

とから、PRL産生腺腫と他の下垂体腺腫との間で、血清Na値に違いがあるかを検討した。PRL産生腺腫群と他の腺腫群とを比較すると、術後一週間後の血清Na値はそれぞれ 135.6 ± 7.4 、 140.5 ± 6.3 mEq/LとPRL産生腺腫群で有意に低下していた($p=0.036$)。また、術後Na低下値も同様に 5.8 ± 8.8 、 1.5 ± 6.0 mEq/LとPRL産生腺腫群で有意に大きかった($p=0.011$)。

D. 考察

TSSが施行された約1週間後に低Na血症を来すことはよく知られているが、その発生機序、誘因については報告がまちまちであり、議論の多いところである。また発生頻度についても2.3~35.0%と様々である。TSS術後の低Na血症発症の機序については、相対的な副腎皮質機能不全、中枢性塩類喪失症候群、SIADHなどが原因として考えられている。その中で、副腎皮質機能不全についてであるが、Whitakarらは周術期に投与したグルココルチコイドが減量された際に生じることが多く、相対的な副腎皮質機能不全が原因ではないかと言及している。またSaneらは低Na血症の頻度が35.0%と最も高かったが、その中でもクッシング病に多いとしている。このことも、術後クッシング病が寛解したことによるコルチゾール値の低下が影響していることを示しているし、この報告での低Na血症の発症頻度を高くした原因ではないかと考えられる。一方、現時点では低Na血症の原因としてSIADHが最も有力視されている。Olsonらは、下垂体手術一週間後に水負荷試験を行い、水利尿不全があることを示している。またVerbalisらは、尿崩症で見られる第二相(残存後葉からADHが逸脱する時期)のみが生じるとしている。

一方、術後低Na血症のリスクファクターであるが、現在までクッシング病、高齢者、一過性尿崩症、女性、microadenomaなどが報告されている。クッシング病については、前述の如く、術後の副腎皮質機能不全が原因と思われるが、高齢者においても、同様に副腎の予備能の低下が示唆されている。さらに一過性尿崩症であるが、これも尿崩症の第二相の時期に関係しているかもしれない。我々の検討ではPRL産生腺腫でNaの低下が多く見られたが、原因については不明である。ただ、PRL産生腺腫は女性が多く、また当施設では非浸潤性のmicroadenomaも手術適応としていることから、これらのリスクファクターに一致する部分があるかもしれない。

一方、被膜外摘出の有無、術中髄液漏の有無など、手術手技に関連する因子においては低Na血症の発生頻度に影響はなかった。特に、被膜外摘出に関しては、以前の報告で下垂体前葉機能にも影響を来さないことを示しており、今回と同様の結果であった。

E. 結論

eTSSにおいても、術後1週間目に22.1%と従来の術式と同様の時期に同様の頻度で低Na血症が認められた。その中でもPRL産生腺腫は、術後一週間目の血清Na値が低く、また血清Na低下値が大きいことが示され、周術期管理に注意を要すると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida D, Teramoto A. Digital imaging for statistical analysis of tissue microarrays. J

- Nihon Med Sch, 78 (6):338-9, 2011.
- 2) Ishino H, Hara Y, Takekoshi S, Teshima T, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M. Ki-67 and minichromosome maintenance-7 (MCM7) expression in canine pituitary corticotroph adenomas. *Domest Anim Endocrinol*, Nov;41 (4):207-13. Epub 2011 Aug 23.
 - 3) Tahara S, Teramoto A. Present conditions and the prospects of the clinical studies of hypothalamus, and the pituitary tumor. *Nihon Rinsho*, Mar;69 Suppl 2:221-7, 2011.
 - 4) Egashira N, Takekoshi S, Takei M, Teramoto A, Osamura RY. Expression of FOXL2 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Pathol*, Jun;24 (6):765-73. Epub 2011 Apr 8.
 - 5) Shimatsu A, Tai S, Tanaka T, Fujieda K, Teramoto A, Chihara K. Clinical characteristics of Japanese adults with growth hormone deficiency: a HypoCCS database study. *Endocr J*, 58 (5):325-33. Epub 2011 Apr 5.
 - 6) Ishii Y, Tahara S, Oyama K, Kitamura T, Teramoto A. Easy slip-knot: a new simple tying technique for deep sutures. *Acta Neurochir (Wien)*, Jul;153 (7):1543-5; discussion 1545. Epub 2011 Mar 26.
 - 7) Taoda T, Hara Y, Masuda H, Teshima T, Nezu Y, Teramoto A, Orima H, Okano S, Tagawa M. Magnetic resonance imaging assessment of pituitary posterior lobe displacement in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Med Sci*, Jun;73 (6):725-31. Epub 2011 Jan 11.
 - 8) Teshima T, Hara Y, Taoda T, Teramoto A, Tagawa M. Central diabetes insipidus after transsphenoidal surgery in dogs with Cushing's disease. *J Vet Med Sci*, Jan;73 (1):33-9, 2011.
2. 学会発表
- 1) Teramoto A. Transition from microscopy to endoscopy in pituitary surgery. 13th Asian-Australasian Congress of Neurological Surgery. 2011.12 (Taipei, Taiwan).
 - 2) Teramoto A. Endoscopic transsphenoidal pituitary surgery. 13th Asian-Australasian Congress of Neurological Surgery. 2011.12 (Taipei, Taiwan).
 - 3) 寺本 明：下垂体外科の歴史と展望. 第20回脳神経外科手術と機器学会, 2011.4.
 - 4) 寺本 明：間脳下垂体研究の最前線－下垂体腫瘍診療の現状. 日本医科大学大学院公開特別講義, 2011.6.
 - 5) 寺本 明：下垂体外科の歴史と展望. 第116回山口県脳神経外科懇話会, 2011.11.
 - 6) 寺本 明：厚生労働省間脳下垂体機能障害班報告－下垂体外科の現状－. 第84回日本内分泌学会学術総会, 2011.4.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図1. 対象症例

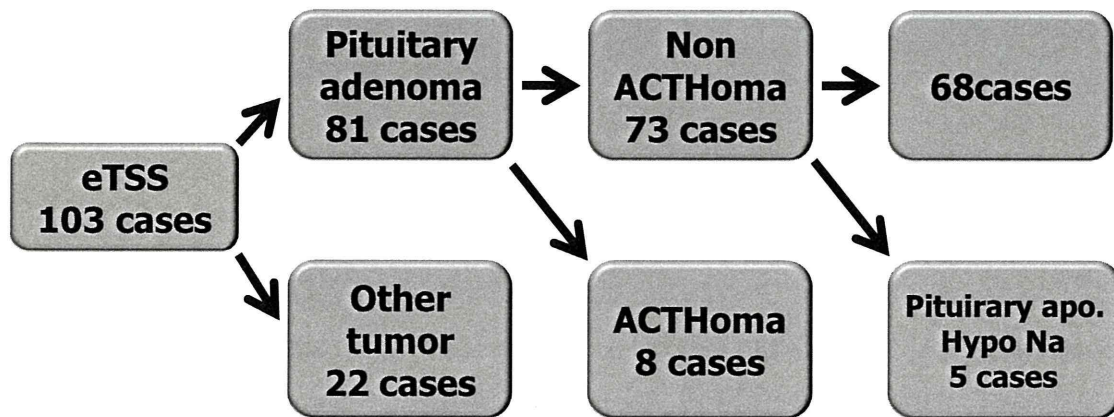
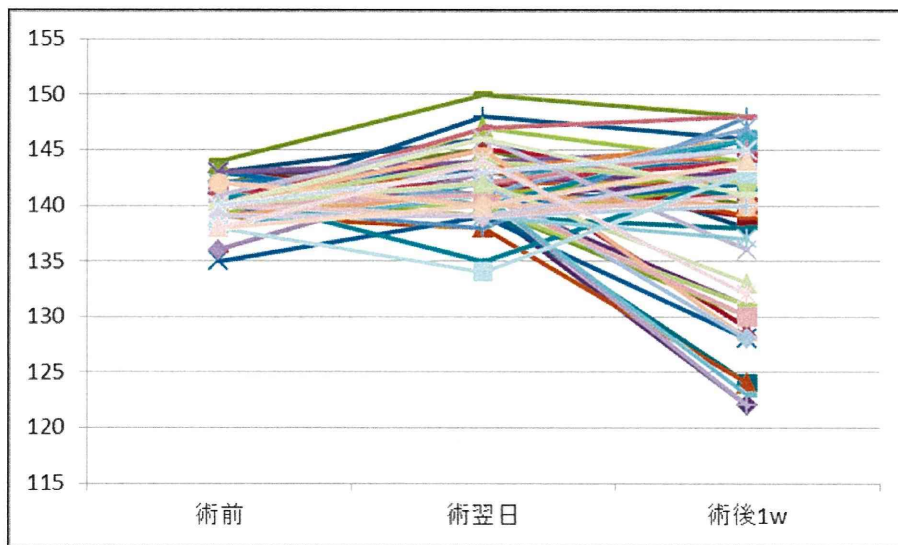


