

平成 26 年 4 月 27 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592143

研究課題名(和文) 副腎皮質刺激ホルモン分泌に関わる新規因子の同定と下垂体腺腫の新たな治療法の確立

研究課題名(英文) Identification of molecules affecting ACTH secretion and establishment of novel therapy of pituitary adenomas

研究代表者

松野 彰 (MATSUNO, AKIRA)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00242058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)に焦点をしぼり、分泌顆粒の形成と細胞内輸送、特に分泌に関わる新規因子の同定と抑制を目的とし、ACTH恒常的過剰発現細胞株を新規に作製した。蛍光タンパク(GFPとその変異型をさす)を融合した野生型ACTH cDNA、splicing variantである大分子量ACTH cDNAをepisomal vectorを用いて、AtT20細胞株へ導入した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ACTH分泌顆粒の細胞内局在を観察した。CRHや細胞外高カリウム刺激で、ACTHの分泌が生じることを観察し、細胞膜直下の分泌顆粒の動態を、全反射顕微鏡を用いて観察した。

研究成果の概要(英文)：We focused on adrenocorticotrophic hormone and tried to identify and suppress novel molecules playing major roles on formation and intracellular transport of secretory granules. Cells continuously overexpressing ACTH were newly established through transfection to AtT20 cells of GFP-fused wild ACTH and high molecular weight ACTH using episomal vector. Under confocal laser microscopy, intracellular localization of ACTH secretory granules and secretion of ACTH stimulated by CRH and extracellular high potassium were observed. The dynamics of ACTH secretory granules under plasma membrane was also observed under total internal reflection fluorescence microscopy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学・脳腫瘍学

キーワード：ACTH 下垂体細胞 分泌顆粒

1. 研究開始当初の背景

平成 15 年までの科学研究費において、我々は、GH の分泌に Rab3B 蛋白と SNARE 機構が必須であることを明らかにし、下垂体ホルモンの分泌の分子機構についてその一端を明らかにしてきた(松野彰ら: 日本内分泌学会雑誌 2002,78[Suppl. Dec]:123-4, ホルモンと臨床 50 巻 '02 臨時増刊号 2002,50:41-4, ホルモンと臨床'03 臨時増刊号 2003,51:44-7, Matsuno A et al.: *Microsc Res Tech* 2003,62:232-9)。

また平成 17 年までの科学研究費においても、蛍光色素である EYFP と GH との融合蛋白 (EYFP-GH) の遺伝子を発現する、下垂体培養細胞の stable cell line を GH3 cell と AtT-20 cell の 2 種類で確立した(Matsuno A et al.: *J Histochem Cytochem* 2005, 53:1177-80)。

そして細胞内での EYFP-GH 分泌顆粒の動態を可視化することに成功した。TRH, high K, CRH などの刺激に応じて EYFP-GH 分泌顆粒の細胞内輸送と分泌を観察し得た。そして EYFP-GH と ECFP-Rab3B の共発現系を作製し、細胞内輸送はもちろんのこと分泌顆粒の放出にも Rab3B が関与していることを明らかにした(Matsuno A et al.: *Brain Tumor Pathology* 2006, 23:1-5)。また平成 19 年までの科学研究費においても、下垂体ホルモンの細胞内輸送における kinesin superfamily(KIF)の役割を明らかにし、KIF をターゲットとした新たな治療法の可能性を探求してきた。さらに R-Ras が exocytosis の調整に関与していることも明らかとした(Takaya A et al.: *Mol Biol Cell* 2007, 18:1850-60)。

また、平成 22 年までの科学研究費においても、下垂体細胞における分泌装置として porosome の形成機構について探求してきた。その過程で、SIRT1 が脱アセチル化を通じて PIP5K γ の活性化をきたし TSH の分泌に関与することを明らかにした (Asai-Akieda S

et al: *PLoS One* 2010, 5:e11755)。

このような TSH の分泌に最終的に関与する分子が明らかになったように、ACTH の分泌についても細胞膜直下で分泌に関与する分子の解明が必要であると考えた。

2. 研究の目的

機能性下垂体腫瘍、特に成長ホルモン(GH)や副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)産生下垂体腫瘍に対する従来の治療法はホルモン産生を抑制することを主眼としてきた。本研究では、ACTH に焦点をしばり、分泌顆粒の形成と細胞内輸送、特に分泌に関わる新規因子を同定し、この抑制を行う。このことにより、機能性下垂体腺腫、ACTH 産生下垂体腺腫の新規治療法の開発と大分子量 ACTH 産生腺腫の病態解析を目指すものである。

