



# 日本下垂体研究会誌

2017年3月6日 発行

## 本号の内容

1. 論文 II 「下垂体におけるプロオピオメラノコルチン遺伝子発現調節機構に関する研究」  
岩崎 泰正 (高知大学)
2. 短報 - 1 「レチノイン酸シグナルによる下垂体特異的転写因子 Prop1 の遺伝子発現制御解析」  
西原 大翔 (明治大学)
3. 短報 - 2 「霊長類進化における妊娠関連タンパク質 PZP、A2LM1、PSG-1 の発現動態の解析」  
柏木 寛史 (東海大学)
4. 短報 - 3 「Analysis of TrkB and PD-1/PD-L1 expression in Common Marmoset placenta」  
木南 理仁 (東海大学)
5. 短報 - 4 「ヒト羊膜上皮細胞の free activin A 分泌に関する研究」  
岡林 武志 (群馬大学)
6. 第 31 回学術集会報告 和泉 俊一郎 (東海大学)

## 事務局

北里大学海洋生命科学部  
〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1  
事務局長 高橋 明義  
e-mail akiyoshi@kitasato-u.ac.jp

## 日本下垂体研究会

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



## 論文 II

## 下垂体におけるプロオピオメラノコルチン遺伝子発現調節機構に関する研究

高知大学臨床医学部門

岩崎 泰正

iwasaki@kochi-u.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.4, 1-5, 2017)

## 1. はじめに

Proopiomelanocortin (POMC) は、1979 年に Nakanishi, Numa らによりクローニングされた遺伝子で、ACTH、 $\alpha$ MSH など種々の神経ペプチドをコードしている。無脊椎動物から存在する進化的に古い遺伝子であるが、高等動物では主に皮膚の melanocyte、下垂体前葉 (corticotroph)、中間葉 (melanotroph) および視床下部弓状核 (arcuate nuclei) に発現している。蛋白産物 (opiomelanocortin) は臓器特異的なプロセッシングを受けて、多彩な作用を発揮するが、主として環境適応 (ストレス応答を含む) や摂食調節に関与している。

下垂体前葉 ACTH 産生細胞 (corticotroph) の ACTH/POMC 発現は、視床下部由来の CRH, vasopressin (AVP) による促進的な、および副腎皮質コルチコステロイドによる抑制的な調節を受けることが古くから知られている。しかし POMC 遺伝子の転写調節は、他の下垂体ホルモン遺伝子、例えば GH や PRL と比較して、分子機序の解明が遅れていた。

## 2. 下垂体 POMC 遺伝子転写調節機構解明のための実験系の確立

POMC 遺伝子転写の研究が進まなかった原因の 1 つとして、適切な *in vitro* の実験系が存在しなかったことが挙げられる。下垂体由来の POMC 産生細胞株としてはマウス由来の AtT20 細胞の存在が知られていた。本細胞は内因性に POMC 遺伝子を発現し、また産生された POMC 蛋白を ACTH にプロセッシングするプロテアーゼ (PC1/3, PC2) も発現しているため、生理活性を有する ACTH を分泌する。しかしその発現調節に関しては、通常の培養条件下では *in vivo* で認められる生理的な調節 (CRH や AVP による刺激、グルココルチコイドによる抑制) を受けにくく、フィードバック調節の分子機序を研究する実験系として用いることが困難であった。

私どものグループは、CRH やグルココルチコイド (GC) に反応しないと言われていた ACTH 産生細胞株 (AtT20) に POMC-luciferase

fusion gene を安定性に導入した細胞株 (AtT20PL) を樹立し、何らかの分化誘導法を用いて生理的な転写調節が再現できるか否か、長期間検討を重ねた。種々の分化誘導薬、ないしエピジェネティック調節を修飾する薬物 (メチル化調節薬など) を検討した結果、最も有効な方法は serum starvation であった。すなわち細胞を少量の FBS (0.5~1%) を含む培養液で 4 日間以上培養すると、CRH/cAMP に対する POMC 遺伝子の転写応答、ならびに GC による転写抑制が明瞭に認められた [1]。CRH 刺激に対する ACTH 分泌応答、またこれに対する GC の分泌抑制が明確に認識できるようになったことも特筆すべきである。また本実験系の副産物として、遺伝子導入効率に起因するデータのバラツキが少ないことから、PACAP、プリン受容体アゴニスト (アデノシン、ATP) など、下垂体内でパラクリン的に作用する因子の影響も、明確に評価することも可能であった [2, 3]。

## 3. POMC 遺伝子転写ならびに ACTH 分泌の促進・抑制機構の分子機序

次の段階として私どもは、本実験系を用いて、cAMP/PKA の下流で実際の遺伝子発現に関与する転写因子の同定を試みた。しかし時を同じくして同様の実験を行っていた Drouin らのグループが、誘導型転写因子 Nur77 の関与を明らかにした [4, 5]。また彼らは同時に GC によるネガティブフィードバック調節は Nur77 とグルココルチコイド受容体 (GR) の拮抗により生じることを示唆する結果を報告した。しかし後者の論文で示された POMC 遺伝子プロモーターにおける GR の作用点に関しては、複数の施設における以後の検討結果を必ずしも一致をみていない。最近私どもの共同研究者は、POMC 遺伝子の転写がレチノイン酸により促進され、その機序の一部に bHLH 型転写因子 NeuroD1 が関与すること [6]、また NeuroD1 が GR による転写抑制の標的であることを示唆する結果を得ている (in preparation)。

また、GC による ACTH 分泌調節抑制は、POMC 遺伝子転写抑制を介する機序の他に、転写を介さず迅速に生じる non-genomic な調節機序の存在が知られているが [7]、その分子実態は不明のままである。私どもは前述の AtT20PL 細胞を用いた検討により、アクチノマイシン D で新規の転写を完全に抑制した条件下でも GC による ACTH 分泌抑制が短時間で生じること、またシグナル伝達系を修飾する種々の阻害薬のうち、Gi 蛋白を阻害する百日咳毒素 (PTX) が GC による ACTH 抑制を完全に解除することを見出した [8]。この結果は、GC が何らかの機序で Gi を介したエフェクター機構を賦活化し、CRH/Gs による adenylate cyclase 活性化を解除する可能性を示唆している。その詳細な分子機構は未だ明らかではないものの、同様の現象は *in vivo* の神経細胞でも報告されており [9]、何らかの普遍的な機構が存在するものと推察される。

