

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：10107
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K08505
 研究課題名(和文) 余剰分泌顆粒のゆくえ：GnRH誘導体を活用した新規クリノファジー解析実験系の構築

研究課題名(英文) A novel experimental framework by using GnRH analogues to clarify the intracellular degradation processes of organelle outdated in their target cells/organs.

研究代表者
 渡部 剛 (Watanabe, Tsuyoshi)
 旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：80220903
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌細胞に滞留して陳旧化した分泌顆粒の処理過程には不明の点が多い。本研究では、下垂体前葉のLH/FSH産生細胞に対するGnRH誘導体の作用の差に着目して、この陳旧化した分泌顆粒の特徴や運命を解明するための新規動物実験系の構築を試みた。その結果、GnRHアゴニストあるいはアンタゴニストの徐放性製剤を投与した雄ラットの血漿LH濃度の経時的推移、標的細胞/器官である下垂体のLH/FSH産生細胞の微細構造や精巣の萎縮過程には明瞭な差が認められ、GnRH誘導体を用いるラット実験モデルの妥当性が裏付けられた。今後さらに分泌顆粒の基質蛋白欠損マウスも活用し、この実験系の有用性について検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、臨床的に前立腺がんのホルモン治療薬として用いられているGnRH誘導体の徐放性製剤を投与したラット実験モデルを新たに確立し、その標的臓器である下垂体や精巣における組織学的変化を詳細に明らかにしたものである。本研究によって、精巣や下垂体に対するGnRH誘導体の薬理作用に関して新しい知見が付加され、将来的にはGnRH誘導体徐放性製剤の新たな活用法や望ましくない副作用の軽減方法の開発に寄与・貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The putative differences in the effects of GnRH agonists and antagonists on their target organs/cells were analyzed in the present study. In the testicular seminiferous tubules, massive exfoliation of premature spermatids and anomalous multinucleated giant cells was observed in shortly after administration of GnRH agonist leuprorelin, whereas no discernible changes were found in those of GnRH antagonist degarelix-treated rats, although long term treatment with both types of GnRH analogues similarly induced a marked reduction of the epithelium. In the pituitary gonadotropes of degarelix-treated rats, crinophagy-like structures appeared and the residual hormones were gradually degraded. These findings clearly demonstrated the differences in the effects of GnRH agonists and antagonists on the target organs, and the comparison of their cytological and histological effects will provide a novel experimental framework to clarify the intracellular processes in the target organs.

研究分野：解剖学、細胞生物学、実験内分泌学

キーワード：視床下部-下垂体-精巣系 GnRH誘導体 性腺刺激ホルモン産生細胞 曲精細管上皮 分泌顆粒 グラニ
 ン蛋白 クリノファジー 電子顕微鏡観察

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

生体で高度に分化したペプチドホルモン分泌性の内分泌細胞では、生合成されたホルモンは細胞内の分泌顆粒に一定量蓄積される。このホルモンは、特異的な分泌刺激にตอบสนองして開口放出されるが、細胞内の分泌顆粒の量や質の恒常性を維持する機構については不明の点が多い。

研究代表者はこれまで、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞 (LH/FSH産生細胞) を主たる研究対象として、ゴルジ装置からの分泌顆粒形成機構やホルモン選別輸送機構について解析してきた。この細胞固有のホルモンであるLHとFSHの生合成と開口放出は、視床下部の神経分泌ニューロンから下垂体門脈に放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) により促進される。この液性調節機構を基盤として、臨床的には既にGnRHのアミノ酸配列を改変したGnRH誘導体が前立腺癌など性ホルモン感受性のある疾患の治療に用いられている。

GnRH誘導体は、薬理作用の面から、LH/FSH産生細胞に対して促進的なアゴニストと抑制的なアンタゴニストの大きく2種類に分類される。しかし、強力なアゴニストも持続的に投与するとGnRH受容体の不応現象を誘起し逆説的にホルモン生合成・分泌を強く抑制するので、臨床的には両者とも徐放性製剤化されて持続的にLHとFSHの分泌を抑える目的で用いられてきた。ただし、我々が先行研究で明らかにしたように、GnRHアゴニスト徐放性製剤をラットに投与すると、投与直後にまず本来の強い分泌促進作用により標的細胞であるLH/FSH産生細胞で分泌顆粒の大量放出が起こり、その時点までに細胞内に蓄積されていた古い分泌顆粒が一掃され、その後、GnRH受容体不応現象が誘起されて新たなLHやFSHの生合成・放出が強く抑制される (Kitahara et. al. (2007) Arch Histol Cytol 70, 79-93)。

