

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21580394

研究課題名（和文） クッシング病罹患犬の下垂体腺腫細胞におけるコルチゾール抵抗性の病態解明

研究課題名（英文） Research on the pathophysiology of resistance to glucocorticoid feedback in canine pituitary ACTH-secreting adenomas.

研究代表者

原 康 (HARA YASUSHI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：00228628

研究成果の概要（和文）：我々の研究はコルチゾール代謝酵素の発現が正常な犬下垂体 ACTH 産生細胞と比較し、犬下垂体 ACTH 産生腺腫では増大しており、またコルチゾールがその作用を及ぼすのに必要な受容体であるグルココルチコイド受容体の発現が減少していることを明らかにした。これらの変化によりコルチゾールの代謝亢進および作用減弱が起こり、犬下垂体 ACTH 産生腺腫におけるコルチゾール抵抗性に関与しているものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Our study revealed that the expression of cortisol-metabolizing enzyme in the pituitary ACTH-secreting adenomas was higher than canine normal ACTH-secreting cells. Moreover, the expression of glucocorticoid receptor was seemed to be decreased in the pituitary ACTH-secreting adenomas. These changes may explain, in part, the resistance to glucocorticoid feedback in canine pituitary ACTH-secreting adenomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2800000	840000	3640000
2010 年度	900000	270000	1170000
2011 年度	200000	60000	260000
年度			
年度			
総計	3900000	1170000	5070000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学、獣医学・臨床病理、病態

キーワード：犬下垂体 ACTH 産生腺腫、クッシング病、コルチゾール抵抗性、ステロイド代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 犬下垂体腫瘍の多くは副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)産生腺腫であり、犬において主要な内分泌疾患である下垂体性副腎皮質機能亢進症(クッシング病)を引き起こす。クッシング病の臨床症状は副腎皮質におけるコ

ルチゾール分泌過剰が原因であり、多飲多尿や免疫機能の低下が認められる。人における ACTH 産生腺腫の発生率は下垂体腫瘍の約 5%程度と低く、また獣医学領域における研究は臨床的治療効果に関するものばかりである。そのため病態生理、発生機序に関しては獣医

学領域のみならず、人医学領域においても未だ解明されていない部分が多い。人および犬のクッシング病は共通する部分が多いため犬クッシング病の病態解明により獣医学および人医学に貢献することが期待されている。

(2)本来、生体内においてストレス反応を調節する視床下部-下垂体-副腎軸では、過剰に分泌されたコルチゾールが視床下部、下垂体に存在する Glucocorticoid receptor (GR) や Mineralcorticoid receptor (MR) を介して ACTH 分泌を抑制する。この結果としてコルチゾール分泌が抑制される。このことは Negative feedback 調節として知られている。しかし、クッシング病罹患症例では Negative feedback が十分に機能せず(コルチゾール抵抗性)過剰なコルチゾール分泌が持続する。この特徴はクッシング病の診断に用いられているが、なぜ腫瘍細胞がコルチゾール抵抗性を持つのかは未だ明らかとなっていない。

(3) 近年コルチゾールの活性、代謝を調節する酵素である 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) が発見され、様々な分野において注目されている。11 β -HSD は二種類存在し、Type1 は不活性型であるコルチゾンに活性型であるコルチゾールに変換する。一方、Type2 は Type1 とは逆にコルチゾールをコルチゾンに変換する。これらの背景から申請者は GR、MR の発現異常や 11 β -HSD 発現が腫瘍では変化している可能性に着目した。コルチゾール代謝亢進や受容体減少によりコルチゾールが下垂体に及ぼす作用が減弱し、ACTH 産生腺腫におけるコルチゾール抵抗性を説明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1)本研究では、健常な犬の下垂体、および PDH 罹患症例犬より得た下垂体における、11 β -HSD isoform および GR、MR の発現動態について比較検討することを目的とする。また、下垂体前葉における 11 β -HSD isoform の発現がどのようなホルモン産生細胞と共発現しているのかについて調査を行うことで、犬下垂体における Negative feedback 調節に 11 β -HSD isoform が関与しているのかを解明する。

