



Direct inhibitory effect of mitotane on adrenocorticotropin release by cultured rat anterior pituitary cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード: 作成者: 松下, 文枝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1164

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 311号	学位授与年月日	平成12年 3月27日
氏名	松下文枝		
論文題目	Direct inhibitory effect of mitotane on adrenocorticotropin release by cultured rat anterior pituitary cells (ラットの培養下垂体前葉細胞における ACTH 分泌に対するミトタンの直接抑制作用について)		

博士(医学) 松下文枝

論文題目

Direct inhibitory effect of mitotane on adrenocorticotropin release by cultured rat anterior pituitary cells
(ラットの培養下垂体前葉細胞におけるACTH分泌に対するミトタンの直接抑制作用について)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ミトタン(o,p'-DDD)は、副腎皮質細胞に対する細胞毒性とステロイド合成酵素阻害作用を持つことが報告されている。このためミトタンは、クッシング症候群による高コルチゾール血症の薬物治療に用いられているが、adrenocorticotropin (ACTH)産生下垂体腫瘍患者において、血中コルチゾール濃度の低下とともに血中ACTH濃度の抑制が認められた、との報告がなされている。また、それらの症例ではネルソン症候群の発症率も低いことから、ミトタンの下垂体への直接作用が示唆されているが、未だ実証されていない。下垂体からのACTH分泌はcAMP-dependent protein kinase A (PKA)系あるいはCa²⁺/phospholipid-dependent protein kinase C (PKC)系を活性化した後、さらにL-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel (VSCC)を介するCa²⁺ influxによって促進されている。そこでラットの培養下垂体前葉細胞を用い、ACTH分泌に対するミトタンの直接作用を検討した。

[材料ならびに方法]

雄SDラット6週令を断頭し、下垂体前葉のみを摘出した後、コラゲナーゼ処理を行い1ウェルあたり10万個の単層培養を行った。PKA系活性化を目的としてcorticotropin-releasing factor (CRF, 1 nM)、forskolin (10 μM)および8-bromoadenosine 3', 5'-cyclicAMP (8 Br-cAMP, 3 mM)を、PKC系活性化を目的としてarginin vasopressin (AVP, 10 nM)およびphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1 nM)を、VSCCの活性化を目的としてmitotane (MTX, 15.5 nM)を、それぞれ培養液に同時添加した。ミトタンの濃度は、これまでにクッシング病患者に対し投与された報告を基に、3、9、30 μMで検討した。それぞれの実験で、分泌された培養液中ACTH濃度と細胞内cyclic AMPはラジオイムノアッセイ (RIA)法で測定した。ACTH-RIAには抗ACTH 1-24家兎血清を用い、その検出感度は1 pg/tubeであった。また、cAMP-RIAには抗cAMP家兎血清を用い、その検出感度は4 fmol/tubeであった。

[結果]

ラットの下垂体前葉培養細胞において、ミトタン (3~30 μM)は、その単独ではACTHの基礎分泌には影響を与えなかった。しかし、ミトタンはCRFによるACTHの分泌増加に対して、濃度依存性に抑制し、その効果は添加後4時間目から有意であった。ACTH分泌はPKA系の活性促進物質であるforskolinおよび8 Br-cAMPにより促進され、ミトタンはそのACTH分泌を抑制したが、CRFによる細胞内cAMPの増加には影響を与えなかった。また、PKC系の活性化物質であるAVPおよびPMAによりACTH分泌は促進され、ミトタンはそれに対しても抑制した。しかしながら、MTXによってVSCCを直接活性化した場合のACTH分泌促進に対しては、ミトタンは影響を与えなかった。

[結論]

今回の結果から、ミトタンはラット培養下垂体前葉細胞に直接作用し、ACTH分泌を抑制することが示された。その作用機序としては、ACTH分泌のセカンドメッセンジャーであるadenylate cyclaseへの直接作用は、細胞内cAMP濃度が変化しなかったことから考えにくいと思われた。また、ミトタンはPKAおよびPKCの活性化によるACTH分泌を抑制したが、PKAあるいはPKCの活性化後に共通に活性化されるVSCCへの直接作用は否定的であった。以上より、ミトタンは受容体、adenylate cyclase、およびVSCCに作用するのではなく、中途過程であるPKAやPKCのキナーゼ活性の抑制によりACTH分泌を抑制する可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

クッシング症候群による高コルチゾール血症の薬物治療に用いられているミトタン(o, p'-DDD)は、副腎皮質細胞に対する細胞毒性とステロイド合成酵素阻害作用を持つことが報告されている。一方でadrenocorticotropin (ACTH)産生下垂体腫瘍患者において、血中コルチゾール濃度の低下とともに血中ACTH濃度の抑制が認められることから、ミトタンの下垂体への直接作用も示唆されているが詳細は不明である。そこで申請者は、ラットの培養下垂体前葉細胞を用い、ACTH分泌に対するミトタンの直接作用を検討した。

6週令雄SDラット下垂体前葉を摘出し、 2×10^5 個の単層培養を行った。protein kinase A (PKA)系活性化を目的としてcorticotropin-releasing factor (CRF, 10nM)、forskolin ($10 \mu\text{M}$) および 8-bromo-adenosine 3', 5'-cyclicAMP (8 Br-cAMP, 3 mM) を、protein kinase C (PKC)系活性化を目的としてarginin vasopressin (AVP, 10nM) およびphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1 nM) を、 Ca^{2+} チャンネルの活性化を目的としてmaitotoxin (MTX, 15.5nM) を、それぞれ培養液に添加した。ミトタンの濃度は、臨床報告を基に、3、9、 $30 \mu\text{M}$ で検討した。培養液中ACTH濃度と細胞内cAMPはRIA法で測定した。ACTH-RIAには抗ACTH 1-24家兎血清を用い、その検出感度は 1 pg/tube であった。また、cAMP-RIAには抗cAMP家兎血清を用い、その検出感度は 4 fmol/tube であった。

ミトタン ($3-30 \mu\text{M}$) 単独ではACTHの基礎分泌には影響を与えなかった。しかし、CRFによるACTHの分泌増加に対して、濃度依存性に抑制した。ACTH分泌はPKA系の活性促進物質であるforskolinおよび8 Br-cAMPにより促進されるが、ミトタンはこれを抑制した。しかし、CRFによる細胞内cAMPの増加には影響を与えなかった。また、PKC系の活性化物質であるAVPおよびPMAによってもACTH分泌は促進されたが、ミトタンはこれも抑制した。しかし、MTXによって Ca^{2+} チャンネルを活性化した際のACTH分泌促進に対しては、ミトタンは影響を与えなかった。

今回の結果から、ミトタンはラット培養下垂体前葉細胞に直接作用し、ACTH分泌を抑制することが示された。下垂体からのACTH分泌はPKA系あるいはPKC系を活性化した後、さらにL-type voltage-sensitive Ca^{2+} channel (VSCC) を介する Ca^{2+} influxによって促進されることが知られている。ミトタンにより細胞内cAMP濃度が変化しなかったことから、その作用機序としてはadenylate cyclaseへの直接作用は考えにくく、また、PKAあるいはPKCの活性化後に共通に活性化されるVSCCへの直接作用も否定的であった。したがって、ミトタンは受容体、adenylate cyclase、あるいはVSCCに作用するのではなく、PKAやPKCのキナーゼ活性の抑制によりACTH分泌を抑制する可能性が示唆された。

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) ミトタンの効果が添加後4時間経たないと現れないことと、キナーゼ活性抑制との関係は
- 2) ミトタンは副腎皮質ステロイド合成酵素のうちどれを最も強く抑制するか
- 3) PKAとPKCはどのような基質をリン酸化してACTH分泌をおこすのか
- 4) L型CaチャンネルからのCa流入がACTH分泌の必要十分条件なのか
- 5) MTXはL型以外のCaチャンネルも活性化するのではないか
- 6) MTX以外にBayK8644や高Kによる刺激を行うことも考慮したか
- 7) 小胞体から放出されたCaとチャンネルから流入したCaはACTH分泌での役割が違うのか
- 8) L型CaチャンネルからのCa流入からACTH分泌に至るまでのメカニズムについて
- 9) ミトタンによるACTH分泌抑制とステロイド分泌抑制のメカニズムの類似性と相異性
- 10) ミトタンがPKAとPKCによるリン酸化の阻害剤ならば他にも様々な薬理作用があるのでは
- 11) ACTH分泌細胞以外にミトタンが作用して、2次的にACTH分泌が変化する可能性は
- 12) ミトタン投与によるネルソン症候群の発生率が低い理由はACTH分泌抑制作用以外では何か
- 13) 患者へのミトタンの投与方法と、その場合の体内での半減期はどれくらいか
- 14) 患者に投与されたミトタンの下垂体での濃度は実験で用いた濃度に比べてどうか
- 15) ミトタンが細胞膜に対して直接作用する可能性は考えられるか
- 16) クッシング症候群のミトタンによる治療に関する研究分野の最近のトピックは何か
- 17) ミトタンによるACTH分泌抑制が起こるとき、細胞内Ca上昇も抑制されるのか
- 18) ミトタンがACTH分泌を抑制する過程で転写に制御的に作用する可能性はあるか

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 大関 武彦 副査 中原 大一郎