HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞におけるニューロメジンBの発現と細胞増殖における影響の検討
Author(s)	亀田, 啓
Description	配架番号：2080
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11208号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11208
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56646
Type	doctoral thesis
File Information	Hiraku_Kameda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞におけるニューロメジン B の発現と細胞増殖における影響の検討

（Expression and proliferative activity of neuromedin B in pituitary adrenocorticotropin-producing cells）

2014 年 3 月

北　海　道　大　学
亀　田　啓

目　次

発表論文目録および学会発表目録.....1 頁

1. 緒言 .....2-3 頁

2. 略語表.....4 頁

3. 第一部.....5-25 頁

下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞におけるニューロメジン B の発現とその調節機構

3.1 緒言 .....6 頁

3.2 実験方法.....7-11 頁

3.2.1 実験に用いた動物 .....7 頁

3.2.2 実験に用いた試薬と入手先 .....7 頁

3.2.3 下垂体摘出法.....7 頁

3.2.4 下垂体の DNA マイクロアレイ法による解析.....8 頁

3.2.5 全身臓器のリアルタイム PCR 法による解析 .....8-9 頁

3.2.6 下垂体の免疫染色.....9 頁

3.2.7 皮下ペレット投与によるニューロメジン B 発現の検討.....10 頁

3.2.8 下垂体単離細胞を用いた薬剤投与実験.....10-11 頁

3.2.9 統計方法について.....11 頁

3.3 実験結果.....12-23 頁

3.3.1 下垂体の DNA マイクロアレイ法による解析.....12-13 頁

3.3.2 全身臓器のリアルタイム PCR 法による解析.....14-15 頁

3.3.3 下垂体の免疫染色.....16-17 頁

3.3.4 皮下ペレット投与によるニューロメジン B 発現の検討.....18-20 頁

3.3.5 下垂体単離細胞を用いた薬剤投与実験.....21-23 頁

3.4 考察.....24-25 頁

4. 第二部.....26-50 頁

ニューロメジン B が下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の増殖と機能に与える影響の検討

4.1 緒言.....27 頁

4.2 実験方法.....28-33 頁

4.2.1 実験に用いた動物.....28 頁

4.2.2 実験に用いた試薬と入手先.....28 頁

4.2.3 AtT-20/D16v-F2 の免疫染色.....28-29 頁

4.2.4 AtT-20/D16v-F2 におけるニューロメジン B 発現調節の検討.....29 頁

4.2.5 AtT-20/D16v-F2 へのニューロメジン B 受容体拮抗薬の投与 29-30 頁

4.2.6 AtT-20/D16v-F2 へのニューロメジン B siRNA の投与実験.....30 頁

4.2.7 実験に用いたヒト下垂体検体.....31 頁

4.2.8 ヒト下垂体腺腫の免疫染色 .....31-32 頁

4.2.9 ヒト下垂体腺腫の遺伝子発現の検討 .....32 頁

4.2.10 統計方法について.....33 頁

4.3 実験結果.....34-49 頁

4.3.1 AtT-20/D16v-F2 の免疫染色 .....34-35 頁

4.3.2 AtT-20/D16v-F2 におけるニューロメジン B 発現調節の検討 36-38 頁

4.3.3 AtT-20/D16v-F2 へのニューロメジン B 受容体拮抗薬の投与 39-41 頁

4.3.4 AtT-20/D16v-F2 へのニューロメジン B siRNA の投与実験...42-44 頁

4.3.5 ヒト下垂体腺腫の免疫染色 .....45-47 頁

4.3.6 ヒト下垂体腺腫の遺伝子発現の検討 .....48-49 頁

4.4 考察.....50 頁

5. 総括および結論. .....51 頁

6. 謝辞 .....52 頁

7. 引用文献 .....53-55 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部成果は以下の雑誌に掲載予定である。
1. 亀田 啓、永井 聡、中垣 整、近藤琢磨、三好秀明、渥美達也、
千田 大、岩倉洋一郎、清水 力　メラノコルチン２受容体欠損マウスにおける下垂体遺伝子発現の検討　ACTH related peptides vol. 24, 2013

本研究の一部は以下の雑誌に投稿中である。
1. Endocrinology

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 亀田　啓、中垣　整、永井　聡、近藤　琢磨、三好　秀明、渥美　達也、千田　大、岩倉　洋一郎、清水　力：メラノコルチン 2 受容体欠損マウスにおける下垂体遺伝子発現の検討　第 86 回日本内分泌学会学術総会　2013 年 4 月 25-27 日　仙台

2. Hiraku Kameda, Osamu Nakagaki, So Nagai, Takuma Kondo, Tatsuya Atsumi, Dai Chida, Yoichiro Iwakura, Chikara Shimizu：Analysis of pituitary gene expression of melanocortin 2 receptor deficient mice　The Endocrine Society's 95th Annual Meeting　June 15-18, 2013 San Francisco

1. 緒　言

視床下部下垂体副腎（Hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA）軸は神経内分泌系の中心をなしており、生体におけるストレスへの反応を制御し、また代謝や消化、情動行動など生体における重要な機能を調節している。

HPA 軸の主な因子としては視床下部からの corticotropin releasing hormone（CRH）、下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、副腎からの glucocorticoid（GC）が重要である。GC はヒトにおいてはコルチゾール、マウスにおいてはコルチコステロンが最終産物として主要な働きをなしている。

ストレスに対してはまず視床下部からの CRH の分泌が亢進し、CRH が下垂体前葉の ACTH 産生細胞に働きかけて ACTH の分泌を促進する。ACTH は副腎に作用して GC の産生を増加させ、最終的に GC が筋肉や脂肪組織、肝臓など全身の臓器において作用しストレスに対する応答反応を制御する。

ACTH は前述のように副腎におけるステロイド合成・分泌を促進するが、その受容体である melanocortin 2 receptor (MC2R)は副腎以外の臓器においても発現が報告されている。MC2R の変異は ACTH 不応症の原因となり、生下時からの副腎皮質機能不全を呈する。副腎から分泌されるグルココルチコイドの諸臓器における作用については未解明な点が多く、副腎不全の状態における副腎以外の臓器における変化についても同様に不明な点が多く残されている。当科ではマウス MC2R のクローニングおよび構造の解析を行い、ノックアウトマウスを共同で作成して ACTH およびグルココルチコイドの機能について検討をこれまで行ってきた[1]。

MC2R ノックアウトマウスは生下時から慢性的な副腎不全を呈し、絶食負荷により容易に低血糖が引き起こされる。副腎は特に束状層の著明な萎縮を呈し、血漿コルチコステロンは低値を示すが､代償的に血漿 ACTH は著明高値となる。MC2R ノックアウトマウスを用いたこれまでの研究としては副腎不全モデルとして GC が胎児期の肺形成に与える影響の検討に用いられ、また慢性的な視床下部 CRH の発現増加をきたすことからストレス状態が性周期や妊孕性に与える影響についての検討の報告がなされている[2]。

MC2R ノックアウトマウスは前述のように慢性的な副腎不全を呈することから下垂体における ACTH の産生が亢進し、ACTH 産生細胞の過形成を呈している。また同様に ACTH 産生細胞の機能も亢進していることが考えられる。

ヒトにおける下垂体ACTH産生細胞が腺腫化しACTHの自律性産生を呈した状態は ACTH 依存性 Cushing 症候群、すなわち Cushing 病と呼ばれる。ACTH の過剰産生によって副腎からのコルチゾール産生が亢進し満月様顔貌、中心性

肥満、四肢の筋萎縮、腹部の赤色線条などの身体・体組成的変化や高血圧、糖尿病、脂質異常、脂肪肝、骨粗鬆症など代謝障害、気分障害などの精神症状、免疫不全を呈し、心血管、脳血管のイベントリスク増加や重症感染症の増加から生命予後は不良である。

Cushing 病の治療として経蝶形骨洞的下垂体腺腫摘除術が施行されるが、特に 1cm を超える macroadenoma では手術による寛解率が低いことが報告されている[3]。また、薬物治療で効果的なものは現時点で存在せず、手術により寛解に至らない症例の治療は難渋することが多く、有効な薬物治療の開発が望まれている。

今回我々は慢性副腎不全状態にあり ACTH 産生細胞の過形成・機能亢進を呈する MC2R ノックアウトマウスの下垂体における遺伝子発現を検討し ACTH 産生細胞の増殖や機能亢進に関わる因子を同定し、Cushing 病の治療ターゲットとなりうるかどうかを検討することを目的として実験を行った。

我々は第一部で示した「下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞におけるニューロメジン B の発現とその調節機構」の研究の結果、MC2R ノックアウトマウスの下垂体の検討から ACTH 産生細胞における neuromedin B（NMB）の発現を同定した。続いて NMB は CRH の投与により発現が増加し、GC の投与により発現が減少するという ACTH と同様に HPA 軸の関連因子によって調節されることを証明した。

第二部で示した「ニューロメジン B が下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の増殖と機能に与える影響の検討」の研究の結果、我々は NMB が下垂体 ACTH 産生細胞の腫瘍株系でもその受容体と共に発現しており、受容体拮抗薬や NMB siRNA の投与によって腫瘍株細胞の増殖は抑制されることを示した。またヒトの ACTH 産生腺腫でも NMB ならびにその受容体の発現が亢進していることを示した。

本研究により、我々は初めて NMB が下垂体 ACTH 産生細胞に、特に副腎不全状態や腫瘍細胞など増殖・機能が活性化した状態で発現することを見出し、ACTH 産生腺腫による Cushing 病の治療ターゲットとなり得ることを示した。今後研究を進め、Cushing 病の治療法の進歩に貢献できることを望む。

2. 略語表

ANOVA	analysis of variance
BSA	bovine serum albumin
CRH	corticotropin releasing hormone
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
DEX	dexamethasone
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
GC	glucocorticoid
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal
HSH	Hank's solution with Hepes
MC2R	melanocortin 2 receptor
NMB	neuromedin B
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
POMC	proopiomelanocortin
siRNA	small interfering RNA
WT	wild type

3. 第　一　部

下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞における
ニューロメジン B の発現とその調節機構

3.1 緒　言

前述の如く下垂体ACTH産生腺腫によるCushing病は内科的治療の選択枝に乏しいことから難治性となることが多い。この研究において我々は慢性副腎不全状態にありACTH産生細胞の過形成･機能亢進を呈するMC2Rノックアウトマウスの下垂体における遺伝子発現を検討しACTH産生細胞の増殖や機能亢進に関わる因子を同定し、Cushing 病の治療ターゲットとなりうるかどうかを検討することを目的として実験を行った。

我々は本研究においてまずMC2Rノックアウトマウスの下垂体と野生型(WT)マウスの下垂体の遺伝子発現をDNAマイクロアレイ解析を行い比較し、NMBの発現が MC2R ノックアウトマウスの下垂体で増加していることを見出した。我々は引き続きリアルタイムPCR法により遺伝子発現の正確な評価と免疫染色によりNMBの局在を行い、MC2Rノックアウトマウスの下垂体ACTH産生細胞においてNMBの発現を認めた。

続いてNMBの発現の調節因子を検討するためMC2Rノックアウトマウスならびに WT マウスにグルココルチコイドの補充量での投与を行ったところ、下垂体における NMB の発現は低下した。さらに単離下垂体細胞を用いて NMB 発現を精査したところCRHの投与によりその遺伝子発現は増加し、GCの投与によって減少した。

本研究において我々はMC2Rノックアウトマウスの下垂体の検討からACTH産生細胞におけるNMBの発現を同定した。続いてNMBはCRHの投与により発現が増加し、GCの投与により発現が減少するというACTHと同様にHPA軸の関連因子によって調節されることを証明した。本研究ではACTH産生細胞に由来するNMBのACTH産生細胞あるいは周囲・遠隔臓器における作用については検討していないが、ACTH産生腺腫における発現とさらにCushing病との関連については検討の意義があるものと考えられる。ACTH 産生細胞におけるNMBの発現の意義、またACTH産生腺腫における発現とその作用についての検討は第二部で記述する。

3.2　実験方法

3.2.1　実験に用いた動物

下垂体単離細胞実験以外の全ての実験において C57BL/6J と Balb/c の混合バックグラウンドを有する MC2R 遺伝子のホモ欠損マウス（MC2R-/-）[2] ならびにその littermate である WT マウスを用いた。下垂体単離細胞では 8 週齢の C57BL/6J マウスを用い、それ以外の実験では 20 週齢以上のマウスを用いた。全ての実験において雄のマウスを用いた。全てのマウスは明期 12 時間、暗期 12 時間の条件下で飼育され、飼料ならびに水は自由に摂取できるものとした。全ての動物を用いた実験は北海道大学の動物実験ならびに遺伝子組み換え実験のガイドラインに沿って施行した。

3.2.2　実験に用いた試薬と入手先

コルチコステロン徐放性ペレット（10mg/3 週間）ならびにプラセボペレットは Innovative Research of America 社から購入した。CRH ならびにデキサメサゾン（DEX）はそれぞれペプチド研究所、和光純薬株式会社から購入した。下垂体細胞単離に用いた全ての試薬は Sigma-Aldrich 社から購入した。免疫染色ならびにリアルタイム PCR に用いた試薬についてはそれぞれの項で記述する。

3.2.3　下垂体摘出法

全てのマウスは午前 8:30 から午後 0:30 までの間にイソフルランを用いた吸入麻酔下で速やかに断頭法を行い苦痛を最低限にして屠殺した。屠殺後速やかに開頭し下垂体を摘出し 1.5mL のマイクロチューブに入れて液体窒素で凍結した。凍結した下垂体は RNA 抽出を行うまで-80℃の冷凍庫で保管した。

3.2.4　下垂体の DNA マイクロアレイ法による解析

総 RNA はマウス下垂体から RNeasy mini kit（QIAGEN 社）を用いて抽出した。3.2.4 の項で記載した凍結下垂体の入ったマイクロチューブに Buffer RLT を 350μL 入れ、ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジナイズ後のサンプルを QIA shredder (QIAGEN 社)のスピンカラムに入れ、2 分間、最高速度で遠心した。遠心時の温度は以下全て室温で行った。濾過液に RNAase free water で希釈された 70%エタノールを 350μL 加え混合した後 RNeasy 付属のカラムに移し 15 秒間最高速度で遠心した。濾過液は破棄し、カラムに RNeasy 付属 Buffer RW1 を 700μL 加え 15 秒間最高速度で遠心した。濾過液は破棄し、カラムに RNeasy 付属の Buffer RPE を 500μL 加え、最高速度で 15 秒遠心した。濾過液を破棄し、Buffer RPE を 500μL 加え、最高速度で 2 分間遠心した。回収用チューブを新しいものに変え、液を加えずに最高速度で 1 分間遠心した。RNase free water を 30μL 加え最高速度で 1 分間遠心し、RNA が含まれる濾過液を回収した。得られた RNA2μg と SuperScript VILO Master Mix (Life Technologies 社)4μL を用い、逆転写 PCR を GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社)を使用して 25℃10 分間、42℃60 分間、85℃5 分間の条件で行い cDNA を得た。cDNA を GeneChip Mouse Gene 1.0 ST array (Affimetrix 社)にハイブリダイズし得られた結果を GeneChip Command Console Software (Affimetrix 社)を用いて解析した。遺伝子発現のレベルは MC2R-/-マウスの結果を WT マウスの結果で除して求めた。