3. 研究の方法

蛍光タンパク (GFP とその変異型をさす) と ACTH との融合蛋白(蛍光タンパク-ACTH)の遺伝子を発現する、下垂体培養細胞の stable cell line(GH3 cell と AtT-20 cell)を確立する。ACTH をはじめとするペプチドホルモンは、細胞外からの分泌刺激に素早く応答するために顆粒上および細胞膜上に存在する分子が複合体を形成し、ホルモン顆粒を細胞膜に繋ぎとめていると考えられている。この複合体を形成している因子を同定する。ついで、RNA 干渉を用いてこれらの分子の作用を阻害し、ACTH の分泌が抑制されることを明らかにする。

4. 研究成果

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)に焦点をしばり、分泌顆粒の形成と細胞内輸送、特に分泌に関わる新規因子の同定と抑制を目的とし、ACTH 恒常的過剰発現細胞株を新規に作製した。蛍光タンパク (GFP とその変異型をさす) を融合した野生型 ACTH

cDNA、splicing variant である大分子量 ACTH cDNA を episomal vector を用いて、AtT20 細胞株へ導入した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ACTH 分泌顆粒の細胞内局在を観察した。CRH や細胞外高カリウム刺激で、ACTH の分泌が生じることを観察し、細胞膜直下の分泌顆粒の動態を、全反射顕微鏡を用いて観察した。

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 12 件)

- 1)Urinary growth hormone level and insulin-like growth factor-1 standard deviation score (IGF-SDS) can discriminate adult patients with severe growth hormone deficiency. Hirohata T, Saito N, Takano K, Yamada S, Son JH, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Mizutani A, Okinaga H, Matsuno A. Endocr J 査読有 2013, 60:369-373
- 2)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. Hirohata T, Asano K, Ogawa Y, Takano S, Amano K, Isozaki O, Iwai Y, Sakata K, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S, Fujio S, Arita K, Takano K, Tominaga A, Hizuka N, Ikeda H, Osamura RY, Tahara S, Ishii Y, Kawamata T, Shimatsu A, Teramoto A, Matsuno A. J Clin Endocri Metab 査読有 2013, 98:1130-1136
- 3)A skull base osteosarcoma presenting with cerebrospinal fluid leaking in CyberKnife treatment: a case report. Yamada SM, Ishii Y, Yamada S, Goto Y, Murakami M, Hoya K, Matsuno A. J Med Case Reports 査読有 2013, 7:116-110
- 4)Modified S/MAR episomal vectors for stably expressing fluorescent-protein tagged transgenes with small cell-to-cell fluctuations. Mizutani A, Kikkawa E, Matsuno A, Shigenari A, Okinaga H, Murakami M, Ishida H, Tanaka M, Inoko H. Anal Biochem 査読有 2013, 443:113-116
- 5)Clinicopathological and molecular histochemical review of skull base metastasis from differentiated thyroid carcinoma. Matsuno A, Murakami M, Hoya K, Yamada SM, Miyamoto S, Yamada S, Son JH, Nishido H, Ide F, Nagashima H, Sugaya M, Hirohata T, Mizutani A, Okinaga H, Ishii Y, Tahara S, Teramoto A, Osamura RY, Yamazaki K, Ishida Y. Acta Histochem Cytochem 査読有 2013, 46:129-136
- 6)Advanced therapeutic strategy for radiation-induced osteosarcoma at the skull base: a case report and review. Yamada SM, Ishii Y, Kuribayashi S, Kumita S, Matsuno A. Radiat Oncol 査読有 2012, 7:136-140
- 7)Endoscopic extracapsular removal of pituitary adenoma: the importance of pretreatment of an adjacent unruptured internal carotid artery aneurysm. Yamada S, Yamada SM, Hirohata T, Ishii Y, Hoya K, Murakami M, Matsuno A. Case Report Neurol Med 査読有 2012;2012:891847.
- 8)Abnormal dynamics of growth hormone after thyrotropin-releasing hormone loading test, gonadotropin-releasing hormone loading test, and oral glucose tolerance test in mixed gonadal dysgenesis with a pituitary lesion. Matsuno A, Yamada S, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M. International Journal of Case Reports and Images (IJCRI) 査読有 2011, 2:12-14.
- 9)A mechanism of acquiring temozolomide

