

図2. ブロモクリプチン単回投与試験

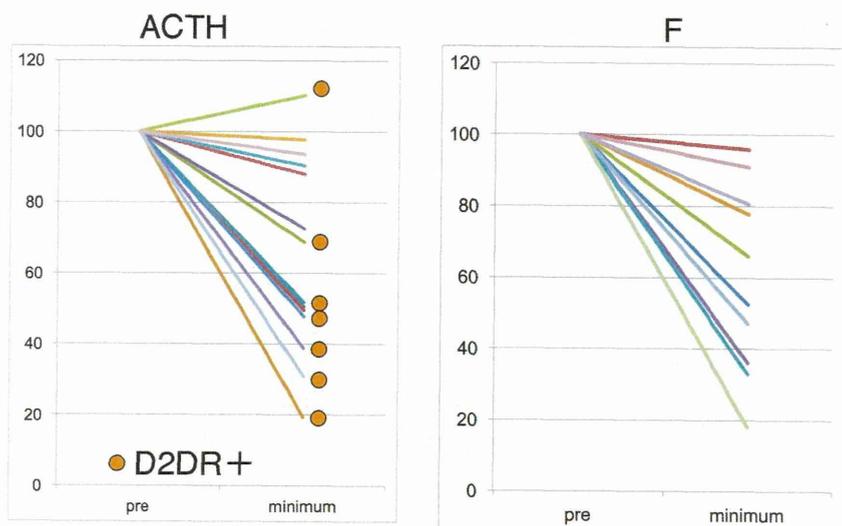
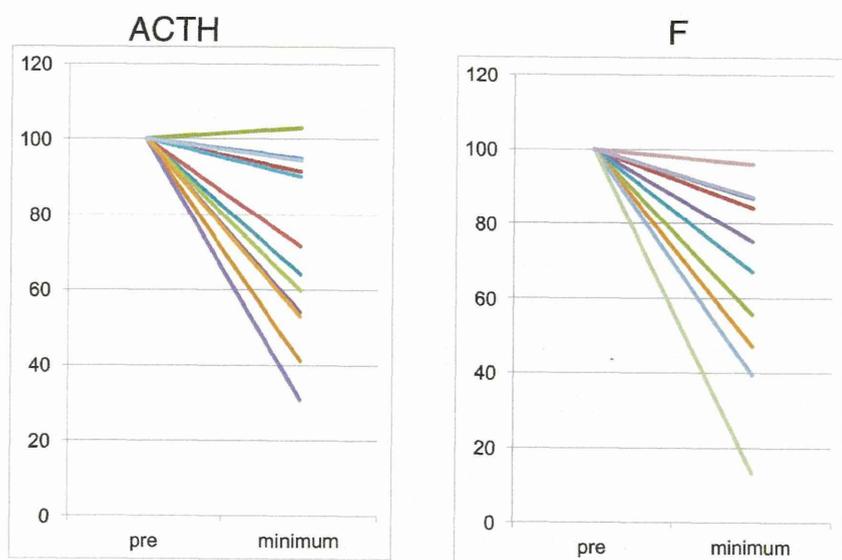


図3. オクトレオチド単回投与試験



## レチノイドX受容体(RXR)アゴニストHX630の *Pomc* 遺伝子転写抑制機構の解明

研究分担者	菅原 明	東北大学大学院医学系研究科分子内分泌学分野
研究協力者	箱田 明子	東北大学大学院医学系研究科分子内分泌学分野
	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分子内分泌学分野
	小暮 直敬	東北大学大学院医学系研究科分子内分泌学分野
	皆川 敬治	東北大学大学院医学系研究科分子内分泌学分野
	伊藤 貴子	東北大学大学院医学系研究科分子内分泌学分野
	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
	佐藤 郁子	東北大学大学院医学系研究科分子内分泌学分野
	壹岐 裕子	東北大学大学院医学系研究科分子内分泌学分野
	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	東京医科歯科大学生体材料工学研究所
	岩崎 泰正	高知大学臨床医学部門
	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：**RXRアゴニストの*Pomc*転写抑制機構の解明のために、AtT20細胞とRXRアゴニストであるHX630を用いて、各遺伝子mRNA発現を定量PCR、*Pomc* promoter活性をルシフェラーゼアッセイ、転写因子のDNA結合能をChIP assayで解析を行った。その結果、AtT20細胞において、HX630は*Pomc* mRNA発現抑制と*Pomc* promoter活性抑制を示し、*Pomc*転写抑制の機序として、転写因子Nurr1、Nur77の発現抑制および*Pomc* promoterへの結合能の減弱が示された。またヌードマウスを用いた腫瘍細胞移植実験によるHX630の抗腫瘍効果の検討を行ったところ、HX630投与によって体重や腫瘍体積に明らかな変化は見られなかったが、腫瘍の*Pomc* mRNAの発現は有意に低下していた。これらより、HX630はCushing病の治療薬になり得る可能性が示唆された。

### 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*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

らに平成22・24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細胞において細胞増殖抑制・アポトーシス誘導効果を持ち、また*Pomc*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、HX630の*Pomc*転写抑制機構の解明とヌードマウスを用いた腫瘍細胞移植実験によるHX630の抗腫瘍効果の検討を行ったので報告する。

## 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)とPA024(RXR pan-agonist)を使用した。各遺伝子mRNA発現をリアルタイムPCRにて、*Pomc* promoter活性をルシフェラーゼアッセイ(r*Pomc*-Luc: -703/+58; -429/+58; -379/+58; -359/+58; -293/+58; -169/+58; -12/+58)にて、転写因子のDNA結合能をChIP assayにてそれぞれ解析した。ヌードマウスの腫瘍細胞移植実験については、生後8週のヌードマウスに1匹あたり100万個のAtT20細胞を埋め込み、その1週間後、HX630投与群(5mg/kg/dose)とコントロール(コーンオイル)群とに分け、週3回の腹腔内投与を3週間継続した。実験最終日、体重測定、腫瘍摘出、腫瘍径計測を行い評価、また腫瘍からRNA抽出を行った後、リアルタイムPCRにて*Pomc* mRNAの発現変化を両群で比較検討した。尚、動物実験については、動物実験等の実施に関する基本指針および国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程に則って行った。

## C. 研究結果

RXRアゴニストのAtT20細胞における*Pomc* mRNA発現に対する影響をリアルタイム

PCRにて検討したところ、HX630 10 $\mu$ M (48hr)添加により*Pomc* mRNAの発現が抑制された一方で、PA024 10 $\mu$ M (48hr)では抑制は認められなかった。次に、AtT20細胞におけるdeletion mutantを用いた*Pomc* promoter解析を行ったところ、HX630 10 $\mu$ M (24hr)添加により、-703(全長)から-379までの間で転写活性が抑制された一方で、-359では抑制が認められなかった(図1)。この転写活性が抑制された領域において、転写因子であるNur77、Nurr1、NeuroD1の結合領域が存在することから、HX630によるこれらの転写因子のmRNA発現に対する影響をリアルタイムPCRにて検討したところ、HX630 10 $\mu$ M (48hr)添加によりNurr1、Nur77のmRNA発現は抑制された。一方、NeuroD1では発現が増加した。この結果に基づき、HX630による*Pomc*転写抑制のメカニズムとして、Nur77やNurr1の*Pomc* promoter領域への結合能の減弱が考えられたため、ChIP assayにて検討を行ったところ、HX630 HX630 10 $\mu$ M (24hr)によりNurr1/Nur77の*Pomc* promoter領域への結合を減弱した一方で、NeuroD1の結合には影響を及ぼさないことが明らかとなった(図2)。一方、ヌードマウスにおける腫瘍細胞移植実験において、体重変化・腫瘍体積ともにcontrol群とHX630投与群との間で有意差はなかったが、HX630投与群の方が体重減少、腫瘍体積ともに少ない傾向にあった。またHX630投与によって腫瘍細胞における*Pomc* mRNAの発現が有意に低下した(図3)。

## D. 考察

AtT20細胞において、HX630は*Pomc* mRNA発現抑制と*Pomc* promoter活性抑制を示した。*Pomc*転写抑制のメカニズムとして、HX630による転写因子Nurr1、Nur77の発現抑制お

よびこれらの *Pomc* promoter 領域への結合能の減弱が明らかとなった。一方、ヌードマウスを用いた AtT20 細胞移植実験では、HX630 投与によって体重や腫瘍体積に明らかな変化は見られなかったが、腫瘍細胞における *Pomc* mRNA の発現は有意に低下していた。HX630 が AtT20 細胞に対し、細胞増殖抑制・アポトーシス誘導効果をもち、また ACTH 分泌抑制効果を示したこれまでの結果も含め、これらの実験結果より HX630 は Cushing 病の治療薬になり得る可能性が示唆された。

## E. 結論

HX630 は Cushing 病の治療薬になり得る可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

英文雑誌 (2012 ~ 2013 年)

- 1) Hoshi Y, Imaizumi M, Sato A, Rikiishi T, Sugawara A, Kizaki M, Tsuchiya S. UF-1, a human acute promyelocytic leukemia cell line carrying the mutant PML-RAR  $\alpha$ , exhibits different maturation pattern in response to ATRA or Am80, a RAR $\alpha$ -selective synthetic retinoid. *Jpn J Pediatr Hematol Oncol.* 2012; 49: 24-30.
- 2) Aoki S, Hoshi K, Kawakami J, Sato K, Sato W, Satoh H, Mori K, Sugawara A, Nakagawa Y, Yoshida K. Assisting the diagnosis of overt hypothyroidism with pattern recognition methods making use of a set of routine tests, and their multiple correlation with total T4. *Biomed*

*Pharmacother.* 2012; 66: 195-205.

- 3) Ikeda T, Takasawa S, Noguchi N, Nata K, Yamauchi A, Takahashi I, Yoshikawa T, Sugawara A, Yonekura H, Okamoto H. Identification of a major enzyme for the synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose in amphibian cells and evolutionary conservation of the enzyme from human to invertebrate. *Mol Cell Biochem.* 2012; 366: 69-80.
- 4) Sugawara A, Uruno A, Matsuda K, Saito-Ito T, Funato T, Saito-Hakoda A, Kudo M, Ito S. Effects of PPAR $\gamma$  agonists against vascular and renal dysfunction. *Curr Mol Pharmacol.* 2012; 5: 248-254.
- 5) Sugawara A, Sato H, Ito S. Diabetes and hepatitis C infection in dialysis patients: the present situation in Japan. *Nephro-Urol Mon.* 2012; 4: 391-392.

和文雑誌・著書 (2012 ~ 2013 年)

- 1) 宇留野晃, 箱田明子, 松田 謙, 工藤正孝, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 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. *ACTH related peptides22*: 58-59, 2012
- 2) 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) アゴニストは, AtT20 細胞の増殖・アポトーシス・POMC 発現・ACTH 分泌に異なる影響を及ぼす. *ACTH related peptides23*: 15-16, 2012
- 3) 菅原 明, 村上 治, 在原善英, 鈴木貴, 麦倉俊司, 笹野公伸, 伊藤貞嘉: 再発後14年を経過した副腎癌の一例. *ACTH related peptides23*: 29-31, 2012

- 4) 菅原 明, 宇留野晃, 工藤正孝, 松田 謙, 清水恭子, 吉川雄朗, 伊藤貴子, 箱田明子, 伊藤貞嘉: PPAR $\gamma$ と高血圧・動脈硬化. 東北大学医学部保健学科紀要21: 1-5, 2012
- 5) 菅原 明, 宇留野晃, 箱田明子, 清水恭子, 佐藤郁子, 松田 謙, 壺岐裕子, 吉川雄朗, 工藤正孝, 伊藤貴子, 伊藤貞嘉: レチノイド/レチノイドの抗動脈硬化作用. 東北大学医学部保健学科紀要21: 61-63, 2012
- 6) 菅原 明, 伊藤貞嘉: 放射線治療. 平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編: 下垂体疾患診療マニュアル. Pp.108-110, 診断と治療社, 2012
- 7) 菅原 明, 麦倉俊司, 伊藤貞嘉: 放射線治療後の合併症. 平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編: 下垂体疾患診療マニュアル. Pp.118-119, 診断と治療社, 2012
- 8) 菅原 明, 伊藤貞嘉: Gitelman症候群. 成瀬光栄, 平田結喜緒, 島津 章 編: 内分泌代謝専門医ガイドブック(改訂第3版). Pp.254-255, 診断と治療社, 2012
- 9) 菅原 明, 伊藤貞嘉: ホルモン受容体異常症. 成瀬光栄, 平田結喜緒, 島津 章 編: 内分泌代謝専門医ガイドブック(改訂第3版). Pp.307-309, 診断と治療社, 2012
- 10) 菅原 明, 伊藤貞嘉: 中枢性尿崩症. 成瀬光栄, 平田結喜緒, 島津 章 編: 内分泌代謝専門医ガイドブック(改訂第3版). Pp.119-121, 診断と治療社, 2012

## 2. 学会発表

### 国際学会(2012~2013年)

- 1) Kudo M, Morimoto R, Iwakura Y, Ono Y, Matsuda K, Sugawara A, Ito S, Satoh F. Evaluation of reproducibility of captopril challenging test in primary aldosteronism. The 38th International Aldosterone Conference. Houston 6/21-22/2012

- 2) Saito-Hakoda A, Uruno A, Shimizu K, Kudo M, Saito-Ito T, Yoshikawa T, Matsuda K, Fujiwara I, Kagechika H, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A. Retinoid X receptor agonists differentially affect proliferation, apoptosis, and ACTH secretion/POMC gene expression in AtT20 corticotroph cells. The Endocrine Society 94th Annual Meeting. Houston 6/23/2012
- 3) Matsuda K, Uruno A, Saito-Ito T, Shimizu K, Kudo M, Satoh F, Yoshikawa T, Saito-Hakoda A, Ito S, Sugawara A. Telmisartan stimulates aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression via the CaMK-mediated induction of NURR1. The Endocrine Society 94th Annual Meeting. Houston 6/26/2012
- 4) Saito-Ito T, Matsuda K, Uruno A, Shimizu K, Nakamura M, Takahashi R, Yoshikawa T, Kudo M, Saito-Hakoda A, Ito S, Sugawara A. High-glucose stimulates aldosterone synthase gene (CYP11B2) expression in human adrenal H295R cells. The Endocrine Society 94th Annual Meeting. Houston 6/23/2012
- 5) Kudo M, Morimoto R, Iwakura Y, Ono Y, Matsuda K, Sugawara A, Ito S, Satoh F. Evaluation of reproducibility of captopril loading test in primary aldosteronism. The Endocrine Society 94th Annual Meeting. Houston 6/23-26/2012

