

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 亀田 啓

学位論文題名

下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞におけるニューロメジン B の発現と
細胞増殖における影響の検討
(Expression and proliferative activity of neuromedin B
in pituitary adrenocorticotropin-producing cells)

【背景と目的】

視床下部-下垂体-副腎軸は生体におけるストレスへの反応を制御し、代謝や消化、情動行動など生体における重要な機能を調節している。HPA 軸の主な因子としては視床下部からの corticotropin releasing hormone (CRH)、下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、副腎からの glucocorticoid (GC) が重要である。ACTH は副腎におけるステロイド合成・分泌を促進するが、その受容体である melanocortin 2 receptor (MC2R) は副腎以外の臓器においても発現が報告されている。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 (Shimizu C et al. *Gene*, 1997)、ノックアウトマウスを共同で作成して ACTH およびグルココルチコイドの機能について検討をこれまで行ってきた (Chida D, Shimizu C, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007)。

MC2R ノックアウト (KO) マウスは副腎束状層の著明な萎縮を認め、慢性的な副腎不全を呈する。血漿コルチコステロンは感度以下となるが、代償的に血漿 ACTH は著明高値となり、下垂体 ACTH 産生細胞の過形成と ACTH の産生亢進を呈している。

ヒトにおいて下垂体 ACTH 産生細胞が腫瘍化し ACTH の自律性産生を呈した状態は ACTH 依存性 Cushing 症候群、すなわち Cushing 病と呼ばれる。ACTH の過剰産生によって副腎からのコルチゾール産生が亢進し身体・体組成的变化や高血圧、糖尿病、脂質異常、脂肪肝、骨粗鬆症など代謝障害、気分障害などの精神症状、免疫不全を呈し、心血管、脳血管のイベントリスク増加や重症感染症の増加から生命予後は不良である。

Cushing 病の治療として経蝶形骨洞的下垂体腺腫摘除術が施行されるが、特に 1cm を超えるマクロアデノーマでは手術による寛解率が低いことが報告されている (Biller BM, et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008)。また、薬物治療で効果的なものは現時点で存在せず、手術により寛解に至らない症例の治療は難渋することが多く、有効な薬物治療の開発が望まれている。

今回我々は慢性副腎不全状態にあり ACTH 産生細胞の過形成・機能亢進を呈する MC2R ノックアウトマウス下垂体における遺伝子発現を検討し ACTH 産生細胞の増殖や機能亢進に関わる因子を同定し、Cushing 病の治療ターゲットとなりうるかどうかを検討することを目的として実験を行った。

第一部

下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞におけるニューロメジン B の発現とその調節機構

【材料と方法】

我々は MC2RKO マウスならびに野生型 (WT) マウスを麻酔下に屠殺し、下垂体の遺伝子発現

を DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析した。解析結果はリアルタイム PCR 法を用いて確認した。続いて MC2RKO マウスならびに WT マウス下垂体の免疫染色を行い発現が増加していた遺伝子の蛋白発現部位を検討した。次に徐放性コルチコステロンペレットならびにプラセボペレットを皮下投与し下垂体遺伝子発現の変化を調べた。C57BL/6J マウスから下垂体前葉細胞を単離して CRH ならびに GC 刺激に対する下垂体遺伝子発現変化を調べた。

【結果】

DNA マイクロアレイ法ならびにリアルタイム PCR 法での検討で MC2RKO マウスの下垂体においてニューロメジン B (NMB) の発現が亢進していた。特異的抗体を用いた免疫染色で NMB は下垂体前葉の ACTH 陽性細胞に発現していた。NMB の発現はコルチコステロンペレットの投与によって抑制された。単離下垂体前葉細胞における NMB の発現は CRH 投与で増加し、GC によって低下した。

第二部

ニューロメジン B が下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の増殖に与える影響の検討

【材料と方法】

マウス下垂体癌細胞株であり、ACTH 産生能を有する細胞株の AtT-20/D16v-F2 を用い、NMB 受容体拮抗薬 (PD168368) ならびに NMB small interfering RNA (siRNA) が細胞増殖に与える影響を MTT アッセイで評価した。また ACTH 産生に与える影響をリアルタイム PCR 法ならびにウェスタンブロッティング法で評価した。次にヒト下垂体腺腫の検体を用いて免疫染色ならびにリアルタイム PCR 法で NMB の発現を調べた。

【結果】

NMB 受容体拮抗薬ならびに NMB siRNA の投与で AtT-20/D16v-F2 の細胞増殖は抑制された。また、ACTH の前駆体であるプロオピオメラノコルチンの遺伝子・蛋白発現も抑制された。ヒト ACTH 下垂体腺腫において、成長ホルモン産生下垂体腺腫ならびに非機能性下垂体腺腫と比較して NMB の発現が増加していた。

【考察と結論】

NMB はボンベシン様ペプチドの一つとしてブタの脊髄から同定された物質である。視床下部、下垂体を含む中枢神経系に広く分布し、情動行動との関連が報告されている。また、膵臓や消化管にも分布し、糖代謝や膵内分泌・外分泌機能にも関与するとされる。また興味深い報告として、自己分泌あるいは傍分泌の機序によって腫瘍細胞の増殖や活性化を促す作用が肺非小細胞癌、前立腺癌、大腸癌などの細胞株やヒト腫瘍細胞で報告されている。

我々は第一部での研究の結果、MC2R ノックアウトマウスの下垂体の検討から ACTH 産生細胞におけるニューロメジン B (NMB) の過剰発現を同定した。続いて NMB は CRH の投与により発現が増加し、GC の投与により発現が減少するという ACTH と同様に HPA 軸の関連因子によって調節されることを証明した。また、第二部での研究の結果、我々は NMB が下垂体 ACTH 産生細胞の腫瘍株系でもその受容体と共に発現しており、受容体拮抗薬や NMB siRNA の投与によって ACTH 産生腺腫細胞株の増殖は抑制されることを示した。またヒトの ACTH 産生腺腫でも NMB ならびにその受容体の発現が亢進していることを示した。

本研究により、我々は初めて NMB が下垂体 ACTH 産生細胞に、特に副腎不全状態や腫瘍細胞など増殖・機能が活性化した状態で発現することを見出し、ACTH 産生腺腫による Cushing 病の治療ターゲットとなり得ることを示した。今後研究を進め、Cushing 病の治療法の進歩に貢献できることが期待される。