

下垂体前葉の発生・分化の過程で 分泌顆粒の多様性はどのように確立されるか

(課題番号 14570001)

平成 14 年度～平成 16 年度科学研究費補助金
基盤研究 (C)(2) 研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者 阪井 裕子
(旭川医科大学医学部助手)

はしがき

下垂体前葉は胎生期に順次分化を遂げた結果生じる多様な内分泌細胞の集合体であり、成体では少なくとも5種類の内分泌細胞が区別される。各内分泌細胞は、微細構造および構成成分に関して特徴のある分泌顆粒を有するが、どのようなメカニズムで内分泌細胞の分泌顆粒の多様性が確立するのかに関しては解明されていない。

本研究では、内分泌細胞の分泌顆粒にペプチドホルモンとともに局在するグラニン蛋白群に着目し、グラニン蛋白群の発現パターンや細胞内局在と各内分泌細胞の分泌顆粒の多様性との関係を明らかにすることを試みた。

研究組織

研究代表者： 阪井 裕子 （旭川医科大学医学部・助手、研究者番号 40041826）

研究分担者： 渡部 剛 （旭川医科大学医学部・教授、研究者番号 80220903）

研究経費（交付決定額）

年度	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	1,100 千円	0 円	1,100 千円
平成 15 年度	1,000 千円	0 円	1,000 千円
平成 16 年度	900 千円	0 円	900 千円
総計	3,000 千円	0 円	3,000 千円

研究発表

1. 原著論文

- (1) Sakai Y, Hosaka M, Hira Y, Harumi T, Ohsawa Y, Wang H, Takeuchi T, Uchiyama Y, Watanabe T: Immunocytochemical localization of secretogranin III in the anterior lobe of male rat pituitary glands. *J Histochem Cytochem* 51:227-238 (2003)
- (2) Hosaka M, Suda M, Sakai Y, Izumi T, Watanabe T, Takeuchi T: Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem* 279:3627-3634 (2004)
- (3) Sakai Y, Hosaka M, Yoshinaga A, Hira Y, Harumi T, Watanabe T: Immunocytochemical localization of secretogranin III in the endocrine pancreas of male rats. *Arch Histol Cytol* 67:57-64 (2004)

2. 学会発表 (ポスターおよび口演)

- (1) 第 108 回日本解剖学会総会 (平成 15 年 4 月、福岡)
「成熟雄マウス下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞におけるグラニン蛋白の局在」
阪井裕子、平 義樹、渡部 剛
- (2) 第 49 回解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 (平成 15 年 9 月、盛岡)
「内分泌細胞におけるセクレトグラニン III の細胞内局在」
阪井裕子、平 義樹、渡部 剛
- (3) 第 16 回国際解剖学会者会議 (IFAA)(平成 16 年 8 月、京都)
「Immunocytochemical identification of GM1-ganglioside-rich lipid microdomains in the rat anterior pituitary.」
阪井裕子、平 義樹、渡部 剛
- (4) 第 110 回日本解剖学会総会 (平成 17 年 3 月、富山)
シンポジウム「分泌細胞研究の新しい試み」:「分泌経路の解析を目的とした電顕免疫組織化学の固定・包埋法の改良」
阪井裕子、平 義樹、渡部 剛

研究成果

研究の背景と目的

下垂体前葉は胎生期に順次分化を遂げた結果生じる多様な内分泌細胞の集合体であり、成体では少なくとも5種類の内分泌細胞が区別される。各内分泌細胞はそれぞれ固有のペプチドホルモンを合成・分泌するが、このホルモンを蓄積する細胞内小器官である分泌顆粒の微細構造や構成成分についても、各内分泌細胞固有の特徴がある。しかしながら、この内分泌細胞の分泌顆粒の多様性を確立する機構やその生理的意義に関しては不明の点が多い。

