

氏 名(本 籍)	磯 部 和 正 (栃 木 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1128 号
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科
学位論文題目	培養ブタ副腎髄質細胞における PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) のカテコールアミン分泌機構
主 査	筑波大学教授 医学博士 山 下 亀 次 郎
副 査	筑波大学教授 医学博士 河 野 邦 雄
副 査	エーザイ株式会社研究開発本部素材探索研究部長 (筑波大学客員教授) 薬学博士 橘 眞 郎
副 査	筑波大学教授 理学博士 板 内 四 郎
副 査	筑波大学助教授 医学博士 岡 戸 信 男

## 論 文 の 要 旨

### ＜目的＞

PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide)は羊視床下部組織より抽出された38個のアミノ酸からなるペプチドである。本ペプチドは中枢神経のみならず、多くの器官に存在し外分泌腺と内分泌腺でも分泌促進作用が認められている。副腎においても PACAP とその受容体が存在し、副腎髄質よりカテコールアミン放出刺激作用が認められている。

一方、カテコールアミン分泌刺激物質の作用機序として、ニコチンは受容体依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを活性化し膜の脱分極を介して分泌作用を起こすことが知られ、カルバコール、アンジオテンシンIIなどはホスホリパーゼ C の活性化と  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの活性化により分泌を引き起こすことが報告されている。本研究は PACAP によるカテコールアミンの分泌機序を解明するため、PACAP の  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル、ホスホリパーゼ C、アデニレートシクラーゼ活性化作用とカテコールアミン分泌におけるそれらの役割を検討した。

### ＜対象と方法＞

実験材料として、既報の方法により調製した培養ブタ副腎髄質細胞を用い、下記の項目について測定した。1) PACAP、カルバコール等のカテコールアミン分泌刺激物質をメジウムに加え、カテコールアミン放出量を全自動カテコールアミン分析計により定量した。2) PACAP 等による  $\text{Ca}^{2+}$ 動員作用を検討するため、 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬である fura2 を用い細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の変動を顕

微側光システムを用いて測定した。3) 培養副腎細胞のイノシトールリン酸の測定は $^3\text{H}$ -ミオノシトール添加メジウム中でインキュベーション後にイノシトール 1 リン酸( $\text{IP}_1$ )、イノシトール 2 リン酸( $\text{IP}_2$ )、イノシトール 3 リン酸( $\text{IP}_3$ )、イノシトール 4 リン酸( $\text{IP}_4$ )を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離しイノシトールリン酸の各分画の放射活性を測定した。4) 培養細胞を各種分泌刺激物質とキサンチン誘導体を含むメジウム中でインキュベーション後に cAMP を抽出し、RIA により測定した。

#### 〈結果と考察〉

- 1) PACAP は培養ブタ副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌を  $3 \times 10^{-9}\text{M}$  から  $10^{-6}$  にかけて用量依存性に増加させた。この分泌促進作用はニコチンより約 100 倍強力であり、時間依存性に持続的に分泌を増加させた。また、EGTA により細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を除くと、この分泌はほぼ完全に抑制され、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルブロッカーによっても強力に分泌が抑制された。これらのことにより、PACAP によるカテコールアミン分泌作用は、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  流入により引き起こされ、しかもその流入には電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが関与していることが示された。
- 2) 上記の現象をさらに検討するため、fura2 を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を測定し PACAP は持続的に細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を起こしていることを認めた。さらに、EGTA により細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を除いた状態においても PACAP が一過性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を起こしたことにより、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の動員にも作用していることが示された。その機序として、PACAP がホスホリパーゼ C の活性化を起こし  $\text{IP}_3$  産生に作用している可能性が示唆された。
- 3) PACAP によるイノシトールリン酸産生作用を  $^3\text{H}$ -ミオノイシトールを用いて測定したところ、用量依存性にイノシトールリン酸産生を増加させ、その最大効果はカルバコールのイノシトールリン酸産生能にほぼ匹敵した。これは PACAP が  $\text{IP}_3$  産生を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の動員に作用していることを示唆している。
- 4) PACAP は種々の組織でアデニレートシクラーゼの著しい活性化作用が報告されており、本研究の培養副腎髄質細胞においても PACAP  $10^{-10}\text{M}$  ~  $10^{-8}\text{M}$  において用量依存性に cAMP 産生増加を起こした。そこで cAMP 産生とカテコールアミン分泌との関連性を検討した。即ち、cAMP の antagonist (Rp-cAMP isomer) は PACAP によるカテコールアミン分泌に影響を与えなかった。また、アデニレートシクラーゼの活性化剤である forskolin も PACAP による分泌に影響を与えなかった。これらの結果は cAMP 系は PACAP によるカテコールアミン分泌の主要な機序ではないことを示している。

以上の検討により、PACAP によるカテコールアミン分泌の主要な機序は電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介する細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入によるものと一部は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の移動によるものであることを明らかにした。PACAP の作用でカルバコールやニコチンとの相違点は、ホスホリパーゼ C やアデニレートシクラーゼの活性化がカテコールアミン分泌を起こす濃度よりも極めて低濃度で作用することから、second messenger を産生しカテコールアミン生合成酵素の活性化に作用するなど、カテコールアミン分泌以外の何らかの機能発現をもたらす細胞内情報伝達に関与していることを示唆

している。

## 審 査 の 要 旨

本研究は培養ブタ副腎髄質細胞を用いて Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) によるカテコールアミン分泌とその機序を検討し、その分泌には電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介する細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入による機序と一部は細胞内小器官からの  $\text{Ca}^{2+}$  動員によることを明らかにした点に意義が認められる。さらに、PACAP は本細胞系においてもアデニレートシクラーゼの著しい活性化を引き起こしたが、カテコールアミン分泌に直接作用を有しないことを明らかにした点も注目される。今後、本研究を発展させることにより、カテコールアミン分泌に関する PACAP の生理的意義を明らかにすることが期待されると同時に、生体に広く存在することが認められている PACAP の作用機構の解明にも役立つと考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。