



Effects of human PTH-related peptide and human PTH on cyclic AMP production and cytosolic free calcium in an osteoblastic cell clone

山田, 元

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-04-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0922

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000922>

※ 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) 山田 元 (富山県)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博い第694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 平成2年3月31日

学位論文題目 Effects of human PTH-related peptide and human PTH
on cyclic AMP production and cytosolic free calcium
in an osteoblastic cell clone
(ヒトPTH関連蛋白及びヒトPTHの骨芽細胞株における
cAMP産生と細胞内遊離カルシウムに及ぼす影響)

審査委員 主査 教授 藤田拓男

教授 岡田安弘 教授 高井義美

論文内容の要旨

I. 緒言

ヒトRTH関連蛋白は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症を合併した肺癌患者の癌細胞培養上清より分離されたペプチドであり癌患者に合併する高カルシウム血症の原因物質の一つと考えられている。最近その141個のアミノ酸配列が決定され、そのアミノ酸配列はヒトPTHと類似しており、特にN端13個のアミノ酸のうち8個までが同一である。従って両者はその標的細胞において同一の受容体に結合すると考えられ、現実に骨肉腫由来骨芽細胞株で、同様にcAMP産生を刺激することが報告されている。しかし近年、cBMP系以外にホルモンの細胞内情報伝達系として、細胞内遊離カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$) が重視されており、骨芽細胞においても、cAMP以外に細胞内カルシウムが細胞機能に影響を及ぼしていることが報告されてきた。さらに最近、骨肉腫由来骨芽細胞株においてPTHが直接 $[Ca^{2+}]_i$ を増加させるという報告も見られるようになった。そこで私共はマウス頭蓋骨由来の非腫瘍性骨芽細胞株MC 3 T 3-E 1細胞を用いてヒトPTH関連蛋白が骨芽細胞の細胞内情報伝達系に如何なる作用を及ぼすかという点につき検討しヒトPTHの作小と比較した。

II. 実験方法

細胞培養

PTHに対する反応性、1石灰化能、アルカリリフォスファターゼ活性、コラーゲン合成等の骨芽細胞様性格を持つMC 3 T 3-E 1細胞を10%血清を含む α MEM培養液にて培養した。また、 $[Ca^{2+}]_i$ 測定にはマイクロシャリヤー上に培養した細胞を用いた。各実験には上記培養7日目の細胞を用いた。

cAMP産生

2 cm²のculture dishに培養した細胞を1 mMのiso-buty1-methy xanthineを含む無血清α MEMに交換し、刺激物質を添加、一定時間後の細胞内cAMP濃度をradioimmunoassayにて測定した。尚マイクロキャリアー上に培養した細胞も同様にして細胞内cAMP濃度を測定した。

細胞内遊離カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$) 濃度の測定

マイクロキャリアー上に培養した細胞の培養液をKrebs Ringer Bicarbonate Glucose Solutionに交換後10 μMのFura-AMを30分間負荷した後、刺激物質添加前後で蛍光波長500nmにて励起波長350nm及び385nmの蛍光強度を測定した。 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度は両者によるTsienの式を用いて算出した。

III. 結 果

- 1) cAMP産生能についてはhPTH1-34, hPTHRP1-34, Tyr⁴⁰ hPTHRP1-40の間で経時変化、1容量依存性、共に差は認められなかった。上記の結果はculture dishに培養した細胞でもマイクロキャリアー上に培養した細胞でも同様であった。
- 2) 細胞外液カルシウム濃度1.5mMの条件下でhPTH4-34 (2.5×10^{-7} M) は本細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を数秒の間に102から144nMまで上昇させた。
- 3) $[Ca^{2+}]_i$ 增加作用についてはhPTH1-34が1.3 μMまでの濃度にて $[Ca^{2+}]_i$ を容量依存性に増加させたのに対しhPTH-34, Tyr⁴⁰ hPTH1-40はいずれも若干の増加傾向はあるものの1.3 μMまでの刺激に対し有意な上昇は見られなかった。
- 4) hPTH1-34の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は細胞外液カルシウム濃度を100 μMのEGTAでキレートした条件下では認められなかった。
- 5) dibutyryl cAMPは1mM刺激でも有意な $[Ca^{2+}]_i$ 加昇をもたらさなかった。