これらの内分泌細胞では、それぞれに固有のペプチドホルモンとともにグラニン蛋白群と総称される酸性分泌蛋白が発現しており、やはり分泌顆粒に選択的に輸送されることが知られている。この蛋白群に属する代表的な蛋白、クロモグラニン A(CgA)、クロモグラニン B(CgB)、セクレトグラニン II(SgII)、セクレトグラニン III(SgIII) の発現パターンは下垂体前葉の各内分泌細胞間で異なっており、この差異が分泌顆粒の形態やサイズの多様性に関係している可能性がある。

そこで、本研究では、ラット下垂体前葉におけるグラニン蛋白群の分布と細胞内局在を免疫組織化学法を用いて詳細に解析し、グラニン蛋白群の発現パターンと各内分泌細胞の分泌顆粒の多様性との関係について検討した。

研究方法と実験結果の概略

ラットのグラニン蛋白に対する特異抗体の準備

代表的なグラニン蛋白である CgA、CgB、および SgII に対する特異抗体は我々のこれまでの研究過程で作成しており、今回の研究でもこれらの抗体 (code: CgA-C#101、CgB-C#4、SgII-C#23) を活用した。また、最近我々が CgA と特異的に結合する蛋白として再発見した SgIII に関しては、今回新たにそのカルボキシル末端側断片 (rat SgIII373-491) と GST との融合蛋白を抗原としてウサギ背部皮下にアジュバントとともに接種し、ポリクローナル抗体 (code: SgIII-C#6) を作成した。

Immunoblot 法および吸収試験による抗体の特異性の検討

まず、ラット下垂体前葉および副腎の組織抽出液を調製し、上記の抗グラニン蛋白抗体の特異性を Immunoblot 法によって検討した。その結果、各グラニン蛋白のアミノ酸配列から予想される分子量の位置に特異的な陽性反応を認めた。さらに、ラット下垂体前葉の組織切片を用いて抗原による吸収試験を行った。その結果、抗体に対応した抗原の添加によって免疫組織化学陽性反応が消失し、用いた抗体が組織切片中の抗原を特異的に認識していることが確認できた。

光顕免疫組織化学法による各グラニン蛋白群の発現パターンの解析

上述した抗グラニン抗体を用いて、成熟雄ラット (Wistar 系統、10 週齢) の下垂体前葉における各グラニン蛋白の組織分布を免疫組織化学法で詳細に検討した。検討にはエボン 812 樹脂包埋組織標本から作製した連続切片 (0.5 μ 厚) を用い、抗原の局在部位は ABC-DAB 法を用いて可視化した。この検討から、(1) ラット下垂体前葉では、グラニン蛋白群のうち CgA は性腺刺激ホルモン産生細胞にほぼ限局して発現していること、(2) CgA 以外のグラニン蛋白群は成長ホルモン産生細胞以外の下垂体前葉内分泌細胞で広く発現していること、(3) 各内分泌細胞におけるグラニン蛋白群の免疫陽性反応の強弱を比較すると、CgB と SgIII の下垂体前葉における発現パターンが類似していることが明

らかになった。

電顕免疫組織化学法による SgIII の細胞内局在の解析

さらに、これまで細胞内局在に関してほとんど報告がない SgIII を中心に、各グラニン蛋白の下垂体前葉内分泌細胞における局在を電顕免疫組織化学法によって詳細に比較・検討した。検討には、L.R.White 樹脂包埋組織標本から作製した超薄切片を用い、金コロイド標識 2 次抗体で各抗原の細胞内局在部位を可視化した。

その結果、SgIII は成長ホルモン産生細胞以外の内分泌細胞の分泌顆粒に広く局在しており、光顕免疫組織化学で得られた所見と一致していた。なかでも SgIII の発現が高いプロラクチン産生細胞や甲状腺刺激ホルモン産生細胞では、分泌顆粒の周辺部に SgIII が集積する傾向が顕著であり、SgIII と分泌顆粒膜の間に何らかの特異的な相互作用が存在する可能性が示唆された。また、ごく少数ではあるが下垂体前葉中の SgIII 陽性の内分泌細胞でプロラクチンと甲状腺刺激ホルモンが共存する小型分泌顆粒を有するものが存在した。このような所見は、細胞分化系列で近縁の細胞であるプロラクチン産生細胞と甲状腺刺激ホルモン産生細胞の中間型の細胞が成体の下垂体前葉にも存在していることを示唆している。

