

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	北原 克教
学位論文題目 Effects of a depot formulation of a GnRH agonist (leuporelin) on the ultrastructure of male rat pituitary gonadotropes. (GnRH アゴニスト(leuporelin)徐放性製剤が下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造に与える影響) 共著者名 阪井 裕子、平 義樹、柿崎 秀宏、渡部 剛 未公表 研究目的 泌尿器科学領域では、男性ホルモンの影響を受けて増殖・増悪する代表的な疾患として前立腺癌が知られている。このため、前立腺癌の治療法として血中アンドロゲンレベルを低下させる内分泌療法が有効であり、視床下部－下垂体－精巣系の調節機構の様々なレベルを標的とする治療法がこれまでに試みられてきた。このうち、既に前立腺癌の治療目的で臨床応用されている leuporelin 徐放性製剤は、本来は強力なゴナドトロピン分泌促進作用を有するゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)アゴニストであるが、同剤の持続的な作用は 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抑制する。この結果、精巣でのテストステロン合成・分泌は、外科的な去勢手術と同様のレベルまで強く抑制され前立腺癌が退縮するが、同剤の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に与える影響に関しては、これまでほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、この GnRH アゴニストである leuporelin の徐放性製剤投与がラット性腺刺激ホルモン産生細胞にどのような影響を与えるか、免疫組織化学法と形態計測法を用いて解析した。 材料・方法 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(leuporelin 3.75mg/バイアル、武田薬品工業株式会社から供与)を投与(3 mg/kg 体重)した後、1、4、7、14、28、84 日後に下記の解析に供した。また、初回投与後 4 週ごとに同量の leuporelin を追加投与し 84 日間飼育する実験群(84 日持続投与群)も設定し、対照群も含めて計 8 実験群(各群 15 匹、計 120 匹)の動物を下記の解析に供した。 形態学的解析:常法に従って各実験群の動物を灌流固定し、下垂体を Epon812 樹脂(光顕用、各群 5 匹)あるいは LR white 樹脂(電顕用、各群 5 匹)に包埋した。この Epon812 樹脂包埋標本から組織切片を作成し、蛍光抗体法で性腺刺激ホルモン産生細胞の分布および LH 含量の変化を比較した。また、LR white 樹脂包埋標本からは超薄切片を作成し、金コロイド法による電顕免疫組織化学で、LHβ、クロモグラニン A(CgA)、セクレトグラニン II(SgII)の細胞内局在を検討した。さらに、電顕観察所見を定量的に評価するために、分泌顆粒の体積率、平均直径、および分泌顆粒の単位面積あたりの金コロイド数(標識率)を形態計測法に基づいて算出した。 生化学的解析:各実験群の動物の下大静脈から採血した後、下垂体と精巣を採取した(各群 5 匹)。この血液から遠心分離で得た血漿を用いて、Amersham 社製の EIA キットで LH 濃度を測定した。また、イムノブロット法により、下垂体から調製した抽出液中の CgA および SgII の量を比較した。精巣は湿重量を測定し、薬剤効果の評価に用いた。			

成績

GnRH アゴニスト徐放性製剤の作用:血漿 LH 濃度は、同剤投与1日後に一過性に上昇(対照群の約 4 倍)したが、その後低下し、以降 28 日後まで対照群より低値で推移した。さらに、薬剤投与開始から 84 日後の時点では、追加投与の有無に関わらず、血漿 LH 濃度の測定値は回復しなかった。一方、各実験群の精巣重量は、同剤投与開始から 28 日後まで有意に減少した。その後、追加投与なしで 84 日後まで経過観察した群では精巣重量が対照群と同程度まで回復したのに対し、4 週間ごとに同剤を追加投与した群では、対照群より有意に低かった。

性腺刺激ホルモン産生細胞の分泌顆粒の変化:同細胞内の分泌顆粒の量および大きさは、投与開始1日後から著明に減少し、4日後および 7 日後には細胞膜直下に限局して少量の小型の分泌顆粒が観察された。その後、28 日後までに徐々に分泌顆粒が細胞内に再蓄積されるが対照群と同程度までは回復せず、分泌顆粒の体積率および平均直径は対照群と比較して有意に低かった。この後、分泌顆粒の体積率および平均直径は、追加投与をしない群では 84 日後までに対照群と同程度まで回復したが、持続投与群では初回投与から 84 日後でも対照群よりも有意に低い値を示した。

分泌顆粒の抗 LH 抗体による標識率の変化:分泌顆粒の抗 LH 抗体による標識率は、同剤投与直後は対照群と同程度であったが、投与開始 7 日後より急激に低下し、以降 28 日後まで対照群と比較して有意に低いレベルで推移した。この後、追加投与をしない群では 84 日後までに対照群と同程度まで回復したが、持続投与群では初回投与から 84 日後でも対照群よりも有意に低い値を示した。

グラニン蛋白の局在と相対量の変化:CgA 陽性分泌顆粒と SgII 陽性分泌顆粒の個別の体積率の推移に関しては、両者を一括して解析した上記の結果と同様の変動を示した。一方、分泌顆粒の平均径は、CgA 陽性分泌顆粒が体積率と同様の変化を示したのに対して、SgII 陽性分泌顆粒は各実験群間でほとんど差が認められなかった。また、CgA と SgII の細胞内局在に関しては、同剤投与後には、対照群と同様に CgA と SgII が単独で含まれる顆粒に加えて、両者が同一の顆粒に共存する中間型分泌顆粒が出現した。また、下垂体抽出液中のグラニン蛋白量に関しては、CgA も SgII も投与開始から 28 日後の時点では対照群より有意に低く、その後追加投与せずに 84 日後まで経過すると対照群と同程度まで回復した。一方、84 日持続投与群ではどちらも対照群より低値であった。

