The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone and Phorbol Ester on Dopamine Release From Dispersed Rat Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons
Author(s)	西川, 吉伸
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38686
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

【108】

氏　　名	西川吉伸（にしかわよしのぶ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第 11063 号
学位授与年月日	平成6年2月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone and Phorbol Ester on Dopamine Release From Dispersed Rat Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons （TRHの視床下部ドーパミンニューロンの初代培養系における ドーパミン放出に及ぼす影響）
論文審査委員	（主査） 教授 谷澤　修 （副査） 教授 遠山 正彌　教授 網野 信行

論文内容の要旨

〔目　的〕

視床下部より下垂体門脈血中に分泌されるドーパミン（DA）は，下垂体におけるプロラクチン（PRL）分泌を抑制的に制御していることが知られているが，そのDAの制御機構についての報告は少ない。一方，下垂体に直接作用しPRL分泌を増加させるTRHは，近年，視床下部のみならず広く脳内に分布しておりドーパミン様作用を発現するとの報告がある。そこで私は，独自に確立したラット視床下部DAニューロンの初代培養系を用いて，TRHの視床下部DAニューロンからのDA放出に及ぼす影響と，その細胞内情報伝達機構について検討した。

〔対象および方法〕

1）Wistar系雌ラット（200-250gr）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，2 mM EDTAを含むCa^{2+}-Mg^{2+}free Hank's液で細胞を分離し，10% FCSを含むTCM 199培養液にて7日間初代培養後，各実験に用いた。

2）培養細胞を用い〔^{3}H〕Me-TRHをligandとして，37℃120分間の培養で，TRH receptor assayを行った。

3）〔^{3}H〕DA120分間前培養後，十分に洗浄しTRHをはじめ各種薬剤，phorbol myristate acetate（PMA），chlordiazepoxide（CDE），EGTA等を添加後，培養液中に放出される〔^{3}H〕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。

4）同培養細胞に蛍光色素であるFura 2-AMあるいはIndo-1-AMを37° 120分間の前培養で取り込ませた後，EGTA存在下およびTRH receptorの拮抗剤であるCDE存在下でのTRH刺激による細胞内Ca^{2+}の変動を，画像処理装置付蛍光顕微鏡にて測定した。

5）同培養細胞をPMAにて24時間前処置後，TRHおよびPMA刺激における培養液中の〔^{3}H〕DAの放射活性を同様に測定した。

〔成　績〕

TRH receptorの存在

1) TRH receptor assay では，Scatchard plot による解析で高親和性の単一の receptor が検出され解離定数は 1.2nM，最大結合部位数は178fmol/mg protein であった。

TRH の DA 放出に及ぼす影響

1) TRH は，濃度依存性および時間依存性に視床下部 DA ニューロンからの DA 放出を促進した。

2) 20分間の TRH（1 μM）添加で見られた DA 放出刺激は，EGTA（1 mM）あるいは CDE（10 μM）の同時添加により有意に（$p<0.01$）抑制された。

細胞内情報伝達機構についての検討

1) 蛍光顕微鏡画像処理システム下における細胞内 Ca^{2+}の変動は，TRH（1 μM）刺激により明かな上昇を認めた。

2) TRH（1 μM）刺激による細胞内 Ca^{2+}の上昇は，培養液中 EGTA（5 mM）あるいは CDE（10 μM）を添加することにより認められなかった。

3) TRH の〔^{3}H〕DA 放出作用機序の特異性を検討するため，直接 C キナーゼを介して作用するといわれている PMA（100nM）を添加したところ，TRH（1 μM）とほぼ同様の〔^{3}H〕DA 放出を認めた。PMA（500nM）にて24時間前培養することにより C キナーゼを枯渇した条件下では，TRH（1 μM）により有意な（$p<0.05$）〔^{3}H〕DA の放出を認めたが，PMA（100nM）では認めなかった。

〔総　括〕

TRH は，視床下部 DA ニューロンに存在する TRH レセプターを介して DA 放出に促進的に作用することが明らかとなった。また，その細胞内情報伝達機構として，TRH は細胞内 Ca^{2+}を増加させ，一部 C キナーゼを介して DA 放出を促進することが初めて明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

生殖生理において重要な役割を演じているプロラクチンの分泌は主として視床下部からのドーパミンにより抑制的に調節されている。しかし視床下部からのドーパミンの放出機序については未だ明らかにされていない。今回西川君は視床下部ドーパミンニューロンの初代培養系を確立し，これらの系を用いて TRH がドーパミンの放出を促進し，細胞内情報伝達機構として細胞内カルシウムと C キナーゼが関与することを初めて明らかにした。これらの知見は産婦人科領域において重要な課題である排卵障害の病態の解明に寄与し，学位の授与に値すると考えられる。