細胞外高浸透圧によるプロラクチン分泌抑制の機序

—細胞外からの Ca^{2+} 流入の重要性—

群馬大学医学部第一内科¹⁾, 群馬大学臨床検査医学²⁾, オレゴン州立医科大学医学部内分泌科³⁾

佐藤 則之¹⁾³⁾, Monte A Greer³⁾, 下村 洋之助¹⁾

清水 弘行¹⁾, 上原 豊¹⁾, 高橋 正樹¹⁾

大島 喜八¹⁾, 小林 功²⁾, 森 昌朋¹⁾

Mechanism of Suppressed Prolactin Secretion due to Medium Hyperosmolarity - The Importance of Ca^{2+} Influx

Noriyuki SATO¹⁾³⁾, Monte A GREER³⁾, Yhonosuke SHIMOMURA¹⁾,
Hiroyuki SHIMIZU¹⁾, Yutaka UEHARA¹⁾, Masaki TAKAHASHI¹⁾,
Kihackhi OHSHIMA¹⁾, Isao KOBAYASHI²⁾ and Masatomo MORI¹⁾

The First Department of Internal Medicine, Gunma University¹⁾

Department of Clinical Laboratory Medicine, Gunma University²⁾

Section of Endocrinology, Department of Medicine,

Oregon Health Sciences University, Portland OR 97201, USA³⁾

It is still unknown how extracellular hyperosmolarity suppresses exocytosis. To evaluate the possibility that extracellular hyperosmolarity affects one of the most important second messenger system, Ca^{2+} signal, we evaluated the effect of hyperosmolarity on the thyrotropin releasing hormone (TRH)-induced changes in both intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and prolactin (PRL) secretion in GH_4C_1 cells. TRH caused two phases of $[\text{Ca}^{2+}]_i$: an initial high-amplitude phase (first phase), which was not inhibited by Ca^{2+} free medium, and a sustained low-amplitude phase (second phase), which was abolished by Ca^{2+} free medium. Medium hyperosmolarity (isotonic = 300mOsm, hypertonic = 338, 375, 450, and 600mOsm) suppressed both TRH-induced phases of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a dose dependent manner, however, the suppressive effect was clearly stronger in the second phase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ than in the first phase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Low doses of medium hyperosmolarity (338 and 375mOsm) suppressed PRL secretion, which was dependent on Ca^{2+} influx. However, high doses of medium hyperosmolarity (450 and 600mOsm) also blocked PRL secretion, which was dependent on Ca^{2+} mobilized from cytosolic Ca^{2+} pools. These data indicate that in GH_4C_1 cells medium hyperosmolarity may inhibit PRL secretion by both blocking Ca^{2+} influx and a mechanism unrelated to Ca^{2+} .

Key words : Hyperosmolarity, Prolactin, Calcium, GH_4C_1 cells

結 言

ホルモン分泌実験においては、細胞外浸透圧を等張にしておくことが重要であることは良く知られた事実である。また最近では、エクソサイトーシスにおいて、浸透圧が、直接関与している可能性も明らかにされている¹⁰。脳下垂体細胞よりのプロラクチン (PRL) 分泌も、細胞外浸透圧により影響されることが知られている [細胞外低浸透圧により促進¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾、高浸透圧により抑制⁸⁾⁹⁾]。ラット脳下垂体腫瘍細胞株 (GH₄C₁細胞) においては、細胞外低浸透圧によるプロラクチン分泌促進には細胞腫脹により生じた Ca²⁺チャンネルを通る Ca²⁺流入の増加が重要な因子であると考えられる⁹⁾³⁾¹⁰⁾⁴⁾。しかし、細胞外高浸透圧による分泌抑制の機序としては、分泌の最終段階にある細胞外膜と分泌顆粒膜の融合が浸透圧の力学的な力により直接妨げられると考えられているが¹¹⁾、その明かな機序 (特にセカンドメッセンジャーとの関係) は依然不明である。そこで今回、我々は、GH₄C₁細胞を用いて、細胞外高浸透圧が thyrotropin releasing hormone (TRH) 刺激による PRL 分泌をいかに抑制するかについて、細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) と PRL 分泌の動態の関係を中心に測定し検討した。なお、本研究の一部は既報⁵⁾に報告した。

