

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05727

研究課題名（和文）トラフグ下垂体スフェロイド培養を用いたゴナドトロピン分泌促進技術の開発

研究課題名（英文）Development of the gonadotropin secretion promotion technique using the Tiger puffer pituitary spheroid culture

研究代表者

山口 明彦（Yamaguchi, Akihiko）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：10332842

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の3次元培養によって得られるスフェロイドは生体に近い性質を維持するため創薬分野で用いられる技術である。下垂体は体内の様々な内分泌腺機能を制御するため、スフェロイドを用いた魚類の生殖生理状態をモニタリングできれば種苗生産に有効な生理活性物質の探索に有効である。本研究ではトラフグ下垂体スフェロイドを作製しその有効性を検証した。魚類下垂体スフェロイドの凝集特性の解析、周年血清を用いた濾胞刺激ホルモンと黄体形成ホルモン細胞の増殖とホルモン合成を解析した結果、下垂体スフェロイドは生体機能を模倣すると考えられ、スフェロイドアッセイは生理活性物質探索等に有効な技法であると証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中・大型の魚種では初回成熟までの期間が長く、生殖腺刺激ホルモンの合成・分泌の早期誘導の技術開発が必要である。本研究ではトラフグを用いた下垂体スフェロイドアッセイ法を確立した。数個の下垂体から数千のスフェロイドが作製でき、生体調査の難しい魚種（クロマグロ等）へも応用できる。トラフグ周年血清を用いたアッセイでは産卵半年前に下垂体細胞の増殖が確認され、成熟開始期の飼育管理の重要性を示した。また黄体形成ホルモンの合成は性ステロイドに反応するが濾胞刺激ホルモンは関係なくスフェロイド内で自律的に合成した。これらの結果は魚類下垂体スフェロイドアッセイが基礎から応用まで幅広く貢献する事を意味する。

研究成果の概要（英文）：Spheroids obtained through 3D cultivation of cells maintain properties close to those of living tissues, making them a valuable technique in drug discovery. The pituitary gland regulates various endocrine gland functions in the body, so using spheroids to monitor the reproductive physiology of fish could be effective in exploring bioactive substances useful for fish seed production. In this study, we created spheroids of the T.rubripes (torafugu) pituitary gland and validated their effectiveness. By analyzing the function of brain-type aromatase in luteinizing hormone-producing cells and the proliferation and hormone synthesis of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone-producing cells using annual serum, it was suggested that pituitary gland spheroids mimic biological functions. Spheroid assays have been proven to be effective techniques for exploring bioactive substances and other purposes.