図2. 周術期のNaの推移



Post-operative hypo Na (Na \leq 135mEq/L): 15/68(22.1%)

表1. 低Na血症をきたした症例の特徴(1)

	Normal Na group	Hypo Na group	P value
n	53	15	
Age	48.0±17.9	43.1±19.5	0.357
Sex (female)	31	10	0.571
Pre-ope Na(mEq/L)	140.4±1.8	140.0±2.0	0.505
Post-ope nadir Na(mEq/L)	142.5±2.8	127.7±3.7	<0.001
Na decline after eTSS	-0.5±3.8	13.5±3.5	<0.001

表2. 低Na血症をきたした症例の特徴(2)

	Normal Na group	Hypo Na group	P value
n	53	15	
Tumor type			
・NFA	34	8	
・PRLoma	10	7	
・GHoma	9	0	
Tumor size (mm)	22.1±11.4	23.0±11.6	0.792
Intraoperative liquorrhea	19	3	0.250
Extracapsular removal	35	11	0.596

表3. PRLomaにおける血清Na値の変化

	PRLoma	Other adenomas	P value
n	17	51	
Post-ope nadir Na(mEq/L)	135.6±7.4	140.5±6.3	0.036
Na decline after eTSS	5.6±8.8	1.5±6.0	0.011

AtT-20細胞におけるソマトスタチン受容体アゴニストSOM230によるACTHの分泌/合成及び細胞増殖抑制効果

研究分担者 須田 俊宏 弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学
研究協力者 蔭山 和則 弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学
岩崎 泰正 高知大学教育研究部医療学系臨床医学部門

研究要旨:新しいソマトスタチン受容体アゴニストのSOM230を用いて、下垂体ACTH産生AtT-20細胞におけるACTHの分泌/合成及び細胞増殖抑制効果について調べた。定量PCR法によってPOMC mRNA発現を、ELISA法にて培養液中のACTH濃度を測定した。更に、細胞増殖とアポトーシスについて調べた。AtT-20細胞において、SOM230(100 nM)はPOMC mRNA発現を有意に低下させ、培養液中のACTH濃度も減少させた。細胞増殖はSOM230によって抑制され、DNA fragmentationの増加とcyclin Eの発現低下を認めた。今回の検討から、AtT-20細胞において、SOM230はACTHの分泌及び合成を抑制させ、更に、アポトーシスの誘導と細胞周期の調節によって細胞増殖を抑制させることが示唆された。SOM230のin vivoの効果についての検討が今後必要である。

A. 研究目的

下垂体adrenocorticotrophic hormone(ACTH)産生腫瘍は、ACTHの自律分泌により生体内でグルココルチコイド(糖質ステロイド)の慢性過剰状態を引き起こすことで、いわゆるクッシング病という病態を呈する。クッシング病による過剰なグルココルチコイドは、高血圧、糖尿病、胃潰瘍、心疾患、免疫異常や悪性腫瘍など多彩な疾患の発症、増悪を引き起こすため、クッシング病の成因、治療、及びグルココルチコイドの生体に与える影響を解明することは、これら関連疾患の発症や増悪の予防にも重要である。また、下垂体ACTH産生腫瘍細胞は、グルココルチコイドでアポトーシスが誘導されにくく、グルココルチコイド抵抗性を有すると考えられる。

クッシング病に対する現在の治療法は、外科的切除が第一であるが、完全切除は難しいために根治は限られており、薬物療法の効果

は補助的である。内外のこれまでの下垂体ACTH産生腫瘍についての研究は、そのホルモンのもたらす多彩な臨床症状から、その分泌機序の解明や分泌抑制機構の解明に主眼がおかれてきたが、下垂体ACTH産生腫瘍の細胞増殖機構については明らかにされてきていない。

各種ソマトスタチン受容体アゴニストの効果が、下垂体成長ホルモン(GH)産生腫瘍で示されてきている。一方、下垂体ACTH腫瘍細胞への同作用効果については未だ明らかではない。ソマトスタチン受容体タイプ2に親和性の強いoctreotideの検討では、ACTH分泌抑制や細胞増殖抑制効果が弱いと報告されている。一方、新規ソマトスタチン受容体アゴニストのSOM230はソマトスタチン受容体タイプ5に強い親和性を示し、下垂体ACTH腫瘍細胞においてもソマトスタチン受容体タイプ5が発現しているため、その治

療効果が期待される。これまでの octreotide や SOM230 を使用した *in vitro* の検討からは、CRF 刺激下での ACTH 分泌抑制作用が示されているが、基礎 ACTH 分泌や細胞増殖に関する抑制作用は未だ見解が一致していない。

このため、本研究では、新規ソマトスタチン受容体アゴニストの SOM230 を用いて、下垂体 ACTH 産生腫瘍細胞における ACTH の分泌／合成及び細胞増殖抑制効果について検討した。更に、細胞増殖因子や細胞周期調節機構に与える SOM230 の影響を調べた。

B. 研究方法

マウス ACTH 産生 AtT-20 細胞を培養して使用した。同細胞に 10% fetal bovine serum (FBS) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて 5 日間培養し、実験前日に 0.2% bovine serum albumin (BSA) 添加の DMEM にて培養を行なった。同細胞を用いて、SOM230 (1-100 nM) を添加し以下について検討した。

SOM230 (100 nM) を添加後 2 時間、6 時間、24 時間インキュベートし、RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) にて RNA を回収した。回収された RNA は、RT-PCR kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) にて、cDNA に合成された。これら cDNA は real-time RT-PCR 法にて、proopiomelanocortin (POMC) mRNA 発現レベルが測定された。

SOM230 (1-100 nM) を添加後 6 時間インキュベートし、RNA 及び培養液を回収した。RNA を回収し、real-time RT-PCR 法にて、POMC mRNA 発現レベルが測定された。また、培養液は、ELISA 法 (MD Bioproducts, St. Paul, MN, USA) にて ACTH 濃度が測定された。

SOM230 (100 nM) を添加後 1 分、5 分、30 分、120 分、360 分インキュベートし、蛋白

を回収した。Western blot 法によって cAMP response element (CRE) -binding protein (CREB) 及び extracellular signal-related kinases (ERK) リン酸化レベルの変化について調べた。

SOM230 (100 nM) を添加後 30 分、120 分、360 分インキュベートし、蛋白を回収した。Western blot 法によって p27、cyclin E 及び β -actin (コントロール) の発現レベルの変化について調べた。

