

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580466

研究課題名(和文) コルチゾール分泌抑制薬が犬下垂体腺腫細胞増殖能に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) The effect of trilostane on the proliferation of canine pituitary corticotroph adenoma

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はCushing病罹患犬において小動物獣医領域で使用されているコルチゾール分泌抑制薬がACTH産生腺腫増殖能に及ぼす影響について解明数することを目的として実施した。健康犬にコルチゾール分泌抑制薬を投与することにより脳脊髄液中のCRHは有意に増加した。健康犬の下垂体前葉およびACTH産生下垂体腺腫の初代培養細胞にCRHを添加するとACTH産生細胞の増殖能が活性化した。また、これはCRH receptor1阻害薬により阻害された。以上の結果からコルチゾール分泌抑制薬の投与により過剰に分泌されたCRHはACTH産生細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted for the purpose of clarifying the effect of cortisol secretion inhibitors that are used in small animal veterinary area in case of Cushing disease affected dogs on the ACTH producing adenoma growth ability. By administering the cortisol secretion inhibitor in healthy dogs, the CRH in cerebrospinal fluid increased significantly. By adding the CRH in primary culture cells of adenohypophysis of healthy dogs or ACTH producing pituitary adenoma, the proliferative capacity of ACTH producing cells was activated. This also was inhibited by CRH receptor1 inhibitors. The above results revealed that CRH that is excessively secreted by the administration of cortisol secretion inhibitor promotes the growth of ACTH producing cells.

研究分野：獣医神経内分泌学

キーワード：Cushing病 コルチゾール分泌抑制薬 CRH Nelson症候群

1. 研究開始当初の背景

犬の下垂体腫瘍の多くは副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)産生性腺腫であり、犬の主要な内分泌疾患の一つである下垂体依存性副腎皮質機能亢進症(Pituitary-dependent hyperadrenocorticism: PDH)の原因となっている。人におけるACTH産生性腫瘍の発生率は下垂体腫瘍の約5%程度であることから、下垂体ACTH産生性腫瘍に関しては、獣医学領域のみならず、人医学領域においても病態生理、発生機序や原因に関しては未だ解明されていない部分が多いのが現状である。生体の視床下部-下垂体-副腎軸におけるホルモン調整機構では、通常、視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(Corticotropin releasing hormone: CRH)が放出され、下垂体からのACTH分泌を亢進させる。下垂体から分泌されたACTHは副腎皮質におけるコルチゾール分泌を亢進させ、さらに副腎皮質から過剰に分泌されたコルチゾールは視床下部からのCRHおよび下垂体からのACTH分泌を抑制し、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調整として知られている。しかし、下垂体ACTH産生性腺腫が存在するPDH罹患症例では、コルチゾールにより下垂体からのACTH分泌が抑制されず、過剰なコルチゾール分泌が持続する結果となる。過剰なコルチゾールにより、PDH罹患症例では多飲多尿、腹部膨満、脱毛等の様々な臨床症状が引き起こされる。現在、犬では副腎におけるコルチゾール分泌を抑制する事を目的とした内科的治療がPDH罹患症例に施されている。一般的に副腎皮質に毒性を示す op' -DDDおよびステロイド合成阻害薬であるトリロスタンが内科的治療に用いられている。しかし、ヒト医学領域において、下垂体ACTH産生性腺腫を持つPDH罹患症例に対して両側副腎切除術を実施した場合、下垂体ACTH産生性腺腫の成長が促されることが知られている。このことはNelson's syndromeと呼ばれており、コルチゾール分泌抑制薬の使用によっても同様の現象が起こるとされている。小動物臨床分野において犬のCushing病についてその増殖能を含めた細胞生物学的特徴に関する研究は未だ十分に行われていない。またNelson's syndromeの危険性は指摘されているもののその有無については解明されておらず、一般的にコルチゾール分泌抑制剤が犬のPDHの治療に用いられている。よって本研究ではCRHがACTH産生細胞増殖能に及ぼす影響について正常下垂体および下垂体ACTH産生腺腫を用いて検討を行うことで犬におけるNelson's syndrome発生の可能性を明らかにする。

2. 研究の目的

犬の下垂体腫瘍の多くは副腎皮質刺激ホルモン産生性腺腫であり、犬の主要な内分泌疾患の一つである下垂体依存性副腎皮質機能

亢進症の原因となっている。しかし、健常犬に対してコルチゾール産生を抑制した場合には下垂体ACTH産生細胞過形成が起こることが知られており、この治療法により下垂体ACTH産生性腫瘍の成長が亢進する危険性が指摘されている。本検討ではコルチゾール産生抑制時のACTH産生細胞が形成が起こる機序をあきらかとし、同様の条件を培養下で再現することで下垂体依存性副腎皮質機能亢進症罹患症例犬においてコルチゾール産生抑制時に下垂体ACTH産生性腺腫の増殖能が亢進するの否かを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 健常犬に対するトリロスタン投与による脳脊髄液中CRH濃度変化について
健常ビーグル成犬6頭にトリロスタン5mg/kg BID 4週間の投与を実施し、トリロスタン投与開始前および投与開始後2週間、4週間の時点において全身麻酔下にて脳脊髄液を採取し、脳脊髄液中のタンパクをC18カラムにて精製、濃縮後、凍結乾燥を実施した。その後CRHをELISAにて測定した。

