

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791057
 研究課題名（和文） BMPに着目した下垂体腫瘍の発症機序の解明と内科治療法の開発を目指して
 研究課題名（英文） For elucidation of the mechanism of pituitary gland tumorigenesis focused on BMP system and the development of the medicine cure
 研究代表者
 三好 智子（MIYOSHI TOMOKO）
 岡山大学・医療教育統合開発センター・助教
 研究者番号：40444674

研究成果の概要（和文）：

ホルモン産生性下垂体腫瘍の中でもクッシング病は難治性となりやすい。クッシング病の細胞モデルにおいて、骨形成タンパク BMP は副腎皮質刺激ホルモン ACTH の前駆物質である POMC の発現を抑制し、ACTH 分泌を抑制していることが知られている。今回の研究では、先端巨大症の治療薬であるソマトスタチン誘導体を用いてクッシング病の細胞モデルを検討したところ、ソマトスタチン誘導体は BMP を調節することにより、ACTH の発現を低下させることが解明された。

研究成果の概要（英文）：

BMP action was known in corticotrope cells as a negative regulator for the expression of an adrenocorticotropin (ACTH) precursor, proopiomelanocortin (POMC). In corticotrope cells, BMP response is upregulated by somatostatin analogs. Thus, somatostatin analogs suppress CRH-induced ACTH production in corticotrope cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：下垂体腫瘍、骨形成タンパク、クッシング病、ソマトスタチン誘導体、視床下部、メタスタチン

1. 研究開始当初の背景

(1)2009年10月より厚生労働省の難病として、新たに間脳下垂体障害が追加された。その中には下垂体腫瘍であるPRL産生腺腫、ACTH産生下垂体腺腫（クッシング病）、GH産生下垂体

腺腫（先端巨大症）、ゴナドトロピン(FSH/LH)分泌腫瘍などが含まれる。下垂体腫瘍の治療においては外科手術が第一選択となる場合が多いが、手術や放射線治療でも完治できない場合には、残存腫瘍の増大や下垂体ホルモン

産生過剰による合併症のために生命予後、QOLの維持が困難となる。薬剤が一般に有効な例として、PRL産生下垂体腫瘍では圧迫や出血を伴う巨大な腫瘍以外、通常ドパミン作動薬が第一選択となり、ホルモン産生抑制だけでなく腫瘍縮小効果も期待できる。GH産生腫瘍による先端巨大症では、ソマトスタチン誘導体に加えGH受容体拮抗薬の導入も可能であるが、残念ながら耐性例も多く存在する。しかしながら、クッシング病のACTH分泌抑制には未だ有効な薬剤が無いのが現状であり、これらの薬剤不応性下垂体腫瘍では腫瘍細胞の増殖抑制と内分泌活性の抑制に非常に苦慮する。これらの薬剤によるホルモン分泌抑制機序の詳細が未だ十分に解明されていないことも難点である。

(2)我々はGH産生下垂体腺腫細胞GH3において薬物相互作用による薬剤耐性の機序について(Bone Morphogenetic Protein: BMP)-4の関与を提唱した。他グループの報告でも、BMP-4がエストロゲン/Smadシグナルのクロストークを介してPRL産生下垂体腺腫の増殖を促すこと(PNAS 100: 1034, 2003)、BMP-4がACTH産生腺腫の増殖とともにACTH分泌を抑制することが示され(Endocrinology 147: 247, 2006)、下垂体BMP-4の制御が下垂体腫瘍に対する治療指標へと繋がる可能性が示唆された。これらの結果は、下垂体腫瘍の増殖活性・内分泌活性のターゲットとしてBMP/activin分子に着目した基礎研究を深めるさらなる我々の動機付けとなった。

2. 研究の目的

我々は、下垂体BMP/activinがACTH産生下垂体腫瘍に発現し、とくにBMP-4がソマトスタチン誘導体・ドパミン作動薬の奏効性のkey moleculeとして寄与することを示した(Endocrinology 151: 1129, 2010)。これまで有効な内科的治療法がなかったACTH産生腫瘍

