



# 日本下垂体研究会誌

2020年3月31日 発行

## 本号の内容

1. 論文Ⅰ 「私達が観察した下垂体の S100 $\beta$  陽性細胞 - ほとんどは分化途上の細胞である -」  
加藤 幸雄・加藤 たか子 (明治大学)
2. 論文Ⅱ 「新規 GPCR を軸とした内分泌細胞制御機構の研究」  
戸村 秀明 (明治大学)
3. 短報 - 1 「ウナギにおける新規ナトリウム利尿ペプチドの発見と脳内発現領域」  
片山 侑駿 (東邦大学)
4. 短報 - 2 「マコガレイの摂食関連神経ペプチドと視覚オプシンの発現」  
佐藤 生 (北里大学)
5. 短報 - 3 「キンギョの摂食行動と情動行動に及ぼすアルギニンバソトシン (AVT) の脳室内投与の影響」  
渡邊 桂佑 (富山大学)
6. 短報 - 4 「食虫目スルクス下垂体隆起部における LH 産生細胞を中心とした構成細胞の形態学的研究」  
埜 堇 (埼玉大学)
7. 短報 - 5 「アクチビン及びインヒビンの視床下部キスペプチンニューロンに対する直接作用について」  
Tumurgan Zolzaya (島根大学)
8. 第 34 回学術集会報告 金崎 春彦 (島根大学)

## 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 I

私達が観察した下垂体の S100 $\beta$  陽性細胞-ほとんどは分化途上の細胞である-

明治大学内分泌研究所  
加藤 幸雄・加藤 たか子  
yukato@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.7, 1-12, 2020)

## 1. はじめに

本レターの創刊号に白澤信行先生が、「吉村不二夫先生から与えられた課題の幹細胞としての濾胞星細胞についての研究から遠ざかってしまったようです。S100 $\beta$ タンパク質陰性の胎生期から生後 1-2 週間の濾胞星細胞については手がつけられない状態です」と記し、「明治大学の加藤幸雄先生のグループは、下垂体細胞の発生・分化過程での各種遺伝子発現の系列と S100 $\beta$ の発現とを合わせて解析し、研究会で発表されています。S100 $\beta$ タンパク質陽性になる前の濾胞星細胞が幹細胞であるか否かについて、出来るだけ速く解決されることを期待しています。」と、お言葉を頂いている。

実は、S100 $\beta$ タンパク質 (S100 $\beta$ ) は、私達が 50 年も前に学生時代に出会った分子である。S100 $\beta$ は、下垂体ではまだ観察もされていない時期で、当時は「脳の神経細胞で記憶に関して働く分子」として注目されていた。飽和硫酸濃度(100%)でも沈殿しない (Soluble) ことから、この名前が付けられた酸性タンパク質である。S100 $\beta$ が本邦の下垂体研究に初めて登場するのは、群馬大学の中島孝先生らが、故植村慶一先生から供与された抗 S100 $\beta$ 抗体を使用した免疫組織化学の結果、陽性細胞が濾胞星状細胞 (濾胞星細胞に同じ) であるとした報告<sup>1)</sup>であり、ここから、下垂体での S100 $\beta$ 陽性細胞の研究が始まった。日本における S100 $\beta$ の研究は、そもそも、フランス留学を終えた植村先生 (当時は東邦大学医学部助教授、その後、埼玉医科大学、慶應義塾大学医学部で生理学の教授を歴任) が日本に持ち帰ったテーマで、この抗体は加藤たか子が東京都立大学在学中に S100 $\beta$ タンパク質を精製し、植村先生の指導のもとで作製したものです。私達の研究生活の最終的なテーマとなったのが「下垂体の幹細胞と S100 $\beta$ 陽性細胞」であり、実に、学生時代から 30 数年の時を経て S100 $\beta$ タンパク質に再会することとなったのです。私達の下垂体の幹・前駆細胞研究の中では、S100 $\beta$ 陽性細胞が重要な位置を占めており、濾胞星状細胞ではなく幹・前駆細胞の中でちゃんと位置づけるべきだと考えていましたが、残

念ながら未完結で終わってしまいました。本稿は、今なら整理できる事を書き残しておきたいと考え、執筆したものです。本文で述べるように、S100 $\beta$ 陽性細胞は多様な系譜を持つことが分かってきました。本稿を読んだ若手研究者が幹・前駆細胞という視点から、S100 $\beta$ 陽性細胞の解析に取り組んでいただけると、私達にとって望外の喜びです。

2. 下垂体の幹・前駆細胞と S100 $\beta$ 陽性細胞

## 2-1 下垂体の SOX2 陽性細胞と PROP1

SOX2 は幹細胞マーカーのひとつであり、下垂体においても細胞の未分化性の指標にもなっている<sup>2),3)</sup>。私達は、下垂体特異的転写因子 PROP1 をクローニングしたことを機に、自作した抗ラット PROP1 特異抗体を使ってラット下垂体の免疫染色を行った。その結果、PROP1 はラット胎齢 11.5 日 (E11.5) の陥入する口腔上皮で構成される下垂体原基に最初に出現していた。この時、下垂体原基の全ての細胞は SOX2 陽性であった。E13.5 では、隆起部の予定領域である Rostral Tip を除くほぼ全ての細胞が PROP1 と SOX2 の二重陽性となり、その後、PROP1 陽性細胞は下垂体の発達に伴い、前葉と中葉の間に存在するラトケ囊遺残腔に接する一層の細胞層 (MCL : Marginal Cell Layer) と、実質層に局在していた (図 1)<sup>4)</sup>。また、生後 600 日 (P600) でも PROP1 陽性細胞は前葉の実質層細胞の約 4% を占めており、常に SOX2 陽性であることも確認され、幹・前駆細胞性を維持していた<sup>5)</sup>。この PROP1 遺伝子については、Camper ら (ミシガン大学) が、*Prop1*-トランスジェニック (TG)-マウスを用いた Gene Tracing 実験により、遺伝子レベルで下垂体の前駆細胞で発現することを証明している<sup>6)</sup>。

前葉の MCL と実質層の SOX2 陽性細胞の関係について、次の様なことが判った。MCL の SOX2 陽性細胞は、その細胞膜の Apical 側に存在する Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) が Basolateral 側に移動し、いわゆる上皮間葉転換 (EMT: Epithelial-mesenchymal transition) 状態となり、実質層に移動し、細胞塊を形成す



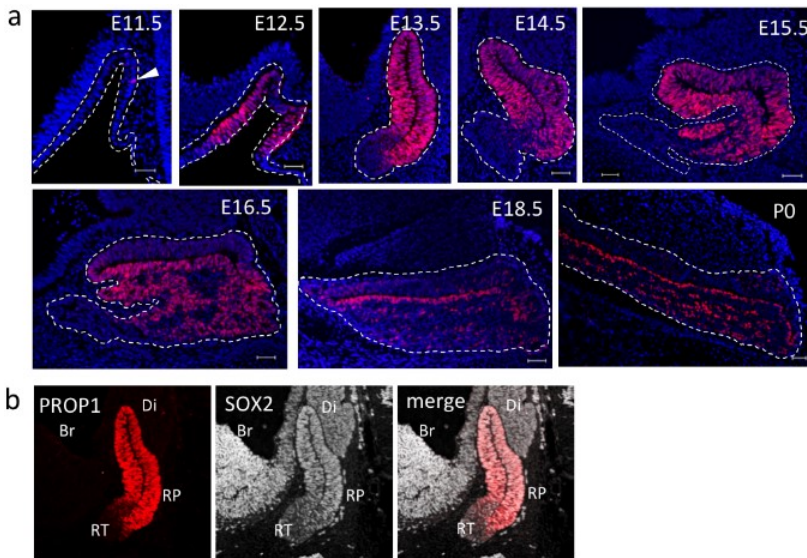


図 1. ラット下垂体の免疫染色像。PROP1 (赤) と SOX2 (白) を特異抗体で染色した。青は DAPI による核染色。a. 胎仔期 11.5 日 (E11.5) から出生 (P0) までの染色像で、PROP1 は E11.5 の下垂体原基に出現し(矢頭)、P0 では PROP1 陽性細胞は主として前葉に観察された。b. E13.5 では、ラトケ嚢(RP)を構成する細胞のみが PROP1 陽性で、ほぼ全てが SOX2 と二重陽性であり、Rostral Tip(RT)、脳(Br)、間脳(Di)では陰性であることが判る。文献<sup>4)</sup>を参照。

る<sup>7)</sup>。さらに、膜上の ephrin B2 とその受容体が EMT 期の細胞移動に関わると思われる染色像を得ている<sup>8), 9)</sup>。これらの膜分子は、実質層の強固な幹・前駆細胞塊の形成にも関与していると考えている(Yoshida ら; 未発表)。

## 2-2. 胎仔期下垂体の S100β 陽性細胞

埼玉大学の井上金治先生のグループは、S100β-TG ラット (S100β のプロモーターの下流に、蛍光タンパク質 GFP の遺伝子を連結したキメラ遺伝子を導入した TG-ラット) を作製した<sup>10)</sup>。この S100β-TG ラットの登場は、下垂体の幹・前駆細胞研究に新たな展開をもたらした。S100β-TG ラットの胎仔期下垂体の解析では、E14.5 までは全ての細胞は S100β 陰性であった。その後、E15.5 の血管形成期に Atwell's recess から S100β 陽性細胞が侵入する組織像が観察された。これらは SOX2 陰性であるが、一部は各種のマーカー、p75 (神経堤細胞)、NESTIN (分裂期の前駆細胞の中間径フィラメント)、DESMIN (骨格筋や心筋の中間径フィラメント)、Isolectin B4 (血管内皮細胞)、VIMENTIN (非上皮系、特に間葉系細胞の中間径フィラメント) に陽性であった (図 2)。その後、E17.5 には Atwell's recess は閉じられるが、E19.5 には SOX2/S100β 二重陽性細胞が後葉と中葉の境界領域から侵入し、やがて中葉の MCL に移動する像が観察されている<sup>11)</sup>。

E15.5 に侵入する S100β 陽性細胞は、血管形成などに、E19.5 の S100β/SOX2 二重陽性細胞は、さらに前葉へも移動して、出生後の下垂体の組織構築に関わるのだろう。SOX2 陰性の S100β 陽性細胞の中に、分化能を維持した細胞として下垂体に定着するものがあるかは判らない。

## 2-3. 出生前後の下垂体の S100β 陽性細胞

下垂体の起源は口腔外胚葉とされるが、以前から、発生過程で起源を異にする細胞が存在するとの報告がある<sup>12), 13)</sup>。また、E15.5 に侵入する細胞の中に、神経堤細胞マーカーである p75 に陽性の細胞が観察されたことから、他の神経堤細胞マーカーである SOX10 の抗体を使って S100β-TG ラットを調べてみた<sup>14)</sup>。その結果、SOX2/SOX10 二重陽性細胞が出生直前に下垂体茎から後葉に侵入する像が観察された。その後の経過を調べると、その細胞が S100β 陽性になる事が確認され (SOX2/SOX10/S100β 陽性細胞)、これらは p75 にも陽性であることから、神経堤由来の細胞と考えられる (図 3)。この細胞の一部は後葉と中葉の境界領域から中葉の小葉構造の間隙を通過し、中葉の MCL に辿り着く。P3 では中葉の MCL に S100β 陽性細胞が局在するようになる。さらに、中葉から前葉へと移行する過程で PROP1 を発現し、下垂体の前駆細胞の性質を示すものもあった。生後における下垂体実質層の細胞供給の一部を担っていると考えられる。この結果は胎仔期後期のラット下垂体に神経堤由来の細胞が侵入し、幹・前駆細胞の一部として定着していることを示唆している。

ところで、神経堤由来細胞の遊走は、第一群と第二群に大別され、前者は Early migratory population (P0/SOX10 二重陽性細胞) と呼ばれ、腹側領域を遊走し、後者は Late migratory population (P0 陰性/SOX10 陽性細胞) と呼ばれ、背側領域を遊走する<sup>15)</sup>。最近、私達は、P0-Cre/EGFP-TG マウスを用いて Gene Tracing 実験を試みた。その結果、下垂体原基の形成の開始期に、P0 系譜の細胞 (Early migratory population) が陥入する口腔上皮に侵入し (第一波)、ラト

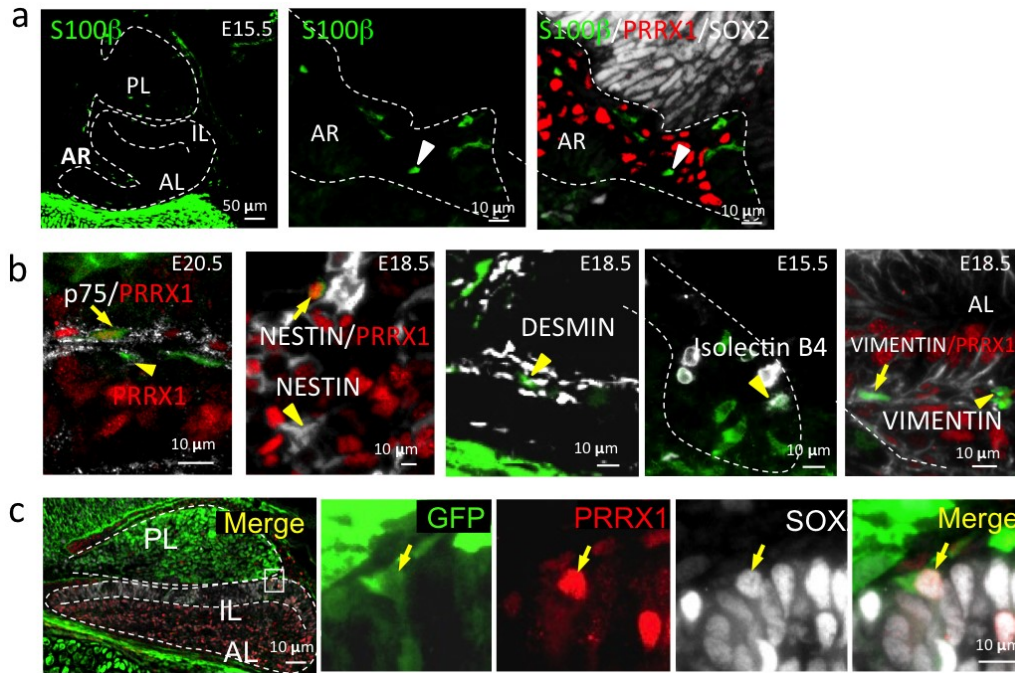


図2. 非下垂体由来の S100β陽性細胞群の下垂体への侵入。胎仔期の S100β-TG ラット下垂体 (AL, IL, PL は、前葉、中葉、後葉の略で、点線で境界を示した) を使って、胎仔期 15 日頃からの血管形成に伴い、Atwell's recess (AR) から侵入する S100β陽性細胞 (緑) を観察した。a. E15.5 では、侵入する S100β陽性細胞は、右の拡大図に示すように PRRX1 (赤、間葉系マーカー) 陰性、SOX2 (白) 陰性である (白の矢頭)。b. その後、様々なマーカー分子 (PRRX1 は赤で、p75、NESTIN、DESMIN、Isolectin B4、VIMENTIN はいずれも白で示した) で免疫染色を行うと、S100βとの二重陽性 (黄色の矢頭) や三重陽性 (黄矢印) が観察された。c. E19.5 の染色像。左図の枠内を拡大した右の 4 つの図では、S100β/PRRX1/SOX2 三重陽性細胞 (黄矢印) が後葉と中葉の境界領域から侵入していることが判る。文献<sup>11)</sup>を参照。