研究分野：魚類生殖生理内分泌学

キーワード：スフェロイド 下垂体 生理活性物質
ゴナドトロピン アロマトラーゼ トラフグ 黄体形成ホルモン 濾胞刺激ホルモン

1. 研究開始当初の背景

世界中の食糧需要の高まりを受けて水産資源の枯渇化が起きており、養殖へのシフトが叫ばれている。特に中・大型魚種(トラフグ・クロマグロ・ニホンウナギ・シロチョウザメ等)は初回成熟までの期間が長いこと、成熟年齢を早める技術開発が望まれている。しかし明確な産卵誘導の羅針盤のない中・大型魚種はまず種固有のゴナドトロピン(GTH)伝達経路の情報整備を行い、最適な成熟・産卵方法を計画・考案する必要がある。一方、多くの魚種で組換えGTHが作製されているが、クロマグロのように十分な活性が得られない場合や、高コストであるため実際に種苗生産現場で使用されるものは稀であり、どのような魚種にでも対応可能な新規技術開発は今後とも必要である。初回成熟時には下垂体で合成・分泌されるGTH: [濾胞刺激ホルモン(FSH); 黄体形成ホルモン(LH)] は、視床下部GnRHニューロンの発火作用やその受容体(GnRHR)の発現により制御されるが、その他にも多種の神経ペプチドやホルモン等の生理活性物質が細胞膜上の7回膜貫通型G蛋白質共役型受容体(GPCR)に結合し、 α 、 β 、 γ の3量体から成るG蛋白質(Gs, Gi, Gq)と共役したシグナル伝達経路(AC/cAMP/PKA, PLC/IP₃/PKC, Ca²⁺/CaM/ CaMK-II)に収束されて最終的に分泌顆粒は細胞膜と融合し分泌され、生殖腺のGTH受容体(GTHR)と結合し性成熟は開始する。しかし、トラフグを含め有用魚種のGTH細胞自体のシグナル伝達情報は皆無である。現在様々なGPCR結合性の生理活性物質ライブラリー(アゴニスト・アンタゴニスト)の入手が可能である。In vitroでGTHの分泌を多検体でスクリーニングする方法があれば、複数の化合物投与により効率的な魚種固有の成熟・産卵法が提案できる。近年3次元構造としてin vitroで培養された細胞塊(スフェロイド・オルガノイド)は、単層細胞に比べてより多くの生物学的特性をin vivoに近い状態で再現できるので組織の機能解析や薬剤スクリーニングの手法として用いられる。そこで申請者はこの手法を魚類下垂体へ応用展開するための研究に着手した。

2. 研究の目的

現在、様々なGPCR結合性の生理活性物質ライブラリー(アゴニスト・アンタゴニスト)の入手が可能である。In vitroでGTHの分泌を多検体でスクリーニングする方法があれば、複数の化合物投与により効率的な魚種固有の成熟・産卵法が提案できる。下垂体は多種類のホルモン細胞が混在する1mm程の非常に小さな組織であり、初代細胞培養法(単層培養)による解析が一般に用いられるが、その都度多数の個体から下垂体を集める必要があった。また細胞継代に時間と手間がかかり実験結果もホルモン細胞間の相互作用を無視しており解釈に困ることが多かった。現在まで魚類下垂体スフェロイドに関する研究報告はなかったため、本研究ではトラフグを用いて下垂体スフェロイドの効率的な作製法を考案し、生体(in vivo)での下垂体機能をin vitroで再現できるスフェロイドを用いた多検体スクリーニング法の確立を目的とした。また得られた研究成果は今まで解析の難しかった中・大型魚種のゴナドトロピン分泌に関する種固有の情報整備に役立つと考えた。

3. 研究の方法

(i) 実験材料

トラフグは福岡県福津市の九州大学水産実験所において受精卵から飼育した0-3歳魚を用いた。飼料は日清丸紅トラフグEPシリーズを用いた。2歳までは屋外の3トン水槽で飼育し、実験に使用する個体は室内の1トンパンライト水槽に移し実験終了まで飼育管理した。

(ii) 血清のサンプリングと性ステロイド濃度測定

周年血清は2019年6月から2020年6月までの13カ月間毎月一度サンプリングしたものを使用した。血清性ステロイド濃度(テストステロン・エストロゲン)はHTRFキット(Perkin Elmer)を用い測定した。

(iii) スフェロイドの準備とアッセイ方法

実験に次の方法で作製したスフェロイドを使用した。(i)単離したトラフグ下垂体は一晚10倍濃度の抗生物質を用いて殺菌したあと、PBS中で0.2%Collagenase type II(Worthington), 0.1% trypsin type II-S(Sigma-Aldrich)を用い22℃で4-6時間nの細胞解離処理後、L-15あるいはMEM(Hank's)培地とスピナーフラスコを用いた攪拌培養あるいはスフェロイド作製プレートを用いスフェロイドを準備した。Exp.1: Rho kinase inhibitor(Y-27632)のスフェロイド凝集効果 Exp.2: トラフグ血清によるスフ

エロイド凝集効果、Exp.3：初回成熟個体の周年血清（2.5%）添加によるゴナドトロピン合成活性評価、Exp.4：初回成熟個体の周年血清による下垂体細胞増殖活性評価

