



Mechanism involved in synergistic ACTH response to activating protein kinase-A and -C in rat anterior pituitary cells

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩淵, 昌康 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/10271/1082 |

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

| | | | |
|-------|--|---------|-------------|
| 学位記番号 | 医博第 229号 | 学位授与年月日 | 平成 9年 3月26日 |
| 氏 名 | 岩 淵 昌 康 | | |
| 論文題目 | <p>Mechanism involved in synergistic ACTH response to activating protein kinase-A and -C in rat anterior pituitary cells (ラット下垂体細胞の ACTH 分泌における細胞内情報伝達系の相互作用に関する研究)</p> | | |

博士(医学) 岩 淵 昌 康

論文題目

Mechanism involved in synergistic ACTH response to activating protein kinase-A and-C in rat anterior pituitary cells

(ラット下垂体細胞の ACTH 分泌における細胞内情報伝達系の相互作用に関する研究)

論文の内容の要旨

[はじめに]

下垂体からの Adrenocorticotropin (ACTH) 分泌の促進機構は主として corticotropin releasing factor (CRF) および arginine vasopressin (AVP) によって調節されている。CRF は cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) 系を、AVP は Inositol-1, 4, 5-P₃/diacylglycerol-protein kinase C (PKC) 系を活性化することが知られている。in vivo および in vitro において CRF および AVP の同時添加によって相乗的 ACTH 分泌促進を認める。その機構については、活性化された PKC の cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) の抑制による細胞内 cyclic AMP の相対的増加が一因である、との報告がなされている。我々は cyclic nucleotide に特異的な PDE 阻害薬である 1-isoamyl-3-isobutylxanthine (IX) を用いて、PKA 系と PKC 系による相乗的 ACTH 分泌促進の機構につき検討した。

[材料ならびに方法]

150-200g の雄 SD ラットを断頭屠殺後、ラット下垂体前葉細胞を分離し、1 well あたり 10 万または 30 万個の単層培養細胞系を用い、各種薬剤に対するラット下垂体前葉細胞の反応を medium 中の ACTH および、細胞内 cyclic AMP をラジオイムノアッセイで測定した。

(検討試薬および測定項目)

PKC 系の活性化剤として AVP、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を、PKA 系の活性化剤として forskolin (FK)、8-bromoadenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP) をもちいて、以下の条件を設定した。

- ・ IX (50 μ M) と AVP (1-100nM) の同時添加による培養液中の ACTH、およびその際の細胞内 cAMP の測定をした。 (実験 I、II)
- ・ IX (50 μ M) および PMA (0.1-10nM) 添加による培養液中の ACTH 値の測定。 (実験 III)
- ・ IX (50 μ M) および CRF (0.1-10nM) 添加による培養液中の ACTH 値の測定。 (実験 IV)
- ・ IX (50 μ M) および FK (0.1mM) または 8-Br-cAMP (0.5mM, 5mM) 添加による培養液中の ACTH 値の測定。 (実験 V)
- ・ 8-Br-cAMP (0.5mM) および PMA (1nM) 添加による培養液中の ACTH 値の測定。 (実験 VI)

[結 果]

ラット下垂体細胞の ACTH 分泌は AVP により濃度依存性に増加し、さらに cAMP に選択的な PDE 阻害薬である IX の同時添加によりさらに相乗的に増加した (I)。一方、細胞内 cAMP は IX 添加によって、PDE 阻害による上昇を認めるが、AVP を同時添加しても、不変であった (II)。また、PKC を直接活性化する PMA の添加により下垂体細胞の ACTH 分泌は用量依存的に増加し、IX 添加により

相乗分泌を認めた (Ⅲ)。また adenylate cyclase (AC) を活性化することにより PKA 系を刺激する CRF 添加により、ACTH 分泌は増加するが、ⅡX の同時添加では相乗作用は明らかでなかった (Ⅳ)。さらに AC を直接活性化する forskolin または PKA を直接活性化する 8-Br-cAMP との同時添加によって、ⅡX の ACTH 分泌に対する相乗効果を認めなかった (Ⅴ)。さらに PKA および PKC を直接的に活性化する 8-Br-cAMP および PMA の同時添加によって、ACTH 分泌は相乗的に増加した (Ⅵ)。

[考察及び結論]

ラット下垂体細胞からの ACTH 分泌調節機構には PKC 系および cAMP-PKA 系が関与するが、既報によれば活性化した PKC が Phosphodiesterase 活性の阻害を介し、cAMP の相対的増加により PKA 系との相乗作用をきたすことが指摘されていた。今回の検討により PKA に関して、phosphodiesterase の阻害を介さずとも、細胞内 cAMP の上昇が存在することが PKC との相乗作用の十分条件であることが推定された。また、PKC および PKA が直接的にあるいは common substrate を介して相乗的に ACTH 分泌を促進するという可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

下垂体からの adrenocorticotropin (ACTH) 分泌の促進機構は主として corticotropin releasing factor (CRF) および arginine vasopressin (AVP) によって調節されている。後者の下垂体前葉細胞に対する作用は CRF に比し弱い、CRF の作用を増強する作用をしめす。従って、CRF と AVP は下垂体前葉細胞の ACTH 分泌において協調的 (synergistic) な作用を有しているといえる。CRF は cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) 系を、AVP は inositol-1, 4, 5-P₃/diacylglycerol-protein kinase C (PKC) 系を活性化することが知られている。in vivo および in vitro において CRF および AVP の同時添加によって相乗的 ACTH 分泌促進を認める。その機構については、活性化された PKC の cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) の抑制による細胞内 cyclic AMP の相対的増加が一因である、との報告がなされている。我々は cyclic nucleotide に特異的な PDE 阻害薬である 1-isoamyl-3-isobutylxanthine (ⅡX) を用いて、PKA 系と PKC 系による相乗的 ACTH 分泌促進の機構につき検討した。

雄 SD ラット下垂体前葉から単離した初代培養細胞からの AVP による ACTH 放出の増加の程度は AVP 1nM で約 1.5 倍、10nM、100nM ではいずれも約 2 倍である。50 μ M の阻害剤 ⅡX を共存させた場合、促進の程度は AVP 1nM で約 2 倍、同 100nM で約 3 倍である。ⅡX は細胞内 cAMP 量を AVP の存否にかかわらず約 1.5 倍増加させるが、AVP そのものは 100nM でもほとんど有意の増加をもたらさない。

PKC の活性化剤である PMA は濃度に応じて ACTH の分泌を増加させる。その効果は PMA 1~10nM でとくに顕著である。ⅡX の存在は PMA の効果をさらに増強するだけでなく PMA 0.1~1nM で増強効果は最も顕著であることから、ACTH 放出の PMA に対する感受性を高めていると考えられた。CRH は ACTH の放出を顕著に増加させるが、その効果は CRH 10nM まではほぼ直線的に上昇する。ⅡX は CRH の 0.1 および 1nM で促進効果を示す (とくに 1nM で) が、0 および 10nM では効果がない。このことは PMA の場合と似て ACTH 放出の CRH に対する感受性を高めたことになる。

アデニル酸シクラーゼ活性化剤である forskolin の 0.1mM は ⅡX の有無にかかわらず ACTH の放出を約 2 倍増加させる。cAMP 類似物質である 8-Br-cAMP は 0.5mM で ACTH の放出を約 1.5 倍増加させる。この作用は ⅡX の添加によってさらに増強される。5mM では約 3 倍の増加がみられるがこの濃度では

ⅡXの添加はほとんど無効である。

これらの結果はまず第一に CRH と AVP が ACTH の放出を増加させるという従来の報告を再確認した上で、細胞内 cAMP の増加がたしかに CRH 効果に関与していることを実証した。また、今回の研究で示されたことは、細胞内 cAMP 濃度の ACTH 放出刺激効果には飽和現象がみられることである。それに対して AVP は確かに ACTH の放出を促進するものの、AVP 単独による ACTH 放出促進効果と細胞内 cAMP 濃度がかならずしも平行しないことは AVP の作用が、PKC 活性化→ PDE 抑制という図式によるより、むしろそれ以外の機構による可能性を想定させるものといえ、申請論文にはこの点で新たな知見がみとめられた。

以上の発表と質疑に続き本研究に関連して以下の質問を行った。

- 1) ACTH 放出量の測定時間
- 2) 用いた細胞試料の細胞構成
- 3) PMA に対する感受性について
- 4) 阻害剤 (ⅡX) の構造
- 5) ⅡX と IBMX の酵素特異性
- 6) PKC のダウンレギュレーションの条件
- 7) ACTH 放出の初期スパイクの内容
- 8) カルシウムチャネルの活性化
- 9) ACTH 分泌に PKC 系は生理的にも関与するのか
- 10) $V1\beta$ と CRH-R1 の数の変動が起こる状況
- 11) AVP が ACTH 分泌細胞に達する経路
- 12) ⅡX の効果と PKC 関与の関連性
- 13) PMA + ⅡX のときの細胞内 cAMP 量
- 14) 浸透圧調節のさいの ACTH 分泌の挙動
- 15) 尿崩症のさいに ACTH 分泌はどうなるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士 (医学) の学位論文としてふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 道 也

副査 副学長 五十嵐 良 雄 副査 講師 西 澤 茂