

図6. GH底値別に分類した、IGF-1 SD値の推移

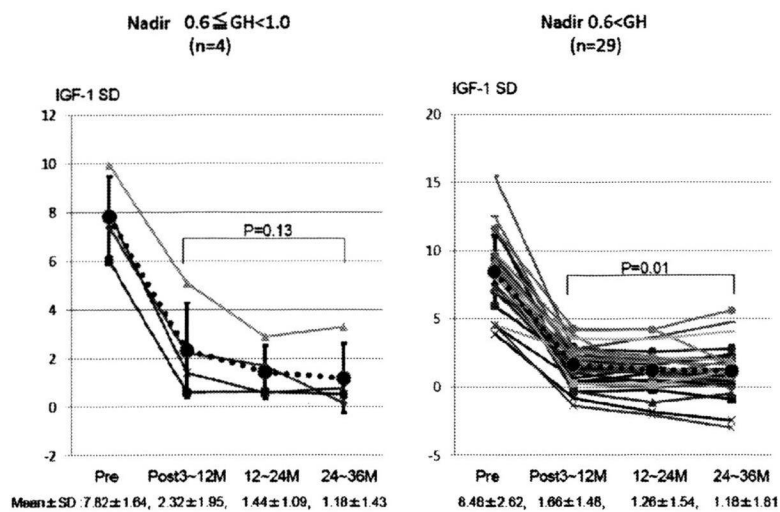
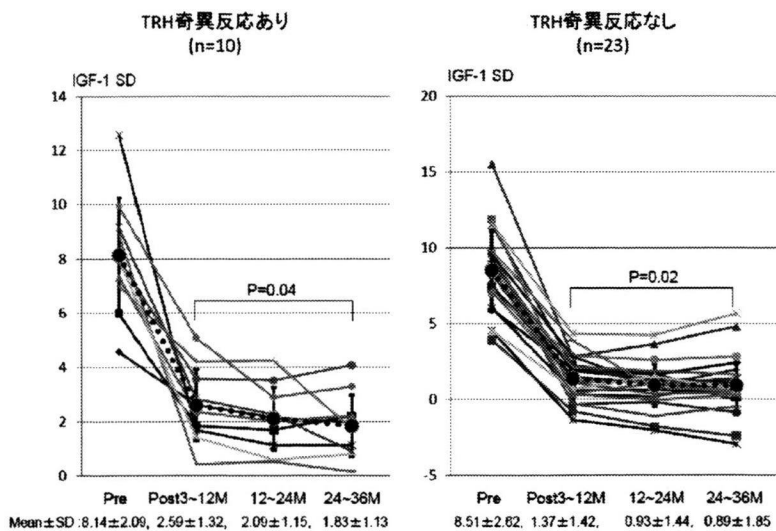


図7. TRH 負荷試験での奇異反応の有無で分類した、IGF-1SD 値の推移



成人GH分泌不全症におけるGH投与量に関する検討

研究分担者	肥塚 直美	東京女子医科大学第二内科
研究協力者	福田いずみ	東京女子医科大学第二内科
	栗本真紀子	東京女子医科大学第二内科
	盛田 順子	東京女子医科大学第二内科
	田中 聡	東京女子医科大学第二内科
	山門 佑有	東京女子医科大学第二内科
	高野加寿恵	東京女子医科大学第二内科

研究要旨：GH治療を6ヶ月以上受けている成人GHD 22例(18～65歳；男性/女性 9/13)を対象とし、GHの投与維持量及び補充中の血中IGF-I値および臨床所見について解析した。GH投与維持量の中央値(範囲)は0.3(0.1～0.6)mg/日、4(2～9)μg/kg/日であった。IGF-Iが正常化したものは11例であり、GHの維持投与量は0.3(0.1～0.5)mg/日、4(2～9)μg/kg/日であり、性差を認めなかった。IGF-Iが正常化していない症例では臨床症状の改善がみられたため現在のGH投与量を維持量としているが投与量はIGF-I正常化群と差を認めなかった。女性では維持投与量と年齢は負の相関を認めたが男性では認めなかった。IGF-Iを正常化するには女性の方がより多いGH投与量を必要とするといわれているが、今回の検討では性差を認めなかった。実地臨床では成人GHD症例は比較的少量のGH投与量で治療されており、少量の維持量であっても臨床症状が改善する例が認められた。今後多数例での検討が必要である。

A. 研究目的

わが国では2006年以降、成人GH分泌不全症(GHD)を対象としたGH治療が認可された。GH投与は3 μg/kg/日を開始量とし、臨床症状と血中IGF-Iを指標に漸増することが推奨されている。今回、我々がGH治療を行っている成人GHD症例のGH投与量について検討した。

B. 研究方法

GH治療を6ヶ月以上受けている成人GHD 22例(18～65歳；男性/女性 9/13)を対象とした。22例中19例(男性/女性 8/11)は小児期発症GHDで、その原因は周産期異常による複合型下垂体機能低下症9例、胚細胞腫瘍5例、頭蓋咽頭腫4例であった。これら小児

期発症19例中16例で小児期にGHの治療経験を有していた。一方、成人期発症GHD3例(男性/女性 1/2)の原因疾患は下垂体腺腫、シーハン症候群、頭蓋咽頭腫が各々1例であった。

これら症例のGH維持投与量及び補充中の血中IGF-I値および臨床所見について解析した。

C. 研究結果

成人としてのGH補充療法開始年齢は18～19歳、20歳代、30歳代、40歳代、50歳代、60歳代はそれぞれ2例(9%)、5例(23%)、7例(31%)、5例(23%)、2例(9%)、1例(5%)であった。

現時点での維持GH投与量の中央値(範囲)は0.3(0.1~0.6)mg/日、4(2~9) μ g/kg/日で、男性では0.3(0.25~0.4)mg/日、4(3~7) μ g/kg/日、女性では0.2(0.1~0.6)mg/日、4(3~9) μ g/kg/日であった。各症例のIGF-Iの治療前後のIGF-I値を図1に示す。IGF-Iが正常化したのは男性9例中5例、女性で女性13例中6例であった。これら正常化した11例のGHの維持投与量は0.3(0.1~0.5)mg/日、4(2~9) μ g/kg/日で、男性では0.3(0.3~0.4)mg/日、4(3~7) μ g/kg/日、女性では0.19(0.1~0.5)mg/日、3.5(2~9) μ g/kg/日であった。一方、IGF-Iが正常化していない症例11例(男性/女性 4/7)は自覚症状および臨床所見の改善がみられたため現在のGH投与量を維持量としているが、その投与量は0.3(0.1~0.6)mg/日、4(2~9) μ g/kg/日で、男性では0.3(0.25~0.3)mg/日、4.5(4~6) μ g/kg/日、女性では0.24(0.1~0.6)mg/日、4(2~9) μ g/kg/日であった。これら投与量には明らかな性差を認めず、またIGF-I正常化群と非正常化群間でも差を認めなかった。

女性ではGH維持量(mg/日、 μ g/kg/日)は年齢と負の相関($R_s=-0.63$, $P<0.05$; -0.58 , $P<0.05$)を認めたが、男性では認めなかった(図2)。

IGF-Iが正常化しなくても治療後IGF-I値は増加しており、脂肪肝障害の消失、QOLの改善などの臨床症状の改善を認めた。

D. 結論

IGF-Iを正常化するには女性の方がより多

いGH投与量を必要とするといわれているが、今回の検討では性差を認めなかった。実地臨床では成人GHD症例は比較的少量のGH投与量で治療されており、少量の維持量であっても臨床症状が改善する例が認められた。今後多数例での検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Morita J, Hakuno F, Hizuka N, Takahashi SI, Takano K: Growth hormone (GH) or insulin-like growth factor (IGF)-I represses 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD1) mRNA expression in 3T3-L1 cells and its activity in their homogenates. *Endocr J* 56:561-570, 2009.

