

機関番号：32643
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591723
 研究課題名（和文） ポロソームに焦点をあてた分泌機構抑制による機能性下垂体腺腫の新しい治療法の確立
 研究課題名（英文） a novel therapy of functioning pituitary adenomas using attenuated secretory machinery focusing porosome
 研究代表者
 松野 彰 (AKIRA MATSUNO)
 帝京大学・医学部・教授
 研究者番号：00242058

研究成果の概要（和文）：

蛍光タンパクと成長ホルモンとの融合蛋白の遺伝子を発現する、ラット下垂体培養細胞において、ポロソームの存在を確認した。ついで、ポロソームの分泌顆粒側の構成因子である VAMP と介在分子である fodrin について、これらが成長ホルモンの分泌において必須であることを明らかにした。これらの分子の抑制が、成長ホルモンの分泌抑制をおこすこと、ひいては成長ホルモン産生下垂体腺腫の新たな治療方法となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Porosome was identified in an experimental rat pituitary cell expressing fluorophore-combined growth hormone. Both VAMP and fodrin were essential for the secretion of growth hormone. The suppression of these molecules induced the attenuated secretion of growth hormone. These results suggest that the suppression of VAMP and fodrin and the suppressed function of porosome will be a novel therapeutic target of growth hormone-producing pituitary adenomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：下垂体細胞、成長ホルモン、ポロソーム、分泌機構、細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

平成 15 年までの科学研究費において、我々は、GH の分泌に Rab3B 蛋白と SNARE 機構が必須であることを明らかにし、下垂体ホルモンの分泌の分子機構についてその一端を明らかにしてきた(松野彰ら：日本内分泌学会雑誌 2002, ホルモンと臨床 50 巻 '02 臨時増刊号 2002, ホルモンと臨床'03 臨時増刊号

2003, Matsuno A et al.: Microsc Res Tech 2003)。また平成 17 年までの科学研究費においても、蛍光色素である EYFP と GH との融合蛋白(EYFP-GH)の遺伝子を発現する、下垂体培養細胞の stable cell line を GH3 cell と AtT-20 cell の 2 種類で確立した(Matsuno A et al.: J Histochem Cytochem 2005)。そして細胞内での EYFP-GH 分泌顆粒の動態を可

視化することに成功した。TRH, high K, CRH などの刺激に応じて EYFP-GH 分泌顆粒の細胞内輸送と分泌を観察し得た。そして EYFP-GH と ECFP-Rab3B の共発現系を作製し、細胞内輸送はもちろんのこと分泌顆粒の放出にも Rab3B が関与していることを明らかにした (Matsuno A et al.: Brain Tumor Pathology 2006)。また平成 19 年までの科学研究費においても、下垂体ホルモンの細胞内輸送における kinesin superfamily (KIF) の役割を明らかにし、KIF をターゲットとした新たな治療法の可能性を探求してきた。さらに R-Ras が exocytosis の調整に関与していることも明らかとした (Takaya A et al.: Mol Biol Cell 2007)。

2. 研究の目的

機能性下垂体腫瘍、特に GH や ACTH 産生下垂体腫瘍は、手術、薬物療法、放射線療法によっても十分な治療成績をあげることが困難であり、さらなる治療方法が必要とされている。これらの従来の治療法はホルモン産生を抑制することを主眼としてきた。本研究が主眼とする、下垂体ホルモンの細胞内輸送と porosome を中心に分泌の過程をターゲットとした治療法は、ホルモンの産生に関わらず細胞内輸送と分泌を制御することにより機能性下垂体腺腫の治療を行うものである。本研究は特に分泌装置である porosome に焦点をあて、その制御を行うことを目的とした。このような下垂体ホルモンの細胞内輸送と分泌の過程を明らかにすることは、下垂体ホルモンの産生がみられても臨床的に症状を示さない silent adenoma の silence の分子機構についての知見を与えることに通じるものである。

3. 研究の方法

まず EYFP と GH との融合蛋白 (EYFP-GH) の遺伝子を発現する、ラット由来の下垂体培養細胞の stable cell line (GH3 cell と AtT-20 cell) において、porosome の存在を原子間力顕微鏡 (走査型プローブ顕微鏡) を用いて確認する。porosome の分泌顆粒側の構成因子である VAMP と介在分子である fodrin に焦点をあて、VAMP と ECFP の融合蛋白、および fodrin と EGFP の融合蛋白を強制発現させ、共焦点顕微鏡下に観察し、これらの分子が porosome の形成機構と GH の分泌に必須であることを確認する。ECFP-VAMP、EGFP-fodrin、およびこれら 2 者を同時にトランスフェクションしたのちに、分泌刺激 (GH3 には TRH, high K, AtT-20 には high K, CRH) を加え、GH の分泌

過程、分泌顆粒が発芽し分泌をおこす際に、ECFP-VAMP、EGFP-fodrin が作用している像を、real-time に観察する。さらに siRNA を用いて VAMP, fodrin の作用を阻害し、porosome の形成と GH の分泌が抑制されることを観察する。

4. 研究成果

我々がさきに確立した EYFP と GH との融合蛋白 (EYFP-GH) の遺伝子を発現する、ラット由来の下垂体培養細胞の stable cell line (GH3 cell と AtT-20 cell) において、porosome の存在を原子間力顕微鏡 (走査型プローブ顕微鏡) を用いて確認した。ついで、porosome の分泌顆粒側の構成因子である VAMP と介在分子である fodrin に焦点をあて、VAMP と ECFP の融合蛋白、および fodrin と EGFP の融合蛋白を強制発現させ、共焦点顕微鏡下に観察し、これらの分子が porosome の形成機構と GH の分泌に必須であることを確認した。ラット VAMP の cDNA についてはラット下垂体組織より mRNA を抽出し、RT-PCR により作製した。VAMP の cDNA に対して制限酵素サイトを PCR に付加し組換えを行い、ECFP と融合させた。この VAMP と ECFP の融合蛋白の組換え遺伝子を、EYFP-GH の遺伝子を発現する、ラット由来の下垂体培養細胞の stable cell line (GH3 cell と AtT-20 cell) に導入した。トランスフェクションは、Trans ITTM などを用いて行った。EYFP-GH と ECFP-VAMP について生物学的免疫学的特性に変化がないことを Western blotting や細胞培養を用いて確認した。fodrin についても同様に EGFP との融合蛋白の組換え遺伝子を作製し、EYFP-GH の遺伝子を発現する、ラット由来の下垂体培養細胞の stable cell line (GH3 cell と AtT-20 cell) に導入した。ECFP-VAMP、EGFP-fodrin、およびこれら 2 者を同時にトランスフェクションしたのちに、分泌刺激 (GH3 には TRH, high K, AtT-20 には high K, CRH) を加え、GH の分泌過程、分泌顆粒が発芽し分泌をおこす際に、ECFP-VAMP、EGFP-fodrin が作用している像を、real-time に観察した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡のほか、二光子顕微鏡を用いて、細胞膜直下の分泌を観察した。その結果、これらの分子が porosome の形成機構と GH の分泌に必須であることを確認した。ついで、siRNA を用いて VAMP, fodrin の作用を阻害し、porosome の形成と GH の分泌が抑制されることを観察した。VAMP, fodrin についていくつかの塩基配列をターゲットとして siRNA を作成し、ベクターに組み込んで、EYFP-GH を発現する GH3 cell と AtT-20 cell に

transfection した。そして、VAMP, fodrin の発現が抑制されていることを、タンパクレベルと mRNA レベルで確認した。これまでにやってきた分泌刺激 (GH3 には TRH, high K, AtT-20 には high K, CRH) に対して、EYFP-GH の分泌が抑制されることを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。このことにより、GH の分泌における VAMP, fodrin の役割をよりいっそう明確になった。これら、VAMP, fodrin の抑制が、GH の分泌抑制をおこすこと、ひいては GH 産生下垂体腺腫の新たな治療方法となりうると考えられた。

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 56 件)

- 1) 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* 査読有 (in press)
- 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* 査読有 (in press)
- 3) Murakami M, Fujimaki T, Asano S, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K, Yamazaki K, Ishida Y, Matsuno A: Combination therapy with rituximab and temozolomide for recurrent and refractory primary central nervous system lymphoma. *Yonsei Med J* 査読有 (in press)
- 4) Matsuno A, Yamada S, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M: Abnormal dynamics of growth hormone after thyrotropin-releasing hormone loading test, gonadotropin-releasing hormone loading test, and oral glucose tolerance test in mixed gonadal dysgenesis with a pituitary lesion. *International Journal of Case Reports and Images* 査読有 (in press)
- 5) Matsuno A, Katakami H, Okazaki R, Yamada S, Sasaki M, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K, Murakami M, Yamazaki K, Ishida Y, Iwasaki H, Kuyama J, Kakudo K: Skull base metastasis from follicular thyroid carcinoma: A report of two cases. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 査読有 2010, 50:421-425
- 6) Nakaguchi H, Matsuno A, Miyawaki S, Murakami M, Yamada M, Yamazaki K, Ishida Y: Small cell carcinoma originating from the cavernous sinus. *Acta Neurochir* 査読有 2010, 152:493-500
- 7) Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, Chapple JP, Gueorguiev M, Guegan K, Stals K, Khoo B, Kumar AV, Ellard S, Grossman AB, Korbonits M, the International FIPA consortium: Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat* 査読有 2010, 31:1-11
- 8) Asai-Akieda S, Zaima N, Ikegami K, Kahyo T, Yao I, Hatanaka T, Iemura S, Sugiyama R, Yokozeki T, Eishi Y, Koike M, Ikeda K, Chiba T, Yamaza H, Shimokawa I, Song SY, Matsuno A, Mizutani A, Sawabe M, Chao MV, Tanaka M, Kanaho Y, Natsume T, Sugimura H, Date Y, McBurney MW, Konioshi Y, Guarente L, Setou M: SIRT1 regulates thyroid-stimulating hormone release by enhancing PIP5K γ activity through deacetylation of specific lysine residues in mammals. *PLoS One* 査読有 2010, 5:e11755
- 9) Matsuno A, Miyawaki S, Yamada S, Ide F, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Takeuchi M, Sugaya M: A rare association of ruptured left middle cerebral artery aneurysm and dextrocardia with situs inversus totalis. *Ir J Med Sci* 査読有 2010, Sep 25. [Epub ahead of print]
- 10) Matsuno A, Murakami M, Mizutani A, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K, Ide F, Yamada S, Onda Y, Takeuchi M, Okinaga H: Current trends in the treatment of malignant pituitary tumors. *Current Trends in Endocrinology* 査読有 2010,