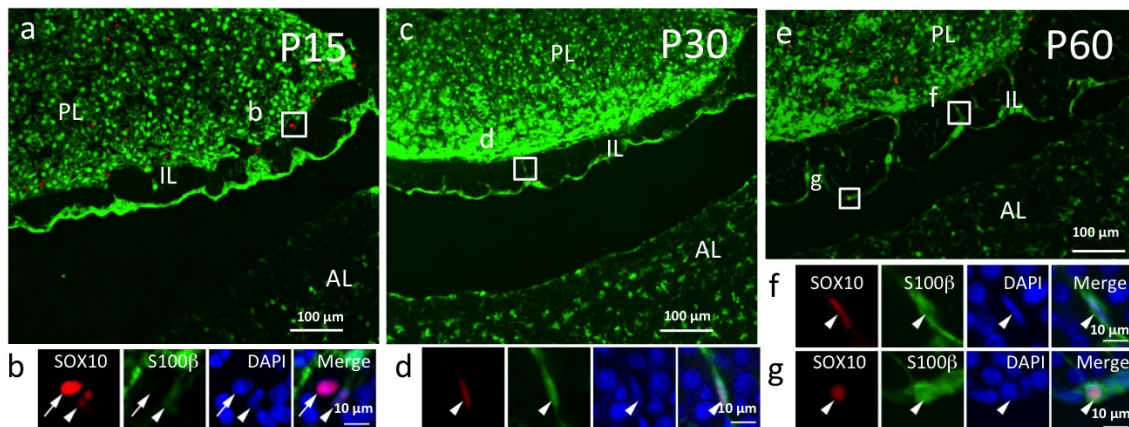


図3. 出生直前にラット下垂体後葉に侵入する SOX10 陽性細胞の前葉への移動。SOX10 陽性 (赤、SOX2 陽性でもある) は後葉に侵入し (a, b)、S100β (緑) を発現しながら細長い形状になって中葉の小葉間の間隙をすり抜け (c, d)、さらに中葉の MCL へと移行する像 (e, f, g) が確認される。矢印は SOX10 単独陽性細胞、矢頭は S100β/SOX10 二重陽性細胞。a, c, e の枠内を拡大した像を、それぞれの下段に示した。解析には S100β-TG ラットを用いた。略号は図2に同じ。文献<sup>14)</sup>の図を参照。

ケ嚢内に SOX2/PROP1 二重陽性細胞として定着すること、その後、SOX2 陰性の P0 系譜の神経堤由来の細胞として Atwell's recess から侵入すること (第二波) を報告している<sup>16)</sup>。第一波の

神経堤由来細胞は、生後の前葉の SOX2 陽性細胞の 5%を占め、さらに全ホルモン産生細胞種へと分化し、それぞれの 5.7-13.2%を占めていた。予備的実験では、二波にわたり侵入する



P0 系譜の神経堤由来細胞のほとんどは S100β 陰性である（未発表）。従って、後葉から侵入する SOX10 系譜(Late migratory population)に由来する細胞とは異なる運命をたどると考えられる。

#### 2-4. 成熟期下垂体の S100β 陽性細胞

出生後の S100β 陽性細胞の解析として、P60 の S100β-TG ラットのオス下垂体を用い、PROP1、SOX2、S100β の抗体による三重免疫染色を行い、前葉におけるそれぞれの陽性細胞数を計測した<sup>5)</sup>。その結果、SOX2 陽性細胞は、MCL と実質層に確認された。一方、S100β 陽性反応は、それぞれの SOX2 陽性細胞の過半数に観察されると共に、SOX2 陰性の細胞にも観察された（図 4）。MCL では、SOX2 陽性細胞の中で、1) SOX2 単独陽性（PROP1/S100β 陰性）は約 34%、2) PROP1 との二重陽性が 1.5%、3) S100β/PROP1

との三重陽性が約 13%、4) S100β との二重陽性が約 51%であった。一方、前葉実質層では、それぞれ、1) 約 8%、2) 10%、3) 69%、4) 14%であった。S100β 陽性細胞から見ると、S100β 単独陽性の細胞（SOX2/PROP1 陰性で、図 4 では Type 5 の細胞）は、MCL で 14%、実質層で 15%であり、残りの約 85%の S100β 陽性細胞が SOX2 陽性であった。以上の結果から、S100β 陽性細胞は胎仔期中期の血管形成期に、SOX2 陰性細胞として侵入するが、成熟期の下垂体では大多数の S100β 陽性細胞は SOX2 陽性であり、幹・前駆細胞性を維持した「分化途上の状態」であると考えられた。

しかし、胎仔期からの SOX2 陽性/S100β 陰性細胞の多様な細胞種への分化系路や相互関係、さらに外部から侵入する SOX2 陰性/S100β 陽性細胞や SOX2/S100β 二重陽性細胞がどのような分

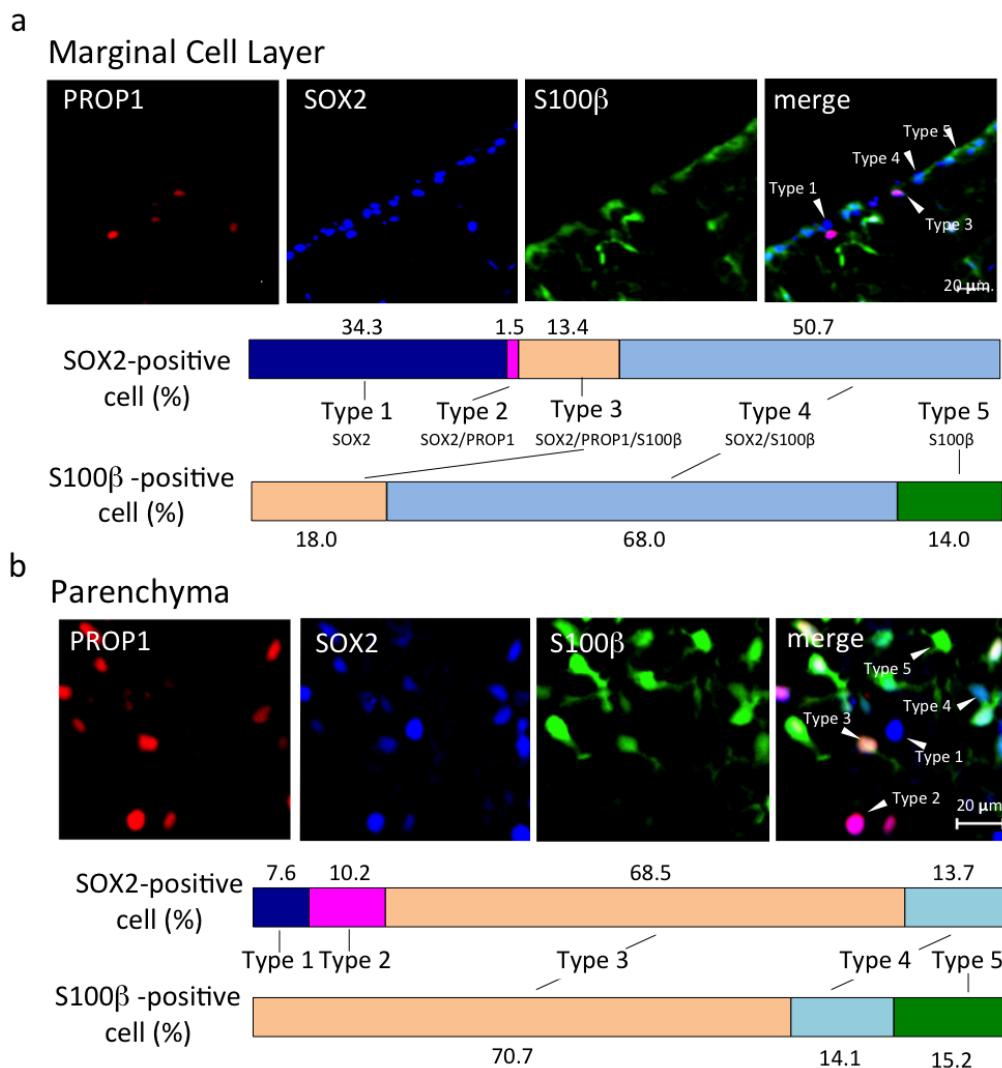


図 4. 生後 60 日齢のオス S100β-TG ラット下垂体の免疫組織化学。PROP1（赤）、SOX2（青）、S100β（GFP, 緑）に対する抗体の免疫染色像を示した。a. Marginal cell layer, b. Parenchyma, それぞれに陽性の 5 種の細胞（Type 1-5）が観察された。SOX2 陽性および S100β 陽性細胞群における、Type 1-5 の割合（%）を、組織像の下に示した。文献<sup>5)</sup>の図表を参照。

化経路をたどり、どの様に下垂体形成に関わるのかは明確に検証できておらず、今後の研究で明らかにされることを期待している。

## 2-5. 成熟期下垂体の S100β陽性細胞の分化能

S100β-TG ラットを用いることで、S100β陽性細胞のライブ観察や GFP の蛍光を指標としたセルソーターによる S100β陽性細胞の分画が可能となり、その分化過程での変化を追跡する研究結果が相次いで報告されている。

井上らは、作製した S100β-TG ラットを用い、S100β陽性細胞が骨格筋細胞への分化能を有することを報告している<sup>17)</sup>。また、自治医科大学の堀口らは、下垂体組織の酵素分散液から S100β陽性細胞群を分画し、さらに、ラミニンコート処理した培養ディッシュへの接着性の違いを利用して、2 種の異なる S100β陽性細胞画分を分離している<sup>18)</sup>。杏林大学に異動した堀口は、私達（明治大学）や自治医科大学のグループと引き続き共同研究をすすめる、分画した S100β陽性細胞群を用いて、細胞の多様性や、前駆細胞性を調べているが<sup>19), 20), 21), 22)</sup>、最近、CD9/SOX2/S100β陽性細胞の一部が内皮細胞に分化することを報告している<sup>23)</sup>。

私達の研究室の樋口（現、鳥取大学）は、下垂体の初代培養細胞実験で S100β陽性細胞の一部が各種のホルモン産生細胞に分化する事を報告している<sup>24)</sup>。また、吉田（現、慈恵会医科大学）は、MCLの幹・前駆細胞群とは別に、強い酵素処理でも分散しない強固な細胞塊構造をもち、実質層の SOX2 陽性細胞で構成されている幹・前駆細胞塊 (Parenchymal stem/progenitor cell cluster; PS-cluster) を単離した（図 5）<sup>25)</sup>。前葉実質層の 1% 弱を占め PS-cluster の細胞は、全てが S100β陽性のもの（Type A）、S100β陽性と陰性の混在したもの（Type B）、全てが S100β陰性のもの（Type C）の 3 種からなり（図 5 a）、三次元分化誘導条件下で Type A と Type C を培養すると、前者はホルモン産生細胞への分化能を持つことが確認されたが、後者は現時点でこの同条件では分化せず、分化抵抗性を示した（図 5 b）<sup>25)</sup>。また、二次元分化誘導条件では、Type A の中には、非ホルモン産生細胞のマーカーである MYOGENIN (骨格筋細胞),  $\alpha$  SMA (平滑筋細胞), NG2 (ペリサイト), そして SOX17 (内胚葉系細胞、未表示) などに陽性を示す細胞が確認された（図 5 c）<sup>26)</sup>。以上の事から、実質層の細胞塊には、高い未分化性を示す Cluster (Type C, S100β陰性) と共に、分化しやすい状態にある Cluster (Type A, S100β陽性) が混在していると考えられる。後述するが、この PS-

cluster が、かつて慈恵会医科大学の吉村不二夫先生達によって報告された MCL から実質層に移動し、分化能を持つ、強固な細胞集団を形成する 'follicular cells' ではないだろうか。

## 3. 下垂体系譜の S100β陽性株化細胞

ところで、下垂体系譜の株化細胞として、埼玉大学の井上らのグループがマウス下垂体から作製した Tpit/E、Tpit/F1、TtT/GF がある。いずれも S100βを発現しているが<sup>27), 28)</sup>、中でも TtT/GF や Tpit/F1 は、濾胞星状細胞様の性質を示すとされ、どの様な Subpopulation かは分からないが、多くの研究者から「濾胞星状細胞の

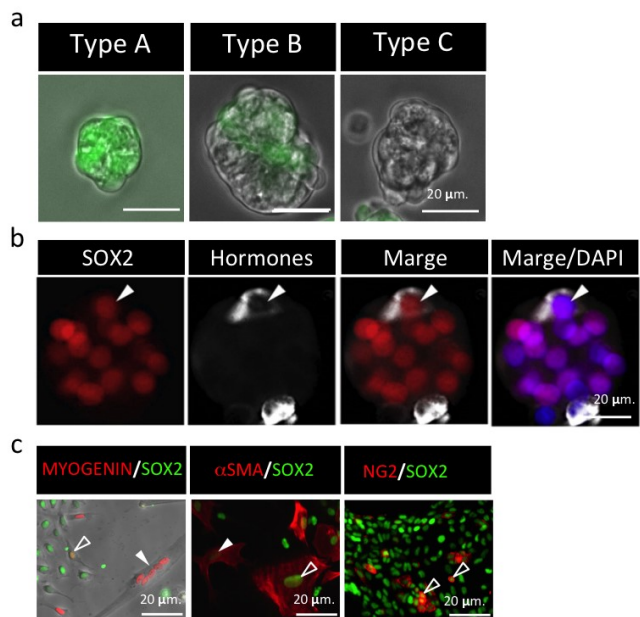


図5. 下垂体前葉の酵素処理分散液から得た幹・前駆細胞塊。生後 60 日齢のオス S100β-TG ラット下垂体前葉を高濃度酵素処理で分散した液から、幹・前駆細胞塊 (PS-cluster) を分離した。a. 前葉細胞の 1% 弱を占める PS-cluster は全てが SOX2 陽性であり、S100β陽性細胞（緑、実際には S100βプロモーター下で発現する GFP に対する抗体で染色）の有無により、Type A（全て S100β陽性のもの）、Type B（S100β陽性と陰性の混在したもの）、Type C（全て S100β陰性のもの）の 3 種が存在した。b. Type A と Type C (未表示) を三次元分化誘導条件下で培養すると、前者がホルモン産生細胞への分化能を持つことが確認された。SOX2 陽性（赤）、ホルモン陽性（白）。c. Type A を二次元分化誘導条件下で培養すると、赤で示す MYOGENIN,  $\alpha$  SMA, NG2, そして、SOX17 (未表示) などに陽性を示す細胞（単独陽性は白矢頭、緑で示す SOX2 との二重陽性は白枠矢頭）が確認された。文献<sup>25), 26)</sup>の図を参照。

