

エストロゲン長期投与により誘発された 多ホルモン産生増殖性病変の分子病理学的解析

研究分担者 竹腰 進 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学

研究要旨：我々はエストロゲン(E2)を長期間投与したラット下垂体において多ホルモン産生性の増殖性病変が生じることを報告し、これがヒトの多ホルモン産生性下垂体腺腫の病態解析モデルとして有用であることを示した。本年度は、この多ホルモン産生腫瘍性結節の再現性の検討とともに、多ホルモン産生に至る機序について分子病理学的解析を行った。雌SDラットにエストラジオールデポ剤を10 mg/kg/2weekの用量で22週間以上投与した後、下垂体を採取し解析を行った。11例中10例においてゴナドトロフ細胞と類似する大型の好酸性細胞からなる増殖性病変が限局性及び多巣状性に認められた。この増殖性病変ではPRL, TSH β 及び α SUが免疫染色陽性であり、GH, LH β , ACTH及びS-100が陰性であった。一方、多能性維持に関わる転写因子であるSOX2の発現を検討したところ、E2投与後、経時的にSOX2の発現が減少することが判明した。特に、多ホルモン産生性病変が生じる22週以上の投与した下垂体では発現が減少していることが判明した。以上の結果から、多ホルモン産生増殖性病変の誘発にはSOX2が重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

ヒト下垂体腺腫は臨床的あるいは形態学的特徴により機能性腺腫と非機能性腺腫に分けられる。前者にはGH産生腺腫(GHoma)、PRL産生腺腫(PRLoma)、TSH産生腺腫(TSHoma)、ACTH産生腺腫(ACTHoma)、FSH産生腺腫(FSHoma)が含まれる。非機能性腺腫は臨床的症状を示さないが、高頻度で α サブユニット(α SU)、FSH β SU、LH β SUなどのゴナドトロピンホルモンのサブユニットが免疫組織化学陽性であることから、現在ではほとんどの非機能性腺腫がゴナドトロピン産生腺腫(LH/FSH)として分類されている。これらの下垂体腺腫症例の殆どは単ホルモン産生性であるが、一部の下垂体腺腫の症例では、複数のホルモンを産生する多ホルモン産生性の特徴を有するものがあることが知られている。ACTHomaでのGH産生、FSHoma

でのGH/ACTH産生といった細胞系譜を超えるホルモン産生は、Pit-1あるいはNeuroD1などのホルモン発現を制御する転写因子のaberrantな発現が主な原因であると考えられている。一方、Carney complexの原因遺伝子である*Prkar1 α* のノックアウトマウスではGHoma、PRLoma、TSHomaなどのPit-1制御下のホルモンを産生する下垂体腺腫が発生すること、また、PROP1トランスジェニックマウスおよび*Prkar1 α* のノックアウトマウスにおいても同様に複数のPit-1系譜のホルモンを産生する腫瘍が生じることが判明している。さらにPituitary tumor transforming gene (PTTG)のトランスジェニックマウスではLHoma、TSHoma、GHomaが生じることが判っている。一方、本研究で用いた下垂体腺腫の実験モデルであるエストロゲン誘発PRLomaは、PRLのみを産生する腺腫として

考えられてきた。昨年度(2012年度)の本班会議において我々は雌SDラットにエストロゲン(E2)を長期間(22~36週間)投与することでエストロゲン誘発PRLomaの病変とともに、通常のPRLoma細胞とは形態的に異なる大型好酸性細胞からなる腫瘍性結節が生じることを報告した。免疫二重染色による解析の結果、この腫瘍性結節では一つの細胞で複数のホルモンを産生することが判明した。2013年度は、このE2の長期投与による多ホルモン産生性腫瘍発生の再現性を確認する実験を行い、本動物が多ホルモン産生性下垂体腺腫のモデルとなることを証明し、さらに増殖調節因子であるp27、多能性維持に働くと考えられる転写因子SOX2について免疫組織学的検討を行い多ホルモン産生に至る機序の解析を試みた。

B. 研究方法

(1) 長期エストロゲン(E2)投与による多ホルモン産生性下垂体腫瘍性結節誘発モデルの作成

雌SDラット(Crj:CD(SD)Rat,)にジプロピオン酸エストラジオール(E2)(オバホルモンドポー筋注5mg(あすか製薬))を10 mg/kgの用量で2週間に1回筋肉内注射し、4週間(N=5)、13週間(N=5)、22週間~36週間(N=11)投与しプロラクチノーマ(PRLoma)および多ホルモン産生腫瘍性結節を発生させた動物モデルを作成した。対照実験として、雌SDラット(N=5)に安息香酸ベンジルとゴマ油の混合液を上記と同様の用量及び頻度で筋肉内注射した。

(2) 病理組織学および免疫組織化学的解析

E2投与の期間が長くなるに従ってラットの全身状態が悪化する。この全身状態の悪化状態

(自発運動の低下、体温低下等)を観察し適宜切迫屠殺し、誘発された下垂体PRLomaをサンプリングし10%中性ホルマリンにて固定後、常法に従ってパラフィン切片を作成しH&E染色標本作製し病理組織学検査を実施した。また下垂体の各種ホルモンの免疫組織化学的染色として、抗PRL抗体、抗GH抗体、抗TSH β 抗体、抗 α サブユニット(α SU)抗体、抗LH β 抗体(全てNIDDK)、抗ACTH抗体(Santa Cruz)、抗S-100抗体(Dako)を用いて免疫組織化学的染色を実施した。さらに抗TSH β -PRL抗体、抗 α SU-PRL抗体、抗TSH β - α SU抗体、抗GH-PRL抗体、抗TSH β -GH抗体、抗 α SU-GH抗体の組み合わせ(6組)で酵素抗体法による免疫二重染色を実施した。また、抗p27抗体(Santa Cruz)、抗SOX2抗体(Santa Cruz)を用い免疫組織化学を施行した。さらに抗Pit-1抗体(Santa Cruz)、抗ER α 抗体(Leica Biosystems)、抗GATA-2抗体(Atlas Antibodies)、抗SF-1抗体(Perseus Proteomics)を用いた転写因子の免疫組織化学的染色も行った。

(3) 正常下垂体組織、多ホルモン産生増殖性病変、病変周辺部における各下垂体ホルモンmRNAの発現解析

正常ラット下垂体組織、PRLomaの内部に認められた大型好酸性細胞の増殖性病変および病変部周囲組織からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション装置を用いて、組織を採取し、ここからRNAを抽出した。抽出RNAを鋳型としてcDNAの作成を行った。リアルタイムPCRは、TaqMan Gene Expression Assay kit(Applied Biosystems社)のラットPRL、GH、TSH及び α SUをプローブとし、DNA Engine Opticon 2 Real-Time Cycler(BIO-RAD社)を用いて解析を行った。

C. 研究結果

(1) モデルの作成及び下垂体の病理組織学的検索

雌SDラット11例にE2を10 mg/kg/2weekの用量で22～36週間投与した後、麻酔下にてと殺し病理組織学的検討を行ったところ、11例中10例でプロラクチノーマ腫瘍内部に大型好酸性細胞から成る増殖性病変が限局性及び多巣状性に認められた(図1: E2投与26週間症例)。下垂体ホルモンの発現を検索するため、抗PRL抗体、抗GH抗体、抗TSH β 抗体、抗 α SU抗体、抗LH β 抗体、抗ACTH抗体、抗S-100抗体を用いて免疫組織化学的染色を行ったところ、大型好酸性細胞はPRL、TSH β 及び α SUに陽性を示し、GH、ACTH及びS-100には陰性であった。大型好酸性細胞におけるPRL、TSH β 及び α SUの免疫組織化学陽性像より、大型好酸性細胞がPRL、TSH β 及び α SUを共発現していることが示唆された為、各種抗体の組み合わせで酵素抗体法による免疫二重染色を実施した。その結果、大型好酸性細胞はPRLとTSH β 、PRLと α SU及びTSH β と α SUを共発現していることが確認された(表1)。さらに転写因子の発現を確認するため、抗Pit-1抗体、抗ER α 抗体、抗GATA-2抗体及び抗SF-1抗体を用いた免疫組織化学的染色を行ったところ、大型好酸性細胞の核がPit-1、ER α 及びGATA-2に陽性を示した。