一方、CRH/cAMP 系を介した ACTH 分泌刺激には細胞内 Ca 濃度の増加が必須であるが、その由来が細胞外からの流入によるものか、細胞内 Ca ストアからの流出も関与するかは不明であった。私どもは AtT20PL 細胞において細胞内 ER 内からの Ca の移動に関与する ryanodine 受容体の機能を修飾する薬剤を用いて検討した結果、所謂 calcium-induced calcium release も ACTH 分泌に部分的に関与している可能性を示唆する結果を得た [10]。

なお、この AtT20 の実験系を用いた私どもの研究ないし共同研究において、POMC 遺伝子の転写に、前述した以外の神経ペプチド (ghrelin, somatostatin, opioids)、細胞増殖・分化に関与する因子 (BMP)、細胞内代謝物質 (polyamines)、日内リズムに関与するホルモン (melatonin) や、体内時計を司る時計遺伝子の関与も示唆されている [11-16]。

#### 4. 各種病態下における POMC 遺伝子転写異常の分子機序

感染症などの炎症性疾患は間脳下垂体・副腎 (HPA) 系を活性化することが知られており、炎症性サイトカインの役割を中心とした immune-endocrine interaction の概念が確立されている。サイトカイン作用の一部は下垂体を介して生じていることを示唆する過去の *in vivo* の成績をもとに、私どもは AtT20PL 細胞を用いて代表的な炎症性サイトカイン (IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL6 の POMC 転写活性に及ぼす影響を検討した。その結果、いずれのサイトカインも有意の促進作用を示したが、興味深いことに CRH との併用において相加・相乗効果を認め、炎症刺激が下垂

体レベルで HPA 系のポテンシエーターとして機能している可能性が示唆された [17]。また、以後の検討で、これらの効果の一部は転写因子 NF- $\kappa$ B と Nurr1 を介していることを示す結果を得た [18]。一方、敗血症の際に増加する LPS にも POMC 発現促進効果を認めたが、こちらは誘導型転写因子 AP1 依存性の効果であった [19]。

一方、これらの病態で HPA 系が賦活化され高コルチゾール血症が持続しても、下垂体 ACTH 分泌は持続することから、ネガティブフィードバックを減弱させる何らかの機序が存在するものと推察される。私どもの実験系はグルココルチコイド抑制が明瞭に評価できる利点を生かし、炎症時に産生される酸化ストレスに着目して検討を行った。その結果、酸化ストレス自体がグルココルチコイド抑制を減弱・消失させること、この効果の少なくとも一部は、GR 核移行の減弱を介して生じていることを示す結果を得た [20]。

糖尿病や栄養不良などの病的な代謝状態でも HPA 系が活性化されることは日常臨床でしばしば認められる。高血糖自体が POMC 転写に及ぼす影響を検討したところ、高グルコース自体に刺激効果を認めること、NF- $\kappa$ B や AP1 などが関与していることが明らかとなった。この効果は抗酸化薬 (tempol) の存在下では効果が消失することから、高グルコースにより生じる細胞内酸化ストレスが関与しているものと推察された [21]。糖尿病関連では、臨床的に頻用される血糖降下薬 sulfonylurea が POMC 発現を刺激するという興味深い結果も得ている [22]。この結果は *in vitro* で認められることから、低血糖を介した機序とは独立した効果である。

逆にグルコース飢餓でも POMC 遺伝子転写の増強を認めるが、こちらは細胞内グルコースセンサーである AMPK の活性化を介した転写因子 AP1 による効果と考えられた [23]。AMPK による AP1 活性化機序に関しては、PKC $\zeta$  のリン酸化が関与していることが近年の論文で示されている [24]。また私どもはラットの *in vivo* モデルを用いて飢餓状態における CRH, POMC 遺伝子の転写を検討したところ、CRH mRNA 発現の低下にもかかわらず HPA 系の活性化が認められることから [25]、実際に下垂体自体が栄養状態を感知してコルチゾール分泌を行う機構の存在が示唆された。