によるクッシング病には、新たなソマトスタチン誘導体が臨床的にも応用されつつある。今回の研究では、これまで研究を進めてきた下垂体BMPシステムと、下垂体腺腫に感受性のあるソマトスタチン誘導体・ドパミン作動薬・PPARアゴニストとの相互関係について、ACTH産生腫瘍やGH産生腫瘍以外の下垂体腫瘍細胞においても細胞生物・分子生物学的に探求を進める。下垂体腫瘍の発生・進展機序の解明を目指す基礎研究を行い、この結果を発展させ臨床応用できる薬剤開発を視野に入れ、有効な下垂体腫瘍の内科的治療法の進化を目指す。

3. 研究の方法

下垂体腫瘍細胞を用いて下垂体 BMP/activinの生理活性を決定し、下垂体親和性薬剤の影響を検討する。視床下部細胞では、視床下部 BMP シグナルの役割とメタスチン (キスペプチン) の相互作用について検討する。ACTH 産生腫瘍細胞では、メラトニンと BMP による分泌リズムに着目した研究を行う。さらに、視床下部 BMP システムとメタスチンシグナルのクロストークについて解析する。

(1)初年度は「下垂体 BMP/activin の生理活性」を決定する：ドパミン作動薬・ソマトスタチン誘導体・PPAR アゴニストによる影響、さらに ACTH 産生細胞でのメラトニンと BMP の関連に着目して検討する。

マウス ACTH 産生細胞 (AtT20 cell)・マウス FSH/LH 産生細胞(LβT2 cell)・ラット PRL/GH 産生細胞(GH3 cell)・マウス GnRH 分泌細胞

(GT1-7 cell)を用いて研究に着手する。①各薬物：ドパミン作動薬 (DA)・ソマトスタチン誘導体 (SS analogs; SSTR2-prefering analog = Octreotide, SSTR5-prefering analog = Pasireotide) による細胞反応性を確認するために、各細胞におけるドパミン受容体 (D2R)・ソマトスタチン受容体 (SSTR)

の発現状態を mRNA および蛋白レベルで決定する。また GnRH 分泌細胞ではメタスチン受容体である GPR54 の存在を AtT20 細胞ではメラトニン受容体 (MtR) を mRNA レベルで確認する。②次に各下垂体腫瘍・GT1-7 細胞株より抽出した total RNA において RT-PCR 法・定量的 Real-time PCR 法・cDNA array 法を用いて、BMP 関連分子の発現パターンを比較検討したのち、Western immunoblot 法により BMP/activin システム構成因子を蛋白レベルで検出し、各下垂体細胞において作動できる内因性 BMP/activin 機構を決定する。③薬物投与時の細胞機能変化について評価するために、下垂体培養細胞を SS analogs・Bromocriptine (BRC)・MtR agonist (Ramelteon) の存在下で培養し、BMP 関連遺伝子および D2R, SSTR, PPAR・MtR の発現を経時的にプロファイリングする。また、各薬剤を異なる用量の条件下で、種々の combination により投与した場合の BMP システム発現の変化を評価する。GT1-7 細胞ではメタスチンおよびエストロゲン刺激による BMP システムの発現変化および GPR54・ER の発現変化を解析する。④BMP 刺激による下垂体および視床下部細胞からのホルモン分泌活性の変化について、基礎分泌能および forskolin/BtcAMP による刺激の存在下で、種特異的 Radioimmunoassay (ACTH, FSH/LH, GnRH) を用いて経時変化・濃度依存的変化を検討する。⑤薬剤の下垂体および視床下部細胞の増殖への影響を評価するために、 $[3H]$ -thymidine assay によって DNA 合成能を、MIB-1 免疫染色による増殖活性を定量評価する。⑥腫瘍細胞系での BMP/activin と薬物反応性の検討に加えて、正常下垂体細胞における比較実験を行う。下垂体細胞内の 2nd messenger について、cAMP レベルを EIA により測定する。⑦薬剤反応性についても継代細