(2) 正常下垂体組織、多ホルモン産生増殖性病変、病変周辺部における各下垂体ホルモンmRNAの発現解析

正常下垂体組織、PRLomaの内部に認められた大型好酸性細胞からなる増殖性病変および周辺部からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション装置を用いて組織を採取した

後、PRL、GH、TSH及び α SUのmRNA発現解析を行ったところ、大型好酸性細胞の増殖性病変(多ホルモン産生部位)は周囲の腫瘍組織と比較して、PRL、GH、TSH及び α SUのmRNAの発現が増加していた。特にTSH及び α SUについては、周囲の腫瘍組織においては殆ど発現しておらず、多ホルモン産生部位でのみ顕著な発現が認められた(図2)。また、多ホルモン産生部位におけるPRL、 α SU、TSH、GHの産生は、正常下垂体組織と比較して高いレベルであった。

(3) p27およびSOX2の免疫組織化学的解析

増殖調節因子であるp27の発現は、正常下垂体組織に比較してE2投与群(4、13、22週間)ではいずれも増加していた(図3)。また、多能性維持に働くと考えられる転写因子SOX2の発現は、E2投与後経時的に減少していた(図4、5、6)。

D. 考察

長期間E2を投与することにより多ホルモン産生性下垂体腫瘍性結節を生じるモデル動物をはじめて作出することに成功した。これまでエストロゲン誘発ラットプロラクチノーマの作出にはエストロゲン感受性の高いFisher系ラットが用いられてきた。今回、むしろ感受性の低いSD系ラットを用いることで長期間のE2投与が可能となり、多ホルモン産生性腫瘍性結節の誘発されたものと推察された。一方、系統間の形質の違いも重要な因子となること考えられる。今後、Fisher系ラット、Wistar系ラットを用いて同様の実験を行い、多ホルモン産生性腫瘍性結節が発症するのはSDラットに特有の現象であるのか否か明らかにする予定である。これまでPrkarlaのノックアウトマウス

あるいはPROP1、PTTGなどの転写因子を過剰発現するトランスジェニックマウスなど遺伝子改変動物において多ホルモン産生性の腫瘍性病変が生じることが判明している。今回、我々が作出した多ホルモン産生性の腫瘍性結節部では、同一細胞内において同時に3種類のホルモンの産生を示す特徴的な病変であった。また、PRLと α SUのように異なる細胞系譜の細胞で産生されるホルモンが、しかも同一の細胞で発現しているという特徴を有しており、下垂体ホルモンの発現の初期の制御を司るProp-1などの転写因子の発現変化が推察される。今回の実験では、E2長期投与した11例の動物のうち10例において多ホルモン産生性の腫瘍性結節が誘発されており、高い再現性を示した。今後、多ホルモン産生性下垂体腫瘍の病態解析に有用なツールとなることが期待される。レーザーマイクロダイセクションによる解析により多ホルモン産生性結節部位では免疫染色の結果と同様にPRL、TSH、 α SUのmRNAの発現が顕著に高いことが確認され、多ホルモン産生誘導は転写レベルであることが判明した。また、結節部では正常組織に比較しても上記4種類のホルモンの発現が高く、PTTGの関与が疑われた。さらに興味深いことに免疫染色では殆ど発現の認められなかったGHのmRNAが結節部位では増加していた。GHの発現誘導に重要な働きをしている転写因子であるPit-1が結節部位の殆どの細胞の核内に強い発現が認められており、結節部におけるGH mRNA増加の原因の一つとして考えられた。上記に述べたようにPrkar1a ノックアウトマウス、PROP1トランスジェニックマウスなどの遺伝子改変動物では多ホルモン産生下垂体腺腫が生じるが、その腺腫で産生される

のは、GH、PRL、TSHといった機能分化の観点からは同一の細胞系譜(GH-PRL-TSH産生系)に由来すると考えられるホルモンであるのに対し、ヒトの下垂体腺腫の中にも細胞系譜を超えたホルモン発現を示す症例が報告されており、これは転写因子発現の異常に基づくtrans-lineage differentiationと考えられている。しかし、エストロゲン誘発多ホルモン産生性結節部位ではPit-1、ER α 、SF-1の発現に大きな変化は認められずヒトの下垂体腺腫で起こっている転写因子発現に基づくtrans-lineage differentiationとは異なる分子機構が推察される。エストロゲンによりMAPキナーゼカスケード依存性にp27のdegradationが誘導されること報告されている。今回、免疫組織化学による検討ではE2投与によりp27の発現はむしろ増加傾向を示していた。今後、レーザーマイクロダイセクションにより採取した結節部位の組織を用いてp27mRNAの発現を検討する予定である。多能性維持に関与するとされるSOX2の発現が多ホルモン産生性結節部位では顕著に低下していることが判明した。これはSOX2が下垂体ホルモン産生を正に制御する因子であることを示唆する重要な知見であると考えられた。今後、細胞の初期化に関わるOkt3/4、SOX9、Klf4、c-mycなどの分子について検討する予定である。

E. 結論

長期エストロゲン投与により多ホルモン産生結節を生じる腺腫モデル動物が再現性をもって作出されることが判明した。多ホルモン産生結節の形成にSOX2が関与することが示唆された。本モデル動物は多ホルモン産生ヒト下垂体腺腫の病態解析のための有用なツールとなると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi T, Tokunaka M, Kikuti YY, Carreras J, Ogura G, Takekoshi S, Kojima M, Ando K, Hashimoto Y, Abe M, Takata K, Yoshino T, Muto A, Igarashi K, Nakamura N. Over-expression of BACH2 is related to ongoing somatic hypermutation of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Pathol Int.* 2013 Jul; 63 (7): 339-44
- 2) Imamura N, Horikoshi Y, Matsuzaki T, Toriumi K, Kitatani K, Ogura G, Masuda R, Nakamura N, Takekoshi S, Iwazaki M.

Localization of aPKC Lambda/Iota and Its Interacting Protein, Lgl2, Is Significantly Associated with Lung Adenocarcinoma Progression. *Tokai J Exp Clin Med.* 2013 Dec 20; 38 (4):146-58.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1. エストロゲン投与26週令ラット下垂体増殖性病変(H&E染色)