#### 5. 腫瘍における POMC 遺伝子転写異常の分子機序

クッシング病 (ACTH 産生下垂体腺腫) は代表的な下垂体良性腫瘍の 1 つであるが、治療に

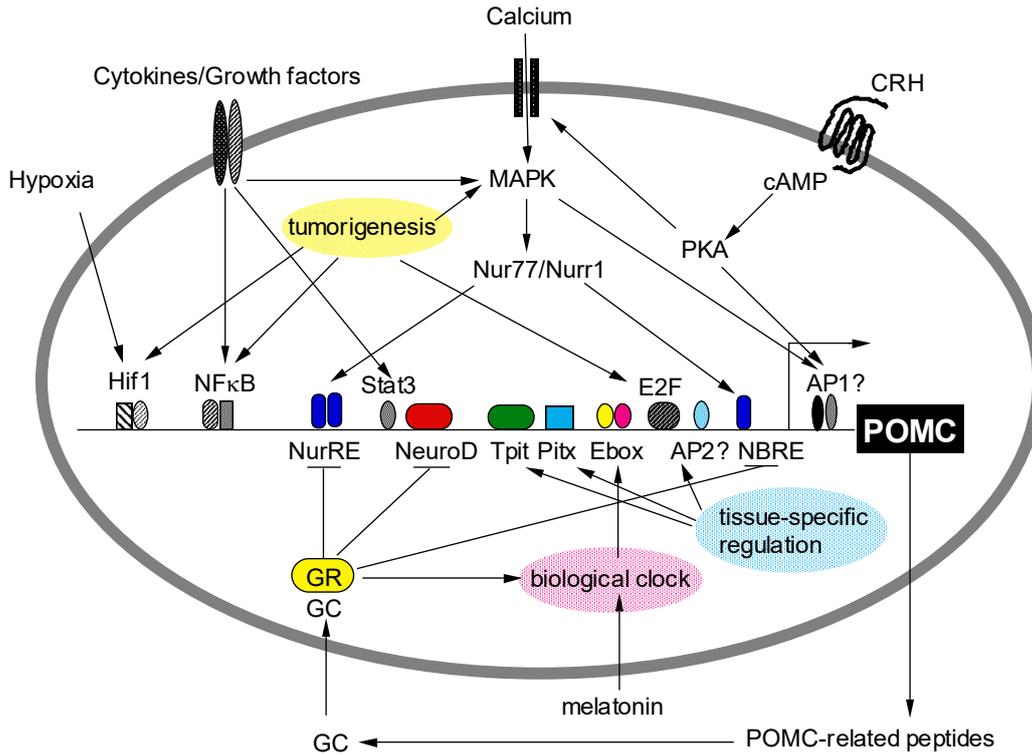


図1 ラット POMC 遺伝子の転写調節と関与する細胞内外の調節因子

難渋する例も多く、病態解明と治療法の確立は喫緊の課題である。本疾患の臨床的特徴の1つとして、高グルココルチコイド血症の存在下にも関わらず腺腫細胞の POMC 発現や ACTH 分泌が持続することが挙げられ、ネガティブフィードバック抑制に破綻をきたしているものと考えられる。その分子機序を解明するため、細胞内グルココルチコイド代謝に焦点を当てて検討したところ、通常の培養条件下における AtT20 細胞では本来は発現していない糖質コルチコイド不活化酵素 (11β-HSD2) の発現が認められ、この不活化経路を特異的な阻害薬 (carbenoxolone) で遮断するとグルココルチコイド抑制が回復すると同時に、長期的には高グルココルチコイドで細胞がアポトーシスに陥ることを見出した [26]。この結果より、クッシング病の腺腫細胞では細胞内でグルココルチコイドが不活化される (ヒトの場合はコルチゾール→コルチゾンに変換される) 結果、ネガティブフィードバック機構が減弱ないし消失することが示唆される。実際、ヒトの ACTH 産生下垂体腺腫細胞において 11β-HSD2 の病的な発現が確認されている [27]。

一方、クッシング腺腫で認められる ACTH の分泌活性は、生理的な corticotroph で認められる活性と比較してはるかに強く、グルココルチコイド抑制の解除のみならず強い発現促進機構の存在が推察される。私どもは AtT20 細胞で活

性が増強している代表的な転写因子を因子特異的なレポーター遺伝子を用いてスクリーニングし、NF-κB が強力なドライビングフォースの1つである可能性を示唆する結果を得た。この結果をもとに、*in vitro* で NF-κB 特異的阻害薬 (partenolide, DHEA) の効果を検討したところ明瞭な POMC 転写減弱効果を認めた。また AtT20 細胞をヌードマウスに移植した *in vivo* の系でも、両薬剤の併用は腫瘍の増殖を著明に抑制したことから [28]、すでに抗腫瘍薬として用いられている NF-κB 阻害薬のクッシング腺腫 (特に aggressive な性状を有するもの) への臨床応用が期待される。また AtT20 細胞を用いた *in vitro* の実験系で、共同研究者らはレチノイン酸アゴニストや HDAC 阻害薬の抗腫瘍効果を示唆する成績を報告している [29, 30]。

## 6. まとめ

POMC 遺伝子の転写調節には、生理的な CRH/cAMP/PKA を介した調節系以外に種々の細胞内外の調節因子が存在すること、複数の転写因子が病態ないし組織 (POMC が発現する下垂体、皮膚、神経) 特異的な調節を行うこと、など、この重要な遺伝子の発現調節機構の全体像が、20 年以上に亘る研究から徐々に浮かび上がってきた感がある。私どもの研究から得られた知見、ならびに国内外の研究から得られた知見を図にまとめて示した (図1)。

POMC 遺伝子（あるいはその上位の CRH 遺伝子）はノックアウトしても胎生致死にはならず、生命の維持に必須の存在ではない。しかし、生体が周囲の環境に適応しつつ生きていくためには必須の存在と考えられる。本遺伝子は下垂体以外では皮膚と視床下部で発現し、前者では皮膚のメラノサイトにおいて体色変化を調節することにより生存環境への適応に、後者では食欲調節機構への関与を介して栄養環境への適応に、それぞれ重要な役割を果たしている。下垂体 ACTH が外界からのストレスへの応答に関与するホルモンであることを考慮すると、POMC 遺伝子の役割を一言で纏めれば、『生体における「環境適応ホルモン」として生存戦略に必須の遺伝子』と位置付けてよいのかもしれない。

