

下垂体前葉細胞の増殖調節

高橋 純 夫

岡山大学理学部生物学教室

I はじめに

脊椎動物の下垂体は腺性下垂体と呼ばれる前葉と中葉と、神経性下垂体と呼ばれる後葉（神経葉）とからなる。口の原基の口蓋の上皮細胞が脳に向かって陥入し、ラトケ嚢が形成される。ラトケ嚢は、脳組織と接して腺性下垂体になる。ラトケ嚢の脳に接した部分が中葉となり、残りが前葉となる。バソプレシンやオキシトシンを分泌する神経分泌細胞の軸索が集まり後葉になる。下垂体は間脳視床下部の指令を受けてホルモンを分泌し、生体内の様々な機能を調節する。最近になり下垂体前葉では、様々な成長因子が合成されていることがわかってきた¹⁾。成長因子のあるものは自己分泌（autocrine）もしくは傍分泌的（paracrine）に前葉ホルモンの分泌を調節していると考えられている。その一方、下垂体由来の成長因子が、下垂体前葉細胞の増殖にも関係していることが明らかになりつつある。本稿では、ラットやマウスにおける前葉細胞の増殖調節機構について、我々の研究成果も含めて述べてみたい。

II 下垂体前葉細胞の増殖

下垂体前葉の分化・機能発現について多くの報告があるがここでは紹介しない。ラットやマウスでは出生前に、甲状腺ホルモン刺激ホルモン産生細胞、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞、生殖腺刺激ホルモン産生細胞、成長ホルモン産生細胞、プロラクチン産生細胞が分化してくる²⁾。分泌細胞が初めて出現した後も下垂体前葉の成長は持続し続ける。前葉の成長がどのように調節されるのか興味深く、前葉細胞の増殖様式について解明する必要がある。前葉細胞の増殖様式としては2つの可能性が考えられる。すなわち、前葉には幹細胞が存在し、その幹細胞から娘細胞が出現し、それらから個々のホルモン産生細胞が分化してくる様式と、分泌細胞に分化した細胞が分裂すること

により、2つのホルモン産生細胞ができる様式（Self-duplication）が考えられる³⁾。前葉細胞の幹細胞の存在は証明されていないが、前者の可能性は否定できない。しかしながら、有糸分裂像やDNA合成中のホルモン産生細胞を光学顕微鏡⁴⁾や電子顕微鏡⁵⁾で観察できることから、後者の増殖様式の存在することが示される。

図1はラットにおける前葉の細胞分裂の頻度を思春期前から老年期までの変化を調べたものである。あわせて、プロラクチン産生細胞の分裂頻度も示してある。分裂頻度は若齢期に高く、加齢にともない次第に低下してくる。60日齢の成獣ラットにおける細胞分裂を調べると（図1）、雌ラットでは発情周期にしたがい細胞分裂の頻度は変動し、発情期（E）に高い値を示している。同齢の雄に比較しても極めて高い。また、発情期には分裂細胞のうち、約70%の細胞がプロラクチン産生細胞であることが明らかとなった⁴⁾。この発情期にみられるプロラクチン産生細胞の分裂の増加は、卵巣を摘出することにより消失する。また発情ホルモンを投与するとプロラクチン産生細胞の分裂が高まることから、卵巣摘出した雌や雄ラットで確認される。したがって、プロラクチン産生細胞の分裂は発情ホルモンにより促進されることが明らかとなった。従来より、発情ホルモンにより下垂体の成長が促進されることが知られている。実際にプロラクチン産生細胞の増殖が下垂体の肥大に寄与していることが、この観察結果より明らかになった。以上の結果より、下垂体前葉細胞においてはホルモン分泌細胞は分化後も、分裂して娘細胞を形成する機構が存在することが示された。

前葉細胞の分裂を開始させる因子は何であろうか。卵巣摘出すると、生殖腺刺激ホルモン産生細胞の分裂が高まる⁶⁾。また、下垂体細胞の単層培養系において、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンを培養液に添加すると生殖腺刺激ホルモン産生細胞

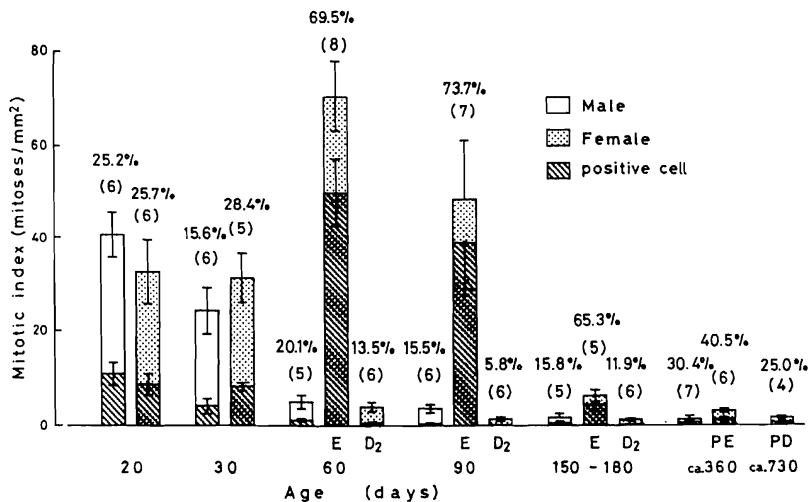


図1 雌雄ラットの下垂体前葉細胞とプロラクチン産生細胞の分裂頻度の変化。分裂頻度は単位面積当たりの分裂中期の細胞数で表してある。各カラム全長が、分裂中の前葉細胞の全体を表し、プロラクチン産生細胞はハッチングのカラムで表している。プロラクチン産生細胞は抗ラットプロラクチン抗体を用いて免疫組織化学的に同定した。パーセントは全分裂細胞中のプロラクチン産生細胞の割合を示す。

E: 発情期、D₂: 発情間期2日目、PE: 連続発情、PD: 連続非発情。参考文献(4)より。

胞のDNA合成が高まる⁷⁾。成長ホルモン放出ホルモンの投与により、成長ホルモン産生細胞の分裂が高まることも、単層培養系において同様に報告されている⁸⁾。このように視床下部の前葉ホルモン放出ホルモンが、ホルモン産生細胞の分裂も促進することがわかる。すなわち、ホルモン分泌の亢進により、その産生細胞数の増加も誘起されることになる。

プロラクチンに関しては視床下部の甲状腺刺激ホルモン放出因子(TRH)が、プロラクチン放出を促進することが知られている。しかし、この視床下部のTRHが生理的なプロラクチンの分泌促進因子であるかどうかは不明である。前述のように、発情ホルモンはプロラクチンの分泌を高める。したがって、発情ホルモンによるプロラクチン分泌刺激の高まりが、プロラクチン産生細胞の分裂も促進することになる。プロラクチンの分泌は、視床下部の弓状核にあるドーパミン作動性ニューロンにより抑制されている。ドーパミン作動性ニューロンは軸索末端を正中隆起部にもち、ドーパミンを下垂体門脈に放出する。ドーパミンは門脈血を流れて、前葉のプロラクチン産生細胞に作用し、プロラクチンの分泌を抑制している。ドーパミンのアゴニストであるプロモクリプチンを投与するとプロラクチンの分泌は抑制される。それと同時にプロラクチン産生細胞の分裂も抑制され、ホルモンの分泌と分裂の相関が明らかとなった⁹⁾。

前述のように、*in vivo*においては、発情ホルモンは下垂体前葉細胞、とくにプロラクチン産生細胞の分裂を促進する。しかしながら、*in vitro*では発情ホルモンは前葉細胞の分裂促進効果を示さない。*in vivo*において発情ホルモンにより増殖が促進される子宮上皮細胞においても、下垂体前葉細胞の場合と同様に、*in vitro*では発情ホルモンは増殖促進効果を示さない。一般に、発情ホルモンは標的細胞に作用し成長因子の合成分泌を高め、その成長因子が、次に自己分泌または傍分泌的に作用して細胞の増殖を促進するためであると考えられる^{10, 11)}。したがって、発情ホルモン依存性の細胞増殖調節系をもつ下垂体前葉組織や子宮組織では、発情ホルモンにより合成分泌が促進される成長因子やその受容体の局在を明らかにすることが、細胞増殖を解明する際に重要である。

