

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591348

研究課題名(和文)2光子励起法を用いた神経内分泌細胞の顆粒分泌の可視化による解析と病態生理の解明

研究課題名(英文)Visualization of exocytosis from neuroendocrine cells and neuroendocrine tumor cells

研究代表者

高野 幸路 (Takano, Koji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：20236243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：2光子励起法のTEP法によって下垂体前葉細胞のホルモン開口分泌を可視化して解析した。ラット下垂体前葉細胞集塊でホルモン分泌細胞を生細胞で同定し、GH、プロラクチン、ACTH分泌細胞からの生理的な顆粒分泌の動態を解析した。プロラクチン細胞は速い自発開口分泌を示し、電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーやD2受容体拮抗薬で消失した。GHRH刺激によるGH細胞の開口分泌とCRHやAVPによるACTH細胞の開口分泌はおもに数秒で終了するfull fusionであった。機能性内分泌腫瘍ではヒトGH産生下垂体腺腫、プロラクチン産生腺腫、ACTH産生腺腫、褐色細胞腫を解析し、それぞれ自発性開口分泌を認めた。

研究成果の概要(英文)：The exocytosis by anterior pituitary cells were visualized by TEP technique using two-photon excitation. The spontaneous exocytosis by rat lactotroph was rapid full fusion that terminated within a second while GHRH-stimulated exocytosis by rat somatotroph was slower full fusion that terminated within 3-6 seconds. D2 agonist and blockers of voltage-gated calcium channels inhibited spontaneous exocytosis, indicating that the observed spontaneous exocytosis corresponds to the spontaneous prolactin secretion from anterior pituitary when liberated from hypothalamic inhibition by dopamine. Somatostatin, that is a physiological hypothalamic inhibitor of GH secretion, attenuated GHRH-induced exocytosis. Somatostatin also inhibited high K-induced GH exocytosis. Because somatostatin did not abolish high K-induced intracellular calcium increase, somatostatin may inhibit GH exocytosis by acting on distal mechanism to calcium influx.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ホルモン分泌 開口分泌 神経内分泌 下垂体 可視化解析

1. 研究開始当初の背景

インスリン分泌細胞からのインスリン開口分泌を2光子励起法のTEP解析法で可視化し観察できることが示されたあと、この手法を用いた可視化解析は膵外分泌細胞、副腎髄質細胞に応用されてきた。下垂体前葉細胞も神経内分泌細胞であり、比較的大きなdense-core granuleを有している。その開口分泌も2光子励起法で解析できるのではないかと研究を開始した。また、ヒトの機能性内分泌腫瘍(機能性下垂体腺腫、機能性神経内分泌腫瘍、褐色細胞腫など)がホルモンを過剰に分泌するメカニズムも可視化解析で明らかにできるのではないかと考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

細胞への外来蛋白の導入を行わないで顆粒分泌を可視化する方法を確立するために、2光子励起法を応用して可視化解析する研究方法を確立し、正常神経内分泌細胞、機能性神経内分泌腫瘍の顆粒分泌を解析し、細胞生理と病態生理を明らかにする。

3. 研究の方法

TEP法を応用し、細胞外の水溶性蛍光物質が開口分泌の際に細胞膜に融合した顆粒内に入ることで、細胞膜に接した蛍光輝点を生じることを利用する。この輝点を2光子励起法で観察する。

観察対象に、下垂体前葉細胞集塊、ヒト機能性内分泌腫瘍を用いる。

4. 研究成果

(1) 正常下垂体前葉細胞からの顆粒分泌の可視化解析。

分散培養した単層細胞細胞は分泌現象の観察には不向きであることが明らかになった。細胞集塊とスライス標本、器官培養標本を次に検討した。スライス標本や期間培養標本は標本ごとのプロラクチンの自発性分泌にばらつきが大きいことが明らかになった。未処理の標本で結果にばらつきがあると、薬理実験等の結果の評価がしづらくなるため、薬理実験を行うには不適切と判断した。そこで、薬理実験を行う目的で細胞集塊での実験系を安定化することに専念し、ある程度成功した。プロラクチン分泌の解析のための薬理実験を行い、開口分泌の刺激伝達系路と分泌のモード変化が解析できた。GHRH, CRH, GnRHによる分泌刺激実験を行い、開口分泌の増加を観察した。GHRHの場合、下垂体前葉に占めるGH細胞の割合が多いためその後の解析が容易であるが、ACTH細胞、LH、FSH細胞などは観察可能な場合が少なく、これらの細胞を2光子励起像で(染色することなしに)同定する方法の確立が必要であることが判明した。以上の解析手法の確立によって、次のように、ラット正常下垂体前葉細胞の顆粒分泌の解析を行った。

ラット下垂体前葉細胞集塊のプロラクチン産生細胞からの自発分泌を蛍光蛋白のトラ

ンスフェクションなどの人工的操作を加えずに観察することができた。自発開口分泌はきわめて早い現象で殆どが1秒以内に終了した。自発開口分泌は、電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーやD2受容体拮抗薬で消失し、この開口分泌が視床下部からのドーパミンによる抑制から解除されたときの高プロラクチン血症を説明するものであることが明らかになった。

一方、GHRH刺激によるGHの開口分泌は数秒の時間経過の現象であった。GH細胞には自発開口分泌は認められなかった。電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーとソマトスタチンによって、GHRHによるGH分泌は抑制された。ソマトスタチンは高カリウム外液刺激によるGHの開口分泌も抑制した。この際に細胞内カルシウム濃度上昇は残っていたことから、ソマトスタチンにはカルシウム流入機構より遠位の作用点で作用する開口分泌抑制機構も存在することが明らかになった。遠位の機構についてG蛋白質の α subunitの関与やアシル化過程の関与が推測された。

(2) ヒト機能性内分泌腺腫の解析

ヒト機能性下垂体腺腫のホルモン過剰分泌の機構を明らかにする目的で、機能性腺腫の開口分泌を解析した。プロラクチン産生腺腫において自発開口分泌が存在することを明らかにした。自発開口分泌の生じる細胞内機構の一部を明らかにできた。

ラット及びヒト正常下垂体およびヒト下垂体腺腫の開口分泌の可視化による基礎的解析により、正常GH細胞ではGHRHやhighKなどの刺激によって主にfull fusionの形式の開口分泌が生じるのに対し、機能性腺腫であるGH産生腺腫では刺激なしにGHの自発顆粒分泌が生じることが明らかになった。これらの解析が臨床医学に応用可能であるかを研究した。対象として多数のGH産生腺腫を用い、その自発顆粒分泌を解析することで、これらの腺腫の機能的特徴を明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計28件)

1. Hirohata, T., Asano, K., Takano, K., Takano, S., Arita, K., Tahara, S., et al. DNA mismatch repair protein MSH6 correlated with the responses of atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas to temozolomide: The national cooperative study by the Japan Society for Hypothalamic and Pituitary Tumors. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 98(3):1130-1136, 2013. doi: 10.1210/jc.2012-2924. (査読あり)
2. 高野幸路: 神経内分泌腫瘍の特徴・症状 *Mebio* 神経内分泌腫瘍を知り尽くす 30(4): 20-25, 2013. (査読なし)
3. 高野順子、高野幸路: 神経内分泌腫瘍の