形態計測法による半定量的解析

SgIII と同様に他のグラニン蛋白である CgB や SgII も成長ホルモン産生細胞以外の内分泌細胞の分泌顆粒に広く局在し、分泌顆粒の周辺部に集積する傾向が認められた。そこで、この 3 種類のグラニン蛋白が分泌顆粒膜近傍に集積する程度を形態計測法による半定量的解析で比較・検討した。

まず、分泌顆粒の断面を中心部 (中心から半径 70% 以内の領域) と周辺部 (半径 70% でひいた境界線より外側の領域) に区分し、それぞれの領域に分布する金コロイド数を計測して、各グラニン蛋白ごとにその相対比を算出し比較した。その結果、検討したどの内分泌細胞 (プロラクチン細胞 (成熟型および未熟型)、甲状腺刺激ホルモン産生細胞) でも、SgIII の局在を示す金コロイド粒子の 90% 以上が分泌顆粒周辺部に集積していることがわかり、さらに CgB や SgII と比較しても有意に顆粒周辺部の金コロイド標識率が高いことが明らかになった。さらに、成熟型のプロラクチン産生細胞において各グラニン蛋白の局在を示す金コロイド粒子と分泌顆粒膜との距離を測定したところ、SgIII の局在を示す金コロイド粒子の 60% 強が分泌顆粒膜から 10nm 以内の近傍に集中していることが明らかになった。これらの形態計測法による解析から、グラニン蛋白群の中でも特に SgIII が分泌顆粒膜と密接な相互作用を持つことが強く示唆された。

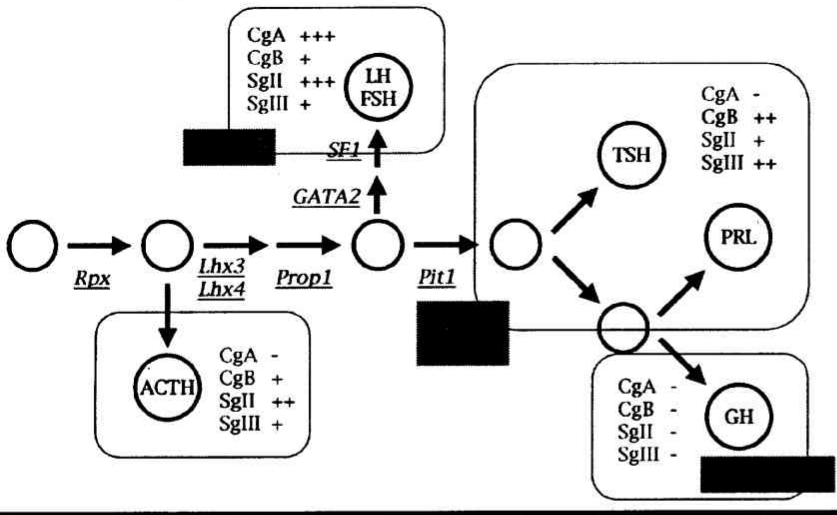
考察および今後の展望

下垂体前葉の細胞分化系列と各内分泌細胞におけるグラニン蛋白群の発現パターン

今回の検討で得られたラット下垂体前葉の各内分泌細胞におけるグラニン蛋白の発現パターンとこれらの内分泌細胞の分化系列を次ページ図にまとめた。

この模式図から明らかなように、下垂体前葉の内分泌細胞の分化の過程で最初に分化する副腎皮質刺激ホルモン産生細胞では SgII が強く発現しており、さらに CgB や SgIII の発現も認められる。今回用いた抗体では同細胞における CgA の発現は観察されなかったが、CgA の他の部位を認識する抗体を用いれば同細胞の分泌顆粒内でプロセッシングを受けた CgA 断片を検出できる可能性も残されている。我々が以前に行った検討でも、マウスの副腎皮質刺激ホルモン産生細胞由来の培養細胞株

ラット下垂体前葉の内分泌細胞の分化系列と グラニン蛋白群の発現パターン



AtT-20 細胞の分泌顆粒内には CgA(あるいはその断片) が局在することを確認しており (Mol Biol Cell 13:3388-3399 (2002))、この点に関しては今後さらに詳しく検討する必要がある。

下垂体前葉で次に分化してくる性腺刺激ホルモン産生細胞では、CgA と SgII の発現量・蓄積量が著明に増加し副腎皮質刺激ホルモン産生細胞

とは異なるグラニン蛋白発現プロファイルを示すようになる。さらに、同細胞内では我々がこれまで報告してきたように、SgII が小型分泌顆粒、CgA と SgIII が大型分泌顆粒と 2 種類の異なる分泌顆粒に選択的に輸送されるようになり、特徴ある分泌顆粒構成を呈するようになる (Histochemistry 96:285-293 (1991)、Arch Histol Cytol 60:355-370 (1997)、Arch Histol Cytol 61:99-113 (1998))。

分化系列のさらに下流で出現してくる甲状腺刺激ホルモン産生細胞とプロラクチン産生細胞の 2 種類の内分泌細胞では、CgA の発現が減少・消失するとともに CgB と SgIII の発現量・蓄積量が相対的に増加し、性腺刺激ホルモン産生細胞や副腎皮質刺激ホルモン産生細胞とはグラニン蛋白群の発現プロファイルが異なってくる。ただ、今回の検討からプロラクチン産生細胞と甲状腺刺激ホルモン産生細胞ではグラニン蛋白群の発現プロファイルが類似しており、両者とも未熟型の細胞では小型顆粒のみを有するよく似た微細構造を呈する。さらにそのような未熟型の細胞の中にグラニン蛋白の発現プロファイルが同じで両方のホルモンを含む中間型の細胞も認められたことから、この 2 種類の細胞は最終的には異なるホルモン産生細胞に分岐するもののグラニン蛋白群の発現調節や分泌顆粒形成に関しては近縁の関係にあることが示唆された。

一方、下垂体前葉の内分泌細胞の中で最後にプロラクチン産生細胞から分かれて分化する成長ホルモン産生細胞では、今回検討した 4 種類すべてのグラニン蛋白 (CgA、CgB、SgII、および SgIII) の発現が著明に低下・消失していた。この細胞における分泌顆粒形成にグラニン蛋白群が必要ないのか、あるいは今回検討した 4 種類の既知のグラニン蛋白以外の蛋白が成長ホルモン産生細胞における分泌顆粒形成に関与しているのかについては、今後さらに検討する必要がある。

以上の検討結果から、下垂体前葉における細胞分化の過程と密接に関連してグラニン蛋白の発現が調節されていることが示唆された。この所見は、下垂体前葉における各内分泌細胞の分化に伴う細胞内小器官の多様性の確立機構を考える上で興味深い所見であると思われた。今回の研究期間では解析できなかったが、今後さらに、下垂体の細胞分化に重要な役割を果たしている Pit-1 や SF-1 などの転写調節因子が各内分泌細胞においてグラニン蛋白の発現をどのように調節しているか検討し、グラニン蛋白群の発現プロファイルと分泌顆粒の形態やサイズの間に関連性をさらに解析していく必要があると思われた。

