

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650109

研究課題名(和文)下垂体隆起部分泌因子の脳内への作用経路の解明

研究課題名(英文)The analysis of action mechanisms of secreted factors produced in pars tuberalis

研究代表者

坂井 貴文(SAKAI, Takafumi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40235114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：大槽内へのhorseradish peroxidase (HRP)投与により、HRPの脳実質内への浸透度が、時間経過に従い有意に上昇した。HRPシグナルは隆起部周辺においてLobule 構造を取り囲むように見られ、第三脳室上衣細胞層及び松果体周辺でも認められた。一方、頸静脈内へのHRP投与では脳実質内でHRPのシグナルが検出されなかった。タンパク質量分析では、3 kDa-16 kDaの範囲において、隆起部ペプチド抽出液で観測された因子が脳脊髄液にも存在することを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, horseradish peroxidase (HRP) was administered into the cistern magna in rats, and HRP penetration in the brain parenchyma was measured. The results showed that the penetration area of HRP in the brain parenchyma increased with time, and the HRP signals were observed in areas surrounding the lobule in the pars tuberalis. In contrast, HRP signals were not observed when HRP was injected intravenously. We also analyzed peptide extracts from the pars tuberalis and the cerebrospinal fluid by mass spectrometry. We showed that several peptides from the pars tuberalis were also found in the cerebrospinal fluid.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体隆起部 脳脊髄液 脳実質

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の下垂体は、腺性下垂体と神経性下垂体に分けられ、腺性下垂体は、主部、中間部、そして隆起部から構成される。隆起部は、主部が口吻側へと伸び、漏斗と正中隆起を覆う薄い細胞層として存在する。下垂体主部の生理機能はよく知られているが、隆起部は正中隆起に隣接して存在することから摘除が困難であり、また主部に影響を与えずに薬物を投与できないなどの理由から実験内分泌学的な研究がほとんど進んでおらず、その生理的機能は明らかにされていない。研究代表者のこれまでの研究から、隆起部で産生されている甲状腺刺激ホルモン(TSH)は、下垂体前葉で産生される TSH とは異なり、メラトニンによって調節されることを明らかにしている。このことは、隆起部 TSH は下垂体前葉とは異なる生理作用を持つことを示唆している。さらに、近年、マイクロアレイ法を用いて隆起部における遺伝子発現を網羅的に検討し、隆起部で特徴的に発現する因子を同定し、ニューロメジン U (NMU) が隆起部で高発現していることを見出している。ラット脳内での NMU の発現解析を行ったところ、ラット脳内では NMU の発現は認められず、第三脳室上衣細胞に NMU 受容体の発現を確認した。以上の結果は、隆起部で作られた NMU が脳内に運ばれて作用することを強く示唆するものであるが、隆起部で産生された因子の作用経路は不明であった。

2. 研究の目的

研究代表者は、隆起部の生理的意義の理解のためには、隆起部で産生される因子の同定とともに、それら因子の作用経路を明らかにすることが突破口になると考えた。隆起部で産生される因子の受容体が脳内で発現していることや、これまでの研究代表者の研究から、隆起部から分泌された因子が正中隆起を介して脳に作用することは考えにくく、くも膜下腔へ分泌され、脳脊髄液を介して脳内に作用するという仮説を立てた。本研究ではその新たな仮説の検証を行った。

3. 研究の方法

(1) ラット大槽内及び頸静脈への HRP 投与実験

ラットの大槽もしくは頸静脈に翼状針を刺し、5% HRP を 100 µl 投与した。投与後 10 分、30 分及び 60 分に 1% グルタルアルデヒドで灌流固定をし、フリーフローティング法によって 30 µm 厚の前額断切片を作成後ジアミノベンジジン(DAB)と反応させ、発色を行った。写真撮影後、脳底から脳実質内への HRP の浸透度を ImageJ によって解析した。

(2) 隆起部と脳脊髄液のタンパク質質量分析

翼状針を用いてラット大槽より採取した脳脊髄液を 1 分間煮沸した。また、ラット脳を摘出して 20 µm の前額断切片をクライオスタットにて作成した後、LMD によって隆起部のみを採取した。脳脊髄液と隆起部は C18 カラムを用いてペプチド精製し、マトリック ス支援レーザー脱離イオン化法/飛行時間型質量分析 (MALDI/TOF-MS) によって解析した。

4. 研究成果

大槽内 HRP 投与実験では、HRP 投与後 10 分、30 分及び 60 分で HRP の脳実質内への浸透度が、時間経過に従い有意に上昇した。HRP シグナルは隆起部周辺において Lobule 構造を取り囲むように見られ、第三脳室上衣細胞層及び松果体周辺でも認められた。一方、頸静脈内への HRP 投与では脳実質内で HRP のシグナルが検出されなかったことから、HRP は末梢血液循環を介して脳実質内へ浸透しているのではないことが示された。

タンパク質質量分析では、3 kDa-16 kDa の範囲において、隆起部ペプチド抽出液で観測された因子が脳脊髄液にも存在することを確認した。

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6件)

1: Kuroda K, Hequing H, Mondal A, Yoshimura M, Ito K, Mikami T, Takemi S, Jogahara T, Sakata I, Sakai T. Ghrelin Is an Essential Factor for Motilin-Induced Gastric Contraction in *Suncus murinus*. *Endocrinology*. 2015 Dec;156(12):4437-47. doi: 10.1210/en.2015-1561. 査読有

2: Suzuki M, Sakata I, Sakai T, Tomioka H, Nishigaki K, Tramier M, Copepy-Moisan M. A high-throughput direct fluorescence resonance energy transfer-based assay for analyzing apoptotic proteases using flow cytometry and fluorescence lifetime measurements. *Anal Biochem*. 2015 Dec 15;491:10-7. doi:10.1016/j.ab.2015.08.022. 査読有