表 1. マウス下垂体から樹立された濾胞星状細胞系譜とされている細胞株における *Sox2* と *S100β* の発現。細胞株 Tpit/E、Tpit/F1、TtT/GF の *Sox2* と *S100β* の発現レベルを、qPCR 法で測定し、それぞれの細胞の発現量を *TATA-box binding protein* のそれに対する相対値として示した。文献<sup>29)</sup>を参照。

遺伝子	相対的発現量		
	Tpit/E	Tpit/F1	TtT/GF
<i>Sox2</i>	1.29	0.45	0.17
<i>S100β</i>	0.01	0.01	6.25

モデル細胞」として利用されている。これら 3 種の細胞は、qPCR 測定により SOX2 の発現が確認される (表 1)<sup>29)</sup>。SOX2 の相対発現量が高い Tpit/E は未分化性が高く、Tpit/F1、TtT/GF の順に低くなると思われる。実際、Tpit/E (埼玉大学時代の藤原ら (現自治医科大学) が樹立した細胞株、未発表) は未だに分化誘導ができていないが、幹細胞性が高い (吉田ら、未発表)。Tpit/F1 は骨格筋細胞への分化能を持つとの報告がある<sup>30)</sup>。最近、私達は、Tpit/F1 がホルモン産生細胞にも分化することを報告している<sup>31)</sup>。また、東邦大学の塚田と私達は、TtT/GF は、TGFβ の作用によりペリサイト様の形質を示す細胞に変化することを報告している<sup>32), 33)</sup>。いずれの株化細胞も SOX2 や S100β の mRNA が確認されるものの、未分化レベルが異なるものである。これら分化能を持つ株化細胞はどのような細胞に由来するのか、今後の研究を期待したい。

#### 4. S100β 陽性細胞と Folliculo-stellate cells (濾胞星状細胞)

##### 4-1. Folliculo-stellate cells (濾胞星状細胞) と Follicular cells (小胞細胞)

上述した私達の下垂体幹・前駆細胞の観察結果は、「濾胞星状細胞は S100β 陽性細胞である」との考えを半ばア priori に受け入れていた私達にとって、余りにも奇異な結果である。不勉強さを恥じながら、改めて濾胞星状細胞とは何かを調べてみることにしたのだが、先に私達の考えを述べておくと以下の様になる。出生後の前葉に存在する S100β 陽性細胞を幹・前駆細胞の視点で見れば、下垂体原基から由来する MCL と、そこから派生する実質層の SOX2/S100β 二重陽性細胞は幹・前駆細胞性の高いグループであり、SOX2 陰性の S100β 陽性細胞は、後述する Stellate cells で、細胞間ネットワークなどに機能する細胞であると考えている。

Vila-Porcile (INSERM) が、下垂体前葉で細胞間のネットワークを形成する無顆粒細胞

(Agranular cells) を構成する、形質の良く似た二種の細胞群のうちの一つにつけた名前が、Folliculo-stellate cells (Follicular cells とは同義としている) である。もう一つが、Stellate cells である<sup>34)</sup>。当時は、二種の無顆粒細胞について形態学的な詳細な研究が行われており、多くの研究者は Stellate cells と Follicular cells の表現を使用していた<sup>34)</sup>。しかし、今日では、Stellate cells と Follicular cells の表現はほとんど見当たらず、Folliculo-stellate cells の Subpopulation として組み込まれている様である。

##### 4-2. 無顆粒細胞の細胞系譜

無顆粒細胞とは、色素嫌性で、ホルモンを蓄える為の分泌顆粒を持たない細胞であり、その構造は胎仔期の下垂体原基の頃から観察される。多くの研究者が形態学的な観察から、細胞内の Golgi の有無などを基準に、Stellate cells と Folliculo-stellate cells の二種について論じている。その中に、下垂体の発生・分化、細胞供給 (幹細胞) の視点から、無顆粒細胞に取り組んだ報告がある。

吉村らは、無顆粒星細胞の原始的な細胞内構造 (小胞体の発達が悪く、豊富な遊離リボソーム・ポリソーム、多量の Tonofilaments を有し、不規則な細胞形、互いに陥入する細胞膜で咬み合っている) に着目して、下垂体の発達過程を観察している<sup>35), 36)</sup>。原始的無顆粒細胞は、1) ラトケ氏囊の前壁の突隆細胞索から MCL に局在し、2) 顆粒化を伴った細胞分化 (Granulation) によって実質層に移動し Follicular cells のクラスターを形成し、3) 分化途上の未熟な好酸性と好塩基性の細胞群 (未分明細胞: Ambiguous cells) となり、4) 分化に伴ってクラスター外へ移動し、他の分化したホルモン産生細胞や色素嫌性で Framework を形成する 2-3 個の細胞塊を形成する細胞群になる、としている。

##### 4-3. Follicular cells (小胞細胞) とは

下垂体の Follicular cells について、吉村らの論文<sup>36)</sup>に以下の様な Synopses があるので、長くなるが全文を引用しておく。形態学的な特徴については、続報に詳述されている<sup>37)</sup>。

Development and differentiation of rat follicular cells were investigated by light and electron microscopy. The cell-cords growing out from the anterior wall of Rathke's pouch at the 15th day of gestation gradually form the original anterior lobe. Thereafter, its agranular primordial cells spread throughout the gland. Most of them begin to granulate, while some others undergo only mitotic division. The latter tends to congregate and



repeat the mitosis for the appointed duration. These cells surround a pseudolumen equipped with microvilli, constituting a cell-mass lacking the basement membrane at the 17, 18 and 20th day of gestation. They may lead to the follicular cells. **Pituitary marginal cells resemble in fine structure the follicular cells.** The former is a residue of the anterior wall of Rathke's pouch, while the latter is **a cluster of the cells differentiating for the specific purpose from the cell-cords. Even in postnatal and infant rats, clusters of ungranulated follicular cells are preserved and may serve as the proliferating center of the gland,** based on the frequent observation of mitosis there. After mitotic division, the intercellular spaces enter midway between two daughter cells, leading to the formation of a cluster consisting of small irregular cells. **The follicular cells permanently keep their undifferentiated capacity for mitosis through the life course of rats (6-, 21-, 45-, 90- and 400-day-old).** **The follicular cells located at the periphery of a cluster spontaneously begin to granulate after completing their own mitosis, and finally transform into immature acidophils or basophils through the intermediary stage of ambiguous cells.** With granulation, they move towards the outside of the cluster to intermingle among the cells which already have been grown. **So-called folliculo-stellate cells, making a framework in the gland, seem to be analogous with the isolated follicular cells without cluster formation.** Thyroidectomy and autotransplantation of pituitaries successfully gave rise to granulation and multiplication of the follicular cells, but all our experiments failed to completely disperse them. **The follicular cells have two capabilities, cell proliferation and differentiation,** both of which are interpreted to be intrinsically balanced. It may be hypothesized in references to our previous accumulated data reported elsewhere that **the pituitary belongs to the “renewal cell system” and the follicular cells may be regarded as the “stem cells” of the pituitary.** (So-called folliculo-stellate cells としているが、Vila-Porcile も含めて当時用いられていた **Stellate cells** <sup>34)</sup>のことであろうか。太文字と下線は著者。)

吉村らが、下垂体構成細胞の分化と細胞供給という細胞系譜を俯瞰しながらその形態学的な視点で解析した結果は、私達が、最近のSOX2と他のマーカーを使った免疫組織化学像の観察結果、1) ラット胎仔期にSOX2陽性/S100β陰性の幹・前駆細胞が存在し、前葉形成に関わり、2) 胎仔期中・後期ではMCLに局在し、3) 生後ではMCLのSOX2陽性細胞の上皮間葉転換により、実質層に細胞移動してClusterを形成して

いる、と良く類似した経過を示している。ところで、冒頭にある白澤先生の疑問、「S100βタンパク質陽性になる前の濾胞星細胞」とは、胎仔期におけるSOX2陽性/S100β陰性の幹・前駆細胞であると考えている。

#### 4-4. S100βと Folliculo-stellate cells/Follicular cells

さて、1980年に、相次いでS100βが下垂体に存在することが報告される。中島らは、実質層に微絨毛を持つFollicle-forming cellsと突起を持つStellate-shaped cellsの二様の細胞にS100βの陽性反応を認め、それらを一括りにFolliculo-stellate cellsとしている<sup>37)</sup>。その直後に、Cocchiaらが、S100β陽性細胞が実質層の二様のStellate cells (Elevated reticular frameworkとFolliclesを形成するもの)と報告している<sup>38)</sup>。また、Cocchiaらは、中島らの観察にはない、前葉と中葉のMCLのMarginal cellsに存在することも観察している<sup>38)</sup>。しかし、これ以降、研究者の多くは、もっぱらS100βを濾胞星状細胞のマーカーとしている様である。

吉村らは、抗 S100β抗体を自作し、S100β陽性細胞の個体発生を調べている。その結果、出生後6日の中葉のMCLに初めて、そして10日の前葉のMCLの細胞と実質層の濾胞星状細胞、さらに後葉のPituicyteにも陽性反応を観察し、Cocchiaら<sup>38)</sup>と同様の結果を確認している<sup>39)</sup>。S100β陽性細胞の形態や局在は、多様である。しかし、先行論文<sup>35)</sup>にあるFollicular cellsやStellate cellsは、今では、濾胞星状細胞の多様さの中の“Subpopulation”の一つに位置づけられている<sup>39)</sup>。

S100β陽性細胞が一様でないことは他にも示されている。サイトケラチン(CK)との二重免疫組織化学では、成人ヒト下垂体には抗 S100β抗体の染色性が低いものと高いものがあり、Stellate cells (S100β protein cells: S100β-high/CK-low)とFollicular cells (CK-type cells: S100β-low/CK-high)が観察されている<sup>40)</sup>。また最近では、帝京大学の中倉らが、MCL細胞層と実質層のFollicleに存在するSOX2/S100β二重陽性細胞の中に、運動性繊毛のマーカーであるFOXJ1を持つものと持たない二種の細胞が存在することを報告している<sup>41)</sup>。やはり、S100β陽性細胞の免疫表現型も一様ではない。

#### 5. S100β陽性細胞はどの様に下垂体形成にかかわるのか

##### 5-1 多様なS100β陽性細胞

これまでに多様な下垂体のS100β陽性細胞が報告されており、Vankelecom (ルーヴェン大学)



は、それらを、Classical folliculo-stellate cell として、Astrocyte-like (GFAP-positive)と Epithelial cell-like (keratin-positive) の二種に分類し、その他に S100β陽性の'True' dendritic cell-like (MCH-CassII-positive)を取り上げて考察している<sup>42)</sup>。また、機能面から、Folliculo-stellate cellsを、1) Scavenger cells、2) Sustentacular cells、3) Inter-cellular communicating cells、4) Nursing/stem cells、に関わる細胞群とする考察もある<sup>43)</sup>。

一方、私達は、S100β陽性細胞が下垂体以外（間葉系や神経堤）の系譜からも派生する多様な細胞であることを観察してきた。少なくとも、成熟期下垂体においては、その85%がSOX2陽性である。それらを、形態学的定義から始まった濾胞星状細胞というグループの何処かに位置づけるには無理があると、私達は感じている。

確かに、「Follicular cellsには形態学的な観察を支える適切な分子マーカーが無かった」<sup>44)</sup>ために、認知が進まなかったのかも知れない。改めて見直すと、私達が観察した実質層SOX2/S100β二重陽性クラスターの膜受容体CARの局在は<sup>7)</sup>、吉村先生が観察している「強固な細胞集団を持つFollicular cells」と一致する様に思われる。また、同様の局在を見せるephrin-B2<sup>8),9)</sup>も、Follicular cellsのマーカーとなり得るだろう。こうした分子マーカーと他の幹・前駆細胞マーカーを組み合わせ、下垂体の幹・前駆細胞の研究が進展することを期待したい。

## 5-2 S100β陽性細胞の多様な系譜の位置づけは未解明である

私達の観察では、下垂体には系譜の異なるS100β陽性細胞が存在することになる。従って、いくつかの疑問がある。それは、免疫表現型の異なるS100β陽性細胞がどのような細胞系譜なのか。また、胎仔期におけるホルモン産生細胞の分化はS100βの発現を伴うことはないが、出生後の、いわゆるEarly growth wave（生後第一週）の開始頃からS100βの発現を伴うという点である。胎仔期と出生後の幹細胞が異なるのだろうか、また、SOX2/S100β二重陽性細胞はどのような系譜の細胞なのだろうか。さらに、胎仔期に侵入するSOX2陰性のS100β陽性細胞は、下垂体を構成するどのような細胞として定着しているのだろうか。実は、口腔上皮系譜の細胞として、S100β陽性細胞が存在するという、確たる証拠がない。この検証も今後の課題である。

下垂体の幹・前駆細胞の側から「SOX2陽性のS100β陽性細胞」と「SOX2陰性のS100β陽性細胞」と大別しながら、現時点で私達が観察してきたラット下垂体前葉の幹・前駆細胞とS100β陽性細胞の系譜を図6に描いてみた。また、これまで報告されている濾胞星状細胞のサブタイプについて、推測であるが表2の様なグループ分けをしてみた。私達は、幹・前駆細胞としてのS100β陽性細胞をみているので、決して、濾胞星状細胞の定義を云々するものではないが、今後は、少なくとも、S100β陽性細胞や濾胞星状細胞を調べる時に、同定に使う指標