性腺刺激ホルモン産生細胞の分泌顆粒構成の生後発達に伴う変化

上述した研究成果をふまえ本基盤研究の研究期間の後半(平成15年度以降)には、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞の生後発達過程の解析を開始し、同細胞内におけるグラニン蛋白の局在様式および分泌顆粒構成の経時的变化を電子顕微鏡観察および免疫組織化学で検討した。その結果、雌雄ラットの同細胞の分泌顆粒構成が出生直後から性成熟が完了する生後6週までの間に劇的に変化することを発見した(Fig. 1)。すなわち、体内の性ホルモン環境が未成熟である生後3週までは、雌雄ともに性腺刺激ホルモン産生細胞でクロモグラニンAを含む大型分泌顆粒が形成されるが、その後、雌では性成熟の進行とともに生後6週までの間にこのタイプの分泌顆粒は縮小・減少する(Fig.2-3 下段)。一方、雄ラットの同細胞内では、クロモグラニンA陽性分泌顆粒は、そのまま成体に至るまで維持される(Fig.2-3 上段)。この所見は、性腺刺激ホルモン産生細胞の分泌顆粒構成の雌雄差の確立過程と生後の性成熟過程とが密接に関連していることを示唆している。我々は以前に、雌雄の性ステロイドホルモンがCgAの発現調節に関しては正反対に働き、その結果、同細胞内の分泌顆粒構成に明瞭な雌雄差が生じることを実験的に示したが(Endocrinology 139:2765-2773 (1998))、今回の検討で、同細胞の生後発達の過程でこのメカニズムが実際に起きていることが明らかになった。

そこで、さらにこの機構の分子的基盤を明らかにする目的で、平成16年度からは、DNAマイクロアレイを利用して、この生後発達過程に伴う下垂体組織の遺伝子発現プロファイルの経時的变化の解析を開始した。現時点までに各生後発達段階の下垂体組織中のmRNAの抽出を完了し、目下、同一条件下で蛍光標識したサンプルをDNAマイクロアレイにハイブリダイズし発現プロファイルデータを取得しているところである。この解析で下垂体前葉の遺伝子発現プロファイルの経時的データが得られたら、上述した形態学的所見とあわせて論文にまとめ専門誌に投稿する予定である。

以上の研究成果のうち、下垂体前葉におけるグラニン蛋白群の局在に関する所見の詳細は、米国Journal of Histochemistry and Cytochemistry誌に原著論文として発表した。この原著論文原稿(研究発表欄・原著論文(1))を研究成果として本研究報告書に掲載する。また、この成果を発展させた関連論文として研究発表欄・原著論文の項の(2)(3)の論文別刷もこの報告書の巻末に綴じてある。

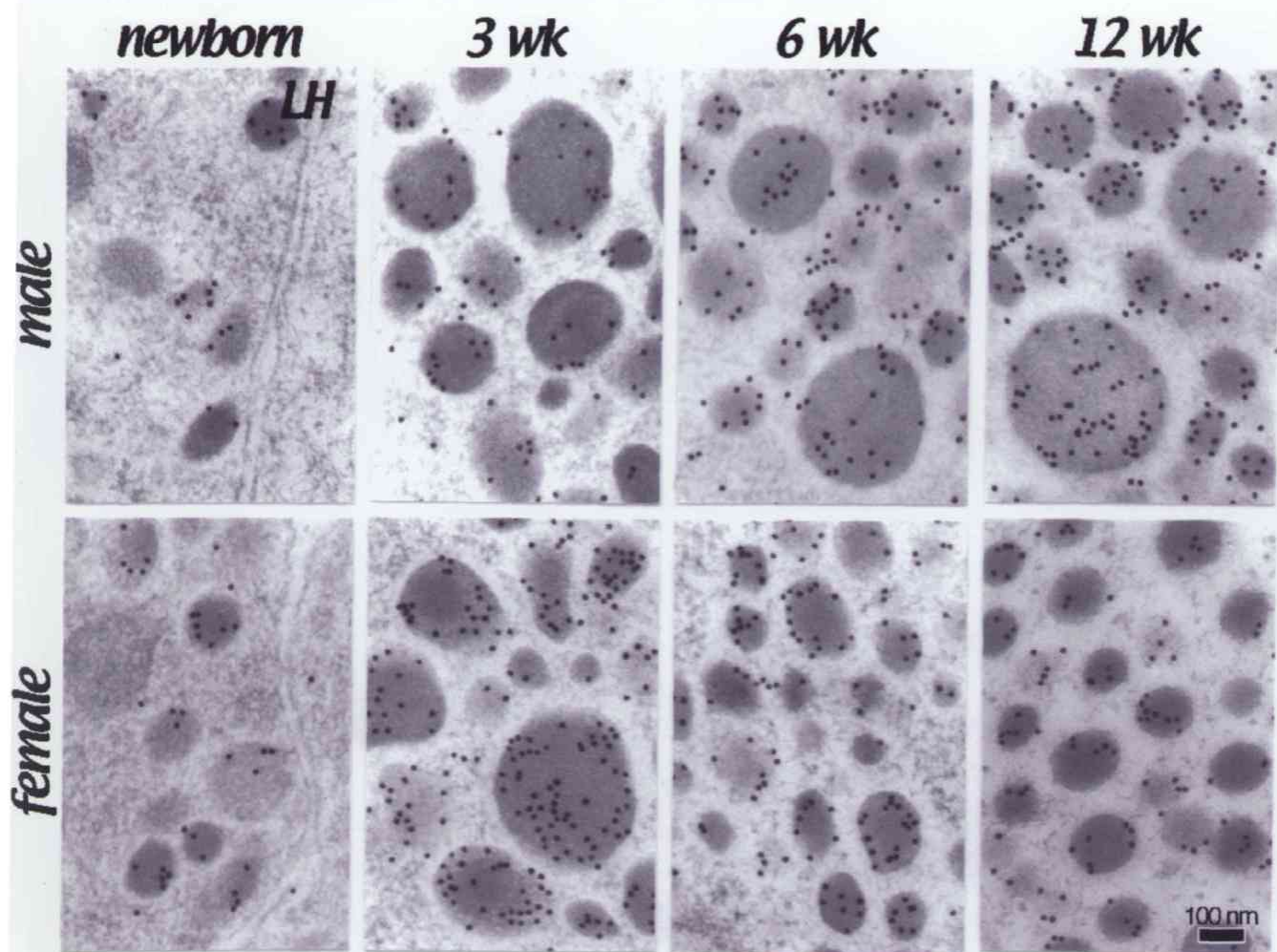


Fig.1 雌(下段)雄(上段)ラットの下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞の電顕像。性腺刺激ホルモン産生細胞を同定するために抗LH β 抗体で免疫組織化学染色してある(10nm径の金コロイド標識2次抗体で可視化)。出生直後の性腺刺激ホルモン産生細胞には小型の分泌顆粒しか認められないが、生後3週までに雌雄ともに大型の分泌顆粒が出現してくる。その後、雄ラットの同細胞では成体になるまで大型分泌顆粒が観察されるが、雌ラットの同細胞では次第に大型分泌顆粒が消失し、生後6週齢で既に同細胞の分泌顆粒構成に明瞭な雌雄差が認められる。

rat gonadotropes (3 wk old)

