

下垂体隆起葉における光周性シグナル分子

安尾しのぶ^{1,2)}  · Horst-Werner Korf¹⁾

1) Institute of Anatomy II, Goethe University Frankfurt

2) 九州大学大学院農学研究院資源生物科学部門

季節周期のもとで生命活動を営む生物は、繁殖活動を始めとした様々な生理機能に光周性変化を示す。鳥類や哺乳類では、下垂体の付け根に存在する下垂体隆起葉 (pars tuberalis, PT) が中枢的役割を果たし、様々なシグナル分子や機能性分子の分泌を介して視床下部-下垂体系の制御を行なう。これらのPT由来分子は数十年前から探索されてきたが、最近特にその解明が進み、甲状腺刺激ホルモン (TSH) や生理活性脂質エンドカンナビノイドなど、新たな役者が同定されつつある。エンドカンナビノイドは生殖・代謝・情動・免疫など様々な生物機能に関わるため、幅広い光周性現象の機構解明に繋がる可能性がある。本総説では、まずPTから分泌される分子について概説した後、その一つとして最近筆者らがPTにて同定したエンドカンナビノイドシステムとその光周性における役割を論じ、最後に今後の展望について俯瞰する。

1. はじめに

温帯地域の生物は季節の変化を上手く捉え、適した季節に適した生理機能を発揮する。例えば、気温が高く餌の得やすい春から夏に繁殖し、栄養の欠乏する冬にはエネルギー代謝を落として冬眠する、といった具合である。季節を測る指標には、気候や環境変動の影響が少ない日長が主に用いられる。このような性質は光周性と呼ばれ、繁殖・代謝・行動・情動・ストレス反応・免疫系など、多彩な生物機能が支配されている。

脊椎動物において、光周性は主に視床下部-下垂体軸の神経内分泌系を介して制御される。中でもPTは視床下部、下垂体前葉 (pars distalis, PD)、下垂体門脈系の中心という要所に位置し (図1)、哺乳類で日長情報を伝達する松果体ホルモン、メラトニンの受容体を高レベルで備えることから、日長入力系と下垂体ホルモン分泌調節とを結ぶ重要なインターフェースと考えられてきた [1]。このインターフェース機構には時計遺伝子が関与しており、PTにリズム的に発現している時計遺伝子が日長やメラトニンによってその発現パターンを変化させることで、下流分子の転写が調節されるといわれている

[2]。この下流分子は同定されていないが、視床下部-下垂体系において神経内分泌の光周性制御にかかわるPT由来分子が近年見つかってきている。以下、それらの知見について概説してゆく。

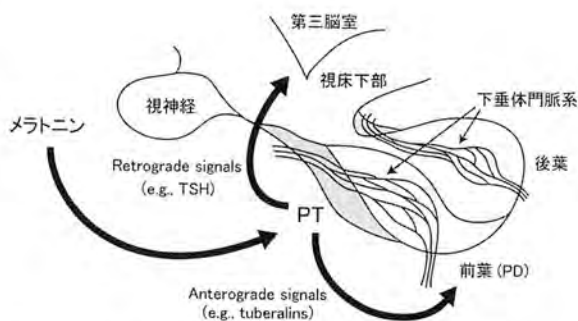


図1 哺乳類における視床下部-下垂体系の模式図
下垂体隆起葉 (pars tuberalis, PT) は視床下部、下垂体前葉 (pars distalis, PD)、下垂体門脈系の中心に位置する。PTから分泌されるシグナル分子には、逆行性 (retrograde) に働く甲状腺刺激ホルモン (TSH) や、順行性 (anterograde) に働く tuberallin (未同定) などが知られる。

