

The Role of Sodium in Mediating Adrenocorticotropin Secretion by Perfused Rat Anterior Pituitary Cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Cynthia, Halili-Manabat メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1499

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	医博論第 222号	学位授与年月日	平成 7年10月20日
氏名	Cynthia Halili-Manabat		
論文題目	The Role of Sodium in Mediating Adrenocorticotropin Secretion by Perifused Rat Anterior Pituitary Cells (灌流ラット下垂体細胞からの副腎皮質刺激ホルモン分泌におけるナトリウムの役割に関する研究)		

博士(医学) Cynthia Halili-Manabat

論文題目

The Role of Sodium in Mediating Adrenocorticotropin Secretion by Perifused Rat Anterior Pituitary Cells

(灌流ラット下垂体細胞からの副腎皮質刺激ホルモン分泌におけるナトリウムの役割に関する研究)

論文の内容の要旨

下垂体前葉細胞から ACTH 分泌は、バソプレッシン (AVP) や視床下部ホルモンである 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って抑制される。CRH は、AMP 依存プロテインキナーゼを、AVP はイノシトール三リン酸-ジアシルグリセロール-プロテインキナーゼ C 系を介して ACTH 分泌を促進し、いずれもカルシウム依存性である。ACTH 分泌における他のイオンの役割についての知見は少ない。私達は、灌流ラット下垂体細胞からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌におけるナトリウムイオン (Na^+) の役割を検討した。

雄 SD ラットの下垂体前葉をコラゲナーゼ処理し細胞を得た。下垂体細胞をセファデックス G10 とともに $50 \mu\text{l}$ のカラムに充填し、Medium 199 (0.1% BSA 添加、95% O_2 - 5% CO_2 飽和) を灌流液として $100 \mu\text{l}$ /分の流速で灌流した。全ての操作を 37°C の恒温室で行った。1分毎 ($100 \mu\text{l}$) の分画を採取し、灌流液中の ACTH をラジオイムノアッセイで測定した。

細胞内 Na^+ を増加させる条件として 1) veratridine (Na^+ -channel opener) 2) ouabain (Na^+/K^+ -ATPase inhibitor) を用いた。一方、細胞内 Na^+ を低下させる条件として 1) tetrodotoxin (TTX, Na^+ -channel blocker) 2) Na^+ -free medium を用いた。これらの条件を与えた灌流ラット下垂体細胞からの ACTH 基礎分泌および CRH や AVP 刺激後の ACTH 分泌を検討した。

TTX および Na^+ -free medium はいずれも ACTH 基礎分泌および CRH や AVP による ACTH 分泌増加に影響しなかった。veratridine は ACTH 基礎分泌を 122% ($P < 0.001$)、AVP による ACTH 分泌の initial phase、sustained phase をそれぞれ 65% ($P < 0.005$)、129% ($P < 0.005$)、CRH による ACTH 分泌を 70% ($P < 0.05$) 増加させた。ouabain は ACTH 基礎分泌を 39% ($P < 0.05$)、AVP による ACTH 分泌の initial phase、sustained phase をそれぞれ 88% ($P < 0.005$)、67% ($P < 0.05$)、CRH による ACTH 分泌を 49% ($P < 0.05$) 増加させた。veratridine や ouabain による ACTH 基礎分泌増加は Ca^{2+} -free EGTA medium を用いた時には観察されなかったことから、veratridine や ouabain の ACTH 分泌に対する効果は直接的でなく、膜脱分極とそれに続く細胞外 Ca^{2+} の influx を介するものと考えられた。また、dexamethasone は、veratridine や ouabain による ACTH 基礎分泌増加に影響を与えなかった。

以上より、細胞内 Na^+ 濃度やナトリウムチャンネル活性の変化そのものは、CRH や AVP による ACTH 分泌増加に直接には関与していないものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者は副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌におけるナトリウムイオン (Na^+) の役割の解明を目的として本研究を行った。細胞内 Na^+ を増加させる条件、低下させる条件で灌流 (perifusion) したラット下垂体細胞からの ACTH の基礎分泌と ACTH 放出ホルモン (CRH) やバソプレッシン (AVP) による刺激後の分泌を測定した。その結果、細胞内 Na^+ 濃度の増加は、膜脱分極とそれに続

く細胞外 Ca^{2+} の流入を介して ACTH の基礎分泌と CRH や AVP 刺激による分泌をともに増加させるが、細胞内 Na^+ 濃度や電位依存性 Na^+ チャンネルの活性の変化そのものはこれら分泌刺激ホルモンによる ACTH 分泌増加に直接関与しないという結論が得られた。

CRH や AVP による ACTH 分泌促進に Ca^{2+} が関与することはよく知られており、機構の解析もなされている。cAMP-プロテインキナーゼA (PKA) 系を用いてシグナルを伝達する CRH は細胞外からの Ca^{2+} の持続的流入を介して" monophasic sustained plateau" 型の ACTH 分泌を引き起こす。一方、ホスホリパーゼC- Ca^{2+} /プロテインキナーゼC (PKC) 系を介して作用する AVP は" initial spike phase" と、これに続く" sustained plateau phase" からなる二相性の ACTH 分泌を引き起こす。この場合には、" initial spike phase" はイノシトール 1、4、5-三リン酸 (IP_3) によりミクロソームから放出される Ca^{2+} に対する応答であり、" sustained plateau phase" はジアシルグリセロールによる PKC の活性化の結果 L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して流入する Ca^{2+} に対する応答と理解されている。

このように ACTH 分泌における Ca^{2+} の役割はかなり詳しく調べられているのに対して、 Na^+ の役割はほとんど不明であった。 Na^+ チャンネル遮断剤のテトロドトキシン (TTX) を用いたいくつかの研究はあるが、互いに矛盾した結果が報告されていた。申請者の実験では、TTX の添加、 Na^+ -free medium による灌流という細胞内 Na^+ 濃度を低下させる条件は ACTH 分泌に影響を及ぼさなかった。一方、細胞内 Na^+ を増加させる条件 (Na^+ チャンネルを開口する veratridine と Na^+/K^+ -AT-Pase 阻害剤である ouabain を使用) では ACTH の基礎分泌、CRH による分泌増加、AVP による ACTH 分泌の initial spike phase, sustained plateau phase のいずれをも有意に増加させた。しかし、 Ca^{2+} -free EGTA medium を灌流液として用いると veratridine や ouabain の ACTH 基礎分泌に対する効果が消失した。これらの観察から上記結論に達した本研究は ACTH の分泌に対する Na^+ の影響についてはじめて堅実な解析結果に基づく見解を示したという点で有意義であり、関連研究分野の知見の蓄積に寄与すると評価された。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) veratridine の作用機構
- 2) veratridine や TTX を含む灌流液で preperifusion を行った下垂体細胞の細胞内 Na^+ 濃度
- 3) 下垂体細胞の分散 (dispersion) のためにコラゲナーゼに加えて DNaseI を用いた理由
- 4) Perifusion の時下垂体細胞を Sephadex G 10 と混ぜた理由
- 5) 実験で用いた 10 nM CRH, 100 nM AVP という濃度とこれら分泌刺激ホルモンの生理的濃度の比較
- 6) AVP の下垂体前葉への到達経路
- 7) 灌流液に veratridine を添加した時 ACTH 分泌の増加に initial spike phase とそれに引き続く sustained plateau phase が認められる理由
- 8) TTX が veratridine による ACTH 分泌増加を消失させる理由
- 9) Ca^{2+} -free medium で灌流した時 ACTH の基礎分泌がむしろ増加する理由
- 10) 本研究では ACTH の基礎分泌や veratridine による ACTH 分泌増加に対するグルココルチコイドの効果はほとんど検知されなかったとのことであるが、分散させた下垂体細胞のグルココルチコイド受容体を測定したか

- 11) この実験の結果から、CRH や AVP は膜脱分極とは無関係に ACTH 分泌を促進すると理解しても良いか

これらの質問に対する申請者の答えは適切であり、問題点をよく把握していることを示した。以上より、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新
副査 教授 五十嵐 良 雄 副査 教授 菅 野 剛 史
副査 助教授 菱 田 明 副査 講師 田 港 朝 彦