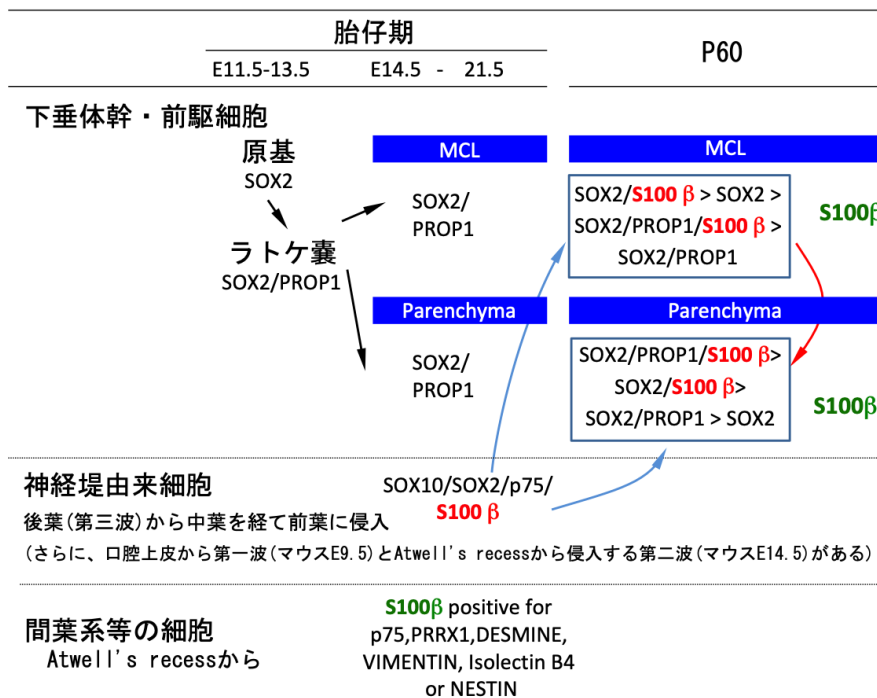


図6. 下垂体前葉のS100β陽性細胞と幹・前駆細胞の胎仔期と出生後の変化。主にラットの結果を参照している。不等号記号は、MCLと実質層における細胞種の割合の多少を示す(図4の棒グラフを参照)。

SOX2陽性あるいは陰性のS100β細胞は、それぞれ、赤と緑で表示

表2. 本文中で引用した文献中に記述された濾胞星状細胞のサブタイプ

	幹・前駆細胞性が高いと思われる	非幹・前駆細胞と思われる
Yoshimura ら <sup>35)</sup>	marginal cells, follicular cells	stellate cells
Vila-Porcile <sup>34)</sup>	folliculo-stellate cells	stellate cells
Nakajima ら <sup>1)</sup>	follicle-forming cells	stellate-shaped cells
Cocchia ら <sup>38)</sup>	marginal cells, stellate cells (form pituitary follicles)	stellate cells (form an elaborate reticular framework)
Yamashita ら <sup>40)</sup>	CK-type cells (follicular cells)	S100 $\beta$ -type cell (stellate cells)
Allaertes ら <sup>42)</sup>	S100 $\beta$ /keratin-positive cells (epithelial cell-like)	S100 $\beta$ /GFAP-positive cells (Astrocyte-like) S100 $\beta$ /MHC-class II-positive/ IL-6 production cells ('true' dendritic cells)
Horiguchi ら <sup>23)</sup>	CD9/SOX2/S100 $\beta$ -positive cell	CD9/S100 $\beta$ -positive (SOX2-negative) cells
Nakakura ら <sup>41)</sup>	SOX2/S100 $\beta$ -positive cells (FOXJ1 <sup>+/-</sup> )	

(ツールやマーカー) と、性質の解析、局在、形態、そしてそれらが占める割合を調べておくことが必要ではないだろうか。

多様な幹・前駆細胞や神経堤系譜の幹・前駆細胞などの存在は、以前に提起されている「下垂体は Embryonic stem cells と出生後の Adult stem cells に大別される幹・前駆細胞が存在する」<sup>45)</sup> という概念を加味して考えると興味深い。私達にはもう解けない問いで、後進の下垂体研究者によって解明されることを期待している。

## 6. 終わりに

タンパク質の適度な濃度の溶液を、液体窒素を使って肉厚のナスフラスコ中でゆっくりと回転させながら凍結させて真空乾燥させると、真綿の様なふわふわとしたタンパク質の乾燥物が得られる。50 年も前に 5kg 近いウシ脳から純化した数百ミリグラムの S100 $\beta$ タンパク質は真っ白なものであったが、機能についても真っ白であった。ところが、50 年たった今もまだその機能は解明されずに真っ白に近く、これからもしばらく“Ambiguous protein”であり続けるのだろうか、と思うこの頃である。

## 謝辞

本稿は、私達よりも長く下垂体研究に関わってきた研究者や、最前線で活躍している中堅・若手の研究者に事前に繰り返し目を通していただいて脱稿したものです。それぞれの方のお名前は割愛しますが、数々のご意見をいただいたことに深謝致します。

明治大学農学部を退職して、2 年が経ち、研究を振り返るのもそろそろ終わりにしようと思

っています。本研究会の第 1 回学術集会（川島誠一郎会長・1986 年・広島）に飛び入り参加して以来、日本下垂体研究会がホームグラウンドになってしまいました。今でも、未練がましく会員の籍を残している唯一の学会です。多くの友人を得て多くの勉強をさせていただいた日本下垂体研究会に感謝して、この稿を閉じます。

## 【引用文献】

- 1) Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K, 1980, S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. Brain Res. **191**, 523-31.
- 2) Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC, 2008, SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. Proc Natl Acad Sci USA. **105**, 2907-12.
- 3) Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, Gaston-Massuet C, Mollard P, Jacques TS, Le Tissier P, Dattani MT, Pevny LH, Martinez-Barbera JP, 2013, Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. Cell Stem Cell. **13**, 433-45.
- 4) Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai L-Y, Nakayama M, Kato Y, 2009, PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. Biochem Biophys Res Commun. **385**, 11-5.
- 5) Yoshida S, Kato T, Yako H, Susa T, Cai LY,



- Osuna M, Inoue K, Kato Y, 2011, Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem/progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary. *J Neuroendocrinol.* **23**, 933-43.
- 6) Davis SW, Keisler JL, Perez-Millan MI, Schade V, Camper SA, 2016, All hormone-producing cell types of the pituitary intermediate and anterior lobes derive from *Prop1* expressing progenitors. *Endocrinology.* **157**, 1385-96.
- 7) Chen M, Kato T, Higuchi M, Yoshida S, Yako H, Kanno N, Kato Y, 2013, Coxsackievirus and adenovirus receptor-positive cells compose the putative stem/progenitor cell niches in the marginal cell layer and parenchyma of the rat anterior pituitary. *Cell Tissue Res.* **354**, 823-36.
- 8) Yoshida S, Kato T, Chen M, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Kato Y, 2015, Localization of juxtacrine factor ephrin-B2 in pituitary stem/progenitor cell niches throughout life. *Cell Tissue Res.* **359**, 755-66.
- 9) Yoshida S, Kato T, Kanno N, Nishimura N, Nishihara H, Horiguchi K, Kato Y, 2017, Cell type-specific localization of Ephs pairing with ephrin-B2 in the rat postnatal pituitary gland. *Cell Tissue Res.* **370**, 99-112.
- 10) Itakura E, Odaira K, Yokoyama K, Osuna M, Hara T, Inoue K, 2007, Generation of transgenic rats expressing green fluorescent protein in *S-100beta*-producing pituitary folliculo-stellate cells and brain astrocytes. *Endocrinology.* **148**, 1518-23.
- 11) Horiguchi K, Yako H, Yoshida S, Fujiwara K, Tsukada T, Kanno N, Ueharu H, Nishihara H, Kato T, Yashiro T, Kato Y, 2016, *S100β*-positive cells of mesenchymal origin reside in the anterior lobe of the embryonic pituitary gland. *PLoS One.* **11**, e0163981.
- 12) Couly GF, Le Douarin NM, 1985, Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol.* **110**, 422-39.
- 13) Couly GF, Le Douarin NM, 1987, Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev Biol.* **120**, 198-214.
- 14) Ueharu H, Yoshida S, Kanno N, Horiguchi K, Nishimura N, Kato T, Kato Y, 2018, *SOX10*-positive cells emerge in the rat pituitary gland during late embryogenesis and start to express *S100beta*. *Cell Tissue Res.* **372**, 77-90.
- 15) Nitzan E, Krispin S, Pfaltzgraff ER, Klar A, Labosky PA, Kalcheim C, 2013, A dynamic code of dorsal neural tube genes regulates the segregation between neurogenic and melanogenic neural crest cells. *Development.* **140**, 2269-79.
- 16) Ueharu H, Yoshida S, Kikkawa T, Kanno N, Higuchi M, Kato T, Osumi N, Kato Y, 2017, Gene tracing analysis reveals the contribution of neural crest-derived cells in pituitary development. *J Anat.* **230**, 373-80.
- 17) Osuna M, Sonobe Y, Itakura E, Devnath S, Kato T, Kato Y, Inoue K, 2012, Differentiation capacity of native pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *J Endocrinol.* **213**, 231-7.
- 18) Horiguchi K, Kouki T, Fujiwara K, Kikuchi M, Yashiro T, 2011, The extracellular matrix component laminin promotes gap junction formation in the rat anterior pituitary gland. *J Endocrinol.* **208**, 225-32.
- 19) Horiguchi K, Fujiwara K, Higuchi M, Yoshida S, Tsukada T, Ueharu H, Chen M, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y, 2014, Expression of chemokine *CXCL10* in dendritic cell-like *S100β*-positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* **357**, 757-65.
- 20) Horiguchi K, Fujiwara K, Yoshida S, Higuchi M, Tsukada T, Kanno N, Yashiro T, Tateno K, Osako S, Kato T, Kato Y, 2014, Isolation of dendritic cell-like *S100β*-positive cells in rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* **357**, 301-8.
- 21) Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yako H, Tateno K, Hasegawa R, Takegami S, Osako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y, 2016, Expression of *Slug* in *S100β* protein-positive cells of the postnatal developing rat anterior pituitary gland. *Cell Tissue Res.* **363**, 513-24.
- 22) Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yoshida S, Higuchi M, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y, 2016, *CXCL10/CXCR3* signaling mediates inhibitory action by Interferon-Gamma on

- CRF-stimulated adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release. *Cell Tissue Res.* **364**, 395-404.
- 23) Horiguchi K, Fujiwara K, Yoshida S, Nakakura T, Arae K, Tsukada T, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y, 2018, Isolation and characterisation of CD9-positive pituitary adult stem/progenitor cells in rats. *Sci Rep.* **8**, 5533.
  - 24) Higuchi M, Kanno N, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Yako H, Shibuya S, Sekita M, Tsuda M, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y, 2014, GFP-expressing S100 $\beta$ -positive cells of the rat anterior pituitary differentiate into hormone-producing cells. *Cell Tissue Res.* **357**, 767-79.
  - 25) Yoshida S, Nishimura N, Ueharu H, Kanno N, Higuchi M, Horiguchi K, Kato T, Kato Y, 2016, Isolation of adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchyma of the rat anterior lobe. *Stem Cell Res.* **17**, 318-29.
  - 26) Yoshida S, Nishimura N, Yurino H, Kobayashi M, Horiguchi K, Yano K, Hashimoto S, Kato T, Kato Y, 2018, Differentiation capacities of PS-clusters, adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchymal-niche, of the rat anterior lobe. *PLoS One.* **13**, e0196029.
  - 27) Matsumoto H, Ishibashi Y, Ohtaki T, Hasegawa Y, Koyama C, Inoue K, 1993, Newly established murine pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) secretes potent pituitary glandular cell survival factors, one of which corresponds to metalloproteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* **194**, 909-15.
  - 28) Chen L, Maruyama D, Sugiyama M, Sakai T, Mogi C, Kato M, Kurotani R, Shirasawa N, Takaki A, Renner U, Kato Y, Inoue K, 2000, Cytological characterization of a pituitary folliculo-stellate-like cell line, Tpit/F1, with special reference to adenosine triphosphate-mediated neural nitric oxide synthetase expression and nitric oxide secretion. *Endocrinology.* **141**, 3603-10.
  - 29) Yoshida S, Higuchi M, Ueharu H, Nishimura N, Tsuda M, Nishihara H, Mitsuishi H, Kato T, Kato Y, 2014, Characterization of murine pituitary-derived cell lines Tpit/F1, Tpit/E and TtT/GF. *J Reprod Dev.* **60**, 295-303.
  - 30) Mogi C, Miyai S, Nishimura Y, Fukuro H, Yokoyama K, Takaki A, Inoue K, 2004, Differentiation of skeletal muscle from pituitary folliculo-stellate cells and endocrine progenitor cells. *Exp Cell Res.* **292**, 288-94.
  - 31) Higuchi M, Yoshida S, Kanno N, Mitsuishi H, Ueharu H, Chen M, Nishimura N, Kato T, Kato Y, 2017, Clump formation in mouse pituitary-derived non-endocrine cell line Tpit/F1 promotes differentiation into growth-hormone-producing cells. *Cell Tissue Res.* **369**, 353-68.
  - 32) Tsukada T, Yoshida S, Kito K, Fujiwara K, Yako H, Horiguchi K, Isowa Y, Yashiro T, Kato T, Kato Y, 2017, TGF $\beta$  signaling reinforces pericyte properties of the non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF. *Cell Tissue Res.* **371**, 339-50.
  - 33) Tsukada T, Isowa Y, Kito K, Yoshida S, Toneri S, Horiguchi K, Fujiwara K, Yashiro T, Kato T, Kato Y, 2019, Identification of TGF $\beta$ -induced proteins in non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF by SILAC-assisted quantitative mass spectrometry. *Cell Tissue Res.* **376**, 281-93.
  - 34) Vila-Porcile E, 1972, The network of the folliculo-stellate cells and the follicles of the adenohypophysis in the rat (pars distalis). *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* **129**, 328-69.
  - 35) Yoshimura F, Soji T, Kiguchi Y, 1977, Relationship between the follicular cells and marginal layer cells of the anterior pituitary. *Endocr J.* **24**, 301-5.
  - 36) Yoshimura F, Soji T, Sato S, Yokoyama M, 1977, Development and differentiation of rat pituitary follicular cells under normal and some experimental conditions with special reference to an interpretation of renewal cell system. *Endocr J.* **24**, 435-49.
  - 37) Nagata M, Mizunaga A, Ema S, Yoshimura F, 1980, Various types of the pituitary folliculo-stellate cells involving the Siperstein's corticotroph in the normal rats. *Endocrinol Jpn.* **27**, 13-22.
  - 38) Cocchia D, Miani N, 1980, Immunocytochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J Neurocytol.* **9**, 771-82.
  - 39) Shirasawa N, Kihara H, Yamaguchi S, Yoshimura F, 1983, Pituitary folliculo-stellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in postnatal, castrated and thyroidectomized rats. *Cell Tissue Res.* **231**, 235-49.



- 40) Yamashita M, Qian ZR, Sano T, Horvath E, Kovacs K, 2005, Immunohistochemical study on so-called follicular cells and folliculostellate cells in the human adenohypophysis. *Pathol Int.* **55**, 244-7.
- 41) Nakakura T, Suzuki T, Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Asano-Hoshino A, Tanaka H, Arisawa K, Nishijima Y, Nekooki-Machida Y, Kiuchi Y, Hagiwara H, 2017, Expression and localization of forkhead box protein FOXJ1 in S100beta-positive multiciliated cells of the rat pituitary. *Med Mol Morphol.* **50**, 59-67.
- 42) Allaerts W, Vankelecom H, 2005, History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *Eur J Endocrinol.* **153**, 1-12.
- 43) Devnath S, Inoue K, 2008, An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol.* **20**, 687-91.
- 44) Vankelecom H, 2012, Pituitary stem cells drop their mask. *Curr Stem Cell Res Ther.* **7**, 36-71.
- 45) Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, Balordi F, Fishell G, Rosenfeld MG, Enikolopov G, 2008, Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**, 6332-7.