2. PT由来のシグナル分子としてのTSH

PTは他の下垂体領域 (PD、中葉、後葉) とは解剖学的特徴や機能が異なる。例えば、メラトニン受容体MT1はPTにのみ局在し、他の下垂体領域には発現していない [1]。これはPTが光周性制御に特化した組織であることを示唆している。PTを構成する細胞は、PT特異的な分泌細胞 (PT-specific cells)、PDの細胞に類似した分泌細胞、ろ胞細胞の三種類に分けられるが、このうちPT特異的な分泌細胞の割合が最も高い [3]。この細胞は抗TSH-beta subunit (TSHB) 抗体に対して免疫陽性反応を示す特徴を持つが、PTのTSH細胞はPDのそれとは細胞内顆粒数や分布など形態学的特徴が異なる [3]。機能面については、ラットではメラトニン受容体MT1のmRNAがPTのTSH細胞に存在すること [4]、ジャンガリアンハムスターでは日長によってTSHの免疫陽性反応の強さが異なることから [5]、その重要性が示唆されてきたが、正確な機能は不明であった。

近年、ウズラを中心に光周性の分子機構の解明が進み、視床下部内側基底部に発現する二型および三型脱ヨード酵素 (type 2 deiodinase, Dio 2; type 3 deiodinase, Dio 3) が光周性制御遺伝子と同定されるなど [6, 7]、新しい知見が蓄積されてきた。最近では、ウズラにおいて光周性反応初期に作動する分子経路が網羅的に解析された結果、驚くべき結果が発表された [8]。すなわち、PTにおけるTSHBの発現が長日刺激にいち早く反応し、それにより合成されたTSHが視床下部内側基底部の第三脳室上衣細胞層に存在するTSH受容体を介してDio 2やDio 3といった光周性制御遺伝子群の発現を調節するというものである。これらの知見は、PTにおけるTSH合成能の重要性に関して、哺乳類とは全く別のアプローチから到達したものであり、これまで不明であったPT由来TSHの機能的役割をも示す重要な結果である。ウズラにおける発表に続き、ヒツジやマウス、またシリアンハムスターにおいても、PTのTSH合成が光周性反応を引き起こす経路に重要なことが示されている [9-11]。興味深いことに、マウスではTSHB遺伝子のプロモーター領域にE-box様配列が存在し、CLOCKとBMALの付加により遺伝子発現が活性化されることがGalシフェラーゼアッセイにより示されている [12]。これは、PTの時計遺伝子発現とTSHBとを結びつける重要な証拠といえる。

3. PT由来のプロラクチン制御因子、tuberalin

PTは視床下部とPDに挟まれた位置に局在するため、そこから分泌されるシグナルは双方向への作用が可能である。すなわち、上記のようにPTで合成されたTSHが視床下部内側基底部に作用するような「逆行性 (retrograde) 経路」、およびPTからPDに向かって作用する「順行性 (anterograde) 経路」である (図1)。後者のような順行性のシグナル分子は「tuberalin」と名付けられ、古くから探索されてきたが、未だに未同定である。Tuberalinの特徴は、1) 分泌物質である (PTを浸した培養液使用やPTとの共培養にてその機能解析が可能)、2) PDからのプロラクチン分泌を促進する、3) 分泌量は長日条件で高く、フォルスコリンやメラトニンによりその分泌調節が可能である、4) PDに作用する際、プロラクチン産生細胞・非産生細胞にて*c-fos* 遺伝子の発現上昇をとまなう、などが挙げられる [1]。幾つかの研究室は、PTを浸した培養液のサイズ分画によりtuberalinの同定を試みてきたが、1 kDa以下であるという報告や、1-10kDaのものと10kDa以上のものがあるという報告など、一貫した結果は得られていない。

一方、PTで合成・分泌される既存の因子がtuberalinである可能性も考えられる。例えば、TSHBやglycoprotein alpha-subunit (CGA) [1, 3]、guanylin [13]、basic fibroblast growth factor (bFGF) [14] などである。最近光周性引き金遺伝子として注目を集めているTSHBについては、そのtuberalinとしての可能性は調べられていない。また、CGAやbFGFの発現量は日長に影響を受けるが、PDからのプロラクチン合成に影響を及ぼさないことが報告されている [1, 14]。