2) 栗本真紀子, 福田いずみ, 肥塚直美, 田中聡, 山門佑有, 高野加寿恵: 成人成長ホルモン分泌不全症におけるJAHQを用いたQOLに関する検討. 日本内分泌学会雑誌 85 (Suppl):82-84, 2009.

2. 学会発表

1) 成人GH分泌不全症の治療適応と効果: 成人GH分泌不全症の診断と治療のガイドライン 第82回日本内分泌学会総会 前橋, 2009年4月

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. 治療前後の血中IGF-I SD値(治療前○, 後●)

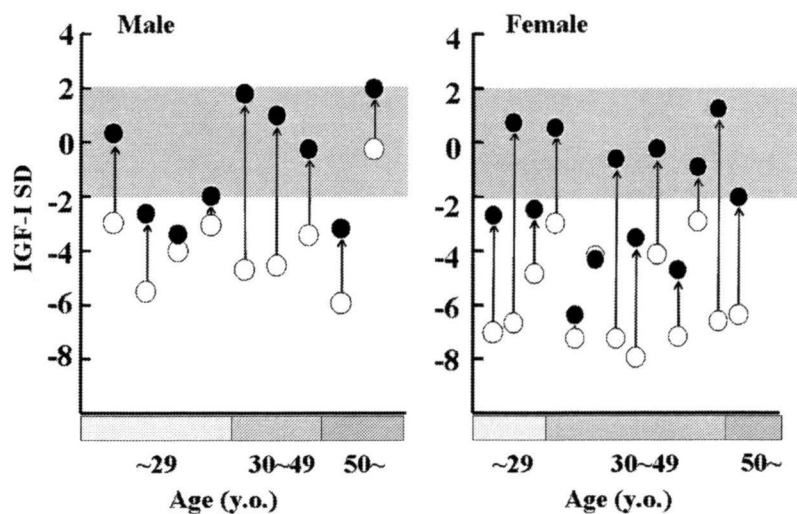
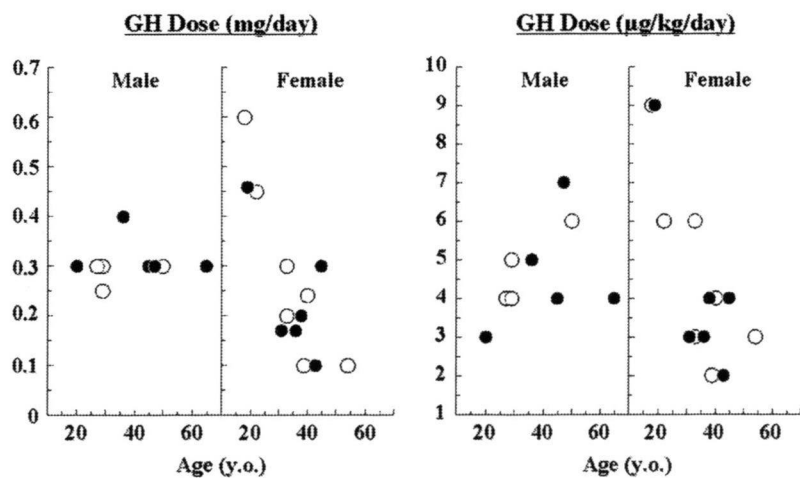


図2. 年齢とGH投与維持量との関係(IGF-I正常化例●, 非正常化例○)



血中遊離GH測定系の開発

研究分担者	清水 力	北海道大学病院検査・輸血部／第二内科
研究協力者	伊藤 誠	北海道大学病院検査・輸血部
	重村 雅彦	北海道大学病院検査・輸血部

研究要旨：血中GHは、約50%がGH結合蛋白(GHBP)と結合しており、生理活性を示すのはGHBPと結合していない遊離GHである。Frystykらは、血清に抗GHBPモノクローナル抗体(MAb263)を添加し、それによる分子量の変化を利用して、GHBPと結合したGH(GH・GHBP複合体)をフィルター(YM-100)を用いて分離し、遊離GHを測定する方法を報告した(JCEM 2008)。今回、我々は、遊離GHを自動測定機器を用いてより簡便に測定する方法を開発する目的の一環として、Frystykらの方法を用いてGH・GHBP複合体と遊離GHを分離できるかを検討した。FCSにGH、GHBP、MAb263を混合した検体のYM-100処理濾過液を抗GH抗体でウェスタンブロットを行ったところ、Frystykらの方法ではGH・GHBP複合体と遊離GHを分離することができず、異なる方法による測定系の開発が必要と考えられた。

A. 研究目的

血中に存在するホルモンの多くは蛋白と結合しており、GHも例外ではない。GHBPは1986年Baumannら、Heringtonらによりはじめて報告され、その本体はGH受容体の細胞外領域が蛋白分解酵素の作用により血中に流出したものであった。その後、 $\alpha 2$ macroglobulinもGH結合能を有することも明らかとなったが、これら2つのGHBPは結合能が異なり、血中GHの約50%は前者と、5~20%は後者と結合していると報告されている。GHBPは加齢、エストロゲン内服、妊娠、肝硬変、甲状腺機能異常などさまざまな個体の状態により変化するとされている。また、一般的に蛋白に結合したホルモンは生理活性を持たないことから、真のGHに対する生体がおかれた状況を検討するには結合蛋白と結合していないGH(遊離GH)の測定が必要となる。2008年Frystykらは、分子量の違いにより蛋白を分離するフィルター(YM-100)

を用いて遊離GHを測定する方法を報告した(図1)。概略すると、血中に存在するGH(分子量約22000)とGHBP(分子量約60000)およびGH・GHBP複合体を分離するため、GHBPに対するモノクローナル抗体MAb263を血清に添加し、それにより生ずるGHとGHBP・MAb263複合体およびGH・GHBP・MAb263複合体との増幅された分子量の違いを利用して、遊離GHを分離するものである。今回の研究目的は、Frystykらの遊離GH測定法の妥当性を検討し、より簡便な方法として自動測定機器を導入することにより遊離GH測定法を確立することである。

B. 研究方法

1) GHBPおよびMAb263のGH測定系に対する影響の検討

ヒト血清にさまざまな濃度のリコンビナントヒト(rh)GHBP(Acris Antibodies GmbH)とMAb263(Santa Cruz Biotechnology)を添

加し、自動測定機器(AIA1800、東ソー)および測定試薬(Eテスト「TOSOH」II(HGH)、東ソー)を用いてGHを測定した。

2) rhGHおよび血清を用いた基礎的検討

rhGH (Assay Designs)を用いて、遠心力、遠心時間、検体量に関して検討を行った。なお遠心力についての検討は血清でもおこなった。すなわち、FCSにrhGHを溶解した検体(最終濃度13.4ng/mL)をYM-100(Milipore corp)上で1時間インキュベーションのち、種々の条件で遠心し上記方法でGHを測定、回収率および残存率を求めた。遠心力は500g、1500g、14000g、遠心時間は10分、30分、60分、検体量は100 μ L、200 μ L、300 μ L、400 μ Lについて各々検討した。さらにGH濃度7.4ng/mLの血清検体を用いて遠心条件(遠心時間30分、検体量200 μ L)の検討も行った。回収率と残存率は下に示す式により求めた。

$$\text{回収率} = \frac{\text{GH濃度(下)} \times \text{サンプル量(下)}}{\text{前処理前のGH濃度} \times \text{添加サンプル量(200}\mu\text{L)}}$$
$$\text{残存率} = \frac{\text{GH濃度(上)} \times \text{サンプル量(上)}}{\text{前処理前のGH濃度} \times \text{添加サンプル量(200}\mu\text{L)}}$$

3) 血清検体を用いたMAB263添加の有無に関する検討

Frystykらの方法、すなわちGH濃度の異なる2種の血清検体L(GH濃度1.9ng/mL)、H(GH濃度7.2ng/mL)にMAB263(最終濃度3 μ g/mL)を加え(総検体量200 μ L)、4 $^{\circ}$ C、一晩インキュベーションの後、YM-100上で37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベーション、1500g、30分遠心を行い、GHを測定、回収率および残存率を求めた。なお対照としてMAB263を添加しない検体についても同様に行った。