### 国内学会(2012~2013年)

- 1) 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 2012年1月6日 東京
- 2) 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 2012年1月6日 東京
- 3) 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)アゴニストは, AtT20細胞の増殖・アポトーシス・POMC発現・ACTH分泌に異なる影響を及ぼす. 第23回間脳・下垂体・副腎系研究会 2012年3月31日 東京
- 4) 菅原 明, 村上 治, 在原善英, 鈴木 貴, 笹野公伸, 伊藤貞嘉: 再発後14年を経過した副腎癌の一例. 第23回間脳・下垂体・副腎系研究会 2012年3月31日 東京
- 5) 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: 各種レチノイドX受容体(RXR)アゴニストが, AtT20細胞の増殖・アポトーシス・POMC発現・ACTH分泌に及ぼす効果の検討. 第24回日本内分泌学会東北地方会 2012年4月7日 仙台
- 6) 松田 謙, 宇留野晃, 伊藤貴子, 清水恭子, 吉川雄朗, 工藤正孝, 佐藤文俊, 箱田明子, 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遺伝子(CYP11B2)発現に異なる影響を及ぼす. 第24回日本内分泌学会東北地方会 2012年4月7日 仙台
- 7) 伊藤貴子, 松田 謙, 宇留野晃, 清水恭子, 吉川雄朗, 工藤正孝, 箱田明子, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 高血糖刺激はアルドステロン合成酵素遺伝子(CYP11B2)の発現を増強する. 第24回日本内分泌学会東北地方会 2012年4月7日 仙台
- 8) 宇留野晃, 松田 謙, 吉川雄朗, 箱田明子, 伊藤貞嘉, 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は, 血球・血管内皮間接着ならびに血球表面CD38発現に異なる影響を及ぼす. 第85回日本内分泌学会学術総会 2012年4月19~21日 名古屋
- 9) 宇留野晃, 箱田明子, 松田 謙, 清水恭子, 伊藤貴子, 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) $\alpha$ はNeuroD・Tpitを介してPOMC遺伝子発現を亢進する. 第85回日本内分泌学会学術総会 2012年4月19~21日 名古屋
- 10) 松田 謙, 宇留野晃, 伊藤貴子, 清水恭子, 吉川雄朗, 箱田明子, 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(第二報). 第85回日本内分泌学会学術総会 2012年4月19~21日 名古屋
- 11) 松田 謙, 宇留野晃, 伊藤貴子, 清水恭子, 工藤正孝, 箱田明子, 吉川雄朗, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 菅原 明: アルドステロン合成酵素および11 $\beta$ -水酸化酵素転写解析系として使用可能な新規安定発現株の作成. 第85回日本内分泌学会学術総会 2012年4月19~21日 名古屋
- 12) 松田 謙, 伊藤貴子, 宇留野晃, 中村美輝, 高橋 朗, 吉川雄朗, 清水恭子, 箱田明子, 工藤正孝, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 高血糖刺激によるアルドステロン合成酵

- 素 (CYP11B2) の発現増強効果. 第85回日本内分泌学会学術総会 2012年4月19～21日 名古屋
- 13) 工藤正孝, 松田 謙, 箱田明子, 伊藤貴子, 清水恭子, 佐藤文俊, 宇留野晃, 伊藤貞嘉, 菅原 明: GLP-1受容体アゴニストの冠動脈血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の検討. 第85回日本内分泌学会学術総会 2012年4月19～21日 名古屋
- 14) 菅原 明, 大和田直樹, 伊藤貞嘉: シタグリプチン50mg からビルダグリプチン100mg への変更が有効であった1症例. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012年5月17～19日 横浜
- 15) 伊藤貴子, 松田 謙, 宇留野晃, 清水恭子, 吉川雄朗, 工藤正孝, 箱田明子, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 高血糖刺激はヒト副腎H295R細胞におけるアルドステロン合成酵素遺伝子の発現を増強する. 第35回日本高血圧学会総会 2012年9月20～22日 名古屋
- 16) 工藤正孝, 松田 謙, 伊藤貴子, 宇留野晃, 清水恭子, 吉川雄朗, 箱田明子, 伊藤貞嘉, 菅原 明: ニコチンがヒト冠動脈血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響ならびにそれに対するACE阻害薬・ARBの効果. 第35回日本高血圧学会総会 2012年9月20～22日 名古屋
- 17) 伊藤貴子, 松田 謙, 宇留野晃, 佐藤郁子, 清水恭子, 壺岐裕子, 吉川雄朗, 工藤正孝, 箱田明子, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 高血糖刺激はアルドステロン合成酵素遺伝子(CYP11B2)の発現を増強する. 第16回日本内分泌病理学会学術総会 2012年10月12日 仙台
- 18) 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, 佐藤郁子, 壺岐裕子, 工藤正孝, 影近弘之, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 種々のRXRアゴニストがAtT20細胞増殖・アポトーシス・POMC発現・ACTH分泌に及ぼす影響. 第16回日本内分泌病理学会学術総会 2012年10月12日 仙台
- 19) 小暮直敬, 伊藤貴子, 菅原香織, 皆川敬治, 松田 謙, 宇留野晃, 佐藤郁子, 清水恭子, 壺岐裕子, 吉川雄朗, 工藤正孝, 箱田明子, 伊藤貞嘉, 菅原 明: 高血糖刺激によるアルドステロン合成酵素遺伝子(CYP11B2)の発現増強機構. 第25回日本内分泌学会東北地方会 2012年11月17日 秋田
- 20) 皆川敬治, 箱田明子, 小暮直敬, 菅原香織, 宇留野晃, 清水恭子, 伊藤貴子, 吉川雄朗, 藤原幾磨, 松田 謙, 佐藤郁子, 壺岐裕子, 工藤正孝, 伊藤貞嘉, 菅原明: 種々のRXRアゴニストは, AtT20細胞の増殖・アポトーシス・POMC発現・ACTH分泌に異なる影響を及ぼす. 第25回日本内分泌学会東北地方会 2012年11月17日 秋田
- 21) 菅原 明, 大和田直樹, 伊藤貞嘉: インスリン療法にシタグリプチン追加投与が奏功したステロイド糖尿病の一症例. 第50回日本糖尿病学会東北地方会 2012年11月10日 仙台

