

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591622

研究課題名（和文）

症候性ラトケ嚢胞の増大機序における炎症性サイトカインとアクアポリンの関与

研究課題名（英文）

Contribution of The Pro-inflammatory Cytokines and Aquaporin 1 & 4 in the Progression

研究代表者

立花 修 (TACHIBANA OSAMU)

金沢医科大学 医学部 教授

研究者番号：40211362

研究成果の概要（和文）：視力視野障害やホルモン分泌不全を呈する、症候性ラトケ嚢胞の嚢胞増大機序の一つに、水チャンネルを司るアクアポリンが関与していることが判明した。また、ラトケ上皮細胞がアンドロジェン受容体を発現することにより、下垂体での炎症の誘発、ラトケ上皮の増殖に関与すると推測された。アクアポリンやアンドロジェン受容体は、症候性ラトケ嚢胞の治療における標的分子となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Expression of water-channel aquaporin 1 and 4 in Rathke epithelium might stimulate to progression of cyst. Over-expression of androgen receptor in Rathke epithelium might induce proliferation with Rathke epithelium itself and inflammation in adenohypophysis. So aquaporin and androgen receptor might be novel target molecules to treat with symptomatic Rathke cleft cyst.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
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：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：ラトケ嚢胞、炎症性サイトカイン、アクアポリン、ホルモン受容体

1. 研究開始当初の背景

ラトケ嚢胞は、MRI の導入により発見される機会が増えたが、自然消退するものや、増大するものがあり、外科治療を導入する時期が定まっていない。また、主に併発する下垂体炎による内分泌学的機能障害の術後の改善度は施設により大きな隔りがある。さらに、標準的被膜開放術では再発することが10%以上と高く手術方法としても確立しているとは言い難い。症候性ラトケ嚢胞の治療指針が確立されるためには、ラトケ嚢胞の増大

の機序が明らかにされなければならない。そのためには、1) ホルモン受容体を中心としたラトケ嚢胞上皮細胞の増殖、分裂の機構、2) アクアポリンを中心としたラトケ嚢胞上皮細胞の液体分泌調節の機序、3) 炎症性サイトカインを中心としたラトケ嚢胞内容物の成分解析、が明らかにされる必要がある。

2. 研究の目的

ラトケ嚢胞増大の機序を解明し、症候性ラトケ嚢胞の治療を確立するため、研究期間内

に以下の3点を明確にする。1) ラトケ嚢胞上皮細胞で発現するホルモン受容体、インターロイキン受容体は何か、免疫組織化学的手法を用いて同定する。2) ラトケ嚢胞上皮細胞において、粘液分泌を司るチャンネルは何か、アクアポリンを中心に免疫組織化学的手法を用いて同定する。3) ラトケ嚢胞内容液の蛋白をプロテインチップシステムを用いて分析をおこなう。症候性ラトケ嚢胞の増大機序が判明すれば、薬物による治療が可能となる。ホルモン受容体、炎症性サイトカイン、アクアポリンに注目し、ラトケ嚢胞増大の機序を、臨床病理学的、および内分泌学的に検討することにより、症候性ラトケ嚢胞の治療法の基盤の確立をめざす。

3. 研究の方法

症候性ラトケ嚢胞の内容液に対してプロテインチップシステムを用いて発現蛋白の解析と定量をおこなう。摘出標本に対して、免疫組織化学的染色をおこない、サイトカインとアクアポリンの発現の局在を同定した。嚢胞および組織内におけるサイトカイン、アクアポリンの発現と、MRI の特徴や内分泌学的所見の関連の有無を臨床病理学的に検討した。

対象 2005 年から 2013 年にかけて、当教室にて外科的切除がなされた症候性ラトケ嚢胞 28 例（男性 9 例、女性 19 例）を対象とした。正常下垂体は剖検より得られた 3 例を使用した。摘出標本は、免疫組織化学用に速やかに 4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィンに包埋した。25 症例では、嚢胞内容液を血液が混入しないように採取して生理的食塩水にて 10-100 倍に希釈し、蛋白、コレステロール、bHCG を測定した後、一部の症例においてプロテインチップシステムを用いて蛋白発現解析をおこなった。

(1) 統計学的検討 症候性ラトケ嚢胞における各種サイトカイン(IL1 α , IL-1 β , IL2, IL6, IL12, TNF α)、サイトカイン受容体(IL1R, IL2R, IL6R, TNF-R)、ホルモン受容体(エストロゲン受容体 ER、プロゲステロン受容体 PgR、ゴナドトロピン放出ホルモン受容体 GnRH-R)、アクアポリン(AQP1、4)の免疫組織化学的発現の有無と、臨床病理学的パラメーターである性別、年齢、視野障害の有無、下垂体機能不全の有無と程度、再発の有無、嚢胞の大きさ、MRI 上の信号強度、嚢胞内容液の蛋白濃度、コレステロール濃度、HCG 濃度との間の有意差判定は、X² 検定または Fisher の直接確率計算法による検定をおこなった。

(2) 免疫組織化学

① 各種抗体：抗インターロイキン 1 α (IL-1 α)、抗 IL-1 β 、抗 IL-2、抗 IL-6、抗 IL-12p40、抗 TNF α 抗体、抗アクアポリン

(AQP1、4)抗体、IL6R、TNF-RI、TNFRII 抗体、抗ホルモン受容体抗体(ER、PgR、AR、GnRH-R)を用いた。

② 免疫染色法：加熱処理を行った材料を使用する。一次抗体を PBS にて希釈して用い、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。陽性コントロールとして正常下垂体および脳、肝臓、腎臓、皮膚、腸管、胎盤を用いた。陰性コントロールとしては一次抗体を省いた PBS のみを反応させたものを使用した。

③ 嚢胞内容液の蛋白質発現解析

手術時に 18G の穿刺針で嚢胞内容液を採取し、採取量により、10~100 倍に 37 度の生理的食塩水にて希釈溶解し、-80 度で保存した。プロテインチップシステム (CIPHERGEN ProteinChip Reader PBS II) を使用し蛋白発現解析をおこなった。

④ 嚢胞内容液のサイトカイン発現解析

同様の方法で採取保存した希釈嚢胞内容液を、ELISA キットを使用して IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-12、および TNF α の定量をおこなった。

4. 研究成果

(1) 症例の臨床上的まとめ

男性 9 例、女性 19 例で平均年齢は 50.3 歳(21-74)であった。症状は視野障害が最も多く 13 例 46%、頭痛 11 例 39%、内分泌機能障害に基づくものが 7 例 25%であった(重複あり)。急性発症は 7 例(25%)であり、慢性発症は 21 例(75%)であった。MRI での嚢胞の最大径の平均は 21.3mm(10-34)で、T1 高信号が 18 例(64%)、等信号が 4 例、低信号は 6 例であり、T1 等および低信号の嚢胞内容はすべて T2 では高信号であった。嚢胞内容液の平均蛋白濃度は T1 高信号が 34943mg/dl(n=17)、等信号が 3500mg/dl(n=4)、および低信号では 805.4mg/dl(n=4)であり、各間で有意差を認めた。コレステロールおよび HCGb は各間で有意差は認めず、いずれも 552mg/dl、38.7ng/ml であった。以上から嚢胞の T1 信号は蛋白濃度に依存することが判明した。下垂体機能分泌障害については、障害なしが 7 例、1 軸のみの障害が 3 例、2 軸が 7 例、3 軸以上が 11 例であった。高 PRL 血症は 10 例(35.7%)に認めた。以上から下垂体前葉分泌不全は 21 例(75%)、高 PRL 血症も含む何らかの内分泌機能障害が血清学的に認めたものは 23 例(82.1%)であった。

(2) 摘出病理と嚢胞液炎症性サイトカイン

28 例中 23 例で細胞を含む病理標本が得られ、内 18 例で下垂体前葉を含んでいた。5 例はコロイドのみの標本であった。18 例全例で下垂体炎の所見を認め、11 例で慢性期—終末期炎症、7 例では軽度のリンパ球浸潤のみ、あるいは急性期—亜急性期炎症像を呈した。

T1 低信号の 5 例中 4 例が軽度のリンパ球浸潤のみの所見であり、有意に下垂体炎の病理学的重症度と相関した。慢性—終末炎症所見を呈した症例では血清内分泌学的に 2 軸以上の下垂体機能不全を呈していた。嚢胞のプロテオーム解析で IL1b 前駆体、IL-6、IL-12p40、TNFa の炎症性サイトカインを同定した(図 1)。

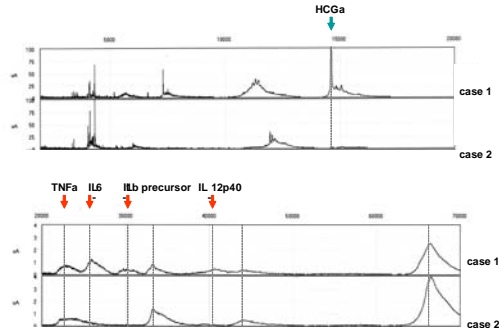


図 1. ラトケ嚢胞内容液の蛋白解析

嚢胞液では、大部分の症例で IL-6 (6019.3pg/ml)、IL-1b (146.7pg/ml)、IL-12 (348.3pg/ml) および TNF α (36.2pg/ml) を認めた。嚢胞内容液の IL-6 が、下垂体前葉機能不全をきたした症例で有意に高い傾向を示した ($p < 0.05$)。病理学的に慢性炎症を伴う症例では、TNFa や IL-6 が嚢胞上皮に発現していた。

