

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461388

研究課題名(和文) 松果体メラトニンによる副腎ホルモン合成・分泌への影響とその分子機序の解明

研究課題名(英文) The direct regulatory effects of melatonin on adrenocortical steroidogenesis and adrenal medullary catecholamine synthesis

研究代表者

稲垣 兼一 (INAGAKI, KENICHI)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：80549882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：松果体より分泌されるメラトニンは網膜から入る光刺激により負に調節され、生体内の概日リズム形成に寄与している。近年副腎ホルモン分泌についてもメラトニンが直接作用、調整する可能性を示唆する研究が報告されている。本研究では副腎皮質及び髄質モデル細胞株を用いて、副腎におけるステロイド及びカテコラミン分泌に対してメラトニンが直接的に及ぼす影響とその細胞内メカニズムについて検討した。その中でメラトニンが細胞局所因子や他のホルモン調整因子と関連し副腎内ホルモン合成を調整している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Melatonin is known to be involved in the physiological circadian rhythm control and activities of various hormones and cytokines. In this study, we evaluated the effects of melatonin on the adrenocortical steroidogenesis and adrenal medullary catecholamine synthesis using the representative adrenocortical and adrenal medullary cell lines. The results of our study suggest the direct regulatory effect of melatonin on adrenal hormone production via the mutual interaction of intracellular signaling between melatonin and the adrenal local growth factors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：メラトニン 副腎

## 1. 研究開始当初の背景

メラトニンは松果体より分泌されるホルモンであり、その分泌は網膜から入る光刺激が視交叉上核に入力し交感神経を介して松果体に伝わることで負に調節される。すなわち夜間に昼間の 50 倍以上多く分泌され、昼間は光刺激により分泌抑制される。そして哺乳類の概日リズム中枢である視交叉上核と相互に作用し生体内の概日リズムを調節している。一方メラトニン受容体は視交叉上核以外の種々の臓器に分布し、概日リズムに関する働きに加えて神経分化・成熟作用、抗酸化作用、視床下部・下垂体・性腺ホルモン系調節作用などを有する。また、メラトニンが副腎皮質・髄質のホルモン合成に影響を与えることを示唆する研究がこれまでにいくつか報告されている。しかし *in vitro* 実験による詳細なメカニズムに関する報告はほとんどなく、メラトニンによる副腎皮質・髄質ホルモン分泌調節機構は明らかでない。

### (1) 副腎皮質ステロイドとメラトニン

ヒトや昼行性の霊長類において副腎皮質ステロイドであるコルチゾールはメラトニンと対照的に早朝をピークに日中高く、夜間低いという特徴的な血中濃度を示す。このコルチゾール分泌の日内リズムは同じ傾向を示す下垂体の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌リズムに主に追従していると考えられていた。ところが ACTH 抑制環境下においてもコルチゾール分泌が日内リズムを維持するというラットやオマキザルにおける研究 (Am J Primatol 70:93, 2008) が報告され、ACTH と独立したコルチゾールの日内リズム調節機構が存在する可能性が示唆された。一方、ヒトを含む哺乳類のステロイド合成臓器 (卵巣・精巣・副腎) にはメラトニン受容体が存在し、最近ヒトの摘出副腎初代培養において、メラトニンが ACTH によるコルチゾール産生を抑制することが報告された (Horm Metab Res 43:337, 2011)。これらの知見からメラトニンが ACTH 非依存的にコルチゾールの夜間分泌低下を促進する可能性があると考えられた。コルチゾール分泌の夜間低下 (nadir) が加齢とともに緩やかになること (J Clin Endocrinol Metab 81:2468, 1996) はメラトニン分泌の加齢による低下と矛盾しない。またメラトニン受容体 (MT1) ノックアウトマウスがインスリン抵抗性を有すること (Obesity 18:1861, 2010) が明らかになり、コルチゾールのインスリン抵抗性誘導作用の関与も示唆されるがノックアウト動物の副腎ホルモン分泌変化についての検討は報告されていない。現代の不規則な生活習慣 (夜間の光刺激) がメラトニン分泌を抑制し睡眠障害に伴うさまざまな病態に影響することが認識されているが、生活習慣病の観点からもメラトニンによる副腎皮質ホルモン分泌の詳細なメカニズムを解明することは非常に重要である。一方、私たちは確立されたヒト副腎皮質細胞モデルを用いて、自

己・傍分泌的に作用する成長因子と副腎皮質ホルモンの合成・分泌調節について一貫して研究し、その成果を報告してきた (Endocrinology 145:639, 2004; Endocrinology 147:2681, 2006; Regul Pept 138:138, 2007; Endocrinology 149:2816, 2008)。その中でコルチゾールおよびアルドステロンが ACTH やアンジオテンシン II (Ang II) などにより産生刺激される古典的内分泌システムを細胞局所で働く骨形成蛋白 BMP やアクチビンが緻密に調整していることを明らかにした。本研究でも松果体由来のメラトニンと副腎皮質局所環境としての成長因子のインタラクションという視点でメラトニンのコルチゾールおよびアルドステロン合成・分泌に対する影響について研究した。

### (2) 副腎髄質カテコラミンとメラトニン

高齢者とともに冠動脈疾患罹患患者においても血中メラトニン濃度が低下していること (Lancet 345:1408, 1995 など) や動物実験にて加齢により種々の臓器のメラトニン受容体が減少することが以前より知られている。また閉経後女性などさまざまな集団においてメラトニン内服によりその数時間後から血圧や血管抵抗の指標である内頸動脈拍動指数が低下し、同時に認めた副腎髄質由来の血中カテコラミン濃度減少がそれらの一因であると報告された (Clin Endocrinol 53:367, 2000)。このことは元来メラトニン濃度が低下する早朝に心血管イベントが多発することもあり、メラトニンの心血管イベント抑制の可能性の観点から注目されている。また脳神経学的にもメラトニンの働きが古くから検討されている。神経細胞モデルとしても頻用されるラット褐色細胞腫細胞株 PC12 を用いた研究では、生理量のメラトニンが細胞増殖を抑制し薬理量ではアミロイドなどによる細胞障害・アポトーシスを緩和することなどが知られている。また PC12 細胞にてドパミン分泌がメラトニンにより抑制されることも報告されている (Brain Res 966:95, 2003)。一方、私たちはこの PC12 細胞を副腎髄質モデル細胞として用いて髄質の外側に隣接する副腎皮質から流入する副腎皮質ステロイドや髄質・皮質に存在する様々な成長因子の存在下にカテコラミン産生・分泌がどのように制御されているかについて研究し発表してきた (Endocrinology 146:5332, 2005; Am J Physiol Endocrinol Metab 296:E901, 2009)。本研究ではこの副腎髄質内部の成長因子や髄質を取り囲む皮質由来のステロイドホルモンを含む副腎髄質局所環境システムにおいてメラトニンがカテコラミン合成をどのようなメカニズムで調節しているのかということについて検討した。

## 2. 研究の目的

正常な副腎皮質・髄質ホルモン分泌において概日リズムや上位ホルモン・外部ストレスに対する応答性が個体を維持する上で非常

に重要であるが、その制御機構には不明な点も多い。一方、日内変動の欠如、フィードバックシステムからの逸脱こそが副腎性クッシング症候群、原発性アルドステロン症、褐色細胞腫などの副腎ホルモン分泌過剰症の病態を形作る。私たちは副腎ホルモンの分泌リズムや外部刺激への応答性が形成される機構を解明すべく、松果体由来のメラトニンが副腎ホルモン分泌に与える影響とその副腎局所環境における詳細な分子機序について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 副腎皮質ステロイド合成細胞モデルとしてヒト副腎皮質癌由来細胞株 H295R 細胞を用いてメラトニン添加時のステロイド基礎分泌量及び ACTH, アンジオテンシン II, カリウムなどにより誘導されるステロイド合成増加に対する影響を細胞培養上清中のステロイド濃度測定 (ラジオイムノアッセイ) により評価した。またアクチビン、BMP などの細胞局所因子によるステロイド合成調節作用に対するメラトニンの影響についてもステロイドアッセイで検討した。また同時にメラトニン添加によるステロイド合成酵素やメラトニン受容体、BMP 受容体、Smad などの mRNA 発現の変化について RT-PCR、定量 PCR にて検討した。またメラトニンによるステロイド合成系への影響に関して細胞内シグナルの鍵となる因子を検索するため細胞培養液中 cAMP 測定やリン酸化 Smad などのイムノプロット等を行った。

(2) ラット褐色細胞腫細胞株 PC12 細胞を副腎髄質カテコラミン合成細胞モデルとしてメラトニンを直接細胞培養液に添加しカテコラミン分泌及びカテコラミン合成酵素発現の変化をそれぞれラジオイムノアッセイ、リアルタイム PCR などで評価した。また副腎皮質ステロイド存在下におけるそれらの変化についても検討した。また自己分泌・傍分泌的にカテコラミン分泌を調整する BMP 及び BMP 受容体以下の細胞内シグナル伝達における key molecule の発現に対するメラトニンの影響についても定量 PCR やイムノプロットなどで検討した。

