

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590267

研究課題名(和文) 免疫系におけるプロラクチン N 端 16k フラグメントの生理的、病的役割の
解明研究課題名(英文) Pathophysiological roles of 16kDa N terminal fragment of prolactin
(PRL) in immune system

研究代表者

服部 尚樹 (HATTORI NAOKI)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：80288828

研究成果の概要(和文):

脳下垂体ホルモンであるプロラクチン(PRL)は妊娠時に増加して乳汁分泌を刺激するが、種々の修飾を受けてその作用が変化する。PRL N 端ペプチドである 16kDa PRL が脳内で生成される可能性があること、アルツハイマー病でアミロイド 蛋白が蓄積する海馬神経細胞には脳下垂体自己受容体に早々する発現があることが明らかとなった。免疫系および神経系において 16kDa PRL は細胞増殖抑制作用を示した。

研究成果の概要(英文):

PRL, one of the anterior pituitary hormone, is secreted in large amounts during pregnancy and stimulates milk production. PRL is known to get several post-translational modifications such as cleavage to produce 16kDa N terminal fragment. In this preliminary study, it was shown that 1) 16kDa could be produced in the brain, 2) PRL receptors were expressed in hippocampal neurons and 3) 16kDa PRL had cytotoxic effects in immune cells and neurons.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

脳下垂体ホルモンであるプロラクチン(PRL)は脳下垂体以外でも産生され、その受容体はほぼすべての組織で発現していることが報告されている。PRL は乳汁産生・分泌刺激作用以外に免疫調節作用、抗不安作用、神経保護作用など多岐にわたる生物作用が報告されている。申請者は免疫-神経-内分泌相互作用の研究の中で、PRL の翻訳後修飾について

検討し、PRL 自己抗体と PRL が結合したマクロプロラクチン血症の病態生理を明らかにしてきた。最近 PRL の翻訳後修飾産物である N 端 16kDa PRL フラグメントが、23kDa PRL とは異なり血管内皮細胞増殖を抑制することが報告された。生体において親ホルモンとその部分ペプチドが互いの作用を調整している可能性がある。

2. 研究の目的

免疫系、神経系における 16kDa PRL の発現、生物作用を明らかにする。

3. 研究の方法

【PRL、PRL 受容体発現】

PCR および real-time PCR 法で mRNA 発現を検討した。

【16kDa PRL 作製】

ラット脳下垂体より得られた PRL cDNA をもとに PCR 法で 16kDa PRL cDNA を作製し、pGEX 6P-1 ベクターに組み込んだ。E coli で発現させた後、PreScission protease で GST 部分を切断し、mature な 16kDa PRL を得た。

【PRL N 端、C 端抗体作製】

PRL N 端、C 端の部分ペプチドを作製し、ウサギアルブミンと conjugate を作製後、フロイントのアジュバンドとともにウサギに注射してそれぞれの抗体を得た。

【16kDa PRL の生物作用】

免疫系における作用：Nb2 rat lymphoma cell に単独または 23kDa PRL と共に投与した後、生存細胞数の指標である WST アッセイおよび細胞傷害の指標である LDH 測定を行った。神経系における作用：培養ラット海馬神経細胞に 16kDa PRL を投与し、同様の測定を行った。

4. 研究成果

1. 免疫系における 16kDa PRL の作用

Nb2 rat lymphoma cell は 0.01ng/mL-10ng/mL PRL に対して濃度依存性に増殖した。16kDa PRL は 1ng/mL PRL による細胞増殖を軽度抑制したが、PRL (-) 下での Nb2 rat lymphoma cell 自体の生存には影響を及ぼさなかった。

11. 神経系における 16kDa PRL の発現と生物作用の検討

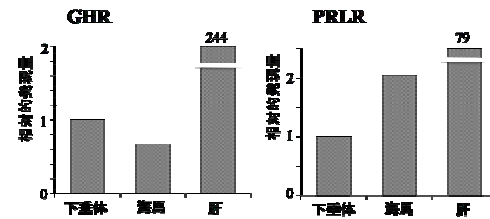
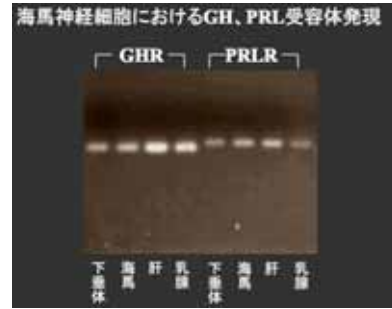
【神経系における PRL および PRL 受容体発現】

中枢神経系において GH 発現が幅広くみられたのに対し、PRL 発現は脳下垂体と下垂体茎、および延髄に限られていた。PRL および GH 受容体は中枢神経系で広く発現がみられた。



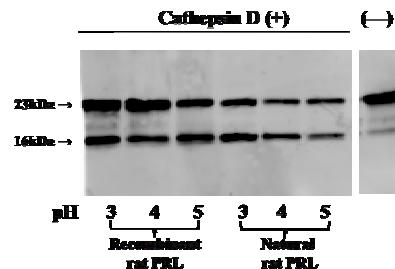
神経幹細胞が存在し、アルツハイマー病でアミロイド (Aβ) が蓄積する海馬神経細胞には脳下垂体自己受容体相当の PRL および GH