4. PT由来の新規シグナル分子、エンドカンナビノイド

上記のように、tuberalinの同定は困難を極め、追い求めれども手に入らない「聖杯伝説」とも揶揄されることもしばしばであった。根本に立ち返り、既存研究の前提部分に目を向けてみると、多くの実験系の根本には、tuberalinはペプチドシグナルであるという暗黙の了解があることが分かる。ここで、ペプチドシグナル以外の分子、例えば脂質シグナル分子に視点を変えてみてはどうであろうか。

近年、脂質は細胞膜を合成するコンポーネントであるのみでなく、情報伝達物質としても働くことが解明されてきた。脂質シグナル分子には様々な種類が存在するが、特に神経内分泌制御に焦点を絞れば、

エンドカンナビノイドシステムが重要である [15]。エンドカンナビノイドはいわば生体内マリファナ様物質であり、マリファナ (*Cannabis sativa*) の主要成分と結合する受容体に対する内因性リガンドの総称である。エンドカンナビノイドは代謝・情動・生殖・記憶・学習・痛み受容・炎症・免疫・神経可塑性など実に様々な生物機能を制御している [16, 17]。マリファナは古来より医薬品として利用されてきた反面、精神攪乱作用があることは周知の事実であるが、注目すべきことに、エンドカンナビノイド関連化合物には精神攪乱作用がなく医学的に必要な効果を発揮できるものが多い。この利点から、新薬としての期待が高く、メタボリックシンドローム、うつ病、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、神経痛、癌など、難治性を含めた多くの疾病への応用研究開発が進められている [17]。主要エンドカンナビノイドにはanandamide (AEA) と 2-arachidonoylglycerol (2-AG) が知られるが、ラットの脳では 2-AG の量が AEA より数百倍多く、またカンナビノイド受容体である CB1/CB2 に対する選択性も高い [16, 17]。生理活性脂質であるこれらの物質は、必要な時に必要なだけ合成され (オン・デマンド合成)、用途が終われば速やかに代謝される。したがって、合成酵素と代謝酵素のバランスが重要なポイントである。神経内分泌制御については、AEA や 2-AG の投与によりプロラクチンを始めとした多くのホルモン分泌量が顕著に変化することが知られている [15]。

筆者らは最近、エンドカンナビノイドと光周性との関連を解明すべく、AEA や 2-AG の合成酵素および代謝酵素の発現をシリアンハムスターの PT において調べた [18]。すると、検討した全ての酵素が PT に発現していた (図 2A)。また幾つかの酵素については、免疫組織化学によりタンパク質の局在も PT に確認できた。さらに、日長に対する反応を調べたところ、2-AG の合成酵素である diacylglycerol lipase-beta (DAGLb) の mRNA 発現量や diacylglycerol lipase-alpha (DAGLa) のタンパク質量が長日条件で増加していた (図 2B)。これらの 2-AG 合成機能を確認するため、パンチアウトした PT 組織中にて様々なエンドカンナビノイド量を LC-MS/MS により測定したところ、2-AG 含量が長日条件で有意に増加していた (図 2C)。以上のことから、エンドカンナビノイドが PT 由来のシグナル分子であること、またエンドカンナビノイドのうち 2-AG が日長に制御される光周性シグナルであることが示唆された。

