



日本下垂体研究会誌

2016年3月31日 発行

本号の内容

1. 論文 II 「ゴナドトロピンサブユニット遺伝子発現調節機構に関する研究」
金崎 春彦 (島根大学)
2. 短報 - 1 「雄ラットの床敷曝露による雌ラット前腹側室周囲核キスペプチンニューロンの活性化および LH 分泌の増強作用」
渡辺 雄貴 (名古屋大学)
3. 短報 - 2 「キンギョにおける組換えソマトラクチンの黒色素胞に及ぼす影響」
南 和希 (富山大学)
4. 短報 - 3 「Gene expression analysis of folliculostellate cells in 'transitional zone' of anterior pituitary gland of rat – special relevance to circadian rhythm –」 Rita Maliza (Jichi Medical University)
5. 短報 - 4 「成体下垂体前葉の幹・前駆細胞ニッチの単離とその解析」
西村 直人 (明治大学)
6. 短報 - 5 「プロトン刺激によるマウス下垂体細胞株 L β T2 の応答解析」
持丸 雄太 (明治大学)
7. 短報 - 6 「ガウシアルシフェラーゼの L β T2 細胞におけるホルモン分泌アッセイ系の構築への利用」
佐藤 一裕 (明治大学)
8. 第 30 回学術集会報告 松田 恒平 (富山大学)

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 3 5 - 1
事務局長 汾陽光盛
e-mail mitsumor@vmas.kitasato-u.ac.jp

日本下垂体研究会

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

論文Ⅱ

ゴナドトロピンサブユニット遺伝子発現調節機構に関する研究

島根大学医学部産科婦人科
金崎 春彦
kanasaki@med.shimane-u.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.3, 1-5, 2016)

1. はじめに

卵巣から正常にエストロゲンが分泌されて子宮内膜が増殖し、卵子の排卵後は卵巣からプロゲステロンが分泌されて増殖期内膜が分泌期内膜に変化する、そして妊娠が成立しなければ女性ホルモンの消褪と共に子宮出血が生じ、そして再び卵巣からのエストロゲン分泌、子宮内膜の増殖が開始する。女性ホルモンにより子宮に生じるこの周期的な変化が正常な女性の月経周期であるが、女性ホルモンの分泌は下垂体から分泌されるゴナドトロピン (follicle-stimulating hormone; FSH、Luteinizing hormone; LH) が卵巣に作用し、卵巣が発育することに伴う。一方、下垂体ゴナドトロピンの分泌は視床下部 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)により制御される。このように GnRH を中心とした女性生殖機能の制御機構は視床下部-下垂体-性腺軸 (Hypothalamo-pituitary gonadal axis; HPG axis) と呼ばれる (図 1)。本稿では HPG axis のうち、GnRH によるゴナドトロピン合成機構に関する知見について報告する。

2. GnRH のパルス状分泌

視床下部に存在する GnRH 産生ニューロンはその神経末端から下垂体門脈血流へ GnRH を放出するが、GnRH はパルス状に分泌されている。つまり GnRH の下垂体門脈への放出はある一定の時間間隔で行われており、これに反応して下垂体 LH もパルス状に分泌されることが知られている。GnRH のパルス状分泌は下垂体 LH、FSH の分泌を維持するために重要であり、持続的な GnRH 刺激では下垂体ゴナドトロピン産生細胞に存在する GnRH 受容体の down regulation が起こり、細胞の脱感作が生じるためゴナドトロピンの分泌は減少する[1]。一方 GnRH パルスの分泌頻度も重要であり、GnRH が低頻度パルス状に分泌される場合下垂体からは FSH が優位に分泌され、GnRH が高頻度パルス状に分泌されると LH の分泌が優位になる[2]。GnRH の分泌パターンは女性の月経周期においても生理的に変化しており、月経開始から卵巣が発育し

始める卵胞期初期において GnRH は比較的 low 頻度でパルス状に分泌され、それに伴い FSH が優位に分泌されて卵巣発育を促すが、卵胞期後期になると GnRH のパルス状分泌は高頻度となり、FSH よりも LH が優位に分泌されて主席卵胞の選択へ至る[3]。

3. GnRH パルス頻度依存性ゴナドトロピンサブユニット特異的発現

下垂体前葉のゴナドトロピン産生細胞は GnRH の刺激で LH、FSH の 2 つのホルモンを合成・分泌する。そして GnRH の刺激頻度、つ

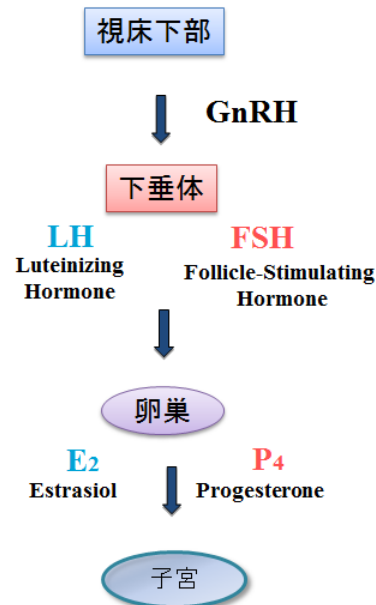


図 1 視床下部-下垂体-性腺軸 (HPG axis)

視床下部から分泌される GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) は下垂体前葉からゴナドトロピンである LH (Luteinizing hormone) と FSH (follicle-stimulating hormone) の合成・分泌を促進する。ゴナドトロピンは卵巣に作用し、卵巣を発育させ、エストラジオールを分泌させる。LH サージが起きて排卵した後は、卵巣からはエストラジオール (E2) に加えてプロゲステロン (P4) が分泌される。

まり GnRH 分泌パターンが高頻度か低頻度かにより LH 優位の分泌になるか、あるいは FSH 優位となるかが決定されている。この現象は下垂体前葉ゴナドトロピン産生細胞株である LβT2 細胞においても認められる。メディウム還流装置を用いて実験的に 30 分間隔で 5 分間の GnRH を持続的に細胞に投与した場合（高頻度）と、120 分間隔とで投与した場合（低頻度）を比べると LHβ サブユニットは低頻度よりも高頻度 GnRH 刺激で増加し、FSHβ サブユニットは高頻度よりも低頻度 GnRH 刺激で有意に増加する[4] (図 2)。このことは GnRH パルスを感じ、細胞レベルで LHβ、あるいは FSHβ を特異的に発現させる機構が存在していることを意味している。