(iv)スフェロイド凝集活性評価（Exp.1 and 2）
位相差倒立顕微鏡観察で得たスフェロイドのイメージを画像解析ソフト（ImageJ Fiji）を用いて面積を測定し凝集活性の指標とした。またスフェロイドプレート中心部にピンのあるプレートを用い円周部からの距離を測定することにより凝集度を計算した。

(v)ゴナドトロピン合成活性評価（Exp.3）
均一なスフェロイド（100-200 μ m）に周年血清（28ヶ月齢：6月～40ヶ月齢：6月）を2.5%になるように加え1週間培養した。プアン固定後 iPGell を用いて包埋し通常の脱水を行いパラフィン切片作成を行った。抗トラフグ LH 抗体、抗マミチヨグ FSH 抗体を用いた蛍光免疫染色法によるスフェロイド上の発現面積を測定し周年血清の LH、FSH の発現を解析した。

(vi)細胞増殖活性評価（Exp.4）
均一なサイズのスフェロイド（直径約 200 μ m）に初回成熟年齢に達したトラフグから回収した各月の周年血清（28ヶ月齢：6月～40ヶ月齢：6月）を2.5%になるように加え1週間培養を行った。最後の2日間 EdU（100 μ M）を加え培養を続け増殖細胞をラベルした。増殖細胞は Sulfo-Cy3-azide を用いたクイックケミストリーにより蛍光ラベルを行い共焦点レーザー顕微鏡により得たイメージをプロジェクションマップ後 ImageJ（Fiji）を用いてスフェロイド内の全陽性細胞数をカウントした。

4. 研究成果

1. 下垂体スフェロイドの凝集特性

下垂体スフェロイドは異種細胞の混合であり、なるべく早期に凝集を進める事が大切である。もともとメダカ等の他魚種でも下垂体初代培養細胞の凝集効果の報告はあったが、申請者により血清に凝集促進活性があることが確認された、そこでトラフグ血清とヒト iPS 細胞研究で細胞凝集効果が認められている Rho-kinase 阻害剤（Y-27632）を用いてスフェロイドの凝集効果を調査した。その結果 Y-27632 に濃度依存的に凝集促進効果が認められた（図1）。またトラフグ血清についても濃度依存的凝集効果が認められた。中心にピンを設置したスフェロイドプレートをを用い凝集度を測定した。下垂体細胞をスフェロイドプレートに撒いて2週間後に血清（2.5%）を加えた区で凝集が顕著に進んだ。一方血清濃度が低い区では凝集の進行が遅くなった。以上の結果は下垂体スフェロイドを短時間で効率よく凝集させるには血清濃度と Rock inhibitor を併用することで解決すると考えられた [Yamaguchi A. 351, 114481 (2024) Gen. Comp. Endocrinol.]。

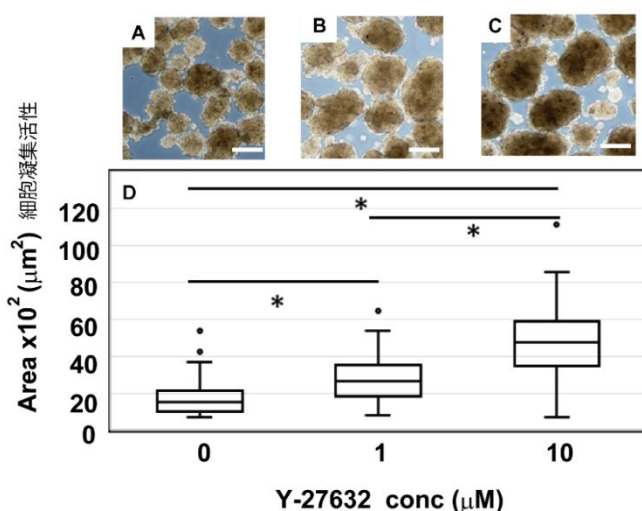


図1 Rho-kinase 阻害剤(Y-27632)の凝集促進効果

回転培養で作製したトラフグスフェロイド。A, B, CはDのY-27632濃度（0, 1, 10 μ M）に対応する下垂体スフェロイドイメージ * : t-検定（ $P < 0.01$ ）, Bar=100 μ m

II 下垂体スフェロイドアッセイの評価

図2にスフェロイドアッセイに使用したトラフグの体重変化と血清性ホルモン濃度の変動を示した。トラフグ（2歳）は水温の低下する9月

から体重の増加が始まる事が初回成熟の開始の合図である。海水温は厳冬期の2月には最低（9）となり、再び上昇する5月（20）で産卵が確認できた。雌トラフグでは成熟開始と同時にエストロゲン（E2）が上昇するが、最終成熟期の5月（産卵直前）にはテストステロン（T）の一過性の急上昇が確認できた。一方、雄トラフグではエストロゲンは年間を通じて低レベルを維持しており、初回成熟に伴うテストステロンの上昇のみが確認できた。雌の各月の血清（2.5%）存在下でスフェロイドのLH合成とFSH合成活性を免疫組織学的手法により測定したところ、LHは性ステロイドホルモン濃度に依存して発現活性が上昇するのに対し、FSHは性ステロイドホルモンとは無関係でありスフェロイド内で自律的に合成可能であることが明らかになった（図3）。このように雌トラフグ初回成熟にはエストロゲンとテストステロンの両方が重要な役割をしており、実際これらの性ホルモンがLHの合成を直接支配する事をスフェロイド実験により証明し

た [Yamaguchi et al. 389, 259-287 (2022) Cell Tissue Res.].

次に 48 時間 EdU を含む培地でスフェロイドの培養を行い、ラベリングされた核を CY3-azide を用いた Click Chemistry で検出し増殖の指標とした (図 4)。EdU 陽性細胞核数をカウントしたところ、トラフグ血清を含まない無血清培地 (SR3: serum replacement 3) は血清を加えた区と比べ 3-10 倍有意に高い値を示した。この結果はトラフグ血清中には下垂体細胞の増殖の阻害活性があることを示す。また各月の増殖活性を見ると、水温が 15 以上ある初回成熟開始時期 (9 月~12 月頃) までは高い活性を示すが、成熟中期から後期 (1 月~5 月) にかけて活性は低下した。また産卵後の 6 月もまだ低い活性を維持していた。細胞増殖活性が一番高い時期は秋 (10 月) であり、1 月から 6 月 (2020) およびコントロール (基本培地のみ) と比較しても有意な差が認められた。これらの結果は下垂体細胞の増殖は食欲が一番高い産卵半年前の秋に血中からの生理活性物質シグナルに反応して最も高くなると考えられた。一方成熟の後半には血中ステロイドホルモン (T/E2) は上昇するが細胞増殖促進効果は確認できなかったことから、性ステロイドの細胞増殖への直接関与は否定された。