3.2.5　全身臓器のリアルタイム PCR 法による解析

動物は 3.2.3 で述べた方法で屠殺して各臓器（視床下部、下垂体、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、大腸、筋肉、精巣）を採取した。総 RNA ならびに cDNA は 3.2.4 で述べた方法と同様に得た。cDNA と NMB、プロオピオメラノコルチン(POMC)、CRH、β-アクチンの各遺伝子特異的プライマーを fast SYBR Green PCR Master Mix と混合し、ABI 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems 社)を用いて遺伝子発現を調べた。各遺伝子特異的プライマーの配列は既報を参考とし、配列は下記に示した通りである [4-7]。NMB : forward, CGGTCACTTCATGGGCAAG; reverse, GAGCTTTCTTTCGCAGGAGGA; POMC : forward CCTTGGTTTGGGTGGAAGATG; reverse, GCGTTCTTGATGATGGCGTTC;

CRH : forward, CCGGGCAGAGCAGTTAGC; reverse, CAACATTTCATTTCCCGATAATCTC; ß-actin : forward, CAACGAGCGGTTCCGAT; reverse, GCCACAGGATTCCATACCCA。各遺伝子発現はβ-アクチンの発現量を用いて標準化し、ΔΔCt 法を用いてコントロールとした遺伝子発現との相対的発現量を求めた[8]。

3.2.6 下垂体の免疫染色

MC2R-/-マウスと WT マウスをイソフルランを用いた吸入麻酔を行った後ペントバルビタールを皮下注射して鎮静した後開胸し、生理食塩水を心臓から灌流して脱血した後 4%パラホルムアルデヒドで灌流し全身臓器を固定し採取した。臓器は固定後 24 時間 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定を行い、パラフィンに包埋して 5μm の厚さで薄切しプレパラート上に固定した。固定した切片はキシレンに浸漬しパラフィンを除き、100%エタノール、90%エタノール、70%エタノールに連続して浸漬して水和した後 Phosphate buffered saline（PBS）で洗浄した。5%のウシ血清アルブミン（BSA）と 0.1%の tween-20 を含む PBS を加え 30 分室温で静置した後 5%BSA と 0.1%tween-20 を含む PBS に一次抗体を加えた液を加え 1 時間静置した。一次抗体としてウサギポリクローナル抗 NMB 抗体（Sigma-Aldrich 社）を 100 倍、マウスモノクローナル抗 ACTH 抗体（Santa Cruz Biotechnology 社）を 200 倍の濃度でそれぞれ用いた。PBS で 3 回洗浄を行った後、二次抗体として 5%BSA と 0.1%tween-20 を含む PBS に Alexa Fluor 594-conjugated 抗マウス IgG 抗体（Molecular Probes 社）と Alexa Fluor 488-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体（Molecular Probes 社）を 200 倍の濃度で混合したものを加え 30 分遮光下で静置した。以後の過程は可能な限り全て遮光下で行った。核染色として 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI)を使用し、固定用の VECTASHIELD HardSet mounting medium with DAPI (Vector Laboratories 社)を滴下しスライドグラスを載せて観察した。観察には蛍光顕微鏡 BZ-900（キーエンス社）を用いた。

3.2.7　皮下ペレット投与によるニューロメジン B 発現の検討

3.2.2 で述べたコルチコステロン 10mg を 3 週間で徐放するペレットならびにプラセボペレットをイソフルランを用いて吸入麻酔した MC2R-/-マウスならびに WT マウスの頚部皮下に投与した。投与 3 週後に吸入麻酔下に屠殺し、心臓より採血を行い血漿を採取した。血漿 ACTH は electrochemiluminescence immunoassay (Roche Diagnostics 社)を用いて測定した。下垂体遺伝子発現は 3.2.5 で述べたリアルタイム PCR 法で、蛋白発現は 3.2.6 で述べた免疫染色法で評価した。

3.2.8　下垂体単離細胞を用いた薬剤投与実験

8 週齢の C57BL/6J マウスから下垂体前葉細胞を採取、単離し CRH ならびに DEX の投与による遺伝子・蛋白発現の変化を検討した。方法は大水・高橋らの方法に若干の修飾を加えたものである[9]。イソフルランを用いた吸入麻酔下にマウスを断頭し、下垂体を採取した。採取した下垂体は Hank's Solution に 20mM の Hepes 緩衝液と 0.3%の BSA を加えたもの（HSH-BSA）内で前葉以外を除去し、さらにメスを用いて細かい切片に細切した。マウス 20 匹分の下垂体から前葉細胞を採取し、HSH-BSA で 3 回洗浄した後 Hank's Solution に 0.5%トリプシンを加えた溶液内で 37℃15 分間培養し、続いて HSH-BSA に DNase を加えた液で 37℃1 分間培養し、次に 1% soy bean trypsin inihibitor を加えた溶液内で 37℃10 分間培養した。続いて下垂体細胞を Ca2+と Mg2+を除いた HSH-BSA で 3 回洗浄した後 2mM の EDTA を加えた Hank's Solution で 37℃5 分、1mM の EDTA を加えた Hank's Solution で 37℃15 分培養した。Ca^{2+}とMg^{2+}を除いた HSH-BSA で 3 回洗浄した後慎重にピペッティングを行い細胞を分離したのち室温、5 分、1500g で遠心を行い細胞を回収し、cytometer を用いて細胞数を計測した。細胞の生存率は 90%以上であった。単離された下垂体細胞は poly-D-lysine でコートされた 24 ウェルの細胞培養プレート（Becton Dickinson 社）5.0×10^5 個の濃度で各ウェルに播種した。細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) と Ham's F12 medium を 1:1 で混合し（DMEM/F12)、10%の fetal calf serum を加えた培養液中で 37℃、5%の CO2 を含む培養器内で培養した。2 日間培養後、培養液は DMEM/F12 にトリヨード

サイロニン 400ng/L、トランスフェリン 10mg/L、グルカゴン 10ng/mL、副甲状腺ホルモン 200ng/L、セレン 5μg/L を含む液に変更し、それぞれ溶媒ならびに CRH と DEX を 10^{-9}M～10^{-7}M の濃度で加え、2 日後に RNA を 3.3.5 で述べたものと同様のリアルタイム PCR 法で遺伝子発現の解析を行った。また単離下垂体細胞は poly-D-lysine でコートされた 35mm の glass bottom dish（Becton Dickinson 社）にも同様の濃度で播種し、3.2.6 で述べた方法と同様の方法で免疫染色を行い蛋白発現を評価した。

3.2.9　統計方法について

図表のデータは全て平均値±標準誤差で表記した。二群間の平均の検定には対応のない Student の t 検定を用いた。他群間の平均の検定には one-way analysis of variance（ANOVA）を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Tukey-Kramer 法を用いて各群間を比較した。p 値が 0.05 未満の場合に有意差のある差を認めると定義した。それぞれの実験においては 3 回の独立した実験を行いデータを得て統計的に解析した。統計解析においてはソフトウェアとして IBM SPSS statistics バージョン 21（IBM 社）を用いた。

3.3　実験結果

3.3.1　下垂体の DNA マイクロアレイ法による解析

MC2R-/-マウスならびに WT マウスの下垂体から 28,853 の遺伝子について結果が得られた。発現を比較したところ MC2R-/-マウスにおいて WT マウスと比べて 3 倍以上の発現を示す遺伝子は 13 個あった（表 1）。NMB が最も発現比が高かった。NMB と同じくボンベシン様ペプチドファミリーに属する遺伝子発現も増加していた。その他に発現が増加していた遺伝子は機能別に内分泌機能（tyrosine hydroxylase, myotilin, chemokine C-C motif ligand 3）、陽イオン輸送（solute carrier family 6, member 14）、抗原結合（immunoglobulin kappa chain variable 1, immunoglobulin joining chain）、ガングリオシド合成（ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5）、アラキドン酸合成経路（arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type）、筋肉におけるオルタナティブスプライシング（muscleblind-like 3）、機能不明（leucine zipper protein 2）であった。

表 1　DNA マイクロアレイ解析

MC2R-/-マウスの下垂体で WT マウスと比較して発現が 3 倍以上増加していた遺伝子を示す。

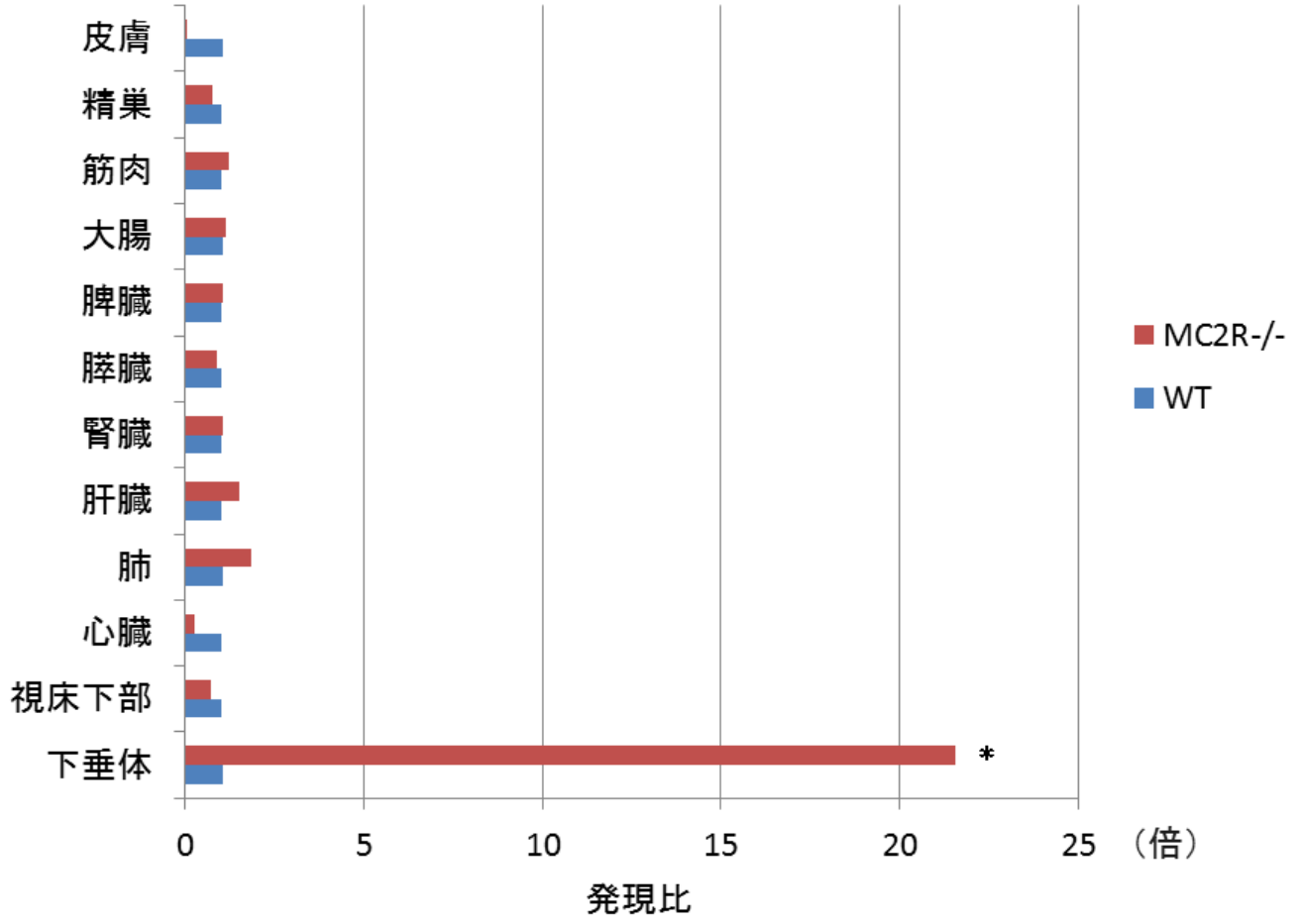
遺伝子シンボル	遺伝子名	発現比（vs WT）
Nmb	neuromedin B	12.8
Ly6g6c	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C	12.5
St8sia5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5	5.5
Slc6a14	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	4.9
Igk-V1	immunoglobulin kappa chain variable 1 (V1)	4.4
Grp	gastrin releasing peptide	4.4
Th	tyrosine hydroxylase	4.0
Alox12b	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	4.0
Mbnl3	muscleblind-like 3 (Drosophila)	3.8
Igj	immunoglobulin joining chain	3.6

3.3.2　全身臓器のリアルタイム PCR 法による解析

NMB の発現は MC2R-/-マウスの下垂体において WT マウスの下垂体と比較して 20 倍以上の増加を認めた。視床下部、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、大腸、筋肉、精巣では MC2R-/-マウスと WT マウスで有意な発現の差を認めなかった。

図１　各臓器における NMB の発現量の比較

データは平均±標準誤差で示した。n=6-8、*：p<0.05

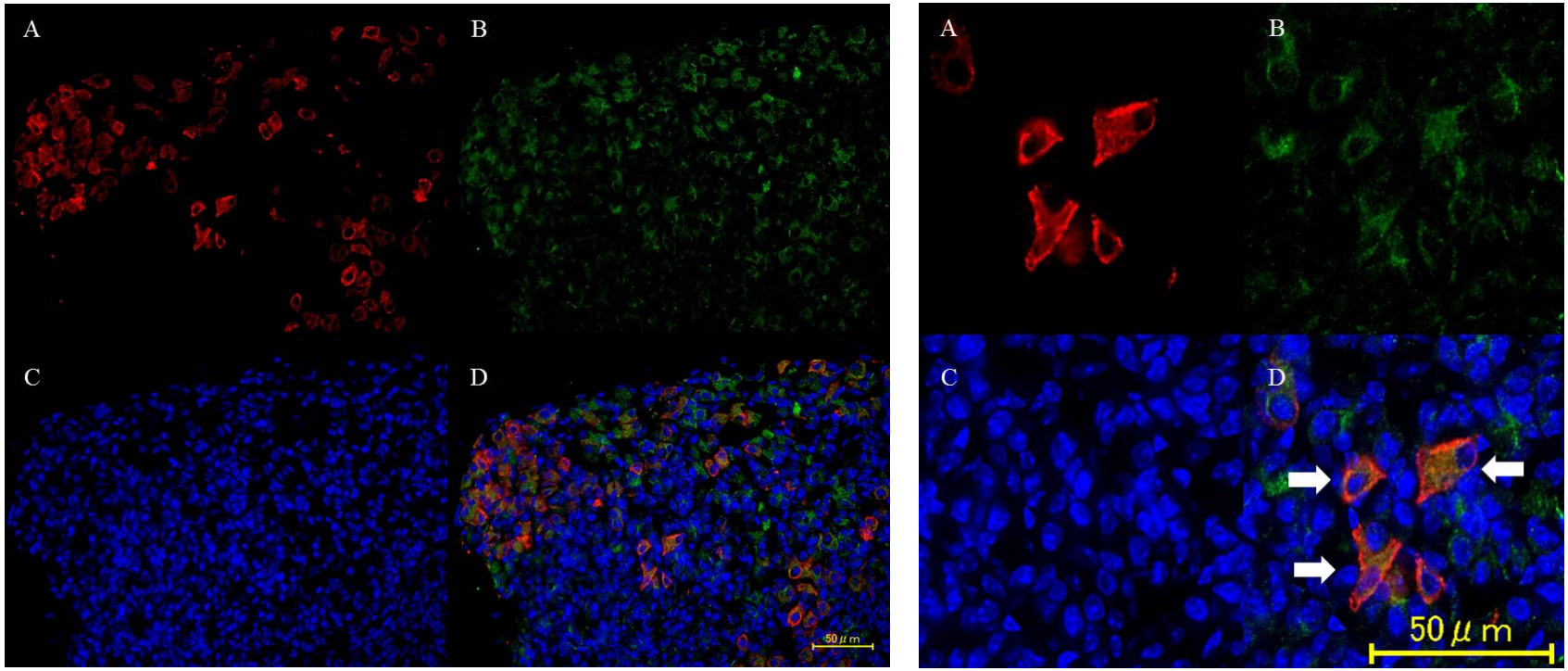


3.3.3　下垂体の免疫染色

MC2R-/-マウスの下垂体前葉の免疫染色において ACTH 陽性細胞と NMB 陽性細胞がそれぞれ認められた。両者の染色像を合成した画像で ACTH と NMB が両者とも陽性となる細胞が存在していることが認められた（図 2)。WT マウスの下垂体前葉の免疫染色では NMB の発現は弱く、ACTH と共に陽性となる細胞は認められなかった。

図 2　MC2R-/-マウス下垂体前葉の免疫染色像

左上・赤：ACTH、右上・緑：NMB、左下・青：核染色（DAPI）、右下：merge 画像
左：弱拡像　右：強拡像　白矢印：ACTH・NMB を共に発現する細胞



3.3.4　皮下ペレット投与によるニューロメジン B 発現の検討

ペレット投与 3 週後の血漿 ACTH はプラセボペレットを投与された MC2R-/-マウスで著明に高値を示した。コルチコステロンペレットを投与された MC2R-/-マウスでは抑制され WT マウスと同程度まで低下した。WT マウスではプラセボペレットとコルチコステロンペレットを投与された群で有意な変化を認めなかった（図 3-A)。下垂体 NMB の遺伝子発現はプラセボペレットを投与された MC2R-/-マウスで著明に高値を示し、コルチコステロンペレットを投与された MC2R-/-マウスでは抑制され WT マウスと同程度まで低下した（図 3-B)。下垂体 NMB の遺伝子発現は WT マウスではプラセボペレットとコルチコステロンペレットを投与された群で有意な変化を認めなかった。下垂体 POMC と視床下部 CRH の遺伝子発現も同様にプラセボペレットを投与された MC2R-/-マウスで著明に高値を示し、コルチコステロンペレットを投与された MC2R-/-マウスでは抑制され WT マウスと同程度まで低下した。下垂体 POMC ならびに視床下部 CRH の遺伝子発現は WT マウスではプラセボペレットとコルチコステロンペレットを投与された群で有意な変化を認めなかった（図 3-B)。下垂体の免疫染色では MC2R-/-マウス下垂体細胞において ACTH 陽性細胞、NMB 陽性細胞、ACTH・NMB 共陽性細胞の占める割合はプラセボペレット投与と比較してコルチコステロンペレット投与で有意に減少した（図 4)。

図 3-A　ペレット投与後血漿 ACTH 濃度

データは平均±標準誤差で示した。n=5-6、*：p<0.05

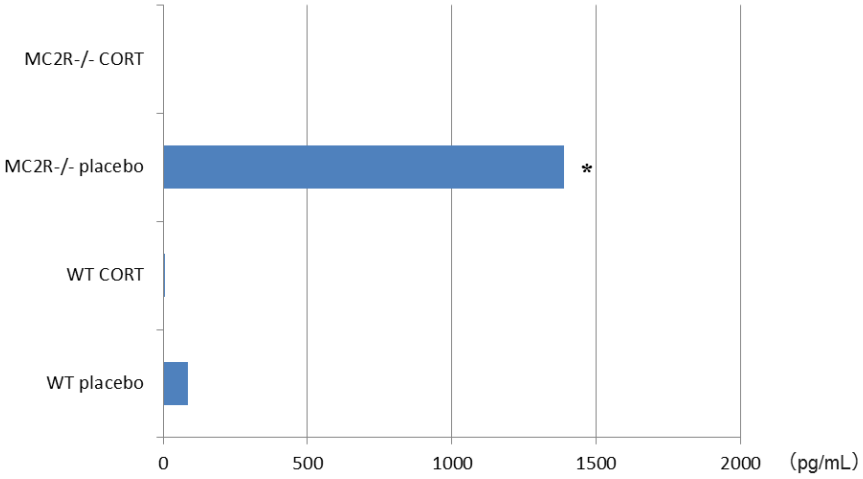


図 3-B　ペレット投与後下垂体・視床下部の遺伝子発現

データは平均±標準誤差で示した。n=5-6、*：p<0.05

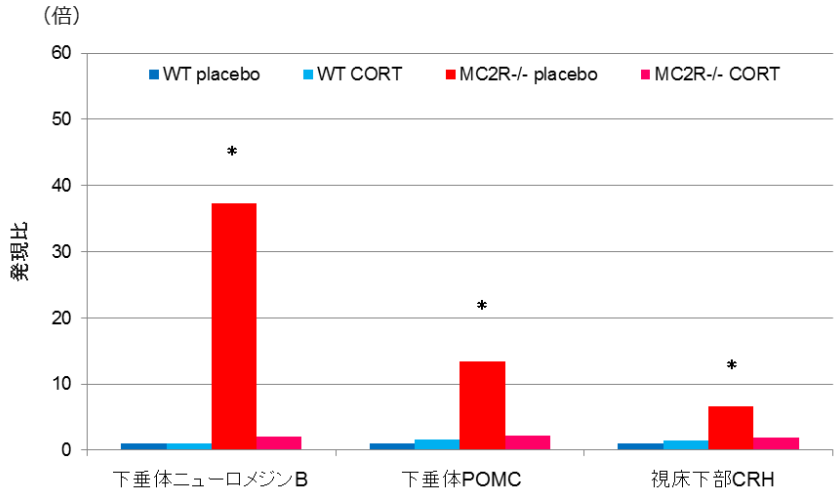
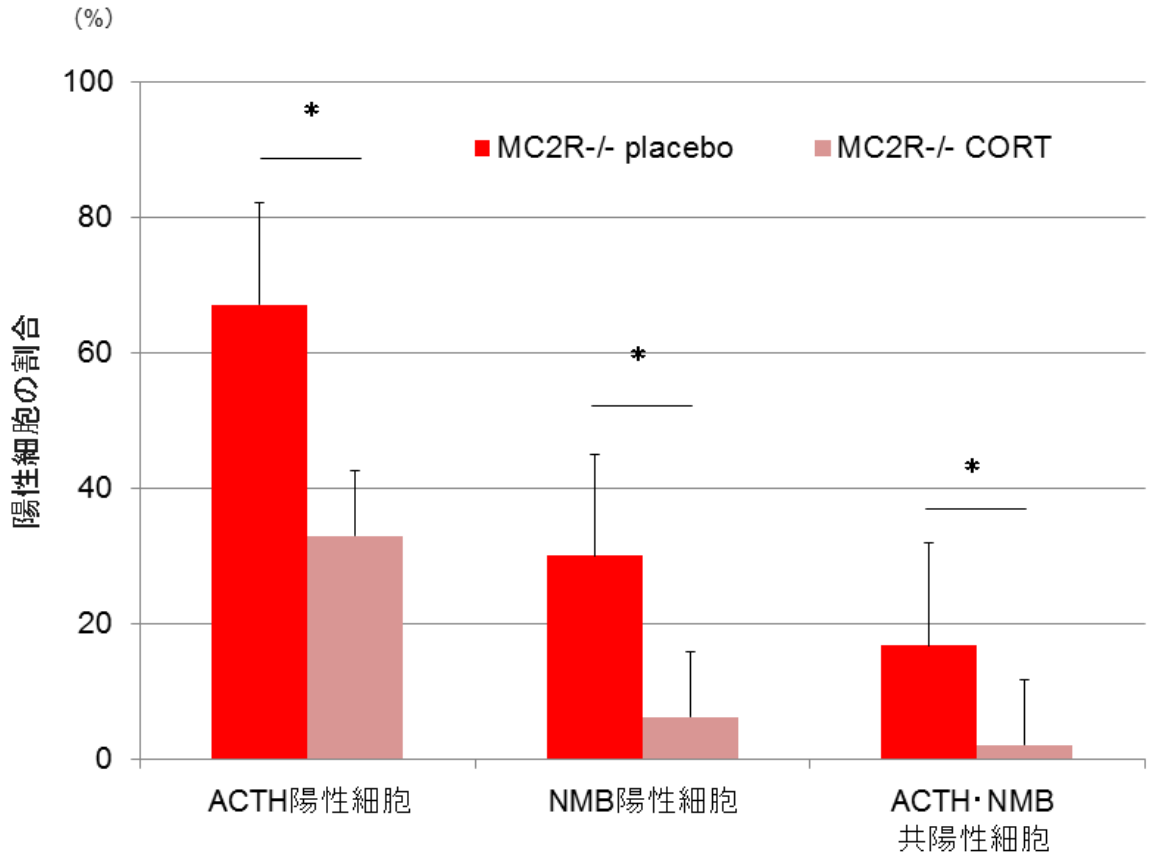


図 4　ペレット投与後の MC2R-/-マウス下垂体免疫染色における ACTH・NMB 陽性細胞数

データは平均±標準誤差で示した。n=5-6、*：p<0.05

（それぞれの陽性細胞数を DAPI で染色された核の個数で除して%表示した）



3.3.5　下垂体単離細胞を用いた薬剤投与実験

単離された下垂体前葉細胞において、NMB の遺伝子発現は CRH の投与（10^{-7}M）で溶媒の投与と比較して有意に増加し、DEX の投与（10^{-8}M）で有意に低下した(図 5-A)。POMC の遺伝子発現は CRH の投与で有意に増加したが、DEX の投与では有意な変化を認めなかった（図 5-B)。下垂体単離細胞の免疫染色では CRH を投与した時のみ ACTH と NMB が共陽性となる細胞が出現した（図 6)。