4) ウェスタンブロット解析

まず、FCSにrhGHを溶解し、YM-100上で

1時間インキュベーションした後、1500g、30分遠心を行い、YM-100処理液のフィルター上部の試料と濾過液を抗GH抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いウェスタンブロットによって解析した。ついで、FCSにrhGHおよびrhGHBPを加え(最終濃度GH20 μ g/mL、GHBP400 μ g/mL)、4 $^{\circ}$ C一晩インキュベーションした検体にMAB263(最終濃度3 μ g/mL)を加え、さらに4 $^{\circ}$ C、一晩インキュベーション、YM-100上で37 $^{\circ}$ C1時間インキュベーションを行い、1500g、30分遠心することにより得られた濾過液について抗GH抗体を用いてウェスタンブロット解析した。対照として、前処理(MAB263の添加、インキュベーション)を行っていないrhGH添加FCSおよび前処理後のrhGHおよびrhGHBP添加FCSを用いた。

C. 研究結果

1) GHBPおよびMAB263のGH測定系に対する影響の検討

GHBPについては最終濃度500ng/mLまで添加してGHを測定したが100ng/mLを超えるとGH濃度は低下するものの、生理的GHBP濃度(~数10ng/mL)の範囲ではGH濃度に影響を与えなかった。MAB263については30 μ g/mLまで添加しGH濃度を測定したがGH値は変化しなかった。以上のことからAIA1800および(Eテスト「TOSOH」II(HGH)は本研究に用いることが可能であると考えられた。

2) rhGHおよび血清を用いた基礎的検討

遠心力(遠心時間30分、検体量200 μ L)については500g、1500g、14000gで、おのおの回収率53.7%(残存率37.8%)、71.5%(同16.4%)、32.9%(同22.6%)と1500gで最も回収率が高かった。遠心時間(遠心力1500g、検体量200 μ L)の検討では、10分、30分、60分でおのおの回収率41.9%(残存率46.6%)、

71.5% (同16.4%)、81.1% (同11.0%) と30分以上の遠心が必要であった。検体量(遠心力1500g、遠心時間30分)については100 μ L、200 μ L、300 μ L、400 μ Lで回収率74.8% (残存率16.0%)、71.9% (同22.9%)、21.4% (同66.2%)、46.0% (同49.2%) と200 μ Lを超えると回収率が著明に減少した。以上の結果から、Frystykらが用いた遠心条件、すなわち、検体量は200 μ L、1500g、30分が妥当と考えられた。

3) 血清検体を用いたMAb263添加の有無に関する検討

検体LにおいてMAb263を添加した検体では、回収率21.1% (残存率66.1%)であった。しかしながら、非添加の検体においても回収率20.0% (残存率67.4%)でありMAb263添加の有無は回収率に影響を与えなかった。検体HにおいてもMAb263添加検体の回収率は19.9% (残存率66.1%)、非添加検体では回収率23.8% (残存率63.8%)と検体L同様、MAb263添加の有無は回収率に影響を与えなかった。

4) ウェスタンブロット解析

FCSにrhGHを添加した検体をYM-100にて遠心分離したろ過液および上部の試料両者にGHに相当するバンドを認めたことからYM-100にて遊離GHは分離できないことが推測された(図2)。ついでFCSにrhGH、rhGHBP、MAb263を添加したのちYM-100にて遠心分離を行ったろ過液中にもGH・GHBP複合体に合致するバンドを認めた(図3、レーン3)ことからYM-100処理によりGH・GHBP複合体を除去できないことが推測された。

D. 考察

より厳密に生体内内分泌環境を評価するうえで、生物学的活性を有する状態のホルモン

を測定することが重要であることは、甲状腺ホルモンやテストステロンの例をみても明らかである。以上の理由から、今回、われわれは、Frystykらにより報告された方法を簡便性の点でさらに発展させるべく自動測定機器を用いた遊離GH測定系の確立をこころみた。

われわれが用いた自動測定機器および試薬はFrystykらが用いたEIAプレート法によるGH測定の代替になりえることが明らかとなったが、Frystykらの方法、すなわち、検体へのMAb263添加、それに引き続くYM-100を用いた遠心処理による遊離GH測定に関しては、ウェスタンブロットによる検討から十分に機能しないことが推測された。今回用いたYM-100は分画分子量100000とされているが厳密なものではないため今回の結果になったと考えられる。現在、抗体吸着磁気ビーズを用いた方法にて遊離GH測定に関して検討を行っている。

E. 結論

Frystykらが報告した遊離GH測定系に関して検討を行った結果、十分に機能しないことが推測された。今後は異なる方法を用いて遊離GH測定法を確立したいと考えている。

F. 参考文献

- 1) Frystyk J, Andreasen CM, Fisker S, J Clin Endocrinol Metab. 93:3008-14, 2008

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

- 1) Kaga K, Mikami T, Onozuka H, Omotehara S, Abe A, Yamada S, Okada M, Komatsu H, Inoue M, Yokoyama S, Nishida M, Shimizu

- C, Matsuno K, Tsutsui H. Right ventricular diastolic dysfunction in patients with left ventricular hypertrophy: analysis of right ventricular myocardial relaxation using two-dimensional speckle tracking imaging. *J Echocardiogr.* 7:25-33, 2009
- 2) Komatsu H, Yamada S, Iwano H, Okada M, Onozuka H, Mikami T, Yokoyama S, Inoue M, Kaga S, Nishida M, Shimizu C, Matsuno K, Tsutsui H. Angiotensin II receptor Blocker, Valsartan, Increases Myocardial Blood Volume and Regresses Hypertrophy in Hypertensive Patients. *Circulation J* 73 (11):2098-2103, 2009
- 3) Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Yoshida M, Aoki K, Kondo T, Miyoshi H, Wada N, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T. Problems in diagnosing atypical Gitelman's syndrome presenting with normomagnesaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 (in press)
- 4) Miyoshi H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW 2nd, Shimizu C, Stancheva Z, Nagai S, Strissel KJ, Yoshioka N, Obin MS, Koike T, Greenberg AS. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J Lipid Res.* 2009 (in press)
- 5) Levels of Transferrin in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Sarcoidosis. Shigemura M, Nasuhara Y, Konno S, Hattori T, Shimizu C, Matsuno K, Nishimura M. *Lung.* 2010 (in press)
- 6) 榎わか菜、澁谷 斉、安田慶子、鈴木春樹、清水 力、松野一彦：異常ヘモグロビン症Hb J-Bangkokにおける各種測定法でのHbA1c値の乖離。 *臨床病理* 57(5): 431-435 (2009)
- 7) 工藤悠輔、安田慶子、澁谷 斉、鈴木春樹、清水 力、松野一彦：インタクトPTH試薬Eテスト「TOSOH II」(インタクトPTH)の基礎的検討。 *医学検査* 58(7): 862-866 (2009)
- 8) 池田陽子、高崎裕代、久保ちづる、植田孝介、柏崎晴彦、白石秀明、斎藤伸治、清水 力、七戸俊明、武田宏司：体重が増え続けて栄養量の設定が困難であった遷延性脳死状態の小児の栄養管理。 *臨床栄養別冊NST症例集2*. 医歯薬出版株式会社 2-7 (2009)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. Frystykらの方法