SOM230 (1-100 nM) を添加後 48 時間インキュベートした後、cell counting kit-8 溶液 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を添加して、WST-8 法にて細胞増殖に与える影響を調べた。

SOM230 (1-100 nM) を添加後 24 時間インキュベートした後、cell death detection ELISA (Roche, Penzberg, Germany) を使用して、DNA fragmentation の検出を行なった。

これらの実験を 3 回行なって解析した。統計学的処理は ANOVA を用い、引き続き Bonferroni/Dunn post-hoc test を行なった。P < 0.05 の危険率をもって有意とした。

C. 研究結果

AtT-20 細胞において、SOM230 (100 nM) は POMC mRNA 発現を添加後 2 時間で低下傾向を示し、6 時間で約 75% まで有意に低下させた。添加後 24 時間では、POMC mRNA 発現は有意な低下を認めなかった (図 1)。SOM230 添加後 6 時間において、POMC mRNA 発現の低下は 1-100 nM の範囲で濃度依存性の低下を示し、100 nM において有意な低下を示した (図 1)。

SOM230 添加後 6 時間において測定された培養液中の ACTH 濃度もまた SOM230 1-100 nM の範囲で濃度依存性の低下を示し、

10 nM及び100 nMにおいて有意な低下を示した(図2)。

CREBリン酸化はSOM230添加後5-120分において低下した。一方、ERKリン酸化は1-5分において増加した(図3)。

細胞増殖はSOM230によって抑制され、100 nMにおいて約70%まで減少し、統計学的に有意な抑制を示した(図4)。DNA fragmentationはSOM230によって増加し、1 nM及び10 nMでは有意差は認められなかったものの、100 nMにおいて約1.5倍まで増加し、有意差を認めた(図4)。

Cyclin E蛋白の発現はSOM230添加後30-120分において低下した(図5)。一方、p27蛋白の発現は、添加後30分において増加を示した(図5)。

D. 考察

暫定的に5段階のコルチゾール濃度に振り分けた血清中の、正確なコルチゾール濃度は、GC/MS/MSおよびLC/MS/MSで決定された。結果はそれぞれ低濃度のものから、1.99、4.67、9.44、19.3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ だった。これらの検体が低濃度域の血清コルチゾール標準物質となり、現在日常検査で使用される各測定キットの校正に利用された。校正による測定値のばらつきの変化を(図1)に示す。コルチゾール濃度がおよそ5~10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清において、校正前日常検査法による測定値とLC/MS/MSによる測定値の差は、いずれの検体でも $\pm 2.5\mu\text{g}/\text{dl}$ 程度あった。これに対し校正後日常検査法による測定値とLC/MS/MSによる測定値の差は、 $\pm 1.5\sim 2.0\mu\text{g}/\text{dl}$ 程度に減少した。CV値も校正前は12~16%とやや高めだったが、校正後は7~12%(一検体だけ15%と高値だったが)と低下した。

技能試験でも校正後の測定値は、LC/MS/

MSの測定値と相関しており、ばらつきも小さかった。対象は、コルチゾール濃度が3~9 $\mu\text{g}/\text{dl}$ と低濃度域にある4検体で、先の検討と同様7つの日常検査用コルチゾール測定キットで測定し、LC/MS/MSの測定値と比較した。いずれの検体でもCV値はほぼ10%以下だった(図2)。

このように新たに作成した低濃度域血清コルチゾール測定用標準物質により各キットで校正を行うことで、低濃度域での測定値はimmunoassayの誤差としては良好とされる $\text{CV} \leq 10\%$ を確保することが出来た。そこで我々はCV 10%の誤差を考慮し、当科で最近4年間に施行したDex抑制試験のCD/subCD診断の感度・特異度を再検討した。subCDでは、Dex 0.5mg抑制試験におけるコルチゾールのカットオフ値について、2.4~3.6までのまでの変動域を考慮すると、感度が58.6まで、特異度が75.5まで低下した。一方CDでは、同じDex 0.5mg抑制試験でコルチゾールのカットオフ値を4~6までの変動域を考慮したが、感度は100のまま変わらず、特異度も97.7と殆ど低下しなかった。Dex 1mg抑制試験においては、コルチゾールのカットオフ値1.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$ でsubCDの数例が見落とされてしまい、もともと感度が高い検査とは言えず、さらに変動域を考慮すると感度・特異度ともに更に低下しまい、スクリーニングには適さない可能性があった(図3)。

E. 結論

AtT-20細胞において、SOM230はACTHの分泌及び合成を抑制させる。更に、アポトーシスの誘導と細胞周期の調節によって細胞増殖を抑制させることが示唆された。SOM230はソマトスタチン受容体タイプ5に強い親和性を示し、下垂体ACTH腫瘍細胞

においてもソマトスタチン受容体タイプ5が発現しているため、その効果が期待される。今後、SOM230の*in vivo*の効果についても検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Kageyama K, Suda T. A case of hyponatremia after cervical spinal cord injury. *Endocr J* 58 (5) : 369-72, 2011.
- 2) Kageyama K, Kumata Y, Akimoto K,

Takayasu S, Tamasawa N, Suda T. Ghrelin stimulates corticotropin-releasing factor and vasopressin gene expression in rat hypothalamic 4B cells. *Stress* 14 (5) : 520-9, 2011.

- 3) Kageyama K, Tamasawa N, Suda T. Signal transduction in the hypothalamic corticotropin-releasing factor system and its clinical implications. *Stress* 14 (4) : 357-67, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. SOM230によるPOMC mRNA発現への影響