図 5-A　単離下垂体細胞における各薬剤投与後の NMB 遺伝子発現

データは平均±標準誤差で示した。n=6、*：p<0.05

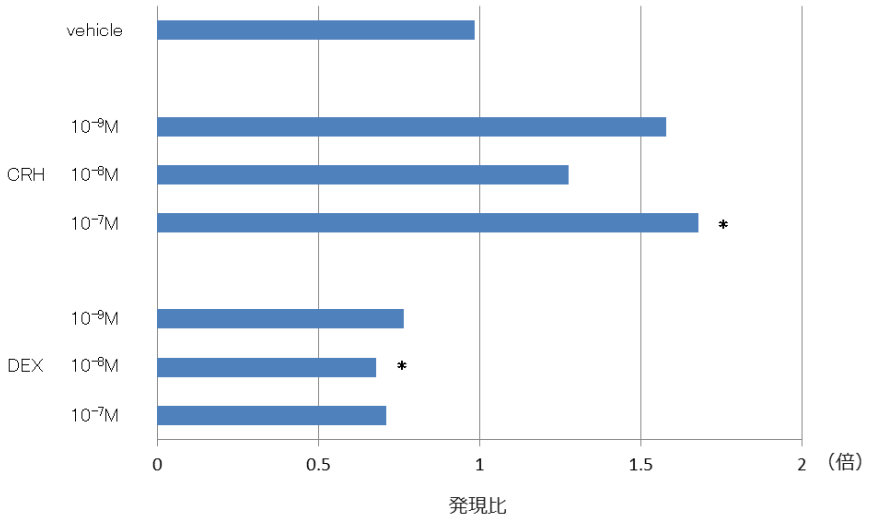


図 5-B　単離下垂体細胞における各薬剤投与後の POMC 遺伝子発現

データは平均±標準誤差で示した。n=6、*：p<0.05

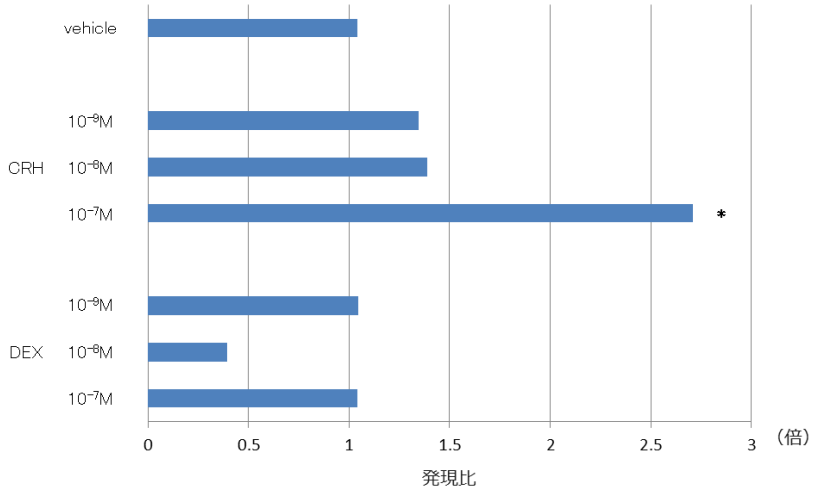
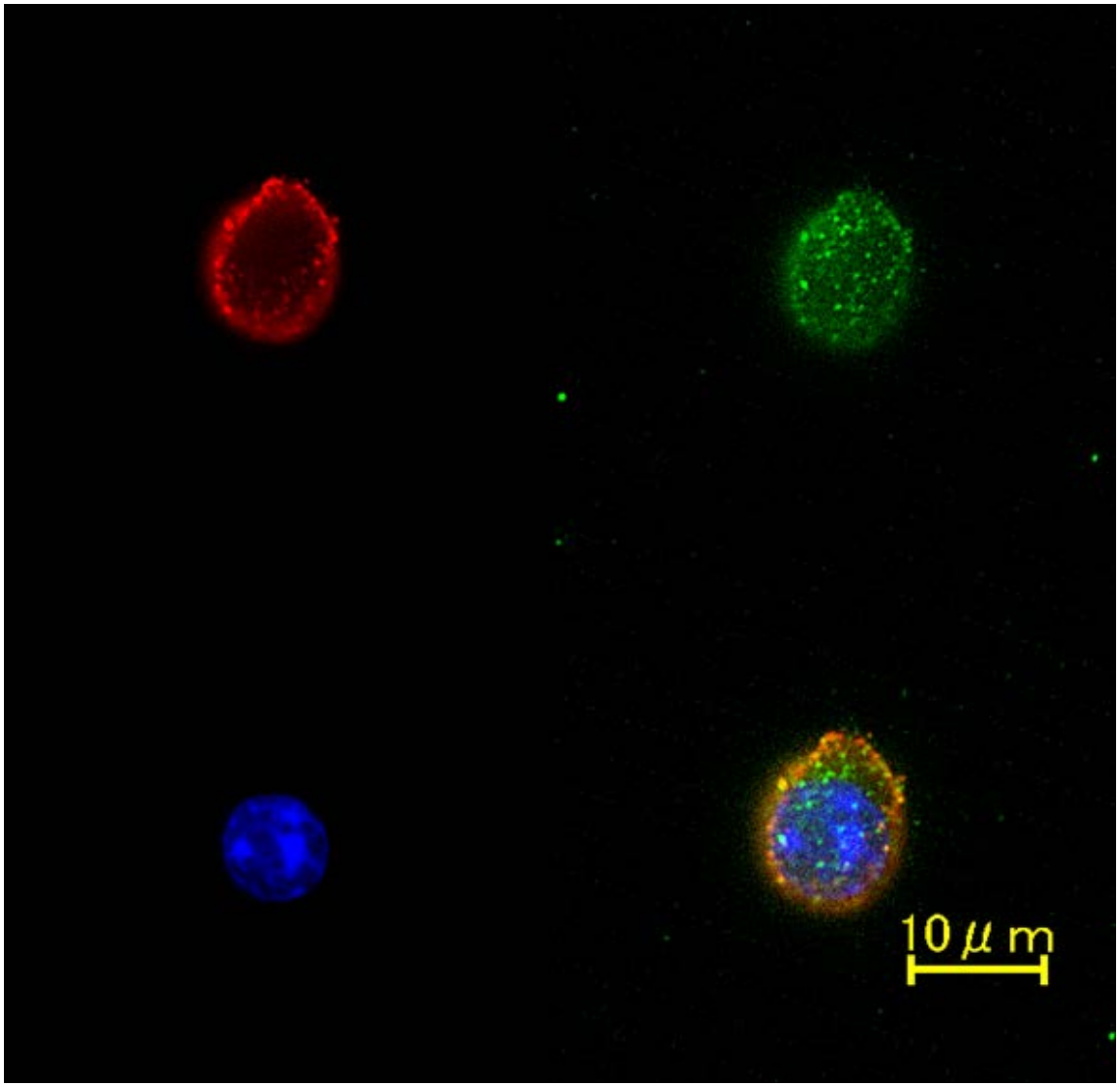


図 6　単離下垂体細胞への CRH 投与後の免疫染色

左上・赤：ACTH、右上・緑：NMB、左下・青：核染色（DAPI）、
右下：merge 画像



3.4　考察

NMB はボンベシン様ペプチドの一つとしてブタの脊髄から同定された物質である [10]。視床下部、下垂体を含む中枢神経系に広く分布し、最近では情動行動との関連が報告されている [11]。また、膵臓や消化管にも分布し、糖代謝や膵内分泌・外分泌機能にも関与するとされる [12,13]。また興味深い報告として、自己分泌（autocine）あるいは傍分泌（paracrine）の機序によって腫瘍細胞の増殖や活性化を促す作用が肺非小細胞癌 [14]、前立腺癌 [15]、大腸癌 [16] などの細胞株あるいはヒト腫瘍細胞で報告されている。

NMB と HPA 軸の関連についてはいくつかの報告がなされている。下垂体では甲状腺刺激ホルモン産生細胞に発現しており [17]、NMB 受容体欠損マウスでは TRH に対する TSH の反応性が変化するとの報告がある [4]。また、NMB を皮下投与すると血漿 ACTH ならびにコルチコステロンが増加するという報告 [18] もあり HPA 軸の刺激因子として働く可能性が指摘されている。

今回我々の検討では MC2R-/-マウスの下垂体においてマイクロアレイ解析で NMB の発現増加を認めたが、同様の報告は副腎摘除マウス下垂体のマイクロアレイ解析でも報告されている [19]。前者が慢性副腎不全モデル、後者が急性副腎不全モデルであるというで異なる病態であるが、NMB の下垂体での発現増加はそれらを問わず副腎不全の病態では共通して起きる事象であると考えられる。

組織学的な解析において我々は MC2R-/-マウスの下垂体において NMB が ACTH 産生細胞に発現していることを証明した。我々の知る限り、これまでに同様の報告は認めない。NMB の ACTH 産生細胞での発現は正常の状況下では弱いが、MC2R-/-のような副腎不全の状態で強く発現すると言える。

グルココルチコイドの皮下投与による補充を行う事で、増加していた下垂体の NMB は下垂体の POMC,視床下部の CRH と同様に抑制された。このことから NMB の調節は ACTH と類似した機序であると推測され、NMB の調節機序を解明するために CRH とグルココルチコイドを下垂体細胞に投与する実験を行った。

単離された下垂体前葉細胞において、CRH の投与は NMB の遺伝子発現を増加させた。CRH はグルココルチコイドによってネガティブフィードバックを受けていることから、血漿コルチコステロンが著明に低値となり、視床下部での CRH 発現が亢進していることが推測される MC2R-/-マウスの下垂体において NMB の発現が増加していることを説明する結果と考えられる。また同様に DEX の投与によって NMB の遺伝子発現が低下することは MC2R-/-マウスへのコルチコステロンペレットの投与の結果と一致するものと言える。また、下垂

体細胞へのDEXの直接投与によってNMB発現が低下することはグルココルチコイドによるフィードバック調節を NMB も受けていることを示唆する。これらの結果から下垂体における NMB の遺伝子発現は下垂体 POMC と同様にCRHとグルココルチコイドによって調節されていることを示すと考えられる。

下垂体における NMB の調節については甲状腺摘除ラットで下垂体抽出物のNMB含量が低下し、サイロキシンを投与されたラットで増加することが報告されている[20]。我々の知る限り下垂体のNMBとHPA軸の関連を示す報告はなく、我々の研究は下垂体におけるNMBの発現がHPA軸の因子によっても調節されていることを示す最初の報告と考えられる。

4. 第　二　部

ニューロメジン B が下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の増殖と機能に与える影響の検討

4.1 緒　言

第一部において我々は慢性副腎不全の状態にある MC2R ノックアウトマウスの下垂体 ACTH 産生細胞に NMB が発現していることを示した。第一部で述べたように NMB は自己分泌（autocine）あるいは傍分泌（paracrine）の機序によって腫瘍細胞の増殖や活性化を促す作用が肺非小細胞癌、前立腺癌、大腸癌などの細胞株あるいはヒト腫瘍細胞で報告されている。

Cushing 病の原因となる ACTH 産生腺腫においても NMB が上述の機序によって増殖や機能を活性化すると仮定すると、NMB の作用を抑制することが Cushing 病の治療となり得る可能性が考えられる。本研究において我々は ACTH 産生腺腫における NMB の発現の検討ならびに NMB の作用を抑制することで増殖や ACTH 産生能を抑制できるかどうかを検討した。

マウス下垂体癌細胞株で、ACTH 産生能を有する AtT-20/D16v-F2 を用いた細胞増殖能の検討では NMB 受容体拮抗薬と NMB siRNA の投与によっていずれも AtT-20/D16v-F2 の細胞増殖は抑制された。また、同様に ACTH の前駆体である POMC の遺伝子発現も低下した。

ヒト下垂体腺腫の病理検体を用いた遺伝子発現と免疫染色による蛋白発現の検討では ACTH 産生下垂体腺腫において NMB ならびに NMB 受容体の発現を認めた。また、非機能性下垂体腺腫ならびに GH 産生下垂体腺腫との比較では ACTH 産生下垂体で有意に発現が増加していた。

本研究により、我々は初めて NMB が下垂体 ACTH 産生細胞に、特に副腎不全状態や腫瘍細胞など増殖・機能が活性化した状態で発現することを見出し、ACTH 産生腺腫による Cushing 病の治療ターゲットとなり得ることを示した。

4.2　実験方法

4.2.1　実験に用いた細胞

マウス下垂体癌細胞株であり、ACTH 産生能を有する AtT-20/D16v-F2（ATCC）を実験に用いた。細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）（Sigma-Aldrich 社）と 10%の fetal bovine serum（FBS）（GIBCO 社）、1%の抗生物質（ストレプトマイシンならびにペニシリン）（GIBCO 社）を加えた培養液中で 37℃、5%の CO2 を含む培養器内で培養した。培養液は 2 日おきに交換し、細胞が培養ディッシュやマルチウェルプレートあるいは培養フラスコの底面積の 70～80%を占めるまで増加したところで 0.25％トリプシン（Sigma-Aldrich 社）を用いて剥離し、適切な細胞数を別の容器に移して培養を継続した。

4.2.2　実験に用いた試薬と入手先

CRH ならびに DEX はそれぞれペプチド研究所、和光純薬株式会社から購入した。NMB は Sigma-Aldrich 社、NMB 受容体拮抗薬である PD168368 は Santa Cruz Biotechnology 社、NMB の siRNA セットは OriGene 社から購入した。免疫染色ならびにリアルタイム PCR、ウェスタンブロッティングに用いた試薬についてはそれぞれの項で記述する。

4.2.3　AtT-20/D16v-F2 の免疫染色

AtT-20/D16v-F2 を glass bottom dish（35mm, Becton Dickinson 社）に 2.5×10^5 個/L の細胞密度で播種し、24 時間予備培養した。培養液を捨て、PBS1mL で 2 回洗浄した後 4%PFA を加え、室温で 30 分間静置した。4%PFA を捨て、PBS1mL で 3 回洗浄した後 Triton-X100（ナカライテスク社）を 0.25%含んだ PBS1mL を加え室温で 10 分間静置した。PBS1mL で 3 回洗浄した後 1BSA を 1.5%含んだ PBS を 1mL 加え室温で 30 分間静置した。1.5%BSA を含む PBS に一次抗体を加えた液を加え 1 時間静置した。一次抗体としてウサギポリクローナル抗 NMB 抗体（Sigma-Aldrich 社）を 100 倍、ウサギモノクローナル抗 NMB 受容体抗体（Abcam 社）を 100 倍、マウスモノクローナル抗 ACTH 抗体

（Santa Cruz Biotechnology 社）を 200 倍の濃度でそれぞれ用いた。PBS で 3 回洗浄を行った後、二次抗体として 1.5%BSA を含む PBS に Alexa Fluor 594-conjugated 抗マウス IgG 抗体（Molecular Probes 社）と Alexa Fluor 488-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体（Molecular Probes 社）を 200 倍の濃度で混合したものを加え 30 分遮光下で静置した。以後の過程は可能な限り全て遮光下で行った。核染色として DAPI を使用し、固定用の VECTASHIELD HardSet mounting medium with DAPI (Vector Laboratories 社)を滴下しスライドグラスを載せて観察した。観察には蛍光顕微鏡 BZ-900（キーエンス社）を用いた。

4.2.4　AtT-20/D16v-F2 におけるニューロメジン B 発現調節の検討

AtT-20/D16v-F2 を 4.2.1 で述べた方法で培養し、試薬投与前 2 時間から培養液を DMEM に 0.2%BSA を加えたものに変更し、2 時間後に CRH を 10^{-9}M～10^{-6}M、DEX を 10^{-9}M～10^{-5}M の濃度でそれぞれ加えた。2 時間後と 6 時間後に RNA を 3.3.5 で述べたものと同様の方法で抽出し、リアルタイム PCR 法で NMB、POMC、β-アクチンの遺伝子発現の解析を行った。各遺伝子発現はβ-アクチンの発現量を用いて標準化し、ΔΔCt 法を用いてコントロールとした遺伝子発現との相対的発現量を求めた。

4.2.5　AtT-20/D16v-F2 へのニューロメジン B 受容体拮抗薬の投与

AtT-20/D16v-F2 を 4.2.1 で述べた方法で培養し、薬剤投与時から 96 ウェルプレート（Becton Dickinson 社）に 2.0×10^{4} 個/ウェルの濃度で播種した。溶媒、NMB と NMB 受容体拮抗薬（PD168368）をそれぞれ 10^{-7}M～10^{-5}M の濃度で加えた。NMB siRNA は 10nM の濃度で SiTran1.0（OriGene 社）と共に培養液に加えた。試薬投与後 0,24,48,72 時間後の細胞増殖を Cell Proliferation Kit I (Roche Applied Science 社)を用いて評価した。また試薬投与 24 時間後の細胞から RNA ならびに蛋白を抽出してリアルタイム PCR 法ならびにウェスタンブロッティング法で POMC の遺伝子と蛋白の発現をそれぞれ評価した。RNA 抽出、リアルタイム PCR については 3.3.5 に記載した通りの方法で行った。蛋白抽出

は 6 ウェルプレート（Becton Dickinson 社）に細胞を 1.0×10^5 個の密度で播種し、試薬投与 24 時間後に培養液を除き PBS で 3 回洗浄した後 Cell lytic M（Sigma-Aldrich 社）を 100μL 加えた。15 分間室温で振盪した後不溶性の物質を遠心分離で除き蛋白を回収し、以下に示すウェスタンブロッティング法によって POMC 蛋白の発現を検討した。細胞より得られた蛋白は 10μg ずつを用い、還元剤入り SDS サンプルバッファーを加え 95℃5 分でボイルし、アクリルアミドゲルにアプライした。SDS-polyaclylamidegel electrophoresis 法によって蛋白を質量別に分離し、ニトロセルロース膜（Millipore 社）に転写した。転写後ニトロセルロース膜を 4%BSA と 0.1%の Tween-20（東京化成社）を含んだ PBS に室温で浸透しながら 1 時間浸漬した。4%BSA と 0.1%の Tween-20 を含む PBS に一次抗体を加えた液を加え 4℃で一晩静置した。一次抗体はマウスモノクローナル抗 ACTH 抗体（Santa Cruz Biotechnology 社）を 200 倍の濃度で用いた。4%BSA と 0.1%の Tween-20 を含む PBS で 3 回洗浄した後 4%BSA と 0.1%の Tween-20 を含む PBS に二次抗体を加えた液を加え室温で 2 時間振盪した。二次抗体には HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（Santa Cruz Biotechnology 社）を使用した。HRP の検出には ImmunoStar LD（和光純薬工業）を用いた。蛍光観察には LAS-4000 mini（富士フイルム社）を用い、画像解析ソフトウェアとして Multi Gauge 3.0（富士フイルム社）を用いた。

4.2.6　AtT-20/D16v-F2 へのニューロメジン B siRNA の投与実験

AtT-20/D16v-F2 を 4.2.1 で述べた方法で培養し、薬剤投与時から 96 ウェルプレート（Becton Dickinson 社）に 2.0×10^4 個/ウェルの濃度で播種した。NMB siRNA は 10nM の濃度で SiTran1.0 と共に培養液に加えた。比較対象として担体となる試薬（SiTran）のみの群と、siTRAN と control siRNA を共に加えた群を設定した。siRNA 投与後 0,24,48,72 時間後の細胞増殖を Cell Proliferation Kit I （Roche Applied Science 社)を用いて評価した。また試薬投与 24 時間後の細胞から RNA ならびに蛋白を抽出してリアルタイム PCR 法ならびにウェスタンブロッティング法で POMC の遺伝子と蛋白の発現をそれぞれ評価した。RNA 抽出、リアルタイム PCR については 3.3.5 に記載した通りの方法で行った。ウェスタンブロッティング法は 4.2.5 で示した通りの方法で行った。

4.2.7　実験に用いたヒト下垂体検体について

2003年1月から2013年8月までの期間に当院で経蝶形骨洞的下垂体腺腫摘除術を受けた ACTH 産生下垂体腺腫、成長ホルモン（GH）産生下垂体腺腫、非機能性下垂体腺腫の患者を対象として、摘出検体の病理切片を遺伝子発現解析と免疫染色による蛋白発現解析に用いた。ACTH 産生下垂体腺腫は 0.5mg デキサメサゾン抑制試験で ACTH とコルチゾールが抑制されない、CRH 負荷試験で ACTH が正常あるいは過大反応を示す、尿中遊離コルチゾールが基準値以上であるなどの内分泌学的評価での ACTH 産生能と、病理所見で ACTH が腫瘍細胞に陽性であるという病理学的な評価が揃っているものと定義した。GH 産生下垂体腺腫は 75g ブドウ糖負荷試験で GH 底値が 1ng/mL 未満に低下しない、GH 過剰の臨床症状（顔貌の変化、軟部組織の肥厚など）を認める、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン負荷試験で GH の奇異性上昇を認めるなどの内分泌学的評価と、病理所見で GH が腫瘍細胞に陽性であるという病理学的な評価が揃っているものと定義した。非機能性下垂体腺腫は上記のホルモン負荷試験や蓄尿検査の結果内分泌学的にホルモンの過剰分泌の所見を認めず、病理所見で下垂体前葉ホルモン（ACTH、GH、甲状腺刺激ホルモン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン）が全て陰性であるものと定義した。ACTH 産生下垂体腺腫、GH 産生下垂体腺腫、非機能性下垂体腺腫の各群でそれぞれ 6 例の患者を対象として検討を行った。この研究はヘルシンキ宣言と医薬品の臨床試験の基本理念に従って施行した。

4.2.8　ヒト下垂体腺腫の免疫染色

固定した切片はキシレンに浸漬しパラフィンを除き、100%エタノール、90%エタノール、70%エタノールに連続して浸漬して水和した後 PBS で洗浄した。5%の BSA と 0.1%の tween-20 を含む PBS を加え 30 分室温で静置した後 5% BSA と 0.1%tween-20 を含む PBS に一次抗体を加えた液を加え 1 時間静置した。一次抗体としてウサギポリクローナル抗 NMB 抗体（Sigma-Aldrich 社）を 100 倍、マウスモノクローナル抗 ACTH 抗体（Santa Cruz Biotechnology 社）を 200 倍の濃度でそれぞれ用いた。PBS で 3 回洗浄を行った後、二次抗体として 5%BSA と 0.1%tween-20 を含む PBS に Alexa Fluor 594-conjugated 抗マウス IgG 抗体（Molecular Probes 社）と Alexa Fluor 488-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体（Molecular Probes 社）を 200 倍の濃度で混合したものを加え 30

分遮光下で静置した。以後の過程は可能な限り全て遮光下で行った。核染色として DAPI を使用し、固定用の VECTASHIELD HardSet mounting medium with DAPI (Vector Laboratories 社)を滴下しスライドグラスを載せて観察した。観察には蛍光顕微鏡 BZ-900（キーエンス社）を用いた。

4.2.9　ヒト下垂体腺腫の遺伝子発現の検討

パラフィン包埋された病理検体から PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit（Life Technology 社）を用いて総 RNA を抽出した。まず 10μm 厚の切片を 5 片 RNase-free 1.5mL tube に入れ、300μL の Melting buffer を加えた。最高速度で 20 秒遠心した後 72℃で 10 分間静置した。20μL の Proteinase K を加え 60℃で 3 時間静置し、最高速度で 1 分遠心した。分離されパラフィン層をピペットでで貫いて下の液層を回収、別の RNase-free tube へ移した。400μL の Binding Buffer と 800μL の 100%エタノールを入れてよく混合し、700μL のサンプルを Spin Cartridge に入れた。800g で 1 分間遠心し、濾過液を捨て 500μL の Wash Buffer を入れた。最高速度で 1 分遠心し、濾過液を捨てた。Wash Buffer を入れ最高速度で 1 分遠心し、濾過液を捨てる過程をさらに 2 回繰り返した。Spin Cartridge を 1.7mL の新しい Recovery tube に入れ、65℃で温めておいた 50μL の RNAase-free water を入れ、1 分間静置するした後最高速度で 1 分遠心し、Recovery tube 内に溶出された総 RNA を回収した。得られた RNA から 3.2.4 で述べた方法で cDNA を得た。cDNA と NMB、NMB 受容体、β-アクチンの各遺伝子特異的プライマーを fast SYBR Green PCR Master Mix と混合し、ABI 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems 社)を用いて遺伝子発現を調べた。各遺伝子特異的プライマーは 3.2.5 に示した通りである。各遺伝子発現はβ-アクチンの発現量を用いて標準化し、ΔΔCt 法を用いてコントロールとした遺伝子発現との相対的発現量を求めた。

4.2.10　統計方法について

図表のデータは全て平均値±標準誤差で表記した。二群間の平均の検定には対応のない Student の t 検定を用いた。他群間の平均の検定には one-way ANOVA を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Tukey-Kramer 法を用いて各群間を比較した。p 値が 0.05 未満の場合に有意差のある差を認めると定義した。それぞれの実験においては 3 回の独立した実験を行いデータを得て統計的に解析した。統計解析においてはソフトウェアとして IBM SPSS statistics バージョン 21（IBM 社）を用いた。

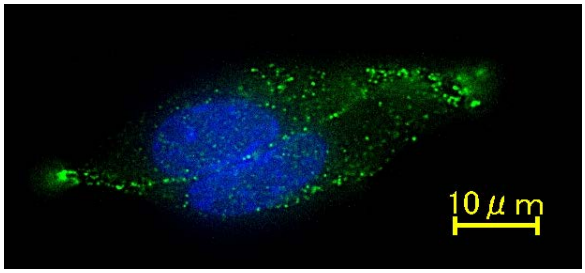
4.3　実験結果

4.3.1　AtT-20/D16v-F2 の免疫染色

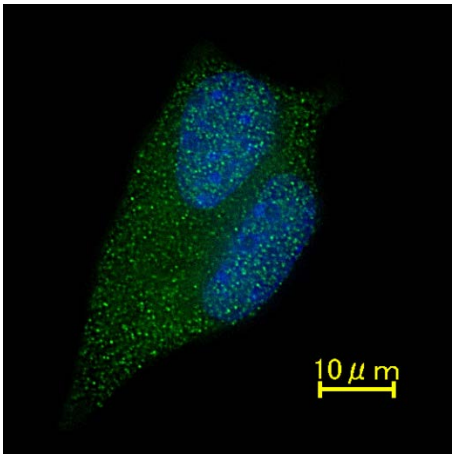
ウサギポリクローナル抗NMB抗体を用いたAtT-20/D16v-F2の免疫染色で細胞質に顆粒状に NMB が陽性となった。ウサギモノクローナル抗 NMB 受容体抗体を用いた免疫染色で NMB 受容体が細胞全体に広く陽性となった。マウスモノクローナル抗 ACTH 抗体を用いた免疫染色で細胞質に ACTH が広く陽性となった。NMB、NMB 受容体、ACTH はいずれも AtT-20/D16v-F2 に発現していることが確認できた。

図 7　AtT-20/D16v-F2 の免疫染色

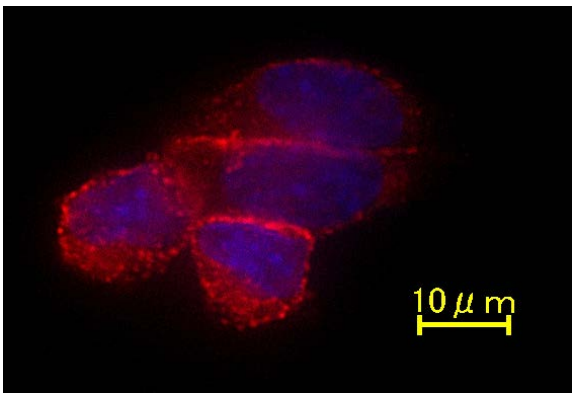
抗 NMB 抗体
（緑：NMB、青：DAPI）



抗 NMB 受容体抗体
（緑：NMB 受容体、青：DAPI）



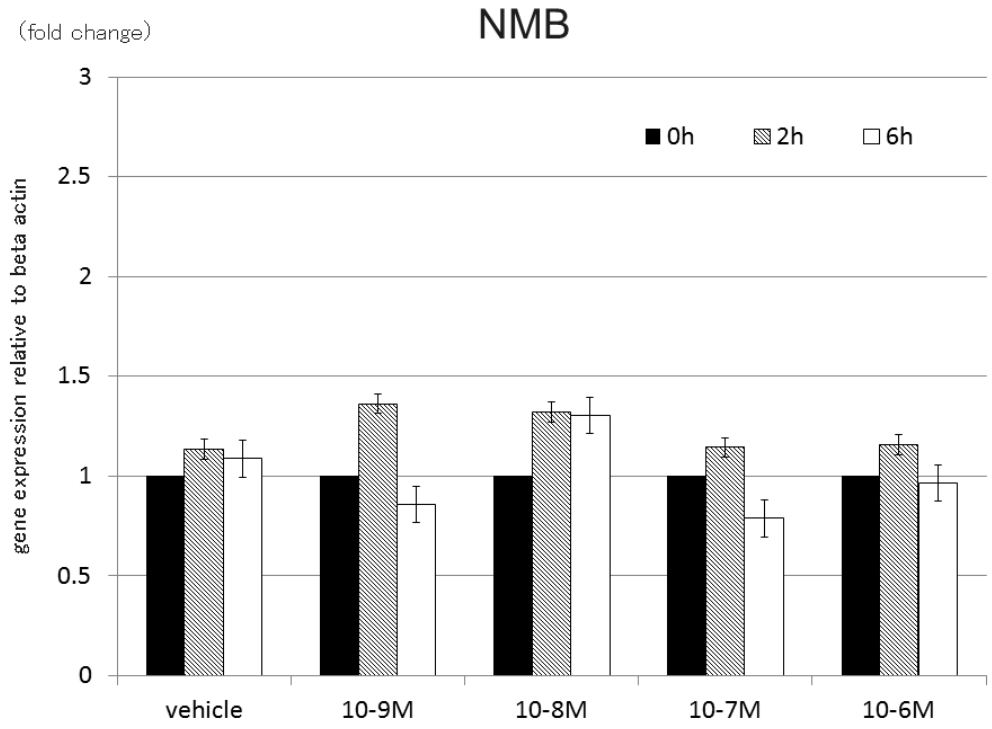
抗 ACTH 抗体（赤：ACTH、青：DAPI）



4.3.2　AtT-20/D16v-F2 における ニューロメジン B 発現調節の検討

AtT-20/D16v-F2 に対する CRH の投与により 2 時間後、6 時間後に POMC の遺伝子発現は増加したが、NMB の発現は有意な変化を認めなかった（図 8)。DEX の投与により POMC の遺伝子発現は低下したが、NMB の発現は有意な変化を認めなかった（図 9)。

