腎, 肝における副甲状腺ホルモンの分解

和歌山県立医科大学内科

高年病部門

太田 喜一郎, 花野 靖久, 谷本 幸三
船迫 真人, 津田 忠昭, 上江州 朝洋
大畑 雅洋, 藤田 拓男

Degradation of the Parathyroid Hormone in the Kidney and Liver

Kiichiro OTA, Yasuhisa HANANO, Kozo TANIMOTO,
Masato FUNASAKO, Tadaaki TSUDA, Asami UEZU,
Masahiro OHATA and Takou FUJITA

Division of Gerontology, Department of Medicine

Wakayama Medical College

(Director: Prof. Takuo Fujita, M.D.)

The cleavage of the parathyroid hormone has been reported to take place in various peripheral tissues, especially in the kidney and liver. In order to clarify the mechanism of such a degradation, bovine PTH (bPTH 1-84) and its synthetic N-terminal peptide (bPTH 1-34) labelled with ^{125}I by the chromamine-T method (^{125}I -bPTH 1-84) and (^{125}I -bPTH 1-34) or labelled with horseradish peroxidase (Pox- ^{125}I -bPTH 1-84 and Pox- ^{125}I -bPTH 1-34) were used to study the disappearance from the blood stream and degradation and retention in the kidney and liver after intravenous injections in male Wistar rats, weighing approximately 200g. Degradation of PTH was also studied in vitro, using isolated cells and a homogenate of the kidney and liver.

PTH labeled with ^{125}I and Pox was more readily degraded by the kidney than PTH labelled with ^{125}I alone, but the opposite was found in the degradation by the liver. Isolated intact kidney cells degraded PTH less efficiently than the homogenate, but the isolated intact liver cells degraded PTH more efficiently than the homogenate, indicating the prominence of an intracellular mechanism of degradation in the kidney and an extracellular mechanism in the liver.

1, 諸 言

副甲状腺ホルモン (PTH) は副甲状腺内で生合成され一部は直ちに分解され, 他は血中に分泌されるが,

その後末梢組織でも分解されて種々の断片となる。このようなPTHの種々の断片への分解は単なる不要物質の処理ではなく積極的かつ有意義な生理作用の一つであり、生体はこの過程によってPTHの血中濃度や生理作用を調節し、カルシウム代謝を適当な方向に保つと考えられている。このようなPTHの分解は腎、肝その他の組織で行われ、腎では主としてマイクロゾームに存在する水解酵素によって水解されると報告され¹⁾²⁾³⁾、またCanterburyはラット肝灌流系の実験でPTHの標的組織の一つである肝は灌流液中のカルシウム濃度に基づいてPTHの分解能率を変化させ、これによってPTHの生体における作用を調節していることを示した。しかしながらPTHの分解における肝と腎の役割の差についてはほとんど知られていない。われわれは腎、肝におけるPTHの代謝、分解の機序ことにその相違について検索を行うために、高度精製ウシ副甲状腺ホルモン(bPTH 1-84)および合成ウシ副甲状腺ホルモンN末端ペプチド(bPTH 1-34)を¹²⁵I単独または¹²⁵Iおよびhorse radish peroxidase (Pox)で標識し、更に腎および肝のホモジネートの他に遊離細胞浮遊液を作成して細胞内外におけるPTHの分解の機序について研究を行った。

II, 研究材料および方法

A, 標識法

高度精製ウシ副甲状腺ホルモン(bPTH 1-84, Wilson 社)および合成ウシ副甲状腺ホルモンN末端ペプチド(bPTH 1-34, Beckman 社)の各0.25 μ gをchloramin T法で10 μ ciに相当する¹²⁵Iで標識し、更に図1に示すようにPox 5mgで追加標識した。また¹²⁵IおよびPoxによる同時標識の程度を確認するために、標識後Sephadex G-200カラムを使用し、各分画採取液0.2mlに抗PTH(R.D 24, Wellcome 社)の10000倍稀釈抗体0.2mlを加え4℃, 48時間反応させ、更に第二抗体(抗モルモットグロブリン家兔血清)0.2mlと4℃, 48時間反応させた後、3000y.p.m, 10分遠沈し、その沈渣物中の¹²⁵Iおよび図2 Poxで同時に標識されていることを確認し、実験に供した。

The method of PTH labeling with peroxidase
 Horseradish peroxidase(5 mg)+0.3M NaHCO₃ 1ml
 ↓
 + 1% fluoro-dinitrobenzene 0.1ml
 +0.06M sodium peroxidate 1ml
 +0.16M ethylene glycol 1ml
 ↓
 active peroxidase dialysed
 with 0.01M NaHCO₃ Buffer (PH9.5)
 ↓
 3ml of active peroxidase added to 10mCi
 of ¹²⁵I-PTH temperature for 3 hours
 at room. Column gel filtration from using
 sephadexG200, elution with 0.2M Tris HCl
 Buffer(PH8.0) in 0.2 M NaCl
 ↓
 measurement of radioactivity and
 peroxidase in each fractions

Fig. 1.

Fig. 2. Peroxidase Activity of Total and Anti-PTH Antibody-Precipitated ^{125}I -POX-bPTH₁₋₃₄.

B. 生体内における PTH 標識化合物の運命.

Wistar 系雄ラット (200 g) にエーテル麻酔下で大腿静脈から ^{125}I -bPTH 1-84, ^{125}I -Pox-bPTH 1-84, ^{125}I -bPTH 1-34, ^{125}I -Pox-bPTH 1-34 を注射し, 30 分後に頸静脈より採血, 同時に腎, 肝, 脾, 甲状腺, 胸腺を摘出し, 各組織の重量を測定し, 0.25M sucrose で 10% (W/V) に調節を行い, Waring-blender でホモジナイズし, 10% ホモジネートを作製した. 注射後 30 分時の血清および各ホモジネート 1 ml を plastic 試験管に入れ, 放射性を測定し, 測定後 10% トリクロール酢酸 (TCA) 2 ml を添加し, 2500r.p.m., 10 分間遠沈, 上清を捨て沈渣の不溶性放射性活性を測定した. 注射後 30 分の ^{125}I -Pox-bPTH 1-84, ^{125}I -bPTH 1-84, ^{125}I -Pox-bPTH 1-34, ^{125}I -bPTH 1-34 の血中停滞率, 腎, 脾, 甲状腺, 胸腺の貯留率および分解率を算定した. なお予備実験においてこれらの PTH 標識物は 10% トリクロール酢酸溶液によって沈澱することが確認された.

C. 遊離腎, 肝細胞浮遊液およびホモジネートによる bPTH 1-84 および bPTH 1-34 分解率の測定.

Wistar 系雄ラット 200 g をエーテル麻酔下で腎, 肝を摘出し, Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで軽くホモジナイズし, Ficoll-Angioconray 法 (9% Ficoll 24 容, 33% Angioconray 10 容) で腎, 肝細胞を採取し, 細胞を 2 回生理食塩水で洗浄し, Tissue Culture Medium 199 (TC 199) で細胞浮遊液を作製し, 自動血球計算器により細胞数を算定し, これを $5 \times 10^4/\text{mm}^3$ に調製した. 調製浮遊細胞 (以下 Susp と略す) をそのまま Waring-blender でホモジナイズし細胞を破壊して中間ホモジネート [(Homo T (-))] を作製し, これを更に [(Triton $\times 100$ (最終濃度 0.02%)] を加えて Waring-blender で完全にホモジナイズして最終ホモジネート [(Homo T (+))] を作製した. 次に腎および肝の [susp], [(Homo T (-))], [(Homo T (+))] を用いて PTH の分解率を測定した.

bPTH 1-84 分解率の測定には plastic 試験台（1×7 cm）を使用し、 ^{125}I -84（30000cpm）0.1ml、中間精製ウシ副甲状腺ホルモン（生物学的活性約300 OSP 単位/μg）300mg、検体0.5ml、TC 199 1 ml ずつ各二本の試験管に入れ、一本の試験管は攪拌後、ただちに2000r.p.m. 10分間遠沈し、その上清0.5ml（A）をとり、一方の試験管は37℃水浴中に1時間孵置し、遠沈後上清0.5ml（B）をとった。AおよびBの0.5ml（B）をとった。AおよびBの0.5mlに抗 PTH（GPW1），抗体0.2ml，1% bovine albumin barbital buffer（PH 8.6，0.05M）0.5ml 加え試験管内で4℃，48時間反応させた後、Aの沈澱物中の対射性活性 A_0 ，B中の沈澱物中の対射性活性 B_0 を測定し bPTH 1-84 の分解率を $\frac{A_0 - B_0}{B_0} \times 100$ で表わした。また bPTH 1-34 の分解率の測定は bPTH 1-84 分解率の測定法に準じた。

Fig. 3. Proportion of TCA Insoluble Blood Radioactivity 30min. after I.V. Injection of Labeled Hormone in Rats.

Fig. 4. Effect of Peroxidase Labeling on the Rate of Degradation and Retention of bPTH₁₋₈₄.
(30min after I.V. Injection, Mean ± SEM)

III, 結 果

図3はbPTH 1-84およびbPTH 1-34について ^{125}I と Pox の二重標識を行ったものと ^{125}I の単独標識を行ったものの注射後30分における血中停滞率 (TCA 不溶性対射能活性) を示す。bPTH 1-84では二重標識によりbPTH 1-84の停滞率は ^{125}I 単独標識に比較して有意の高値を呈し, horse radish peroxidase 標識による生体内での分解の遅延を認めたがbPTH 1-34では二重標識により血中停滞率に有意の変化は起らなかった。

図4, ^{125}I -POx-bPTH 1-84および ^{125}I -bPTH 1-84における種々組織, 腎, 脾, 胸腺, 肝, 甲状腺における分解率, 停滞率について比較すると腎での分解率は二重標識により著明に低下して二重標識により腎ではbPTH 1-84の分解の抑制を認めたが, 肝, 脾では有意差を認めなかった。また停滞率は二重標識を行うと腎では低く, 肝では逆に高値を呈した。すなわち腎, 肝における分解率および停滞率の態度は二重標識を行うことにより異なった結果を得た。

Fig. 5. Effect of Peroxidase Labeling on the Rate of Degradation and Retention of bPTH₁₋₃₄. (30min. after I.V. Injection (Mean $\pm$ SEM))

Fig. 6. Intracellular and Extracellular Degradation of b-PTH by Kidney Cells

図5に示すごとく ^{125}I -Pox-bPTH 1-34 および ^{125}I -bPTH 1-34 の肝、胸腺、脾、甲状腺における注射後30分の分解率および停滞率を比較すると、分解率は二重標識により、腎では有意差を認めなかったが、肝、脾、では分解率は上昇した。また停滞率は腎では二重標識を行うと上昇し、肝ではむしろ低下した。

図6に示すごとく腎 susp, 腎 Homo T (-), 腎 Homo T (+) の bPTH 1-84 および bPTH 1-34 分解率を比較すると bPTH 1-84, bPTH 1-34 とともにその分解率は腎 susp でもっとも低く腎 Homo T (-), 腎 Homo T (+) の順に高値を呈し、細胞および細胞内小器管の破壊程度が進むほど活性値が増加することがみとめられた。

図7には同様に肝 susp, 肝 Homo T (-), 肝 Homo T (+) 中の bPTH 1-84 および bPTH 1-34 の分解率を比較した結果を示すが腎細胞における PTH の分解の態度とは逆に肝 Susp でもっとも PTH の分解率は高く、これをより完全なホモジネートとするに従って、その PTH 分解率は低下することがみとめられた。

Fig. 7. Intracellular and Extracellular Degradation of b-PTH by Liver Cells

IV, 考 察

PTH の分解は副甲状腺内および末梢組織で行われ、特に腎と肝が主要な役割を果たす^{5) 6) 7)}。

われわれの成績では bPTH 1-84, bPTH 1-34 の分解の機序は肝と腎では相違することを示す。すなわち腎では細胞内の機序が、肝では細胞外の機序が主として関与することが Pox 標識実験および遊離細胞による in vitro の実験から明きらかである。また Martin⁸⁾ らはイヌに ^{125}I -bPTH 1-84 および ^{125}I -bPTH 1-34 注射後の動静脈の PTH 濃度較差を観察した結果、腎と肝では PTH の分解の機序は異なると述べており、また Neuman⁹⁾ らは肝では生物学的活性を有する PTH だけが選択的に貯留し、腎では非選択的に生物学的活性の有無にかかわらず蓄積され、特に腎では ^{125}I -bPTH 1-84, autoradiograph による検索では proximal tubule の上皮に蓄積されるが、肝ではよりびまん性に分布する報告している⁹⁾。われわれの研究では bPTH 1-84 の二重標識により分子量の大きな complex が出来るとその分解が抑制され、貯留され難く、肝では逆にその分解はむしろ促進され、貯留し易くなる。このことは腎では大きな分子量をもつ複合物は細胞膜を通過し難いために分解がおこりにくく、このような分解がおこるために細胞膜を通る必要はなく、分解は細胞の外で主として行われると考えられる^{6) 7)}。bPTH 1-34 を二重標識すると腎では分解率は低下し、肝、脾ではむしろ高値を示し、これも腎と肝では分解の態度は相違し、また同様に停滞率も異なる。また腎、肝の停滞率、分解率は bPTH 1-84, bPTH 1-34 で異なっており、Martin⁸⁾ らの腎および肝では uptake の面で bPTH 1-34 と bPTH 1-84 の代謝が異なるという報告と一致する。

PTH の分解について遊離腎、肝細胞を利用して検索した結果ではbPTH 1-84 およびbPTH 1-34 の分解は細胞を破壊すると促進されることは腎ではこれらの分解は腎細胞内で行われることを示唆する。このことは腎細胞膜を用いた検索で、腎における作用と分解が一致しないことや、また藤田ら³⁾ Martin¹⁾らにより腎細胞のマイクロゾーム分画中の PTH の水解酵素の存在の報告されたことを対応する所見であると思われ、腎では主として細胞内でbPTH 1-84 およびbPTH 1-34 は分解されることが考えられる。Canterbury⁴⁾らによると肝は PTH の標的組織であり、bPTH 1-84 は7000, 3500 分子量に分解され、また彼らはこの現象を PTH の活性断片を産生するための積極的作用として意義があると報告している。肝細胞を利用したのわれわれの成績では肝細胞を破壊するとbPTH 1-84, bPTH 1-34 の分解は低下し、腎細胞を利用したの成績と相違した。肝ではこれらの分解は細胞膜が関与して細胞外で行われている可能性が考えられる。

V, 結 語

1, bPTH 1-84 を ¹²⁵I およびペルオキシダーゼによって二重標識すると血中停滞率は延長したがbPTH 1-34 では同様な操作は血中停滞率には影響を与えない。

2, bPTH 1-84 は二重標識によって腎組織では分解が遅延し、停滞率は低下したが肝ではむしろ逆の結果であった。bPTH 1-34 は二重標識により分解率は腎では変化せず、肝では亢進した。停滞率は腎では高値を呈し、肝では低下した。

3, 遊離腎、肝細胞浮遊液を用いた成績からはbPTH 1-84, bPTH 1-34 の分解は腎では細胞内で、肝では細胞外で行われている可能性が考えられた。

文 献

- 1) Martin, T.J., Melick, R.A. and de Luise, M.: Metabolism of parathyroid hormone, Degradation of ¹²⁵I labeled hormone by a kidney enzyme. *Biochem. J.*, 111: 509-514, 1969.
- 2) Vajda, F.J.E., Martin, T.J. and Melick, R.A.: Destruction of bovine parathyroid hormone labeled with ¹³¹I by rat kidney tissue, *Endocrinol.*, 84: 162-164, 1969.
- 3) Fujita, T., Orimo, T., Ohata, M., Yoshikawa, M. and Maruyama, M.: Enzymatic inactivation of parathyroid hormone by rat kidney homogenate, *Endocrinol.*, 86: 42-49, 1970.
- 4) Canterbury, J.M., Bricker, L.A., Levey, G.S., Kozlovski, P.L., Ruiz, E., Zull, J.E. and Reiss, E.: Metabolism of bovine parathyroid hormone, Immunological and biological characteristics of fragments generated by liver perfusion. *J. Clin. Invest.*, 55: 1245-1253, 1975.
- 5) Catherwood, B. and Singer, F.R.: Generation of a carboxyl-terminal fragment of bovine parathyroid hormone by canine renal plasma membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57: 469-475, 1974.
- 6) Neuman, W.F., Neuman, M.W., Sammon, P.J. Simon, W. and Lane, K.: The metabolism of labeled parathyroid hormone. III, Studies in rats. *Calcif. Tissue Res.*, 18: 25-261, 1975.
- 7) Becker F. O., Buchanan, F. and Rashed, M.: Parathyroid hormone degradation studies in maternal and fetal rat tissues by radioimmunoassay., *Horm. Metab. Res.*, 6: 407-410, 1974.
- 8) Martin, K., Hruska, K., Greenwalt, A., Klahr, S. and Slatopolsky, E.: Selective uptake of intact parathyroid hormone by the liver. Differences between hepatic and renal uptake., *J. Clin. Invest.*, 58: 781-788, 1976.
- 9) Neuman, W.F., Neuman, M.W., Sammon, P. and Casarett, G.W.: The metabolism of labeled parathyroid hormone. IV, Autographic studies. *Calcif. Tissue Res.*, 18: 263-270, 1975.
- 10) Fang, V.S. and Tashjian, A.H.Jr.: Studies on the role of

liver in the metabolism of parathyroid hormone, effects of partial hepatectomy and incubation of the hormone with tissue homogenates, *Endocrinol.*, 90: 1177–1184, 1972.

11) Goltzman, D., Peytremann, A., Callahan, E.N., Segre, G.V. and Potts, J.T.Jr.: Metabolism and biological activity of parathyroid hormone in renal cortical membranes, *J. Clin. Invest.*, 57: 8–19, 1976.