

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2007 ～ 2009
 課題番号： 19590245
 研究課題名(和文) 新規下垂体糖蛋白ホルモン、サイロスティムリンの生理機能の探索
 研究課題名(英文) Biological roles of the thyrostimulin, the novel glycoprotein hormone from pituitary
 研究代表者
 長崎 弘 (NAGASAKI HIROSHI)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師
 研究者番号：30420384

研究成果の概要(和文)：甲状腺、副腎皮質、性腺等の内分泌臓器の働きを支配する下垂体前葉において、新たにサイロスティムリンというホルモンが発見されました。サイロスティムリンの役割を調べる為に、その遺伝子調節機構を調べたところ、炎症を引き起こすサイトカインによって発現が誘導されることが分かりました。また、このホルモンはヒツジ、ブタ、ウシ、ヒトの脳下垂体前葉において、ACTH というホルモンと同じ細胞で作られることもわかりました。

研究成果の概要(英文)：Thyrostimulin is a novel glycoprotein hormone from anterior pituitary that regulates various endocrine organs including thyroid, adrenal gland, and reproductive glands. We found inflammatory cytokines up-regulated GPB5 (one of the subunit composing heterodimeric thyrostimulin) that suggest the hormone is involved in the stress response. Also GPB5 co-localize with ACTH in the anterior pituitary cells in higher mammalian species including ovine, porcine, bovine, and human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：サイロスティムリン、下垂体、甲状腺、ACTH、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 2000年頃にデータベースから見出された2種類の糖タンパク質、GPA2及びGPB5(GlycoProtein hormone subunit Alpha 2及びBeta 5)は、ヘテロ2量体を形成してサイ

ロスティムリンという甲状腺刺激活性を有する生理物質であることが明らかとなった。

1950年代に相次いだ下垂体ホルモンの発見から50年を経た現在、サイロスティムリンの発見はポストゲノム時代の内分泌物質検索方

法の新たなパラダイムとなった。下垂体に大量に存在していることにより蛋白精製が比較的容易だった既知の下垂体ホルモンと異なり、ゲノムデータベースから発見されたサイロスティムリンは蛋白レベルでの発現量が少なかったために発見が遅れたとも考えられる。

(2) しかし実験動物として汎用されるマウス及びラットなどのげっ歯類の下垂体には GPB5 がほとんど存在しないため生物学的機能の詳細は不明であった。2006 年、サイロスティムリンはヒト下垂体前葉の ACTH 産生細胞に共存するという報告があり、このホルモンに注目が集まった。

。

2. 研究の目的

(1) GPA2 および GPB5 の転写調節機構を *in vitro* 実験系で解明する。

(2) サイロスティムリンを脳下垂体で発現する種がこれまでのところヒトしかいないため、動物実験に用いることの出来る動物種を検索する。

(3) ヒトの血液及び病理標本からサイロスティムリンの循環動態や組織発現を詳細に検討してヒトにおける生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 転写調節領域の解析: これまでの検討で内分泌器官の組織発現に関与する、LIM homeodomain 系の転写因子である *isl-1* が正の調節を行なうことを明らかにしたが、今後は機能調節に関する転写調節因子の探索を行なう。GPB5 については NFkB が機能調節性の転写因子であることを培養細胞系で明らかにしている。更に、より生理的な実験系を開発して NFkB の上流に存在する生理活性物質の探索をすすめる。

(2) ELISA 系の構築: すでに各蛋白の合成部分ペプチドで免疫する方法で、GPA2 および GPB5 それぞれの抗血清を得た。いずれも Western blotting では使用可能であったが、免疫組織染色では GPB5 抗体のみ有効であった。GPA2 の免疫染色用、及び GPB5 のサンドイッチ ELISA 用に新たに抗体を作成する必要がある。いずれの蛋白についても、哺乳類浮遊細胞系、用いて蛋白を大量精製し、家兎に免疫して抗血清を得る。

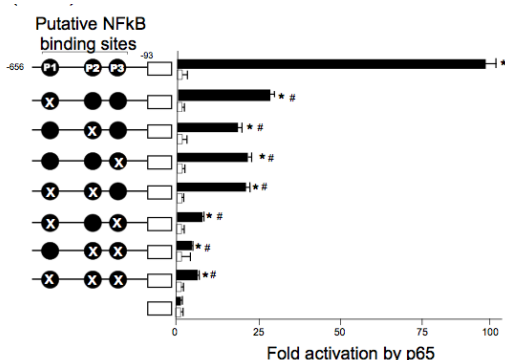
(3) 下垂体腫瘍の免疫染色: 外科的に切除された、各種下垂体疾患標本（末端肥大症、クッシング病、プロラクチノーマ、非機能性腺腫、ラトケ嚢腫、下垂体炎など）において GPB2 および GPB5 の免疫染色を行ない腫瘍病理との相関を探る。

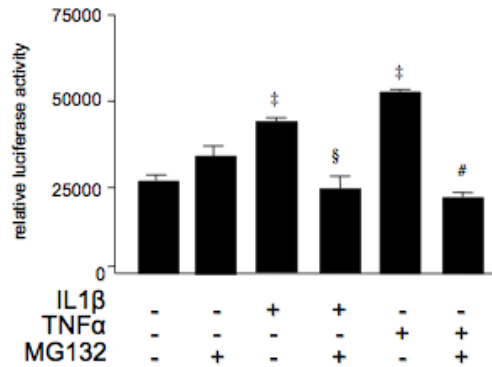
(4) 各種哺乳類下垂体におけるサイロスティムリンの探索: 比較生物学的な興味と、サイロスティムリンの生理実験が可能な動物を探索するという目的で、各種哺乳類（サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、フェレット、モルモットなど）から下垂体をサンプリングし、免疫組織化学を行なう。

4. 研究成果

(1) 転写調節領域の解析: 内分泌組織発生に関与する転写因子、*isl-1* が GPA2 の正の調節を行なうことを *Regulatory Peptide* 誌に発表した。

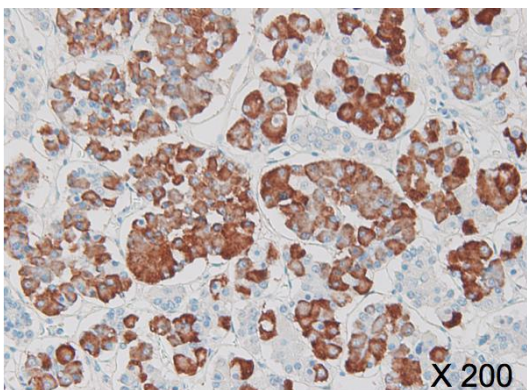
GPB5 については、培養細胞系において IL1- β および TNF α 等の炎症性サイトカインが NFkB を介して発現調節に関与することを明らかにした。





(2) ELISA系の構築：ELISA系を構築するため、E. Coli 大量蛋白発現系で GST-GPB5 を発現、家兔に免疫して抗血清を作成したが、ELISA系の確立には至らなかった。

(3) 下垂体腫瘍の免疫染色：各種下垂体疾患標本（末端肥大症 10 例、クッシング病 5 例、プロラクチノーマ 3 例、非機能性腺腫 10 例）において免疫染色を行なったところ、GPB5 免疫活性はクッシング病の腫瘍組織にのみ認められ、ACTH との共存が確認された。他の下垂体腫瘍には GPB5 は検出されなかった。



(4) 各種哺乳類下垂体におけるサイロステイムリンの探索：各種哺乳類（ウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、モルモット、マウス）から下垂体を摘出し、免疫組織染色を行なった。ウシ、ブタ、ヒツジではヒトと同様 GPB5 陽性であったが、それ以外では陰性であった。比較的高等、大型の哺乳類の下垂体でのみサイロステイムリンが存在するという、種差が観察された。

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）

- ①. Chizuko Suzuki, Hiroshi Nagasaki, Yoshiki Okajima, Hidetaka Suga, Nobuaki Ozaki, Hiroshi Arima, Yasumasa Iwasaki, and Yutaka Oiso. Inflammatory Cytokines Regulate Glycoprotein Subunit Beta 5 (GPB5) of Thyrostimulin through NF-κB. *Endocrinology* 150 (5), 2237-2243:2009 査読有り
- ②. Yoshiki Okajima, Hiroshi Nagasaki, Chizuko Suzuki, Hidetaka Suga, Nobuaki Ozaki, Hiroshi Arima, Yoji Hamada, Olivier Civelli, Yutaka Oiso. Biochemical roles of the oligosaccharide chains in thyrostimulin, a heterodimeric hormone of glycoprotein hormone subunits alpha2 (GPA2) and beta5 (GPB5). *Regulatory Peptides* 148,62-67, 2008 査読有り
- ③. Chizuko Suzuki, Hiroshi Nagasaki, Yoshiki Okajima, Hidetaka Suga, Hiroshi Arima, Yasumasa Iwasaki, and Yutaka Oiso. The LIM Domain Homeobox Gene isl-1 is a positive regulator of Glycoprotein alpha2 (GPA2), a subunit of thyrostimulin. *Regulatory Peptides*, 142, 60-67,2007, 査読有り

〔学会発表〕（計 3 件）

- ①. Hiroshi Nagasaki, A TSH-like heterodimer thyrostimulin is localized in the corticotroph and ACTH producing tumor ENDO 2008, The 89th annual meeting, The Endocrine Society 2008 June 15-18, 2008 (Sun-Wed) San Francisco, California
- ②. Hiroshi Nagasaki, The regulatory systems for novel pituitary hormone, thyrostimulin.

Neuroscience 2007, The Scientific meeting for Society for Neuroscience. 2007. 11. 2-7 San Diego, U.S.A.

- ③. Yoshiki Okajima, A Novel Glycoprotein Hormone thyrostimulin is Localized in the Corticotroph Cells of Human Anterior Pituitary. *Neuroscience 2007*, the Scientific meeting for Society for Neuroscience. 2007. 11. 2-7 San Diego, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長崎 弘 (NAGASAKI HIROSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師
研究者番号：30420384

(2) 研究分担者

濱田 洋司 (HAMADA YOUJI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：20293706
大磯 ユタカ (OOISO YUTAKA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40203707