

★P-373 GnRH 産生細胞株 GT1-7細胞に対する corticotropin-releasing hormone (CRH) の直接作用について

横浜市立大¹, 藤沢市民病院²村瀬真理子¹, 近藤芳仁¹, 稲田真愛¹, 平原史樹¹, 植村次雄²

【目的】ストレス時に視床下部において増加した CRH はオピエイトを介して GnRH パルスジェネレーターを抑制することが広く知られているが、ここ数年 in vivo 実験により CRH がゴナドトロピンの分泌を促進するとの報告もあり、CRH の GnRH パルスジェネレーターに対する直接作用は未だ明らかでない。そこで GnRH 産生細胞株 GT1-7細胞を用いて CRH の GnRH 分泌に対する直接作用を検討した。【方法】(1) GT1-7細胞は10%ウシ胎仔血清 (FBS) 添加 DMEM 中で継代した。GT1細胞より抽出した RNA を CRH 受容体 type1 (CRHR1) に特異的な primer を用いて RT-PCR を施行した。(2) 還流実験において、cytodex beads 付着 GT1細胞を DMEM で灌流し、GnRH 分泌が定常化した後、CRH を添加し GnRH 分泌を測定した。(3) 細胞培養実験において、CRH、さらに CRH 受容体拮抗薬 α helical CRH を同時添加培養し、培養液中の GnRH 濃度を調べた。【成績】(1) GT1-7細胞に CRHR1 に規定された1100bp の PCR 産物が得られ、その PCR 産物の塩基配列を sequencing により CRHR1 であることを同定した。(2) 灌流実験により CRH (10^{-10} M $\sim 10^{-6}$ M) は GnRH 分泌を濃度依存的に促進する傾向がみられた。(3) 細胞培養系において、培養液中 GnRH 濃度は CRH により濃度依存的 (10^{-10} M $\sim 10^{-6}$ M) に増加し ($P<0.01$)、この増加は α helical CRH 添加 (10^{-6} M) により抑制された。【結論】GT1細胞において CRHR1 の mRNA が存在することを初めて明らかにした。さらにこの受容体を介して CRH は GT1細胞からの GnRH 分泌に対して直接的かつ促進的に作用していることが示唆された。この結果は羊第3脳室内への CRH 投与が GnRH 分泌を促進するという最近の成績を支持する結果である。

P-374 GnRH 分泌調節における cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) subtype の役割

横浜市立大

榊原秀也, 吉田 浩, 大河内千鶴子, 平原史樹

【目的】GnRH ニューロンからの GnRH 分泌調節には cAMP が重要な役割をはたしている。今回、我々は cAMP の分解酵素である PDE に注目し、GnRH 分泌調節におけるその関与を検討した。【方法】去勢後 4 週の成熟 SD 雌ラットの視床下部より RNA を抽出し、PDE subtype のうち1A,1B,1C,3A,3B,4A,4B,4D に特異的な primer を用いて RT-PCR を施行した。更に、PDE 4D には4D1,4D2,4D3の3つの splice variant が存在するため、それを識別する primer set を作成して PCR-Southern blot を行った。次に、GnRH 分泌細胞である GT1細胞を培養した24-well plate および cytodex beads を詰めたカラムに PDE 阻害剤を投与し、24-well plate の60分間の培養上清およびカラム灌流液の6分毎の分画中の GnRH 濃度を RIA にて測定した。【成績】1. RT-PCR では3A,3B,4A,4B,4D の発現が認められた。2. Southern blot では4D1,4D2,4D3の発現が認められた。3. 培養実験では、非選択的 PDE 阻害剤 IBMX (1mM) および PDE4選択的阻害剤 rolipram (0.1mM) の投与で培養液中の GnRH 濃度がそれぞれ28%, 23% ($p<0.05$) 有意に増加した。4. 灌流実験では、IBMX (1mM) および rolipram (0.1mM) の投与により GnRH 分泌の速やかな増加が認められた。【結論】以上より、GnRH 分泌調節には PDE4D、なかでも protein kinase A によるリン酸化により活性化される PDE4D3が深く関与している可能性が示唆された。

15
日
(火)
ポ
ス
タ
ー

P-375 ラット視索前野における一酸化窒素合成酵素 mRNA の発現

日本医大¹, 同第一生理学²石原珠紀¹, 折笠千登世², 明楽重夫¹, 竹下俊行¹, 荒木 勤¹, 佐久間康夫²

【目的】GnRH の合成分泌の調節に関して一酸化窒素 (NO) 関与の詳細を明らかにするために NO の合成酵素である神経一酸化窒素合成酵素 (nNOS) mRNA の発現を、GnRH 細胞体が局在する視索前野 (POA) 前方と GnRH 細胞体がほとんど存在しない視索前野 (POA) 後方において調べた。【方法】26日齢で卵巣摘除しエストロゲンとプロゲステロンを投与し強制的に LH サージを引き起こした雌ラット (OVX+E+P) $n=5$ と、対照群として卵巣摘除した雌ラット (OVX) $n=5$ を用いて POA 前方と POA 後方の nNOS mRNA の発現を非 RI-in situ hybridization 組織化学によって検討を行った。さらに26日齢で去勢しエストロゲンとプロゲステロンを投与した雄ラット (GDX+E+P) $n=5$ と、去勢しただけの対照群 (GDX) $n=5$ においても同様に nNOS mRNA の発現の検討を行った。【成績】その結果 POA 前方では OVX+E+P 群は OVX 群に比べて nNOS mRNA の発現が有意に減少していることが明らかとなった。しかし POA 後方では OVX+E+P 群と OVX 群との間に有意な差は認められなかった。さらに雄ラットでも同様に26日齢で去勢しエストロゲンとプロゲステロンを投与したが (GDX+E+P), 去勢しただけの対照群 (GDX) とともに LH サージは引き起こされず、また POA 前方と POA 後方において GDX+E+P 群と GDX 群との間に nNOS mRNA の発現に有意差は認められなかった。【結論】NO は GnRH の合成分泌の調節に関与している可能性が示唆された。