

氏名	相澤 清香
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 859 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	下垂体隆起部における甲状腺刺激ホルモンの制御機構
論文審査委員	委員長 教授 坂井 貴文 委員 教授 小林 哲也 委員 教授 西垣 功一 委員 准教授 足立 明人 委員 准教授 塚原 伸治

論文の内容の要旨

下垂体前葉はホルモン内分泌器官として知られ、下垂体主部と下垂体隆起部から構成される。下垂体主部についてはホルモン産生制御機構や生理学的解析等多くの研究がなされているのに対し、下垂体隆起部は、正中隆起を覆う薄い細胞層として存在する組織でありその採取や摘除が難しいために、ホルモン制御機構や生理的機能について研究が進んでいない。隆起部の細胞構成は主部とは大きく異なり、主に糖タンパク質ホルモン産生細胞(甲状腺刺激ホルモン産生細胞、性腺刺激ホルモン産生細胞)と濾胞星状細胞から構成される。また、隆起部にはメラトニン受容体が高密度に存在し、生物時計を作り出す時計遺伝子が日内リズムを持って発現していることが報告されている。これらの特徴から、隆起部はメラトニンや生物時計を作り出す季節的、日周的メッセージを内分泌系に仲介する部位であると考えられている。しかしながら、隆起部におけるホルモン産生とメラトニンや時計遺伝子の関係は不明であり、隆起部の生理的意義の理解のためには、隆起部のホルモン制御メカニズムの解明が必要であると考えられる。

そこで本研究は、下垂体隆起部において主に産生されるホルモンである甲状腺刺激ホルモン(TSH)産生細胞に着目し、隆起部 TSH の mRNA 発現及び産生の制御機構を明らかにすることを目的とした。まず、TSH β 、 α -glycoprotein hormone subunit (α GSU)mRNA 発現および TSH 免疫染色性の日内変動を検討した。その結果、明暗周期下において、ラット隆起部における TSH β 、 α GSU mRNA 発現は顕著な日内変動を示し、両サブユニット mRNA とも Zeitgeber Time (ZT) 0、4 において発現が低く、ZT12 から ZT20 に高い発現を示した。TSH 免疫染色性にも日内変動が見られ、ZT4 で最も弱く、その後 ZT8 から ZT20 で強い染色性を示した。興味深いことに、細胞内免疫染色性の局在にも変化が見られ、染色性の弱い ZT4 においてはゴルジ装置が強く染色されたが、ZT8 から ZT20 においてはゴルジ装置のみならず、細胞質全体も強く染色されていた。また、下垂体主部における TSH β mRNA 発現は、隆起部に比べるとその変動幅は小さかったが、ZT20 で同様にピークとなる日内変動を示した。

次に、隆起部にはメラトニン受容体が高密度に存在するため、メラトニンによる TSH 調節作用を *in vivo* において検討した。その結果、メラトニン投与によって隆起部における TSH β 、 α GSU mRNA 発現は著しく低下したのに対し、TSH 免疫染色性は逆に増強されていた。以上の結果より、隆起部における TSH β 、

α GSU mRNA 発現は、メラトニンによる抑制的な制御より日内変動を持つことが強く示唆された。

隆起部の TSH 産生細胞は、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) 受容体と甲状腺ホルモン (TH) 受容体 TR β を産生しないことから、隆起部には下垂体主部で見られる TRH と TH によるフィードバック制御機構が存在しないと考えられている。しかしながら、隆起部 TSH β 及び α GSU mRNA 発現に対するメラトニン以外の制御因子は不明であり、受容体を含めた種々の遺伝子の発現に対する知見が少ないために解析が進んでいなかった。そこで、隆起部における遺伝子発現を網羅的に検討し、TSH 発現制御因子を探索するために、レーザーマイクロダイセクション法によって得られた隆起部組織より抽出した Total RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、これまでの報告から明らかにされていたメラトニン受容体タイプ 1 (MT1)、アデノシン受容体 A2B の mRNA の高発現に加えて、新たにイオンチャンネル共役型グルタミン酸受容体カイニン酸型 2 (KA2) mRNA が高発現していることが見出された。また細胞外からグルタミンを取り込むグルタミントランスポーターのひとつである ATA2 も高発現していた。さらに、グルタミン酸の代謝、合成に関わるその他の因子としてグルタミナーゼ GlS 及び GlS2 の発現も確認された。

以上の結果を受けて、グルタミン及びグルタミン酸の隆起部 TSH への影響を検討するために *in vitro* 隆起部スライス培養実験を行った。その結果、1 mM グルタミンまたは 1 mM グルタミン酸は隆起部 TSH β mRNA 発現を有意に増加させた。グルタミンは添加後 4 時間から TSH β mRNA 発現を増加させたのに対し、グルタミン酸は添加後 2 時間から顕著に TSH β mRNA 発現を増加させた。これは、隆起部ではグルタミントランスポーターにより細胞外から取り込まれたグルタミンがグルタミン酸に変換され、オートクラインもしくはパラクライン様式でイオンチャンネル型受容体 KA2 に作用し、TSH β mRNA 発現を促進させていることを示唆している。一方、このグルタミン及びグルタミン酸の影響は隆起部 α GSU mRNA 発現と下垂体主部 TSH β と α GSU mRNA 発現に対してはみられなかった。

以上の結果から、隆起部における TSH β mRNA 発現及び産生は、下垂体主部とは異なる制御機構により調節を受けていることが明らかとなった。隆起部における TSH β mRNA 発現はグルタミン酸がオートクラインまたはパラクライン様式にグルタミン酸受容体 KA2 に作用することで促進され、メラトニンによる抑制的な制御を受けることにより日内変動を持つことが示唆された。

論文の審査結果の要旨

相澤清香氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成 24 年 2 月 8 日に理学部 11 番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に、審査結果の概要を示す。

下垂体前葉はホルモン内分泌器官として知られ、下垂体主部と下垂体隆起部から構成される。下垂体主部についてはホルモン産生制御機構や生理学的解析等多くの研究がなされているが、下垂体隆起部は、正中隆起を覆う薄い細胞層として存在する組織でありその採取や摘除が難しく、ホルモン制御機構や生理的機能について研究が進んでいない。隆起部はその細胞構成や転写調節機構等で下垂体主部とは異なる特徴を持つことが報告されている。隆起部のホルモン産生細胞は、糖タンパク質ホルモン産生細胞（甲状腺刺激ホルモン産生細胞、性腺刺激ホルモン産生細胞）がその多くを占め、他の下垂体前葉ホルモン（成長ホルモン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン）産生細胞が存在しない。また、隆起部にはメラトニン受容体が高密度に存在するため、隆起部はメラトニンの季節的、日周的なメッセージを内分泌系に仲介する役割をもつ部位であると考えられている。しかしながら、隆起部におけるホルモン産生と分泌調節に関する研究はほとんどなく、隆起部の生理的意義を理解するためには、隆起部のホルモン発現、分泌制御メカニズムの解明が必要であると考えられる。そこで申請者は、下垂体隆起部の主な産生ホルモンである甲状腺刺激ホルモン（TSH）に着目し、隆起部 TSH β 及び α サブユニット（ α GSU）の mRNA 発現及び分泌の制御機構を明らかにするための一連の研究を行った。本偏に述べられている主要な研究成果は以下の通りである。

第一章では、隆起部における TSH β 、 α GSU mRNA 発現および TSH 免疫染色性の日内変動について記述している。申請者は、明暗周期下で飼育された Wistar 系オスラットを用いて、隆起部における TSH β 、 α GSU mRNA 発現が顕著な日内変動を示し、明期である Zeitgeber Time (ZT) 0、4 において発現が低く、暗期である ZT12 から ZT20 に高い発現を示すことを明らかにした。TSH 免疫染色性にも同様の日内変動が見られ、ZT4 で最も弱く、その後 ZT8 から ZT20 で強い染色性を示した。次に申請者は、隆起部にはメラトニン受容体が高密度に存在することに着目し、メラトニンによる TSH 調節作用を *in vivo* において検討した。その結果、メラトニン投与によって隆起部における TSH β 、 α GSU mRNA 発現は著しく低下し、メラトニンの抑制的な制御の存在が示された。興味深いことに、メラトニンによって TSH 免疫染色性は、逆に増強されることが示された。このことは、メラトニンは隆起部における TSH β 、 α GSU mRNA 発現を抑制するだけでなく、TSH 分泌も抑制している可能性を示唆している。

