

# 主 論 文

## Orexin A modulates prolactin production by regulating BMP-4 activity in rat pituitary lactotrope cells

(オレキシン A のプロラクチン分泌への影響と BMP-4 の関与：ラット下垂体細胞を用いた検討)

### **【緒言】**

Orexin は主に視床下部で合成される神経ペプチドであり、orexin A・orexin B の 2 つのサブタイプがある。そして受容体も orexin-1 受容体(OX1R)・orexin-2 受容体(OX2R)があり、OX1R は orexin A に選択的に、OX2R は orexin A・B の両方に結合する。orexin の作用としては睡眠覚醒・摂食・自律神経系の調整が良く知られているが、orexin やその受容体は中枢神経系のみならず末梢の内分泌臓器(副腎・性腺・下垂体)においても発現している。これまでに視床下部・下垂体・副腎系や視床下部・下垂体・性腺系の調節における orexin の作用は報告されているが、プロラクチン(PRL)分泌への orexin の作用については未だ十分に知られていない。また BMP は TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する増殖因子であり、種々の内分泌組織に発現していることや、BMP が内分泌機能の調節について様々な作用を有することが知られている。特に下垂体においては BMP-4 が下垂体への分化に必須であり、近年 BMP-4 は下垂体腫瘍細胞でのホルモン分泌の制御にも働くことが明らかになってきた。したがって、本研究においては PRL 産生腫瘍細胞である GH3 細胞を用いて、下垂体での PRL 産生における orexin の作用について、特に下垂体に発現する BMP-4 に着目して検討した。

### **【材料と方法】**

#### 試薬と材料

ラット下垂体腫瘍細胞のGH3細胞を使用した。培地は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。試薬としてBMP-4 (R&D Systems)、forskolin (FSK)、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX ; Sigma-Aldrich Co.Ltd.)、BMP-I型受容体シグナル阻害薬 : LDN193189 (Stemgent)、dorsomorphin (Calbiochem)、orexin A (Wako pure Chemical Industries, Ltd)、dual orexin-receptor antagonist : DORA-12 (Merck Sharp & Dohme Corp.より提供)、selective OX1R antagonist : SB408124 (Tocris Bioscience) を使用した。またMAPKs阻害薬として、U0126 (ERK inhibitor) 、SB203580 (P38-MAPK-inhibitor ; Promega Corp.) 、SP600125 (SAPK/JNK inhibitor ; Biomol Lab.Inc.)、H-89 (PKA inhibitor ; Sigma-Aldrich Co.Ltd.)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% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。24 well-plate に 5×10<sup>4</sup> cells/well で 24 時間の予備培養の後に 0.1mM の IBMX を加えた無血清培地に変更し、FSK、BMP-4、orexin A を添加し 24 時間培養後に培養液上清の cAMP を ELISA 法 (Enzo Life Sciences, Inc.) で測定した。

#### RNA 抽出、real-time PCR 解析

12 well-plate で GH3 細胞を 1×10<sup>5</sup> cells/well で 24 時間の予備培養を行い、無血清培地に変更し、orexin A、FSK、BMP-4、BMP-I 型受容体シグナル阻害薬 : LDN193189、dorsomorphin、MAPKs 阻害薬(U0126、SB203580、SP600125、H-89)、オレキシン受容体阻害薬 (DORA-12、SB408124) を添加し、24 時間培養後に TRI Reagent (Cosmo Bio) を用い total RNA を抽出した。RNA (1 $\mu$ g) を用いて逆転写を行い cDNA を作成した。OX1R、OX2R、BMP-4 について RT-PCR の後に電気泳動を行った。PRL、OX1R、BMP 標的遺伝子である Id-1、BMP 受容体(ALK2、

ALK3、BMPRII)については 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

12 well-plateでGH3細胞を $1 \times 10^5$  cells/wellで24時間の予備培養を行い、無血清培地に変更の上で、orexin Aを添加し24時間の培養後、一部ではBMP-4を添加して1-2時間刺激した。その後 RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology)で細胞を溶解し、SDS-PAGEにて展開した後、抗リン酸化Smad1/5/9 抗体、抗Smad1抗体 (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) により解析した。

#### 統計解析

全ての結果は少なくとも3回以上の実験データを平均値 $\pm$ 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、有意水準はP値 $<0.05$ とした。

#### **[結果]**

ラット正常下垂体では OX1R・OX2R の両方の mRNA 発現を認めたが、GH3 細胞では OX1R の発現を認め、GH3 細胞では orexin 受容体は OX1R が優位であった。また GH3 細胞において orexin A(10-300nM)は単独では PRL mRNA の発現量に大きな影響を与えなかった。しかし FSK によって誘導された PRL mRNA の発現については orexin A(100-300nM)の抑制作用を認めた。この機序を調べるため、cAMP を測定すると orexin A(100nM)は単独あるいは FSK 誘導性においても cAMP 産生に大きな影響を認めなかった。

GH3 細胞では、BMP-4 は Smad と estrogen 受容体の複合体を介する作用と細胞内の 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 GH3 細胞では BMP-4(10ng/mL)によって PRL mRNA の発現は亢進し、orexin A は BMP-4 に誘導される PRL mRNA も抑制した。更に orexin A は BMP-4 によって上昇した cAMP 産生についても同様に抑制した。また GH3 細胞における内因性の BMP の作用を確認するため、BMP-I 型受容体シグナル阻害薬である LDN193189 と dorsomorphin(100-300nM)で処理したところ、両者は FSK の存在下・非存在下に関わらず、ともに PRL mRNA 発現を抑制した。これより、GH3 細胞では内因性の BMP が PRL 産生に関わることが明らかとなった。更に orexin A が BMP-4 に誘導される PRL mRNA を抑制する機序を調べるため、ERK 阻害薬の U0126、P38-MAPK 阻害薬の SB203580、SAPK/JNK 阻害薬の SP600125、cAMP-PKA 阻害薬の H-89 をそれぞれ使用すると、SB203580(1 $\mu$ M)によって orexin A の PRL mRNA 発現の減弱が解除された。このことから orexin A の BMP-4 に誘導された PRL 分泌への作用については P38-MAPK のシグナルが作動することが明らかとなった。