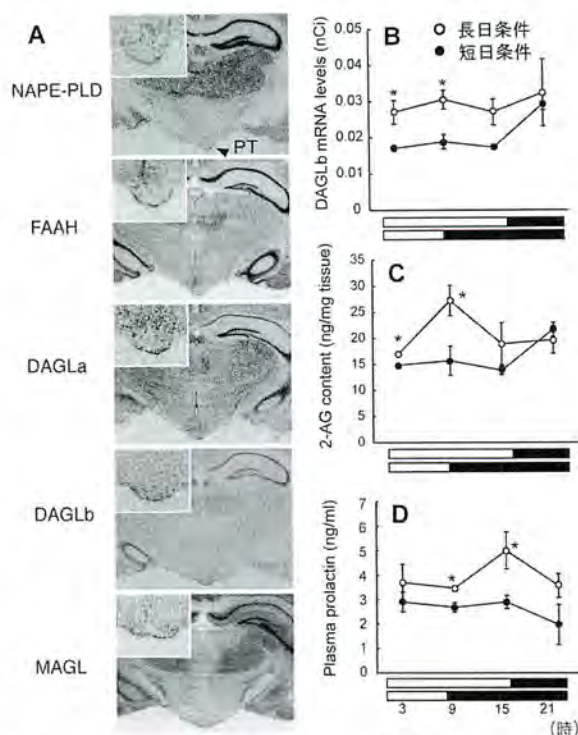


図 2 シリアンハムスターの下垂体隆起葉 (pars tuberalis, PT) におけるエンドカンナビノイド合成・代謝酵素の発現と日長の影響

(A) シリアンハムスターの PT におけるエンドカンナビノイド合成・代謝酵素の発現。Anandamide の合成酵素である *N*-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD)、anandamide の代謝酵素である fatty acid amide hydrolase (FAAH)、2-arachidonoylglycerol (2-AG) の合成酵素である *sn*-1-selective diacylglycerol lipases (DAGLa and DAGLb)、2-AG の代謝酵素である monoacylglycerol lipase (MAGL) の発現が PT にみられた。各写真中の左上のボックスは PT の拡大を示す。(B-D) PT のエンドカンナビノイドシステムおよび血中プロラクチン量に対する日長の影響。長日条件において、PT における DAGLb の発現 (B)、2-AG 含有量 (C)、血中プロラクチン量 (D) が増加していた (* $P < 0.05$, *t*-test)。文献 18 より改変。

5. PT 由来エンドカンナビノイドの作用部位と機能

PT で合成・分泌されたエンドカンナビノイドはどこに作用するのであろうか? この質問に答えるべく、筆者らはカンナビノイド受容体の CB1 および CB2 の発現を PT および PD において調べた [18]。すると、CB1 受容体は PT には発現せず、PD のみに発現していることが分かった (図 3A)。一方 CB2 は PT, PD ともに発現が見られなかった (図 3A)。他にも、peroxisome proliferators-activated receptor-alpha および γ や G-protein coupled receptor 55 もエンドカンナビノイド受容体として働くことが知られるが、いずれも PT や PD に発現は見られなかった。これらのことから、PT で合成されたエンドカンナビノイドの標的が PD の CB1 受容体であることが示唆

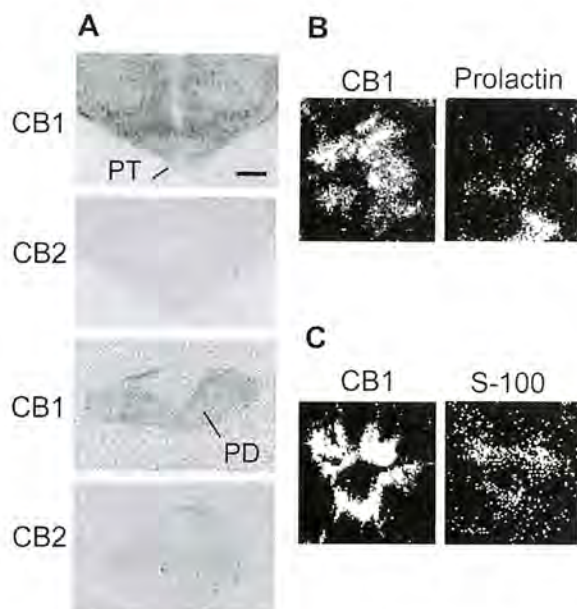


図3 シリアンハムスターの下垂体隆起葉 (pars tuberalis, PT) と前葉 (pars distalis, PD) におけるCB1およびCB2受容体の発現