第二章では、隆起部 TSH β 、 α GSU mRNA 発現の制御に関わるメラトニン以外の因子、特に促進的な制御をもたらす因子の同定を目的に、申請者はまず、マイクロアレイ解析を行い、隆起部に発現する受容体を網羅的に解析した。その結果、隆起部における高発現が知られているメラトニン受容体タイプ 1 (MT1) 以外に、新たにイオンチャンネル共役型グルタミン酸受容体カイニン酸型 2 (KA2) mRNA が高発現していることが見出された。さらに、局所的にグルタミンからグルタミン酸を合成するのに必要であるグルタミントランスポーター ATA2、グルタミナーゼ Gls 及び Gls2 mRNA の発現も確認された。このことから、隆起部では局所的にグルタミンからグルタミン酸を合成し、それが KA2 受容体に作用している可能性が示唆された。

以上の結果を受けて、第三章では、グルタミン及びグルタミン酸の隆起部 TSH への影響を、*in vitro* 隆起部スライス培養実験にて検討している。その結果、グルタミン及びグルタミン酸刺激は隆起部 TSH β mRNA 発現を有意に増加させることが明らかとなった。グルタミン酸はグルタミンに比べて、より強い作用を示し、グルタミン酸刺激 2 時間後から有意な TSH β mRNA 発現の増加がみられた。このことは、隆起部において、グルタミントランスポーターにより細胞外から取り込まれたグルタミンが、グルタミナーゼによってグルタ

ミン酸に変換され、オートクラインもしくはパラクライン様式でイオンチャンネル型受容体 KA2 に作用し、TSH β mRNA 発現を促進させていることを示唆している。しかしこの作用は、隆起部 α GSU mRNA 発現に対しては見られず、また下垂体主部 TSH β 、 α GSU mRNA 発現に対してもみられなかった。また、グルタミン及びグルタミン酸は隆起部において有意に TSH β mRNA 発現を増加させたにもかかわらず、TSH 免疫染色性を変化させなかった。しかしグルタミン酸刺激により培養液中の TSH 濃度が有意に増加したことから、グルタミン酸は隆起部 TSH β mRNA の転写を促進し、それに伴い TSH 産生が増加し、産生された TSH は細胞内に蓄積されることなく構成性に細胞外へ分泌されるものと考えられる。

以上の検討により、隆起部における TSH β mRNA 発現及び産生は、下垂体主部とは全く異なる制御機構により調節を受けていることが明らかになった。隆起部における TSH β mRNA 発現は、グルタミン酸がオートクラインまたはパラクライン様式にグルタミン酸受容体 KA2 に作用することで促進され、夜間後半にメラトニンによる抑制的な制御を受けることにより日内変動を持つことが示唆された。

以上、本論文により示された新しい知見は、(1)ラット下垂体隆起部における TSH β 及び α GSU mRNA 発現は、明期に低く暗期前半に高くなるが、その後夜間後半に顕著に低くなる日内変動を示し、またこの変動は、血中メラトニンによって調節を受けること、(2)ラット隆起部にはイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 KA2 が高発現し、グルタミン酸合成経路も存在すること、さらに (3)グルタミン及びグルタミン酸は隆起部における TSH β mRNA 発現を有意に増加させること明らかにした。これらの結果は、これまで不明であった隆起部における TSH 発現及び分泌の制御機構を明らかにしたもので、隆起部の生理的意義の解明に大きく貢献するものである。また、相澤氏は本論文の内容を第一著者として査読付英語論文 2 編に発表している。なお、本論文の内容の一部は第 26 回日本下垂体研究会学術集会にて発表し、特別優秀発表賞を受賞したことを付記しておく。これらの成果から、本審査委員会は、本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものと判断した。