

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590224
 研究課題名（和文）細胞増殖に関するエストロゲン感受性のラット系統差の発現機構の解明
 研究課題名（英文）Rat strain difference in estrogen responsiveness of cell proliferation
 研究代表者
 有田 順 (ARITA JUN)
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
 研究者番号：80128587

研究成果の概要：

エストロゲンに対する下垂体前葉のプロラクチン産生細胞の増殖反応には著しい系統差が見られる。本研究はこの系統差の発現機構の解明を目指した。エストロゲン高反応性の Wistar 系および低反応性の Wistar-Kyoto 系のラットの下垂体初代培養細胞を実験モデルとして用いた。多くの増殖刺激を培養プロラクチン細胞を用いて調べた結果、insulin-like growth factor-I に対する増殖反応性の違いが系統差発現に関与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：発達・成長・老化、内分泌

1. 研究開始当初の背景

エストロゲンの標的細胞の増殖に対する作用は、周知の促進作用だけでなく抑制作用も存在することが明らかになってきている。既に我々は代表的なエストロゲン感受性細胞である下垂体前葉のプロラクチン産生細胞の初代培養において、この対立する二つのエストロゲン作用が細胞環境依存性に現れることを明らかにし、エストロゲンによる細胞増殖の変化はエストロゲンの

促進作用と抑制作用の両者のバランスを反映していることを示唆した。このバランスの破綻がエストロゲン感受性腫瘍の発症に関与する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

in vivo に投与されたエストロゲンは、下垂体前葉のプロラクチン産生細胞に作用して細胞増殖を促進することによって下垂体重

量を増加させ、この長期投与はプロラクチン産生下垂体腫瘍を誘発させる。このようなエストロゲンによるプロラクチン産生細胞の増殖促進は、ヒトを含めた多くの動物種で報告されているが、興味深いことには一部のラットの系統では全く認められない。このような系統で見られるプロラクチン産生細胞の増殖に関するエストロゲン非感受性の発現機構は解明されていない。

そこで本研究では、プロラクチン産生培養細胞をモデルとして、細胞増殖に関するエストロゲン感受性の系統差の発現機構を解明するために、以下のことを調べる。

(1) エストロゲン非感受性ラットのプロラクチン産生細胞において、エストロゲンの増殖促進作用および抑制作用がどのように変化しているか？

(2) エストロゲン非感受性ラットの細胞において、エストロゲン反応性遺伝子の発現はどのように変化しているか？

3. 研究の方法

実験動物は、SLC 8 週令の Wistar 系 (slc:Wistar/ST) および Wistar-Kyoto (WKY/Hos) (WKY) 系メスラットを用いた。プロラクチン細胞の増殖率は、増殖マーカーである BrdU 投与による BrdU 標識率をプロラクチン免疫陽性細胞を対象として求めた。下垂体前葉はメスラットから摘出し、酵素処理によって単一細胞に分散後、無血清培養下で培養し、実験に用いた。無血清培養には、0.1% BSA, 10 µg/ml bovine transferrin, 40 nM sodium selenite, 30 µM ethanolamine, 100 pM triiodothyronine, 5 mM ethanol を supplement として添加した D-MEM/F-12 培地を用いた。エストロゲン感受性遺伝子の発現は、培養細胞より total RNA を既報の方法で抽出後、quantitative real time PCR 法で定量した。

4. 研究成果

(1) 本研究で用いる Wistar 系および Wistar-Kyoto (WKY) 系ラットの間、プロラクチン産生細胞増殖に関するエストロゲン感受性に系統差が存在することを *in vivo* 条件下で確認した。estradiol valerate 2 mg 皮下投与3週間後には、下垂体前葉湿重量が Wistar 系では2.8倍に増加していたが、WKY系では1.3倍にしか増加していなかった。BrdU法によるプロラクチン細胞の増殖率は Wistar 系では1.9%であったのに対して WKY 系では0.6

%であった。

(2) *in vivo* においてプロラクチン産生細胞に対するエストロゲンの増殖促進作用が強い Wistar 系と、増殖促進作用が弱い Wistar-Kyoto (WKY) 系の違いを、無血清初代培養細胞を用いて検討した。基礎増殖レベルには両者の間で違いが見られなかった。forskolin 投与による細胞内 cAMP 増加による増殖にも違いがみられなかったが、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) による増殖のレベルは WKY の方が低かった。エストロゲンの作用に関して調べた結果、IGF-1 存在下の抑制作用および、forskolin あるいは dextran-coated charcoal 処理血清の存在下の促進作用には両者の間に違いはなかった。また、エストロゲン単独長期投与による促進作用にも違いは認められなかった。

(3) IGF-1 に対する増殖反応の系統差を詳細に調べるために、用量反応性を検討した。WKY 系のプロラクチン産生細胞では、Wistar 系のプロラクチン産生細胞に比較して、1 から 30 ng/ml の IGF-1 に対する増殖促進反応性が減弱していた。

