

主 論 文

Regulatory role of melatonin and BMP-4 in prolactin production by rat pituitary lactotrope GH3 cells

(メラトニンによる下垂体プロラクチン分泌調節メカニズムの研究)

【緒言】

Melatonin は松果体で合成されるホルモンであり、生体内において概日リズムや季節変動の形成に重要な役割を果たす。Melatonin は全身臓器に発現する melatonin 受容体 (MT1/MT2) を介して作動するほか、受容体を介さない機序での作用も有し、臨床的には抗酸化作用や腫瘍抑制効果が報告されている。ヒト以外の脊椎動物においては melatonin が概日リズムのみならずホルモンやサイトカインの分泌調節に寄与することが報告されている。これまでに melatonin は副腎に直接作用して ACTH によるグルココルチコイド産生を抑制するという報告があり、我々は以前 ACTH 産生細胞において melatonin が骨形成蛋白 (BMP) -4 シグナルを介して ACTH 分泌を抑制することを報告した。BMP は TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子であり、卵巣・下垂体・甲状腺・副腎等の内分泌組織に発現していることや、BMP システムが内分泌機能調節に様々な作用を有することが知られる。下垂体においては BMP-4 が Pit-1 遺伝子発現に影響しており下垂体の器官形成への関与や、プロラクチン (PRL) 産生腫瘍における BMP-4 発現亢進等が報告されており、下垂体組織の分化や腫瘍発生に重要な役割を有していると考えられている。下垂体の PRL 産生における melatonin の調節機序はまだ明らかとなっておらず、今回 PRL 産生細胞である GH3 細胞を用いて、下垂体に発現する BMP-4 に着目して melatonin の PRL 産生への影響について検討した。

【材料と方法】

試薬と材料

ラット下垂体腫瘍細胞である GH3 細胞を使用した。培地として Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) / Ham F-12 medium (F12)、10% fetal calf serum albumin (FCS)、penicillin-streptomycin solution (Sigma-Aldrich Co.Ltd.) を使用した。培養試薬として BMP-4 (R&D Systems)、forskolin (FSK)、N⁶,O²-dibutyryl adenosine-3',5'-cyclic monophosphate monosodium salt (Bt-cAMP)、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、melatonin、MT1/MT2 agonist : ramelteon (Takeda Pharmaceutical Co.Ltd.より提供)、MT1/MT2 antagonist : luzindole (Sigma-Aldrich Co.Ltd.) を使用した。MAPKs 阻害薬として H-89 (PKA inhibitor ; Sigma-Aldrich Co.Ltd.)、U0126 (ERK inhibitor)、SB203580 (P38-MAPK-inhibitor ; Promega Corp.)、SP600125 (SAPK/JNK inhibitor ; Biomol Lab.Inc.) を使用した。

細胞培養と cAMP 測定

GH3 細胞は 10%FCS、抗生剤を含む DMEM/F12 培地にて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。96 well-plate に 1×10⁵ cells/well で 24 時間の予備培養の後、無血清培地に変更し FSK、melatonin、ramelteon、BMP-4 を添加し 24 時間培養後に培養液上清の cAMP を EIA 法 (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, US) にて測定した。

PRL 測定

10%FCS、抗生剤を含む DMEM/F12 培地にて 96 well-plate に 1×10⁵ cells/well で 24 時間の予備培養の後、無血清培地に変更した上で FSK、melatonin、ramelteon、BMP-4 を添加し 24 時間培養後に培養液上清中の PRL を EIA 法にて測定した (SPI-BIO, France.)。

RNA 抽出、real-time PCR 解析

10%FCS、抗生剤を含む DMEM/F12 培地にて 12 well-plate に 3×10⁵ cells/well で 24 時間の予備培養の後、無血清培地に変更し、FSK、Bt-cAMP、melatonin、ramelteon、luzindole、BMP-4、その他 MAPKs 阻害薬を添加し、24 時間培養後に TRIzol (Invitrogen, CA) を用い total RNA を抽出した。RNA (1 μ g) より逆転写を行い cDNA を作成した。MT1/MT2 について RT-PCR を行い電気泳動を行った。PRL、MT2、BMP 標的遺伝子である Id-1 の mRNA 発現レベルを real-

time PCR 法にて定量化し、各データは ribosomal protein L19 (RPL19) 発現量で標準化した。

ウエスタンブロット法

12 well-plateに 3×10^5 cells/wellで24時間の予備培養の後、無血清培地に変更の上で、FSK、melatonin、ramelteon、luzindoleを添加し24時間培養後、一部の実験ではBMP-4を添加し1時間刺激した。その後RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology, US) で細胞を溶解し、SDS-PAGEにて展開した後、抗リン酸化Smad1/5/8 (9) 抗体、抗リン酸化ERK1/2抗体 (pERK/tERK)、抗リン酸化P38抗体 (pP38/tP38)、抗リン酸化SAPK/JNK抗体 (pJNK/tJNK; Cell Signaling Technology, Inc.)、抗actin抗体 (Sigma-Aldrich Co.Ltd.) を用いてイムノブロット解析を行った。各シグナル強度はC-DiGit Blot Scanner System (LI-COR Bioscience, US) により解析した。