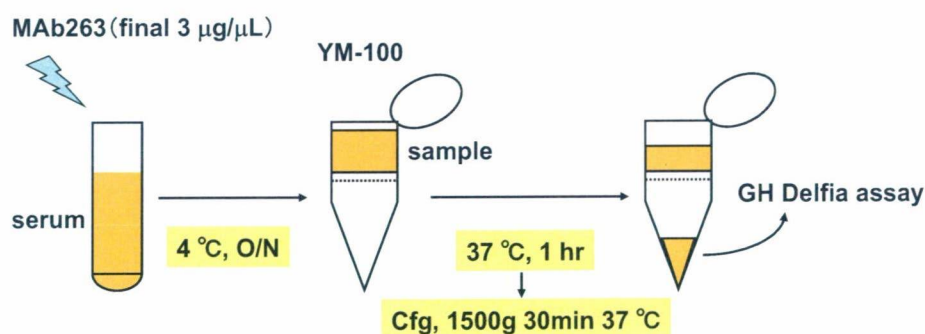


図2. ウェスタンブロットによるフィルター上部の試料と濾過液の解析

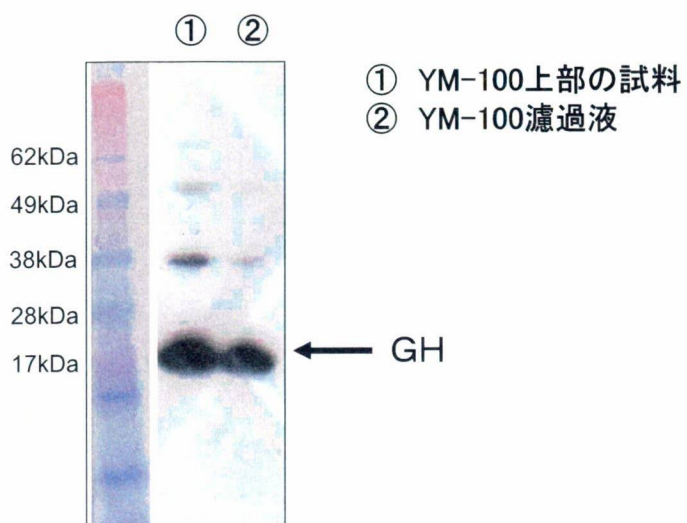
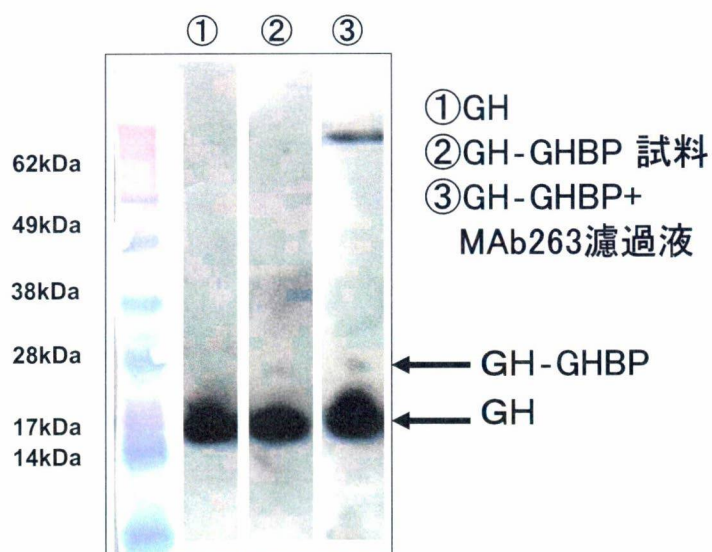


図3. ウェスタンブロットによる試料と濾過液の解析



下垂体で高発現する機能未知の遺伝子の プロラクチン分泌に及ぼす影響

研究分担者 巽 圭太 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学
研究協力者 高坂 和芳 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学

研究要旨：われわれはこれまで下垂体で高発現する新規遺伝子をBodyMap法や他のデータベースから同定し、報告してきた。今回、遺伝子の機能解析の一例として、KIAA1324/maba1 (Pi-a/EIG121) による下垂体細胞株でのプロラクチンの産生・分泌に及ぼす影響について解析した。方法としては、ドキシサイクリン(Dox)存在下でのみ発現するKIAA1324/maba1に対するRNAi用ベクター、あるいは、過剰発現ベクターをGH3細胞株に安定に導入した、KIAA1324/maba1発現抑制株と過剰発現株を樹立し、これらにDoxを投与してKIAA1324/maba1の発現抑制、あるいは、過剰発現後の細胞株内と上清のPRL量をウエスタン法で比較した。今回は、KIAA1324/maba1の発現抑制・過剰発現で、プロラクチンの産生・分泌能に明らかな影響は認めなかったが、今後、下垂体で高発現するが、機能が未知な遺伝子について、機能解析に役に立つ可能性は示唆された。

A. 研究目的

先天性下垂体複合欠損症を始めとする下垂体疾患の診断・病因解明・加療には下垂体で発現する遺伝子の全体像を知ることが望ましい。我々は1997年にBodyMap法で下垂体特異的に発現する新規遺伝子PGSF (pituitary gland specific factor) 1、PGSF2と、下垂体で高発現する新規遺伝子Pi-aを同定し、自己免疫性視床下部下垂体炎の補助診断に役立つ可能性があることを示した。2005年には他のデータベースからヒトとマウス共に高発現を認めた遺伝子で、ホルモン遺伝子、ホルモン関連遺伝子以外に、新たにDLK1, PLAGL1, PEG3, NNAT, SEZ6L2, FLJ3005の6つの遺伝子について下垂体が他の全組織と同等以上の高発現する脊椎動物に共通の遺伝子があることを明らかにしてきた。しかしながら、これまでこれらの遺伝子の機能はよく分かっていない。

今回、下垂体で高発現するこれらの遺伝子の内、KIAA1324/maba1 (Pi-a/EIG121) がプロラクチンの産生・分泌に及ぼす影響について、プロラクチンとGHを産生するラットGH3細胞株とテトラサイクリンリプレッサー (TR)-Dox系による遺伝子発現制御系を用いて解析し、これらの機能がよく分からない遺伝子の解析方法として有用かを検討した。

B. 研究方法

下垂体細胞株での発現抑制と発現過剰の系(TR-Dox系)を用いて、KIAA1324/maba1 (Pi-a/EIG121) について解析した。

この方法の概要を図1に示した。ドキシサイクリン (Dox; テトラサイクリン誘導体) 存在下でのみ発現するKIAA1324/maba1に対するRNAi用ベクター、あるいは、過剰発現ベクターをGH3細胞株に安定に導入

した、KIAA1324/maba1発現抑制株(GH3/TR/maba1-siRNA)と過剰発現株(GH3/TR/maba1-EGFP)を樹立し、これらにDoxを投与してKIAA1324/maba1の発現抑制、あるいは、過剰発現させた後のPRL量をウエスタン法で比較し、また、maba1-EGFPの細胞内局在を検討した。

この方法でDoxの存在で転写を調節する原理を、RNAi用ベクターの系を例に図2に示した。これはDox存在下でのみ標的遺伝子が抑制される系で、テトラサイクリンリプレッサー(TR)蛋白発現ベクターと、テトラサイクリンオペレーター配列(TetO2配列)がKIAA1324/maba1のsiRNA用配列の上流に付いたRNAi用ベクターとをstableに細胞内に導入したクローンを用いる。これらの2つのベクターが入ったクローンでは、Dox非存在下では細胞内のTetR蛋白がTetO2配列に強力に結合し、下流のsiRNA用配列の転写を強力に抑制する。一方、Dox存在下では細胞内のTetR蛋白がDoxと結合した結果、TetO2配列に結合しなくなり、下流のsiRNA用配列が転写され、KIAA1324/maba1の転写を抑制する。

1) RNAi用ベクターの構築と選定

KIAA1324/maba1のcDNA配列で、RNA干渉(RNAi)によりKIAA1324/maba1の発現を抑制するsiRNA(small interfering RNA)を生成するヘアピン状のRNAを持つRNAi用ベクターを複数構築した。これら各々のRNAi用ベクターに関してKIAA1324/maba1_Myc_His発現抑制実験を、別に構築したKIAA1324/maba1_Myc_His Tag過剰発現ベクターとともにHEK293細胞に導入することにより行い、KIAA1324/maba1発現抑制活性のあるRNAi用ベクターを選定した。

