



副甲状腺ホルモンとビタミンDのモルモット腎遠位尿管細管における相互作用に関する定量細胞化学的研究 (Interaction of parathyroid hormone and vitamin D on cyclic changes of glucose-6-....

坂口, 和成

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1984-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0509

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000509>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	さか 坂	ぐち 口	かず 和	しげ 成	(和歌山県)
学位の種類	医学博士				
学位記番号	医博い第446号				
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当				
学位授与の日付	昭和59年3月31日				
学位論文題目	副甲状腺ホルモンとビタミンDのモルモット腎遠位尿管細管における相互作用に関する定量細胞化学的研究				
審査委員	主査	教授	藤田	拓男	
		教授	岩村	昇	教授 山口 延男

## 論文内容の要旨

### 緒言

遠位尿管細管が副甲状腺ホルモン (PTH) と活性型ビタミンDである  $1,25-(OH)_2D_3$  の標的組織であることはよく知られているが、この尿管細管におけるこれら2種のホルモンの相互作用に関する報告はない。

イギリスで Chayen, Bitensky らにより開発された感度の高い定量的細胞化学の手法は、細胞レベルで定量的に物質の生物学的活性を調べることを可能にした。PTHの cytochemical bioassay もこの方法によったものであり、モルモット腎遠位尿管細管の glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 活性の変化に基づいている。

PTHの cytochemical bioassay では、これまで詳細な検討なく vitamin D 補充モルモットを使ってなされていた。本研究は、*in vitro* において  $1,25-(OH)_2D_3$  と PTH が遠位尿管細管の G6PD 活性調節に何らかの相互作用をもっていないか、かつ、*in vivo* において vitamin  $D_3$  を補充することは PTH の cytochemical bioassay にいかなる影響を与えるかを調べるためになされた。

### 方法

Hartley 系雌の vitamin D 欠乏および補充モルモットを使用した。

cytochemical bioassay は Chayen らの方法に従って実施した。一辺 8 mm 以下の腎組織片を切り出し、Trowell's T8 medium で、 $37^{\circ}C$ 、95%  $O_2$ /5%  $CO_2$  の条件下で 5~5.5 時間維持培養した後 8 分間新しい培地と取り換え、その後にホルモンを含んだ培地と腎組織を反応させた。time course

をみるためには種々の時間反応させ、その時点で $-70^{\circ}\text{C}$ の *n*-hexane 中に入れて組織を固化すると共に反応を停止させた。各組織塊からクリオスタットで $16\mu\text{m}$ の切片を2枚切り出しG6PD活性を定量化する反応を行なった。反応液は50mM glycyglycine buffer pH 8.0中に30% polyvinyl alcohol, 5mM glucose-6-phosphate, 3mM NADP, 0.67mM phenazine methosulfate, 5mM neotetrazolium chloride, 10mMKCM を含んでいる。この反応により遠位尿管細管1細胞当りに沈着したformazan量をVickers M85 scanning and integrating microdensitometerにより測定し、これをその細胞のG6PD活性とした。

## 結果

### 1. vitamin D 欠乏動物における実験

維持培養5時間でG6PD活性は安定した低い基礎値となった。この時点でPTH濃度を0.001~10pg/mlの範囲で変化させて、各濃度でG6PD活性のtime courseをみると、PTH濃度が高いほど周期の短い波状変化が認められた。しかし、その振幅は濃度に関係なく一定であった。維持培養の最初から培地中に $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ を60, 120, 1200pg/mlの最終濃度で添加したところ、基礎値は濃度依存性に上昇した。腎組織を600pg/mlの $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ と維持培養後に0.01または1pg/mlのPTHと反応させると、G6PD活性は基礎値からの減少をもって始まる波状変化を示し、周期はPTH濃度が高いほど短かかった。腎組織を $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  600pg/mlの添加培地と無添加培地で培養した後、0.1pg/mlのPTHと反応させると、添加培地での周期は6分となり無添加培地での14分より短かくなった。 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の基礎値上昇に対する作用および周期短縮に対する作用は共にcycloheximide  $35\mu\text{M}$ の添加により完全に抑制した。

### 2. vitamin D 補充動物における実験

慢性的にvitamin Dを補充した動物の腎組織を維持培養後にPTHと反応させると、G6PD活性は初期下降をもって始まる波状変化を示し、その周期はPTH濃度の高いものほど短かかった。vitamin  $\text{D}_3$  100 $\mu\text{g}$  または500 $\mu\text{g}$ を培養開始の50時間前に腹腔内に注入すると、G6PD活性基礎値は対象群と比べて有意に上昇した。次に、これら急性vitamin D補充動物の腎組織を培養後0.1pg/mlのPTHと反応させると、100 $\mu\text{g}$ 補充群は対象群より周期が短かかった。しかし、500 $\mu\text{g}$ 補充群ではPTHはG6PD活性をその基礎値から変化させられなかった。

## 考察

今回の研究において、PTHにより遠位尿管細管細胞でG6PD活性の波状変化が誘発され、その振幅はPTHの濃度、 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の濃度にかかわらず一定であること、さらに、周期はPTH  $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の量を増加させると短縮されることが証明された。このような波状変化は、細胞内の恒常性を保つための迅速なG6PD活性の制御機構が存在していることを示唆する。

$1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ はG6PD活性基礎値を用量依存に上昇させ、PTHによるG6PD活性の波状変化を加速させ、かつ、これらの作用はcycloheximideにより完全に抑制されるということも判明した。このことから推論できることは、 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ が蛋白合成を介して活性型G6PD自体の量を変化させることにより働くのか、もしくは、間接的にvitamin D-dependent calcium binding pro-

tein などの他の蛋白合成を介して G 6 P D 活性を変化させることにより働くのかということである。

動物に vitamin D を補充することによっても *in vitro* において維持培養中に  $1,25-(OH)_2 D_3$  を添加したと同様のことが証明された。このことから、PTH の cytochemical bioassay に vitamin D 補充動物を使うことは、G 6 P D 活性基礎値を上昇させ、G 6 P D 活性の変化速度を加速させるためには好ましくなく、むしろ、vitamin D 欠乏状態のほうが望ましい。図 1 は、わかりやすく図式化したものであるが、図中 A のような用量反応曲線が得られることが望ましい。

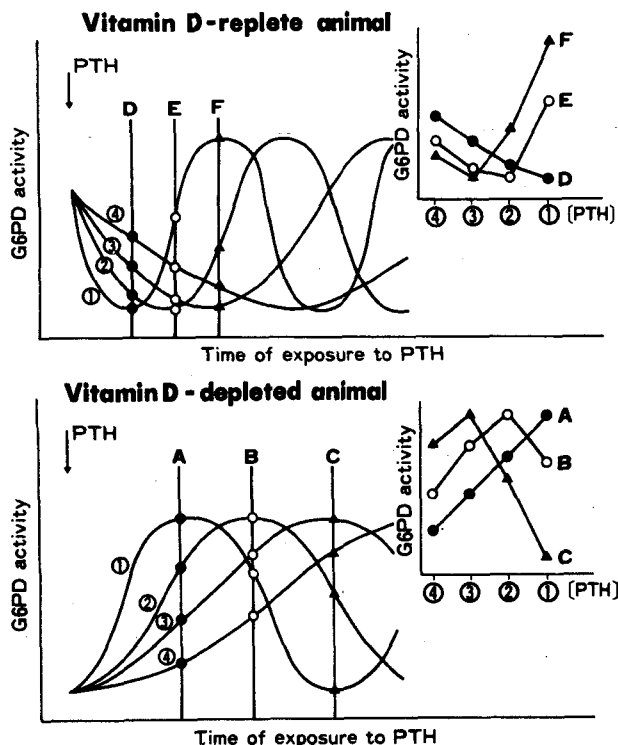


Fig. 1 Theoretical concept of the kinetics of G6PD activity elicited by PTH in vitamin D-depleted and -replete animals. The kidney segments may be exposed to PTH for time A, B, C, D, E or F. The number (1)-(4) represent different concentrations of PTH, (1) being the highest concentration and (4) the lowest. In the vitamin D-depleted animal, the cyclic changes of G6PD activity begin with an initial increase, and the higher the concentration of PTH, the shorter the cycle length. In the vitamin D-replete animal, the cyclic changes begin with an initial decrease, and the higher the concentration the shorter the cycle length. In both vitamin D-depleted and -replete animals, the amplitudes of the changes of G6PD activity are similar in the same animal regardless of the concentrations of PTH. The segments exposed for time A, B, C, D, E and F produce the dose-response curves A, B, C, D, E and F respectively.

## 論文審査の結果の要旨

副甲状腺ホルモンと $1,25(\text{OH})_2$  ビタミンD の関係はユニークであり、T度下垂体のACTHやTSHが副腎皮質ホルモンや甲状腺ホルモンの分泌を刺激する様に副甲状腺ホルモンが腎の近位尿細管で $25(\text{OH})$  ビタミンDの1位水酸化による $1,25(\text{OH})_2$  ビタミンDの合成を刺激し、この点では副甲状腺ホルモンは $1,25(\text{OH})_2$  ビタミンDの上位ホルモンであるが、同時に標的器官である骨の骨芽細胞ではこの二つのホルモンは共に受容体をもち、協同してその作用を示し、副甲状腺ホルモンが全身的に作用するホルモンとして急速に働らくのに対して $1,25(\text{OH})_2$  ビタミンD は局所ホルモンとして副甲状腺ホルモンが作用する条件をつくるのに必要でありその作用は比較的小さいとされている。しかしながら副甲状腺ホルモンのもう一つの主要な標的器官である腎での両者の相互作用については不明の点が多い。副甲状腺ホルモンの腎に対する作用は近位尿細管における $1,25(\text{OH})_2$  ビタミンD合成の促進とともに磷再吸収の抑制、更に主として遠位尿細管におけるカルシウム再吸収の促進が主である。Chayen, Bitensky等によって定量的細胞化学的方法により通常のラジオイムノアッセイの1000分の1のきわめて微量の副甲状腺ホルモンをモルモット腎遠位尿細管曲部の細胞のグルコース6 磷酸脱水素酵素(G6PD)を増加させる作用を指標として測定するサイトケミカルバイオアッセイの方法が開発されたので本研究者は6ヶ月間ロンドンのケネディリウマチ研究でChayen教授からその技術を学び本邦で唯一人この副甲状腺ホルモンの測定法を実用化しているが同時にこの方法を用いて遠位尿細管曲部の細胞に対する副甲状腺ホルモンと $1,25(\text{OH})_2$  ビタミンDの相互作用について次の様な研究を行った。

ビタミンD 欠乏又は充足状態で飼育したモルモットの腎を摘出し被膜を除いた後、一辺8 mm以下の16切片を切り出しTrowell T 8培養液中で $37^\circ\text{C}$  95%  $\text{O}_2$  5%  $\text{CO}_2$ 下で5時間維持培養し、培養液を交換して8分間種々の濃度の副甲状腺ホルモンを含んだ培養液を加えて反応させた後 $-70^\circ\text{C}$ のn-ヘキサン中で冷却して反応を止め同時に切片を凍結した。cryostatで $16\mu\text{m}$ の切片を切り出し5mMのグルコース6 磷酸、3mM NADP、0.67mM フェナジン、メトサルフェート、5mMネオテトラゾリウムクロライド10mM KCNと反応させて遠位尿細管細胞中に沈着したフォルマザンの量をVickers M85スキヤニング、インテグレイティングマイクロデントメーターによって585 nmの波長光で測定しG6PD活性を求めた。

ビタミンD 欠乏動物では0.01から1 pg/mlの副甲状腺ホルモンに反応してG6PD活性は一旦増加後に減少する波状変化を示し、その周期は高濃度の副甲状腺ホルモンが存在する程短いが振幅即ち最大酵素活性は一定であった。即ちChayen等の原法はこの様な周期的変化の一部だけをみたものであることが明らかになった。培養液にあらかじめ $1,25(\text{OH})_2$  ビタミンDを加えておくとこの波状変化の位相の移動がおり高い基礎値からの減少によって始まる変化が見られた。又ビタミンDを充足させた状態で飼育したモルモットの腎で同様に実験を行っても同じく高い基礎値からの減少が始まりその後の周期的変化は同様であった。即ちモルモットの遠位尿細管曲部の細胞において $1,25(\text{OH})_2$  ビタミンDはG6PD活性の基礎値を調節し、又副甲状腺ホルモンはG6PD活性の波状変化の

周期を変化させることにより両ホルモンが協同作用することが従来の無細胞系におけるものとことなる定量的細胞化学的方法に証明され限られた細胞の中での基質その他の調節因子の供給の制限がこの様な波状変化を起すのではないかと推定された。

以上、本研究者は従来殆ど行われなかった定量的細胞化学の方法により副甲状腺ホルモンとビタミンDの腎遠位尿管曲部における相互作用について研究し、新しい知見を得たものであって医学博士の学位を得る資格があると考えられる。