

第2号



日本下垂体研究会誌

2015年5月8日 発行

本号の内容

1. 論文 I-1 「ラット下垂体ゴナドトロフに見られるアネキシン A5 の LH サージ出現に伴う分布の変化」
汾陽 光盛 (北里大学)
2. 論文 I-2 「プロラクチン細胞はどこから？」
野上 晴雄 (筑波大学)
3. 論文 I-3 「ラット下垂体前葉における基底膜の主要構成成分であるラミニンの研究」
塚田 岳大 (自治医科大学)
4. 短報 - 1 「Ethinyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する視床下部キスペプチンニューロンの異常」
市村 亮平 (国立医薬品食品衛生研究所)
5. 短報 - 2 「神経堤細胞由来細胞は下垂体に侵入し S100 β 陽性となる」
上春 浩貴 (明治大学)

事務局

北里大学獣医学部獣医生理学研究室
〒034-8628 青森県十和田市東二十三番町35-1
事務局長 汾陽光盛
e-mail mitsumor@vmaskitasato-u.ac.jp

日本下垂体研究会

<http://www.jjichi.ac.jp/jspr>

論文 I-1

ラット下垂体ゴナドトロフに見られるアネキシン A5 の LH サージ出現に伴う分布の変化

汾陽光盛

北里大学・獣医学部・獣医生理学研究室
mitsumor@vmas.kitasato-u.ac.jp

要旨

下垂体前葉の黄体形成ホルモン (LH) 分泌は、視床下部のゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)で調節される。GnRH によってゴナドトロフでアネキシン A5 (ANXA5) の合成が促進され、LH の合成と放出に対して促進的に作用することを既に報告した。本研究では、生理的 LH 放出に伴ってゴナドトロフにおいて ANXA5 の分布に起こる変化を免疫組織化学法で検討した。LH サージのピークが 17:00 時に観察され、この時 LH β サブユニット陽性のゴナドトロフでは、細胞質に粗面小胞体の拡張像と考えられる空胞構造が出現し、光学顕微鏡レベルで容易に観察された。この空胞構造は 23:00 時で更に拡大していた。ANXA5 は 11:00 時と 14:00 時に核内に認められたが、17:00 時には核内から細胞質に移動しており、細胞質内の特に核周囲と細胞膜付近に存在することが明らかとなった。更に、GnRH 受容体拮抗薬とペントバルビタールを投与して LH サージを抑制したところ、これらの変化は消失した。以上の本研究の結果から、発情前期の GnRH 受容体刺激によって ANXA5 がゴナドトロフ内で局在を変えることが明らかになり、ANXA5 が LH 分泌に生理的に関与していることが示唆された。

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.2, 1-5, 2015)

視床下部で産生される GnRH は、下垂体のゴナドトロピン産生細胞(ゴナドトロフ)で、ゴナドトロピン(黄体形成ホルモン(LH)と卵胞刺激ホルモン(FSH))分泌を促進する。LH の大量放出は排卵を誘起する直接の刺激となる。GnRH は、ゴナドトロフ上の膜 7 回貫通型 GnRH 受容体に結合し、受容体と共役する三量体 G 蛋白質の G α q/11 サブユニットを介して、ホスホリパーゼ C(PLC)を活性化するが、GnRH 受容体刺激による LH 放出促進機序には、複数の経路が複雑に関与しており未だに不明な点が多い[1, 2]。

当研究室の一連の研究で、ゴナドトロフにアネキシン A5 (ANXA5) が発現し、GnRH の LH 放出促進作用を増強することを明らかにしてきた[3-6]。ゴナドトロフの ANXA5 は、GnRH によって合成が促進される[4, 6]。アネキシンは今までに哺乳類に 12 種類が報告されている、カルシウム依存性にリン脂質結合親和性を示す蛋白質ファミリーである[7-9]。中でも、ANXA5 は、比較的発現量の多い蛋白質として知られる。アネキシンは分子量 36 k の単純蛋白質で、分子内に約 60 アミノ酸残基からなる相同性の高い 4 回 (アネキシン A6 は 8 回) の繰り返し構造を持ち、この部分がカルシウムとリン脂質への結合能を示す[10]。ANXA5 は、カルシウム濃度依存性にリン脂質結合親和性を持つ以外に、PLA₂ と PKC の活性抑制、抗血液凝固作用が知られているが、ゴナドトロフにお

ける作用機序はよく分かっていない。生理的なゴナドトロピン放出への関与も不明なままである[7, 10]。

本研究では、生理的な LH 大量放出である発情前期の LH サージにおける、ゴナドトロフ内の ANXA5 の変化を検討した。

材料と方法

1. 実験動物

本研究には、動物繁殖研究所(財)より導入し、当教室で継代維持している成熟雌ウイスターイマミチラット(3-6ヶ月齢;体重250~350g)を用いた。ラットは、14時間点灯(5:00-19:00時)、10時間点灯の照明条件、室温23±3℃の環境下で飼育し、固形飼料(CE-2、日本クレア)と水を自由に摂取させた。毎日膣垢像を観察し発情周期を判定した。本研究の全ての実験計画は、北里大学獣医学部動物実験倫理委員会の指針に従った。

2. 血液中 LH 濃度の測定

発情期の LH サージを検出するため、連続して 2 回以上の性周期を確認したラットから断頭で血液を採取した。発情前期の 11:00、14:00、17:00、20:00、23:00、2:00 時にそれぞれ 5 頭のラットを断頭屠殺して採血を行った。血液は遠心分離(4℃、

3,000 rpm, 10 分)し、血漿を用いて LH 濃度を測定した。血漿を LH 測定まで -30°C で保存した。

LH を時間分解蛍光免疫測定法で測定した。ユーロピウム標識用 LH (NIDDK-RAT LH - I - 9)、ウサギ抗ラット LH 抗体 (NIDDK Anti-rat LH-S-11)、標準品としてラット LH (NIDDK-rat LH-RP-3) を用いた。マイクロプレートに抗ウサギ γ グロブリン (二次抗体、自家製) を固相化し、抗 LH 抗体を結合させた。ユーロピウム標識 LH と非標識 LH の競合拮抗によって LH を測定した。ユーロピウムの蛍光強度を 420 Arvo マルチラベルカウンター (Perkin Elmer, Branchburg, NJ) で測定した。

3. 免疫組織化学

発情前期のラットの下垂体を用い、免疫組織化学法で ANXA5 と LH β の分布を観察した。抗ラット ANXA5 ウサギ抗体は自作した。抗ラット LH β 抗体は NIDDK から入手した。

発情前期の 11:00、17:00、23:00 時に各 2 頭のラットから下垂体を採取し、常法でパラフィンブロックを作製し、4 ミクロンの切片を免疫組織化学法に供した。10,000 倍希釈した一次抗体 (抗 ANXA5 あるいは抗 LH β) を組織切片上に 50 μ l ずつ乗せ、4°C で一晩反応させた。一次抗体反応後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗 IgG 抗体を載せ、室温で 2 時間、湿潤箱内で反応させた。ジアミノベンチジン (DAB) 溶液を組織切片上に滴下して発色させた。ヘマトキシリンで対比染色を行った。

セトロレリックス (Aeterna Zentaris、東京) あるいはソムノペンチル (ペントバルビタールナトリウム、共立製薬株式会社、東京) を発情

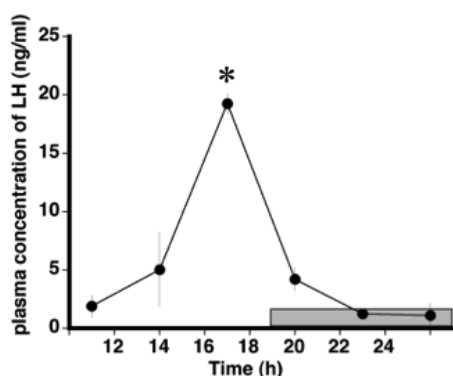


Fig.1 発情前期における血中 LH 濃度

発情前期の正常ラットから 3 時間ごと (11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00, 02:00 時) に採血を行い、それぞれの血漿 LH 濃度を測定した。値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。* $p < 0.05$ (vs all other values)

前期の 12 時に、ラットに投与した。LH サージの抑制による発情期の 1 日延長を確かめられた。そこで、この時の下垂体での ANXA5 のゴナドトロフにおける分布の変化を観察した。発情前期の 12 時にセトロレリックス 40 mg/kg、あるいはペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル) 40 mg/100g を腹腔内投与し、17:00 時に下垂体を採取した。

4. 統計

本研究において各群の測定値の平均と標準誤

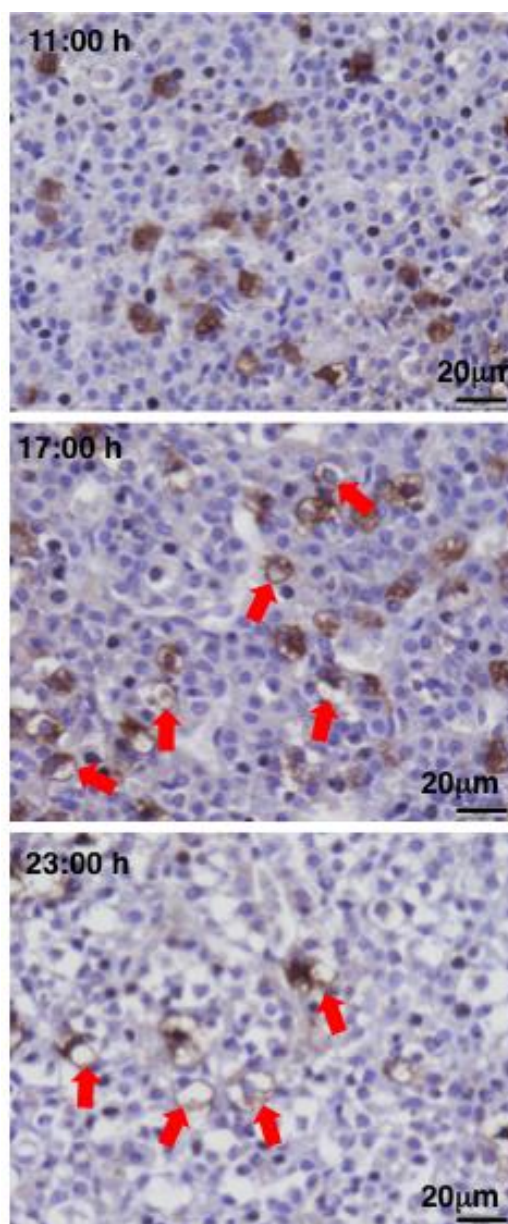


Fig.2 発情前期の下垂体における LH β の分布

発情前期の 11:00 時、17:00 時、23:00 時に下垂体を採取し、抗 LH β 抗体を用いて免疫組織化学を行った。赤矢印は細胞質に空胞を生じた細胞を示している。

差を算出し、平均地の有意差は Tukey の多重比較を用いて検定し、 $p < 0.05$ をもって有意な差があると判定した。

結果

1. 発情前期の LH サージ

発情前期の 11:00 時以降血漿 LH 濃度が増加し、14:00 時から急激な上昇を示し、17:00 時にピークに達した(他の時刻に対して $P < 0.05$)。17:00 時を過ぎるとすぐに減少し、23:00 時には基底値に戻った (Fig.1)。

2. 発情前期の下垂体前葉における LH β の免疫組織化学像

発情前期の 11:00、17:00、23:00 時に下垂体を採取し、抗 LH β 抗体を用いた免疫組織化学を行った。17:00 時の陽性反応は 11:00 時に比較して弱くなり、陽性細胞の細胞質に大きな空胞が認められるようになった。23:00 時には、空胞構造は更に大き

くなり、陽性反応の領域が小さくなった (Fig.2)。

3. 発情前期の下垂体前葉における ANXA5 の免疫組織化学

発情前期の 11:00 時から 2:00 時まで 3 時間おきにラットの下垂体を採取し、抗 ANXA5 抗体を用いて免疫組織化学を行った。11:00 時には核内の陽性反応が最も多く見られ、14:00 時には 11:00 時に比べ核内に陽性を示す細胞は少なくなった (Fig.3)。17:00 時には核内の陽性反応は弱くなったが、それに対して細胞質は 14:00 時と比較して広くなり、空胞が出現した。この細胞質が広がった細胞の核周囲と細胞膜に ANXA5 陽性反応が見られた。20:00 時以降には核内の陽性反応はほとんど見られなくなった。

