卵巣黄体細胞における HCG の ステロイド産生促進効果に対する カルシウムイオンの役割に関する 実験的研究

東京慈恵会医科大学
産婦人科学教室
(主任: 細川 勉教授)
神 谷 直 樹

Calcium Ions in the Steroidogenic Action of HCG

Naoki KAMIYA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Jikei Medical School,
Tokyo, Japan
(Director: Prof. T. Hosokawa)

Extensive studies have recently been conducted on the expression of hormone actions, especially on its mechanisms. Sutherland, et al. identified the function of C-AMP as an intracellular messenger of peptide hormones. Recent studies by several investigators including ours have concluded that the role of C-GMP and calcium are as important as that of C-AMP. In this report we present our findings on the role of Ca ions in the acceleration of steroid production in isolated porcine cells of the corpora lutea. (1) The incubation time needed to compare the production of progesterone and that of C-AMP is at least 120 mins. (2) Production rates of both C-AMP and progesterone in the presence of HCG were maximum at 10^{-7} g/ml HCG. Inclusion of Ca ions in the medium increases this production rate. (3) When Ca ions are included in the medium, the accelerated rate of progesterone production takes on its highest value at 1.2mM Ca. (4) Verapamil and cycloheximide inhibit the production of progesterone. (5) The binding capacity of 125 I-HCG combined with corpora lutea cells is independent of the Ca concentration in the medium. (6) Ca uptake into corpora lutea cells increases according to the concentration of HCG until it reaches a plateau at 10^{-7} g/ml HCG. This acceleration by HCG is affected by Ca and is remarkably inhibited by verapamil.

These results indicate the important role of Ca ions in the acceleration of progesterone production compared to that of C-AMP.

緒 言

ホルモン産生機構に関する研究は、最近10年間きわめて活発に行われ、特に Sutherland らにより発見された C-AMP は⁷⁾¹⁰⁾、ペプチドホルモンによるホルモン産生における細胞内 messenger として、その意義が広く認められるに至った。しかしその一方では、副腎皮質細胞のステロイド産生に関して、ACTH の促進効果の上で、messenger として C-AMP のほかにカルシウムに注目する研究が認められている¹⁾。このカルシウムについては、古くからホルモン作用の際に重要な役割を果していることが知られており⁴⁾、したがって C-AMP とカルシウムとの相関は重要な課題であると思われる。そこで本研究では、ブタの黄体細胞を用い、ACTH と同じペプチドホルモンである HCG の、ステロイド分泌促進効果におけるカルシウムの意義を明らかにするため、若干の実験的研究を行った。

実験材料および実験方法

A 実験材料

肉眼的に同時期と思われるブタ卵巣の黄体を屠殺場より入手し、分離剔出した黄体を約 3 mm 角に細切し、トリプシン処理を行った。このトリプシン処理は、細胞分離用三角コルベんに黄体組織を入れ、95% O₂ と 5% CO₂ 混合の気相で、37℃ で15分間ゆっくり回転し incubate した。トリプシン処理は5回行い、最初の処理液は放棄し、第2回目よりは80メッシュフィルターを用い細胞を採取した。この細胞の生存率をトリパンブルーにより測定し、80%以上の生存率を示し文献成績と一致することを確かめたのち、Ca free の KRBGA 液で suspend して実験に供した。

B 実験方法

progesterone 産生量と C-AMP 産生量の時間的経過を測定し incubation time を種々検討しその結果、incubation time は120分と一定にした⁸⁾。次に HCG 負荷時における progesterone 産生量と C-AMP 産生量を、カルシウムの有無により比較検討した。次にカルシウム単独負荷における progesterone 産生促進効果を観察した後、verapamil (カルシウムの細胞内取り込み阻害剤), cycloheximide (蛋白合成阻害剤) と ¹²⁵I-HCG, ⁴⁵CaCl₂ を用いカルシウムの作用部位についての推察を加えた。

(1) progesterone および C-AMP の測定法

市販の RIA kit にて測定した。

progesterone: progesterone H. 3 kit (フランス原子力庁)

C-AMP: Cyclic AMP assay kit (The Radiochemical Centre)

(2) カルシウムの取り込み量の測定法

細胞内へのカルシウムの取り込みは Keppens らの方法により測定した³⁾。

0.8 μCi ⁴⁵CaCl₂ (1.35 nmoles per ml) と 1.2 mM Ca²⁺ とを加え incubation 後、ワットマン GF/A グラスファイバーフィルターにて、濾過し HEPES buffer (PH 7.4) にて洗浄した。このフィルターを室温にて乾燥し、放射能活性の測定に供した。

(3) HCG の結合能の測定法

1.35 nmoles/ml の ¹²⁵I-HCG とカルシウムとを加えて 37℃ にて 30分 incubation したのち、放射能活性の測定をした。

(4) 使用化学物質

¹²⁵I-HCG と ⁴⁵CaCl₂ は NEN Co. より購入した。HCG は持田製薬より供与されたものを、またトリ

ブシンインヒビター, 牛血清アルブミンはシグマ社のものを使用し, トリプシンは Difco のものを, 他の化学物質は全て特級品を用いた。

Fig. 1. HCG-induced steroidogenesis in the presence (●—●) or absence (○—○) of 1.2mM Ca⁺⁺. Incubation was carried out for 120 min at 37°C. The values are shown by the means of duplicate determination.

Fig. 2. HCG-induced C-AMP production in the presence (●—●) or absence (○—○) of 1.2mM Ca⁺⁺. Incubation was carried out for 120 min at 37°C. The values are shown by the means of duplicate determination.

Fig. 3. Effect of Ca⁺⁺ on progesterone production by dispersed cells prepared from pig corpus luteum. Cell suspension were incubated for 2 hr with Ca⁺⁺. Mean refer to estimates on duplicate incubation.

Fig. 4. Effect of verapamil on 100ng/ml HCG induced progesterone production. Incubation was carried out for 120 min at 37°C. Hatched column; 10μM verapamil added. The values represent means of duplicate determination.

Fig. 5. Effect of cycloheximide on the HCG + Ca⁺⁺ induced (●—●) and HCG induced (○---○) steroidogenesis in the corpus luteal cell. HCG and Ca⁺⁺ were added in the incubation medium at 100ng/ml and 1.2mM, respectively. Incubation was carried out for 2 hr at 37°C. The values are shown by the means of duplicate determinations.

実験成績

A) HCG 負荷実験の成績

1) progesterone の測定成績 (Fig. 1)

progesterone 産生量は HCG が 10^{-7} g/ml にて最大となり、又カルシウム (1.2mM) が存在する方が progesterone 産生量は増強された。

2) C-AMP の測定成績 (Fig. 2)

C-AMP 産生量は、HCG 10^{-7} g/ml にて最大となり、カルシウム 1.2mM の存在により、C-AMP 産生量が増強される傾向にあった。

B) カルシウム単独負荷における progesterone 産生量 (Fig. 3)

medium 中にカルシウムを添加した場合、progesterone 産生量は dose-dependent に増加し、カルシウムが 1.2mM にて産生量は最大となった。

C) verapamil (カルシウム取り込み阻害剤) を用いた実験成績 (Fig. 4)

verapamil は medium 中にカルシウムが存在する時のみ、HCG の progesterone 産生促進効果を抑制し、カルシウムが存在しない場合は HCG の progesterone 産生促進効果に影響を与えなかった。

Fig. 6. Effect of Ca^{++} on the binding of ^{125}I -HCG to the cell. Incubation was carried out for 30 min at 37°C in the presence of 1.35 nmoles per ml ^{125}I -HCG. The points represent the mean $\pm$ S.E. of triplicate determination.

Fig. 7. HCG-induced Ca^{++} -uptake into the cell. Incubation was carried out for 30 min at 37°C in the presence of both $0.8\mu\text{Ci}$ ^{45}Ca and unlabeled 1.2mM Ca^{++} . The values are shown the mean of duplicate determinations.