4. GnRH パルス刺激と細胞内情報伝達様式

GnRH は G 蛋白共役型の受容体であり、Gq 及び Gs 蛋白に結合しているため、phospholipase C を介して protein kinase C を活性化し、最終的に extracellular signal-regulated kinase (ERK) を活性化する経路と、Gs 蛋白を介して adenylyl cyclase を活性化させて細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、最終的に protein kinase A を活性化する少なくとも 2 つの情報伝達系路を有する。これら情報伝達物質の活性化が、ゴナドトロピンサブユニットの発現に関与する。ERK の活性化は LHβ、FSHβ の両サブユニット発現に重要であることは阻害剤を用いた実験で明らかになっている[5]。この ERK の活性であるが、GnRH を直接培養ディッシュに添加した時の ERK の活性化は GnRH 刺激 5-10 分後をピークに 6 時間以上持続する。一方、還流装置を用いて GnRH をパルス状に添加した場合、30 分間隔の高頻度パルス刺激では ERK はパルス投与後 10 分をピークに活性化し、30 分後には

活性は消失している。一方 120 分間隔の低頻度パルス刺激の場合は 10 分後をピークに約 60 分かけてゆっくりと活性化は低下する (図 3)。阻害剤を投与してこのパターンを消失させるとパルス頻度依存性のサブユニット発現が消失する事から ERK の活性化パターンが特異性を決定している可能性がある[6, 7]。また ERK の活性化を不活性化する MAP kinase phosphatase は高頻度 GnRH 刺激時にものみ発現し[8]、cAMP 経路の活性化も高頻度刺激で有意に増加することが分かった[4]。細胞内情報伝達経路が活性化されるパターンが GnRH のパルスの頻度により異なり、このことが頻度依存性 LHβ、FSHβ 発現に関係している可能性がある。

5. ゴナドトロピン発現と PACAP

視床下部 GnRH が下垂体ゴナドトロピン合成・分泌に主要な役割を持つことは間違いない。しかし、GnRH 以外にもゴナドトロピンの制御を行うペプチドが存在する。Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) は 1989 年に下垂体細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化するペプチドホルモンとして分離同定された視床下部ホルモンであり、PACAP27 と PACAP38 の 2 つのフォームが存在する[9]。下垂体ゴナドトロピン産生細胞は PACAP の受容体である PACAP type I (PAC1) 受容体を持ち、PACAP の刺激により LHβ、FSHβ の両サブユニット発現は増加する[10]。興味深いことにゴナドトロピン産生細胞自体も PACAP を発現しており、しかもゴナドトロピン産生細胞における PACAP 発現、PAC1 受容体発現は GnRH の刺激により増加する[11]。

6. GnRH パルス頻度依存性ゴナドトロピン発現における PACAP 及び PAC1 受容体の役割

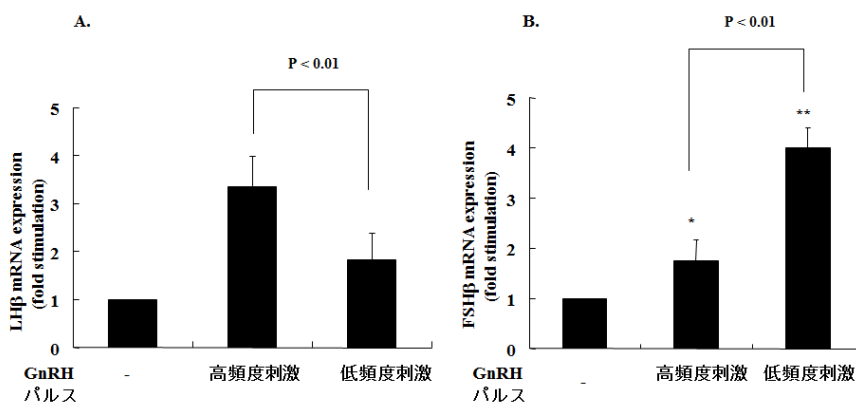


図 2 GnRH パルス頻度依存性ゴナドトロピンサブユニット発現

下垂体 LβT2 細胞において LHβ サブユニット (A) は高頻度 GnRH パルス刺激 (5 分間の GnRH を 30 分間隔で投与) でより優位に増加する。一方 FSHβ サブユニットは高頻度 GnRH パルス刺激よりも低頻度刺激 (5 分間の GnRH を 120 分間隔で投与) においてより優位に増加する。LHβ、FSHβ (A, B) ともにパルス頻度間に有意差あり。

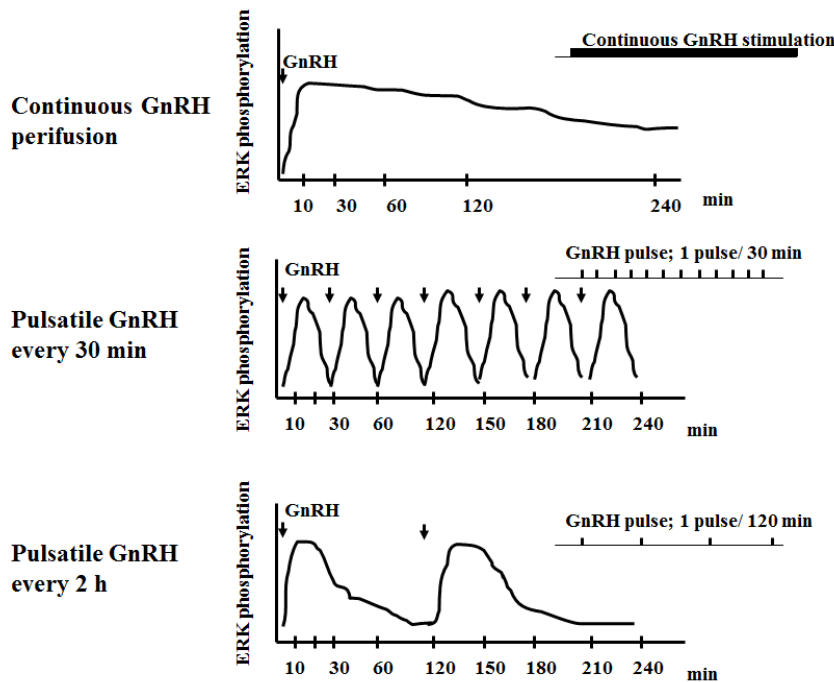


図3 GnRH 刺激様式の違いによる ERK 活性化パターンの変化

還流持続刺激では ERK の活性化は 6 時間以上持続する。30 分間隔の高頻度 GnRH パルス刺激ではパルス投与後 10 分をピークに、30 分後には活性化は消失する。2 時間間隔の低頻度刺激ではパルス投与後 10 分をピークとして 60 分以上活性化は持続する。両刺激とも次の GnRH パルスにより再び ERK 活性化がおこる。

下垂体ゴナドトロピン産生細胞の培養ディッシュに GnRH を添加すると、細胞内の PACAP 発現及びその受容体である PAC1 受容体は増加する。還流装置を用いて GnRH パルス刺激を行った場合、PACAP は高頻度 GnRH パルス刺激よりも低頻度 GnRH パルス刺激でより発現が増加する。PAC1 受容体も同様に低頻度 GnRH パルス刺激でより発現が増加する[12]。低頻度 GnRH パルス刺激では LH β サブユニットよりむしろ FSH β サブユニット発現が優位に促進されることから、PACAP とその受容体が FSH β 産生に関与している可能性がある。実際、GnRH 刺激により増加する FSH β サブユニット発現は PACAP のアンタゴニストでその増加が阻害される[12]。このことは GnRH 刺激によりゴナドトロピン産生細胞自身が合成・分泌させた PACAP が、GnRH により増加した細胞膜表面の PAC1 受容体に結合し、より FSH β を産生する能力を獲得している可能性を示している。興味深いことに PACAP 受容体の受容体の増加は GnRH によるゴナドトロピン発現能を増加させるが[13]、この現象と GnRH パルス頻度依存性ゴナドトロピン発現との関連は不明である。

7. その他、GnRH パルス頻度依存性変化

GnRH パルス刺激においては、そのパルス頻度の違いによりゴナドトロピンサブユニット発現に変化が生じる。低頻度パルス刺激においては PACAP 及び PAC1 受容体発現は高頻度に比べて有意に増加する。一方で、ゴナドトロピン産生細胞に存在する GnRH 受容体の数は PAC1 受容体と異なり高頻度 GnRH パルス刺激におい

て増加するとされる[14]。GnRH 受容体数の増加は LH β 発現能を高め、逆に FSH β 発現を抑制する方向に働くことが分かっている[15]。その他、GnRH のパルス刺激によるゴナドトロピン細胞内のフォリスタチン発現の変化は特質すべき事象と思われる。下垂体局所で産生されるアクチビンは FSH 産生に特異的な因子として知られているが[16]、フォリスタチンはアクチビンと結合してその作用を抑制し、アクチビンによる FSH 産生を阻害する[17]。ゴナドトロピン細胞内で産生されるフォリスタチンは高頻度 GnRH パルス刺激下のみで増加し、低頻度刺激では増加しない。高頻度 GnRH 刺激においては LH β サブユニット発現優位になるが、高頻度刺激でのみ増加するフォリスタチンが FSH β 産生に抑制的な作用をもたらしている可能性がある[4]。

8. まとめ

ひとつの細胞から合成分泌される 2 つのホルモン (LH、FSH) が、GnRH というひとつのホルモンによりどのように特異的に制御されるのか? GnRH はそのパルス分泌の頻度を変えることにより LH β 、FSH β 両サブユニットを特異的に制御する。そのメカニズムは依然不明であるが、GnRH パルスの頻度の違いにより細胞内情報伝達物質の活性化パターンは大きく異なる。また高頻度あるいは低頻度 GnRH パルスに暴露されることで、GnRH 受容体や PAC1 受容体の数、そして細胞自身が産生する PACAP やフォリスタチンなどの生理活性物質の量が変化するなど、ゴナドトロピン産生細胞にダイナミック

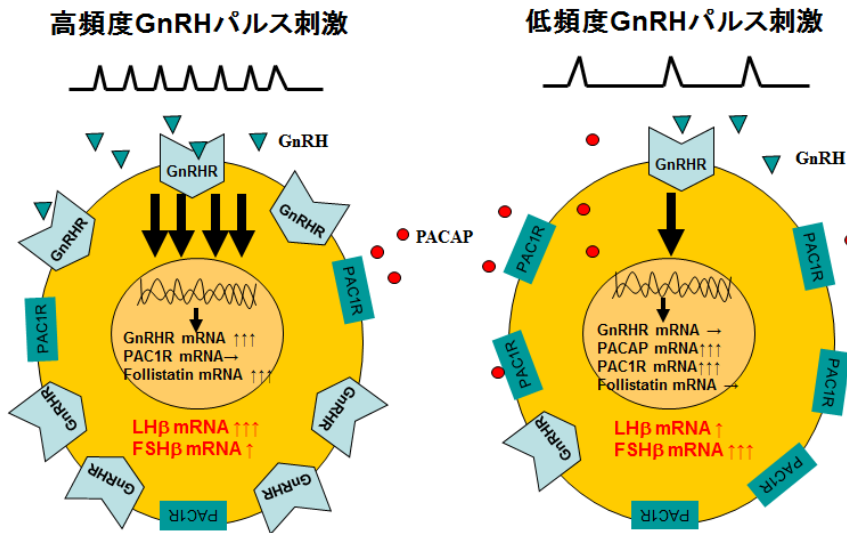


図 4 GnRH パルス刺激による細胞内変化

高頻度 GnRH パルス刺激により LHβ サブユニット発現は増加する。この時、細胞内 GnRH 受容体 (GnRHR) は増加し、フォリスタチン発現も増加する。一方 FSHβ サブユニットを有意に増加させる低頻度 GnRH パルス刺激においては、細胞内 GnRHR は増加せず、PACAP 及び PAC1 受容体 (PAC1R) 数が増加し、フォリスタチンの増加はない。

な変化が生じていることが分かる (図 4)。GnRH による LH, FSH 制御機構の詳細を知るとは、LH, FSH を個別に制御する可能性を秘める。有効な排卵誘発法や新たな避妊法の開発や、中枢性の生殖機能障害の病態を解明する手掛かりが得られるかもしれない。