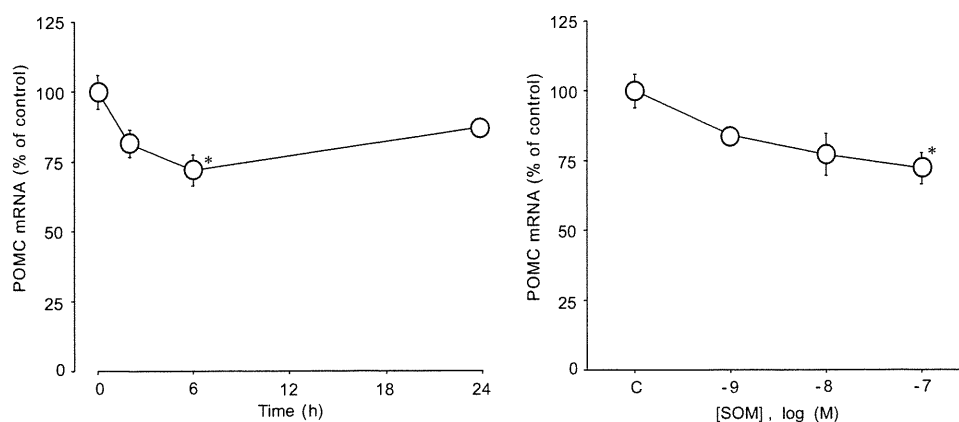


図2. SOM230による培養液中ACTH濃度への影響

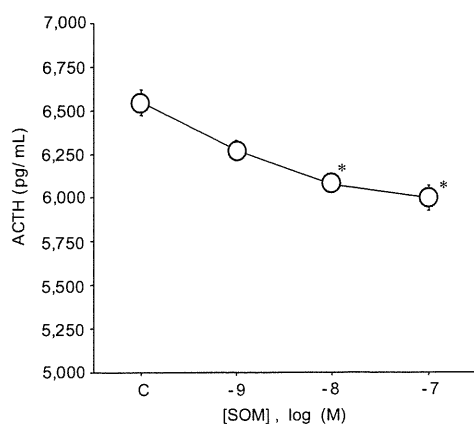


図3. SOM230によるpCREB及びpERK発現への影響

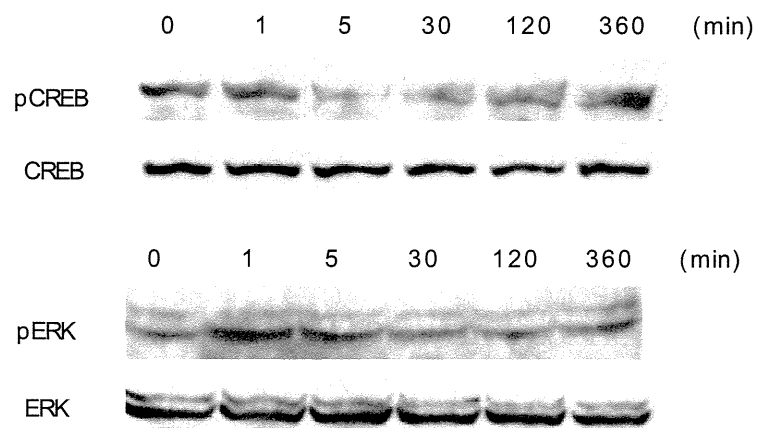


図4. SOM230による細胞増殖抑制効果

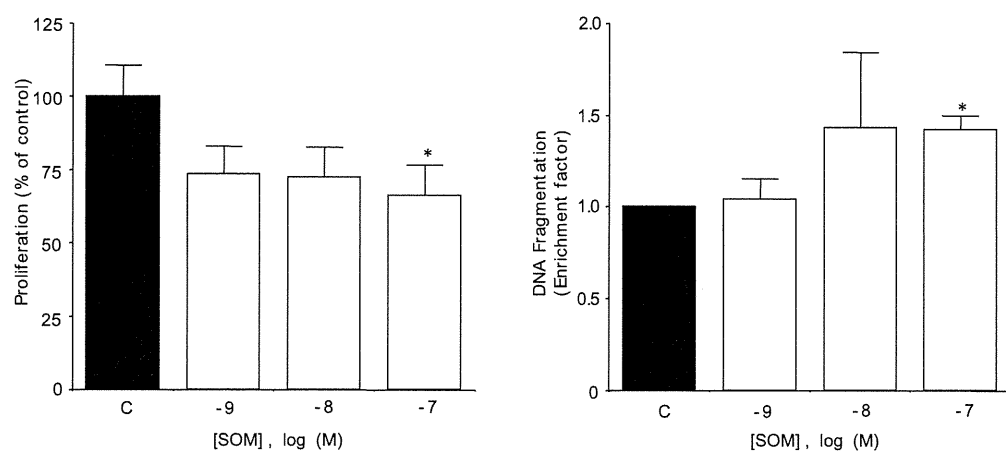


図5. SOM230によるcyclin E蛋白発現調節作用

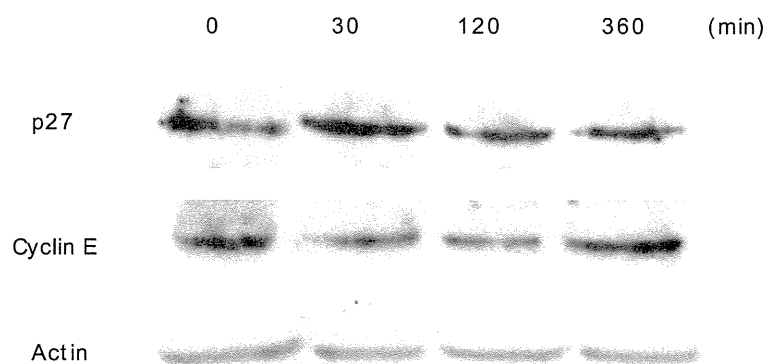
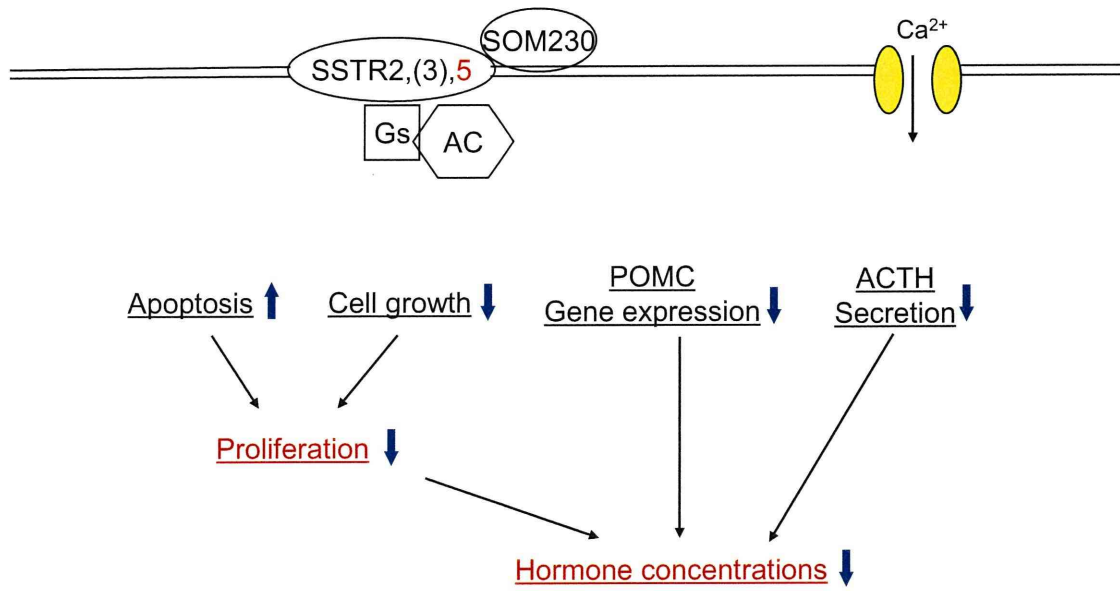


図6. AtT-20 細胞におけるSOM230による作用調節機序



種々のレチノイドX受容体 (RXR) アゴニストがAtT20細胞の増殖・アポトーシスに及ぼす影響の検討

研究分担者	菅原 明	東北大学大学院医学系研究科病態検査学分野
研究協力者	箱田 明子	東北大学大学院医学系研究科病態検査学分野
	宇留野 晃	東北大学大学院医学系研究科医化学分野
	清水 恭子	東北大学大学院医学系研究科病態検査学分野
	伊藤 貴子	東北大学大学院医学系研究科病態検査学分野
	吉川 雄朗	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野
	藤原 幾磨	東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野
	松田 謙	東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学分野
	工藤 正孝	東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学分野
	影近 弘之	東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部薬化学分野
	岩崎 泰正	高知大学教育研究部医療学系臨床医学部門
	伊藤 貞嘉	東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学分野

研究要旨：【目的】我々は一昨年の本会議において、RXRアゴニストであるHX630が、マウス下垂体由来ACTH産生細胞であるAtT20細胞におけるACTH分泌・POMC遺伝子発現を抑制する可能性に関して報告した。今回我々は、種々のRXRアゴニストがAtT20細胞の増殖・アポトーシスに及ぼす影響に焦点を当て、以下の検討を行なった。【成績】RXRアゴニストとしてHX630、PA024、CD3254を使用した。AtT20細胞の増殖はCell Counting Kit-8を用いて、アポトーシスはホモジニアスカスパーゼアッセイを用いて、それぞれ検討した。増殖に関しては、HX630、PA024、CD3254のいずれも明らかな増殖促進・抑制効果を示さなかった。アポトーシスに関しては、HX630とPA024の両者において、濃度依存的なアポトーシス増強効果が認められた一方で、CD3254は影響を及ぼさなかった。【結論】以上から、HX630とPA024に関しては、アポトーシス促進の観点からクッシング病治療薬たり得る可能性が示唆された。現在、これらRXRアゴニストによるアポトーシス誘導の分子メカニズムの解明目的で、AtT20細胞における遺伝子変動をDNAマイクロアレイにて解析中である。

A. 研究目的

ビタミンA誘導体であるレチノイン酸(RA)は、クッシング病実験モデル(J Clin Invest 2001; 108: 1123-1131)およびイヌのクッシング病(Endocrinology 2006; 147: 4438-4444)に対してACTH分泌を抑制し治療的效果を持つ事が報告されている。我々は

平成21・23年の本会議において、レチノイン酸受容体(RAR)アゴニストであるAm80が、マウス下垂体由来ACTH産生AtT20細胞におけるPOMC遺伝子転写活性およびACTH分泌を、むしろ増加させることを報告した。さらに我々は平成22年の本会議において、レチノイドX受容体(RXR)アゴニ

ストであるHX630が、AtT20細胞におけるPOMC遺伝子転写活性およびACTH分泌を、抑制することを報告した。今回我々は、種々のRXRアゴニストが、AtT20細胞における細胞増殖・アポトーシス・POMC mRNA発現・ACTH分泌に及ぼす影響を比較検討したので報告する。

B. 研究方法

細胞はマウス下垂体由来ACTH産生細胞であるAtT20細胞を使用した。RXRアゴニストはHX630 (RXR pan-agonist)、PA024 (RXR pan-agonist)、CD3254 (RXR α -agonist) をそれぞれ使用した。AtT20細胞に種々の濃度(0, 100 nM, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M)のRXRアゴニストを添加した後に、細胞増殖をCell Counting Kit-8を用いて、アポトーシスをホモジニアス カスパーゼアッセイを用いて、POMC mRNA発現はリアルタイムPCR法にて、細胞上清へのACTH分泌はELISA法にて、それぞれ検討した。DNAマイクロアレイはアジレント社のMouse GE 4 \times 44K Ver.2を用いて施行した。

C. 研究結果

各RXRアゴニストをAtT20細胞に24時間添加した後の細胞増殖に及ぼす影響を検討したが、24時間のインキュベーションでは一定の傾向は認められなかった(data not shown)。

次に、各RXRアゴニストを96時間添加した後のアポトーシスに及ぼす影響を検討したところ、HX630とPA024が濃度依存的にアポトーシスを誘導した一方で、CD3254による誘導は認められなかった(図1)。

次に、RXRアゴニストを24時間添加した後のPOMC mRNA発現を検討したところ、

HX630は濃度依存的にPOMC mRNA発現を抑制した一方で、PA024とCD3254による発現抑制は認められなかった(図2)。

次に、RXRアゴニストを72時間添加(最後の4時間にCRH 10 nMも共添加)した後のACTH分泌を検討したところ、HX630は濃度依存的にACTH分泌を抑制した一方で、PA024とCD3254による分泌抑制は認められなかった(図3)。

次に、HX630 (10 μ M) を48時間添加後のRNAを抽出してDNAマイクロアレイを施行したところ、コントロールに比して1437遺伝子が有意に、2倍以上または0.5倍未満の減少を示した。変動した遺伝子群のパスウェイ解析を現在施行中であるが、preliminaryな結果からHX630がcell cycleやcell deathに関連する遺伝子群を変動させる可能性が示唆された。

D. 考察

今回我々は、これまで検討を行なって来たHX630のみならず、他のRXRアゴニストであるPA024とCD3254も加えて、RXRアゴニストがAtT20細胞に及ぼす影響を比較検討した。興味深い事に、アポトーシスに関してはHX630とPA024の両者が誘導効果を示したのに対し、POMC mRNA発現・ACTH分泌に関してはHX630のみが抑制効果を示した。以上の結果から、クッシング病の治療薬としては、HX630が最も有効である可能性が考えられた。

E. 結論

HX630はクッシング病の治療薬たり得る可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文雑誌(2011～2012年)

- 1) Aoki S, Hoshi K, Kawakami J, Sato K, Satoh K, Mori K, Sugawara A, Saito Y, Yoshida K. Assisting the diagnosis of Graves' hyperthyroidism with pattern recognition methods and a set of three routine tests parameters, and their correlations with free T4 levels: extension to male patients. *Biomed Pharmacother.* 2011; 65: 95-104.
- 2) Uruno A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Hui XG, Akahira JI, Nakamura Y, Sasano H, Okamoto H, Ito S, Sugawara A. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ suppresses CYP11B2 expression and aldosterone production. *J Mol Endocrinol.* 2011; 46: 37-49.
- 3) Zheng HC, Sugawara A, Okamoto H, Takasawa S, Takahashi H, Masuda S, Takano Y. Expression profile of the REG gene family in colorectal carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59: 106-115.
- 4) Uruno A, Noguchi N, Matsuda K, Nata K, Yoshikawa T, Chikamatsu Y, Kagechika H, Harigae H, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C- $\{\delta\}$. *J Leukoc Biol.* 2011; 90: 235-247.
- 5) Peterson KM, Guo X, Elkahloun AG, Mondal D, Bardhan PK, Sugawara A, Duggal P, Haque R, Petri WA Jr. The expression of REG 1A and REG 1B is

increased during acute amebic colitis. *Parasitol Int.* 2011; 60: 296-300.

- 6) Fujishima F, Suzuki T, Nakamura Y, Taniyama Y, Ono K, Sugawara A, Miyazaki S, Moriya T, Sato A, Satomi S, Sasano H. Retinoid receptors in human esophageal squamous cell carcinoma: Retinoid X receptor as a potent prognostic factor. *Pathol Int.* 2011; 61: 401-408.
- 7) Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Matsuda K, Yang CW, Ito S. PPAR γ agonist beyond glucose lowering effect. *Korean J Intern Med.* 2011; 26: 19-24.
- 8) Kaur S, Harikrishnan VS, Shenoy SJ, Radhakrishna NS, Uruno A, Sugawara A, Kartha CC. Transfection of endothelial nitric oxide synthase gene improves angiogenic efficacy of endothelial progenitor cells in rabbits with hindlimb ischemia. *J Clin Exp Heart Cardiol.* 2011; 2:140. doi: 10.4172/2155-9880.1000140

和文雑誌・著書(2011～2012年)

- 1) 菅原 明：ビタミン欠乏症・過剰症・依存症。吉岡成人編：今日の治療指針2011年版－私はこう治療している。Pp.659-660, 医学書院, 2011
- 2) 菅原 明, 宇留野晃, 松田 謙, 箱田明子, 工藤正孝, 伊藤貞嘉：ACE阻害薬およびアンジオテンシンII受容体拮抗薬の血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響—マイクロアレイを用いた検討—。東北福祉大学感性福祉研究所年報第12号：175-177, 2011

2. 学会発表

国際学会(2011～2012年)

- 1) Kudo M, Satoh F, Morimoto R, Iwakura Y, Ono Y, Murakami O, Matsuda K, Sugawara