4. LH サージ抑制後の下垂体前葉における ANXA5 と LH β の免疫組織化学

発情前期夕方 (17:00 時) に起こる LH サージと細胞内の ANXA5 の分布に見られた変化に関連があるか否かを確かめるため、GnRH

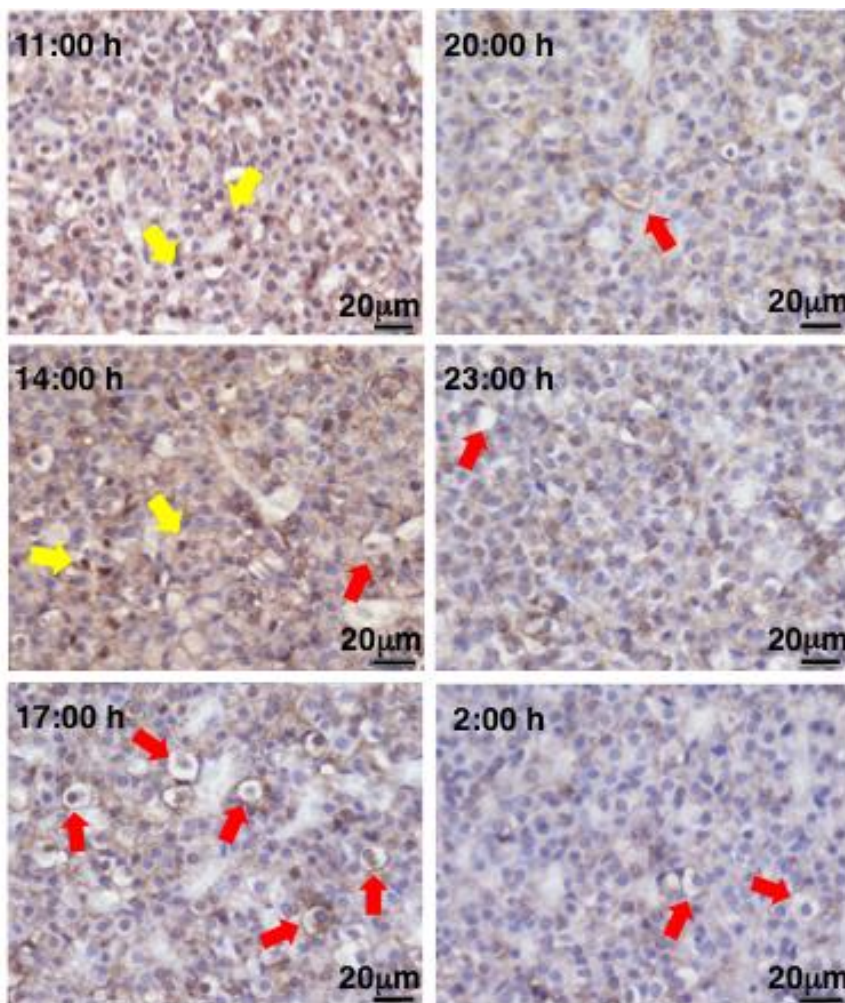


Fig.3 発情前期の下垂体における ANXA5 の分布

発情前期の図中に示した各時刻に下垂体を採取し、抗 ANXA5 抗体を用いて免疫組織化学を行った。黄矢印は核内に陽性反応の見られた細胞を、赤矢印は細胞質に空胞を生じた細胞を示している。

受容体拮抗薬と脳幹麻酔薬で LH サージを抑制した。まずどちらの処置によっても、膣スメアが発情期を 2 日続けること、即ち排卵の抑制されることを確認した。

抗 LH β 抗体を用いた免疫組織化学では、細胞質が密に陽性反応を示し、intact に見られるような細胞質の広がり(空胞)はほとんど見られなかった。抗 ANXA5 抗体を用いた免疫組織化学では、intact に見られた空胞は見られず、陽性反応を示す核が存在した(Fig.4)。

考察

GnRH の作用で ANXA5 合成が促進され、黄体形成ホルモン(LH)の合成と放出を促進する[3, 4, 6]。生理的な LH 放出に ANXA5 の関与があるかどうかは不明である。本研究では、ゴナドトロフにおける GnRH のゴナドトロピン分泌促進作用における ANXA5 の関与をその細胞内分布を調べることで検討した。

抗 LH β 抗体を用いた免疫組織化学で観察された陽性反応を示す細胞の細胞質に生じた空胞は、LH サージが終了しても更に広がり、23:00 時には細胞周囲と核周囲のみに陽性を示す細

胞が増加した。この空胞構造が何か即座に判断できないが、LH 合成の促進される時間であることから、拡張した粗面小胞体である可能性が考えられた。本研究の結果から、ゴナドトロフでは、LH サージに伴って光学顕微鏡レベルで容易に観察される変化の起こっていることが明らかとなった。従って、時間帯によっては空胞を指標にゴナドトロフを特定できることが明らかになった。

11:00時に核内に ANXA5 の認められる細胞が多かった。14:00時には、11:00時に比べ核内に ANXA5 陽性反応を示す細胞は少なくなり、17:00時には核内の陽性反応はさらに弱くなり、これらの細胞の細胞質が拡大し、細胞質内の反応は弱くなり細胞膜と核に陽性反応が見られた。20:00時以降では核に陽性反応は認められず、細胞質に均一に弱い陽性反応が見られた。深夜2:00時には核、細胞質ともに陽性反応が弱くなった。このような ANXA5 の分布の変化から、ANXA5 は発情前期のゴナドトロフ内で場所を変えて作用することが示唆された。11:00時に観察された核内の ANXA5 と、17:00時に観察された細胞膜及び細胞質に分布する ANXA5 が、それ

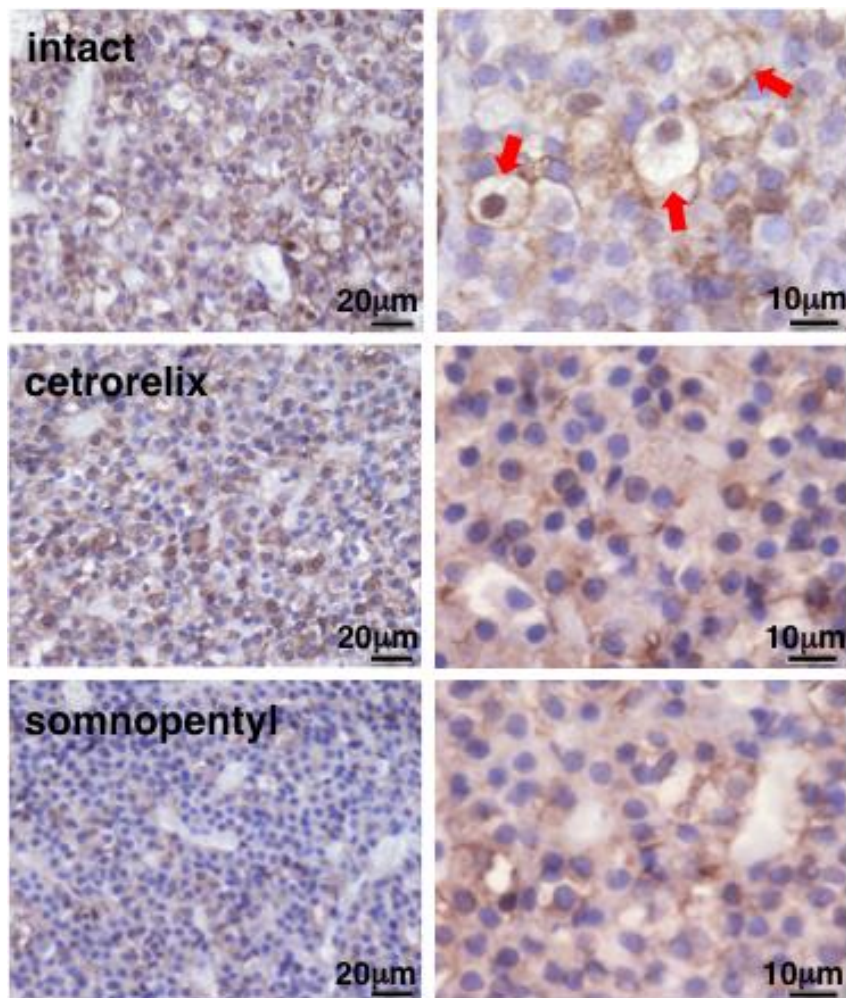


Fig.4 発情前期の下垂体における LH サージ抑制後の ANXA5 の分布

発情前期の12:00時セトロレリックスあるいは染むのペンチルを投与した。17:00時に下垂体を採取し、抗 ANXA5 抗体を用いて免疫組織化学を行った。図の左側に低倍像を右側に高倍像を示した。赤矢印は細胞質に空胞を生じ細胞膜の染色された細胞を示している。

それぞれの様な機能状態を示しているのかに興味を持たれる。これらは、GnRH の大量放出によってもたらされる変化と考えられた。

LH サージを抑制した時の LHβ と ANXA5 の分布の変化を調べると、セトロレリックスとソムノペンチルの両者で、違いはほとんど見られず、intact で見られたような細胞膜上の ANXA5 は減少し、細胞質に陽性反応が薄く広がった。セトロレリックス投与では核内に陽性反応を示す細胞が見られるようになったが、ソムノペンチル投与ではそのような細胞は認められなかった。LH 放出を抑制することで、ANXA5 の細胞内分布の変化が抑制されたことから、発情前期ラットの下垂体で観察された ANXA5 の細胞内局在の変化は、GnRH の大量放出の結果であることが示唆された。

下垂体前葉細胞の初代培養系で、ANXA5 合成を抑制すると、GnRH による LH と FSH 放出の抑制されることを観察している[4]。また卵巣摘出後の下垂体で ANXA5 の増加すること、細胞膜と核内に ANXA5 の局在することを観察している[3]。本研究の結果は、発情前期午後に出現するゴナドトロピンサージに伴って、空胞で識別できるゴナドトロフにおいて ANXA5 の局在が変化すること、特に細胞膜に移動する ANXA5 の増加することが明らかになった。細胞膜上の ANXA5 が幕の内側か、外側のどちらに存在するかは現時点では分からないが、我々は高カリウムによる非特異的脱分極刺激で細胞外に移送される ANXA5 量の増えることを観察した[11]。ANXA5 が自己分泌的にゴナドトロフ細胞膜外側で機能している可能性が考えられた。

以上の本研究の結果から、まず生理的な LH 大量放出時に ANXA5 がゴナドトロフ内で、その分布を変えて機能していることが示唆された。次いで、この ANXA5 の分布も GnRH によって調節されていることが明らかになった。ANXA5 は、ゴナドトロフにおいて、生理的に GnRH 受容体下流で機能する新規の機能分子と考えられた。

※本報は原著論文として投稿され、2名の査読者により審査され、受理されました。

References

- 1) Shacham S, Harris D, Ben-Shlomo H, Cohen I, Bonfil D, Przeddecki F, Lewy H, Ashkenazi IE, Seger R, Naor Z. Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitam Horm* 2001, 63,63-90.
- 2.) Naor Z. GnRH receptor signaling: cross-talk of Ca²⁺ and protein kinase C. *Eur J Endocrinol* 1997, 136,123-127.
- 3.) Kawaminami M, Yamaguchi K, Miyagawa S, Numazawa S, Ioka H, Kurusu S, Hashimoto I. Ovariectomy enhances the expression and nuclear translocation of annexin 5 in rat anterior pituitary gonadotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 1998, 141,73-78.
- 4) Kawaminami M, Tsuchiyama Y, Saito S, Katayama M, Kurusu S, Hashimoto I. Gonadotropin-releasing hormone stimulates annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in the anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 291,915-920.
- 5) Kawaminami M, Kawamoto T, Tanabe T, Yamaguchi K, Mutoh K, Kurusu S, Hashimoto I. Immunocytochemical localization of annexin 5, a calcium-dependent phospholipid-binding protein, in rat endocrine organs. *Cell Tissue Res* 1998, 292,85-89.
- 6) Kawaminami M, Etoh S, Miyaoka H, Sakai M, Nishida M, Kurusu S, Hashimoto I. Annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in pituitary gonadotropes is induced by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and modulates GnRH stimulation of gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 2002, 75,2-11.
- 7) Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biol* 2004, 5,219.
- 8) Morgan RO, Fernandez MP. Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci* 1997, 53, 508-515.
- 9) Walker JH, Boustead CM, Koster JJ, Bewley M, Waller DA. Annexin V, a calcium-dependent phospholipid-binding protein. *Biochem Soc Trans* 1992, 20, 828-833.
- 10) Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002, 82, 331-371.
- 11) Kawaminami M, Uchida S, Marumoto N, Naito K, Ozaki K, Sato Y, Kurusu S, Hashimoto I, Mutoh K, Walker AM. Stimulation of secretion by membrane depolarization increases extracellular plasma membrane association of annexin 5 in the pituitary gland. *Endocrine J* 1994, 2, 357-362.