## 論文 II

## 新規 GPCR を軸とした内分泌細胞制御機構の研究

明治大学農学部生命科学科

戸村 秀明

tomurah@meiji.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.7, 13-18, 2020)

## 1. はじめに

私の下垂体との出会いは今から約 30 年前、群馬大学内分泌研究所（現生体調節研究所）物理化学部門において故・近藤洋一先生、岡島史和先生とおこなった TSH の作用機構の研究に遡ります。下垂体から放出された TSH は甲状腺細胞に存在する TSH 受容体に作用し、甲状腺ホルモンの合成・分泌や甲状腺細胞の増殖を制御しています。TSH 受容体は GPCR の一種であり、その受容体の活性化は  $G_s/cAMP$  シグナル伝達系と  $G_q/$ イノシトールリン酸・ $Ca^{2+}$  シグナル伝達系の活性化を引き起こします。これらシグナル伝達系のうち、甲状腺ホルモン合成に必須なヨード化反応は  $G_q/$ イノシトールリン酸・ $Ca^{2+}$  系によって、一方ヨード化以外の甲状腺ホルモンの合成ステップや甲状腺細胞の増殖は  $G_s/cAMP$  系によって制御されていることはそれまでに明らかにされてきました。しかしながら問題は、 $G_q/$ イノシトールリン酸・ $Ca^{2+}$  系を活性化させるためには  $G_s/cAMP$  系を活性化させる濃度の 10~100 倍の TSH 濃度が必要であったことです。この問題に対し岡島先生を中心として、生体内ではアデノシンが A1 受容体を介して TSH による  $G_q/$ イノシトールリン酸・ $Ca^{2+}$  系の活性化を増強する一方、TSH による  $G_s/cAMP$  系の活性化を抑制させることで、より

低濃度の TSH で  $G_q/$ イノシトールリン酸・ $Ca^{2+}$  系の活性化を引き起こす可能性が提唱されました（図 1）。A1 受容体も GPCR の一種です。私はこの A1 受容体による TSH 受容体を介したシグナル伝達系の活性化のスイッチング機構に興味を持ち、研究を始めました<sup>1)</sup>。以来、GPCR の研究を継続し今日に至っています。本稿では最近おこなっているプロトン感知性 GPCR 研究の現況を紹介したいと思います。

## 2. プロトン感知性 GPCR

OGR1 ファミリー(OGR1, GPR4, TDAG8)は、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P)、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC)、リゾフォスファチジルコリン (LPC)、サイコシンなどの生理活性脂質をリガンドとする GPCR サブファミリーとして最初に同定されましたが、その再現性に関しては議論があります。一方 Ludwig らは<sup>2)</sup>、この OGR1 ファミリーの中で OGR1、GPR4 が、我々<sup>3)</sup>と Ishii ら<sup>4)</sup>は TDAG8 が、細胞外プロトンを感じ細胞内シグナル系を活性化するプロトン感知性 GPCR であることを見出しました。すなわち OGR1 ファミリーは、細胞外 pH の低下を感知するユニークな GPCR ファミリーです<sup>5)</sup>。

人の体液の pH は 7.4 に保たれています。しか

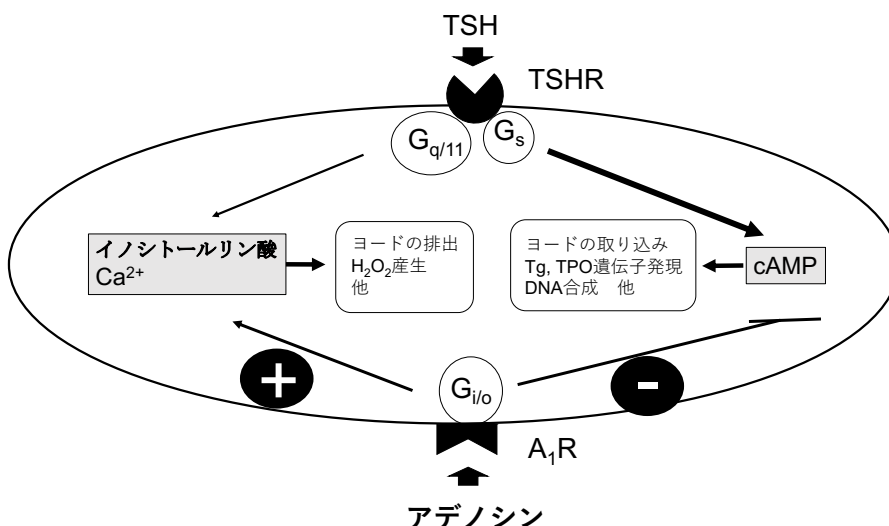


図 1 アデノシンによる TSH 応答の修飾。アデノシンは A1 受容体を介して、TSH による cAMP 系の活性化を減弱させるのと同時に  $Ca^{2+}$  系の活性化を増強する。



しながら腎臓からの有機酸の排出や肺からの  $\text{CO}_2$  の排出に障害がおきると、アシドーシス状態となり体内の pH が 7.4 よりも酸性側に傾いたアシデミア ( $\text{pH}7.35$ ) を引き起こします。アシデミアは重篤化すると高カリウム血症、心筋の活動低下他を引き起こし、昏睡、死に至ります。

一方、生体内の局所では組織の活動・維持のためにプロトンが積極的に利用されています。たとえば胃酸は、食物の消化や殺菌に利用されています。また骨では破骨細胞から分泌される塩酸が、骨吸収を促すことで骨リモデリングを維持しています<sup>6)</sup>。さらに細菌感染時にも、局所的な pH の低下が観察されます。細菌感染時には炎症が引き起こされますが、炎症部位では炎症性細胞の集積、酸素供給の停止などに伴う解糖系の亢進により、大量の乳酸が産生するため、局所的な pH の低下が観察されます。この pH の低下が免疫細胞や炎症周辺の細胞応答を調節していることも報告されています<sup>7)</sup>。これまでに我々は、細胞外 pH の低下が OGR1 を介して、ヒト大動脈血管平滑筋細胞からのプロスタサイクリン産生<sup>8)</sup>や、ヒト骨芽細胞からのプロスタグランジン E2 産生を引き起こすこと<sup>9)</sup>で、抗動脈硬化作用や骨代謝に関与する可能性を報告しました。OGR1 ファミリーを欠損するマウスは、骨代謝異常、がん転移の促進または抑制などの症状を呈することが知られています。我々も OGR1 欠損マウスが、気道過敏に関与することを示しました<sup>10)</sup>。

### 3. プロトンとホルモン分泌

プロトンとホルモン分泌の間には密接な関係があることも、古くから知られています。胃酸により十二指腸内の pH が低下すると、十二指腸から消化管ホルモンの一種であるセクレチンが分泌されます<sup>11)</sup>。セクレチンは最初に発見されたホルモンとしても有名です。我々も OGR1 がインスリン分泌に関与することを示しました<sup>12)</sup>。

下垂体におけるプロトン感知性 GPCR に関しては、杏林大学の堀口先生から報告がなされています。その報告において、下垂体 S100 $\beta$  細胞に発現する OGR1 が細胞外酸性化に伴う IL-6 の産生に関与することが明らかにされています<sup>13)</sup>。我々は下垂体ホルモン産生細胞に着目しました。ホルモンの合成・分泌活性に、細胞外酸性化とプロトン感知性 GPCR がどのように関与しているのかを明らかにするため、まず我々は鋭敏でかつ簡便なホルモン分泌活性の測定法の開発を行いました。

ホルモン産生細胞株からの培養液中へのホルモンの放出量は微量です。このような微量のホルモンを測定するためには、RIA や ELISA などのイムノアッセイが従来、用いられてきました。これらの方法は測定に多くのステップと時間を要するので、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す。そこで我々は、ガウシアルシフェラーゼ (GLuc) に注目しました。GLuc は細胞外に分泌される特性を持つルシフェラーゼです。マウスゴナドトロフ細胞株である L $\beta$ T2 に GLuc 遺伝子を導入・発現後、GnRH または KCl で細胞を刺激し、培養液中に放出された GLuc 量を発光量に変換して測定を行いました。また同様の実験を、GnRH のアンタゴニストであるアンチド、カルシウムイオンチャネルの阻害剤であるニモジピンをそれぞれ作用させ、発光量の変化を測定しました。その結果、GnRH、KCl それぞれの刺激により、培養液中の発光量がコントロールと比較して増加しました。またアンチドを作用させた場合では、GnRH 刺激による発光量はコントロールと同程度まで抑制されたが、KCl 刺激による発光量の増加には変化が観察されませんでした。さらにニモジピンを作用させた場合は、KCl 刺激による発光量がコントロールと

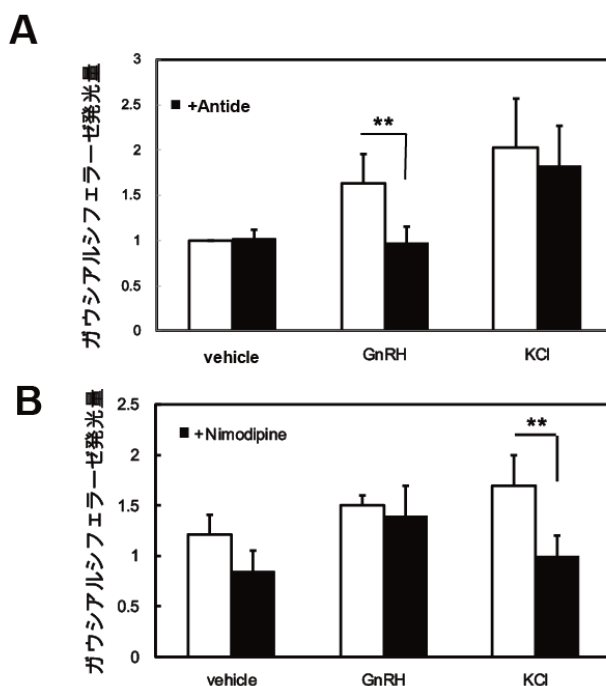


図 2 ガウシアルシフェラーゼによるホルモン分泌応答の測定。ガウシアルシフェラーゼを用いることにより、ホルモン産生細胞株からの構成性分泌、調節性分泌をリアルタイムに測定することができる。(A) GnRH 受容体アンタゴニスト (antide) の効果 (B) カルシウムチャンネル遮断薬 (nimodipine) の効果

同程度まで抑制されました。これらの結果から GLuc が、構成性分泌に加えて調節性分泌経路によっても細胞外に放出されることが示されました (図 2)。すなわちホルモン分泌の簡便な検出法として、GLuc を用いたアッセイ法が使用できることを示しました<sup>14)</sup>。

次に GLuc を用いた分泌アッセイ法を用いて、堀口先生と共同研究を行いました。その結果、ラット下垂体ゴナドトロフ細胞の一部には OGR1 の発現が検出されること。また LβT2 細胞にも OGR1 が発現していること。LβT2 細胞においては、細胞外酸性化により OGR1 を介した細胞内カルシウム濃度の増加が観察されること。また同細胞において、細胞外酸性化に伴い GnRH 刺激によるホルモン分泌活性が増加することを明らかにしました<sup>15)</sup>。すなわち下垂体ホルモン産生細胞においてもプロトンがホルモン分泌を促進すること。酸性化の感知にはプロトン感知性 GPCR が関与することが明らかとなりました。

#### 4. プロトンと機能性下垂体腫瘍

機能性下垂体腫瘍は、その無秩序なホルモンの過剰産生・分泌によって下垂体機能亢進を引き起こすことが大きな問題となっています。しかしながら、なぜ機能性下垂体腫瘍がホルモンの過剰産生・分泌を引き起こすのかは不明です。一般に固形腫瘍の内部やその周辺は血管形成が脆弱なため血流が不足しており、低酸素状態となっています。また腫瘍細胞自身も代謝が変化

しており、解糖系が優位となっています (ワールブルグ効果)。このような理由により、固形腫瘍の内部やその周辺は乳酸などの代謝産物により pH が低下しています。我々はこの低 pH 状態が下垂体腫瘍細胞に影響を及ぼし、そのホルモンの過剰産生・分泌を引き起こしている可能性を探りました。ラット下垂体ホルモン産生腫瘍株である MtT/S 細胞に、GPR4 の高発現が検出されました。この細胞をモデルとして GPR4 が細胞外酸性化によるホルモン産生腫瘍からの無秩序なホルモン過剰産生・分泌に関与しているのかどうかを調べました。その結果、細胞外酸性化により細胞内の GH 量が増加すること。また GRF 刺激により培養上清中に分泌される GH 量が増すこと。細胞外酸性化により、GH-および PRL-mRNA の発現量が増加すること。その増加は GPR4 アンタゴニストによって部分的に抑制されることを明らかにしました。すなわち MtT/S 細胞における細胞外酸性化に伴う GH および PRL 合成の増加は、GPR4 によって部分的に媒介されることが明らかとなりました (図 3)<sup>16)</sup>。この知見は、ホルモン産生下垂体腺腫が示す無秩序なホルモンの過剰合成・分泌に GPR4 が関与する可能性を示したものであり、今後、GPR4 を標的としたアンタゴニストの開発が機能性下垂体腫瘍への新規治療法開発へとつながる可能性を秘めています。

#### 5. LβT2 細胞におけるプロトンによる cAMP 系の新たな活性化様式

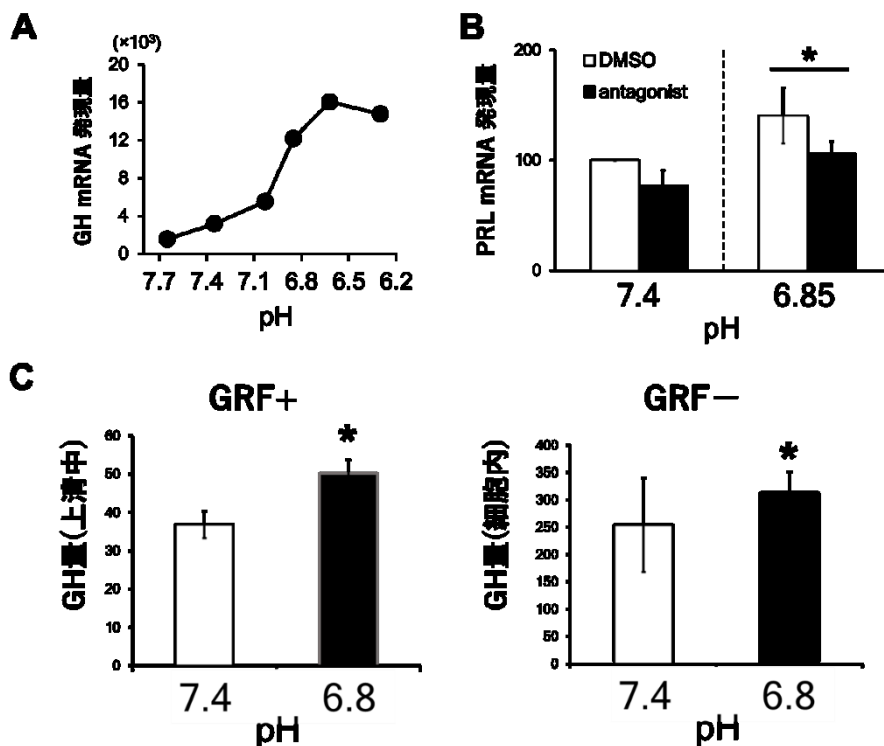


図 3 MtT/S 細胞におけるプロトンによるホルモンの増強作用。(A) プロトンにより GH 遺伝子発現が増加する。PRL 遺伝子発現も同様に増加する (data not shown)。(B) プロトンによる PRL 遺伝子発現の増加は GPR4 アンタゴニスト (antagonist) により阻害される。GH 遺伝子発現も同様に阻害する (data not shown)。(C) プロトンにより細胞内の GH 量と GRF 刺激による GH 分泌が増す。