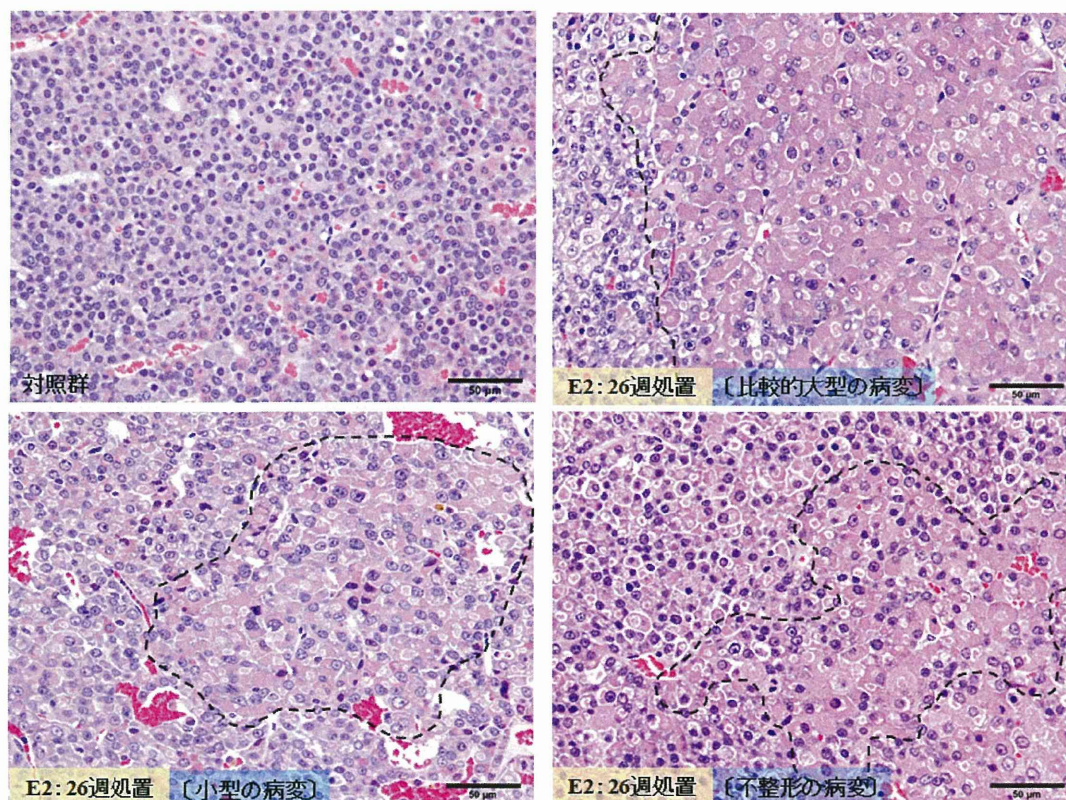


表1. 多ホルモン産生性結節部における各ホルモンの発現(免疫二重染色)

群	動物番号	E2-PRLoma 内部に認められた好酸性細胞の染色結果					
		TSHβ-PRL	αSU-PRL	TSHβ-αSU	GH-PRL	TSHβ-GH	αSU-GH
対照群		-	-	+	-	-	-
E2投与	1	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-
	5	病変なし	病変なし	病変なし	病変なし	病変なし	病変なし
E2投与	6	+	+	+	-	-	-
	7	+	+	+	-	-	-
	8	+	+	+	-	-	-
	9	+	+	+	-	-	-
	10	+	+	+	-	-	-
	11	+	+	+	-	-	-