(A) PTとPDにおけるCB1/CB2の発現。PTにはCB1、CB2ともに発現は見られず、PDにはCB1の発現が見られた。(B, C) PDにおけるCB1受容体の局在。二重蛍光免疫染色によって、CB1はプロラクチン細胞には存在していないこと (B)、またろ胞星状細胞のマーカであるS-100タンパク質と同じ細胞に存在していること (C) が示された。文献18より改変。

される。なお、PD自身にも2-AGやAEAの合成酵素・代謝酵素の発現が見られたが、その発現量はPTに比べて低く、日長に対する変化も見られなかった [18]。またPDでもエンドカンナビノイドが検出されたものの、その量はPTより著しく低く、PTからのパラクリン因子としてのエンドカンナビノイドが重要と考えられる。

以上の結果から、エンドカンナビノイドの2-AGがtuberalinの一つである可能性が示唆される。さらにこの可能性を探るため、PDにおけるCB1受容体がプロラクチン産生細胞に存在するか否かを二重蛍光免疫組織化学法により調べた [18]。しかし予想に反して、CB1受容体はプロラクチン産生細胞には存在していなかった (図3B)。そこでCB1受容体細胞の形態や分布を詳しく観察すると、細胞突起を放射状に広げていることや、プロラクチン産生細胞を包み込むように分布していることが分かった。これらはホルモン非産生細胞であるろ胞星状細胞 (folliculostellate cells, FS細胞) と考えられたため、FS細胞のマーカであるS-100タンパク質抗体を用いて確認したところ、予想どおりCB1受容体分布はFS細胞分布と一致していた (図3C)。FS細胞はプロラ

クチン細胞などのホルモン産生細胞を形態的に支持すると同時に、様々なホルモン調節因子を放出してホルモン分泌を複雑に制御する [19]。このような調節因子には、各種成長因子 (fibroblast growth factor, vascular endothelial cell growth factor) やサイトカイン (interleukin-6, leukemia inhibitory factor)、またnitrogen oxideなどが挙げられる [19]。現在のところ、CB1受容体とこれらの因子との関連は明らかではないが、いずれかの因子を介してプロラクチン分泌を制御している可能性が十分に考えられるため、今後の研究が期待される。

2-AGやAEAとプロラクチン分泌との関連を示す結果は多数報告されている。例えば、2-AGやAEA、またCB1受容体アゴニストをラットやマウスに皮下投与すると、血中プロラクチン量は減少する [15, 20]。注意が必要なことに、末梢投与されたエンドカンナビノイドは視床下部に作用し、プロラクチン抑制因子であるドーパミン放出を介して下垂体からのプロラクチン分泌を調節する [21]。一方、筆者らの結果はエンドカンナビノイドが下垂体に直接作用することを示唆している。この作用についても幾つか報告があり、例えばラット下垂体の初代培養細胞にCB1のアゴニストを投与すると、プロラクチン分泌およびcAMP量が増加することが示されている [22]。現在筆者らは組織培養により2-AGがプロラクチン分泌に及ぼす影響やその経路にかかわるシグナリング経路を探索している。将来的には、PTにおける2-AGの合成量がメラトニンやフォルスコリンで調節できるか否か、また2-AG合成酵素の発現が時計遺伝子に制御されるか否か、といった研究が必要であろう。

6. 新たな挑戦：

代謝・情動機能の光周性とエンドカンナビノイド

季節の変化は繁殖機能のみではなく、代謝や情動機能にも影響を与える。ヒトにおいては、冬期にうつ症状を発症する季節性感情障害 (seasonal affective disorder, SAD) が知られ、欧米における有病率は1-10%、日本においてもうつ病全疾患の1-3%がSADの基準を満たすといわれている [23]。SAD患者の症状は過食、過眠、炭水化物飢餓を特徴としており、代謝機能の季節性調節とも何らかの関係があることがうかがえる。また、小型げっ歯類でも日長によって不安行動やうつ様行動が変化することが報告されており [24]、SADの根本には本来生物が備える季節応答性があるといえる。

前述したように、エンドカンナビノイドは代謝や情動機能にも深い関わりを持つ。Di Marzoらは2001年、CB1ノックアウトマウスは絶食処理後の摂食量が激減することや、肥満モデル動物で視床下部内のエンドカンナビノイド量が増加していることを示し、CB1による摂食促進機構を解明した [25]。これらの知見から、CB1アンタゴニストであるリモナバントは肥満症の新薬として注目され、欧米を中心に治験が進められてきた結果、3.9-5.4kgの体重減少や3.3-4.7cmのウエスト減少が確認されている [26]。また中性脂肪の減少やHDLコレステロールの増加など、動脈硬化の危険因子レベルに対して好ましい結果も得られている [26]。その一方で、副作用として目眩、吐き気、うつ症状、不安症状が報告されており、うつ病などの精神疾患を煩う患者には処方すべきでないといわれている [26]。これらの報告は、リモナバント利用にともなう注意を喚起すると同時に、エンドカンナビノイドには情動調節機能があることを示す。このことについては、CB1ノックアウトマウスは深刻なうつ様症状を示すことや、うつ病患者の血中エンドカンナビノイド量が減少していること等からも明らかである [27]。

以上の議論を俯瞰すると、情動・代謝機能はともに関連しあいながら季節に影響を受け、かつ、その両機能にエンドカンナビノイドが深く関わっていることが分かる。これらのことから筆者は、エンドカンナビノイドと情動・代謝機能の季節応答性との関連に興味を抱いている。この観点からみると、光周性機構の中核部位であるPTにおいてエンドカンナビノイドシステムが同定されたことは大変興味深いといえよう。今後は、PT、PD、また視床下部におけるエンドカンナビノイドの役割について、情動・代謝機能の光周性という側面からも探っていきたい。

7. おわりに

PTは数細胞層からなる小さな組織であるが、本総説でみてきたように、様々なシグナル分子を分泌し、視床下部や下垂体の機能を広く調節する。特にここ数年において、光周性の分子機構が解明されるにつれて、その重要性が脚光を浴びてきた。今後は、本総説に登場したような様々な分子について機能解析が不可欠であるが、PTを扱う実験にはその組織の微細さゆえの技術的困難がともなう。すなわち、機能解析のための細胞培養やPT特異的な物質含有量測定には、PT細胞のみ取り出す必要があるが、ハムスターやウズラなど小型動物のPTは極めて小さ

く、取り出す際にどうしても視床下部組織が混入してしまう。この問題を解消するために、生細胞のマイクロダイセクション技術、あるいはPT細胞由来の細胞株の樹立などが望まれる。また、ヒツジ・ヤギ・ウシなど大型動物のPTは比較的単離しやすいため、必要に応じて利用することも一つの手である。

近年、PTを中心として光周性の根本的な分子機構が解明されてきたが、そこから派生して起こる様々な現象（代謝・情動・ストレス反応・免疫系等の季節変化）の制御機構解明はこれからの課題である。本総説の6節で述べたように、各生理機能の光周性は密接に関連しているため、狭い視野にて“木を見て森を見ず”といった状況に陥らぬよう、総合的視野から取り組んでいく必要があると思われる。

謝辞

本稿執筆の機会を与えてくださった富岡憲治先生に感謝いたします。本研究はLOEWE Lipid Signaling Forschungszentrum Frankfurt (LiFF) にサポートされています。なお、本総説の内容は、第11回欧州時間生物学会若手奨励賞受賞シンポジウム（2009年8月22日～28日、ストラスブール、フランス）で発表されたものです。