resistance during transformation of atypical prolactinoma into prolactin-producing pituitary carcinoma: case report. Murakami M, Mizutani A, Asano S, Katakami H, Ozawa Y, Yamazaki K, Ishida Y, Takano K, Okinaga H, Matsuno A. Neurosurgery 査読有 2011, 68:E1761-E1767

10)Functional molecular morphology of anterior pituitary cells, from hormone production to intracellular transport and secretion. Matsuno A, Mizutani A, Okinaga H, Takano K, Yamada S, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Takeuchi M, Sugaya M, Itoh J, Takekoshi S, Osamura RY. Med Mol Morphol 査読有 2011, 44:63-70

11)Molecular morphology of pituitary cells, from conventional immunohistochemistry to fluorescence imaging. Matsuno A, Mizutani A, Okinaga H, Takano K, Yamada S, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Takeuchi M, Sugaya M, Itoh J, Takekoshi S, Osamura RY. Molecules 査読有 2011, 16:3618-3635

12)Molecular morphological research of anterior pituitary hormone production, intracellular transport and secretion. Matsuno A, Mizutani A, Okinaga H, Takano K, Yamada S, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Takeuchi M, Sugaya M, Itoh J, Takekoshi S, Osamura RY. Trends in Cell and Molecular Biology 査読有 2011, 6:1-8

[学会発表](計 17 件)

1)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. Matsuno A. The 6th International Mt. BANDAI Symposium for Neuroscience & The 7th Pan-Pacific Neurosurgery Congress (Joint Neurosurgical

Convention 2013 2013.2.2 (Hawaii)

2)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. Matsuno A. The 24th Annual Meeting of Asia-Pacific Endocrine Conference (APEC) 2013.7.14 (Dalian, China)

3)Effect of intensive resection of pseudocapsule on surgical results in no-functioning pituitary macroadenomas. Ishii Y, Matsuno A, Tahara S, Teramoto A, Morita A. The 24th Annual Meeting of Asia-Pacific Endocrine Conference (APEC) 2013.7.14 (Dalian, China)

4)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. Matsuno A. The 15th World Congress of Neurosurgery (WFNS) 2013.9.10 (Seoul, Korea)

5)Studies of the Japan Society for Hypothalamic and Pituitary Tumors: Temozolomide treatment of pituitary carcinoma and atypical adenoma. Matsuno A. The 5th Harbin International Neurosurgical Conference 2012.7.15 (Harbin, China)

6)Functional molecular morphology of pituitary cells, from conventional immunohistochemistry to fluorescein imaging. Matsuno A, Mizutani A, Murakami M, Hoya K, Nakaguchi H, Yamada SM, Hirohata T, Ishibashi S, Okinaga H. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2012) 2012.8.27 (Kyoto)

7)Analyses of factors influencing the acute effect of octreotide in growth

hormone-secreting adenomas. Ishibashi S, Matsuno A, Mizutani A, Murakami M, Hoya K, Nakaguchi H, Yamada SM, Hirohata T, Okinaga H. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2012) 2012.8.27 (Kyoto)

8)A mechanism of acquiring temozolomide resistance during transformation of atypical prolactinoma into prolactin-producing pituitary carcinoma. Murakami M, Mizutani A, Hoya K, Matsuno A. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2012) 2012.8.27 (Kyoto)

9)Identification of a novel interactor of human growth hormone. Mizutani A, Matsuno A, Hirohata T, Tanaka M, Inoko H. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2012) 2012.8.27 (Kyoto)

10)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. Hirohata T, Matsuno A, Osamura RY, Teramoto A, the subcommittee of JSHP. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2012) 2012.8.27 (Kyoto)

11)Temozolomide treatment of malignant pituitary adenomas. Matsuno A, Murakami M, Mizutani A, Nakaguchi H, Yamada SM, Hoya K, Asano S, Ozawa Y, Yamazaki K, Ishida Y, Okinaga H. The 4th International Neurosurgical Winter Congress 2011.2.9 (Rusutsu, Hokkaido, Japan)

12)Functional molecular morphology of pituitary cells, from conventional immunohistochemistry to fluorescein imaging. Matsuno A. Capital Medical University

2011.4.14 (Beijing, China)

13)Functional molecular morphology of pituitary cells, from conventional immunohistochemistry to fluorescein imaging. Matsuno A, Mizutani A, Hoya K, Murakami M, Ishibashi S, Okinaga H. The 10th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (CJSHC) 2011.10.23 (Beijing, China)

14)Differential diagnosis among patients with total thyroidectomy, thyroid dysgenesis and mutations in the thyroglobulin gene by a novel ultrasensitive EIA for human thyroglobulin. Katakami H, Hashida S, Iwasaki H, Hishinuma A, Fukata S, Matsuno A, Ieiri T. ENDO 2011 2011.6.4-7 (Boston, USA)

15)A mechanism of acquiring temozolomide resistance during transformation of atypical prolactinoma into prolactin-producing pituitary carcinoma. Murakami M, Mizutani A, Hoya K, Matsuno A. The 10th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (CJSHC) 2011.10.22-23 (Beijing, China)

16)Identification of novel interaction partners for human growth hormone (hGH) by the yeast two hybrid system. Mizutani A, Tanaka M, Yoshimura S, Okinaga H, Takano K, Inoko H, Matsuno A. The 10th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (CJSHC) 2011.10.22-23 (Beijing, China)

17)Analyses of factors influencing the acute effect of octreotide in growth hormone-secreting adenomas. Ishibashi S, Matsuno A, Mizutani A, Hoya K, Murakami M, Okinaga H. The 10th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (CJSHC) 2011.10.22-23 (Beijing, China)

〔図書〕(計7件)

1)4. 脳腫瘍 トルコ鞍部腫瘍 非機能性

下垂体腺腫. 松野彰. 水澤英洋、鈴木則宏、梶龍兒、吉良潤一、神田隆、齊藤延人 編 今日の神経疾患治療指針 第2版 医学書院 2013, 360-362

2)第5章生化学検査 A.下垂体. 松野彰. 高木康、山田俊幸 編 標準臨床検査医学 第4版 医学書院 2013, 93-105

3)下垂体腺腫. 松野彰. 今日の治療指針 2013年版 私はこう治療している 医学書院 2013, 800-801

4) . 間脳・下垂体・傍鞍部の治療 悪性下垂体腺腫 異型性下垂体腺腫、下垂体癌. 廣畑倫生、村上峰子、松野彰. 齋藤延人 編 ビジュアル脳神経外科6 間脳・下垂体・傍鞍部 メジカルビュー社 2013, 144-153

5)11章 脳腫瘍 §8 脳腫瘍各論(6) 下垂体腺腫、頭蓋咽頭腫. 松野彰. 太田富雄 総編 川原信隆、西川亮、野崎和彦、吉峰俊樹 編 脳神経外科学 改訂第11版 金芳堂 2012, 1545-1574

6)各論編 第2章 基礎知識 D. 下垂体前葉疾患各論 35. 下垂体癌と異型性下垂体腺腫. 松野彰、村上峰子、水谷晃子. 平田結喜緒、山田正三、成瀬光栄 編 下垂体疾患診療マニュアル 診断と治療 2012, 216-218

7)第2章 各論 XII 内分泌の疾患 XII-4 下垂体細胞の分化、下垂体腺腫の原因遺伝子と視床下部・下垂体のクロストーク. 松野彰. 日本臨床分子形態学会 編 病気の分子形態学 学際企画 2011, 342-344

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松野 彰 (MATSUNO AKIRA)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号:00242058

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

水谷 晃子 (MIZUTANI AKIKO)
帝京平成大学・健康メディカル学部・講師
研究者番号:80465252

竹腰 進 (TAKEKOSHI SUSUMU)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号:70216878

長村 義之 (OSAMURA YOSHIYUKI)
国際医療福祉大学・大学病院健康・教授
研究者番号:10100992