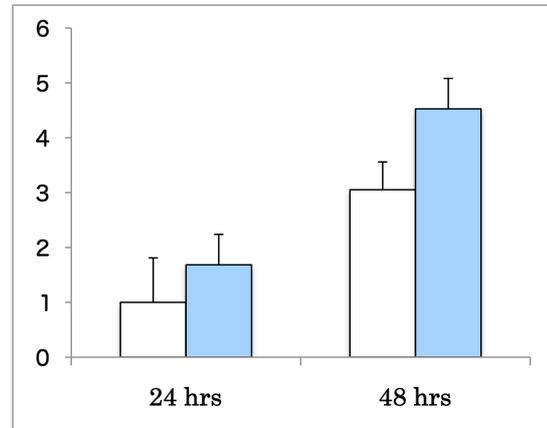
(5) SDC3 siRNA導入による発現抑制により、FGF-2やヘパリンに誘導されたNCI-H295A細胞増殖が抑制された。

(6) NCI-H295A細胞でのSDC3発現抑制により、FZ細胞特異的分子マーカーであるP450c17、LDL-R、SPARCの発現が増加した(図7)。



<図7 SDC3発現抑制による各遺伝子変化>

(7) NCI-H295A細胞でのSDC3発現抑制により、DHEAS産生が増加した(図8)。



<図8 SDC3発現抑制によるcAMP刺激後DHEAS産生の経時的変化>

## 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)

[学会発表] (計2件)

(1) Kazuhiro MINEGISHI, Hitoshi ISHIMOTO, Seon Hye KIM, Momo UMEZU, Ikuko KADOHIRA, Kei MIYAKOSHI, Mamoru TANAKA, Yasunori YOSHIMURA. Knockdown of Syndecan-3 Expression Attenuates Adrenocortical Cell Proliferation Induced by Fibroblast Growth Factor-2: Implication for Human Fetal Adrenal Development. ENDO (米国内分泌学会), San Diego, USA, 6.19-22 2010.

(2) 峰岸一宏, 石本人士, 金善恵, 浅井哲, 田中守, 青木大輔, 吉村泰典. ヒト胎児副腎の層形成機構におけるSyndecan-3の関与の可能性. 第61回日本産科婦人科学会, 国立京都国際会館, 2009 4.3-5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峰岸 一宏 (MINEGISHI KAZUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30276331

(2) 研究分担者

石本 人士 (ISHIMOTO HITOSHI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10212937

浅井 哲 (ASAI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：0383867