

する傾向が得られた。これらの変異がADH産生異常を招く機序を検討する目的で、マウス下垂体腫瘍細胞AtT-20を用いてADH前駆体のプロセッシングと分泌を調べる実験を施行し、delE 47ではpro-AVPの半減期の延長、プロセッシング障害、ゴルジへの輸送の障害が示された。また家族性中枢性尿崩症でみられる別の変異 G75S について培養 Neuro 2A 細胞で発現実験を施行し、細胞の壊死性変化が生じることが示された。これらの成績は、家族性中枢性尿崩症の発症は変異ADH前駆体蛋白が小胞体に貯留する結果、細胞に緩徐な壊死がおこるという仮説を支持する。

ADH過剰状態では水の貯留と低ナトリウム血症が発生し患者の状態を悪化させる。ADHの抗利尿作用部位である腎集合尿管のAVP感受性の水チャンネル、アクアポリン (AQP)2について臨床的ならびに実験的に検討し、副腎皮質機能低下状態における水利尿不全は、AQP2産生系の賦活化亢進に由来することが明らかにされた。尿中AQP2測定は腎のAQP2反応性の指標として臨床的に有用度が高いと考えられる。SIADHでは血漿 AVP 濃度に比較して抗利尿反応は低下しAVP escape 現象を来す。動物実験において、SIADHにおけるescape現象の機序はAVPのV2受容体の抑制でおこること、それに体液量増大や血漿浸透圧低下などの要因が関与することが示された。

低ナトリウム血症と SIADH の発症の実態を外来および入院患者について検討した成績から、総検体の1.1%に129mEq/l以下の低ナトリウム血症が認められ、このうちSIADHは60%、高齢者が80%を占め、炎症性サイトカイン誘発によるAVP分泌亢進があると考えられた。

4) 下垂体ホルモン複合欠損症

自己免疫性視床下部下垂体炎における抗GH及び抗ACTH 抗体の存在につき検討した。ラット下垂体サイトゾールを抗原とすると、リンパ球性下垂体炎（前葉炎+漏斗神経葉炎）において11例中2例が22kDa抗原に対し陽性であったが、シーハン症候群44%、橋本病25%、バセドウ病8%、産前婦人15%、産後の婦人7.3%、健常人5%にも陽性を認めた。ヒト下垂体サイトゾールを抗原とすると、リンパ球性下垂体炎では、22kDa抗原に対し11例中8例が陽性と高い陽性率を示し、甲状腺疾患では陽性者はなく、産後の婦人で僅かに陽性者を認める程度であった。下垂体22kDaの抗原としてGHが考えられたため、ヒトGH を抗原としてウエスタンブローディングを行ったところ、リンパ球性下垂体炎では全例陽性であり、橋本病の血清では陰性であった。抗 GH 抗体陽性と下垂体機能低下の関係を検討したところ一定の傾向は認められず、この抗体の病因的意義は明らかではなかった。抗 ACTH 活性は陽性率は低く、疾患特異性も低かった。

ウエスタンブローディング法によりヒト下垂体膜分画を抗原として用いて抗下垂体

抗体について検討した結果、リンパ球性下垂体炎13例中5例で68、49、43kDaの陽性バンドが認められた。リンパ球性漏斗神経葉炎患者では12例中1例で49kDaの陽性バンドを認めた。ACTH 単独欠損症ではいずれも陰性であった。ヒト下垂体膜分画に対する抗体は、リンパ球性下垂体炎に特異性が高く、発病初期に陽性となり治療経過とともに抗体価が下がる可能性が示された。従って、これらの抗体の病因的意義はなお明らかではないが、自己免疫性視床下部・下垂体炎の診断的意義はあると考えられる。

Prophet of Pit-1 (Prop-1) の遺伝子変異は家族性複合性下垂体ホルモン欠損症の原因となることが明らかにされている。ヒトProp-1 cDNAのクローニングを行い、転写活性化能と正常下垂体での発現について検討した。ヒトProp-1は226個のアミノ酸から成り、N端、ホメオドメイン、C端はマウスProp-1それぞれ48.5%、93.3%、77.6%と相同性を示し、配列は142番目のアラニンがスレオニンである以外は同一であった。転写活性はC端にのみ認められた。ヒト成人組織では下垂体のみにProp-1 遺伝子発現が認められた。また、Prop-1 遺伝子の発現はACTH産生腺腫や非機能腺腫において認められた。Prop-1遺伝子変異をもつ複合性下垂体ホルモン欠損症患者では GH、PRL、TSHの欠損のみでなく、ゴナドトロピン系障害やACTH系障害を示す例も存在する。Prop-1はPit-1遺伝子のエンハンサーとしての機能以外に、直接または他の転写因子を介してACTH、LH、FSH遺伝子の発現調節に関与する可能性が推定される。

1999年10月にGrowth Hormone Research Society (GRS) において提案された小児のGHD における診断と治療のコンセンサスガイドラインに基づいて、わが国の成長ホルモン分泌不全性低身長症の診断の手引きを改訂する案について検討した。

5) 疫学実態調査

前年度に疫学研究班と協力して施行した第一段階調査で得られた自己免疫性視床下部下垂体炎、Kallmann 症候群および家族性中枢性尿崩症の3疾患患者を対象として、個々の患者の血清ヒト下垂体抗体、遺伝子検査を施行し、これらの疾患の病態解析を進展させた。第二段階としてPRL、ゴナドトロピン、ADH分泌異常症の患者数調査を施行した。得られた推定患者数は、各々、13,360例、13,800例、6,400例であった。第三段階として、次年度施行予定の成人下垂体機能低下症を対象とした疫学調査の準備を進めた。

