

機関番号：32202

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790165

研究課題名 (和文) 下垂体ホルモン産生細胞の機能亢進・過形成・腫瘍化におけるレチノイン酸合成の動態

研究課題名 (英文) The role of retinoic acid in pituitary tumorigenesis

研究代表者

藤原 研 (FUJIWARA KEN)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00382945

研究成果の概要 (和文)：下垂体前葉は 6 種類のホルモンを分泌して成長、生殖、恒常性の維持に重要な器官です。本研究は下垂体腫瘍形成の過程で、レチノイン酸 (RA) の役割を明らかにすることを目的としました。エストロゲンによる腫瘍モデルラットで、腫瘍形成に伴い RA 合成酵素が減少し、その作用はエストロゲン  $\alpha$  受容体を介することを明らかにしました。また、RA は下垂体前葉細胞で様々な遺伝子発現を調節することが分かりました。本結果は、腫瘍形成機構の解明や治療に寄与することが期待されます。

研究成果の概要 (英文)：The anterior pituitary gland secretes six types of hormones, which are crucial to maintain growth, reproduction, and homeostasis. The purpose of this study is to clarify the relationship between retinoic acid (RA) and tumorigenesis of pituitary. I demonstrated that RA synthesizing enzyme was reduced in estrogen-induced prolactinoma model rats, and that the effect was mediated by estrogen receptor alpha. In addition, RA exerted effects on several genes expression in the anterior pituitary cells. It is hoped that these results contribute to elucidating the neoplasia mechanism and tumor therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：下垂体前葉、レチノイン酸、オートクライン、パラクライン、細胞間相互作用、腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

レチノイン酸 (RA) は細胞増殖・分化を調

節して個体発生や器官形成・維持に不可欠な因子として広く知られている。さらに RA は

様々な腫瘍形成を抑制することから、基礎と臨床医学の両面において重要なホルモンとして認識されている。RA は前駆物質より細胞内において代謝を経て合成され、遺伝子調節因子として作用する。前駆物質であるビタミン A (レチノール) やプロビタミン A は経口的に摂取され、一旦レチニルエステルの形で肝臓に貯蔵され、必要に応じてレチノールとして血中に分泌される。そして細胞内において酸化酵素群 (ADH, SDR, RALDH) によりレチノール→レチナール→RA の代謝経路を経て合成される。合成された RA は核内受容体 (RAR, RXR) に結合して特定の遺伝子発現を調節し、そして代謝酵素 (CYP26a1, b1) により不活性化される。

下垂体前葉は 6 種類のホルモンを産生・分泌して成長、生殖、恒常性の維持に重要な内分泌腺である。下垂体前葉ホルモンの合成・分泌は視床下部からの神経内分泌的調節、末梢臓器からの内分泌的調節、下垂体前葉内での自己分泌・傍分泌的調節のさまざまな機構により制御されている。これら調節機構の破綻は下垂体ホルモン産生腫瘍の大きな要因の一つとして考えられている。RA は下垂体前葉の細胞分化、ホルモン産生の制御に重要な因子一つとして知られている。さらに、最近下垂体ホルモン産生腫瘍との関連が報告されている。しかし、RA がどこで産生されどのように作用し、代謝されるかはほとんど明らかにされていなかった。申請者はこれまでに正常ラットの下垂体前葉で発生期には RA 合成酵素のうち RALDH2, 3 が発現し、成体では RALDH1 が発現していることを明らかにしている。さらに、RALDH1 はエストロゲンにより抑制的に制御されていることを見出している。これらのことから申請者は下垂体前葉で局所的に RA が合成されることを示唆してきた。

## 2. 研究の目的

下垂体前葉での RA 受容体、代謝酵素の局在、動態がどのように制御され、局所的に産生された RA がどのように作用するかについては未だ明らかになっておらず、RA の機能を理解するうえで合成経路、受容経路、代謝経路を包括的に明らかにすることは必要と考えられる。さらに、下垂体ホルモン産生腫瘍形成における局所での RA 合成-代謝経路の関与についてはまったく明らかにされていないことから、申請者は下垂体前葉での RA による細胞機能調節機構の破綻が下垂体ホルモン産生腫瘍を誘導する可能性に着目した。本研究は、①正常、機能亢進状態、腫瘍組織で RA 合成酵素、受容体、代謝酵素の発現細胞を明らかにする、②それらの発現変動を定量的に明らかにする、③RA によるホルモン産生や細胞増殖、細胞分化への影響を明

らかにする、ことを計画した。

## 3. 研究の方法

(1) RA 受容体、代謝酵素産生部位の同定：ラット下垂体前葉から RNA を抽出し、オリゴ(dT)<sub>20</sub> プライマーと逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。cDNA を鋳型にして RT-PCR 法により下垂体前葉に発現する RA 受容体 (RAR, RXR)、代謝酵素 (CYP26a1, b1) のそれぞれのサブタイプを同定した。PCR 産物をベクターに組み込み、大腸菌に形質転換し、クローニングした。得られたプラスミドから *in vitro* transcription により DIG ラベルした特異的アンチセンスまたはセンス cRNA プローブを作製した。4%パラフォルムアルデヒド固定したラット下垂体凍結切片で、作製した DIG ラベル cRNA プローブを用いて *in situ* hybridization (ISH) 法を行った。

(2) RA 合成酵素、受容体、代謝酵素の動態解析：生殖腺摘出、副腎摘出、甲状腺摘出、エストロゲン投与などにより下垂体機能亢進状態となったラットを作成した。さらに、エストロゲン誘発下垂体腫瘍モデルラットを用いて、エストロゲンを持続投与することで、プロラクチン細胞が機能亢進から過形成を経てプロラクチン産生腫瘍へと進行する各段階を作成した。これらの動物を用い、RA 合成酵素、受容体、代謝酵素の発現細胞の動態を ISH、免疫組織化学 (IHC) を用いて明らかにした。また、mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により定量解析した。PCR には特異的 PCR プライマーを設計し、SyberGreen を用いた。タンパク質の定量にはケミルミを用いた Western Blotting 法により高感度・定量解析系を確立する。

(3) RA の下垂体前葉細胞への作用：ラット下垂体前葉を酵素処理により分散し、初代培養を行った。培養液に RA を  $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$  M 濃度で添加し、24~72 時間培養した。細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成してリアルタイム RT-PCR 法により前葉ホルモン、視床下部ホルモン遺伝子発現を定量した。

## 4. 研究成果

(1) 下垂体で発現しているレチノイン酸受容体 (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) を RT-PCR により増幅し、クローニングした。リアルタイム PCR により発現量を定量したところすべての受容体サブタイプ遺伝子の発現が見られたが、RAR  $\alpha$  が最も高い発現パターンを示した。成体ラット下垂体前葉で発現するレチノイン酸代謝酵素 (Cyp26a1, b1) 遺伝子をクローニングした。得られた遺伝子断片から *in situ* hybridization のプローブを作成することが可能となった。また、ISH および免疫組織化学により正常成獣ラット下

垂体前葉で RA 合成酵素の一つである RALDH1 はプロラクチン細胞と濾胞星状細胞に局在することが明らかになった。

(2) エストロゲン高感受性ラットである LEXF ラットに diethylstilbestrol(DES)を詰め入れたチューブを皮下に埋め込み1ヵ月で既に著しい下垂体の肥大がみられ、3ヶ月では血腫を伴うプロラクチノーマが形成された。リアルタイム PCR 法により RALDH1 の mRNA 発現が DES 処理1週間で著しく減弱していることが分かった。さらに、プロラクチン細胞で産生された RALDH1 は DES 投与により減弱するが、濾胞星状細胞の RALDH1 発現はプロラクチノーマにおいても維持されることが分かった。DES により形成されたプロラクチノーマは DES を除くことで縮小したが、3ヶ月経過しても正常な下垂体の大きさには戻らず、RALDH1 発現は抑制されたままであった。

(3) 正常下垂体前葉細胞の初代培養系で、①17beta-estradiol は RALDH1 を濃度依存的、時間依存的に抑制した、②その抑制効果はエストロゲン受容体 (ER) アンタゴニスト (ICI182,780) で阻害された、③ER alpha の選択的アゴニスト (PPT) では抑制効果が見られたが、ER beta の選択的アゴニスト (DPN) では見られなかった。以上のことから、エストロゲンは ER alpha を介して RALDH1 発現を抑制することが明らかとなった。さらに、RALDH1 はプロラクチン細胞と濾胞星状細胞で発現しているが、エストロゲンはプロラクチン細胞で発現する RALDH1 を抑制することから、細胞の種類により RALDH1 の発現調節機構が異なることが考えられた。

(4) 正常下垂体前葉から細胞を単離し、RA を添加した培地で培養した後、前葉ホルモンのうち成長ホルモン、プロラクチンは増加し、甲状腺刺激ホルモンは抑制された。視床下部ホルモン受容体では成長ホルモン放出刺激ホルモン受容体及びドーパミン2型受容体の発現が促進された。All trans-、9cis-RA ともに濃度依存的、時間依存的に各種遺伝子発現を変化させた。

以上の結果から、エストロゲン誘発プロラクチノーマで腫瘍が形成され、それに伴う RALDH1 の減少が、プロラクチン細胞で ER alpha を介して引き起こされる可能性が示され、エストロゲンによるレチノイン酸合成酵素減少、それによるレチノイン酸の産生量の減少がプロラクチノーマ形成に関与する可能性が示唆された。また、下垂体前葉でレチノイン酸が合成され、オートクライン、パラクラインによりホルモン遺伝子の発現を制御する可能性が示唆された。また、レチノイン酸は視床下部ホルモン受容体遺伝子の発現にも作用することから、視床下部ホルモンの