文献

1. Belchetz, P.E., et al., Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 1978. 202(4368): p. 631-3.
2. Wildt, L., et al., Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 1981. 109(2): p. 376-85.
3. Crowley, W.F., Jr., et al., The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent Prog Horm Res*, 1985. 41: p. 473-531.
4. Mutiara, S., et al., Follistatin gene expression by gonadotropin-releasing hormone: a role for cyclic AMP and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in clonal gonadotroph LbetaT2 cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. 307(1-2): p. 125-32.
5. Purwana, I.N., et al., Induction of dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the role for gonadotropin subunit gene expression in mouse pituitary gonadotroph L beta T2 cells. *Biol Reprod*, 2010. 82(2): p. 352-62.
6. Kanasaki, H., et al., Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase pathways in perfused LbetaT2 cells. *Endocrinology*, 2005. 146(12): p. 5503-13.
7. Kanasaki, H., et al., Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Activation and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 Induction by Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone in Pituitary Gonadotrophs. *J Signal Transduct*, 2012. 2012: p. 198527.
8. Purwana, I.N., et al., Induction of dual-specificity phosphatase 1 (DUSP1) by pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulation: role for gonadotropin subunit expression in mouse pituitary LbetaT2 cells. *Biol Reprod*, 2011. 84(5): p. 996-1004.
9. Miyata, A., et al., Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. 164(1): p. 567-74.
10. Harada, T., et al., Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/protein kinase A and mitogen-activated protein kinase 3/1 pathways are involved in adenylate cyclase-activating polypeptide 1-induced common

- alpha-glycoprotein subunit gene (Cga) expression in mouse pituitary gonadotroph LbetaT2 cells. *Biol Reprod*, 2007. 77(4): p. 707-16.
11. Purwana, I.N., et al., GnRH-induced PACAP and PAC1 receptor expression in pituitary gonadotrophs: a possible role in the regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Peptides*, 2010. 31(9): p. 1748-55.
 12. Kanasaki, H., et al., Possible involvement of PACAP and PACAP type 1 receptor in GnRH-induced FSH beta-subunit gene expression. *Regul Pept*, 2011. 167(2-3): p. 227-32.
 13. Purwana, I.N., et al., Expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) potentiates the effects of GnRH on gonadotropin subunit gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 410(2): p. 295-300.
 14. Bedecarrats, G.Y. and U.B. Kaiser, Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology*, 2003. 144(5): p. 1802-11.
 15. Kaiser, U.B., et al., A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(26): p. 12280-4.
 16. Carroll, R.S., et al., In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology*, 1991. 129(6): p. 3299-304.
 17. Shimonaka, M., et al., Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. *Endocrinology*, 1991. 128(6): p. 3313-5.

短報-1

雄ラットの床敷曝露による雌ラット前腹側室周囲核キスペプチンニューロンの活性化および LH 分泌の増強作用

名古屋大学大学院生命農学研究科 生命技術科学専攻 生殖科学研究分野
渡辺 雄貴
watanabe.yuki@c.mbox.nagoya-u.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.3, 6, 2016)

哺乳類の繁殖機能において、嗅覚刺激は重要な役割を担っている。その例としては、雄マウス由来のフェロモンによって雌マウスの発情が誘発される Whitten 効果 (1) や、雄ヤギによって非繁殖期にある雌ヤギの発情が誘起される雄効果フェロモン (2,3) などがあげられる。このように、雄由来の嗅覚刺激が雌の繁殖機能を調節することが実験動物や家畜において報告されているが、嗅覚刺激がどのようなメカニズムにより、視床下部の生殖中枢に作用するかの詳細は、未だ不明な点が多い。

Kiss1 遺伝子にコードされるキスペプチンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) と、その支配下にある性腺刺激ホルモン分泌を強力に促す神経ペプチドである (4)。これまでの知見から、視床下部前部 (視索前野/前腹側室周囲核) に局在するキスペプチンニューロンは、種を超えて、エストロジェンの正のフィードバックの作用部位であり、排卵を促す GnRH/黄体形成ホルモン (LH) サーージ中枢であると考えられている (5-9)。

本研究では、嗅覚刺激が繁殖機能に及ぼす影響を明らかにするために、雄ラット由来の嗅覚刺激が雌ラットのキスペプチンニューロンの活動および LH 分泌に及ぼす影響を検討した。その結果、雄由来の嗅覚刺激が、雌の前腹側室周囲核に局在するキスペプチンニューロンを活性化することが明らかとなった。続いて、LH 分泌に対する嗅覚刺激の効果を検証したところ、雄由来の嗅覚刺激がピーク値の高い明瞭な LH サーージを誘起した。キスペプチンの強い LH 分泌促進作用と考え合わせると、雄由来の嗅覚刺激が、雌の前腹側室周囲核のキスペプチンニューロンの活動を促進し、LH サーージを増強することが明らかとなった。

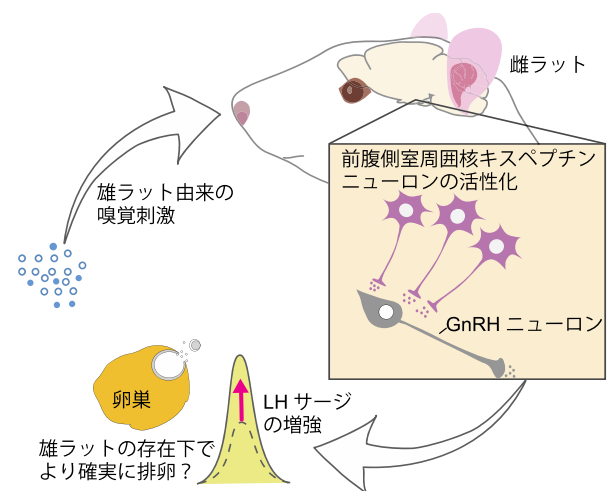
本研究の成果により、雌の前腹側室周囲核に局在するキスペプチンニューロンが雄個体からの嗅覚刺激の情報を仲介し活性化することで、

単独で飼育されている条件よりも確実に排卵に結びつけるメカニズムの存在が示唆された。

※本報は第 30 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。

【引用文献】

1. Whitten *et al.*, (1956) *J Endocrinol*
2. Murata *et al.*, (2011) *J Reprod Dev*
3. Murata *et al.*, (2014) *Curr Bior*
4. Matsui *et al.*, (2004) *Biochem Biophys Res Commun*
5. Smith *et al.*, (2005) *Endocrinology*
6. Adachi *et al.*, (2007) *J Reprod Dev*
7. Inoue *et al.*, (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A*
8. Watanabe *et al.*, (2014) *J Neuroendocrinol*
9. Matsuda *et al.*, (2015) *J Neuroendocrinol*



