

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591088

研究課題名（和文）2光子励起蛍光顕微鏡を用いた下垂体前葉ホルモン開口分泌の可視化と解析

研究課題名（英文）Visualization of exocytosis by anterior pituitary cells.

研究代表者

高野幸路（TAKANO KOJI）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：20236243

研究成果の概要（和文）：

2光子励起法の TEP 法によって下垂体前葉細胞のホルモン開口分泌を可視化して解析した。ラット下垂体前葉細胞集塊のプロラクチン産生細胞からの自発分泌を蛍光蛋白のトランスフェクションなどの人工的操作を加えずに観察することができた。自発開口分泌はきわめて早い現象で殆どが1秒以内に終了した。自発開口分泌は、電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーや D2 受容体拮抗薬で消失し、この開口分泌が視床下部からのドーパミンによる抑制から解除されたときの高プロラクチン血症を説明するものであることが明らかになった。

一方、GHRH 刺激による GH の開口分泌は数秒の時間経過の現象であった。GH 細胞には自発開口分泌は認められなかった。電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーとソマトスタチンによって、GHRH による GH 分泌は抑制された。ソマトスタチンは高カリウム外液刺激による GH の開口分泌も抑制した。この際に細胞内カルシウム濃度上昇は残っていたことから、ソマトスタチンにはカルシウム流入機構より遠位の作用点で作用する開口分泌抑制機構も存在することが明らかになった。遠位の機構について G 蛋白質の α -subunit の関与やアシル化過程の関与が推測された。

研究成果の概要（英文）：

The exocytosis by anterior pituitary cells were visualized by TEP technique using two-photon excitation. The spontaneous exocytosis by rat lactotroph was rapid full fusion that terminated within a second while GHRH-stimulated exocytosis by rat somatotroph was slower full fusion that terminated within 3-6 seconds. D2 agonist and blockers of voltage-gated calcium channels inhibited spontaneous exocytosis, indicating that the observed spontaneous exocytosis corresponds to the spontaneous prolactin secretion from anterior pituitary when liberated from hypothalamic inhibition by dopamine. Somatostatin, that is a physiological hypothalamic inhibitor of GH secretion, attenuated GHRH-induced exocytosis. Somatostatin also inhibited high K-induced GH exocytosis. Because somatostatin did not abolish high K-induced intracellular calcium increase, somatostatin may inhibit GH exocytosis by acting on distal apparatus to calcium influx. The characteristics of the distal mechanism was investigated further.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：内科学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：下垂体、ホルモン分泌、開口分泌、2光子励起法

1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉ホルモンの開口分泌の可視化解析は研究代表者が共同研究で蛍光蛋白質とGHの融合蛋白質を下垂体前葉の細胞株に導入しコンフォーカル蛍光顕微鏡で解析を開始してから始まっている。研究を進めるうちに蛍光蛋白質との融合蛋白質を細胞内導入すると、生理的な分泌動態を必ずしも反映していないことが次第に明らかになってきた。そこで、細胞への外来蛋白質の導入を行わないで顆粒分泌を可視化する方法の確立が必要になってきた。

2. 研究の目的

細胞への外来蛋白質の導入を行わないで顆粒分泌を可視化する方法を確立するために、2光子励起法を応用して可視化解析する研究方法を確立する。

3. 研究の方法

TEP法を応用し、細胞外の水溶性蛍光物質が開口分泌の際に細胞膜に融合した顆粒内に入ることで、細胞膜に接した蛍光輝点を生じることを利用する。この輝点を2光子励起法で観察する。

観察対象に、分散培養した下垂体前葉細胞、下垂体前葉細胞集塊、下垂体前葉スライスを用い、どの系が生理的分泌現象の解析にゆうよいかを解明する。

4. 研究成果

分散培養した単層細胞細胞は分泌現象の観察には不向きであることが明らかになった。細胞集塊とスライス標本、器官培養標本を次に検討した。スライス標本や期間培養標本は標本ごとのプロラクチンの自発性分泌にばらつきが大きいことが明らかになった。未処理の標本で結果にばらつきがあると、薬理実験等の結果の評価がしづらくなるため、薬理実験を行うには不適切と判断した。そこで、薬理実験を行う目的で細胞集塊での実験系を安定化することに専念し、ある程度成功した。プロラクチン分泌の解析のための薬理実験を行い、開口分泌の刺激伝達系路と分泌のモード変化が解析できた。GHRH, CRH, GnRHによる分泌刺激実験を行い、開口分泌の増加を観察した。GHRHの場合、下垂体前葉に占めるGH細胞の割合が多いためその後の解析が容易であるが、ACTH細胞、LH, FSH細胞などは観察可能な場合が少なく、これらの細胞を2光子励起像で(染色することなしに)同定する方法の確立が必要であることが判明した。

以上の解析手法の確立によって、次のように、ラット正常下垂体前葉細胞の顆粒分泌の解析を行った。

ラット下垂体前葉細胞集塊のプロラクチン産生細胞からの自発分泌を蛍光蛋白質のトランスフェクションなどの人工的操作を加えずに観察することができた。自発開口分泌はきわめて早い現象で殆どが1秒以内に終了した。自発開口分泌は、電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーやD2受容体拮抗薬で消失し、この開口分泌が視床下部からのドーパミンによる抑制から解除されたときの高プロラクチン血症を説明するものであることが明らかになった。

一方、GHRH刺激によるGHの開口分泌は数秒の時間経過の現象であった。GH細胞には自発開口分泌は認められなかった。電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーとソマトスタチンによって、GHRHによるGH分泌は抑制された。ソマトスタチンは高カリウム外液刺激によるGHの開口分泌も抑制した。この際に細胞内カルシウム濃度上昇は残っていたことから、ソマトスタチンにはカルシウム流入機構より遠位の作用点で作用する開口分泌抑制機構も存在することが明らかになった。遠位の機構についてG蛋白質の α subunitの関与やアシル化過程の関与が推測された。

ヒト機能性腺腫の解析

ヒト機能性下垂体腺腫のホルモン過剰分泌の機構を明らかにする目的で、機能性腺腫の開口分泌を解析した。プロラクチン産生腺腫において自発開口分泌が存在することを明らかにした。自発開口分泌の生じる細胞内機構の一部を明らかにできた。

ラット及びヒト正常下垂体およびヒト下垂体腺腫の開口分泌の可視化による基礎的解析により、正常GH細胞ではGHRHやhighKなどの刺激によって主にfull fusionの形式の開口分泌が生じるのに対し、機能性腺腫であるGH産生腺腫では刺激なしにGHの自発顆粒分泌が生じることが明らかになった。これらの解析が臨床医学に応用可能であるかを研究した。対象として多数のGH産生腺腫を用い、その自発顆粒分泌を解析することで、これらの腺腫の機能的特徴を明らかにした。

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 20 件)

1. Murakami M, Takano K et al. A mechanism of acquiring temozolomide resistance during transformation of atypical prolactinoma into prolactin-producing pituitary carcinoma. *Neurosurgery* in press 2011 (査読あり)
2. Bakhtiar Y, Takano K et al. Relation ship between cytokeratin staining patterns and clinico-pathological features in somatotropinoma. *Eur. J. Endocrinol.* 163:531-539, 2010 (査読あり)
3. Koji Takano, Junko Yasufuku-Takano, et al. Evidence that PKA activity is constitutively activated in human GH-secreting adenoma cells in a patient with Carney complex harbouring a *PRKARIA* mutation. *Clinical Endocrinology* 70: 769-775, 2009 (査読あり)
4. Koji Takano, Junko Yasufuku-Takano et al. GH receptor His49Arg mutation was not detected in Japanese acromegalics. *Endocrine Journal.* 57 Suppl. S530, 2009 (査読あり)
5. Ito T, Sasano H, Tanaka M, Osamura RY, Sasaki I, Kimura W, Koji Takano et al.. Epidemiological study of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in Japan. *Journal of Gastroenterology* 45: 234-243, 2009 (査読あり)
6. Nakashima M, Koji Takano, Matsuno A. Analyses of factors influencing the acute effect of octreotide in growth hormone-secreting adenomas. *Endocrine Journal* 56: 295-304, 2009 (査読あり)
7. Morita K, Takano K, Yasufuku-Takano J, Ymada S, Teramoto A, Fujita T. Expression of pituitary-tumor-derived isoform of fibroblast growth factor receptor 4 (ptd-FGFR4) in human GH-secreting pituitary adenomas correlates with tumor invasiveness, not with *gsp* mutation. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 68:435-441, 2008. (査読あり)
8. 村上峰子, 水谷晃子, 中口博, 山田昌興, 保谷克己, 浅野修一郎, 松野彰, 片上秀喜,

山崎一人, 石田康生, 小沢義典, 高野幸路, 高野順子, 佐伯直勝, 沖永寛子異型性下垂体腺腫と下垂体癌に対するテモゾロミドの有効性と不応性日本内分泌学会雑誌 86 巻 Suppl :40-42、2010