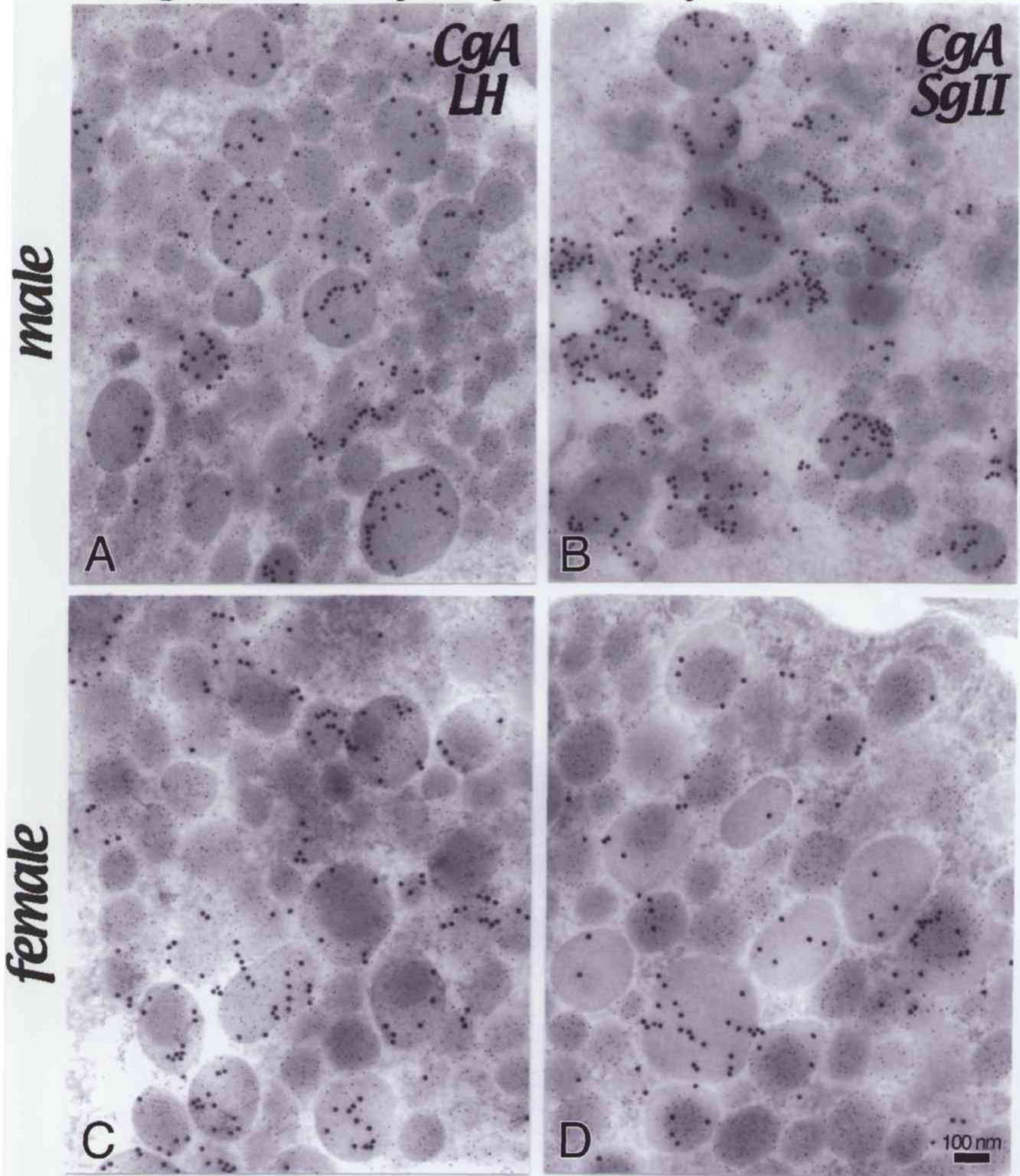


Fig.2 生後3週齢の雌(下段)雄(上段)ラットの下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞におけるグラニン蛋白の局在。AおよびCは、抗LH β 抗体(ϕ 5nm金コロイド標識)と抗CgA抗体(ϕ 15nm)で、BおよびDは、抗SgII抗体(ϕ 5nm金コロイド標識)と抗CgA抗体(ϕ 15nm)で、それぞれ免疫組織化学染色してある。3週齢では雌雄ともにCgA陽性の大型分泌顆粒とSgII陽性の小型分泌顆粒の2種類の分泌顆粒を有し、微細構造上の雌雄差は認められない。

rat gonadotropes (6 wk old)

