Osaka University Knowledge Archive

Title	Prostaglandin induces C2+ influx and cyclic GMP formation in mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid NG108-15 cells in culture
Author(s)	三輪, 直人
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36884
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【72】

氏名・(本籍)	三輪直人（みわなおと）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9016 号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Prostaglandin induces Ca^{2+} influx and cyclic GMP formation in mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid NG108-15 cells in culture （プロスタグランジンは、マウス神経芽腫細胞とラットグリア腫細胞の雑種細胞NG108-15の培養系において、Ca^{2+}を細胞内へ流入させ、cGMPの産生を促進する。）
論文審査委員	（主査）教授 坂本 幸哉 （副査）教授 多田 道彦　教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

〔目　的〕

中枢神経系においても種々の作用が知られるようになったプロスタグランジン（ＰＧ）が中枢系で作用を発現する機序を明らかにするため，神経細胞のモデルとして培養細胞NG108－15 を選び，ＰＧの細胞内情報伝達機構への影響を調べること。

〔方法ならびに成績〕

培養：

ダルベッコ変法イーグル培地（日水製薬）に5％準胎児血清（三菱化成）を加えた培養液を用いた。培養は10％炭酸ガスを含む雰囲気下，37℃で行った。 145㎠のディッシュ（培養液25ml）を細胞内Ca^{2+}濃度の測定に，21㎠（培養液4ml）のディッシュをサイクリックヌクレオチドの定量に用いた。いずれのディッシュにも4－5×10^3細胞／㎠となるよう細胞を播種した。培養3日目，および5日目に培養液の交換を行い，6日目に各実験に供した。

サイクリックヌクレオチドの定量：

培養液を0.5mM 3－イソブチル－1－メチルキサンチンを含む緩衝液と交換し，30分間，37℃に放置後，各種薬剤を培養液に添加した。所定時間後，緩衝液を吸引除去し，氷冷した6％過塩素酸を加えて細胞からサイクリックヌクレオチドを抽出した。cAMP，cGMP の定量はラジオイムノアッセイキット（ヤマサ醤油）を用いて行った。

細胞内遊離Ca^{2+}濃度（〔Ca^{2+}〕i）の測定：

NG108-15 細胞をディッシュからかきとり，培養液に10^7細胞／ml となるよう懸濁した後，37℃で30分間，クイン2アセトキシメチルエステル（50μM）を負荷した。クイン2を負荷した細胞懸濁液 1.5mlを石英セルに移し，撹拌下，日立F−3000 蛍光分光光度計にて各種薬剤を添加した時の蛍光強度（励起波長336nm，蛍光波長495nm）の変化を測定し，〔Ca^{2+}〕i に換算した。

成績：

NG108−15細胞の内因性PGであるPGD$_2$，PGE$_2$，PGF$_{2a}$はいずれも，培養系に加えると細胞内cGMP量を一過性に上昇させた。10μMの濃度で比較すると各々，3.9，3.1，7.5倍上昇させた。また，これらPGは同じ強さの順序で〔Ca^{2+}〕i も一過性に増加させた。しかし，培養液中のCa^{2+}を除くと〔Ca^{2+}〕i の増加はほとんど起こらなかった。さらに，細胞内のCa^{2+}をクイン2でキレートするとPG刺激によるcGMPの産生の促進はほとんど認められなくなった。PGの代謝物や，合成アナログの作用を調べたところPGF$_{ab}$，PGD$_1$，PGD$_3$ にcGMPの産生，〔Ca^{2+}〕iの増加が共に認められたが，他のPGはPGD$_2$のエナンチオマーを含めて，いずれの作用も有さなかった。培養液中のK^+の濃度を5mMから50mMに上げると，〔Ca^{2+}〕i，cGMP共に増加した。高K^+濃度処理によるNG108−15細胞の〔Ca^{2+}〕i，cGMP量の増大はベラパミルなどの電位依存性Ca^{2+}チャンネルのブロッカーにより完全に抑えられるが，PGに対するこれら細胞応答は影響を受けなかった。

〔総　括〕

PG刺激によるNG108−15細胞の応答は，①〔Ca^{2+}〕i の増加がcGMPの増加に先立って起こること，②細胞外のCa^{2+}を除くと〔Ca^{2+}〕iとGMPの増加が，③細胞内のCa^{2+}を除くとcGMPの増加がほとんど見られなくなることから，PGにより細胞外液からCa^{2+}が流入し，〔Ca^{2+}〕iが上昇し，その結果cGMPの産生が促進されることが分った。また，このPGによるCa^{2+}の流入は電位依存性Ca^{2+}チャンネルを介するものではなく，PGに特異的な構造を認識する受容機構を介して起こると考えられた。

論文の審査結果の要旨

プロスタグランジン刺激により神経細胞のモデルとして用いられたNG108−15細胞には，細胞外液からCa^{2+}が流入し，胞内遊離Ca^{2+}濃度が上昇する結果，cGMPの産生が促進されること，また，プロスタグランジンによるCa^{2+}の流入は，電位依存性カルシウムチャンネルを介するものではなく，プロスタグランジンの特異的な構造を認識する受容機構を介して起こると考えられることが明らかにされた。

本研究は，脳・中枢神経系においても重要な役割を果していることが明らかにされてきたプロスタグランジンの作用発現のメカニズムの解明に役立つことが期待される。

以上，論文審査の結果，医学博士の学位を授与するに足るものと確認した。