- 4:1-7
- 11) Matsuno A, Ide F, Tanaka H, Asano S, Miyawaki S, Uno T, Tanaka J, Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M, Fuke N: Oral administration of cilnidipine to patients with hypertensive intracerebral hemorrhage in an acute stage: significance and role of an N-type calcium channel blocker. *Ir J Med Sci* 査読有 2009, 178:419-422
 - 12) Sasaki M, Okazaki R, Inoue D, Nakashima M, Ide F, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K, Murakami M, Mizutani A, Okinaga H, Matsuno A: Preoperative elevated serum growth hormone is preventive of osteopenia in postsurgical patients with pituitary somatotroph adenomas: comparison with clinically non-functioning adenomas. *Endocrinologist* 査読有 2009, 19:208-210
 - 13) Nakashima M, Takano K, Matsuno A: Analyses of factors influencing the acute effect of octreotide in growth hormone-secreting adenomas. *Endocr J* 査読有 2009, 56:295-304
 - 14) Matsuno A, Mizutani A, Takekoshi S, Osamura RY, Sanno N, Teramoto A, Ide F, Yamada S, Sasaki M, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K, Murakami M, Okinaga H: Molecular pathogenesis and functional analysis of pituitary adenoma. *Current Trends in Neurology* 査読有 2009, 3:69-73
 - 15) Matsuno A, Fujimaki T, Mizutani A, Ide F, Tanaka H, Asano S, Miyawaki S, Uno T, Tanaka J, Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M, Yamazaki K, Ishida Y: Disappearance of gadolinium enhancement in a chemoresistant astrocytoma of the tectum after high dose interferon beta. *Tumori* 査読有 2008, 94:853-855
 - 16) Matsuno A, Katakami H, Okazaki R, Mizutani A, Osamura RY, Miyawaki S, Uno T, Ide F, Asano S, Tanaka J, Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M, Yamazaki K, Ishida Y, Okinaga H, Teramoto A: Effective combined medical treatment with octreotide long acting release (Sandostatin LAR) and cabergoline for an extremely rare pituitary somatotroph adenoma producing growth hormone-releasing hormone. *Endocrinologist* 査読有 2008, 18:266-269
 - 17) Matsuno A, Itoh J, Mizutani A, Takekoshi S, Osamura RY, Okinaga H, Ide F, Miyawaki S, Uno T, Asano S, Tanaka J, Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M: Co-transfection of EYFP-GH and ECFP-rab3B in an experimental pituitary GH3 cell: a role of rab3B in secretion of GH through porosome. *Folia Histochem Cytobiol* 査読有 2008, 46:419-421
 - 18) Nakaguchi H, Matsuno A, Teraoka A: Prediction of the incidence of spontaneous intracerebral hemorrhage from meteorological data. *Int J Biometeorol* 査読有 2008, 52:323-329
 - 19) Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JAH, Popovic V, Ribeiro-Oliveira Jr. A, Gadelha MR, Monson JP, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Peters G, Bolger G, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M: The role of the AIP gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 査読有 2008, 93:2390-2401
- [学会発表] (計 137 件)
- 1) Matsuno A: Microsurgery and neuroendoscopic surgery of pituitary tumors with medical and pathological studies. The 4th International Neurosurgical Conference 2010.7.17 (Harbin, China)
 - 2) Matsuno A, Murakami M, Mizutani A, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K: Temozolomide treatment of malignant pituitary tumors. The 8th China-Japan Friendship Neurosurgical Symposium 2010.6.18 (Chengdu, China)
 - 3) Yamada SM, Yamada S, Onda Y, Nakaguchi H, Murakami M, Hoya K, Matsuno A, Nakayama H: A case of subarachnoid with pituitary apoplexy caused by idiopathic pachymeningitis. The 8th China-Japan Friendship Neurosurgical Symposium 2010.6.18 (Chengdu, China)

- 4) Matsuno A, Murakami M, Mizutani A, Yamada S, Onda Y, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K, Okinaga H: Temozolomide treatment of malignant pituitary tumors. The 2nd Russian-Japanese Neurosurgical Symposium 2010.5.10 (Yamanashi)
 - 5) Katakami H, Hashida S, Matsuno A, Miyamura N, Usui T, Yamada S, Nishikawa T: Differential diagnosis of adrenocorticotropin (ACTH) insufficiency by a novel ultrasensitive EIA. ICE2010 2010.3.27 (Kyoto, Japan)
 - 6) Matsuno A, Mizutani A, Yamada S, Onda Y, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K, Murakami M, Okinaga H, Ishibashi S: Effectiveness and ineffectiveness of temozolomide for atypical prolactinoma and prolactin-producing pituitary carcinoma. Joint Neurosurgical Convention 2010, 2010.1.24 (Hawaii, USA)
 - 7) Matsuno A, Murakami M, Mizutani A, Asano S, Ishida Y, Okinaga H: Temozolomide is not effective for recurrent pituitary carcinoma transformed from atypical adenoma. 21st Annual Meeting of Asaia-Pacific Endocrine Conference 2010.1.10 (Taipei, Taiwan)
 - 8) Matsuno A, Murakami M, Mizutani A, Asano S, Yamazaki K, Ishida Y, Okinaga H: Temozolomide is not effective for recurrent pituitary carcinoma transformed from atypical adenoma. The 9th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry 2009.11.5 (南寧、中国)
 - 9) Matsuno A, Murakami M, Mizutani A, Asano S, Ishida Y, Okinaga H: Temozolomide is not effective for recurrent pituitary carcinoma transformed from atypical adenoma. The 11th International Pituitary Pathology Society (IPPS) Meeting 2009.10.19 (Awaji, Japan)
 - 10) Katakami H, Genga S, Kawa S, Fujii S, Okajima T, Ishikawa E, Nishina Y, Sugihara H, Kurita M, Hizuka N, Yamada S, Matsuno A, Hashida S: Ectopic acromegaly due to extracranial GHRH-producing tumors in Japan: Prevalence and clinical features. The 11th International Pituitary Congress 2009.6.13-15 (Washington D.C., U.S.A.)
 - 11) Matsuno A, Murakami M, Nakaguchi H, Sasaki M, Uno T, Ide F, Tanaka H, Fujimaki T: Intravenous rituximab combined with temozolomide as a second line therapy for CD20 positive primary central nervous system malignant lymphoma. The 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, jointly with The 6th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology 2009.5.14 (Yokohama, Japan)
 - 12) Matsuno A: In situ hybridization with quantum dot detection and confocal scanning microscopy for three-dimensional visualization of protein and mRNA: comparison with electron microscopic in situ hybridization. The 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry 2008.8.27 (Gdansk, Poland)
 - 13) Matsuno A, Nakashima M, Takano K, Yasufuku-Takano J, Mizutani A, Osamura RY, Takei M, Tahara S, Teramoto A, Yamada M, Yamazaki K, Ishida Y, Katakami H, Ide F, Miyawaki S, Uno T, Tanaka J, Asano S, Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M: Contribution of factors influencing the acute effect of octreotide in GH-secreting adenomas. 19th Annual Meeting of Asaia-Pacific Endocrine Conference 2008.1.13 (Suzhōu, China)
- 〔図書〕 (計 13 件)
- 1) Matsuno A, Mizutani A, Itoh J, Utsunomiya H, Takekoshi S, Osamura RY: Nova Science Publishers, Inc. Progress in Laser and Electro-Optics Research. 2010, pp 89-104
 - 2) Matsuno A: Nova Science Publishers, Inc. Antisense Elements (Genetics) Research Focus. 2008, pp179-198
 - 3) Matsuno A, Mizutani A, Takekoshi S, Osamura RY, Itoh J, Ide F, Miyawaki S, Uno T, Asano S, Tanaka J, Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M, Okinaga H: Nova Science Publishers, Inc. Quantum Dots:

Research, Technology and Applications.
2008, pp415-427

- 4) Matsuno A, Mizutani A, Takekoshi S,
Osamura RY, Itoh J, Takano K, Ide F,
Miyawaki S, Uno T, Asano S, Tanaka J,
Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M,
Okinaga H: Nova Science Publishers,
Inc. New Research on Neurosecretory
Systems. 2008, pp17-31

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 彰 (MATSUNO AKIRA)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号: 00242058

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

水谷 晃子 (MIZUTANI AKIKO)

帝京平成大学・健康メディカル学部・助教

研究者番号: 80465252