



Urocortin expression in human pituitary gland and pituitary adenoma

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 飯野, 和美 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1571

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 294号	学位授与年月日	平成11年 2月19日
氏名	飯野和美		
論文題目	Urocortin expression in human pituitary gland and pituitary adenoma (ヒト正常下垂体および下垂体腺腫におけるウロコルチンの発現)		

博士(医学) 飯野和美

論文題目

Urocortin expression in human pituitary gland and pituitary adenoma

(ヒト正常下垂体および下垂体腺腫におけるウロコルチンの発現)

論文内容の要旨

[はじめに]

1995年 Vaughan らによって発見された新しい神経ペプチド、ウロコルチン (Ucn) は視床下部ホルモンである ACTH 放出因子 (CRF) と45%の homology を有し、CRF 受容体や CRF 結合蛋白に、CRF と同程度、またはそれ以上の親和性を持って結合する。しかし、その生理学的作用、また全身組織や中枢神経系における発現動態は未解明である。我々はヒト Ucn と共通の部位であるラット Ucn21-35 を家兎に免疫し、CRF と交差しない抗 Ucn 血清を作製した。この抗体を用い Ucn のヒト中枢神経系、特に下垂体における発現をラジオイムノアッセイ (RIA)、免疫染色、にて検討した。また下垂体における Ucn mRNA の発現を reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) 法、in situ hybridization (ISH) にて検討した。

[材料と方法]

剖検にて得られたヒト正常脳、および正常下垂体を PO4/EDTA 緩衝液でホモゲネート後、上清中の Ucn を RIA にて測定した。正常下垂体 3 例より調整した total RNA を用い RT-PCR 法にて Ucn mRNA の発現を検討した。免疫染色は、10%ホルマリンで固定、パラフィン包埋後、抗原賦活処理を行いストレプトアビジン・ビオチン法にて施行した。ISH は 4%パラホルムアルデヒド+0.5%グルタルアルデヒドで固定後、28 base の Ucn ビオチン化オリゴヌクレオチドをプローブに用い施行した。手術にて得られた 52 例の下垂体腺腫組織についても免疫染色、ISH を施行した。

[結果]

ヒト下垂体における Ucn 組織内濃度は $103 \pm 39 \text{ ng/g. w. w}$ であり、ヒト中枢神経の他の部位に比し有意に高値を示した。

また RT-PCR 法による検討でヒト下垂体に 145bp の Ucn mRNA に相当する band を認めた。

免疫染色では下垂体前葉細胞に陽性所見が確認された。下垂体茎、後葉の神経線維は陰性であった。下垂体前葉の Ucn 陽性細胞について、ミラー切片を用いて検討したところ、Ucn 陽性細胞の 77% が成長ホルモン (GH) 産生細胞であり、22% がプロラクチン (PRL) 産生細胞であった。副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) については、Ucn と両方の immunoreactivity を示す細胞はほとんど認められなかった。また、ISH にて下垂体前葉細胞に Ucn mRNA の存在が確認された。

GH 産生腫瘍 14 例を含む 52 例の下垂体腺腫については、GH 産生腫瘍 1 例と非機能性腺腫の 1 例を除いて Ucn の発現は認められなかった。

[結論・考察]

ヒト正常下垂体における Ucn の組織内濃度が他の中枢神経部位に比し有意に高値であることを示した。さらに免疫染色、ISH、RT-PCR 法を用いて、下垂体前葉細胞に Ucn の immunoreactivity、mRNA

が存在すること、またその発現の大部分が GH 産生細胞であること、を証明し初めて報告した。Ucn はこれまでに CRF 受容体への親和性と ACTH 分泌刺激作用が報告されており、GH 産生細胞で産生された Ucn が CRF 受容体を介して ACTH 産生細胞に何らかの作用を及ぼす可能性も示唆された。

一方、ほとんどの腺腫で Ucn の immunoreactivity が失われるという結果が得られ、腫瘍化した GH 産生細胞においては Ucn 産生能が失われることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