4. 結論

PRL、ゴナドトロピン、ADH分泌異常症の診断や病態の解明において飛躍的な成果を得た。しかし生命予後とQOLの改善を目的にした治療に関して残された領域は

果てしなく大きい。難治性高PRL血症はドパミン作動薬が無効で手術による根治の不可能な病態であり、新しい治療薬の開発が必要である。Kallmann 症候群や家族性中枢性尿崩症における遺伝子異常の検索は、これらの異常と発症機序との関係を解明することによって、初めて治療に結びつくと考えられる。ADH生物活性の新しい指標である尿中アクアポリン2の測定系(RIA)はADH分泌異常症の新しい解析法として有用と考えられる。診断に応用するためには、測定系の確立と一般化に向けてさらに努力する必要がある。ゴナドトロピン産生下垂体腫瘍の分子機能的な新分類を確立して新しい治療の指針を作成する必要がある。自己免疫性視床下部下垂体機能低下症の診断に不可欠な自己免疫異常評価法を確立する必要がある。器質的疾患による成人下垂体機能障害は高脂血症、骨粗鬆症、動脈硬化を伴い、これまでのホルモンに加えてゴナドトロピンやGH補償によりQOLが改善する可能性が高く正確な診断と新しい治療法を早急に確立する必要がある。いずれにおいても国際的な医療レベルを考慮してさらに研究を継続することが不可欠である。

VI. 研究成果の概要

1. プロラクチン(PRL)分泌異常症

- 1) PRL産生腫瘍細胞GH₃においてプロモクリプチンによるアポトーシス誘導機構にp38MAPキナーゼが関与することを見出した。
- 2) 新転写因子mPOUによるPRL遺伝子発現増幅作用機序を解明した。
- 3) 下垂体前葉細胞のNO産生はE2、GRHおよびLHRHの調整を受け、NO合成酵素の補酵素テトラヒドロピオプテリンはNO産生を介してPRL分泌に抑制的に作用することを見出した。

2. ゴナドトロピン分泌異常症

- 1) Kallmann症候群の家族例および孤発例を対象として、本邦におけるKAL遺伝子の変異の頻度を検討した。
- 2) 小児期の男子中枢性性腺機能低下症の診断におけるHCGテストとLHRHテストの有用性について比較検討した。
- 3) 摂食促進物質オレキシンが性機能を障害する可能性を示唆した。
- 4) 新しいFSH-GnRHパルス療法は、ゴナドトロピン療法の副作用を軽減する治療法として有用であることを明らかにした。
- 5) 偶発性下垂体腺腫 pituitary incidentaloma は、非機能性腺腫と同様に、潜在的にゴナドトロピン分泌能を有する腫瘍であることを明らかにした。
- 6) 非機能性下垂体腺腫における転写因子Ptx1およびNeuroD1の局在について検討し、Ptx1はゴナドトロピン産生腺腫の機能発現に、NeuroD1はゴナドトロピン産生腺腫の機能分化に各々関与する可能性を示唆した。

3. 抗利尿ホルモン (ADH)分泌異常症

- 1) 家族性中枢性尿崩症の2家系において新しい遺伝子異常を見出した。
- 2) これらの変異遺伝子の発現実験から、家族性中枢性尿崩症の発症には変異ADH前駆体蛋白の小胞体内貯留に基づく細胞壊死が関与することが示唆された。
- 3) 副腎皮質機能低下状態における水利尿不全は、ADHの抗利尿作用部位である腎集合尿管のAVP感受性水チャネル、アクアポリン(AQP2)産生系の賦活化亢進に由来することを実験的に明らかにした。
- 4) 尿中AQP2測定は腎のAQP2反応性の指標として臨床的に有用度が高いことを明らかにした。

- 5) SIADHでは血漿AVP濃度に比較して抗利尿反応は低下し、AVP escape現象はAVPのV2受容体の抑制によって生じること、体液量増大や血漿浸透圧低下などの要因が関与することを動物実験で示した。
- 6) 低ナトリウム血症(129mEq/l以下)のうちSIADHは60%、高齢者は80%を占め、炎症性サイトカイン誘発によるAVP分泌亢進があることが示唆された。

4. 下垂体ホルモン複合欠損症

- 1) 自己免疫性視床下部下垂体炎における自己抗体について検討した。下垂体サイトゾール抗原(22kDa)に対する抗体は、リンパ球性下垂体炎で高い陽性率を示したが疾患特異性は低かった。ヒト下垂体膜分画抗原(68、49、43kDa)に対する抗体は頻度は低いがリンパ球性下垂体炎に特異性が高く、発病初期に陽性となり治療経過とともに抗体価が低下する可能性を示した。
- 2) 家族性複合性下垂体ホルモン欠損症の原因となるヒトProp-1 cDNAのクローニングを行い、転写活性化能と正常下垂体での発現について検討した。Prop-1遺伝子の発現はACTH産生腺腫や非機能腺腫で認められ、Prop-1はPit-1遺伝子のエンハンサーとして機能する以外に、直接または他の転写因子を介してACTH、LH、FSH遺伝子の発現調節に関与する可能性が示唆された。
- 3) 国際的な小児GHDの診断と治療のコンセンサスガイドラインに基づいて、わが国の成長ホルモン分泌不全性低身長症の診断の手引きの改訂案を示した。

5. 疫学実態調査

- 1) 疫学研究班と協同で施行した第一段階調査で得られた自己免疫性視床下部下垂体炎、Kallmann症候群および家族性中枢性尿崩症の3疾患を対象として、個々の患者の血清ヒト下垂体抗体、遺伝子検査を施行して病態解析を進展させた。
- 2) 第二段階としてPRL、ゴナドトロピン、ADH分泌異常症の患者数調査を施行した。得られた推定患者数は、各々、13,360例、13,800例、6,400例であった。
- 3) 第三段階として、次年度以後に成人下垂体機能低下症を対象とした疫学調査を施行する準備を進めた。

VII. 分担研究報告

【1】プロラクチン分泌異常症

「プロラクチン分泌異常症」座長のまとめ

寺本 明 (日本医科大学脳神経外科)