図 8　CRH 投与後の遺伝子発現の変化



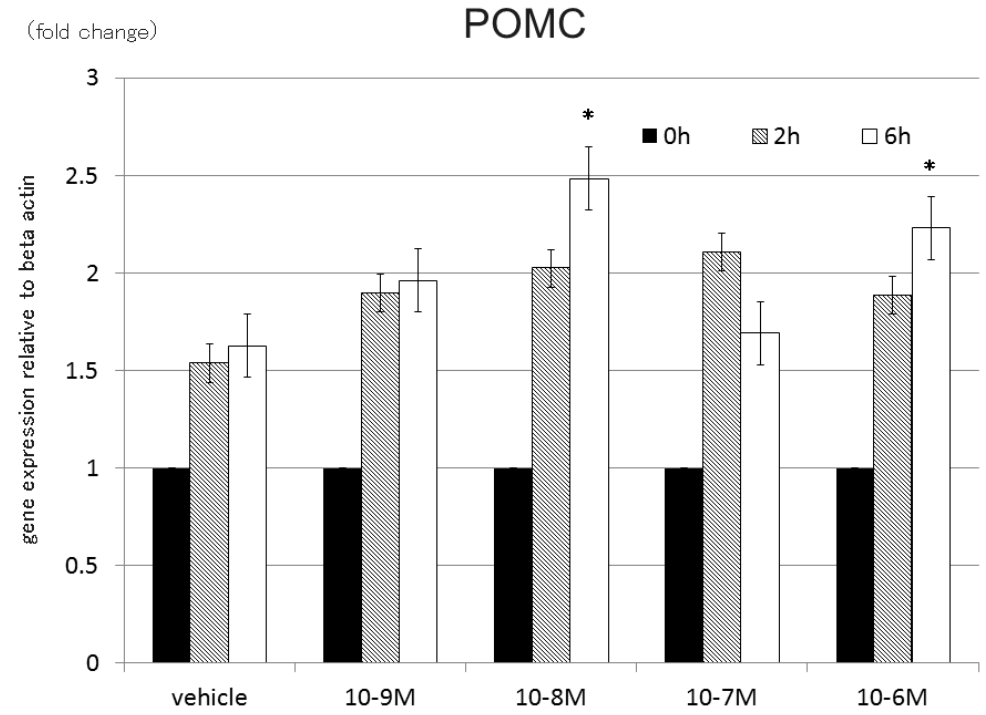
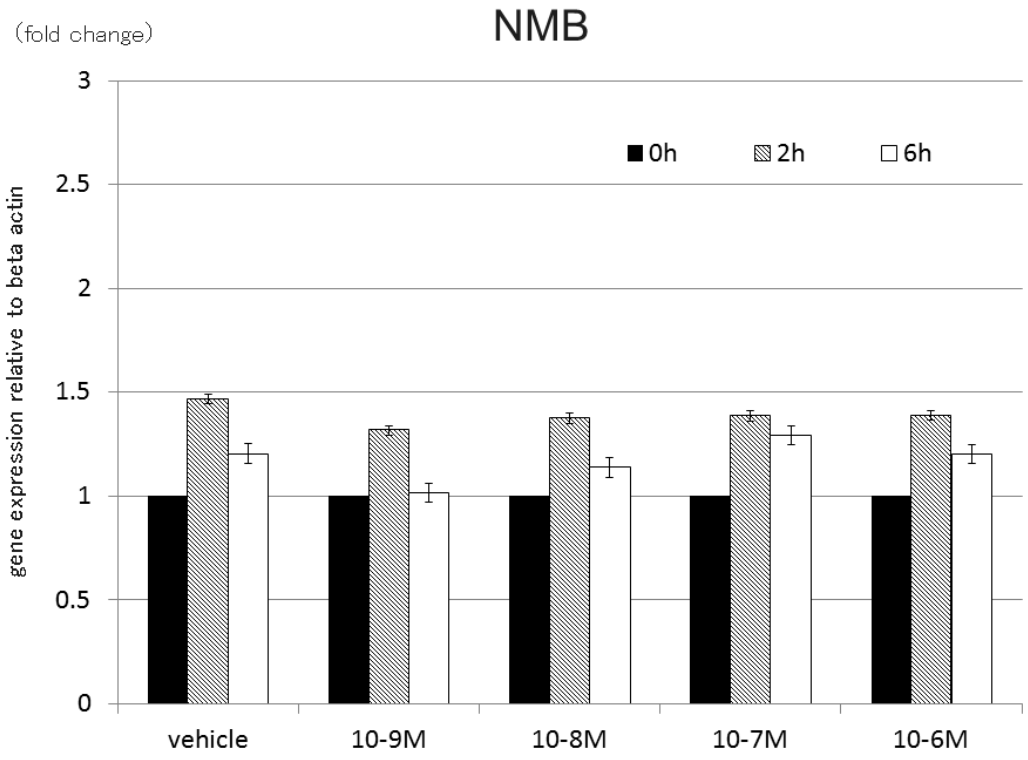
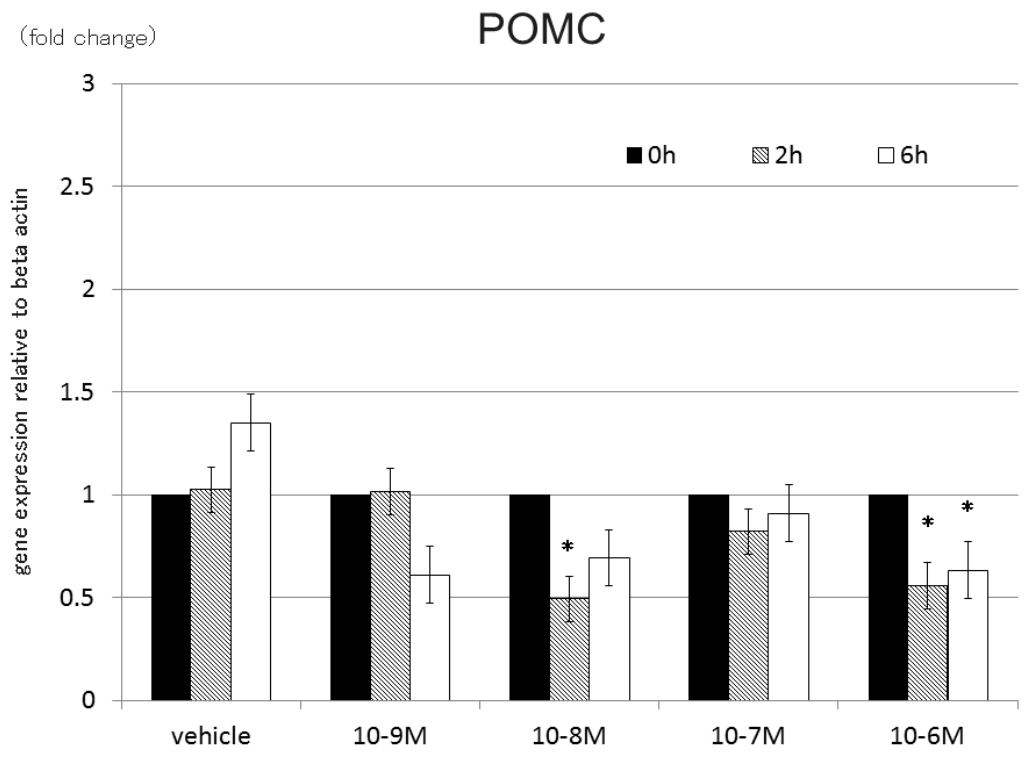


図 9　DEX 投与後の遺伝子発現の変化





4.3.3　AtT-20/D16v-F2 へのニューロメジン B 受容体拮抗薬の投与

AtT-20/D16v-F2 に対して NMB を投与したところ細胞の増殖数は溶媒の投与と有意な差を認めなかった。NMB 受容体拮抗薬である PD168368 を 5×10^{-7}M、10^{-6}M の濃度で投与すると細胞増殖は有意に抑制された。PD168368 による細胞増殖抑制効果は NMB を投与しても回復しなかった（図 10）。

リアルタイム PCR 法での検討では試薬投与 24 時間後の POMC の mRNA 発現は PD168368 の 10^{-6}M の濃度での投与で有意に低下していた。ウェスタンブロッティング法での検討では試薬投与 24 時間後の POMC 由来蛋白の発現は PD168368 の 5×10^{-7}M と 10^{-6}M の濃度での投与で低下していた（図 11）。

図 10　NMB 受容体拮抗薬 PD168368 の投与による細胞増殖能の変化

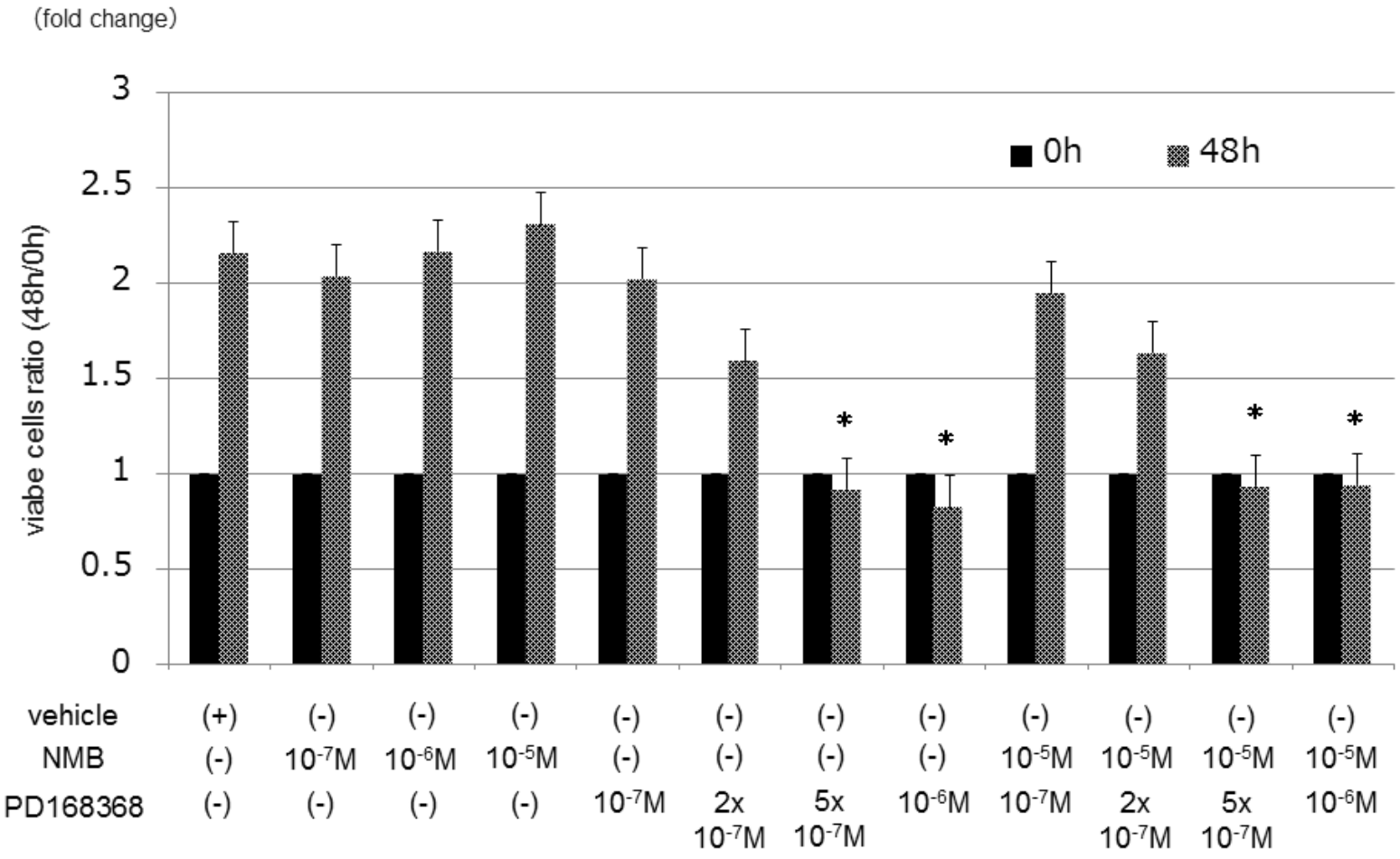
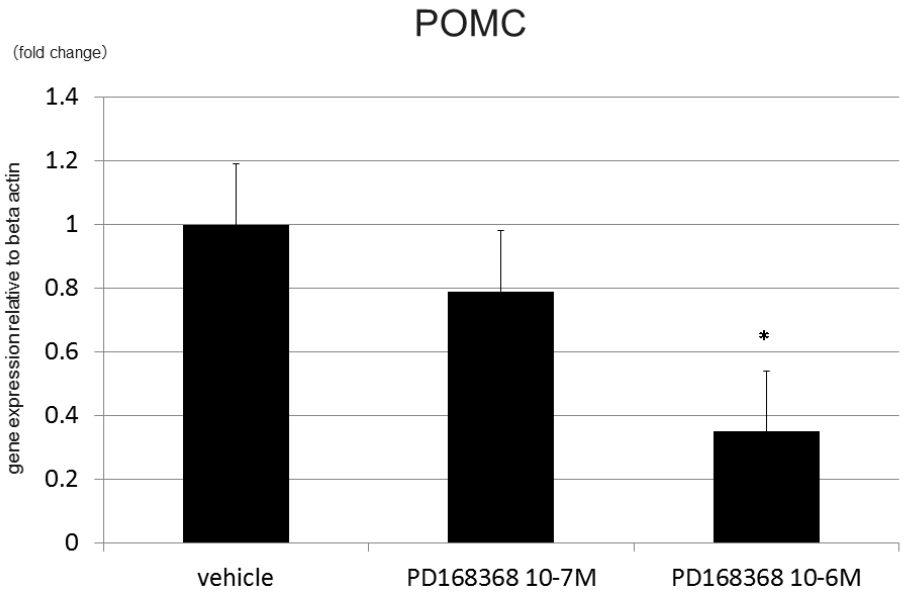
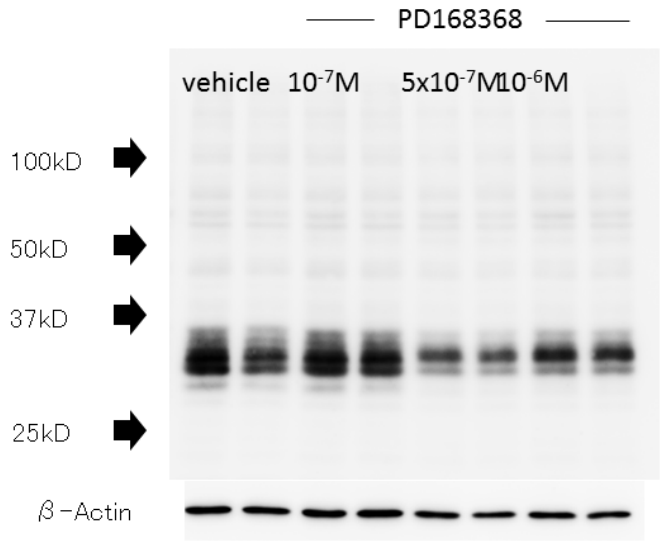


図 11　NMB 受容体拮抗薬 PD168368 の投与による POMC 発現の変化

遺伝子発現の変化



蛋白発現の変化



4.3.4　AtT-20/D16v-F2 へのニューロメジン B siRNA の投与実験

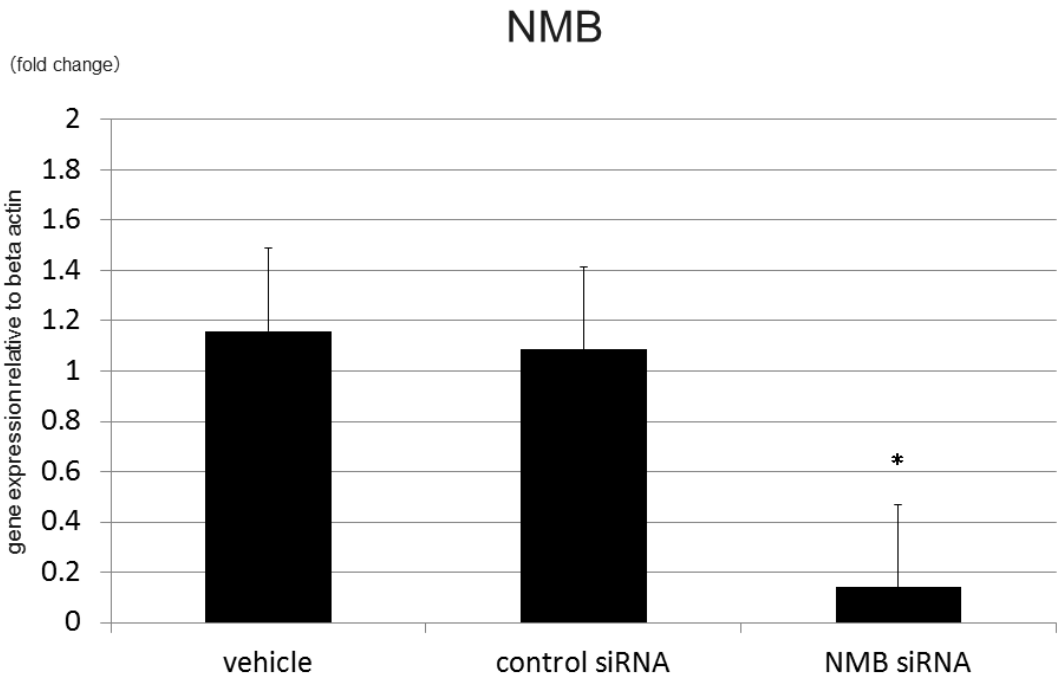
NMB の siRNA を投与すると 24 時間後に NMB の RNA 発現は 10%程度まで低下した。siTRAN のみ（vehicle）と control siRNA 投与では NMB 発現は変化しなかった（図 12-A)。

細胞増殖は NMB siRNA の投与によって有意に抑制された（図 12-B)。

リアルタイム PCR 法での検討では試薬投与 24 時間後の POMC の mRNA 発現とウェスタンブロッティング法での検討では siRNA 投与 24 時間後の POMC 由来蛋白の発現は NMB siRNA の投与で低下傾向を認めたが、有意な差はなかった（図 13-A,B)。

図 12　NMB 受容体拮抗薬 PD168368 の投与による細胞増殖能の変化

A



B

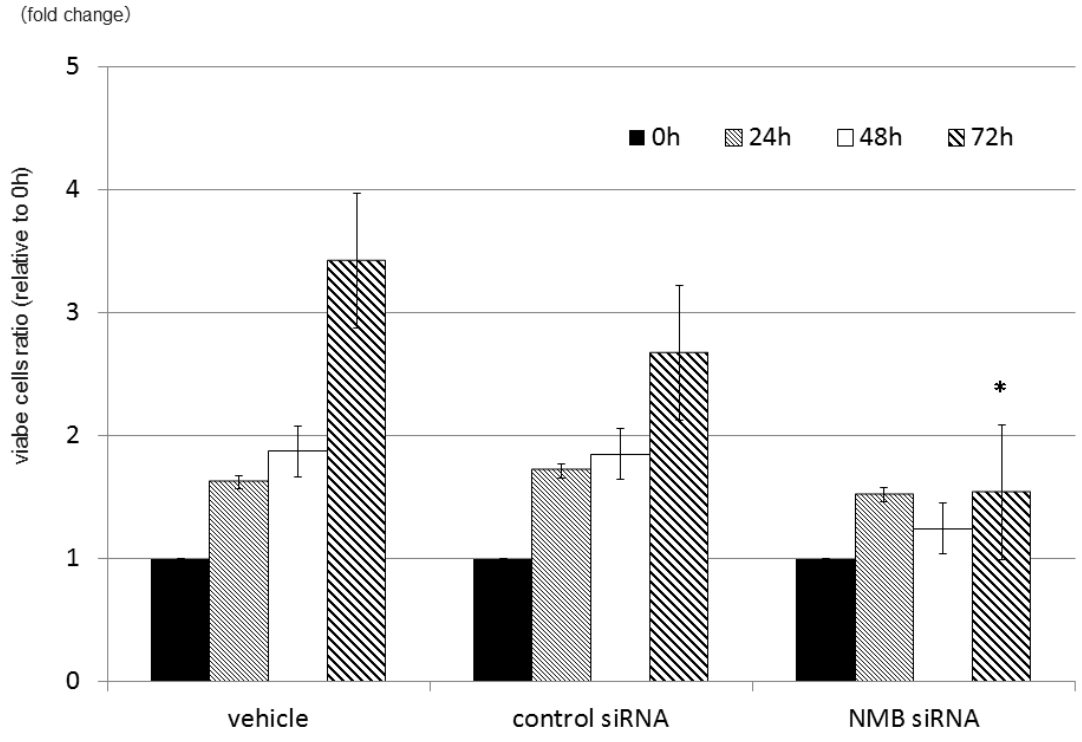
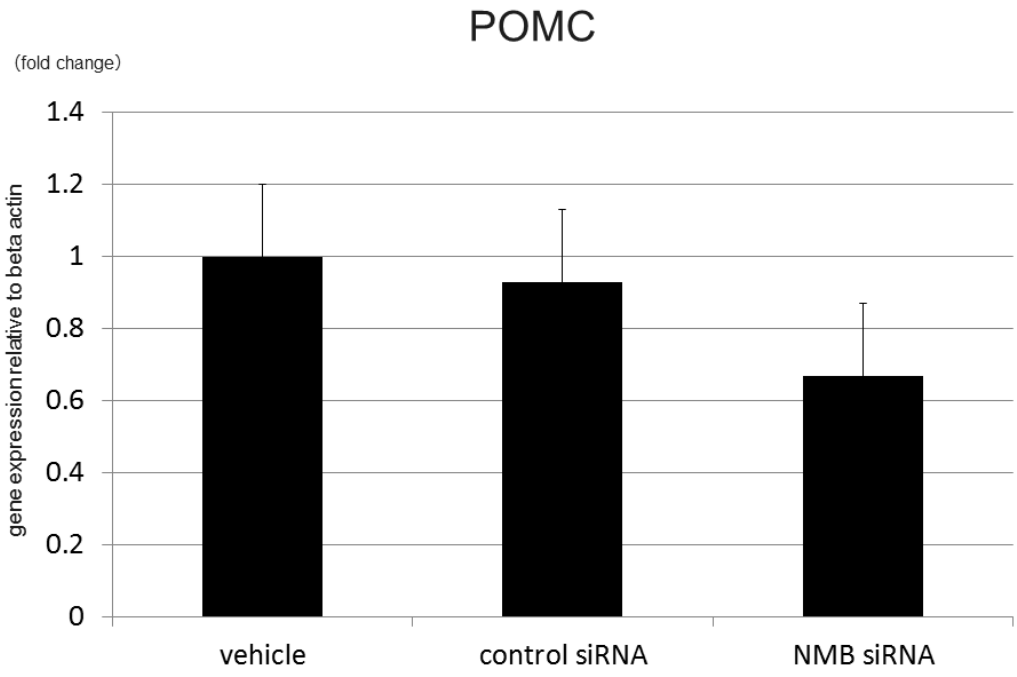
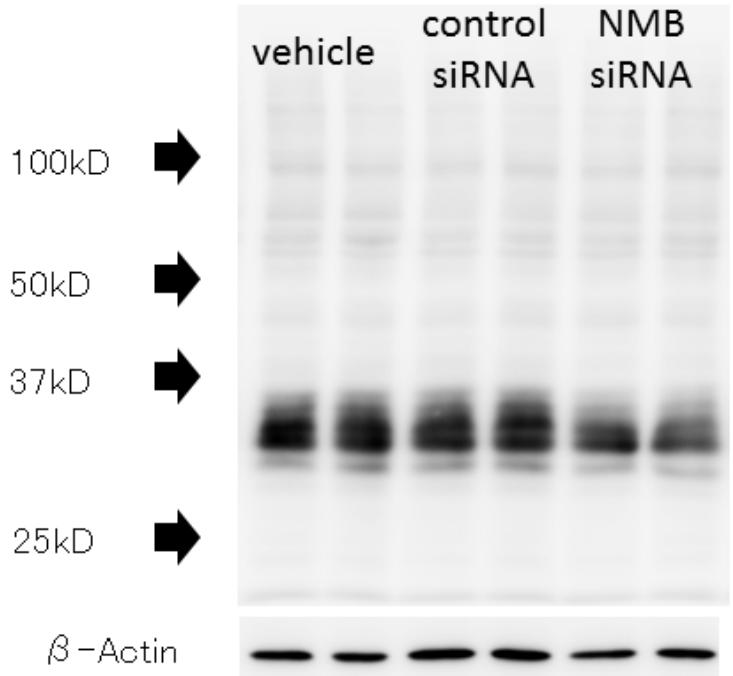


図 13　NMB 受容体拮抗薬 PD168368 の投与による POMC 発現の変化

A



B



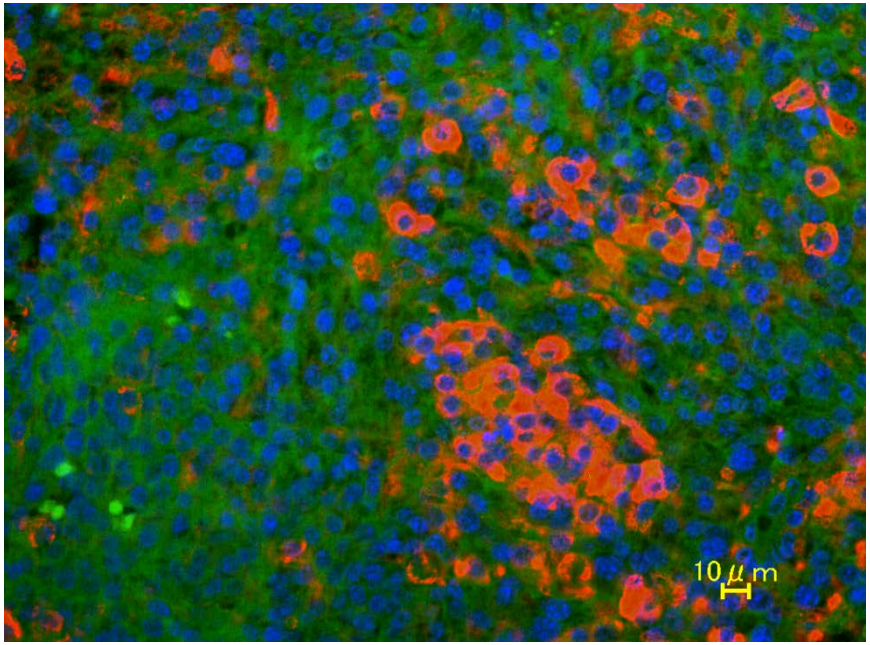
4.3.4　ヒト下垂体腺腫の免疫染色

ACTH 産生腺腫では ACTH 陽性細胞のみならず周囲の細胞も含めて広範に NMB の発現を認めた（図 14-A)。GH 産生下垂体腺腫では GH 陽性細胞で一部に NMB の発現を認めるものの、背景細胞にはほとんど NMB の染色像を認めなかった（図 14-B)。非機能性下垂体腺腫では NMB の陽性像はほとんど認めなかった（図 14-C)。