一方で、アゴニストと本来対照的な作用を発揮するGnRHアンタゴニスト徐放性製剤投与では、投与直後の分泌顆粒の大量放出が起こらず、投与開始時点で細胞内に蓄積していた分泌顆粒は細胞内に保持されることが予想されていた。しかし、GnRHアンタゴニスト徐放性製剤投与後のLH/FSH産生細胞の分泌顆粒の微細構造や機能分子局在の変化を経時的に検討した研究は、この研究開始時点までなかった。

内分泌細胞内で長く貯留して古くなったホルモンあるいはホルモンを含む分泌顆粒の処理過程については、これまでクリノファジー (crinophagy) と呼ばれる現象が報告されてきた

(Farquhar (1977) Adv Exp Med Biol 80:37-94; Halban (1991) Diabetologia 34:767-78)。透過電顕では、複数の分泌顆粒のコアが不定形の膜で囲まれて細胞質から隔離される像として観察され、ここにリソソームが融合して余剰のホルモンなどが分解されると推測されている。しかし、これまで再現性の高い解析実験系がなかったため、内分泌細胞内で陳旧化した分泌顆粒を識別し選択的に分解処理する機構については解明が進んでいなかった。

そこで、上述したGnRHアゴニストとアンタゴニストがLH/FSH産生細胞で発揮する作用の違いに着目して、その差分を取り形態学と生化学の両面から解析すれば、細胞内で陳旧化した余剰分泌顆粒の処理/再利用機構を解明できるのではないかと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

上述した学術的背景を踏まえて、本研究期間内には、以下の研究目標を立てて検討した。

(1) まず、GnRH誘導体、特に研究開始時点まで先行研究がほとんどなかったGnRHアンタゴニストの徐放性製剤をウィスター系雄ラットに投与して、その結果生じる視床下部-下垂体前葉LH/FSH細胞-精巣系の微細構造や機能分子局在の経時的な変化を解析することで、この液性調節系に対するGnRHアゴニストとアンタゴニストの作用の違いを明らかにする。

(2) 次に、下垂体前葉LH/FSH産生細胞で分泌顆粒内のホルモンと基質蛋白であるグラニン蛋白の量比や分泌顆粒の微細構造の変化を明らかにし、GnRH誘導体徐放性製剤投与ラットモデルが、陳旧化した分泌顆粒の処理機構の詳細を解析する実験系として有用かどうか検証する。

このような解析を通して、内分泌細胞の恒常性維持に深く関わる分泌顆粒の品質管理機構を解明するための新たな動物実験モデルを確立したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) GnRH誘導体持続投与動物モデルの作成と標本採取

下垂体前葉のLH/FSH産生細胞におけるLHとFSHの生合成・分泌に影響を与えるGnRH誘導体は、LHとFSHの産生・分泌を強く促進 (GnRHアゴニストの急性期) したり抑制 (GnRHアンタゴニストおよびアゴニストの持続的作用) したりする。そこで、本研究期間には以下のラット実験群を設定し、血中ホルモン濃度、精巣の組織学的変化、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造変化や機能分子の局在変化を比較・検討した。

① GnRHアンタゴニスト持続投与によるLH/FSH産生細胞の長期抑制

この実験モデルは、8週齢のウィスター系雄ラットの背部皮下に、2mg/kg体重のdegarelix徐放性製剤 (アステラス製薬) を単回注射することで作成した。同剤は強力なGnRHアンタゴニストdegarelixがマイクロカプセル化された製剤で、1ヶ月間にわたって有効量のdegarelixが放出される。本研究では、同剤の投与開始から、1日後、2日後、4日後、7日後、14日後、21日後、28日後に、後述する方法で血液、下垂体組織及び精巣を採取し、解析に供した。

② GnRHアゴニスト持続投与によるLH/FSH産生細胞の一過性刺激および長期抑制

この実験モデルは、8週齢のウィスター系雄ラットの背部皮下に、1.5mg/kg体重のleuprorelin徐放性製剤 (武田薬品工業) を単回注射することで作成した。同剤は強力なGnRHアゴニストleuprorelinがマイクロカプセル化された製剤で、1ヶ月間にわたって有効量のleuprorelinが放出される。本研究では、GnRHアンタゴニスト持続投与群と同様に、同剤の投

与開始から、1日後、2日後、4日後、7日後、14日後、21日後、28日後に、後述する方法で血液、下垂体組織及び精巣を採取し、解析に供した。

(2) 生化学的解析法

① 実験群ラットからの血液及び下垂体及び精巣組織の採取

GnRH誘導体持続投与の効果を検証する目的で、上記の実験群ラットをケタミン/キシラジン混合液の腹腔投与で深麻酔した後、下大静脈よりヘパリン化した注射筒で全血を採取した。採取した血液は直ちに遠心分離し、得られた血漿は氷上で分注した後、 -80°C で凍結保存して、生化学的解析に供した。この脱血死させた直後のラットから下垂体及び精巣組織を切除し、下垂体は液体窒素で急速凍結後、 -80°C で凍結保存して、生化学的解析に供した。精巣は、ブアン固定液で浸漬固定（室温、48時間以上浸漬）した後、常法に従いパラフィン包埋組織標本を作成し、後述する組織学的検討に供した。

② 血漿LH濃度の測定

各実験群4匹のラット血漿中のLH濃度は、市販のELISAキット（Endocrine Technologies社、rodent LH ELISA test kit）を用いて測定し、3回反復した測定値の平均を各ラット個体の血漿LH濃度とした。得られた値は、まずGnRHアゴニスト投与実験群とGnRHアンタゴニスト投与実験群のそれぞれにおける血漿LH濃度の経時的変動の有意性の有無を1元配置分散分析法で検証した後、Tukey HSD post-hoc testで任意の2実験群間での差の有意性を検討した。

③ イムノブロット法による下垂体組織抽出液中のグラニン蛋白量の量的変化の評価

各実験群ラットから採取した凍結下垂体組織をホモジェナイズして組織抽出液を作成し、常法に従い還元条件下でSDS-PAGEによる蛋白の分離、PVDF膜への転写を行った後、抗クロモグラニンA (CgA) 抗体および抗セクレトグラニンII (Sg2) 抗体で免疫染色し、下垂体組織におけるこれら2つのグラニン蛋白の発現量や分子量の経時的変化を評価した。

(3) 形態学的解析法

① 精巣曲精細管の組織学的検討

上述した生化学的解析用に脱血死させた各実験群のラットから採取しブアン固定/パラフィン包埋した精巣組織標本より 5μ 厚のパラフィン切片を作成し、常法に従いヘマトキシリン-エオシン染色を施した後、曲精細管の組織学的変化を光学顕微鏡観察で解析した。

② 下垂体及び精巣組織のOCT包埋凍結組織標本と樹脂包埋標本の作成

光顕免疫組織化学用の組織標本は、上述したGnRH誘導体徐放性製剤投与群ラットおよび無処置対照群ラット（ウイスター系雄ラット、8-12週齢）を4%パラホルムアルデヒドと4%スクロースを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.4）で灌流固定して作成した。灌流固定した動物から切り出した下垂体及び精巣の各組織の半分は、氷晶防止処理を施した後、OCTコンパウンド中で凍結させ包埋した（凍結切片作成用標本）。また、固定した組織の残りの半分は、常法に従いエタノール系列で脱水し、プロピレンオキサイドを仲介剤としてEpon812樹脂を浸透させた後、樹脂を重合（24時間、 60°C ）させ包埋した（連続準超薄切片による解析用標本）。

微細構造の解析を目的とした電顕観察用組織標本は、2%グルタルアルデヒドと2%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.4）で上記ラットを灌流固定して作製した。灌流固定した動物から切り出した下垂体および精巣組織を1%OsO₄溶液で後固定（2時間、 4°C ）した後、常法に従いEpon812樹脂に包埋した。

また、電顕免疫組織化学用の組織標本は、0.5%グルタルアルデヒド、0.5%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.4）で上記ラットを灌流固定して作製した。灌流固定した動物から切り出した下垂体組織は速やかに細切し、さらに0.5%OsO₄を含む0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.4）で浸漬固定（1時間、 4°C ）した。固定された下垂体組織は、1%隣タングステン酸を含む70%エタノールで脱水した後、L.R.white樹脂に包埋した。

③ 免疫組織化学標識

本研究で用いた下垂体前葉ホルモンに対する抗体、グラニン蛋白に対する抗体、精巣の機能蛋白に対する抗体、ゴルジ装置など細胞内小器官のマーカー蛋白に対する抗体の入手先や特異性・希釈倍率に関しては、先行研究（Sakai et. al. (2003) J Histochem Cytochem 51:227-238; Watanabe et. al. (2012) J Histochem Cytochem 60:588-602）および研究成果欄の論文（Hori et. al.(2018) Biomedical Research (Tokyo) 39:197-214）に詳細に記載した。

抗原局在部位の可視化は、光顕レベルの蛍光抗体法ではAlexaFluor 405、488、594、633標識ロバ抗ウサギ-、マウス-、ヤギ-、およびヒツジ-IgG抗体（Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific）を、電顕レベルの金コロイド標識法では5nmと15nmの金コロイド粒子で標識されたヤギ抗ウサギ-、マウス-IgG抗体（British Biocell International）を用いて行った。

光顕レベルの蛍光抗体法による標識の方法については、研究成果欄の論文（Hori et. al.(2018) Biomedical Research (Tokyo) 39:197-214）に詳細に記載した。得られた切片は封入後、共焦点レーザー顕微鏡（オリンパス）で観察・記録した。

電顕レベルの金コロイド法による標識方法については、先行研究の論文（Watanabe et. al. (2012) J Histochem Cytochem 60:588-602）に詳細に記載した。具体的には、L.R.white樹脂包埋した下垂体組織標本から超薄切片を作成し、5%正常ヤギ血清による非特異的吸着のブロッキングを経て、一次抗体を結合させた（12時間、 4°C ）。一次抗体の結合反応後、0.1%BSA含有0.5 M NaCl - 0.02MTris-HCl緩衝液（pH 8.2）で良く洗浄し、さらに金コロイド標識抗ウサギあるいはマウスIgG抗体（金コロイド径：5、15nm）を結合（1時間、 20°C ）させるこ

とで抗原の局在部位を可視化した。なお、2重標識が必要な場合には、Bendayan (1982) の方法に基づいて行った。金コロイド標識した切片は、電子染色を施した後、H-7650透過型電子顕微鏡（日立ハイテクノロジーズ）を用いて観察した。

④ 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた曲精細管上皮の立体組織構築及び微細構造の解析

新潟大学の牛木辰男博士が確立したKOH消化法 (Ushiki and Ide (1988) Arch Histol Cytol 51:223-232) に従って、2%グルタルアルデヒドを含む固定液で前固定したGnRH誘導体持続投与後の各実験群のラット精巣組織を60°Cの30% KOHで8分処理し結合組織中の膠原線維を選択的に除去した後、曲精細管上皮の立体組織構築の変化をSEMを用いて解析した。

また、連携研究者である本学の甲賀大輔准教授が確立した反射電子像を用いた樹脂包埋切片のSEM観察法 (BSE-SEM観察法; Koga et. al. (2015) Microscopy (Oxf) 64:387-394) で、L.R.white樹脂包埋した精巣組織標本の準超薄切片を観察し、各実験群における曲精細管上皮の微細構造変化を解析した。

4. 研究成果

(1) GnRH誘導体持続投与動物モデルの妥当性の検証

GnRH誘導体持続投与ラットモデルの妥当性を評価するために、まずGnRHアゴニスト leuprorelinおよびアンタゴニスト degarelixの徐放性製剤投与後の血漿LH濃度と精巣重量の経時的变化を比較した。

① 血漿LH濃度の経時的推移

血漿LH濃度については、GnRHアゴニスト leuprorelin投与群では、その本来のLH/FSH細胞刺激作用により投与直後に顕著に上昇した後、受容体不応現象が惹起されて投与から2日目までに測定下限値近くまで低下し、以降28日目まで低値が持続した。一方、GnRHアンタゴニスト degarelix投与群では、投与直後から血漿LH濃度は測定下限値以下に低下し、以降28日目までこの状態が持続した。

② 精巣重量の経時的推移

精巣重量については、leuprorelin投与群では、投与直後から7日目までに対照群の1/2程度まで急激に低下し、その後、漸減して28日目には1/3程度まで低下した。一方、degarelix投与群では、投与直後から7日目までは精巣重量の変化は軽度であったが、その後、14日目までに対照群の1/3程度まで急激に低下し、28日目にはleuprorelin投与群よりも低い対照群の1/4程度の重量になった。

以上の所見から、leuprorelinとdegarelixのどちらも、徐放性製剤投与4週間後には視床下部-下垂体-精巣系を強く抑制し精巣の顕著な萎縮を引き起こすが、その萎縮に至る経時的变化については両者で明瞭な違いがあることが明らかになった。

(2) GnRH誘導体持続投与がラット精巣の曲精細管の組織構築に及ぼす影響

精巣重量の経時的变化に関してGnRHアゴニスト leuprorelin投与群とアンタゴニスト degarelix投与群で明瞭な差が認められたので、当初の研究計画には含まれていなかったが、さらに、精巣組織像、曲精細管壁の微細構造、血液精巣関門構成機能分子の局在について光学及び電子顕微鏡観察、免疫組織化学法を用いて解析し、これらのGnRH誘導体が曲精細管上皮に与える影響の差異について検討を進めた。

① 精巣曲精細管における組織学的変化

leuprorelin投与群では、投与直後から未成熟の精子細胞が大量に管腔内に剥落するとともに、異形の多核巨細胞が曲精細管内に出現した。同時に曲精細管壁の萎縮が経時的に進行し、曲精細管径は28日目には対照群の1/2まで減少した。一方、degarelix投与群では、投与開始から7日目までは曲精細管に明らかな組織学的変化は認められなかったが、その後、曲精細管壁の萎縮が急激に進行し、曲精細管径は28日目にはleuprorelin投与群と同様に対照群の1/2弱まで減少した。この経過中、degarelix投与群でも未成熟の精子細胞の管腔内への剥落は観察されたが、多核巨細胞は観察期間中、ほとんど認められなかった。

② 曲精細管壁の微細構造に対する影響

電子顕微鏡観察では、GnRHアゴニスト leuprorelin投与群で徐放性製剤投与4日後をピークとして特異的に曲精細管に出現した多核巨細胞には5~20個の核が観察され、他の未成熟な精子細胞とともに管腔内に剥落しているものも認められた。この多核巨細胞が高い頻度で観察されたleuprorelin投与群の曲精細管上皮では全般に曲精細管上皮の細胞配列が著しく乱れていたのに対して、対照群およびGnRHアンタゴニスト degarelix投与群では、尾部が伸長した成熟精子が上皮上端に整列する曲精細管断面も認められた。

そこで、差が最も著しかった徐放性製剤投与後7日目の時点での曲精細管上皮の微細構造を比較観察したところ、leuprorelin投与群では、精子細胞間に伸びていたSertoli細胞の細胞突起が基底方向に著しく退縮し、未成熟の精子細胞が管腔に大量に剥落していた。高頻度で曲精細管内に観察された多核巨細胞の細胞質には先体の遺残物と思われる電子密度の高い小胞や発達したゴルジ装置など精子細胞特有の構造が多数観察され、その核の一部では、核辺縁部へのクロマチンが輪状に集積しており、この巨細胞がアポトーシスによる変性過程にある可能性が示唆された。一方、degarelix投与群では、投与開始から7日目の時点でも、柱状に積層した造精系細胞の間をSertoli細胞の細胞突起が埋めており、曲精細管上皮基底部分における精祖細胞の分裂・増殖過程も障害されていなかった。しかし、この後、degarelix徐放性製剤投与後14日目より、Sertoli細胞の細胞突起が基底方向に退縮し始め、投与開始後28日目には、Sertoli細胞の細

胞突起の退縮が著しく精子細胞の大部分が未成熟の球形の状態のまま管腔に大量に剥落し、曲精細管上皮の表面には大型の精母細胞が直接露出していた。これらの所見は、走査型電子顕微鏡によるKOH消化法で処理した曲精細管壁の立体微細構造観察でも確認された。