9. 高野順子 高野幸路 GH 産生腺腫の自発分泌の病態生理と病理 ホルモンと臨床—内分泌病理学の最近の進歩 57: 12-19 2009
10. 松野彰, 中島美智, 高野幸路, 高野順子下垂体 GH 産生腫瘍 GH 産生下垂体腺腫における octreotide による GH の低下に関する多変量解析 Ki-67 staining index、*gsp* mutation、SSTR immunohistochemistry ホルモンと臨床 57 巻秋季増刊 :28-32、2009
11. 高野幸路, 高野順子, 盛田幸司, 森茂俊, 竹井麻生, 長村義之, 寺本明, 藤田敏郎 *PRKARIA* の不活化変異と LOH を伴う Carney complex 症例の GH 産生腺腫における PKA の恒常的活性化日本内分泌学会雑誌 85 巻:358、2009
12. 高野順子, 高野幸路 【先端巨大症の診療最前線】 病態生理 発症機構と関連因子 ホルモンと臨床 57 巻:749-757、2009
- 13 高野順子, 高野幸路, 山田正三, 寺本明, 高橋倫子, 河西春郎, 藤田敏郎 2 光子励起蛍光顕微鏡による下垂体プロラクチン産生細胞の開口分泌の可視化と解析 日本内分泌学会雑誌 84 巻 :527、2008
14. 高野順子, 高野幸路 【ホルモンの病態異常と臨床検査】 多臓器, 組織におけるホルモン相互間作用 炎症と内分泌機構 重篤な病態の急性期・慢性期における視床下部下垂体系の反応を中心に 臨床検査 52 巻 :1367-1372、2008
15. 高野幸路 神経内分泌腫瘍の内科治療 ホルモンと臨床 56 巻 :825-833、2008
16. 高野幸路 分泌現象と生体膜、そしてその可視化 下垂体前葉細胞からの顆粒分泌の可視化 日本内分泌学会雑誌 84 巻:146、2008
17. 高野順子, 高野幸路【成人 GH 分泌不全症の診断と治療】 成人 GH 分泌不全症の臨床的特徴 内分泌・糖尿病科 26 巻:317-327、2008
18. 高野幸路 【NET(神経内分泌腫瘍) 新しい概念・診断・治療】 神経内分泌細胞からのホルモン分泌 医学のあゆみ 224 巻:770-774、2008

19. 高野幸路 【膵内分泌腫瘍の最近の知見】膵内分泌腫瘍におけるソマトスタチン受容体とオクトレオチド 膵臓 23 巻:710-715、2008

20. 高野順子, 高野幸路, 山田正三, 寺本明, 高橋倫子, 河西春郎, 藤田敏郎 2 光子励起法によるヒトプロラクチン産生下垂体腺腫の分泌特性の解析 日本内分泌学会雑誌 84 巻:723、2008

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 高野幸路下垂体前葉細胞からの顆粒分泌の可視化解析第 10 回日本下垂体研究会シンポジウム 2009 年 8 月 26 日(高知市)

2. 高野幸路先端巨大症の内科治療の基礎と臨床 日本脳神経外科学会 2009 年 10 月 16 日(東京)

3. 高野幸路 GH 産生下垂体腺腫治療の基礎と臨床間脳下垂体腫瘍学会 2009 年 9 月 27 日(横浜市)

4. 高野幸路 GH 分泌障害の基礎と GH 補充療法の効果四国下垂体研究会 2010 年 5 月 10 日(高松市)

5. 高野幸路 GH 産生下垂体腺腫の病態生理東北信内分泌懇話会 2010 年 5 月 22 日(長野市)

6. 高野幸路機能性神経内分泌腫瘍の治療の基礎広島神経内分泌治療研究会 2010 年 5 月 30 日(広島市)

7. 高野幸路 神経内分泌腫瘍のホルモン過剰分泌について四国神経内分泌研究会 2010 年 6 月 24 日(高松市)

8. 高野幸路機能性下垂体腺腫の最新治療とその原理北関東間脳下垂体疾患研究会 2010 年 10 月 13 日(前橋市)

9. 高野幸路 GH 分泌障害の基礎と臨床藤田保健衛生大学神経内分泌研究会 2010 年 11 月 18 日(名古屋市)

〔図書〕(計 6 件)

1. 高野幸路 他 下垂体腫瘍のすべて 452pages 医学書院 2009

2. 高野幸路 専門医を目指す Case Method Approach 2 内分泌疾患日本医事新報社 326pages 2010

3. 高野幸路 臨床検査基準値エクспレス 中外医学社 428pages 2010

4. 高野順子、高野幸路「遺伝性クッシング症候群」、p 129-131、クッシング症候群診療マニュアル、In: 平田結喜緒&成瀬光栄、editors. 診断と治療社; 東京: 2009 年

5. 高野順子、高野幸路「PPNAD - 診断と治療」、p 216-218、クッシング症候群診療マニュアル、In: 平田結喜緒&成瀬光栄、editors. 診断と治療社; 東京: 2009 年

6. 高野順子、高野幸路 炎症と内分泌機構ホルモンの病態異常と臨床検査 1367-1372 医学書院、2008

〔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

高野幸路 (TAKANO KOJI)

東京大学・附属病院・特任講師

研究者番号: 20236243

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

なし