※本稿は第 31 回日本下垂体研究会学術集会（ハワイ、オアフ島）において「吉村賞」を受賞した研究内容の紹介です。

## 文献

- Aoki Y, Iwasaki Y, et al. Regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. I: Effects of the common secretagogues. *Endocrinology* 1997;138:1923-9.
- Aoki Y, Iwasaki Y, et al. Regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. II: Effects of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide. *Endocrinology* 1997;138:1930-4.
- Zhao LF, Iwasaki Y, et al. Purinergic receptor ligands stimulate pro-opiomelanocortin gene expression in AtT-20 pituitary corticotroph cells. *J Neuroendocrinol* 2006;18:273-8.
- Philips A, et al. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 1997;5946-51.
- Philips A, Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 1997;17:5952-9.
- Uruno A., et al. Retinoic acid receptor- $\alpha$  up-regulates proopiomelanocortin gene expression in AtT20 corticotroph cells. *Endocr J* 2014;61:1105-14.
- Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 1984;5:1-24.
- Iwasaki Y, et al. Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:295-9.
- Schutsky K, et al. Stress and glucocorticoids impair memory retrieval via  $\beta$ 2-adrenergic, Gi/o-coupled suppression of cAMP signaling. *J Neurosci* 2011;31:14172-81.
- Yamamori E, Iwasaki Y, et al. Possible involvement of ryanodine receptor-mediated intracellular calcium release in the effect of corticotropin-releasing factor on adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology* 2004;145:36-8.
- Yamamoto E, Iwasaki Y, et al. Polyamine regulation of the rat pro-opiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. *J Neuroendocrinol* 2001;13:774-8.
- Nomura A, Iwasaki Y, et al. Effects of loperamide and other opioid-related substances on the transcriptional regulation of the rat pro-opiomelanocortin gene in AtT20 cells. *Neuroendocrinology* 2001;74:87-94.
- Tsukamoto N, Otsuka F, et al. Effects of bone morphogenetic protein (BMP) on adrenocorticotropin production by pituitary corticotrope cells: involvement of up-regulation of BMP receptor signaling by somatostatin analogs. *Endocrinology* 2010;151:1129-41.
- Tsukamoto N, Otsuka, et al. Functional interaction of bone morphogenetic protein and growth hormone releasing peptide in adrenocorticotropin regulation by corticotrope cells. *Mol Cell Endocrinol* 2011;344:41-50.
- Tsukamoto N., et al. Melatonin receptor activation suppresses adrenocorticotropin production via BMP-4 action by pituitary AtT20 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2013 ;375:1-9.
- Tsukamoto-Yamauchi N, Interaction of pituitary hormones and expression of clock genes modulated by bone morphogenetic protein-4 and melatonin. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;459:172-7.

17. Katahira M, Iwasaki Y, et al. Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. *Endocrinology* 1998;139:2414-22.
18. Takayasu S, Iwasaki Y, et al. Involvement of nuclear factor- $\kappa$ B and Nurr-1 in cytokine-induced transcription of proopiomelanocortin gene in AtT20 corticotroph cells. *Neuroimmunomodulation* 2010;17:88-96.
19. Asai M, Iwasaki Y, et al. Lipopolysaccharide stimulates proopiomelanocortin gene expression in AtT20 corticotroph cells. *Endocr J* 2008;55:285-90.
20. Asaba K, Iwasaki Y, et al. Attenuation by reactive oxygen species of glucocorticoid suppression on proopiomelanocortin gene expression in pituitary corticotroph cells. *Endocrinology* 2004;145:39-42.
21. Asaba K, Iwasaki Y, et al. High glucose activates pituitary proopiomelanocortin gene expression: possible role of free radical-sensitive transcription factors. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23:317-23.
22. Morisita M, Iwasaki Y, et al. Antidiabetic sulfonylurea enhances secretagogue-induced adrenocorticotropin secretion and proopiomelanocortin gene expression in vitro. *Endocrinology* 2000;141:3313-8.
23. Iwasaki Y, et al. Activation of AMP-activated protein kinase stimulates proopiomelanocortin gene transcription in AtT20 corticotroph cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E1899-905.
24. Voelkl J, et al. AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 1-sensitive activation of AP-1 in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2016;97:36-43.
25. Nishiyama M, Makino S, Iwasaki Y, et al. CRH mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is inhibited despite the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during starvation. *Brain Res* 2008;1228:107-12.
26. Nigawara T, Iwasaki Y, et al. Inhibition of  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase eliminates impaired glucocorticoid suppression and induces apoptosis in corticotroph tumor cells. *Endocrinology* 2006;147:769-72.
27. Tateno T, et al. Differential gene expression in ACTH -secreting and non-functioning pituitary tumors. *Eur J Endocrinol* 2007;157:717-24.
28. Taguchi T, Iwasaki Y, et al. Suppressive effects of dehydroepiandrosterone and the nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor parthenolide on corticotroph tumor cell growth and function in vitro and in vivo. *J Endocrinol* 2006;188:321-31.
29. Saito-Hakoda A et al. Effects of RXR Agonists on Cell Proliferation/Apoptosis and ACTH Secretion/Pomc Expression. *PLoS One* 2015;10:e0141960.
30. Nakada Y. et al Inhibitory effects of trichostatin A on adrenocorticotrophic hormone production and proliferation of corticotroph tumor AtT-20 cells. *Endocr J* 2015;62:1083-90.

## 短報-1

## レチノイン酸シグナルによる下垂体特異的転写因子 Prop1 の遺伝子発現制御解析

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

西原 大翔

cf50415@meiji.ac.jp

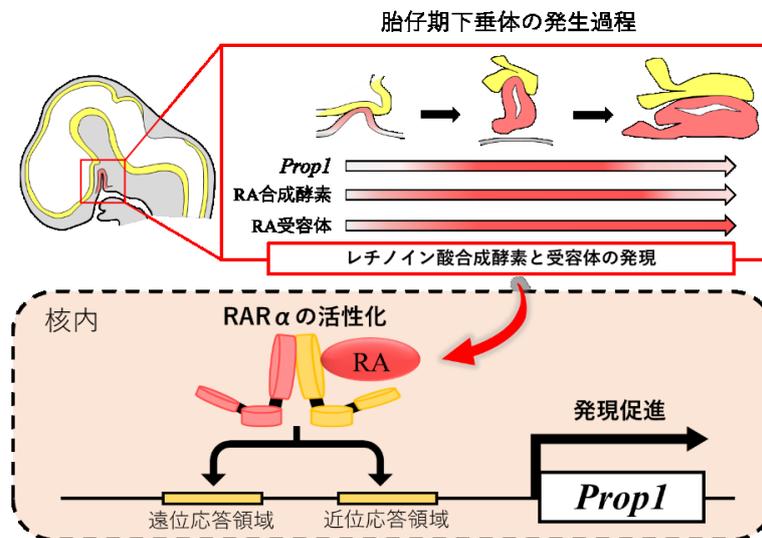
日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.4, 6, 2017)

