

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590177
 研究課題名 (和文)
 LHRH 誘導体が性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造に与える影響
 研究課題名 (英文)
 Effects of LHRH analogues on the ultrastructure of male rat pituitary gonadotropes.
 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

研究成果の概要： 前立腺癌等に対するホルモン治療薬として実用化されている LHRH 誘導体のうち、本研究では、代表的な LHRH アゴニストである leuprorelin の持続投与で生じる性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造の経時的变化を解析した。その結果、同剤投与開始直後に発揮される強力な分泌促進作用と慢性効果である LHRH 受容体の不応化誘導の相乗作用で、同細胞からのゴナドトロピン分泌が強力かつ効率的に抑制されることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：顕微解剖学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

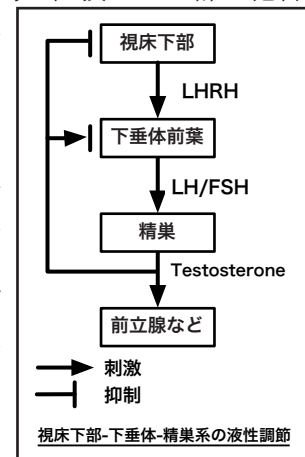
キーワード：下垂体前葉、LHRH 誘導体、leuprorelin、性腺刺激ホルモン産生細胞、電子顕微鏡観察、免疫組織化学、分泌顆粒、細胞内膜系小器官

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞は、黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) という2種類の性腺刺激ホルモンを血中に分泌し性腺機能の液性調節系で重要な役割を担っている。これらのホルモンの分泌はまた、上位中枢である視床下部から分泌される黄体形成ホルモン放出刺激ホルモン (LHRH) や標的臓器である性腺から分泌される様々な液性因子 (アンドロゲンやエストロゲンなど) による調節を受けている (右図)。

この液性調節系に作用する薬剤の一つである LHRH 誘導体 (アナログ) は、LHRH の構

成アミノ酸を部分的に置換した一群の化合物の総称で、生理的リガンドである LHRH よりも強力な性腺刺激ホルモン分泌促進作用を有する LHRH アゴニストと、逆に分泌抑制作用を有する LHRH アンタゴニストの2種に大別される。この2種類の LHRH 誘導体の短期的な作用



は対照的であるが、どちらも持続的に過剰量が投与されると細胞膜上の LHRH 受容体と強く結合したまま細胞内へと移行してしまうため、内在性の LHRH も含めて以降の性腺刺激ホルモン分泌刺激の受容が遮断される。その結果、これらの LHRH 誘導体の持続的投与によって性腺刺激ホルモン分泌は強く抑制され、雄では標的臓器である精巣でのテストステロン合成も抑制される。

臨床的にも泌尿器科学領域では、男性ホルモンの影響を受けて増殖・増悪する代表的な疾患として前立腺癌が知られており、既に LHRH 誘導体はアンドロゲン感受性を有する前立腺癌のホルモン治療薬として実用化されている。このような治療薬のうち最も早期から臨床応用されている leuprorelin 徐放性製剤は、本来は強力なゴナドトロピン分泌促進作用を有する LHRH アゴニストであるが、投与開始直後の急性効果として一過性の分泌促進効果を発揮した後は一転して LHRH 受容体の不活性化 (desensitization) を誘起し、逆説的に下垂体からのゴナドトロピンの分泌を持続的に抑制する。この結果、精巣でのテストステロン合成・分泌は、外科的な去勢手術と同様のレベルまで強く抑制され前立腺癌が退縮し、同疾患に対する治療法の向上に大きく貢献している。しかし、その基礎となる同剤の作用機序に関しては完全に解明されているわけではなく、特に、本研究開始時点まで、この LHRH アゴニストの持続的投与が直接的な標的細胞である下垂体前葉の性腺刺激ホルモン分泌細胞の微細構造にどのような影響を与えるのかに関して、電子顕微鏡レベルで詳細に検討した研究はなかった。

そこで、このような研究の背景を踏まえ、研究代表者は、LHRH 誘導体はその直接的な標的細胞である下垂体性腺刺激ホルモン産生細胞にどのような影響を与えるかという問題について、特に形態学的観点から詳細に解析することを計画した。

2. 研究の目的

上述した研究の背景を踏まえ、本研究課題では具体的に次の 2 点を明らかにすることを目標とした。

(1) 本来は強力な LHRH アゴニスト作用を発揮する代表的な LHRH 誘導体 leuprorelin が、どのような機序で性腺刺激ホルモン産生細胞からのゴナドトロピン分泌を抑制するのか、leuprorelin 徐放性製剤の投与開始から経時的に同細胞の微細構造に与える影響を解析することで、明らかにする。

(2) 次に、この leuprorelin が性腺刺激ホル

モン産生細胞の微細構造に与える影響が可逆的かどうか、leuprorelin 徐放性製剤の有効期間が経過した後の同細胞の形態学的変化を追跡することで、明らかにする。

以上の解析で得られる所見を総合して、これまで不明であった強力な LHRH アゴニストが逆説的にその標的細胞である性腺刺激ホルモン産生細胞を抑制する機構の形態学的基盤を解明したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) LHRH アゴニスト持続投与ラットモデルの作成

LHRH アゴニスト持続投与ラットモデルは、8 週齢のウィスター系雄ラットの背部皮下に、3mg/kg 体重の leuprorelin 徐放性製剤 (武田薬品工業) を注射することで作成した。同剤は強力な LHRH アゴニストである leuprorelin(5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-HCH₂CH₃-CH₃COOH) 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 (Okada et al., Pharm Res. 8:584-587 (1991))。本研究では、同剤の投与開始から、1 日後、4 日後、7 日後、14 日後、28 日後に後述する方法で下垂体組織を採取し、解析に供した。

また、同剤の影響が可逆的かどうかを検討する目的で、投与開始から追加投与なしで 84 日後に標本採取した実験群 (単回投与 84 日群) と初回投与後 28 日ごとに 2 回追加投与し、初回投与から 84 日後に標本採取した実験群 (反復投与 84 日群) も合わせて設定し、解析に供した。

(2) 形態学的解析:

① 下垂体前葉組織の樹脂包埋標本の作成

光顕免疫組織化学用の組織標本は、4% パラフォルムアルデヒドと 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常法に従いエタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドを伸介剤として Epon812 樹脂を浸透させた後、樹脂を重合 (24 時間、60℃) させ包埋した。

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% パラフォ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、1% 四

酸化オスミウム溶液で後固定(2時間、4℃)した後、常法に従いエタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドを伸介剤としてEpon812樹脂を浸透させた後、樹脂を重合(24時間、60℃)させ包埋した。

また、電顕免疫組織化学用の組織標本は、0.05% グルタルアルデヒド、4% パラフォルムアルデヒド、および4% スクロースを含む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同じ固定液中で追固定(2時間、4℃)した後、さらに0.2% 四酸化オスミウム溶液および7.5% スクロースを含む0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)で浸漬固定(1時間、4℃)した。固定された下垂体組織は、1% 燐タンクスチン酸を含む70% エタノールで脱水(20分 x 3回、4℃)した後、L.R.white樹脂を浸透・重合(24時間、60℃)させ包埋した。

②免疫組織化学標識

抗体：

性腺刺激ホルモン産生細胞の2種類の分泌顆粒の基質の指標としたクロモグラニンA(CgA) およびセクレトグラニンII(SgII) に対する抗体は、当該蛋白のアミノ酸配列をもとに合成したペプチドを抗原として当研究室で作製したウサギポリクローナル抗血清(Sakai et al., J Histochem Cytochem. 51:227-238(2003))を用いた。また、下垂体前葉組織中の性腺刺激ホルモン産生細胞は、群馬大学生体調節研究所から供与された抗ヒツジLH β 抗体(ウサギポリクローナル)を用いて同定した。

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 488 標識抗ウサギIgG抗体(Molecular Probes)を、電顕レベルの金コロイド標識法では5nm、10nm、15nmの金コロイド粒子で標識された抗ウサギIgG抗体(British Biocell International)を用いて行った。

蛍光抗体法(光顕レベルの解析)：

光顕レベルの解析は、Epon812樹脂包埋した下垂体組織標本から作成した0.5 μ 厚の切片を用い、Grubeの方法(Arch Histol Jpn. 49:391-410(1986))に従ってSodium Methoxide処理で樹脂を除去した後、蛍光抗体法によりLHの局在を標識し行った。脱樹脂した切片は、2% 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℃)。一次抗体の結合反応後、緩衝液(0.5 M NaCl - 0.01M リン酸緩衝液、pH 7.4)で良く洗浄し、さらにAlexa Fluor 488 標識抗ウサギIgG抗体を結合(1時間、20℃)させることで抗原の局在部位を可視化した。蛍光標識された切片は0.1%のp-phenylenediamine dihydrochloride(Sigma Chemical Co.)を含む90%グリセロール溶液で封入後、落射蛍光顕微鏡(BX51-FL; オリンパス)で観察し、必要に応じて、典型的な所見をデジタル写真撮影装置(MP5Mc/OL; オリンパス)で記録した。

金コロイド標識2次抗体を用いた包埋後標識法(電顕レベルの解析)：

電顕レベルの金コロイド法による標識は既発表の方法に基づいて行った(Sakai et al., Arch Histol Cytol. 68:337-347(2005))。手順を簡単にまとめると、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℃)。一次抗体の結合反応後、緩衝液(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IgG抗体(金コロイド径:5、10、15nm)を結合(1時間、20℃)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の方法(J Histochem Cytochem. 30:81-85(1982))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、透過型電子顕微鏡(JEM-1010; 日本電子)を用いて観察した。

③形態計測法による定量化

LHRHアゴニスト持続投与によって生じる性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造の変化を定量的に評価するために、免疫標識された切片から各実験群ごとに無作為的に抽出した24視野を同一倍率・同一条件で撮影し、得られた電顕写真上で分泌顆粒の体積率($\mu \text{m}^3 / \mu \text{m}^3$: 分泌顆粒の断面積 / 細胞質の断面積で算出)、平均直径(nm)、金コロイド粒子の標識密度(particles / μm^2 : 金コロイド数 / 分泌顆粒の断面積で算出)を算出した。

(3) 生化学的解析

①生化学的解析に供する血液および組織

標本の採取

形態学的解析に用いたラットと同様に leuprorelin 徐放性製剤投与開始から所定の日数を経た各実験群個体を深麻酔下で開腹し、少量のヘパリンで処理したプラスチック注射筒を用いて下大静脈から静脈血を採取した。採取した血液は直ちに冷却下で遠心し血漿と血球を分離後、血漿のみをマイクロチューブに分注して液体窒素で急速凍結し、後述するホルモン濃度測定に供するまで、 -80°C のディープフリーザー内で保存した。

また、この全採血後、直ちに断頭して下垂体組織を切り出し、液体窒素で急速凍結し、後述するイムノブロット解析に供するまで、 -80°C のディープフリーザー内で保存した。

さらに、同個体から精巣を切り出し、その湿重量を測定した。

②酵素免疫測定法 (EIA 法) による血漿 LH 濃度の測定

血漿中の LH 濃度は、市販の EIA キット (Amersham Biosciences Corp.) を用い、添付されたプロトコールに従って測定した。各サンプル中の LH 量は既知量の LH 標準品を測定して得られた標準曲線に当てはめて算出し、1 元配置分散分析法および Tukey の HSD 法を用いて統計学的な有意性を検討した。

③イムノブロット法による下垂体組織中のグラニン蛋白の変動の解析

下垂体組織中のグラニン蛋白 (CgA および SgII) の量的変動については、イムノブロット法により半定量的に解析した。各実験群の個体から採取した下垂体組織から組織抽出液を調製し、Townsend らの方法 (PNAS. 76:4350-4354 (1979)) に従って、10% アクリルアミドゲルを用いた SDS 電気泳動法で組織抽出液中の蛋白を分離後ニトロセルロース膜に転写した。

続いて、分離した蛋白が転写されたニトロセルロース膜を 5% BSA によりブロッキングし、一次抗体の結合反応 (1 時間、 20°C)、HRP 標識二次抗体の結合反応 (1 時間、 20°C) を常法通り行った後、市販の化学発光キット (ECL キット: Amersham Biosciences Corp.) を用いて膜上で一次抗体が結合したバンドを検出した。得られたブロット上の目的のバンドの濃度はデンシトメトリーで半定量的に評価し、得られた値の統計学的な有意性については、

1 元配置分散分析法および Tukey の HSD 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) LHRH アゴニスト持続投与ラットモデルの妥当性の検証

本研究で作製した各実験群で、LHRH アゴニスト徐放性製剤が適切に作用しているかどうかについては、各実験群ラットの血漿 LH 濃度および精巣重量を測定することで検証した。

血漿 LH 濃度は、同剤投与 1 日後に一過性に対照群の約 4 倍まで上昇したが、その後低下し、以降 28 日後まで対照群より低値で推移した。さらに、薬剤投与開始から 84 日後の時点では、追加投与の有無に関わらず、血漿 LH 濃度の測定値は回復しなかった。

一方、各実験群の精巣重量は、同剤投与開始から 28 日後まで有意に減少した。その後、追加投与なしで 84 日後まで経過観察した群 (単回投与 84 日群) では精巣重量が対照群と同程度まで回復したのに対し、28 日ごとに同剤を追加投与した群 (反復投与 84 日群) では、対照群より有意に低かった。

以上の結果をまとめると、今回の実験で使用した leuprorelin 徐放性製剤の投与量で、これまで報告されている通り、一過性にゴナドトロピンの大量放出が起きる投与直後の急性効果期を経たのち約一ヶ月間にわたって下垂体からの LH 分泌を十分に抑制することができ、解析に供する動物モデルの作製法は適切であることが確認された。

また、同徐放性製剤の有効期間である 1 ヶ月を過ぎた後には、追加投与をしなければ投与から 84 日目までに精巣重量が対照群の値まで回復したことから、同剤の機能的影響は可逆的であることが示唆された。ただし、単回投与 84 日群でも、反復投与 84 日群と同様に、血漿 LH 濃度は低値のまま対照群レベルまで回復しなかった。その理由については不明であるが、用いた EIA キット中の抗体に結合し得る LH とは糖鎖などの修飾が若干異なる (しかし機能的には活性のある) LH が産生・分泌されているのかもしれない。

(2) 性腺刺激ホルモン産生細胞における分泌顆粒構成の経時的変化から見た leuprorelin 徐放性製剤の影響

①性腺刺激ホルモン産生細胞の分泌顆粒

の変化：同細胞内の分泌顆粒の量および大きさは、投与開始1日後から著明に減少し、4日後および7日後には細胞膜直下に局限して少量の小型の分泌顆粒が観察された。その後、28日後までに徐々に分泌顆粒が細胞内に再蓄積されるが対照群と同程度までは回復せず、分泌顆粒の体積率および平均直径は対照群と比較して有意に低かった。この後、分泌顆粒の体積率および平均直径は、追加投与をしない群では84日後までに対照群と同程度まで回復したが、持続投与群では初回投与から84日後でも対照群よりも有意に低い値を示した。

②分泌顆粒の抗LH抗体による標識率の変化：分泌顆粒の抗LH抗体による標識率は、同剤投与直後は対照群と同程度であったが、投与開始7日後より急激に低下し、以降28日後まで対照群と比較して有意に低いレベルで推移した。この後、追加投与をしない群では84日後までに対照群と同程度まで回復したが、持続投与群では初回投与から84日後でも対照群よりも有意に低い値を示した。

③グラニン蛋白の局在と相対量の変化：CgA陽性分泌顆粒とSgII陽性分泌顆粒の個別の体積率の推移に関しては、両者を一括して解析した上記の結果と同様の変動を示した。一方、分泌顆粒の平均径は、CgA陽性分泌顆粒が体積率と同様の変化を示したのに対して、SgII陽性分泌顆粒は各実験群間でほとんど差が認められなかった。また、CgAとSgIIの細胞内局在に関しては、同剤投与後には、対照群と同様にCgAとSgIIが単独に含まれる顆粒に加えて、両者が同一の顆粒に共存する中間型分泌顆粒が出現した。また、下垂体抽出液中のグラニン蛋白量に関しては、CgAもSgIIも投与開始から28日後の時点では対照群より有意に低く、その後追加投与せずに84日後まで経過すると対照群と同程度まで回復した。一方、84日持続投与群ではどちらも対照群より低値であった。

以上の所見を総合すると、1ヶ月にわたって有効量のLHRHアゴニストを持続的に放出する徐放性製剤は、まず投与直後にその本来の分泌刺激作用によって性腺刺激ホルモン産生細胞内の分泌顆粒を枯渇させ、その後、同剤の持続投与の効

果として現れるLHRH受容体の不活性化を介してゴナドトロピン生合成および分泌顆粒放出を強力に抑制することが示された。

薬理的な作用機序の見地からは、LHRH誘導体は下垂体での性腺刺激ホルモン産生細胞の細胞膜上のLHRH受容体を強力に刺激するアゴニストと逆に抑制するアンタゴニストの二つに分類される。前立腺癌の治療などにおけるLHRH誘導体の目的は精巣でのテストステロン合成・分泌を抑制することであり、その目的のためには同細胞からのゴナドトロピン分泌を低下させるLHRHアンタゴニストの方が理論的には適切であると思われるが、前立腺癌の治療目的で実際に臨床的に実用化されているのは、本研究で用いたleuprorelinに代表されるLHRHアゴニストである。

これまで、LHRHアゴニスト投与直後の一過性のゴナドトロピン放出は、臨床的な見地からは忌避すべき副作用であると考えられてきたが、今回の電顕免疫組織化学法および形態計測法による解析によって、そのような作用を持たないLHRHアンタゴニストよりもむしろleuprorelinのようなLHRHアゴニストの方が、投与開始初期に標的細胞内から生理活性のあるゴナドトロピンを含む分泌顆粒を枯渇させることができるため、アンタゴニストより効率的に以降の同細胞からのゴナドトロピン放出を抑制できるのではないかと考えられた。

加えて、単回投与84日群と反復投与84日群の比較から、LHRHアゴニストであるleuprorelinが性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造に与える影響は可逆的であることも示された。

以上、分泌顆粒構成の経時変化から見たleuprorelin徐放性製剤の性腺刺激ホルモン産生細胞への影響に関する研究成果の詳細は、研究発表欄に記載した原著論文(Kitahara et al., Arch Histol Cytol. 70:79-93 (2007))にまとめ報告した。

(3) 急性効果が現れる時期における細胞内膜系の変化

分泌顆粒構成に注目してLHRHアゴニスト持続投与の影響を解析した上記の研究過程で、本来の強力なアゴニスト作用が発揮される急性効果期にホルモン生合成及び修飾の場である粗面小胞体やゴルジ装置で興味深い変化が現れることを発

見した。

leuprorelin 徐放性製剤投与の急性効果期とされる投与開始 1 日後から 4 日後までの間に、性腺刺激ホルモン産生細胞内では、粗面小胞体が核膜から伸展して増殖し網状の塊を形成し、同時にゴルジ装置の層板が断片化する像が頻りに観察された。これらの所見は、急性効果期から慢性効果期に移行する同剤投与開始から 7 日後までには消失し、以降は同剤の効力が失われる 28 日間後まで、対照群と比較してゴルジ装置、粗面小胞体の発達は悪かった。

以上の所見より、LHRH アゴニストである leuprorelin が急性効果で性腺刺激ホルモン産生細胞を過剰に刺激する時期には、一過性に分泌蛋白合成の場である粗面小胞体の量を増やす細胞内応答が起こり、その結果ゴルジ装置への膜供給が一時的に不足することが示唆された。この研究結果は、研究発表欄に記載した学会 (日本解剖学会・第 114 回全国学術集会, 2009 年 3 月、岡山) のシンポジウムで報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 渡部 剛、阪井裕子、平 義樹、暮地本宙己、穂坂正博「**内分泌細胞における分泌顆粒形成機構**」顕微鏡 43:29-34 (2008) 査読無 (依頼稿)
- ② Kitahara K, Sakai Y, Hosaka M, Hira Y, Kakizaki H, Watanabe T: Effects of a depot formulation of the GnRH agonist leuprorelin on the ultrastructure of male rat pituitary gonadotropes. Arch Histol Cytol 70:79-93 (2007) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 渡部 剛、阪井裕子、暮地本宙己「**実験内分泌学的アプローチを活用した細胞内過程の解析**」第 114 回解剖学会全国学術集会シンポジウム「細胞内輸送と代謝」(2009 年 3 月 28 日、岡山)
- ② 渡部 剛、阪井裕子、穂坂正博「**内分泌細胞における分泌顆粒形成とそれに係わるグラニン蛋白と脂質ラフトの役割**」第 81 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム「分泌現象と生体膜、そしてその可視化」(2008 年 5 月 17 日、青森)
- ③ 阪井裕子、平 義樹、河野 透、渡部 剛「**ラット下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞におけるゴルジ装置の形態と微小管の走行**」第 113 回解剖学会全国学術

集会 (2008 年 3 月 28 日、大分・由布市)

- ④ 阪井裕子、平義樹、渡部 剛「**ラット下垂体前葉における分泌蛋白の品質管理過程の多様性について**」第 112 回解剖学会全国学術集会 (2007 年 3 月 29 日、大阪)
- ⑤ 渡部 剛、伊藤恵美、阪井裕子、渡辺慎哉「**遺伝子発現から見た下垂体の雌雄差**」第 112 回解剖学会全国学術集会シンポジウム「視床下部 - 下垂体研究の最前線 - 新しい発見と新たな概念の提言 -」(2007 年 3 月 27 日、大阪)
- ⑥ 渡部 剛、穂坂正博、阪井裕子、平義樹「**神経・内分泌細胞における分泌蛋白の動線の再考 - ゴルジ装置の極性が示すもの -**」NPO 法人総合画像研究支援・第 3 回可視化技術ワークショップ「ゴルジ装置と物質輸送のイメージング」(2006 年 11 月 11 日、東京)

6. 研究組織

(1) 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

(3) 連携研究者

阪井 裕子 (SAKAI YUKO)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：40041826

穂坂 正博 (HOSAKA MASAHIRO)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号：80311603