



The role of ether-a-go-go-related gene K⁺ channels in glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin release by rat pituitary cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山下, 美保 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/806

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 5 4 4 号	学位授与年月日	平成 2 1 年 3 月 1 8 日
氏 名	山 下 美 保		
論文題目	<p>The role of ether-a-go-go-related gene K⁺ channels in glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin release by rat pituitary cells (ラット下垂体前葉における ACTH 分泌に対するグルココルチコイド抑制作用での ether-a-go-go-related gene K⁺チャンネルの役割)</p>		

博士(医学) 山下 美保

論文題目

The role of ether-a-go-go-related gene K^+ channels in glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin release by rat pituitary cells

(ラット下垂体前葉における ACTH 分泌に対するグルコルチコイド抑制作用での ether-a-go-go-related gene K^+ チャンネルの役割)

論文内容の要旨

[はじめに]

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)は副腎皮質からのグルコルチコイド分泌を促進する重要な下垂体ホルモンである。その合成および分泌は主に視床下部由来のACTH放出ホルモン (CRH)によって促進され、グルコルチコイドによるフィードバックによって抑制されている。ラット下垂体前葉細胞において、CRHはG蛋白質共役型受容体であるCRH-R1を介してcAMP依存プロテインキナーゼ A (PKA)カスケードを活性化し、ACTH分泌を促進する。

下垂体前葉細胞からのACTH分泌に対するグルコルチコイドの抑制作用は暴露開始後30分以内に起こる早期、30分から2時間以内に起こる中期、数時間以降に起こる後期の三期に分かれるとされている。後期抑制においてACTH前駆体(プロオピオメラノコルチン; POMC)およびCRH-R1の発現が抑制されるのに対し、中期抑制においてPOMC発現は抑制されず、ACTH放出が抑制されるとされているが、その機序は未だ解明されていない。

我々は、細胞膜電位を調節する様々な K^+ チャンネルに着目し、CRHによるACTH分泌およびグルコルチコイドによる中期ACTH分泌抑制作用に対する関与を検討し、ether-a-go-go-related gene (ERG) K^+ チャンネルに関し重要な知見を得た。

[材料ならびに方法]

K^+ チャンネル阻害薬として、広域 K^+ チャンネル阻害薬であるtetraethylammonium(TEA) (0.1-10 mM)、小コンダクタンス Ca^{2+} 依存型 K^+ チャンネル阻害薬であるapamin (1-100 μ M)、高コンダクタンス Ca^{2+} 依存型 K^+ チャンネル阻害薬であるcharybdotoxin (1-100 nM)、ERG K^+ チャンネル阻害薬であるastemizole (0.3-10 μ M)、E-4031 (0.01-10 μ M)を用いた。雄SDラット(6週齢)の下垂体前葉細胞をコラゲナーゼ処理し、細胞を採取。5万個細胞を各ウェルに散布し、10%FCSを含むM199で単層培養を行い、4日目に実験に供した。

(1) ACTH分泌に関する検討

前処置として各 K^+ チャンネル阻害薬を30分間添加した。その後、さらに100 nM corticosteroneおよび1 nM CRHを1時間添加し、培養液を回収してACTHを測定した。培養液中ACTH濃度はラジオイムノアッセイ(RIA)法を用いた。ACTH-RIAには抗ACTH1-24家兔血清を用い、その検出感度は2 pg/tubeであった。

(2) ERG K^+ チャンネル発現に関する検討

雄SDラット下垂体前葉を摘出し、total RNAを抽出した。ERG K^+ チャンネルのサブタイプであるr-erg 1~3 の遺伝子発現について、RT-PCRを行った。さらに、雄SDラットの下垂体前葉をコラゲナーゼ処理し、細胞を採取。20万個細胞を散布し、単層培養を行った。培養細胞に100 nM corticosteroneを1時間添加した後、total RNAを抽出。各サブタイプについて、発現遺伝子の定量解

析(realtime RT-PCR)を行った。

[結果]

(1) ACTH分泌に関する検討

K⁺チャンネル阻害薬のうちTEAは最大濃度でのみCRHによるACTH分泌を増加させた(1.86 ± 0.23 vs. 2.58 ± 0.27 ng/well at 10 mM, $p < 0.05$)。CRHによるACTH分泌はcorticosteroneとの1時間同時添加によって有意に抑制された(1.24 ± 0.19 vs. 1.86 ± 0.23 ng/well, $p < 0.02$)。TEA、apamin、charybdotoxinはcorticosteroneによるACTH分泌抑制作用に影響を与えなかった。これに対し、astemizoleは3～10 μ MにおいてcorticosteroneによるACTH分泌抑制を有意に解除し、よりERG K⁺チャンネルに特異性の高いE-4031 (0.01～10 μ M)も容量依存性にACTH分泌抑制を有意に解除した(1.71 ± 0.16 vs. 1.91 ± 0.32 ng/well at 10 μ M, $p > 0.05$)。

(2) ERG K⁺ チャンネル発現に関する検討

下垂体前葉においてr-erg1～3のいずれのサブタイプも遺伝子発現を認めた。realtime RT-PCRにてERG K⁺ チャンネルサブタイプのうちr-erg1 mRNAはcorticosterone 添加後に約2.5倍に増加したが、r-erg2および3 mRNAは明らかな増加を示さなかった。

[考察]

今回の研究はグルココルチコイド曝露開始後1時間以内の影響を検討しているため、中期作用にあたりと考えられた。中期抑制効果には、何らかのmRNA・蛋白発現がPKAやPKC以降でのシグナル伝達系を介し、抑制機構を制御していると推測されている。グルココルチコイドは下垂体細胞においてK⁺電流を増幅させると報告されており、K⁺電流を惹起することによって膜を過分極させることは脱分極を抑制し、ACTH分泌を阻害する有効なメカニズムであると考えられる。ERG K⁺ チャンネル阻害薬はグルココルチコイドによるACTH分泌抑制を有意に解除し、グルココルチコイドはr-erg1 mRNAを増加させた。これらの結果から、ERG K⁺チャンネルが膜電位を変化させることによって、少なくとも中期以降のACTH分泌抑制機構を制御している可能性が示唆された。

[結論]

ラット下垂体前葉細胞において、ERG K⁺チャンネルの活性変化がCRHによるACTH分泌に対するグルココルチコイドの中期抑制作用に関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)は副腎皮質からのグルココルチコイド分泌を促進する重要な下垂体ホルモンで、その合成および分泌は主に視床下部由来のACTH放出ホルモン(CRH)によって促進され、グルココルチコイドによるフィードバックによって抑制されている。ラット下垂体前葉細胞において、CRHはG蛋白質共役型受容体であるCRH-R1を介してcAMP依存プロテインキナーゼ A (PKA)カスケードを活性化し、ACTH分泌を促進する。下垂体前葉細胞からのACTH分泌に対するグルココルチコイドの抑制作用は暴露開始後30分以内に起こる早期、30分から2時間以内に起こる中期、数時間以降に起こる後期の三期に分けられている。後期抑制においてACTH前駆体(プロオピオメラノコルチン;POMC)およびCRH-R1の発現が抑制されるのに対し、中期抑制においてのACTH放出抑制機序は未だ解明されて

いない。そこで申請者は、細胞膜電位を調節する様々な K^+ チャンネルに着目し、CRHによるACTH分泌およびグルコルチコイドによる中期ACTH分泌抑制作用に対する関与を検討した。

K^+ チャンネル阻害薬として、広域 K^+ チャンネル阻害薬であるtetraethylammonium (TEA)、小コンダクタンス Ca^{2+} 依存型 K^+ チャンネル阻害薬であるapamin、高コンダクタンス Ca^{2+} 依存型 K^+ チャンネル阻害薬であるcharybdotoxin、ether-a-go-go-related gene (ERG) K^+ チャンネル阻害薬である astemizole、E-4031を用いた。雄SDラット(6週齢)の下垂体前葉細胞をコラゲナーゼ処理し、10%FCSを含むM199で単層培養を行い、4日目に実験に供した。前処置として各 K^+ チャンネル阻害薬を30分間添加し、さらに100 nM corticosteroneおよび1 nM CRHを1時間添加し、培養液を回収して抗ACTH1-24家兔血清を用いたラジオイムノアッセイ(RIA)法でACTHを測定した。

K^+ チャンネル阻害薬のうちTEAは最大濃度でのみCRHによるACTH分泌を増加させた(1.86 ± 0.23 vs. 2.58 ± 0.27 ng/well at 10 mM, $p < 0.05$)。CRHによるACTH分泌はcorticosteroneとの1時間同時添加によって有意に抑制された(1.24 ± 0.19 vs. 1.86 ± 0.23 ng/well, $p < 0.02$)。TEA、apamin、charybdotoxinはcorticosteroneによるACTH分泌抑制作用に影響を与えなかった。これに対し、astemizoleは3-10 μ MにおいてcorticosteroneによるACTH分泌抑制を解除し、よりERG K^+ チャンネルに特異性の高いE-4031 (0.01-10 μ M)も濃度依存性にACTH分泌抑制を解除した(1.71 ± 0.16 vs. 1.91 ± 0.32 ng/well at 10 μ M, $p > 0.05$)。

また、雄SDラット下垂体前葉を摘出し、total RNAを抽出し、ERG K^+ チャンネルのサブタイプであるr-erg 1-3 の遺伝子発現について、RT-PCRを行った。その結果、r-erg1-3のいずれのサブタイプも遺伝子発現を認めた。さらに、培養下垂体前葉細胞に100 nM corticosteroneを1時間添加した後、total RNAを抽出し、各サブタイプについて発現遺伝子の定量的解析(realtime RT-PCR)を行った。ERG K^+ チャンネルサブタイプのうちr-erg1 mRNAはcorticosterone 添加後に約2.5倍に増加したが、r-erg2および3 mRNAは明らかな変化を示さなかった。

以上から、グルコルチコイドはERG K^+ チャンネル(erg1)を介して膜電位を過分極さ、CRHによるACTH分泌を抑制する可能性が示唆された。

審査委員会では、いまだメカニズムがわかっていないグルコルチコイドによるACTH分泌のネガティブフィードバック作用機序に関して、申請者がはじめてERG K^+ チャンネルの関与を明らかにした点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) ERG K^+ チャンネルタンパクはみたか
- 2) グルコルチコイドによる過分極は確認したか
- 3) グルコルチコイドによる早期、中期、後期の ACTH 分泌抑制機序のちがいのについて
- 4) 今回の結果では ERG K^+ チャンネルは静止電位に関与してないのではないか
- 5) ERG K^+ の転写から翻訳の時間経過はどのくらいか
- 6) 1 時間以下の短時間のメカニズムも検討したか
- 7) CRH による ACTH 分泌のメカニズムは SNARE 依存性か
- 8) 既存の ERG K^+ チャンネルが開く可能性を蛋白合成阻害で検討したか

- 9) 今回の結果からは中期作用か早期作用か区別できないのではないか
- 10) アルギニンバゾプレッシンによる ACTH 分泌も CRH と同様に抑制されるか
- 11) ERG K^+ チャンネルが開く膜電位はどれくらいか
- 12) 培養自体が細胞生存等で結果に作用した可能性はないか
- 13) グルココルチコイド受容体について検討したか
- 14) グルココルチコイドと CRH は生理的濃度で使ったか
- 15) ERG K^+ チャンネルサブタイプの発現パターンと機能のちがいのついて
- 16) グルココルチコイドによる ACTH 分泌抑制に Cl^- チャンネルは関与しないか
- 17) 実験に雄のみを使用した理由と、雌で反応に差が出る可能性について

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)の学位論文に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 福田 敦夫

副査 中原 大一郎 中川 祐一