③ GnRHアゴニストとアンタゴニスト持続投与で生じる曲精細管の組織構築の変化の差異

以上の所見をまとめると、GnRH誘導体が下垂体前葉のLH/FSH産生細胞に持続的に作用すると、アゴニストではGnRH受容体の不応化現象、アンタゴニストではGnRH受容体に対する強力な競合阻害が起こり、LHとFSHの分泌が強く抑制され、その結果、曲精細管上皮では、柱状に積層した精子細胞の間に伸長するSertoli細胞の細胞突起が時間経過とともに基底側に退縮し、足場を失った精子細胞が成熟前に管腔へ剥落して、上皮表面に大型の精母細胞が露出した。ただし、GnRHアゴニスト特有の影響として、曲精細管ではSertoli細胞-造精細胞間の接着構造が離開して、未成熟な精子細胞の管腔への早期剥落と多核巨細胞化が誘起され、曲精細管の萎縮はアンタゴニスト投与群に比べて速やかに起こった。この変化は投与開始直後に一過性に発揮されるアゴニスト本来の強力なLHとFSHの分泌刺激作用によるものと思われた。一方、GnRHアンタゴニスト持続投与では曲精細管上皮の形態学的変化は緩徐であったが、時間経過とともにSertoli細胞への脂肪滴の蓄積が顕著になったことから、曲精細管上皮内で陳旧化した精子細胞はSertoli細胞により貪食処理されることが示唆された。この現象は、GnRHアンタゴニスト持続投与群では投与開始当初からLHとFSHの分泌が強力に抑制されるため、曲精細管における精子成熟・精子放出過程が阻害された結果、起こると考えられた。これらの観察所見から、GnRH誘導体の徐放性製剤投与は、アゴニストとアンタゴニストの両者とも最終的には曲精細管の萎縮をもたらすものの、その萎縮に主な至る過程は、アゴニストとアンタゴニストで明瞭に異なることが明らかになり、この両者の薬理作用の違いに着目したラット実験モデルの妥当性が実証された。なお、このGnRH誘導体徐放性製剤が精巣の曲精細管上皮の構造に及ぼす影響の詳細については、研究成果欄の雑誌論文 (Hori et. al.(2018) Biomedical Research (Tokyo) 39:197-214) で発表した。

(3) GnRH誘導体持続投与がラット下垂体前葉のLH/FSH産生細胞の分泌顆粒の量や機能分子局在に及ぼす影響

上述したGnRH誘導体持続投与後の精巣の組織・細胞学的変化の解析と並行して、GnRH誘導体の直接的な標的細胞である下垂体前葉のLH/FSH産生細胞の解析も進めた。

その結果、GnRHアンタゴニストdegarelix投与群では、予想した通りGnRHアゴニストleuprorelin投与群で見られたような急性期の分泌顆粒の大量放出は起こらず、細胞内の分泌顆粒の体積率、分泌顆粒径のどちらについても、無処置対照群と統計的に有意な差は認められなかった。しかし、免疫組織化学法で分泌顆粒内のホルモンであるLHと分泌顆粒基質であるクロモグラニンA (CgA)およびセクレトグラニンII (Sg2)の発現や局在の変化を経時的に調べたところ、degarelix投与群では投与開始14日後から28日後に細胞内のLH量は著減し、相対的に分泌顆粒基質蛋白であるグラニン蛋白CgAとSg2の蓄積の方が優位になることが明らかになった。このdegarelix徐放性製剤投与後の下垂体前葉におけるグラニン蛋白量の経時的変化は、組織抽出液のイムノブロット解析でも確認された。これらの所見は、GnRHアンタゴニスト作用下でLH/FSH産生細胞内に貯留したままの分泌顆粒あるいは顆粒内部に蓄積されているLHが何らかの機構で選択的に分解処理され次第に細胞内から消失することを示唆するものと思われた。

そこで、さらにGnRHアンタゴニスト持続投与実験群ラットのLH/FSH産生細胞の微細構造を電子顕微鏡で経時的に観察したところ、投与開始14日後から28日後の同細胞内で、特異な膜系構造物が分泌顆粒のコアを隔離することを示す像が高頻度に認められた。この所見をもとに、同細胞内でクリノファジー様の分泌顆粒処理過程が起きている可能性を考え、オートファジーマーカーであるp62、LC3、Atg16L、およびリソソーム酵素カテプシンDの発現の有無について、光顕/電顕レベルの免疫組織化学法とイムノブロット法で検討したが、今までのところ、これらの分子がGnRHアンタゴニスト持続投与実験群ラットのLH/FSH産生細胞で特異的に発現/蓄積する所見は得られていない。