図2. 各ホルモンmRNAの発現

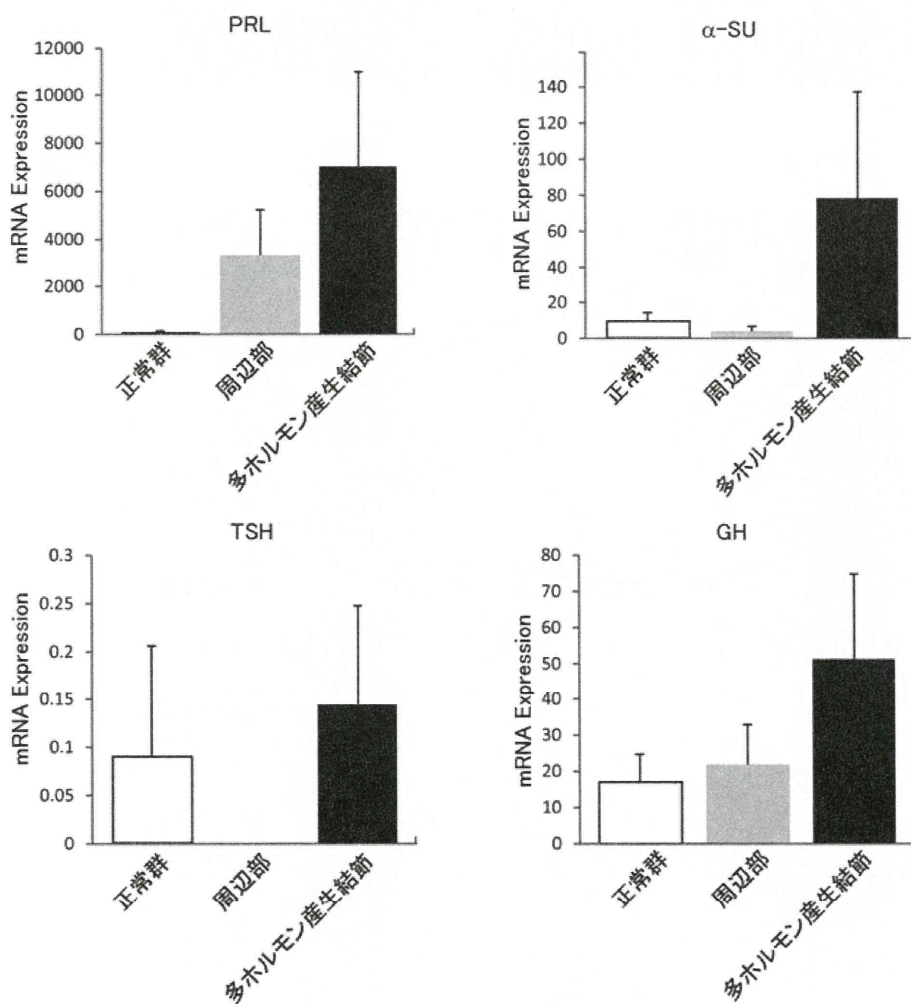


図3. E2投与後のp27の発現の経時的変化

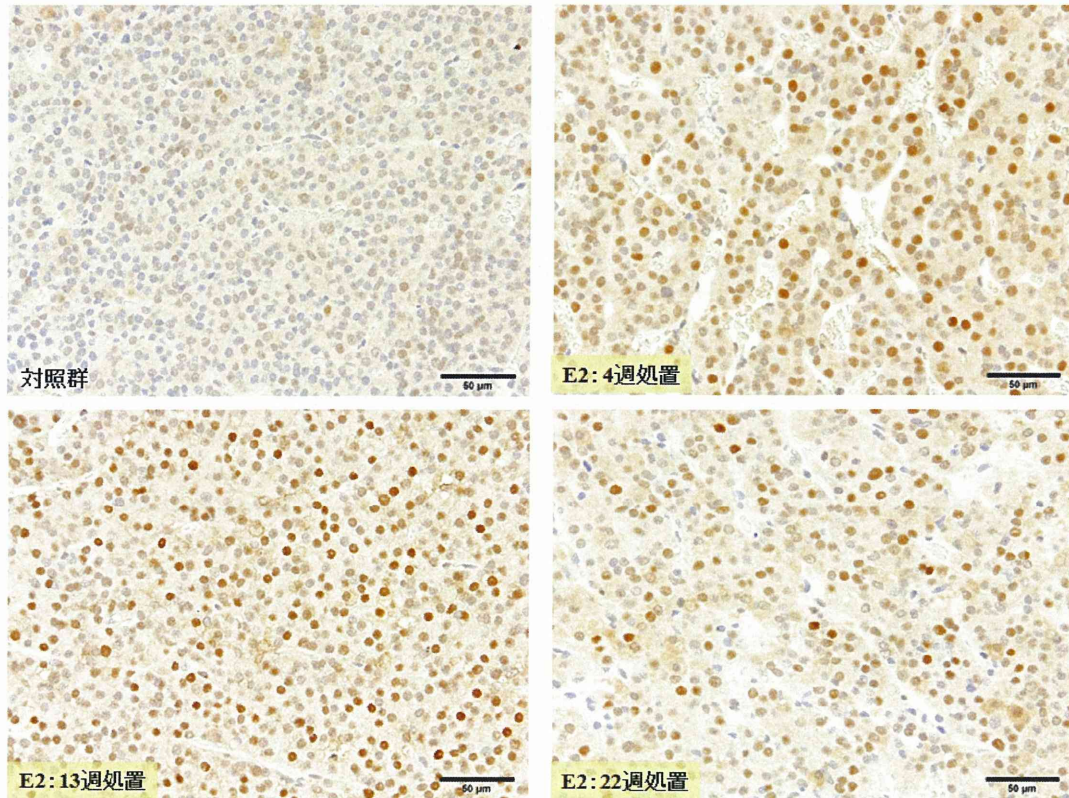


図4. E2投与4週後のSOX2の発現

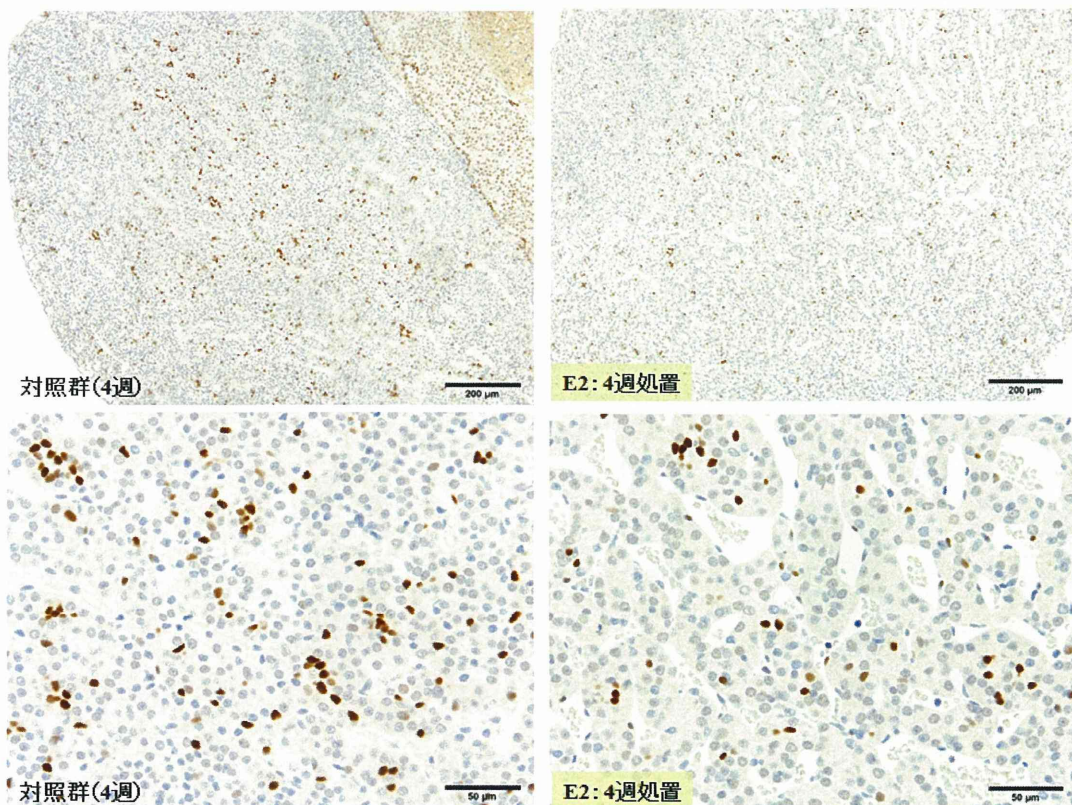


図5. E2投与13週後のSOX2の発現

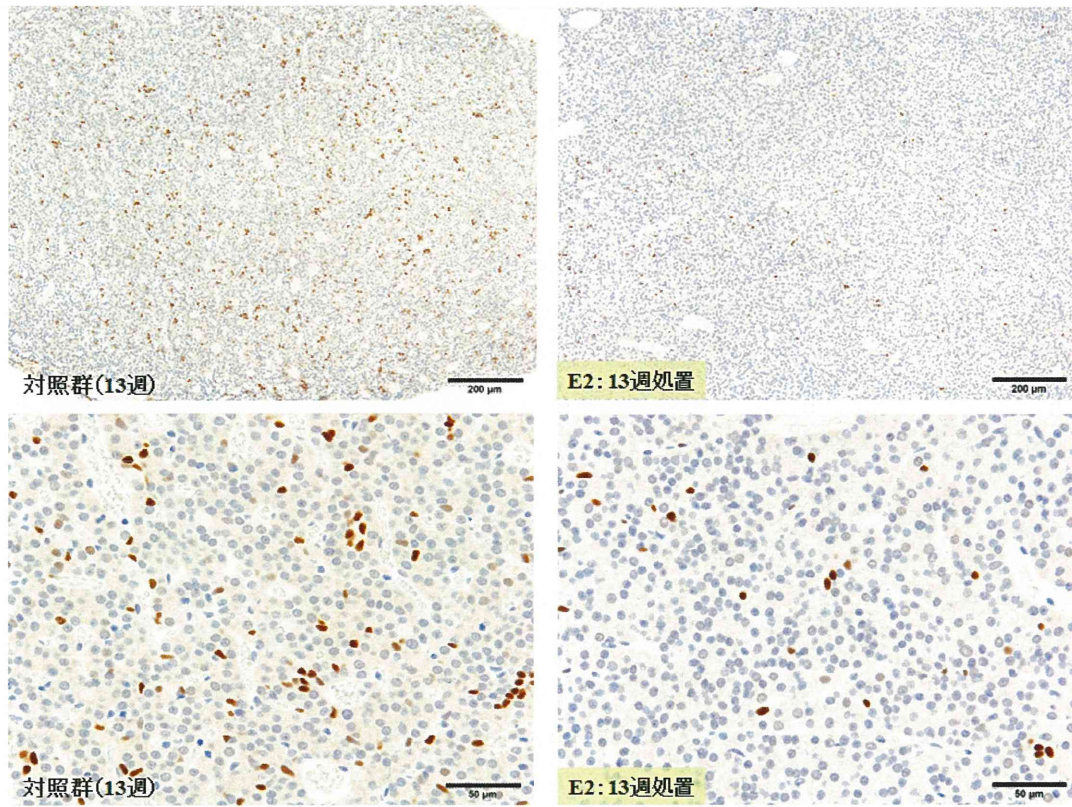
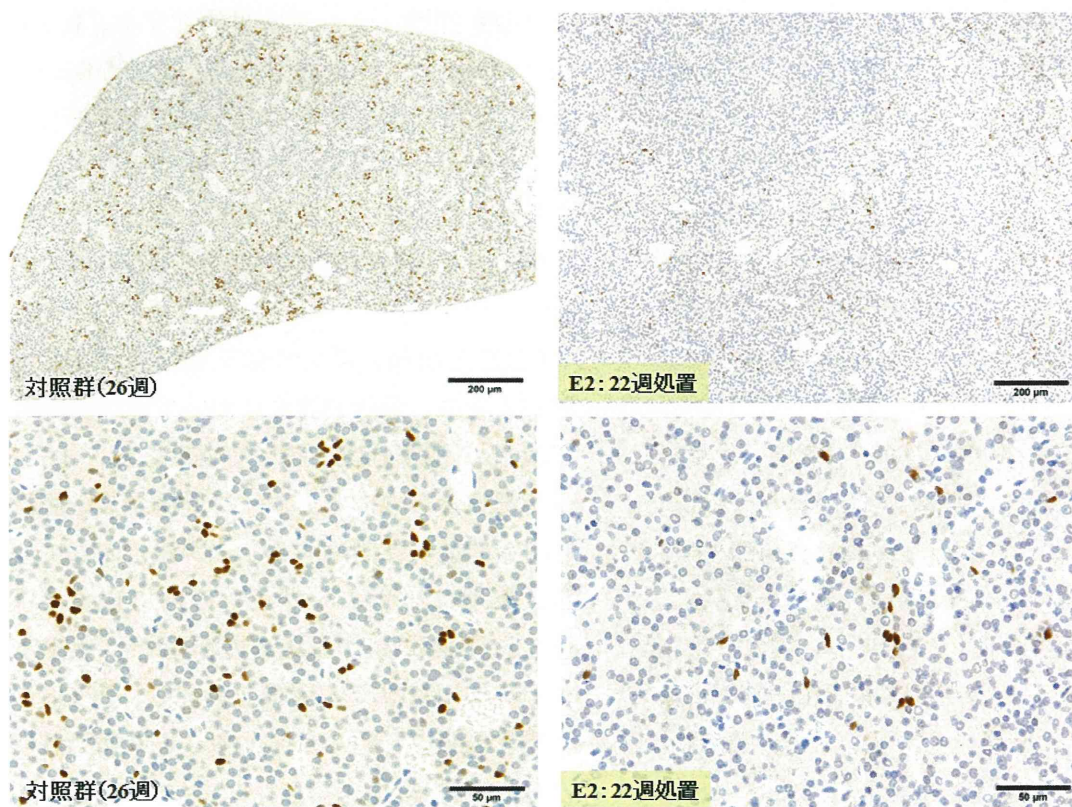