統計解析手法

全ての結果は少なくとも3回以上の実験データの平均値 \pm 標準誤差で示した。各群の有意差はANOVA及びt検定によって解析しP値 <0.05 を有意とした。

【結果】

GH3 細胞に MT1・MT2 の発現を確認したが正常下垂体とは対照的に MT2 発現が優位であった。GH3 細胞においては FSK 誘導にて PRL mRNA の有意な上昇を認め、melatonin (10-100 μ M) 及び MT1/MT2 agonist : ramelteon (10-100 μ M) は濃度依存性に PRL mRNA 産生に対して抑制作用を認めた。PRL mRNA の抑制作用は melatonin に比して ramelteon の方が強かった。また、melatonin (100 nM) による PRL mRNA 産生の抑制効果は MT1/MT2 antagonist : luzindole (100-1000 nM) 投与により解除されることから、melatonin の PRL 産生調節に MT2 が関与している可能性が示された。Melatonin (100-1000 nM)、ramelteon (100-1000 nM) はいずれも細胞培養液中の PRL 産生に対して抑制効果を認め、特に ramelteon では有意な抑制効果を示した。

GH3 細胞において、BMP-4 は Smad/ER complex のクロストークおよび細胞内 cAMP 上昇を介して PRL 産生に寄与することが報告されている。今回の検討では BMP-4 (100 ng/ml) 刺激により Smad1/5/8 をリン酸化し、リン酸化刺激は melatonin および ramelteon 処理にて減弱を認めたが、luzindole 刺激により再び抑制が解除され、GH3 細胞における PRL 産生調節に MT2 受容体を介した機序が示唆された。BMP 標的遺伝子である Id-1 mRNA における検討では、BMP-4 および FSK 誘導性の Id-1 mRNA 上昇は melatonin (10-100 nM) 及び ramelteon (10-100 nM) 処理にて抑制効果を認めた。Id-1 mRNA 抑制効果は melatonin と比して ramelteon が優位であった。また、BMP-4 添加にて MT2 mRNA 発現上昇を認めた。

GH3 細胞の PRL 産生調節における細胞内シグナルについての検討では、melatonin、ramelteon は cAMP 産生の抑制効果を認めた。Ramelteon は FSK および BMP-4 誘導性の cAMP 上昇を有意に抑制することより、MT2 作用が cAMP を介する可能性が示唆された。一方で melatonin、ramelteon とともに Bt-cAMP 誘導性の PRL mRNA 産生に対しては抑制効果を認めなかった。

次に melatonin の PRL 産生調節における MAPKs 関与について検討した。GH3 細胞においては、FSK 刺激にて P38、SAPK/JNK と比して ERK のリン酸化傾向が強く、melatonin、ramelteon 刺激によりともに ERK リン酸化の抑制効果を認めたが、melatonin と比して ramelteon の ERK リン酸化抑制が有意であった。MAPKs 阻害剤 (H-89, U0126, SB203580, SP600125) を用いた検討では、H-89 (PKA inhibitor)、U0126 (ERK inhibitor) が FSK 誘導性の PRL mRNA 上昇に対して有意な抑制効果を認めた。これらの結果より cAMP-PKA のみならず ERK シグナルが MT2 を介した PRL 産生調節に寄与している可能性が示唆された。

【考察】

本研究では melatonin が BMP-4 と協調的に作用して PRL 分泌調節に寄与し、その作用は主に MT2 を介することが示された。GH3 細胞では melatonin、MT agonist : ramelteon による MT 活性化により、基礎および FSK 誘導性の PRL 分泌および PRL mRNA 発現レベルを抑制した。

MT は中枢神経系組織に広く発現し、ヒトおよびその他の脊椎動物においては melatonin 作用は主に MT1 を介することが報告されているが、今回用いた GH3 lactotrope 細胞においては

MT1・MT2 両者の発現を認め、MT2 が優位であった。Melatonin は MT を介さない機序においても様々な作用を有するが、GH3 細胞における melatonin の PRL 産生の抑制作用は MT antagonist : luzindole により解除されることより MT2 を介した作用が推察される。

これまでに魚類（マス）の下垂体細胞において melatonin が PRL 分泌抑制作用を有し、FSK 誘導性の cAMP 産生に対して melatonin が抑制的に作用することや、エストロゲン誘導によるラット下垂体 PRL 産生細胞において、melatonin は下垂体細胞のアポトーシスを誘導し、その作用には bcl-2 抑制および bax 誘導を伴うことが報告されている。また、霊長類（ヒヒ）の正常下垂体培養細胞において melatonin は lactosomatrope 細胞の MT1 に直接作用し、adenylcyclase (AC) -PKA および PLC 経路を介して PRL 及び GH 分泌レベル上昇をきたすことが報告されている。

今回の検討では、GH3 細胞において MT 活性は MT2 が主体であり、基礎および BMP-4、FSK 誘導性の PRL 産生に対して melatonin は抑制的に作用することが示された。PRL 産生抑制効果は BMP-4・FSK 誘導性の cAMP 上昇および ERK リン酸化の抑制を伴った。一方で PKA を介した Bt:cAMP 刺激による PRL 産生増加に対しては melatonin、ramelteon ともに抑制効果を認めなかった。このことより GH3 細胞における melatonin の PRL 産生の抑制機序として、MT2 を介した BMP 受容体シグナルおよび cAMP-PKA 系の抑制が示唆される。

我々が以前 corticotrope 細胞において行った検討では、melatonin、ramelteon は CRH 誘導性の ACTH 産生に対して抑制的に作用した。また、corticotrope 細胞においては BMP-4 刺激により MT1 発現が亢進し、MT1 活性により BMP-4 誘導性の Smad リン酸化を認め、BMP-4 と melatonin は異なる機序にて CRH 誘導性の ACTH 産生を抑制することが示された。一方で、今回検討に用いた GH3 細胞においては、MT2 活性は PRL 産生において BMP-4 誘導性の Smad リン酸化および cAMP 産生に対して抑制的に作用することで PRL 産生を抑制した。MT agonist : ramelteon は melatonin と比して MT に対して高い親和性を有し (MT1: 6 倍、MT2: 3 倍 (vs. melatonin))、PRL 産生の抑制効果は melatonin と比較し ramelteon の方が有意に高かった。GH3 細胞においては MT2 発現が優位であり、melatonin 作用は MT2 を介した機序が示唆された。

これまでに D2 レセプター欠損マウスにおける PRL 産生腺腫、エストロゲン誘導のラット下垂体組織、およびヒト PRL 産生腺腫において、BMP-4 の過剰発現が報告されている。また、GH3 細胞においては ALK-6 の発現を認めず、ALK-3 及び BMP type II 受容体が BMP-4 の PRL 産生及び cAMP 産生制御に関与しているものと考えられている。BMP-4 は Smad-ER の相互作用により lactotrope 細胞の増殖や PRL 産生に関与する。GH3 細胞では MT2 活性は PRL 産生に抑制的に作用し、BMP-4 は MT2 を upregulate することより PRL 産生においてフィードバック調節を行っているものと推察され、BMP-4-Smad・ER の相互作用による PRL 産生調節が示唆された。

GH3 細胞において、MT agonist : ramelteon は PRL 産生および BMP-4 シグナルに対して抑制的に作用した。PRL 産生腺腫は下垂体機能性腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍であり、治療に際してはドパミンアゴニストが第一選択となるがしばしば治療抵抗性の症例が散見される。Melatonin の BMP システムを介した melatonin 作用による PRL 産生抑制効果は、今後機能性 PRL 産生腫瘍において治療選択肢の一つとなり得る可能性があり、今後も更なる検討が必要と考えられる。

【結論】

Lactotrope GH3 細胞において、melatonin は主に MT2 を介した PRL 産生抑制作用を有する。Melatonin 作用は BMP-4 による Smad のリン酸化および BMP 標的遺伝子 Id-1 の転写を減弱して PRL 発現を抑制し、一方で BMP-4 は MT2 の発現レベルを増加した。また、PRL 分泌には cAMP-PKA の関与の他、ERK 経路の関与が示唆された。

Melatonin は BMP-4 活性の制御、cAMP-PKA 経路および ERK 経路の制御により PRL 産生調節を行っていると考えられ、今後 PRL 産生腫瘍においての臨床応用が期待できる。