

脳下垂体前葉細胞からの Adrenocorticotropic Hormone (ACTH) 分泌動態に関する生理学的研究

—MICROPERIFUSION SYSTEM の開発とその応用—

学位論文内容の要旨

1 背景

副腎皮質から分泌される cortisol などの glucocorticoid は、生体の恒常性維持に極めて重要な働きを持つ。glucocorticoid の合成、分泌は主として脳下垂体前葉から分泌される adrenocorticotropic hormone (ACTH) により調節されており、ACTH は日内リズムをもって分泌される他、各種のストレスに対応して急速に分泌が亢進する。このような脳下垂体 - 副腎皮質系ホルモンの分泌調節には、corticotropin - releasing factor (CRF), arginin vasopressin (AVP), angiotensin - II (A - II), oxytocin (OT), epinephrine (EPI), nor - epinephrine (NEPI), gastrin - releasing peptide (GRP), atrial natriuretic factor (ANF), cholecystokinin (CCK) など多くのホルモンが関与していることが推察されているが、CRF 以外は各ホルモンの脳下垂体前葉からの ACTH 分泌調節における生理的意義は、いまだ十分に解明されているとは言えない。

脳下垂体前葉細胞のホルモン分泌機能研究のための in vitro 実験システムは、細胞灌流法または初代単層培養法が一般的に用いられてきた。細胞灌流法は単層培養法に比べ、刺激因子を持続的に作用できる点、細胞代謝産物をすみやかに除去できる点などで、生体内での反応をより忠実に再現できると考えられている。しかし、脳下垂体からの ACTH は短時間にパルス様に分泌されることが示唆されており、これは視床下部からのホルモンの分泌が短時間に繰り返しおきることによると考えられている。従って、脳下垂体前葉からのホルモン分泌動態をより詳細に検討するためには、従来の灌流システムを改良し、1) 刺激物質が急峻な濃度変化をもって投与できること、2) 刺激物質の濃度変化を確実にコントロールできること、3) 細胞が充填される灌流室の断面積は十分に小さく、灌流室内部での流れが均等であること、4) 流出液が直接採取でき、可能な限り少量を、または短時間で採取できること、5) 流出液中の各種ホルモンの定量が確実

に行えること等の条件をみだすシステムの開発が必要であると考えた。

2 研究目的

視床下部 - 脳下垂体門脈系における脳下垂体ホルモン分泌動態を詳細に検索する目的で脳下垂体前葉細胞の灌流実験システムを開発し、それを用いて各種 ACTH 分泌刺激因子の作用、相互作用を検討した。

3 実験方法

今回、新たに開発した MICROPERIFUSION SYSTEM では、内容量 $50\mu\text{l}$ の CHAMBER 中に支持体（セファデックス樹脂）と共に、トリプシン処理により単離したラットの脳下垂体前葉細胞を充填し、毎分 $72\mu\text{l}$ の流速で還流し5秒毎に $6\mu\text{l}$ の流出液を採取することができた。刺激物質は CHAMBER 直上より流速を変化させることなく作用できる。流出液中の ACTH 等のホルモンは、radioimmunoassay (RIA) により測定した。

4 実験結果

1) CRF, AVP, OT, A-II による ACTH 分泌反応は刺激開始後、5秒以内に認められ40秒で定常状態に達し、プラトー様の ACTH 分泌反応を示した。この反応は CRF の灌流が続いている間、認められた。CRF 灌流終了後、ACTH 分泌は徐々に基礎値に向かって低下した。これに対し、AVP による ACTH 分泌は、刺激開始後、5秒以内に認められ20秒以内に最高値に達し、それに引き続き徐々に基礎値に向かって低下した。A-II による ACTH 分泌反応は AVP 同様スパイク様であったが、ピークに達した後、速やかに基礎値に復し、持続的な分泌相は認められなかった。OT による ACTH 分泌反応は AVP に見られたスパイク様分泌とそれに続く持続的な分泌相が認められた。

2) AVP の CRF による相乗的 ACTH 分泌刺激効果の時間的相互作用を検討した。AVP は CRF と同時または CRF 灌流直後に灌流した場合にのみ CRF の ACTH 分泌刺激効果を相乗的に増強した。

3) 同様に短時間作動性である A-II と AVP の ACTH 分泌刺激効果の時間的相互作用を検討した。A-II による ACTH 分泌は細胞が A-II の灌流直前に AVP または OT に暴露されると強く抑制されたが、細胞が直前に A-II に暴露されても OT または AVP による ACTH 分泌は影響を受けなかった。また、AVP, A-II の ACTH 分泌刺激効果は相加的であった。

4) MICROPERIFUSION SYSTEM, 浮遊細胞培養法, および単層培養法を用いて CRF, AVP, OT, A - II, EPI, NEPI, ANF, CCK, GRP の脳下垂体前葉細胞からの ACTH 分泌刺激作用の強さを比較した。CRF, AVP, OT, A - II は, いずれの実験系においても ACTH 分泌刺激作用が認められた。EPI, NEPI は浮遊細胞培養法, 単層培養法においては AVP と同程度の ACTH 分泌刺激作用を示したが MICROPERIFUSION SYSTEM では作用は極めて微弱であった。GRP, ANF, CCK はいずれの実験系においても明らかな ACTH 分泌刺激反応は認められなかった。

5 考案

MICROPERIFUSION SYSTEM により, ACTH 分泌刺激因子の作用動態を詳細な時間経過を追って検討でき, 視床下部ホルモンの生理的分泌動態であると考えられている断続的分泌 (episodic 又は pulsatile secretion) に極めて近い形で刺激因子を作用できる。また, 非特異的 ACTH 分泌作用は, ほとんど認められず, 極めて鋭敏な実験システムであると言える。今回の検討の結果から 1) 種々の刺激原因に対する脳下垂体前葉細胞からの ACTH 分泌反応は強さの違いだけでなく反応パターンの相違に見られるように質的な違いがある, 2) 種々の ACTH 分泌刺激因子の効果の発現のためには互いの刺激が加えられる時間的前後関係が重要である, 3) 分泌パターンの相違は, これらの因子が ACTH 分泌を引き起こす際に刺激する細胞内刺激伝達経路が異なるためかもしれないことが示唆された。MICROPERIFUSION SYSTEM は, 脳下垂体前葉からのホルモン分泌動態を詳細に解析し, 種々の刺激因子の相互作用を検索することにより細胞内刺激伝達経路の解析のために有用な実験系であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

脳下垂体前葉からの adrenocorticotrophic hormone (ACTH) は, 生体の恒常性の維持に重要な働きをもち, その分泌は視床下部からの corticotropin - releasing factor (CRF) など

数多くのホルモンより調節されていると考えられているが、この調節系は完全には解明されていない。

本論文は、視床下部 - 脳下垂体系における脳下垂体ホルモン分泌動態を詳細に検索する目的で、脳下垂体前葉細胞の灌流実験システムを開発し、それをを用いて各種 ACTH 分泌刺激因子の作用、相互作用を検討したものである。新たに開発されたシステムでは、内容量が $50\mu\text{l}$ の chamber 内に、支持体（ラファデックス）と共に、トリプシン処理により単離したラットの下垂体前葉細胞を充填し、毎分 $72\mu\text{l}$ で還流し5秒毎に $6\mu\text{l}$ の流出液を採取することができる。刺激物質は chamber 直上より流速を変化させることなく作用できる。このシステムの特徴は、(1)刺激物質が急峻な濃度変化をもって投与できる、(2)刺激物質の濃度変化を確実にコントロールできる、(3)細胞が充填される灌流室の断面積は十分に小さく、灌流室内部での流れが均等である、(4)流出液が直接採取でき可能な限り少量を、または短時間で採取できる、(5)流出液中の各種ホルモンの定量が確実にできる等である。

結果は、(1)CRF による ACTH 分泌反応は刺激開始後、5秒以内に認められ40秒で定常状態に達するプラトー様の分泌反応を示した。これに対し、Arginine Vasopressin (AVP) による ACTH 分泌は刺激開始後、5秒以内に認められ20秒以内に最高値に達し、それに引き続き徐々に基礎値に向かって低下した。Angiotensin - II (A - II) による ACTH 分泌反応は AVP 同様スパイク様であったが、その後、速やかに基礎値に復し、持続的な分泌相は認められなかった。Oxytocin (OT) による ACTH 分泌反応は AVP に見られたスパイク様分泌と、それに続く持続的な分泌相が認められた。(2)AVP の CRF による相乗的 ACTH 分泌増強効果の時間的相互作用の検討では、AVP は CRF と同時または CRF 灌流直後に灌流した場合にのみ、CRF の ACTH 分泌刺激効果を相乗的に増強することが認められた。(3)本実験システム、浮遊細胞培養法、および単層培養法の3種類の実験系を用いて CRF, AVP, OT, A - II, Epinephrine (EPI), Norepinephrine (NEPI), Atrial Natriuretic Factor (ANF), Cholecystokinin (CCK), Gastrin Peptide (GRP)の、脳下垂体前葉細胞からの ACTH 分泌刺激作用の強さを比較したところ、CRF, AVP, OT, A - II は、いずれの実験系においても ACTH 分泌刺激作用が認められたが、EPI, NEPI は、浮遊細胞培養法、単層培養法においては AVP と同程度の ACTH 分泌刺激作用を示したが、本システムでは作用は極めて微弱であった。GRP, ANF, CCK はいずれの実験系においても明らかな ACTH 分泌刺激反応は認められなかった。

以上の結果から、(1)種々の刺激因子に対する脳下垂体前葉細胞からの ACTH 分泌反応は強さ

の違いだけでなく反応パターンの相違に見られるように質的な違いがあることが見いだされ、このような分泌パターンの相違は、これらの因子が ACTH 分泌を引き起こす際に刺激する細胞内刺激伝達経路が異なることによることが示唆された、(2)複数の ACTH 分泌刺激因子の効果発現には、互いの刺激が加えられる時間的前後関係が重要である、(3)本システムでは、細胞周囲の代謝産物等が速やかに除去されるため非特異的分泌反応が生じにくく、また軽微な分泌反応が阻害されないことが示唆された。

以上の口頭発表に際し、本間教授から(1)ACTH 分泌細胞と他の細胞の interaction について、(2)分泌パターンと細胞内情報伝達系の関与について、藤本教授から(1)チャンバー内の細胞数はコンスタントか、(2)細胞の Viability について、(3)CRF と AVP の相乗効果について、(4)2 分程度で cAMP は刺激されるか、西教授から用語、特に cephadex gell resin と microperifusion について、皆川教授から(1)用いた CRF は recombinant か、(2)natural なものに比べて差はないか、(3)サイトカインの関与はないかなど多数質問があったが、申請者は概ね妥当に答えたと思う。

以上、本論文は脳下垂体前葉細胞からの ACTH 分泌動態を新しく開発したシステムを用いて詳細に追求したもので学位（医学）に相当するものと認めた。