ウシ脳下垂体前葉細胞のヌクレオシド取り込みにおける 麦角アルカロイドの阻害作用

名古屋大学医学部脳神経外科

加藤 哲夫, 桑山 明夫, 景山 直樹

三重大学医学部生化学

中島 邦夫

Inhibitory Effect of Ergot Alkaloids on Nucleosides Transport in Cultured Bovine Anterior Pituitary Cells

Tetsuo KATO, Akio KUWAYAMA and Naoki KAGEYAMA

Department of Neurosurgery, School of Medicine,
Nagoya University

Kunio NAKASHIMA

Department of Biochemistry, School of Medicine,
Mie University

Effect of ergot alkaloids on (^3H)-nucleosides uptake by dispersed cells from fresh female bovine anterior pituitary glands was examined, because we had interested in the mechanism of pituitary tumor regression following bromocriptine treatment and considered nucleic acid synthesis as an important process in the metabolism of these cells.

The anterior pituitary cells were implanted on culture tubes using D-valine minimal essential medium with serum to suppress the overgrowth of fibroblasts and then maintained in L-valine Dulbecco's modified Eagle medium.

(^3H)-Uridine uptake by these cells was suppressed by bromocriptine, @-ergocriptine or ergotamine at a concentration varying from 10^{-6}M to 10^{-5}M , but not 10^{-5}M of lergotril. Among these alkaloids, bromocriptine had most strong inhibitory effect and suppressed the uptake to below 25% of control value at the concentration of 10^{-5}M . Bromocriptine also inhibited the uptake of (^3H)-thymidine, (^3H)-cytidine, (^3H)-adenosine or (^3H)-guanosine in the same manner as (^3H)-uridine. But neither (^3H)-uracil, the base of uridine, nor (^3H)-galactose uptake by cells was affected by bromocriptine. The incorporation of (^3H)-uridine or (^3H)-thymidine into TCA-insoluble fraction of the cells was also inhibited by bromocriptine as that in the total cells.

It was suspected that bromocriptine acted on distinct transport site of both ribonucleoside and deoxyribonucleoside, because a high concentration ($3.3 \times 10^{-5}\text{M}$) of radioinactive thymidine did not modify (^3H)-uridine uptake by these cells as well as inhibitory

effect of bromocriptine on it.

These effect of bromocriptine were not blocked by haloperidol, known as dopamine antagonist, at the same concentration as bromocriptine, and dopamine had no effect on (^3H)-uridine uptake by the cells. In addition, by adding $5 \times 10^{-4}\text{M}$ of dibutyryl cyclic AMP into the medium, the effect of bromocriptine was also not affected. These data suggest that the effect of bromocriptine on nucleoside transport in anterior pituitary cells may be dependent on the other binding site than D-2 dopamine receptor in the anterior pituitary cell membrane.

結 言

2-Bromo- α -ergocriptine (bromocriptine) を中心とした麦角アルカロイドは dopamine agonist として脳下垂体前葉細胞に直接作用し, 特に prolactin (PRL) の分泌や合成, および PRL messenger RNA の転写を阻害することが知られており^{8) 9) 11)}, 広く臨床に应用されている。更に脳下垂体前葉ホルモン分泌に影響するのみでなく, PRL 産生脳下垂体腺腫を中心に腺腫そのものの縮小効果を有することも衆知されるところとなった^{4) 5) 10) 12)}。

しかし, 麦角アルカロイドが脳下垂体前葉細胞におよぼす生化学的な機構の詳細については不明な点が多い。著者らは, 核酸合成は細胞代謝における極めて基本的かつ重要な過程であり, 麦角アルカロイドの影響を解析する上で, nucleoside の脳下垂体前葉細胞への輸送は重要な検討事項であると考え, 雌ウシ脳下垂体前葉初代培養細胞を材料として, 麦角アルカロイドが nucleoside の細胞内への取り込みに与える影響について検索した。