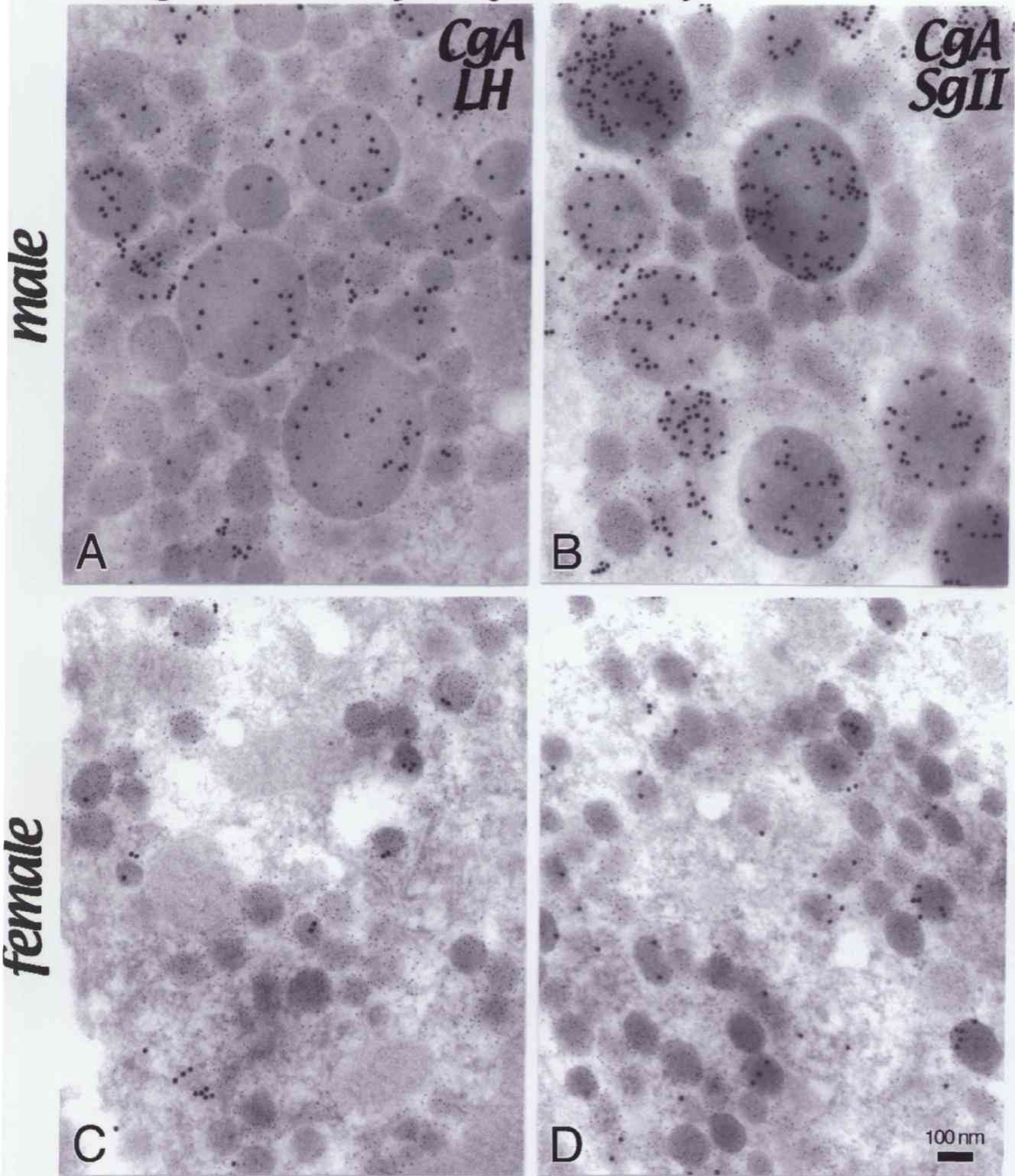


Fig.3 生後6週齢の雌(下段)雄(上段)ラットの下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞におけるグラニン蛋白の局在。AおよびCは、抗LH β 抗体(ϕ 5nm金コロイド標識)と抗CgA抗体(ϕ 15nm)で、BおよびDは、抗SgII抗体(ϕ 5nm金コロイド標識)と抗CgA抗体(ϕ 15nm)で、それぞれ免疫組織化学染色してある。6週齢になると雌ラットの性腺刺激ホルモン産生細胞内からCgA陽性の大型分泌顆粒が消失するのに対して、雄ラットと同細胞内ではCgA陽性の大型分泌顆粒が観察される。SgII陽性の小型分泌顆粒は雌雄ともに同細胞内に観察される。