

# 主 論 文

## Melatonin regulates catecholamine biosynthesis by modulating bone morphogenetic protein and glucocorticoid actions

(メラトニンによるカテコラミン合成調節メカニズムの解析)

### 【緒言】

副腎においては皮質からの糖質コルチコイドの流入により髄質でのカテコラミン分泌が促進するという皮髄連関が存在する。我々は以前副腎皮質細胞と同様に副腎髄質細胞にも骨形成蛋白(BMP)システムが存在することを報告した。BMPsを含むTGF $\beta$ スーパーファミリーは成長、分化因子であり、アクチビンとともに自己分泌、傍分泌によりステロイド合成調節に関与する。また、内因性BMP-4は副腎髄質に発現しており副腎皮質ホルモンによるカテコラミン合成調節を行っている。

一方で、メラトニンはホルモンやサイトカインの概日リズム、季節変動の形成に重要な働きをしている。メラトニン作用は脳、全身臓器に発現するG蛋白質共役受容体MT1、MT2によって作動する。MT1は多くのほ乳類の副腎細胞で同定されている。副腎皮質ホルモンに対するメラトニンの影響に関して、メラトニンが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る。我々は以前ACTH産生細胞においてメラトニンがBMP-4シグナルを介してACTH分泌を抑制することを報告し、下垂体、副腎それぞれ異なった方法でコルチゾール産生を抑制していることが示された。また副腎皮質細胞においてメラトニンがアクチビンと協調してACTHによるアルドステロン産生を抑制することも報告した。臨床試験でメラトニンにより血圧やカテコラミンレベルが下がったという報告もあり、メラトニンは血圧やカテコラミンレベルを調節することで心血管系の活動や夜間高血圧を調節している可能性がある。

しかし、副腎髄質におけるメラトニンの影響はまた明らかではなく、今回我々は副腎髄質に発現するBMP-4、副腎皮質ホルモンとメラトニンとの相互作用に着目し、メラトニンのカテコラミン産生への影響についてラット褐色細胞腫細胞を用いて検討した。

### 【材料と方法】

#### 試薬と材料

ラット褐色細胞腫細胞であるPC12を使用した。培地としてDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、fetal calf serum albumin (FCS)、horse serum albumin (HS)、penicillin-streptomycin solution (PS)、(Sigma-Aldrich CO. Ltd)を使用した。培養試薬としてBMP-4 (R&D Systems)、d-aldosterone、dexamethasone、dihydrotestosterone (DHT)、2-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、melatonin、luzindole (Sigma-Aldrich CO. Ltd)を使用した。

#### 細胞培養とカテコラミン測定

PC12細胞はRIKEN Cell Bankより購入した。10%FCS、10%HS、1%PSを含むDMEM培地にて37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。12well-plateに3×10<sup>5</sup> cells/wellで24時間の予備培養の後、1%FCS、1%HS、1%PSを含むDMEM培地に変更しmelatoninを添加し24時間培養後に培養液上清と細胞溶解液中のカテコラミン3分画をHPLC法(BML, Inc)にて測定した。

#### cAMP測定

12well-plateに3×10<sup>5</sup> cells/wellで24時間の予備培養の後、1%FCS、1%HS、1%PS、0.1mM IBMXを含むDMEM培地に変更しmelatoninを添加し24時間培養後に培養液上清と細胞溶解液中のcAMPをEIA法(Cyclic AMP EIA Kit, Cayman Co.)にて測定した。

#### RNA抽出、RT-PCRとreal-time PCR解析

12well-plateに3×10<sup>5</sup> cells/wellで24時間の予備培養の後、1%FCS、1%HS、1%PSを含むDMEM培地に変更しmelatonin、BMP-4、d-aldosterone、dexamethasone、DHT、luzindole

を添加し、24時間培養後に TRIzol® (Invitrogen 社)を用い totalRNA を抽出した。RNA(1µg)より逆転写を行い cDNA を作成した。メラトニン受容体 MT1、Mineralocorticoid receptor (MR)、Glucocorticoid receptor (GR)、Androgen receptor (AR) について RT-PCR を行い電気泳動を行った。カテコラミン合成酵素である tyrosin hydroxylase (TH)、3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase (DDC)、dopamine-β-hydroxylase (DBH)と Id1、BMP-4、ALK2、ALK3、BMPR2、Smad6、Smad7、MR、GR、AR 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。

#### ウェスタンブロット法

12well-plateに $1 \times 10^5$  cells/wellで24時間の予備培養の後、無血清培地に変更の上でmelatonin、dexamethasone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社) で細胞を溶解し、SDS-PAGEにて展開した後、抗 MT1 抗体、抗 GR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Smad1/5/8 抗体 (Cell Signaling Technology)及び抗Actin抗体 (Sigma-Aldrich社)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, NE) 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±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】**

#### メラトニンのカテコラミン産生に対する影響

PC12 細胞に MT1 発現を確認した。メラトニンは細胞培養液中、細胞溶解液中のドパミンレベルを抑制した。またメラトニン (0.03 - 3 µM) は 濃度依存性にカテコラミン合成酵素 TH、DDC、DBH mRNA 発現を抑制した。また MT1/MT2 アンタゴニストである luzindole (100nM) によってメラトニン (0.1 - 1 µM) の TH mRNA 発現抑制作用は打ち消され、メラトニンの TH mRNA 抑制作用は MT1 を介していることが示唆された。細胞培養液中、細胞溶解液中の cAMP もメラトニンによって抑制された。