III 下垂体前葉の成長因子と細胞分裂

下垂体では、上皮成長因子(EGF)、腫瘍化成長因子 α (TGF α)、腫瘍化成長因子 β (TGF β)、インスリン様成長因子I(IGF-I)、インスリン様成長因子II(IGF-II)、繊維芽細胞成長因子(FGF)など様々な成長因子が産生されることが報告されている¹⁾。しかし、それらの産生細胞や生理的役割が解明されている例は少ない。ここでは、EGF、TGF α 、IGF-Iについて考察することにする。

TGF α はEGFファミリーに属する成長因子である。

TGF α はEGFの受容体に結合して作用を発現するとされている。下垂体や子宮において、EGFやTGF α が、発情ホルモンによる細胞増殖作用の直接の成長因子である可能性が報告されてきた。下垂体では発情ホルモン投与により、EGFやTGF α のmRNA量が増加し、これらの成長因子の合成が増加していることが示されている。さらに、ドーパミンのアゴニストであるプロモクリプチンを投与すると、これらのmRNA量の発情ホルモンによる増加が抑制されることがわかった¹²⁾。前節で、発情ホルモンは前葉細胞の増殖を刺激し、下垂体の成長を促進すること、またドーパミンは前葉細胞の増殖を抑制し、下垂体の成長を抑えることを述べたが、以上の結果はあわせて、前葉細胞の増殖に、EGFやTGF α が関与することを示している。我々は、マウス下垂体前葉細胞の無血清培養系でEGFが前葉細胞の増殖を高めることを明らかにした(図2)。

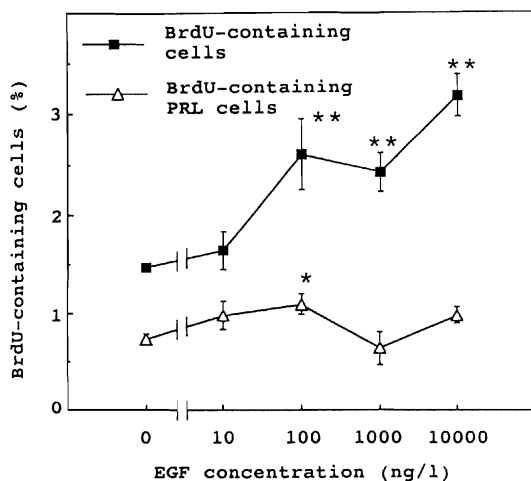


図2 マウス下垂体前葉細胞の無血清単層培養系における上皮成長因子(EGF)の細胞増殖効果。

プロモデオキシウリジン(BrdU)の核への取り込みを検索し、DNA合成期の細胞を同定した。あわせて、抗マウスプロラクチン抗体を用いてプロラクチン産生細胞を同定した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; それぞれのEGF無添加群に対して有意の差。

また、最近になってラット下垂体の前葉細胞においてin situ hybridizationで検出した報告によれば、EGF mRNAは成長ホルモン産生細胞と生殖腺刺激ホルモン産生細胞に存在すること、またTGF α

mRNAは成長ホルモン産生細胞、生殖腺刺激ホルモン産生細胞やプロラクチン産生細胞に存在するという¹³⁾。また、EGFの受容体は全ての種類の前葉細胞に、発現がみられるという。我々の、in vitro実験では、EGFにはプロラクチン産生細胞にたいする増殖促進作用は認められなかった。したがって、プロラクチン産生細胞の分裂には、EGF以外の分裂促進因子が、同時に作用する必要があるのではないかと考えている。

IGF-Iはインスリンと構造の類似した成長因子である。IGF-Iは様々な組織において、前葉ホルモンである成長ホルモンの作用により合成分泌が高まる。分泌されたIGF-Iは、自己分泌または傍分泌的に作用して細胞の増殖を刺激すると考えられている。すなわち、成長ホルモンの細胞増殖作用はIGF-Iを介していることになる。

下垂体に存在するIGF-Iは、成長ホルモンの合成分泌に関係している。成長ホルモンの分泌が高まると、逆に成長ホルモンの分泌を抑える機構が存在することが知られている。ラットに成長ホルモンを投与すると、成長ホルモンの分泌が低下する。またIGF-Iを投与しても、同様に成長ホルモンの分泌が低下し、この分泌抑制機構にIGF-Iが関与していることが示されている¹⁴⁾。このIGF-Iの成長ホルモンの分泌抑制には下垂体由来のIGF-Iが関与していると考えられる。ところが、前葉細胞の増殖促進因子である発情ホルモンを投与すると、下垂体のIGF-Iの産生が高まることが知られている¹⁵⁾。さらに、我々は前葉細胞の無血清培養系においてIGF-Iが、前葉細胞の増殖を刺激することを発見した(図3)。さらに詳しくみると、IGF-Iによりプロラクチン産生細胞の分裂が高まることがわかった。

また、インスリンを投与してみると、IGF-Iに比べて高濃度でインスリンにも前葉細胞の増殖効果があることがわかった。従って、インスリンはIGF-I受容体を介している可能性が考えられる。いずれにしろ、インスリンの前葉細胞における増殖効果の生理的意義は不明である。

マウス下垂体前葉細胞におけるIGF-Iを免疫組織化学的に検出したところ、ホルモン分泌細胞と考えられる細胞に免疫反応が検出された。また、IGF-I mRNAを含有する細胞をin situ hybridizationによっても、我々は検出することができた。したがって、前述のMichels et al. (1993)の報告¹⁵⁾や、下垂体前葉におけるIGF-Iの受容体の存在¹⁶⁾と、我々の形態学的な知見から、下垂体IGF-Iは、前葉

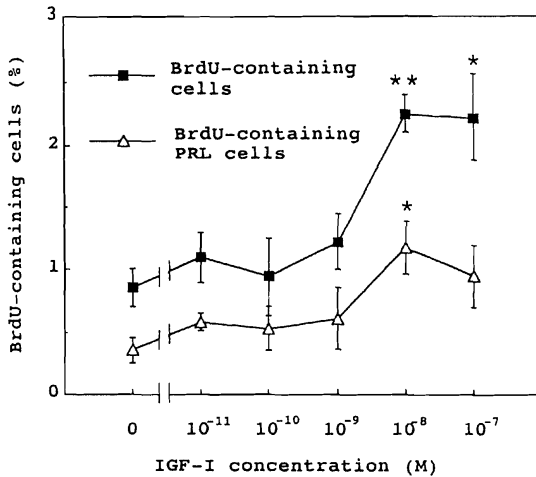


図3 マウス下垂体前葉細胞の無血清単層培養系におけるインスリン様成長因子I (IGF-I)の細胞増殖効果。

プロモデオキシウリジン (BrdU) の核への取り込みを検索し、DNA合成期の細胞を同定した。あわせて、抗マウスプロラクチン抗体を用いてプロラクチン産生細胞を同定した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; それぞれのIGF-I無添加群に対して有意の差。

細胞の増殖調節に関与していることが示された。すなわち、発情ホルモンにより下垂体のIGF-Iの合成分泌が高まり、近傍の前葉細胞の分裂を促進する機構の存在が考えられる。今後、IGF-I産生細胞や、IGF-I受容体をもつ細胞の同定が必要である。

つぎに、インスリンと下垂体前葉細胞の増殖の関連について考察をおこなう。インスリンは血糖値の調節ホルモンとして、代謝調節に関わるホルモンの一つであるが、多くの種類の細胞において、その増殖調節にも重要な働きをもつことが知られている。インスリンはプロラクチンの合成分泌を促進する働きをもつことも知られている。そこで、インスリン分泌を低下させたマウスやラットを作成し、前葉細胞の増殖について検討した^{17, 18)}。卵巣摘出した雌マウスにStreptozotocinを投与してインスリン産生を低下させた。このマウスは低インスリンになり糖尿病になる。この糖尿病マウスに発情ホルモンを投与して、下垂体前葉細胞の分裂能を調べた(図4)。正常のマウスでは、発情ホルモン投与により前葉細胞の分裂は増加するが、糖尿病を発症しているマウスでは、発情ホルモンの増殖促進効果が低下してい

