内因性睡眠誘発物質プロスタグランディン D₂ の ラット下垂体遊離細胞における生理作用

弘前大学医学部麻酔科学教室

工 藤 美穂子, 工 藤 剛, 松 木 明 知

Prostaglandin D₂-Endogenous Regulator of Physiological Sleep-Inhibited
CRF-Induced ACTH Secretion from Rat Anterior Pituitary Cells

Mihoko KUDO, Tsuyoshi KUDO and Akitomo MATSUKI

Department of Anesthesiology, University of Hirosaki School of Medicine

Delta sleep-inducing peptide(DSIP) is described as being an endogenous sleep factor. This DSIP inhibits ACTH release induced by CRF from rat anterior pituitary tissue. Prostaglandin D₂(PGD₂) is regarded as another endogenous sleep factor. However, little information has been accumulated concerning the involvement of PGD₂ in the regulation of hormone secretion from the anterior pituitary. It was, therefore, interesting to observe the effect of PGD₂ on ACTH release from rat anterior pituitary cells.

Rat anterior pituitary cells were obtained by enzymatic digestion of the pituitary gland of male Wister rats. The cell pellet was suspended in Hank's balanced salt solution containing 0.1% BSA and distributed in a 800 μ l aliquot to 12 $\times$ 75mm glass tubes. The samples were preincubated for 90 min. in a 37°C waterbath under 5% CO₂/95% O₂. After preincubation, aliquots of various concentrations of CRF, PGD₂ and PGE₂ were added in a 100 μ l volume and incubated for 4 hr. ACTH in the incubation medium was determined by radioimmunoassay.

0.01-1.0nM CRF significantly increased the ACTH release from rat anterior pituitary cells in a dose dependent manner. Each concentration of 0.1, 1, 2nM PGD₂ or PGE₂ had no effect on basal ACTH levels. 2nM PGD₂ showed a significant inhibition of the CRF-induced ACTH secretion from rat anterior pituitary cells. Similarly, 2nM PGE₂ significantly inhibited the CRF-induced ACTH release from rat anterior pituitary cells. The magnitude of the inhibitory effect of PGE₂ was slightly higher than that of PGD₂.

From these results, we concluded that PGD₂ inhibited CRF-induced ACTH secretion at the level of pituitary gland.

This inhibitory action of PGD₂ on ACTH secretion could be attributed to a stress attenuating effect of this eicosanoid.

結 言

プロスタグランディン(PG)は炭素数20個から成る不飽和モノカルボン酸で、生体内の種々の臓器に広く存在し、その生理作用は多岐にわたっている。最近、脳内の主要な PG は PGD_2 であることが確認され¹²⁾体温制御、睡眠に対する作用が知られている。特に睡眠に関しては、これまでに知られている睡眠導入物質の中で最も必要用量が少ないことが確認されている¹⁰⁾。

一方、デルタ睡眠誘発ペプチド(DSIP)は睡眠中あるいは入眠前の動物の体内から抽出された物質であるが⁶⁾、ホルモン分泌にも重要な役割を示すことが認められており、*in vitro* で CRF による下垂体前葉からの ACTH 分泌を抑制したとの報告がある⁷⁾。

今回、我々はラット下垂体遊離細胞を用いて DSIP と同様の睡眠誘発作用をもつ PGD_2 の下垂体前葉よりの ACTH 分泌作用について検討した。また PGD_2 と類似構造を持ちながら、体温調節あるいは LH-RH 分泌に関して PGD_2 と相反する作用を示す PGE_2 の効果との比較を行った。

1. 方 法

ウイスター系雄ラット(体重200–250g)を用い断頭後下垂体を摘出した。摘出した下垂体より中後葉部を除去し、下垂体前葉組織を細片し遊離細胞を作成した。遊離細胞の作成は既述の方法⁵⁾により組織をコラゲナーゼ(4mg/ml)、DNase(4 μ g/ml)を含む Hank's balanced salt solution(HBSS)中で37℃50分間の攪拌温浸を行った。細胞浮遊液はガーゼで濾過後1600rpmで5分間冷却遠沈した。上清を捨て、残った細胞を0.1%BSAを含むHBSS中に浮遊させ再び1600rpmで5分間遠沈した。この洗浄操作を2回行った。洗浄後細胞は0.1%BSAを含むHBSS中に浮遊させ、12×75mmチューブに800 μ lづつ分注し、37℃にてインキュベーションを行った。インキュベーションメジウム中の遊離細胞数は 10^6 cell/tube程度となるように調整した。検体は95% O_2 /5% CO_2 混合ガスの下で、振とうしながら90分間のプレインキュベーションの後、それぞれの濃度の CRF, PGD_2 , PGE_2 100 μ l を各チューブに添加し、さらに4時間のインキュベーションを行った。4時間のインキュベーション後、検体を氷水中に移し反応を停止させ3000rpm、20分間の遠沈にて浮遊細胞を除去した。インキュベーションメジウム中に分泌された ACTH は特異的なラジオイムノアッセイを用いて測定した。測定結果は Mean $\pm$ S.E. で表し、統計処理は Student の t-test のより $P<0.05$ をもって有意差ありとした。

2. 結 果

1) . CRF の影響 (図1)

CRF は0.01, 0.1, 1nM の各濃度で下垂体遊離細胞よりの ACTH 分泌を用量依存性に増加させた。即ち、コントロール値の $37.3\pm1.1\times2\text{pg}/\text{tube}/4\text{hr}$ に対し0.01nM では 107.8 ± 4.2 ($P<0.005$), 0.1nM では 128.8 ± 1.1 ($P<0.005$), 1nM では 195.8 ± 4.3 ($P<0.005$)と各々有意の増加を示した。

2) . PGD_2 , PGE_2 の ACTH 基礎分泌への影響

0.1, 1, 2nM の各濃度の PGD_2 , PGE_2 は下垂体遊離細胞の ACTH 基礎分泌にたいしてほとんど影響を及ぼさなかった(データは示していない)。

3) . CRF によって刺激分泌された ACTH に対する PGD_2 , PGE_2 の影響

① PGD_2 と PGE_2 の濃度が CRF 濃度と等モルの場合: 図には示していないが0.1, 1nM PGD_2

及び1nM PGE₂では抑制傾向は示すものの有意ではなかった。しかし0.1nM PGE₂では0.1nM CRF によって刺激分泌された ACTH $128.8 \pm 1.1 \times 2\text{pg}/\text{tube}/4\text{hr}$ を 117.0 ± 3.7 へと有意 ($p < 0.025$) に抑制した。

Fig. 1 Effects of CRF on ACTH secretion in rat anterior pituitary cells.

Fig. 2 Effects of PGD₂ on CRF-induced ACTH release in rat anterior pituitary cells. The values were presented as the mean $\pm$ S.E. The number of experiments (n) were 8 for the control group and 5 for the other groups. Significant differences between CRF and CRF+2nM PGD₂ noted in the figure.

② PGD₂ と PGE₂ の濃度が2nM と CRF の濃度より高い場合: 図2および図3に示すように PGD₂ は0.1, 1nM CRF 添加時の, PGE₂ は0.01, 0.1, 1nM CRF 添加時の ACTH 分泌をそれぞれ有意に減弱した。即ち, 0.1nM CRF 添加時の ACTH $128.8 \pm 1.1 \times 2\text{pg}/\text{tube}/4\text{hr}$ を 2nM PGD₂ は 113.8 ± 4.4 ($P < 0.025$), 2nM PGE₂ は 102.8 ± 1.8 ($P < 0.005$) と著明に抑制した。1nM CRF 添加では分泌された ACTH 195.8 ± 4.3 を 2nM PGD₂ は 170.0 ± 9.2 ($P < 0.05$), 2nM

PGE₂ は 162.6 ± 3.6 ($P < 0.005$)へと明らかに抑制した。

③ 一方, 0.01nM CRF 添加では分泌された ACTH 107.8 ± 4.2 に対して2nM PGD₂ はほとんど影響を与えなかったが, 2nM PGE₂ は 84.6 ± 2.9 ($P < 0.005$)と有意に抑制し, それは刺激分泌値の78.4%であった。0.1nM CRF 添加時には PGD₂ は刺激分泌値の88.3%, PGE₂ は79.8%へ, さらに1nM CRF 添加時には PGD₂ は86.8%, PGE₂ は83.0%へとそれぞれ ACTH 分泌を抑制した(図2, 3および4)。

Fig. 3 Effects of PGE₂ on CRF-induced ACTH release in rat anterior pituitary cells. The values were presented as the mean $\pm$ S.E. The number of experiments (n) were 8 for the control group and 5 for the other groups. Significant differences between CRF and CRF+2nM PGE₂ noted in the figure.

Fig. 4 Effects of PGD₂ and PEG₂ on CRF-induced ACTH release in rat anterior pituitary cells.

3. 考 察

ラット脳における主要な PG は D₂, E₂, F₂αであり, なかでも PGD₂が最も多いと報告されている。PGD₂ は下垂体前葉, 後葉, 松果体, 視床下部に多く¹²⁾, その合成酵素活性も脳全域⁸⁾⁹⁾にわたりまた活性に代謝されていることから他の PG 類とは異なる中枢性の作用を持つことが推測され, 興味深いいくつかの作用が発見されている¹³⁾。

Ueno ら¹¹⁾はラットの視束前野に微量の PGD₂ を注入することで生理的な睡眠が誘発されることを報告している。PGD₂ は他の内因性睡眠物質の一つである DSIP とは異なり, 睡眠の誘発と維持の双方に関わっているようである。DSIP には睡眠誘発効果以外に種々の生理作用が知られているが²⁾⁴⁾⁷⁾, PGD₂ に関してはその詳細は未だ不明な点が多い。PGD₂ の合成, 分解酵素, 結合蛋白のすべてが下垂体や視床下部に多く認められることから PGD₂ の内分泌機能への関与が考えられ, 今回下垂体遊離細胞よりの ACTH 分泌に及ぼす PGD₂ の影響を検討し, 併せて PGD₂ の作用と比較した。

今回下垂体遊離細胞を用いた系において, PGD₂ は ACTH の基礎分泌には影響を与えなかったが, CRF で惹起された ACTH 分泌を抑制した。我々のこれらの成績は Okajima ら⁷⁾により報告された同様の系における DSIP の ACTH 分泌抑制作用と一致した。彼らは同時に細胞内の cAMP 濃度を測定し, DSIP が CRF による cAMP 濃度を抑制したことより, DSIP は CRF によって刺激された ACTH 分泌をアデニレートサイクレーズの活性を抑制することにより, 下垂体レベルで減弱したと結論づけている。

PGE₂ は脳内に多量に存在し, PGD₂ とは9位の水酸基と11位のケト基の配置が逆の異性体であるが, 心拍数, 体温, 睡眠, 鎮痛, 視床下部での効果などの点において PGD₂ とは相反した作用を示す¹⁴⁾。PGE₂ は下垂体遊離細胞における ACTH の基礎分泌には影響を与えず, CRF で刺激された ACTH 分泌を抑制し PGD₂ と同様の作用を示したが, PGD₂ に比してより強力な抑制効果を示した。

このように PGE₂ は PGD₂ とは他の生理作用の面で逆の効果を持ちながら下垂体レベルでは PGD₂ と同様 ACTH 分泌抑制効果が認められた。しかしこのような抑制作用の機序や抑制程度の違いについては今回の我々の実験結果からは明確にすることが出来なかった。

天野は, ストレス時の脳内の PGD₂ の低下は, ストレスに対する生体の防御的反応として生じたと推察している¹⁾。一般にストレス下では PGD₂ は低下し, CRF および ACTH の分泌は増加するが, 正常の状態では PGD₂ 濃度はストレス下におけるそれよりも高く保たれ CRF の作用を減弱することによって ACTH 分泌を抑制する方向に働いている可能性が推察される。

睡眠物質の生理的な意味づけは必ずしも一様ではないが, 生体の様々な内部環境の変化に応じて休息状態を必要とする時, 脳から分泌されると思われる。これらのことより, 本研究により示された下垂体遊離細胞における PGD₂ の ACTH 分泌抑制作用はストレスを軽減して休息状態を保とうとする生理的意義を示す可能性が考えられる。

4. 結 語

ラット下垂体前葉における PGD₂ および PGE₂ の ACTH 分泌に対する効果を検討した。PGD₂ および PGE₂ はいずれも ACTH の基礎分泌には影響を与えなかったが, CRF によって促

進された ACTH 分泌を著明に抑制した。PGD₂ のこの抑制効果は PGD₂ のもつストレス減弱効果と考え併せると興味深い結果と思われた。

本論文の要旨は、第63回日本内分泌学会学術総会（平成2年5月19日、大阪）において発表した。またプロスタグランジン D₂, E₂ を提供して下さいました小野薬品工業株式会社に感謝致します。

文 献

- 1) 天野教之：麻酔およびストレスのラット脳プロスタグランジン D₂ 含有量および各種血漿ストレスホルモン濃度に及ぼす影響。麻酔, 36: 1374—1384, 1987.
- 2) Graf, H.V., Kastin, A.J., Coy, D.H. and Fischman, A.J.: Delta sleep-inducing peptide reduces CRF-induced corticosterone release. Neuroendocrinology, 41: 353—356, 1985.
- 3) 井上昌次郎：睡眠物質と徐波睡眠。臨床精神医学, 13: 189—196, 1984.
- 4) Iyer, K.S. and McCann, S.M.: Delta sleep-inducing peptide (DSIP) stimulates growth hormone (GH) release in the rat by hypothalamic and pituitary actions. Peptides, 8: 45—48, 1987.
- 5) Kudo, T. and Baird, A.: Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor. Nature, 312: 756, 1984.
- 6) Monnier, M., Koller, T. and Graver, S.: Humoral influences of induced sleep and arousal upon electrical brain activity of animals with crossed circulation. Exp. Neurol., 8: 264—277, 1963.
- 7) Okajima, T. and Hertting, G.: Delta sleep-inducing peptide (DSIP) inhibited CRF-induced ACTH secretion from rat anterior pituitary gland in vitro. Horm. Metab. Res., 18: 497—499, 1986.
- 8) Shimizu, T., Mizuno, N., Amano, T. and Hayaishi, O.: Prostaglandin D₂, a neuromodulator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 6231—6234, 1979.
- 9) Shimizu, T., Yamamoto, S. and Hayaishi, O.: Purification and properties of prostaglandin D₂ synthetase from rat brain. J. Biol. Chem., 25: 5222—5228, 1979.
- 10) 上野隆司, 成宮 周, 早石 修, 井上昌次郎：睡眠のメカニズム d) プロスタグランジン D₂ と睡眠。治療学, 11: 32—36, 1983.
- 11) Ueno, R., Honda, K., Inoue, S. and Hayaishi, O.: Prostaglandin D₂ a cerebral sleep-inducing substance in rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 1735—1737, 1983.
- 12) Yamashita, A., Watanabe, Y. and Hayaishi, O.: Autoradiographic localization of a binding protein(s) specific for prostaglandin D₂ in rat brain. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80: 6114—6118, 1983.
- 13) 渡辺恭良, 早石 修：プロスタグランジン研究の最近の進歩と臨床。臨床検査, 27: 157—165, 1983.
- 14) 渡辺恭良, 早石 修：中枢神経系におけるプロスタグランジンの役割。代謝, 20: 303—312, 1983.

(受付日: '90. 1. 5)

(採択日: '90. 5. 23)