2) KIAA1324/maba1発現抑制株と過剰発現

株の樹立

まずGH3細胞株にTR蛋白発現ベクターを導入し、GH3/TR細胞株をクローニングした。次に、このGH3/TR細胞株にKIAA1324/maba1に対するRNAi用ベクター(maba1-siRNA)、あるいは、別に構築した過剰発現ベクター(maba1-EGFP)をGH3細胞株に安定に導入した、KIAA1324/maba1発現抑制株(GH3/TR/maba1_siRNA)と過剰発現株(GH3/TR/maba1-EGFP)をクローニングした。

3) KIAA1324/maba1発現抑制実験

KIAA1324/maba1発現抑制株(GH3/TR/maba1_siRNA)をDox非存在下とDox存在下で培養し、Dox存在下で内在性のKIAA1324/maba1の発現が抑制されるクローンをRT-PCRで選別した。これらのクローンに対しDox非存在下とDox存在下で培養し、培養上清と細胞内のプロラクチンの量を抗ラットプロラクチン抗体を用いたウエスタン法で測定した。

4) KIAA1324/maba1過剰抑制実験

KIAA1324/maba1過剰発現株(GH3/TR/maba1-EGFP)をDox非存在下とDox存在下で培養し、Dox存在下でmaba1-EGFPの発現が強いクローンをEGFPの発現の強さで選別した。これらのクローンに対しDox非存在下とDox存在下で培養し、培養上清と細胞内のプロラクチンの量を抗ラットプロラクチン抗体を用いたウエスタン法で測定した。また、maba1-EGFPの細胞内局在を組織学的に検討した。

C. 研究結果

1) RNAi用ベクターの構築と選定

KIAA1324/maba1の4種類のRNAi用ベクターの働きをKIAA1324/maba1_Myc_His Tag過剰発現ベクターとともにHEK293細胞に

導入することにより行ったところ、1種類のRNAi用ベクターはKIAA1324/maba1発現抑制活性が低く、発現抑制活性が高い他の3種類のRNAi用ベクターを選定した。

2) KIAA1324/maba1発現抑制株と過剰発現株の樹立

まずGH3細胞株にTR蛋白発現ベクターを導入し、GH3/TR細胞株をクローニングした。次に、このGH3/TR細胞株にKIAA1324/maba1に対するRNAi用ベクター(maba1-siRNA)、あるいは、過剰発現ベクター(maba1-EGFP)をGH3細胞株に安定に導入し、KIAA1324/maba1発現抑制株(GH3/TR/maba1_siRNA)と過剰発現株(GH3/TR/maba1-EGFP)をクローニングした。

3) KIAA1324/maba1発現抑制実験と過剰発現実験

Dox存在下で内在性のKIAA1324/maba1の発現が抑制されるKIAA1324/maba1発現抑制株(GH3/TR/maba1_siRNA)に対しDox非存在下とDox存在下で培養し、プロラクチン量を抗ラットプロラクチン抗体を用いたウエスタン法で測定した結果、培養上清と細胞内のプロラクチン量には有意な変化を認めなかった。

また、Dox存在下でmaba1-EGFPの発現が強いKIAA1324/maba1過剰発現株(GH3/TR/maba1-EGFP)に対しDox非存在下とDox存在下で培養し、プロラクチン量を抗ラットプロラクチン抗体を用いたウエスタン法で測定した結果、培養上清と細胞内のプロラクチン量には有意な変化を認めなかった。

KIAA1324/maba1過剰発現株(GH3/TR/maba1-EGFP)でmaba1-EGFPの細胞内局在を組織学的に観察した結果、maba1-EGFPは細胞膜に局在した。

D. 考察

今回研究に用いたKIAA1324/maba1(Pi-a/EIG121)は、BodyMap法や他のデータベースで下垂体、気管、乳腺、膵臓、胃、乳腺腫瘍、子宮腫瘍で高発現する1,013アミノ酸の遺伝子で、蛋白の一次構造としては、膜貫通ドメインが一つと、9回繰り返すCXXC構造がある。また、マウスと線虫にorthologがあり、マウスと91%、線虫と29%アミノ酸が一致し、脊椎動物のみならず、多細胞生物で重要な働きがあると推定される。最近の研究では、estrogen依存性に子宮内膜で発現が上昇したと報告されたが、蛋白機能の本体は明らかではない。このようなことから、本遺伝子が多細胞生物の蛋白分泌機構に関与する可能性が考えられ、下垂体ではプロラクチンを指標として機能を観察できるのではないかと考えた。

今回行ったTR-Dox系による遺伝子発現制御系は、stableに細胞内に導入したクローンをを用いることにより、transientだとベクターが導入されなかった細胞により出るバックグラウンドを防ぐ効果がある。

今回、KIAA1324/maba1はGH3細胞株でのTR-Dox系による発現抑制・過剰発現系では、今回は、プロラクチンの産生・分泌能に明らかな影響を認めなかった。原因として、1) KIAA1324/maba1はプロラクチンの産生・分泌能に関与しない、2) KIAA1324/maba1はプロラクチンの産生・分泌能に関与するが、今回のTR-Dox系による発現抑制・過剰発現系では検出されない、ことが考えられる。後者に関して、さらに、3) 細胞内の蛋白プールが多く、数日の発現抑制では顕著な影響を与えない、4) 遺伝子の発現レベルが高く、RNA干渉(RNAi)が不十分となり、十分に発現抑制されない、ことが考えられる。

今回用いたKIAA1324/maba1は高発現であることから、発現抑制に用いたsiRNAの発現量が不足して、内在性のKIAA1324/maba1に対してRNAiが不十分となり、KIAA1324/maba1が十分に発現抑制されなかった可能性は十分ある。RNAiに関しては、RT-PCRで内在性のKIAA1324/maba1の発現の抑制は確認でき、また過剰発現でmaba1-EGFPの細胞膜局在も確認でき、系自体が、機能が未知な遺伝子について、機能解析をしていくのに役に立つ可能性は示唆された。

今回は、下垂体ホルモンに次いで最も発現レベルが高いKIAA1324/maba1のような遺伝子で機能を観察できれば、それより発現レベルが低いグループの遺伝子で機能を観察できる可能性が大きいので試金石としたが、次回は発現レベルが高くなく、発現抑制ではラッ

トGH3細胞株でプロラクチンの産生分泌に関与する可能性が極めて高いPit1遺伝子に関して再検討し、GH3細胞株でのTR-Dox系による発現抑制・過剰発現系の有用性を確認後、下垂体で高発現するが、機能が未知な他の遺伝子について、機能解析をしていくことを計画している。

E. 結論

今回行ったGH3細胞株とTR-Dox系による遺伝子発現制御系を用いた解析は、KIAA1324/maba1に対しては有用であったとはいえなかったが、今後、下垂体で高発現するが、機能が未知な遺伝子について、機能解析をしていくのに役に立つ可能性は示唆された。