(4) IGF-1 以外の成長因子に対する増殖反応性が WKY 系で変化している可能性が考えられるので、プロラクチン産生細胞の増殖に影響を及ぼすことが知られている増殖刺激に関して用量反応性を調べた。TGFβ3 はプロラクチン産生細胞の増殖を抑制したが、この抑制作用に関して両系統間で違いは見られなかった。また、fetal calf serum はプロラクチン産生細胞の増殖を促進したが、この促進作用に関して両系統間で違いは見られなかった。さらに、これらの増殖刺激の作用に対するエストロゲンの修飾作用に対しても両者の系統差は認められなかった。

(5) ドーパミンはプロラクチン産生細胞の増殖に関する抑制性の視床下部調節因子として知られているので、ドーパミンに対する増殖反応性の系統差、およびドーパミン作用に対するエストロゲンの修飾作用に関する系統差を調べた。ドーパミン作動薬である bromocriptine の単独作用およびエストロゲンによる増殖抑制の減弱に関して、両者の系統差は認められなかった。

(6) エストロゲン反応性遺伝子の発現に関する実験は現在進行中である。これまでの実験によって、Wistar 系ラットの下垂体細胞

では、エストロゲン投与4時間後に、Wnt4, Pdlm3, Abcg2, Rasd1, Prkag2, Ephb2, Pim3, Jdp1, Nfix, Gas6等の遺伝子発現が増加し、一方、Nptx1, Giot1, Stc1, mybl1, Jag2, Nfkb2, Sema3a, Phlda1, Sepine1, Fosl1, Sept9, Bcl3等の遺伝子発現が減少することが明らかになった。

以上の実験結果より、WKY系のプロラクチン産生細胞のエストロゲンに対する増殖反応性の低下の原因としてIGF-1に対する増殖促進反応性が考えられる。

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6件)

- ① Z Wang, T Mitsui, M Ishida, J Arita
Adenovirus vectors differentially modulate proliferation of pituitary lactotrophs in primary culture in a mitogen and infection time-dependent manner. *Journal of Endocrinology* 198:209-217, 2008. 査読あり
- ② M Ishida, J Arita,
Dopamine inhibition of estrogen receptor activity in pituitary lactotrophs. *Journal of Physiological Sciences* 58:S139, 2008. 査読なし
- ③ H Hagiwara, T Funabashi, J Arita, F Kimura, T Takahashi
Role of CREB in the response of the bed nucleus of the stria terminalis (BST) to formalin-induced nociceptive stimuli in female rats. *Journal of Physiological Sciences* 58:S165, 2008. 査読なし
- ④ M Ishida, W Takahashi, S Itoh, S Shimodaira, S Maeda, J Arita
Estrogen actions on lactotroph proliferation are independent of a paracrine interaction with other pituitary cell types. *Endocrinology* 148:3131-3139, 2007. 査読あり
- ⑤ M Ishida, T Mitsui, K Yamakawa, N Sugiyama, W Takahashi, H Shimura, T Endo, T Kobayashi, J Arita
Involvement of cAMP response element-binding protein in the regulation of cell proliferation and the prolactin promoter of lactotrophs in primary culture. *American Journal of Physiology, Endocrinology & Metabolism* E1529-1537, 2007. 査読あり
- ⑥ LQ Qin, JY Xu, H Tezuka, J Li, J Arita, K Hoshi, A Sato
Consumption of commercial whole and

non-fat milk increases the incidence of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Cancer Detection and Prevention* 31:339-343, 2007. 査読あり

[学会発表] (計6件)

- ① 石田真帆、三井哲雄、有田順、プロラクチン産生細胞の増殖制御に関するエストロゲン作用、公募シンポジウム「下垂体前葉細胞の分化制御の新展開」第82回日本内分泌学会学術総会、2009年4月24日、前橋
- ② 石田真帆、有田順、プロラクチン細胞におけるドーパミンD2受容体シグナルを介したエストロゲン受容体活性の抑制。第35回日本神経内分泌学会、2008年8月28日、東京
- ③ 石田真帆、有田順、プロラクチン産生細胞においてドーパミンはエストロゲン受容体活性を抑制する、第85回日本生理学会大会、2008年3月26日、東京
- ④ 萩原裕子、船橋利也、有田順、貴邑富久子、高橋琢哉、ホルマリン誘発侵害刺激に対する雌性ラット分界状床核のCREBの役割、第85回日本生理学会大会、2008年3月26日、東京
- ⑤ 石田真帆、有田順、エストロゲン誘導性のラット下垂体プロラクチン細胞増殖にbFGFは関与しない。第34回日本神経内分泌学会、2007年8月5日、前橋
- ⑥ 三井哲雄、王振華、石田真帆、有田順、下垂体プロラクチン産生細胞の増殖に対するアデノウイルス感染の影響。第34回日本神経内分泌学会、2007年8月5日、前橋

[図書] (計1件)

有田順、標準生理学第7版、医学書院、917-931頁、2009年

[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

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/physio01/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 順 (ARITA JUN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号：80128587

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
石田 真帆 (ISHIDA MAHO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：80362086
三井 哲雄 (MITSUI TETUO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：20402084