

氏名	<sup>ラヒミ</sup> Rahimi <sup>シヤイダ</sup> Syaidah
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 738号
学位授与年月日	平成 29年 8月 25日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第3項該当
学位論文名	ラット下垂体前葉におけるフィブロモジュリン発現機構の解明 (Fibromodulin expression in rat anterior pituitary gland)
論文審査委員	(委員長) 教授 柳 澤 健 (委員) 教授 野 田 泰 子 准教授 海老原 健

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

Extracellular matrix (ECM) components are crucial in providing tissues cellular environments and cell functioning. Many studies have revealed that ECM is present in anterior pituitary gland and influence the behavior and activities of cells. Recently, our group revealed that fibromodulin, a member of ECM small leucine-rich proteoglycan (SLRP), is produced in rat anterior pituitary gland. Fibromodulin is mostly known for its role in regulating collagen fibrillogenesis and ECM assembly. However, the function and regulatory mechanism underlying fibromodulin synthesis in anterior pituitary have not been identified. The aim of this study was to identify factors associated with fibromodulin expression in rat anterior pituitary gland.

### 2 研究方法

#### Experiment I

This experiment evaluated the possible effects of major anterior pituitary ECM components, laminin and type I collagen, on the expression of fibromodulin in rat anterior pituitary cells. Transgenic S100 $\beta$ -green fluorescent protein (GFP) rats, which express GFP in folliculostellate cells, were used for this study. Frozen frontal sections of 8-10 weeks old male transgenic GFP rats' anterior pituitary gland were used to examine the expression and distribution of fibromodulin in rat anterior pituitary gland. To examine the effect of laminin and type I collagen on fibromodulin expression, GFP-positive and GFP-negative anterior pituitary cells were separated and cultured for 72 h inside 8-well glass chamber slides ( $1 \times 10^5$  cells) with or without coating of laminin or type I collagen. The cultured cells then treated with antibody against fibromodulin to assess protein expression of fibromodulin in the presence and absence of ECM by immunostaining, real-time PCR and western blot analysis.

#### Experiment II

This experiment was to determine whether transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) signaling is associated with fibromodulin expression in anterior pituitary gland. *In situ* hybridization for TGF $\beta$  receptor II followed by immunohistological technique was performed to reveal the presence of TGF $\beta$  receptor II in fibromodulin producing cells. To confirm canonical TGF $\beta$  intracellular signaling, Smad2 immunocytochemistry was performed after TGF $\beta$ 2 treatment. Next, real-time PCR and western blot analysis were performed to determine the effects of TGF $\beta$ 2 on fibromodulin gene and protein expressions in cultured anterior pituitary cells.

### 3 研究成果

#### Experiment I

Immunostaining of anterior pituitary sections and western blot analysis showed that fibromodulin was expressed in anterior pituitary gland, and double-immunostaining showed that fibromodulin was produced in folliculostellate cells and pericytes. Using cultured anterior pituitary cells treated with laminin or type I collagen, the different distribution of fibromodulin in folliculostellate cells and pericytes were revealed. While fibromodulin distribution in folliculostellate cells was shown higher with wider distribution in the present of ECM component, there was no difference in fibromodulin expression of pericytes as compared with control. The western blot analysis confirmed this result by showing that treatment with laminin or type I collagen for 72 h increased the protein expression levels of fibromodulin in folliculostellate cells but not in pericytes. Interestingly, at the transcription level, the increase in fibromodulin expression in anterior pituitary cells was higher on type I collagen-coated surfaces than on laminin-coated surfaces.

#### Experiment II

*In situ* hybridization showed that TGF $\beta$  receptor II was expressed in parenchymal cells, perivascular cells, and endothelial cells of the anterior lobe of pituitary gland. Double-staining with *in situ* hybridization and immunohistochemical techniques revealed that this TGF $\beta$  receptor II was expressed in fibromodulin-producing cells, and this receptor had intense Smad2 nuclear translocation after treated with TGF $\beta$ 2. Using cultured anterior pituitary cells, we found that fibromodulin gene and protein expression was increased after treated with TGF $\beta$ 2 in a dose-dependent manner. Furthermore, TGF $\beta$ 2-induced fibromodulin expression was completely abolished by co-administration of TGF $\beta$  receptor I inhibitor.

### 4 考察

#### Experiment I

In the present experiment, fibromodulin expression was detected in the anterior lobe of rat pituitary and was colocalized with folliculostellate cells and pericytes. This result confirmed the findings of our previous study at the transcription level. Because fibromodulin is

important in modulating collagen fibrillogenesis, this finding suggests that both folliculostellate cells and pericytes have roles in collagen fibrillogenesis in anterior pituitary gland. The present study also found that major ECM laminin and type I collagen induced fibromodulin expression in folliculostellate cells but not in pericytes. Both these cells expressed ECM receptors of integrin  $\beta 1$ , and our group previously showed that ECM signaling via this receptor is mediated by caveolin-3 in folliculostellate cells. Thus, we believe that pericytes cannot be further stimulated by ECM. Furthermore, this finding also showed that type I collagen is more important in modulating fibromodulin expression.

## Experiment II

In the present experiment, TGF $\beta$  receptor II was expressed in folliculostellate cells and pericytes of rat anterior pituitary gland. These fibromodulin-expressing cells respond to TGF $\beta 2$  and increased fibromodulin mRNA and protein expressions in dose-dependent manner. This result is consistent with the previous study that showed that TGF $\beta 2$  is indeed stimulated synthesis of ECM components. Our previous study showed that TGF $\beta 2$  is exclusively expressed in folliculostellate cells, suggesting that the action of TGF $\beta 2$  on pericytes is paracrine mechanism while on folliculostellate cells is probably an autocrine mechanism. In experiment I, fibromodulin expression in folliculostellate cells was increased by collagen and laminin, which suggests that there is another pathway that regulates fibromodulin expression in folliculostellate cells.