- 腫瘍発生機序 臨牀消化器内科 28 巻 1 号 : 33-37, 2013. (査読なし)
4. Hirohata T, Saito N, Takano K, Yamada S, Son JH, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Mizutani A, Okinaga H, Matsuno A. Urinary growth hormone level and insulin-like growth factor-1 standard deviation score (IGF-SDS) can discriminate adult patients with severe growth hormone deficiency. *Endocr J.* 60:369-373, 2012. (査読あり)
 5. Ishii, H., Shimatsu, A., Okimura, Y., Tanaka, T., Hizuka, N., Kaji, H., Hanew, K., Oki, Y., Yamashiro, Y, Takano, K., Chihara, K. Development and Validation of a New Questionnaire Assessing Quality of Life in Adults with Hypopituitarism: Adult Hypopituitarism Questionnaire (AHQ). *PLoS ONE* 7(9): e44304., 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0044304. (査読あり)
 6. Yamada, H., Takano, K., Ayuzawa, N., Seki, G., Fujita, T.: Re-lowering of serum Na for osmotic demyelinating syndrome. *Case Reports in Neurological Medicine*, 2012: 704639, 2012. doi: 10.1155/2012/704639. (査読あり)
 7. 島津章, 香川二郎, 都研一, 高橋裕, 堀川玲子, 高野幸路, 中村明枝, 沼倉周彦, 北中幸子, 長崎啓祐, 河野斉, 西美和: 小児期から成人期へ GH 分泌不全症の移行期医療を考える、内分泌・糖尿病・代謝内科、35 巻 3 号 : 275-283, 2012. (査読なし)
 8. 高野幸路: 下垂体疾患治療の進歩、日本内科学会雑誌 101 巻 4 号 : 975-984:2012. (査読なし)
 9. 高野幸路: いま、内科薬はこう使う-内分泌疾患薬 成長ホルモン製剤、*Medicina*49 巻:358-360、2012. (査読なし)
 10. 高野幸路: 高プロラクチン血症の鑑別診断、内分泌・糖尿病・代謝内科、34 巻 2 号 : 101-107、2012. (査読なし)
 11. 高野幸路: クッシング病の診断 診断と治療 100 : 1113-1120, 2012 (査読なし)
 12. 高野幸路: NET の薬物治療、コンセンサス癌治療、11 巻 3 号 : 155-158、2012. (査読なし)
 13. 高野幸路: カルチノイド症候群、内科 109 巻 6 号 : 1321-1324、2012. (査読なし)
 14. Matsuno, A., Mizutani, A., Okinaga, H., Takano, K., Yamada, S., Yamada, S.M., Nakaguchi, H., Hoya, K., Murakami, M., Takeuchi, M., Sugaya, M., Itoh, J., Takekoshi, S., Osamura, R.Y.: Molecular Morphology of Pituitary Cells, from Conventional immunohistochemistry to Fluorescein Imaging. *Molecules.* 16: 3618-3635, 2011. doi: 10.3390/molecules16053618. (査読あり)
 15. Matsuno, A., Mizutani, A., Okinaga, H., Takano, K., Yamada, S., Yamada, S.M., Nakaguchi, H., Hoya, K., Murakami, M., Takeuchi, M., Sugaya, M., Itoh, J., Takekoshi, S., Osamura, R.Y., Functional molecular morphology of anterior pituitary cells, from hormone production to intracellular transport and secretion. *Med Mol Morphol.*, 44: 63-70, 2011. doi: 10.1007/s00795-011-0545-4. (査読あり)
 16. Murakami, M., Mizutani, A., Asano, S., Katakami, H., Ozawa, Y., Yamazaki, K., Ishida, Y., Takano, K., Okinaga, H., Matsuno, A.: A mechanism of acquiring temozolomide resistance during transformation of atypical prolactinoma into prolactin-producing pituitary carcinoma. *Neurosurgery*, 68: E1761-1767, 2011. doi: 10.1227/NEU.0b013e318217161a. (査読あり)
 17. 高野幸路: 成人成長ホルモン分泌不全症にともなう続発性骨粗しょう症、ホルモンと臨床、59 巻 4 号 : 353-358、2011. (査読なし)
 18. 高野順子, 高野幸路: グルココルチコイドの withdrawal syndrome(離脱症候群)、腎と透析 71 巻 5 号 : 725-729、2011. (査読なし)
 19. 高野幸路: 先端巨大症の内科治療、内分泌・糖尿病・代謝内科 33 巻 3 号 : 222-228、2011. (査読なし)
 20. 高野順子, 高野幸路: 機能性腫瘍の臨床・画像診断 その他の機能性腫瘍 (VIPoma-WDHA 症候群、ソマトスタチノーマ、GRH 産生腺腫瘍、ACTH 産生腺腫瘍)、肝・胆・膵、63 巻 2 号 : 267-275、2011. (査読なし)
 21. 高野順子, 高野幸路: 神経内分泌腫瘍 (NET) に対する化学療法、外科 73 巻 8 号 : 851-857、2011. (査読なし)
 22. 高野幸路: 妊娠時の先端巨大症の管理と治療 ホルモンと臨床 59:787-791、2011. (査読なし)
 23. 高野順子, 高野幸路: 間脳下垂体系の加齢による変化、最新医学 66 巻 4 号 : 833-838、2011. (査読なし)
 24. 高野幸路: 消化管神経内分泌腫瘍の臨床と基礎の現状と展望、日本臨床、69 巻増刊 2 内分泌腺腫瘍 : 660-666、2011. (査読なし)
 25. 高野順子, 高野幸路: 膵内分泌腫瘍の

腫瘍マーカー、腫瘍内科 7 巻 2 号
Page190-197、2011. (査読なし)

