

博士(医学) 林 千 雅

論文題目

Possible contribution of 2-Aminoethoxydiphenyl-borate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization to adrenocorticotropin-induced glucocorticoid synthesis in rat adrenal cells

(ラット副腎皮質細胞の副腎皮質刺激ホルモンによるグルココルチコイド合成における 2-Aminoethoxydiphenyl-borate 感受性  $\text{Ca}^{2+}$  供給経路の関与の可能性)

論文の内容の要旨

[はじめに]

副腎皮質束状層において、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)は、cAMP-プロテインキナーゼ A(PKA)経路を活性化し、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル(VDCC)を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )を増加させ、グルココルチコイド (ラットにおいては corticosterone) を合成する。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は PKA の再活性化とコレステロールのミトコンドリア内への輸送の際に不可欠と考えられている。

一方、哺乳類において、生理的濃度の ACTH が cAMP 増加を伴わずにステロイドを合成することから、別の  $\text{Ca}^{2+}$ 供給経路が存在する可能性について議論されているが、未だ一定の見解は得られていない。今回、cAMP-VDCC 以外の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 供給経路として、cAMP と並び代表的な細胞内情報伝達物質であるイノシトール三リン酸( $\text{IP}_3$ )-プロテインキナーゼ C(PKC)系を介する可能性を考え、同経路の阻害薬である 2-aminoethoxydiphenyl borate(2APB)を用いて検討を行った。

[材料]

雄性 SD ラット 6 週令の副腎皮質束状層細胞(AZFR)をコラゲナーゼ処理し、10% FCS 含有 M199 を用いて単層培養し、実験に供した。

[方法]

1. ACTH  $10^{-14}$ ~ $10^{-9}$  M によるステロイド合成と細胞内 cAMP に関する検討

AZFR(10 万個/well)に ACTH  $10^{-14}$ ~ $10^{-9}$  M を添加し、4 時間後の培養液中 corticosterone 濃度、15 分後の 0.01 M 酢酸抽出細胞内 cAMP 濃度をそれぞれ radioimmunoassay で測定した。更に、これらに 2APB 10  $\mu\text{M}$  を同時添加し、それぞれについて検討した。

2. ACTH によるステロイド合成における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化

1 日間単層培養した 10 万個/dish の AZFR に細胞内蛍光色素 fluo-4 を導入した。ACTH  $10^{-11}$  M および ACTH  $10^{-11}$  M+2APB 10  $\mu\text{M}$  について、添加後の蛍光光度を蛍光顕微鏡下で 420 秒観察し、比較した。

3. ACTH による  $\text{IP}_3$  への影響に関する検討

AZFR(30 万個/well)に ACTH  $10^{-9}$ ~ $10^{-14}$  M を 1 分間添加した後に過塩素酸抽出細胞内  $\text{IP}_3$  を、radioreceptor assay kit を用いて測定した。

#### 4. 本経路から供給された $\text{Ca}^{2+}$ のステロイド合成系における作用部位の検討

AZFR(100 万個/well)に ACTH  $10^{-11}$  M および ACTH  $10^{-11}$  M+2APB  $10 \mu\text{M}$  を添加、4 時間後の培養液中 pregnenolone、progesterone、deoxycorticosterone(11-DOC)、corticosterone の濃度を質量分析法で測定した。P450<sub>SCC</sub> 活性は pregnenolone 濃度、 $3\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ HSD)活性・P450<sub>C21</sub> 活性・P450<sub>C11</sub> 活性は、それぞれの酵素を介する前後の中間代謝産物濃度の比を用いて、評価した。

##### [結果]

1. ACTH は、 $10^{-11}$  M より濃度依存性に corticosterone 合成を刺激した。その際、 $10^{-10}$  M 以上で cAMP 増加が観察され、このことから、ACTH  $10^{-11}$  M では、cAMP 増加を伴わない corticosterone 合成が存在すると考えられた。2APB は、ACTH  $10^{-11}$  M 以上で、cAMP の抑制を伴わずに corticosterone 合成を約 50%抑制した。

2. ACTH  $10^{-11}$  M により、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は有意に上昇した。その動態は添加直後の急上昇相と、その後の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  維持相の二相性を呈していた。2APB の追加添加により、第一相が消失し、420 秒間の濃度曲線下面積は 30.3%に抑制された。

3. 細胞内  $\text{IP}_3$  濃度は ACTH の濃度変化に伴い、ベル型に上昇した。すなわち、ACTH  $10^{-13}$  M でピークとなり、前値の 133.5%の上昇がみられた。一方、corticosterone 合成が確認される ACTH  $10^{-11}$  M 以上では、細胞内  $\text{IP}_3$  濃度に変化を認めなかった。

4. ACTH  $10^{-11}$  M により P450<sub>SCC</sub> 活性、P450<sub>C11</sub> 活性が有意に上昇した。このうち 2APB は P450<sub>SCC</sub> 活性を有意に抑制した。3 $\beta$ HSD 活性・P450<sub>C21</sub> 活性には、ACTH、2APB とも影響しなかった。

##### [考察]

副腎皮質束状層における ACTH によるステロイド合成に cAMP-VDCC 経路以外の  $\text{Ca}^{2+}$  供給細胞内情報伝達経路が存在する可能性が示唆された。この経路は、cAMP-VDCC 経路の活性化を生じる ACTH 濃度より低い  $10^{-11}$  M から活性化された。2APB が ACTH  $10^{-11}$  M 以上の corticosterone 合成を約 50%抑制したことから、本経路が ACTH  $10^{-10}$  M 以上で cAMP-VDCC 経路と同時に活性化されている可能性が考えられた。また、この ACTH 濃度において、細胞内  $\text{IP}_3$  濃度は変化しないため、 $\text{IP}_3$ -PKC 経路以外の細胞内情報伝達の関与が示唆された。

2APB によって、ACTH  $10^{-11}$  M 刺激による P450<sub>SCC</sub> 活性の上昇が有意に抑制されたことから、本経路から供給される  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の作用部位は、コレステロールがミトコンドリアに流入する段階であると考えられた。

ACTH  $10^{-11}$  M による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の動態は、細胞内小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出因子である thapsigargin 刺激による二相性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  動態と類似の動態を示していた。更に 2APB は、細胞内貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  放出相と考えられる上昇を有意に抑制することから、今回提唱した新しい  $\text{Ca}^{2+}$  供給は、細胞内貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  放出及びそれに引き続く store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE)に由来する可能性が示唆された。

## [結語]

生理的な濃度(ACTH  $10^{-11}$  M) 以上でのステロイド合成において、cAMP-VDCC 以外に、2APB に感受性のある  $\text{Ca}^{2+}$  供給経路が、コレステロールのミトコンドリアへの流入段階で重要な役割を担うと考えられた。

**論文審査の結果の要旨**

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)は、副腎皮質束状層において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を増加させ、グルココルチコイド合成を促進する。近年、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の増加経路として cAMP-プロテインキナーゼ A(PKA) を介した電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル(VDCC) 以外にも  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  調節メカニズムが存在することが示唆されている。

申請者らは ACTH によるグルココルチコイド合成に関わる  $\text{Ca}^{2+}$  供給経路を明らかにするため、雄性 SD ラット 6 週令の単層培養副腎皮質束状層細胞(AZFR)を用いて、 $\text{IP}_3$ -PKC 経路の阻害薬である 2-aminoethoxydiphenyl borate(2APB)の存在下、非存在下における ACTH 刺激時の細胞内 cAMP 濃度変化、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  動態および corticosterone 濃度変化を解析した。さらにグルココルチコイド合成系における  $\text{Ca}^{2+}$  の作用部位についても検討を加えた。

その結果、副腎皮質束状層における ACTH によるグルココルチコイド合成には cAMP-VDCC 経路以外の  $\text{Ca}^{2+}$  供給経路が存在し、この経路は、thapsigargin 刺激時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  動態と類似した細胞内貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  放出及びそれに引き続く store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry(SOCE)である可能性が高い事を明らかにした。さらに、本経路から供給される  $\text{Ca}^{2+}$  の作用部位は、 $\text{P450}_{\text{SCC}}$  活性調節の段階であることを解明した。

本研究は、生理的 ACTH 濃度によるグルココルチコイド合成において、cAMP-PKA-VDCC 経路以外に、2APB に感受性のある  $\text{Ca}^{2+}$  供給経路が存在し、コレステロールのミトコンドリアへの流入段階で重要な役割を担うことを示したものとして高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 渡邊 裕司  
副査 中原 大一郎 副査 中川 祐一