図 14　ヒト下垂体腺腫における NMB の発現

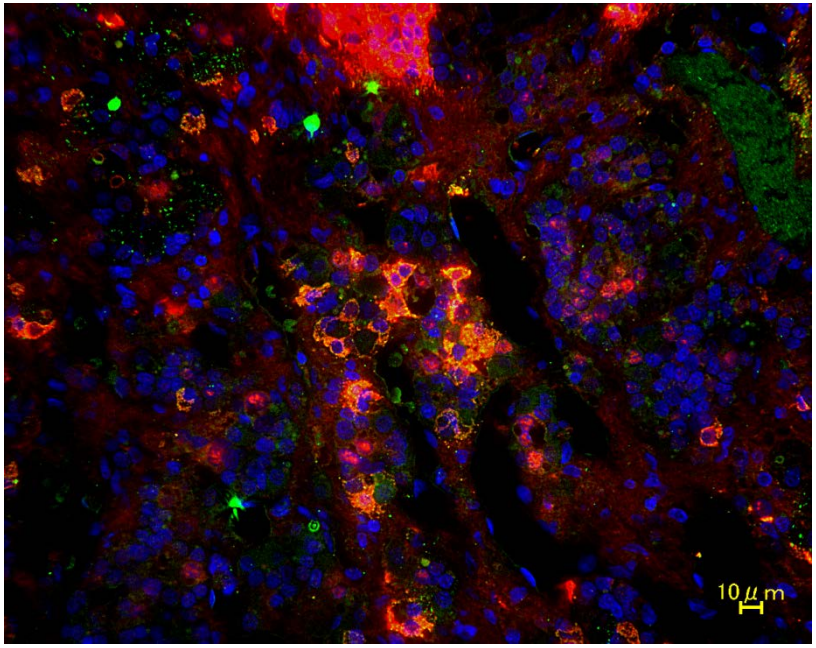
A

赤：ACTH、緑：NMB、青：核染色（DAPI）



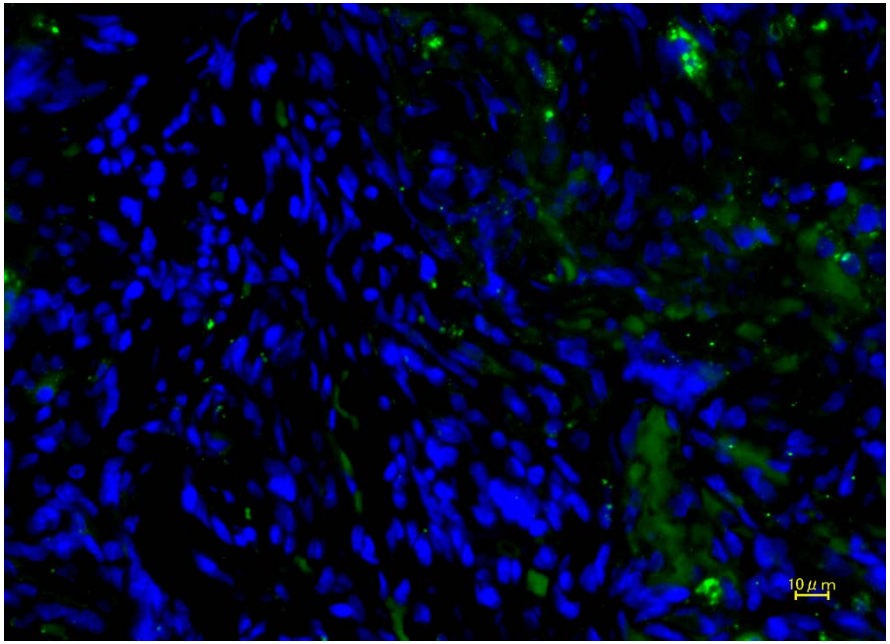
B

赤：GH、緑：NMB、青：核染色（DAPI）



C

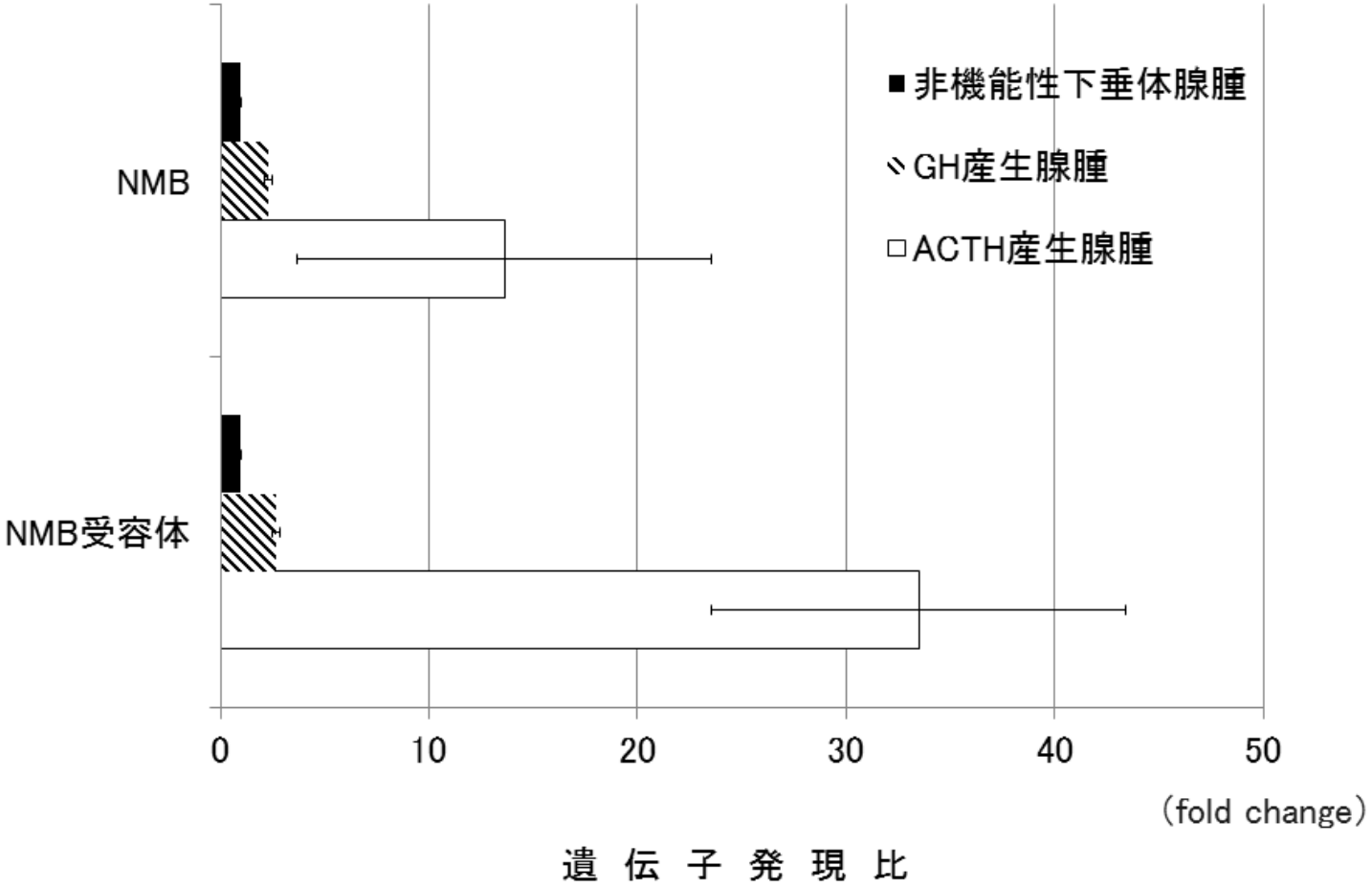
緑：NMB、青：核染色（DAPI）



4.3.5　ヒト下垂体腺腫の遺伝子発現の検討

NMB の mRNA 発現は非機能性下垂体腺腫、GH 産生腺腫と比較して ACTH 産生腺腫で有意に増加していた。NMB 受容体の mRNA 発現も同様に非機能性下垂体腺腫、GH 産生腺腫と比較して有意な増加を認めた。NMB、NMB 受容体共に非機能性下垂体腺腫と比較して GH 産生腺腫で発現が多い傾向を認めた。（図 15）

図 15　ヒト下垂体腺腫における NMB の遺伝子発現



4.4　考察

下垂体癌の細胞株である AtT20/D16v-F2 は特異的抗体を用いた免疫染色で NMB、NMB 受容体、ACTH の前駆体である POMC の蛋白発現を認め、NMB の作用を検討する実験に適していると考えられた。

第一部での検討を踏まえ癌細胞株でも CRH ならびに DEX が NMB の調整に関与するかを検討したが、AtT20/D16v-F2 では CRH や DEX 投与による NMB の発現変化は認めなかった。腫瘍細胞では NMB の発現が正常の調整機構を保っておらず、また NMB の過剰発現が腫瘍細胞の増殖や機能亢進に影響する可能性を考慮して NMB の作用を抑制することでの変化を検討することとした。

NMB 受容体を特異的に阻害する PD168368 の投与によって、AtT20/D16v-F2 の細胞増殖は抑制され、また産生される POMC 由来蛋白も低下した。また、NMB siRNA の投与によって NMB 発現を低下させることで、同様に AtT20/D16v-F2 の細胞増殖は抑制され、自律性に産生される NMB が自己分泌あるいは傍分泌の機序を介して自身の細胞増殖を刺激している可能性が考えられた。

次にヒトの下垂体腺腫においても同様の機構が見られるかを検討する目的で、ヒト下垂体腺腫のサンプルを用いて検討を行った。ACTH 産生下垂体腺腫では特異的抗体を用いた免疫染色で広範に NMB の発現を認め、またサンプルから RNA を抽出して行ったリアルタイム PCR 法での検討でも同様に NMB の発現は非機能性下垂体腺腫、GH 産生腺腫と比較して増加していた。また、NMB 受容体も ACTH 産生腺腫において発現が増加しており、細胞株での実験と同様に分泌された NMB が自己分泌または傍分泌の機序を介して ACTH 産生腺腫の細胞増殖やホルモン分泌を刺激している可能性が考えられた。

ACTH 産生腺腫は通常巨大な腺腫となることは少ないが、周囲組織への浸潤性が高いことが難治性となる要因となっている。また、ホルモン分泌能が高く、高コルチゾールによる症状は全身臓器に及び多彩な合併症を呈する。NMB の作用を抑制することで ACTH 産生腺腫の増殖の抑制、ホルモン分泌の抑制が可能であるかどうか、今後の検討を要する。第二部の実験では腫瘍細胞株並びに病理検体を用いた *in vitro* の実験が主体であり、NMB 抑制による抗腫瘍効果を確認するためには動物を用いた *in vivo* の実験あるいはヒト下垂体腺腫の生細胞を用いた実験が必要と考えられる。具体的には、ヌードマウスの皮下に腫瘍細胞を投与して増殖させた後、NMB 受容体拮抗薬を投与して腫瘍径の変化ならびに血中 ACTH の変化を見る実験ならびにヒト下垂体腺腫の生細胞に対して NMB 受容体拮抗薬を投与して細胞増殖抑制作用を見る実験が必要であり、今後これらの実験を進めて Cushing 病の治療としての可能性を検討していく予定である。

5. 総 括 お よ び 結 論

今回我々は慢性副腎不全状態にあり ACTH 産生細胞の過形成・機能亢進を呈する MC2R ノックアウトマウスの下垂体における遺伝子発現を検討し ACTH 産生細胞の増殖や機能亢進に関わる因子を同定し、Cushing 病の治療ターゲットとなりうるかどうかを検討することを目的として実験を行った。

我々は第一部で示した「下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞におけるニューロメジン B の発現とその調節機構」の研究の結果、MC2R ノックアウトマウスの下垂体の検討から ACTH 産生細胞における NMB の発現を同定した。続いて NMB は CRH の投与により発現が増加し、GC の投与により発現が減少するという ACTH と同様に HPA 軸の関連因子によって調節されることを証明した。

NMB はボンベシン様ペプチドの一つとしてブタの脊髄から同定された物質である。視床下部、下垂体を含む中枢神経系に広く分布し、最近では情動行動との関連が報告されている。また、膵臓や消化管にも分布し、糖代謝や膵内分泌・外分泌機能にも関与するとされる。また興味深い報告として、autocrine あるいは paracrine の機序によって腫瘍細胞の増殖や活性化を促す作用が肺非小細胞癌、前立腺癌、大腸癌などの細胞株あるいはヒト腫瘍細胞で報告されている。

第二部で示した「ニューロメジン B が下垂体副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の増殖と機能に与える影響の検討」の研究の結果、我々は NMB が下垂体 ACTH 産生細胞の腫瘍株系でもその受容体と共に発現しており、受容体拮抗薬や NMB siRNA の投与によって腫瘍株細胞の増殖は抑制されることを示した。また続くヒト検体での検討においてヒトの ACTH 産生腺腫でも NMB ならびにその受容体の発現が亢進しており、NMB あるいはその受容体をターゲットとした薬物が Cushing 病の治療として候補となりうることを示した。

本研究により、我々は初めて NMB が下垂体 ACTH 産生細胞に、特に副腎不全状態や腫瘍細胞など増殖・機能が活性化した状態で発現することを見出し、ACTH 産生腺腫による Cushing 病の治療ターゲットとなり得ることを示した。今後研究を進め、Cushing 病の治療法の進歩に貢献できることが望まれる。

6. 謝　辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学分野博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同分野教授渥美達也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて頂き、その遂行にあたって終始ご指導を頂きました。ここに深謝の意を表します。

北海道大学大学院医学研究科名誉教授小池隆夫先生は教授退官まで親身になってご指導、ご助言を賜りました。また、退官後も温かい励ましのお言葉を頂きました。ここに深謝の意を表します。

北海道大学病院検査・輸血部准教授清水力先生には実験の始めから全てにわたりご指導、ご助言を賜りました。ここに深謝の意を表します。

東京理科大学生命医科学研究所実験動物学研究部門教授岩倉洋一郎先生ならびに埼玉医科大学医学部千田大先生にはMC2R欠損マウスのご提供ならびに実験に対する温かい励ましと実験細部にわたるご助言を頂きました。ここに深謝の意を表します。

本分野講師三好秀明先生、助教近藤琢磨先生、中村昭伸先生、客員臨床講師永井聡先生には終始適切なご助言、また丁寧なご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

本分野助教Olga Amengual先生には論文の作成や学会発表におけるプレゼンテーションなど多大なるご指導を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

また当科実験助手の藤森なつみさん、妹尾智里さん、渡邊真理華さん、大宮みなみさん、野澤あさひさんのご協力なしに実験を遂行することは不可能でした。感謝を申し上げます。この他にも、この論文作成にあたり、ご協力、ご助言、ご支援を頂いた多くの諸先輩方、同僚、後輩の皆様に対しまして心より感謝を申し上げます。

7. 引 用 文 献

1. Chida, D. et al. Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 18205-18210, (2007).

2. Chida, D. et al. Characterization of mice deficient in melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background. Mol. Cell. Endocrinol. 300, 32-36, (2009).

3. Biller, B. M. et al. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 2454-2462, (2008).

4. Oliveira, K. J. et al. Disruption of neuromedin B receptor gene results in dysregulation of the pituitary-thyroid axis. J. Mol. Endocrinol. 36, 73-80, (2006).

5. Winnay, J. N., Xu, J., O'Malley, B. W. & Hammer, G. D. Steroid receptor coactivator-1-deficient mice exhibit altered hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. Endocrinology 147, 1322-1332, (2006).

6. Heisler, L. K. et al. Serotonin activates the hypothalamic pituitary adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. J. Neurosci. 27, 6956-6964, (2007).

7. Cai, K. et al. MCP-1 upregulates amylin expression in murine pancreatic beta cells through ERK/JNK-AP1 and NF-kappaB related signaling pathways independent of CCR2. PloS one 6, e19559, (2011).

8. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-408, (2001).

9. Oomizu, S., Takeuchi, S. & Takahashi, S. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I on proliferation of mouse pituitary cells in serum-free culture. J. Endocrinol. 157, 53-62 (1998).

10. Minamino, N., Kangawa, K. & Matsuo, H. Neuromedin C: a bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 14-20 (1984).

11. Ohki-Hamazaki, H. Neuromedin B. Prog. Neurobiol. 62, 297-312 (2000).

12. Namba, M., Ghatei, M. A., Ghiglione, M. & Bloom, S. R. Effects of decapeptide of mammalian bombesin and neuromedin B on pancreatic exocrine secretion in the rat. Digestion 34, 105-114 (1986).

13. Otsuki, M. et al. Effects of neuromedin B and neuromedin C on exocrine and endocrine rat pancreas. Am. J. Physiol. 252, G491-498 (1987).

14. Siegfried, J. M. et al. Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. Pulm. Pharmacol. Ther. 12, 291-302, (1999).

15. Sun, B., Halmos, G., Schally, A. V., Wang, X. & Martinez, M. Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. Prostate 42, 295-303 (2000).

16. Matusiak, D. et al. Neuromedin B and its receptor are mitogens in both normal and malignant epithelial cells lining the colon. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 288, G718-728, (2005).

17. Namba, M. et al. Presence of neuromedin B-like immunoreactivity in the brain and gut of rat and guinea-pig. Peptides 6 Suppl 3, 257-263 (1985).

18. Malendowicz, L. K. & Nussdorfer, G. G. Investigations on the acute effects of neuropeptides on the pituitary-adrenocortical function in normal and cold-stressed rats. I. Bombesin and neuromedin B. Exp. Toxicol. Pathol. 47, 31-34 (1995).

19. Nishida, Y. et al. Regulation of pituitary gene expression by adrenalectomy. Obesity 17, 114-120 (2009).

20. Steel, J. H. et al. Localization of 7B2, neuromedin B, and neuromedin U in specific cell types of rat, mouse, and human pituitary, in rat hypothalamus, and in 30 human pituitary and extrapituitary tumors. Endocrinology 122, 270-282 (1988).