Fig. 8. Effect of external Ca^{++} concentration on the steroidogenesis in the corpus luteal cell. Incubation was carried out for 30 min at 37°C in the presence (●—●) or absence (●---●) of Verapamil $10\mu\text{M}$. The values are shown by the means of duplicate determination.

D) cycloheximide (蛋白合成阻害剤)を用いた実験成績 (Fig. 5)

cycloheximide は、カルシウムの存否にかかわらず、HCG による progesterone 産生促進効果を著明に抑制した。

E) ^{125}I -HCG の結合能に関する成績 (Fig. 6)

黄体細胞に対する HCG の結合を ^{125}I -HCG を用い、カルシウム濃度を变化させ調べたところ、外液カルシウムの濃度に関係なく、一定の結合能を示した。

F) カルシウムの黄体細胞内取り込みに関する成績

1) HCG の効果 (Fig. 7)

HCG が存在しない状態でも $5\text{ nmole}/10^5\text{ cells}/30\text{ min}$ 程度の取り込みがあり、HCG の濃度が高くなるにしたがってカルシウムの取り込みは多くなった。

2) 外液カルシウムの影響 (Fig. 8)

外液カルシウムの濃度が高いほど、カルシウムは、多く取り込まれ、verapamil 存在下では、外液カルシウム濃度に関係なく、 $1\sim 2\text{ nmole}$ の取り込みのみで、著明に抑制された。

考 察

最近のホルモン作用機序の研究において、second messenger の論義が進展しているが、Sutherland らにより見出された C-AMP を重視する研究者^{5) 9)} のほかに、Rasmussen を代表とするカルシウムに注目する研究者が少なくない^{6) 11)}。特に松葉らによる副腎皮質細胞を用いた ACTH の作用機序の

研究において、副腎皮質細胞のステロイド産生では、C-AMPよりカルシウムがsecond messengerとして優位ではないかと報告していることが注目される¹⁾²⁾。そこで黄体細胞のprogesterone産生についても、ACTHと同じpeptide hormoneであるHCGの作用につきカルシウムの役割を検討する必要があると思われるが、今日まで黄体細胞でカルシウムの細胞内伝達物質としての意義を検討した報告はほとんど認められていない。

ブタの黄体を用いた本研究の成績では、まず黄体細胞にHCGを負荷した場合のprogesterone産生量は、1.2 mMのカルシウムの存在下で明らかにカルシウム不在の場合より増加を示し、C-AMPの測定成績でもその傾向が認められた。このような黄体細胞のprogesterone産生におけるカルシウムの促進効果は、HCGを負荷しない場合でも同様で、progesterone産生はdose-dependentに増加し、カルシウムの1.2 mM添加で最大を示していた。

そこで次に、medium中にカルシウムの取り込み阻害剤であるverapamilを加えたところ、HCGによるprogesterone産生の促進効果は、カルシウムの存在下では抑制されたが、存在しない場合には影響のないことが認められた。また次に蛋白合成阻害剤であるcycloheximideを用いた実験においては、カルシウムの有無にかかわらずprogesterone産生は抑制され、当然のことながら、progesterone産生には蛋白合成が最も必要であると認められた。

上記のことから、ブタ黄体細胞のprogesterone産生には、特にHCGの存在下でカルシウムが重要な役割を果していると認められるが、次にその作用部位が問題となると思われる。そこで¹²⁵I-HCGを用いて検討したが、¹²⁵I-HCGはカルシウム濃度と無関係に黄体細胞と一定の結合能を示していたから、HCGとカルシウムとの作用部位は異なるとみてよいと考えられる。そこで次にカルシウムの黄体細胞内取り込みにつき検討したが、HCGが存在しない状態でもある程度の取り込みが認められたが、HCGの濃度が高くなるにしたがい取り込み量の増加が認められた。また外液カルシウムの濃度が高いほど黄体細胞内の取り込み量は多いが、これにverapamilを用いた場合には、カルシウム濃度と関係なく取り込み量の著明な抑制が認められた。これらのことは、カルシウムの作用部位は細胞膜のHCG receptorとは異なり細胞内であることを示すものと考えられる。

以上を総括すると、ブタ黄体細胞におけるHCGによるprogesteroneの産生効果は、カルシウムにより明らかに促進されると認められ、C-AMPに匹敵するsecond messengerとしての重要な役割を果しているものとする。

結 語

ブタ遊離黄体細胞を用い、HCGのステロイド産生促進効果に対するカルシウムイオンの役割について研究した。

- 1) HCGによるprogesterone産生は、カルシウムが存在する場合の方が著明である。
- 2) カルシウム単独負荷にてprogesterone産生増加する。
- 3) verapamilによりprogesterone産生抑制される。
- 4) cycloheximideによりprogesterone産生抑制される。
- 5) カルシウムは¹²⁵I-HCGと黄体細胞の結合に影響を与えない。
- 6) カルシウムはHCGにより細胞内取り込みを促進され、外液カルシウム濃度に影響される。

以上よりC-AMPが細胞内messengerとして作用していることは、明白ですが、カルシウムイオンも、HCGにより積極的に細胞内に取り込まれ、progesterone産生促進に参画する可能性を認めた。

稿を終わるに臨み、本研究の御指導を下された、細川勉教授、松葉三千夫教授に感謝いたします。

本研究の一部は文部省科研費(477653)によった。

文 献

- 1) Kazutoshi Yanagibashi: Calcium Ion as "Second Messenger" in Corticoidogenic Action of ACTH. *Endocrinol. Japon*, 26(2), 227-232, 1979.
- 2) Kazutoshi, Y., N. Kamiya, G. Lin and M. Matsuba: Studies on Adrenocorticotrophic Hormone Receptor Using Isolated Rat Adrenocortical Cells. *Endocrinol. Japon*, 25(6), 545-551, 1978.
- 3) Keppen, S., J.R. Vandenheede and H. De Wulf: ON THE ROLE OF CALCIUM AS SECOND MESSENGER IN LIVER FOR THE HORMONALLY INDUCED ACTIVATION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE. *Biochem. Biophys. Acta*, 496, 448-457, 1977.
- 4) Koriz, S.B. and Péron, F.G.: The Stimulation in Vitro by Ca^{++} , Freezing and Profeolysis of Corticoid Production by Rat Adrenal Tissue. *J. Biol. Chem.*, 234(12), 3122-3128, 1959.
- 5) Marsh, J.M., Butcher, R.W., Savard, K. and Sutherland, E.W.: The Stimulatory Effect of Luteinizing Hormone on Adenosine 3', 5'-Monophosphate Accumulation in Corpus Luteum Slice.
- 6) Rasmussen: Cell Communication, Calcium Ion and Cyclic Adenosine Monophosphate. *Science*, 170, 404-412, 1970.
- 7) Robison, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.W.: CYCLIC AMP. *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 149-169, 1968.
- 8) Sala, G.B., Dufau, M.L. and Catt, K.J.: Gonadotropin Action in Isolated Ovarian Luteal Cells. *J. Biol. Chem.*, 254(6), 2077-2083, 1979.
- 9) Sutherland, E.W., Rall, T.W.: FRACTIONATION AND CHARACTERIZATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE FORMED BY TISSUE PARTICLES. *J. Biol. Chem.*, 232, 1077-1091, 1957.
- 10) Sutherland, E.W., Robison, G.A. and Butcher, R.W.: Some Aspects of the Biological Role of Adenosine 3', 5'-Monophosphate (Cyclic AMP). *Circulation*, 37, 279-306, 1968.
- 11) 尾形悦郎: ホルモンの作用と Ca^{++} , 代謝, I, 363-504, 1974. 特別掲載(受付日: 57. 2. 17)