論文 I-2

プロラクチン細胞はどこから？

筑波大学医学医療系

野上 晴雄

hnogami@md.tsukuba.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.2, 6-10, 2015)

少し前のことになるが、下垂体細胞の細胞系譜に関する興味深い論文に出会った。Luque らの論文¹⁾で、下垂体前葉のプロラクチン (PRL) 細胞の殆どは成長ホルモン (GH) 細胞から由来するものではないというのである。PRL 細胞は GH 細胞から分化転換の結果生み出されるという説があったが、これに反対する見事な結果が示されていた。PRL 細胞の由来を明らかにするために彼らは、GH プロモーター制御下に Cre-recombinase を発現するマウスを Cre の作用により CMV プロモーターの制御下にアルカリフォスファターゼ (ALP) が発現するような遺伝子を持つトランスジェニックマウスと交配した。このようにして生まれたマウスでは一度 GH を発現した細胞はその後恒常的に ALP を発現し続ける。前葉組織を ALP と前葉ホルモンの免疫組織化学により調べた所、予想通り殆どすべての GH 細胞は ALP 陽性であったが、PRL 細胞についてはその約 10%程度が ALP 陽性を示したにすぎなかったのである。Luque らの実験は多くの PRL 細胞は GH 細胞とは別の細胞から分化するというを明らかに示しているが、それでも一部の PRL 細胞は GH 細胞経由ということも示している。本稿では下垂体前葉の PRL 細胞の発生について歴史的な背景と最近の研究について、私共の研究結果も含めて概説したい。

成長ホルモンとプロラクチン

下垂体前葉から分泌される PRL と GH はともに分子量 20-22K の単純タンパクホルモンで、分子内に SS 結合によるループ構造を持っている。構造的にはサイトカインの一種とされており、受容体もともにチロシンキナーゼ型である。受容体は全身のさまざまな組織に発現している。これらの特徴は、単一の標的器官に発現する G タンパク共役型受容体に作用する副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、性腺刺激ホルモンなどの前葉の糖タンパクホルモンと大きく異なっている。GH と PRL は共通の祖先分子から分化したホルモンで、ともに転写因子 pit-1

(GHF1, Pou1f1) によりその発現が制御される^{2,3)}が、通常各々異なる細胞から分泌されている。

プロラクチン細胞の発生と機能発達

1970年代に免疫組織化学が一般的に研究手段として用いられるようになると、下垂体前葉細胞の発生もホルモンの免疫組織化学によって検討することができるようになった。ラットでは Sétáló と Nakane⁴⁾は PRL 細胞が胎生 16日に分化するとしたが、日本下垂体研究会の前身である「下垂体研究者の集い」の設立当初からのメンバーであった新潟大学の渡辺先生（当時は徳島大学）⁵⁾は PRL 細胞が現れるのは出生後であるという結果を発表した。Chatelain ら⁶⁾、Hemming ら⁷⁾も渡辺先生と同様の報告をしている。その後、私も調べてみたが、いくら免疫染色の感度を上げていってもいくつかの個体で胎生 18日に1切片あたり1個か2個の PRL 細胞を検出できた程度で、多くの PRL 細胞が分化するのは渡辺先生の報告のとおり出生後であることを確認した⁸⁾。渡辺先生は 1994年にこの問題を再度検討し、ラットでは胎生 18日以降 PRL 細胞が検出可能であるが、GH 細胞に比べるとはるかに小数であると報告している⁹⁾。マウス下垂体でも免疫組織化学や電子顕微鏡による研究が行われたが、PRL 細胞が現れるのはやはり出生前後であると考えられていた¹⁰⁾。

しかし、GHF1(pit-1)を発見したカルフォルニア大学の Dr. Karin は胎生 15日、16日のマウス下垂体に PRL 細胞が一過性に出現し、その後消失することを報告している¹¹⁾。この論文の発表に先立って、私の留学先のテキサス大学に Dr. Karin が来校し、討論の機会があった。私は PRL 細胞が一過性に現れるときいて、どうしてそのようなことが起こるのか質問してみた。彼も理由はよく解らないが、胎生 15,16日は GHF1(pit-1)タンパクが産生され始めるときにあたるので、この転写因子の働きで PRL 遺伝子の転写が一過性に起こるのではないかとの返事であった。この頃 Dr. Karin のグループは GHF1(pit-1) mRNA は胎生 13日に発現するが、

タンパクは 15 日から検出できると主張していたのである。しかし、GHF1(pit-1)単独で PRL 遺伝子の転写が起こるわけではないので、これは妥当な説明とは言い難い。今では私は、一度現れた PRL 細胞が数日で消えてしまうのは、胎生 16 日以降胎仔において血中濃度が上昇するコルチコステロンによる発現抑制作用¹²⁾の結果ではないかと思っている。

2000 年に私たちもマウス PRL 細胞の発生を免疫組織化学で調べ、Karin の報告と同様に胎生 15 日と 16 日に少数の PRL 細胞を検出したが、17 日以降ではほとんどみられなかった¹³⁾。マウス胎仔下垂体の PRL mRNA レベルの変化を定量的に調べてみたが、結果は免疫染色と同じで、胎生 15, 16 日に一過性の PRLmRNA 発現上昇が検出できた。しかし、その発現レベルは成熟マウス下垂体の 1/1000 以下に過ぎなかった(野上、未発表)。In situ hybridization による研究から、Japon ら¹⁴⁾は PRL mRNA 陽性細胞は GHmRNA 陽性細胞とともに胎生 15 日に初めて出現するが、GH 細胞がその後急速に増加するのに対し、PRL 細胞数は増加するものの、GH 細胞に比べると小数であったとしている。このように報告によって多少の違いがあるが、ラットやマウスでは PRL 細胞は胎生期にごく少数出現するものの、多数の PRL 細胞が分化するのは出生後であるというのが多くの研究の一致した所見であった。これに対し、GH 細胞はラットでは胎生 18-19 日に、マウスでは胎生 15-16 日に現れその後急速に細胞数を増加させるという結果がほとんどであった。^{4,5,6,7,9,11)}

プロラクチン細胞は成長ホルモン細胞から分化する?

PRL 細胞は GH 細胞の一部が分化転換を起こして生まれるとする考え方を支持するもっとも有力な証拠は、Behringer ら¹⁵⁾によって 1988 年に発表された。彼らはラット GH 遺伝子の上流 310bp の断片が GH を下垂体前葉にのみ発現させるのに十分な配列を含んでいることを確認し、このプロモーター断片をジフテリア毒素の遺伝子につなげた transgene を導入したトランスジェニックマウスを作製した。このマウスでは GH 遺伝子の転写が起こると、ジフテリア毒素遺伝子も転写され、毒素が細胞内に産生される。その結果 GH 発現細胞のみが死滅するはずであった。彼らの見込み通り、このトランスジェニックマウスは生まれて 5 日が過ぎると徐々に成長が遅れ、dwarf となった。下垂体を調べると GH 細胞はほとんど検出されない。問題は、こ

のマウス下垂体には GH 細胞以外にも PRL 細胞が極めて少数しか存在しなかった点である。この結果から、彼らは PRL 細胞の殆どは GH 発現細胞から供給されると考えた。GH 細胞以外にも PRL 細胞は生まれるかもしれないが、その確率は小さいのではないかとしたのである。この「PRL 細胞は GH 細胞から」という説は上記のように多くの免疫組織化学的研究が GH 細胞は胎生期に多数発生するのに、PRL 細胞は実質的には出生後に発生するという結果^{4,5,6,7,9,11)}や、Frawley のグループが reverse hemolytic plaque assay を用いて発表した、生後最初に検出される PRL 細胞は同時に GH も分泌するという結果¹⁶⁾ともよく一致していた。さらにその翌年、Borrelli ら¹⁷⁾は HSV1-thymidine kinase (HSV1-TK) 遺伝子を Behringer ら¹⁵⁾と同じ GH 遺伝子断片につなぎトランスジェニックマウスを作製した。このマウスに FIAU という核酸誘導体を投与すると細胞分裂に入った HSV1-TK 発現細胞、すなわち GH 細胞が代謝産物の毒性により死滅することになる。胎生期からこの試薬を投与されたトランスジェニックマウスは下垂体に GH 細胞が存在せず、生後 2 週目から体重が対照に対して有意に低下し、結果的に dwarf となった。そして、このようなマウスではやはり PRL 細胞の数が著しく減少していたのである。このような一連の研究の結果から、「PRL 細胞は GH 細胞から」という考え方は広く受け入れられるようになった。事実、埼玉大学の井上先生の研究室は、GH 産生下垂体腫瘍細胞である MtT/S 細胞にインスリンと EGF を作用させることによって、実際に PRL 産生細胞を分化させることに成功した¹⁸⁾。この処理によって PRL 産生を示す細胞は培養期間を延長しても最大 10%であったが、GH 細胞が PRL 産生細胞へ変化することがありうることを、実験的に証明したのである。

しかし、その後の研究で「PRL 細胞は GH 細胞から」では説明できないデータが報告された。新潟大学の渡辺先生は下垂体前葉組織の器官培養系で GH 細胞の分化が見られない条件で PRL 細胞が現れることを観察した¹⁹⁾。胎生 13.5 日のラット下垂体を無血清の MEM α で 8 日間培養すると、培養組織中に PRL 細胞が分化したのである。このとき GH 細胞は全く認められなかったため、この実験系では PRL 細胞は GH 発現細胞から生じるのではないと考えられる。私たちは胎生期に PRL 細胞が分化しない、あるいは分化しても極めて少数であるのは PRL 遺伝子発現を強く促進するエストロゲンの作用が、胎仔血中の α フェトプロテインにより抑制され

ているからだと考えた。そこで、妊娠マウスに合成エストロゲン、ジエチルスチルベストロール (DES) を投与してみた¹³⁾。DES は胎盤を通じて胎仔血中に入るが、 α フェトプロテインとは結合せず、エストロゲン作用を発揮する。妊娠 15 日目のマウスに DES を投与して次の日(16 日)に胎仔下垂体を調べると、生後 6 日目の下垂体に相当するぐらいの多数の PRL 細胞が存在することがわかった。胎生 14 日に投与し 15 日に調べても、誘導される PRL 細胞数は減少するが、16 日と同様の結果が得られた。この実験で、胎仔下垂体には PRL 細胞が分化していないのではなく、分化した PRL 細胞が、エストロゲンが供給されないために PRL を産生できない、したがって免疫組織化学や、*in situ hybridization* により検出できなかったのだと考えることができる。マウス下垂体では GH 細胞は胎生 16 日には多数見られるが、15 日にはごく少数しか存在しない。つまり、DES によって胎生 15 日の下垂体に出現した PRL 細胞は GH 発現細胞に由来するのではないと思われる。私達はこのことを *in vitro* でも確かめてみた¹²⁾。胎生 15 日のマウス下垂体を器官培養し、エストロゲンを作用させると 24 時間後に多数の PRL 細胞が見られるようになったのに対し、GH 細胞は検出できなかったのである。

ニワトリ胚を用いた研究では、結果はさらに明快である。ニワトリ下垂体の発生を研究しているメリーランド大学の Dr. Porter は、ニワトリでは PRL 細胞が GH 細胞から生まれるとは考えられないという。トリでは PRL 細胞は cephalic lobe に、GH 細胞は caudal lobe に発生する²⁰⁾。ニワトリ胚では、グルココルチコイドは PRL 細胞、GH 細胞の両方の発生を促進するが、グルココルチコイドを含む培養液で培養した cephalic lobe の組織には PRL 細胞のみが発生し、GH 細胞は発生しない。同様に、caudal lobe にはグルココルチコイドにより GH 細胞は現れるが、PRL 細胞は発生しない²¹⁾。

このような状況の中、冒頭の Luque らの論文¹⁾が発表されたのである。彼らの結果は私や渡辺先生、トリ下垂体の研究とよく一致していた。2009 年にはヒト GH 遺伝子の組織特異的発現を制御する 1.6kb の locus control region と 1.77kb のラット GH プロモーター、および Cre 遺伝子からなる transgene を導入されたマウスを Cre により β アクチンプロモーター制御下に LacZ を産生するトランスジェニックマウスと交配させた実験が報告された²²⁾。このマウスにおいて、GH 遺伝子の転写が起こった細胞はその後恒常的に LacZ を発現し続けるが、LacZ を発現する

PRL 細胞は、全ての PRL 細胞の 9%程度であった。やはり、多くの PRL 細胞は LacZ を発現せず、従って GH 発現細胞から生まれるのではないというのである。

GH 欠損と PRL 細胞の分化

このような結論は「PRL 細胞は GH 細胞から」とした Behringer ら¹⁾や Borrelli¹⁷⁾らの報告と正反対であるといっている。PRL 細胞が GH 細胞から生まれるのではないのなら、なぜ GH 細胞がなくなると PRL 細胞数も減少するのだろうか。Luque らの見解は、GH 細胞がなくなると PRL 細胞の増殖にかかわる IGF1 が不足するからだということである。IGF1-KO マウスでは PRL 細胞数は対照のおよそ 50%に低下していると報告されている²³⁾し、実験的にも IGF1 は PRL 細胞の増殖を刺激する²⁴⁾。私達はかつて spontaneous dwarf rat (SDR) という自然発症の GH 単独欠損症のラットの解析をしたことがある。このラットの GH 遺伝子には点突然変異があり、正常の GH mRNA も GH タンパクも合成されない^{25,26)}。したがって、肝の IGF1 mRNA レベルも低下しており²⁷⁾、問題の PRL 細胞数も SDR では対照に比べて 30-40%減少していた²⁸⁾。やはり、IGF1 レベルが正常でなければ PRL 細胞数を正常に保つことができないのかもしれない。また、下垂体における局所的な GH の作用も考えなければならない。GH 受容体 (GHR) mRNA は胎生後期以降下垂体に発現しており、発現レベルは特に PRL 細胞が分化する胎生期に高い²⁹⁾。この結果は、局所的 IGF 産生を介するか、あるいは直接 GH が前葉内で PRL 細胞の発達、増殖に関与する可能性を示しているのかもしれない。しかし、GH や IGF1 の欠損が原因のすべてではないと思われる。IGF1-KO マウスや SDR では PRL 細胞数は減少したが、それでも正常の 50-60%は存在する。IGF1-KO マウスには正常の GH 細胞が存在するし、SDR についても、非機能性の GH 細胞と考えられるホルモン非産生細胞がおよそ 30%も存在する²⁸⁾。これに対して、Behringer¹⁵⁾や Borrelli¹⁷⁾らのデータでは下垂体に GH 細胞はほとんど存在せず、PRL 細胞数の減少は IGF1-KO や SDR に比べてもっと顕著である。GH 分泌だけでなく、GH 細胞自体の欠損が PRL 細胞数の低下に何らかの形で影響を持つのかもかもしれない。

ところで、遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜に関する実験は、この分野の研究を大きく進展させたが、GH プロモーターを使って GH 細胞を除いたり、レポーター遺伝子を発現させた

りしているの、GH 発現細胞が PRL 細胞になるかどうかは調べることができるが、GH 細胞に分化していながら、まだ GH を発現しない発達段階があるとすると、このような未成熟な GH 細胞が PRL 細胞系譜とどのような関係にあるかを知ることはできない。私たちの研究では少なくとも胎生 15 日のマウス下垂体には多数の未成熟の GH 細胞と未成熟 PRL 細胞が存在することが明らかである^{12,13)}。この時期の下垂体細胞を培養し、グルココルチコイドを作用させれば未成熟 GH 細胞で GH 産生が刺激され免疫陽性の GH 細胞が現れるし、エストロゲンを用いさせれば未成熟 PRL 細胞が機能的 PRL 細胞に発達し、免疫組織化学的に PRL 細胞が認められるようになる。このような未成熟細胞は胎生 14 日にはきわめて少数しか存在しない。胎生 16 日になると血中のグルココルチコイドが上昇する¹²⁾ので、未成熟 GH 細胞は GH 産生細胞へと変化する。つまり多くの未成熟な GH 細胞が存在するのは胎生 15 日から 16 日までの 1 日程度と思われる。これに対し、PRL 産生は α フェトプロテインと高濃度のグルココルチコイドが存在する胎生後期から出生直後まで抑制されたままである。従ってこの期間、下垂体には未成熟 PRL 細胞がかなりの数存在するのかもしれない。GH 産生細胞はその一部しか PRL 細胞にならない^{1,21)}ようだし、PRL 産生細胞は GH 細胞に分化転換することはなさそうである³⁰⁾。現在のところ、GH 細胞と PRL 細胞の前駆細胞は未成熟 GH 細胞と未成熟 PRL 細胞に分化し、これらの細胞がステロイドの刺激により成熟 GH 細胞、PRL 細胞へ発達していくと考えるのが最も自然だろう。しかし、何らかの刺激で未成熟 GH 細胞が PRL 細胞へ、あるいは未成熟 PRL 細胞が GH 細胞へ分化することはあるかもしれない。今はこれを確かめる方法はないが、今後の研究でこの点が明らかになると期待している。

※本報は総説として投稿され、2 名の査読者により審査され、受理されました。

References

1. Luque RM, Amargo G, Ishii S, Lobe C, Franks R, Kiyokawa H, Kineman RD 2007 Reporter expression, induced by a growth hormone promoter-driven Cre recombinase (rGHp-Cre) transgene, questions the developmental relationship between somatotropes and lactotropes in the adult mouse pituitary gland. *Endocrinology* 148:1946-1953.
2. Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG 1988 A tissue specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529
3. Bodner M, Karin M. 1987 A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 50:267-275.
4. Sétáló G, Nakane PK 1976 Functional differentiation of the fetal anterior pituitary cells in the rat. *Endocrinol Exp* 10:155-166.
5. Watanabe YG, Daikoku S 1979 An immunohistochemical study on the cytogenesis of adenohypophysial cells in fetal rats. *Dev Biol* 68:557-567.
6. Chatelain A, Dupouy JP, Dubois MP 1979 Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, prolactin) in the fetal hypophysis of the rat: influence of the hypothalamus. *Cell Tissue Res* 196:409-427.
7. Hemming FJ, Dubois MP, Dubois PM 1986 Somatotrophs and lactotrophs in the anterior pituitary of fetal and neonatal rats. Electron-microscopic immunocytochemical identification. *Cell Tissue Res* 245:457-460.
8. Nogami H, Suzuki K, Enomoto H, Ishikawa H 1989 Studies on the development of growth hormone and prolactin cells in the rat pituitary gland by in situ hybridization. *Cell Tissue Res* 255:23-28.
9. Watanabe YG, Haraguchi H 1994 Immunohistochemical study of the cytogenesis of prolactin and growth hormone cells in the anterior pituitary gland of the fetal rat. *Arch Histol Cytol* 57:161-166
10. Harigaya T, Hoshino K 1985 Immunohistochemical study of postnatal development of prolactin-producing cells in C57BL mice. *Acta Histochem Cytochem* 18:343-351.
11. Dollé P, Castrillo J, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M 1990 Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of

- growth hormone gene activity. *Cell* 60:809-820.
12. Ogasawara K, Nogami H, Tsuda MC, Gustafsson JA, Korach KS, Ogawa S, Harigaya T, Hisano S. 2009 Hormonal regulation of prolactin cell development in the fetal pituitary gland of the mouse. *Endocrinology* 150:1061-1068.
 13. Matsubara M, Harigaya T, Nogami H 2001 Effects of diethylstilbestrol on the cytogenesis of prolactin cells in the pars distalis of the pituitary gland of the mouse. *Cell Tissue Res* 306:301-307.
 14. Japón MA, Rubinstein M, Low MJ 1994 In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125.
 15. Behringer RR, Mathews LS, Palmiter RD, Brinster RL 1988 Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Gene Dev* 2:453-461.
 16. Hoeffler JP, Boockfor FR, Frawley LS. 1985 Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: initial prolactin secretors also release growth hormone. *Endocrinology* 117:187-195.
 17. Borrelli E, Heyman RA, Arias C, Sawchenko PE, Evans RM 1989 Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* 339:538-541.
 18. Goda H, Sakai T, Kurosumi M, Inoue K. 1998 Prolactin-producing cells differentiate from G0/G1-arrested somatotrophs in vitro: an analysis of cell cycle phases and mammotroph differentiation. *Endocr J* 45:725-735.
 19. Sato K, Watanabe YG 1998 Corticosteroids stimulate the differentiation of growth hormone cells but suppress that of prolactin cells in the fetal rat pituitary. *Arch Histol Cytol* 61:75-81.
 20. Zheng J, Nakamura K, Maseki Y, Geelissen SM, Berghman LR, Sakai T 2006 Independent differentiation of mammotropes and somatotropes in the chicken embryonic pituitary gland. Analysis by cell distribution and attempt to detect somatomammotropes. *Histochem Cell Biol* 125:429-439.
 21. Fu X, Nishimura S, Porter TE 2004 Evidence that lactotrophs do not differentiate directly from somatotrophs during chick embryonic development. *J Endocrinol* 183:417-425.
 22. Nasonkin IO, Potok MA, Camper SA 2009 Cre-mediated recombination in pituitary somatotropes. *Genesis* 47:55-60.
 23. Stefaneanu L, Powell-Braxton L, Won W, Chandrashekar V, Bartke A 1999 Somatotroph and lactotroph changes in the adeno-hypophyses of mice with disrupted insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology* 140:3881-3889
 24. Oomizu S, Takeuchi S, Takahashi S 1998 Stimulatory effect of insulin-like growth factor I on proliferation of mouse pituitary cells in serum-free culture. *J Endocrinol* 157:53-62.
 25. Nogami H, Takeuchi T, Suzuki K, Ookuma S, Ishikawa H 1989 Studies on the prolactin and growth hormone gene expression in the pituitary gland of spontaneous dwarf rats. *Endocrinology* 125:964-970.
 26. Takeuchi T, Suzuki H, Sakurai S, Nogami H, Ishikawa H 1990 Molecular mechanism of growth hormone (GH) deficiency in the spontaneous dwarf rat: detection of abnormal splicing of GH messenger ribonucleic acid by the polymerase chain reaction. *Endocrinology* 126:31-38.
 27. Nogami H, Watanabe T, Kobayashi S 1994 IGF-I and IGF-binding protein gene expressions in the Spontaneous Dwarf Rat. *Am J Physiol* 267:E396-E401.
 28. Nogami H, Takeuchi T 1993 Increased population of non-hormone producing cells suggests the presence of dysfunctional growth hormone cells in the anterior pituitary gland of the Spontaneous Dwarf Rat. *Neuroendocrinology* 57:374-380.
 29. Nogami H, Lee MC, Soya H, Hisano S 2011 Regional distribution and ontogeny of the first exon variants of the rat growth hormone receptor mRNA in the brain and the pituitary gland. *Growth Horm IGF Res* 21:11-15.
 30. Castrique E, Fernandez-Fuente M, Le Tissier P, Herman A, Levy A 2010 Use of a prolactin-Cre/ROSA-YFP transgenic mouse provides no evidence for lactotroph transdifferentiation after weaning, or increase in lactotroph/somatotroph proportion in lactation. *J Endocrinol* 205:49-60.

論文 I-3

ラット下垂体前葉における基底膜の主要構成成分であるラミニンの研究

自治医科大学解剖学講座組織学部門
塚田岳大、Ramadhani Dini、屋代 隆
tsukada@jichi.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.2, 11-17, 2015)

1. はじめに

下垂体前葉は、5 種類ホルモン産生細胞とホルモンを産生しない細胞（濾胞星状細胞、血管内皮細胞、周皮細胞）で構成されている。前葉には、これらの細胞成分に加え、コラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスも存在している。細胞外マトリックスは、細胞の足場として機能するだけでなく、周囲の細胞に作用し、増殖、分化、移動、接着にも関与している。基底膜は、上皮組織下や血管周囲に存在するシート状の細胞外マトリックスで、上皮細胞や内皮細胞を結合組織から物理的に分離している（図 1）。基底膜は、ラミニン、4 型コラーゲン、ニドゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの 4 つのタンパクが組み合わさったシート状の細胞外マトリックスで、上皮組織下や血管周囲に存在する（図 1）。中でも、ラミニンは基底膜シート構造の骨格となる分子であるだけでなく、主要な細胞外マトリックス受容体であるインテグリンとの結合ドメインをもつことから、細胞-細胞外マトリックス接着や細胞の機能修飾に重要な分子と考えられている^{1,2,3)}。

ラミニンは、 α 、 β 、 γ 鎖からなるヘテロ 3 量体である^{4,5)}（図 2）。これまで 5 つの α 鎖（ $\alpha 1-5$ ）、3 つの β 鎖（ $\beta 1-3$ ）、3 つの γ 鎖（ $\gamma 1-3$ ）が同定されており、これらの組み合わせによりラミニンアイソフォームが決まる⁶⁾。ラミニンアイソフォームの名称は、各鎖の番号

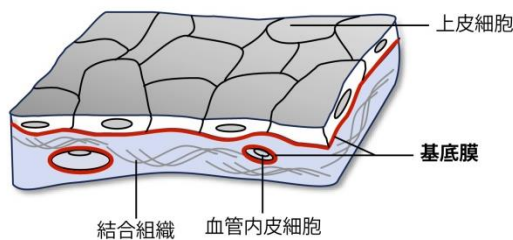


図 1 基底膜の模式図。基底膜（赤）は上皮細胞下と血管内皮細胞の周囲を覆っている。

の組み合わせで表記される⁷⁾（例：ラミニン 121 は、 $\alpha 1$ 鎖、 $\beta 2$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖からなる）。3 つの鎖のうち、 α 鎖は、ラミニンの重合、細胞外放出、インテグリンへの結合に必須であり、ラミニンアイソフォームの特性を決める重要な鎖である⁸⁻¹¹⁾。

ラミニンアイソフォームの発現は組織や発生時期で異なる。腎糸球体では発生初期にラミニン 111 が発現し、成熟と伴にラミニン 521 へと置き換わる¹²⁾。骨格筋形成では、ラミニン 111 からラミニン 211 に移行する^{13, 14)}。また、 $\alpha 1$ 鎖をもつラミニンは小脳発生に¹⁵⁾、ラミニン 411 は、血小板やリンパ球、血管内皮細胞の接着に¹⁶⁾、 $\alpha 5$ 鎖をもつラミニンは肺胞形成に重要である¹⁷⁾。これらの組織・発生時期における発現変動から、ラミニンアイソフォームが、組織の発生・成熟、とりわけ、細胞の分化、増殖、移動、成長に寄与していると考えられている。