本研究班における「プロラクチン分泌異常症」に関する平成11年度の研究は臨床病態の裏付けを行った以下の3件にまとめられる。

まず宮崎（島根医大産婦人科）らは、PRL産生腫瘍細胞においてD2受容体を介さないドーパミンの作用機序を検討した。D2ドーパミン受容体作動薬であるブロモクリプチン（BCと略）は高PRL血症やいくつかのタイプの下垂体腺腫に対する治療薬として広く用いられている。今回彼等はBCがD2受容体を介さないと考えられる経路で下垂体腫瘍細胞に細胞死をもたらす細胞内情報伝達系について調べた。実験は、ラット下垂体腫瘍細胞GH3細胞を用い、BCによるp38MAPキナーゼ活性化反応とアポトーシスに関して行った。GH3細胞をBC存在下に培養するとp38MAPキナーゼ活性は上昇し、同時にTUNEL陽性のアポトーシス細胞数が増加した。これらの変化はp38MAPキナーゼ特異的阻害剤で有意に抑制された。また、p38MAPキナーゼ活性はD2受容体拮抗薬(eticlopride)で阻害されなかった。P44/42MAPキナーゼ活性化因子（EGF・TRH）をBCと同時に投与するとp38MAPキナーゼ活性は有意に減弱し、アポトーシスが抑制された。これらの結果から、彼等はD2受容体を介さないBCによるアポトーシス培養機構にp38MAPキナーゼ活性化反応が関与していること、またP44/42MAPキナーゼ活性化因子はp38MAPキナーゼ活性化反応の抑制を介してアポトーシス誘導を阻害する事を明らかにした。

次に、千原（神戸大学第三内科）らは新規転写因子mPOUによるPRL遺伝子発現増幅作用に関する報告を行った。彼等は、PRL遺伝子発現機構の解析中にPit-1以外のタンパクがPit-1結合DNAエレメントに結合しその発現を調節する可能性を見出した。ついでヒト下垂体ライブラリーから酵母のone-hybrid systemを使用し、Pit-1結合DNAエレメントに結合するタンパク（mPOUタンパク）をクローニングした。本年度はこのタンパクのPRL遺伝子発現に及ぼす効果について検討を加えた。mPOUはPRL遺伝子の近位エンハンサー領域にあるPit-1結合DNAエレメント、1Pおよび3Pに特異的に結合することが、Mobility Shift Assay で確認された。mPOUのPRLレポーター遺伝子をCos細胞に一過性に発現させたところ、mPOUのPRL遺伝子発現促進効果はわずかであったが、mPOUはPit-1存在下にPRL遺伝子発現を増幅させた。また、cAMPはこのPit-1、mPOUの両者存在下にみられるPRL遺伝子の発現亢進をさらに増強させた。以上の如くPRLレポーター遺伝子の一過性発現実験においてmPOUはPit-1存在下にPRL遺伝子発現を活性化させるが、実際にmPOUが生理的な意義を有しているか否かは明らかではない。彼等は、既にmPOU mRNAがラット下垂体、ヒト下垂体に存在することは確認しているがそのタンパクの存在を証明するためmPOUの抗体を作製中であるとしている。抗体の確立によりmPOUの生理的な意義やPRL産生腺腫

における病態解明に寄与するものと思われる。

第3に、加藤（島根医大第一内科）らは、テトラヒドロビオプテリン（6R-BH4）のPRLおよびGH分泌に及ぼす効果を検討した。彼等は現在までに下垂体における一酸化窒素（NO）産生調節機序とNOのホルモン分泌における役割についてGH3細胞を用いた実験結果を報告してきた。すなわち、GH3細胞においては、定常的に発現されるNO合成酵素によって産生されるNOがautocrineまたはparacrineに作用してguanylate cyclaseを活性化しホルモン分泌を抑制的に調節する。TRHはイノシトールリン酸系を活性化して細胞内Ca濃度を増加させ、細胞内Ca濃度の増加はホルモン分泌を促進させる一方、NO合成酵素を活性化してNO産生を増加させる機序が推定される。本年度はラット下垂体におけるNOの産生並びにNO合成酵素（NOS）の補酵素、6R-BH4のPRL及びGH分泌に及ぼす効果について検討した。ラット下垂体前葉初代培養細胞の培養緩衝液中 [NO₂⁻] は培養細胞数に依存し、E2で前処置すると [NO₂⁻] は増加した。[NO₂⁻] はGRHやLHRHの添加によって更に増加し、NOS阻害剤、L-NAMEによって抑制された。6R-BH4はラット下垂体細胞のPRL分泌を抑制し、GH分泌を増加させた。以上より、下垂体前葉細胞のNO産生はE2、GRHおよびLHRHの調整を受けること、並びに6R-BH4はNO産生を介してPRL分泌に抑制的に作用し、GH分泌に対しては異なる機序で促進的に作用することが示唆された。

プロラクチン産生腫瘍細胞におけるドーパミン作用機序 —D₂ 受容体を介さない機構の解明—

分担研究者	宮崎康二 (島根医科大学産科婦人科)
研究協力者	金崎春彦 (同)
	福永浩二 (熊本大学医学部第一薬理)
	宮本英七 (同)

【背景】

これまで我々は古典的 MAP キナーゼ経路 (p44/42 MAP キナーゼ) が TRH や EGF 等のホルモン分泌促進因子により活性化され、プロラクチン産生や細胞分化に関与していることを報告してきた¹⁾。一方 p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAP キナーゼ) は MAP キナーゼ family の一つでありサイトカインや紫外線、炎症反応により活性化され、細胞死を含む様々な細胞反応に関与する事が報告されている。