図6. E2投与22週後のSOX2の発現



多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の病態解明と ゴナドトロピン療法の個別化

研究分担者 峯岸 敬 群馬大学大学院医学系研究科産科婦人科学

A. 研究目的

PCOSにおいては、ホルモン分泌の異常としてのLH高値と多嚢胞性の形態を示す卵巣が特徴的であり、視床下部-下垂体-卵巣系の調節の不全が関与していると推定されている。欧米におけるPCOSは、肥満やアンドロゲン高値が特徴となり、診断基準においてもNIH診断基準を拡大したロッテルダム診断基準が用いられている。すなわち、PCOSの表現型やホルモン状況が人種間で異なっているため、本邦では2007年に日本産婦人科学会が示した独自の診断基準が用いられている。

FSHレセプターにおいては、1996年GromollらはFSHレセプターの点突然変異に関する症例を報告した。症例は下垂体腫瘍のため下垂体切除後、ゴナドトロピン欠損症を示した男性患者、テストステロンの補充後、受精が成立したという症例である。FSHレセプターの遺伝子解析では、1700番目のコドンがアデニンからグアニンに点突然変異したもので、この結果、細胞内第3ループを形成するAsp567がGlyに置換されたものであった。発現実験では、このmutant FSHレセプターのcAMPの基礎値はwild type FSHレセプターより上昇していたが、2倍以下程度の小さな上昇であった。その後、別々のグループにより追試されたが、mutant FSHレセプターとwild type FSHレセプターとの間にcAMPの基礎値の違いは認めることはなかった。このため患者の表現型と遺伝子変異との関連を否定する意見も多い。一方、FSHレセプターの多型に関しては人種差があり、こ

の卵巣機能に関わる機能とPCOSとの関連を検討することは、PCOSの病態を理解する上で重要な意味を持つため、検討を行った。卵胞発育過程には、FSHによる作用が主体となり、そのFSHレセプターには、遺伝子多型(SNPs)(Ala307Thr-Asn680Ser)があることが報告され、女性不妊症患者では680Ser/SerはFSH製剤に対する反応性が不良と報告されている(JCEM 90:4866-4872,2005)。さらに、本邦のPCOSの患者におけるFSHレセプターの遺伝子多型を調査し、アミノ酸配列とゴナドトロピン製剤に対する反応性の相関を明らかにすることで、排卵誘発における個別化を可能にし、多胎妊娠や卵巣過剰症候群などの合併症を予防することで安全性の高い医療を提供することを目的とする。PCOSはゴナドトロピンに対する有効閾値の範囲が狭く、不妊治療に際して、過剰刺激等の合併症を生じやすい病態であり、個別化して治療することにより、これを予防することは生殖医療と周産期医療の向上に貢献するものである。

PCOSの病態に関しては不明な点が多く検討がなされ、最近PCOSにおいては、肥満に関連して耐糖能が低下していること、また、脂肪細胞からのサイトカイン分泌がこの肥満と耐糖能低下に関連することが報告されている。我々は、サイトカインの中でIL-6に注目し、卵巣におけるIL-6の作用がゴナドトロピン作用に与える影響を検討し、PCOSの病態との関連を明らかとすることを病態解明のため検討した。

B. 研究方法

ラット顆粒膜細胞培養

この卵胞発育・排卵過程での顆粒膜細胞におけるゴナドトロピン受容体発現について注目し、まずFSH受容体が次いでLH受容体がFSH依存性に発現し、LHの作用を受けた顆粒膜細胞は排卵後に黄体化顆粒膜細胞へと変化する。特に排卵過程に関しては、LHサージに反応する顆粒膜細胞が重要な役割を果たすことが現在までに明らかにされている。

一方で排卵障害を特徴とするPCOSの卵胞液中にIL-6が増加するという報告があるため、IL-6がLH受容体発現に影響を与えているのではないかという観点から、IL-6と顆粒膜細胞LH受容体発現との関連を検索した。

- 3週齢メスラットにDES 2mg/body/day を4日間投与し、未熟な顆粒膜細胞を採取し培養を行った。
- FSH vs FSH、IL-6 同時添加群とでLH・IL-6受容体mRNAの発現量をNorthern blot及びreal time RT-PCRを用い評価し、有意差を持ってIL-6添加による増強効果を確認したので、転写活性やmRNAの安定性に関して検討した。
- IL-6受容体の構造のうちIL-6受容体 α 鎖はIL-6に特異的に結合するので、このmRNAをFSH及びFSH、IL-6同時添加群で経時的にIL-6R α mRNA発現量を検討した。
- IL-6のLH受容体mRNA転写活性を調べるため、LH受容体遺伝子プロモーター領域を含むベクター(LH-Receptor-Luc)を顆粒膜細胞にトランスフェクションし、FSHまたはFSH及びIL-6同時添加におけるルシフェラーゼ活性を検討した。
- IL-6の作用がERK、JAK/STAT系のいずれのシグナル伝達が関与するか、western

blotで確認した。

- IL-6・FSH刺激がJAK/STAT及びERK阻害剤を使用しLH-R mRNA発現を検索した。
- IL-6のエストロゲン産生に及ぼす影響に関しては、テストステロンを培養液に追加してエストロゲン産生量に対する作用を検討した。

C. 研究結果

- FSH単独添加群に比して、IL-6同時添加群でLH受容体mRNA発現が時間と用量依存的に増強した。
- IL-6のLH受容体mRNA転写活性を調べるため、LH受容体遺伝子プロモーター領域を含むベクター(LH-Receptor-Luc)を顆粒膜細胞にトランスフェクションし、FSHまたはFSH及びIL-6同時添加におけるルシフェラーゼ活性を検討し、非添加群に比して、FSH添加によりルシフェラーゼ活性が上昇した。IL-6同時添加により相乗的に有意な差をもって活性上昇していることが分かり、IL-6はLH受容体mRNA転写活性を上昇させた。
- IL-6刺激は主にMAPKとSTAT3経路を介してシグナル伝達するといわれており、顆粒膜細胞においてもこのようにErk及びSTAT3のリン酸化が確認できた。一方FSHはErkのリン酸化のみ起こし、STAT3のリン酸化は認めなかった。また、FSH・IL-6同時添加によりリン酸化シグナルの増強を認めた。FSHとIL-6刺激がMAPK系で協調的に働いていることが分かり、またErk阻害薬U0126併用によりErkのリン酸化は消失した。
- ERK阻害剤ではリン酸化を抑える濃度でもLH-R mRNAの発現を有意に抑制しな