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特記事項なし

##### 2. 実用新案登録

特記事項なし

##### 3. その他

特記事項なし

図1. deletion mutantを用いた*Pomc* promoter解析

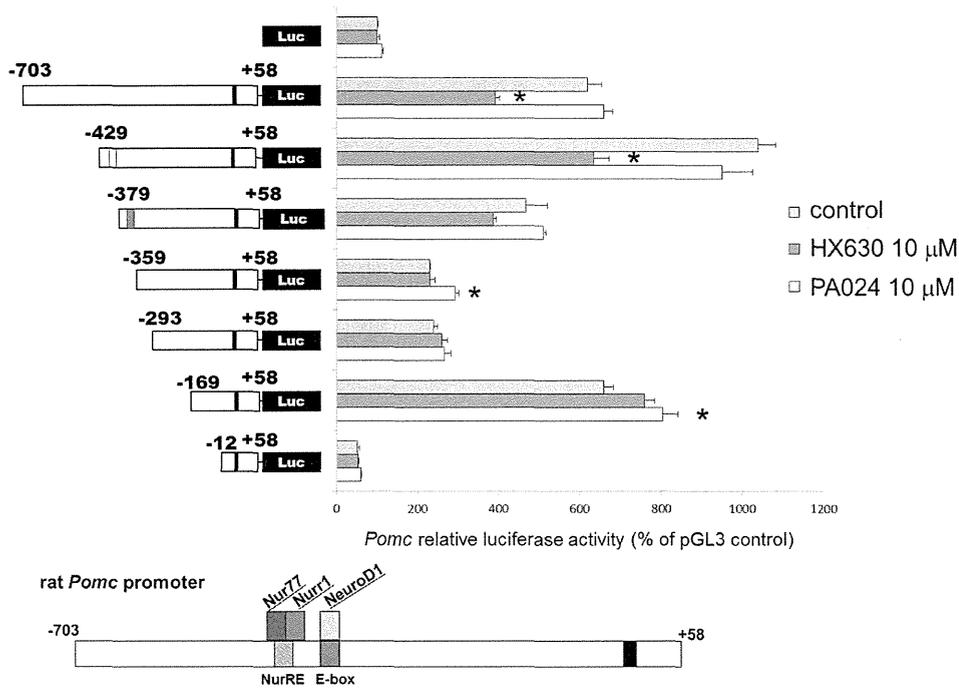


図2. Nurr1/Nur77とNeuroD1の*Pomc* promoter領域に対する結合能

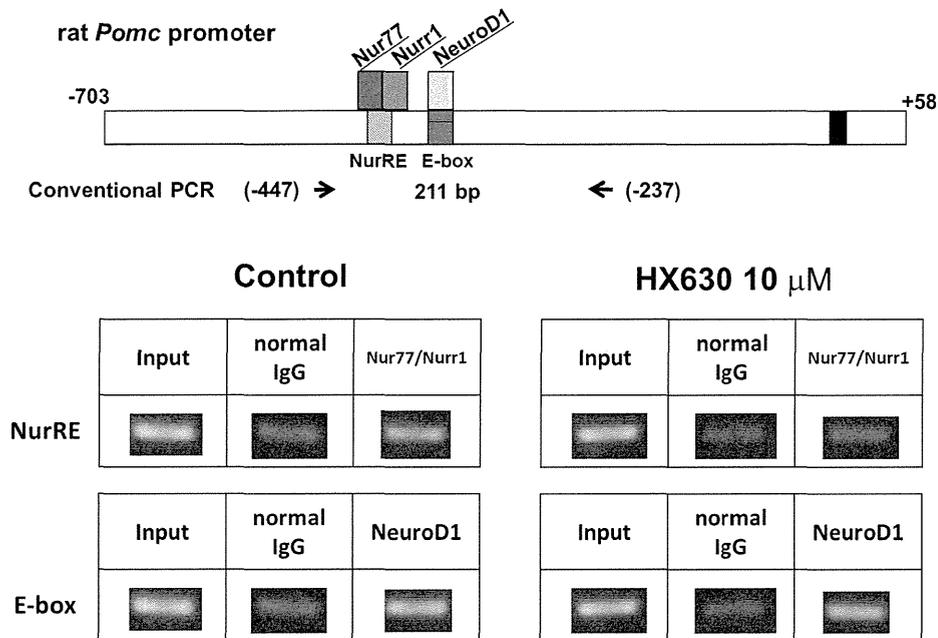
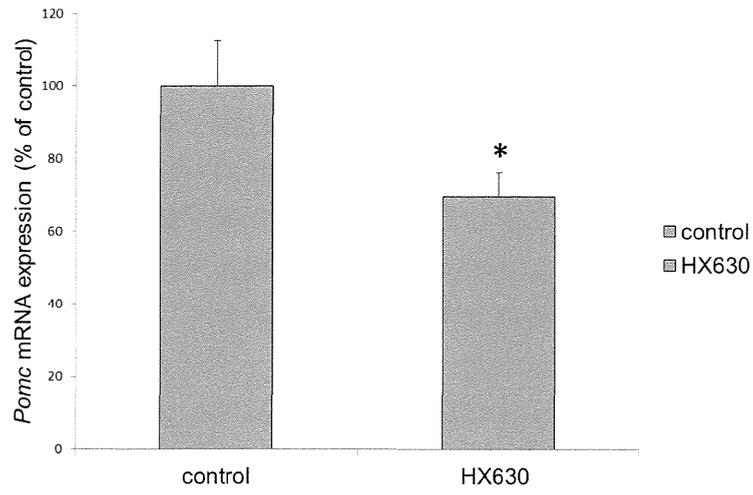


図3. AtT20細胞腫瘍における*Pomc* mRNA発現変化



## 下垂体 ACTH 産生腺腫細胞における転写因子 Hif1 $\alpha$ および NFAT の役割

研究分担者	岩崎 泰正	高知大学保健管理センター
研究協力者	西山 充	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	田口 崇文	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	次田 誠	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	中山 修一	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	高尾 俊弘	高知大学医学部地域看護学

**研究要旨：**ACTH産生下垂体腺腫ではPOMC遺伝子の恒常的な発現を認めるが、その機序の詳細は明らかでない。本年度の研究で私どもは、転写因子Hif1およびNFATが果たす役割を検討し、以下の結果を得た。1) RatおよびhumanのPOMC遺伝子転写調節領域に hypoxia-response element (HRE) およびNFAT結合配列が存在した。2) マウスAtT20細胞において内因性 Hif1  $\alpha$ /Arnt, NFATの mRNA 発現を認めた。3) Hif1 $\alpha$ /Arntは用量依存性にPOMC遺伝子の転写活性を最大120倍と劇的に増強した。4) 同様の条件でNFATも用量依存性に有意な増強効果(約9倍)を示した。5) Hif1阻害剤ないしNFAT/calcineurin阻害剤(cyclosporine A, FK506)は、POMC遺伝子の基礎転写活性を有意に抑制した。下垂体前葉は血液供給が少なく虚血に陥りやすい組織であること、また腫瘍化に伴い自律的な脱分極が生じることから、低酸素ないし電氣的興奮に起因してHif1ないしNFATが活性化され、これがPOMC遺伝子の恒常的な発現に関与している可能性が推察される。またNFAT阻害剤ないしHif1阻害剤が、ACTH産生腺腫の治療薬として有効である可能性がある。

### A. 研究目的

Cushing病の原因であるACTH産生下垂体腺腫では、高コルチゾール血症の存在下にもかかわらずACTHをコードする proopiomelanocortin (POMC) 遺伝子発現が恒常的に活性化され、結果的にACTHの持続的な過剰分泌が生じる。しかし腺腫細胞においてPOMC遺伝子の持続的な発現が維持される機序の詳細は明らかでない。恒常的発現に直接関与する転写因子が明らかとなれば、それを分子標的とした薬物療法を開発する端緒となる可能性がある。

下垂体は視床下部由来の下垂体門脈から

血液の供給を受けており、比較的虚血・低酸素状態にある組織である。また正常では、ACTH産生細胞はCRHやバゾプレシンなどの刺激時に細胞内Ca<sup>++</sup>が上昇する興奮性細胞であるが、細胞の腫瘍化に伴い持続的な脱分極が生じることが知られている。

そこで、本年度の研究において私どもは、虚血・低酸素により活性化される転写因子 Hypoxia-inducible factor-1 (Hif1)、ならび細胞内Ca<sup>++</sup>濃度の上昇で活性化される転写因子 Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) に焦点を当て、両転写因子のPOMC遺伝子発現への関与を、AtT20細胞を用いた *in*

*vitro* の系で解析した。

## B. 研究方法

研究対象として、マウス ACTH 産生下垂体腫瘍由来 AtT20 細胞を用いた。私どもは従来の研究において、ラット POMC 遺伝子 5'-転写調節領域約 1kb とレポーター遺伝子との結合プラスミドを作成し、AtT20 細胞に一過性に導入して転写活性の変動を解析する実験系を既に確立している。今回はこの系を用いて、恒常活性型 NFAT、ないし Hif1  $\alpha$ /Arnt の共発現が POMC の遺伝子発現に及ぼす効果を、POMC 遺伝子の転写活性を指標として評価した。また POMC 遺伝子の基礎転写活性に対する calcineurin/NFAT 阻害剤 [cyclosporin A (CyA), FK506]、または Hif1 阻害剤 (acriflavin) の影響を、上記と同様の一過性遺伝子導入法を用いた系で解析した。AtT20 細胞における内因性 NFAT および Hif1/Arnt mRNA の発現は、RT-PCR 法により評価した。

## C. 研究結果

1. AtT20 細胞において、NFAT の全ての isoform (NFAT C1,C2,C3,C4) および Hif1 $\alpha$ , Arnt mRNA の内因性発現を認めた (結果省略)。2. Rat POMC 遺伝子プロモーター上に、複数の hypoxia-response element (HRE) および NFAT 結合コンセンサス配列 (NFAT-RE) を認めた。3. Hif1  $\alpha$ /Arnt の共発現は、POMC 遺伝子の転写活性を用量依存的、かつ劇的 (最大で約 120 倍) に増強した (図 1)。この効果は、対照として用いた RSV promoter では認められなかった。4. Hif1 阻害剤 acriflavine は、POMC 遺伝子の基礎転写活性を時間依存性に抑制した (図 2)。すなわち 24 時間で約 50%、48 時間で約 70% の抑制効果が認め

られた。対照として用いた RSV プロモーターの活性に対しては影響を及ぼさなかった。5. NFAT の共発現は、POMC 遺伝子の転写活性を用量依存性に誘導し、最大で 8 倍以上の増加が認められた (図 3)。この効果は、対照として用いた RSV プロモーターでは認められなかった。6. Calcineurin/NFAT 阻害効果を有する CyA および FK506 は、時間依存性に POMC 遺伝子の基礎転写活性を抑制した (図 4)。その効果は CyA で最大 40%、FK506 ではさらに強力で最大 90% の抑制効果が認められた。両薬剤とも、対照として用いた RSV プロモーターの活性に対しては影響を及ぼさなかった。

## D. 考察

私どもは、Cushing 病の原因である下垂体 ACTH 産生腺腫に対する内科的治療法を開発する目的で、従来から種々の検討を行ってきた。すなわち、細胞の腫瘍化の際に活性化される転写因子 Nuclear Factor  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) が POMC 遺伝子の転写を促進することを明らかにし、その阻害剤である parthenolide や DHEA, E3330 が抑制効果を発揮することを *in vitro*, *in vivo* の系で確認した。しかし前二者の効果は比較的軽度で、高濃度の併用治療を必要とした。逆に E3330 は抗癌剤として開発された薬剤のため、正常細胞に対する副作用が危惧された。実際、NF- $\kappa$ B は全身に発現し、正常組織でも種々の生体制御に関与しているため、下垂体特異的な効果を期待することは困難であると考えられた。

そこで今回私どもは、下垂体腺腫の腫瘍細胞としての特性を考慮し、より特異的な転写因子を標的とした薬物療法の開発を試みた。その 1 つとして、虚血・低酸素で活性化される Hif1 に注目した。下垂体前葉は視床下部

由来の下垂体門脈系から血液が供給されるため血流供給が比較的乏しい臓器であり、特に腺腫組織で、しばしば虚血による出血性梗塞(下垂体卒中)を来すことは良く知られている。そこで低酸素で活性化される転写因子Hif1 $\alpha$ およびそのheterodimerのパートナーであるArntを共発現したところ、POMCの転写活性は著明(>100倍)に増強された。またHif1の特異的阻害剤であるacriflavineはPOMC遺伝子の基礎発現を強力に抑制した。以上の結果は、ACTH産生下垂体腺腫細胞において、Hif1の阻害がPOMC/ACTHの発現抑制に有効である可能性を示唆している。しかしHif1はエリスロポエチンの発現誘導を介して造血機能の維持に重要な役割を果たしていることを考慮すると、その阻害は、貧血などの副作用を招来する可能性が推察される。

一方、Cushing病のACTH産生腺腫や先端巨大症のGH産生腺腫では、細胞の腫瘍化に伴い、CRHやGRHによる刺激のない状態でも細胞の自発的な電氣的興奮と脱分極が生じ、細胞内Ca<sup>++</sup>の上昇を来すことが明らかにされている。そこで2つ目の分子標的として、Ca/calmodulin/calcineurinにより活性化される転写因子NFATの役割を検討した。その結果、恒常活性化型NFATの共発現はPOMCの転写に促進的に作用し、逆にcalcineurin阻害剤であるCyAやFK506は強力な抑制効果を発揮した。周知の如く、両薬剤とも免疫抑制剤として臨床の現場で、自己免疫疾患や各種炎症性疾患に幅広く使用されている。従って、これらの薬剤ないし他のNFAT阻害作用を有する薬剤は、自律性興奮に起因するホルモン過剰分泌を呈する疾患、特にCushing病の内科的治療薬として有効である可能性が示唆される。

先端巨大症やプロラクチノーマの内科的治療が普及しつつある中で、Cushing病の薬物療法には、未だ確立されたものはない。ソマトスタチン5型受容体を標的としたSOM230の効果が期待されているが、本邦ではまだ治験が緒に着いたばかりである。ACTH産生下垂体腫瘍細胞におけるPOMC遺伝子持続的発現の分子機序を解明することにより、今回検討した2つの転写因子を含む、特定の分子標的に作用する薬剤の開発に向けた努力が必要と考えられる。

## E. 結論

今回の我々の検討により、虚血・低酸素で活性化される転写因子Hif1、および細胞興奮時の細胞内Ca<sup>++</sup>上昇で活性化される転写因子NFATがPOMC遺伝子の転写を強力に誘導すること、また各々の転写因子に対する特異的な阻害剤が、POMC遺伝子の発現を強力に抑制することを明らかにした。特にNFATに関しては、calcineurin/NFAT系の阻害剤であるCyAやFK506が既に免疫抑制剤として臨床の現場で使用されていることを考慮すると、関連する薬剤が、難治性Cushing病や異所性ACTH症候群に対する新たな薬物療法として有効性を発揮する可能性がある。今後、*in vivo*の疾患モデルを用いた検証が必要と考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表・著書

- 1) 岩崎泰正, 先端巨大症. 山口 徹/北原光夫/福井次矢編, 今日の治療指針, 医学書院, p664-665, 2012年.

- 2) 岩崎泰正. 機能検査総論. 成瀬光栄, 平田結喜緒 編. 内分泌代謝専門医ガイドブック. 診断と治療社. p48-49. 2012年.
- 3) 岩崎泰正. 下垂体後葉疾患. 中枢性尿崩症. 代謝・内分泌疾患診療最新ガイドライン. 総合医学社. P194-198. 2012年.
- 4) 次田 誠, 岩崎泰正. サルコイドーシスと腎障害. 日本臨床 別冊 新領域別症候群シリーズ. 腎臓症候群(第2版)下—その他の腎臓疾患を含めて—. p739-743, 2012年.
- 5) 岩崎泰正. 栄枯盛衰. 巻頭言. 腎と透析. 72: 281-282, 2012.
- 6) 岩崎泰正. 腎性・中枢性尿崩症の病態と治療. 特集: 水代謝の基礎と機能障害. 腎と透析. 73: 69-72, 2012.
- 7) 岩崎泰正. 血漿バソプレシンおよびコペプチンの測定. Fluid Management Lunaissance 2: 380-383, 2012.
- 8) 岩崎泰正. 中枢性尿崩症に関する最近の動向. 特集: 下垂体後葉ホルモンの最前線. ホルモンと臨床 59: 457-462, 2012.
- 9) 山形 聡, 蔭山和則, 秋元加奈子, 岩崎泰正, 須田俊宏. 視床下部細胞におけるレプチンによるCRF family peptides遺伝子発現調節について. ACTH RELATED PEPTIDES 23: 5-7; 2012.
- 10) 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)アゴニストは, AtT20細胞の増殖・アポトーシス・POMC発現・ACTH分泌に異なる影響を及ぼす. ACTH RELATED PEPTIDES 23: 15-16; 2012.
- 11) 西山 充, 岩崎泰正, 西岡達矢, 橋本浩三. 副腎不全診断におけるCRH負荷試験の有用性. ACTH RELATED PEPTIDES 23: 83-84; 2012.
- 12) Otsuka F, Tsukamoto N, Miyoshi T, Iwasaki Y, Makino H. BMP action in the pituitary: Its possible role in modulating somatostatin sensitivity in pituitary tumor cells. Mol Cell Endocrinol 349: 105-110, 2012.
- 13) Li P, Zhao Y, Wu X, Xia M, Fang M, Iwasaki Y, Sha J, Chen Q, Xu Y, Shen A. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) disrupts energy expenditure and metabolic homeostasis by suppressing SIRT1 transcription. Nucleic Acids Res 40: 1609-1620, 2012.
- 14) Zhao LF, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Okazaki M, Nakayama S, Kambayashi M, Fujimoto S, Hashimoto K, Murao K, Terada Y. Liver X Receptor  $\alpha$  Is Involved in the Transcriptional Regulation of the 6-Phosphofructo-2-Kinase/ Fructose-2,6-Bisphosphatase Gene. Diabetes 61: 1062-1071, 2012.
- 15) Amano E, Nishiyama M, Iwasaki Y, Matsushima S, Oguri H, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S, Inoshita N, Fukaya T, Terada Y. Remarkable Cystic Expansion of Microprolactinoma Causing Diabetes Insipidus during Pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 97: 2575-2576, 2012.