(2)さらに本学附属動物医療センターにて診断ならびに外科学的治療を受けた PDH 罹患症例犬より摘出した下垂体 ACTH 産生性腺腫組織における 11 β -HSD isoform、およびコルチコイドレセプターの発現動態を調査し、健常な犬の下垂体と比較検討を行うことで、犬の下垂体 ACTH 産生性腺腫においても、人で報告されているような 11 β -HSD isoform の発現動態の変化がみられるのかについて調査

する。

3. 研究の方法

(1)犬の正常下垂体における 11 β -HSD isoform、Corticoid receptor (GR、MR) 発現について

①11 β -HSD Type1、2 mRNA 発現の有無を RT-PCR 法を用いて検討

②Corticoid receptor mRNA 発現量について RT-PCR 法を用いて検討

(2)下垂体 ACTH 産生腺腫における 11 β -HSD isoform、Corticoid receptor (GR、MR) 発現について

①11 β -HSD Type1、2 mRNA 発現の有無を RT-PCR 法を用いて検討

②Corticoid receptor mRNA 発現量について RT-PCR 法を用いて検討

(3) 正常下垂体と ACTH 産生腺腫における比較検討

①レーザーマレーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いてクッシング病罹患症例犬から得た腫瘍組織から ACTH 産生腺腫細胞のみを分離、同様に犬の正常下垂体組織において ACTH 産生細胞のみを分離

②11 β -HSD isoform mRNA 発現量を Real time RT-PCR 法を用いて比較検討

③Corticoid receptor mRNA 発現量を Real time RT-PCR 法を用いて比較検討

4. 研究成果

(1) ACTH 産生腺腫細胞では正常 ACTH 産生細胞と比較し、MR mRNA は有意に低下していたが、GR mRNA 発現は正常 ACTH 産生細胞と比較し変化は見られなかった(図 1)。また、ACTH 産生腺腫細胞では 11 β -HSD Type2 mRNA 発現が有意に増加し、11 β -HSD Type1 mRNA 発現は有意に低下していた(図 2)。

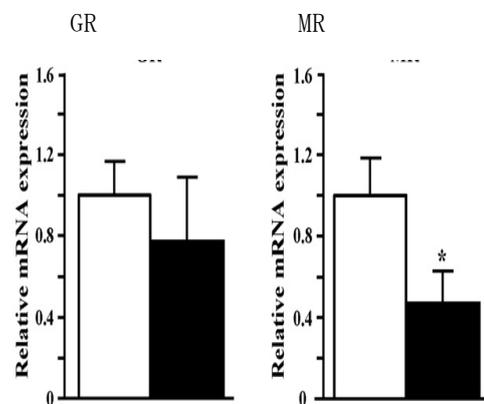


図 1) GR、MR mRNA 発現量の比較
□正常細胞 ■腫瘍細胞

11β-HSD Type1

11β-HSD Type2

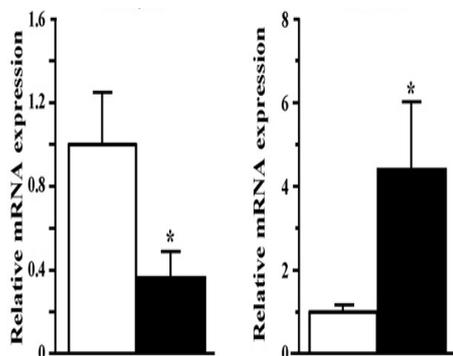


図2) 11β-HSD Type1、Type2 mRNA 発現量の比較

□正常細胞 ■腫瘍細胞

(2)本研究の結果から、犬 ACTH 産生性腺腫において 11β-HSD type2 の発現増加および type1 の発現減少によりコルチゾール代謝が亢進している可能性が考えられ、腫瘍細胞のコルチゾール抵抗性に関与している可能性が示唆された。また、正常な下垂体前葉の GR 発現量は加齢に伴って顕著に増加することが報告されている。本研究に用いた正常犬の年齢はクッシング病罹患症例と比較して若く、GR mRNA 発現量は腺腫において減少しているものと考えられた。従って受容体の減少によりコルチゾール作用が減弱し、腫瘍細胞におけるコルチゾール抵抗性に関与している可能性が考えられた。

(3) 獣医学領域において下垂体性副腎皮質機能亢進症の研究は、臨床的治療効果に関するものが大半を占め、発生機序や病態生理に関する研究は十分に行われて来なかった。そのため本研究の成果は下垂体性副腎皮質機能亢進症の発生機序や病態生理の中で重要な位置を占める下垂体 ACTH 産生腺腫のコルチゾール抵抗性を理解する上で非常に重要である。一方で小動物臨床分野ではクッシング病の治療は外科的切除、内科的治療、放射線学的治療が実施されている。しかし下垂体切除術には専門知識および技法が必要であり、本手術を実施可能な施設は日本国内のみならず世界的にも限られている。そのため腫瘍細胞を利用した研究を実施可能な施設は世界的にも少ない。現在、犬の副腎皮質機能亢進症における類似研究はなく、本研究が果たした役割は世界的に見ても高い。また、獣医学領域と比較し、人医学領域における研究

が先行している現状は認められるが、人における ACTH 産生性腺腫の発生率は低く十分な研究は実施されていない。犬における下垂体性副腎皮質機能亢進症の発生率は人よりも遥かに高く、本研究の成果は医学分野にもインパクトを与えるものと考えている。

(4) 本研究の成果からコルチゾールの代謝促進および受容体減少による作用の減弱が腫瘍細胞におけるコルチゾール抵抗性に関与しているものと推察された。しかし、遺伝子発現様式の変化のみでは実際にどの程度この抑制機構減弱に関与しているのか不明である。またこれらの発現様式変化がコルチゾール分泌過剰によりもたらされている可能性も考えられる。そのため、我々は下垂体 ACTH 産生腺腫および正常下垂体細胞の培養系を確立し、実際に培養細胞を用いてコルチゾールが代謝酵素および受容体発現に及ぼす影響の検討、さらには代謝酵素および受容体発現の変化がコルチゾール代謝、作用に及ぼす影響の研究を現在進めている。

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石野寛和、原康、竹腰進、(以下 4 名)、Ki-67 and minichromosome maintenance-7 (MCM7) expression in canine pituitary corticotroph adenomas. Domestic Animal Endocrinology、査読有、41 巻、2011、207-213 DOI: 10.1016/j.domaniend.2011.07.002

②原康、手嶋隆洋、埜田高広、(以下 7 名)、Efficacy of transsphenoidal surgery on endocrinological status and serum chemistry parameters in dogs with Cushing's disease. The Journal of Veterinary Medical Science、査読有、72 巻、2010、397-404

DOI: 10.1292/jvms.09-0367

③手嶋隆洋、原康、竹腰進、(以下 3 名)、Expression of genes related to corticotropin production and glucocorticoid feedback in corticotroph adenomas of dogs with Cushing's disease. Domestic Animal Endocrinology、査読有、36 巻、2009、3-12

DOI: 10.1016/j.domaniend.2008.08.002

[学会発表] (計 5 件)

①石野寛和、犬下垂体 ACTH 産生腺腫における Ki-67 および minichromosome maintenance (MCM) タンパク発現に関する検討、獣医神経病学会、2011 年 6 月 26 日、東京大学

②原康、下垂体切除術、獣医麻酔外科学会、
2011年6月11日、大宮ソニックシティ

〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 康 (HARA YASUSHI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：00228628

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

多川 政弘 (TAGAWA MASAHIRO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：90097072