

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860768

研究課題名(和文) BMP-4に着目したメラトニン受容体刺激によるACTH/PRL分泌抑制機序の検討

研究課題名(英文) Roles of bone morphogenetic protein-4 in ACTH/PRL regulation by melatonin receptor activation.

研究代表者

山内 尚子(塚本尚子)(Yamauchi, Naoko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90601302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズム調節に重要なホルモンであるメラトニンは、種々のホルモン分泌にも影響するが、その機序は十分に知られていない。そこでマウスAtT20細胞を用い、メラトニンおよびメラトニン受容体agonistのACTH分泌への影響についてBMP-4に着目して検討したところ、MT1受容体の活性化がAktを介し、BMP-4と協調的に作動することが示された。

更に、概日リズムを司る時計遺伝子についても着目しマウスAtT20細胞とラットGH3細胞を用いて検討した。日内変動を伴うACTHやPRLの分泌に対して、メラトニンはBMP-4や時計遺伝子と協調し、下垂体前葉機能の調節に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of melatonin, a regulator of circadian rhythm, in ACTH production by corticotrope cells has not been elucidated. We investigated the effect of melatonin on ACTH production in relation to the biological activity BMP-4 using mouse corticotrope AtT20 cells. Melatonin and BMP-4 activities were mutually augmented, leading to fine-tuning of ACTH production by corticotrope cells. Next, we examined the correlation of mRNA levels of POMC and clock genes using mouse corticotrope AtT20 and rat lactosomatotrope GH3 cells. Collectively, the expressional correlation between POMC and Per and that between PRL and Clock were uncovered in the corticotrope and lactosomatotrope cells, respectively. Thus, the effects of melatonin and BMP-4 on the clock gene expression may imply the difference of stability of circadian fluctuations of ACTH and PRL secreted from the anterior pituitary.

研究分野：内分泌学

キーワード：メラトニン 下垂体 BMP 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

クッシング症候群は副腎皮質の主要グルココルチコイドであるコルチゾールの慢性分泌過剰による病態であり、中心性肥満や満月様顔貌・高血糖・高血圧など様々な症候を呈し、患者の予後に重大な影響を与える。なかでも副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 産生下垂体腺腫に由来するクッシング病に対しては第一選択は手術加療であるが、手術適応自体が困難な場合や術後再発例への薬物治療の有効率は低く、腫瘍細胞の増殖抑制と内分泌活性の抑制に非常に苦慮する。これらの薬剤によるホルモン分泌抑制機序の詳細が、未だ十分に解明されていないことも問題点として挙げられる。BMP-4 は、クッシング病患者の下垂体においては発現が減弱しているという報告も他施設よりなされており、ソマトスタチン (SS) アナログがコルチコトロープ細胞からの ACTH 分泌を抑制する機序について BMP の作用に着目して検討し、SS アナログの CRH 刺激による ACTH 分泌抑制機序において、内因性 BMP シグナルの活性化が関与することを明らかとした (Endocrinology 151:1129, 2010)。その後、BMP-4 が lactotrope 細胞においては SSTR 感受性の modulator として作用し、SS アナログの奏効性や耐性に影響する可能性を示した (MCE 332:163, 2011. MCE 344: 41, 2011. MCE 349:105, 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、これまで研究を進めてきた下垂体 BMP システムと、下垂体腺腫に感受性のあるソマトスタチン誘導体・ドパミン作動薬・メラトニンアゴニストの相互関係について、下垂体腫瘍の内分泌機能・増殖能を中心に探求した。下垂体腫瘍の発生・進展機序の解明を目指す基礎研究を行い、この結果を発展させ臨床応用できる薬剤開発を視野に入れ、有効な下垂体腫瘍の内科的治療法の進化を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

ACTH 産生能を有するマウスコルチコトロープ細胞 AtT20 細胞を用い、メラトニン (Mel) およびメラトニン受容体アゴニストラメルテオン (TAK) を用いた ACTH 分泌への影響・経時変化を検討した。[1] まずコルチコトロープ細胞において、CRH (100nM) 刺激下・非刺激下で Mel/TAK の濃度勾配処理下における培養液中の ACTH 分泌量を測定した。刺激後の培養においては、血清の影響を避けるために、無血清の低血清培地にて培養。培養は 24 時間継続し、その間の Mel/TAK による ACTH 産生に対する効果を検討した。