## 2. 学会発表

### 《教育講演》

- 1) 岩崎泰正. Cushing 病の病態と診断. 第85回日本内分泌学会学術総会. 2012年4月19-21日. 名古屋市

### 《シンポジウム》

- 1) 岩崎泰正. 下垂体・副腎系のパラダイムシフト. シンポジウム 16. 下垂体前葉研

究の最近の進歩. 第85回日本内分泌学会  
学術総会. 2012年4月19-21日. 名古屋市.  
《一般演題》

- 1) Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Okazaki M, Nakayama S, Ema H, Terada Y, Kambayashi M, Kawamura K. Role of Ca-dependent transcription factor NFAT in the regulation of CYP11B2 gene. The 15th International Congress on Hormonal steroids and Hormones & cancer. 2012, November 15-17, Kanazawa, Japan
- 2) Kanako Ogura-Ochi, Fumio Otsuka, Naoko Tsukamoto, Tomoko Miyoshi, Eri Nakamura, Masaya Takeda, Kenichi Inagaki, Toshio Ogura, Yasumasa Iwasaki, Hirofumi Makino. Regulatory Role of Melatonin and BMP-4 in Prolactin Secretion by Rat Pituitary Lactotrope Cells. The 94th Annual Meeting of the Endocrine Society. 2012, June 23-26. Houston, USA.
- 3) Saito-Hakoda A, Uruno A, Shimizu K, Kudo K, Saito-Ito T, Yoshikawa T, Matsuda K, Fujiwara I, Kagechika H, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A. Retinoid X Receptor Agonists Differentially Affect Proliferation,

Apoptosis, and ACTH Secretion/POMC Gene Expression in AtT20 Corticotroph Cells. The 94th Annual Meeting of the Endocrine Society. 2012, June 23-26. Houston, USA.

- 4) 岩崎泰正, 西山 充, 田口崇文, 次田誠, 中山修一, 岡崎瑞穂, 寺田典生, 神林真知子, 山口秀樹, 中里雅光, 川村和夫. 摂食促進ペプチドNERPをコードするVGF遺伝子の転写におけるPKA/CREB系とCa/CaMK系の役割. 第85回日本内分泌学会学術総会. 2012年4月19-21日. 名古屋市.
- 5) 岩崎泰正, 西山 充, 田口崇文, 次田誠, 岡崎瑞穂, 中山修一, 江間宏樹, 寺田典生, 菅原 明, 蔭山和則, 沖 隆, 神林真知子, 川村和夫. 下垂体 ACTH 産生腺腫細胞における転写因子Hypoxia-inducible factor 1 および NFAT の役割. 第39回日本神経内分泌学会学術集会. 2012年9月28-29日. 北九州市.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. AtT20細胞において、転写因子 Hif1  $\alpha$ /Arnt の共発現が POMC 遺伝子転写活性に及ぼす効果