## 5 結論

This study showed that major ECM of anterior pituitary and growth factor are important in regulating fibromodulin expression in anterior pituitary. As fibromodulin is important in modulating collagen fibrillogenesis, this study both highlights the importance of interaction between TGF $\beta$  signaling and fibromodulin in collagen regulation and yields new insights regarding ECM-to-cell communication and cell-to-cell interaction within the pituitary gland.

## 論文審査の結果の要旨

要約 ; 申請者は下垂体前葉におけるプロテオグリカンのなかで、細胞外基質 (ECM) などに特異的に発現を調節されるファイブロモジュリン (Fibromodulin、以下 Fmod) に注目し、それが濾胞星状細胞 (Folliculostellate cell、以下 FS 細胞) と pericytes (ペリサイト) に特異的に発現していることを明らかにし、さらにその性状を解明した。

1. ECM の主要タンパク質であるラミニンとタイプ I コラーゲン上に培養した時、FS 細胞における Fmod タンパク質の発現は増加したが、ペリサイトでは変化しなかった。また、Fmod の mRNA 発現量はラミニンに比べタイプ I コラーゲン上に培養した場合に著明に増加した。

2. FS細胞とペリサイトは TGF $\beta$  受容体タイプ II (TGF $\beta$ RII)を発現しており、TGF $\beta$ 2 で下垂体前葉細胞を刺激すると Fmod の発現が誘導された。この応答は TGF $\beta$ R の阻害剤で打ち消すことができ、TGF $\beta$ の細胞内シグナル伝達が実際に Fmod の発現を制御していることが判明した。

評価； 申請者は、不明な点が多い下垂体前葉におけるプロテオグリカンの動態とその発現制御の機構の一端を明らかにした。ここで焦点を当てた Fmod はそれ自体 TGF $\beta$ と結合し、その作用を阻害することが報告されており、また Fmod はコラーゲンの線維形成を促進するとされている。ECM の構成要素としてプロテオグリカンは構造支持的な機能が主体とされてきたが、近年はより機能的な側面から注目されており、細胞内外の情報伝達にも関与すると考えられている。

実験としては細胞染色法を用いた検討の他に、*in situ* ハイブリダイゼーションを用いた TGF $\beta$ RII の発現確認、さらに qPCR、ウエスタンブロッティング法を用いた mRNA とタンパク質の検出と、現代の分子生物学的手法の代表的なものを駆使しており、博士課程で身につける手法として、広く基本的な手技を習得していることがうかがわれる。

データとしても S-100 タンパク質と Fmod の共在など明瞭だったが、すべての S-100 陽性細胞 (FS 細胞) が Fmod 陽性ではなく、さらなる subpopulation の存在が推察され、不明の点が残った。また、コラーゲンによる Fmod mRNA の誘導も非常に顕著だったが、逆にタンパク質量で見ると、コラーゲンとラミニンに差はあまり見られず、フィードバックがかかっている可能性があるという説明も、むしろ、本来細胞外に分泌されるタンパク質である Fmod の細胞外の量を考慮しなかったためである可能性が考えられた。

他にも、ECM 上での培養時に TGF $\beta$ の分泌が充進していなかったかと言う指摘があったが、残念ながら、実験されていなかった。また、2D と 3D の培養時に Fmod の見かけの分子量が変化していることが指摘されたが、その原因も不明であった。

全体的にはきっちりした仕事で、論文も良く書かれており、誤りも少なかった。また、2報の出版された英文論文を元に学位論文は書かれており、良い評価をつけ得ると考える。

問題点等； ECM 上での培養時の TGF $\beta$ の検討が欲しかった。また 2D と 3D の培養時に Fmod の見かけの分子量が変化していることは、糖鎖の違いに由来している可能性があり、その検討があればより良い仕事になったと考える。

書き直し部分に関して真摯に対応していただいたが、TGF $\beta$ の作用を単離した FS 細胞あるいはペリサイトのみで行うには技術的に問題があったということで、審査員から指摘されたように、混合した細胞で TGF $\beta$ 作用を検討せざるをえなかったのは残念だった。

分泌タンパク質の Fmod の細胞外含量を検討するのに ELISA はないようなので、下垂体組織全体のライゼートを作成しウエスタンブロッティングをやれば推測できたと考える。また審査員から、下垂体の生理的、また病的観点からの意味合いに関する質問があったが、その観点からはまだあまり考察が進んでいないようであった。

また、少なくともあったが、誤字や図の誤りなどは、申請者によって訂正が行われた。

合否；本論文は、医学部博士課程として十分なデータ量とそれを裏打ちする仕事量を持ち、2報

の英文論文もアクセプトされており、審査員一同、本学の学位論文の基準を満たすと判断した。

## 試問の結果の要旨

内容；論文審査の項に準ずる。

質疑、応答

論文審査の項参照。

申請者による発表は、明瞭で理解しやすかった。

はじめに **Fmod** に焦点を当てた理由をもう少し詳しく述べていたら、もっと導入されやすかったと思われる。二部の英文論文を一つにまとめた形だったが、中心の分子が **Fmod** ではっきりしており、発現検討ということでも一貫していたが、若干の手法の違いがあり、そこが少し引っ掛かりを招いた。

質問に対する受け答えも真摯であり、現段階での限界点や課題も理解しているようだった。

以上より、審査員は全員一致で申請者が医学博士号を受けるに値すると判断し、最終試験を合格とした。