

## 審査の結果の要旨

氏名 仁科 祐子

本研究は、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用いられている somatotropin-release-inhibiting hormone (SRIH) と D<sub>2</sub> 作動薬である bromocriptine の作用の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

### 1. D<sub>2</sub> 作動薬のヒト GH 産生下垂体腺腫細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> に対する作用とその機構

初代培養したヒト GH 産生下垂体腺腫細胞において bromocriptine 投与により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> はほぼ濃度依存的に低下した。この反応は、D<sub>2</sub> 受容体阻害薬 sulpiride や、百日咳毒素 (PTX) で解除された。また、L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネル遮断薬である nitrendipine の投与により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が低下したが、NIT 投与後に bromocriptine を追加しても [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> はそれ以上低下しなかった。この細胞で BC は D<sub>2</sub> 受容体、PTX 感受性 G タンパク質を介して作用すること、L 型 VGCC を介する Ca<sup>2+</sup> 流入が [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の維持に重要であり、BC による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 低下は L 型 VGCC からの Ca<sup>2+</sup> 流入の抑制を介していることが示された。また、細胞膜透過性 cAMP 作動物質である 8Br-cAMP を投与すると [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は上昇したが、その後に BC を追加しても [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は低下した。これより、bromocriptine が引き起こす [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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。

### 2. D<sub>2</sub> 作動薬の GH 分泌に対する作用

static incubation assay で GH 分泌を測定すると、BC は GH 分泌を濃度依存性に抑制した。この分泌抑制は、sulpiride、PTX、nitrendipine 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。これより、BC による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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ることが示された。

### 3. D<sub>2</sub> 作動薬の VGCC に対する作用

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<sup>2+</sup> 電流を記録したところ、ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞には 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。bromocriptine を投与すると、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、bromocriptine 投与によりほぼ濃度依存性に Ca<sup>2+</sup> 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 タンパク質を介することが示された。さらに 8Br-cAMP 投与時には Ca<sup>2+</sup> 電流は増加したが、bromocriptine 追加で減少した。これより、bromocriptine は細胞内 cAMP 濃度の変化とは独立して VGCC に作用することが示された。

#### 4. GH-EYFP 導入 AtT20 細胞株の樹立

SRIH により過分極反応が生じ、Gs と共約する受容体として CRH 受容体の存在が確認されている、マウス下垂体前葉細胞株 AtT-20 細胞に GH-EYFP を導入し、これを安定して発現する細胞株を作成した。この GH-EYFP 導入 AtT-20 細胞の蛍光量は 10 分間の観察時間に対照群では蛍光量は変化しなかったが高濃度 K<sup>+</sup>溶液投与 2 分、5 分、10 分後で蛍光は経時的に減弱し、脱分極刺激による顆粒放出を確認できた。次に分泌刺激作用を示す CRH 投与でも同様に蛍光が減弱した。high K、CRH の反応は共に nitrendipine で阻害され、L 型 VGCC を介する Ca<sup>2+</sup>流入があると考えられた。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を測定したところ、high K や CRH の分泌刺激により [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が上昇し、SRIH 投与時はこの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 応答は阻害された。

以上より樹立した細胞株は生理的な刺激に反応して GH を分泌し、SRIH 受容体が機能していることが示された。

#### 5. GH-EYFP 導入 AtT-20 細胞の全反射顕微鏡観察

全反射顕微鏡で細胞膜直下 100 nm 程度の顆粒の動態を 300 ms 毎に撮影して観察したところ、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。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た。

以上、本論文はヒト GH 産生下垂体腫瘍細胞における経口 D<sub>2</sub> 作動薬である bromocriptine 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。前者は GH 産生下垂体腺腫患者において bromocriptine 投与でみられる奇異性 GH 分泌減少反応の機構の一部を明らかにしたものであり、後者は下垂体細胞における開口分泌の三次元的解析を含めた詳細な機序を解明するにあたって役立つものと思われ、学位の授与に値するものと考えられる。