26. 高野幸路: 神経内分泌腫瘍の臨床と基礎の現状と展望、日本臨床、69 巻増刊号 2 660-666 2011. (査読なし)
27. 高野順子, 高野幸路: 神経内分泌腫瘍の分化と腫瘍発生機構、日本臨床 69 巻増刊号 2 629-634 2011. (査読なし)
28. 高野幸路: 総論 神経内分泌腫瘍とは何をさすのか BioClinica 25: 1116-1117 2011. (査読なし)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 高野幸路 特別講演 先端巨大症の基礎 アクロメガリーフォーラム(東京) 2013 年 11 月
2. 高野幸路 先端巨大症の内科治療とその基礎 日本脳神経外科学会 (横浜) 2013 年 10 月
3. 高野幸路 神経内分泌臨床の最近の進歩 日本神経内分泌学会(宮崎) 2013 年 10 月
4. 高野幸路, 先端巨大症の病態生理と内科治療 日本内分泌関東甲信越地方会(横浜) 2013 年 9 月
5. 高野幸路 機能性下垂体腺腫のホルモン過剰分泌機構 KIGS 内分泌シンポジウム (東京) 2013 年 9 月
6. 高野幸路 成人成長ホルモン分泌不全症の病態生理 名古屋成長ホルモン研究会 (名古屋) 2013 年 9 月
7. 高野幸路 日本内分泌学会総会(仙台) 先端巨大症の集学的治療 2013 年 4 月
8. 高野幸路 成人成長ホルモン分泌不全症 日本内分泌学会総会(仙台) クリニカルアワー 2013 年 4 月
9. 高野幸路 重症成人成長ホルモン分泌不全症の病態と治療 間脳下垂体腫瘍学会(鹿児島) 2013 年 3 月
10. 高野幸路, 盛田幸司: 下垂体機能低下症の診断, 臨床内分泌代謝 Update (埼玉), 2013 年 2 月
11. 高野幸路 成長ホルモン分泌不全症の臨床とトランジション 小児血液・がん学会学術集会(横浜) 2012 年 11 月
12. 高野幸路 特別講演 下垂体疾患の臨床 第二回内分泌糖尿病アカデミー(川越) 2012 年 9 月
13. 高野幸路 神経内分泌腫瘍の治療の進歩 日本内分泌病理学会(東京) 2011 年 11 月
14. 高野 幸路: 下垂体機能低下症の臨床-見逃しやすい症例: 検診で偶然見出され経過観察された下垂体腺腫の一例, 日本内分泌学会総会(神戸) 2011 年 4 月
15. 高野幸路 神経内分泌腫瘍の内科治療 東京神経内分泌腫瘍研究会(東京) 2011 年 4 月

〔図書〕(計 11 件)

1. 高野幸路: 下垂体病変の内分泌学的検査と診断 ビジュアル脳神経外科 間脳・下垂体・傍鞍部 斉藤延人、片山容一、富永悌二編 メジカルビュー社(東京) 44-53 頁、2013
2. 高野幸路: 代謝・内分泌疾患診療 最新ガイドライン 門脇孝 下村伊一郎編 総合医学社(東京) 318-327 頁、2012.
3. 高野幸路: 神経内分泌腫瘍, 内科学, 門脇孝, 永井良三編, 西村書店(東京) 1231-1236 頁, 2012.
4. 高野幸路: 下垂体疾患の薬物療法 下垂体疾患マニュアル 平田結喜緒、山田正三、成瀬光栄編 診断と治療社(東京) 102-107 頁、2012
5. 高野幸路: 視床下部・下垂体系総論, 先端巨大症、内科学, 門脇孝, 永井良三編, 西村書店(東京), 1168-1166 頁, 2012
6. 高野幸路: 臨床検査基準値 Express 下垂体検査 富野康日己編集, 中外医学社, (東京), 129-135 頁, 2011.
7. 高野幸路: 消化管神経内分泌腫瘍の内科治療 膵・消化管神経内分泌腫瘍診断・治療実践マニュアル, 今村正之監修 総合医学社, 東京, 2011, 164-168 頁.
8. 高野幸路: 膵神経内分泌腫瘍の内科治療 膵・消化管神経内分泌腫瘍診断・治療実践マニュアル, 今村正之監修 総合医学社, 東京, 2011, 149-153 頁.
9. 高野幸路: 機能性膵・消化管神経内分泌腫瘍の鑑別診断, 膵・消化管神経内分泌腫瘍診断・治療実践マニュアル, 今村正之監修 総合医学社, 東京, 2011, 34-48 頁.
10. 高野幸路: 膵・消化管神経内分泌腫瘍の臨床症状, 膵・消化管神経内分泌腫瘍診断・治療実践マニュアル, 今村正之監修 総合医学社, 東京, 2011, 23-33 頁.
11. 高野幸路: 下垂体ホルモンの負荷試験, 内分泌・糖尿病内科学, 森昌朋編 シュプリンガー・ジャパン, 東京, 2011, 13-18 頁.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 幸路 (Takano, Koji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 20236243