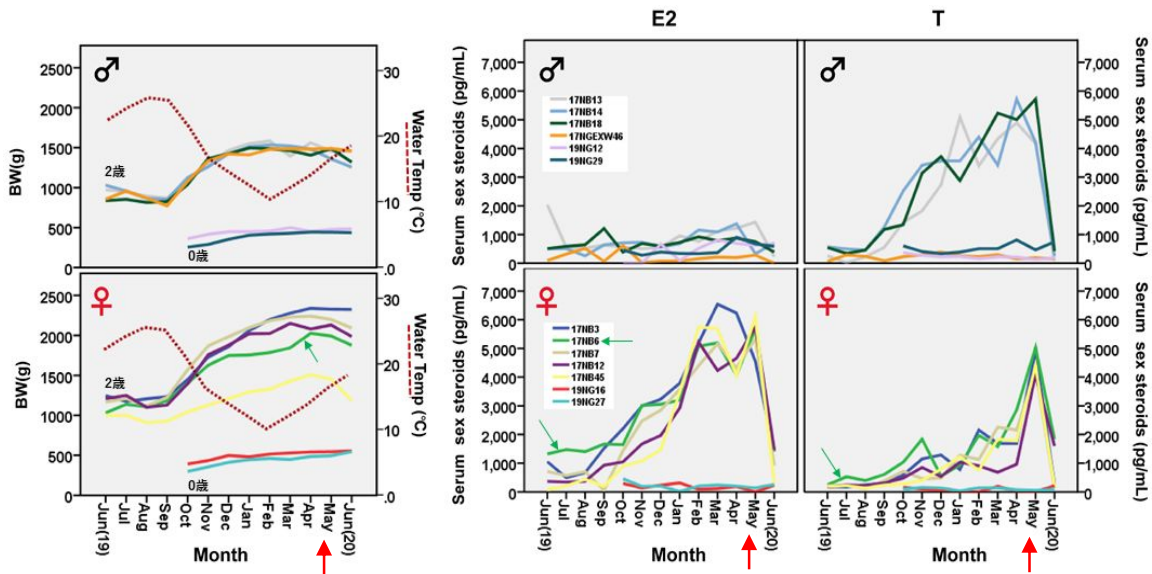


図2 初回成熟を迎えたトラフグの体重 (BW) と血清ステロイドホルモン濃度 (T, testosterone; E2, estrogen pg/mL) の年周期変動

左: 体重と水温の年周期変動; 2 歳魚は初回成熟を迎える個体, 0 歳魚はコントロールとして使用、右: 血中ステロイドホルモン (E2, エストロゲン; T テストステロン) の年周期変動。スフェロイドアッセイ (図 3, 4) には 17NB6 個体 (雌, 緑矢印) から採取した血清 (2.5%) を培養に使用した。赤矢印は産卵月 (May)。

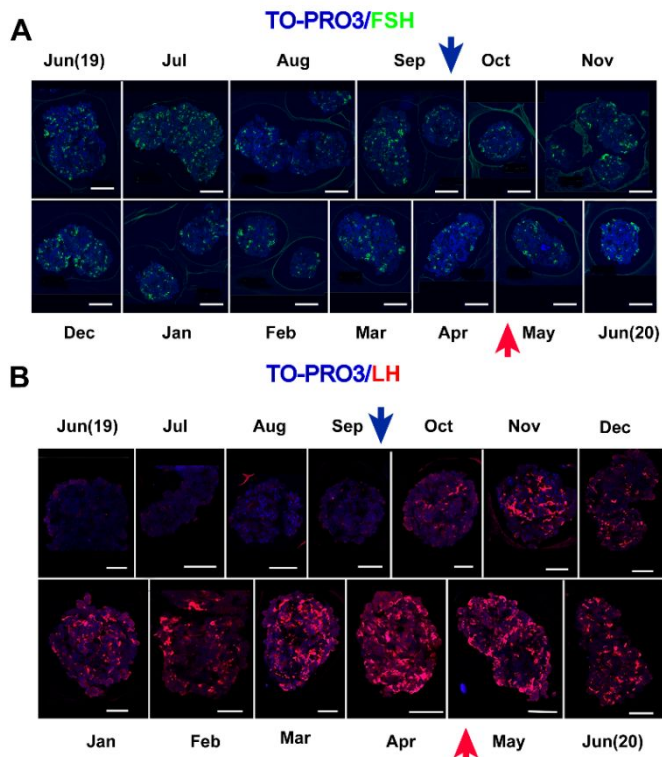
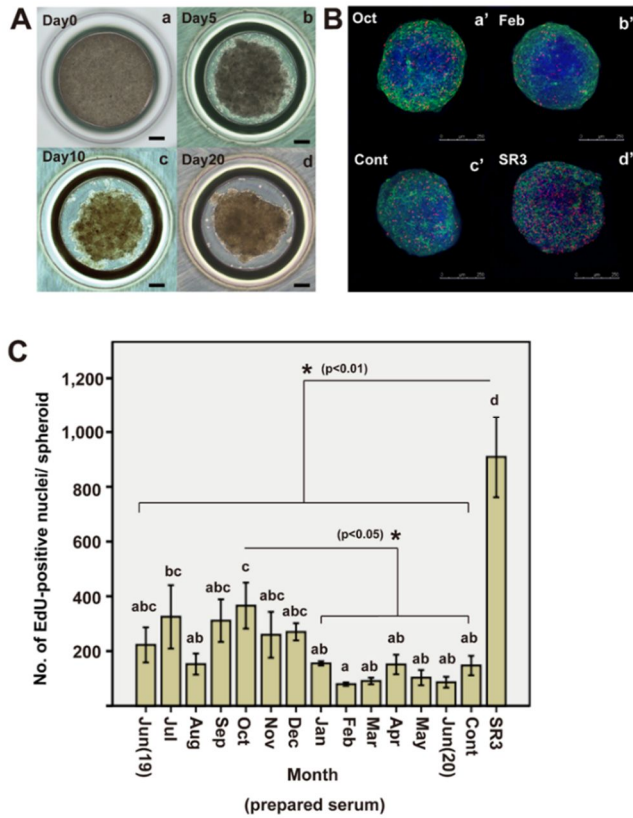