転写因子 PROP1 は、矮小化を呈する Ames dwarf mice の原因遺伝子として同定された、下垂体特異的転写因子である。PROP1 の機能不全は、下垂体組織の形成不全ならびに下垂体前葉ホルモン産生細胞の欠損を示すことから、PROP1 は下垂体の発生と分化に重要な役割を担っているとされている。しかしながら、PROP1 遺伝子の発現制御機構に関しては、これまでに Notch シグナルや転写因子 SOX2 による制御などの関与が報告されているものの、まだ未解明な部分が多く残されている。近年我々の研究グループは、ラット下垂体発生初期において、レチノイン酸合成酵素遺伝子と PROP1 遺伝子が同様に発現しており、その後の発生の進行過程においても、PROP1 と類似した挙動を示すことを報告している。レチノイン酸は、個体の発生過程において多様な組織形成に関与しており、また下垂体においても一部のレチノイン酸シグナル関連因子の欠損によって下垂体形成不全を示すことが報告されている。そこで我々は、レチノイン酸シグナルが PROP1 遺伝子の発現制御機構に関与する可能性を検討した。ラット下垂体発生過程の E12.5~E18.5 及び P60 成体下垂体において、定量的リアルタイム PCR によるレチノイン酸受容体の発現解析から、

Rar および Rxr の各サブタイプが発現していることが確認できた。さらに、E13.5 下垂体原基ラトケ囊における *in situ hybridization* による局在解析から、PROP1 遺伝子の発現領域にレチノイン酸合成酵素 Raldh2/3 およびレチノイン酸受容体 Rar $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  の発現を確認した。次に、CHO 細胞を用いたレポーターアッセイを行い、マウス PROP1 遺伝子の転写開始点約 3 kb 上流までの領域に対するレチノイン酸受容体の作用を解析した。その結果、特に RAR $\alpha$  が合成レチノイド存在下で転写促進作用を示すこと、さらに RXRs との共存によって相乗的な作用がある事を確認した。また、転写開始点上流の段階欠失体を用いた解析から、転写開始点上流の遠位と近位の 2 領域に RAR $\alpha$  の作用領域が存在する可能性が示唆された。

以上本研究の結果から、特に胎仔期下垂体における PROP1 遺伝子の発現に、RAR $\alpha$  を介したレチノイン酸シグナルが関与する可能性が示唆された。

※本報は第 31 回日本下垂体研究会学術集会において最優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。



図：胎仔期下垂体におけるレチノイン酸シグナルによる PROP1 遺伝子発現制御モデル

短報-2

霊長類進化における妊娠関連タンパク質 PZP、A2LM1、PSG-1 の発現動態の解析

東海大学医学部専門診療学系産婦人科学

柏木 寛史

hirofumi@tsc.u-tokai.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.4, 7, 2017)

妊娠期間中、母体では様々な妊娠関連タンパク質が発現する。これらには Pregnancy-zone-protein (PZP) および Pregnancy-specific-β-1-glycoprotein (PSG-1) 等の妊娠中胎盤で高発現し、血漿中に高濃度で検出され、免疫寛容に関連する事が報告されている分子が含まれる。また、PZP と同一の Alpha-2-macroglobulin (A2M) ファミリーに属する A2M-like-1 (A2ML1) はヒトでは PZP と 70% の homology をもっており、低レベルで胎盤に発現する。しかし、これらの分子、特にヒト A2ML1 の妊娠における機能的役割については今のところ解明されていない<sup>1)2)</sup>。

本研究では、ヒト及び新世界ザルであるコモンマーモセット (CM) における PZP、PSG および A2ML1 タンパク質の血中動態と胎盤における発現を比較解析し、霊長類の進化過程における各分子発現の変遷について検討した。

ヒトおよび CM の末梢血より血漿を分離し、LS/MS によりこれに含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った。また、胎盤より RNA を抽出し、RT-PCR により上記 3 種類の分子の mRNA 発現を解析した。

妊娠期間を trimester に分けそれぞれの血漿タンパク質動態を測定したところ、ヒトでは PZP が、CM では PZP と同一の A2M ファミリー分子である A2ML1 が 2nd trimester をピークとして血漿中濃度が 100 倍以上に上昇することが明らかとなった。一方、ヒトおよび CM 胎盤を胎盤全体、絨毛膜、脱落膜に分け、PZP および A2ML1 の発現を RT-PCR を用いて確認したところ、両種に PZP、A2ML1 が共に発現することが明らかとなった。

PZP および A2ML1 はヒト・CM 間では 91% の homology を持ち、系統樹を作成すると、両者の配列が種間で非常に保存されている事が明らかとなった。妊娠中にヒトでは PZP が、CM では A2ML1 が血漿中で高濃度となることから、進化の過程においてこれらのタンパク質は機能的役割を代替しながら存続してきたことが示唆された。

A2ML1 の進化過程における機能の変遷を解析することは、種の存続に関わる重要な妊娠と

いう機構解明に重要である。CM はこのタンパク質の in vivo での妊娠免疫への関与を解析するために適した系である事が示唆された。

【引用文献】

- 1) Tayade C, Esadeg S, Fang Y, Croy BA, 2005, Functions of alpha 2 macroglobulins in pregnancy. Mol Cell Endocrinol. 245, 60-66.
- 2) Galliano MF, Toulza E, Gallinaro H, Jonca N, Ishida-Yamamoto A, Serre G, Guerrin M, 2006, A Novel Protease Inhibitor of the Alpha-2-Macroglobulin Family Expressed in the Human Epidermis. J Biol Chem. 281, 5780-5789.

※本報は第 31 回日本下垂体研究会学術集会において最優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です

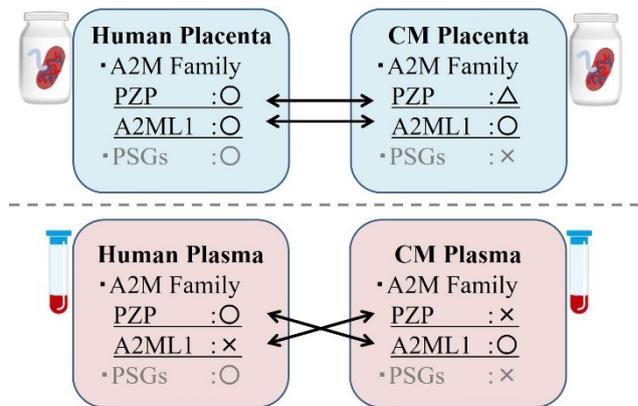


表1 ヒト、CM における妊娠関連タンパク質の発現

## 短報-3

## Analysis of TrkB and PD-1/PD-L1 expression in Common Marmoset placenta

東海大学医学研究科医科学専攻

木南 理仁

5bmr001@mail.u-tokai.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.4, 8, 2017)

