

氏名(本籍)	佐藤貴弘
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博第692号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	副腎皮質刺激ホルモン産生細胞における神経ペプチドガラニンの発現調節機構
論文審査委員	(主査) 教授 山口 高 弘 教授 小 原 嘉 昭 教授 佐 藤 英 明

論文内容要旨

第1章 序論

ガラニン (galanin) は、1983 年に Takemoto らによってブタ小腸で発見された 29 個のアミノ酸からなるポリペプチドで、中枢および末梢神経組織中に多く含まれる。このため、視床下部において、形態学および生理学的な研究が精力的に進められた結果、galanin が摂食亢進作用を持つことや、視床下部レベルで下垂体前葉の成長ホルモン産生細胞 (somatotrophs) からの成長ホルモン (growth hormone: GH) 分泌を制御することなどが明らかにされた。

近年、galanin がラットやヒトの下垂体前葉にも存在することが明らかになると同時に、ラット下垂体前葉において、galanin 発現のレベルには著しい性差があることや、雌では galanin の発現および分泌がエストロゲン (estrogen) によって調節されていることも示された。しかしながら雄では、雌における estrogen のように galanin 発現の著しい変化を誘導する因子が見つかっていないことから、研究がほとんど進んでいない。

脊椎動物の情報伝達機構は神経系と内分泌系に大別されるが、パラニューロン説において示されているように、これらの系を構成する神経細胞および内分泌細胞では、同一細胞から複数の分泌物が分泌される点や、分泌顆粒の形成機序などの点での共通点も多く、発生学的に一連の細胞として考えることができる。神経系は内分泌系より発生が早く、単純な多細胞生物で既に神経系が成立しているのに対し、内分泌系の機能は脊椎動物から確立する。系統発生学的に見て、生理活性物質は自己分泌および傍分泌により局所因子として作用し、発達の程度が進むにつれてホルモンあるいは神経調節物質として機能するに至ったものと考えられる。したがって、神経ペプチドである galanin は、下垂体前葉細胞の発生・分化過程に密接に関与することが考えられる。

下垂体前葉において、galanin の放出が副腎皮質刺激ホルモン (corticotropin: ACTH) 濃度によって制御される一方で、高濃度の galanin が黄体形成ホルモン (lutening hormone: LH) 分泌を促進したり、成長ホルモン放出ホルモン (growth hormone releasing hormone: GHRH) 誘導性の GH 分泌を刺激する。これらの結果は、galanin 発現が下垂体前葉ホルモンの影響を受けることを示すと共に、galanin も下垂体前葉のホルモン分泌に作用していることを示している。

以上のような背景を踏まえ、本研究では、主として雄の下垂体前葉細胞における galanin の発現調節機構を解析することを目的とする。まず、ウシ下垂体前葉における galanin 陽性細胞について、形態学的に同定する (第2章)。次に、雄ラットを用いて、下垂体前葉における galanin の分泌と細胞内局在を形態学的に同定すると共に、galanin 受容体 (galanin receptor) 発現を検討する (第3章)。第4章では、galanin 陽性細胞の個体発生と成長に伴う変化、および galanin 陽性細胞に対するステロイドホルモンの影響を検討する。最後に、galanin 発現に対するテストステロン (testosterone) の作用機序について、ステロイドホルモン受容体と細胞内に存在するステロイドホルモン変換酵素群の局在を明らかにし、galanin の発現調節

機構について考察する (第5章)。

なお、本研究で用いる実験動物は、「東北大学における動物実験指針」に基づいて使用する。

第2章 ウシ下垂体前葉におけるガラニン陽性細胞の同定

ウシやブタをはじめ、家畜下垂体前葉における galanin の研究は報告されていない。しかしながら、げっ歯類では、galanin が GH やプロラクチン (prolactin: PRL) の分泌を増強することが示された。GH および PRL の分泌能は畜肉やミルクの生産に大きく影響するため、家畜における galanin の機能を解析することが重要である。そこで、本研究ではウシ下垂体前葉における galanin 陽性細胞を形態学的に同定することを試みた。

黒毛和種牛の下垂体前葉において、reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) 法および免疫組織細胞化学的手法により、galanin mRNA 発現と galanin 陽性細胞が確認された (図 1, 2)。Galanin 陽性細胞の出現割合は、去勢雄および雌とも非常に低く、差は見られなかった (図 3)。二重免疫組織化学的染色法により、ウシ下垂体前葉における galanin は、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞 (corticotrophs) に局在することが示された (図 4)。一方、in situ RT-PCR 法により、galanin mRNA 発現細胞は、galanin 陽性細胞よりも多く観察された (図 5)。

以上から、ウシ下垂体前葉における去勢雄と雌の比較では、galanin 陽性細胞の出現割合に、げっ歯類の遺伝子発現量の去勢雄と雌の差に見られるような著しい性差は観察されなかった。また、ウシ下垂体前葉において galanin が corticotrophs に局在することから、galanin の機能としてストレスに対する恒常性の維持機能が予測される。Galanin の機能を検討するためには、どのような条件で galanin が発現するのかを明らかにする必要がある。しかしながら、ウシの雄下垂体前葉において、実験区を設けて研究を進めることは困難である。そこで、ラット下垂体前葉における galanin 陽性細胞を同定し、ウシ下垂体前葉における galanin 陽性細胞と比較検討することが必要である。

第3章 ラット下垂体前葉におけるガラニン陽性細胞の同定

ラットはウシのモデル動物として必ずしも適当であるとは考えられないが、雄の下垂体前葉での galanin 発現調節機構を詳細に検討するために、以下の研究を行った。ラット下垂体前葉においても、galanin 陽性細胞に関する形態学的な報告は少ない。このため、galanin 陽性細胞の同定に関しても一定の見解が得られておらず、また galanin の細胞内微細局在も十分に検討されていない。そこで初めに、雄ラッ