下垂体前葉のラミニン研究は、1987 年に Holck らが、毛細血管周囲とゴナドトロフの細胞質にラミニン免疫陽性反応があると報告したのみで¹⁸⁾、その後 20 年以上、研究は進んでいなかった。近年、我々の研究グループでは、ラ

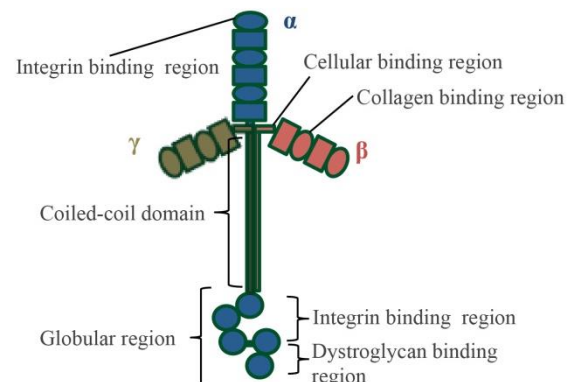


図 2 ラミニンの分子構造。ラミニンは α 、 β 、 γ 鎖からヘテロ 3 量体である。 α 鎖は 5 つ、 β 鎖は 3 つ、 γ 鎖は 3 つ存在し、鎖の組み合わせによりラミニンアイソフォームが決まる。細胞外マトリックス受容体であるインテグリンとの結合領域は α 鎖に存在する。

ミニンが前葉細胞に作用して、細胞の増殖や移動に関与していることを明らかにした^{19, 20)}。下垂体前葉の組織発生、さらには腫瘍発生時には、ダイナミックな細胞の増殖、移動、分化が観察される。果たして、これらの現象にラミニンアイソフォームは関与しているのか、大変興味深い。本研究では、下記の3つの実験を行い、下垂体の組織発生・腫瘍発生時におけるラミニンアイソフォームの発現およびラミニン発現細胞を調べた。

2. 正常ラット下垂体前葉に発現するラミニンアイソフォーム

組織・腫瘍発生のラミニンアイソフォームを調べる前に、正常ラット下垂体前葉に発現するラミニンアイソフォームを調べた。実験には60週齢のWisterラット(雄)を用いた。まず、ラットラミニン鎖のプライマーを作成し、下垂体前葉に発現する α 、 β 、 γ 鎖をRT-PCRを用いて調べた。その結果、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 鎖が発現していた(図3)。そこで、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖に特異的に結合する抗体と血管内皮細胞のマーカーであるisolectin B4を用いて、下垂体前葉に発現する α 鎖と毛細血管の組織分布を調べた。 $\alpha 1$ 鎖陽性細胞は、前葉細胞に見られ、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖陽性細胞は、isolectin B4(血管内皮細胞)と共染色していた(図4A)。 $\alpha 3$ 鎖陽性の血管内皮細胞の数は極めて少なく、ほとんどの血管内皮細胞は $\alpha 4$ 鎖陽性であった。さらに、 $\alpha 1$ 鎖陽性細胞を同定するため、 $\alpha 1$ 鎖抗体と各種ホルモン抗体を用いた二重染色を行った。その結果、 $\alpha 1$ 鎖はLH β とのみ共染色したことが

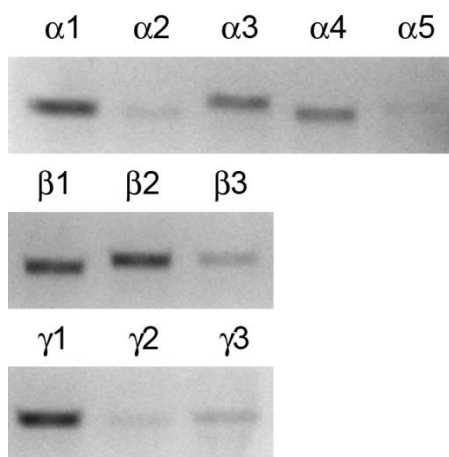


図3 ラット下垂体前葉におけるラミニン鎖の遺伝子発現。成体雄ラットの下垂体前葉に発現するラミニン鎖をRT-PCR法を用いて調べた。 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 鎖が発現していた。

ら、 $\alpha 1$ 鎖陽性細胞がゴナドトロフであることがわかった(図4B)。 β 鎖と γ 鎖の特異的な抗体がないため、*in situ hybridization*法を用いて β 鎖と γ 鎖の発現細胞を同定したところ、ゴナドトロフでは、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 鎖が、血管内皮細胞では $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 鎖が発現していた(data not shown)。

以上の結果から、ゴナドトロフでは、ラミニン111と121が、血管内皮細胞では、ラミニン411とわずかにラミニン311が発現していることがわかった。

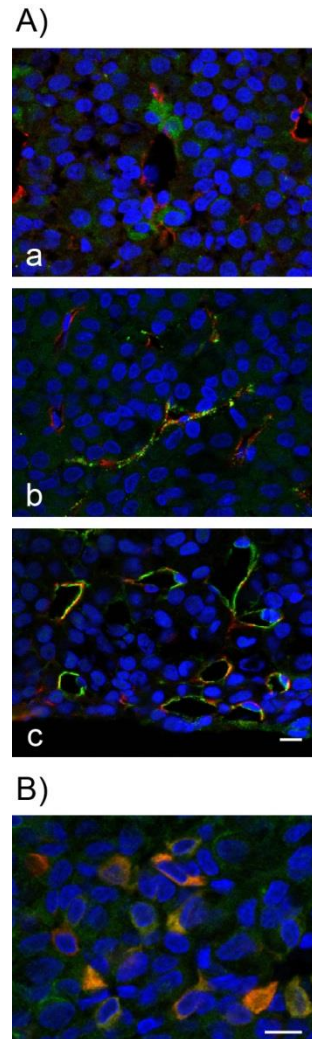


図4 A) ラット下垂体前葉におけるラミニン α 鎖の組織分布。 $\alpha 1$ (a)、 $\alpha 3$ (b)、 $\alpha 4$ (c)鎖に特異的に結合する抗体を用いて免疫染色を行った(緑)。血管内皮細胞の染色にIsolectin B4(赤)、核染色にDAPI(青)を用いた。 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖陽性細胞はisolectin B4と共染色したが、 $\alpha 1$ 鎖陽性細胞はしなかった。スケール: 10 μ m。B) ラミニン $\alpha 1$ 鎖陽性細胞の同定。 $\alpha 1$ 鎖に特異的に結合する抗体とLH β の抗体を用いて免疫染色を行った。 $\alpha 1$ 鎖陽性細胞(緑)はLH β (赤)と共染色し、その他のホルモンとは共染色しなかった。スケール: 10 μ m。

3. ラット下垂体前葉発生時に発現するラミニンアイソフォーム

成体雄ラットの下垂体前葉では、ゴナドトロフと血管内皮細胞にラミニンの発現が見られた。ホルモン産生細胞への分化や血管侵入が始まっていない下垂体の発生初期に一体どのようなラミニンアイソフォームが発現しているのか、それを明らかにするため *in situ hybridization* 法を用いて各発生時期における α 、 β 、 γ 鎖の発現を調べた。実験には胎生 12.5 日齢から生後 30 週齢の Wister ラットを用いた。

胎生 12.5 日齢は、口腔上皮が陥入し、ラトケ嚢を形成する時期である。この時期のラミニン α 鎖の発現を調べたところ、 $\alpha 5$ 鎖のみが口腔上皮の細胞に強く発現していた (図 5)。

胎生 15.5 日齢は、下垂体前葉が末端部 (*pars distalis*)、中間部 (*pars intermedia*)、隆起部 (*pars tuberalis*) に分化する時期にあたる。この時期も $\alpha 5$ 鎖のみが発現していた (図 5)。 $\alpha 5$ 鎖のシグナルは、末端部と中間部で強く、隆起

部で弱かった。

胎生 19.5 日齢は、下垂体前葉内に血管が侵入し、ラトケ嚢の遺残腔周囲に周辺細胞層 (*marginal cell layer*) が確認できる時期にあたる。胎生 15.5 日齢まで前葉の全体に発現していた $\alpha 5$ 鎖は、周辺細胞層でその発現が強く、前葉内での発現は低かった (図 5)。 $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 4$ 鎖は、前葉内に侵入した血管内皮細胞に発現していた (図 5)。

生後 5、10 日齢においても、 $\alpha 5$ 鎖の発現は周辺細胞層に強く観察されたが、そのシグナルの強さは胎生時に比べると低かった (図 6)。大変興味深いことに、胎生時の血管内皮細胞に発現していた $\alpha 1$ 、 $\alpha 4$ 鎖ともに生後 5、10 日齢の血管内皮細胞には発現していなかった。

生後 30 日齢においては、すべての α 鎖が前葉内に発現していた (図 6)。 $\alpha 1$ 鎖は前葉細胞 (ゴナドトロフ) に発現しており、血管内皮細胞には発現していなかった。 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖は、血管内皮細胞に、 $\alpha 3$ 鎖は、前葉内の細胞に発現

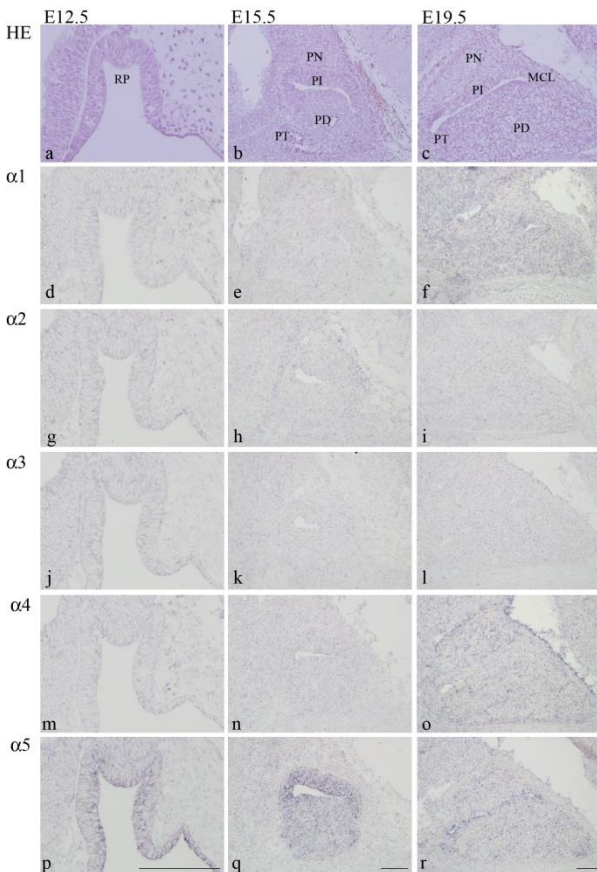


図 5 胎生期における α 鎖の発現。 *in situ hybridization* 法を用いて胎生 12.5、15.5、19.5 日齢の下垂体に発現する α 鎖を調べた。胎生期では、 $\alpha 5$ 鎖が主に発現していた (p-r)。RP (ラトケ嚢)、PT (隆起部)、PD (末端部)、PI (中間部)、PN (後葉)、MCL (周辺細胞層)。スケール：100 μ m。

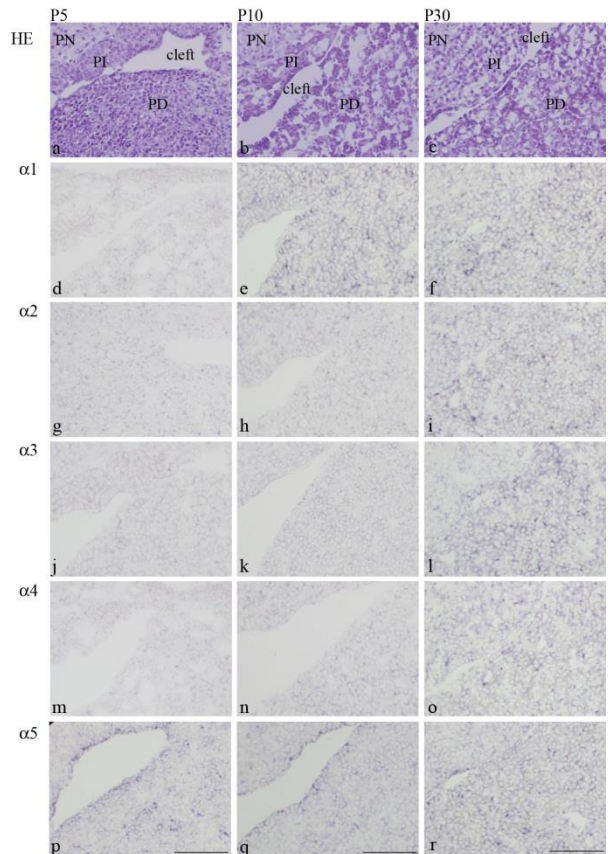


図 6 生後発生時における α 鎖の発現。 *in situ hybridization* 法を用いて生後 5、10、30 日齢の下垂体に発現する α 鎖を調べた。生後発生では、すべて α 鎖が時期・部位特異的に発現していた。PD (末端部)、PI (中間部)、PN (後葉)。スケール：100 μ m。