図1. TR-Dox系の概要

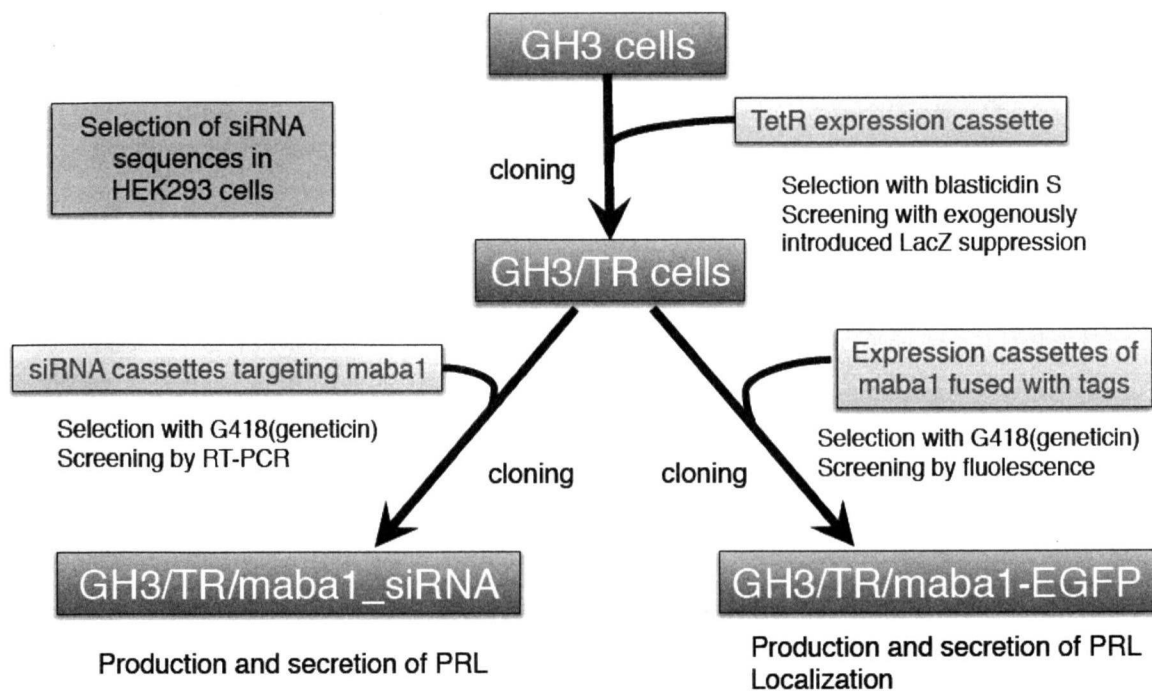
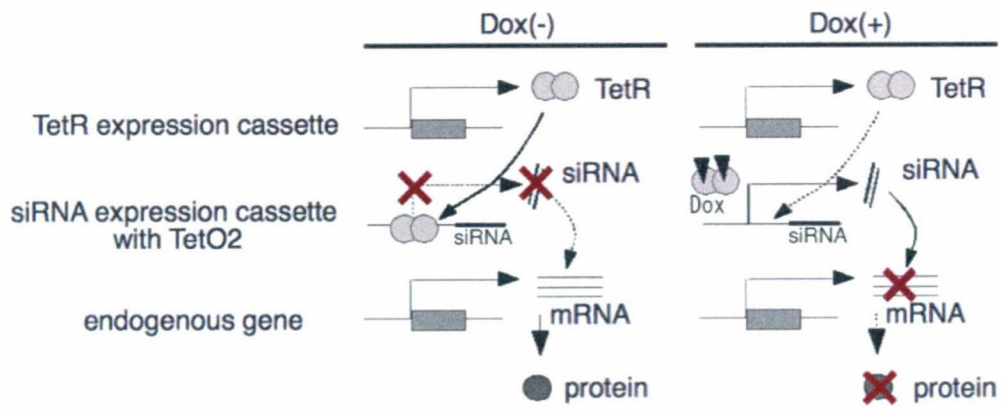


図2. TR-Dox系の原理 (RNAi用ベクターの系)



プロラクチン分泌異常症の病態生理に関する研究

研究分担者 高野 幸路 東京大学大学院医学系研究科腎臓・内分泌内科学

研究要旨：プロラクチン分泌過剰症の主要なものとして、薬剤性高プロラクチン血症とプロラクチン産生腺腫が挙げられる。薬剤性高プロラクチン血症の病因としては視床下部からのドーパミンによる抑制作用の消失がその主体と考えられている。一方、プロラクチン産生腺腫からのプロラクチン過剰分泌の機構については未だにほとんど明らかになっていない。この過剰分泌の病態生理を明らかにするため、本研究では二光子励起法を用いて下垂体プロラクチン細胞からの顆粒分泌を可視化し解析した。視床下部からのドーパミン作用が解除された場合の正常プロラクチン細胞からの自発性分泌をラット下垂体前葉細胞を用いて明らかにした。またTRH刺激下の分泌を検討した。またヒトプロラクチン産生細胞からの自発分泌も明らかにし、これが正常細胞でTRH刺激下の顆粒分泌の動態に一致することを明らかにした。

A. 研究目的

プロラクチン分泌過剰症の主要なものとして、薬剤性高プロラクチン血症とプロラクチン産生腺腫が挙げられる。薬剤性高プロラクチン血症の病因としては視床下部からのドーパミンによる抑制作用の消失がその主体と考えられている。一方、プロラクチン産生腺腫からのプロラクチン過剰分泌の機構については未だにほとんど明らかになっていない。この過剰分泌の病態生理を明らかにするため、本研究では二光子励起法を用いて下垂体プロラクチン細胞からの顆粒分泌を可視化し解析した。

これまで機能性下垂体腺腫の中でGH産生下垂体腺腫においては腫瘍発生の原因とそれによるGH過剰分泌の機構が一部解明されている。GH産生腺腫の場合、三量体Gタンパク質のGs α サブユニットの活性化変異やPKARIAの変異がこれまで報告されておりその腫瘍発生、ホルモン過剰分泌についてその病態生理がある程度明らかになっている(1, 2, 3)。本研究班においても、これまでわ

れわれは、GH産生腺腫の過剰分泌の機構と治療薬の作用機構を解析し、論文発表してきた。しかしながら、プロラクチン産生腺腫については腫瘍発生の原因やプロラクチン過剰分泌の機構など未だにほとんど明らかになっていない。プロラクチン分泌は視床下部からのドーパミンにより抑制的な制御を受けており、視床下部の制御をはずれるとプロラクチン分泌はこうしんする。D2受容体ノックアウトマウスがプロラクチン産生腺腫を発生したことから、プロラクチン産生腺腫の発生原因としてD2受容体もしくはその下流の刺激伝達経路の機能消失変異が腫瘍発生原因となっている可能性が考えられている。一方、GH産生腺腫の場合のように、何らかの刺激伝達経路の活性化変異が原因となっている可能性も想定されている。実際にPKARIAの変異によって起こるCarney Complexでは、プロラクチンの過剰分泌が生じることが報告されており、PKA経路の活性化がプロラクチン過剰分泌に関与すると考えられる。本研究では、プロラクチン産生腺腫からの過剰分

泌の分泌動態を2光子励起法を用いて解析することで、1.薬剤性高プロラクチン血症の病態を明らかにすること、2.プロラクチン産生腺腫からのホルモン過剰分泌の病態を明らかにすることと、3.これによりプロラクチン産生腺腫の発生原因に対する示唆を得ることにある。

B. 研究方法

培養

手術で得られたヒトプロラクチン産生腺腫と正常プロラクチン細胞としてラット下垂体前葉のクラスターを作成して用いた。プロラクチン産生腺腫の使用に当たっては、施設の倫理委員会の許可を得、書面でインフォームドコンセントを得た。ヒトプロラクチン産生腺腫はピペッチングで細胞クラスターを作成し、手術後6時間以内に実験に用いた、ラット前葉細胞クラスターについては、8週令のウィスターオスラットの下垂体をコラゲナーゼを用いて細胞集塊を作成し、2日間10%FCS含有DMEMで培養後に用いた。

2光子励起法を用いた開口分泌の可視化

オリンパスの2光子励起装置を用い、細胞外液内の、親水性蛍光試薬のsulforhodamin B (SRB, 50 microg/L)が開口分泌によって分泌顆粒内に入り、顆粒状の蛍光を形成することで開口分泌を観察した。

免疫染色

分泌顆粒がプロラクチン顆粒であることを確認するため、固定可能な細胞外蛍光試薬のLucifer Yellowで開口分泌した顆粒を同定し、そこにプロラクチン免疫染色が一致するかを検討した。

C. 研究結果

ラット下垂体前葉クラスターからの自発顆粒分泌

培養2日目のラット前葉細胞集塊を観察すると、元の細胞構築を保持しており、細胞間隙は100 nm未満であり、微小細胞血管系の構築も観察できた(図1)。この状態では、視床下部からのドーパミンによる抑制がなく、薬剤性高プロラクチン血症の病態を反映している。この高プロラクチン血症の原因は下垂体からの自発性のプロラクチン分泌と考えられるが、これが調節性開口分泌の促進によっているか否かは明らかになっていない。最初に、このことを解析した。摂氏35度、非刺激下で分泌現象を観察したところ、大部分の分泌現象が0.7秒以下で終了するという極めて早いfull fusionの分泌現象が観察できた(図2)。分泌現象は毛細血管に面した細胞膜と細胞間隙に面した細胞膜のいずれにも均等に生じた(図3A)。電位依存性カルシウムチャネル阻害薬はこの自発分泌を消失させた。これらのことから、視床下部の抑制から解放されたプロラクチン産生細胞は、調節性の開口分泌現象が自発性に生じることによって起こることが明らかになった。D2受容体拮抗薬のbromocriptineによって分泌が抑制された、抑制は10 nMの濃度でも認められた。このことから、自発分泌はプロラクチン分泌と考えられ、この系が薬剤性高プロラクチン血症の病態を反映していると考えられた。この自発分泌がどのような機構で維持されているかを明らかにするため、これまで想定されているPKA経路やPKC経路の関与を調べた。この刺激伝達機構を明らかにするため、PKA阻害薬のH89、PKC阻害薬のGö6976による前処理を行って自発分泌を観察した。いずれの処理によっても自発分泌は著しく減少し、

これらの経路と電位依存性カルシウムチャンネルを介するカルシウム流入が自発分泌の維持に重要であることが明らかになった(図3B)。

一方、TRH刺激によって開口分泌を刺激すると、細胞塊で生じる開口分泌現象は著しく増加したが、それとともに開口分泌のmodeも変化した。自発分泌の場合のfull fusionと異なり分泌顆粒を示す蛍光スポットは形質膜の近傍に留まり蛍光強度は極めてゆっくりと減少していった(図4)。このkiss-and-stay exocytosisは、プロラクチン産生腺腫からの自発分泌の際に観察されるkiss-and-stay exocytosisと同等であった。PKC阻害薬のGö6976により前処理したクラスターでは、TRH刺激による分泌促進現象は認められたがそのmodeは比較的ゆっくり生じるfull fusionであった。一方High K

ヒトプロラクチン産生腺腫からの顆粒分泌の動態

2光子励起法を用いてプロラクチン産生腺腫からの分泌を解析した。SRB含有細胞外液の中で、プロラクチン産生腺腫集塊は本来の細胞構築を保持しており、100-200 nmの細胞間隙と、微少血管系を確認できた(図4)。無刺激下、25度Cにおいて、腺腫細胞の周縁に分泌顆粒に相当する蛍光スポットが自発的に出現し、その場に留まった(図5)。この現象はkiss-and-stay exocytosisに相当する開口分泌現象と想定された。SRBの代わりに固定可能なLucifer Yellowを用いて開口分泌を同定し、ラットプロラクチンとのco-localizationを確認したところ、co-localizationが確認でき、プロラクチンの顆粒分泌であることが確認できた。このことから、プロラクチン産生腺腫は刺激なしに自発開口分泌を盛んに行っており、これがプロラ

クチン産生腺腫からのプロラクチン過剰分泌の本体であると考えられた。kiss-and-stay exocytosisは観察時間の間(10-30分)形質膜近傍に留まって、細かい振動を示した。細胞外のSRBを洗い流しても顆粒内の蛍光は消失せず、開口分泌顆粒が、endocytosisを起こしていることが確認できた。

high Kによる刺激を行ったところ、kiss-and-stay exocytosisの頻度が著しく増加した。D2 agonistのbromocriptine (1 μ M/L)の投与によって自発分泌の抑制が認められたが、1 nM/L以下の低濃度では抑制は観察されなかった。分泌は、細胞膜のどの部分に対しても生じており、微少血管に接する細胞膜と接しない細胞膜の間で開口分泌の頻度に差はなかった(図6)。蛍光スポットの径は電子顕微鏡で観察したプロラクチン産生腺腫の分泌顆粒の径と同等であった。

D. 考察

これまでプロラクチンの自発分泌の可視化を試みた報告は2つある。ひとつは膜感受性蛍光試薬を密度勾配で分離したプロラクチン細胞に用いたもので、自発性開口分泌は認められなかった。他方の論文では、密度勾配で分離したプロラクチン細胞に蛍光蛋白を付加したANPを発現させて解析したものである。この報告では、自発性開口分泌を確認したもののその分泌現象は数分にわたるゆっくりした開口分泌現象であり、本研究で示されたような速い分泌ではなかった。密度勾配による分離過程や、細胞に融合蛋白を発現させる際に本来の生理的分泌現象が阻害されてしまう可能性が考えられた。融合蛋白を発現させて解析する実験では、発現させる蛋白質の設計によって、観察される開口分泌現象がそれぞれ異なることが他の神経内分泌細胞を用

いた報告でも知られており、この方法の限界が明らかになっている。本研究で用いた手法では、このような人為的操作が不要であり、正常細胞や腺腫細胞の解析が可能である。ヒトプロラクチン産生腺腫における開口分泌を解析した報告はこれまでになく、プロラクチンの過剰分泌が自発性の開口分泌現象によるものであることを明らかにした。プロラクチン産生腺腫のプロラクチン過剰分泌の機構がD2受容体の機能消失によるものであればその分泌様式は正常細胞で視床下部の抑制をはずれた状態の分泌様式(full fusion)になると考えられるが、実際は正常細胞に分泌刺激を与えた場合の分泌様式をとった。このことは、プロラクチン産生腺腫のからの過剰分泌のメカニズムに何らかの刺激伝達経路の活性化が関与していることを強く示唆するものである。ほかに副次的に明らかになったことだが、プロラクチン産生腺腫に特徴的なmisplaced exocytosisという現象の成因が明らかになった。まずプロラクチン産生腺腫の自発分泌がkiss-and-stay exocytosisであり、分泌顆粒がしばらく細胞膜近辺残ることでmisplaced exocytosisを観察する確率が多いこと、さらに分泌現象が血管に面した形質膜に限らずどの形質膜にも起こることから、固定した標本で血管に面しない細胞膜にも分泌顆粒のオメガ構造が認められやすいのであると判明した。これまで長らくなぞであったmisplaced exocytosisの本態が明らかになった。

E. 結論

二光子励起法を用いて下垂体プロラクチン細胞からの顆粒分泌を可視化し解析した。ラット正常プロラクチン細胞からの自発性分泌を明らかにし、TRH刺激下の分泌を比較した。またヒトプロラクチン産生細胞からの

自発分泌も明らかにし、これが正常細胞で刺激下の顆粒分泌の動態に一致することを明らかにした。ヒトプロラクチン産生細胞からのホルモンの過剰分泌の原因とその動態を明らかにできた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究成果発表

1. 論文発表

- 1) Takano K, Yasufuku-Takano J, Morita K, Mori S et al. Evidence that PKA activity is constitutively activated in human GH-secreting adenoma cells in a patient with Carney complex harbouring a PRKAR1A mutation Clin Endocrinol (Oxf). 70:769-75, 2009
- 2) Nakashima M, Takano K, Matsuno A. Analyses of factors influencing the acute effect of octreotide in growth hormone-secreting adenomas 56:295-304, 2009
- 3) 著書 プロラクチン分泌調節 (下垂体腫瘍のすべて(452ページ) p26-32, 2009/10/15発行 医学書院 編集 寺本明、長村義之)
- 4) 高野順子、高野幸路、佐野壽昭、高橋倫子、河西春郎、山田正三、寺本明、藤田敏郎: GH産生腺腫の自発開口分泌の病態生理と病理、ホルモンと臨床
- 5) 高野幸路 GH産生下垂体腺腫治療の基礎と臨床 日本内分泌学会雑誌

2. 学会発表

- 1) 2009年8月26日、第10回日本下垂体研究会シンポジウム、高野幸路 下垂体前葉細胞からの顆粒分泌の可視化解析2009年8月28日、

- 2) 2009年10月16日 日本脳神経外科学会
セミナー 先端巨大症内科治療
- 3) 2009年1月30日 横浜下垂体シンポジウム
GH産生下垂体腺腫治療の基礎と臨床
- 4) 2009年1月27日 広島神経内分泌シンポジウム
神経内分泌腫瘍の治療の基礎と臨床

