

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 D2 dopamine receptor agonist および SRIH による GH  
分泌抑制機構

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 仁科 祐子

## 要旨

[背景]

成長ホルモン(GH)産生下垂体腺腫からの GH の過剰分泌によっておこる先端巨大症・巨人症の内科治療に、somatotropin-release-inhibiting hormone(SRIH)誘導体と2型 dopamine 受容体作動薬(D<sub>2</sub>作動薬)が用いられている。経口 D<sub>2</sub>作動薬である bromocriptine (BC) 投与により健常人の GH 濃度軽度上昇を示すが、GH 産生下垂体腺腫患者の約半数で血中 GH 濃度が低下する(Melmed S, 2002) paradoxical response がみられる。この現象を利用して先端巨大症の治療に D<sub>2</sub>作動薬が用いられており、このように GH 分泌に対して抑制的に作用する薬剤によって、先端巨大症・巨人症患者の予後は著しく改善してきた。本研究では、GH 分泌に対して抑制的に作用する D<sub>2</sub>作動薬や SRIH 誘導体の作用機構をヒト GH 産生腺腫細胞や下垂体前葉由来の細胞株を用いて調べた。

D<sub>2</sub>作動薬はヘテロ三量体型 G タンパク質の Gi に共役する7回膜貫通型受容体で adenylyl cyclase を抑制し、細胞内 cAMP 濃度を減少させる(Banihashemi B et al., 2002)。また prolactin (PRL) 産生下垂体細胞においては D<sub>2</sub>作動薬が細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)を低下させて PRL 分泌を抑制する機構の存在も示されており(Vallar L et al., 1989)、GH 産生下垂体細胞にお

いても  $D_2$  作動薬が同様の機序によって GH 分泌を抑制している可能性が考えられる。そこで bromocriptine がヒト GH 産生下垂体腺腫細胞で  $[Ca^{2+}]_i$  を低下させる機構を解析した。またこの細胞で  $[Ca^{2+}]_i$  の調節に重要な働きをしている VGCC に対する作用も検討した。

また、GH 分泌機構の詳細を明らかにするためには、下垂体ホルモン分泌の細胞内輸送、開口分泌を生細胞で real-time に観察することが有用である。内分泌細胞では分泌物質であるホルモンとその受容体が近傍にないため、実際に分泌されたかどうかを確認するために細胞外液中のホルモン濃度測定や、膜容量測定が用いられてきたが、ホルモン濃度測定は時間分解能が低い、膜容量測定は技術の修練を要するなど難点も多い。そこで分泌顆粒を可視化することで時間、空間分解能を高くし、簡便に解析できる方法の確立を試みた。enhanced yellow fluorescein protein (EYFP)-GH を AtT-20 細胞に導入して安定して発現する細胞株を作成して観察した。観察には共焦点レーザー顕微鏡と、細胞膜近傍数 100 nm 程度のみを観察できる全反射型レーザー顕微鏡を用いた。

## [方法、結果]

### *$D_2$ 作動薬のヒト GH 産生下垂体腺腫細胞に対する作用*

先端巨大症患者から経蝶形骨洞手術により摘出され、初代培養したヒト GH 産生下垂体腺腫細胞を用いた。あらかじめ患者さんから研究に使用する承諾を頂き、東京大学倫理委員会の承認を得た。第二世代の蛍光  $Ca^{2+}$  指示薬である Fura 2 を用いた  $[Ca^{2+}]_i$  測定と static incubation assay、電機生理実験により BC の作用機構を解析した。

BC 投与により GH 産生下垂体腺腫細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  は有意に低下した。  $10^{-7}$  から  $10^{-5}$  mol/L で  $[Ca^{2+}]_i$  はほぼ濃度依存的に低下した。  $10^{-6}$  mol/L の BC による  $[Ca^{2+}]_i$  低下反応は、  $D_2$  受容体阻害薬 sulpiride (10  $\mu$ mol/L で 5 分間前処理) や、百日咳毒素 (PTX, 0.1 mg/ml で 12 時間前投与) で解除された。これらから、この現象は  $D_2$  受容体を介しており PTX 毒素感受性 G タンパク質を介していることが示された。また、L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル (L 型 VGCC) 遮断薬である nitrendipine (NIT, 1  $\mu$ mol/L) の投与により  $[Ca^{2+}]_i$  が低下したが、NIT 投与後に BC を追加しても  $[Ca^{2+}]_i$  はそれ以上低下しなかった。この細胞で L 型 VGCC を介する  $Ca^{2+}$  流入が  $[Ca^{2+}]_i$  の維持に重要であり、BC による  $[Ca^{2+}]_i$  低下は L 型 VGCC からの  $Ca^{2+}$  流入の抑制を介していると考えられた。  $D_2$  作動薬の cAMP 減少が上記の  $[Ca^{2+}]_i$  低下反応に関与するか否かを調べるため、細胞膜透過性 cAMP 作動物質である 8Br-cAMP (100  $\mu$ mol/L) を用いた。  $[Ca^{2+}]_i$  は 8Br-cAMP 投与により上昇したが、その後に BC を追加しても  $[Ca^{2+}]_i$  は低下した。これより、BC が引き起こす  $[Ca^{2+}]_i$  低下が cAMP 減少に依存せず独立して起こりうる反応であることが示唆された。

BC による  $[Ca^{2+}]_i$  低下反応が GH 分泌抑制にどのように関与するかを調べるため static incubation assay で GH 分泌を測定した。各試薬投与後 2 時間培養し、培養液中の GH 濃度を IRMA 法で測定した。BC は GH 分泌を抑制し、その効果は  $10^{-8}$  から  $10^{-5}$  mol/L で濃度依存性であった。さらにこの分泌抑制は、sulpiride、PTX、NIT 投与により消失した。8Br-cAMP

投与時には GH 分泌は増加したが、BC 追加で減少した。これらの結果は BC による $[Ca^{2+}]_i$ 低下に対応するものであった。しかしながら、8Br-cAMP 前投与後の BC 追加投与で生じた $[Ca^{2+}]_i$ 低下反応、および GH 分泌抑制は対照に比べて有意に少なかった。これより、BC による $[Ca^{2+}]_i$ 低下反応が GH 分泌抑制に関与しているが、cAMP 減少とは独立して GH 分泌抑制を引き起こす経路があり、しかも cAMP は別の経路に調節的に作用することを示している。

cAMP を介さずに $[Ca^{2+}]_i$ 低下、GH 分泌を抑制する機構について、dopamine による膜の過分極反応が報告されており(Takano K, 1994)この関与が考えられるが、VGCC に対する直接作用の可能性もある。bromocriptine の VGCC に対する作用を電機生理実験で検討した。電位依存性  $Ca^{2+}$ 電流を記録したところ、L 型、T 型と二種類の電流成分を有する細胞と、L 型電流が主体の細胞を認めた。次に bromocriptine を投与して電位依存性  $Ca^{2+}$ 電流を比較した。T 型および L 型 VGCC を豊富に発現している細胞でも L 型主体の細胞でも、 $10^{-7}$  から  $10^{-5}$  mol/L において bromocriptine 投与によりほぼ濃度依存性に  $Ca^{2+}$ 電流は減少した。この減少効果は PTX の前投与により消失し、PTX 感受性 G タンパク質介することが示唆された。

Bromocriptine が膜の過分極反応を介するだけでなく VGCC に直接作用して $[Ca^{2+}]_i$ を減少させることを示した。上で示した cAMP 低下と独立して起こる $[Ca^{2+}]_i$ 低下反応はこの過分極反応と VGCC への直接作用と考えられる。

先端巨大症患者でみられる paradoxical response が  $D_2$  作動薬による $[Ca^{2+}]_i$ 低下により引き起こされることを本研究で示した。