(4) 本研究の総括と今後の展望

本研究では、陳旧化した内分泌顆粒の認識・処理機構を解析するための新たな動物実験モデルの確立を目指して、下垂体前葉のLH/FSH産生細胞に作用する2種類のGnRH誘導体、アゴニストのleuprorelinとアンタゴニストのdegarelixの徐放性製剤をラットに投与して、その視床下部-下垂体前葉-精巣系の液性調節系に対する影響の差異について検討した。

その結果、視床下部-下垂体前葉-精巣系の液性調節の最終的な標的臓器である精巣曲精細管でleuprorelinとdegarelixが明瞭に異なる組織学的変化をもたらすことが初めて明らかになり、本研究の当初の着想である「GnRHアゴニストとアンタゴニストの影響の差分を取ることで標的細胞における様々な生命現象を解明する新たな実験系を確立する」という目標は達成できた。特に本研究では、当初計画していなかった曲精細管Sertoli細胞における余剰/陳旧化した精子の処理過程に関して、新規の知見を得られたのは大きな成果と思われる。

一方、当初の着眼点であった下垂体前葉のLH/FSH産生細胞における余剰の分泌顆粒の処理/再利用過程の解明に関しては、クリノファジー様現象を示唆する所見が得られたものの、その分子細胞生物学的なメカニズムの解明にまでは至らなかった。この問題に関しては、今後、分泌顆粒基質であるグラニン蛋白の欠損マウスで同様のGnRH誘導体持続投与モデルを構成し、さらなる知見が得られないかどうか検討を続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Sato Eri, Maeda Yoshinori, Sato Yui, Hinata Airi, Gomi Hiroshi, Koga Daisuke, Torii Seiji, Watanabe Tsuyoshi, Hosaka Masahiro | 4. 巻 476 |
| 2. 論文標題 Culture in 10% O2 enhances the production of active hormones in neuro-endocrine cells by up-regulating the expression of processing enzymes | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical Journal | 6. 最初と最後の頁 827 ~ 842 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20180832 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Koga D, Kusumi S, Watanabe T | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Backscattered electron imaging of resin-embedded sections. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Microscopy | 6. 最初と最後の頁 196-206 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfy028 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Hori JI, Koga D, Kakizaki H, Watanabe T | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Differential effects of depot formulations of GnRH agonist leuprorelin and antagonist degarelix on the seminiferous epithelium of the rat testis. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biomed Res | 6. 最初と最後の頁 197-214 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.39.197 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Koga D, Kusumi S, Ushiki T, Watanabe T | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 Integrative method for three-dimensional imaging of the entire Golgi apparatus by combining thiamine pyrophosphatase cytochemistry and array tomography using backscattered electron-mode scanning electron microscopy. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biomed Res | 6. 最初と最後の頁 285-296 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.38.285 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Maeda Y, Kudo S, Tsushima K, Sato E, Kubota C, Kayamori A, Bochimoto H, Koga D, Torii S, Gomi H, Watanabe T, Hosaka M | 4. 巻 159 |
| 2. 論文標題 Impaired processing of prohormones in secretogranin III null mice causes maladaptation to an inadequate diet and stress. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 1213-1227 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2017-00636 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡部剛、甲賀大輔、穂坂正博 |
| 2. 発表標題 セクレトグラニンIII (SgIII) ノックアウトマウスで見られた内分泌学的ストレスに対する脆弱性 |
| 3. 学会等名 第65回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡部剛、甲賀大輔 |
| 2. 発表標題 分泌動線とゴルジ装置の大局的構造を指標とした分泌細胞の類型化 |
| 3. 学会等名 日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡部 剛、堀 淳一、柿崎 秀宏、甲賀 大輔 |
| 2. 発表標題 GnRH誘導体持続投与により生じるラット曲精細管の組織学的変化 |
| 3. 学会等名 第63回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡部 剛、堀 淳一、柿崎 秀宏、甲賀 大輔 |
| 2. 発表標題 GnRH agonistとantagonist持続投与により生じるラット曲精細管の組織学的変化の比較 |
| 3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 連携研究者 | 甲賀 大輔 (Koga Daisuke) (30467071) | 旭川医科大学・医学部・准教授 (10107) | |
| 連携研究者 | 穂坂 正博 (Hosaka Masahiro) (80311603) | 秋田県立大学・生物資源科学部・教授 (21401) | |