

学位論文題名

カルシトニンの脳および下垂体における

発現とその生理的意義

学位論文内容の要旨

1. 序論

カルシトニン (CT) は、32アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、血中カルシウム濃度の調節を担うホルモンとして知られている。現在、CTの臨床応用としては、骨粗鬆症や悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症などの治療に用いられている。一方、CTは、脳室内投与による鎮痛作用、下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) および β -endorphinの分泌の促進、食欲の抑制など多岐にわたる中枢作用を有している。CTによる鎮痛作用が、熱刺激や機械刺激に対してよりも炎症に対して強く発現すること、CTの脳室内投与により、血中ACTHが上昇することなどから、末梢での免疫反応に対して、CTが中枢神経系または、内分泌系を介して作用する可能性がある。そこで、CTの産生と生理作用さらに、中枢神経系および内分泌系におけるCTの役割を明らかにすることを目的として、in vitroとin vivoの両者の系を用いて検討した。

2. ヒトグリオブラストーマ細胞株A172におけるCTのInterleukin 6 (IL-6) 産生

細胞レベルでCT受容体 (CTR) の存在が確認されているのはアストロサイトである。したがって、ヒトグリオブラストーマ細胞株A172を用いて、中枢神経系におけるCTの役割を検討した。A172細胞において、CTはIL-6を産生させることが見出された。CTは用量依存的にcAMPを上昇させ、IL-6の産生量とよく対応していた。さらに、PKA特異的阻害薬であるH89がCTによるIL-6の産生を抑制したことから、CTはセカンドメッセンジャーであるcAMP生成を介して、IL-6を産生させると推定した。

CTとCGRPは、アミノ酸残基数が同程度で、N末端側およびC末端側に類似した構造をもっている。したがって、CTとCGRPは、互いの受容体とも結合してその作用を発現している可能性がある。CTおよびCGRPの各々の受容体に対するアンタゴニストであるsCT (8-32) とhCGRP (8-37) を用いて、cAMP生成を指標に検討した結果、CT、CGRPは各々各自の受容体を介してその作用を発現していることが明らかになった。

3. lipopolysaccharide (LPS) 投与による炎症モデルラットの作成

ラットにLPS (5 mg /kg body weight) を腹腔内に投与し、炎症モデルラットを作成した。ラットの体温は、平常時では38 °Cであるが、LPS投与1.5時間後には、37 °Cまで体温が下降した。3時間後には、コントロールと

同じ体温まで回復したが、4時間後には、コントロールに比べ0.5℃前後の体温の上昇が認められた。血中ACTH値は、平常時では、5 pg/ml以下であったが、LPS投与1.5時間後に約200 pg/mlまで上昇し、その後減少していき、12時間後には、約35 pg/mlまで減少した。下垂体において、ACTHの前駆体であるPOMCのmRNAの発現を調べたところ、LPSによるPOMC mRNAの発現は変化していなかった。一方、下垂体において、LPS投与3時間後にIL-1 β 、IL-6およびTNF- α のmRNAの発現が認められた。このことは、下垂体においても、サイトカイン誘導のネットワークが存在することを示唆している。

4. LPS投与ラット下垂体におけるCT mRNAの誘導および血中CT値の変動

RT-PCR法によりラットの嗅球以外の脳全域および下垂体において、CTR mRNAが検出された。一方、CT mRNAはコントロールおよびLPS投与したラットの脳では検出できなかったが、下垂体において、CT mRNAが発現していることが分かった。LPS投与ラットの下垂体におけるCT mRNAは、6時間後に発現が誘導され、12時間後まで発現は持続していた。LPS投与ラットの血中CT値は、平常時において、40 pg/ml 前後であったが、LPS投与後3時間から6時間において、50 pg/mlまで上昇し、その後、減弱することが分かった。

5. 下垂体星状濾胞 (Folliculo-Stellate, FS) 細胞株TtT/GFにおけるCTの作用

ラットにCTを過剰投与すると、FS細胞において、下垂体腺腫が発現する。さらに、FS細胞はアストロサイトに類似している。これらのことから、FS細胞にグリア細胞と同様にCTRが存在し、CTがCTRに結合することにより情報が伝達されると推定した。マウスFS細胞株TtT/GFにCTを添加すると、用量依存的に細胞内cAMPが上昇した。また、CGRPを添加した場合も、同様に細胞内cAMPの上昇が認められた。つぎに、sCT (8-32) とhCGRP (8-37) を用いてCTおよびCGRPによるcAMP生成について検討した結果、FS細胞においても、CTおよびCGRPは各々独自の受容体を介してcAMPを増加させていることが明らかになった。また、FS細胞にIL-1 β およびTNF- α を添加すると、著しくIL-6が増加することが認められた。さらに、CTはこれらのサイトカインによるIL-6の産生を増強させることも明らかになった。

6. 結論

- 1) グリア細胞において、CTが独自の受容体に結合し、cAMPをセカンドメッセンジャーとしてIL-6を産生させることが見出された。
- 2) LPSを投与したラットにおいて、下垂体のCT mRNAの発現が上昇した。このCT mRNAの発現の上昇は血中のCT量の増加を伴っており、CTが甲状腺だけではなく下垂体からも血中に分泌される可能性を示唆している。
- 3) LPS投与ラットの下垂体において、IL-1 β 、IL-6およびTNF- α mRNAの発現が誘導されることが分かった。
- 4) FS細胞において、CTがIL-6を産生させた。さらに、CTがIL-1 β およびTNF- α によるIL-6産生を増強させることも見出された。

下垂体において、IL-6はACTH、プロラクチンなどの各種ホルモンの誘導を起こす重要な因子の一つである。ACTH、プロラクチンなどの下垂体ホルモンは炎症に深く関わっていることから、CTはIL-6の産生を介して、炎症の際に重要な役割を担っていることが推定された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 徳 光 幸 子
副 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 助 教 授 大 熊 康 修

学 位 論 文 題 名

カルシトニンの脳および下垂体における 発現とその生理的意義

カルシトニンは、32 アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、血中カルシウム濃度の調節を担うホルモンとして知られている。一方、カルシトニンは、脳室内投与による鎮痛作用、下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) および endorphin の分泌の促進、食欲の抑制など多岐にわたる中枢作用を有している。

本論文提出者は中枢神経系および内分泌系におけるカルシトニンの役割を明らかにすることを目的として研究を行い、以下の成果をおさめた。

1. 細胞レベルでカルシトニン受容体の存在が確認されているヒトグリオブラストーマ細胞株 A172 を用いて、中枢神経系におけるカルシトニンの役割を検討した。A172 細胞において、カルシトニンは IL-6 を産生させることが見出された。カルシトニンは用量依存的に cAMP を上昇させ、IL-6 の産生量とよく対応していた。さらに、プロテインキナーゼ A の特異的阻害薬である H89 がカルシトニンによる IL-6 の産生を抑制したことから、カルシトニンはセカンドメッセンジャーである cAMP 生成を介して、IL-6 を産生させると推定した。
2. カルシトニンと calcitonin gene related peptide (CGRP) は、アミノ酸残基数が同程度で、N 末端側および C 末端側に類似した構造をもっている。したがって、カルシトニンと CGRP は、互いの受容体とも結合してその作用を発現している可能性がある。カルシトニンおよび CGRP の各々の受容体に対するアンタゴニストであるサケカルシトニン (8-32) とヒト CGRP (8-37) を用いて、cAMP 生成を指標に検討した結果、カルシトニン、CGRP は各々各自の受容体を介してその作用を発現していることが明らかになった。
3. ラットに lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内に投与し、炎症モデルラッ

トを作成した。ラットの体温は、平常時では 38 °C であるが、LPS 投与 1.5 時間後には、37 °C まで体温が下降した。3 時間後には、コントロールと同じ体温まで回復したが、4 時間後には、コントロールに比べ 0.5 °C 前後の体温の上昇が認められた。血中 ACTH 値は、平常時では、5 pg/ml 以下であったが、LPS 投与 1.5 時間後に約 200 pg/ml まで上昇し、12 時間後には、約 35 pg/ml まで減少した。下垂体において、ACTH の前駆体である POMC の mRNA の発現を調べたところ、LPS による POMC mRNA の発現は変化していなかったが、LPS 投与 3 時間後に IL-1 β 、IL-6 および TNF- α の mRNA の発現が認められた。このことは、下垂体においても、サイトカイン誘導のネットワークが存在することを示唆している。

4. RT-PCR 法によりラットの嗅球以外の脳全域および下垂体において、カルシトニン受容体 mRNA が検出された。一方、カルシトニン mRNA はコントロールおよび LPS 投与したラットの脳では検出できなかったが、下垂体に、カルシトニン mRNA が発現していることが分かった。LPS 投与ラットの下垂体におけるカルシトニン mRNA は、6 時間後に発現が誘導され、12 時間後まで発現は持続していた。LPS 投与ラットの血中カルシトニン値は、平常時において、40 pg/ml 前後であったが、LPS 投与後 3 時間から 6 時間において、50 pg/ml まで上昇し、その後、減弱することが分かった。

5. ラットにカルシトニンを過剰投与すると、下垂体星状濾胞細胞に下垂体腺腫が発現する。これらのことから、マウス下垂体星状濾胞細胞細胞株 TtT/GF にカルシトニンを作用させると、用量依存的に細胞内 cAMP が上昇した。また、CGRP を添加した場合も、同様に細胞内 cAMP の上昇が認められた。つぎに、サケカルシトニン (8-32) とヒト CGRP (8-37) を用いてカルシトニンおよび CGRP による cAMP 生成について検討した結果、TtT/GF 細胞においても、カルシトニンおよび CGRP は各々独自の受容体を介して cAMP を増加させていることが明らかになった。IL-1 β および TNF- α を添加すると、IL-6 が増加したが、さらに、カルシトニンを添加すると、これらのサイトカインによる IL-6 の産生が著しく増強されることも明らかになった。以上のことから、カルシトニンが下垂体からも分泌され、IL-6 の産生を介して、炎症の際に重要な役割を担っていることを突き止めた。

以上の新知見およびこれらの研究を遂行するために考案した研究手法はカルシトニンの新しい中枢における作用を見だし、作用機構の解明に寄与したものである。審査員一同はこれら一連の研究を高く評価し、本論文提出者が博士 (薬学) の称号を受けるにふさわしいと判断したものである。