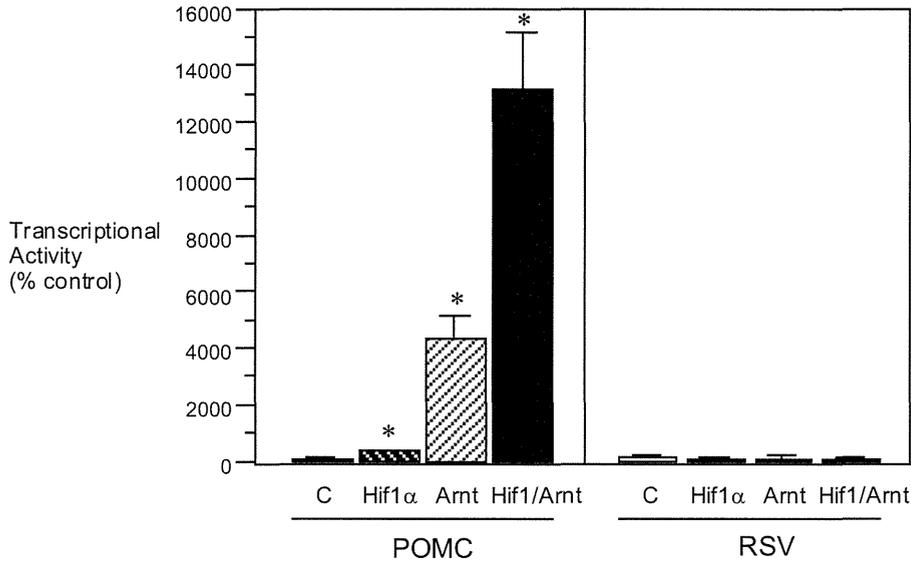


図2. AtT20細胞において、Hif1阻害剤(acriflavine)がPOMC遺伝子転写活性に及ぼす効果

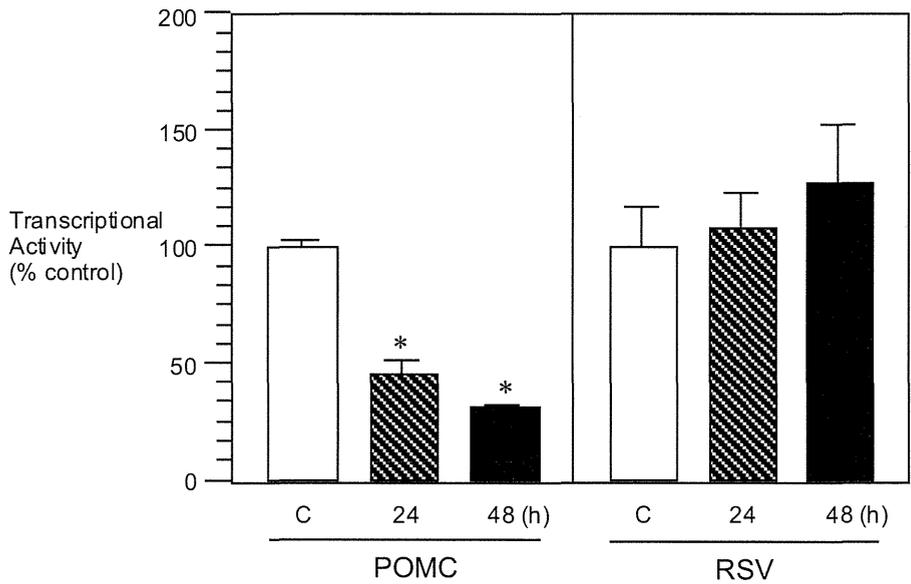


図3. AtT20細胞において、転写因子NFATの共発現がPOMC遺伝子転写活性に及ぼす効果

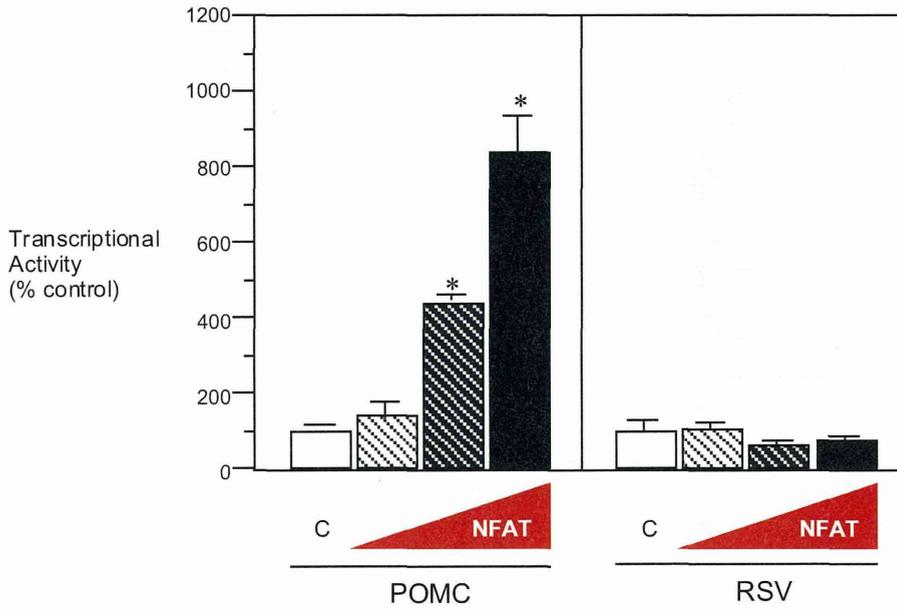
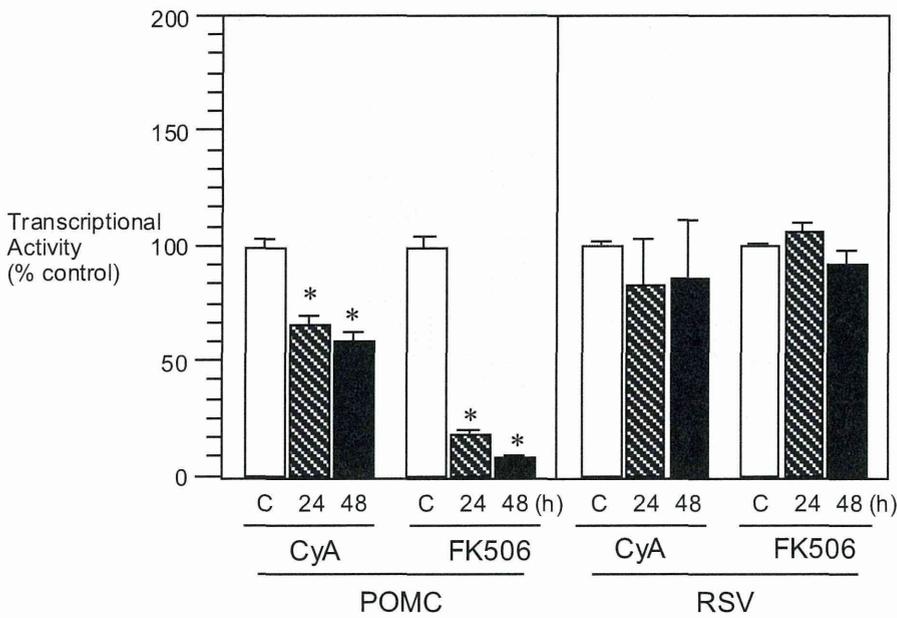


図4. AtT20細胞において、NFAT阻害剤[Cyclosporin A (CyA)およびFK506]がPOMC遺伝子転写活性に及ぼす効果



## メラノコルチン2受容体欠損マウスにおける 下垂体遺伝子発現の検討

研究分担者 清水 力 北海道大学病院検査・輸血部  
研究協力者 亀田 啓 北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学

**研究要旨：**副腎不全状態における下垂体の遺伝子発現の変化について検討することを目的として、メラノコルチン2受容体欠損(MC2RKO)マウスを用いて検討した。18週齢のMC2RKOマウスを用いて下垂体における遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法で検討したところ、ニューロメジンB(NMB)の発現が上昇していた。コルチコステロン徐放性ペレットを皮下投与して3週間後に下垂体における遺伝子発現をリアルタイムPCR法で検討したところ、NMBの発現はコルチコステロン投与後に低下していた。NMBとHPA軸の関連を検討するために下垂体癌細胞株であるAtT-20/D16v-F2にCRHとdexamethasoneを投与してNMBの発現の変化を検討したが、有意な発現の変化を認めなかった。NMBとPOMCがグルココルチコイド投与により同様の挙動を示したことからNMBとACTH、HPA軸の関連が示唆された。今後、免疫染色などの検討を追加していく予定である。

### A. 研究目的

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)は副腎におけるステロイド合成を刺激するが、その受容体であるメラノコルチン2受容体(MC2R)は副腎以外の臓器にも発現が報告されている。MC2Rの変異はACTH不応症の原因となり、生下時からの副腎皮質機能不全を呈する。副腎から分泌されるグルココルチコイドの諸臓器における作用については未解明な点が多く、副腎不全の状態における副腎以外の臓器における変化についても同様に不明な点が多く残されている。当科ではマウスMC2Rのクローニングおよび構造の解析を行い、ノックアウトマウスを共同で作成してACTHの機能について検討をこれまで行っているが、今回は副腎不全状態における全身臓器の変化、特に下垂体の遺伝子発現の変化について検討した。

### B. 研究方法

#### 《動物》

本研究はMC2RKOマウスならびにそのlittermateであるMC2R+/+(野生型)マウスを用いた。MC2RKOマウスは副腎皮質束状層の著明な萎縮を示し、生下時より慢性的な副腎不全状態にあるマウスである。血漿のコルチコステロンは感度以下であり、血漿ACTHは野生型のlittermateと比較して著明に高値を示す。また絶食負荷により容易に低血糖を呈するという表現型を示す(Chida D, Shimizu C, et al. PNAS. 2007 104:18205-18210)。

#### 《実験1》

18週齢のMC2Rノックアウト(MC2RKO)マウス5匹と野生型(WT)マウス5匹を午前中に麻酔下にと殺して下垂体ならびに諸臓器を採取しRNAを抽出した。RNAはキットを

用いて抽出し (RNeasy Mini Kit, Invitrogen)、下垂体由来の RNA を用い、DNA マイクロアレイ法 (GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array, Affimetrix) で遺伝子発現を解析した。有意な発現の変化を認めた遺伝子について、リアルタイム PCR 法 (7500 fast realtime PCR system, Applied Biosystems) によって遺伝子発現を検証した。リアルタイム PCR 法での遺伝子発現は  $\beta$  アクチンを内在性コントロールとして  $\Delta \Delta$  Ct 法を用いて相対的に定量評価した。また麻酔下に MC2RKO マウスならびに WT マウスを 4% paraformaldehyde を用いて灌流固定し、下垂体を採取し抗 ACTH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を 1:50 の濃度で 1 次抗体として用い、ACTH 陽性細胞を染色した。

#### 《実験 2》

18 週齢の MC2RKO マウス 6 匹と WT マウス 6 匹を用い、コルチコステロン徐放性ペレット (10mg、21 日間、Innovative Research of America) ならびにプラセボペレットを皮下投与し、3 週間後に午前中に麻酔下にと殺して血漿ならびに下垂体と視床下部から RNA を採取した。コルチコステロン徐放性ペレット群は MC2RKO マウスと WT マウス各 3 匹ずつ、プラセボペレット群も同様に各 3 匹ずつと振り分けた。血漿の ACTH 測定 (Roche Diagnostics) ならびにコルチコステロン測定を行い、また下垂体と視床下部の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析した。リアルタイム PCR 法での遺伝子発現は  $\beta$  アクチンを内在性コントロールとして  $\Delta \Delta$  Ct 法を用いて相対的に定量評価した。