ト下垂体前葉において、免疫組織細胞化学的に galanin 陽性細胞を同定することを試みた。

雄ラット下垂体前葉において、galanin 陽性細胞は下垂体前葉全体に散在的に分布し、その多くは多角形の形状を呈した (図 6)。Galanin 陽性細胞の分布を、下垂体前葉前背面の、前部、中央部および外側後部で数量形態学的に検討した結果、中央部に最も多く出現することが明らかとなった (図 7)。次に、galanin 陽性細胞を二重免疫組織化学的染色法で同定したところ、galanin の大部分が corticotrophs に局在することが明らかとなった (図 8)。さらに、galanin の微細局在を二重免疫電子顕微鏡法で検討したところ、galanin は corticotrophs の分泌顆粒内に局在することが示され、分泌顆粒内での存在様式は、galanin と ACTH が共存する、galanin のみが存在する、および ACTH のみが存在する、という 3 種類の分泌顆粒が認められた (図 9)。細胞ごとにこれら顆粒型の割合を求めた結果、いずれの部位に存在する galanin 陽性細胞においても共存型顆粒が最も多く存在し、下垂体前葉の部位による galanin 存在顆粒の構成に差は認められなかった (図 10)。また、RT-PCR 法による検討から、下垂体前葉における galanin 合成が示され (図 11A)、さらに in situ hybridization 法によって galanin mRNA 発現細胞が、多角形および卵円形の形状を呈することが明らかとなった (図 12)。また、下垂体前葉細胞において、type1 および type2 の galanin receptor 発現が認められた (図 11B)。

以上より、ラット下垂体前葉においても、ウシと同様に、galanin が下垂体前葉の corticotrophs で分泌されることが示された。このことから、ラット下垂体前葉における galanin 陽性細胞は、ウシ下垂体前葉の galanin 陽性細胞での galanin 発現調節を検討するために、使用できるものと考えられる。また、ラット下垂体前葉において galanin receptor 発現が観察されたことから、下垂体前葉内で局所的に産生された galanin が自己分泌および傍分泌的に作用することが強く示唆された。なお、galanin は下垂体前葉において合成・放出されることが示されたことから、次章以降、galanin 陽性細胞を「galanin 細胞」と呼ぶこととした。

第 4 章 ガラニン細胞の成長に伴う変化とステロイドホルモンの影響

雌ラット下垂体前葉において、galanin の発現は estrogen の動態に大きく依存する。このことは、galanin 発現には性差があることを示しているが、galanin 発現に対する雄性ステロイド、testosterone の効果を調べた報告は少ない。しかしながら、「雌雄差がある」ということは「性ステロイドが galanin 発現に関与する」ことを意味すると考えられることから、本章では galanin 細胞に及ぼす testosterone の影響を組織細胞化学的に詳細に検討した。さらに、前章で示したように、galanin が ACTH と同一分泌顆粒に共存したことから、グルココルチコイド (glucocorticoid) が galanin 細胞に及ぼす影響についても検討した。

まず、galanin 細胞の個体発生の時期を正確に決定するために、胎児齢 14.5 日から 17.5 日までの胎児の、

外側から内側方向へ 39 μm おきに切片を作製して、galanin 細胞および corticotrophs の出現時期を検討した。また、成長に伴う galanin 細胞および corticotrophs の変化は、corticotrophs に染色性の異なる細胞が確認されたことから、ミラー切片法を用いて細胞レベルでの変化を詳細に検討した。Corticotrophs を ACTH の染色性と galanin の存在の有無により、AsGp (ACTH strongly positive and galanin positive) 細胞、AsGn (ACTH strongly positive and galanin negative) 細胞、および AwGn (ACTH weakly positive and galanin negative) 細胞の亜型に分類し、さらに ACTH 陰性の galanin 細胞を AnGp (ACTH negative and galanin positive) 細胞とした (図 13)。

雄ラット下垂体前葉において、corticotrophs は胎児齢 15.5 日に初めて出現し、galanin 細胞は胎児齢 16.5 日に初めて認められた (図 14)。また、成長に伴う galanin 細胞の出現割合には有意な変化が観察されなかったものの、減少傾向を示した (図 15)。この変化を亜型構成で検討したところ、1 週齢に比べ 52 週齢で AsGp 細胞の割合が減少し、AwGn 細胞の割合が増加した (図 16)。以上より、galanin 細胞は corticotrophs よりも後に発生することから、galanin の合成開始機構と ACTH の合成開始機構とは異なると考えられる。

次に、Sprague-Dawley 雄ラットを使用し、去勢手術と副腎除去手術を行い、corticotrophs での galanin 発現に対するステロイドホルモンの影響を検討した。初めに、testosterone と galanin 発現の関係を明らかにするために、対照区[Int]、偽手術区[So]、去勢区[Cx]、および去勢+testosterone propionate 投与区 (50 μg testosterone propionate/250 μl sesame oil/100g 体重) [CxT] の実験区を設けた。手術は 5 週齢で行い、6, 12, および 24 日後に下垂体を採取した。次に、glucocorticoid と galanin 発現の関係を明らかにするために、対照区[Int]、偽手術区[So]、副腎除去区[AdX]、および副腎除去+デキサメサゾン (dexamethazone) 投与区[AdX+DEX]を設けた。10 週齢で手術を行い、1, 5, および 15 日後に下垂体を採取した。

去勢雄において、galanin 細胞の出現割合は手術後の日数に関わらず減少し、testosterone 投与によって回復した (図 17A)。しかしながら、corticotrophs の出現割合は影響を受けなかった (図 17B)。亜型構成を詳細に検討したところ、AsGp 細胞の割合が減少し AwGn 細胞の割合が増加していることが示された (図 18)。副腎除去により galanin 細胞の出現割合は著しく減少した (図 19A)。副腎除去後における変化は、去勢の場合とは異なり、corticotrophs も galanin 細胞と同様の減少を示し (図 19B)、その亜型構成にもほとんど変化は見られなかった (図 20)。