#### GH-EYFP 導入 AtT-20 細胞の樹立

GH 分泌減少を可視化して解析するための系を組み立てた。ラット GH のアミノ酸配列 1 から 217 をコードする配列の 26-27 間に EYFP をコードする領域を挿入し GH-EYFP の fusion construct である pCMV-sig-EYFP-GH-1 を作成した。この実験系には SRIH 受容体を豊富に発現し、Gs に共役する受容体として CRH 受容体の機能が知られているマウス下垂体前葉細胞の細胞株である AtT-20 細胞を用いた。この fusion construct を AtT-20 細胞に感染させ安定的に発現する細胞株を確立した。感染細胞のタンパク抽出物を抗ラット GH ポリクローナル抗体でウエスタンブロットすると、GH-EYFP 融合タンパク(75-kDa)のバンドを検出でき、AtT-20 細胞に GH-EYFP が導入されたことを確認した。また、この細胞を共焦点レーザー顕微鏡、全反射型近接場レーザー顕微鏡で励起して観察すると蛍光が細胞質に顆粒状に分布しており、導入した GH-EYFP が分泌顆粒に存在することが示唆された。

共焦点顕微鏡でこれを撮影し、細胞の頂点からガラス接着面まで投影して蛍光量を測定して比較した。蛍光は対照群では 10 分間の観察時間に変化しなかったが、高濃度  $K^+$ 細胞外液 (high  $K^+$ , 30 mEq/L) 投与後 2 分、5 分、10 分で経時的に減弱し、脱分極刺激による顆粒放出を確認できた。この細胞に、分泌刺激作用を示す CRH (10  $\mu$ mol/L) を投与したところ、同様に蛍光が減弱した。これらの反応は NIT (5  $\mu$ mol/L) で阻害されたため、L 型 VGCC による  $Ca^{2+}$ 流入を介すと考えられた。SRIH (100 nmol/L) でも同様に阻害された。また、Rhod 2 を用いて

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を測定したところ、high K、CRH 投与により[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇し、SRIH 投与で[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が抑制された。よってこの系は、脱分極刺激、分泌刺激因子に対する生理的な性質は既知のものと同様であり、ホルモン分泌に関して生理的な性質は変化していないと考えられた。

全反射顕微鏡で細胞膜直下 300 nm 程度の顆粒の動態を 300 ms 毎に撮影して観察した。細胞質にある顆粒は径 327.3 ± 68.8 nm で 電子顕微鏡で観察された AtT-20 細胞の顆粒の大きさとほぼ一致していた。細胞膜直下の顆粒も high K (60 mEq/L)、CRH 投与により放出が促進され、NIT 投与により抑制された。

GH 全長に蛍光色素を付与して安定した細胞株や transgenic mouse を作成した報告は本研究と並行する一報告のみである (Matsuno A et al., 2005)。この細胞株は下垂体ホルモン分泌調節因子の作用機構、ならびに細胞内輸送、開口分泌の三次元的解析に役立つと考えられる。

#### [結語]

ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞において BC が [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を低下させてホルモン分泌を抑制すること、さらにそれは cAMP の抑制に完全には依存せず、直接 VGCC に作用もして Ca<sup>2+</sup>流入を減少させることを明らかにした。

またマウス下垂体前葉細胞 AtT-20 に EYFP-GH を導入して開口分泌のモデル細胞株を作成し、この系は脱分極刺激、Gs 共役受容体刺激に反応して細胞質にある顆粒を分泌させ、L 型 VGCC 阻害剤や SRIH 投与で分泌が減少することを確認した。さらに下垂体細胞生細胞で細胞膜表面数 100 nm にある顆粒の動態を全反射型顕微鏡で初めて観察した。下垂体の開口分泌の詳細な機序は十分に明らかにされていないが、下垂体ホルモンの細胞内輸送、開口分泌の三次元的解析にこの系の検討が役立つと考えられる。