IV. 考 察

cAMP産生に関する他の報告及び私共の実験結果からhPTHとhPTHRPとは骨芽細胞においてadenylate cyclase-cAMP系に関する受容体を共有している可能性が強いと考えられた。また、1hPTHRのアミノ酸配列のうち35-4, 番までの部分はcAMP系刺激にとって重要ではないと思われた。一方、本実験結果並びに他の報告よりPTHは骨芽細胞において、二つの細胞内情報伝達系 (cAMP系, $[Ca^{2+}]_i$ 系) を刺激する可能性が示唆された。さらに、本細胞におけるhPTHによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は主として、細胞外液からのCa²⁺流入によると考えられ、cAMP系の刺激とは関係が少ないとと思われた。

近年、骨芽細胞においてcAMP系と $[Ca^{2+}]_i$ 系のそれぞれに関連する二種類のPTH受容体の存在が提唱されているが、1本実験におけるhPTHとhPTHRPの作用の差はMC3T3-E1にもPTH受容体が二種類あり、hPTHRPは $[Ca^{2+}]_i$ に関連する受容体に対する親和性が低いことも考えられる。また、 $[Ca^{2+}]_i$ は、Ca²⁺の流入の流出機構の総和で決定されhPTHRP

は Ca^{2+} 流出機構刺激作用がhPTHより強い可能性も考えられた。

本実験からhPTHとhPThrPはMC3T3-E1において、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 系刺激作用に差が認められなかった。両者によってもたらされる骨芽細胞機能のある可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒトPTH関連蛋白は、長年さがし求められてきた扁平上皮癌由来の高カルシウム血症の原因物質として肺癌細胞系から分離同定された161ヶのアミノ酸から成る蛋白であり、PTHと同様の骨吸収促進及び尿中燐排泄促進作用があり、PTHと同じ骨芽細胞における受容体に作用するとされているが骨に対する作用はいくつかの相違点があり、TPHは骨吸収とともに骨形我をも促進するがPTHrPは骨吸収のみを促進するともいわれるが、一定の結論が得られていない。発生学的により古く、胎児のカルシウム代謝を調節すると考えられるPThrPの作用機序を明らかにすることは、骨の発生と発育の機序を明らかにし、個体と細胞の環境におけるカルシウムの役割を考える上からも、きわめて重要な意義を有する。そこで本研究者はPTHの受容体を有する骨芽細胞系MC3T3-E1を用いPTH(1-34)とPThrP(1-40)の作用の差を検討した。

正常マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞であるMC3T3-E1細胞を37°で5%CO²95%O²気流下に維持し、IBMXを加えたα-MEMで培養し、ヒトPTH又はTHrPを加えた後、一定時間後10%トリクロロ酢酸を加えて反応を終結させラジオイムアッセイで細胞内サイクリックAMP活性を測定した。又10⁶個以上の細胞をクレプス・リンガー、重曹、ブドウ糖液に浮遊させ、Fura IIによる蛍光法によって細胞内遊離カルシウムを測定した。ヒトPTH 1-34とヒトPThrP 1-40は骨芽細胞系MC3T3-E1のサイリックスAMP含量を全く等力価で上昇させたが、10⁻⁶-10⁻⁷モルのPTH 1-3は細胞遊離カルシウムを有意に増加させたのに比でて、等モルのPThrP 1-40は細胞内遊離カルシウムを有意に上昇させなかった。すなわちPTHとPThrPは同じ受容体に作用し同様にサイクリックAMPを上昇させながら細胞内遊離徹については、明らかに両者の作用の間に解離をみとめた。この様な差が、二つの受容体の存在によるか、又は受容体以後の情報伝達の差による細胞内のカルシウム動態の違いによるかはあきらかではないが、この様な細胞レベルでの作用機序の違いが器官レベルの骨吸収と形成に対する作用の差をもたらしている可能性がある。

以上本研究者は、従来殆ど知られていないPTHとPThrPの骨作用の相違の機序を培養骨芽細胞において詳細に研究し、新しい知見を得たものであり、価値ある集積と考えられる。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると考えられる。