- A, Uruno A, Takase K, Ito S. Clinical significance of silent brain infarction in the patients with primary aldosteronism. The 37th International Aldosterone Conference. Boston 6/2/2011
- 2) Matsuda K, Uruno A, Kudo M, Satoh F, Ito S, Sugawara A. ARBs differentially affect aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression in human adrenal H295R cells. The 37th International Aldosterone Conference. Boston 6/2/2011
- 3) Uruno A, Matsuda K, Kudo M, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A. Effects of retinoid X receptor on ACTH secretion and POMC gene expression in AtT20 corticotroph cells. The Endocrine Society 93rd Annual Meeting. Boston 6/4/2011
- 4) Matsuda K, Uruno A, Kudo M, Satoh F, Ito S, Sugawara A. Differential effects among ARBs on aldosterone synthase (CYP11B2) gene expression in human adrenal H295R cells. The Endocrine Society 93rd Annual Meeting. Boston 6/4/2011
- 5) Kudo M, Satoh F, Morimoto R, Iwakura Y, Ono Y, Murakami O, Matsuda K, Sugawara A, Uruno A, Takase K, Ito S. Relationship between silent brain infarction and primary aldosteronism. The Endocrine Society 93rd Annual Meeting. Boston 6/5/2011
- 6) Nakamura T, Yoshikawa T, Noguchi N, Okamoto H, Sugawara A, Yanai K. Histamine receptor H3 regulates the functions of pancreatic β -cells. American Diabetes Association 71th Scientific Sessions. San Diego 6/24-28/2011
- 国内学会(2011~2012年)
- 1) 宇留野晃, 菅原 明, 松田 謙, 工藤正孝, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉: レチノイン酸受容体(RAR)によるPOMC遺伝子発現における転写因子NeuroD1およびTpitの役割. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究班平成22年度班会議 2011年1月7日 東京
- 2) 松田 謙, 宇留野晃, 工藤正孝, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 各アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)はアルドステロン合成酵素(CYP11B2)発現に異なる影響を及ぼす. 第84回日本内分泌学会学術総会 2011年4月21~23日 神戸
- 3) 工藤正孝, 佐藤文俊, 青木空真, 森本 玲, 岩倉芳実, 小野美澄, 松田 謙, 村上 治, 宇留野晃, 菅原 明, 佐藤憲一, 伊藤貞嘉: 基本的血液検査データを用いたパターン認識手法に基づくクッシング症候群の早期診断支援システムの開発. 第84回日本内分泌学会学術総会 2011年4月21~23日 神戸
- 4) 菅原 明, 西條 茂, 伊藤貞嘉: 4種類の経口糖尿病薬内服からリラグルチドへの変更が可能であった1症例. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19~21日 札幌
- 5) 菅原 明, 大和田直樹, 西條 茂, 伊藤貞嘉: ビルダグリプチン50mg投与が有効であった4症例. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19~21日 札幌
- 7) 菅原 明, 宇留野晃, 松田 謙, 箱田明子, 工藤正孝, 伊藤貞嘉: PPAR γ とレチノイド受容体: 臨床に還元できる基礎研究を目指して. 第29回内分泌代謝学サマーセミナー 2011年7月7日 仙台
- 8) 松田 謙, 宇留野晃, 工藤正孝, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 各ARBはアルドス

- テロン合成酵素CYP11B2遺伝子発現に異なる影響を及ぼす. 第29回内分泌代謝学サマーセミナー 2011年7月7日 仙台
- 9) 宇留野晃, 柳下陽子, 菅原 明, 山本雅之: 膵β細胞における Keap1-Nrf システムの役割. 第77回日本生化学会東北支部会例会 2011年7月23日 仙台
- 10) 宇留野晃, 菅原 明, 松田 謙, 工藤正孝, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉: レチノイドX受容体(RXR)によるACTH分泌・POMC遺伝子発現抑制作用の検討. 第22回間脳・下垂体・副腎系研究会 2011年9月3日 東京
- 11) 宇留野晃, 岡本 宏, 菅原 明: 全トランス型レチノイン酸(ATRA)と合成レチノイドAm80の血球・血管内皮間接着ならびに血球表面CD38発現に及ぼす影響の差異. 第84回日本生化学会大会 2011年9月21~24日 京都
- 12) 竹田真由, 船渡忠男, 斉藤邦明, 菅原 明: マイクロチップ電気泳動システムを用いたRNAの品質評価に関する検討. 日本臨床検査自動化学会第43回大会 2011年10月6~8日 横浜
- 13) 松田 謙, 宇留野晃, 工藤正孝, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 各アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)はアルドステロン合成酵素(CYP11B2)発現に異なる影響を及ぼす. 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月20~22日 宇都宮
- 14) 菅原 明, 大和田直樹, 西條 茂, 伊藤貞嘉: アリスキレン追加投与が有効であった7症例の検討. 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月20~22日 宇都宮
- 15) 菅原 明, 大和田直樹, 西條 茂, 伊藤貞嘉: バルサルタン/アムロジピン合剤の使用経験. 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月20~22日 宇都宮
- 16) 工藤正孝, 佐藤文俊, 青木空真, 前田恭輔, 森本 玲, 岩倉芳倫, 小野美澄, 菅原明, 星 憲司, 川上準子, 佐藤憲一, 伊藤貞嘉: パターン認識手法を用いたクッシング症候群のスクリーニングおよび術後フォローアップへの応用についての検討. 第23回日本内分泌学会東北地方会 2011年10月1日 山形
- 17) 菅原 明, 大和田直樹, 伊藤貞嘉: シタグリプチンの追加投与が有効であったSU剤無効の2症例. 第49回日本糖尿病学会東北地方会 2011年11月5日 仙台
- 18) 宇留野晃, 松田 謙, 箱田明子, 工藤正孝, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉, 菅原 明: レチノイン酸受容体(RAR)αがACTH分泌・POMC遺伝子発現に及ぼす影響. 日本神経内分泌学会第38回学術集会 2011年11月25~26日 東京
- 19) 箱田明子, 宇留野晃, 清水恭子, 伊藤貴子, 吉川雄朗, 藤原幾磨, 松田 謙, 工藤正孝, 影近弘之, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 種々のレチノイドX受容体(RXR)アゴニストがAtT20細胞の増殖・アポトーシスに及ぼす影響の検討. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究班平成23年度班会議 2011年1月6日 東京
- 20) 菅原 明, 岩崎泰正, 沖 隆, 須田俊宏: Cushing病に対する新規薬物療法の開発. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究班平成23年度班会議 2011年1月6日 東京

図1. 各RXRアゴニストがアポトーシスに及ぼす影響

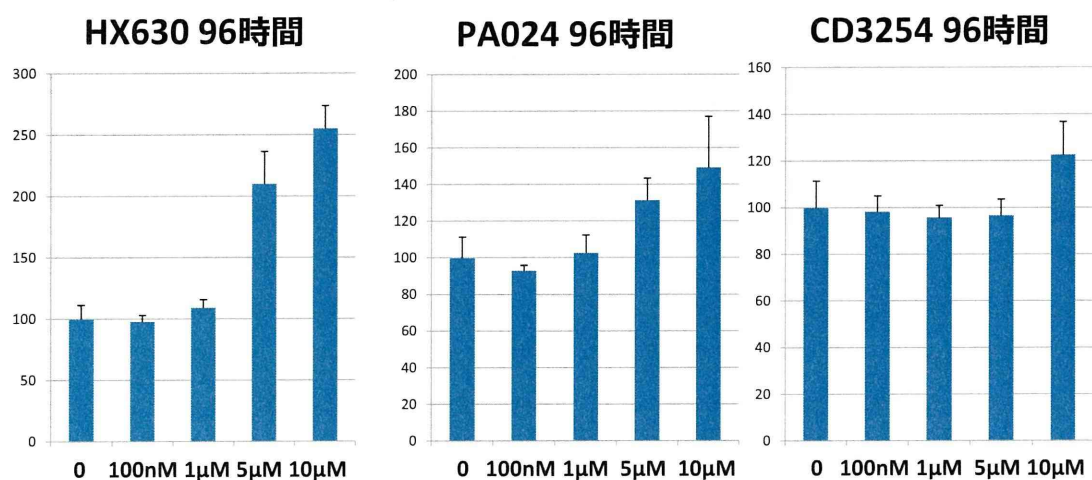


図2. 各RXRアゴニストがPOMC mRNA発現に及ぼす影響

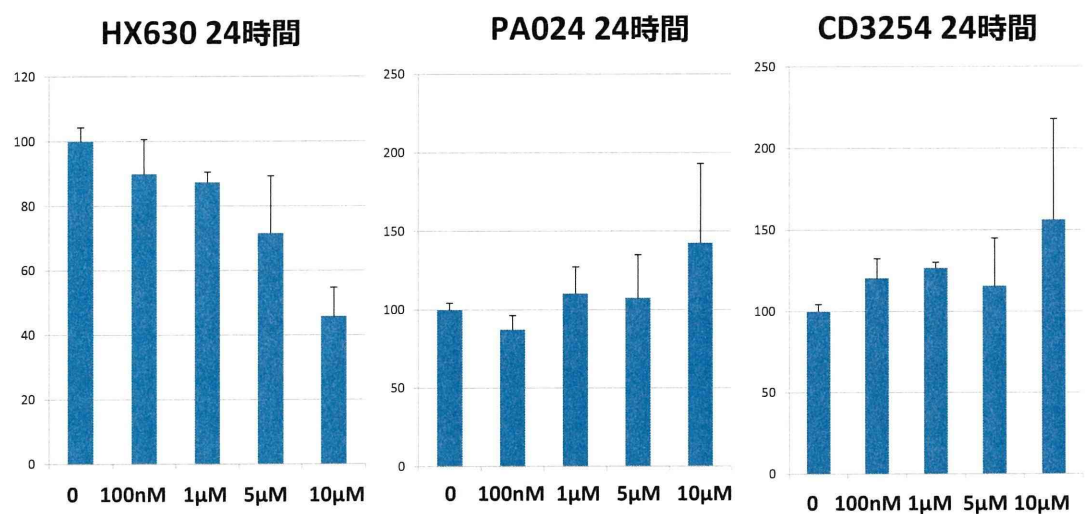
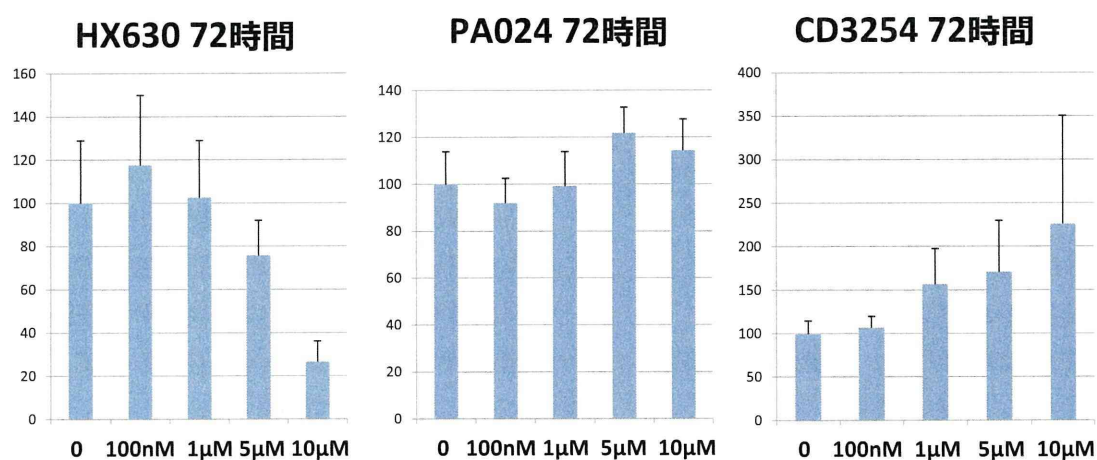


図3. 各RXRアゴニストがACTH分泌に及ぼす影響



ラットACTH産生細胞からの開口分泌の可視化解析

研究分担者 高野 幸路 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科学

研究要旨: 2光子励起法によりラットACTH産生細胞のACTH顆粒分泌を可視化し、分泌動態を解析した。ラットACTH細胞は、下垂体前葉の細胞集団の1割程度にすぎないため、生きた状態でラット下垂体前葉細胞集塊の中のACTH細胞を確認する方法をまず確立し、ACTH細胞と確認された細胞に対し、CRHやAVPなどの生理的アゴニストによるACTH顆粒分泌の動態を調べた。CRHによる顆粒分泌はCRH作用後、30-40秒ごとに起こりはじめ、0.3秒以下で終了する速いfull fusionの分泌と、数秒の経過のゆっくりとしたfull fusionの分泌のふたつの分泌動態を示す顆粒分泌が見られた。分泌は、投与後比較的長時間続いた。一方AVP投与では投与10秒以内にburst上の分泌が見られた。Burst状分泌は数10秒以内で終了する速い経過のものであった、このburst状の分泌を形成する個々の顆粒分泌はほとんどが速いfull fusion分泌であった。一方、high K刺激により膜を脱分極させ電位依存性カルシウムを介するカルシウム流入を増加させた状態では、ゆっくりとしたfull fusionとkiss-and-stayの分泌動態を示す分泌が混在して生じた。刺激の種類によって、顆粒分泌の動態と持続時間が異なり、刺激によって惹起される刺激伝達経路の相違がその原因ではないかと考えられた。

A. 研究目的

クッシング病ではACTH産生腺腫からの過剰なACTH分泌が生じ、代謝障害、臓器障害により生命予後、QOLの低下がもたらされる。クッシング病の治療は手術的切除が第一選択であるが、手術のみで治癒に至らない場合や手術不能の場合は内科的治療が必要である。しかしながら下垂体腺腫をターゲットとした保険適応の治療法はない。D2アゴニストやソマトスタチンアナログが下垂体をターゲットとした治療の候補となるがその作用機構の解明は不十分である。この作用機構を明らかにするためにも、ホルモン過剰分泌のしくみを解明すること必要であり、新しい治療法を模索するためにも必要である。このためにACTH顆粒分泌を解析する方法を確立する必要がある。

蛍光蛋白を用いた顆粒分泌現象の解析は、

蛍光分子の設計に結果が左右されることが知られており、蛍光蛋白を用いない方法が求められる。またACTH細胞は細胞集塊中でまばらにしか存在しないため、薬理実験を行うためには、生きた状態で細胞同定しておく必要がある。

本研究の目的はACTH細胞を、生きた状態で細胞同定する方法を確し、ACTH顆粒分泌を蛍光蛋白を用いないで解析する方法を確立することである。

Two-photon extracellular polar tracer法(TEP法)1, 2は、水溶性の蛍光物質を細胞外液に分布させ、開口分泌によって細胞膜と分泌顆粒膜が融合して生じる Ω 型の分泌顆粒内に細胞外液の蛍光物質が流入したものを2光子励起蛍光顕微鏡によって輝点として検出するものである(図1)。TEP法は観察対象の細胞に事前処置(蛍光物質との融合蛋白のラン

スフェクションなど)を必要としないため、インタクトな細胞における開口分泌現象の観察も可能である。この方法を用いてACTH顆粒分泌の可視化を試みた。

B. 研究方法

ラット下垂体前葉を初代培養し細胞集塊を作成、FITCなどの蛍光物質をつけたレクチンを用いてACTH細胞を同定し可能であるかを調べた。用いたレクチンは、過去の報告を参考に21種類を選び、室温または4°Cで10分3つの濃度で処理した後、PBSで3回洗浄し、2光子励起法で観察した。非特異的に染まるものを除いた7種類について、固定後に下垂体前葉ホルモンとの共存を蛍光染色で確認した。

2光子励起法のTEP法を用いてACTH分泌を可視化し、観察を行った。実験は、一部を除いて30°Cの環境で行い、CRHやAVPによる分泌を観察し、high K刺激下の分泌と比較した