の感受性を高め、間接的に分泌を制御していることが示唆された。

#### 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 4 件)

- ① Fujiwara K, Jindatip D, Kikuchi M, Yashiro T, In situ hybridization reveals that type I and III collagens are produced by pericytes in the anterior pituitary gland of rats, Cell and Tissue Research, 査読有 Vol. 342, 2010, pp. 491-495
- ② 藤原研, 屋代隆, 下垂体前葉細胞の機能調節因子としてのレチノイン酸-RA 合成酵素の存在と細胞間相互作用の可能性-、比較内分泌学、査読無、Vol. 35、2009、pp. 280-284
- ③ Fujiwara K, Kikuchi M, Horiguchi K, Kusumoto K, Kouki T, Kawanishi K, Yashiro T, Estrogen receptor alpha regulates retinaldehyde dehydrogenase 1 expression in rat anterior pituitary cells, Endocrine Journal, 査読有、Vol. 56、2009、pp. 963-973
- ④ Fujiwara K, Davaadash B, Yatabe M, Kikuchi M, Horiguchi K, Kusumoto K, Kouki T, Yashiro T, Reduction of retinaldehyde dehydrogenase 1 expression and production in the estrogen-induced prolactinoma of rat, Medical Molecular Morphology, 査読有、Vol.41、2008、pp.126-131

[学会発表] (計 10 件)

- ① Fujiwara K, Yashiro T, Retinoic acid as a non-peptidic paracrine/autocrine factor in the anterior pituitary gland, 第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 (2011 年 3 月 28 日)
- ② 藤原 研, Jindatip Depicha, 屋代 隆, ラット下垂体前葉における線維性コラーゲン遺伝子発現細胞の同定、第 14 回日本内分泌病理学会学術総会、2010 年 10 月 29 日、京都府・ハイアットリージェンシー京都
- ③ 藤原 研, Jindatip Depicha, Mohamad Reza, 塚田岳大, 屋代 隆, ラット下垂体前葉における I、III 型コラーゲン産生細胞の同定、第 25 回日本下垂体研究会学術集会、2010 年 8 月 20 日、愛知県・伊良湖ガーデンホテル
- ④ 藤原 研, 楠本憲司, 川西康太郎, 屋代 隆,

発生過程のラット腺下垂体におけるレチノイン酸合成酵素 (RALDH) 発現細胞の同定、第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010 年 3 月 28 日、岩手県・岩手県民会館

- ⑤ 藤原 研、堀口幸太郎、楠本憲司、菊地元史、屋代 隆、ラット下垂体前葉細胞のホルモンと各種受容体遺伝子発現に対するレチノイン酸の作用、第 24 回日本下垂体研究会学術集会、2009 年 8 月 28 日、青森県・古牧温泉青森屋
- ⑥ 藤原 研、楠本憲司、堀口幸太郎、菊地元史、屋代 隆、ラット下垂体前葉で発現するレチノアルデヒド脱水素酵素 1 はエストロゲンによりエストロゲン受容体  $\alpha$  を介し抑制される、第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009 年 4 月 25 日、群馬県・群馬県民会館
- ⑦ 藤原 研、Bulgan Davaadash、菊地元史、屋代 隆、ラット下垂体前葉プロラクチン細胞におけるレチノアルデヒド脱水素酵素 1 の発現調節機構の解明、第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009 年 3 月 28 日、岡山県・岡山理科大学
- ⑧ 藤原 研、楠本憲司、堀口幸太郎、矢田部 恵、幸喜 富、菊地元史、屋代 隆、正常ラット下垂体とプロラクチノーマモデルにおけるレチノアルデヒド脱水素酵素 1 の局在比較、第 40 回日本臨床分子形態学会、2008 年 10 月 3 日、福岡県・福岡国際会議場
- ⑨ 藤原 研、Bulgan Davaadash、矢田部 恵、屋代 隆、エストロゲン誘発プロラクチノーマにおけるレチノイン酸合成酵素；RALDH1 の発現動態、第 12 回日本内分泌病理学会、2008 年 9 月 26 日、埼玉県・大宮ソニックシティ
- ⑩ 藤原 研、レチノイン酸による視床下部一下垂体前葉系の機能調節機構の解明、第 35 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本下垂体研究会合同学術集会、2008 年 8 月 28 日、東京都・政策研究大学院大学

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤原 研 (FUJIWARA KEN)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00382945

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

屋代 隆 (YASHIRO TAKASHI)  
自治医科大学・医学部・教授