



## Phorbol ester stimulates calcitonin secretion synergistically with A23187, and additively with dibutyryl cyclic AMP in a rat c-cell line

菱川, 留王

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-03-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1023

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001023>

※ 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) ひし かわ る おう  
菱 川 留 王 (兵庫県)

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医博ろ第 882号

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の日付 昭和61年3月12日

学位論文題目 PHORBOL ESTER STIMULATES CALCITONIN  
SECRETION SYNERGISTICALLY WITH A23187,  
AND ADDITIVELY WITH DIBUTYRYL  
CYCLIC AMP IN A RAT C-CELL LINE  
(フォルボール エステルのラット甲状腺C細胞における  
カルチトニンの分泌刺激効果—A23187及びDibutyryl  
cyclic AMPとの併用効果—)

審査委員 主査 教授 藤田拓男  
教授 望月眞人 教授 西塚泰美

### 論文内容の要旨

#### ＜緒言及び目的＞

西塚らにより発見された  $\text{Ca}^{++}$  - activated, phospholipid-dependent protein kinase (以下 protein kinase Cと略す) は生体内に広く分布し、細胞内での情報伝達系に重要な役割を果たしていることが知られつつある。いくつかのホルモンの分泌に関して、protein kinase Cの関与が報告されている。また phorbol ester の一つである 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (以下 TPAと略す) は強力な発癌促進因子として知られているが、種々の内分泌細胞にたいしてホルモン分泌刺激作用を持つことが知られており、この作用機序の一つに protein kinase C系への関与が想定されている。即ち、protein kinase Cは phosphoinositide turnover の結果生ずる diacylglycerol により活性化されるが、TPAは diacylglycerol の代替物としてこの kinase の活性化を惹起すると考えられている。さらにその作用は calcium ionophore により細胞内のカルシウム濃度を上昇させることにより相乗的に増強されることが見出されている。

カルチトニンは甲状腺のC細胞より分泌されるホルモンで、生体内のカルシウムの調節に parathyroid hormone や vitamin Dなどと並んで重要な働きを持っているが、その細胞内での分泌調節機構については未だ報告がない。そこで本研究においてカルチトニンの分泌機構における protein kinase Cの役割を調べるため、カルチトニン産生能を有するラット甲状腺髓様癌樹立細胞株を用いて phorbol-

ester 及び diacylglycerol のホルモン分泌への効果を検討した。

#### 〈方 法〉

ラット甲状腺臓様癌細胞 rMTC 6-23は15%馬血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium にてCO<sub>2</sub>インキュベーター内で単層培養、維持した。分泌実験は confluent に達した細胞を15分の preincubation の後、リン酸緩衝液で洗浄し、各種試薬 (TPA, diacylglycerol, calcium ionophore, dibutyryl cyclic AMP) を含む Ham's F12 medium (Ca<sup>++</sup> 1.0 mM) にて incubation を行い一定時間後に medium を採取し、そのカルチトニン濃度をラジオイムノアッセイ法にて測定した。

#### 〈結 果〉

32nMのTPA, 250nMの calcium ionophore (A23187) 及び両者の同時投与時のカルチトニン分泌の時間経過を90分まで調べると、TPAはA23187に比べて分泌促進効果は緩徐な傾向を示し、両者の同時投与では60分及び90分で著しい分泌亢進がみられた。

各種濃度のTPAと60分間 incubation した場合には、TPAは16nMより有意なカルチトニン分泌刺激作用を有し、160nMまで明らかな濃度依存性を示して分泌増加作用が認められた。250nMのA23187とTPAの同時投与ではTPAの各濃度 (16nM~160nM) で相乗的効果が認められた。さらにその他の phorbol ester のカルチトニン分泌への影響を調べると、protein kinase C活性化能を有さない 4  $\alpha$ -phorbol-12, 13-didecanoate では分泌刺激効果を認めなかったのに対し、一方この kinase 活性化能を有する 4  $\beta$ -phorbol-12, 13-didecanoate では有意な分泌亢進を認めた。

次に合成 diacylglycerol である 1-oleoyl-2-acetyl glycerol (以下OAGと略す) のカルチトニン分泌への効果を調べた。OAGは10  $\mu$ g/mlの濃度から分泌促進傾向を示し、25  $\mu$ g/mlで対照に比し有意な分泌増加を示し、50  $\mu$ g/mlでさらにその効果は増大した。OAGとA23187の同時投与では、TPAと同様に相乗的な分泌促進効果が認められた。

最後に phorbol ester と cyclic AMP系との関連を調べるため、TPAと dibutyryl cyclic AMPを同時投与した所、相加的なカルチトニンの分泌増加が認められた。

#### 〈考 案〉

TPAのカルチトニン分泌刺激効果は16nMという比較的低濃度で認められ、かつその効果は calcium ionophore により相乗的に増強された。これは血小板からのセロトニン放出反応と類似した現象と考えられる。即ち、TPAは protein kinase Cに、A23187は細胞内カルシウム動員に働き両者の協同により細胞機能が充分に発揮されるという説に合致するものであり、同様の反応はアルドステロン、インスリン、カテコラミン等の分泌でも見出されている。また 4  $\alpha$ -phorbol-12, 13-didecanoate で認められなかったカルチトニン分泌刺激作用が 4  $\beta$ -phorbol-12, 13-didecanoate で認められたことは、TPAの作用が protein kinase Cの活性化を介したものであることを示唆する所見と

考えられる。さらにTPAと同様に合成 diacylglycerol であるOAGがA23187と相乗的な分泌亢進を示したことはカルチトニン分泌に対する protein kinase Cの関与を裏付けるものと思われる。またTPAのカルチトニン分泌に対する効果は dibutyryl cyclic AMPにより相乗的に増加したことより、TPAの作用は cyclic AMP系以外の経路を介して働くことを意味するものと考えられる。

従来よりカルチトニン分泌に関しては、細胞外カルシウムの上昇が重要な刺激の一つであることが知られているが、私共は電位依存性カルシウムチャンネルを介する細胞内へのカルシウム流入及びそれに伴う細胞質の遊離カルシウム濃度の上昇がカルチトニン分泌を促進させることを報告した（参考論文参照）。さらに本論文では新たに protein kinase Cがこのホルモン分泌機構に果たす役割の可能性につき述べた。

### 論文審査の結果の要旨

カルシウム調節ホルモンは個体レベル及び細胞レベルにおいてカルシウム代謝を調節するとともに又カルシウムによる調節を受けるホルモンであるが、その中でも最もよく知られている副甲状腺ホルモンは細胞外液及び副甲状腺主細胞の細胞内液のカルシウム濃度の減少によって分泌が増加し、逆にカルチトニンは細胞外液及び甲状腺C細胞の細胞内液のカルシウム濃度の増加によって分泌が増加すると考えられており、これらのホルモンの分泌機序の研究は個体レベル及び細胞レベルでのカルシウムの役割りの接点を明確にしたものとして重要である。本研究者はカルチトニンの分泌細胞であるラットの甲状腺C細胞を用いて細胞内カルシウム濃度を変化させるか、又はこれに反応するフォルボールエステル、A23187及びサイクリックAMPのカルチトニンの分泌に対する効果を検討した。

ラット甲状腺髓様癌C細胞 2 MTC 6 -23をダルベッコ modified essential medium に15%馬血清を加えた培地で 5%CO<sub>2</sub>95%空気下で培養し、単層を形成させ、試験物質又は溶媒のみを加えて60分放置の後培養液をあつめ、ヒトカルチトニンに対する抗体を用いてラジオイムノアッセイを行った。ラットカルチトニンとの完全な交叉反応性がみられた。

既知の細胞外液のカルシウム增加のカルチトニン分泌促進効果の他に、4  $\beta$ -phorbol-12, 13-didecanoate (TPA) 及びA23187カルシウムイオノフォアは甲状腺C細胞のカルチトニン分泌を促進したが、TPAの効果の方がより持続的であった。TPAの効果はA23187を同時に加えると著明に増強され、250nMのA23187によってコントロールの130%のカルチトニンの分泌がみられ、32nMのTPAでは160%であったが、両者同時に加えると260%で個々の物質の効果の和を越えていた。C-kinase を活性化する 4  $\beta$ -phorbol-12, 13-didecanoate のカルチトニン分泌促進効果と比べて 4  $\alpha$ -phorbol-12, 13-didecanoate は150nMの濃度でもカルチトニンの分泌を亢進させることはなかった。合成ジアシルグリセロールであるOAGもA23187との間にカルチトニン分泌促進の相乗効果を示した。A-kinase との関係をしらべるために dibutyryl cyclic AMPの効果を検討したが、200  $\mu$ Mでカルチトニンの分泌をコントロールの141%まで増加させた。TPAと dibutyryl cyclic AMPを同時に加えた所、TPAの効果に対して相加的なカルチトニン分泌促進効果がみとめられ

た。このことはTPAによって刺激されるC-kinase 系と cyclic AMPによって活性化される。A-kinase 系は独立した別個の機序によってカルチトニンの分泌を促進することを示唆し、プロラクチンも成長ホルモンと同様の機序が考えられた。

以上本研究者は従来殆ど行われなかった甲状腺C細胞のカルチトニン分泌の生化学的機序について研究し、新しい知見を得たものであり、価値ある集積とみとめられる。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。