開口分泌の観察には蛍光物質としてsulforhodamine Bを用い、分泌顆粒の計測と分泌現象の解析を行った。実験には、OlympusのFluoview 1000を用いた。

C. 研究結果

1. レクチンによるACTH産生細胞の同定

下垂体前葉細胞からの顆粒分泌を解析するためには、正常下垂体の多細胞構築を残した細胞集塊で研究を行う必要があることをラット正常GH細胞からの顆粒分泌研究の際に見出している。そのため、分散培養ではなく細胞集塊でACTH細胞を同定することを試みた。GH細胞と異なり、ACTH細胞が下垂体前葉細胞集団の中で占める割合は1割以下と少ない。下垂体前葉細胞はそれぞれ細胞表面

マーカーを発現しており、それらに特異的に結合する蛍光物質付加レクチンを用いてACTH細胞の同定を試みた。分散培養の場合と異なり、細胞集塊の場合は集塊の接着面に多くのレクチンで陽性細胞を多数確認しこれらはhigh K刺激で顆粒分泌が認められず、盛んにendocytosisを行うことから下垂体前葉細胞ではないFS細胞などの間質系細胞と考えられた。このendocytosisを盛んに起こす接着面から1-2層の細胞層を除外し、それより上方の細胞群を観察対象とした。検討したレクチンのうち、一つのレクチンがACTH細胞を特異的に同定することに役立った。最適濃度と処理時間を確定して、これを同定に用いることが可能となった(図2)(細胞集塊内における細胞同定について論文投稿準備中)。

2. ラットACTH分泌の可視化解析

このようにFITCラベルレクチンで同定したACTH細胞が認められる断面で2光子励起法のTEP法による観察を行った。細胞外液をSRBを含む細胞外液に置換すると、ただちに細胞間隙が蛍光で染まり、少なくとも分子量2000程度の分子は細胞間隙を自由に動きうることが明らかになった(図3)。

刺激をしない状態でACTH細胞を観察したが、20分を超える観察時間で自発性の顆粒分泌は観察できなかった(n=10)。

ACTH分泌を特異的に促進するCRH(10nmol/L)を投与すると、投与後数10秒後に、レクチンで同定されたACTH細胞の一部の辺縁に、蛍光輝点が急激に出現した後ただちに消失した(図4)。輝点の大きさは、 $255 \pm 108 \text{ nm}$ (n=20)であった。輝点の出現は細胞間隙に接して生じ、ACTH顆粒分泌であると考えられた。輝点の出現の時間経過は2種類に分かれ、0.3 msec以内で終了すると

ても速い分泌と3秒近い経過で輝点の出現と消失が観察される遅い分泌の二つが観察された。

一方、kiss-and-stay exocytosisやsequential exocytosisは認められなかった。この分泌は、細胞によって異なるものの、分泌頻度を変化させながら10分以上継続した。

AVP (10nmol/L) 刺激では、CRH刺激と異なる分泌経過と分泌動態で顆粒分泌が刺激された。

刺激後10秒前後に、burst状に顆粒分泌を起す細胞が観察された(図5)。Burst状分泌は10-20秒で終了し、その後顆粒分泌はしばらく観察されなかった。このburst状の分泌では速い分泌とkiss-and-stayの分泌動態を示す2種類の分泌が観察された。一方、他の細胞では刺激後30秒以上経過した後に、散発性に分泌が認められた。この場合の分泌は、ほとんどが速い分泌動態であった。

これらに対し、high K刺激ではACTH細胞において盛んな分泌が観察され、多くはkiss-and-stay分泌であった。

D. 考察

レクチンによるACTH細胞の同定で観察が容易になり、薬理実験も可能になった。分散培養の場合と異なり、細胞集塊の場合は集塊の接着面に多くのレクチンで陽性細胞を多数確認しこれらは下垂体前葉細胞ではないFS細胞などの間質系細胞と考えられた。

CRH刺激とAVP刺激では、分泌の時間経過、分泌動態のことなる分泌現象が観察された。全体としては、CRH分泌の方が分泌量は多く、長く刺激された。

ヒトACTH産生腺腫からは、刺激なしに自発分泌が起こることを観察している。この自発分泌においては遅い分泌しか観察されて

おらず、正常ACTH細胞に生理的刺激を加えて生じる分泌とは異なっていた。

E. 結論

レクチンによるACTH細胞の同定で観察が容易になり、薬理実験も可能になった。この方法で同定した正常ACTH細胞で、CRH刺激やAVP刺激による顆粒分泌を可視化し解析した。刺激の種類により、分泌の時間経過と分泌動態は異なっていた。

参考文献

- 1) Nemoto T, et al: Nat Cell Biol, 3: 253, 2001.
- 2) Takahashi N & Kasai H: Endocr J, 54: 337, 2007.
- 3) Landis CA, et al: J Clin Endocrinol Metab, 71:1416, 1990.
- 4) Spada A, et al: J Clin Endocrinol Metab, 71:1421, 1990.
- 5) Yasufuku-Takano J, et al: Clin Endocrinol (Oxf), 64:91, 2006.
- 6) Yasufuku-Takano J, et al: Endocrinology, 140:2018, 1999.

F. 健康危険情報

該当なし

F. 研究成果発表

1. 論文発表

- 1) Akira Matsuno*, Akiko Mizutani, Hiroko Okinaga, Koji Takano, So Yamada, Shoko M. Yamada, Hiroshi Nakaguchi, Katsumi Hoya, Mineko Murakami, Masato Takeuchi, Mutsumi Sugaya, Johbu Itoh, Susumu Takekoshi and R. Yoshiyuki Osamura
Molecular Morphology of Pituitary Cells, from Conventional Immunohistochemistry

to Fluorescein Imaging. *Molecules*, 16, 3618-3635, 2011

- 2) Murakami M, Mizutani A, Asano S, Katakami H, Ozawa Y, Yamazaki K, Ishida Y, Takano K, Okinaga H, Matsuno A, A mechanism of acquiring temozolomide resistance during transformation of atypical prolactinoma into prolactin-producing pituitary carcinoma. *Neurosurgery* 68:E1761-7, 2011
- 3) Matsuno A, Mizutani A, Okinaga H, Takano

K, Yamada S, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Takeuchi M, Sugaya M, Itoh J, Takekoshi S, Osamura RY. Functional molecular morphology of anterior pituitary cells, from hormone production to intracellular transport and secretion. *Med Mol Morphol.* 44 (2) :63-70. 2011

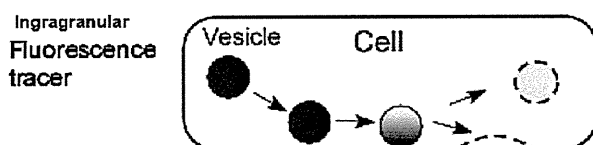
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. Two-photon extracellular polar tracer 法 (TEP 法)

- (A) 分泌顆粒を可視化する通常の方法は、分泌顆粒の内容物や顆粒膜を蛍光物質で標識し、開口分泌を蛍光物質で染色された分泌顆粒の消失として観察するものである。この方法では通常の蛍光顕微鏡で観察できるが、分泌顆粒を蛍光させるために人為的な融合蛍光蛋白をトランスフェクションするなどの操作が必要であり、臨床検体の観察には適さない。
- (B) TEP法では細胞外に水溶性蛍光性物質を分布させ、分泌顆粒膜が細胞膜に融合した以降に分泌顆粒が蛍光する (post-fusion labeling)。このため臨床検体でも観察可能である。ただし開口分泌の検出には2光子励起顕微鏡が必要である。(文献²より改変引用。)

A. 通常の方法



B. TEP画像