引用文献

- 1) Morgan PJ: *J Neuroendocrinol* 12: 287-295 (2000)
- 2) Lincoln GA, Andersson H, Loudon A: *J Endocrinol* 179: 1-13 (2003)
- 3) Wittkowski W, Bockmann J, Kreutz M, Bockers TM: *Int Rev Cytol* 185: 157-194 (1999)
- 4) Klosen P, Bienvenu C, Demartean O, Dardente H, Guerrero H, Pevet P, Masson-Pevet M: *J Histochem Cytochem* 50: 1647-1657 (2002)
- 5) Wittkowski W, Bergmann M, Hoffmann K, Pera F: *Cell Tissue Res* 251: 183-187 (1988)
- 6) Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S: *Nature* 426: 178-181 (2003)
- 7) Yasuo S, Watanabe M, Nakao N, Takagi T, Follett BK, Ebihara S, Yoshimura T: *Endocrinology* 146: 2551-2554 (2005)
- 8) Nakao N, Ono H, Yamamura T, Anraku T, Takagi T, Higashi K, Yasuo S, Katou Y, Kageyama S, Uno Y, Kasukawa T, Iigo M, Sharp PJ, Iwasawa A, Suzuki Y, Sugano S,

- Niimi T, Mizutani M, Namikawa T, Ebihara S, Ueda HR, Yoshimura T: *Nature* 452: 317-322 (2008)
- 9) Hanon EA, Lincoln GA, Fustin JM, Dardente H, Masson-Pevet M, Morgan PJ, Hazlerigg DG: *Curr Biol* 18: 1147-1152 (2008)
- 10) Ono H, Hoshino Y, Yasuo S, Watanabe M, Nakane Y, Murai A, Ebihara S, Korf HW, Yoshimura T: *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18238-18242 (2009)
- 11) Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf HW: *J Neuroendocrinol* 22: 43-50 (2010)
- 12) Unfried C, Ansari N, Yasuo S, Korf HW, von Gall C: *Endocrinology* 150: 4653-4662 (2009)
- 13) D'Este L, Kulaksiz H, Rausch U, Vaccaro R, Wenger T, Tokunaga Y, Renda TG, Cetin Y: *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1131-1136 (2000)
- 14) Graham ES, Hazlerigg DG, Morgan PJ: *Mol Cell Endocrinol* 156: 45-53 (1999)
- 15) Wang H, Dey SK, Maccarrone M: *Endocr Rev* 27: 427-448 (2006)
- 16) Piomelli D: *Nature Rev* 4: 873-884 (2003)
- 17) Di Marzo V, Petrosino S: *Curr Opin Lipid* 18: 129-140 (2007)
- 18) Yasuo S, Koch M, Schmidt H, Ziebell S, Bojunga J, Geisslinger G, Korf HW: *Cell Tissue Res*: 340: 127-136 (2010)
- 19) Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S: *Arch Histol Cytol* 62: 205-218 (1999)
- 20) Olah M, Milloh H, Wenger T: *Mol Cell Endocrinol* 286: S36-S40 (2008)
- 21) Scorticati C, Mohn C, De Laurentiis A, Vissio P, Fernandez Solari J, Seilicovich A, McCann SM, Rettori V: *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2134-2139 (2003)
- 22) Rodriguez de Fonseca F, Wenger T, Navarro M, Murphy LL: *Brain Res* 841: 114-122 (1999)
- 23) 三島和夫: 気分障害 第17章 季節性感情障害、pp466-480、医学書院
- 24) Prendergast BJ, Nelson RJ: *Psychoneuroendocrinology* 30: 438-452 (2005)
- 25) Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkal S, Jaral Z, Fezza F, Mlura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G: *Nature* 410: 822-825 (2001)
- 26) Wang J, Ueda N: *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 1-10 (2008)
- 27) Hill MN, Hillard CJ, Bambico FR, Patel S, Gorzalka BB, Gobbi G: *Trends Pharmacol Sci* 30: 484-493 (2009)