

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860711

研究課題名(和文)(プロ)レニン受容体を介した下垂体前葉ホルモン調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of anterior pituitary hormone by (pro)renin receptor

研究代表者

谷 祐至 (TANI, YUJI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30456214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：(プロ)レニン受容体(PRR)は下垂体で発現しているが、その役割は不明である。本研究では、ヒト下垂体腺腫(特にGH産生腫瘍)でPRRが発現していることを明らかにした。臨床データとの比較検討では、PRRの染色性と先端巨大症患者の血中GH/IGF-1との間に正相関を認めたことから、PRRがGH分泌を調節する可能性が考えられた。ラットGH3細胞を用いた検討では、PRRのノックダウンはV-ATPase阻害剤(Bafilomycin A1)と同様に、酸性オルガネラの減少、細胞内GHの貯留と上清中GHの低下を認めたことから、PRRはV-ATPaseの機能を介してGH分泌に関与することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The roles of (pro)renin receptor (PRR) in the pituitary are unknown. Here, we revealed the preferential expression of PRR in human pituitary adenoma. Positive PRR immunoreactivity was detected more often in surgically resected, growth hormone-producing adenomas (GHomas) than in nonfunctional pituitary adenomas. The close association of high PRR expression in GHomas with markedly elevated circulating GH/IGF-1 levels may be explained by the regulatory mechanisms of GH secretion by PRR. Reduced GH secretion and significantly enhanced intracellular GH accumulation in rat GHoma-derived GH3 cells, following transfection with PRR siRNA or treatment with a V-ATPase inhibitor, both of which impaired intracellular acidification, strongly suggests a functional role for PRR in GH secretion via V-ATPase.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体腫瘍 先端巨大症 プロレニン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

(プロ)レニン受容体(PRR)は、2002年にヒト腎臓から同定されたが、レニンだけでなくその不活性型前駆体とされているプロレニンとも結合し、レニンよりプロレニンに対する親和性が高い。また、プロレニンはPRRに結合するとアンジオテンシン II を介することなく細胞内シグナルを惹起するうえに、PRRは腎以外にも脳・心・脾など全身に広範囲に分布するため、組織レニン・アンジオテンシン系(RAAS)においても重要な役割を果たしているものと期待され、近年、とくに盛んに研究が行われてきた。もともと ATPase accessory protein 2 (ATP6ap2)は、哺乳類の Vo ドメインに結合する蛋白 M8-9 として同定されていた。その後、PRR がクローニングされ、それが M8-9 と同じ ATP6ap2 遺伝子にコードされていることが明らかとなった。PRR は当初は形質膜に存在するものと考えられていたが、その後の研究で Trans Golgi Network で Furin などにより切断され、レニン・プロレニン結合部位を含む N 末端側の断片が細胞外に分泌され可溶性受容体として存在することもわかってきた。一方、C 末端側は哺乳類の M8-9 に相当するもので、液胞型(V型)ATPase(V-ATPase)と共局在する。V-ATPase は酸性小胞膜に存在し、ATP の加水分解エネルギーによってプロトンを送り込んで小胞内を酸性化する他、膜融合を媒介したり、pH センサーとして働いたり、多機能性をもつことが示されている。ATP6ap2 lox/Y マウスの胎児繊維芽細胞に Cre を発現させて ATP6ap2 をノックダウンすると、ATP6ap2 の発現低下に一致して Vo ドメインのサブユニットの発現低下が観察されており、細胞内小器官の酸性化障害を認める。このことから ATP6ap2 は V-ATPase の Vo ドメインの安定化に必須であることが明らかとなっている。さらに、プロレニンが PRR に結合するとアンジオテンシン非依存的に V-ATPase 活性を上

げるとの報告もあり、非常に興味深い機能を有する。また、Wnt 受容体が PRR を介して V-ATPase と結合しており、LRP6 のリン酸化に V-ATPase による細胞内酸性化が関係しているとの報告もある。

## 2. 研究の目的

腎臓や心臓をターゲットとした研究に比べ、下垂体における報告は皆無に近く、剖検例の下垂体における発現や、ラット下垂体における免疫組織学的検討で GH 細胞や ACTH 細胞に PRR が発現していることが報告されているにすぎない。また、GH 産生腫瘍の 30 - 40%は Gs 蛋白の機能獲得型(gsp)変異により GHRH の刺激なくして GH の過剰分泌を生じるとされる。しかし、gsp 変異を有さない GH 産生腫瘍での過剰分泌機構の詳細は不明である。そこで今回、PRR による下垂体前葉ホルモン(特に GH)の新たな調節機構の解明を目指した研究を行った。

## 3. 研究の方法

ヒト下垂体腫瘍(83例)における PRR 発現の解析と臨床データとの比較検討：免疫組織化学法(IHC)により PRR とプロレニンを染色し、染色強度を半定量解析した。特に GH 産生腫瘍では術前血中 GH 基礎値、IGF-1、75g-OGTT の GH 底値を抽出した。