[2] 次に、realtime-PCR 法およびルシフェラーゼアッセイにより ACTH の前駆体である POMC 転写に対する Mel/TAK の影響を検討した。[3] コルチコトロープ細胞におけるメラトニ

ン受容体の発現と、BMP-4 添加による影響を PCR 法にて検討した。またメラトニン受容体アンタゴニストである luzindole を用いて、Mel/TAK によるコルチコトロープ細胞での ACTH 分泌に対する影響を確認した。[4] realtimePCR 法により BMP 受容体に対する Mel/TAK の影響を検討した。[5] 細胞内シグナルに対する Mel/TAK の影響をウェスタンブロットティングおよび、各種細胞内シグナル阻害剤を用いて検討した。

次に、PRL 産生能を有するラクトロープ細胞 GH3 細胞を用いて Mel および TAK を用い、BMP-4 活性に着目して PRL 分泌への影響を検討した。

[1] まずラクトロープ細胞において、FSK 刺激下・非刺激下で Mel/TAK の濃度勾配処理下における培養液中の PRL 分泌量を測定。刺激後の培養においては、血清の影響を避けるために、無血清の低血清培地にて培養した。培養は 24 時間継続し、その間の Mel/TAK による PRL 産生に対する効果を検討した。[2] realtimePCR 法を用いて、PRL mRNA 発現に対する Mel/TAK の影響を検討する。[3] ラクトロープ細胞におけるメラトニン受容体の発現と、BMP-4 添加による影響を PCR 法にて検討した。またメラトニン受容体アンタゴニストである luzindole を用いて、Mel/TAK によるラクトロープ細胞での ACTH 分泌に対する影響を確認した。[4] realtimePCR 法により BMP 受容体に対する Mel/TAK の影響を検討する。[5] 細胞内シグナルに対する Mel/TAK の影響をウェスタンブロットティングおよび、各種細胞内シグナル阻害剤を用いて検討する。

さらに、時計遺伝子の発現と下垂体ホルモン分泌制御について検討する。種々のほ乳類の時計遺伝子において、その発現のネガティブフィードバックループが提唱されている。動物では正の転写因子である CLOCK/BMAL 複合体が E-Box 配列に結合して、負の転写因子である Per, Cry の転写を活性化する。作られた PER/CRY 複合体が核に移行して、CLOCK/BMAL 複合体を抑制して Per, Cry の転写が減少する。概日リズムの形成のためには、これらコア時計遺伝子以外にも多くの遺伝子が関与しているが、下垂体ホルモン分泌過剰モデル細胞を用いて、これらの時計遺伝子の発現パターンを明らかにし、メラトニンの作用による変動について検討した。

4. 研究成果

マウス corticotrope 細胞 AtT20 には MT1R の発現を認め、Mel および TAK の存在下では CRH 誘導性の ACTH 分泌と POMC mRNA レベルを濃度反応性に抑制した。Mel/TAK による CRH 誘導性の POMC および cAMP 抑制効果は MT2R-antagonist に影響を受けず、BMP-4 は CRH による POMC 転写活性を抑制したが、Mel/TAK と BMP-4 の共存下では相加的に POMC を抑制した。Mel/TAK 刺激は、Akt/MAPK 経路の活性化を促し、BMP-4 の Smad1/5/8-Id1 転

写活性を増強した。シグナル阻害薬を用いた検討では、Akt-inhibitor 存在下で Mel/TAK の POMC 抑制作用が解除され、Mel/TAK による BMP-4 シグナルの増強が減弱した。Mel/TAK 投与にて BMP 受容体発現は増加し、BMP-4 は MT1R 発現を促した。よって corticotrope において MT1R 活性化は Akt を介して ACTH 分泌を抑制し、BMP-4 と相互協調的に ACTH 分泌を調節する新たな機序が示された。

時計遺伝子に関しては、まず、コルチコトロープ細胞 AtT20 における POMC と時計遺伝子の関連を検討したところ、POMC と Per の発現レベルに正の相関を認めた。siRNA で Per を抑制すると、CRH 刺激の有無に関わらず POMC 発現が抑制された。メラトニン処理下では、BMP-4 処理の場合と同様に、CRH 刺激の有無に関わらず POMC および Per の発現が抑制された。一方、ラクトソマトロープ細胞 GH3 では PRL と Bmal1, Clock の発現レベルに相関を認めたが、PRL 分泌を促す FSK の存在下でこの相関は減弱した。siRNA で Clock を抑制すると PRL 発現は減弱したが、Bmal1 の抑制下では PRL 発現に影響を与えなかった。FSK・BMP-4 およびメラトニン処理により Bmal1 の発現は増加したが、Clock 発現には変化を認めなかった。