ドーパミン D₂ 受容体作動薬であるプロモクリプチンは高プロラクチン血症や下垂体腫瘍の治療薬として臨床的に広く使用されているが、中にはドーパミン抵抗性の下垂体腫瘍が存在する事が知られている。ドーパミンは cAMP や細胞内の Ca²⁺ の上昇を抑制することで下垂体ホルモンの分泌を抑制することは知られているが、その作用機序については不明な点が多い。今回我々は、ドーパミン抵抗機序解明の目的で D₂ 受容体を介さないドーパミンの作用機序について検討した。また p38MAP キナーゼと 44/42 MAP キナーゼとの関係についても併せて検討した。

【方法】

(細胞培養) ラット下垂体腫瘍 GH3 細胞を 35mm ディッシュに 15% ウマ血清、2.5% ウシ胎仔血清を含む Ham F¹⁰ メディウムを用いて培養し、3日後培養メディウムに 10 μ M プロモクリプチンを添加し刺激を行った。

(p38MAP キナーゼ assay) プロモクリプチンで刺激後、細胞を MAP キナーゼ assay buffer にて scrape し、上清を SDS 化した後、myelin basic protein を基質としたゲル内リン酸化法にて活性の測定を行った。

(アポトーシス検出) GH3 細胞を刺激後、メタノールで固定し TUNEL 法を用いた apoptosis detection system, fluorescein (Promega) にて検出した。

【結果】

GH3細胞を 10 μ M プロモクリプチンで刺激すると p38 MAP キナーゼ 活性は刺激後48時間より control に比べて著明に上昇し (図 1)、この活性化反応は特異的 p38 MAP キナーゼ阻害剤 (SB202190, SB203580) にて完全に抑制された (図 2)。プロモクリプチン投与

にてアポトーシスに陥った TUNEL 陽性細胞の割合は上昇し、この上昇は p38 MAP キナーゼ阻害剤にて有意に抑制された (図 3)。ドーパミン D₂ 受容体拮抗薬である eticlopride (20 μ M) はブロモクリプチンによる p38 MAP キナーゼ活性化反応を阻害しなかった (図 4)。Epidermal growth factor (EGF) 及び Thyrotropin-releasing hormone (TRH) は共に 44/42 kDa MAP キナーゼ (ERK) を著明に上昇させたが、ブロモクリプチンとの同時投与により p38 MAP キナーゼ活性化を有意に抑制した (図 5)。また EGF、TRH は共にブロモクリプチンによる GH3 細胞のアポトーシス誘導を有意に抑制した (図 6)。

【考察】

ブロモクリプチンは D₂ ドーパミン受容体を介し、アデニル酸シクラーゼの抑制や細胞内 Ca²⁺ の上昇を抑制することで下垂体ホルモンの分泌を抑制する事は知られているが、その抗腫瘍効果については不明な点が多い。本研究において私たちはブロモクリプチンがラット下垂体 GH3 細胞において p38 MAP キナーゼを活性化し得ること、またその活性化が細胞死に強く関連している知見を得た。p38 MAP キナーゼは MAP キナーゼ family の一つとして近年クローニングされ²⁾、古典的 MAP キナーゼカスケード (44/42 kDa MAP キナーゼカスケード) が主に増殖因子受容体からの増殖、分化シグナルを伝達するのに対し、p38 MAP キナーゼは放射線、紫外線、高浸透圧等の物理化学的ストレスにより強く活性化される事が知られ、これら物理化学的ストレスの多くがアポトーシスを誘導することから p38 MAP キナーゼとアポトーシスの関係が議論されるようになった。ブロモクリプチンはプロラクチノーマや成長ホルモン産生腫瘍等の下垂体腫瘍に効果を持ち、臨床的に広く使われる薬剤である。今回、我々はブロモクリプチンが GH3 細胞において p38 MAP キナーゼを強く活性化し、同時にアポトーシスに陥ったことを示す TUNEL 陽性細胞の割合を上昇させる事を明らかにした。p38 MAP キナーゼの特異的阻害剤を用いた実験ではこの阻害剤でブロモクリプチンによる p38 MAP キナーゼ活性化反応、及びアポトーシス誘導が共に抑制されたことから、p38 MAP キナーゼの活性化が GH3 細胞においてブロモクリプチンのアポトーシス誘導に何らかの役割を果たしていると考えることが出来る。しかし D₂ ドーパミン受容体作動薬であるブロモクリプチンの p38 MAP キナーゼ活性化反応は、D₂ 受容体拮抗薬である eticlopride により阻害されなかった。このことは、ブロモクリプチンが D₂ 受容体を介さない機序で細胞死シグナルを伝えている可能性を示している。近年、培養神経細胞においてドーパミンが神経毒として作用すること、またアポトーシスを引き起こすことが報告され、しかもそれらの効果は D₂ 受容体を介してではなく、ドーパミントランスポーターを介した細胞質へのドーパミンの取り込みによりミトコンドリアが阻害され、ミトコンドリアからのチトクローム C の漏出がプロテアーゼであるカスパーゼ 3 を最終的に活性化させて細胞死を引き起こすとされている³⁾。ブロモクリプチンによる下垂体細胞障害がこのような機序によるのか、またその経路に p38 MAP キナーゼはどの様に関与するのか、今後の検討課題である。EGF、TRH はホルモン分泌促進因子で

あり、共に44/42 kDa MAP キナーゼ (ERK) を強く活性化するが、これらは分泌のみならず cell survival にも関与することが明らかになった。p38 MAP キナーゼとERK の target となる因子は何であるのか今後検討する必要がある。

下垂体腫瘍の治療を行う上で、プロモクリプチンに抵抗性を示すドーパミン抵抗性が大きな問題となっている。この機序を解明する上で、D₂ ドーパミン受容体を介した系と介さない系の2つの系を考慮する必要があることを、今回の研究結果は示している。

【文献】

1. Kanasaki H, Fukunaga K, Takahashi K, et al: Mitogen-activated protein kinase activation by stimulation with thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary GH3 cells. *Biol Reprod* 61: 319-325, 1999.
2. Han J, Lee JD, Bibbs L, et al: A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-811, 1994.
3. Du Y, Dodel RC, Bales KR, et al: Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 69: 1382-1388, 1997.

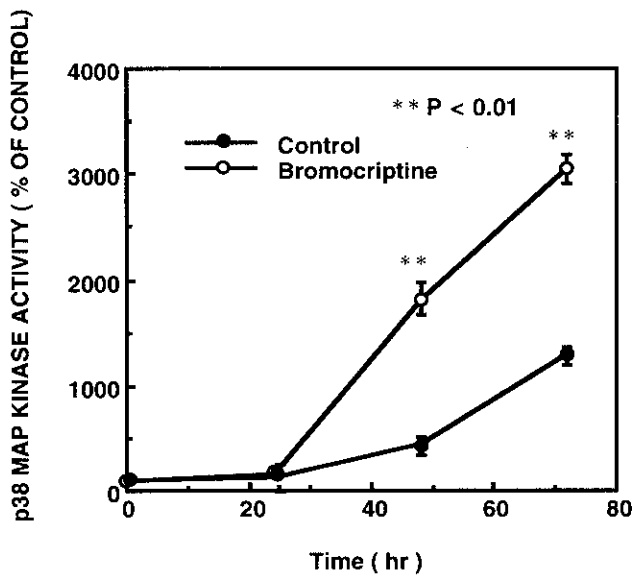


图 1

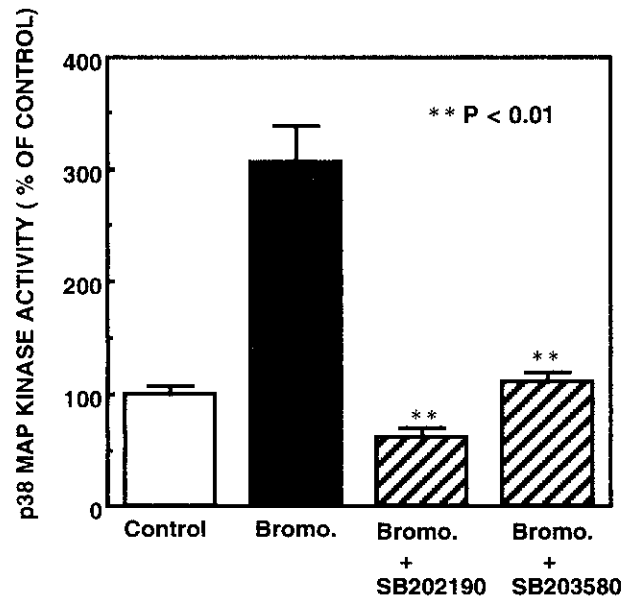


图 2

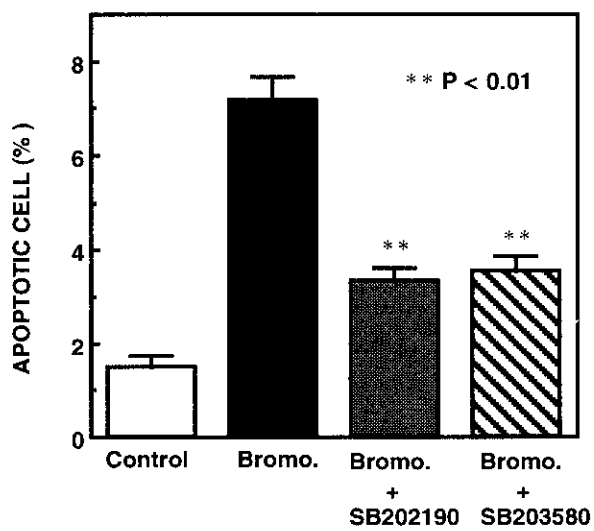


图 3

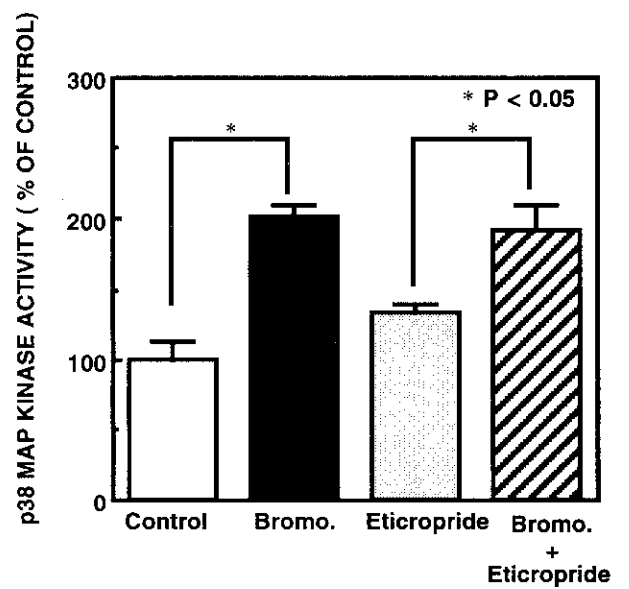


图 4

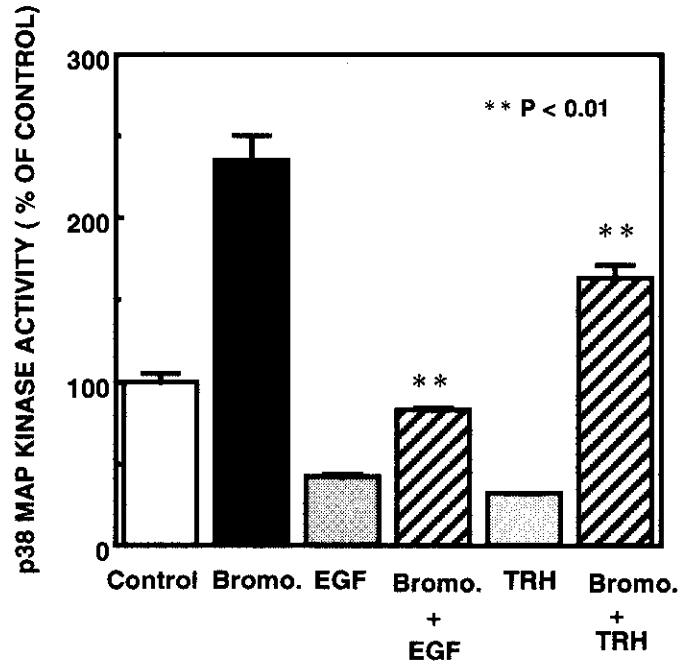


图 5

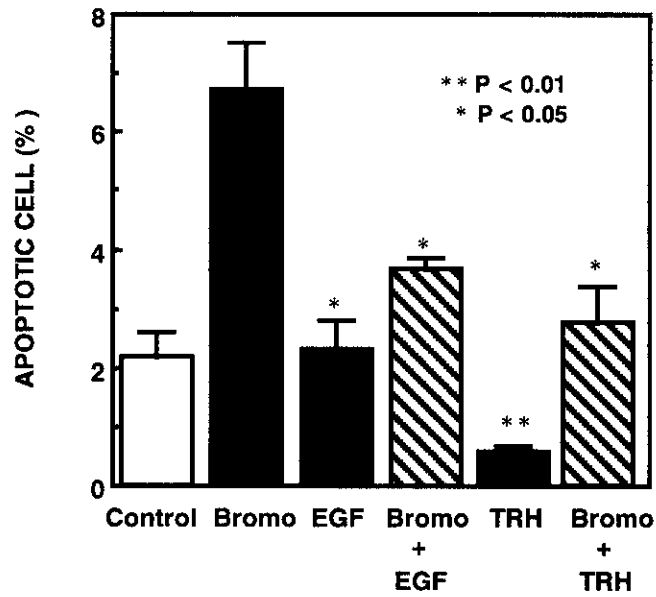


图 6

新規転写因子 mPOU のプロラクチン遺伝子発現増幅作用

分担研究者 千原和夫（神戸大学医学部第三内科）
研究協力者 置村康彦（神戸大学医学部保健学科医療基礎学）
麓万里子（神戸大学医学部第三内科）

【背景】

下垂体ホルモンの転写調節機構を理解することは、下垂体ホルモン産生異常症の病態理解のために欠くことのできないものである。これらの機構は、時間的空間的に巧妙に制御された転写因子の発現によることがあきらかとなってきた。GH および PRL 遺伝子の発現においては、下垂体特異的転写因子である Pit-1 が、GH、PRL 遺伝子の組織特異的発現を規定するばかりか、種々のホルモンによる GH、PRL 発現量の調節にも関与することが報告されている^{1,2)}。

一方、私どもは、PRL 遺伝子において最も転写開始点に近い Pit-1 結合 DNA 配列である 1P に Pit-1 以外の蛋白が結合し、PRL 遺伝子発現を促進する可能性を提唱していたが³⁾、実際にそのような蛋白があるのか、酵母の one-hybrid system でのクローニングを試み、Pit-1、Oct-1 にホモロジーを有する POU 蛋白 (mPOU) をクローニングした。これについては、昨年度の報告書に記載した。本年度は、この蛋白の PRL 発現に及ぼす効果について検討したので報告する。

【方法および結果】

1. mPOU の Pit-1 結合 DNA 配列への結合性の検討