いが、JAK/STAT系の阻害剤は同等の濃度でLH-R mRNAの発現を有意に抑制した。

- IL-6受容体の構造のうちIL-6受容体 α 鎖はIL-6に特異的に結合するが、このmRNAをFSH及びFSH、IL-6同時添加群で経時的に比較したところ。IL-6同時添加によりIL-6R α mRNA発現が増強していた。
- IL-6のエストロゲン産生に及ぼす影響に関しては、テストステロンを培養液に追加してエストロゲン産生量に対する作用を検討し、IL-6はエストロゲン産生に関しては抑制的に働いた。

D. 考察

顆粒膜細胞へのFSH添加により内因性のIL-6分泌が上昇するという報告が過去にされており、これを併せて考えると、FSH、IL-6同時添加によりIL-6受容体発現およびIL-6分泌が上昇し、auto-regulationのようなかたちでIL-6刺激を増強している可能性が示唆された。

Yosino達 はLH-R 5'-flanking-regionの-171から-137bp領域がLH-R発現に重要であると報告している。またChenらはLH-R promoter領域の中の-143から-83bpに位置している3つのSP1結合領域がcAMP誘導性のLH-R転写活性に重要であるとしている。このため我々はこれらの領域を含む-281から-1bpの5' flanking regionにおけるLH-R転写活性に対するIL-6の影響を検索した。その結果IL-6単独では活性に影響を示さないが、FSHとIL-6で相乗的に活性が上昇したことから、IL-6はFSHによるLH-R mRNA転写活性の上昇を増強することが示された。actinomycin-Dを用いてLH-R mRNA

半減期について検索したが、IL-6の影響は認めなかった(data not shown)。以上の結果

よりIL-6はFSHと相乗的にLH-Rプロモーター活性を上昇させ、mRNA安定性には寄与していないことが分かった。

IL-6は卵胞液中に存在し、IL-6R α も顆粒膜細胞表面に発現しているとされる。FSHはIL-6R α mRNAの発現を増強するが、IL-6添加により相乗的に発現増強を認めた。FSHにより顆粒膜細胞中のIL-6産生が増加するという報告と併せて考えると、FSHはIL-6系のautoregulationを介してLH-R発現を増強することが示唆された。

IL-6はFSH誘導性のLH-R発現を増強することがわかったが、これに関与するシグナル伝達系を検索した。JAK/STAT及びMAPK阻害剤を使用しLH-R mRNA発現を検索した結果、JAK/STAT系が発現増強に寄与するシグナル伝達であることが示された。またFSH及びIL-6同時添加によりERK及びSTAT3のいずれもリン酸化を起しており、シグナル阻害剤の選択性も確認した。また我々はIL-6刺激がERK、JAK/STATのいずれのシグナル伝達にも関与する一方、FSH投与ではERKのみが活性化しJAK/STAT3には影響を与えていないこともwestern blotで確認した。

IL-6は様々な細胞で産生され、免疫や炎症反応において生化学的役割を果たすサイトカインとして知られている。IL-6の正常卵巣機能における役割としては、卵胞発育過程の血管形成、血管透過性増強などが報告されている。またLiuらはIL-6がERK、JAK/STAT及びp38MAPKを通じ卵母細胞機能やCOC expansionの調整因子として働くと報告している。FSHシグナルに関しては、FSH誘導性の顆粒膜細胞分化においてはPKAがその重要な経路であるとされ、またFSHを介したLH-R発現はPKA pathwayを介しているとされている。これらの報告と、IL-6単独で

はLH-R発現を起こさないという結果を併せて考えると、JAK/STAT3シグナルがLH-R発現を増強するメカニズムは、JAK/STAT3が単独でLH-R発現させるのではなく、何らかのPKA下流シグナルに影響を与えることでLH-R mRNA転写活性を上昇させるメカニズムが考えられた。

IL-6はFSH誘導性のLH-R発現を増強し、これは卵胞発育にも重要な役割を果たしていると考えられる。IL-6が自己調節的に卵巣にpositiveな働きをしていることを示したが、卵胞発育の局所調節因子については更なる検索が必要である。一方排卵誘発に伴うOHSS発症のメカニズムは不明確である。OHSS患者の卵胞液中にIL-6が増加しているという報告がある。今回の我々の研究結果と併せて考えると、OHSS発症の仮説として、顆粒膜細胞においてFSH刺激により増加したIL-6産生及びIL-6R発現がLH-Rを過剰に発現させ、外因性のhCGがこの過剰に発現したLH-Rに結合するというメカニズムが考えられた。但し仮説であるのでIL-6のOHSSに果たす役割については更なる検索が必要である。

今回我々の研究でIL-6がFSH誘導性のLH-R発現を増強することを明らかにした。このメカニズムとしてはLH-R mRNA転写活性を上昇させることが考えられ、またJAK/STAT系がこれに関与するシグナルであることが分かった。これらの結果はIL-6がFSHと協調的に卵巣機能調節を行っていることを示すものである。

E. 結論

PCOSではLH基礎値が高値であることも知られており、PCOSではLHがIL-6の影響で増加したLH受容体を介して、高アンドロゲン血症を引き起こす可能性が考えられた。

また、高濃度のIL-6存在下では顆粒膜細胞でのLH受容体が適切なタイミングより早く発現して、FSHのシグナルを抑制し、十分な卵胞発育が阻害され、排卵障害をきたすという機構が考えられた。これらの結果からIL-6などのシグナル伝達系を修飾することで排卵の制御が可能になれば、現在最も多胎発生の危険性の高いPCOSの排卵誘発に画期的な方法を提供する可能性があり生殖・周産期医療に貢献することが考えられる。

正常下垂体前葉細胞からの生理的開口分泌と ヒト機能性下垂体腺腫細胞からの開口分泌の可視化解析

研究分担者 高野 幸路 北里大学医学部内分泌代謝内科学

研究要旨：機能性下垂体腺腫は腫瘍の mass effect により正常下垂体機能障害、視機能障害を起こすばかりでなく、過剰分泌された下垂体ホルモンによる内分泌症状、合併症によって QOL の低下ひいては生命予後の悪化が引き起こされる重大な疾患である。特に、ホルモン過剰分泌による症状、合併症はこの疾患に特異的な問題点で、腫瘍の大きさのコントロールだけでなく、ホルモン過剰分泌のコントロールが患者管理に重要になっており、その目的のための治療薬が開発されてきた。なぜ機能性ヒト下垂体腺腫がホルモン過剰分泌を起こすのかについて、電気生理学的方法で解析を行ってきたがその背景もとに下垂体ホルモンの開口分泌を2光子励起法でほぼインタクトな腺腫組織を用いて可視化する手法を確立した。これにより正常下垂体前葉細胞の顆粒分泌を解析した。また正常下垂体細胞とヒト機能性下垂体腺腫の顆粒分泌を比較し、機能性下垂体腺腫の多くで自発性開口分泌が観察され、これがホルモン過剰分泌の原因であることを明らかにした。

A. 研究目的

先端巨大症やクッシング病などの機能性下垂体腺腫では腺腫からの過剰なホルモン分泌が生じ、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。治療は手術的切除が第一選択であるが、手術のみで治療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。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が必要であり、新しい治療法を模索するためにも必要である。このために下垂体前葉細胞からの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立し、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ト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。この方法を用いて正常下垂

体前葉細胞とヒト機能性下垂体腺腫細胞からの顆粒分泌の可視化解析法を開発し、正常細胞と機能性腺腫細胞の比較を行った。

B. 研究方法

正常下垂体細胞には、ラット下垂体前葉細胞集塊を用いた。可能な場合は、下垂体腺腫手術の際に摘出が必要であったごく少量の正常ヒト下垂体前葉細胞を対象にした。ヒト下垂体腺腫細胞については、手術によって得られた摘出腫瘍組織を30-50個の細胞からなる細胞集塊とし、可視化解析を行った。2光子励起法のTEP法を用いて顆粒分泌を可視化し、観察を行った。実験は、一部を除いて30°Cの環境で行い、自発分泌の有無を観察し、CRHやAVPによる分泌を観察した。細胞の同定には蛍光標識したレクチンを用い、生細胞で同定を行った。

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

正常GH産生細胞からのGHRHによる開口分泌

正常下垂体GH細胞はラットでもヒトでも自発開口分泌を認めなかった。GHRH投与により、投与40秒後から開口分泌が開始し、多くがfull fusionであったが、kiss-and-stayの動態も見られた。

正常プロラクチン産生細胞からの自発開口分泌とTRHによる開口分泌

GH細胞と異なり、正常プロラクチン細胞は活発な自発開口分泌を示した。全経過が0.4秒以内で終了するととても速い開口分泌であった。この自発開口分泌は視床下部障害の

際に生じる高プロラクチン血症の実態を可視化解析で明らかにしたものである。TRH刺激により自発開口分泌より遅い経過の開口分泌が認められた。一部ではkiss-and-stay形式の開口分泌が認められた。

ヒトGH腺腫細胞からの開口分泌の可視化解析

1) 開口分泌、病理所見、*gsp* 変異、臨床所見
それぞれの結果

解析可能であった51例中21例に標準外液での活発な自発性開口分泌を認めた(41.2%)。他の30例では自発開口分泌は見られるものの開口頻度は低かった。自発分泌が見られた21例中12例で高カリウム外液下の開口分泌を調べたところ、いずれも高カリウム外液下で分泌が促進された(100%)。自発分泌のなかった30例中24例で高カリウム刺激に対する反応を調べ、うち13例で高カリウム外液下での顆粒分泌が見られた(54.2%)。顆粒放出の時間経過でも差はなく、数秒以内の短いfull fusionであった。

2) 開口分泌と、病理所見、*gsp* 変異および臨床所見の関連性

サイトケラチン染色を行った腺腫の中で、DGとSpGで自発分泌の有無には差が認められなかったが、高カリウム刺激で分泌促進が見られた20例のうち8例は分泌の促進が顕著であり、いずれもDGタイプ(7例)またはSpGの混在したDGタイプ(1例)であった(表1A)。

Gsp 変異と自発分泌との関連を表2にまとめた。*Gsp* 変異の有無と自発分泌の有無には有意な関連は認められなかった($P=0.336$ 、Fisher検定)が、*gsp* 変異のある腺腫で高カリウム刺激による開口分泌が有意に起こりやすいことが示された($P=0.026$ 、Fisher検定)(表1B)。

同様の自発性顆粒分泌は、ヒトACTH腺腫細胞でも認められた。

治療薬の作用

ヒトGH産生腺腫において、ソマトスタチンやソマトスタチンアナログが顕著に自発分泌を抑制し、これらの薬剤の作用機構を可視化できた。これらの薬剤で膜の過分極反応が生じ自発性活動電位の発火が消失することを過去に報告したが、その結果を反映するものであった。ヒトACTH産生細胞においては、D₂アゴニストとソマトスタチンアナログが一部の症例で自発分泌を有意に抑制した。抑制は、D₂アゴニストよりソマトスタチンアナログのほうがよく認められたが、総じてGH産生腺腫での抑制より弱かった。

D. 結論

正常下垂体前葉細胞からの顆粒分泌を可視化できた。その結果、視床下部障害における高プロラクチン血症が、プロラクチン細胞のみに認められる自発開口分泌のためであることを初めて可視化解析で明らかにできた。他のホルモン産生正常細胞ではこのような自発発火は認められず、生理的刺激因子による開口分泌を観察できた。

多くのヒト機能性下垂体腺腫細胞は、刺激のない状態でも自発性の開口分泌を示した。これは、プロラクチン細胞以外の正常下垂体前葉細胞では見られない現象で、機能性下垂体腺腫からのホルモンの過剰分泌が、自発開口分泌によって示していることを示している。

また、治療薬の投与により自発開口分泌が抑制されることも見出し、薬剤の作用機構を明らかにできた。

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.

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究成果発表文献

1. 論文発表

- 1) Hirohata, T., Asano, K., Takano, S., Arita, K., Tahara, S., Takano, K. et al. DNA mismatch repair protein MSH6 correlated with the responses of atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas to temozolomide: The national cooperative study by the Japan Society for Hypothalamic and Pituitary Tumors. J. Clin. Endocrinol. & Metab., 98 (3): 1130-1136, 2013.
- 2) Hirohata T, Saito N, Takano K, Yamada S, Son JH, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Mizutani A, Okinaga H, Matsuno A. Urinary growth hormone level and insulin-like growth factor-1 standard deviation score (IGF-SDS) can discriminate adult patients with severe growth hormone deficiency. Endocr J. 60: 369-373, 2012.
- 3) Ishii, H., Shimatsu, A., Okimura, Y., Tanaka, T., Hizuka, N., Kaji, H., Hanew, K., Oki, Y., Yamashiro, Y, Takano, K., Chihara, K. Development and Validation of a New Questionnaire Assessing Quality of Life in Adults with Hypopituitarism: Adult Hypopituitarism Questionnaire (AHQ). PLoS ONE 7 (9): e44304., 2012.
- 4) Yamada, H., Takano, K., Ayuzawa, N., Seki, G., Fujita, T.: Re-lowering of serum Na for

- for osmotic demyelinating syndrome. Case Reports in Neurological Medicine, 2012: 704639, 2012.
- 5) Matsuno, A., Mizutani, A., Okinaga, H., Takano, K., Yamada, S., Yamada, S.M., Nakaguchi, H., Hoya, K., Murakami, M., Takeuchi, M., Sugaya, M., Itoh, J., Takekoshi, S., Osamura, R.Y.: Molecular Morphology of Pituitary Cells, from Conventional Immunohistochemistry to Fluorescein Imaging. *Molecules*. 16: 3618-3635, 2011.
- 6) Matsuno, A., Mizutani, A., Okinaga, H., Takano, K., Yamada, S., Yamada, S.M., Nakaguchi, H., Hoya, K., Murakami, M., Takeuchi, M., Sugaya, M., Itoh, J., Takekoshi, S., Osamura, R.Y., Functional molecular morphology of anterior pituitary cells, from hormone production to intracellular transport and secretion. *Med Mol Morphol.*, 44: 63-70, 2011.
- 7) 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: E1761-1767, 2011
- 8) Morey Haymond, Anne-Marie Kappelgaard, Paul Czernichow, Beverly MK Biller, Koji Takano, Wieland Kiess, on behalf of the participants in the global advisory panel meeting on the effects of growth hormone. Early recognition of growth abnormalities permitting early intervention. *Acta Paediatrica* 102: 787-96, 2013.
- 9) 高野幸路: 下垂体疾患治療の進歩, 日本内科学会雑誌 101巻4号: 975-984: 2012.

