

Title	Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate enhances dopamine accumulation in rat hypothalamic cell culture containing opaminergic neurons
Author(s)	門脇, 浩三
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37374
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	かど 門	わき 脇	こう 浩	ぞう 三
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 2 9 9	号	
学位授与の日付	平成 2 年 8 月 8 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	Adenosine 3'. 5'-cyclic monophosphate enhances dopamine accumulation in rat hypothalamic cell culture containing dopaminergic neurons (ラット視床下部培養細胞における cAMP のドーパミン取り込み促進作用)			
論文審査委員	(主査) 教授	谷澤	修	
	(副査) 教授	松本 圭史	教授 遠山 正彌	

論文内容の要旨

〔目的〕

視床下部のドーパミン神経系である隆起核-下垂体-ドーパミン神経系は、正中隆起部において GnRH 神経末端からの GnRH の放出を制御し、また一方、下垂体門脈系を通じて下垂体前葉からのプロラクチンの分泌に抑制的に作用しており、生殖内分泌と大きく関わっている。一般にカテコラミン神経末端から放出されたカテコラミンは、再取り込みや酵素の分解の機作によりその神経伝達物質としての作用が解除されると考えられている。カテコラミン再取り込みの機構については、(1)外液の Na イオン濃度、(2)外液の温度、(3) Na⁺, K⁺-ATPase などに依存することが証明されているが、細胞内セカンドメッセンジャーの関与の有無について、詳細に検討した報告はまだない。今回、ラット視床下部培養細胞系を用いて、cAMP およびそれをセカンドメッセンジャーとし、かつ視床下部での免疫組織活性の高い神経ペプチドである vasoactive intestinal polypeptide (VIP) のドーパミン取り込みに及ぼす影響につき検討した。

〔方法〕

(1) ラット視床下部培養細胞系の作成

生後 1 日の HLA-Wistar 系ラットの視床下部を摘出し、トリプシン処理及びピペッティングの操作により細胞を単離した。Falcon 24 well プレートに 10⁶個/Well の濃度でまき、5%牛血清及び 5%胎仔牛血清を含む Medium-199 にて 7 日間培養の後実験に用いた。

(2) ドーパミン細胞の同定

ヒツジ抗マウスチロシン水酸化酵素抗体を用いて培養細胞を蛍光染色し、ドーパミン細胞の存在を確認

した。約100個/well のチロシン水酸化酵素陽性細胞を認めた。

(3) 取り込まれたドーパミンの測定

[^3H]ドーパミン(0.024 μM)を含むMedium-199にて細胞を一定時間培養の後、培養液にて3回洗浄後、細胞を剥離し細胞内の [^3H] の放射活性を、シンチレーションカウンターにて測定した。培養培養液中に各種薬剤を添加し、取り込みへの影響をみた。

〔成績〕

- (1) cAMPの細胞膜通過型アナログである $(\text{Bu})_2\text{-cAMP}$ は、濃度依存的(1.0 - 10.0 mM) に有意に [^3H]ドーパミンの取り込みを促進し、また細胞内cAMPの合成を促進する forskolin によっても同様の取り込み促進効果が認められた。
- (2) 培養初日をDay 0として、経日的にドーパミンの取り込みの変化を観察すると、 $(\text{Bu})_2\text{-cAMP}$ による促進効果はDay 4までは認められず、Day 5より出現し、Day 6でピークに達し、Day 9以後は急減した。
- (3) $(\text{Bu})_2\text{-cAMP}$ は、取り込まれたドーパミン及びその分解産物の放出には影響しなかった。
- (4) VIP添加(10^{-9} - 10^{-5}M)により濃度依存的に [^3H]ドーパミン取り込みの促進が認められ、この効果は 10^{-6}M で平衡に達した。同時に測定した細胞内のcAMP濃度もVIPの濃度依存的に上昇を認め、VIP 10^{-6}M 添加でほぼ平衡に達した。

〔総括〕

本研究において以下のことを明らかにした。

- (1) 視床下部培養細胞におけるドーパミンの取り込みは、細胞内cAMPにより促進的に調整されている。
- (2) 視床下部培養細胞内のcAMPの濃度はVIPにより上昇する。
- (3) 視床下部培養細胞によるドーパミンの取り込みはVIPにより促進される。

以上のことより、視床下部においてVIPは、細胞内cAMP系を介してドーパミンの再取り込みを制御することによりドーパミン神経の活動を修飾し、これによりゴナドトロピンやプロラクチンの分泌を調節している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

視床下部のドーパミン神経系はゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)の分泌制御ならびに下垂体門脈系を介してプロラクチンの分泌を抑制するなど、生殖内分泌との関わりが大きい神経系である。著者らはラット視床下部細胞によるドーパミンの取り込み作用が細胞内のサイクリックAMP系により促進的に制御されていることをはじめて見出した。さらにGnRH分泌促進作用やプロラクチン分泌促進作用を有することが証明されている Vasoactive intestinal peptida (VIP) が視床下部細胞内のサイクリックAMPの濃度を上昇させ、同時にドーパミンの取り込みを促進させることを見出し、VIP

の作用がドーパミン神経系を修飾することにより発現されている可能性を示唆した。

これらはいずれも独創的で、生殖内分泌学に新しい知見を加え得たものであり、学位論文に値するものと考えられる。