図3 雌周年血清を用いたスフェロイドのゴナドトロピンの合成活性の評価
A: スフェロイド内 FSH 合成 (緑) の周年変動 B: スフェロイド内 LH (赤) の発現。TO-PRO3 による核染色 (青)。スフェロイドをパラフィン包埋し切片を免疫組織学法で解析した。Bar=100 μm

図4 トラフグ下垂体スフェロイドを用いた細胞増殖アッセイ

(A) スフェロイドプレート(試作品)でのトラフグ下垂体細胞の凝集 (a) 3×10^6 細胞をウェル(32well/dish)に入れた直後の様子, (b) 5日後, (c) 10日後, (d) 20日後 (B) 血清培地での EdU 陽性細胞の検出 (赤, Click chemistry による CY3 を用いた EdU 陽性細胞核; 青, DAPI 核染色; 緑, FITC 結合 2 次抗体によるアクチン繊維の検出), (a') 10 月 (Oct) の血清 (2.5%) を含む培地で培養, (b') 2 月 (Feb) の血清 (2.5%) での培養, (c') 基本培地 (血清無し) のみでの培養, (d') 無血清培地 (SR3) での培養 (C) 各月の血清 (2.5%, 2019 年 6 月 ~ 2020 年 6 月) を含む培地での細胞増殖頻度の比較。血清は同一個体 (17NB6) から周年サンプリングを行ったものを使用した。縦軸はスフェロイド 1 個当たりの平均 EdU 陽性細胞数, 横軸はトラフグ血清の採取した月を示す。Cont (基本培地のみ, 血清無し), SR3 (無血清培地)。1 次配置分散分析 (N = 3-5) 後の Tukey による多重検定 (*)



III トラフグ脳ニューロスフェアの作製

下垂体スフェロイドと同様の手法を用いトラフグ脳からもスフェロイドの作製を行った。作製できる量は組織に含まれる神経細胞数に依存しており、サイズは 100 ミクロンほどのものが多かった。現在までに脳各パーツ (終脳、間脳、視床下部下葉、視葉、小脳) 由来のニューロスフェア作製に成功している。



図5 トラフグ間脳由来のニューロスフェア (左、接着前) と dish に接着後 (右、1 週間)

位相差倒立顕微鏡 (X20 対物レンズ) での撮影。ニューロスフェア (赤矢印) から神経突起 (黄矢印) の伸長が確認できる。Bar=100 μ m

IV まとめ

本研究により下垂体や脳ニューロン由来のスフェロイドを構築し、数ヵ月の維持が可能になり、魚類下垂体スフェロイドを用いて生体環境に近い in vitro 実験が常時可能となった。またニューロスフェアと下垂体スフェロイドとの共培養により、さらに生体に近い状況を構築することで、新規の生理活性物質が同定できる可能性がある。生体を用いた中・大型魚種の産卵誘導実験は多大な労力が必要となるが、本研究で提案するスクリーニング技術を適応することにより、産卵誘導に最適な生理活性物質の組み合わせを今後提案できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaguchi Akihiko	4. 巻 351
2. 論文標題 Evaluation of fish pituitary spheroids to study annual endocrine reproductive control	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 114481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2024.114481	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 Yamaguchi Akihiko, Tsunematsu Tomoko, Motojima Yoshihiro, Toriyama Kanako, Horinouchi Asami, Ishii Yukari, Murata Hanezu, Yoshikawa Sota, Nyuji Mitsuo, Shimizu Akio	4. 巻 389
2. 論文標題 Pituitary luteinizing hormone synthesis starts in aromatase (cyp19a1b)-positive cells expressing esr1 and esr2b at the onset of puberty in Takifugu rubripes (fugu)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 259 ~ 287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-022-03629-6	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 Chakraborty Tapas, Yamamoto Yume, Hanai Shoma, Hirano Mayumi, Mohapatra Sipra, Yamaguchi Akihiko, Takeda Tatsusuke, Matsuyama Michiya, Ohta Kohei	4. 巻 9
2. 論文標題 Divulging the social sex change mechanism in a unique model system for studying the sexual plasticity of protogynous hermaphrodite fish, three bamboo leaf wrasse (<i>Pseudolabrus sieboldi</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	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） 10.3389/fmars.2022.1048506	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 Selvaraj S, Ahilan B, Yamaguchi A, Matsuyama M	4. 巻 9
2. 論文標題 Multiplicity of gonadotropin-releasing hormone in fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Entomology and Zoology Studies	6. 最初と最後の頁 352 ~ 361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22271/j.ento.2021.v9.i3e.8729	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 該当する

1. 著者名 LUMAYNO SANNY DAVID PACHECO, OHTA KOHEI, YAMAGUCHI AKIHIKO, MATSUYAMA MICHIIYA	4. 巻 35
2. 論文標題 Molecular Characterisation and Reporter Gene Assay of the Three GnRH Isoforms and Two GnRH Receptors of a Clupeiform Fish, Japanese Sardine, <i>Sardinops sagax melanostictus</i> (Temminck & Schlegel, 1846)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 26-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33997/j.afs.2022.35.1.003	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 該当する

1. 著者名 山口明彦	4. 巻 -
2. 論文標題 トラフグ下垂体から均一なスフェロイドを作製するための最適な培養条件の評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 nova biomedical: customer focus: Researcher's interview	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) なし	査読の有無 無
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山口明彦
2. 発表標題 トラフグ下垂体スフェロイドを利用した性ステロイドフィードバック機構の解析
3. 学会等名 第37回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口明彦
2. 発表標題 トラフグ下垂体スフェロイドを利用した細胞増殖とゴナドトロピン合成活性の周年モニタリング
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会 (山形)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口明彦
2. 発表標題 トラフグ下垂体スフェロイド培養系の開発とゴナドトロピン合成機構の解明
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会（オンライン米子大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口明彦
2. 発表標題 トラフグ下垂体スフェロイドの効率的培養法の確立とゴナドトロピン産生機能の検証
3. 学会等名 第35回日本下垂体研究会学術集会（福岡国際会議場）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口明彦
2. 発表標題 下垂体スフェロイドを用いたトラフグ初回成熟機構の解析
3. 学会等名 三学会合同福岡大会（九州大学伊都キャンパス）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------