していた。 $\alpha 5$ 鎖は、周辺細胞層と前葉内に観察されたが、そのシグナルは生後発生に伴い低くなっていった。

β 、 γ 鎖の発現は、胎生 12.5 日齢にすべての β 、 γ 鎖が発現していたが、胎生 15.5 日齢以降は、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ のみが発現していた (data not shown)。

以上の結果から、下垂体の胎生初期には、 $\alpha 5$ 鎖をもつラミニンアイソフォームが、胎生 19.5 日齢から、血管内皮細胞に $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 4$ 鎖が発現していた。そして、生後 10 日齢までは、ラミニンアイソフォーム動態に大きな変化はなく、生後 30 日齢にすべての α 鎖が発現していた。

4. ラット下垂体前葉の腫瘍発生時に発現するラミニンアイソフォーム

腫瘍発生モデルとして、合成エストロゲンであるジエチルstilbestロール (DES) を投与した LEXF 組み換え近交系ラットを用いた。このラットは、腫瘍関連遺伝子の研究のため、Shisa らが樹立したラットで、通常のラットと比べ、エストロゲンに対する感受性が高く、エストロゲン投与により迅速にプロラクチノーマを誘発することができる²¹⁾。我々は、ラット背部の皮下に DES を詰めたサイラスティックチューブを埋め込み、処理後 4 週、8 週、12 週後の下垂体に発現するラミニン α 鎖を調べた。

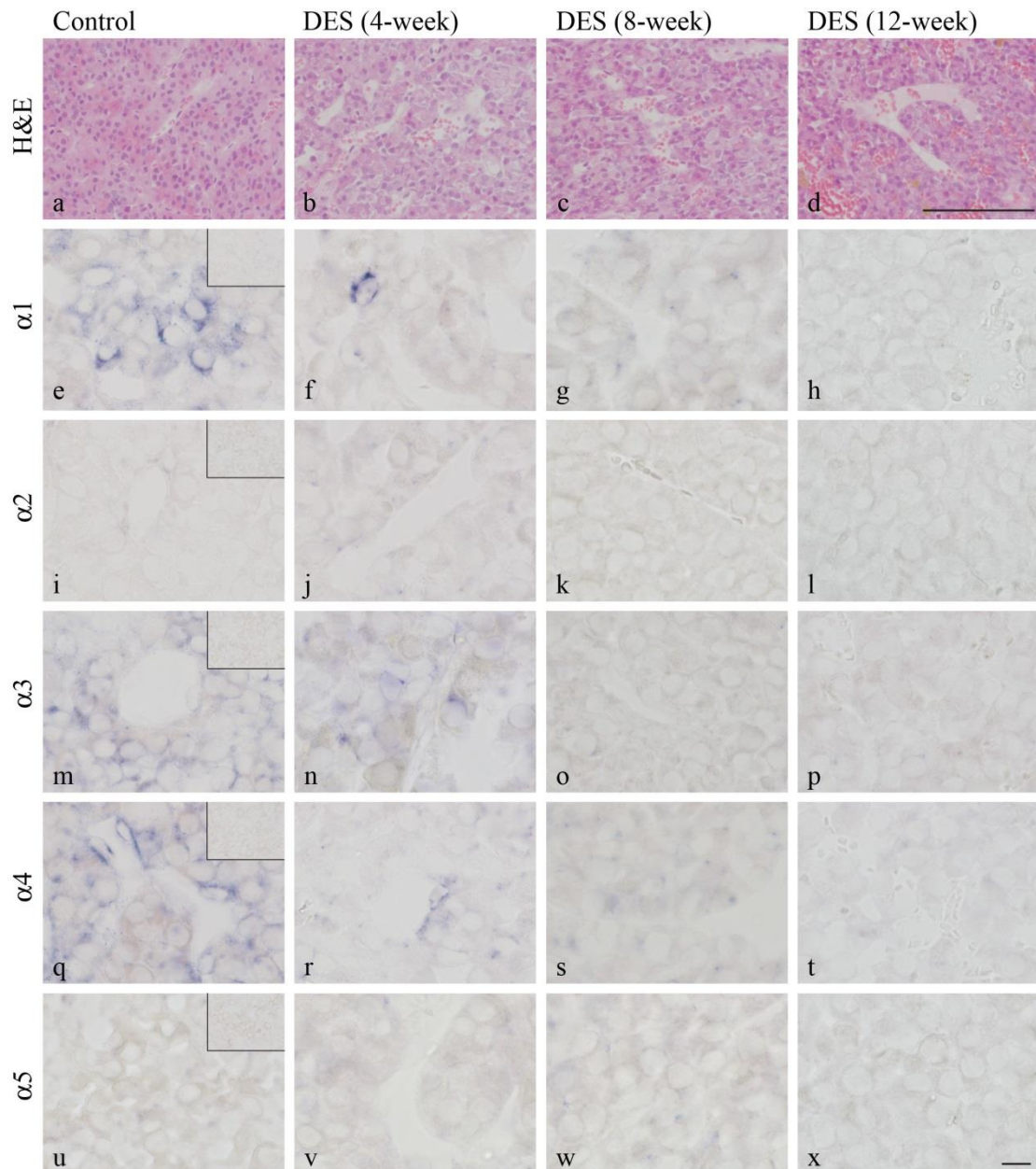


図 7 腫瘍発生時における α 鎖の発現。*in situ* hybridization 法を用いて DES 処理後生後 4、8、12 週の下垂体に発現する α 鎖を調べた。ラット下垂体には $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖が発現していた。DES 処理後 8 週ですべての α 鎖の発現は見られなくなった。スケール：100 μm (a-d)、10 μm (e-x)。

HE 染色で DES 処理した前葉の組織構造を調べてみると、DES 処理後 4 週まで、前葉内に色素好性と色素嫌性細胞が混在していたが (図 7a, b)、DES 処理後 8 週には単一形態をとる細胞の数が優位となった (図 7c)。また、DES 処理後 12 週では、単一形態をとる細胞で前葉が埋め尽くされていた (図 7d)。毛細血管の構造は、DES 処理後 4-8 週で次第に湾曲し、DES 処理後 12 週では枝分かかれ構造が顕著に観察された (図 7a-d)。これらの形態変化に加え、Tachibana らは、DES 処理後 12 週で、下垂体重量と血中プロラクチン濃度が有意に増加していることを確認している²²⁾。これらの結果を踏まえると、DES 処理後 12 週で、下垂体前葉細胞が、過形成を介してプロラクチノーマに遷移していくことがわかった。

このプロラクチノーマモデルを用いて、 α 鎖の発現を *in situ* hybridization 法で調べた。Wistar ラットの結果と同様に、無処置群では、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖が発現していた (図 7e, m, q)。それらの発現は DES 処理後 4 週まで確認できたが、DES 処理後 8 週以降は確認できなかった。次に、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖に特異的に結合する抗体と血管内皮細胞のマーカーである isolectin B4 を用いて、前葉に発現する α 鎖と毛細血管の組織分布を調べた。 $\alpha 1$ 鎖陽性細胞は、前葉細胞に見られ (図 8a, b)、LH β との二重染色により、

ゴナドトロフであることがわかった。大変興味深いことに、DES 処理後 8 週で、 $\alpha 1$ 鎖陽性細胞は、LH β ではなく、isolectin B4 と共染色していた (図 8c)。この $\alpha 1$ 鎖陽性の血管内皮細胞は、通常の血管内皮細胞の形態と異なり、丸型で、その数も少なかった。いっぽう、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖陽性細胞は、isolectin B4 と共染色し、典型的な血管内皮細胞の形態 (扁平な核を持つスピンドル型) を示していた (図 8e, i)。 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖のシグナルは DES 処理後 8 週で見られなくなり、*in situ* hybridization の結果と一致していた。

5. 考察

「1. はじめに」にも述べたように、 α 鎖は、ラミニンアイソフォームの特性を決める重要な鎖である⁸⁻¹¹⁾。また、本研究において、 α 鎖とは対照的に β 鎖と γ 鎖の発現に大きな変動は見られなかった。下記のとおりでは、 α 鎖の動態変化に着目し、予測されるラミニンアイソフォームの機能について述べる。

$\alpha 1$ 鎖は、ゴナドトロフに発現していた。1987年に Holck らによりゴナドトロフにラミニンの免疫陽性反応があることが示されていたが¹⁸⁾、本研究では、そのアイソフォームがラミニン 111 と 121 であることを初めて同定した。また、本研究では示していないが、ラット下垂体前葉の超薄凍結切片を用いた蛍光二重免疫染色

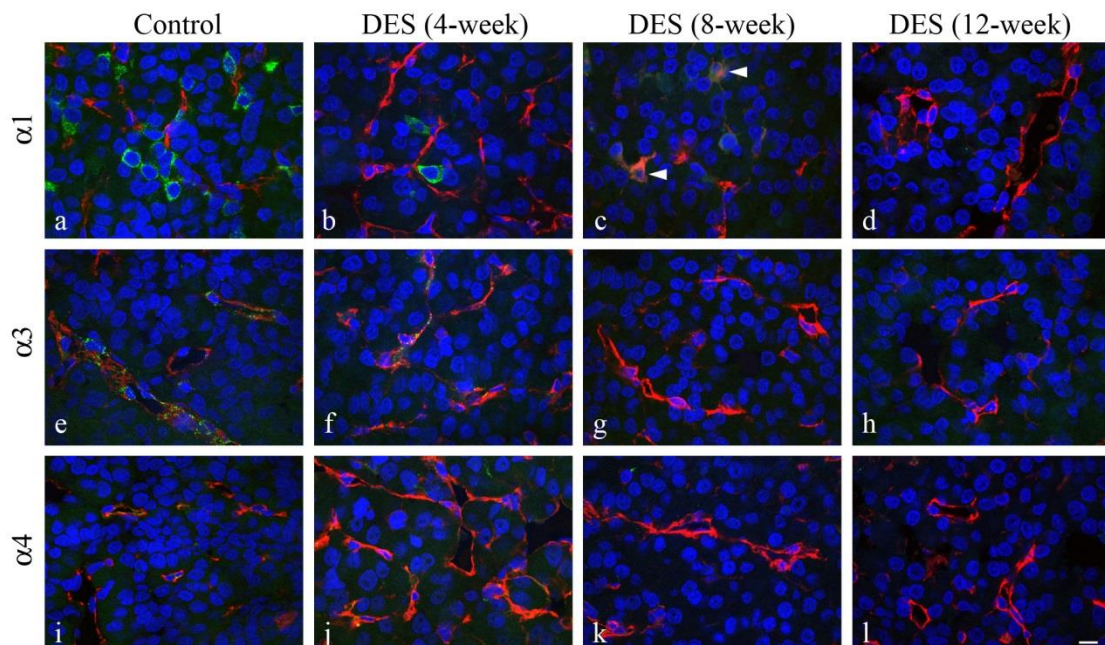


図 8 DES 処理したラット下垂体前葉におけるラミニン α 鎖の組織分布。 $\alpha 1$ (a), $\alpha 3$ (b), $\alpha 4$ (c) 鎖に特異的に結合する抗体を用いて免疫染色を行った (緑)。血管内皮細胞の染色に Isolectin B4 (赤)、核染色に DAPI (青) を用いた。コントロール、DES 処理 4 週の下垂体に見られた $\alpha 1$ 鎖陽性細胞は、isolectin B4 と共染色しなかったが (a, b)、DES 処理 8 週の $\alpha 1$ 鎖陽性細胞は、isolectin B4 と共染色した (c)。 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖陽性細胞は isolectin B4 と共染色した (e, f, i)。 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖陽性細胞は、DES 処理 8 週以降確認できなかった。スケール: 10 μ m。

で、LH β とラミニンの細胞内局在が異なることがわかっている。この結果から、LH とラミニンが別の機構で細胞外に放出されると予測される。また、我々の最近の研究により、このゴナドトロフからのラミニン放出に濾胞星状細胞の存在が必要であることも明らかとなった²³⁾。LH β 陽性細胞にラミニンが発現する時期は生後 10 日齢からであり、その時期は濾胞星状細胞が S100b タンパクを発現する時期と一致している。ゴナドトロフのラミニンがどのような機能を持っているのか、さらなる研究が必要である。また、 $\alpha 1$ 鎖は、胎生 19.5 日齢の血管内皮細胞と、DES 処理により過形成となった前葉の血管内皮細胞に発現していた。通常、血管内皮細胞には $\alpha 4$ 鎖が発現しており、 $\alpha 1$ 鎖を発現した血管内皮細胞は初の報告である。 $\alpha 1$ 鎖を発現する血管内皮細胞の形態は通常の扁平型ではなく、丸型であり、その発現も一過的であった。このことから、 $\alpha 1$ 鎖は、新規の血管が形成される時期 (vasculogenesis) に血管内皮細胞に一過的に発現すると考えられ、今後、新規血管形成のマーカーとして期待される。

$\alpha 2$ 鎖と $\alpha 3$ 鎖は、生後 30 日齢から 50 日齢まで発現が確認された特殊なラミニンアイソフォームであった。 $\alpha 2$ 鎖が血管、 $\alpha 3$ 鎖が前葉細胞に発現しているが、なぜこの時期にこれらの鎖が発現しているのかは不明であり、さらなる解析が必要である。

$\alpha 4$ 鎖は、 $\alpha 1$ 鎖同様に、新規の血管が形成される時期の内皮細胞に見られたが、その後、生後 30 日齢まで発現は見られなかった。我々のグループの研究により、この時期の前葉の毛細血管の基底膜は、成熟した血管と異なり不連続であることがわかっている²⁴⁾。また、DES 処理した前葉では、血管の異常に伴い、 $\alpha 4$ 鎖の発現が減少していた。これらのことから、 $\alpha 4$ 鎖の主な機能は、正常血管の維持であると考えられる。

$\alpha 5$ 鎖は、胎生前期に発現するラミニンで、胎生後期から生後初期においては、周辺細胞層に強く発現がみられた。周辺細胞層は未分化な細胞が多く存在する部位である²⁵⁻²⁷⁾。また、マウス ES 細胞の自己複製に $\alpha 5$ 鎖が重要であるという報告もある²⁸⁾。 $\alpha 5$ 鎖は、未分化細胞の維持に関与するラミニンであることが推測される。

6. まとめ

一連の研究により、ラット下垂体前葉の組織・腫瘍発生時に多くのラミニンアイソフォームが発現し、ラミニン発現細胞も複数存在することがわかった。また、ラミニン発現細胞は、発生時期や腫瘍発生時でラミニンの発現を変化

させることも明らかとなった。以上の結果から、ラミニンアイソフォームが、下垂体前葉細胞の機能や分化、血管形成、さらには腫瘍形成に関与していることが示唆された。

本研究は、下記の 3 つの論文をまとめたものである。詳細な結果や考察は、そちらを参考にさせていただきたい。また、本文に用いた図は出版社の許可を得て転載している。

1. Ramadhani D, Tsukada T, Fujiwara K, Horiguchi K, Kikuchi M, Yashiro T, 2012, Laminin isoforms and laminin-producing cells in rat anterior pituitary. *Acta Histochem Cytochem.* **45**, 309–15.
2. Ramadhani D, Tsukada T, Fujiwara K, Azuma M, Kikuchi M, Yashiro T, 2014, Changes in Laminin Chain Expression in Pre- and Postnatal Rat Pituitary Gland. *Acta Histochem Cytochem* **47**, 231–37.
3. Ramadhani D, Tofrizal A, Tsukada T, Yashiro T, 2015, Histochemical Analysis of Laminin α Chains in Diethylstilbestrol-Induced Prolactinoma in Rats. *Acta Histochem Cytochem* **48** (in press).

※本報は総説として投稿され、2 名の査読者により審査され、受理されました。

References

1. Colognato-Pyke H, O'Rear JJ, Yamada Y, Carbonetto S, Cheng YS, Yurchenco PD, 1995, Mapping of network-forming, heparin-binding, and alpha 1 beta 1 integrin-recognition sites within the alpha-chain short arm of laminin-1. *J Biol Chem.* **270**, 9398–406.
2. Colognato H, MacCarrick M, O'Rear JJ, Yurchenco PD, 1997, The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *J Biol Chem.* **272**, 29330–6.
3. Li S, Edgar D, Fässler R, Wadsworth W, Yurchenco PD, 2003, The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell.* **4**, 613–24.
4. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR, 1979, Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* **254**, 9933–7.
5. Hogan BL, Cooper AR, Kurkinen M, 1980, Incorporation into Reichert's membrane of laminin-like extracellular proteins synthesized by parietal endoderm cells of the mouse embryo. *Dev Biol.* **80**, 289–300.
6. Durbejj M, 2010, Laminins. *Cell Tissue Res.* **339**, 259–68.

7. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JCR, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD, 2005, A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24**, 326–32.
8. Sasaki M, Kleinman HK, Huber H, Deutzmann R, Yamada Y, 1988, Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J Biol Chem.* **263**, 16536–44.
9. Schittny JC, Yurchenco PD, 1990, Terminal short arm domains of basement membrane laminin are critical for its self-assembly. *J Cell Biol.* **110**, 825–32.
10. Yurchenco PD, Quan Y, Colognato H, Mathus T, Harrison D, Yamada Y, O’Rear JJ, 1997, The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**, 10189–94.
11. Yurchenco PD, 2011, Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **3**, 1–27.
12. Miner JH, 2008, Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech.* **71**, 349–56.
13. Patton BL, 2000, Laminins of the neuromuscular system. *Microsc Res Tech.* **51**, 247–61.
14. Pedrosa-Domellöf F, Tiger CF, Virtanen I, Thornell LE, Gullberg D, 2000, Laminin chains in developing and adult human myotendinous junctions. *J Histochem Cytochem.* **48**, 201–10.
15. Ichikawa-Tomikawa N, Ogawa J, Douet V, Xu Z, Kamikubo Y, Sakurai T, Kohsaka S, Chiba H, Hattori N, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E, 2012, Laminin $\alpha 1$ is essential for mouse cerebellar development. *Matrix Biol.* **31**, 17–28.
16. Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K, 2001, Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$ integrins. *J Biol Chem.* **276**, 17550–8.
17. Nguyen NM, Kelley DG, Schlueter JA, Meyer MJ, Senior RM, Miner JH, 2005, Epithelial laminin $\alpha 5$ is necessary for distal epithelial cell maturation, VEGF production, and alveolization in the developing murine lung. *Dev Biol.* **282**, 111–25.
18. Holck S, Albrechtsen R, Wewer UM, 1987, Laminin in the anterior pituitary gland of the rat. Laminin in the gonadotrophic cells correlates with their functional state. *Lab Invest* **56**, 481–8.
19. Horiguchi K, Kikuchi M, Kusumoto K, Fujiwara K, Kouki T, Kawanishi K, Yashiro T, 2010, Living-cell imaging of transgenic rat anterior pituitary cells in primary culture reveals novel characteristics of folliculo-stellate cells. *J Endocrinol.* **204**, 115–23.
20. Horiguchi K, Fujiwara K, Ilmiawati C, Kikuchi M, Tsukada T, Kouki T, Yashiro T, 2011, Caveolin 3-mediated integrin $\beta 1$ signaling is required for the proliferation of folliculostellate cells in rat anterior pituitary gland under the influence of extracellular matrix. *J Endocrinol.* **210**, 29–36.
21. Shisa H, Lu L, Katoh H, Kawarai A, Tanuma JJ, Matsushima Y, Hiai H, 1997, The LEXF: A new set of rat recombinant inbred strains between LE/Stm and F344. *Mamm Genome.* **8**, 324–7.
22. Tachibana M, Lu L, Hiai H, Tamura A, Matsushima Y, Shisa H, 2006, Quantitative Trait Loci Determining Weight Reduction of Testes and Pituitary by Diethylstilbesterol in LEXF and FXLE Recombinant Inbred Strain Rats. *Exp Anim.* **55**, 91–5.
23. Tsukada T, Fujiwara K, Horiguchi K, Azuma M, Ramadhani D, Tofrizal A, Batchuluun K, Maliza R, Syaidah R, Kikuchi M, Yashiro T, 2014, Folliculostellate Cells Are Required for Laminin Release from Gonadotrophs in Rat Anterior Pituitary. *Acta Histochem Cytochem.* **47**, 239–45.
24. Jindatip D, Fujiwara K, Horiguchi K, Tsukada T, Kouki T, Yashiro T, 2013, Changes in fine structure of pericytes and novel desmin-immunopositive perivascular cells during postnatal development in rat anterior pituitary gland. *Anat Sci Int.* **88**, 196–203.
25. Yoshimura F, Soji T, Kiguchi Y, 1977, Relationship between the follicular cells and marginal layer cells of the anterior pituitary. *Endocrinol Jpn.* **24**, 301–5.
26. Gremeaux L, Fu Q, Chen J, Vankelecom H, 2012, Activated Phenotype of the Pituitary Stem/Progenitor Cell Compartment During the Early-Postnatal Maturation Phase of the Gland. *Stem Cells Dev.* **21**, 801–13.
27. Yako H, Kato T, Yoshida S, Higuchi M, Chen M, Kanno N, Ueharu H, Kato Y, 2013, Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary just before birth. *Cell Tissue Res.* **354**, 837–47.
28. Domogatskaya A, Rodin S, Boutaud A, Tryggvason K, 2008, Laminin-511 but not -332, -111, or -411 enables mouse embryonic stem cell self-renewal in vitro. *Stem Cells.* **26**, 2800–9.

短報-1

Ethinyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する
視床下部キスペプチンニューロンの異常

国立医薬品食品衛生研究所 病理部

市村亮平

r-ichimura@nihs.go.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.2, 18, 2015)

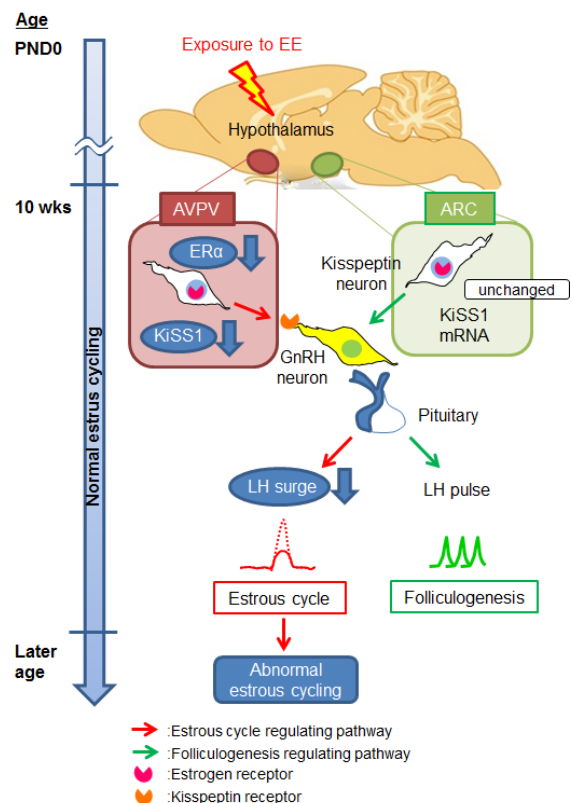
げっ歯類の脳では、出生前後のおよそ1週間
の間に脳の性分化が完了すると考えられており、
この性分化の臨界期に高用量のエストロゲン曝
露を受けると、本来雌型として分化するはずだ
った脳の雄型化 (masculinization) が生じるこ
とが知られている。一方、同時期に比較的低用
量のエストロゲン曝露を受けた場合は、脳は完
全に雄型化せず、性周期の早期停止や、子宮に
おける発がん感受性の増加といった、雌性生殖
器に対する遅発性の影響が生じることを我々は
これまでに報告してきた。

げっ歯類を含む哺乳類の性周期は、視床下部-
下垂体-性腺軸において、様々な雌性生殖機能
を第一義的に制御する神経ペプチドとして近年
注目を集めるキスペプチンによる制御を受けて
いる。キスペプチンニューロンは視床下部の前
腹側脳室周囲核 (AVPV) および弓状核 (ARC)
に主に分布し、それぞれの領域において部位特
異的な役割を担っていることが報告されている。
すなわち、AVPVは卵巣からのエストロゲンポ
ジティブフィードバックにより、下垂体からの
LHサージの分泌ととそれに引き続く排卵・性
周期を調節し、一方ARCはエストロゲンネガ
ティブフィードバックにより、LHのパルス状
分泌と卵胞発育を調節していると考えられてい
る。

我々は、遅発影響におけるキスペプチンニュー
ロンの機能的変化を明らかにするため、生後
0日齢の雌ラットに 17 α -Ethinyl estradiol (EE)
を投与し、性成熟後に人工的に誘発した LH サ
ージを経時的に検索した。その結果、遅発影響
では性周期の早期停止が認められるよりも早く
(約 10 週齢) から、LH サージが EE の用量依
存的に低下することを見出し、さらにサージが
認められる時刻もやや遅延する傾向があること
を明らかにした。さらにこの時期の視床下部に
おける遺伝子発現を詳細に検索した結果、
AVPV では KiSS1 の発現量が低下し、さらに
AVPV における KiSS1 発現細胞数と、ER α 共発
現率が同時に低下していることを明らかにした。