本章では、雄ラット下垂体前葉において、galanin 発現が testosterone により制御されることを初めて示した。同時に、corticotrophs に testosterone 反応性の細胞型が存在することを見い出した (図 21)。副腎除去において galanin 細胞の出現割合は減少したが、その変化は亜型構成の変化を伴わなかった。副腎除去後の galanin 細胞割合の減少は、副腎除去に伴う副腎皮質ホルモンの著しい減少による ACTH 動員刺激、すなわちネガティブフィードバック作用によるものである。以上より、galanin 細胞に対して

testosterone が作用することが示されたことから、その作用機序に関してさらなる解析が必要である。

第5章 ガラニン発現に対するテストステロン作用機序の解明

ステロイドホルモンの作用調節は、ステロイドホルモンの活性化および不活性化と、受容体発現量によって制御されている。これまで testosterone が galanin の発現を調節するという報告がないことから、本章では testosterone による galanin の発現調節系を”Intracrinology (細胞組織内分泌学)”的な側面から捉え (図 22), corticotrophs での galanin 発現に対する testosterone の作用機構を明らかにすることを試みた。

材料および実験区の設定は前章と同様に行い、二重免疫組織化学的染色法により galanin 細胞内でのアンドロゲンレセプター (androgen receptor: AR) およびエストロゲンレセプター (estrogen receptor: ER) の局在を検討した。その結果, galanin 細胞の一部が AR と ER の一方あるいは両方を発現することが明らかとなった (図 23, 24)。しかしながら, 全 galanin 細胞に占める, AR および ER を発現する galanin 細胞の割合に, So 区と Cx 区での差は見られなかった。次に, RT-PCR 法により, ステロイド変換酵素である 5 α -レダクターゼ タイプ 1 (5 α -reductase type1: 5 α -R1), 17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ タイプ 1 (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type1: HSD1), およびチトクローム P450 アロマトラーゼ (cytochrome P450 aromatase: P450arom) の発現を調べた。その結果, 下垂体前葉において, HSD1 および P450arom の発現を確認した (図 25)。さらに, P450arom mRNA 発現を in situ RT-PCR 法によって細胞レベルで調べた結果, 全ての実験区で galanin 細胞の多い部位で P450arom mRNA 発現細胞が多く観察された (図 26)。

以上のことから, corticotrophs での testosterone による galanin 発現の調節機構として, (1) testosterone の直接作用, および (2) P450arom により testosterone からエストラジオール (estradiol) に変換された estradiol の作用が考えられる (図 27)。また, (3) 循環血中のアンドロステンジオン (androstenedione) が, P450arom および HSD1 の両酵素により, 同じく estradiol へ変換されることによって作用する機構も考えられる (図 27)。一方, galanin 細胞に存在する AR および ER の発現には, 去勢に伴う変化は認められなかった。以上のことから, corticotrophs での galanin 発現に対する testosterone の主要な作用機序として, 下垂体前葉内で testosterone が estradiol へ変換され, この estradiol が作用する機構の存在が示され, 雄ラット下垂体前葉における intracrinology 説による galanin 発現調節機構を立証した。

第6章 総合考察

本論文では、雄の下垂体前葉における galanin 細胞を組織細胞化学的に corticotrophs であると同定した上で、testosterone による corticotrophs 内での galanin 発現調節機構を解析した。本研究では、血中に大量にあるホルモンが組織内で活性型に変換されてその場で局所的に作用するという、「intracrinology (細胞組織内分泌学)」の概念を持ち込んだ。細胞組織内分泌学的研究では、特定の細胞が関与し、対象となるホルモン量は微量で、かつ作用範囲も限定的であることから、従来の生化学的検索法では解析が困難であり、組織細胞化学的手法と分子生物学的な手技の組み合わせによる解析が威力を発揮する。

本研究では、初めに galanin 細胞内に AR および ER が局在することを証明した。このことから、AR に対する、testosterone あるいは DHT の直接作用が考えられた。しかしながら、ER 陽性の galanin 細胞が AR 陽性の galanin 細胞よりも多いことから、testosterone が P450arom によって estradiol へ、androstenedione が P450arom および HSD1 の両酵素により estradiol へ、それぞれ変換されることによって ER に作用し、galanin 発現を調節するという、新たな調節機構の存在を確認することに成功した。一方、去勢による AR および ER 発現 galanin 細胞割合に、変化は観察されなかった。

以上を総合すると、雄ラット下垂体前葉における corticotrophs の galanin 発現調節因子は、細胞組織内分泌学的に testosterone から変換された estrogen であるという新知見が得られた。ウシ下垂体前葉の galanin も、ラット下垂体前葉の galanin と同様 corticotrophs に局在しており、またアミノ酸配列の相同性も高いことなどから、ウシ下垂体前葉においても、ラット下垂体前葉における galanin 発現調節機構と同様の機構が存在する可能性が考えられる。