### 4. 研究成果

(1) 副腎皮質ステロイド合成細胞モデルとしてヒト副腎癌由来細胞株 H295R 細胞を使用し副腎ステロイド合成におけるメラトニンの影響について検討した。まず濃度勾配をつけたメラトニンを H295R 細胞培養液に添加し、コルチゾール及びアルドステロン合成の基礎分泌及び ACTH, アンジオテンシン II, カリウム刺激による分泌に対する影響をラジオイムノアッセイにて検討した。またステロイド合成酵素 (P450scc, CYP11B1, CYP11B2 など) の mRNA 発現変化をリアルタイム PCR にて検討した。その結果、メラトニンはアルドステロンの基礎分泌には影響を与えなかったが、ACTH 刺激下でメラトニンはアルドステロン分泌を増加し、これはアクチビン添加

によりさらに増幅した。一方、メラトニンはアンジオテンシン II によるアルドステロン分泌には影響を与えず、アクチビンとメラトニンの共存下でもアルドステロン分泌の増大を認めなかった。ACTH による cAMP 産生がメラトニンおよびアクチビンにより増幅したことから、メラトニンは副腎皮質細胞で cAMP-PKA 経路を直接的またはアクチビンと相加的に活性化して、ACTH によるアルドステロン合成を促進することが示され、コルチゾール分泌への作用と相反する新たな作用を持つことが明らかとなった。

(2) メラトニンによる副腎髄質カテコラミン産生への影響とそのメカニズムについて検討した。生体内でメラトニンは副腎髄質カテコラミン分泌を抑制して降圧効果を発揮するが、その機序の詳細は不明である。これまでにラット褐色細胞腫細胞 PC12 を用いた検討から、副腎に発現する BMP がカテコラミン合成を抑制すること、デキサメサゾンやアルドステロンなど副腎皮質ステロイドによるカテコラミン分泌調節に BMP が関与することを報告してきたが、その手法を活かしてメラトニンのカテコラミン産生への影響とその機序について、BMP-4・デキサメサゾン・アルドステロン・ジヒドロテストステロンとの相互作用に着目して検討した。メラトニンは、PC12 におけるカテコラミン分泌と律速酵素 TH の発現を抑制し、BMP-4 による Smad 経路を介したカテコラミン合成抑制を増強した。その機序としてメラトニンが BMP 受容体 (ALK-2/BMPRII) の発現を増強し、抑制性 Smad6/7 の発現を減弱することが示された。一方で BMP-4 はメラトニン受容体 (MT1) の発現に影響を与えなかった。また、副腎皮質ステロイドデキサメサゾン・アルドステロン・ジヒドロテストステロンは TH 発現を増加し、メラトニンはアルドステロン・ジヒドロテストステロンによる TH 発現に対しては抑制的に、デキサメサゾンによる TH 発現に対しては相加的に作用し、後者にはメラトニンによるグルココルチコイド受容体発現増強が関与していた。以上より、メラトニンは BMP-4 と協調的にカテコラミン合成を抑制するが、グルココルチコイド刺激下でのカテコラミン合成は増強するという新たな調節系が示された。

### 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 1 件)

Hara T, Otsuka F, Tsukamoto-Yamauchi N, Inagaki K, Hosoya T, Nakamura E, Terasaka T, Komatsubara M, Makino H. Mutual effects of melatonin and activin on induction of aldosterone production by human adrenocortical cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 査読あり 2015 Aug;152:8-15. doi:

10.1016/j.jsbmb

〔学会発表〕(計 6件)

小松原 基志, 稲垣 兼一 ら. カテコラミン合成系におけるメラトニンとBMP-4・ステロイドの作用とその機序. 日本内分泌学会学術総会. 2016年4月21日, 京都市

Komatsubara M, Inagaki K, et al., Melatonin regulates catecholamine synthesis by activating bone morphogenetic protein signaling and glucocorticoid actions. ENDO2016. April 1<sup>st</sup>, 2016, Boston, USA

小松原基志, 稲垣 兼一ら. MelatoninとBMP-4・副腎皮質ステロイドによるカテコラミン合成への影響. 日本ステロイドホルモン学会学術集会. 2016年1月15日, 倉敷市

原孝行, 稲垣 兼一ら. メラトニンとアクチビンによる副腎皮質アルドステロン合成への相互作用. 日本内分泌学会学術総会. 2015年4月23日, 東京都

小松原基志, 稲垣 兼一ら. カテコラミン分泌に対するメラトニンの影響: PC12細胞を用いた検討. 日本内分泌学会学術総会. 2015年4月23日, 東京都

原孝行, 稲垣 兼一ら. メラトニンによる副腎皮質アルドステロン分泌への影響と機序. 日本内分泌学会学術総会. 2014年4月24日, 福岡県

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲垣 兼一 (INAGAKI KENICHI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号: 80549882

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし