

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	暮地本 宙己
<p style="text-align: center;">学位論文題目</p> <p style="text-align: center;">Sustained treatment with a GnRH agonist (leuprorelin) affects the ultrastructural characteristics of endomembranous organelles in male rat pituitary gonadotropes.</p> <p style="text-align: center;">(GnRH アゴニスト (leuprorelin) 持続投与は下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞の細胞内膜系小器官の微細構造に影響を与える。)</p> <p style="text-align: center;">共著者名</p> <p style="text-align: center;">甲賀 大輔、阪井 裕子、平 義樹、穂坂 正博、牛木 辰男、渡部 剛</p> <p style="text-align: center;">未公表</p> <p style="text-align: center;">研究目的</p> <p>ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) アゴニストである leuprorelin の徐放性製剤は投与初期に強力なゴナドトロピン分泌促進作用を発揮するが、その後 GnRH 受容体の不活性化 (desensitization) を誘起し、逆説的に下垂体からのゴナドトロピンの分泌を長期間にわたり抑制する。この作用を利用して、臨床的には、同剤は性ステロイド依存的に増悪する前立腺癌や乳癌などに対する有効な治療選択肢として、多分野にわたり用いられている。しかし一方で、同剤が直接的な標的細胞である下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞 (LH/FSH 細胞) に対して与える影響、特に同剤投与後に起こる細胞内小器官の微細構造の変化に関しては、これまで殆ど明らかにされていない。そこで本研究では、この leuprorelin 徐放性製剤投与によって生じる LH/FSH 細胞の微細構造の変化の詳細を、免疫組織化学法と電子顕微鏡観察を用いて解析した。</p> <p style="text-align: center;">材料・方法</p> <p>実験動物と実験計画: Wistar 系雄ラット (8 週齢) の背部皮下に GnRH agonist 徐放性製剤 (one-month depot formulation of leuprorelin 3.75mg/ バイアル、武田薬品工業株式会社から供与) を投与 (3mg/kg 体重) した後、1、7、28 日後に下記の解析に供した。また、Wistar 系雄ラット (8 週齢) に両側精巣除去術を行い、2、7、28、56 日後に下記の解析に供した。さらに、両側精巣除去術を行い 56 日経過したラットの背部皮下に上述と同様に GnRH agonist 徐放性製剤を投与した後、1、7、28 日間飼育する実験群も設定し、対照群も含めて計 11 実験群 (各群 15 匹、計 165 匹) の動物を下記の解析に供した。</p> <p>形態学的解析: 常法に従って各実験群の動物を適切な固定液にて灌流固定し、摘出した下垂体を光顕免疫組織化学用 (各群 5 匹) として Epon812 樹脂および O.C.T. compound に、透過電顕観察用として Epon812 樹脂 (各群 3 匹) 及び LR white 樹脂 (各群 4 匹) に包埋し試料を作成した。また、走査電顕観察用 (各群 3 匹) には、AODO 法 (Tanaka et al. 1984, Koga et al. 2006) に従い試料を作成した。光顕用 Epon812 樹脂包埋標本からは準超薄組織切片 (切片厚 0.5µm) を作成し、蛍光抗体法で LH/FSH 細胞における BiP、カルネキシン (CNX)、GM130、TGN38 の分布と局在を検討した。また O.C.T. compound 包埋組織標本からは凍結組織切片 (切片厚 15µm) を作成し、LH/FSH 細胞における LHβ、CNX の細胞内局在を三次元的に再構築し解析した。一方、電顕用 Epon812 樹脂及び LR white 樹脂包埋標本からは超薄切片 (切片厚 80-100 nm) を作成し、抗 LHβ 抗体を用いた電顕免疫組織化学標識 (金コロイド法) により LH/FSH 細胞を同定した後、粗面小胞体やゴルジ装置など細胞内膜系小器官の微細構造や BiP の細胞内局在を実験群間で比較・検討した。さらに、AODO 法を用いて作成した試料を走査型電子顕微鏡で観察し、細胞内膜系小器官の立体的な微細構造を実験群間で比較・検討した。</p>			

成績

Leuprorelin 徐放性製剤投与による LH/FSH 細胞の粗面小胞体の微細構造変化: Leuprorelin 徐放性製剤投与 1 日後の血漿 LH 濃度の急激な上昇に一致して、下垂体前葉の LH/FSH 細胞内に小胞体シャペロンである CNX と BiP の斑状の集積が認められた。同様の小胞体シャペロンの集積は、程度がやや軽いものの、去勢 2 日後の同細胞内にも認められた。電子顕微鏡観察では、刺激された LH/FSH 細胞内に核膜と連続して BiP や CNX が局在する特異な管状細網様の小胞体塊が多数認められた。この特殊な形態の小胞体塊は、同剤投与開始あるいは去勢手術から 7 日後までに消失し、代わりに同細胞内には層板状の粗面小胞体が主として観察された。この粗面小胞体の内腔は、leuprorelin 徐放性製剤投与群では投与後 4 週目まで一定の厚さを維持し、明らかな拡張性の変化は生じなかった。

Leuprorelin 徐放性製剤投与による LH/FSH 細胞のゴルジ装置の変化: 対照群で見られる LH/FSH 細胞の球形のゴルジ装置は、leuprorelin 徐放性製剤投与 1 日後および去勢 2 日後に一過性に断片化し、その後、同剤投与開始あるいは去勢手術から 7 日後までに、断片化していたゴルジ装置は再び核周囲部に集結し球状の構築に復帰した。その後、同剤投与群の LH/FSH 細胞では、球状のゴルジ装置の内腔側の trans-Golgi 領域が徐々に虚脱し扁平化した。

去勢後拡張した LH/FSH 細胞の粗面小胞体に対する leuprorelin 徐放性製剤投与の影響: 去勢手術により持続的に刺激された LH/FSH 細胞内には、手術後 56 日までに粗面小胞体の一部が極めて拡張して巨大な腔が形成される。このような去勢ラットに leuprorelin 徐放性製剤を投与したところ、同剤投与 1 日後には拡張していた同細胞の粗面小胞体腔に細胞質を伴いながら小胞体膜が多数陥入し、粗面小胞体腔は高度に分葉化した。その後、拡張していた同細胞の粗面小胞体腔は徐々に狭小化し、同剤投与開始から 28 日後までには、粗面小胞体は対照群と同様の扁平な層板状に変化することが観察された。

考案

既に多数の研究によって明らかにされているように、去勢手術や GnRH アゴニスト徐放性製剤の投与後初期には、GnRH 受容体を介した情報伝達経路の活性化が起こり、LH/FSH 細胞における性腺刺激ホルモンの生合成と放出が促進される。今回の形態学的解析によって、この時期に一致して同細胞内で、①ゴルジ装置の断片化と②管状細網様構造の小胞体塊の形成が一過性に起こることが示された。同様のゴルジ装置の断片化は細胞分裂時に観察され、この過程ではゴルジ装置の高次構造を維持している GRASP 55/65 のリン酸化制御が重要な役割を果たしている。LH/FSH 細胞においても MAP キナーゼ経路が GnRH 刺激を受けて活性化されることが知られており、本研究で観察されたゴルジ装置の一過性の断片化はこの刺激に起因する可能性が示唆された。一方、GnRH 受容体刺激によって分泌蛋白の生合成亢進のための一連の応答が惹起されるが、その過程で小胞体膜脂質を増やす応答が先行し、粗面小胞体に特有の複合体構成蛋白の生合成が間に合わない可能性がある。その際、小胞体膜と機能蛋白の量的不均衡が原因で、リボゾームの集積密度の低い管状細網様の小胞体塊が生じるのではないかと考えられた。この急性期の後、GnRH アゴニスト徐放性製剤は GnRH 受容体を不応化し LH/FSH 細胞における性腺刺激ホルモン産生を強く抑制するが、今回観察した同細胞内の粗面小胞体やゴルジ装置の微細構造の経時的変化はこの薬理学的作用を形態学的に裏付ける所見であると思われた。さらに去勢手術によってあらかじめ刺激された状態の LH/FSH 細胞に対しても、GnRH アゴニスト徐放性製剤が抑制的に作用することが形態学的に示された。以上の所見は、GnRH アゴニスト徐放性製剤の臨床的な作用機序を裏付けるものであると同時に、ゴルジ装置や小胞体の構造形成・維持機構を解析する上で興味深いものであると思われた。


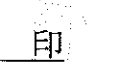

引用文献

1. Kitahara K, Sakai Y, Hosaka M, et al. Effects of a depot formulation of the GnRH agonist leuprorelin on the ultrastructure of male rat pituitary gonadotropes. Archives of histology and cytology. 2007;70(2):79-93.
2. Naor Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. Frontiers in neuroendocrinology. 2009;30(1):10-29.
3. Conn PM, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. Annual review of medicine. 1994;45:391-405.

参考論文

1. 渡部 剛他 内分泌細胞における分泌顆粒形成『顕微鏡』社団法人日本顕微鏡学会出版 vol. 43、No.1、pp29- 34、2008

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	暮地本 宙己
<p>審査委員長 <u>吉田 成孝</u> </p> <p>審査委員 <u>西川 祐司</u> </p> <p>審査委員 <u>渡部 剛</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Sustained treatment with a GnRH agonist (leuprorelin) affects the ultrastructural characteristics of endomembranous organelles in male rat pituitary gonadotropes. (GnRH アゴニスト(leuprorelin)持続投与は下垂体前葉性腺刺激ホルモン産成細胞の細胞内膜系小器官の微細構造に影響を与える。)</p>			
<p>本論文の概要</p> <p>本論文は下垂体前葉性腺刺激ホルモン産成細胞に対して、免疫組織化学法と電子顕微鏡観察により GnRH アゴニストである leuprorelin 徐放性製剤投与による細胞内膜系小器官の微細構造変化を検討したものである。</p> <p>研究方法の適切性</p> <p>本論文では雄性ラットに対し、精巣除去と leuprorelin 投与を組み合わせを行い、下垂体組織に対し、免疫組織化学と走査型および透過型電子顕微鏡観察を行った。いずれも、確立された手法であり、得られたデータの処理方法とその解釈にも問題がないと判断できる。</p>			

新規の知見

本論文以前に leuprorelin 徐放性製剤投与後の上記細胞における分泌顆粒の微細構造については解析されており、投与直後の強いアゴニスト作用とその後の受容体不応化現象による持続的な抑制作用とに呼応した経時的变化を呈することが明らかにされていた。本論文ではこれらに加え、分泌顆粒の上流に位置するゴルジ装置および粗面小胞体の微細構造の変化に関して検討され、以下の知見を得た：(1) leuprorelin 投与により急性期には粗面小胞体が細網状化をきたす；(2) leuprorelin 慢性投与により粗面小胞体は平板化をきたす；(3) leuprorelin 投与により、通常の球状構造のゴルジ装置が細断化される(4) 精巣除去により、肥大化した粗面小胞体は leuprorelin 投与により正常な形態をとるようになる。以上の様に本論文により GnRH アゴニスト投与による細胞内膜系小器官の微細構造変化に関するあらたな重要な知見が加えられた。

科学的小および医学的意義

本論文の知見は下垂体前葉性腺刺激ホルモン産成細胞の微細形態の意義に関する知見をもたらしたのみならず、ホルモン異常症の治療や ER ストレス等の病態時における治療法にもつながる意義があると認められる。

論文の構成

本論文は適切に構成されている。

論文提出者に対して本論文および関連領域に関する試問に対し適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。

以上より、本論文は学位論文として適切なものであると判断される。