#### 《実験 3》

マウス下垂体癌由来細胞株であり、また

ACTH 産生細胞株である AtT-20/D16v-F2 (ATCC) を 10% のウシ胎児血清と 1% の抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養し、 $2.0 \times 10^5$  個/ウェルごとにプレートに播種した。播種した AtT-20/D16v-F2 に CRH (Peptide institute) ならびに Dexamethasone (DEX) (Wako Pure Chemical Industries) を 10-9M から 10-5M の濃度で投与し 0、2、6 時間後に RNA を採取し遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR 法を用いて溶媒のみを投与した群と比較検討した。リアルタイム PCR 法での遺伝子発現は  $\beta$  アクチンを内在性コントロールとして  $\Delta \Delta$  Ct 法を用いて相対的に定量評価した。

#### (倫理面への配慮)

実験動物を用いた実験は全て当施設における倫理基準に基づき、動物への苦痛を最小限にとどめるよう配慮し施行した。

### C. 研究結果

#### 《実験 1》

DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析の結果、MC2RKO マウス下垂体において、WT マウスと比較してニューロメジン B (NMB) が 12.8 倍と高い発現増加を認めた。その他に lymphocyte antigen 6 complex locus G6C が 12.5 倍、ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5 が 5.5 倍、solute carrier family 6 member 14 が 4.9 倍、immunoglobulin kappa chain variable 1 が 4.4 倍、gastrin releasing peptide が 4.4 倍と高い発現を示した (表 1)。リアルタイム PCR 法で下垂体における NMB の発現を検討したところ、MC2RKO マウスでは WT マウスと比較して 28.8 倍の遺伝子発現増

加を認めた。下垂体以外の臓器(視床下部、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、皮膚、筋肉、精巣)ではNMBの有意な発現増加は認めなかった。抗ACTH抗体を用いた免疫染色の結果、MC2RKOマウス下垂体ではWTマウスと比較してACTH陽性細胞が有意に多く認められた(図1)。

#### 《実験2》

血漿ACTHはMC2RKOマウスのプラセボペレット群で $1390.0 \pm 42.4$  pg/mL、コルチコステロンペレット群で感度以下、WTマウスのプラセボペレット群で $85.9 \pm 7.8$  pg/mL、コルチコステロンペレット群で $5.1 \pm 1.5$  pg/mLとMC2RKOマウスのプラセボペレット群では血漿ACTHの著明な上昇を認めたが、コルチコステロンペレット群では血漿ACTHは抑制された。血漿コルチコステロンはMC2RKOマウスのプラセボペレット群で感度以下、コルチコステロンペレット群で $258.0 \pm 96.0$  ng/mL、WTマウスのプラセボペレット群で $136.6 \pm 149.9$  pg/mL、コルチコステロンペレット群で $217.8 \pm 77.8$  pg/mLであり、コルチコステロン補充量は十分と考えられた。下垂体におけるNMBの遺伝子発現はWTマウスのプラセボペレット群を1とするとWTマウスのコルチコステロンペレット群で1.0倍、MC2RKOマウスのプラセボペレット群で37.4倍、コルチコステロンペレット群で2.1倍であった。下垂体におけるプロオピオメラノコルチン(POMC)の遺伝子発現量はWTマウスのプラセボペレット群を1とするとWTマウスのコルチコステロンペレット群で1.56倍、MC2RKOマウスのプラセボペレット群で13.5倍、コルチコステロンペレット群で2.1倍であった。視床下部におけるコルチコトロピン放出ホルモン(CRH)の

遺伝子発現量はWTマウスのプラセボペレット群を1とするとWTマウスのコルチコステロンペレット群で1.5倍、MC2RKOマウスのプラセボペレット群で6.6倍、コルチコステロンペレット群で1.9倍であり、下垂体におけるNMB、POMCの遺伝子発現量ならびに視床下部におけるCRHの遺伝子発現量は共にMC2RKOマウスのプラセボ群で増加しており、コルチコステロンペレットの投与によってWTマウスと同程度に低下していた。

#### 《実験3》

CRHの投与後2時間あるいは6時間においてPOMCの遺伝子発現量は濃度を問わず2.0から2.2倍に増加したが、NMBの遺伝子発現量は有意な変化を認めなかった(図2)。DEXの投与後2時間あるいは6時間後においてPOMCの遺伝子発現量は濃度を問わず0時間を1とすると0.5から0.7倍に低下したが、NMBの遺伝子発現量は有意な変化を認めなかった(図3)。

#### D. 考察

MC2RKOマウス下垂体においてNMBの遺伝子発現が増加していたが、グルココルチコイドを補充したことによりNMBの発現は低下した。グルココルチコイドの補充により下垂体のPOMCならびに視床下部のCRHも同様の変化を示すことから、CRHやACTHといった視床下部下垂体副腎(HPA)軸とNMBの関連が示唆された。

NMBはボンベシン様ペプチドに属するペプチドで、中枢神経系や消化管に広く分布していることが知られている。平滑筋の収縮、体温調節、情動行動の制御などの様々な作用を有するが、肺非小細胞癌ではautocrineあるいはparacrineを介して細胞増殖に関与してい

ることが報告されている。ラットにおいては下垂体に多く存在していることが報告されており、また副腎摘除マウスでも下垂体において遺伝子発現が増加しており副腎不全との関連が示唆されているが、これまでにHPA軸との関連を論じた報告はない。

下垂体におけるNMBの発現細胞については甲状腺刺激ホルモン産生細胞での発現が報告されているが、MC2RKOマウスでは下垂体でACTH陽性細胞が増加しているという結果も踏まえ、HPA軸との関連を検討する目的でACTH産生細胞を用いて細胞実験を行った。細胞実験ではCRHやDEXの投与でNMBは変化しなかった。NMBの発現についてはCRHやDEX以外の因子によって制御されている可能性も考えられるが、腫瘍細胞を用いた検討であったためNMBの発現が生体とは違う動態を示した可能性も考えられる。今後、下垂体におけるNMBの発現細胞を明らかにする目的で、抗NMB抗体ならびに抗ACTH抗体等下垂体前葉ホルモンに対する抗体を用いた免疫多重染色による発現の検討を行う予定である。また、成長ホルモン産生細胞や甲状腺刺激ホルモン産生細胞の細胞株を用いて同様の刺激実験も行う予定である。

## E. 結論

MC2RKOマウスを用いた検討により、NMBが副腎不全の状態下における下垂体において発現亢進していることが示された。NMBの高発現はグルココルチコイドの投与によって抑制され、HPA軸とNMBの関連が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakurai T, Ichikawa A, Furukawa H, Wada N, Nagasaka A, Takahashi Y, Fujikawa M, Ikuta A, Furumaki H, Shiga M, Shimizu C, Hui SP, Jin S, Takeda S, Fuda H, Nagasaka H, Kobayashi S, Chiba H. Novel monoclonal antibody recognizing triglyceride-rich oxidized LDLs associated with severe liver disease and small oxidized LDLs in normal subjects. *Annals of Clinical Biochemistry* 2012; 49: 456-62.
- 2) Shigemura M, Konno S, Nasuhara Y, Shimizu C, Matsuno K, Nishimura M. Impact of Asthmatic Control Status on Serum Cystatin C Concentrations. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 1367-71.
- 3) Matsukawa T, Shigematsu A, Hayasaka K, Fujisawa S, Asanuma S, Yasumoto A, Goto H, Takahata M, Endo T, Tanaka J, Hashino S, Shimizu C, Imamura M. Chimerism analyses by sex-chromosome analysis confused relapse with donor cell leukemia after sex-mismatched allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47: 1583-1584.
- 4) Shigemura M, Nasuhara Y, Konno S, Shimizu C, Matsuno K, Yamaguchi E, Nishimura M. Effects of Molecular Structural Variants on Serum Krebs von den Lungen-6 Levels in Sarcoidosis. *J Transl Med*. 2012; 10: 111.
- 5) Hattori T, Konno S, Shigemura M, Matsuno K, Shimizu C, Shigehara K, Shijubo N, Hizawa N, Yamaguchi E, Nishimura M. Total serum IgE levels and atopic status in patients with sarcoidosis. *Allergy Asthma Proc*. 2012; 33: 90-4.