2. 学会発表

- 1) 講演: 日本内分泌学会第22回臨床内分泌代謝Update, 下垂体前葉機能低下症の診断. 2013.02.18
- 2) シンポジウム: 間脳下垂体腫瘍学会, 下垂体腫瘍の発生原因と病態生理. 2013.03.15
- 3) セミナー: 間脳下垂体腫瘍学会, 重症成人成長ホルモン分泌不全症の病態と治療 2013.03.16
- 4) セミナー: 日本内分泌学会総会, 先端巨大症の集学的治療. 2013.04.25
- 5) 特別シンポジウム: 日本脳神経外科学会, 下垂体腫瘍の内科治療. 2013.10.17
- 6) セミナー: 日本脳神経外科学会, 先端巨大症の内科治療とその基礎. 2013.10.18
- 7) セミナー: 日本神経内分泌学会, 神経内分泌臨床の最近の進歩. 2013.10.25

G. 知的財産権の出願・登録状況

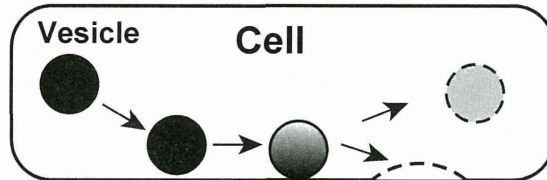
該当なし

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. 通常の画像

Intracellular
Fluorescence
tracer



B. TEP画像

Extracellular

Fluorescence
tracer

Intercellular
space

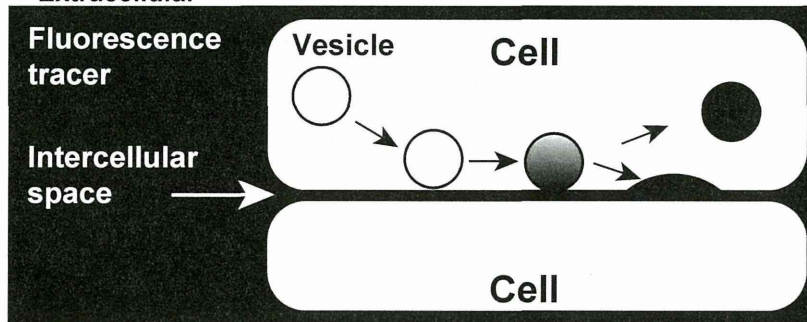


図2. 2光子励起法のTEP法を用いたヒトACTH腺腫細胞集塊の構造

細胞外にSRBを流すと、直ちに細胞間隙に蛍光物質が分布する

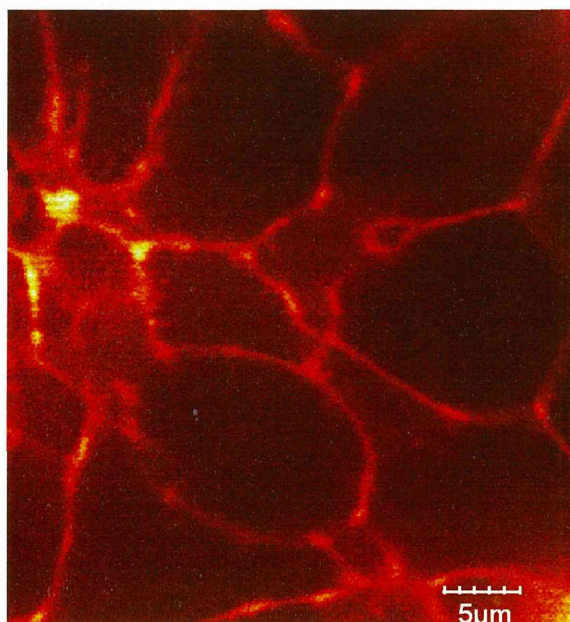
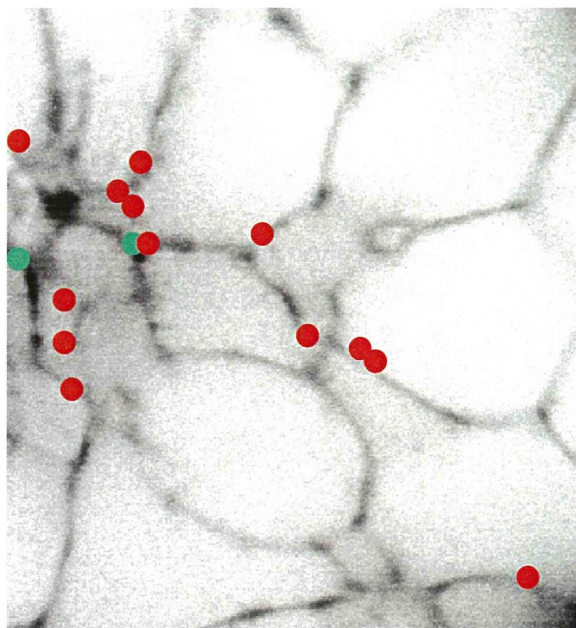


図3. CRH刺激によるACTH分泌の可視化像

CRH刺激により生じたACTH分泌は、図の赤い点で示されるように、細胞間隙に接した細胞縁に生じ、毛細血管に接する場所以外の細胞間隙にもよく開口していた。自発分泌でも、同様の結果が得られている。



V. 重点研究課題報告書

Cushing病に対する新規薬物療法および診断法の開発

研究分担者 岩崎 泰正 高知大学保健管理センター
菅原 明 東北大学大学院医学系研究科分子内分科学
沖 隆 浜松医科大学第二内科

研究要旨：下垂体腺腫全般の治療法は急速に進歩しているが、Cushing病の診断・治療に関しては未だ困難な点が多い。今回の検討課題において私どもは、本疾患診断の再検討、および新規治療法開発に向けた検討を行った。その結果、診断法に関してはCRHおよびdDAVP試験の陽性率は既報と比較して低く、逆にGRHR2試験の陽性率は高かったが特異度が低かった。dDAVP試験に関しては至適投与量の再検討が必要と考えられた。治療面では、腫瘍自体を標的としたレチノイドX受容体(RXR)アゴニストHX630の効果が*in vitro*, *in vivo* (mouse)で確認された。また合併症を標的とした検討では、グルココルチコイドによる内臓肥満の成因に関与する中性脂肪合成酵素を特定し、それらを標的とした治療法の開発が展望される段階に至った。

A. 研究目的および研究方法

機能性下垂体腺腫に対する内科的治療法は、ソマトスタチンアナログやドパミン受容体作動薬がGH産生腺腫、プロラクチノーマなどに各々臨床応用され、その有用性が確立されている。しかしACTH産生腺腫(Cushing病)に対する治療法は決定的なものがなく、ACTH分泌抑制薬ないしグルココルチコイド合成・作用阻害薬が試験的ないし姑息的に投与されているにすぎない。また本疾患の診断に関しても、従来の検査法で鑑別診断に難渋する例が存在する。本研究班では、Cushing病に対する有効な薬物治療法および診断法を開発すべく、種々のアプローチから検討を行った。

B. 研究結果

1) Cushing病診断法の比較検討

Cushing病では各種ACTH分泌刺激に対するACTHの反応性は症例により様々である。沖らは、現在用いられている刺激試験

およびGHRP2試験を比較検討したところ、Cushing病におけるCRHおよびdDAVP試験の陽性率は既報と比較して低かった。逆にGHRP2刺激に対する陽性率は高かったが、特異度も劣るため診断上の有用性は低いと判断された。またdDAVP試験の標準化にあたっては、今後その至適投与量に関して、多数例を対象とした比較検討が必要と考えられた。

2) ACTH産生腺腫自体を標的とした治療法 の開発

菅原らは、RXRアゴニストHX630が、マウス下垂体由来ACTH産生AtT20細胞に対して、細胞増殖抑制・アポトーシス誘導作用ならびに*Pomc*遺伝子転写およびACTH分泌抑制作用を示すことを*in vitro*で明らかにした。今回、その分子機序をさらに解析するとともに、ヌードマウスを用いた*in vivo*の検討を行ったところ、HX630が転写因子RXR α を介して効果を発揮すること、誘導