BMP-Smad シグナルに対する orexin A の影響を検討すると、orexin A は BMP-4 で誘導される Smad 1/5/9 のリン酸化を抑制し、BMP 標的遺伝子である Id-1 mRNA の発現も同様に減弱した。そして更に orexin 受容体阻害薬(DORA-12、SB408124)をそれぞれ使用すると、共に orexin A による Id-1 mRNA の抑制作用は解除され、この作用は OX1R を介することが明らかとなった。一方で GH3 細胞を BMP-4 で処理すると、OX1R mRNA 発現は減弱した。また orexin A が BMP-Smad シグナルを調整する機序を調べると、orexin A は BMP-I 型受容体 ALK-3 の発現を減弱した。そして抑制性 Smad である Smad6、Smad7 については orexin A は Smad6、Smad7 の mRNA 発現を共に増強した。

#### **[考察]**

本研究では GH3 細胞において orexin A と BMP-4 の PRL 分泌における相互作用が明らかとなった。GH3 細胞には OX1R が優位に発現しており、orexin は OX1R を介して FSK や BMP-4 によって誘導される PRL mRNA 発現を抑制した。また BMP-I 型受容体シグナルの阻害が PRL mRNA 発現を抑制したことから内因性 BMP が PRL 分泌を調整していることが明らかになり、orexin は内因性の BMP-4 のシグナルを抑制することで PRL mRNA 発現を抑制していると考えられた。また orexin は OX1R を介して Smad 1/5/9 のリン酸化と Id-1 mRNA 発現を抑制しており、その機序

として ALK3 の発現の減弱と抑制性 Smad6/7 の増強があり、一方で BMP-4 は OX1R の発現を抑制した。

下垂体における OX1R、OX2R の発現はこれまでも報告があり、ラット下垂体前葉・中間部に OX1R、OX2R が発現し、免疫染色では OX1R は GH 陽性細胞に、OX2R は ACTH 陽性細胞に発現していた。また *Xenopus* を用いた検討では OX1R は PRL 陽性細胞に発現していたと報告されている。しかしながら、下垂体での PRL 分泌における orexin の作用については未だ一定の見解が得られていない。興味深いことに ovine の下垂体を用いた研究では orexin は PRL 分泌を増強するか抑制するかは季節によって違いが見られたとされている。我々はこれまでに GH3 細胞において BMP-4 による PRL 分泌調整に時計遺伝子や体内時計を調整するメラトニンが関与していることを報告しており、今回の orexin の PRL 分泌における作用についても PRL の日内変動の調整に影響を与えている可能性がある。

今回我々が着目した BMP は当初骨形成に関与する因子とされていたが、現在 BMP は卵巣、下垂体、副腎、甲状腺など多くの内分泌臓器での作用も知られている。我々はこれまで BMP は GH3 細胞において PRL 分泌でのソマトスタチンへの感受性や体内時計を調整するメラトニンの PRL 分泌抑制作用に関与していると明らかにしてきた。また BMP はゴナドトロピン分泌細胞での LH、FSH 分泌や ACTH 分泌細胞での ACTH 分泌への関与も知られている。

Orexin は視床下部での神経ペプチドとして発見されたが、今回我々は下垂体での orexin の作用について検討を行った。そしてこの下垂体で作用する orexin は一体どこで合成されているのかという点は非常に興味深い。過去の報告では orexin の前駆体である preproorexin の mRNA は下垂体に発現が見られなかったとされている。一方で orexin と orexin ニューロンはラットの正中隆起や下垂体後葉に見られたと報告されている。またヒト下垂体を用いた検討では orexin A、orexin B は共に下垂体に発現し、特に orexin A は 80%以上の PRL 陽性細胞に発現していたとされる。更にヒトの血中にも微量の orexin が循環し、この濃度はエネルギー代謝の影響を受けて変動があるとされている。これらを踏まえると下垂体への orexin の分布は下垂体門脈や他の末梢組織から全身循環を介する可能性も考えられるが、詳細は未だ不明確なままである。

今回の検討では GH3 細胞での orexin の BMP シグナルへの作用を明らかにしたが、過去のいくつかの報告でも orexin の BMP シグナルに与える影響について検討されていた。orexin シグナルが生体内のどのような経路に影響を与えるかを遺伝子発現プロファイリングでみた検討では BMP-Smad シグナルをこの 1 つにあげている。更に我々の最近の報告でもラット卵巣顆粒膜細胞を用いた検討で、orexin A は BMP シグナルの抑制を介して、FSH 誘導性の progesterone 分泌を増強していた。これらの結果は本研究結果と類似しており、orexin と BMP-Smad シグナルの相互作用は他の内分泌臓器においても応用性を持つ可能性が示唆された。また今回 OX1R の BMP-4 に誘導された PRL mRNA の発現抑制は P38-MAPK 経路を介することが示唆された。しかし、PLC、PKC、Ca<sup>2+</sup>を介する経路については今後の検討が必要である。

## 【結論】

下垂体 Lactotrope GH3 細胞では、orexin A は BMP-4 と協調的に作用し、BMP-Smad シグナルを抑制することによって PRL 産生を負に調節する新たな機序が明らかとなった。この orexin の作用は PRL の日内変動に影響している可能性があり、また治療抵抗性のプロラクチノーマへの新たな臨床展開も期待できると考えられた。