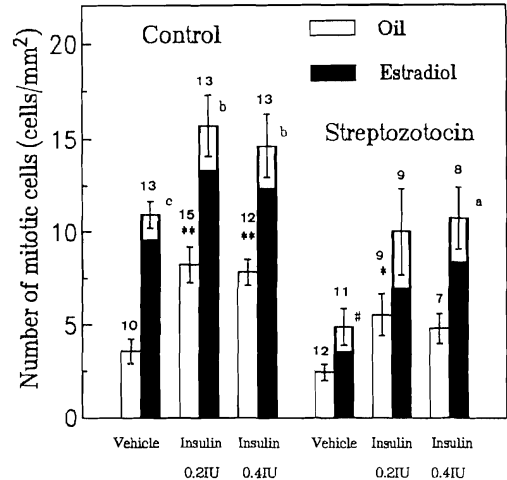


図4 Streptozotocinにより糖尿病を誘発した卵巣摘出雌マウスにEstradiol-17 β (50 μ g)とインスリン (0.2IU, 0.4IU) を投与したときの前葉細胞の細胞分裂頻度。

分裂頻度は単位面積当たりの分裂中期の細胞数で表してある。前葉細胞全体は白いカラムで、プロラクチン産生細胞は黒カラムで表している。プロラクチン産生細胞は抗マウスプロラクチン抗体を用いて免疫組織化学的に同定した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; それぞれのVehicle投与群に対して有意の差。a $P < 0.05$, b $P < 0.01$, c $P < 0.001$; それぞれのoil投与群に対して有意の差。参考文献(17)より。

た¹⁶⁾。しかし、インスリンを補うと発情ホルモンの増殖効果の回復が認められた。このことから、発情ホルモンの分裂促進効果には、インスリンが関与することが示唆された。インスリンが発情ホルモンによる調節機構にどのように作用するのか、明らかにしていく必要がある。また、このインスリン作用が、IGF-Iによる細胞増殖機構といかなる関係にあるのか、今後解析する必要がある。

IV おわりに

細胞分裂の調節機構の解析に関しては、株化細胞、肝細胞、血球細胞、免疫細胞など様々な細胞を用いて、細胞レベルから分子レベルに至るまでの膨大な研究成果が報告されている。しかしながら、内分泌細胞などの機能細胞の増殖調節機構の解析は多くない。内分泌細胞の腫瘍形成も数多くみられるので、

内分泌細胞の増殖調節機構の解明は特に興味深い分野である。子宮においては、発情ホルモンや黄体ホルモンが子宮細胞の増殖を調節することはよく知られている。本稿では紹介できなかったが、これらの性ステロイドにより、子宮組織内ではEGFやIGF-Iなどの成長因子が合成分泌され、ついでそれらの成長因子が、子宮を構成する様々な細胞の増殖を調節している様子が明らかになってきた。このように、生体内の細胞増殖の調節は、1次因子、2次因子というように、多数の因子による多段階反応であり、一気に細胞の分裂まで進行するような機構ではない。細胞分裂を誘導する因子を、“competence”のシグナルと、“progression”のシグナルの2つに分けて考えることが多い。下垂体前葉における“competence”シグナルは、第1次の因子である発情ホルモンであり、細胞のタンパク質合成活性や代謝を高め、2次因子である“progression”シグナルに対する準備状態を整えているのかもしれない。下垂体前葉の“progression”シグナルは、下垂体由来の成長因子であろう。今後、細胞増殖の各段階の反応に対応するシグナル伝達系の解明が必要となろう。内分泌細胞においては、主要な生産物であるホルモンの合成分泌活性と細胞分裂の関連を明らかにしていく必要もあろう。

前葉細胞においても、多能性の未分化細胞から分裂を経て、各ホルモン産生細胞の細胞系譜にしたがい分化し、成熟したホルモン産生細胞となると考えられる。ホルモン産生能を獲得した細胞が分裂をすることが明らかとなり、分化と分裂能の関係も明らかにする必要がある。前葉細胞の増殖における増殖促進因子や、多段階逐次的増殖調節過程をシグナル伝達の観点から明らかにしていけば、細胞分化における基本的問題点の解明に役立つと期待している。

V 参考文献

- 1) Webster, J. and Scanlon, M. F.: Growth factors and the anterior pituitary. In "Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism", Vol. 5. pp. 699-726 (1991)
- 2) Nemeskéri, A. Sétáló, G. and Halász, B.: Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohypophysis. A detailed immunohistochemical analysis. *Neuroendocrinology*, 48: 534-543 (1988)
- 3) Takahashi, S. Development and heterogeneity of prolactin cells. *Int. Rev. Cytol.*, 157: 33-98 (1995)
- 4) Takahashi, S., Okazaki, K. and Kawashima, S.: Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. *Cell Tissue Res.*, 235: 497-502 (1984)
- 5) Takahashi, S. and Kawashima, S.: Age-related changes in prolactin cells in male and female rats. *Acta Anat.*, 113: 211-217.
- 6) Inoue, K. and Kurosumi, M.: Mode of proliferation of gonadotrophic cells of the anterior pituitary after castration-immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch. Histol. Jpn.*, 44: 71-85 (1981)
- 7) Tilemans, D., Andries, M. and Deneef, C.: Luteinizing hormone-releasing hormone and neuropeptides Y influence deoxyribonucleic acid replication in three anterior pituitary cell types. evidence for mediation by growth factors released from gonadotrophs. *Endocrinology*, 130: 882-894 (1992)
- 8) Billestrup, N., Swanson, L. W. and Vale, W.: Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 6854-6857 (1986)
- 9) Takahashi, S. and Kawashima, S.: Proliferation of prolactin cells in the rat: effects of estrogen and bromocriptine. *Zool. Sci.*, 4: 855-860 (1987)
- 10) Sirbasku, D. A.: Estrogen induction of growth factors specific for hormone-responsive mammary, pituitary, and kidney tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75: 3786-3790 (1978)
- 11) Sutherland, R. L., Watts, C. K. W. and Clarke, C. L.: Oestrogen action. In "Hormones and their Actions, Part I" Ed by B. A. Cooke, R. J. B. King and H. J. van der Molen, Elsevier, Amsterdam, pp. 197-215 (1988)

- 12) Borgundvaag, B., Kudlow, J. E., Mueller, S. G. and George, S. R.: Dopamine receptor activation inhibits estrogen-stimulated transforming growth factor- α gene expression and growth in anterior pituitary, but not in uterus. *Endocrinology*, 130: 3453-3458 (1992)
- 13) Fan, X. and Childs, G. V.: Epidermal growth factor and transforming growth factor- α messenger ribonucleic acids and their receptors in the rat anterior pituitary: localization and regulation. *Endocrinology*, 136: 2284-2293 (1995)
- 14) Yamashita, S. and Melmed, S.: Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, 118: 176-182 (1986)
- 15) Michels, K. M., Lee, W.-H., Seltzer, A., Saavedra, J. M. and Bondy, C. A.: Up-regulation of pituitary [¹²⁵I]insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding and IGF binding protein-2 and IGF-I gene expression by estrogen. *Endocrinology*, 132: 23-29 (1993)
- 16) Goodyer, C. G., de Stephano, L., Wei Hsien Lai, Guyda, H. J. Posner, B. I.: Characterization of insulin-like growth factor receptors in rat anterior pituitary, hypothalamus, and brain. *Endocrinology*, 114: 1187-1195 (1984)
- 17) Takahashi, S., Oomizu, S. and Kobayashi, Y.: Proliferation of pituitary cells in streptozotocin-induced diabetic mice: effect of insulin and estrogen. *Zool. Sci.*, 11: 445-449 (1994)
- 18) Takahashi, S. and Osawa, T.: Decreased proliferation of pituitary cells of streptozotocin-induced diabetic rats in response to estradiol-17-beta. *Acta Anat.*, 151: 239-244 (1994)