この mPOU は 1P に対する結合性から、クローニングされたものであるが、実際に 1P に結合することを確認する目的で、大腸菌で発現させた GST フュージョン mPOU 蛋白および Pit-1 蛋白を使用し Mobility shift 実験を行った。Pit-1 の量が増加するに従って、³²P で標識した 1P に対して、Pit-1 はダイマーで結合するというこれまでの報告に合致するものであった。一方、mPOU も量が増加するに従って、1P プローベのシフトが明瞭になったが、シフトしたバンドは一本のみであり、1P にモノマーで結合することが明らかとなった。

PRL 遺伝子の近位エンハンサーには4つの Pit-1 結合 DNA 配列 (1P、2P、3P、4P) が存在する。それらに対する mPOU の親和性の相違について Mobility Shift Assay を用いて検討した。mPOU は容量依存性に 1P、3P に結合し、過剰量の非標識の 1P あるいは 3P によってその結合は減弱し、特異的に 1P、3P に結合するものと考えられた。しかし、3P に対する結合は 1P に対する結合ほど明確ではなく、mPOU は 1P により高親和性であるものと考えられた。2P に対する結合は、過剰量の非標識 2P によって、明確には減弱せず、非特異的な結合である可能性が示唆された。

つぎに、mPOU の結合に 1P のどの部位が必須であるか、ミュータント 1P オリゴ DNA (1

Pmut) を用いて検討した。TATNCAT で示される配列が Pit-1 結合のコンセンサス配列であるとされているが Pit-1 がダイマーで 1P に結合する場合、上流の AT に富む領域も結合に重要であり、この領域にミューテーションを加えると、モノマーの結合しか生じなくなる。この AT に富む領域に変異を加えた。1 Pmut を用いて mobility shift 実験を行った。前述したように、1P プロベインに対して mPOU は結合し、過剰量の 1P オリゴによってその結合は減弱した。しかし、過剰量のコールド 1 Pmut を加えた時、mPOU の結合は減弱せず、AT に富む領域が mPOU の結合に重要であることが示された。一方、1 Pmut をプローベとして用いた時には、mPOU を増加させていっても全く結合は認められず、やはり、この AT に富む領域が mPOU の結合に重要であることが示された。

2. PRL レポーター遺伝子発現に及ぼす mPOU の効果

1) mPOU の 0.6kPRL レポーター遺伝子発現に及ぼす効果

ラット PRL 遺伝子の転写開始点から 0.6k 上流までの DNA 配列にルシフェラーゼ構造遺伝子を結合させたレポーター遺伝子を、Cos 細胞にトランスフェクトし、48時間後にハーベストを行い、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションした mPOU 発現ベクターの量に従って、PRL レポーター遺伝子発現は活性化された。しかし、その効果は Pit-1 のそれと比べると小さいものであった。

2) mPOU、Pit-1 の 0.6kPRL レポーター遺伝子発現に及ぼす効果

mPOU は Pit-1 結合 DNA 配列に結合する性質を有しており、その結合を介して機能を発揮すると考えられるので、Pit-1 存在下にその作用が変化する可能性がある。そこで、mPOU と Pit-1 のコトランスフェクション実験を行なった。前述のごとく、mPOU 単独では、PRL レポーター遺伝子の活性化はわずかなものでしかなかった。一方、Pit-1 は 0.6k の PRL レポーター遺伝子発現を明らかに増加させた。mPOU と Pit-1 をコトランスフェクションした場合、その効果は、mPOU、Pit-1 単独時の効果の和に比べ、増加しており、この増加は cAMP の添加時にさらに明瞭であった。

3) mPOU、Pit-1 の 7 x 1P レポーター遺伝子発現に及ぼす効果

0.6k の PRL レポーター遺伝子は PRL 遺伝子の近位エンハンサーを含んでおり、その近位エンハンサーは、4つの Pit-1 結合 DNA 配列を含んでいる。Pit-1 結合 DNA 配列によって mPOU の効果に違いがあるか否か、mPOU の特異的結合が Mobility Shift 実験で明かとなった 1P、3P について検討した。1P を 7つ結合させ、PRL のミニマルプロモーターの上流に挿入し、これをルシフェラーゼ遺伝子と結合させたレポーター遺伝子 (7 x 1P) を作製し、これを Cos 細胞にトランスフェクションした。0.6kPRL レポーター遺伝子を用いた時と同様に、mPOU 単独ではレポーター遺伝子発現の活性化能は小さいものであったが、Pit-1 とコトランスフェクションした時には、Pit-1 の作用を著明に亢進させた。cAMP 存在下に、その効果はさらに増強した。

4) mPOU、Pit-1 の 7 x 3P レポーター遺伝子発現に及ぼす効果

つぎに、3P を 7つもつ同様のレポーター遺伝子 (7 x 3P) を使用して、3P に対する mPOU

の効果を検討した。mPOU は明かなレポーター遺伝子発現促進効果を示さなかった。

Pit-1 はレポーター遺伝子活性を亢進させたが、7 x 1P のときと異なり、mPOU は Pit-1 による 7 x 3P レポーター遺伝子の発現亢進を増強しなかった。また、mPOU および Pit-1 の作用は cAMP によって影響されなかった。

【考察】

Mobility Shift 実験により、mPOU は、1P、3P に特異的に結合するが、1P に対してより親和性に富むこと、さらにモノマーで 1P に結合し、その結合に重要な領域は Pit-1 のコンセンサス配列 CATNTAT の上流の AT に富む領域であることが明らかとなった。一方、PRL レポーター遺伝子を用いた一過性発現実験系において、mPOU 単独による 0.6k PRL レポーター遺伝子の活性化は Pit-1 による活性化に比べ小さいものの、Pit-1 による PRL レポーター遺伝子発現をさらに亢進させた。また、この増幅効果は 1P をもつ レポーター遺伝子では明確であったが、3P をもつ レポーター遺伝子では明瞭ではなかった。以上の結合および機能解析両者から、mPOU による、Pit-1 の PRL 遺伝子の増幅効果の作用点の少なくとも一部は 1P であると推定された。

mPOU の増幅効果は、cAMP の在下にさらに亢進する。Pit-1 は cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素 (A kinase) によってリン酸化されるが、Pit-1 自身のリン酸化は PRL 遺伝子発現の亢進には影響しないので³⁾、mPOU あるいは mPOU と結合する他の因子のリン酸化が、A kinase の下流の情報伝達系で生じ、PRL 遺伝子発現の調節に関与している可能性がある。プロラクチノーマ治療の第一選択が cAMP 産生を抑制するブロモクリプチンであることから、cAMP は PRL 産生において、大きな役割を果たしていることが想像され、この増幅機構を解明することは、PRL 遺伝子の発現機構を明確にするだけでなくプロラクチノーマに対するより有用な治療法を開発する基盤となる可能性がある。

最近、Fliss らによって、1P に作用して PRL 遺伝子を促進する新たな転写因子として、PREB (PRL regulatory element binding) がクローニングされた⁴⁾。PREB のアミノ酸配列は mPOU のそれと全く異なっており、mPOU とは別個の蛋白である。また、1P における PREB の結合部位も、mPOU の結合に重要な領域よりさらに上流とすいていされており、PREB 単独で PRL 遺伝子発現を活性化することから、作用様式も mPOU のそれと異なるものと推測される。1P 近傍に Pit-1 以外のさまざまな因子が結合し、微妙に PRL 遺伝子発現を調節している可能性が想像される。今後、これらの諸因子の生理的意義をさらに明確にしていく必要があると考えられる。

【文献】

1. Ingraham HJ, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn AE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG: A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55: 519, 1988.
2. Day RN, Koike S, Sakai M, Muramatsu M, Maurer RA: Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 4: 1964,

1990.

3. Okimura Y, Howard PW, Maurer RA: Pit-1 binding sites mediate transcriptional responses to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate through a mechanism that does not require inducible phosphorylation of Pit-1. *Mol Endocrinol* 8: 1559, 1994.
4. Fliss MS, Hinkle PM, Bancroft C: Expression cloning and characterization of PREB (prolactin regulatory element binding), a novel WD motif DNA-binding protein with a capacity to regulate prolactin promoter activity. *Mol Endocrinol* 13: 644, 1999.

テトラヒドロビオプテリンのプロラクチン(PRL)および成長ホルモン(GH)分泌に及ぼす効果

分担研究者 村上宜男 (島根医科大学第一内科)

研究協力者 越村邦夫 (同)

【背景】

GH₃細胞においては、定常的に発現される一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS)によって産生されるNOがオートクリンまたはパラクリンに作用してguanylate cyclaseを活性化してホルモン分泌を抑制的に調節する(文献1)。TRHはイノシトールリン酸系を活性化して細胞内Ca²⁺濃度を増加させ、細胞内Ca²⁺濃度の増加はホルモン分泌を促進する一方、NO合成酵素を活性化してNO産生を増加させる(文献2)。

今回の研究では、ラット下垂体前葉初代培養細胞におけるNO産生調節機序ならびにNO合成酵素の補酵素、tetrahydrobiopterin (6R-BH₄)のプロラクチン(PRL)および成長ホルモン(GH)分泌に及ぼす効果について検討した。

【方法】

無菌的に得たラット下垂体前葉組織を細切後、0.25%トリプシンを用いて酵素的に細胞を分離、浮遊化させた。10%ウシ胎児血清を含むDME培養液中で2日間培養して単層を形成させた後、血清を除去した培養液中でさらに24時間培養して実験に供した。一部の実験では、無血清培養液に10 μM estradiol または5 mM 2, 4-diamino-6-hydroxypyrimidine (DAHP) を添加した。細胞を Krebs-Hepes 緩衝液中で2時間培養し、培養液中に放出されたNOの代謝産物であるNO₂⁻とNO₃⁻濃度を、両者を分離するポリスチレン粒子を充填した逆相カラム、カドミウム還元カラム、Griess 試薬との反応ならびに分光光度計を組み合わせた HPLC 法(文献2)を用いて測定した。ホルモン分泌実験では、細胞をDME培養液中で3時間培養し、培溶液に試薬を添加した。培養上清中のラット PRL ならびにGH濃度をRIAで測定した。

【結果】

ラット下垂体前葉細胞培養緩衝液中のNO代謝産物は、GH₃細胞の場合と同様に、主にNO₂⁻であった。NO₂⁻濃度は培養細胞数に依存して増加した。Estradiol 非処理群においては、GRH や LHRH の添加は緩衝液 NO₂⁻濃度に有意の影響を与えなかった。一方、あらかじめestradiolで24時間前処理した細胞では、NO₂⁻濃度が増加し、GRHやLHRHの添加はNO₂⁻濃度をさらに増加させた(図1)。L-NAME は対照群のNO₂⁻濃度には影響を与えなかったが、GRH添加時のNO₂⁻濃度の増加を抑制した。

6R-BH₄の添加はラット下垂体前葉細胞の PRL 分泌を用量反的に抑制した (図 2、上)。対照的に、6R-BH₄ は GH 分泌を用量反的に増加させた (図 2、下)。あらかじめ DAHP で 4 8 時間前処理した場合には、基礎 GH 分泌は影響を受けなかったが、GRH の GH 分泌促進作用は対照群に比較して低下した。

【考察】

今回の成績から、estradiol、GRH ならびに LHRH が下垂体前葉細胞の NO 産生調節に促進的役割を有する可能性が示唆された。NO はラット下垂体 PRL 分泌に抑制的に作用する (文献 3)。NO 供与体、sodium nitroprusside の添加は PRL 分泌を抑制し、この効果は NO を結合してその作用を抑制する hemoglobin によって阻害される。また、NO 作用の主なセカンドメッセンジャーである cyclic GMP も PRL 分泌を抑制する。本研究において、6R-BH₄ はラット下垂体前葉細胞の PRL 分泌を用量反的に抑制した。この成績から、6R-BH₄ が NO 合成酵素活性を亢進させて NO 産生を増加させる結果、PRL 分泌が抑制されたことが示唆される。

対照的に、6R-BH₄ はラット下垂体前葉細胞の GH 分泌を増加させた。この効果は、Ca²⁺ チャネル拮抗剤、nicardipine によって抑制されることから、細胞内への Ca²⁺ 流入を介する反応であることが示唆された。あらかじめ DAHP で 2 4 時間前処理した場合には、基礎 GH 分泌は影響を受けなかったが、GRH の GH 分泌促進作用は低下した。DAHP は 6R-BH₄ の de novo 合成過程において GTP cyclohydrolase の酵素活性を抑制して内因性 6R-BH₄ を減少させることが知られている。したがって、内因性 6R-BH₄ が GH 分泌に促進的役割を有することが示唆される。6R-BH₄ は PC12 細胞の dopamine 遊離を促進する (文献 4)。6R-BH₄ は PC12 細胞の細胞膜を脱分極し、Ca²⁺ 流入を促進する (文献 4) ことから細胞膜レベルで作用する機序が推定される。類似の機序で GH 分泌を促進する可能性が推定されるが、詳細についてはさらに検討が必要である。

【まとめ】

GH 分泌細胞やその他の下垂体細胞に存在する NO 合成酵素によって産生される NO は PRL 分泌に抑制的に作用すると考えられる。一方、これらの細胞や視床下部のカテコラミンニューロン、末梢血に由来する 6R-BH₄ は Ca²⁺ 流入促進作用を介して GH 分泌を促進する可能性が示唆される。

【文献】

1. Tsumori M, Murakami Y, Koshimura K, Kato Y: Endogenous nitric oxide inhibits growth hormone secretion through cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms in GH3 cells. *Endocrine J* 46: 779-785, 1999.
2. Tsumori M, Murakami Y, Koshimur K, Kato Y: Thyrotropin-releasing hormone stimulates nitric oxide release from GH3 cells. *J Neuroendocrinol.* 11: 451-456, 1999.
3. Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Diaz MDeIC, Belova N, Rettori V, McCann SM: Role of nitric oxide in control of prolactin release by the