#### カテコラミン合成調節におけるメラトニンと BMP-4 の相互作用

メラトニン (100nM) は BMP-4 (10ng/ml) による Th mRNA 発現抑制作用を増強した。この機序としてメラトニン(100nM)が内因性の BMP-4 発現を増加させることと、BMP 受容体 (ALK2、BMPR2) の発現を増強、抑制性 Smad6/7 の発現を減弱させ BMP シグナルである Smad1/5/8 リン酸化および BMP シグナルの標的遺伝子 Id1 mRNA 発現を増強することが示された。

#### カテコラミン合成調節におけるメラトニンと副腎皮質ステロイドの相互作用

PC12 細胞に MR、GR、AR mRNA 発現を確認した。メラトニン (100 - 1000nM) は GR 発現を増強し内因性 BMP-4 発現を抑制することでグルココルチコイドによる Th mRNA 発現増強作用を促進した。一方でミネラルコルチコイドとアンドロゲンによる Th mRNA 発現増強作用は抑制し、MR、AR 発現には影響を与えなかった。

### **【考察】**

本研究ではメラトニンが BMP-4、グルココルチコイドと協調的に作用しカテコラミン調節に寄与していることが示された。

PC12 細胞ではメラトニン受容体 MT1 のみ発現を認め MT2 は発現を確認できなかった。MT1 の発現はラット、ヒト、霊長類の副腎で確認されているが、MT2 はラットの副腎による RT-PCR で検出したという報告が1研究しかない。MT1/MT2 受容体アンタゴニストであるルジンドール単独では TH mRNA 発現に影響はなく PC12 での内因性メラトニン産生は無視できるものと考えられた。ルジンドールはメラトニンのカテコラミン産生抑制作用を打ち消し、メラトニンのカテコラミン抑制作用は MT1 を介した機序と考えられた。メラトニンが直接カテコラミン産生を抑制

するメカニズムについて、PC12において高濃度のメラトニンがcAMPに影響せずカルシウムチャンネルの興奮を抑制するという報告や、PC12細胞でメラトニンがニコチン誘導性のドーパミン分泌を抑制するという報告がある。

我々は副腎髄質細胞においてBMP-4が副腎皮質ホルモンとともにカテコラミン分泌調節に関与していることを報告してきた。今回の研究ではメラトニンはBMP-4と協調的に働きカテコラミン産生を抑制するということが明らかになった。BMP受容体にリガンドが結合するとSmadリン酸化を惹起し核内でId1遺伝子の転写が起こる。メラトニンはBMP-4によるSmad1/5/8リン酸化を増強しId1 mRNA発現を増加させた。さらにBMP受容体発現を増強し抑制性Smad6/7発現を減弱した。これらのことからメラトニンは副腎髄質細胞においてBMP-4とともにカテコラミン合成調整に関与していると考えられた。メラトニンとTGF- $\beta$ ファミリーとの相互作用について、ヒトの前立腺でTGF- $\beta$ の産生を増加させるという報告や、乳がんでのメラトニンの細胞増殖抑制効果がSmadsリン酸化と関係しているという報告がある。これまで我々は下垂体細胞、卵巣、副腎皮質細胞においてメラトニンとTGF- $\beta$ の相互作用について報告してきた。メラトニンの全身的なカテコラミン分泌に対する影響に関してはさらなる検討が必要と思われる。

本研究では副腎髄質におけるメラトニンとグルココルチコイドの機能的な相互作用も明らかとなった。メラトニンの全身でのステロイドホルモンの調節に関しては副腎皮質でのACTHによるグルココルチコイドを抑制するという報告が多数ある。また胸腺でのGRを介するアポトーシスなどGRを介した作用に拮抗することも報告されている。興味深いことに、視床下部ではGRを介してNF- $\kappa$ Bの転写を抑制することでカテコラミン誘導性のメラトニン産生が促進されているという報告もある。これらの報告から副腎髄質でもメラトニンはグルココルチコイド誘導性のカテコラミン産生を抑制すると予測したが、PC12を使った検討ではメラトニンはGR発現を増強しグルココルチコイドによるカテコラミン産生を促進した。一方で、アルドステロン、アンドロゲンによるカテコラミン産生には影響を与えなかった。これらの結果から、メラトニンはGR発現に対して細胞や組織によって異なった調節的役割をもっていると思われるが、今回の結果がPC12に特別なものか、副腎髄質でのことなのかは明らかではない。しかし、ホルモン分泌臓器においてカテコラミン・グルココルチコイド・メラトニンの3者の間で互いにホルモン調節に関する連関が存在していると考えられる。

副腎皮質からのグルココルチコイドの流入によって髄質でのカテコラミン分泌を促進することはよく知られている。臨床的には褐色細胞腫の患者がコルチコステロイド内服後にクリーゼを起こしたという報告も多くある。しかし、褐色細胞腫以外の副腎腫瘍ではデキサメサゾンにより血中カテコラミンレベルは変化しないという報告もあり、全身的にみるとグルココルチコイドによるカテコラミン過剰産生は褐色細胞腫に特異的な反応かもしれない。メラトニンは全身的にはACTH-グルココルチコイド系を抑制するが、副腎髄質ではグルココルチコイドのカテコラミン産生促進効果を増強し、副腎皮質髄質連関においては調節役として働くと考えられる。

## 【結論】

メラトニンはcAMP経路を介してカテコラミン産生を抑制しSmad1/5/8経路を介してBMP-4と協調してカテコラミン産生を抑制した。この機序として内因性のBMP-4を増加させるとともに、BMP受容体発現を増加し抑制性Smad6/7を抑制することでBMP-4により誘導されたSmad1/5/8リン酸化を増強することが示された。メラトニンはGR発現を増強しグルココルチコイドによるカテコラミン産生促進作用を増強した。メラトニンはBMP-4、グルココルチコイドと協調的に働き副腎髄質でのカテコラミン合成調節に関与していると考えられた。臨床的視点から、これらのメラトニン作用が夜間血圧の調節に関与している可能性が想起された。