実験材料ならびに方法

1) 雌ウシ脳下垂体前葉細胞の初代培養法

屠殺後20分以内に雌ウシより取り出した脳下垂体を 4°C の N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (Hepes) 緩衝液 (137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na_2HPO_4 , 360 μM CaCl_2 , 10mM glucose, 20mM Hepes; pH 7.4) 内に保存して, 1時間以内に細胞分散を開始した。脳下垂体は Hepes 緩衝液内にて結合組織, および下垂体後葉を除去した後に, 約1mm 角に細切し, 0.3% collagenase (type I, Sigma), 0.2% hyaluronidase (type II, Sigma), 1% BSA を含む Hepes 緩衝液 (37°C) 内でピペッティングをくり返し分散した。Stainless mesh でろ過した後に phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) にて細胞を3回洗浄し, 培養液中に 1×10^5 cells/ml の濃度になるように浮遊した。培養液は fibroblast の増殖を抑制するため, Padmanabham らの方法¹³⁾に従い, D-valine minimal essential medium (D-valine MEM, Gibco) に 20mM Hepes (pH 7.4), 5% fetal calf serum (FCS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 100 units/ml penicillin G, 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone を含んでおり, 一面が平坦な culture tube (Nunc 社製) に各1ml を分配して 95% air-5% CO_2 気相下に 37°C で培養した。尚, 1個の雌ウシ脳下垂体前葉からは $1.5 \sim 2.0 \times 10^7$ 個の前葉細胞が採取され, trypan blue を用いた dye exclusion 法で測定した細胞生存率は約95%であった。

単層培養となった2日後に, 培養液を D-valine MEM から FCS および抗生物質を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 日水製薬) に交換し, 培養開始後6日目に実験に供した。

2) 培養細胞による取り込み実験法

培養細胞による取り込みは、(5, 6-³H)-uridine (specific activity 45.9 Ci/mmol; New England Nuclear, NEN), (6-³H)-thymidine (16.2 Ci/mmol; NEN), (5-³H)-cytidine (30.0 Ci/mmol; Amersham), (2, 8-³H)-adenosine (31.0 Ci/mmol; NEN), (8-³H)-guanosine (9.4 Ci/mmol; NEN), (5, 6-³H)-uracil (41.0 Ci/mmol; NEN) および L-(1-³H(N))-galactose (14.2 Ci/mmol; NEN) を用いて検討した。

6 日目に培養液を FCS free の DMEM に換え、10 μ l の bromocriptine, @-ergocriptine, ergotamine, lergotrile または dopamine を添加、あるいは非添加状態にして、これら薬剤の細胞膜への吸着と、それによる膜コンホメーションと機能の変化に要する必要最小限の時間として30分間の preincubation を行ない、前述のアイソトープを1 μ Ci 加えて経時的に細胞内、および trichloroacetic acid (TCA) 不溶分画内の放射活性を測定した。

細胞内への取り込みは、culture tube を冷却して取り込みを停止させた後に培養液を除去し、PBS にて3回洗浄し1ml の0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS) を加えて細胞を融解させ、この内の400 μ l を scintillator 10ml 内に加え liquid scintillation counter にて測定した。また、400 μ l の SDS 融解液内には10% TCA を加えてこの沈殿物をろ紙に取り、10% TCA および ethanol で洗浄した後に乾燥させ、10ml の scintillator を加えて放射活性を測定した。蛋白量の測定は一部の SDS 融解液を取り、Lowry ら⁶⁾の変法によって行なった。

Bromocriptine の作用におよぼす他の薬剤の影響を検討する場合には、bromocriptine を加える更に30分前に他薬剤を添加した。Bromocriptine, @-ergocriptine, ergotamine, lergotrile および haloperidol は使用直前に ethanol を用いて溶解し、同一実験内では対照を含めて全てが同 ethanol 濃度となるように調整し、培養液中の最終濃度は1%を越えないようにした。

尚、bromocriptine, @-ergocriptine は Sandz 社より、lergotrile は Eli Lilly 社より、haloperidol は大日本製薬よりそれぞれ提供をうけ、dopamine hydrochloride, N⁶, O²'-dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (dibutyryl cyclic AMP) は Sigma 社より購入した。

成 績

1) 雌ウシ脳下垂体前葉細胞の(³H)-uridine 取り込みに対する種々の麦角アルカロイドの影響

Fig. 1 に示したようにそれぞれ dopamine 様構造を有する bromocriptine, @-ergocriptine, ergotamine および lergotrile について、(³H)-uridine 取り込みにおよぼす影響を比較検討した。

Ergotoxin 類である bromocriptine, @-ergocriptine および ergotamine は、それぞれ 1×10^{-6} M から 1×10^{-5} M の濃度で (³H)-uridine の取り込みを阻害し、 1×10^{-5} M での2時間の取り込み値では、それぞれ対照の24.5, 35.0 および40.0%にまで抑制しており、bromocriptine に最も強い阻害作用が認められた (Fig. 2, A, B, C)。

これに対し、ergotoxin 類に特徴的な peptide side chain を有しない ergoline 誘導体である lergotrile は、 1×10^{-5} M の濃度でもほとんど阻害作用を示さなかった (Fig. 2, D)。

2) その他の nucleoside の取り込みに対する bromocriptine の作用

Uridine と同じく pyrimidine ribonucleoside である (³H)-cytidine の取り込みも bromocriptine により同様に阻害された。Bromocriptine 1×10^{-6} および 1×10^{-5} M により、1時間の取り込みが対照のそれぞれ34.4 および10.7%に抑えられた。

Fig. 1. Chemical structures of (A) bromocriptine (B) @-ergocriptine, (C) ergotamine and (D) lergotril.

Fig. 2. Effect on (^3H)-uridine uptake by female bovine pituitary cells of (A) bromocriptine, (B) @-ergocriptine, (C) ergotamine and (D) lergotril. Cells were incubated without drugs ($\circ$) or with $1 \times 10^{-6}\text{ M}$ (Δ), $5 \times 10^{-6}\text{ M}$ ($\square$) or $1 \times 10^{-5}\text{ M}$ ($\blacksquare$) of drugs. The mean values of duplicate experiments were expressed.

また, purine ribonucleoside の adenosine と guanosine の取り込みに対する bromocriptine の影響についても検討を行った。(^3H)-Adenosine (Fig. 3, A) も (^3H)-guanosine (Fig. 3, B) も同様にこの麦角アルカロイドで細胞内への取り込みが阻害された。

次に, ヘパトーマ細胞などの場合には ribonucleoside と deoxyribonucleoside の transport system が異なる成績が得られているので¹⁹, deoxyribonucleoside である (^3H)-thymidine の取り込みに対する bromocriptine の影響を検討した。(^3H)-thymidine の細胞内への移行も bromocriptine によって効率よく阻害され (Fig. 4, A), さらに (^3H)-thymidine の DNA への取り込みもほぼ同様に bromocriptine 存在下で強く抑制された (Fig. 4, B)。

Fig. 3. Effect of bromocriptine on (A) (^3H)-adenosine uptake and (B) (^3H)-guanosine uptake by pituitary cells. Cells were incubated without bromocriptine ($\circ$) or with 1×10^{-6} M (Δ), 5×10^{-6} M ($\square$) or 1×10^{-5} M ($\blacksquare$) of the drug. The values were obtained from the determinations of a single experiment.

Fig. 4. Effect of bromocriptine on (A) (^3H)-thymidine uptake by pituitary cells and (B) (^3H)-thymidine incorporation into TCA-insoluble fraction of the cells. Cells were incubated without the drug ($\circ$) or with 1×10^{-6} M (Δ), 5×10^{-6} M ($\square$), 1×10^{-5} M ($\blacksquare$) or 5×10^{-5} M ($\blacktriangle$) of the drug. The data were from a single experiment.

3) Bromocriptine の(^3H)-uridine 取り込み阻害作用におよぼす高濃度 thymidine の影響

このdeoxyribonucleoside transport systemとribonucleosideのそれとが, 下垂体前葉細胞においても異なるか否かを調べる目的で, (^3H)-uridineの取り込みを1500倍濃度のthymidine存在下で検討した。その結果, thymidineの存在は培養細胞での(^3H)-uridineの細胞内移行とRNAへの取り込みに全く影響せず, またbromocriptineの示す(^3H)-uridine取り込み阻害作用にも変化を与えない結果が得られた。

4) (^3H)-Uracil, (^3H)-galactoseの前葉細胞での取り込みに対するbromocriptineの影響

前葉細胞での(^3H)-uracil (Fig. 5, A) および(^3H)-galactose (Fig. 5, B)の取り込みに関しては, $1 \times 10^{-5}\text{M}$ の濃度のbromocriptineによっても阻害を受けなかった。

5) (^3H)-Uridineの取り込み阻害作用におけるbromocriptineの濃度依存曲線, およびdopamine, dopamine antagonistの影響 (Fig. 6)

前葉細胞での2時間の(^3H)-uridineの取り込みを, 対照を100%として表わすと, bromocriptineは $2 \times 10^{-6}\text{M}$ で50%阻害を示し $1 \times 10^{-5}\text{M}$ ではほぼ最大阻害作用を示した。

Dopamine antagonistであるhaloperidolで前処置をした前葉細胞においても, このbromocriptineの(^3H)-uridine取り込み阻害作用は影響を受けなかった。Dopamineそのものには, いかなる濃度でも阻害作用は認められなかった。

また, 培養細胞内のcyclic AMP濃度を高める目的で $5 \times 10^{-4}\text{M}$ のdibutyryl cyclic AMPで前処置をした前葉細胞においても, dibutyryl cyclic AMPそのものの作用により, (^3H)-uridineの取り込みは約9%低下するものの, bromocriptineの阻害作用は影響されなかった。

Fig. 5. Effect of bromocriptine on (A) (^3H)-uracil uptake and (B) (^3H)-galactose uptake by pituitary cells. Cells were incubated without bromocriptine (○) or with $1 \times 10^{-6}\text{M}$ (△), $5 \times 10^{-6}\text{M}$ (□) or $1 \times 10^{-5}\text{M}$ (■) of the drug. The values were obtained from a single experiment.

Fig. 6. Effect of bromocriptine, dopamine, haloperidol and/or dibutyryl cyclic AMP on (^3H) -uridine uptake by pituitary cells for 2 hours. Cells were incubated with bromocriptine (●), bromocriptine and haloperidol (○), bromocriptine and 5×10^{-4} M dibutyryl cyclic AMP (□) or dopamine (Δ). The values were means of duplicate experiments.

考 察

脳下垂体からのPRL分泌は、視床下部より放出されるdopamineによりnegative controlを受けていると考えられており¹⁾ dopamineと同様に種々の麦角アルカロイドも、脳下垂体前葉に直接作用してPRL分泌を抑制することが知られている^{8) 11)}。そして、この麦角アルカロイドのPRL分泌に対する作用はdopamine antagonistによって阻害され、麦角アルカロイドの前葉細胞膜への結合もdopamine agonist, antagonistの両者ともに競合されることから、dopamine agonistとしてPRL分泌を抑制すると考えられている¹⁾。

PRL分泌のみならず、その生合成に関しても麦角アルカロイドは阻害作用を示し、ergocryptineがrat脳下垂体前葉内のPRL messenger RNAを低下させることが報告されている⁹⁾。更には、in vitroおよびin vivoでrat脳下垂体腺腫の育成が麦角アルカロイドによって阻止され⁷⁾、臨床的にもbromocriptineにより大部分のPRL産生脳下垂体腺腫が縮小を示すことが知られている^{4) 10) 16)}。また、このbromocriptineによって非機能腺腫でさえ縮小することがあると報告されるに至ったが⁵⁾、そのmechanismの詳細は明らかでない。

麦角アルカロイドの細胞代謝にあたえる影響を検索するには、それは核酸合成に対する検討が極めて重要であり、種々の細胞においてnucleosideの取り込みがその指標として広く用いられている。核酸の材料として、リン酸化されたnucleoside、即ちnucleotideの形では細胞膜を通過せず、細胞外液中のnucleosideのみが外来性の材料として利用され、この細胞内への輸送は、細胞膜でのcarrier mechanismによるfacilitated diffusionによって行なわれている¹²⁾。そこで著者らは雌ウシ脳下垂

体前葉細胞での nucleoside の取り込みに、種々の麦角アルカロイドがいかなる影響を与えるかを検討した。

その結果, bromocriptine, @-ergocriptine および ergotamine はそれぞれ 1×10^{-6} M から 1×10^{-5} M の濃度で uridine の取り込みを抑制し、なかでも bromocriptine は最も強力な阻害作用を示した。一方, lergotril にも PRL 分泌を抑制する効果が認められているが¹⁸⁾, uridine の取り込みにはほとんど阻害作用を示さず、この阻害作用発現のためには ergotoxin としての構造が必須であると考えられた。

Bromocriptine は uridine の取り込みを抑制するのみならず, thymidine, cytidine, adenosine および guanosine の取り込みも同様に阻害したが, uridine の塩基部分である uracil や、糖類の galactose の取り込みには影響しなかった。このように bromocriptine は, pyrimidine nucleoside あるいは purine nucleoside にかかわらず広く nucleoside の取り込みを阻害することが判明したが、高濃度の thymidine と incubate した前葉細胞においても uridine の取り込みには変化がなくまた bromocriptine による uridine 取り込み阻害作用も影響されなかった。このことは、以前より ribonucleoside と deoxyribonucleoside の細胞内への輸送経路は異なっていることが示されているが¹⁹⁾, 脳下垂体前葉細胞においても同様であり, bromocriptine は前葉細胞膜におけるいずれの輸送経路にも阻害的に作用することを示している。

また、細胞全体への取り込みと同様に、TCA 不溶分画への (^3H)-uridine および (^3H)-thymidine の取り込みも、bromocriptine により阻害を受けていたが、今回の実験において培地に加えた (^3H)-nucleoside の濃度では、細胞内 nucleotide pool はアイソトープにより飽和されておらず、核酸合成を阻害しているとは即断できない。しかし、内在性の生合成系である de novo 合成による nucleotide の供給には限界があり、nucleoside の形で細胞内への輸送の遮断は核酸合成に多大な影響を与えると考えられる¹⁴⁾。

Bromocriptine によるこの nucleoside 取り込み阻害作用は、dopamine antagonist である haloperidol によっては block されず、dopamine そのものには uridine の取り込みに対する阻害作用はなかった。また、脳下垂体前葉細胞における dopamine receptor は、cyclic AMP を介さない D-2 receptor とされているが、De Camieli らは dopamine が PRL 産生脳下垂体腺腫において、細胞内の adenylate cyclase を低下させることを報告している²⁾。しかし、bromocriptine の nucleoside 取り込み阻害作用は、 5×10^{-4} M の dibutyryl cyclic AMP の前処理により細胞内 cyclic AMP 濃度を高めても変化を認めず、cyclic AMP の低下に基づく作用ではないと考えられた。

PRL の分泌に対して、bromocriptine を含めた麦角アルカロイドは 10^{-9} M から 10^{-8} M の濃度で抑制を示すとされている³⁾。それに対し、bromocriptine による前葉細胞での nucleoside 取り込み阻害は、 2×10^{-6} M で 50% 阻害作用が認められた。これらの結果から、bromocriptine は前葉細胞において、D-2 receptor よりも親和性の低い結合部位も持っており、この結合部位を介して nucleoside の取り込みを阻害すると考えられた。

結 語

麦角アルカロイドの細胞代謝におよぼす影響を検討するため、雌ウシ脳下垂体前葉初代培養細胞を材料として、核酸前駆物質である nucleoside の細胞内への輸送につき検索した。

1) Bromocriptine, @-ergocriptine, ergotamine は uridine の前葉細胞内への取り込みを阻害し、

この内bromocriptineに最も強い作用が認められた。

2) Bromocriptineはpyrimidine nucleosideおよびpurine nucleoside, ribonucleosideおよびdeoxyribonucleosideの相異なる取り込みシステムに対し、nucleosideの取り込みをそれぞれ阻害した。