胞から得られた結果を参考に key となる項目についてその再現性を検証し、薬物治療の有効性を決定する因子の探求を目指す。

(2)次年度は、下垂体 BMP/activin と下垂体作動薬の「シグナル連関」および視床下部「メタスチン」活性について分子レベルで探究する。

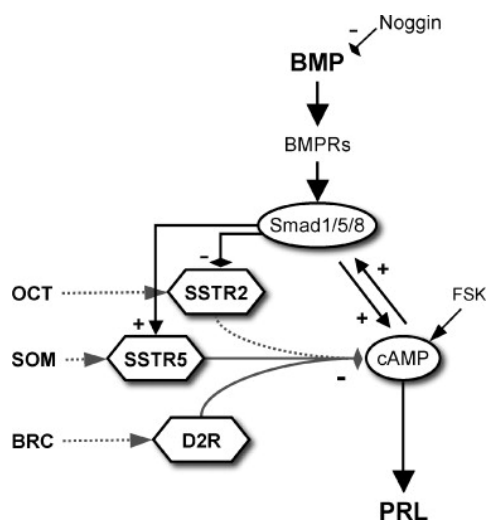
各下垂体培養細胞における D2R/SSTR シグナルと下垂体 BMP システムとの相互関係をより分子レベルで明らかにし、薬物治療による下垂体内分泌機構の変化の詳細に迫る。視床下部細胞においては BMP とメタスチンシグナルの相互関係を明らかにする。①まず BMP 特異的な転写因子である Smad1/5/8 と

activin/TGF β の特異的な転写因子 Smad2/3 蛋白のリン酸化について、特異的なリン酸化抗体を用いた Western immunoblot により検出する。②下垂体細胞における BMP/activin シグナル活性が D2R/SSTR シグナルによってどのように変化するか、Smad1/5/8 特異的 reporter assay により定量的に評価する。さらにゴナドトロフ細胞を始め下垂体ホルモン分泌に寄与するシグナルとして重要な MAPK: ERK1/2, p38, SAPK/JNK の活性化についても、Western blotting および MAPK 特異的 reporter assay を用いて MAPK 活性化強度の変化を検出し、BMP/activin シグナルと D2R/SSTR シグナルのクロストークについて探索する。MAPK の下垂体内分泌活性への影響については、各 MAPK 経路の薬理的阻害薬 (U0126・SB203580・SP600125) を用いた抑制実験により結果の裏付けを行う。同様に GT1-7 細胞では BMP シグナルとメタスチンシグナルの相互関係を検討するために immunoblotting/reporter assay を用いて BMP 活性や MAPK 活性の変化を確認する。③この検討では下垂体・視床下部に存在する内因性 activin シグナルによる BMP シグナルに対

する干渉作用も考慮される。よって BMP 受容体-D2R/SSTR-メタスタチンシグナル伝達間 interaction については、BMP シグナルを特異的に抑制する follistatin/noggin を用いてアプローチする。

4. 研究成果

ラット下垂体 somato-lactotrope 腫瘍細胞である GH3 細胞では、ソマトスタチン受容体および BMP が発現していた。BMP-4 と BMP-6 は cAMP 産生を増加し、PRL 分泌も増加した。ドーパミンアゴニストである BRC やソマトスタチン誘導体である SOM230 は PRL 分泌を低下させたが、別のソマトスタチン誘導体である OCT は PRL の産生に影響を与えなかった。BMP-4 はこの BRC や SOM230 の PRL 低下作用をさらに増強した。これは BMP-4 が SSTR-2 の発現を低下することに起因した。BMP は SSTR の感受性を調節することにより、GH3 の PRL 分泌に関与していることが示唆された。

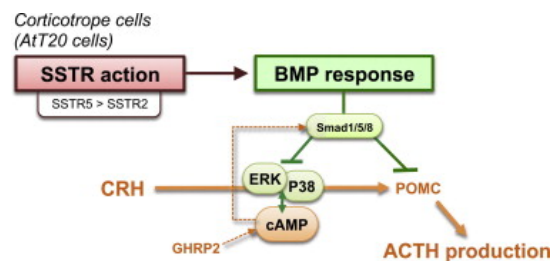


(Mol Cell Endocrinol. 332, 163-169, 2011)

Corticotrope cell である AtT20 細胞では、BMP は adrenocorticotropin (ACTH) の前駆物質 proopiomelanocortin (POMC) の発現を低下すると報告されている。我々の検討では BMP-4 は CRH によって活性化される ERK1/2 および p38 のリン酸化を減弱し、また、POMC の

転写を抑制し ACTH の産生を減少した。ソマトスタチン誘導体である OCT と SOM230 は BMP 受容体の発現を増加し、抑制型 Smad を減少し、Smad1/5/8 を増加した。つまり、ソマトスタチン誘導体は BMP シグナルを増強することにより、CRH に誘導される ACTH 分泌を抑制した。

また、Growth hormone releasing peptide (GHRP-2) は臨床的に GH 分泌機能評価に使用されるようになった。他の下垂体機能評価にも使用されるようになってきているため、ACTH 分泌への影響を AtT20 細胞で検討した。GHRP-2 は CRH とは別の機序により ACTH 分泌や cAMP 産生を増加した。さらに、BMP-4 は GHRP-2 誘導性の ACTH 分泌に抑制的に作用した。



(Mol Cell Endocrinol. 349, 105-110, 2012)

さらにクッシング病は ACTH の日内変動リズムの消失が認められるため、日内リズムとホルモン分泌に影響を与えるメラトニンと BMP の関係に着目して研究を進めている。AtT-20 細胞にはメラトニン受容体が発現しており、メラトニンにより CRH 誘導性の ACTH 分泌と POMC 発現を低下させた。メラトニンは MAPK 経路を活性化し、BMP 受容体の発現を増加した。このことから BMP とメラトニンは相互的に ACTH 分泌を調節することが解明された。この結果は現在、論文作成中である。

視床下部細胞 GT1-7 細胞においては BMP とメタスタチンシグナルの相互間件を探索してい

る。GT1-7 細胞ではエストロゲン受容体および BMP 受容体/Smad 経路の存在を確認した。メタスチンにより、Gn-RH の mRNA 発現が増加したため、BMP シグナルの変化について検討した。BMP 特異的な転写因子である Smad1/5/8 や activin/TGF β の特異的転写因子 Smad2/3 蛋白のリン酸化について、特異的リン酸化抗体を用いた WB により検出し、また、Smad1/5/8 特異的 reporter assay により定量的に評価した。さらに GT1-7 細胞をはじめ、下垂体ホルモン分泌に寄与するシグナルとして重要な MAPK : ERK1/2, p38, SAPK/JNK の活性化についても WB および reporter assay を用いて定量的に検出した。この結果は日本内分泌学会に報告した。

これらの報告は随時、日本内分泌学会や米国内分泌学会で発表を行っており、メラトニン受容体と ACTH 分泌については、第 39 回日本神経内分泌学会学術集会で YIA に、第 86 回日本内分泌学会学術総会で YIA に選出された。今後は in vitro だけでなく、in vivo に研修を進めていく予定である。

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 16 件)

①Miyoshi T, Otsuka F, Shimasaki S. GRK-6 mediates FSH action synergistically enhanced by estrogen and the oocyte in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 434, 2013, 401-406.

②Miyoshi T, Otsuka F, Nakamura E, Inagaki K, Ogura-Ochi K, Tsukamoto N, Takeda M, Makino H. Regulatory role of kit ligand-c-kit interaction and oocyte

factors in steroidogenesis by rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 358, 2012, 18-26.

