The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A Possible Involvement of Tyrosine Kinase in TRH-induced Prolactin Secretion in GH3 Cells
Author(s)	神田, 裕樹
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39530
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

【 12 】

氏　　名	神田裕樹（かんだ ゆうき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第 11992 号
学位授与年月日	平成7年5月16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	A Possible Involvement of Tyrosine Kinase in TRH－induced Prolactin Secretion in GH3 Cells (甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンによるGH3細胞株のプロラクチン分泌に対するチロシンキナーゼの関与)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 高井 義美　教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

【目 的】

TRH刺激によるプロラクチン（PRL）分泌機構にG蛋白の活性化やイノシトールリン脂質代謝亢進とそれに連動するCキナーゼの活性化や細胞内Ca2＋の上昇等が関与することが知られている。また，ラット正常下垂体前葉細胞やGH3，GH4CI細胞などのPRL産生下垂体腫瘍細胞においてTRH刺激により細胞内蛋白がリン酸化されることが報告されているが，この細胞内蛋白のリン酸化がPRL分泌機構にどのように関与しているかどうかは知られていない。一方，microtubule が分泌顆粒に関連し，microtubuleの重合を抑制する薬剤がホルモン分泌を抑制する事実より，microtubule－associated proteinが分泌顆粒の輸送やexocytosisにおいて重要な役割を果たしている可能性が示唆されており，microtubule－associated protein を基質とするMAP（Mitogen－activated protein）Kinaseも同様にホルモン分泌に関与していると考えられる。GH3細胞において上皮成長因子が MAP kinase のチロシン残基のリン酸化および活性化をおこすとともにPRLの分泌を促進することから，我々は同様の細胞内情報伝達系がTRHにおいても関与する可能性について検討を加えた。その結果，TRH投与により MAP kinase のチロシン残基がリン酸化され，活性化されることを発見した。そこで今回チロシンキナーゼ阻害剤（ST638）を用いてTRH刺激下のMAP kinase のチロシン残基のリン酸化とPRL 分泌の関連を調べた。

【方 法】

①GH3細胞を24穴プレートに蒔き，15％ウマ血清および2.5 ％ウシ胎児血清添加 Ham－F10 液体培地下に培養した。細胞がconfluentに達した時点で血清無添加 Ham－F10 液体培地にて細胞を2回洗浄した後，ST638（50 μM）投与群および非投与群に分けて1時間培養後に培地を回収し，NIDDK供与のRIAキットを用いて培地中のPRL基礎分泌量を測定した。次に細胞を回収しトリパンブルー染色を行った。またST638を除去した後にTRH刺激を行い培地中のPRLを測定し，その毒性を検定した。②GH3細胞を6cmプレートに蒔き，①と同様の条件で培養し洗浄した。次にST638（50 μM）投与群，非投与群に分け，ST638投与群には1時間のST638の前投与を行った。この後細胞に最終濃度が1μMになるようにTRHを加え，刺激2分後に細胞を HNTG buffer にて加溶化し，10,000rpmにて

遠沈した。細胞質分画である上清にポリクローナル抗MAPkinase抗体を加えて1時間静置した後，プロティンAセファロースビーズを加えて免疫複合体を免疫沈降させ，Laemmli SDS サンプルバッファーを加えて変性させ，SDS－ポリアクリルアミド電気泳動に供した。泳動蛋白をニトロセルロース膜にtransferした後，抗phosphotyrosine抗体および［125I］－labeled anti－mouse immunoglobulin を用いimmunoblotを行った。③GH3細胞を①と同様の条件で培養し，ST638（50 μM）投与群，非投与群に分け，ST638投与群には1時間のST638の前投与を行った。この後TRH（1 μM）刺激後に培地上清を回収しRIAにてPRLを測定し時間経過を調べた。また種々の濃度のST638を投与条件下にTRH（1 μM）刺激30分後に培地上清を回収しPRLを測定しST638のTRH刺激によるPRL分泌に対する影響を調べた。

【成　績】

①GH3細胞において1時間のST638（50 μM）の投与ではPRLの基礎分泌量は非投与群に比べて有意な変化は認められなかった。またトリパンブルーテストやST638 除去後のTRH刺激に対するPRL分泌量の点からも急性の毒性は認められなかった。②GH3細胞においてST638非投与群ではTRH刺激により MAP kinase のチロシン残基のリン酸化が観察され，ST638投与群ではこの現象は著明に抑制された。③GH3細胞においてST638投与群ではTRH刺激によるPRL分泌はTRH刺激5分後に早くも抑制効果が認められ，この効果は2時間まで持続した。またTRH刺激30分後のPRL分泌は種々の濃度のST638を投与条件下で調べた結果，5 μMで有意な抑制効果が認められ濃度依存性が確認された。

【総　括】

以上の結果からPRL産生下垂体腫瘍細胞株GH3細胞においてTRH刺激によるPRL分泌機構に MAP kinase kinase をはじめとするチロシンキナーゼが関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

産婦人科領域においてプロラクチンは生理的には乳汁分泌に，病態的には高プロクラチン血症による無月経，下垂体腺腫などと関係することが知られており，下垂体におけるプロラクチン分泌機構の研究は生殖生理機構の解明の一助となると考えられる。本申請者は，まず甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）刺激によっておこる MAP kinaseのチロシン残基のリン酸化がチロシンキナーゼ阻害剤であるST638によって抑制されることを示し，続いてこの条件下でTRH刺激によるプロラクチン分泌が抑制されることを示した。これは，従来より報告されていた系の他に別のTRHの細胞内情報伝達系が存在し，この系がTRH刺激によるプロラクチン分泌に関与する可能性があるという新しい知見を見いだしたもので，学位の授与に値すると考えられる。