3) Bromocriptineは細胞内への取り込みのみならず、TCA不溶分画へのuridineおよびthymidineの取り込みにも阻害作用を示した。

4) Bromocriptineのnucleoside取り込み阻害作用は、dopamine antagonistのhaloperidolによってblockされず、dopamineには阻害作用は認められなかった。

5) Bromocriptineは前葉細胞膜にD-2dopamine receptorよりも親和性の低い結合部位を持ち、これを介してnucleosideの取り込みを阻害すると考えられた。

本論文の一部は第56回日本内分泌学会総会において報告した。

文 献

- 1) Caron, M.G., Beaulieu, M., Raymond, V., Gagné, B., Drouin, J., Lefkowitz, R.J. and Labrie, F.: Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. *J. Biol. Chem.*, 253: 2244–2253, 1978.
- 2) De Camieli, P. and Macconi, D.: Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas. *Nature*, 278: 252–254, 1979.
- 3) Delitala, G., Yeo, T., Grossman, A., Hathway, N.R. and Besser, G.M.: A comparison of the effects of four ergot derivatives on prolactin secretion by dispersed rat pituitary cells. *J. Endocr.*, 87: 95–103, 1980.
- 4) George, S.R., Burrow, G.N., Zinman, B. and Ezrin, C.: Regression of pituitary tumors, a possible effect of bromergocryptine. *Am. J. Med.*, 66: 697–702, 1979.
- 5) Johnston, D.G., Hall, K., McGregor, A., Ross, W.M. and Hall, R.: Bromocriptine therapy for “nonfunctioning” pituitary tumors. *Am. J. Med.*, 71: 1059–1061, 1981.
- 6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 183: 265–275, 1951.
- 7) MacLeod, R.M. and Lehmyer, J.E.: Suppression of pituitary tumor growth and function by ergot alkaloids. *Cancer Res.*, 33: 849–855, 1973.
- 8) MacLeod, R.M. and Lehmyer, J.E.: Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology*, 94: 1077–1085, 1974.
- 9) Maurer, R.A.: Dopaminergic inhibition of prolactin synthesis and prolactin messenger RNA accumulation in cultured pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, 255: 8092–8097, 1980.
- 10) McGregor, A.M., Scanlon, M.F., Hall, R. and Hall, K.: Effects of bromocriptine on pituitary tumor size. *Br. Med. J.*, 22: 700–703, 1979.
- 11) Müller, E.E., Panerai, A.E., Cocchi, D. and Mantegazza, P.: Endocrine profile of ergot alkaloids. *Life Sci.*, 21: 1545–1558, 1977.
- 12) Oliver, J.M. and Paterson, A.R.P.: Nucleoside transport. I. A mediated process in human erythrocytes. *Can. J. Biochem.*, 49: 262–270, 1971.
- 13) Padmanabham, V., Friderici, K.H., Convey, E.M. and Rottman, F.M.: D-Valine medium maintains prolactin production in primary culture. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 28: 613–626, 1982.
- 14) Plagemann,

- P.G.W.: Nucleotide pools of Novikoff rat hepatoma cells growing in suspension culture. I. Kinetics of incorporation of nucleosides into nucleotide pools and pool sizes during growth cycle. *J. Cell. Physiol.*, 77: 213–240, 1971.
- 15) Plagemann, P.G.W. and Erbe, J.: The deoxyribonucleoside transport systems of cultured Novikoff rat hepatoma cells. *J. Cell. Physiol.*, 83: 337–344, 1974.
- 16) Thorner, M.O., Martin, W.H., Rogol, A.D., Morris, J.L., Perryman, R.L., Conway, B.P., Howards, S.S., Wolfman, M.G. and MacLeod, R.M.: Rapid regression of pituitary prolactinomas during bromocriptine treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 438–445, 1980.
- 17) Weiner, R.I. and Ganong, W.F.: Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol. Rev.*, 58: 905–976, 1978.
- 18) Yeo, T., Thorner, M.O., Jones, A., Lowry, P.J. and Besser, G.M.: The effect of dopamine, bromocriptine, lergotril and metoclopramide on prolactin release from continuously perfused columns of isolated rat pituitary cells. *Clin. Endocrinol.*, 10: 123–130, 1979. (受付日: '86. 9. 19)