3: Goswami C, Shimada Y, Yoshimura M, Mondal A, Oda S, Tanaka T, Sakai T, Sakata I. Motilin Stimulates Gastric Acid Secretion in Coordination with Ghrelin in *Suncus murinus*. *PLoS One*. 2015 Jun 26;10(6):e0131554. doi:10.1371/journal.pone.0131554. 査読有

4: Goswami C, Tanaka T, Jogahara T, Sakai T, Sakata I. Motilin stimulates pepsinogen secretion in *Suncus murinus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jul;3:462(3):263-8. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.129. 査読有

5: Hoshino S, Kurotani R, Miyano Y, Sakahara S, Koike K, Maruyama M, Ishikawa F, Sakata I, Abe H, Sakai T. Macrophage colony-stimulating factor induces prolactin expression in rat pituitary gland. *Zoolog Sci*. 2014 Jun;31(6):390-7. doi: 10.2108/zs130226. 査読有

6: Miyano Y, Tahara S, Sakata I, Sakai T, Abe H, Kimura S, Kurotani R. Regulation of LH/FSH expression by secretoglobin 3A2 in the mouse pituitary gland. *Cell Tissue Res*. 2014 Apr;356(1):253-60. doi: 10.1007/s00441-014-1794-z. 査読有

〔学会発表〕(計 1 1 件)

(1) 井田可菜美、近藤大介、坂田一郎、坂井貴文: スンクスモチリンモノクローナル抗体の作製とスンクスモチリン測定法の検討. 日本動物学会関東支部 第 68 回大会、神奈川県横浜市) 2016 年 3 月 12 日

(2) 坂井田初季、相澤清香、坂井貴文、坂田一郎: ラット下垂体隆起部から産生される因子の作用経路の検討. 日本動物学会関東支部 第 68 回大会、神奈川県横浜市) 2016 年 3 月 12 日

(3) 染谷浩平、相澤清香、坂田一郎、坂井貴文: スンクス下垂体前葉におけるホルモン産生細胞の分布の検討. 日本動物学会関東支部 第 68 回大会、神奈川県横浜市) 2016 年 3 月 12 日

(4) 竹見祥大、坂田一郎、塚原伸治、矢橋里和、勝浦五郎、岩重記洋、阿久根淳、乾 明夫、坂井貴文: Common marmoset (*Callithrix jacchus*)における ghrelin の同定と消化管での ghrelin 産生細胞の局在. 日本動物学会関東支部 第 68 回大会、神奈川県横浜市) 2016 年 3 月 12 日

(5) Ikenoya C, Gong Z, Chacrabati R, Kondo D, Sakai T and Sakata I: Origin of medium-chain fatty acids that modify ghrelin in mice. 第 40 回日本比較内分泌学会大会、広島市文化交流会館(広島県広島市) 2015 年 12 月 12 日

(6) Apu A, Rakhi C, Mondai A, Kitazawa T, Kaiya H, Sakai T and Sakata I: Motilin-induced contraction occurs via direct action on the smooth muscles of the quail gastrointestinal tract. 第 40 回 日本比較内分泌学会大会、広島市文化交流会館(広島県広島市) 2015 年 12 月 12 日

(7) Takemi S, Sakata I and Sakai T: The Relationship between Gastric Motility and Vomiting in *Suncus murinus* (House Musk Shrew). 第 40 回 日本比較内分泌学会大会、広島市文化交流会館(広島県広島市) 2015 年 12 月 12 日

(8) Ito K, Mikami T, Mondal A, Sakata I and Sakai T: Effect of Motilin and Ghrelin on Postprandial Gastric Contractions in *Suncus murinus*. 第 40 回 日本比較内分泌学会大会、広島

市文化交流会館(広島県広島市) 2015
年 12 月 12 日

- (9) Dudani A, Aizawa S, Zhi G, Ikenoya C, Mondal A, Jogahara T, Sakata I and Sakai T: Synergistic action of motilin and ghrelin facilitates different responses in various parts of the Suncus stomach in vitro. 第 40 回 日本比較内分泌学会大会、広島市文化交流会館(広島県広島市) 2015 年 12 月 12 日

- (10) Chacrabati R, Gong Z, Ikenoya C, Kondo D, Goswami C, Sakai T and Sakata I: A novel role of G protein coupled receptor, family C, group5, member B (GPCR5B) in the regulation of ghrelin signaling in vitro and in vivo. 第 40 回 日本比較内分泌学会大会、広島市文化交流会館(広島県広島市) 2015 年 12 月 12 日

- (11) 池之谷知佳、Gong Zhi、Rakhi Chacrabati、近藤大介、坂井貴文、坂田一郎: マウスを用いたグレリンを修飾する中鎖脂肪酸の起源に関する研究. 日本動物学会 第 86 回新潟大会、新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市) 2015 年 9 月 17 日

〔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〕
ホームページ等

SUCRA :
<http://sucra-rd.saitama-u.ac.jp/search/profile.do?lng=ja&id=uaLmupym>
埼玉大学生体制御学コース :
<http://seitai.saitama-u.ac.jp/>
埼玉大学細胞制御学研究室 :
<http://cell.seitai.saitama-u.ac.jp/>
埼玉大学脳科学融合研究センター :
<http://subsi.saitama-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 貴文 (SAKAI, Takafumi)
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号 : 4 0 2 3 5 1 1 4

(2) 研究分担者

坂田 一郎 (SAKATA, Ichiro)
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号 : 8 0 6 1 0 8 3 1

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :