

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590194

研究課題名（和文） 過労時の下垂体変性の分子機序の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of pituitary cell degeneration in a fatigued animal model.

研究代表者

小川 登紀子 (OGAWA TOKIKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：30382229

研究成果の概要（和文）：疲労ストレスを受けたラットの下垂体では、ホルモン分泌細胞の機能に異常を生じることを見いだした。中間葉のメラノトロフには、視床下部からの持続的な刺激により引き起こされたストレスに起因した細胞死が起こることを、前葉のソマトトロフは、増殖刺激に対する反応性が失われることを報告した。また、これらの機能異常の分子メカニズムについて研究を行い、関連する分子を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cellular dysfunctions were observed in two types of pituitary cells of a fatigued rat model. One was melanotrophs cell death induced by abnormality of hypothalamic neurons, and the other was proliferating disorder of somatotrophs. As a result of molecular analysis, part of the mechanism inducing cellular dysfunctions were founded.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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：持続的ストレス、下垂体、細胞死、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

1) 過労死や慢性疲労症候群に代表されるように、過度の疲労が身体に深刻な状況をもたらすことはすでに広く知られていた。一方で、このような疲労関連疾患が起こるメカニズムはほとんど明らかになっていなかったが、神経・内分泌および免疫系の異常が深く関わることを示唆されはじめていた。また臨床的には、疲労による深刻な身体的状況の診断の指標となる、いわゆる

疲労のバイオマーカーが求められていた。

(2) 疲労関連疾患の起こるメカニズムを明らかにするためには、動物モデルを用いた解析は有効な手法の一つである。疲労を反映する動物モデルが開発され、この一つが本研究に用いた過労モデルである。研究開始当初までに、ラットに持続的かつ複合的ストレス（疲労ストレス）を与えると、下垂体に疲労ストレスに非常に敏感に反応して複数の分

子の遺伝子発現が大きく変動することを見いだしていた。過労モデルが、内分泌系を中心とする疲労のメカニズム研究に有効なツールとなると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

(1) 過労が下垂体細胞の機能にどのように影響するかを明らかにする。下垂体は上位中枢である脳視床下部神経細胞からの制御によって種々のホルモンを分泌し、他の内分泌器官の制御のみならず、様々な末梢器官の恒常性維持に関与している。このように重要な器官である下垂体が、過労時にどのような変化を生じるのか、また上位中枢からの制御の異常を明らかにする。

(2) 過労時に見られる下垂体の変化を、細胞形態、ホルモン分泌を含む細胞機能を中心に解析し、下垂体の変化を引き起こす分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 過労モデル

Tanaka ら(2003)により作出された過労モデルは、ラットを1.5 cmの低水位の水を張ったケージで数日間飼育することにより、疲労ストレスを与えるもので、本研究にはこのモデルを用いた。また、これに準じて作出し、マウスモデルによる解析も行った。

(2) 過労モデル下垂体細胞の形態学的解析

ラットモデルは、通常のケージで飼育した対照動物と比較し、疲労ストレスを1, 3, 5日間与えたラット、および5日間の疲労ストレスの後3日間通常のケージで疲労回復させたラットの下垂体組織を解析した。下垂体組織は光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて形態観察し、各種細胞を同定したうえでそれぞれの細胞の変化を調べた。この結果、明らかな変化が認められた、中間葉のメラノトロフと前葉のソマトトロフについて以下の解析を行った。

(3) 下垂体細胞の機能解析

下垂体機能の健全性の維持には、下垂体細胞が常にターンオーバーを繰り返すことで細胞数を保つことと、ホルモン分泌刺激に対して適切な分泌を起こすことが必要と考えられる。そこで次の3項目について過労ラットの下垂体機能を調べた。

① 増殖細胞数の変化

細胞種によりその細胞分裂頻度が異なることから、下垂体組織を細胞増殖マーカーである抗Ki-67抗体と各々の下垂体細胞のマーカーとなる抗ホルモン抗体で二重染色を行い、細胞種ごとに増殖細胞の割合を調べた。

② 分泌ホルモンの血中濃度の変化

末梢血液中の下垂体ホルモン濃度は、断頭採血により採取した検体を用いて、RIA法により測定した。

③ 増殖およびホルモン分泌刺激に対する反応性

メラノトロフについては、ドーパミンアンタゴニストおよびアゴニスト投与による効果を、ソマトトロフにおいては成長ホルモン分泌ホルモン(GHRH)投与による効果を調べた。これらの効果は、前述の増殖細胞数および末梢血液中のホルモン濃度を調べることで評価した。

(4) 下垂体細胞変性の分子メカニズム解析
過労ラットのメラノトロフおよびソマトトロフそれぞれに生じる、機能的・形態学的異常に関与すると考えられる分子解析を以下の手法によって行った。

① 免疫組織染色

② 判定量的RT-PCR、*in situ* hybridization
およびwestern blottingによる関連分子の発現動態

③ 遺伝子改変マウスを用いた解析

4. 研究成果

(1) 過労ラットの下垂体細胞に起こる変化の概要

下垂体のホルモン分泌細胞は前葉に5種類、中間葉に1種類が存在する。下垂体組織を、増殖期の細胞マーカーであるKi-67抗体により免疫染色を行うと、通常どちらの葉においてもKi-67陽性細胞が認められた。5日間の疲労ストレスを与えたラットでは、前葉におけるKi-67陽性細胞が極度に減少し、他方中間葉では有意に増加した。

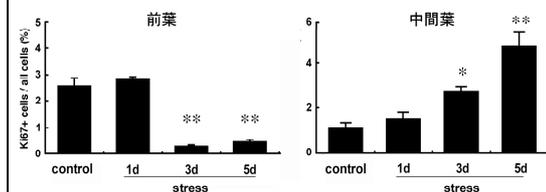


図 1. 過労モデルラット下垂体前葉と中間葉におけるKi-67陽性細胞数の変化

また細胞自体の形態的变化をみると、前葉細胞では一部の細胞に萎縮が認められ、中間葉ではホルモン分泌の活性化を示す像を呈した。

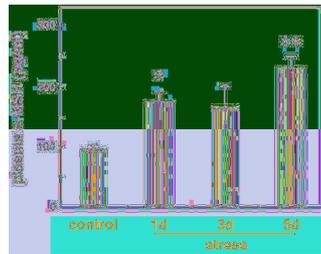
個体としては同一のストレスを受けながら、前葉と中間葉に逆の変化が生じる現象は、それぞれの葉が視床下部の異なる領域から別々の制御を受けることに起因するものと考えられ、この点も含めた解析を行った。

(2) 中間葉メラノトロフの過労死

① 疲労ストレスは限定された神経核にドーパミン合成異常を介して、メラノトロフのホルモン分泌を亢進させる

単一のホルモン分泌細胞メラノトロフからなる中間葉は、疲労ストレスを与え続けると、細胞増殖が盛んになるだけでなく、中間葉ホルモン (α -MSH, β -endorphin) の産生と分泌が盛んになり、末梢血液中のホルモン濃度も常に高い値を示した (図 2)。この結果に基づいて発展させた研究から、ヒトにおいても血液中の α -MSH 濃度が疲労の状態と関連があることを明らかにし (Shishioh-Ikejima et al., 2010)、さらに疲労のバイオマーカーとしての活用につながった (特許申請)。

図 2. 過労モデルラット末梢血液中の中間葉ホルモン、 α -MSH 濃度の推移。

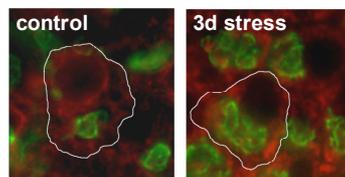


メラノトロフのホルモン分泌は、視床下部脳室周囲核領域のドーパミン神経細胞 (A14) が中間葉に直接入力し、ドーパミンによる負の制御を受けている。疲労ストレス下にあるラットの間葉のドーパミン線維では、ドーパミン合成酵素、チロシンヒドロキシラーゼの染色性が低下していた。脳視床下部領域におけるチロシンヒドロキシラーゼの mRNA の発現を *in situ* hybridization により調べたところ、過労ラットでは A14 領域においてのみ発現が低下していることが明らかになった。さらに過労ラットにドーパミンアゴニストを投与すると、末梢血液中の α -MSH 濃度が低下した。これによって、過労ラットでは中間葉におけるドーパミンの分泌低下が、ホルモン分泌を促していることが明らかとなった。

② メラノトロフは活発なホルモン分泌を続けた末に細胞死 (過労死) に陥る

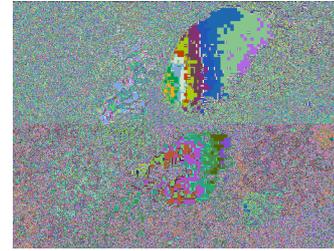
疲労ストレスを受けた中間葉では、 α -MSH の前駆体 (プロオピオメラノコルチン) mRNA が発現上昇した。メラノトロフは一過性の分泌刺激に対して、貯蔵しているホルモンを放出した後フィードバックにより分泌を終息するため、前駆体 mRNA の発現量は変化しない。疲労ラットでは、神経細胞の異常により分泌刺激が継続するため、ホルモン合成を亢進させるものと考えられた。免疫組織染色や微細形態の観察により、メラノトロフの粗面小胞体やゴルジ体が極度に発達した像 (図 3) が観察された。これによって、疲労ラットのメラノトロフでは、タンパク合成が極度に亢進していることが裏付けられた。

図 3. 小胞体 (赤) とゴルジ体 (緑) の変化。白のラインは細胞の外形を示す。



ストレスがさらに持続すると、メラノトロフの細胞内小器官に変性性的変化が生じ始め、最終的には特徴的な形態を有する細胞死の像が観察された (図 4)。

図 4. ストレス 5 日目のメラノトロフの電顕像。



過労ラットのメラノトロフに起こる細胞死は、疲労ストレスを受けた視床下部の限られた部位にある神経細胞 (A14) が、ドーパミン分泌を停止することに起因する。これにより、メラノトロフはホルモン分泌を亢進し続け、最終的には細胞死に陥ることから、この現象はホルモン分泌細胞の過労死といえる、極めて象徴的な現象といえる。

以上の研究成果は、国際学会 (Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, 2009) および国内学会 (日本解剖学会、2010. 招聘口演) にて発表するとともに、国際誌 (Ogawa et al., 2009) および和文雑誌 (小川 ほか、2010、総説) に掲載された。

③ メラノトロフの過労死には CHOP が関与する

メラノトロフ過労死の起こる過程にどのような分子が関与するのか、疲労ラットの間葉組織を対象とした、DNA マイクロアレー、RT-PCR および *in situ* hybridization による解析を行った。これらの結果および細胞内小器官の形態学的変化から、疲労ストレスを受けたメラノトロフは、一部の細胞に小胞体ストレスマーカーであり細胞死に向かう引き金となる分子として知られる転写因子、C/EBP homologous protein (CHOP/GADD153) が発現して核集積し、その後細胞死に陥ると考えられた。しかしながら、細胞死の像はいわゆるアポトーシスとは異なることから、これとは異なるメカニズムによる細胞死である可能性が考えられた。一方で、CHOP の発現が細胞死の引き金となっていることから、この分子を中心とした解析に着手した。

CHOP の発現が引き起こすアポトーシスは、CHOP の発現が抑えられた細胞では起こらないことが知られている。そこで、CHOP ノックアウトマウスを導入し、解析を行うこととした。まず、野生型マウスにラットに準じた疲労ストレスを負荷したマウスモデルの確立をめざしたが、マウスにラット同様の期間 (5 日間) のストレス負荷することが難しいこと

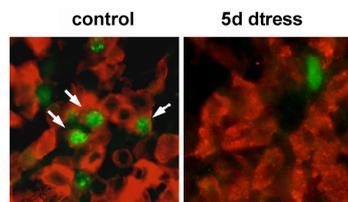
がわかった。3日間の疲労ストレスを与えたマウスでは、メラノトロフの細胞死を確認するには至らず、より長期のストレスを与えるための検討を行った。一方で、3日間の疲労ストレスであっても、一部のメラノトロフにCHOPの核集積がおこることが確かめられた。マウスモデルは、CHOP-koマウスを用いた細胞死およびその防御メカニズムの解析を行うための有効なツールとして今後の活用に道筋をつけた。

(3) 前葉ソマトトロフの増殖異常

① 過労ラット、ソマトトロフの細胞増殖は極度に抑制される

前葉における5種類のホルモン分泌細胞のうち、雄のSDラットで最も盛んに細胞増殖するのは成長ホルモンを分泌するソマトトロフで、KI-67陽性細胞のうちおよそ40%を占めていた。過労ラットではKI-67陽性のソマトトロフはほぼ認められなくなり(図5)、ソマトトロフの機能が障害されていることが示唆された。

図5. Ki-67陽性のソマトトロフ(矢印)は過労ラットでは極度に減少した。



② 過労ラット、ソマトトロフのホルモン分泌機能

過労ラットの血中成長ホルモン濃度は、比較的低い値を示したが、有意な差は認められなかった。疲労ストレス5日目のラットに成長ホルモン分泌ホルモン(GHRH)を静脈内投与すると、通常のラットと同様に一過性のホルモン分泌が起こったことから、過労ラットのソマトトロフがホルモン分泌機能は維持していることがわかった。

一方で、ソマトトロフを電子顕微鏡により観察すると、過労ラットでは通常以上の分泌顆粒を蓄えており、また細胞体の萎縮が認められた。この所見は、成長ホルモン分泌の低下傾向を裏付けるものであった。

③ 過労ラット、ソマトトロフの増殖異常とその分子メカニズム解析

ソマトトロフの増殖とホルモン分泌の制御は主として視床下部より分泌されるGHRHにより促進され、ソマトスタチンにより抑制される。これらの疲労ストレス下での遺伝子発現を *in situ* hybridizationにより調べたところ、一過性の変動はあるものの、疲労ストレス5日目においてはどちらも通常のラットと同様の発現量を示した。一方、これらのレセプターの下垂体前葉における遺伝子発現をみると、疲労ストレス下で、ソマトトロフにのみ発現するGHRHレセプターは上昇し、ソマトスタチン2型レセプター

は低下していた。

そこで、ソマトトロフのGHRH刺激による細胞増殖能を評価する目的で、GHRHを静脈内投与した後のKi-67陽性細胞数をカウントした。通常のラットでは、GHRH投与後にKi-67陽性細胞が有意に増加するのに対し、疲労ストレス5日目のラットでは、全く増加を認めなかった(図6)。このことから過労ラットのソマトトロフは、GHRHに対する反応性を失っていると考えられた。しかしながら一方ではGHRH投与後に成長ホルモンの一過性の分泌を起こすことから、GHRHレセプターは機能しているものの、増殖に結びつくシグナル伝達が阻害されていると考えられた。

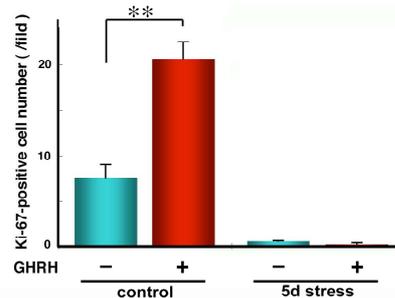


図6. GHRH投与によるKi-67陽性細胞数の変化。

この増殖シグナルの阻害メカニズムには、GHRH刺激によるMAP kinaseのリン酸化が起こらないことが関与しているとの結果を得た。

以上の研究成果は、国際学会(International Conference on Fatigue Science)にて発表し、論文として投稿中である。

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6件)

① 小川登紀子、岡出朋子、池島(獅子王)信江、木山博資(2011) 抑肝散は慢性的複合ストレスラットの明期自発行動量増加を抑制する. 日本疲労学会誌、掲載確定、査読有り.

② Konishi H, Ogawa T, Kawahara S, Matsumoto S and Kiyama H. (2011) Continuous stress-induced dopamine dysfunction augments PAP-I and PAP-II expression in melanotrophs of the pituitary gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407: 7-12、査読有り.

③ Shishioh-Ikejima N, Ogawa T., Yamaguchi K, Watanabe Y, Kuratsune H, Kiyama H (2010) The increase of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the plasma of chronic fatigue syndrome patients. BMC Neurology, 10: 73-78、査読有り。

④ Konishi H., Ogawa T., Nakagomi S., Inoue K., Thoyama M. and Kiyama H. (2010) Id1, Id2 and Id3 are induced in rat melanotrophs of the pituitary gland by dopamine suppression under continuous stress. Neuroscience, 169: 1527-1534、査読有り。

⑤ 小川登紀子、池島(獅子王)信江、木山博資 (2010) 疲労ラット下垂体細胞の過労死とその機序. 日本疲労学会誌、5 (2) : 25-29、査読無し。

⑥ Ogawa T., Shishioh-Ikejima N., Konishi H, Makino T. Sei H., Kiryu-Seo S, Tanaka M, Watanabe Y, Kiyama H (2009) Chronic stress elicits prolonged activation of α -MSH secretion and subsequent degeneration of melanotroph. *J Neurochem*、109(11): 1389-1399、査読有り。

[学会発表] (計9件)

① 小川登紀子 他、持続的ストレスラットでは GHRH 刺激によるソマトトロフの増殖が阻害される. 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 (震災により誌上開催)

② 小川登紀子 他、疲労ラットにおけるソマトトロフの増殖阻害は ERK1/2 のリン酸化抑制を介して起こる. 第6回日本疲労学会総会・学術集会、2010.6.26. 大阪

③ 小川登紀子 他、下垂体細胞の過労死. 第15回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010.3.28. 岩手

④ Ogawa T. et al., Prolonged stress affects the hypothalamic dopamine system and causes degeneration of the pituitary cells. Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, 2009.8.27. Busan, Korea

⑤ 小西博之、小川登紀子 他、慢性ストレス負荷ラット下垂体中間葉においてドーパミンレベル低下により誘導される pancreatitis-associated protein I の発現. 日本神経化学学会大会、2009.6.23. 群馬

⑥ 小川登紀子 他、疲労ラットにおける成長ホルモン産生細胞の機能阻害メカニズム. 第5回日本疲労学会総会・学術集会、2009.5.16. 福岡

⑦ 小西博之、小川登紀子 他、疲労モデルラット下垂体中間葉においてドーパミンレベル枯渇により誘導される Id ファミリー分子の発現. 日本神経科学会、2008.11.28. 東京

⑧ Ogawa T. et al., Prolonged fatigue exhibits the opposed proliferation regulations in the anterior and intermediate pituitary cells. International Conference on Fatigue Science 2008, 2008.9.3-5. Okinawa

⑨ Kiyama H., Shishioh-Ikejima N., and Ogawa T., Disorders of homeostasis centers in fatigued rat. International Conference on Fatigue Science 2008, 2008.9.4. Okinawa

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 疲労度の判定方法および疲労度判定キット

発明者: 木山博資、池島信江、小川登紀子、渡辺恭良、倉恒弘彦

権利者: 大阪市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-115685

出願年月日: 21年5月12日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/anatomy1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 登紀子 (OGAWA TOKIKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号: 30382229

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし