In vitro に於ける, 合成 ovine CRF の ACTH 放出活性

岡山大学・医学部第三内科

村 上 和 春, 橋 本 浩 三, 景 山 甚 郷
高 原 二 郎, 太 田 善 介

The Effect of the Synthetic Ovine Corticotropin-Releasing Factor (CRF) on ACTH Release in Vitro Systems

**Kazuharu MURAKAMI, Kozo HASHIMOTO,
Zingo KAGEYAMA, Jiro TAKAHARA and Zensuke OTA**

Third Department of Internal Medicine,
Okayama University Medical School,
Okayama, Japan

The effect of the synthetic ovine corticotropin-releasing factor (CRF) on adrenocorticotropin (ACTH) release was examined by the perfusion method using rat anterior pituitary tissue and rat monolayer cultured pituitary cells.

Quartered anterior pituitaries were placed in a chamber and perfused at a rate of 400 μ l/min with Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, pH 7.4) bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. The perfused medium was fractionated, and the ACTH concentration was measured by radioimmunoassay.

In the monolayer cultured pituitary cells, the amount of ACTH released in the culture medium during three hours incubation was assayed by radioimmunoassay.

ACTH was released from the perfused anterior pituitary in a dose-related manner by the pulse administration of CRF or arginine vasopressin (AVP) at the concentration of 1 ng/ml, 10 ng/ml and 100 ng/ml. A significant difference was not found between CRF- and AVP-induced ACTH release.

In the monolayer cultured pituitary cells, synthetic ovine CRF induced ACTH release in a dose-related manner between 30 pg/ml and 30 ng/ml, but AVP induced a slight ACTH release.

ACTH release was pulsatile during the continuous administration of 2.5 ng/ml of CRF for 150 min, although it gradually increased during the continuous administration of 10 ng/ml or 20 ng/ml of CRF. The continuous administration of AVP also caused pulsatile ACTH release at 10 ng/ml, but the ACTH release gradually decreased during the continuous administration of AVP.

The interaction between CRF and AVP on ACTH release was examined by two methods. When CRF and AVP were given simultaneously, a mainly additive effect on

ACTH release was observed. However, a low concentration of CRF seemed to potentiate AVP-induced ACTH release.

These results show that both CRF and AVP have a significant CRF activity on the perfusion system, that AVP induced a slight ACTH release in monolayer cultured pituitary cells, and that CRF acts additively or potentially with AVP to control the ACTH release from the anterior pituitary gland.

緒 言

1955年, Saffran and Schally¹⁾, Guillemin and Rosenberg²⁾により, corticotropin releasing factor (CRF) の存在が, 最初に推定されてから, 25年余, その化学構造は, 決定されなかった。しかし, 1981年 Vale^{3) 4)}らは, 49万個の ovine 視床下部から, CRF の純化に成功し, 41個のアミノ酸から成るペプチドであることを明らかにし, また, 合成にも成功した。さらに, その合成 ovine CRF が, ラットを用いる in vitro・in vivoにおいて, 著明な ACTH 放出活性を有することを報告した。

今回我々は, Vale 博士より, 合成 ovine CRF の提供を受け, その ACTH 放出活性を, ラット下垂体前葉組織を用いた灌流系, 及び, ラット下垂体前葉細胞単層培養系を用いて検討した。また, 以前より, 生理的 CRF との関係が問題となっていた vasopressin も, この灌流系・単層培養系を用いて検討し, 両者の相互関係にも若干の考察を試みた。

実験材料及び方法

1) 実験動物

Wistar 系雄ラット 200-250g を使用した。断頭屠殺後, 下垂体をすみやかにとり出し, ラット 4 ~ 5 匹分の下垂体前葉を, Hanks-HEPES 緩衝液中で, メスにて 4 分割片として, 灌流実験に供した。また, 同様に下垂体を取り出し, Hanks-HEPES 液中で, メスにて細切し, 単層培養を行った。

2) 灌流法

下垂体前葉の 4 分割片を, ミニカラム (0.66×10 cm) に入れ, 37℃ の水槽に入れて, 灌流系としては, 95%O₂・5%CO₂ で飽和させた, 1% non-essential amino acid, penicillin 50 U/ml, streptomycin 50 µg/ml, fungisone 25 µg/ml を含む, Dulbecco's modified Eagle medium (DME-M) を用い, peristaltic pump にて, 毎分 400 µl の速度で灌流した。5 分間の灌流液を 1 分画として分画採取し, 各分画中の ACTH 濃度を radioimmunoassay⁵⁾ にて測定した。

3) 単層培養法

ラットを断頭屠殺し, 下垂体前葉をすみやかにとり出し, Hanks-HEPES 液中で, メスにて細切し, それらを既報の方法⁶⁾で, 遊離細胞とした。遊離細胞を, 10% 馬血清, 2.5% 牛胎児血清を含む DMEM に再浮遊させ, 滅菌したプラスチック製の培養皿 (35×10mm) に 2 ~ 4 × 10⁵ / 1.5ml となるよう調製して加えた。通常 1 下垂体から 4 dish を得た。これを, 95% air と 5% CO₂ 水蒸気の充満した 37℃ の incubator 中で 4 日間培養した。その後, 培養皿に付着した細胞を, 抗生物質と非必須アミノ酸を含み, 血清を含まない DMEM で 2 回洗浄し, 試料を含む DMEM を加え, incubator 中で 3 時間静置培養し, 分泌された ACTH を radioimmunoassay で測定した。

4) 合成 ovine CRF は, Vale 博士提供のもの, arginine vasopressin (AVP) はペプチド研より購入したもの, ラット正中隆起抽出物 (median eminence extract, M.E.E) は NIH より NIA MDD-Rat-HE-RP-1 をそれぞれ使用した。

結 果

1) 灌流系における ACTH 放出の再現性

CRF と AVP の両者を含んでいる M.E. を用いて, この実験系における ACTH 放出の再現性を検討した。30分, 40分間隔で, 5～6 時間にわたり, 0.1 M.E./ml, 0.2 M.E./ml の濃度で, パルス投与を繰り返し反したところ, 良好な再現性をもって, 急速な ACTH 放出がみられた。(Fig. 1)

Fig. 1. ACTH response of superfused rat pituitary tissue to repeated 2 min stimulation with 0.2 M.E./ml every 40 min and 0.1 M.E./ml every 30 min.

Fig. 2. ACTH response of superfused rat pituitary tissue to 5 min pulse stimulation with 1, 10 and 100 ng/ml of synthetic ovine CRF or arginine vasopressin (AVP).

2) 合成 ovine CRF による ACTH 放出の用量反応性 (灌流系)

合成 ovine CRF 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml の各濃度を用いて, 各々 5 分間 CRF を投与した。CRF による ACTH 放出は, 非常に速やかであり, 用量反応性を示した。また, AVP についても, CRF と同様の短時間の投与を行ったところ, ACTH 放出は, 同重量濃度では, 大きな差は認められなかった。(Fig. 2)

しかし, AVP と CRF の 100 pg/ml ~ 25 ng/ml を, 交互に短時間投与した際には, むしろ AVP が CRF より強い ACTH 放出を示した。(Fig. 3)

Fig. 3. ACTH response of superfused rat pituitary tissue to 5 min pulse stimulation with 100 pg/ml, 1, 10, 25 ng/ml of synthetic ovine CRF and AVP.

Fig. 4. The effect of synthetic ovine CRF and AVP on the release of ACTH from cultured rat pituitary cells.

3) 単層培養系における合成 ovine CRF と AVP の ACTH 放出

単層培養系において、CRF は30pg/ml から30ng/ml の濃度で、用量反応性に著明な ACTH 放出を示し、AVP は軽度の ACTH 放出を認めたのみであった。(Fig. 4)

4) 合成 ovine CRF の持続投与における ACTH 放出動態 (灌流系)

合成 ovine CRF 2.5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml の各濃度を用いて、各々、150分、150分、80分間の持続投与を行った。2.5ng/ml の濃度では、同濃度の持続投与中にもかかわらず、投与期間を通じて、脈動的な ACTH 放出がみられた。一方、10ng/ml, 20ng/ml の持続投与では、漸増する持続的な ACTH 放出がみられ、濃度により、ACTH 放出パターンに差異が認められた。(Fig.5.A,B)

Fig. 5. (A, B)

The effect of continuous administration of 2.5 ng/ml and 20 ng/ml synthetic ovine CRF on ACTH release from perfused rat pituitary.

5) AVP の持続投与における ACTH 放出動態 (灌流系)

AVP 10ng/ml の濃度で、5 分間の短時間投与後、90分間の持続投与を行い、ACTH 放出を検討した。この場合、ACTH 放出が頂値に達するまでの時間は速やかであり、時間と共に、ACTH 放出は低下していく傾向にあった。Fig 5 で示した、漸増して頂値に達する CRF の場合と比較し、ACTH 放出パターンに若干の差異を認めた。(Fig. 6)

6) 合成 ovine CRF と AVP の相互作用

灌流系において、CRF 10ng/ml, AVP 10ng/ml の同重量濃度で、各々30分間の持続投与を行った。30分間という短時間においても、両者の ACTH 放出パターンには違いがみられ、AVP は ACTH 放出の頂値に達するまでの時間は速やかであり、時間と共に放出反応は低下する傾向を示した。また、両者の30分間の持続投与では、相加的な ACTH 放出が認められた。(Fig.7.A)

Fig. 6. The effect of continuous administration of 10 ng/ml AVP on ACTH release from perfused rat pituitary.

Fig. 7. (A, B)

The interaction between ovine CRF and AVP on ACTH release from perfused rat pituitary.

Fig. 8. The interaction between ovine CRF and AVP on ACTH release from cultured rat pituitary cells.

また、AVP 5 ng/ml の5分間の短時間投与を2回加えた後、CRF 100 pg/ml の濃度で、5分間の短時間投与を2回行った。CRF のこの濃度では、ACTH 放出反応は有意ではなかった。しかし、CRF 100 pg/ml と AVP 5 ng/ml の同時投与を5分間加えると、AVP 単独時に比べ、ACTH 放出反応は強力で、相乗的な放出が認められた。(Fig. 7.B)

単層培養系において、CRF と AVP の相互作用を検討した。両者を、30 pg/ml から 30 ng/ml まで、同重量濃度で同時投与した場合、3 ng/ml の濃度では相乗的な ACTH 放出が、30 ng/ml では相加的な ACTH 放出が認められた。(Fig. 8)

考 案

1974年、Lowry⁷⁾らにより始められた、組織や細胞を利用した灌流系は、in vitro の実験系としては、in vivo の状態に比較的近いものであり、ホルモン放出の動的な変化をとらえるのに優れた系である。また、ラット下垂体前葉細胞を用いた単層培養系は、種々の物質の CRF 活性を検討するのに優れた系である。我々は、この2つの系を用い、種々の物質の CRF 活性を検討しているが、今回、合成 ovine CRF を Vale 博士より提供を受け、その ACTH 放出活性の動態を検討した。

CRF の存在が提唱されてより、長い間その化学構造は解明されなかったが、1981年、Vale らは^{3) 4)}、ovine CRF の構造決定及び合成に成功した。彼らは、ovine CRF の CRF 活性を、ラット前葉細胞単層培養系を用いて検定してきたが、ヒツジ視床下部より精製した CRF も、合成した ovine CRF も、両者共、10 pM から 200 pM の濃度で、ほぼ直線的に反応する ACTH 放出が認められることを報告している。

今回、合成 ovine CRF の CRF 活性を、下垂体前葉組織を用いた灌流系にて検討したところ、合成 ovine CRF 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml の濃度では、用量反応性に ACTH 放出を認めた。しかし、AVP の ACTH 放出活性と比較すると、灌流系では大きな差が認められなかった。

以前より、vasopressin には CRF 活性がみられるとの報告^{8) 9) 10)}があるが、ラット下垂体前葉細胞単層培養系においては、Yasuda & Greer¹¹⁾は全く認めないと報告したが、Vale¹²⁾や我々の成績¹³⁾では、

弱いながらも認められた。一方培養細胞の代わりに、ラット下垂体組織や細胞を用いた灌流系では、明らかな CRF 活性を認めるとの報告が多い。この 2 つの実験系での vasopressin の CRF 活性の差異は、以前より疑問とされるところであった。我々も、灌流系・単層培養系の 2 つの系で比較検討したが、同様な差異が認められた。この点については、vasopressin の CRF 活性は、ラット下垂体細胞に、in vivo の状態の影響が残存している時、すなわち、何らかの物質の影響が残存している時、十分に発揮され得るのではないかという可能性を考えているが、今後、検討を加えたい。

一方、単層培養系における ovine CRF の CRF 活性に比較し、灌流系においては、CRF 活性が弱いのは、この物質が非常に不安定な物質で、下垂体前葉組織に接触するまでに不活化されるのか、または、灌流系のチューブに付着する可能性を想定している。

Yates¹⁴, Buckingham¹⁵, Arimura¹⁶ らは、vasopressin は視床下部 CRF の CRF 活性を、増強すると報告している。我々の実験では、合成 ovine CRF と AVP を、同時に刺激すると、灌流系でも、単層培養系でも相加ないし相乗的な ACTH 放出を示した。両者が相加作用を示すか、相乗作用を示すかは、今回の実験では結論的なことはいえないが、少なくとも、競合的に作用するものではない。このことに関し、Sayers¹⁷ らは、CRF と AVP が競合的に作用する可能性を報告しているが、Lutz-Bucher¹⁸ らは、下垂体の 4 分割片を用いた系で、vasopressin と真の CRF は、前葉細胞の異なるリセプター部位を有していると報告している。

Fig. 5 で示した如く、合成 ovine CRF は、2.5 ng/ml の濃度の持続投与では、脈動的な ACTH 放出を示し、それより高濃度の 10 ng/ml, 20 ng/ml の持続投与では、漸増する ACTH 放出が認められ、刺激濃度の程度により、ACTH 放出パターンの相違が認められた。2.5 ng/ml という低濃度では、同濃度の刺激が続いているにもかかわらず、ACTH 放出は脈動的なものであった。この点については、我々はすでに、M, E, E や AVP を用いた場合でも、同一濃度の持続投与中にもかかわらず、ACTH 放出は周期性を示し、ACTH 放出は、下垂体レベルでも修飾されている可能性を報告している¹⁹。

我々は、CRF 活性を、合成 ovine CRF, AVP の 2 者の面から考察してきたが、CRF 活性の全てを、この 2 者で説明することは不可能であり、prostaglandin や catecholamine など、下垂体レベルで、ACTH 分泌調節に関与している可能性も強い。今後、これらの多因子 C R F 間の相互関係が解明されねばならない。

結 語

- 1) ラット下垂体前葉組織を用いた灌流系・及びラット下垂体前葉細胞単層培養系を用いて、合成 ovine CRF の ACTH 放出活性を検討した。
- 2) 合成 ovine CRF は、2 つの系において、用量反応性の ACTH 放出を示した。
- 3) 単層培養系では、合成 ovine CRF の CRF 活性は、AVP のそれと比較すると、はるかに強力であったが、灌流系では、同じ重量濃度では、ほぼ同等か、多少強い程度であった。
- 4) 合成 ovine CRF の持続投与において、低濃度では、脈動的な、高濃度では漸増する ACTH 放出を認め、濃度により、ACTH 放出パターンに差異を認めた。
- 5) 合成 ovine CRF と AVP は、2 つの系において、ACTH 放出に関し、互いに競合するものではなく、相加ないし相乗作用を示した。

稿を終るにあたり、合成 ovine CRF の提供をいただいた、Salk 研究所の Vale 博士、Rivier 博士、M, E, E を提供して下さった N, I, H に深謝いたします。

文 献

- 1) Saffran, M. and Schally, A.V.: The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vivo. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33: 408–415, 1955.
- 2) Guillemin, R. and Rosenberg, B.: Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: study with combined tissue cultures. *Endocrinology*, 57: 599–607, 1955.
- 3) Vale, W.J., Spiess, J., Rivier, C. & Rivier, J.: Characterization of a 41 residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science*, 213: 1394–1397, 1981.
- 4) Spiess, J., Rivier, J., Rivier, C. & Vale, W.: Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6517–6521, 1981.
- 5) 橋本浩三, 高原二郎, 細木秀美, 大藤信子, 安原東陽子, 森 正彦, 大藤 真: ACTH radioimmuno-assay を用いた ACTH 放出活性の in vitro 測定法。日内分泌誌, 52: 114–124, 1976.
- 6) Hashimoto, K., Yunoki, S., Takahara, J. and Ofuji, T.: Effect of neurogenic peptide and neurotransmitter substances on ACTH release induced by hypothalamic corticotropin releasing factor (CRF). *Endocrinol. Japon*, 26: 103–109, 1979.
- 7) Lowry, P.J.: A sensitive method for the detection of corticotropin releasing factor using a perfused pituitary cell column. *J. Endocrinol.*, 62: 163–164, 1974.
- 8) Fleischer, N. and Vale, W.: Inhibition of vasopressin-induced ACTH release from the pituitary by glucocorticoid in vitro. *Endocrinology*, 83: 1232–1236, 1968.
- 9) Lutz-Bucher, B., Koch, B. and Mialche, C.: Comparative in vitro studies on corticotropin releasing activity of vasopressin and hypothalamic median eminence extract. *Neuroendocrinology*, 23: 181–182, 1977.
- 10) Gillies, G., Van Wimersma Greidanus, T.B. and Lowry, P.J.: Characterization of rat stalk median eminence vasopressin and its involvement in adrenocorticotropin release. *Endocrinology*, 103: 528–534, 1978.
- 11) Yasuda, N. and Greer, M.A.: Studies on the corticotrophin-releasing activity of vasopressin using ACTH secretion by cultured rat adenohypophyseal cells. *Endocrinology*, 98: 936–942, 1976.
- 12) Vale, W., Rivier, C., Brown, M., Chan, L., Ling, N. and Rivier, J.: Applications of adenohypophyseal cell cultures to neuroendocrine studies. In: Labrie, F., Meites, J., Pelletier, G (eds) *Hypothalamus and Endocrine Functions*, vol. 3: 397.
- 13) Hashimoto, K., Yunoki, S., Hosogi, H., Takahara, J. and Ofuji, T.: Specificity of cultured anterior pituitary cells in detecting corticotropin releasing factor(s). *Endocrinol. Japon*, 26(1): 103–109, 1979.
- 14) Yates, F.E., Russell, S.M., Dallman, M.F., Hedge, G.A., McCann, S.M. and Dhariwal, A.P.S.: Potentiation by vasopressin of corticotropin release induced by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology*, 88: 3–15, 1971.
- 15) Arimura, A. and Schally, A.V.: Hypothalamic releasing and inhibitory hormones and factors. In: *Hormones in Blood*, edited by C.H. Gray and V.H.T. James, London: Academic Press, pp. 1–53, 1978.
- 16) Buckingham, J.C. and Hodges, J.R.: The use of corticotropin production by adenohypophyseal tissue in vitro for the detection and estimation of portal

- corticotrophin releasing factors. *J. Endocr.*, 72: 187–193, 1977. 17) Portanova, R. and Sayers, G.: Isolated pituitary cells: CRF-like activity of neurohypophysial and related polypeptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 143: 661–666, 1973. 18) Lutz-Bucher, B., Koch, B., Mialche, C. and Briaud, B.: Involvement of vasopressin in corticotropin-releasing effect of hypothalamic median eminence extract. *Neuroendocrinology*, 30: 178–182, 1980.
- 19) 村上和春, 橋本浩三, 高原二郎: ホルモンと臨床, ラット下垂体前葉組織灌流法による ACTH 分泌動態, 35: 459–462, 1983. (受付日: 57. 12. 6)