受容体発現が認められた。

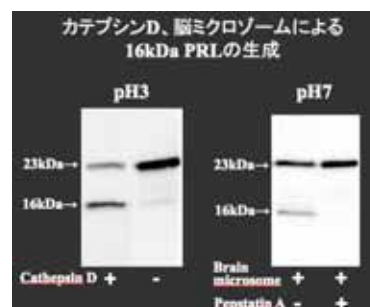


【Cathepsin D による 16kDa PRL 生成】

N 端および C 端 PRL ペプチド抗体が得られた。この抗体を用いて Western blot にて cathepsin D による PRL 消化を行った。PRL は酸性条件下でペプチド分解され、16kDa PRL が生成された。この 16kDa PRL は C 端抗体では認識されず、N 端のペプチド分解産物であることが確認された。

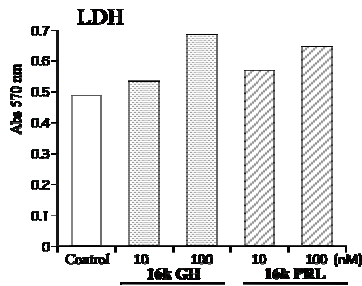


PRL をラット脳ミクロゾーム分画と cathepsin D が作用しない中性条件下でインキュベートしたところ 16kDa PRL が生成された。この反応は pepstatin A で抑制されたことから脳内に cathepsin D 以外の pepstatin A 感受性のペプチダーゼが存在し、脳内 16kDa PRL 生成に関与している可能性が示唆された。



【16kDa PRLの神経毒性作用】

16kDa PRL および 16kDa GH には図に示す様な神経毒性作用が認められた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. 服部尚樹、石原 隆、島津 章 特集：プロラクチンの生理・病理の新展開「マクロプロラクチン血症」 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 2011 in press. (査読無し)
2. 島津 章, 服部 尚樹 特集「下垂体疾患の診断と治療 現状と課題」高プロラクチン血症の内分泌診断 ホルモンと臨床 2011 in press. (査読無し)
3. Naoki Hattori, Takashi Ishihara, Yasuhiko Saiki and Akira Shimatsu Macroprolactinaemia in patients with hyperprolactinaemia: composition of macroprolactin and stability during long-term follow-up, *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 73, 792-797, 2010. (査読有り)
4. Naoki Hattori, Takashi Ishihara, Yasuhiko Saiki Macroprolactinaemia: Prevalence and Aetiologies in a Large Group of Hospital Workers *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 71, 702-708, 2009. (査読有り)
5. Naoki Hattori Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system *Growth Hormone & IGF Research*, 19, 187-197, 2009. (査読有り)

6. Hattori N, Nakayama Y, Kitagawa K, Ishihara T, Saiki Y, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies suppress PRL bioactivity in patients with macroprolactinaemia.

Clin Endocrinol (Oxf) 68, 72-76, 2008. (査読有り)

7. 服部尚樹、北川香織、中山靖久、稲垣千代子

アルツハイマー病の基礎と臨床—現状と課題(アミロイド 蛋白の神経毒性機構)

日本薬理学会雑誌 131, 326-332, 2008. (査読無し)

[学会発表](計7件)

1. Hattori N, Talshihara T, Shimatsu A Changes in serum prolactin (PRL) concentrations in subjects with macroprolactinemia having normal free PRL levels during 4 years follow-up. The The 93rd Annual meeting of American Endocrine Society 2011/06/6 Boston MA, USA
2. Hattori N, Shimatsu A Possible involvement of 16kDa prolactin (PRL) in the pathophysiology of hippocampal neurons. The The 93rd Annual meeting of American Endocrine Society 2011/06/4 Boston MA, USA
3. 服部尚樹、石原 隆、才木康彦、島津 章 マクロプロラクチン血症の長期経過の検討 第84回日本内分泌学会 2011/4/23 神戸国際会議場(兵庫県)
4. Hattori N, Ishihara T, Saiki Y, Shimatsu A. Long term follow up of macroprolactinaemia The 92nd Annual meeting of American Endocrine Society 2010/06/21 San Diego, CA, USA
5. 服部尚樹、石原 隆、才木康彦、島津 章 マクロプロラクチン血症：その頻度と病態 第37回日本神経内分泌学会教育講演 2010/10/23 京都大学(京都府)
6. Hattori N, Saiki Y, Ishihara T. Macroprolactinemia: prevalence and aetiologies 14th International Congress of Endocrinology 2010/03/28 京都国際会館(京都府)

7. 服部尚樹 アミロイド タンパクの神経毒性機構 第80回日本薬理学会年会シンポジウム 2007/03/16 名古屋国際会議場 (愛知県)

〔図書〕(計2件)

1. Naoki Hattori

Macroprolactinemia: A New Cause of Hyperprolactinemia Due to Anti-Prolactin (PRL) Autoantibodies. *New Research on Autoantibodies* (Claude T. Petrelli ed.) NOVA Science Publishers, NY, p.13-59, 2008.

2. Hattori N, Ishihara T, Shimatsu A. Autoimmunity in the pituitary gland and the pituitary hormones. *Advances in Medicine and Biology*, 2011 in press. NOVA Science Publishers, NY.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部 尚樹 (HATTORI NAOKI)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：80288828