③ Otsuka F, Tsukamoto N, Miyoshi T, Iwasaki Y, Makino H. BMP action in the pituitary: its possible role in modulating somatostatin sensitivity in pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 349, 2012, 105-110

④ Takeda M, Otsuka F, Takahashi H, Inagaki K, Miyoshi T, Tsukamoto N, Makino H, Lawson MA. Interaction between gonadotropin-releasing hormone and bone morphogenetic protein-6 and -7 signaling in L β T2 gonadotrope cells. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 348, 2012, 147-454.

⑤ Tsukamoto N, Otsuka F, Miyoshi T, Inagaki K, Nakamura E, Terasaka T, Takeda M, Ogura T, Iwasaki Y, Makino H. Functional interaction of bone morphogenetic protein and growth hormone releasing peptide in adrenocorticotropin regulation by corticotrope cells. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 344, 2011, 41-50

⑥ Tsukamoto N, Otsuka F, Miyoshi T, Inagaki K, Nakamura E, Suzuki J, Ogura T, Iwasaki Y, Makino H. Activities of bone morphogenetic proteins in prolactin regulation by somatostatin analogs in rat pituitary GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 332, 2011, 163-169

[学会発表] (計 22 件)

① 三好智子・他、卵母細胞—顆粒膜細胞間の KL/c-kit および GRK による新たな Estrogen 調節系、第 17 回日本生殖内分泌学会 2012/12/8、東京

② 塚本尚子・三好智子・他、コルチコトロー

プ細胞におけるACTH分泌調節に及ぼすメラトニンとBMP-4の役割、第39回日本神経内分泌学会、2012/9/28~29、北九州

③Tomoko Miyoshi, et. al. Effects of BMP-6 on Aldosterone Production by Rat Adrenal Gland In Vivo, ENDO2012, June 23-26, 2012, Houston (USA)

④Kanakano Ogura-Ochi, Tomoko Miyoshi, et. al. Regulatory Role of Melatonin and BMP-4 in Prolactin Secretion by Rat Pituitary Lactotrope Cells. ENDO2012, June 23-26, 2012, Houston (USA)

⑤塚本尚子・三好智子・他、下垂体コルチコトロープにおけるACTH分泌制御機構：GHRP/CRHとBMP-4の機能連関、第85回日本内分泌学会学術総会、2012/4/19~21、名古屋

⑥寺坂友博・三好智子・他、KisspeptinによるGnRH発現調節とBMP/Estrogenの関与、第85回日本内分泌学会学術総会、2012/4/19~21、名古屋

⑦越智可奈子・三好智子・他、Lactotrope細胞におけるメラトニンによるPRL分泌制御とその機序、第85回日本内分泌学会学術総会、2012/4/19~21、名古屋

⑧塚本尚子・三好智子・他、GHRP-2によるACTH分泌調節機序の検討とBMP-4の関与、第38回日本神経内分泌学会学術集会 2011/11/25~26、東京

⑨Miyoshi T, et. al. Functional roles of kit ligand-c-kit interaction and oocyte factors in regulation of steroidogenesis by rat granulosa cells, 44th Annual Meeting - Society for the Study of Reproduction 2011/7/31~8/4, Portland

⑩Naoko Tsukamoto, Tomoko Miyoshi, et. al. A Novel Interaction of Bone Morphogenetic Protein and Growth Hormone-Releasing Peptide in Regulating Adrenocorticotropin

Production by Corticotrope Cells, ENDO 2011: The 93rd Annual Meeting & Expo 2011/6/4~6/7, Boston (USA)

⑪塚本尚子・三好智子・他、PRL分泌調節におけるBMP-4の作用とSSTR反応性の変化、第84回日本内分泌学会学術総会、2011/4/21~2011/4/23、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 智子 (MIYOSHI TOMOKO)

岡山大学・医療教育統合開発センター・助教

研究者番号：40444674

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者