【第2章 ウシ下垂体前葉におけるガラニン陽性細胞の同定】

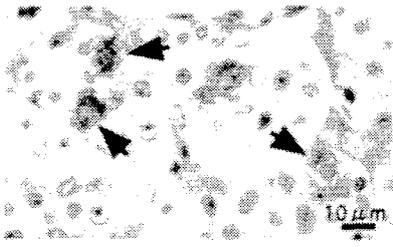


図1. ウシ下垂体前葉におけるgalanin陽性細胞の分布

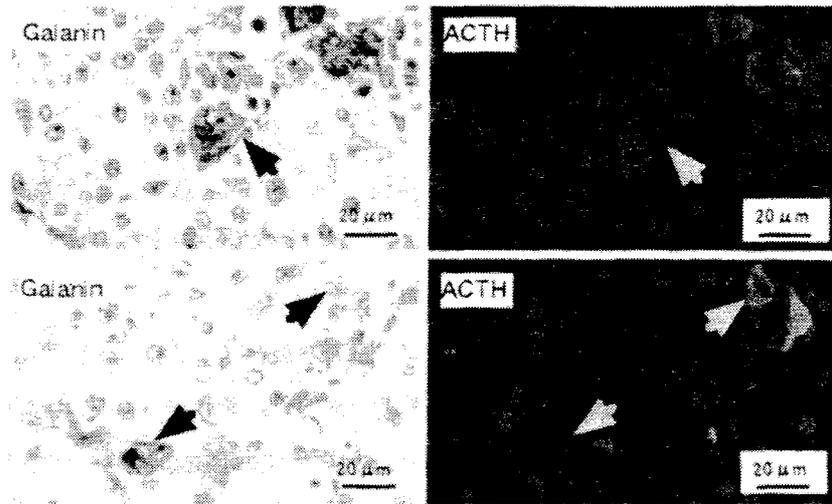


図4. ウシ下垂体前葉におけるgalanin陽性細胞の同定

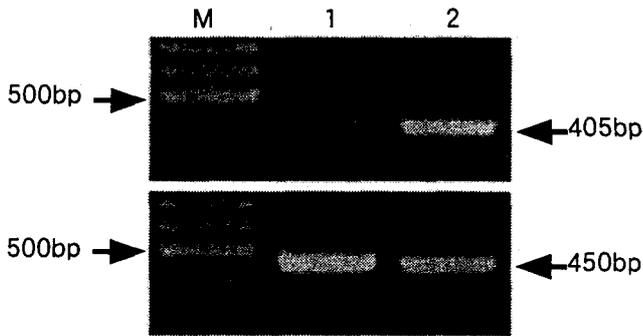


図2. ウシ下垂体前葉におけるgalanin mRNA発現
M: 100bpマーカー, レーン1: 去勢雄, レーン2: 雌。
上段: galanin, 下段: GAPDH。

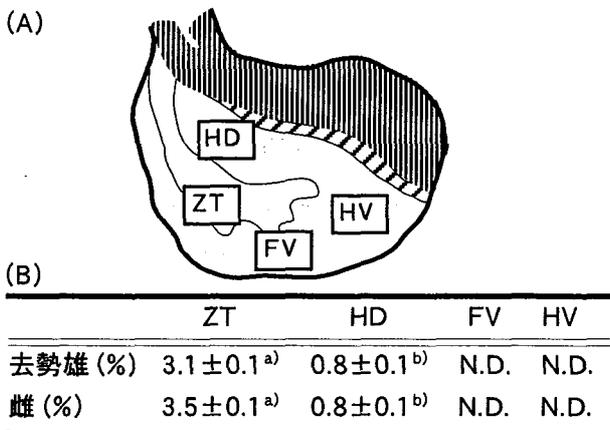


図3. ウシ下垂体前葉におけるgalanin陽性細胞の分布と出現割合
同性異符号間に有意差有り(P<0.05)。

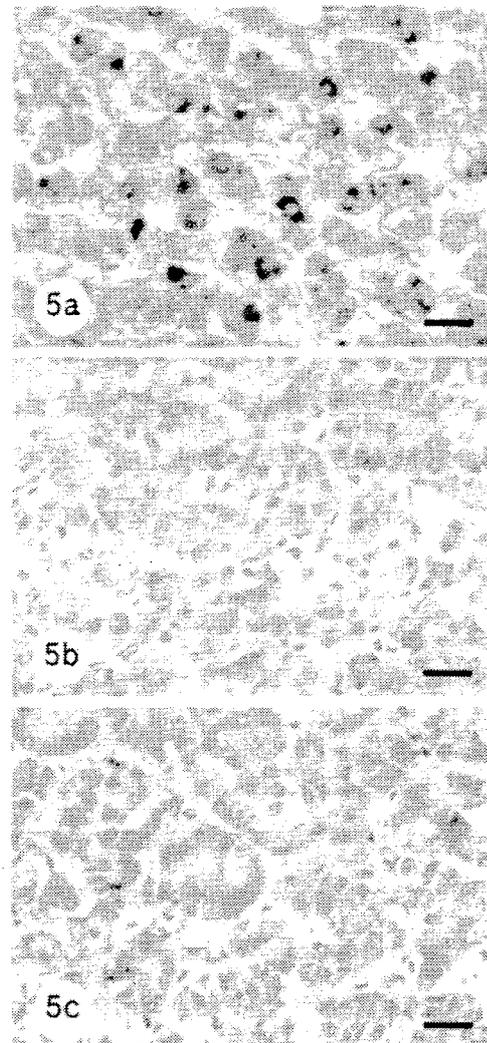


図5 ウシ下垂体前葉におけるgalanin mRNA発現細胞の同定
a: galanin mRNA発現細胞, b: ネガティブコントロール(逆転写酵素(-)), c: ネガティブコントロール(プライマー(-))。スケールバー=20μm。