研究材料と方法

1. 材料

[Ca²⁺]_i及び PRL 分泌測定実験中の灌流液は、既報の Krebs-Ringer Hepes Buffer (KRBH, pH = 7.4, 300mOsm) を用いた⁴⁾。Ca²⁺フリー灌流液 ((-)Ca²⁺KRBH) は KRBH における CaCl₂を NaCl で置き換え、かつ 0.03mM の EGTA を加えた。細胞外高浸透圧は、灌流液に膜透過性の無い蔗糖を直接加えて高張液を作成し、灌流液の浸透圧を変化させることにより調節した。灌流液浸透圧は Advanced DigiMatic Osmometer model 3D3 (誤差範囲 ± 1mOsm) を用いてチェックした。Fura-2/AM は Molecular Probes 社 (Eugene, OR, U. S. A) より、またイオノマイシンは Calbiochem 社 (La Jolla, Ca, U. S. A) より購入した。GH₄C₁細胞は Dr. Tashjian, Jr, A. H. よりプレゼントされた。

2. [Ca²⁺]_i測定

[Ca²⁺]_iは、既報のごとく⁴⁾、細胞をカバーガラス上に単相培養した後、Fura-2/AM (2 μM, 37°C, 30分) によりロードし、0.5ml のチャンバー内で灌流しながら、顕微鏡下での蛍光分光光度計を用いて2波長 (340nm, 380nm) を毎2秒おきに直接測定した。[Ca²⁺]_iは340/380比演算を用いて計算した。比演算に必要な [Ca²⁺]_i = 0nM 及び飽和濃度は、イオノマイシンを用いて求めた。また、Fura-2の励起スペクトルは、[Ca²⁺]_i = 0nM および飽和濃度において、両波長 (340nm, 380nm) とも、高浸透圧 (600mOsm) により変化がみられなかった。

3. PRL 分泌測定

PRL 分泌は、既報のように⁴⁾、3X10⁶個の細胞を0.2ml のプラスチックチャンバー内で灌流し (0.6ml/min), 流出液中 PRL を RIA で測定し、その分泌動態を30秒単位で解析した。

4. 統計計算, その他

統計計算は Student's t 検定, linear correlation, 及び comparing the equality of regression³⁾ を用いた。[Ca²⁺]_iデータの検討において、, TRH による第二相の値は、TRH 刺激後3分から4分間の値の平均値を用いた。

Fig. 1

Effect of medium Ca^{2+} on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and PRL secretory dynamics in GH_4C_1 cells in response to 10nM TRH. The horizontal closed bars indicate the duration of 10nM TRH stimulation (4 min). Experiments were performed as "crossover" studies. Half of the cell preparations were initially studied with a normal Ca^{2+} concentration in the medium followed by the study without Ca^{2+} in medium; in the other half the order was reversed. A: Mean dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with 1.5mM Ca^{2+} (solid line) or without Ca^{2+} (dashed line) in the medium, $N = 6$. B: Mean dynamics of PRL secretion with 1.5mM Ca^{2+} (solid line) or without Ca^{2+} (dashed line) in the medium.

Fig. 2

Effect of graded degrees of medium hyperosmolarity on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics induced by 10nM TRH. GH_4C_1 cells were perfused with hypertonic medium (338, 375, 450, and 600mOsm; 300mOsm = isotonic) 5 min before TRH stimulation. The horizontal closed bar indicates the duration of TRH stimulation. The numbers indicate the osmolarity (mOsm). Data are from a single experiment representative of 3 similar experiments in which the sequence of exposure with different doses of osmolarity was altered in each experiment.

研究結果

1. TRH 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及び PRL 分泌動態の細胞外 Ca^{2+} 濃度の影響

まず等張状態における, TRH 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と PRL 分泌の関係を検討した。細胞外 $[\text{Ca}^{2+}]_i = 1.5\text{mM}$ での基礎 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は, $175 \pm 12\text{nM}$ ($n=6$, mean $\pm$ SE) であった (Fig. 1A)。4分間の 10nM TRH 刺激により, 従来¹²⁾¹³⁾の報告と同様に, 急激な一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加 (第一相, $497 \pm 23\text{nM}$, $n=6$) とそれに続く軽度の継続的増加 (第二相, $285 \pm 31\text{nM}$) が見られた。

5分間の(一) Ca^{2+} KRBH灌流の前処置により、基礎 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、 $143 \pm 9 \text{ nM}$ ($n=6$, mean $\pm$ SE)と低下した。そして、(一) Ca^{2+} KRBH灌流下での、TRHにより増加した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の第一相は、ほとんど変化が無かったが、第二相は、ほぼ完全にブロックされた。

等張状態、細胞外 $\text{Ca}^{2+}=1.5 \text{ mM}$ での基礎PRL分泌は、 $2.5 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$ ($n=6$)であり、4分間の10nM TRH刺激により、2-3分に頂値を示す、PRLの急激な分泌が見られた (Fig. 1B)。

(一) Ca^{2+} KRBH灌流状態では、TRH刺激後1分間の初期の急激なPRL分泌には変化がみられなかったが、1.5分以後の分泌は明らかに抑制された ($P < 0.01$, Student's *t*-test)。

2. TRH刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態の、細胞外高浸透圧の影響。

高張KRBH灌流により、一過性に、基礎 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は低下したが、5分後にはほぼ前値に復帰した (Fig. 2)。灌流液を高張 (338, 375, 450, および600mOsm) にすることにより、TRH刺激により生じた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の第一相及び第二相は明らかに、用意依存性に抑制された (Fig. 2)。しかし、100%高張液灌流により第一相は20%のみ、第二相は、ほぼ完全にブロックされ、明らかに、第二相における抑制が第一相による抑制よりも強かった (Fig. 4)。

3. TRH刺激によるPRL分泌動態の、細胞外高浸透圧の影響。

高張KRBH灌流にて、基礎PRL分泌は有意に抑制されなかった (Fig. 3)。低、中濃度細胞外浸透圧 (338, 375, 450mOsm) は、始めにTRH刺激後、1.5分してから後のPRL分泌を抑制した。しかし、50%の高浸透圧灌流下においても、TRH刺激による初期 (1.5分間) のPRL分泌には変化が認められなかった。この初期のPRL分泌は、上記の実験結果 (Fig. 1参照) より、細胞内 Ca^{2+} プールからの動員により急激に増加した第一相の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に依存していると考えられる。しかし、この初期のPRL分泌も高濃度細胞外高浸透圧により、ほぼ完全にブロックされた (Fig. 3)。

Fig. 3 Effect of graded degrees of medium hyperosmolarity on PRL secretory dynamics induced by 10nM TRH. GH₄C₁ cells were perfused with hypertonic medium (338, 375, 450, and 600mOsm; 300mOsm = isotonic) 5 min before TRH stimulation. The horizontal closed bar indicate the duration of TRH stimulation. The numbers indicate the osmolarity (mOsm).

4. TRH 刺激後1.5分間 (第一相), 及びそれ以後 (第二相) における, 細胞外高浸透圧により抑制された $[Ca^{2+}]_i$ 及び PRL 分泌の関係。

Fig. 1の実験結果より, TRH 刺激により増加した $[Ca^{2+}]_i$ は細胞内 Ca^{2+} プール及び細胞外からの Ca^{2+} 流入により構成されており, それぞれによる $[Ca^{2+}]_i$ 増加は TRH 刺激1.5分前後の PRL 分泌に影響を与えていることから, TRH 刺激1.5分前後を第一相, 第二相と分けて, 細胞外高浸透圧によるそれぞれの相における両パラメーターの変化を検討した (Fig. 4)。第一, 二両相において, 細胞外高浸透圧は両パラメーターを用量依存性に抑制した。しかしながら, その両パラメーターの細胞外高浸透圧による抑制率は, 第二相においてはほぼ同様であったが, 第一相においては有意の差が認められた。

Fig. 4 Correlation of medium hyperosmolarity with the rises in $[Ca^{2+}]_i$ (open circles) and PRL (closed circles) secretion for the first phase (left panel) and the second phase (right panel) from the data in Figs. 2 and 3. Data are expressed as % of peak $[Ca^{2+}]_i$ and integral PRL secretion in isotonic medium.

考察および結語

従来より, 細胞外高浸透圧は種々の細胞において, エクソサイトーシスを抑制すると考えられている¹⁴⁾。この機序としては, 分泌の最終段階にある分泌顆粒膜と細胞外膜の癒合を力学的な力が直接妨げるとされている。化学浸透圧説¹⁵⁾によると, 分泌顆粒が最終的に細胞外膜と癒合するには, 分泌顆粒内浸透圧の上昇 [分泌顆粒内の浸透圧を構成する分子数の増加 (おそらく, 分泌顆粒内水素イオンと分泌顆粒外陽イオンとの交換の結果生じる) による] にともなう, 分泌顆粒の膨張が必要であるとされている。この化学浸透圧説は, 牛の脳下垂体からの PRL 分泌においても重要な因子であると報告されている¹⁶⁾。すなわち, 細胞外高浸透圧が分泌顆粒の膨張を直接力学的に抑制し, その結果, 分泌抑制を起こすと考えられる¹¹⁾。しかし, 細胞外高浸透圧が直接細胞内セカンドメッセンジャーを介して影響を与える可能性は検討されていない。

