

Title	Involvement of Extracellular Calcium and Arachidonate in [³ H] Dopamine Release from Rat Tuberoinfundibular Neurons.
Author(s)	大道, 正英
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37509
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	おお	みち	まさ	ひで
	大	道	正	英
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 2 9 7	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	Involvement of Extracellular Calcium and Arachidonate in ^3H Dopamine Release from Rat Tuberoinfundibular Neurons. ラット視床下部よりのドーパミン分泌におけるカルシウムおよび アラキドン酸の役割			
論文審査委員	(主査)			
	教授	谷	沢	修
	(副査)			
	教授	遠山	正彌	教授 松本 圭史

論文内容の要旨

〔目的〕

高プロラクチン血症は排卵障害の一因と考えられ、プロラクチン分泌を主として制御するのは視床下部より下垂体門脈中に分泌される dopamine (DA) であることは知られている。視床下部よりの DA 分泌に関しては従来より脳切片もしくは神経終末を集めたシナプトゾームで行なわれていたが、これらの系は必ずしも正常ニューロン全ての機能を反映しているとは限らない。従って本研究においてはまず視床下部 DA ニューロンの初代培養系を確立した。次に従来より calcium (Ca) は神経伝達物質の放出に必須と考えられているが、アラキドン酸 (AA) の関与については不明であるので、Ca-AA が DA 分泌の細胞内伝達機構の一端を担うかどうか検討した。

〔方法〕

① 視床下部初代培養系の確立

Wistar 系雌ラットを断頭し、顕微鏡下で弓状核、室周囲核、および正中隆起部を含む部分を切除した。0.1% trypsin で 25 分処理し、2 mM EDTA を含む Ca-Mg-free の HANKS 培養液内で細胞を分離して単離細胞浮遊液を得た。次に 0.15% bovine serum albumin, 5% fetal calf serum を含む TCM 199 培養液を用い 24 well plate (1.0×10^6 cells/well) で 7 日間培養して下記の実験に用いた。

② DA ニューロンの証明

7 日間初代培養細胞を Zamboni 固定液につけ 2,000 倍の tyrosine hydroxylase 抗体を用いて間接免疫蛍光染色を施行した。

③ [^3H] DA 分泌の測定

7日間初代培養細胞を[^3H]DAで120分間培養後、4回TCM 199 培養液にて洗浄し、細胞外から細胞内にCaを流入させるcalcium ionophore A 23187, Ca channel activator である maitotoxin (MTX), Caにより活性化されAA分泌を刺激するphospholipase A₂ (PLA₂), AAを投与し培養液中に放出される[^3H]DAの放射活性を液体シンチレーション・カウンターにて測定した。なお放出されたDAは高速液体クロマトグラフィーにてDAであることを同定した。

④ [^3H] AA 分泌測定

7日間初代培養細胞を[^3H]AAで90分間培養後、4回0.25% BSAを含むTCM 199 培養液で洗浄し、A 23187を投与し、放出された[^3H]AAをethyl acetateにて抽出後、薄層クロマトグラフィーにてAAを分離し液体シンチレーション・カウンターにて測定した。

[成績]

① 間接免疫蛍光抗体法にて視床下部7日間初代培養細胞においてtyrosine hydroxylase 陽性細胞を認めた。よってDAニューロンの存在が明らかになった。

② [^3H]DA 分泌は、

i) A 23187 5分間投与により 10nM - 50 μM の間で濃度依存性に刺激された。

ii) 50 μM A 23187 投与により30秒以内にcontrolに比し有意に刺激され、15分でplateauに達した。

③ 50 μM A 23187の[^3H]DA分泌刺激効果は、2mMEDTAにより細胞外Caを下げると消失した。

④ [^3H]DA分泌は、MTX 5分間投与により1ng - 100ng/mlの間で濃度依存性に刺激された。

⑤ [^3H]DA分泌は、100mIU/ml PLA₂, 10 μM AA 5分間投与によりcontrolに比し有意に刺激された。

⑥ [^3H]AA分泌は、

i) A 23187 5分間投与により5 μM - 50 μM の間で濃度依存性に刺激された。

ii) 50 μM A 23187投与により5分の間で時間依存性に刺激された。

[総括]

本研究において視床下部DAニューロンの初代培養系を確立し、これを用いてDA分泌の細胞内情報伝達機構にCa-PLA₂-AA系が一端を担っている可能性を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

ドーパミン(DA)は、視床下部より下垂体門脈中に分泌されプロラクチン分泌を制御しているため、DA分泌の機構を検索することは産婦人科分野にとって重要である。しかし、DA分泌についての実験系は確立されたものが無く、また細胞内情報伝達機構も不明な点が多い。

今回、著者は、視床下部 DAニューロンの初代培養系を確立し、それをを用いて Ca の動員が phospholipase A₂ (PLA₂) を活性化し、Arachidonic acid (AA) の放出を介して DA 分泌を促進することより、DA 分泌の細胞内情報伝達機構に Ca-PLA₂-AA 系が一端を担っている可能性を明らかにした。

これらはいずれも独創的で、新しい知見を生殖内分泌学に加え得たものであり、博士論文に値するものとする。