考察

これまでに GnRH 誘導体として、下垂体での性腺刺激ホルモン産生細胞の細胞膜上の GnRH 受容体を強力に刺激するアゴニストと逆に抑制するアンタゴニストの両方が開発されている。精巣でのテストステロン合成・分泌を抑制するためには同細胞からのゴナドトロピン分泌を低下させる必要があり、GnRH アンタゴニストの方が理論的には適切であると思われるが、前立腺癌の治療目的で実際に臨床的に実用化されているのは、本研究で用いた leuprorelin に代表される GnRH アゴニストである。今回の電顕免疫組織化学法および形態計測法による解析によって、1ヶ月にわたって有効量の GnRH アゴニストを持続的に放出する徐放性製剤が、まず投与直後にその本来の分泌刺激作用によって性腺刺激ホルモン産生細胞内の分泌顆粒を枯渇させ、その後、同剤の持続投与の効果として現れる GnRH 受容体の不活性化(desensitization)を介してゴナドトロピン生合成および分泌顆粒放出を強力に抑制することが示された。これまで、GnRH アゴニスト投与直後の一過性のゴナドトロピン放出は、臨床的な見地からは忌避すべき副作用であると考えられてきたが、そのような作用を持たない GnRH アンタゴニストよりもむしろ GnRH アゴニストの方が、治療開始初期に標的細胞内から生理活性のあるゴナドトロピンを含む分泌顆粒を枯渇させることができるので、以降の同細胞からのゴナドトロピン放出をアンタゴニストより効果的に抑制できるのではないかと思われた。

引用文献

1. Okada H, Heya T, Ogawa Y, Toguchi H, Shimamoto T (1991) Sustained pharmacological activities in rats following single and repeated administration of once-a-month injectable microspheres of leuprolide acetate. *Pharm Res* 8:584-587
2. Watanabe T, Jeziorowski T, Wuttke W, Grube D (1993) Secretory granules and granins in hyperstimulated male rat gonadotropes. *J Histochem Cytochem* 41:1801-1812
3. Conn PM, Crowley WF, Jr. (1994) Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med* 45:391-405
4. Watanabe T, Banno T, Jeziorowski T, Ohsawa Y, Waguri S, Grube D, Uchiyama Y (1998) Effects of sex steroids on secretory granule formation in gonadotropes of castrated male rats with respect to granin expression. *Endocrinology* 139:2765-2773
5. Murase M, Uemura T, Gao M, Inada M, Funabashi T, Hirahara F (2005) GnRH antagonist-induced down-regulation of the mRNA expression of pituitary receptors: comparisons with GnRH agonist effects. *Endocr J* 52:131-137

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	北原 克教
審査委員長 藤 枝 憲 二 ㊞ 審査委員 柿 崎 秀 宏 ㊞ 審査委員 渡 部 剛 ㊞ 審査委員 ㊞			
学 位 論 文 題 目 Effects of a depot formulation of a GnRH agonist (leuporelin) on the ultrastructure of male rat pituitary gonadotropes (GnRH アゴニスト (leuporelin) 徐放性製剤が下垂体前葉性性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造に与える影響)			
ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)アゴニストはヒト前立腺癌などの治療薬として用いられており、その有効性が示されている。本製剤の作用機構に関して、下垂体-精巣系に及ぼす内分泌学的作用機序に関しては明らかにされているが、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に与える形態学的影響に関しては余り明らかとなっていない。本研究では、この点を明らかにするために免疫組織化学法と形態計測法を用いて検討した。 実験動物として Wistar 系雄ラット(8 週齢)を用い、GnRH 徐放性製剤 (leuporelin) 3mg/kg 体重での単回投与群、4 週毎 12 週 投与群を設定し、84 日まで経時的な下垂体ゴナドトロピン産生細胞の			

形態学的な解析を行った。形態学的解析は、性腺刺激ホルモン産生細胞の分布および LH 含量の変化を蛍光抗体法で検索し、また、LH β 、クロモグラニン A、セクレトグラニン II の細胞内局在を電顕免疫組織化学法で検討した。血中 LH 濃度も測定した。

GnRH アゴニスト製剤投与にて血中 LH 濃度は単回投与群、持続投与群とも投与後 84 日まで低値をとっていた。性腺刺激ホルモン産生細胞の分泌顆粒、及び抗 LH 抗体による標識率は、単回投与群では開始 1 日後から著明に減少し、4~7 日後には細胞直下に限局して小型の分泌顆粒が少量観察された。その後 28 日までには徐々に回復し、投与 84 日後には対照群と同程度まで回復していた。持続投与群では減少が持続していた。グラニン蛋白も同様な変化を示した。

以上の結果は、GnRH アゴニストのゴナドトロピン分泌抑制に及ぼす急性、慢性効果について検討し、投与直後に本来の分泌刺激作用によって性腺刺激ホルモン産生細胞内の分泌顆粒を枯渇させるが、その作用は reversible であること、また同剤の持続投与効果は GnRH 受容体の desensitization を介してゴナドトロピン生合成及び分泌顆粒放出が強力に抑制されることで起こることを形態学的にはじめて示したものである。

以上の研究成果は、臨床応用されている GnRH アゴニストの作用機構の理解に有用な情報を提供したものと考えられ、また、諮問審査において論文提出者から適切な解答がえられ、この分野において十分な知識を有しているものと判断された。その結果、本論文の内容は学位論文として価値があるものと判定した。