短報-2

キンギョにおける組換えソマトラクチンの黒色素胞に及ぼす影響

富山大学理学部生物学科
南 和希
s1240333@ems.u-toyama.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.3, 7-8, 2016)

動物にとって、環境に応じて体色を変化させることは生存するために重要である。多くの真骨魚類は、鱗などの体表に存在する色素細胞(色素胞)内の色素顆粒を凝集または拡散させることで体色を変化させる。ソマトラクチン(SL)は1991年にタイセイヨウタラ(*Gadus morhua*)の下垂体より単離・同定された成長ホルモン/プロラクチンファミリーに属する魚類特有の下垂体中葉ホルモンである。SLの生理機能として、成長や脂質代謝、体色などの調節を行うことが示唆されている。ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)を用いた解析により、コイ科魚類におけるSLは2分子種(SL- α およびSL- β)存在することが報告された。一方、メダカ(*Oryzias latipes*)やフグ(*Takifugu rubripes*)のゲノム上にSL- β 遺伝子を見出せないことから、SL- β 遺伝子を欠失した魚種も存在しており、SL- α とSL- β の生理作用上の異同が示唆される。我々は、黒背景色で飼育したキンギョ(*Carassius auratus*)においてSL- α mRNA発現量が増加し、白背景色で飼育したキンギョにおいてはSL- β mRNA発現量が増加することを明らかにした。さらに、SL- α の合成および分泌は白背景色において抑制され、SL- β の合成および分泌は白背景色において促進されることを見出した。これらのことから、SL- α およびSL- β はキンギョの体色調節に関与するホルモンであることが示唆された。そこで、本研究では観察が容易な黒色素胞を有するキンギョ(デメキン)を用いて、鱗へSL- α およびSL- β の遺伝子組換えタンパク質を添加することにより、SL- α とSL- β が体色調節を担うホルモンであるか否かについて探ることを目的とした。

バキュロウイルス-カイコ発現系により組換えキンギョSL- α およびSL- β を作製した。精製した組換えキンギョSL- α およびSL- β 生化学的特徴をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法およびウエスタンブロット解析により探った。その結果、組換えSL- α は、約31.1 kDaにおいて免疫陽性バンドが検出された。組換えSL- β

は、約54.1 kDaと26.6 kDa、24.3 kDaにおいて免疫陽性バンドが検出された。これらの免疫陽性バンドは下垂体抽出物より得られる免疫陽性バンドと類似しており、FLAGオクタペプチド断片(DYKDDDK配列タグ)の付加分だけ分子量が増加していた。

体色調節に及ぼすSL- α およびSL- β の作用を明らかにするため、作製した組換えSL- α およびSL- β を黒色素顆粒の拡散した鱗と凝集した鱗に添加した。色素顆粒が凝集した鱗への添加による色素顆粒の拡散と、色素顆粒が拡散した鱗への添加による色素顆粒の凝集をそれぞれ調べた。SL- α の添加により色素顆粒の拡散は有意に増加した(図1)。一方、SL- β の添加により

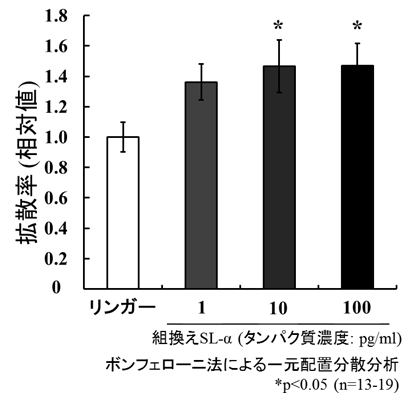


図1 黒色素胞に及ぼす組換えSL- α の影響

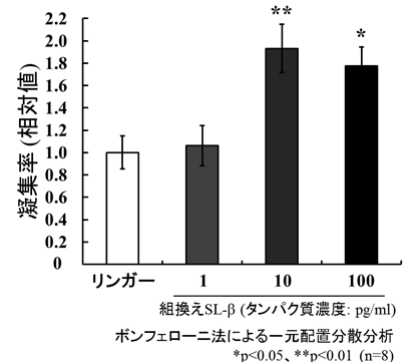


図2 黒色素胞に及ぼす組換えSL- β の影響

色素顆粒の凝集は有意に増加した（図2）。

本研究により、組換え SL- α の添加により黒色素胞の色素顆粒が拡散し、一方、組換え SL- β の添加により黒色素胞の色素細胞が凝集することが明らかとなった。これらの結果より、キンギョにおいて、SL- α は暗化に、SL- β は明化に関与するホルモンであることが強く示唆された。

※本報は第 30 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。

短報-3

Gene expression analysis of folliculostellate cells in 'transitional zone' of anterior pituitary gland of rat - special relevance to circadian rhythm -

Division of Histology and Cell Biology, Department of Anatomy, Jichi Medical University School of Medicine
Rita Maliza
d1310@jichi.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.3, 8-9, 2016)

Hormone secretion from the anterior pituitary gland is primarily regulated by hypothalamic hormones via hypothalamic-hypophyseal portal system and by feedback regulation system from peripheral endocrine tissues. In addition to these regulations, Soji's group has proposed the folliculostellate (FS) cell network deeply participated in the regulation of the anterior pituitary gland (1). FS cells are distributed from pars tuberalis to pars distalis, and especially at higher density in "transitional zone" at which the pituitary tissue made the transition from the pars tuberalis to the proximal part of the anterior lobe (2). Moreover, their group also found that LHRH induces intracellular Ca^{2+} concentration in FS cells of transitional zone. Interestingly, there is a difference in the LHRH-response of FS cells between tissues sampled in the morning and afternoon, suggesting that the network of FS cells may participate in a circadian control of the organ (3). However, molecular mechanism underlying the different LHRH response is unknown. Purpose of this study is to analyze the gene expression in FS cells and to evaluate its relation with circadian rhythm. We performed DNA microarray for analyzing the gene expression pattern in the in the transitional zone by selecting the tissues sample from Wistar rats in the morning (AM group) and afternoon (PM group). We successfully identified 28 down-regulation genes and 30 up-

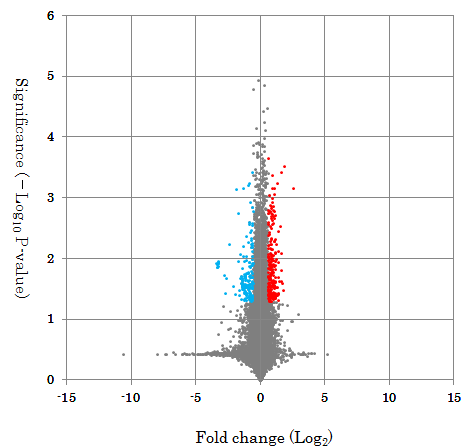


Fig. 1 Analysis of gene expression levels.

Volcano plot of microarray data analyzed using Agilent technology. The fold changes between the two groups compared (AM vs PM) are represented on the x-axis and the log P-value on the y-axis. In the plot, each gene is represented by a point. The blue and red dots show the down- and up-regulation genes that show more than 1.5-fold changes with statistically significance (t-test, $p < 0.05$). This data represents result from three different experiments.

regulation genes in PM group (Fig. 1). Next, in order to analyze gene expression in FS cells, we used S100b-transgenic rats. In the anterior pituitary gland of this transgenic rat, only FS cells express GFP. FS cells were purified by fluorescence activated cell sorting and we compared the gene expression between FS cells and other anterior pituitary cells by DNA microarray. From this microarray and AM/PM group microarray, we selected 12 genes that were predominantly expressed in FS cells and also had different expression level between AM and PM group. Among these genes, 7 genes were increased and 5 genes were decreased in PM group. Next, we determined the localization of the cells expressing these genes in the transitional zone by means of histological techniques. Aquaporin 5 (Aqp5), which is a membrane water channel proteins, was identified as an up-regulated gene in PM group. Using in situ hybridization with antisense probe, Aqp5 mRNA was detected in the transitional zone. Aqp5 mRNA was also expressed in FS cells, which are determined by S100 protein immunohistochemistry (Fig. 2). Further studies are needed to clarify the role of these genes in circadian rhythm of LHRH-response in FS cells.

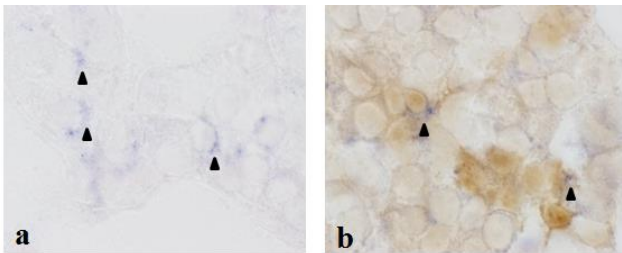


Fig. 2 Aquaporin 5 (Aqp5)-expressing cells in the transitional zone of anterior pituitary gland of rat.

a: Aqp5 mRNA was detected by in situ hybridization (blue). Aqp5-expressing cells were observed in the transitional zone (arrowheads). b: Aqp5 mRNA was detected by in situ hybridization (blue) and S100 protein was detected by immunohistochemistry (brown). Aqp5 mRNA was expressed in FS cells, which were identified by S-100 protein immunoreactivity (arrowheads).

References

1. Soji T, Herbert DC (1989) Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Anat Rec* 224:523-533.
2. Sato G, Shirasawa N, Sakuma E, Sato Y, Asai Y, et al (2005) Intercellular communications within the rat anterior pituitary XI: An immunohistochemical study of distributions of S-100 positive cells in the anterior pituitary of the rat. *Tissue and Cell* 37: 269-280.
3. Hattori K, Shirasawa N, Suzuki H, Otsuka T, Wada I, et al. (2013) Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. XV. Properties of Spontaneous and LHRH-Induced Ca^{2+} Transients in the transitional Zone of the Rat Anterior Pituitary *in Situ*. *Endocrinology* 154: 400-409.

※本報は第 30 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。

短報-4

成体下垂体前葉の幹・前駆細胞ニッチの単離とその解析

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

西村 直人

cf40417@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.3, 10, 2016)

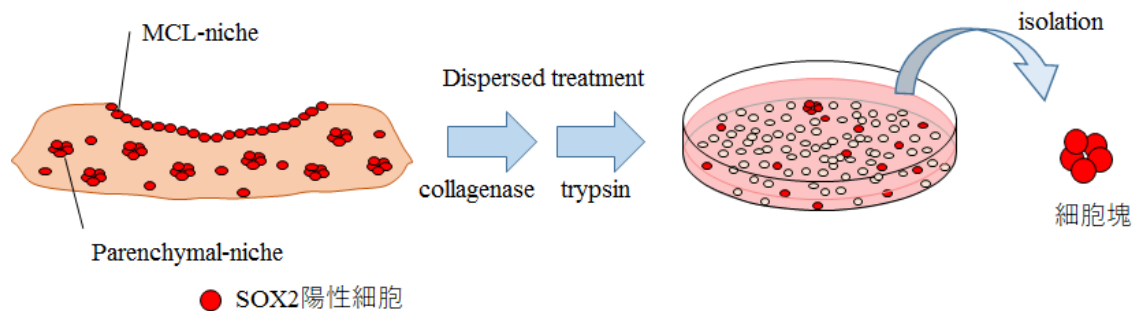
下垂体前葉に存在する 5 種類のホルモン産生細胞の数や質は、幹・前駆細胞によって恒常的に維持され、個体の生理状態の応じたホルモン産生細胞の供給機構が存在することが示唆されている。我々は、下垂体幹・前駆細胞において、*SI00β*、下垂体特異的転写因子 *Prop1*、paired-related homeobox 転写因子 *Prrx1* や *Prrx2* の発現を確認しており、下垂体幹・前駆細胞が、複数の population で構成されていることを報告している。一方で、近年、成体下垂体幹・前駆細胞が、MCL-niche と Parenchymal-niche の 2 様のニッチを形成していることが示されている。しかし、これらニッチ間の機能的な差異は、未だに明らかとされていない。その一因として、これらニッチの単離法が確立されていないことが挙げられる。そのため、我々は、2 様の下垂体幹・前駆細胞ニッチの機能的差異並びに、その制御機構に関する解析を目的として、幹・前駆細胞ニッチの単離を計画した。

我々は、幹・前駆細胞ニッチが細胞外マトリックスによって、その構造を強固に維持しているとの仮説のもと、タンパク質分解酵素を組み合わせることで作用させ、ニッチの単離を試みた。下垂体前葉をコラゲナーゼとトリプシンによる段階的な処理で細胞分散を行った結果、これらの処理によっても分散されない細胞塊の存在を確

認した。免疫染色による解析の結果、細胞塊は、SOX2 陽性細胞で構成されていた。このことから、細胞塊は幹細胞性を有した細胞集団であることが示唆された。さらに、下垂体幹・前駆細胞ニッチに局在する膜タンパク質 E-cadherin、CAR、ephrin-B2 も陽性であった。また、多くの細胞塊において、2 様のニッチのうち実質層ニッチに多く発現している PROPI が陽性であった。以上の結果より、細胞塊は、実質層ニッチであると結論した。

本研究では、段階的にタンパク質分解酵素を用いた分散処理による成体下垂体前葉実質層に存在する幹・前駆細胞ニッチ(細胞塊)の簡便な単離法を示した。今後、この細胞塊を用いることで、成体下垂体前葉における細胞供給機序、並びにニッチの制御機序の解明を行うことが可能であると期待できる。

※本報は第 30 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。



下垂体前葉分散細胞中に存在する細胞塊

短報-5

プロトン刺激によるマウス下垂体細胞株 LβT2 の応答解析

明治大学大学院農学研究科 生命科学専攻 細胞情報制御学研究室

持丸 雄太

mocchi@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.3, 11, 2016)

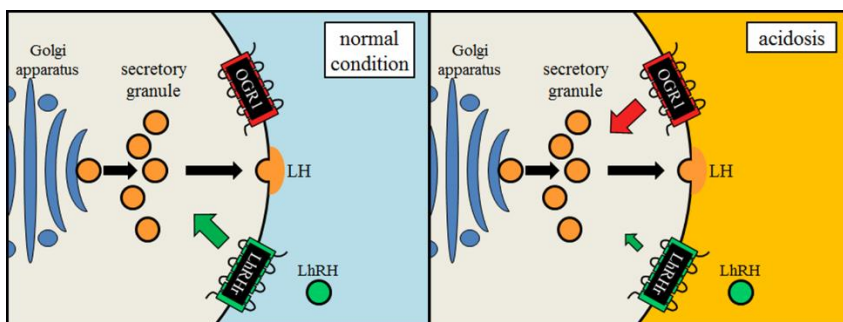
下垂体に存在する性腺刺激ホルモン産生細胞 (gonadotropes) は黄体形成ホルモン (LH) や卵胞刺激ホルモン (FSH) など、性腺刺激ホルモンを合成・分泌し生殖機能を制御している。また gonadotropes におけるこれらホルモンの合成・分泌は、視床下部ニューロンからの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (LhRH) により主に調節されている。一方、LhRH 以外にも下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP)、プロスタグランジン F2α やプロスタサイクリンなどが、オートクリン、パラクリンに gonadotropes に作用して LH、FSH の合成・分泌を調節していることが、近年明らかにされつつある。LhRH、PACAP、プロスタグランジン F2α やプロスタサイクリンは、すべて G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に作用する。そこで gonadotropes に発現している GPCR の種類を調べることにより、新たな gonadotropes 機能調節因子が明らかとなる可能性がある。今回我々は GPCR の一種である ovarian cancer G-protein coupled receptor 1 (OGR1) が、マウス下垂体 gonadotropes 由来の細胞株である LβT2 に発現していることを見出した。この受容体は細胞外プロトンにより活性化され、G_q/イノシトールリン酸系を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させる。一般にホルモンの分泌応答は細胞内カルシウム濃度の変化により調節をうけるので、OGR1 の活性化は gonadotropes におけるホルモン分泌応答に影響を与える可能性が考えられた。

この可能性を検証する第一歩として本研究で

私は、まず LβT2 に発現する OGR1 が機能しているのかどうかを調べた。細胞外 pH を低下させ LβT2 の細胞内カルシウム濃度の変化を測定すると、細胞外 pH の低下に伴い細胞内カルシウムの一過性の上昇が観察された。またこの細胞外 pH 低下に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇は、OGR1 に対するアンタゴニストである CuCl₂ により抑制された。すなわち細胞外 pH の低下は LβT2 の OGR1 を実際に活性化させることが明らかとなった。そこで LβT2 細胞の分泌応答への OGR1 の関与を調べた。Gaussia ルシフェラーゼや OGR1 過剰発現細胞を用いて LβT2 の分泌応答を測定したところ、細胞外 pH の低下時には LhRH による分泌応答が弱まり、OGR1 を介した分泌応答が強まる傾向が観察された。

シーハン症候群や下垂体腫瘍では下垂体組織の pH が恒常的に低下していることが予想される。このような病態時には LhRH 刺激によるホルモン分泌応答が減弱することが多い。上記の結果は、OGR1 活性化による LhRH 刺激の分泌応答の減弱と、pH が恒常的に低下することに起因する OGR1 自身の脱感作がその一因となる可能性を示唆している。この可能性を検証するために今後は、LhRH 受容体と OGR1 間の脱感作機構の解明と OGR1 の脱感作機構の解明が必要である。

※本報は第 30 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：LβT2 における OGR1 の分泌応答への関与

左図は通常時の LβT2 細胞における分泌応答、右図は細胞外 pH 低下時の分泌応答を表す。

短報-6

ガウシアルシフェラーゼの LβT2 細胞における
ホルモン分泌アッセイ系の構築への利用

明治大学大学院農学研究科 生命科学専攻 細胞情報制御学研究室
佐藤 一裕
cf40409@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.3, 12, 2016)

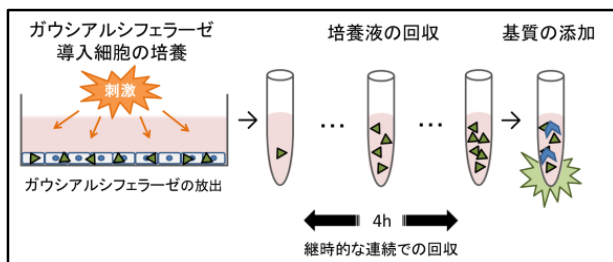
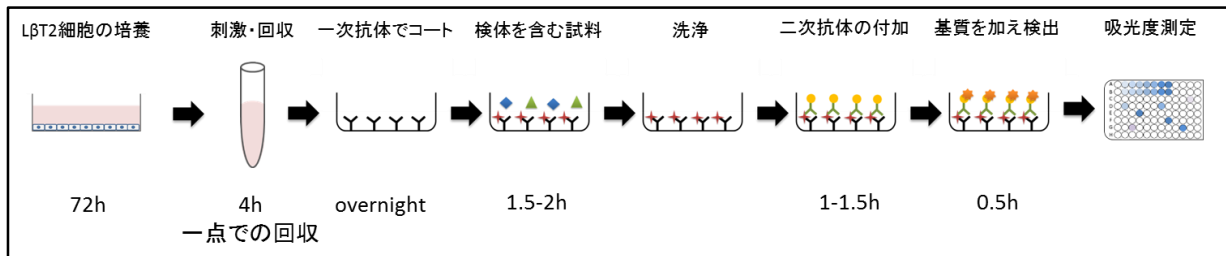
培養液中へのホルモン放出量を測定することは、ホルモン産生細胞を用いた実験において重要である。しかし、培養液中へのホルモン分泌量は微量であり、その測定のためには RIA や ELISA などが従来、用いられてきた。これらの免疫アッセイは検体に対する特異性、定量性が高いという利点を有しているが、その測定に多くのステップと時間を要する。そこで私たちは、これらの方法に加え培養液中のホルモン分泌を簡便且つ継時的に測定するアッセイ系があると便利であると考えた。今回私たちは、海洋性動物プランクトンの一種、Gaussia Princeps 由来のルシフェラーゼであるガウシアルシフェラーゼに注目した。ガウシアルシフェラーゼは 2002 年に報告されたカイアシ類由来としては初めてのルシフェラーゼであり、その分子量は約 20kDa とルシフェラーゼとしては極めて小さい。またガウシアルシフェラーゼの N 末端には 17 アミノ酸残基の分泌シグナル配列が存在し、細胞に発現させると培養液中へと分泌される特性を持っている。ガウシアルシフェラーゼを用いた実験の有用性を明らかにするため、ゴナドトロフ由来の細胞株である LβT2 を用いて、各種刺激時にメディウム中に放出されるガウシアル

シフェラーゼの活性測定を行った。

LhRH, KCl それぞれの刺激により、培養液の発光量がコントロールのものと比較して増加した。また LhRH アンタゴニストである Antide を作用させた場合では、LhRH 刺激による活性はコントロールと同程度まで抑制されたが、KCl 刺激による活性量の増加には変化が観察されなかった。さらに L 型カルシウムイオンチャネル拮抗薬である Nimodipine を作用させた場合は、KCl 刺激による活性がコントロールと同程度まで抑制されることを観察した。

本研究により、LβT2 においてガウシアルシフェラーゼの一部は、調節性分泌経路を介して細胞外に分泌されている可能性が示唆された。このことは、ガウシアルシフェラーゼを用いたアッセイが、ホルモン分泌の簡便な検出法として利用できる可能性を示している。

※本報は第 30 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。



図上段：LβT2 細胞における ELISA 法の模式図
図下段：ガウシアルシフェラーゼアッセイの模式図
ELISA 法では同一サンプルで一点の時間しかとれないのに対して、ガウシアルシフェラーゼアッセイでは継時的なサンプリングが可能である。

第 30 回学術集会報告

富山大学大学院理工学研究所
松田恒平
kmatsuda@sci.u-toyama.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.3, 13, 2016)

平成 27 年 8 月 5 日 (水) ~ 7 日 (金) にかけて富山県黒部市宇奈月温泉にて開催させていただきました 第 30 回学術集会を無事終えることができました。会期中の参加者数は 82 名で、学生数は 34 名でした。黒部峡谷の大自然に接しながら、日中の一般講演 26 演題、最優秀発表賞審査講演 6 演題、塩田清二先生と津田正明先生による特別・教育講演、上田陽一先生、興水崇鏡先生、今野紀文先生、山口陽子先生によるシンポジウム「下垂体後葉ホルモン研究の新展開」および金崎春彦先生による吉村賞受賞講演「ゴナドトロピンサブユニット遺伝子発現調節機構に関する研究」において、これまでのご研究の成果をご披露いただき、また、活発な質疑応答によって、発表者とフロアが一体となって熱く議論を交わっていたことが非常に印象的でした。さらに、これまでの学術集会に負けず劣らず、夜の部のファイルオンザデスクでは、学生・若手向けの企画も織り交ぜながら、教員と学生が文字通り膝を突き合わせ

ながら、下垂体研究に係る議論を通して将来への夢などを語り合っている姿に感動すら覚えました。本学術集会を支えていらっしゃる先生方より日本下垂体研究会の醍醐味を肌で感じることでできた集会であったとお褒めの言葉を頂戴することができたことに、私も主催者は安堵したところです。このような大盛会となったことに、ご参加された全ての方々にご支援いただいた全ての方々に心より感謝とお礼を申し上げます。どうもありがとうございました。一方で、至らぬ点が多々あったかと思いますが、どうかお許し下さい。

来年度の学術集会は第 31 回となり、30 年の節目を迎えます。記念すべき大会は、日本を飛び出してハワイにて和泉俊一郎先生のご主宰で開催されます。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。皆様とハワイでお会いできることを楽しみにしております。



写真 1 大会参加者一同 (懇親会)



写真 2 吉村賞受賞講演 (金崎春彦先生)



写真 3 最優秀発表受賞者



写真 4 エクスカーション (黒部峡谷めぐり)

編集後記

寒暖定まらぬ日々ですが、会員の皆様におかれましては忙しくも活気ある日々をお過ごしのことと存じます。私事ですが、暖かい日に舞い漂うスギの雄性配偶体（花粉）に悩まされる日々を過ごしております。下垂体研究のことを考えるだけで花粉症が改善したりしないのでしょうか。

さて、会員の皆様のご協力を賜り、日本下垂体研究会誌第 3 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（6 報）に加えて、昨年度開催された第 30 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。視床下部ホルモンの分泌リズムはその標的となる内分泌細胞からのホルモン分泌に直結します。金崎先生は GnRH 刺激のリズムの違いによりゴナドトロフの分泌する LH と FSH の発現に差異が生じることを証明されました。本号では、第 30 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 30 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。嗅覚情報と生殖内分泌、魚類特有の腺性下垂体ホルモンの機能解析、サーカディアンと前葉機能、下垂体前葉内幹細胞ニッチの単離法、pH 受容体とホルモン分泌、ホルモン分泌活性の新規測定法と様々な記事を掲載しております。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、本年の日本下垂体研究会の学術集会は日本を飛び出し、ハワイで開催されます。日本下垂体研究会 30 年の節目となる第 31 回学術集会を会員に皆様に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