下垂体腫瘍細胞株を用いた In vitro での解析：ラット由来 GH 産生下垂体腫瘍細胞株(GH3)を用いて、PRR の発現を RT-PCR、Immunoblotting(W.B.)、蛍光免疫染色で確認した。各種 siRNA を用いたノックダウンや、PRR と蛋白-蛋白相互作用を有するとされる Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF)をクローニングし、一過性過剰発現を用いて検討した。併せて、V-ATPase 阻害薬である Bafilomycin A1、プロレニン等の各種刺激に対する GH 分泌の変化を W.B.、GH ELISA を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

はじめに下垂体摘出腫瘍において PRR の発現を免疫染色で確認したところ、GH 産生腫瘍 (25/33 例; 76%)、次いで ACTH 産生腫瘍 (7/14 例; 50%) で強い染色性を示した。特に GH 産生腫瘍に高頻度であったことから、PRR の染色性を半定量解析 (図 1) し、臨床データとの比較検討を行った。PRR の染色性と血中 GH、IGF-1、75g-OGTT の GH 底値、との間に正相関を認めた (図 2)。

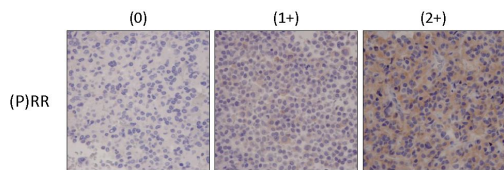


図1. GH産生下垂体腺腫における(プロレニン受容体の免疫染色(半定量解析)

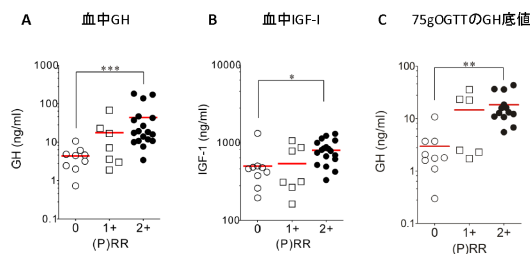


図2. (プロレニン受容体の染色強度と臨床データとの関連性

PRR の内因性リガンドであるプロレニンの発現も免疫染色し、半定量解析した上で血中 GH、IGF-1、75g-OGTT の GH 底値との関連性を解析したが、有意な相関は認めなかった。以上より PRR 自体がプロレニンを介さず、GH 分泌に関与する可能性を考えた。

次に、GH3 を用いて GH 産生・分泌への影響を検討した。蛍光免疫染色では PRR は、主に ER や golgi と、一部に形質膜への共局在を示した。PRR のノックダウンでは、酸性オルガネラの減少、細胞内 GH の貯留と上清中 GH の低下を認めた (図 3)。V-ATPase 阻害剤 (Bafilomycin A1) は PRR の siRNA と同様、細胞内 GH 貯留と上清中 GH の低下を認めた。PRR と相互作用を有する PLZF は、PRR のノックダウンで PLZF の mRNA 発現が亢進し、逆に

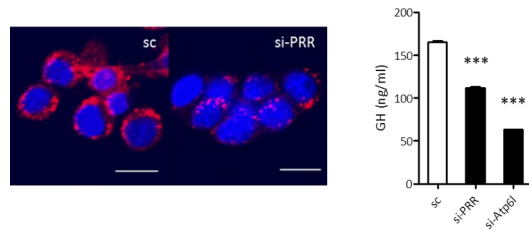


図3. si-PRRによる細胞内酸性オルガネラとGH分泌の低下

PLZF のノックダウンで PRR の mRNA 発現が亢進することから、相互に発現調節をしていることが明らかとなった。さらに、PLZF のノックダウン、一過性過剰発現を用いて GH 分泌への影響を検討したところ、PLZF を介しては GH 分泌へ影響しないことが明らかとなった。PRR は V-ATPase の Vo ドメインの安定化に必須とされる。そこで、Bafilomycin A1 の結合部位を有する Vo ドメインの ATP6VoC サブユニットに注目した。ATP6VoC のノックダウンで、細胞内 GH の貯留と上清中 GH の低下を確認した。

以上より、PRR は V-ATPase の安定化・酸性化機能を介して GH 分泌に関与することを明らかにした。

#### 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 3 件)

Suzuki-Kemuriyama N, Nakano-Tateno T, Tani Y, Hirata Y, Shichiri M. Salusin- as a powerful endogenous antidipsogenic neuropeptide. *Sci Rep.* 6:20988, 2016. 査読有, doi: 10.1038/srep20988

Tani Y, Yamada S, Inoshita N, Hirata Y, Shichiri M. Regulation of growth hormone secretion by (pro)renin receptor. *Sci Rep.* 5:10878, 2015. 査読有, doi: 10.1038/srep10878

Sekiguchi Y, Miyamoto Y, Kasahara I, Hara Y, Tani Y, Doi M, Hirata Y. Ectopic ACTH syndrome caused by desmopressin-responsive thymic neuroendocrine tumor. *Endocr J.* 62: 441-7, 2015. 査読有, doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0455

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷 祐至 (TANI, Yuji)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：30456214

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし