活性アミンのラット下垂体前葉 cAMP 含量に及ぼす影響

大阪大学医学部第3内科

・ 現. 日生病院内分泌内科

・ 富山医科薬科大学

花 崎 信 夫, 植 村 泰 三,* 野 間 啓 造
中 尾 皖 英, 矢 野 三 郎,** 山 村 雄 一

Effect of Biogenic Amines on Rat Anterior Pituitary cyclic AMP

**Nobuo HANASAKI, Taizo UEMURA, Keizo NOMA, Kanei NAKAO,
Saburo YANO and Yuichi YAMAMURA**

Third Department of Internal Medicine,
School of Medicine, Osaka University
Osaka, Japan

(Director: Professor Yuichi Yamamura)

The effects of biogenic amines on the formation of adenosine-3', 5' monophosphate (cAMP) in the anterior pituitary of rats were investigated. Pituitary halves were pre-incubated in a Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) containing theophylline (10^{-2} M) at 37°C for 30 minutes and incubated in a fresh buffer for 15 minutes after the addition of test substances. Noradrenaline at 4×10^{-4} M and serotonin at 3.3×10^{-4} M were effective in elevating cAMP, but dopamine at 2×10^{-4} M was ineffective. The β adrenergic blocking agent, propranolol, effectively antagonized the cAMP response to noradrenaline, but the α adrenergic blocking agent, phentolamine, did not. The serotonin antagonist, methysergide, remarkably antagonized the cAMP response to serotonin, but the α and β adrenergic agents did not.

緒 言

現在, 視床下部抽出物²⁹⁾や, 個々の視床下部下垂体ホルモン放出因子Thyrotropin releasing hormone (TRH)¹²⁾, Lutenizing hormone releasing hormone (LHRH)^{1) 7)}, Growth hormone releasing hormone (GHRH)^{19) 2)}が下垂体cAMP含量を上昇させることが知られている。また, in vitroにおいてtheophylline^{26) 34) 22) 13)}, dibutyryl cAMP^{19) 13) 5) 11) 12)}, prostaglandin^{19) 14)}などによって直接下垂体前葉より各種ホルモンが放出される。以上のことより各種下垂体前葉ホルモンは, adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) をsecond messengerとして放出されると考えられている。活性アミンは一般に, 視床下部を介して下垂体ホルモンの分泌に関与する⁴⁾とみなされているが, 下垂体への直接作用も報告^{27) 35)}されている。

そこで本実験では、活性アミンが下垂体前葉ホルモン放出因子のsecond messengerと考えられる下垂体cAMP含量に直接影響を及ぼすかどうかを検討した。

実験材料および方法

体重150~250grのSprague-Dawley系ラットの雄をpituitary donorとして使用した。断頭屠殺を午前10時より12時の間に行い、屠殺後30秒以内に下垂体前葉を摘出し、0.2% glucoseを加えたKrebs-Ringer bicarbonate buffer (KRBG) にて洗浄後、下垂体を正中線で左右両葉に切断し、一方を対照群、他方を添加群とした。phosphodiesterase inhibitorであるtheophylline 10^{-2} Mを加えたKRBG (KRBGT) 2mlで30分間37℃, 95%O₂, 5%CO₂気相下で、組織内cAMP含量を一定化するため preincubationを行なった。preincubation後組織切片を2mlのKRBGT又はtest materialを含むKRBGTに移しかえ、アミンの酸化を防ぐためVit.C 1mg/mlを加えて同様条件下でさらに15分間のincubationを行なった。Incubation終了後、下垂体を直ちにドライアイスアセトンにて凍結し、6% TCAでhomogenizeした遠沈上清を水飽和エーテルで数回洗浄後、45℃で残留エーテルを除去したものを減圧乾燥してcAMPの測定に供した。cAMPの測定にはKumonらの手法⁹⁾でラット肝臓より得たbinding proteinを用いたcompetitive protein binding assay法又はSteinerの方法²⁰⁾に準じたradioimmunoassay法にて測定した。6% TCAでhomogenizeした遠沈沈査を1N NaOHでdigestして、蛋白量をLowryらの方法で測定した。cAMP含量nanomoleを1grあたりの組織蛋白量であらわした値を算出し、夫々に対応した対照群の百分率で表現した。推計学的検討はpaired t testによった。

使用薬剤の提供者及び購入先は以下の通りである。

noradrenaline (NA): Fluka, serotonin (5 HT): 半井化学, dopamine (DA): 半井化学, phentolamine: CIBA, propranolol: 化友化学, methysergide: Sandoz, adenosine 3', 5' - monophosphate (cAMP): Sigma, 視床下部抽出物 (H.E.): NIAMDD, ³HcAMP (27Ci/mMol): Amersham.

Fig. 1. Correlation between protein binding assay method and radioimmunoassay method.

Fig. 2. Standard curve of cycle AMP and sample dilution curve.

成 績

図1は同一試料をprotein binding assay法とradioimmunoassay法にて測定した時の相関を示した。 $r = 0.972$ と良い相関を認めた。

図2にbinding assay法時のstandard curveを示した。freeとbound型の分離にはmembrane filter (pore size 0.45μ) 又は0.5%charcoalを用いた。bound型はcAMP freeで35%程度に、cAMP 10 pMol/tubeで10%程度となった。sampleのdilution curveとstandard curveとの間には平行性が認められた。cAMP 1 pMol/tubeより10pMol/tubeの間において行なった interassay variationは10.6%, intraassay variationは6.3%であった。

表1はbinding assay法時のrecoveryを示したもので94~120%と満足すべき値をえた。

表2は、視床下部抽出物(H.E.)並びに各種アミン添加によるcAMP含量の変化を示したものである。H.E.は0.5, 1 H.E.とも有意の上昇を認めた。noradrenaline (NA) $4 \times 10^{-5}M$ では有意差は認めないが $4 \times 10^{-4}M$ にて下垂体蛋白1grあたり82nMolが添加群では240nMolへと有意の上昇を示し、さらにserotonin (5HT) $3.3 \times 10^{-4}M$ にて下垂体蛋白1grあたり78nMolが添加群では102nMolへと有意の上昇を認めた。しかしdopamine (DA) $2 \times 10^{-4}M$ においては変化を認めなかった。

アミン添加による変化の特異性を検討するため各種blockerの影響を調べた。まず、 α -blocker, phentolamine 100 $\mu g/ml$, β -blocker, propranolol 100 $\mu g/ml$, serotonin拮抗剤methysergide 50, 500 $\mu g/ml$ 等単独の影響を検討したものが表3である。methysergide 500 $\mu g/ml$ 以外は有意の影響を認めなかった。次に対照群、添加群ともにアミンを加え、添加群にはさらにblockerを加えて、blockerの併用効果を検討した。NA $4 \times 10^{-4}M$ に α -blocker併用では影響を認めなかったが、 β -blockerの併用にてNA単独群の73%と有意の低下を示した。5HT $3.3 \times 10^{-4}M$ に α -blocker, β -blockerの併用では特に影響を認めなかったが、5HT拮抗剤methysergideの併用では50 $\mu g/ml$ で77%, 500 $\mu g/ml$ では39%と5HT単独添加群と比較して著明な低下を示した。

Table 1. Adenosine-3',5'-monophosphate recovery added to the extract of rat anterior pituitary.

	cAMP measured pMol	cAMP recovered pMol	Recovery %
Anterior pituitary	1.51		
+cAMP 1 pMol	2.59	1.08	108
+cAMP 5 pMol	7.2	4.69	93.8
+cAMP 10 pMol	12.4	11.89	118.9
Anterior pituitary	1.72		
+cAMP 1 pMol	2.92	1.21	121
+cAMP 5 pMol	7.2	5.49	109.8
+cAMP 10 pMol	12.5	10.79	107.9
Anterior pituitary	15.4		
+cAMP 1 pMol	16.5	1.1	110
+cAMP 5 pMol	20.2	4.8	96
+cAMP 10 pMol	25.2	9.8	98

Table 2. Effects of hypothalamic extract and biogenic amines on the formation of adenosine-3',5'-monophosphate in rat anterior pituitary *in vitro*.

Group	Dose	cAMP formation nMol/gr.protein	
control		83.8 ± 16.0 (7)	
H.E.	$\frac{1}{2}$	349.2 ± 50.7 (7)	P<0.01
control		84.6 ± 8.0 (7)	
H.E.	1	744.9 ± 68.2 (7)	P<0.001
control		102.8 ± 7.9 (10)	
Noradrenaline	4 x 10 ⁻⁵ M	140.0 ± 13.0 (10)	N.S.
control		82.3 ± 10.8 (6)	
Noradrenaline	4 x 10 ⁻⁴ M	239.6 ± 40.5 (6)	P<0.01
control		88.3 ± 6.9 (9)	
Serotonin	3.3x10 ⁻⁵ M	116.4 ± 15.6 (9)	N.S.
control		77.8 ± 8.5 (7)	
Serotonin	3.3x10 ⁻⁴ M	102.1 ± 7.3 (7)	P<0.01
control		99.6 ± 10.6 (8)	
Dopamine	2 x 10 ⁻⁴ M	96.3 ± 10.2 (8)	N.S.

Mean ± SEM (No.)

Table 3. Effects of phentolamine, propranolol and methysergide on the formation of cAMP in rat anterior pituitary *in vitro*.

Group	Dose μg/ml	cAMP formation % of paired control	
Phentolamine	100	106.8 ± 10.6 (3)	N.S.
Propranolol	100	117.0 ± 10.6 (4)	N.S.
Methysergide	50	91.4 ± 19.6 (7)	N.S.
Methysergide	500	79.7 ± 4.1 (11)	P<0.01

Mean ± SEM (No.)

Table 4. Influences of alpha and beta adrenergic blockers and serotonin antagonist on the effects of serotonin and noradrenaline.

Biogenic amines		blocker or antagonist μg/ml		cAMP formation % of paired control		
Noradrenaline	$4 \times 10^{-4}M$	phentolamine	100	88.7 ± 4.7	(7)	N.S.
Noradrenaline	$4 \times 10^{-4}M$	propranolol	100	72.5 ± 9.5	(7)	$P < 0.03$
Serotonin	$3.3 \times 10^{-4}M$	phentolamine	100	100.5 ± 19.0	(3)	N.S.
Serotonin	$3.3 \times 10^{-4}M$	propranolol	100	152.5 ± 23.4	(6)	N.S.
Serotonin	$3.3 \times 10^{-4}M$	methysergide	50	77.0 ± 5.5	(7)	$P < 0.01$
Serotonin	$3.3 \times 10^{-4}M$	methysergide	500	39.1 ± 8.1	(6)	$P < 0.001$

Mean $\pm$ SEM (No.)

考 察

一般に組織のcAMP含量をbinding assay法にて測定する場合Dowex columnを通す等の操作が必要であるとされるがラット下垂体においてはradioimmunoassayと満足すべき相関（図1），十分なrecovery（表1）sampleのdilution curveのstandard curveとの平行性（図2）等のことにより血液・尿と同様に定量反応の阻害物質がほとんど抽出されてこないので，必ずしもpurificationする必要がないものと考えられる。

cAMPが視床下部下垂体ホルモン放出因子が下垂体前葉に働き各種ホルモンを分泌するsecond messengerであると考えられる理由は以下の通りである。第1に，個々の視床下部下垂体ホルモン放出因子TRH¹²⁾，LHRH¹⁾⁷⁾，GHRH²⁾¹⁹⁾は下垂体前葉cAMP含量を上昇せしめ，各々TSH，LH，GH等を放出する。

第2にcyclic nucleotideのphosphodiesterase inhibitorであるtheophyllineによってGH¹⁹⁾²⁶⁾³⁴⁾，TSH³⁴⁾，ACTH⁵⁾，LH²²⁾，PrL¹³⁾¹⁸⁾がin vitroにおいて直接下垂体より放出される。第3にcAMPよりも細胞膜の透過性に富み，phosphodiesteraseにて分解されにくいdidutyryl cAMPにても下垂体より直接GH¹⁰⁾¹³⁾¹⁹⁾，TSH³⁶⁾，ACTH⁵⁾，LH¹¹⁾²²⁾，FSH¹¹⁾，PrL³⁾¹³⁾が分泌される。なかにはLH，FSH，PrLにおいてはGHほど影響を認めない³⁾³³⁾といった報告もある。

第4にadenylate cyclase activatorであるprostaglandin¹⁴⁾¹⁹⁾³⁰⁾³⁷⁾にはcAMP含量を上昇させ，下垂より直接GHの分泌作用を認める等のことがあげられる。

一方，カテコールアミン類は各種臓器においてcAMP含量を上昇させる。特にNAは肝臓・心臓にて組織中cAMP含量を上昇させることによってphosphorylase活性の上昇，inotropic action等をおこし¹⁶⁾，骨格筋，脂肪組織，小腸平滑筋，有核赤血球等においてもcAMP含量の上昇作用を認めている。⁸⁾³²⁾ 5HTについても肝臓においてcAMP含量を上昇させる等の報告がある。¹⁵⁾

視床下部において活性アミンのcAMP含量に及ぼす影響を検討した報告としては，NA，5HT，DAが 10^{-6} ～ $10^{-5}M$ にてcAMP含量を上昇させる²⁵⁾とかNA $10^{-5}M$ にてcAMP含量を上昇させ，5HTは単独で影響はないが α, β -blockerと同様にNAの作用を抑制する¹⁷⁾といった成績がある。

また，下垂体前葉への活性アミンの影響を検討した報告としては，豚下垂体を用いてNA $10^{-5}M$ ，adrenaline (AD) $10^{-6}M$ ，isoproterenol $10^{-6}M$ 以上の濃度にてcAMP含量の上昇を認めているが5HTでは影響を示さないという成績がある。²⁹⁾

in vivoで活性アミンが下垂体ホルモン分泌に影響を与えるという報告は多々あるが，多くはneurotransmitterとして視床下部かそれより中枢側を介して働いている⁴⁾と考えられているが，下垂体への直接作用といった報告も認められる。²⁷⁾³⁵⁾ 下垂体前葉には視床下部と同程度の5HT含量²⁰⁾が同定されカテコールアミンの分解酵素も認められている。²⁴⁾

今回、我々はNA, 5HTは下垂体cAMP含量上昇作用がありそれぞれ β -blocker, 5HT拮抗剤によって抑制されることを報告したが、5HT拮抗剤methysergide単独でも500 μ g/mlにてcAMP含量減少作用を認めたことは、内因性5HTの作用を抑制したためと考えられ、特に5HTに生理的意義のある可能性を示唆するものである。著者等は先にNA 4×10^{-4} M, 5HT 3.3×10^{-4} Mにて有意のACTH放出作用を直接下垂体より認め、NAの作用は β -blockerにて、又、5HTの作用は5HT拮抗剤によって特異的に抑制することを報告⁶⁾したが、cAMP含量の変化と平行していることは興味深い。

結 論

ラット下垂体前葉cAMP含量はin vitroでNA 4×10^{-4} M, 5HT 3.3×10^{-4} Mの添加にて上昇することを認めた。さらに、NAの作用は β -blocker propranololにて抑制され、さらに5HTの作用は5HT拮抗剤methysergideにて特異的に抑制されることを認めた。これらのことは、NA, 5HTは直接下垂体レベルにおいても下垂体ホルモン分泌に影響を与えることを示唆するものである。

cAMPのradioimmunoassayについて岸本忠三先生の御協力に感謝致します。

本研究の一部は第49回日本内分泌学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Borgeat, P., Chavancy, G., Dupont, A., Labrie, F., Arimura, A., and Schally, A.V. Stimulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by synthetic luteinizing hormone-releasing-hormone/follicle-stimulating hormone-releasing hormone (LH-RH/FSH-RH). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:2677-2681, 1972.
- 2) Borgeat, P., Labrie, F., Poirier, G., Chavancy, G., & Schally, A.V. Stimulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by purified growth-hormone-releasing hormone. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 86: 284-299, 1974.
- 3) Cehovic, G., Lewis, V.J., and Vander, L.P., Etude de l'action adenosine-3', 5'-monophosphate-cyclique sur la liberation de l'hormone de croissance et de la prolactine in vitro. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 270: 3119-3122, 1970.
- 4) Donso, A.O., Bishop, W., Fawcett, C.P., Krulich, L. & McCann, S.M.: Effect of drugs that modify brain monoamines concentration on plasma gonadotropin and prolactin levels in the rat. *Endocrinology* 89: 774-784, 1971.
- 5) Fleisher, H., Donald, R.A., and Butcher, R.W. Involvement of adenosine-3', 5'-monophosphate in release of ACTH. *American J. Physiol.* 5: 1287-1291, 1969.
- 7) Kaneko, T., Saito, S., Oka, H., Oda, T., and Yanaihara, N.: Effects of synthetic LH-RH and its analogs on rat anterior pituitary cyclic AMP and LH and FSH release. *Metabolism* 22: 77-78, 1973.
- 8) Klainer, L.M., Chi, Y.M., Freidberg, S.L., Rall, T.W., and Sutherland, E.W.: Adenyl cyclase IV. The effect of neurohormones on the formation of adenosine-3', 5'-monophosphate by preparations from brain and other tissues *J. Biol. Chem.* 237: 1239-1243, 1962.
- 9) Kumon, A., Yamamura, H., and Nishizuka, Y. Mode of action of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate on protein kinase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 1290-1297, 1970.
- 10) Labrie, F., Beraud, G., Gauthier, M., and Lemay, A.: Actinomycin-insensitive stimulation of protein synthesis in rat anterior pituitary in vitro by dibutyryl adenosine-3', 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.*

- 246: 1902–1908, 1971. 11) Labrie, F., Pelletier, G., Lemay, A. and Borgeat, P.: Control of protein synthesis in anterior pituitary gland. Karolinska symposium on research methodology of reproductive endocrinology. 301–340, 1973. 12) Labrie, F., Borgeat, P., Lemay, A., Lemaire, S., Barden, N., Drouin, J., Lemaire, I., Jolicoeur, P., and Balanger, A. Role of cyclic AMP in the action of hypothalamic regulatory hormones. *Advances in cyclic nucleotide research*. 5: 1975. 13) Lemay, A., and Labrie, F. Calcium-dependent stimulation of prolactin release in rat anterior pituitary in vitro by N⁶-monobutyryl adenosine-3', 5'-monophosphate. *FEBS Lett.* 20: 7–10, 1972. 14) MacLeod, R.M., and J.E. Lehmeyer. Release of pituitary growth hormone by prostaglandins and dibutyryl adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate in the absence of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67: 1172–1179, 1970. 15) Mansour, T.E., Sutherland, E.W., Rall, J. W., and Bueding, E. The effect of serotonin on the formation of adenosine-3', 5'-phosphate by tissue particles from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *J. Biol. Chem.* 235: 466–470, 1960. 16) Murad, F., Chi. Y.M., and Sutherland, E.W.: Adenyl cyclase III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine 3', 5'-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. *J. Biol. Chem.* 237: 1233–1238, 1962. 16) 花崎信夫, 植村泰三, 矢野三郎, 山村雄一: 活性アミンのラット下垂体 cAMP 含量と ACTH 分泌に対する影響について, 日内分泌誌, 51, 296, 1975. 17) Palmer, G.C. Sulser, F., and Robison, G.A. Effect of neurohumoral and adrenergic agents on cyclic AMP levels in various areas of the rat brain in vitro. *Neuropharmacology* 12: 327–337, 1973. 18) Parsons, J.A., and Nicoll, C.S. Cations, secretion of prolactin and growth hormone, and PIF action. *Fed. Proc.* 29: 377, 1970. 19) Peake, G.T. The role of cyclic nucleotides in the secretion of pituitary growth hormone. *Frontiers in neuroendocrinology* 173–208, 1973. 20) Piezzi, P.S., Larin, F., and Wurtman, R.J. Serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), and monoamine oxydase in the bovine median eminence and pituitary gland. *Endocrinology* 86: 1460–1462, 1970. 21) Posternak, T.H., Sutherland, E.W., and Henion, W.F. Derivatives of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. *Biochem. biophys. Acta.* 65: 558–560, 1962. 22) Ratner, A., Stimulation of luteinizing hormone release in vitro by dibutyryl-cyclic AMP and theophylline. *Life Sci.* 9: 1221–1226, 1970. 23) Robison, G.A., Butcher, R.W., and Sutherland, E.W.: Cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* 37: 149–174, 1968. 24) Saavedra, J.M., Palkovits, M., Kizer, J.S., Brownstein, M., and Zivin, J.A. Distribution of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland. *J. Neurochem.* 25: 257–260, 1975. 25) Sato, A., Onaya, T., Kotani, M., Harada, A., and Yamada, T. Effect of biogenic amines on the formation of adenosine 3', 5'-monophosphate in porcine cerebral cortex, hypothalamus and anterior pituitary slices. *Endocrinology* 94: 1311–1317, 1974. 26) Schofield, J.G. Measurement of growth hormone released by ox anterior-pituitary slices in vitro. *Biochem. J.* 103: 331–341, 1967. 27) Schneider, H.P.G., and McCann, S. M. Possible role of dopamine as transmitter to promote discharge of LH-releasing factor. *Endocrinology* 85: 121–132, 1969. 28) Steiner, A.L., Kipnis, D.M., Utiger, A.,

- and Parker, C.W.: Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 64: 367-373, 1969.
- 29) Steiner, A.L., Peake, G.T., Utiger, R.D., Karl, I.E., and Kipnis, D.M.: Hypothalamic stimulation of growth hormone and thyrotropin release in vitro and pituitary 3', 5'-adenosine cyclic monophosphate. *Endocrinology* 86: 1354-1360, 1970.
- 30) Sundberg, D.K., Fawcett, C.P., Illner, P., and McCann, S.M.: The effect of various prostaglandins and a prostaglandin synthetase inhibitor on rat anterior pituitary cyclic AMP levels and hormone release in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148: 54-59, 1975.
- 31) Sundberg, D.K., Fawcett, C.P., and McCann, S.M. The involvement of cyclic-3', 5'-AMP in the release of hormones from the anterior pituitary in vitro (39163). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151: 149-154, 1976.
- 32) Sutherland, E.W., and Robison, G.A. Metabolic effects of catecholamines. *Pharmacol. Rev.* 18: 145-161, 1966.
- 33) Tang, L.K.L. and Spies, H.G. Effect of hypothalamic-releasing hormones on LH, FSH, and prolactin in pituitary. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151: 189-192, 1976.
- 34) Wilber, J.F., Peake, G.T., Mariz, I., Utiger, R.D., and Daughaday, W.H. Theophylline and epinephrine effect upon the secretion of growth hormone and thyrotropin in vitro. *Clin. Res.* 16: 277, 1968.
- 35) Wilber, J.F., Peake, G.T., and Utiger, R.D. Cyclic AMP stimulation of pituitary hormone secretion in vitro GH, TSH. *J. Lab. Clin. Med.* 72: 1025, 1968.
- 36) Wilber, J.F., Peake, G.T., and Utiger, R. D. Thyrotropin release in vitro: Stimulation by cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. *Endocrinology* 84: 758-760, 1969.
- 37) Zor, U., Kaneko, T., Schneider, H.P.G., McCann, S.M., and Field, J.B. Further studies of stimulation of anterior pituitary cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate formation by hypothalamic extract and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 245: 2883-2888, 1970.