

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17985

研究課題名(和文) 時計遺伝子に着目した機能性下垂体腫瘍の薬物制御とその機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of drug regulation mechanisms of functional pituitary tumors by focusing on circadian rhythm

研究代表者

小松原 基志 (komatsubara, motoshi)

岡山大学・大学病院・医師

研究者番号：80794338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：日内変動をもつホルモンを過剰産生する腫瘍では「分泌リズムの異常・フィードバック機構の破綻」を必ず伴うが、その機序は十分に知られていない。今回の研究ではマウスAtT20細胞を用いて睡眠覚醒に関与するオレキシンのACTH分泌への影響についてBMP-4に着目して検討した。オレキシンAはCRH受容体発現を増強、BMP-Smadシグナルを減弱させACTH合成促進に働くことが示された。更に摂食調節と自律神経との関与を検討するためにラットPC12細胞を用いてインクレチンによるカテコラミン合成への影響を検討した。GIPはステロイドやBMP-4作用と協調してカテコラミン合成調節に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルモンを過剰産生する機能性腫瘍の治療の第一選択は手術による摘出であるが、多くの症例で術後薬物治療を要する。手術不能例や薬剤治療抵抗例、副作用による使用不能例に対する有効な治療法がなく臨床課題となっている。我々のグループでは各内分泌臓器でのホルモン調節機構について概日リズム、摂食調節などの生体リズムとBMP作用の関連に着目して検討してきた。今回の検討では中枢神経で睡眠覚醒に関与するオレキシンが下垂体ACTH合成促進に働くことを明らかにした。生体リズム、フィードバック機構に着目し、ホルモン調節メカニズムを更に検討することでホルモン過剰産生腫瘍に対する新たな治療戦略を模索していく。

研究成果の概要(英文)：Tumors that overproduce hormones with circadian rhythms are characterized by dysregulation of secretory rhythms and disruption of feedback mechanisms, but the underlying mechanisms are not fully understood. In the present study, we investigated the role of orexin, which is involved in sleep-wake regulation, in regulation of ACTH synthesis, focusing on the relationship with BMP signaling by using the mouse pituitary corticotrope tumor cell line AtT20. It was shown that Orexin A promoted ACTH synthesis by enhancing the expression of CRH receptors as well as suppressing BMP-Smad signaling. In addition, we investigated the effects of incretins on catecholamine synthesis in rat pheochromocytoma PC12 cells to evaluate the relationship between feeding regulation and autonomic nervous system. The results suggest that GIP is involved in the regulation of catecholamine synthesis in cooperation with steroids and BMP-4 action.

研究分野：内分泌学

キーワード：オレキシン インクレチン 下垂体 褐色細胞腫 BMP 概日リズム

## 1. 研究開始当初の背景

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、ドパミン作動薬やソマトスタチン(SS)アナログを使用する。しかし、薬剤抵抗例が存在し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。また下痢や高血糖など副作用でSSアナログ使用が困難な症例も存在する。薬剤によるホルモン分泌抑制メカニズムの詳細が、十分に解明されていないことも問題点として挙げられる。我々のグループでは、クッシング病やプロラクチン産生下垂体腺腫のように、日内変動をもつ下垂体前葉ホルモンを過剰産生する腫瘍では分泌リズムの異常、フィードバック機構の破綻を必ず伴うという点に注目し、時間軸調節ホルモンであるメラトニン・オレキシンおよび時計遺伝子、治療薬として使用されているSSアナログのホルモン合成への影響とその機序を検討することで、分泌リズムの異常を来すメカニズムの解明を目指し、ホルモン過剰産生腫瘍に対する新たな治療戦略を模索している。これまでの研究成果としてマウスコルチコトローブ細胞 AtT20 において、メラトニンは CRH 誘導性の ACTH 分泌を抑制し、BMP-4 と相互協調的に ACTH 分泌を調節する新たな機序を示した(Tsukamoto N, et al. MCE 375:1, 2013)。また時計遺伝子に関して、ACTH 産生は Period 遺伝子(Per)、PRL 産生は Clock 遺伝子(Clock) と関連し、メラトニンや BMP-4 は Per と POMC の発現を共に抑制した。メラトニンが BMP-4 や時計遺伝子と協調し、日内変動を持つ ACTH や PRL の調節に寄与していることが示唆された(Tsukamoto-Yamauchi N, et al. BBRC 459:172, 2015)。また自律神経調節に関与するカテコラミン調節に関する検討では、ラット褐色細胞腫細胞 PC12 を用いてメラトニンによるカテコラミン分泌への影響を検討し、メラトニンは BMP-4、グルココルチコイドと協調的に働き副腎髄質でのカテコラミン合成調節に関与していることを明らかにした(Komatsubara M, et al. J Steroid Biochem Mol Biol. 165:182, 2017)。

## 2. 研究の目的

これまでの検討で概日リズム調節に深く関わるメラトニンが下垂体前葉において BMP-4 や時計遺伝子と協調し ACTH 合成調節に寄与していることを示してきた。本研究では中枢神経で睡眠覚醒、摂食調節に関与するオレキシンによる ACTH 合成調節への影響を、これまで検討を進めてきた下垂体 BMP システムとの相互作用を中心に検討する。ホルモン産生腫瘍に対するより有効で新たな内科的治療戦略の実現へ向けて、日内変動のある下垂体前葉ホルモンの概日リズム形成、フィードバック機構の機序の解明を目指す基礎的研究を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

ACTH 産性能を有するマウスコルチコトローブ細胞 AtT20 を用いてオレキシンによる ACTH 合成への影響を検討した。

1) AtT20 細胞におけるオレキシン受容体の発現と CRH 受容体および POMC の発現に対するオレキシン A の影響。

[A]まず AtT20 細胞におけるオレキシン受容体の発現をマウスゴナドトローブ細胞 L T2 と比較して RT-PCR 法で検討した。[B]次に定量 PCR 法及びウエスタンブロットを用いオレキシン A (100 nM) 添加後 24 時間、48 時間での CRH 受容体発現の変化を検討した。[C]さらに CRH(100nM) 刺激下・非刺激下でオレキシン濃度勾配(10-300nM)処理下における ACTH の前駆体である POMC 転写量変化を定量 PCR 法を用いて検討した。

2) AtT20 細胞におけるオレキシン A の BMP シグナルへの影響

[A]定量 PCR 法を用いてオレキシン A 刺激(10nM、100nM)24 時間後から、BMP-4(10ng/ml)で 1 時間、6 時間、24 時間刺激し POMC 発現量の変化を検討した。[B]次にオレキシン A(100nM)刺激 24 時間ののち BMP-4(10ng/ml)刺激 1 時間後のリン酸化 Smad1/5/9 発現量変化をウエスタンブロットで検討した。[C]同様の条件で total RNA を回収し BMP-Smad シグナルの標的遺伝子である Id-1 発現量変化を定量 PCR 法で検討した。

3) AtT20 細胞におけるオレキシン A の BMP 受容体への影響

[A]オレキシン A 添加後 24 時間での BMP 受容体(ALK2、ALK3、ALK6、BMPRII、ACTRIIa)mRNA 発現量変化を定量 PCR 法で検討した。[B、C]オレキシン A 添加後 24 時間での抑制性 Smad6、7 の発現量変化を定量 PCR 法、ウエスタンブロットでそれぞれ検討した。

次に、概日リズムと下垂体ホルモン調節において関連する因子として摂食調節と自律神経との関与を検討するために、摂食によるインスリン分泌に寄与するインクレチンと交感神経系の活性化を示すカテコラミンとの関係にも着目して研究を進めた。ラット褐色細胞腫細胞 PC12 を用いてインクレチンによるカテコラミン合成への影響を検討した。

4) PC12 細胞におけるインクレチン受容体発現とインクレチンによるカテコラミン合成への影響

[A]PC12 細胞における GIP 受容体、GLP-1 受容体発現を RT-PCR 法で検討した。[B]GIP、GLP-1 濃

度勾配処理下における 24 時間後の培養液中のカテコラミン濃度を測定した。[C, D]次に GIP、GLP-1 濃度勾配処理下における 24 時間後のカテコラミン合成酵素であり TH、DDC、DBH の発現量変化を定量 PCR 法で検討した。

#### 5) PC12 細胞におけるインクレチンの副腎皮質ステロイド作用への影響

[A, B]定量 PCR 法を用いて[A]デキサメサゾン(100nM)、[B]アルドステロン(100nM)と GIP(100nM) or GLP-1 (100nM)を同時添加後 24 時間でのカテコラミン合成の律速酵素である TH 発現量変化を検討した。[C, D]GIP(100nM)、GLP-1(100nM)添加後 24 時間での[C]グルココルチコイド受容体(GR)、[D]ミネラルコルチコイド受容体(MR)発現量変化を定量 PCR 法で検討した。

#### 6) PC12 細胞における GIP の BMP 作用への影響

[A]GIP(100nM)刺激下・非刺激下での BMP-4(10ng/ml)刺激 24 時間後の TH 発現量変化を定量 PCR で検討した。[B]GIP(100nM)刺激下・非刺激下 24 時間後から BMP-4(10ng/ml)刺激 1 時間後のリン酸化 Smad1/5/9 発現量変化をウエスタンブロットで検討した。[C]GIP(100nM)刺激下・非刺激下での BMP-4(10ng/ml)刺激 24 時間後の Id-1 発現量変化を定量 PCR で検討した。

### 4. 研究成果

#### 1) マウスコルチコトロフ細胞 AtT20 での検討

マウスゴナドトロフ細胞 L T2 ではオレキシン 1 受容体(OX1R)、オレキシン 2 受容体(OX2R)が同程度に検出されたがマウスコルチコトロフ細胞 AtT20 では OX2R が主に発現していた。オレキシン A(100nM)添加により CRH 受容体発現は増強した。オレキシン A(10-300nM)は単独では POMC mRNA 発現に変化はなかったが、CRH(100nM)存在下ではオレキシン A(10-300nM)添加により POMC mRNA 発現が増強した。BMP-4(10ng/ml)刺激後 24 時間で POMC mRNA 発現は減弱したが、オレキシン A(10nM, 100nM)存在下でも BMP-4 の POMC 発現抑制作用は変化しなかった。一方で BMP シグナルに着目すると、オレキシン A(100nM)による 24 時間の前処理により BMP-4(10ng/ml)誘導性の Smad1/5/9 リン酸化が抑制され、BMP シグナルの標的遺伝子である Id-1 mRNA 発現も減弱した。オレキシン A による BMP シグナル減弱の機序を検討するため BMP 受容体発現への影響を検討したが、24 時間のオレキシン A(100nM)処理では BMP 受容体発現は変化しなかった。一方で抑制性 Smad である Smad6、Smad7 発現は 24 時間のオレキシン A 処理により増強した。このように、オレキシン A は CRH シグナルを増強し、BMP-Smad 作用を減弱することで、POMC の発現を増強する効果があり、これがストレス応答の制御に関与している可能性が示唆された。

#### 2) ラット褐色細胞腫細胞 PC12 での検討

ラット褐色細胞腫細胞 PC12 には GIP 受容体、GLP-1 受容体発現を認めた。24 時間の GIP(10-300nM)刺激で培養液中へのドパミン分泌、カテコラミン合成酵素である TH、DDC、DBH mRNA 発現が増強したが、24 時間の GLP-1(10-300nM)刺激ではカテコラミン合成へは影響を与えなかった。生理的に存在する副腎皮質ホルモンとの相互作用を検討したところ、GIP(100nM)はグルココルチコイド/ミネラルコルチコイド誘導性の TH mRNA 発現を増強したが、GLP-1(100nM)は副腎皮質ステロイド誘導性のカテコラミン合成にも影響しなかった。この機序として GIP 添加によりグルココルチコイド受容体、ミネラルコルチコイド受容体発現が増強することが示された。また副腎髄質に発現している BMP-4 との相互作用について検討したところ GIP(100nM)は Smad1/5/9 リン酸化を抑制し BMP-4(10ng/ml)のカテコラミン合成抑制作用を減弱させた。この機序について現在更なる検討を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoshi Fujisawa, Motoshi Komatsubara, Naoko Tsukamoto-Yamauchi, Nahoko Iwata, Takahiro Nada, Jun Wada, Fumio Otsuka	4. 巻 22
2. 論文標題 Orexin A Enhances Pro-Opiomelanocortin Transcription Regulated by BMP-4 in Mouse Corticotrope AtT20 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22094553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤澤 諭、小松原基志、越智可奈子、原 孝行、当真貴志雄、山内尚子、稲垣兼一、和田 淳、大塚文男
2. 発表標題 Effects of orexin A on prolactin production by regulating BMP-4 activity in rat pituitary lactotorope cells.
3. 学会等名 ENDO 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松原基志、藤澤諭、灘隆宏、岩田菜穂子、大塚文男
2. 発表標題 Effects of incretins on catecholamine synthesis by rat pheochromocytoma PC12 cells.
3. 学会等名 ENDO 2020（COVID-19のため開催中止）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松原基志、西山悠紀、灘隆宏、岩田菜穂子、藤澤諭、原孝行、細谷武史、当真貴志雄、稲垣兼一、和田淳、大塚文男
2. 発表標題 インクレチンによるカテコラミン合成への影響：BMPとステロイドに着目して
3. 学会等名 第92回内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬隆宏、小松原基志、藤澤諭、中野靖浩、長尾聡子、岩田菜穂子、大塚文男
2. 発表標題 カテコラミン合成におけるSSTR作動薬の影響とBMP-4の関与
3. 学会等名 第92回内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤諭、小松原基志、森本栄作、西山悠紀、原孝行、細谷武史、当真貴志雄、越智可奈子、稲垣兼一、和田淳、大塚文男
2. 発表標題 Orexinによる下垂体前葉ホルモン分泌への影響とBMP-4の関与
3. 学会等名 第92回内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本栄作、稲垣兼一、小松原基志、藤澤諭、西山悠紀、原孝行、細谷武史、当真貴志雄、稲垣兼一、大塚文男、和田淳
2. 発表標題 カテコラミン産生に対するスクレロスタチンの影響：PC12細胞を用いた検討
3. 学会等名 第92回内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤諭、小松原基志、原孝行、当真貴志雄、越智可奈子、稲垣兼一、和田淳、大塚文男
2. 発表標題 OrexinとBMP-4の下垂体前葉ホルモン分泌に与える影響
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松原 基志、灘隆宏、岩田菜穂子、藤澤 諭、原 孝行、当真貴志雄、稲垣 兼一、和田淳、大塚 文男
2. 発表標題 インクレチンの副腎髄質カテコラミン合成への影響とBMP-4の関与
3. 学会等名 第93回内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤澤諭、小松原基志、森本栄作、西山悠紀、寺坂友博、原孝行、当真貴志雄、越智可奈子、稲垣兼一、和田淳、大塚文男
2. 発表標題 コルチコトロフ細胞におけるorexinの影響とBMP-4の関与
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本栄作、稲垣兼一、小松原基志、藤澤諭、西山悠紀、寺坂友博、原孝行、当真貴志雄、越智可奈子、三好智子、大塚文男、和田淳
2. 発表標題 カテコラミン産生に対するWntシグナルの影響：PC12細胞を用いた検討
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------