一方、ARC の KiSS1 発現に変化は認められな
かった。これらに結果は、新生児期に投与され
た EE がキスペプチンニューロンの発達に影響
を及ぼし、遅発影響で認められる性周期の早期
停止に先駆けて、排卵制御中枢である AVPV の
機能に異常が生じていることを示唆している。
LH サージの減弱化やキスペプチンの発現低下
は、正常な個体でも加齢や生殖機能の老化に伴
い認められる変化であることから、遅発影響が
加齢の早期化を反映している可能性があること
も興味深い知見である。化学物質の持つ遅発影
響リスクは通常の生殖毒性試験系における検出
が困難であることから、今後さらなるメカニ
ズムの解明が望まれる。

※本報は第 29 回日本下垂体研究会学術集会に
おいて優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介で
す。



短報-2

神経堤細胞由来細胞は下垂体に侵入し S100 β 陽性となる

明治大学大学院農学研究科 生命科学専攻 遺伝情報制御学研究室
上春浩貴
hueharu@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.2, 19, 2015)

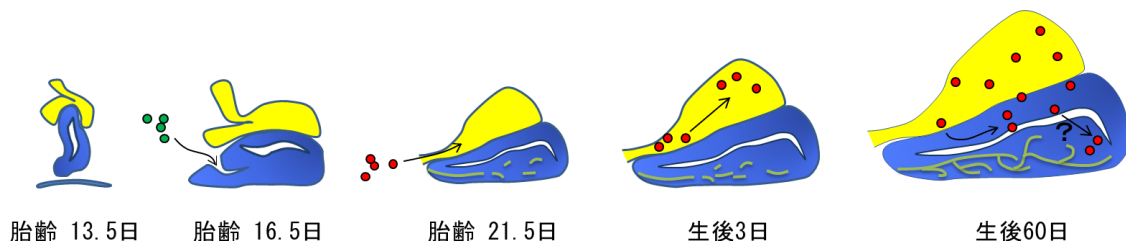
私達はこれまでに、下垂体幹細胞からのホルモン産生細胞の供給メカニズムに注目して研究を行ってきた。その中で、出生後より下垂体に出現することが知られている S100 β 陽性細胞の一部は成熟下垂体幹・前駆細胞として機能することを、私達は報告している。これは、胎仔期と成熟後において下垂体幹・前駆細胞が異なる性質を持っている可能性を示唆している。さらに最近、私達は S100 β 陽性細胞の局在を詳しく解析したところ、胎仔期下垂体における血管形成に伴い、この時期に S100 β 陽性細胞が下垂体に侵入するという新知見を得つつある。これらの知見から、成熟後の下垂体幹・前駆細胞の少なくとも一部は、下垂体発生と発達過程において外部より侵入してきた細胞である可能性が考えられる。ところで、胎仔期の組織形成時には様々な組織に侵入し分化、さらに、成熟後の組織幹細胞として機能する細胞として、神経堤細胞が知られている。しかし、下垂体における神経堤細胞に注目した研究は行われていない。そこで、私達は、この神経堤細胞が下垂体に存在するのか、どのような特徴を持つかを解析するため、神経堤細胞マーカー分子 SOX10 の特異抗体を用いて下垂体における神経堤細胞の局在解析を行った。

SOX10 陽性細胞は、発生後期のラット胎齢 21.5 日に下垂体後葉に初めて出現した。その局在は吻部のみに見られ、尾部には存在しなかった。しかし、性成熟後の生後 60 日では、後葉吻部のみならず後葉尾部にも存在しており、さらに胎仔期には存在しなかった中葉にも存在し

ていた。さらに、下垂体幹細胞は下垂体形成時に生じる遺残腔に面した第一層の Marginal Cell Layer (MCL) に存在するとされているが、中葉側 MCL に SOX10 陽性細胞の局在が確認された。これらは、胎仔期には存在しなかった神経堤細胞由来細胞である SOX10 陽性細胞が後葉吻部より侵入し、さらに移動する過程で下垂体幹・前駆細胞へと転換する可能性を示している。そこで、この SOX10 陽性細胞と S100 β との関連について解析を進めた。SOX10 陽性細胞は、胎仔期後期では S100 β 陰性であったが、成熟後では中葉に存在するほぼ全ての SOX10 陽性細胞は S100 β 陽性であった。加えて、下垂体幹・前駆細胞で発現している SOX2、分裂細胞マーカー Ki67 と共存することから、SOX10 陽性細胞は下垂体侵入後に下垂体幹・前駆細胞としての性質を獲得した後、未分化性を保ちながら自己分裂をすることで、成熟下垂体を構成する細胞群を構成する可能性を見出した。

従来、下垂体は口腔上皮由来である前葉・中葉、間脳由来である後葉、さらにホルモンを分泌する間葉細胞由来の毛細血管で構成されていると考えられてきたが、本研究は、下垂体を構成する細胞として神経堤由来細胞の存在を観察したことから、この細胞が成熟下垂体幹・前駆細胞として機能している可能性を示している。

※本報は第 29 回日本下垂体研究会学術集会において優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。



図：発生・成長過程での下垂体を構成する細胞群の変化

青；口腔上皮由来細胞、黄色；間脳由来細胞、緑；間葉系由来細胞、赤；神経堤由来細胞 (SOX10陽性細胞)

編集後記

新年度も1ヶ月が過ぎ、青葉の候、新芽や若葉のような新人が研究室にあふれ、活気のある日々を忙しく過ごされておられることと存じます。

会員の皆様のご協力を賜り、創刊号につづき第2号を発行することができました。本号より「日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research」と会誌名を改めましたが、創刊号の「日本下垂体研究会レター」と同一のものとなります。本号には、論文I(3報)、短報(2報)を掲載しております。下垂体前葉の研究においては視床下部による調節だけでなく、ホルモン産生細胞内の分子の役割や挙動を探ったり、その細胞の由来、さらには細胞周囲に存在する細胞外マトリックスの研究も重要です。本号では汾陽先生にゴナドトロフ内のアネキシンA5の挙動に関する報告を、野上先生にはプロラクチン産生細胞の由来に関する総説を、塚田先生には前葉内のラミニンに関する記事をご投稿いただきました。また、創刊号につづき、第29回学術集会で発表賞を受賞された大学院生の方々にもアクティブな研究内容をご紹介いただきました。原稿をご投稿くださいました先生方に、この場をお借りして御礼申し上げます。

さて、北陸新幹線も順調に運行し、その乗り心地(寝心地)も良いと伺っております。世間では、メディアを通し、伝統と食文化など北陸の魅力が広まっているようです。そして8月には北陸、富山で学術集会が開かれます。会場となる宇奈月温泉では温泉だけでなく鮮度の良い食材を使った料理やおいしいお酒も堪能できるはずで、会員の皆様には、鮮度抜群な最新の研究成果の発表と活発な討論により脳内カロリーを消費いただき、食事で胃を満たし、温泉で体をほぐしながら大会を盛り上げていただきたくお願い申し上げます。また、日本下垂体研究会誌もより充実した情報発信の場となるように編集部も日々、努力してまいります。今後とも宜しくお願い致します。

(東 森生)

本誌は、日本下垂体研究会の会誌として、下垂体及びその関連する分野に関する記事（論文 I、論文 II、短報）とその他（解説、学会記録、紹介、事務局からのお知らせなど）を掲載する。会誌の発行は年 1 回（3 月末）とする。本誌は、印刷版に加えて Web 掲載（PDF 形式、Open access）する。

1. 執筆要領

- 1) 使用言語は日本語ないし英語とする。
- 2) 最初の頁に表題、著者名（所属）、E-mail address を書く。
- 3) 本文に節を設ける場合は、1.○○○、2.△△△、3.□□□、をつけて節を示す。節の見出しは簡潔にする。
- 4) 文字はなるべく常用漢字と新仮名遣いとする。
- 5) 述語、物質名などは、できる限り日本語で表し、必要に応じてその原語を（）で示す。ただし、略号に関してはそのまま用いる。（例）テストステロン、cAMP
- 6) 生物名は、片仮名書きの和名で表し、必要に応じて初出時に学名を（）で示す。学名は斜体（イタリック体）文字で標記する。（例）ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)
- 7) 人名は、姓の原綴りで示す。
（例）吉村は、Guillemin と Schally は、
- 8) 原則として国際単位（SI）記号、化学記号、数学記号は立体、量記号は斜体とする。
（例）h、cm、A、g、H₂O
- 9) 数字は、原則としてアラビア数字を用いる。ただし、漢字と結合して名称を表すものは、漢字とする。（例）1 つ、2~3 時間、50 個、数十個、一例
- 10) 文献の記載方法
参考文献は、本文の出現順に並べ、1 から順に通し番号をつけて文末にまとめる。本文中での引用箇所には、通し番号を右肩につけて示す（表示のしかたは下記の例を参照）。著者名を引用する場合、3 名以上の連名のときは“ら”あるいは“et al.”とする。
（例）吉村らによると^{1)~3)}、……である^{4), 6), 7)}。
- 11) 文末の参考文献の記載は、次のようにする。著者が連名の場合でも省略せず、全員の名前を記載する。
[雑誌] 通し番号) 著者名, 発行年, 題名, 雑誌名 (省略形), 巻 (ボールド), ページ。
[書籍] 通し番号) 著者名, 発行年, 表題, 編集者, 書名, 出版社, ページ。
（例）1) Fujiwara K, Maliza R, Tofrizal A, Batchuluun K, Ramadhani D, Tsukada T, Azuma M, Horiguchi K, Kikuchi M, Yashiro T, 2014, In situ hybridization analysis of the temporospatial expression of the midkine/pleiotrophin family in rat embryonic pituitary gland. *Cell Tissue Res.* **357**, 337-44.
2) 川島誠一郎, 1993, ホルモンとホメオスタシス, 川島誠一郎編、内分科学、朝倉書店、pp.6-7
- 12) 表は簡潔な表題と必要な説明をつけて、本文とは別に作成する。
- 13) 図には必ず簡潔な表題をつける。図の表題と説明は、図面原稿とは別紙にまとめて書く。
- 14) 図および表の表示は、図 1、図 2、……、表 1、表 1、……の通し番号で行う。これらを挿入する箇所を本文の原稿欄に赤字で指示する。
- 15) 図および表を文献から引用した場合は、引用を明記するとともに、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可をとっておく。

2. 原稿は、すべてワードプロセッサ（ワープロ）を使用する。フォントはタイトル、サブタイトルはゴシック体、本文は明朝体、英数字は Times New Roman を使用する。左寄せで打ち、行間は「1 行」とする。特殊なコマンドは使用しない。

3. 本誌の刷り上がり 1 頁は、21 字×40 行×2 段 = 1680 字の分量に対応する。

4. 記事内容

- 1) 論文 I: 下垂体あるいは関連分野における最近の目立った研究成果や学界で注目された事象に関する記事を掲載する。（5 千字～1 万字程度 = 図を含めて 4～6 頁程度）
- 2) 論文 II: 吉村賞を受賞した者に、受賞講演内容に関する総説の執筆を依頼する。（5 千字～1 万字程度 = 図を含めて 4～6 頁程度）
- 3) 短報: 日本下垂体研究会の開催する学術集会において、最優秀発表賞等を受賞した研究者に原稿を依頼する。（1 千字 = 図を含めて 1 頁程度）
- 4) 解説、学会記録、紹介、事務局からのお知らせなど

5. その他

- i) 掲載希望の方は、編集委員に連絡の上、発行の 1 ヶ月前までに原稿をお届けください。
- ii) 投稿原稿（論文 I）の採用は、編集委員を含む 2 名の査読により決定し、その他の採用は編集委員で査読し決定します。
- iii) 本誌に掲載された記事、画像の著作権は、日本下垂体研究会に帰属します。
- iv) 本文中の図は、写真も含め、白黒およびカラーのどちらの使用も認めます。
- v) 掲載料、寄稿や記事の掲載に著者負担はありません。
- vi) 校正は著者による校正を 1 回のみ行います。日本下垂体研究会誌編集委員より著者宛に E-mail で初稿が送られますので、校正して当該委員へ返送してください。

6. 論文の送り先

各日本下垂体研究会誌編集委員へ E-mail で送ってください。

印刷原稿の送付先

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

自治医科大学医学部解剖学講座（組織学部門）

電話: 0285-58-7314 Fax: 0285-44-5243

編集長 : 屋代 隆: tyashiro@jichi.ac.jp

編集委員 : 菊池元史: kikuchim@jichi.ac.jp

東 森生: azumam@jichi.ac.jp



日本下垂体研究会誌編集部

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1
自治医科大学医学部解剖学講座(組織学部門)

電話: 0285-58-7314

Fax : 0285-44-5243

編集長 : 屋代 隆 tyashiro@jichi.ac.jp

編集委員: 菊池元史 kikuchim@jichi.ac.jp

東 森生 azumam@jichi.ac.jp