今回の我々の結果は、GH₄C細胞においては、細胞外高浸透圧による PRL 分泌の抑制は、一部、直接細胞内セカンドメッセンジャーを介して（細胞外からの Ca²⁺流入をブロックすることにより）生じる可能性を示唆している。本実験において、細胞外 Ca²⁺を取り除くことにより、TRH 刺激により増加する [Ca²⁺]_iの第二相が見られなかった。これは、従来のデータと一致しており¹²⁾¹³⁾、この [Ca²⁺]_iの第二相は細胞外からの Ca²⁺チャンネルを通る Ca²⁺流入に依存していることを示している¹³⁾。この Ca²⁺流入が、PRL 分泌にいかん、またどの時点の分泌に関与しているかはまだはっきりした結論はだされていないが¹³⁾、本実験においては、少なくとも TRH 刺激1.5分以後（第二相）の PRL 分泌に重要な影響を与えていることが観察された。

今回、細胞外高浸透圧により、TRH 刺激による [Ca²⁺]_iの第二相を主に抑制したが、この原因としては、1)細胞外からの Ca²⁺流入のブロックと、2)Ca²⁺流出や 3)Ca²⁺の細胞内の再分布の促進が考えられる。今回の実験に於いて、細胞外高浸透圧による [Ca²⁺]_iの第二相が、細胞外 Ca²⁺を取り除くことによりみられた反応とほとんど同様に、完全にブロックされたこと、また、細胞外高浸透圧が PRL 分泌の第二相を抑制した結果は、細胞外高浸透圧は細胞外からの Ca²⁺流入をブロックし、その結果、PRL 分泌も抑制される可能性が最も考えられる。しかし、細胞外高浸透圧による、Ca²⁺流出や Ca²⁺の細胞内の再分布の促進の可能性も否定はできない。

細胞外高浸透圧が Ca²⁺流入を抑制するとするならば、その機序としては、細胞外高浸透圧が Ca²⁺チャンネルを直接的、もしくは、間接的に影響を与えている可能性が考えられる。既報において、dihydropyridine (DHP) 感受性の Ca²⁺チャンネルを直接開くとされている BAY K 8644による [Ca²⁺]_iの増加は、100%の細胞外高浸透圧によりブロックされなかった⁵⁾。この結果は、細胞外高浸透圧が Ca²⁺チャンネルを間接的に影響を与えていることを示唆している。この間接的影響は、以下のいくつかの理由から、プロテイン キナーゼ C (PKC) を介しているのかも知れない。1) PKC は多くの細胞において、その細胞容積変化にともない活性化される¹⁷⁾。2)脳下垂体細胞において、フォボルエステル (PKC の活性化物質) の前処置は、特異的刺激物質による Ca²⁺チャンネルを通る Ca²⁺流入をブロックする⁷⁾。いずれにせよ、より詳細な機序を知るためには、電気生理学的手法等を用いての更なる研究が必要であろう。

今回の研究は、細胞膜上には細胞容積の変化に影響される Ca²⁺チャンネルが存在するとする我々の仮説⁹⁾をさらに支持していると考えている。すなわち、細胞容積の増加により開かれ⁹⁾³⁾¹⁰⁾、容積の減少により閉じられる⁵⁾Ca²⁺チャンネルが存在する可能性が考えられる。

以上、細胞外高浸透圧による PRL 分泌抑制においては、セカンドメッセンジャーとしての Ca²⁺動態異常の重要性を示唆した。しかし、Ca²⁺を介さない分泌抑制機序も明らかに存在していると考えられる。本研究において、100%の高浸透圧は TRH による [Ca²⁺]_i増加の第一相はほとんど抑制しなかったが、この細胞内 Ca²⁺プールからの動員によると考えられる [Ca²⁺]_i増加に依存している PRL 分泌は、600mOsm の高浸透圧により、ほぼ完全に抑制された。この分泌抑制の機序は今回明らかにされなかったが、従来より指摘されている、分泌の最終段階にある分泌顆粒膜と細胞外膜の癒合が直接妨げられているのかもしれない。

生体にとって、細胞外液の高浸透圧状態は臨床上、しばしば遭遇する病態である（糖尿病、脱水状態等）。今回の研究は、高浸透圧状態による細胞機能異常の一部にはカルシウムシグナル系を介して生じている可能性のあることを示唆している。