(2) ACTH産生腺腫におけるKi67, minichromosome maintenance7 (MCM7)の免疫組織学的検討
腫瘍組織は経蝶形骨下垂体切除術を実施した症例のサンプルをオーナーの承諾を得て使用した。
2 μ Mに薄切したパラフィン切片を使用し検討を行った。脱パラフィン後10mMCitrate bufferにて121 10分間オートクレーブ処理にて賦活化を行い、10%goat serumにて室温30分間ブロッキングを行った。一次抗体はanti-MCM7 monoclonal rabbit(Cell Signaling Technology Japan, Tokyo, Japan 1:400), anti-Ki67 monoclonal rabbit antibody(Lab Vision, Fremont, CA, USA 1:100)を使用し4オーバーナイトで反応させた。二次抗体反応後anti-ACTH monoclonal mouse antibody(Dako, Japan 1:200)を室温1時間反応させ、二次抗体を反応させることによりcorticotrophの染色を行い、Ki67およびMCM7陽性率を算出した。5視野、平均1000個のcorticotrophをカウントすることにより陽性率を算出した。

(3) CRHが正常犬およびACTH産生腺腫corticotrophに及ぼす影響
増殖中のACTH産生細胞を検出するため、Eduによる化学的標識およびACTHの蛍光免疫学的標識を実施し、CRH添加によるEdu陽性かつACTH陽性細胞数およびACTH陽性細胞数を計測した。またこれがCRHreceptor1阻害薬であるAntalarminの添加により阻害されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 健常犬に対するトリロスタン投与による脳脊髄液中 CRH 濃度変化について
トリロスタン投与前の脳脊髄液中の CRH 濃度は 260 ± 19.5 pg/ml であった。投与後の脳脊髄液中の CRH 濃度は投与前と比較して有意な増加 ($p < 0.01$) が認められ、投与後 2 週目および 4 週目の CRH 濃度はそれぞれ 337.8 ± 20.7 pg/ml, 366.2 ± 19.5 pg/ml であった。

(2) ACTH 産生腺腫における Ki67, MCM7 の免疫組織学的検討
MRIGDT1WI において P/B ratio 0.31 以上を腫大と判定して検討を行った。

腫大が認められなかった ACTH 産生腺腫の Ki67 陽性率は $0.55 \pm 0.59\%$ であり、腫大が認められた群では $1.6 \pm 0.6\%$ であった。一方 MCM7 は非腫大群で $2.9 \pm 2.2\%$ 、腫大群で $10.9 \pm 3.7\%$ であった。

P/B ratio と Ki67 および MCM7 の間に有意な正の相関関係が認められたことから、犬の ACTH 産生腺腫においてもこれらの増殖マーカーの有用性が明らかとなった。

(3) CRH が正常犬および ACTH 産生腺腫 corticotroph に及ぼす影響

正常犬における ACTH 産生細胞の EdU 陽性率は対照群が $1.28 \pm 0.23\%$ 、0.5nMCRH 添加群が $1.42 \pm 0.23\%$ 、5nMCRH 添加群が $2.52 \pm 0.25\%$ であり、5 nMCRH を添加した群では対照群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.01$)。また培養上清中の ACTH 濃度は培養後 4 時間、24 時間で対照群と比較し有意に高値を示した。これらは CRHR1 阻害薬である Antalarmin $1 \mu\text{M}$ の添加で阻害された。

また、ACTH 産生腺腫細胞では CRH5nM の添加により ACTH 産生細胞の増殖能に増加傾向が認められ、これは Antalarmin $1 \mu\text{M}$ の添加で阻害される傾向が認められた。また Cortisol を 10nM, 100nM 添加した場合、増殖率に変化が認められなかった。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

佐藤朝香、原康 間脳下垂体副腎系研究会 2014 ACTH 産生腺腫罹患犬および下垂体過形成モデル犬から採取した下垂体組織における BMP4 の発現に関する検討

原康 日本獣医師会学術集会年次大会(招待講演) 2014 下垂体腫瘍の外科治療

佐藤朝香、石野寛和、澤田治美、神野信夫、原田恭治、余戸拓也、原康 獣医麻酔外科学会 2014 Cushing 病罹患犬における内因性血漿 ACTH 濃度および CRH 負荷試験と下垂体サイズに関する検討

佐藤朝香、神野信夫、原田恭治、余戸拓也、原康 獣医神経病学会 2014 ACTH 産生腺腫罹患犬および下垂体過形成モデル犬から採取した下垂体組織における BMP4 の発現に関する検討

原康 第 22 回文京脳腫瘍研究会(招待講演) 2015 小動物獣医療の脳神経外科手術

原康 第 29 回神奈川脳腫瘍フォーラム(招待講演) 2015 小動物獣医療の脳神経外科手術

原康 第 4 回千駄木脳腫瘍研究会(招待講演) 2014 小動物獣医療の脳神経外科手術

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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

獣医外科学教室 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

()

研究者番号：