【第3章 ラット下垂体前葉におけるガラニン陽性細胞の同定】

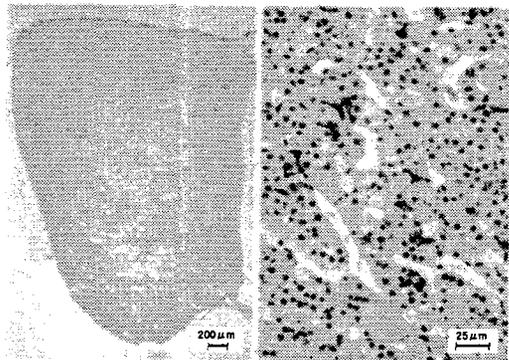


図6. ラット下垂体前葉におけるgalanin陽性細胞の分布

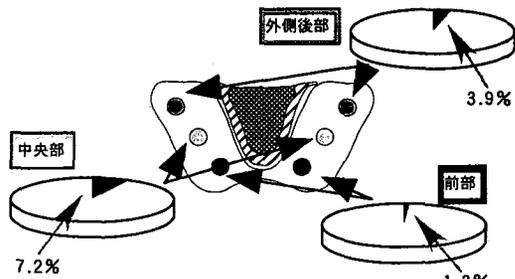


図7. ラット下垂体前葉におけるgalanin陽性細胞の出現割合

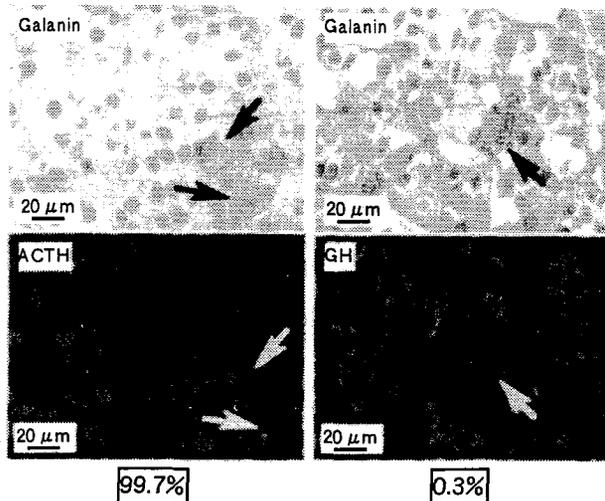
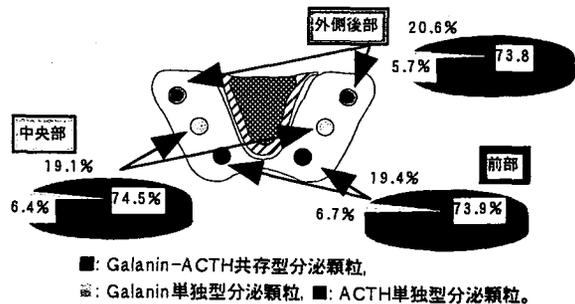
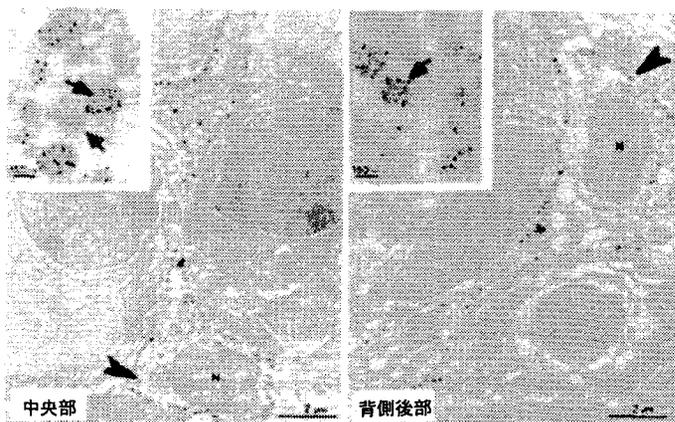


図8. ラット下垂体前葉におけるgalanin陽性細胞の同定
同列は同一切片を示す。Galanin陽性corticotrophsは99.7%, galanin陽性somatotrophsは0.3%, それぞれ存在した。



■: Galanin-ACTH共存型分泌顆粒, □: Galanin単独型分泌顆粒, ▨: ACTH単独型分泌顆粒。
図10. ラット下垂体前葉におけるgalanin陽性細胞あたりの分泌顆粒型構成

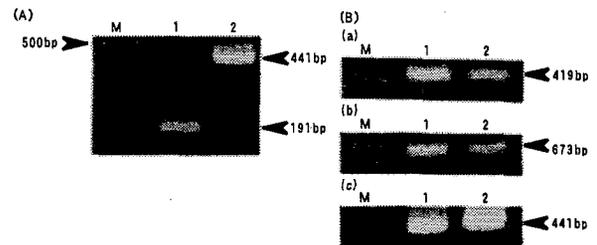


図11. ラット下垂体前葉におけるgalanin および galanin receptor mRNA発現

(A)Galanin mRNA 発現: M: 100bpマーカー, レーン1: galanin, レーン2: GAPDH。 (B)Galanin receptor mRNA発現: a:type1, b:type2, c:GAPDH。 M: 100bpマーカー, レーン1: 視床下部, レーン2: 下垂体前葉。

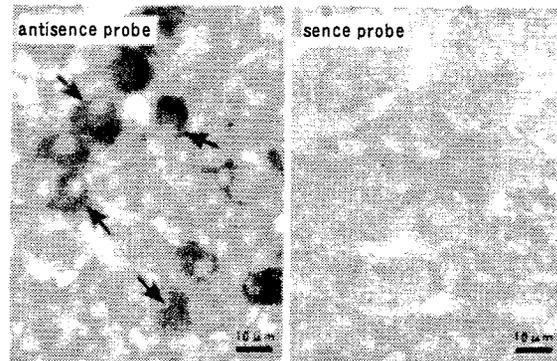
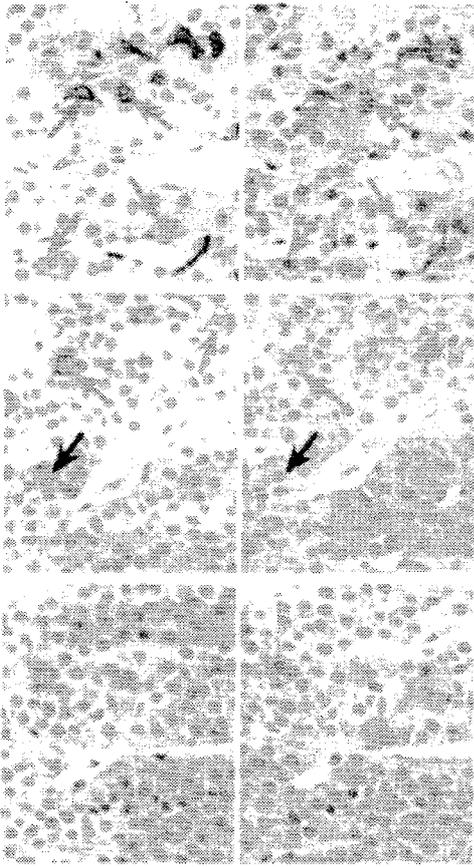


図12. ラット下垂体前葉におけるgalanin mRNA発現細胞の同定

図9. ラット下垂体前葉におけるgalaninの微細局在
Galanin陽性細胞を*で示した。左上の挿入写真は、▶付近の強拡大像。金粒子径: 15nm: galanin, 5nm:ACTHの局在を示す。分泌顆粒には, galaninとACTH双方が含有されているもの(→), いずれか一方のみを含有するもの(→, ◀)が存在する。N: 核。

【第4章 ガラニン細胞の成長に伴う変化とステロイドホルモンの影響】



細胞亜型	AsGp	AsGn	AwGn	AnGp
ACTH	++	++	+	-
galanin	+	-	-	+
	↗	↗	↗	↗

図13. ラット下垂体前葉におけるcorticotrophs亜型の同定

左の列はcorticotrophsを、右の列はgalanin細胞の写真。同段の2枚はミラー切片で、右の列の写真をコンピューター上で反転させた。細胞亜型の表記は、As:ACTH strongly positive, Aw: ACTH weakly positive, An: ACTH negative, Gp: galanin positive, Gn: galanin negativeであることを示す。したがって、AsGpはACTH strongly positive and galanin positive細胞を表す。

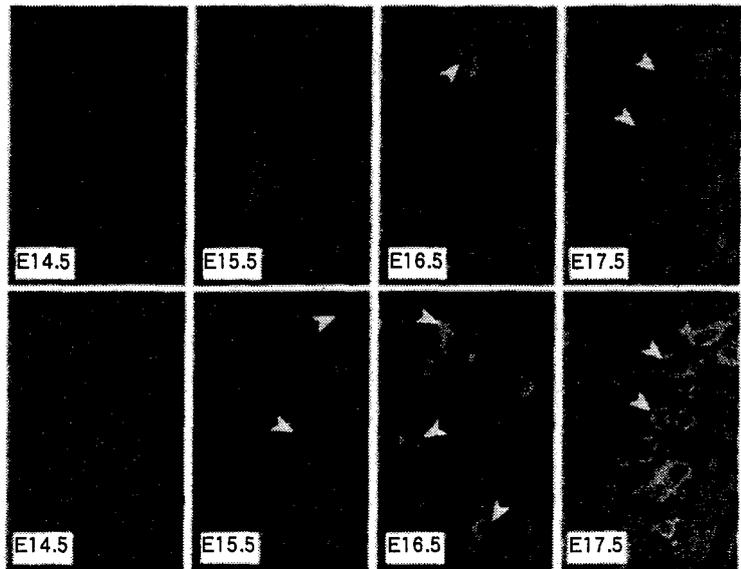


図14. ラット胎児下垂体前葉におけるgalanin細胞の個体発生
同列は連続切片。上段: galanin細胞, 下段: corticotrophs。

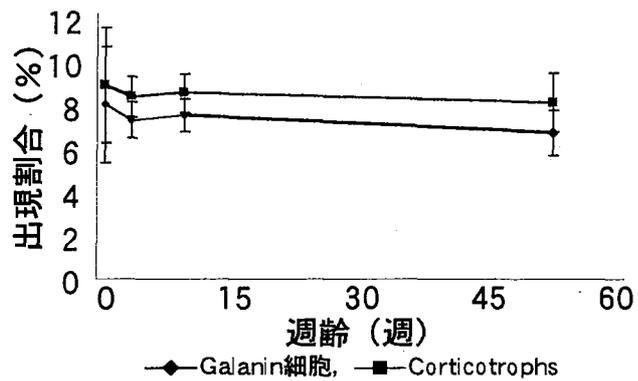


図15. ラット下垂体前葉における, galanin細胞とcorticotrophsの成長に伴う出現割合の変化

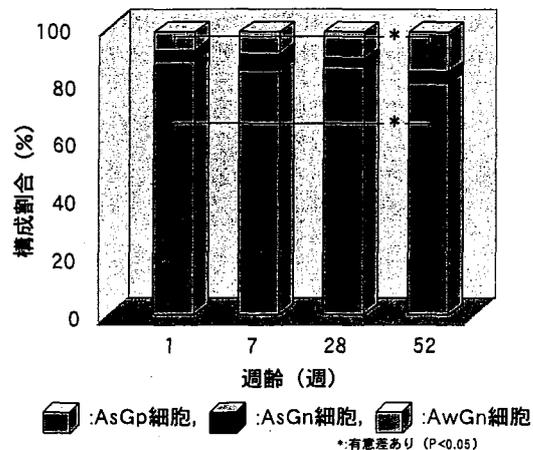


図16. ラット下垂体前葉におけるcorticotrophs亜型の構成割合の成長に伴う変化

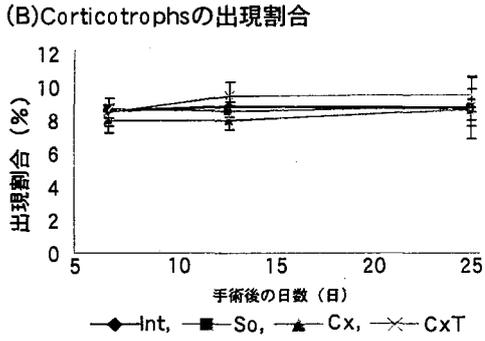
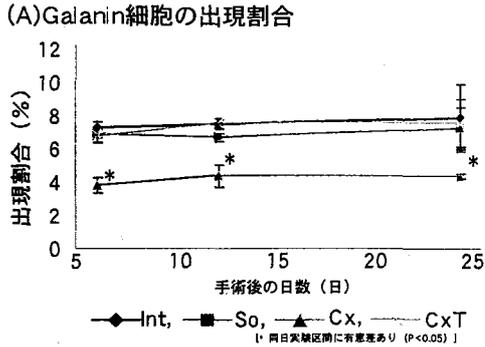


図17. ラット下垂体前葉におけるgalanin細胞とcorticotrophsの出現割合の去勢に伴う変化

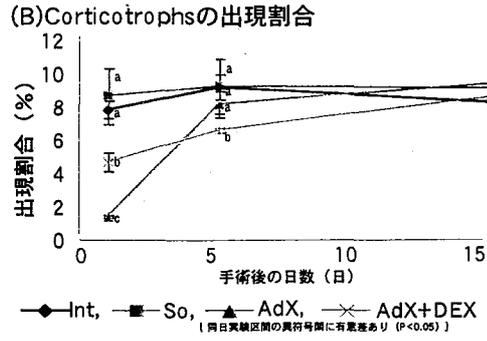
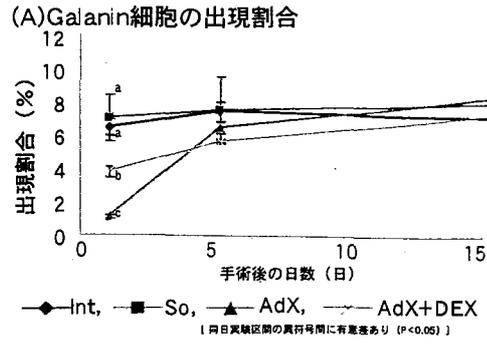


図19. ラット下垂体前葉におけるgalanin細胞とcorticotrophsの副腎除去に伴う出現割合の変化

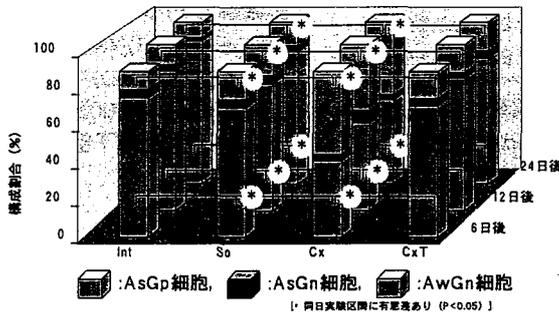


図18. ラット下垂体前葉における去勢に伴うcorticotrophs亜型構成割合の変化

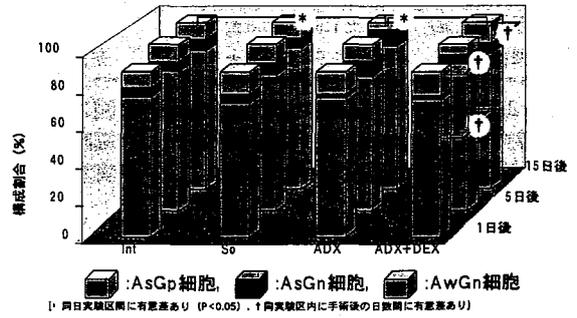


図20. ラット下垂体前葉における副腎除去に伴うcorticotrophs亜型構成割合の変化

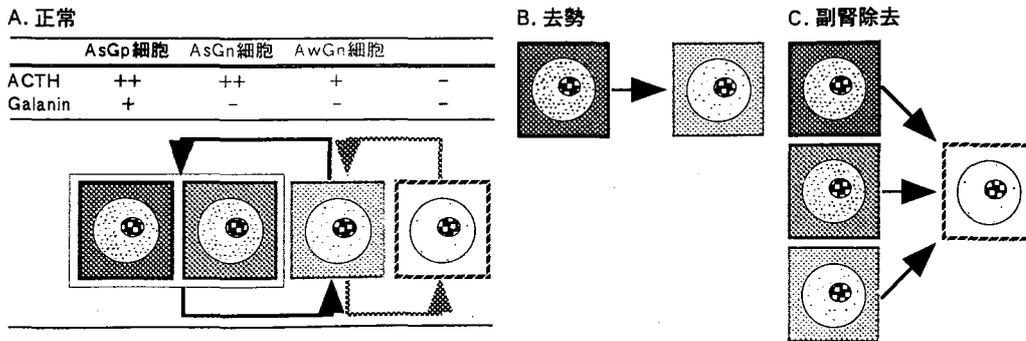


図21. ラット下垂体前葉におけるcorticotrophs亜型と去勢および副腎除去に伴う変化のモデル

【第5章 ガラニン発現に対するテストステロン作用機序の解明】

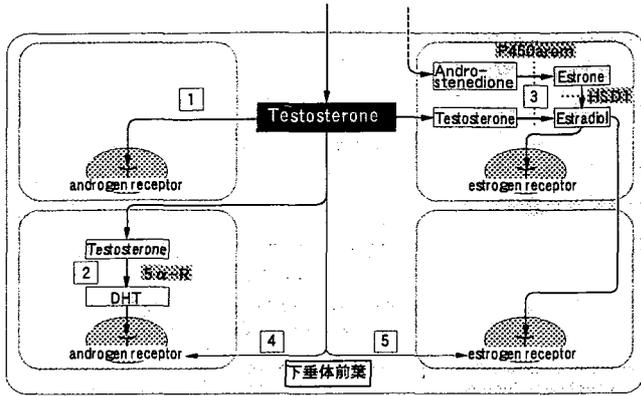
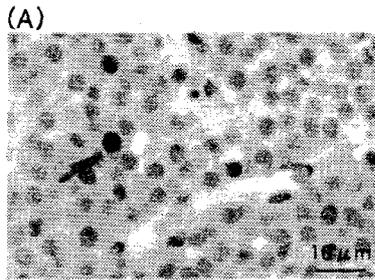


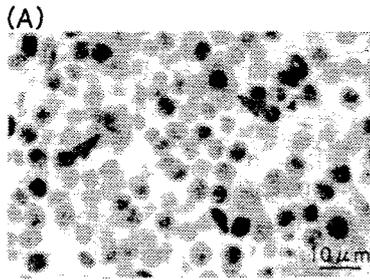
図22. ラット下垂体前葉でのtestosteroneによるgalanin発現調節機構のモデル



(A) AR陽性galanin細胞 (→), AR陰性galanin細胞 (→)

	AR(+)	AR(-)
偽手術区 (%)	5.7 ± 1.9	94.3 ± 1.9
去勢区 (%)	6.4 ± 1.9	93.6 ± 1.9

図23. ラット下垂体前葉におけるgalanin細胞内のandrogen receptor発現の比較
実験区間に有意差なし(P<0.05)。



(A) ER陽性galanin細胞 (→), ER陰性galanin細胞 (→)

	ER(+)	ER(-)
偽手術区 (%)	18.1 ± 2.9	81.9 ± 2.9
去勢区 (%)	14.8 ± 6.9	85.2 ± 6.9

図24. ラット下垂体前葉におけるgalanin細胞内のestrogen receptor発現の比較
実験区間に有意差なし(P<0.05)。

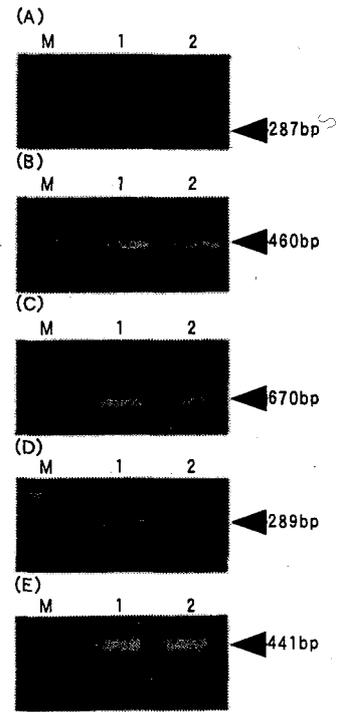


図25. ラット下垂体前葉におけるステロイドホルモン変換酵素群の mRNA発現
(A)5α-R1, (B)HSD1 (1.4), (C)HSD1(1.7), (D)P450arom, (E)GAPDH. M:100bpマーカー, レーン1:視床下部, レーン2:下垂体前葉。

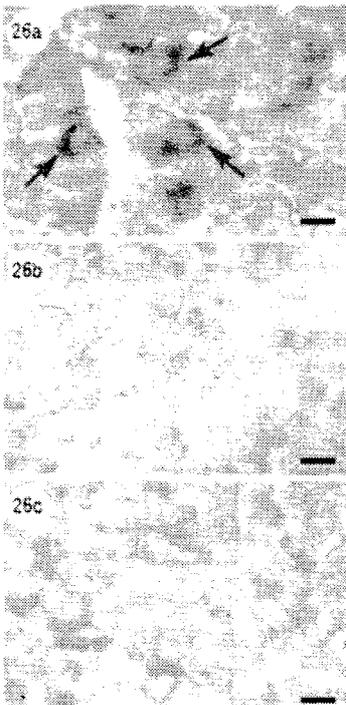


図26. ラット下垂体前葉におけるP450arom mRNA発現細胞
a: P450arom mRNA発現, b: ネガティブコントロール (逆転写酵素(-)), c: ネガティブコントロール (プライマー(-))。スケールバー=10μm。

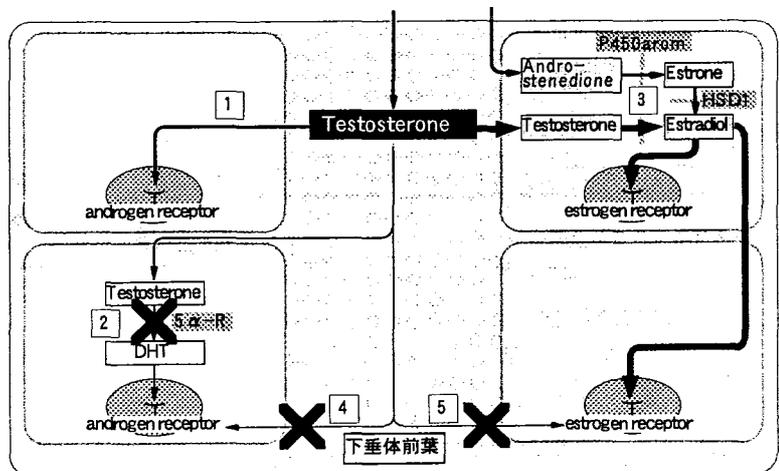


図27. ラット下垂体前葉におけるgalanin発現の細胞組織内分泌学的制御

論文審査結果要旨

ガラニンとは、1983年にブタ小腸で発見された29個のアミノ酸からなる脳腸ホルモンの一種であり、視床下部レベルで摂食亢進作用や下垂体前葉の成長ホルモン分泌促進作用を有する。ラットやヒトの下垂体前葉にガラニンが存在し、雌ではガラニンの発現および分泌がエストロゲンによって調節されるが、雄のガラニン発現の誘導・調節因子が見つかっていないことから、下垂体前葉でのガラニンの役割とその発現調節機構に関する研究が遅れているのが現状である。

本論文の提出者は、雌の下垂体前葉での成績を受けて、雄性ステロイドホルモンであるテストステロンが雄下垂体前葉のガラニン発現調節因子であるとの考えから、細胞組織内分泌学の概念を持ち込み、雄下垂体前葉細胞のガラニン発現機構を解析した。

ガラニンは視床下部において、自己分泌あるいは傍分泌的に神経細胞に作用することから、下垂体前葉でのガラニン産生細胞の同定を試み、ウシ下垂体前葉でガラニンが副腎皮質刺激ホルモン産生細胞で産生されることを二重免疫染色法とin situ RT-PCR法により、初めて証明した。また、雄ラットの下垂体前葉でも、ガラニン産生細胞は副腎皮質刺激ホルモン産生細胞であり、分泌顆粒内に局在することを二重免疫電子顕微鏡法で明らかにした。さらに、前葉細胞で、タイプ1とタイプ2のガラニンレセプター発現を認め、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞で産生されたガラニンが自己分泌および傍分泌的に前葉細胞に作用することを示した。

ガラニン産生細胞が副腎皮質刺激ホルモン産生細胞であったことから、去勢雄ラットで副腎皮質刺激ホルモン産生細胞でのガラニン発現に対するテストステロンの影響を調べ、ガラニン陽性細胞の出現割合は去勢後に減少し、テストステロン投与によって回復することを確認した。このことから、雄ラット下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン産生細胞において、ガラニン発現がテストステロンにより制御されることを初めて明らかにした。

そこで、テストステロンによるガラニンの発現調節機構の本質を探るべく、細胞組織内分泌学的に解析し、雄下垂体前葉でステロイド変換酵素である 17β -ヒドロキシ脱水素酵素タイプ1とチトクロームP450アロマターゼの発現をRT-PCR法とin situ RT-PCR法で確認した。さらに、ガラニン産生細胞でアンドロゲンレセプターとエストロゲンレセプターが発現することを明らかにした。このことから、雄ラット下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン産生細胞のガラニン発現調節因子は、テストステロンから変換されたエストロゲンであるという新知見を得た。

以上、本論文は細胞組織内分泌学的に細胞内で変換を受けたステロイドホルモンがガラニン発現を調節することを証明した。このことは、下垂体前葉細胞の機能分化に新たな研究展開を提示するものであり、高く評価される。よって、審査員一同は、これを博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。