新規神経ペプチド、ウロコルチン (Ucn) は視床下部ホルモンの ACTH 放出因子 (CRF) と 43% の homology を有し、CRF 受容体 (CRFR1, CRFR2 α , CRFR2 β) に強い親和性を持つことが知られている。しかし、その生理的作用、中枢神経系における発現様式は未だ良く知られておらず、特にヒトの脳における発現様式に関しては報告がない。申請者らはヒト Ucn との共通の部位であるラット Ucn21-35 を家兎に免疫し、CRF と交差抗原性のない抗ヒト Ucn ポリクローナル抗体を作製し、この抗体を用いてヒト正常脳、正常下垂体の剖検標本および下垂体腺腫摘出標本について Ucn の発現を以下の方法にて検討した。

剖検にて得られたヒト正常脳、および正常下垂体ホモゲネート上清中の Ucn をラジオイムノアッセイ (RIA) にて測定した。正常下垂体 total RNA を用いて reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) 法を行い下垂体における Ucn mRNA の発現を検討し、さらに 28 base の Ucn ビオチン化オリゴヌクレオチドをプローブに用いて in situ hybridization (ISH) 法を施行し Ucn mRNA の発現部位を検討した。また、ストレプトアビジン・ビオチン法による免疫組織化学染色法を施行した。また、手術にて得られた 52 例の下垂体腺腫組織についても免疫染色と ISH を施行した。

ヒト下垂体における Ucn 組織内濃度は、ヒト中枢神経系の他部位 (大脳皮質、小脳、中隔核、視床下部、外側上オリブ核、Edinger-Westphal 核) に比し有意に高値を示し、RT-PCR 法による検討でもヒト下垂体に Ucn mRNA を同定した。また、ISH にて下垂体前葉細胞に Ucn mRNA の存在を確認し、免疫染色でも下垂体前葉細胞に陽性所見が確認された。以上より、ヒト下垂体前葉細胞に Ucn および Ucn mRNA の発現を確認した。しかし下垂体基、後葉の神経腺腫は Ucn、Ucn mRNA とともに陰性であった。下垂体前葉の Ucn 陽性細胞について、ミラー切片および二重免疫染色を用いて検討した結果、Ucn 陽性細胞の 77% が成長ホルモン (GH) 産生細胞であり、22% がプロラクチン (PRL) 産生細胞であり、Ucn と GH は同一細胞で共存していた。これとは対照的に、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) については、Ucn との共存を示す細胞はほとんど認められなかった。また、GH 産生腫瘍を含む下垂体腺腫例についてはほとんど Ucn の発現を認めなかった。

以上から、ヒト正常下垂体前葉に Ucn、Ucn mRNA が高度に発現しており、その大部分が GH 産生細胞であることが証明された。Ucn はこれまでに CRF 受容体への親和性と ACTH 分泌刺激作用が報告されており、本論文の結果より下垂体で産生された Ucn が CRF 受容体を介して ACTH 産生細胞に何らかの作用を及ぼす可能性が示唆された。一方、ほとんどの腺腫で Ucn 産生能がないことから、腫瘍化した GH 産生細胞においては Ucn 産生能がないことが示唆された。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) ISHプローブにオリゴヌクレオチドを用いた理由
- 2) ACTH放出に関して下垂体のUcnと視床下部のCRFとどちらの作用が強いと考えるか
- 3) 下垂体腺細胞におけるUcnとGHの共存の生理的意味
- 4) 2重染色とミラー切片の両者を用いて免疫染色した理由
- 5) Ucn産生細胞は腺腫になりにくいと考えることは出来ないか
- 6) ラットで報告されたUcnの脳内分布とどう違うのか、特にラット下垂体での発現について
- 7) RT-PCRのネガティブコントロールに何を用いたか、RT-PCR産物の塩基配列を確認したか
- 8) ヒトUcn抗体の認識部位としてラットとの相同部位を選んだ理由
- 9) UcnとCRFの受容体結合親和性に差があるのなら、作用が相加的になることと矛盾しないか
- 10) Ucnの摂食抑制作用の機序について
- 11) 少ない標本数でUcn含有量を比較するのに統計をもちいたか
- 12) Ucnの血管拡張作用持続時間がCRFより長いのはなぜか
- 13) Ucnのみを産生する下垂体細胞はあるのか
- 14) UcnとCRFの投与による作用の違いをみた報告はあるか
- 15) Ucnは実際に下垂体で放出され、下垂体からのACTH放出に働くのか
- 16) Ucn産生細胞は下垂体細胞全体の何%になっていたか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 福田 敦 夫

副査 教授 植村 研 一 副査 教授 中原 大 一 郎