(3) 正常下垂体前葉におけるホルモン受容体、AQP1、4 および IL-6R、TNF-R の発現

AR、ER、PgR、GnRH-R は一部の前葉細胞に陽性を示した。AR のみが一部のラトケ間裂の上皮細胞に陽性を示した。AQP1 は濾胞星状細胞やラトケ上皮細胞に陽性を呈し(図 2-A)、少数の前葉細胞にも陽性を認めたが、後葉細胞は陰性であった。AQP4 は前葉では主に濾胞星状細胞やラトケ上皮細胞、中間葉嚢胞周囲上皮に、さらに後葉細胞群にも陽性を示した(図 2-B)。IL-6R は極一部の前葉細胞とラトケ上皮、中間葉嚢胞周囲上皮細胞に陽性を呈した(図 2-C)。TNFR1 は前葉細胞、中間葉嚢胞周囲上皮細胞に発現を認めたが、ラトケ上皮には陰性であった(図 2-D)。TNFR2 は前葉細胞、ラトケ上皮および中間葉嚢胞周囲上皮細胞に発現を認めた(図 2-E)。

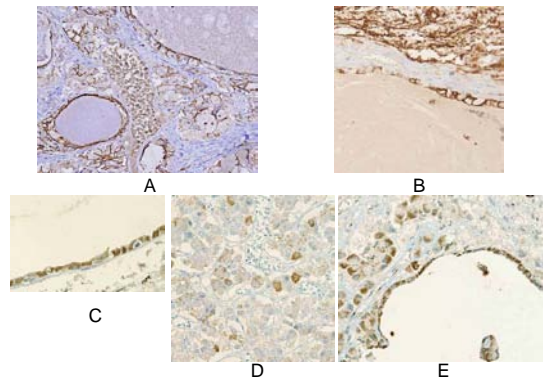


図 2. 下垂体における AQP1、4 および IL-6R、TNF-R の発現

(4) 症候性ラトケ嚢胞とホルモン受容体および AQP の関係

ホルモン受容体では AR のみが 50% の症例でラトケ上皮に過剰発現を認めた(図 3-A)。ラトケ上皮に AQP1 を発現するもの(図 3-B)が 90% に、AQP4 を発現するものが 40% にみられ、AQP4 陽性例(図 3-C)の嚢胞液蛋白濃度は 2073 mg/dl であり、AQP4 陰性、AQP1 陽性の 26000 mg/dl に比較して有意に低濃度であった ($p < 0.05$)。IL6-R および TNF-R1 は全ての症例でラトケ上皮に陰性(図 3-D)であったが、TNF-R2 は 27% の症例で陽性であった(図 3-E)。

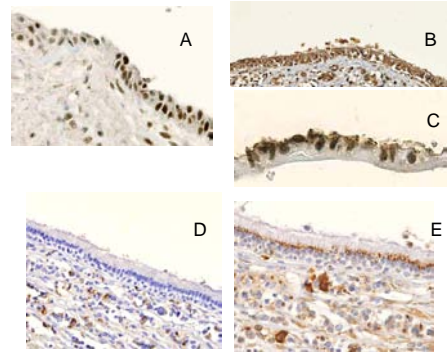


図 3. ラトケ嚢胞における AR、AQP1、4 および TNF-R1、2 の発現

(5) 考察

ラトケ嚢胞は AR を過剰発現することにより、マクロファージの遊走と炎症の誘発、およびラトケ上皮自身の増殖に関与する可能性がある。嚢胞内容液の蛋白濃度の違いは、ラトケ上皮に発現する AQP4 による水チャンネル機序の関与のためと考えられた。また、嚢胞増大機序にも AQP は深く関与すると思われる。ラトケ上皮が炎症性サイトカインを産生分泌するが、自身は損傷を受けないのは、

サイトカイン受容体を有しないか、あったとしても death domain を含まない TNF-R2 であるためと考えられた。

(6) 結語

AR および AQP は、症候性ラトケ嚢胞の治療における標的分子となりうると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① Osamu Tachibana, Yasuo Sasagawa, Hideaki Iizuka
Surgical significance of anatomy for supra-sellar tumor in relation to arachnoid membrane and critical perforating branches on extended transsphenoidal surgery. the 5th Harbin International Neurosurgical Conference. 2012年7月13日、Harbin、China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 修 (TACHIBANA OSAMU)
金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40211362