The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨代謝におけるインスリンおよび副甲状腺ホルモンの相互作用に関する研究
Author(s)	Akiko, Iida-Klein
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36963
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【6】

氏名・(本籍)	AKIKO IIDA-KLEIN (アキコ イイダ クライン)
学位の種類	薬　学　博　士
学位記番号	第　8835　号
学位授与の日付	平成元年9月22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	**骨代謝におけるインスリンおよび副甲状腺ホルモンの相互作用に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教　授　岩田平太郎 (副査) 教　授　近藤　雅臣　教　授　三村　務　教　授　三浦　喜温

論文内容の要旨

生体内の血清カルシウム濃度は，骨形成を司るosteoblast（OB）と骨吸収を司るosteoclast（OC）の2種の骨細胞によって非常に精緻に制御されており，これらOBとOCの細胞間ではお互いの機能調節に関するシグナルが何らかの形で伝達されていると考えられている。

副甲状腺ホルモン（PTH）はカルシウム代謝を調節するホルモンの1つで，腎臓や腸管でのカルシウムの吸収，再吸収作用の調節と共に骨細胞においても，その強力な骨吸収作用とOB細胞における種々のsecond messenger系への影響が報告されている。一方，インスリンの骨細胞に対する作用に関しては，若年性糖尿病や実験的に糖尿病を誘発した動物におけるインスリンの欠乏が，骨形成速度の低下，骨重量の減少，あるいはosteopeniaと関連していることが指摘されており，又，in vitroの実験でもOB様細胞へのアミノ酸およびグルコースの取り込みやtype Iコラーゲンの合成がインスリンにより刺激促進されることが報告されている。本研究は，インスリンの骨代謝における役割を明確にする目的で，特にPTHとの相互作用について，osteoblastとしての機能を高度に備えており，かつ，インスリンやPTHのレセプターの存在が確認されているラットの骨肉腫細胞UMR－106－01を用いて，OBの機能調節に対する影響を検討した。

まず最初に，^{3}H－Thymidine（^{3}H－TdR）取り込みにより，インスリンおよびPTHのUMR－106－01細胞におけるDNA合成に対する影響を検討したところ，インスリンは用量依存的にDNA合成を促進し，PTHは単独では用量依存的に，DNA合成を抑制した。さらに，PTHのDNA合成抑制作用は生理的用量（10^{-9}M）のインスリンの存在下で緩減され，特に10^{-12}～10^{-11}Mといった生理的用量のPTHはインスリンの共存下でDNA合成を促進した。次に，インスリンによるPTHのDNA合成抑

制効果の緩和作用が，ＰＴＨによる細胞内cAMP蓄積作用に対する抑制に起因しているかどうかを検討する目的で，細胞内cAMPを測定した。インスリン単独ではbasalな細胞内ｃＡＭＰ含量は変化しないが，ＰＴＨによるcAMP蓄積作用はインスリンにより有意に低下した。

続いて，インスリンおよびＰＴＨによるcAMPの分解酵素であるcAMPフォスフォジエステラーゼ（cAMP－ＰＤＥ）活性に及ぼす影響を検討したところ，インスリンとＰＴＨは共に，用量依存的にcAMP－ＰＤＥを活性促進し，両者の最大効果用量の併用で相加的な活性促進効果が認められたことから，各々の活性化の作用機序が異なることが示唆された。無細胞系ではインスリン，ＰＴＨともに何ら効果が認められなかったことから，どちらのホルモンによるcAMP－ＰＤＥ活性促進作用も，intactな細胞における生物学的な作用を介しているものと思われる。又，インスリンのcAMP－ＰＤＥ活性促進効果はプロティンキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤で，ＰＴＨのそれはCa^{++}拮抗剤で有意に抑制されたことから，インスリンは主にＰＫＣ系を介し，一方，ＰＴＨはCa^{++}系およびcAMPプロティン・キナーゼ系を介してcAMP－ＰＤＥ活性を促進していると示唆された。