本論文の要旨は 14th International Diabetes Federation Congress (Washington D. C., 1991) にて発表した。

文 献

- 1) Greer, M.A. Greer, S.E. Opsahl, Z. McCafferty, L. and Maruta, S.: Hyposmolar stimulation of in vitro pituitary secretion of luteinizing hormone - a potential clue to the secretory process. *Endocrinology* 1983; 113: 1531-1533
- 2) Greer, M.A. Greer, S.E. Opsahl, Z. and Maruta, S.: Hyposmolar stimulation of secretion of thyrotropin, prolactin, and luteinizing hormone does not require extracellular calcium and is not inhibited by colchicine, cytochalasin B, ouabain, or tetrodotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1990; 193: 203-209
- 3) Sato, N. Wang, X. and Greer, M.A.: The rate of increase not the amplitude of cytosolic Ca^{2+} regulated the degree of prolactin secretion induced by depolarizing K^{+} or hyposmolarity in GH4C1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 170: 968-972
- 4) Sato, N. Wang, X. Greer, M.A. Greer, S.E. McAdams, S. and Oshima, T.: Medium hyposmolarity stimulates prolactin secretion in GH4C1 cells by inducing an increase in cytosolic free calcium. *Endocrinology* 1990; 127: 957-964
- 5) Sato, N. Wang, X. and Greer, M.A.: Medium hyperosmolarity depresses TRH-induced Ca^{2+} influx and prolactin secretion in GH4C1 cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 1991; 77: 193-198
- 6) Sato, N. Wang, X. and Greer, M.A.: Hormone secretion stimulated by ethanol-induced cell swelling in normal rat adenohypophyseal cells. *Am. J. Physiol.* 1991; 260 (Endocrinol. Metab. 23): e946-e950
- 7) Wang, X. Sato, N. Greer, M.A. Greer, S.E. and McAdams, S.: Cell swelling induced by the permeant molecules urea or glycerol induces immediate high amplitude thyrotropin and prolactin secretion by perfused adenohypophyseal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 163: 471-475
- 8) Greer, M.A. Greer, S.E. Opsahl, Z. and Maruta, S.: Comparison of hyposmolar and hyperosmolar effects on in vitro luteinizing hormone secretion by anterior pituitary cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1985; 178: 24-28
- 9) Sato, N. Wang, X. Greer, M.A. Greer, S.E. and McAdams, S.: The permeant molecule urea stimulates prolactin secretion in GH4C1 cells by inducing Ca^{2+} influx through dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels. *Mol. Cell Endocrinol.* 1990; 70: 273-279
- 10) Sato, N. Wang, X. Greer, M.A. Greer, S.E. and McAdams, S.: Evidence that ethanol induces prolactin secretion in GH4C1 cells by producing cell swelling with resultant calcium influx. *Endocrinology* 1990; 127: 3079-3086
- 11) Holz R.W.: The role of osmotic forces in exocytosis from adrenal chromaffin cells.

- Annu. Rev. Physiol. 1986; 48: 175-189
- 12) Gershengorn M.C.: Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. Ann. Rev. Physiol. 1986; 48: 515-526
 - 13) Tashjian A.H., Jr.: Hormone regulation of cytosolic free calcium and its functional consequences-the GH-cell model. Environ. Health. Perspect. 1990; 84: 27-30
 - 14) Rink, T.J. and Knight, D.E.: Stimulus-secretion coupling-a perspective highlighting the contribution of Peter Baker. J. Exp. Biol. 1989; 139: 1-30
 - 15) Pollard, H.B. Pazoles, C.J. Creutz, C.E. Scott, J.H. Zinder, O. and Hotchkiss, A.: An osmotic mechanism for exocytosis from dissociated chromaffin cells. J. Biol. Chem. 1984; 259: 1114-1121
 - 16) Lorensen, M.Y. and Jacobs, L.S.: Osmotic pressure regulation of prolactin and growth hormone release from bovine secretory granules. Endocrinology 1987; 120: 365-372
 - 17) Grinstein, S. Goetz-Smith, J.D. Stewart, D. Beresford, B.J. and Mellors, A.: Protein phosphorylation during activation of Na^+/K^+ exchange by phorbol esters and by osmotic shrinking-possible relation to cell pH and volume regulation. J. Biol. Chem. 1986; 261: 8009-8016
- (受付日: '91, 11, 27)
(採択日: '92, 1, 27)