

α-メラノサイト刺激ホルモンによるプロラクチン分泌の促進作用

—下垂体中葉による前葉機能の制御機構—

高橋 純夫・松村 龍成・竹内 栄

岡山大学理学部生物学科生体制御科学講座

はじめに

哺乳類の下垂体前葉細胞の機能発現は、視床下部ホルモンや下垂体ホルモンの標的器官から分泌される末梢ホルモンによって制御されている。その一方、下垂体内には、下垂体由来の成長因子等による局所的な制御機構、すなわち「下垂体内制御機構」があると考えられる (Schwartz, 2000; Takahashi, 2004)。「下垂体内制御機構」は、視床下部・標的器官系による中軸的制御機構とは独立に機能するのではなく、相互に情報を交換し協調的に下垂体機能の制御にあたると考えられる。この「下垂体内制御機構」は、下垂体前葉に認められる機構であり、実例としてマウス下垂体の成長ホルモン産生細胞において発現しているインスリン様成長因子 I (IGF-I) に着目し、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 産生細胞の機能制御を明らかにした (Honda *et al.*, 2003)。本稿では、下垂体中葉ホルモンである α-メラノサイト刺激ホルモン (α-MSH) が、前葉ホルモンの一つであるプロラクチン分泌を促進することを示し、下垂体中葉による前葉機能の局所的制御機構の実例を紹介していきたい。

α-MSH、β-MSH、γ-MSH および ACTH は、プロオピオメラノコルチンを前駆体とするホルモンで、メラノコルチンと総称される。ラットやマウスの下垂体前葉においては ACTH が、下垂体中葉においては α-MSH が産生されている。下垂体中葉由来の α-MSH の生理的な役割は不明であったが、我々の研究も含めて最近の研究により α-MSH が下垂体前葉機能の制御に関係することが明らかになってきた。

メラノコルチンは、メラノコルチン受容体を用いて様々な生理作用を制御している。メラノコルチン受容体には 5 種類のサブタイプがあり、マウスの下垂体前葉にはメラノコルチン 3 受容体 (MC3-R) が発現している (Morooka *et al.*, 1998)。我々は、*in situ* hybridization と免疫組織化学の併用により、マウス下垂体前葉における MC3-R mRNA 発現細胞を解析したところ、プロラクチン産生細胞と成長ホルモン産生細胞に MC3-R mRNA が発

現していることがわかった (Matsumura *et al.*, 2003)。このことから、α-MSH はプロラクチン産生細胞に発現する MC3-R を介してプロラクチン産生細胞の機能を制御することが示唆される。そこで、本稿においては α-MSH のプロラクチン産生細胞に及ぼす作用について、マウス下垂体前葉の初代培養系を用いて解析をした。また、MC3-R とメラノコルチン 4 受容体 (MC4-R) の特異的阻害剤である SHU9119 (Schioth *et al.*, 1999) を用いて、α-MSH が作用する受容体の種類を解析した。

材料と方法

マウス下垂体前葉細胞の初代培養

2~3 ヶ月齢の ICR 系雄マウスから下垂体前葉を採取した。下垂体前葉細胞を 0.5% トリプシンと EDTA により単一細胞に解離した (Oomizu *et al.*, 1998)。前葉細胞は、Dulbecco 改変の Eagle 培地と Ham の F12 培地を 1 対 1 に混合した培養液を用いて無血清的に培養した。

RNA 抽出と MC3-R mRNA の解析

下垂体から RNA を Chomczynski and Sacchi (1987) の方法により抽出し Northern 分析を行った。プローブは ³²P-dCTP 標識されたマウス MC3-R cDNA を用いた。

プロラクチンの定量

培養液中のプロラクチンは、米国 National Hormone and Pituitary Program (NHPP) より供与されたキットを用いて酵素免疫定量法により測定した。プロラクチンはビオチンで標識し、プロラクチン量は、NHPP 供与の標準品 (NIDDK-mPRL-RP-AFP-6467C) の重量で表した。

DNA 合成細胞とプロラクチン産生細胞の検出

下垂体前葉細胞は、24 ウェルの培養プレートを用い、poly-L-lysine (Sigma Chemical Co.) により表面処理したカバーガラス上で培養した。DNA 合成細胞は bromodeoxyuridine (BrdU) の核への取り込みを免疫組織化学的に検出することにより同定し、プロラクチンは免疫組織化学的に検出した (Oomizu *et al.*, 1998)。BrdU の検出には、

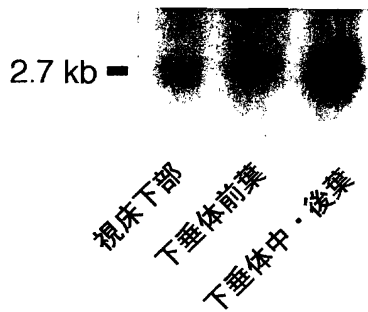


図1 成獣雌マウスにおける MC3-R mRNA の Northern analysis による解析

アマシャム社製キットを用い、プロラクチンの検出にはシキボウ製抗マウス・プロラクチン抗体 (mP-001P) を用いた。

ホルモン処理と MC3-R と MC4-R の特異的阻害剤 SHU9119 処理

培養開始 2 日目から下垂体前葉細胞に α -MSH (Sigma Chemical Co.) を添加した。 α -MSH 作用の時間的変化を調べるために、6 時間ごとに培養液を採取しプロラクチン含量を定量した。SHU9119 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) は、培養液に溶解して下垂体前葉細胞に作用させた (10^{-6} M)。

下垂体前葉細胞の計測と統計処理

カバーガラス上で培養した下垂体前葉細胞を免疫組織化学的染色後に光学顕微鏡を用いて、各カバーガラスより 1000 細胞以上を観察し免疫陽性細胞を調べた。データは分散分析法と Dunnett の多重比較により解析した。 α -MSH のプロラクチン分泌の促進効果の解析については、処理群と対照群の比較は Student の t テストを用いた。

結果

下垂体前葉細胞における MC3-R mRNA の発現

成獣雌マウスの視床下部、下垂体前葉および下垂体中・後葉から RNA を抽出し、MC3-R mRNA の発現を Northern analysis した。下垂体前葉および下垂体中・後葉には視床下部に発現する mRNA と同サイズ (2.7 kb) の MC3-R mRNA が発現することがわかった (図 1)。

α -MSH のプロラクチン分泌に及ぼす効果の解析

成獣雌マウスから採取した下垂体前葉細胞を用いて、 α -MSH のプロラクチン分泌に及ぼす効果を解析した。 α -MSH (10^{-8} M) を培養液に添加し 6 時間毎のプロラクチン分泌量を測定した。

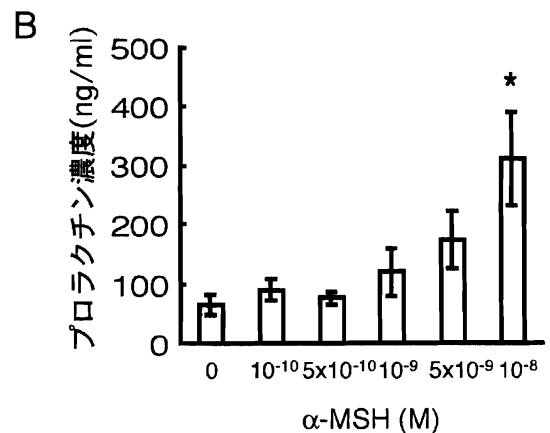
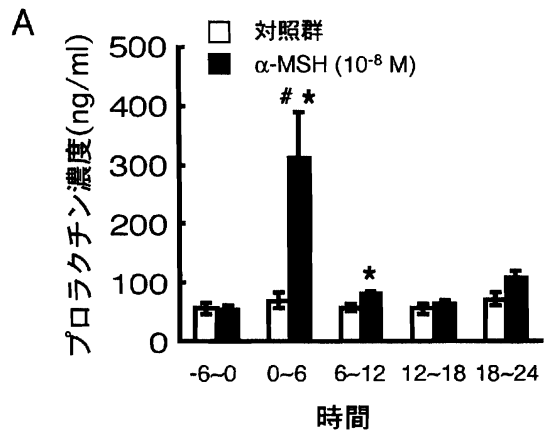


図2 マウス下垂体前葉細胞における α -MSH によるプロラクチン分泌の促進作用の解析

- (A) α -MSH (10^{-8} M) を投与し (0 時)、6 時間毎のプロラクチン濃度を測定した。#: $p < 0.05$, 投与前の値と有意の差; *: $p < 0.05$, 対照群と有意の差
(B) α -MSH 投与 6 時間後におけるプロラクチン濃度の解析 *: $p < 0.05$, 0 M と有意の差

α -MSH 処理によって、培養液中のプロラクチン濃度は、0~6 時間と 6~12 時間において対照群と比較して有意に増加していた (図 2 A, $p < 0.05$)。また、 α -MSH 処理 6 時間後における α -MSH の用量作用についても調べたところ、 α -MSH 添加量の増加につれてプロラクチン濃度は増加していた (図 2 B)。

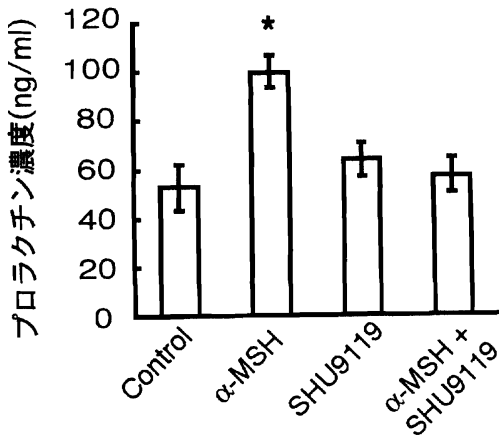


図3 SHU9119による α -MSHのプロラクチン分泌促進作用の阻害の解析
*: $p < 0.05$, 対照群(Control)と有意の差

MC3-Rの阻害剤SHU9119による α -MSH作用の阻害

α -MSHのプロラクチン分泌促進作用に及ぼすSHU9119作用を解析した(図3)。SHU9119 (10^{-6} M)は、単独ではプロラクチン分泌に効果はなかったが、 α -MSH (10^{-8} M)によるプロラクチン濃度の増加を阻害した。

α -MSHのプロラクチン細胞の増殖作用

α -MSHのプロラクチン細胞の増殖に及ぼす効果を解析した。培養した下垂体前葉細胞には、核にBrdUを取り込んだプロラクチン産生細胞が観察され(図4A; 矢印)、プロラクチン産生細胞がDNAを合成し、分裂していることが示された。 α -MSHはBrdUの核へ取り込んだプロラクチン産生細胞数を有意に増加させた(図4B, $p < 0.05$)。SHU9119 (10^{-6} M)は、単独では効果はなかったが、 α -MSH (10^{-8} M)によるプロラクチン産生細胞のDNA合成細胞数の増加を阻害した(図4C)。

考察

ラットにおいて下垂体中・後葉にプロラクチン分泌を促進する因子が存在し(Murai and Ben-Jonathan, 1990; Ellerkmann *et al.*, 1991)、その促進因子の候補物質として α -MSHが考えられてきた(Hill *et al.*, 1993)。本研究によりメラノコルチンの一つである α -MSHが、下垂体前葉のプロラクチン産生細胞に発現するMC3-Rを介して、プロラクチンの分泌を刺激するとともにDNA合成を促進することが明らかになった。

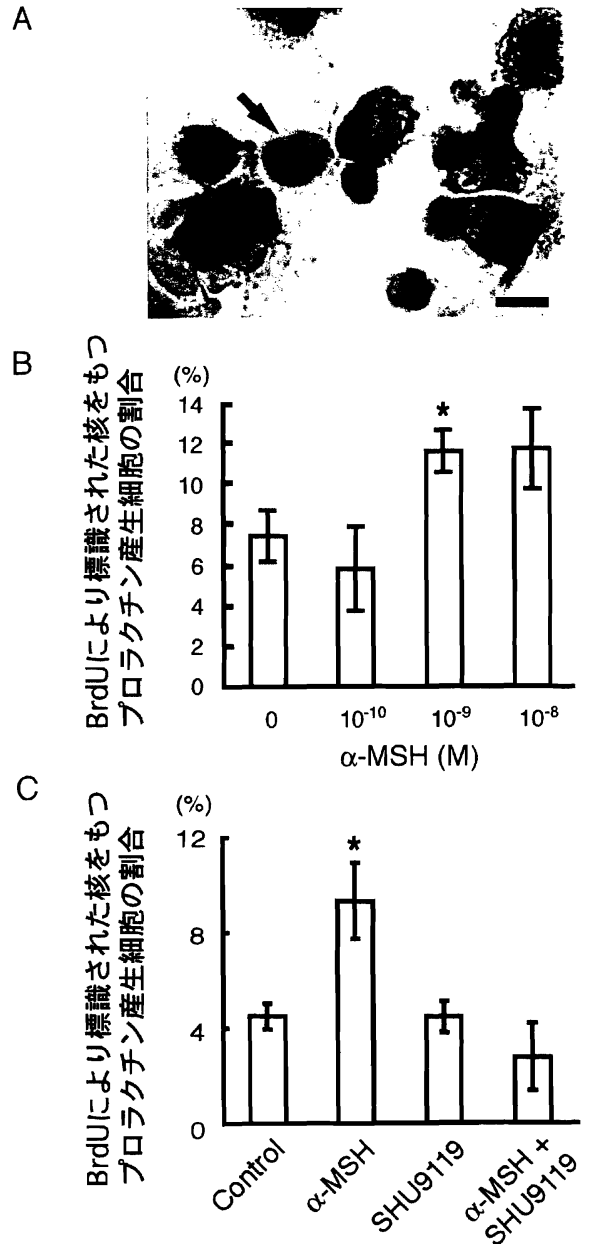


図4 (A) BrdUを取り込んだプロラクチン産生細胞(矢印) スケールは20 μ m,
(B) α -MSHによるプロラクチン産生細胞におけるDNA合成促進作用の解析
*: $p < 0.05$, 対照群と有意の差
(C) SHU9119による α -MSHのプロラクチン産生細胞におけるDNA合成促進作用の阻害の解析
*: $p < 0.05$, 対照群(Control)と有意の差

MC3-Rは、 α -MSHをリガンドとするメラノコルチン受容体の一つである。MC3-Rは、視床下部ニューロンに発現することが知られていたが、本研究により、下垂体前葉、中・後葉においても視床下部に発現するmRNAと同じサイズのMC3-R mRNAが検出されたことから、下垂体細胞においても視床下部ニューロンと同じMC3-Rが発現していることが示唆された。*In situ hybridization*を用いた我々の解析により、前葉においては、 α -MSHはプロラクチン産生細胞と成長ホルモン産生細胞に発現し、中・後葉においては中葉の α -MSH産生細胞に発現していることがわかっている(Matsumura *et al.*, 2003)。したがって、 α -MSHはプロラクチン産生細胞に直接作用してプロラクチン分泌や細胞増殖を制御していることが示唆される。成長ホルモン産生細胞や α -MSH産生細胞にもMC3-Rの発現が示唆されるが、両細胞における α -MSHの生理作用は不明であり今後の解析が必要である。

哺乳中のラットにおける吸飲刺激によるプロラクチン分泌の増加は α -MSHによることが報告されている(Hill *et al.*, 1991)。さらに、発情ホルモンによるプロラクチン分泌の増加には、下垂体中・後葉が存在することが必要である(Murai and Ben-Jonathan, 1990)。本研究では、下垂体細胞培養系において α -MSHは用量依存的にプロラクチン分泌を促進し、 α -MSH作用は投与後12時間まで認められることを初めて明らかにしたものであり、本研究の結果は、 α -MSHが生理的なプロラクチン分泌促進因子であることを強く支持している。

α -MSHは、プロオピオメラノコルチンよりプロセッシングにより生成される。下垂体においては、 α -MSHは主に中葉細胞で産生される。中葉の α -MSHの合成と分泌は視床下部のドーパミンによって制御されている。中葉で分泌された α -MSHは、中葉から前葉に流れる血管系(Murakami *et al.*, 1985)を経由して前葉に運ばれ、前葉細胞機能を制御すると考えられる。

哺乳中の雌ラットではプロラクチン産生細胞数が増加し、プロラクチン分泌も高まっている。哺乳中の雌マウス下垂体中・後葉のプロオピオメラノコルチンmRNAを定量したところ、非哺乳中のマウスと比較して有意に増加していた(未発表)。このことから、哺乳中の雌マウスでは α -MSHの産生が増加していることが推察され、この α -MSHの増加が下垂体前葉からのプロラクチン分泌の亢進やプロラクチン産生細胞の増加に関係していると考えられる。

本稿では、下垂体中葉由来の α -MSHが、前葉のプロラクチン産生細胞の機能を制御する機構が存在する可能性を示した。プロラクチンの分泌は、主に視床下部弓状核ドーパミンと発情ホルモンにより制御されている。中葉の α -MSHによる制御

機構は、哺乳時などの大量なプロラクチン分泌が必要なときに、プロラクチン産生細胞数を増加させ、プロラクチン分泌を高める補助的な機構であると考えられる。我々は、「下垂体内制御機構」として、前葉内における細胞間の局所制御機構を明らかにしてきたが、本稿ではさらに中葉と前葉の間に機能的相関が存在する可能性を示唆した。

引用文献

- Ellerkmann E, Nagy GM, Frawley LS: Rapid augmentation of prolactin cell number and secretory capacity by an estrogen-induced factor released from the neurointermediate lobe. *Endocrinology* 129:838-842 (1991)
- Hill JB, Nagy GM, Frawley LS: Suckling unmasks the stimulatory effect of dopamine on prolactin release: possible role for α -melanocyte-stimulating hormone as a mammatrope responsiveness factor. *Endocrinology* 129:843-847 (1991)
- Hill JB, Lacy ER, Nagy GM, Gorcs TJ, Frawley LS: Does α -melanocyte-stimulating hormone from the pars intermedia regulate suckling-induced prolactin release? Supportive evidence from morphological and functional studies. *Endocrinology* 133:2991-2997 (1993)
- Honda J, Manabe Y, Matsumura R, Takeuchi S, Takahashi S: Insulin-like growth factor-I regulates proopiomelanocortin and growth hormone gene expression in the mouse pituitary gland. *J Endocrinol* 178:71-82 (2003)
- Matsumura R, Takagi C, Kakeya T, Okuda K, Takeuchi S, Takahashi S: α -Melanocyte-stimulating hormone stimulates prolactin secretion through melanocortin-3 receptors expressed in mammatropes in the mouse pituitary. *Neuroendocrinology* 78:96-104 (2003)
- Morooka Y, Oomizu S, Takeuchi S, Takahashi S: Augmentation of prolactin release by α -melanocyte stimulating hormone is possibly mediated by melanocortin 3-receptors in the mouse anterior pituitary cells. *Zool Sci* 15:567-572 (1998)
- Murai I, Ben-Jonathan N: Acute stimulation of prolactin release by estradiol: mediation by the posterior pituitary. *Endocrinology* 126:3179-3184 (1990)

- Murakami T, Ohtsuka A, Taguchi T, Kikuta A, Ohtani O: Blood vascular bed of the rat pituitary intermediate lobe, with special reference to its development and portal drainage into the anterior lobe. A scanning electron microscope study of vascular casts. *Arch Histol Jpn* 48:69-87 (1985)
- 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)
- Schioth HB, Muceniece R, Mutulis F, Bouifrouri AA, Mutule I, Wikberg JE: Further pharmacological characterization of the selective melanocortin 4 receptor antagonist HS014: comparison with SHU9119. *Neuropeptides* 33:191-196 (1999)
- Schwartz J: Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr Rev* 21:488-513 (2000)
- Takahashi S: Intrapituitary regulatory system of proliferation of mammothrophs in the pituitary gland. *Zool Sci* 21:601-611 (2004)