蛍光染料ＦＵＲＡ２／AMを用いて細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{++}]i$）を検討したところ，2×10^{-10}M以上のＰＴＨ投与により細胞外Ca^{++}の存在下で$[Ca^{++}]i$は3相性の変化を示した。$[Ca^{++}]i$は，ＰＴＨ投与直後30秒以内に急速に上昇するが（Ｉ）すぐ元のレベルあるいはそれよりもやや低い値にまで低下した後（Ⅱ），再び時間経過と共にゆっくりと上昇した（Ⅲ）。初期のＩの急速な$[Ca^{++}]i$の上昇は，細胞外Ca^{++}の不在下でも認められたが，その上昇率がやや低下したことより，細胞膜からのCa^{++}のinfluxによるものだけではなく，細胞内小器官からのCa^{++}の遊離による$[Ca^{++}]i$の上昇も含まれると考えられた。Ⅲ相の$[Ca^{++}]i$の上昇は細胞外Ca^{++}に依存し，かつ，dibutyryl－cAMPなど細胞内cAMP含量を高める薬物投与による$[Ca^{++}]i$上昇パターンと類似しており，ＰＴＨ投与による細胞内cAMP蓄積作用の結果として誘導されたcAMP依存性の$[Ca^{++}]i$の上昇と考えられた。インスリン単独では$[Ca^{++}]i$に対し有意な影響を及ぼさなかったが，インスリンの用量及び投与時間経過に依存し，ＰＴＨによるＩ相の急速な$[Ca^{++}]i$の上昇効果を抑制した。

インスリン及びＰＴＨで前処置したＵＭＲ－106－01細胞を遠心分離分画しＤＥＡＥセファロースで部分精製を行なったＰＫＣのcytosolic及びmembrane-boundの各分画について，その活性を測定した。インスリンはmembrane-boundのＰＫＣ活性及びmembrane-bound活性／cytosolic活性（Ｍ／Ｃ）の活性比を減少させ，一方，ＰＴＨは著明にmembrane-boundの活性及びＭ／Ｃの活性比を増大させた。ＰＴＨのＭ／Ｃ活性比増大作用はインスリンの併用で抑制される傾向が認められた。

最後に，ＰＴＨがCa^{++}の輸送に影響を及ぼすこと，又，インスリンがこのＰＴＨの作用をmodulateすることが示されたため，これらのホルモンが他のイオンの輸送に対してもどのような影響を及ぼすかを検討する目的で，ouabain-sensitiveな$^{86}Rb^{+}$の取り込みを，Na^{+}／K^{+}pump活性として測定した。インスリン及びＰＴＨは共に用量依存的にNa^{+}／K^{+}pump活性を刺激促進したが，ＰＴＨは低用量で抑制傾向を示した。インスリンの併用でＰＴＨの低用量に見られた抑制降下は逆転された。又，ＰＴＨは投与５分後のK^{+}efflux を亢進，この作用もインスリンの併用で緩和された。

本研究の結果により，インスリンは骨代謝，特にosteoblastの機能調節に関して，自身，mitogen

として作用するばかりでなく，種々のsecond messenger系の作用部位で骨代謝調節に対して“動的”に顕著な効果を示すＰＴＨの作用を“静的”にmodulateすることが確認された。すなわち，生体内血清カルシウム濃度の恒常性を保つべくＰＴＨは急激に対応して種々の系において著明な変化をもたらすが，インスリンはＰＴＨのこのような急激な変化に対して，それを制御する方向で恒常性を保とうとする。このようなインスリンとＰＴＨの相互作用が，ＯＢの増殖あるいは分化，さらにＯＢの機能の１つとしてのＯＣとのコミュニケーションの調節に関連していることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

本論文は，インスリンが骨代謝の機能調節に関し，mitogenとして作用し，且つ種々のsecond messengerの作用部位で副甲状腺ホルモンの作用を修飾することを明らかにしたもので，薬学博士の称号を授与するに値するものである。