- 5) 2009年9月27日 間脳下垂体腫瘍学会シンポジウム
GH産生下垂体腺腫治療の基礎と臨床

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

図1 (A)ラット下垂体細胞塊の2光子励起画像。TEP法で細胞間隙、毛細血管が蛍光により描写されている。矢印は自発分泌した分泌顆粒。
(B)2分間に観察された自発分泌を●で示した。血管に面した形質膜のみではなく、細胞間隙にも分泌が認められる。

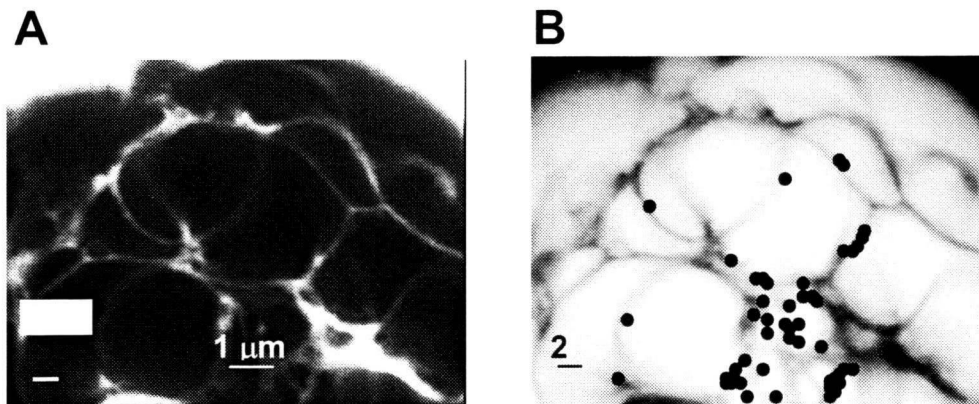


図2 (A)自発分泌を経時的に記録した図。突然出現した蛍光スポット(自発顆粒分泌に相当する)が、0.96秒以内に消失しており、極めて速い分泌現象である。
(B)各分泌の経過時間の分布図。0.7秒以内がほとんどで、特に0.2秒未満が多い。

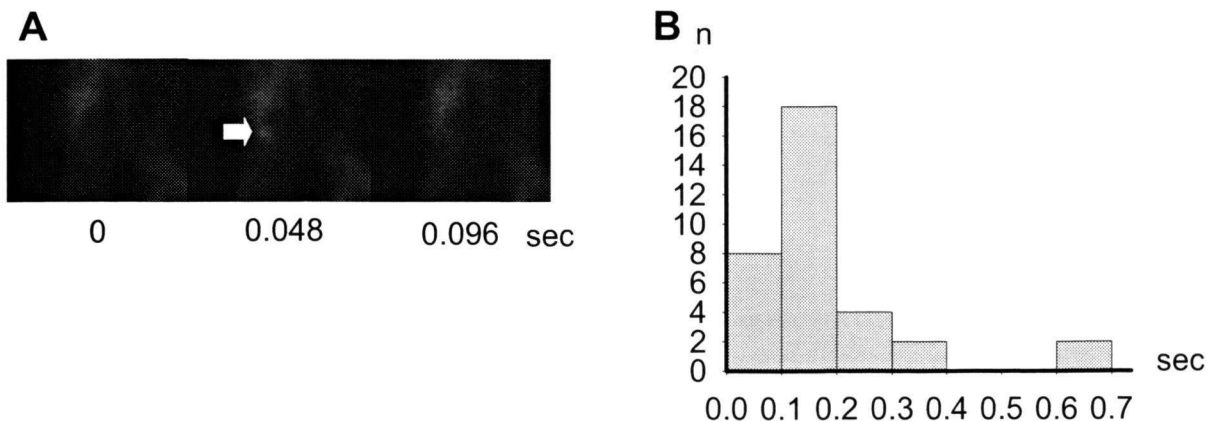


図3 (A) 自発分泌の血管側、細胞間隙側の分布は形態上の分布にほぼ一致し、毛細血管に対する親和性は認められなかった。
 (B) 電位依存性カルシウムチャネルの阻害薬、D2アゴニスト、PKA阻害薬、PKC阻害薬により自発分泌は著しく減少した。

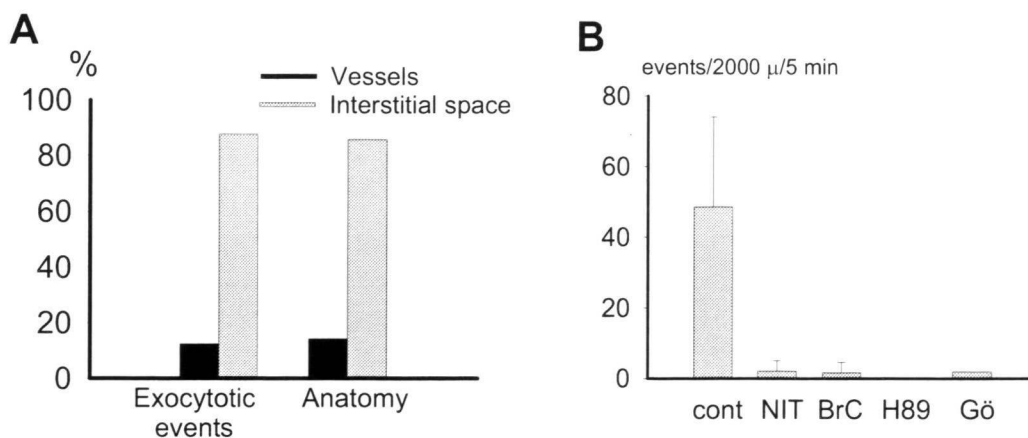


図4 (A) TRH刺激により生じた分泌はほとんど、kiss-and-stay exo-endocytosisであった。
 (B) 分泌顆粒が膜近傍にstayしていることを経時的に確認できた。

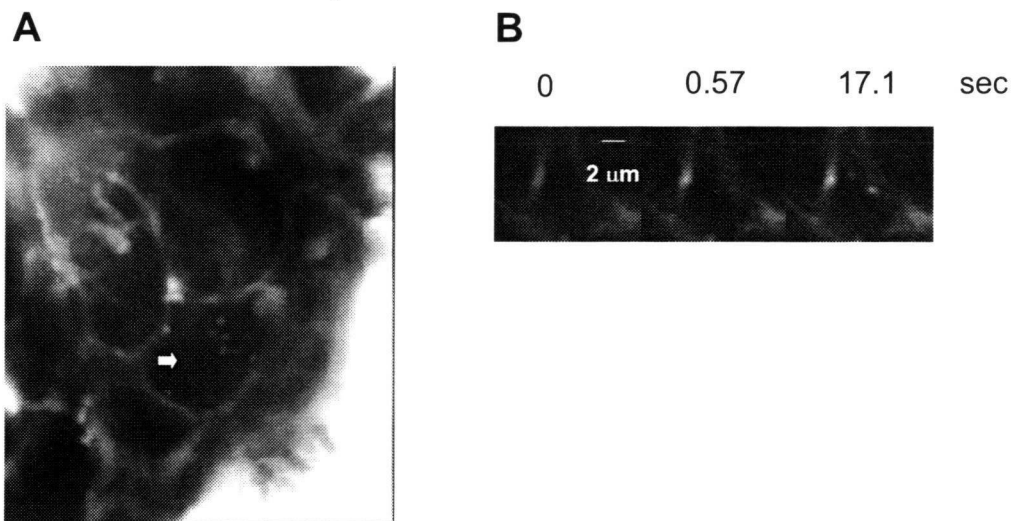


図5 ヒトプロラクチン産生腺腫の顆粒分泌像。観察開始にすでに終了しているkiss-and-stay exo-endocytosisと新たに生じるkiss-and-stay exo-endocytosisが観察され、自発分泌の約7割がkiss-and-stay exo-endocytosisであった。