以上より、コルチコトロープ ACTH 産生には Per が関与し、メラトニンや BMP-4 は Per と POMC の発現を共に抑制する。一方で、ラクトソマトロープ PRL 産生には Clock との関連が強く、これはメラトニンや BMP-4 の影響を受けない。このように、メラトニンが BMP-4 や時計遺伝子と協調し、日内変動を持つ ACTH や PRL の調節に寄与していることが示唆された。

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 7 件)

山内尚子、大塚文男、下垂体前葉機能制御におけるメラトニンの役割、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読なし、40 巻第 5 号(掲載予定) 2015

Naoko Tsukamoto-Yamauchi, Tomohiro Terasaka, Yasumasa Iwasaki, Fumio Otsuka. Interaction of pituitary hormones and expression of clock genes modulated by bone morphogenetic protein-4 and melatonin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有, 459, 2015, 172-177.

Takeshi Hosoya, Fumio Otsuka, Eri Nakamura, Tomohiro Terasaka, Kenichi Inagaki, Naoko Tsukamoto-Yamauchi, Takayuki Hara, Kishio Toma, Motoshi Komatsubara, Hirofumi Makino. Regulatory role of BMP-9 in steroidogenesis by rat ovarian granulosa cells. The Journal of

Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 査読有, 147, 2014, 85-91.

Eri Nakamura, Fumio Otsuka, Tomohiro Terasaka, Kenichi Inagaki, Takeshi Hosoya, Naoko Tsukamoto-Yamauchi, Kishio Toma, Hirofumi Makino. Melatonin counteracts BMP-6 regulation of steroidogenesis by rat granulosa cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 査読有, 143, 2014, 233-230.

Tomohiro Terasaka, Fumio Otsuka, Naoko Tsukamoto, Eri Nakamura, Kenichi Inagaki, Kishio Toma, Kanako Ogura-Ochi, Christine Glidewell-Kenney, Mark A. Lawson, Hirofumi Makino. Mutual interaction of kisspeptin, estrogen and bone morphogenetic protein-4 activity in GnRH regulation by GT1-7 cells. Molecular and Cellular Endocrinology. 査読有, 381, 2013, 8-14.

Naoko Tsukamoto, Fumio Otsuka, Kanako Ogura-Ochi, Kenichi Inagaki, Eri Nakamura, Kishio Toma, Tomohiro Terasaka, Yasumasa Iwasaki, Hirofumi Makino. Melatonin receptor activation suppresses adrenocorticotropin production via BMP-4 action by pituitary AtT20 cells. Molecular and Cellular Endocrinology. 査読有, 375, 2014, 1-9.

Yoshinori Matsumoto, Fumio Otsuka, Mariko Takano-Narazaki, Takayuki Katsuyama, Eri Nakamura, Naoko Tsukamoto, Kenichi Inagaki, Ken-ei Sada, Hirofumi Makino. Estrogen facilitates osteoblast differentiation by upregulating bone morphogenetic protein-4 signaling. 査読有, Molecular and Cellular Endocrinology, 78, 2013, 513-520.

[学会発表](計 6 件)

Naoko Tsukamoto-Yamauchi, Circadian Regulation of Pomc and Prolactin By Melatonin and BMP-4 in Anterior Pituitary Cells. ENDO2015, March 5 2015, San Diego Convention Center.

山内尚子、下垂体前葉におけるメラトニンの作用と BMP の役割、(シンポジウム) 第 41 回神経内分泌学会 2014 年 10 月 31 日、都道府県会館(東京)

山内尚子、コルチコトロープ細胞における ACTH と時計遺伝子の発現連関の検討、第 87 回内分泌学会総会、2014 年 4 月 24 日、福岡国際会議場

塚本尚子、肺嚢胞と多彩な腫瘍性病変を合併した先端巨大症の 1 例、第 23 回臨床内分泌 Update、2014 年 1 月 24 日、名古屋国際会議場

Naoko Tsukamoto. Inhibitory effects of melatonin on adrenocorticotropin production via BMP-4 activation by pituitary corticotrope cells. ENDO2013,

June 16 2013, San Francisco Moscone Center

塚本尚子、メラトニン受容体刺激による ACTH 分泌抑制とその機序の検討、第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日、仙台国際センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 尚子 (YAMAUCHI NAOKO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90601302

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし