

学 位 論 文 題 名

モルモット副腎髓質と PC12細胞の
刺激分泌連関に対する副腎皮質ステロイドの抑制作用

学位論文内容の要旨

副腎髓質の刺激分泌連関に対するステロイドの非ゲノム効果を調べるため、モルモット副腎髓質におけるアセチルコリン受容体刺激によるカテコールアミン分泌、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) 変化およびホールセル電流に対する皮質ステロイドの影響を検討した。また、ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いて ATP と nicotine による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ 変化に対する皮質ステロイドとその構造類似体の影響についても検討した。

1. Acetylcholine および神経刺激による灌流副腎からのカテコールアミン分泌は、cortisol によって抑制された。ACTH は灌流副腎の cortisol 分泌を増加させ、acetylcholine によるカテコールアミン分泌を抑制した。
2. Nicotine による灌流副腎と分離副腎髓質細胞からのカテコールアミン分泌および細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) 上昇は、dexamethasone、cortisol および aldosterone で濃度依存性に抑制された。いずれの場合も dexamethasone が最も強い力価を示した。
3. Muscarine による灌流副腎および分離副腎髓質細胞からのカテコールアミン分泌は、cortisol と aldosterone で濃度依存性に抑制された。Dexamethasone は抑制効果を示さず、高濃度では逆に灌流副腎からのカテコールアミン分泌を増強した。Muscarine による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ 上昇はこれらのステロイドによっては抑制されなかった。
4. Nicotine および muscarine によるカテコールアミン分泌に対する cortisol と aldosterone の抑制効果は、それぞれのステロイド受容体拮抗薬である mifepristone および spironolactone では回復しなかった。
5. Cortisone、corticosterone、11-deoxycortisol、11-deoxycorticosterone および cholesterol はいずれも nicotine および muscarine によるカテコールアミン分泌を抑制した。Prednisolone は nicotine による反応を抑制したが、

muscarine による反応を抑制しなかった。

6. Nicotine による副腎髄質細胞の内向き電流反応は dexamethasone、cortisol および aldosterone によって濃度依存性に抑制され、いずれのステロイドも nicotine の濃度反応曲線を下方に移動させた。
7. 蛋白キナーゼ C (PKC) 活性化薬の phorbol 12-myristate 13-acetate による分離副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌は cortisol、aldosterone および staurosporine によって抑制された。Muscarine による分泌も staurosporine により抑制された。
8. ATP による PC12 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は prednisolone、androsta-1,4-diene-3,17-dione および dexamethasone で抑制され、cortisol、testosterone および 19-nortestosterone によっては抑制されなかった。Prednisolone と androsta-1,4-diene-3,17-dione はいずれも ATP の濃度反応曲線を右方に移動させた。外液 Ca^{2+} を除去した条件では、ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は dexamethasone によって影響を受けなかった。
9. Nicotine による PC12 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は prednisolone、cortisol、androsta-1,4-diene-3,17-dione および testosterone によって濃度依存性に抑制された。いずれのステロイドも nicotine の濃度反応曲線を下方に移動させた。

以上の結果より、モルモット副腎では、大内臓神経の活性化による髄質の刺激分泌連関が、皮質から放出されるステロイドによって非ゲノム的に抑制されることが示唆された。コリン作動性反応において、ニコチン受容体を介する経路では、ニコチン受容体チャネルが脂質親和性を持つステロイドによって非競合的に抑制されることが示された。ムスカリン受容体を介する経路では、ステロイド骨格 A 環の 1-2 位間に二重結合を持たないステロイドが、 IP_3 産生を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には影響を与えずに、ジアシルグリセロール産生を介した PKC 活性化を抑制することが示唆された。また、PC12 細胞の P2X 受容体はステロイド骨格 A 環の 1-2 位間に二重結合を持つステロイドによって競合的に抑制されることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 助 教 授 太 田 利 男

学 位 論 文 題 名

モルモット副腎髓質と PC12細胞の

刺激分泌連関に対する副腎皮質ステロイドの抑制作用

モルモット副腎髓質における acetylcholine (ACh) 受容体刺激によるカテコールアミン (CA) 分泌、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) 変化および膜電流に対する皮質ステロイドの作用、さらにラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞における ATP と nicotine による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ 変化に対するステロイドの作用を調べ、以下の成績を得た。

1. ACh および神経刺激による灌流副腎からの CA 分泌は、cortisol によって抑制された。ACTH は灌流副腎の cortisol 分泌を増加させ、ACh による CA 分泌を抑制した。
2. Nicotine による灌流副腎からの CA 分泌と分離副腎髓質細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ 増加は、dexamethasone、cortisol および aldosterone で抑制された。Muscarine による CA 分泌は、cortisol と aldosterone で抑制されたが、dexamethasone では抑制されなかった。これらステロイドは muscarine による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ 増加を抑制しなかった。Nicotine および muscarine による CA 分泌に対する cortisol と aldosterone の抑制作用は、それぞれの受容体拮抗薬である mifepristone と spironolactone では影響受けなかった。
3. 副腎髓質細胞における nicotine による内向き電流反応は dexamethasone、cortisol および aldosterone によって濃度依存性に抑制された。蛋白キナーゼ C (PKC) 活性化薬の phorbol 12-myristate 13-acetate による分離副腎髓質細胞からの CA 分泌は cortisol、aldosterone および PKC 阻害薬 staurosporine によって抑制された。Muscarine による CA 分泌も staurosporine により抑制された。
4. PC12 細胞における ATP による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ 増加はステロイド骨格 A 環の 1-2 位間に二重結合を持つ prednisolone、androsta-1,4-diene-3,17-dione および dexamethasone により抑制された。Nicotine による PC12 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ 増加反応も数種のステロイドにより抑制されたが、このような構造活性相関はみられなかった。

以上本論文では、モルモット副腎では、コリン作動性神経の活性化による髄質の刺激分泌連関が、皮質から放出されるステロイドによって抑制されること、また、nicotinic ACh 受容体を介する分泌反応の抑制には受容体チャネルの抑制が、muscarinic ACh 受容体を介する分泌反応の抑制には、PKC を介する経路の抑制が関与することを示した。また、PC12 細胞の P2X 受容体はステロイド骨格 A 環の 1-2 位間に二重結合を持つステロイドによって抑制されることを明らかにした。よって、審査員一同は、米久保和樹氏が博士（獣医学）の学位をうける資格を有すると認めた。