胎盤において胎児細胞である Trophoblast は免疫抑制能と浸潤能を持ち、正常組織で唯一固型癌と類似した性質を持っている。しかし Trophoblast のこれらの性質は高度に調節されており、固形癌のように生存を脅かす病態は発生しない。そのため、Trophoblast において免疫抑制・浸潤の両者を調節する機構の解明は癌の病態の解明とその制御法の開発に繋がると考えられる。ヒトを材料とするには多くの制限があるため、我々は霊長類における Trophoblast 浸潤の解析モデルとしてコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) をヒトとの比較解析に用いた。コモンマーモセットは性成熟が早く、日本国内において飼育コロニーも確立している。2009 年には実験動物中央研究所にて次世代に形質を遺伝可能な GFP Transgenic マーモセットの作出に成功し 1)、2016 年には IL-2 receptor- $\gamma$ KO マーモセットの作出に成功している 2)。本研究では癌で発現が確認されている免疫抑制関連分子である PD-L1 (programmed cell death-1 ligand-1) と生存や上皮間葉転換に関わる TrkB に着目した。TrkB は妊娠時に免疫寛容を引き起こすとされる浸潤性胎児細胞の Trophoblast と一部の癌に発現が確認されている。PD-L1 は、多くの癌細胞に発現しており、PD-1 (programmed cell death-1) は T 細胞上にある PD-L1 の受容体である。PD-1/PD-L1 経路は癌細胞が T 細胞の免疫を抑制するために利用すると考えられている。そこで Immunohistochemistry (IHC), Flow cytometry (FCM), Reverse Transcription PCR (RT-PCR) を用いて、これらの分子が霊長類 Trophoblast の分化過程でどのような発現プロファイルを示すかを明らかにすることを試みた (図 1)。

IHC および FCM では、PD-L1 および TrkB の発現は脱落膜、絨毛膜に見られ、一部共発現している細胞が存在することが明らかとなった。RT-PCR により、PD-1, PD-L1, TrkB mRNA の発現がコモンマーモセットおよびヒト胎盤において確認された。しかし、脱落膜において発現する TrkB は細胞内領域を持たないことが明らかになった。

以上のことから、両種の胎盤絨毛膜の一部 Trophoblast では胎児細胞が免疫抑制機能と浸潤能を共に有している可能性が示唆された。しかし、脱落膜では細胞内領域を持つ TrkB バリエントが発現しないことから、脱落膜において Trophoblast の生存維持能、浸潤能が調節されている可能性が示された。また、本研究により、コモンマーモセットは今後脱落膜環境におけるこれら分子の動態を *in vivo* にて解析する上で有用であると考えられる。

## 【引用文献】

- 1) Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. "Generation of Transgenic Non-Human Primates with Germline Transmission." *Nature* 459, no. 7246 (2009): 523-7.
- 2) Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E. "Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing." *Cell Stem Cell* 19, no. 1 (2016): 127-3

※本報は第 31 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

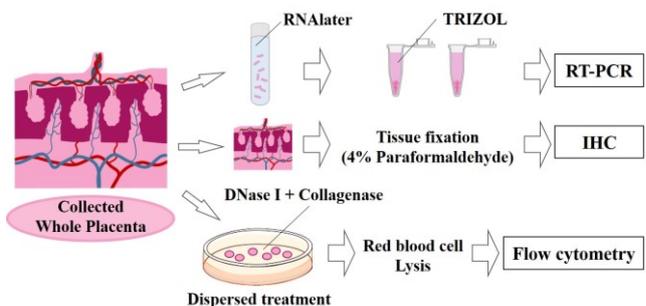


図 1 胎盤からのサンプル調整法

## 短報-4

## ヒト羊膜上皮細胞の free activin A 分泌に関する研究

群馬大学大学院 保健学研究科 生体情報検査科学  
岡林 武志  
m15711001@gunma-u.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.4, 9, 2017)

Activin は、FSH 合成・分泌促進因子として卵胞液より発見された増殖因子であり、FSH 合成・分泌を抑制するホルモンである inhibin が卵胞液から単離同定された翌年の 1986 年に発見された。Activin は 2 つの inhibin/activin  $\beta$ -subunit ( $\beta$ -subunit) から成る二量体であり、inhibin は inhibin  $\alpha$ -subunit ( $\alpha$ -subunit) と  $\beta$ -subunit から成る二量体である。哺乳類の  $\beta$ -subunit としては、 $\beta$ A-subunit、 $\beta$ B-subunit、 $\beta$ C-subunit、 $\beta$ E-subunit が存在するが、activin A は 2 つの  $\beta$ A-subunit から構成される。一方、activin 発見の翌年に inhibin とは化学構造の異なる FSH 合成・分泌抑制因子として卵胞液から単離された follistatin は、activin と結合することにより activin の受容体への結合を阻害する activin 結合蛋白質である。また、follistatin like-3 も follistatin 類似の activin 結合蛋白質で、follistatin や follistatin like-3 が結合していない activin (free activin) が生理活性のある activin である。

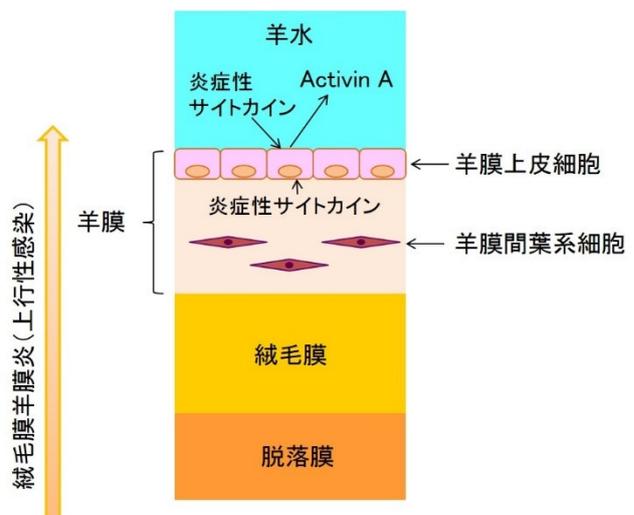
1986 年の発見以降、activin は FSH 合成・分泌促進作用以外にも様々な作用を発揮することが報告されたが、その一つが activin A と炎症・創傷治癒に関するものであり、敗血症、髄膜炎、関節リウマチ、早産等で血液や体液中の activin A 濃度が上昇することが報告されている。また、LPS 投与による敗血症モデルマウスでは、死亡群の血中 activin A 濃度は高値で、follistatin の事前投与により生存率が上昇することが報告されている。しかし、これらの報告では、結合蛋白質の結合の有無によらず activin A を検出する ELISA が用いられているため、本研究では、free activin A に特異的な ELISA を開発し、当研究室の絨毛膜羊膜炎における activin の研究に応用することとした。

院内臨床試験審査委員会の承認の下、感染症等の合併症の無い妊婦の満期予定帝王切開術時に卵膜を得て、酵素処理により羊膜上皮細胞と羊膜間葉系細胞を分離、培養し、実験に用いた。24-120 時間の培養で、TNF- $\alpha$  刺激により、羊膜上皮細胞では羊膜間葉系細胞よりも、早期から長時間の有意な  $\beta$ A-subunit mRNA 発現の上昇が

みられたのに対して、 $\alpha$ -subunit、follistatin、follistatin like-3 の mRNA 発現は有意な上昇を認めなかった。Inhibin A を免疫したヤギ血清を activin A 結合樹脂を用いた immunoaffinity chromatography により精製した polyclonal 抗体を固相化抗体とし、 $\beta$ A-subunit の follistatin、follistatin like-3 との親和性が高い領域をエピトープとした、抗ペプチド抗体を二次抗体とした free activin A ELISA で、培養上清中の activin A を測定したところ、羊膜上皮細胞の TNF- $\alpha$  添加群で、対照群に比べ有意な free activin A の上昇を認めた。

早産の病因となる絨毛膜羊膜炎の多くは上行性感染であることが知られており、今回の結果は、炎症が羊膜上皮細胞まで及んだ段階では、羊水中への free activin A 分泌が増加する可能性を示唆している。羊膜細胞培養系と臨床検体を用いた研究により、絨毛膜羊膜炎の病態の解明と検査法・治療法の開発が期待される。

※本報は第 31 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：絨毛膜羊膜炎における activin A 分泌の模式図 炎症が羊膜上皮細胞まで及んだ段階では、羊水中への free activin A 分泌が増加する可能性が推測される。

## 第 31 回学術集会報告

東海大学医学部 産婦人科  
和泉 俊一郎  
kmatsuda@sci.u-toyama.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.4, 10-11, 2017)

このたび日本下垂体研究会 第 31 回学術集会を担当するにあたり国際会議として開催することを企画し、無事終えることができました。その概要を紹介します。この国際会議は、ISPGRS 2016 ; International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems という名称とし、日本下垂体研究会、日本比較内分泌学会、日本神経内分泌学会、日本内分泌病理学会の共催という形で各学会の推薦によるシンポジストを国内外から迎えて、2016年9月1日より5日まで、ハワイ大学マノア校内の East-West Center の Jefferson Hall にて開催致しました。日本下垂体研究会の第 31 回学術集会は最終日に吸収する形での同時開催でした。

開催前夜（8月31日水曜）に同会場でオバマ大統領が「国際環境会議」の冒頭演説をされたこともあり、同じ壇上から、大会長として少し緊張した開会の挨拶を手短にさせていただきました（写真1）。日本からメールのやり取りのみで進めた開催準備で不安要素が多々ありましたが、総勢104名の参加を頂きました（写真2）。シンポジウムはもちろんのこと、若手の発表が中心となったポスター発表の会場においても、活発な議論と学術的交流が行われました。海外からの参加者の中には昔から日本人を指導してきた大御所も多く、彼らからは、日本人の静かなイメージが変化し、ずいぶん積極的に会話するようになった・・・とコメントを頂きました。初日夜のレストラン Tiki での get together party は、80名以上の参加があり、ワイキキの夕日を眺めながら懇親に花が咲きました。本来講演予定だった群馬大学医学部長の峯岸教授は急用のため、Tiki での挨拶だけで、翌朝ホノルル空港へ向かわれ inhibin 関連の講演は何えませんでした。

全体の構成について少し触れます（写真3）。2日午前是最優秀賞候補の講演と short oral セッションで、ハワイ大学キャンパスでの昼食後、日本比較内分泌学会企画の“*Session 1: Recent advances in pituitary researches in the comparative field: with special reference to GH/PRL/SL family*”の5演題で盛り上がり、その後階下へ移動して、下垂体研究会では珍しいポスター発表でした。



写真1：会長講演



写真2：集合写真

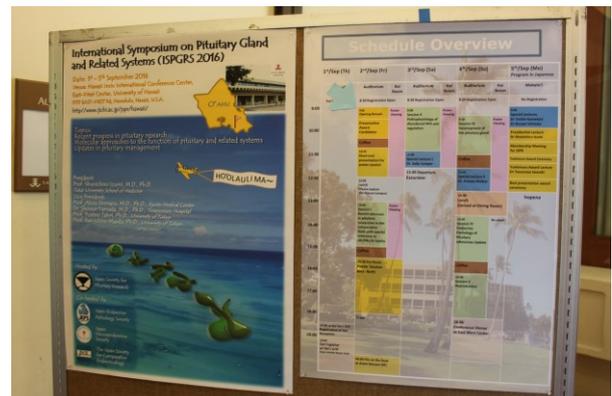


写真3：シンポジウムのポスター

下垂体研究会恒例の file on the desk は、場所を、参加者の多くが宿泊したアストン・ワイキキ・パニヤンのコンドミニウムに移動して、夜に企画しました。しかし、会議室では州のアルコール

ル禁止条例のため、むしろその後、各部屋に分かれた懇談の方が活発でした。いくつかのグループに分断されたことが心残りでした。翌日の3日午前には、日本神経内分泌学会企画の“**Session 2: Pathophysiology of disordered HPA axis regulation**”（6演題）を、日本内分泌病理学会企画の“**Session 4: Endocrine Pathology of Pituitary adenomas Update**”（6演題）は、4日午後に配して、日本下垂体研究会企画の2つのシンポジウムの“**Session 3: Development of the pituitary gland**”（4演題）と“**Session 5: Reproduction**”（3演題）は、4日の午前と午後の最後にサンドイッチ構成としました。さらに6つのLectureを、若い研究者にとって教育的であるように演者にお願いしました。この意図は十分に参加者に理解されたようで、ポスターセッションでも、招待講演の演者のお歴々が若手演者に指導的Q&Aを直接施されている場面が、随所に見られました。

上述の招待講演の方々の具体的な演題は、下記の表を参照いただくとして、特に本会企画の演者やその構成についての紹介は、企画段階から Secretary general として深く関与いただいた汾陽光盛教授（北里大：今期まで学会事務局長）に別稿で解説をお願いしました。

3日午後に企画した日本下垂体研究会恒例の“遠足”は、珍しく2つの台風が並んでホノルルを襲うかもしれないという天気予報により、中止が危惧されましたが、無事ハリケーンは“北へ”外れて、予定通りに plantation village を訪問できました。この plantation village は、サトウキビ農園での日本人をふくめたハワイの移民の歴史に直接触れていただける場所で、単なる観光では訪れられない場所でしたので、参加者には満足いただけたようでした。4日夜の conference dinner は、事務局の緻密な式次第通りに進行して盛り上がり、翌日の第31回学術集会へスムーズに移行できました。最終日の5日は、私の会長講演と2つの特別講演（亀谷先生、石塚先生）に次いで、優秀賞の表彰（写真4）と岩崎先生による本年度吉村賞の受賞講演を拝聴しました。

このように大変な盛会のうちに無事学術集会を終了することができましたのは、ひとえに会員の皆様方のご協力、ご理解の賜物と存じます。さらに、シンポジウム共催をご了解いただいた各学会の理事会・評議員会関係者の皆様、国際シンポジウムにふさわしい大変充実したプログラムを作成いただいたプログラム委員会やオーガナイザーの皆様、各分野における最新の知見をわかりやすくご講演いただいたシンポジスト



写真4：優秀賞受賞者

等演者の方々、座長の労をお取りいただき活発な討論に導いていただいた先生方、一般演題を応募され新しい知見を報告された皆様、ハワイ大会に出席いただいたすべての方々に、あらためて厚く御礼申し上げます。

今回の大会では世代交代を見据えたメッセージも多く発信されていたように思います。ここで築いた新たなネットワークを発展させ、様々な分野で横のつながりを大事にした研究がさらに充実することを祈念して、皆様への御礼のことばにかえさせていただきます。

なお、今回の31回を節目として International Symposium を企画した根拠は、one generation が30年と言うところから始まっています。すなわち31回は 2nd generation の初年度と言うわけです。27年度からはまた会場を本邦に戻して、新規一転した新たな 2nd generation を、会員皆で活気あるものにしたいと思えます。次回の第32回下垂体研究会は、自治医科大学奥水先生が会長で、開催期日は2017年8月2日（水）より4日（金）で、鬼怒川グランドホテル（栃木県日光市鬼怒川温泉）にて恒例の合宿形式です。次回も皆様お誘いあわせの上、是非ご参加いただきますようお願いいたします。毎年お会いできることを楽しみにしております。以上御礼を兼ねた報告をさせていただきます。

## 編集後記

春なお浅く、朝夕の冷え込みもまだきびしい時期ですが、会員の皆様におかれましては日々の研究に邁進されていることと存じます。また、研究室や講座から学生が巣立つ時期でもあります。本誌の編集委員が所属する講座からも3人の大学院生が無事に博士論文を提出し、修了予定であります。本誌にご寄稿いただいた方の中にも、4月から社会人として羽ばたく学生もいらっしゃるようです。寂しいところもございますが、皆様の今後活躍を願いつつ、本誌の編集にあたっております。

さて、会員の皆様のご協力を賜り、日本下垂体研究会誌第4号を発行することができました。本号には、論文Ⅱ(1報)、短報(4報)に加えて、昨年度開催された第31回日本下垂体研究会学術集会の報告文を掲載しております。下垂体前葉のコルチコトロフより分泌されるACTHは個体のストレス応答に必要なホルモンです。岩崎先生はACTHの前駆体であるPOMCの遺伝子発現調節機構の研究を進められ、様々な調節因子を同定されました。本誌にご寄稿いただいた記事におけるまとめの図を拝見させていただくと、コルチコトロフが生体内外の環境変化に対応するための細胞として、複雑な情報伝達系を有してPOMC遺伝子を使いこなしていることがわかります。本号では、第31回学術集会における吉村賞受賞講演内容をご執筆いただきました。また、第31回学術集会における発表賞の受賞者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。レチノイン酸と下垂体特異的転写因子、霊長類進化と妊娠関連タンパク質、コモンマーモセットを用いたTrophoblastの解析、free activin A分泌に関する研究と様々な記事を掲載しております。ハワイ大会がInternational Symposium on Pituitary Gland and Its Related Systemsと銘打たれていただけに、記事内容の多くは下垂体に関連した器官の話題となっております。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、今年の第32回日本下垂体研究会学術集会は栃木県の鬼怒川温泉で開催されます。本誌編集部も微力ながら尽力させていただきます。鬼怒川の温泉と川下りを交えながら、下垂体研究に関する活発な議論が行われることを期待しております。是非ご参加ください。最後になりますが、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）文字で表記する。（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、H<sub>2</sub>O
- 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<sup>1)3)</sup>、……である<sup>4)6)7)</sup>。
- 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 : 菊地元史: 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: 菊地元史 kikuchim@jichi.ac.jp

東 森生 azumam@jichi.ac.jp