LβT2 細胞においては GnRH 刺激によるパルス状の cAMP 量の増減が、FSH/LH の合成、分泌に重要な役割をはたすことが報告されています<sup>17)</sup>。そこでこの細胞におけるプロトンと cAMP 系の役割を探るため、リアルタイムに cAMP 量の増減が測定できる Glosensor cAMP アッセイを利用しました。そして細胞外酸性化による cAMP 系の活性化を測定しました。その結果、Glosensor cAMP アッセイ法では、細胞外酸性化により LβT2 細胞内の cAMP 量の増加が観察されました。しかしながら ELISA 法では、細胞外酸性化による LβT2 細胞内の cAMP 量の増加は検出されませんでした (図 4)。この結果により LβT2 細胞において細胞外酸性化は、ELISA では検出できない局所的な cAMP 蓄積を誘発する可能性があること。その局所的な cAMP の蓄積が、FSH/LH の合成や分泌に関与するエフェクターを活性化する役割を果たす可能性があることが示唆されました。このような cAMP 系の活性化様式はこれまで明らかとなっておらず、新たな様式である可能性があります<sup>18)</sup>。この点を明らかにするために、今後のさらなる解析が必要です。

## 6. 金属とプロトン感知性 GPCR

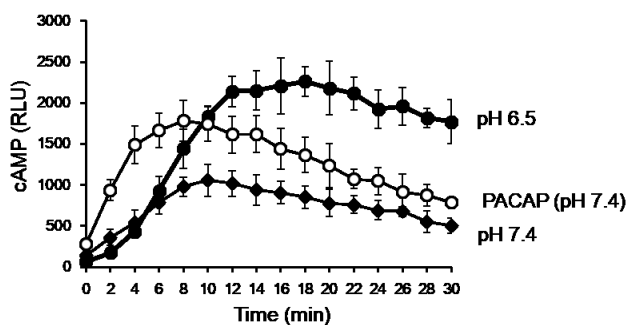
Abe-Ohya らは、ヒトとマウスの OGR1 がプロトン以外にマンガン・コバルト・ニッケルなどの生体微量元素によっても活性化されることを報告しました<sup>19)</sup>。我々もゼブラフィッシュ抽出液がヒト、ゼブラフィッシュ OGR1 を活性化すること。その活性化はキレート剤により抑制されること。ヒト OGR1 と同様にゼブラフィッシュの OGR1 もマンガンにより活性化されることを報告しました<sup>20)</sup>。下垂体はマンガンを豊富に含む組織の一つであること、上記のように OGR1 は下垂体においてもその発現が報告され

ていること<sup>13)</sup>から、下垂体に発現する OGR1 がプロトン以外にマンガンなど生体微量元素によっても活性化されている可能性があります。その可能性を調べるためには、外部から金属をアプライすることが可能なゼブラフィッシュなど、マウス以外のモデル動物の使用も考慮する必要があります。そこで多様な動物種由来の OGR1 が、マンガンに応答しうるものなのかを調べました。その結果、調べたすべての種においてプロトンに対する応答が観察されたのに対して、マンガンへの応答性は生物種によって異なることが明らかとなりました<sup>21)</sup>。すなわちプロトンと異なり生体微量元素による応答を観察する場合は、その種の OGR1 の金属に対する応答性を細胞で事前に調べる必要があることが明らかとなりました。

## 7. 抗不安薬とプロトン感知性 GPCR

Huang らは、ヒト OGR1 が抗不安薬であるロラゼパムによって活性化されることを報告しました<sup>22)</sup>。ロラゼパムは GABA-A 受容体をメインターゲットとした臨床薬です。そこで彼らはロラゼパムの骨格をもとに、OGR1 特異的に作用する化合物である ogerin を作成しました。そして ogerin を用いて OGR1 がマウスの不安行動に関与することを示しました<sup>22)</sup>。近年のゲノム編集技術の発達により、ゼブラフィッシュなど、マウス以外の動物が薬物のスクリーニングやその作用解析に利用されるようになっていきます。しかしながら ogerin がヒト、マウス以外の OGR1 に対して同様の活性化作用を示すのかどうかは明らかとなっていない。多様な動物種由来の OGR1 のアミノ酸配列を比較したところ、ogerin との結合部位として報告されているアミノ酸残基に違いは観察されませんでした。しかしながら実際にこれら動物種由来の OGR1

### A Glosensor



### B ELISA

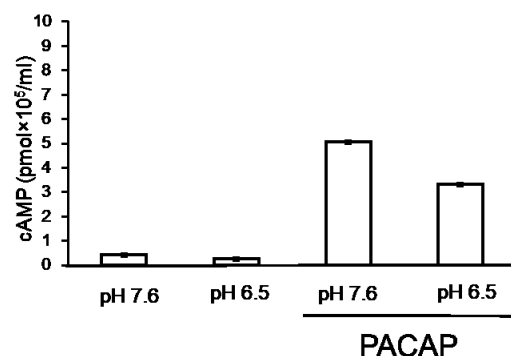


図 4 LβT2 細胞におけるプロトンによる特異的な cAMP 系の活性化応答。(A) Glosensor 法ではプロトンにより cAMP の産生応答の増加が観察される。(B) ELISA 法ではプロトンによる cAMP 産生応答は観察されない。

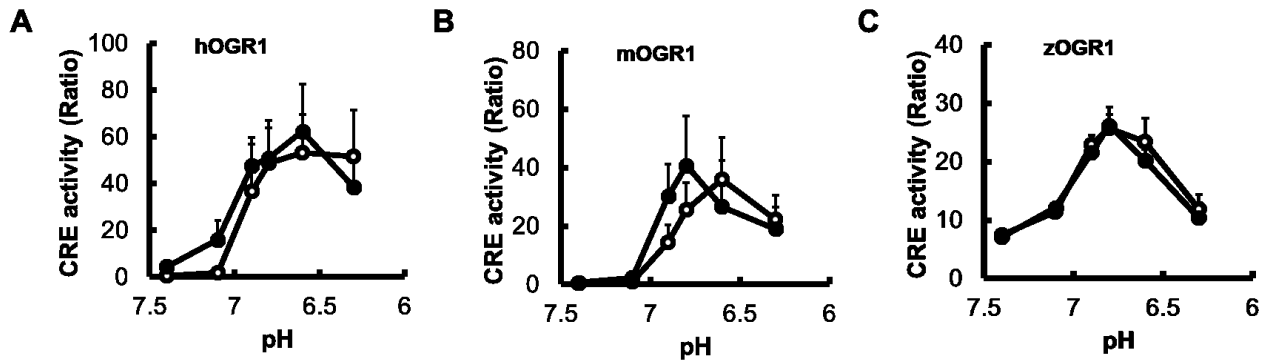


図5 OgerinによるOGR1活性化作用の種による違い。Ogerinは(A)ヒト(hOGR1)、(B)マウス(mOGR1)のOGR1の活性化を増強するが、(C)ゼブラフィッシュ(zOGR1)OGR1の活性化には影響を与えない。

を用いて ogerin に対する感受性を実験で調べたところ、ogerin による活性化が検出される OGR1 と検出されない OGR1 が存在することが明らかとなりました(図5)。この結果は、報告されている結合部位以外の未知のアミノ酸残基の相違が、ogerin との結合や応答能に差を生じさせているものと考えられます。本実験によりアミノ酸の1次配列の情報のみで各種のモデル動物に ogerin を投与し、その影響を解釈することには注意が必要であることが明らかとなりました<sup>23)</sup>。

## 8. まとめ

TSH 受容体というメジャーな GPCR の作用機構の研究から、プロトンや生体微量元素を感知する新規 GPCR の研究へと研究対象が変化してきました。いま思い返せば研究の進展には、下垂体研究が絡んでいることが多いことに気がつきます。「新たな発見は下垂体から」です。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究開始時にご指導いただいた故・近藤洋一教授、岡島史和教授をはじめ、群馬大学の皆さま、明治大学農学部に赴任後、研究を推進してくれている細胞情報制御学研究室の院生・学生の皆さん、下垂体研究をご指導くださった加藤幸雄教授(明治大学名誉教授)、共同研究を通じて研究を支えてくださっている吉田彩舟先生(慈恵医科大学)、堀口幸太郎先生(杏林大学)、中倉敬先生(帝京大学)にお礼を申し上げます。

本稿の執筆の機会を与えてくださった菊地元史先生(自治医科大学教授)はじめ関係の方々にこの場を借りて感謝申し上げます。

## 【引用文献】

1. Tomura H, Itoh H, Sho K, Sato K, Nagao M, Ui M, Kondo Y, Okajima F. Betagamma subunits of pertussis toxin-sensitive G proteins mediate A1 adenosine receptor agonist-induced activation of phospholipase C in collaboration with thyrotropin. A novel stimulatory mechanism through the cross-talk of two types of receptors. *J Biol Chem* 1997; **272**: 23130-7.
2. Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 2003; **425**: 93-8.
3. Wang JQ, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, Komachi M, Malchinkhuu E, Murata N, Kimura T, Kuwabara A, Wakamatsu K, Koizumi H, Uede T, Tsujimoto G, Kurose H, Sato T, Harada A, Misawa N, Tomura H, Okajima F. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2004; **279**: 45626-33.
4. Ishii S, Kihara Y, Shimizu T. Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2005; **280**: 9083-7.
5. Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell Signal* 2005; **17**: 1466-76.
6. Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 2002; **30**: 533-40.
7. Okajima F. Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cell Signal* 2013; **25**: 2263-71.

8. Tomura H, Wang JQ, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, Kon J, Misawa N, Sato K, Okajima F. Prostaglandin I(2) production and cAMP accumulation in response to acidic extracellular pH through OGR1 in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 34458-64.
9. Tomura H, Wang JQ, Liu JP, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, Nochi H, Tamoto K, Im DS, Sato K, Okajima F. Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in response to acidic pH through OGR1 in a human osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 2008; **23**: 1129-39.
10. Aoki H, Mogi C, Hisada T, Nakakura T, Kamide Y, Ichimonji I, Tomura H, Tobo M, Sato K, Tsurumaki H, Dobashi K, Mori T, Harada A, Yamada M, Mori M, Ishizuka T, Okajima F. Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model. *PLoS One* 2013; **8**: e79985.
11. Boden G, Essa N, Owen OE, Reichle FA. Effects of intraduodenal administration of HCl and glucose on circulating immunoreactive secretin and insulin concentrations. *J Clin Invest* 1974; **53**: 1185-93.
12. Nakakura T, Mogi C, Tobo M, Tomura H, Sato K, Kobayashi M, Ohnishi H, Tanaka S, Wayama M, Sugiyama T, Kitamura T, Harada A, Okajima F. Deficiency of proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Endocrinology* 2012; **153**: 4171-80.
13. Horiguchi K, Higuchi M, Yoshida S, Nakakura T, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Kato T, Kato Y. Proton receptor GPR68 expression in dendritic-cell-like S100 $\beta$ -positive cells of rat anterior pituitary gland: GPR68 induces interleukin-6 gene expression in extracellular acidification. *Cell Tissue Res* 2014; **358**: 515-25.
14. Satou K, Mochimaru Y, Nakakura T, Kusada T, Negishi J, Musha S, Yoshimura N, Kato Y, Tomura H. Easy detection of hormone secretion from LbetaT2 cells by using Gaussia luciferase. *J Reprod Dev* 2017; **63**: 199-204.
15. Kojima R, Horiguchi K, Mochimaru Y, Musha S, Murakami S, Deai M, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H. Characterization of molecular mechanisms of extracellular acidification-induced intracellular Ca(2+) increase in LbetaT2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; **517**: 636-641.
16. Musha S, Yoshida S, Murakami S, Kojima R, Deai M, Saso N, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H. Involvement of GPR4 in increased growth hormone and prolactin expressions by extracellular acidification in MtT/S cells. *J Reprod Dev* 2020.
17. Kanasaki H, Mutiara S, Oride A, Purwana IN, Miyazaki K. Pulse frequency-dependent gonadotropin gene expression by adenylate cyclase-activating polypeptide 1 in perfused mouse pituitary gonadotroph LbetaT2 cells. *Biol Reprod* 2009; **81**: 465-72.
18. Musha S, Murakami S, Kojima R, Tomura H. Increased luminescence of the GloSensor cAMP assay in LbetaT2 cells does not correlate with cAMP accumulation under low pH conditions. *J Reprod Dev* 2019; **65**: 381-388.
19. Abe-Ohya R, Ishikawa T, Shiozawa H, Suda K, Nara F. Identification of metals from osteoblastic ST-2 cell supernatants as novel OGR1 agonists. *J Recept Signal Transduct Res* 2015; **35**: 485-92.
20. Negishi J, Omori Y, Shindo M, Takanashi H, Musha S, Nagayama S, Hirayama J, Nishina H, Nakakura T, Mogi C, Sato K, Okajima F, Mochimaru Y, Tomura H. Manganese and cobalt activate zebrafish ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 but not GPR4. *J Recept Signal Transduct Res* 2017; **37**: 401-408.
21. Mochimaru Y, Negishi J, Murakami S, Musha S, Sato K, Okajima F, Tomura H. Metals Differentially Activate Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1 in Various Species. *Zoolog Sci* 2018; **35**: 109-114.
22. Huang XP, Karpiak J, Kroeze WK, Zhu H, Chen X, Moy SS, Saddoris KA, Nikolova VD, Farrell MS, Wang S, Mangano TJ, Deshpande DA, Jiang A, Penn RB, Jin J, Koller BH, Kenakin T, Shoichet BK, Roth BL. Allosteric ligands for the pharmacologically dark receptors GPR68 and GPR65. *Nature* 2015; **527**: 477-83.
23. Murakami S, Mochimaru Y, Musha S, Kojima R, Deai M, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H. Species-dependent enhancement of ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 activation by ogerin. *Zoolog Science* 2020 in press.

※本稿は、第 34 回日本下垂体研究会学術集会で「吉村賞」を受賞した研究内容の紹介です。



## 短報-1

## ウナギにおける新規ナトリウム利尿ペプチドの発見と脳内発現領域

東邦大学理学部生物分子科学科

片山 侑駿

yukitoshi.katayama@sci.toho-u.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.7, 19, 2020)

C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は、主に脳に発現するペプチドホルモンであるが、下垂体や心臓などの末梢組織でも発現しており、多彩な機能を有していることが予想されている1)。CNPの生理作用については、哺乳類で骨代謝に関わることがよく知られているが2)、そのほかの組織における作用は不明な点が多い。我々はこれまで、硬骨魚類のウナギ (*Anguilla Japonica*) を用いて CNP の生理作用を検討してきた。硬骨魚類では全ゲノム重複によって CNP が多様化しているため、CNP の作用を分子ごとに切り分けて解析可能である。これまでウナギには CNP1, CNP3, CNP4 の3つのサブタイプが同定されていたが、今回我々がウナギのゲノムデータベースを探索したところ、未知の CNP 様遺伝子の部分配列を取得した。そこで本研究では、この CNP 様遺伝子の基礎的知見を収集するため、CNP 様遺伝子の mRNA 配列を同定し、その組織発現を調べた。

まず、得られた部分配列に特異的なプライマーを設計し、RACE法を用いて mRNA 全長配列を取得した。そこから得られたアミノ酸配列をもとに系統樹解析を行うと、新規 CNP 様遺伝子は CNP4 のクレードの中に含まれた。さらに、新規 CNP 様遺伝子のゲノム配列を用いてシソーラ解析を行ったところ、従来の CNP4 と非常によく似た遺伝子の並びであったことから、この新規遺伝子は CNP4 の遺伝子重複で生まれたと考えられた。そこで、この新規遺伝子を CNP4b と命名し、従来のウナギ CNP4 遺伝子を便宜上 CNP4a と呼ぶことにした。次に他の脊椎動物のシソーラを詳しく解析したところ、メダカ、ゼブラフィッシュ、トラフグで見ついている“CNP4”は、ウナギ CNP4b と相同であることがわかった。一方、ヒトの“CNP” (サブタイプはないと考えられている) は、ウナギ CNP4a と相同であると考えられた。次にウナギ CNP4b の組織別の発現を RT-PCR 法で調べたところ、心臓には発現がみられず主に脳、下垂体、胃、脾臓、皮膚に発現していた。これは脳だけに発現するウナギ CNP4a とは異なるパターンであった。前述のように CNP は神経ペプチド

として脳で多様な機能を有していると予想されているので、ウナギ CNP4a および CNP4b の mRNA の脳内局在を *in situ* hybridization 法を用いて詳しく調べた。その結果、ウナギ CNP4a は主に前脳に発現するのに対し、CNP4b は延髄の浸透圧調節や血圧調節に関わる部位に強く発現していた (図1)。

以上のことから、ウナギ CNP4b は脳および末梢器官において CNP4a と異なる生理作用をもつ可能性が示唆された。現在、受容体との結合性を調べるとともに、生理機能、特にウナギが淡水や海水に適応する際の浸透圧調節における役割の検討を進めている。

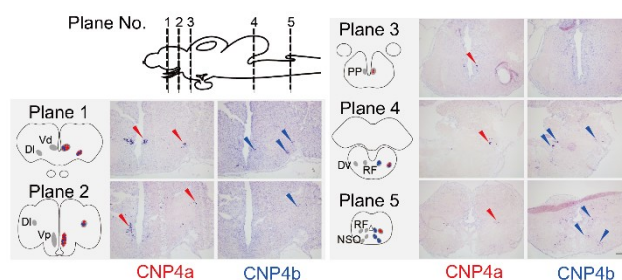


図1. CNP4a と CNP4b のウナギ脳内における発現領域。DI, 終脳背外側野; VD, 終脳腹背側野; VP, 終脳後交連核; PP, 小細胞性視索前野; DV, 下行三叉神経根; RF, 網様体; NSO, 迷走神経運動核。

## 【引用文献】

- 1) Tsukada, T., 2016. C-type Natriuretic Peptides, in: Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K. (Eds.), Handbook of Hormones. Academic Press, pp. 286-290.
- 2) Chusho, H., Tamura, N., Ogawa, Y., Yasoda, A., Suda, M., Miyazawa, T., Nakamura, K., Nakao, K., Kurihara, T., Komatsu, Y., Itoh, H., Tanaka, K., Saito, Y., Katsuki, M., Nakao, K., 2001. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci USA. 98, 4016-4021.

※本報は第34回日本下垂体研究会学術集会で最優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

## 短報-2

## マコガレイの摂食関連神経ペプチドと視覚オプシンの発現

北里大学海洋生命科学研究科

佐藤 生

mf18006@st.kitasato-u.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.7, 20-21, 2020)

カレイ類の成長は有彩色光照射により促進する<sup>1) 2)</sup>。これは眼を主とする光受容システムによって感知された光の特定の波長が摂食や代謝に関与する生物学的作用に影響を与えることによって起こると考えられる。そのメカニズムを明らかにするための一端としてマコガレイ (*Pseudopleuronectes yokohamae*) を研究材料とし、変態前後の仔稚魚期におけるオプシンの発現動態、および稚魚において有彩色光が神経ペプチドの発現に与える効果について研究した。

マコガレイの視覚オプシン遺伝子 8 種類 (RH1、SWS1、SWS2A、SWS2B、RH2-A、RH2-B、RH2-C、LWS) を cDNA クローニングにより同定し、変態前後における各視覚オプシン遺伝子の発現動態を qRT-PCR により測定した。その結果、SWS1、SWS2B、RH2-B の発現量は変態前から変態後にかけて減少し、SWS2A、RH1、RH2-C の発現量は変態前から変態後にかけて増加していた。また、RH2-A は変態前および変態中にのみ発現が認められ、変態後は発現が検出されなかった。

神奈川県水産技術センターにおいて孵化後 85 日のマコガレイ稚魚に青、緑、赤、白 LED 光および蛍光灯光 (対照区) をそれぞれ照射した 52 日間の飼育実験が行われた<sup>3)</sup>。その結果、緑 LED 光区と青 LED 光区において他より高い成長が認められた<sup>3)</sup>。飼育後の個体から脳を採取し各種摂食関連神経ペプチド、メラニン凝集ホルモン 1 (MCH1)、MCH2、プロオピオメラノコルチン-C (POMC-C)、アグーチ関連ペプチド 1 (AgRP1)、AgRP2、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP)、オレキシン (ORX)、およびニューロペプチド Y (NPY) の遺伝子発現量を qRT-PCR により定量した結果、MCH1 および MCH2 の遺伝子発現量が青 LED 光区で他の試験区より高いことがわかった。MCH には摂食促進作用がある<sup>4)</sup>ことから、青色光照射により増加したこれらのペプチドがマコガレイの摂食を促進し成長を促したと考えられる。以上の結果から、有彩色光による成長促進効果は脳内の MCH 遺伝子発現量

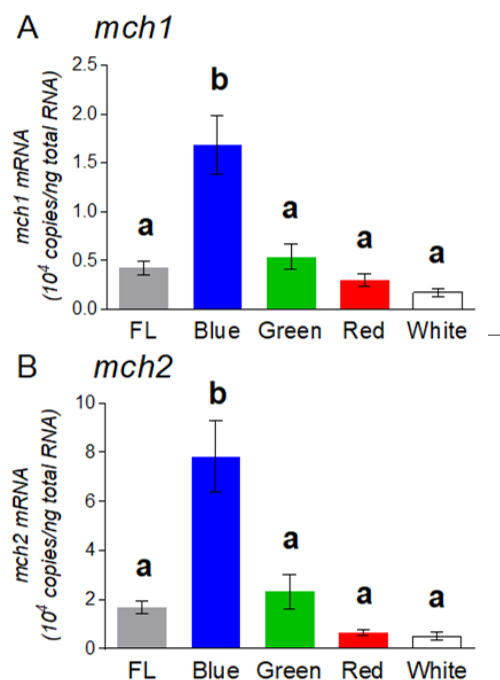


図 1. 青、緑、赤、白 LED 光および蛍光灯光を照射して飼育したマコガレイ脳における MCH1 (A) および MCH2 (B) の遺伝子発現量 (One-way ANOVA,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ )

が増加し摂食量が増えた結果である可能性が示唆された<sup>5)</sup>。

本研究により、マコガレイに 8 種類のオプシン遺伝子が存在し、それらの発現が変態前と変態後で切り替わることがわかった。これは成長に伴う深水域への移動による光環境の変化に対する適応と推測される。また、青色光により成長が亢進したマコガレイにおいて MCH 遺伝子発現の増加が認められたことから、光刺激を摂食等の生理活動を司る生体内システムへと伝達する神経ペプチドとして MCH が有力な候補であることが示唆された。

## 【引用文献】

- 1) Yamanome T, Mizusawa K, Hasegawa E, Takahashi A, 2009, Green light stimulates somatic growth in the barfin flounder *Verasper moseri*. J Exp. Zool. A: Ecol. Genet. Physiol. 311, 73–79.

- 2) Shimizu D, Kasagi S, Takeuchi R, Maeda T, Furufuji S, Mizusawa K, Andoh T, Takahashi A, 2019, Effects of green light on the growth of spotted halibut, *Verasper variegatus*, and Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and on the endocrine system of spotted halibut at different water temperatures. Gen. Comp. Endocrinol. **271**, 82–90.
- 3) 中村良成, 鈴木将平, 古川大, 2019, マコガレイの成長を促進する特定波長光, 豊かな海, **48**, 18–23.
- 4) Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E, 1996, A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. Nature **380**, 243–247.
- 5) Sato I, Mizusawa K, Kasagi S, Takahashi A, 2020, Blue light stimulates the expression of the genes for melanin-concentrating hormones in marbled sole, *Pseudopleuronectes yokohamae*. Aquac. Sci. (in press)

※本報は第 34 回日本下垂体研究会学術集会で最優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

### 短報-3

## キンギョの摂食行動と情動行動に及ぼす アルギニンバソトシン (AVT) の脳室内投与の影響

富山大学大学院理工学教育部生物学専攻

渡邊 桂佑

m1841320@ems.u-toyama.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.7, 21-22, 2020)

アルギニンバソトシン (AVT) は 9 アミノ酸残基からなるペプチドであり、下垂体後葉ホルモンとして水・電解質代謝などの調節に関与する。一方で、中枢作用として社会性行動に影響を及ぼすことが知られている。他の中枢作用として、AVT の脳室内投与はニジマスにおいて摂食行動に影響を及ぼすことが報告されている<sup>1)</sup>。しかしながら、AVT の中枢作用は社会性行動に関する影響以外にはほとんど解明されていなかった。キンギョ (*Carassius auratus*) において、AVT 様免疫陽性神経線維は脳の広範な領域に存在する<sup>2)</sup>ことから社会性行動以外にも中枢機能を有することが考えられた。そこで、キンギョの摂食行動および情動行動における AVT の脳室内投与の影響について探った。加えて、AVT の作用を介する AVT 受容体も探った。

まず、摂食行動に及ぼす AVT の影響について探った。AVT の脳室内投与を施したキンギョに浮遊性の顆粒餌を与え、30 分後の餌の残存量を計測することで累積の摂食量を算出した。その結果、5 および 10 pmol / g BW (体重) の AVT が摂食量を有意に減少させることが分かった。続いて、AVT の影響が V1a 受容体を介するか調べるため、V1a 受容体アンタゴニストである Manning Compound (MC) を同時投与して、

摂食行動に及ぼす影響を調べた。その結果、AVT による摂食量の減少が MC によって有意に阻害された (図 1)。これらのことから、キンギョにおいて AVT は V1a 受容体を介して摂食抑制作用を示すことが示唆された。次に、情動

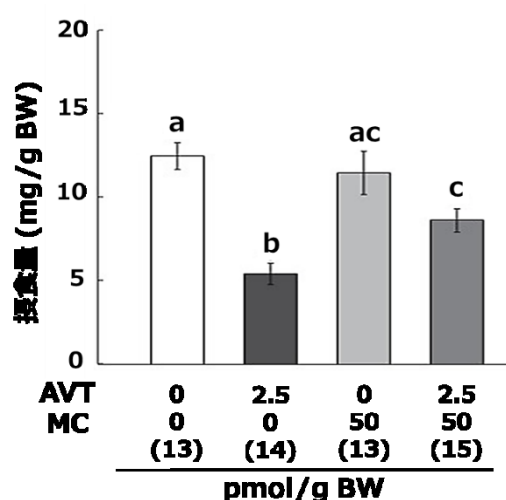


図 1. 摂食量に及ぼす AVT および MC の影響  
二元配置分散分析 Bonferroni 法 ( $p < 0.05$ )、  
かっこ内の数字は実験に用いた個体数を示す。  
Peptides, **119**, 170118, 2019 より引用、  
一部改変。



行動に及ぼす AVT の影響について探った。キンギョは水槽の下層を好んで遊泳する深み選好性行動を示し、不安惹起剤の投与によって深み選好性行動が増強されることが明らかにされている<sup>3)</sup>。そこで、AVT の脳室内投与を施したキンギョを深さ 30 cm の実験水槽に移して 30 分間の遊泳行動を観察した。水槽の深さの半分より上を上層、下を下層と設定して、それぞれの領域の滞在時間を測定した。その結果、1、5 および 10 pmol / g BW の AVT が下層滞在時間を有意に増加させることが分かった。続いて、AVT の影響が V1a 受容体を介するか調べるため、MC を同時投与して、情動行動に及ぼす影響を調べた。その結果、AVT による下層滞在時間の増加が MC によって有意に阻害された

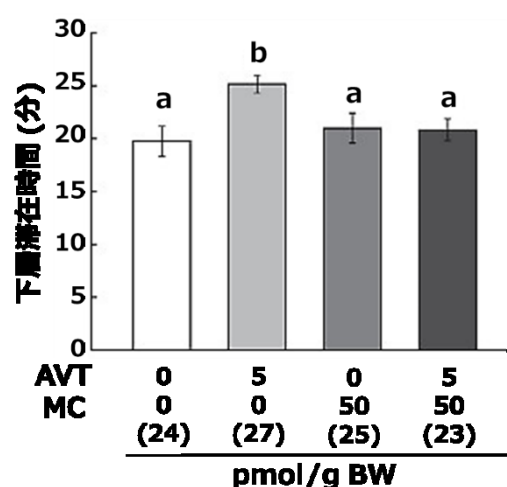


図 2. 下層滞在時間に及ぼす AVT および MC の影響

二元配置分散分析 Bonferroni 法 ( $p < 0.05$ )、かっこ内の数字は実験に用いた個体数を示す。Peptides, 119, 170118, 2019 より引用、一部改変。

(図 2)。これらのことから、キンギョにおいて AVT は V1a 受容体を介して不安様行動の惹起作用を示すことが示唆された。

本研究の結果より、キンギョにおいて AVT は摂食抑制作用および不安様行動の惹起作用を有することが示唆された。また、これらの作用は V1a 受容体を介して発揮されることが示唆された。今後、内因性の AVT が摂食行動および情動行動に果たす役割が不明であることから、摂食行動や不安様行動が変化した時の *avt* mRNA の発現動態について調べる必要がある。なお、本発表の内容は Peptides, 119, 170118, 2019 に公表された。本研究の遂行にあたり、日本科学協会の笹川科学研究助成を受けました。ここに深く感謝いたします。

#### 【引用文献】

- 1) Gesto M, Soengas JL, Rodríguez-Illamola A, Míguez JM, 2014, Arginine vasotocin treatment induces a stress response and exerts a potent anorexigenic effect in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J Neuroendocrinol. 26(2), 89-99.
- 2) Thompson RR, Walton JC, 2009, Vasotocin immunoreactivity in goldfish brains: characterizing primitive circuits associated with social regulation. Brain Behav Evol. 73(3), 153-64.
- 3) Sachuriga, Iinuma N, Shibata H, Yoshida D, Konno N, Nakamachi T, Matsuda K, 2019, Intracerebroventricular administration of sulphated cholecystokinin octapeptide induces anxiety-like behaviour in goldfish. J Neuroendocrinol. 31(1), e12667(1-9).

※本報は第 34 回日本下垂体研究会学術集会で優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

#### 短報-5

#### 食虫目スunks下垂体隆起部における LH 産生細胞を中心とした構成細胞の形態学的研究

埼玉大学大学院理工学研究科生命科学系専攻生体制御学コース

塙 堇

s.hanawa.426@ms.saitama-u.ac.jp

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.7, 22-23, 2020)

ジャコウネズミともよばれるスunks (*Suncus murinus*) は食虫目に分類される小型哺乳動物であり、交尾排卵を行う<sup>1)</sup>。ヒツジ下垂体隆起部に存在する黄体形成ホルモン (LH) 産生細胞は卵巣摘除後もその密度や分布が変化し

ないといった報告などから<sup>2)</sup>、下垂体隆起部は主部とは異なる調節機構を持つと考えられている。これまでに我々はスunks下垂体隆起部には、4 種類ホルモン (甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、濾胞刺激ホルモン、副腎皮

質刺激ホルモン) が産生・分泌されること、また濾胞星状細胞 (FS 細胞) の存在を明らかにしたが、それらの分布や機能は不明である。ラットを除く哺乳類下垂体隆起部を構成するホルモン産生細胞は、LH/FSH 産生細胞の割合が高いことが知られているため<sup>3)</sup>、本研究では、スunks下垂体隆起部の形態と LH 産生細胞の分布を明らかにし、卵巣摘除による LH 産生細胞の形態学的変化を検討した。

HE 染色の結果、スunksの下垂体隆起部は吻側から尾側にかけて全長約 500  $\mu\text{m}$  であり、吻側で正中隆起の脳底側を覆い、尾側で下垂体柄を覆う様に存在していた。吻側から隆起部を形態学的に 3 つの領域 (position 1 ~ 3) に分類し、LH に対する免疫組織化学を行うと、LH 免疫陽性細胞数は position 1 で  $23.5 \pm 9.6$  cells/mm<sup>2</sup>、position 2 で  $274.2 \pm 108.9$  cells/mm<sup>2</sup>、position 3 で  $1341.7 \pm 134.4$  cells/mm<sup>2</sup> であり、尾側で高密度に分布し、吻側で非常に少なかった。隆起部吻側には SOX2 陽性の FS 細胞が高密度に分布しており、偽濾胞構造が連続して見られた (図 1)。

卵巣摘除を行った結果、偽手術群と比較して LH 免疫陽性細胞数に変化はなかったが、卵巣摘除した LH 免疫陽性反応の染色性が低下していた。電子顕微鏡観察から、偽手術群の LH 産生細胞では電子密度が高く小型と電子密度が低く大型の 2 種類の分泌顆粒が細胞質全体に豊富に存在する様子が観察されたが、卵巣摘出群の LH 産生細胞では分泌顆粒数が減少しており、特にそれは小型分泌顆粒において顕著であった (図 2)。加えて、ゴルジ装置及び粗面小胞体の発達が見られ、卵巣摘除による LH の分泌及び合成の亢進が示された。

本研究によりスunks下垂体隆起部の形態と、スunks隆起部吻側では FS 細胞が多く尾側で LH 産生細胞が多く分布することが明らかとなり、吻側と尾側で機能が異なる可能性が示された。また、隆起部 LH 産生細胞は視床下部-下垂体-性腺軸のネガティブフィードバックを受ける可能性が示唆された。



矢印：SOX2 免疫陽性細胞

図 1. 隆起部吻側に見られる SOX2 陽性細胞が形成する偽濾胞構造

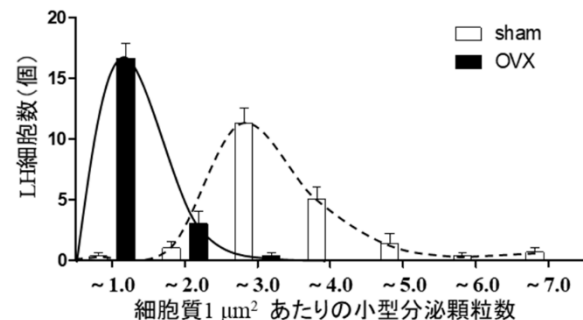


図 2. OVX 処理の影響による小型分泌顆粒数の変化

#### 【引用文献】

- 1) Bedford JM, Cooper GW, Phillips DM, Dryden GL, 1994, Distinctive features of the gametes and reproductive tracts of the Asian musk shrew, *Suncus murinus*. Biol. Reprod. 50, 820-834.
- 2) Skinner DC, Robinson JE, 1996, The pars tuberalis of the ewe: no effect of season or ovariectomy on the distribution, density or presence of immunoreactive cells. Cell Tissue Res. 284, 117-123.
- 3) Gross DS, 1984, The mammalian hypophysial pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. Gen. Comp. Endocrinol. 56, 283-298

※本報は第 34 回日本下垂体研究会学術集会で優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

## 短報-5

## アクチビン及びインヒビンの視床下部キスペプチンニューロンに対する直接作用について

島根大学医学部産科婦人科

Tumurgan Zolzaya

zolzaya.tumurgan@gmail.com

日本下垂体研究会誌 Journal of Japan Society for Pituitary Research (vol.7, 24, 2020)

女性の性周期は視床下部-下垂体-性腺軸 (HPG axis) により制御されている。現在のところ視床下部キスペプチンニューロンが視床下部 GnRH ニューロンからの GnRH 分泌を制御し、GnRH が下垂体ゴナドトロピン産生細胞からの Luteinizing hormone (LH)、follicle-stimulating hormone (FSH) の合成・分泌を促進し、LH、FSH が卵巣に作用して卵胞形成及び性ステロイド産生・分泌を司っていることが分かっている。一方、卵巣の局所因子として同定されたアクチビンは卵胞発育やステロイド合成に促進的に作用し、同じく卵巣局所因子であるインヒビン、フォリスタチンはアクチビンの作用を抑制する。アクチビン、インヒビン、フォリスタチンは下垂体前葉にも存在し、主として FSH の合成・分泌に関与することが明らかになっている。

HPG axis の頂点に位置するキスペプチンニューロンがアクチビン、インヒビン、フォリスタチンの影響を受けるか否かを検討すべく、視床下部弓状核キスペプチンニューロン細胞株 mHypoA-55 を用いて実験を行った。視床下部弓状核に存在するキスペプチンニューロンは GnRH のパルス状分泌を制御し、エストラジオールによるネガティブフィードバック機構に関与すると考えられている。同部位のキスペプチンニューロンはダイノルフィン、ニューロキニン B を共発現しており KNDy ニューロンとも呼ばれるが、mHypoA-55 細胞も KNDy ニューロンの性質を有していることが分かっている。

mHypoA-55 細胞をアクチビン A で刺激するとキスペプチンをコードする Kiss-1 遺伝子及びキスペプチン発現は有意に増加した。一方、mHypoA-55 細胞をフォリスタチンで刺激すると、Kiss-1 遺伝子及びキスペプチン発現は有意に減少することが分かった。一方インヒビン A は Kiss-1 遺伝子発現を抑制したが、インヒビン B に抑制効果は認められなかった。またアクチビンによる Kiss-1 遺伝子発現はフォリスタチン及びインヒビン A の存在下で抑制された 1)。これらの結果は視床下部キスペプチンも、卵巣局所因子であるアクチビン、インヒビン、フォリスタチンによる制御を受けている可能性を示唆

している。脳内にはフォリスタチン、並びにアクチビン、インヒビンを構成するサブユニット発現がある事が分かっている。これまで卵巣及び下垂体の局所因子として HPG axis に関与するとされてきたアクチビン、インヒビン、フォリスタチンは脳内において GnRH 制御因子であるキスペプチンニューロンを制御している可能性がある。脳内アクチビン、インヒビン、フォリスタチン発現が何によって制御されるのか、更に検討を進める予定である。

## 【引用文献】

- 1) Z. Tumurgan, H. Kanasaki, T. Tumurbaatar, A. Oride, H. Okada, T. Hara, S. Kyo, Role of activin, follistatin, and inhibin in the regulation of Kiss-1 gene expression in hypothalamic cell models, *Biol Reprod*, 101 (2019) 405-415.

※本報は第 34 回日本下垂体研究会学術集会で優秀発表賞を受賞した研究内容の紹介です。

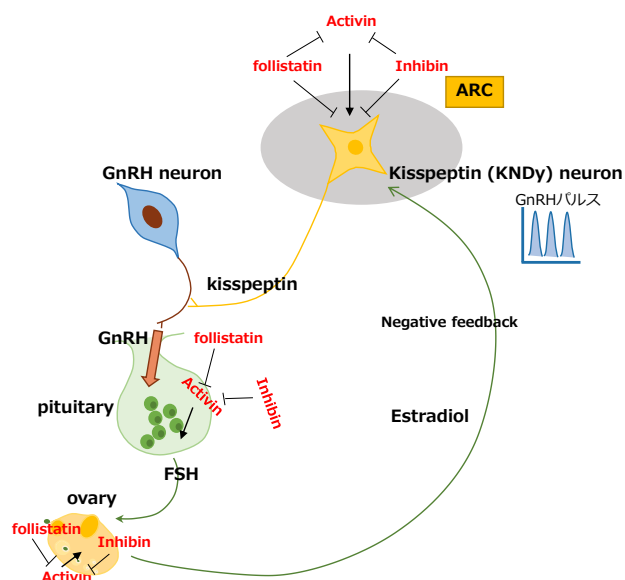


図 HPG axis におけるアクチビン/インヒビン/フォリスタチン。卵巣局所因子として発見されたアクチビン/インヒビン/フォリスタチンは下垂体前葉で FSH 合成分泌に関与する他、視床下部キスペプチンニューロンの制御を行っている可能性がある。



## 学術集会報告

## 日本下垂体研究会第34回学術集会を終えて

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.7, 25, 2020)

令和元年8月7日から9日までの3日間、島根県玉造温泉にて第34回日本下垂体研究会学術集会を開催させて頂きました。「神の湯」と呼ばれる玉造温泉に80名以上もの下垂体研究者に集まり頂き、お陰様で例年通りの楽しい集会を開催することが出来ました。東北大学薬学部の福永浩司先生には特別講演で創薬に至る研究についてお話頂き、スポンサードセミナーでは生殖医療の第一線でご活躍のミオファティリティークリニックの見尾保幸先生にタイムラプスで観察されたヒト受精卵の不思議な現象をご紹介して頂きました。シンポジウム1「非モデル生物の下垂体を中心とする内分泌学」では新進気鋭の若手研究者による素晴らしい研究成果の発表があり、シンポジウム2「生殖機能の中枢制御」では私が公私共にお世話になっている先生方を中心に講演を賜りました。33題もの一般演題をご発表頂き、例年通りの盛況な集会になったことに安堵しております。ご参加頂きました先生方に心より感謝し、御礼申し上げます。

同じ宿に泊まり、寝食を共にして研究その他諸々について楽しく語り合う下垂体研究会の伝統の素晴らしさを改めて感じました。私自身も集会を主催する立場ながら大いに楽しませて頂きました。若い素晴らしい研究者たちにご参加頂き、先輩方から受け継いだ本研究会は継続し、益々発展するだろうと確信いたしました。

来年度の第35回集会は「令和」ゆかりの地太宰府天満宮近くの福岡県久山温泉で産業医科大学の上田陽一先生のご主催で開催されます。来年もまた下垂体研究会の仲間たちとお会い出来ますことを楽しみにしております。



写真 1. 会場風景



写真 2. 参加者集合写真（懇親会）



写真 3. 吉村賞受賞者



写真 4. 発表賞受賞者

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、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、内分泌学、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総合教育部門

電話: 0285-58-7314 Fax: 0285-44-5243

編集長 : 菊地元史: kikuchim@jichi.ac.jp

編集委員: 藤原 研: ken\_fuji@jichi.ac.jp

東 森生: azumam@jichi.ac.jp

## 編集後記

新元号となり、もうすぐ1年が経とうとしております。世間は自粛ムードですが、今こそ自分磨き(研究、教育、~~私生活~~)に励み、令和時代の下垂体研究会を盛り上げて参りたいと存じます。

会員の皆様のご協力を賜り、「令和第1号」となる「日本下垂体研究会誌第7号」を発行することができました。本号には、明治大学の加藤幸雄先生がご寄稿くださいました「論文Ⅰ」、戸村秀明先生にご執筆いただいた吉村賞受賞内容「論文Ⅱ」、発表賞受賞者の「短報」を5報に加えて、昨年度開催された第34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。特に、加藤先生の記事内容は、下垂体前葉内の幹・前駆細胞の解析をまとめられたロマン溢れる内容となっており、まだまだ下垂体研究には完結していない、伸びしろのある部分が大いに存在することを認識致しました。充実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、本年の第35回日本下垂体研究会学術集会は産業医科大学の上田陽一先生を会長に福岡県で開催されます。「Beautiful Harmony of Pituitary Research」を熱く議論し、太宰府天満宮にて下垂体研究のさらなる発展を祈願したいですね。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)



### 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総合教育部門

電話: 0285-58-7314

Fax : 0285-44-5243

編集長 : 菊地元史 kikuchim@jichi.ac.jp

編集委員: 藤原 研 ken\_fuji@jichi.ac.jp

東 森生 azumam@jichi.ac.jp