

氏 名 (本国籍)	水谷内 香 里 (愛知県)
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 教授 川 島 光 夫
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第527号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	雌鶏のステロイドホルモン産生組織におけるカルシトニンの生理学的役割に関する研究
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 森 誠 副査 岐阜大学 教授 川 島 光 夫 副査 岐阜大学 准教授 岩 澤 淳 副査 信州大学 教授 小 野 珠 乙

論 文 の 内 容 の 要 旨

雌鶏のステロイドホルモン産生組織 (副腎と卵巣) における、カルシトニン (CT) の役割について、内分泌生理学的研究がなされた。

副腎にて産生されるステロイドホルモンのうち、副腎の皮質から分泌されるコルチコステロンは脳下垂体前葉から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によって産生が刺激され、カルシウムの恒常性維持に関与していることが知られている。また、卵巣の顆粒層細胞から放出されるプロジェステロンは脳下垂体前葉から分泌される黄体形成ホルモン (LH) によって産生が刺激され、卵管の子宮部 (卵殻腺部) に作用して卵殻の形成を制御している可能性が示唆されている。CTは鳥類においては鰓後腺から分泌され、骨 (破骨細胞)、卵管子宮部および腎臓に直接作用して、血中のカルシウムイオン濃度を低下させることが知られている。カルシウム代謝において CT と相補的な生理作用を有する副甲状腺ホルモン (PTH) は、副腎皮質に直接作用し、ACTH によるコルチコステロン産生量を増加させることが報告されている。しかしながら、CTについては、カルシウム代謝にかかわるステロイドホルモンの産生を制御するかどうかは不明であった。そこで本研究は、雌鶏の副腎皮質細胞と卵巣顆粒層細胞のそれぞれにおいて、CTが直接作用するかどうかを検討するためにCTのレセプター (受容体) と見なしうる物質が存在するかどうかを明らかにし、さらに副腎皮質細胞においてはACTHによるコルチコステロンの産生を、また卵巣顆粒層細胞においてはLHによるプロジェステロンの産生を制御しているかどうかを検討した。

産卵している雌鶏の副腎を採取し、パーコールを用いた密度勾配遠心分離法で副腎皮質細胞とその他の画分の細胞に分けた。それぞれの細胞の細胞膜画分を調製し、¹²⁵I

で標識したニワトリ CT (cCT) を用いて結合実験を行なった。その結果、cCT の特異的結合物質は 90% 以上が副腎皮質細胞の画分に相当する細胞膜画分に存在することを明らかにし、雌鶏の副腎における cCT の結合部位は皮質細胞であると推察した。さらに、副腎皮質細胞に存在する CT 結合物質は、cCT に対して結合特異性と結合飽和性を有し、高い結合親和性と限定的な結合容量を持っており、1 種類存在することを明らかにした。したがって、雌鶏の副腎皮質には CT のレセプターと見なされる物質が存在し、CT は副腎皮質に直接作用するものと推察された。次に、雌鶏の副腎皮質細胞を得た後、*in vitro* で培養実験を行なった。培養液に cCT を単独で加えてもコルチコステロンの産生量の変化は認められなかったが、cCT を ACTH とともに加えるとコルチコステロン産生に対する ACTH の反応性を高めることを明らかにした。以上のように CT は雌鶏の副腎皮質細胞に直接作用し、コルチコステロン産生に対する ACTH の反応性を増強することを明らかにした。また、鶏の排卵から放卵までの産卵周期中における CT レセプターの解離定数および結合量の変動の結果から、CT が副腎皮質細胞に対して顕著に生理作用を発揮すると見なされる時期は、卵殻形成終了時期の放卵 3 時間前から放卵 3 時間後であることを明らかにした。

卵巣においては、産卵している雌鶏の卵胞のうちプロジェステロンを最も多く産生する最大卵胞 (F1) の顆粒層細胞を採取し、遠心分離法で顆粒層細胞の細胞膜画分を調製して [125 I]cCT に対する結合実験を行なった。その結果、鶏の最大卵胞の顆粒層細胞には cCT に対して結合特異性と結合飽和性を有し、高い結合親和性と限定的な結合容量を持った、1 種類の CT レセプターと見なされる物質が存在することを明らかにした。*in vitro* で F1 の顆粒層細胞の培養を行なった場合、cCT を単独で培養液に加えてもプロジェステロンの産生量の変化は認められなかったが、cCT を LH とともに加えるとプロジェステロン産生における LH の感受性を低下させ、プロジェステロン産生量を減少させた。このことから、CT は鶏の F1 の顆粒層細胞に直接作用することにより、LH によるプロジェステロン産生を抑制することを明らかにした。以上のように本研究では、雌鶏において CT は副腎皮質細胞に作用して ACTH によるコルチコステロンの産生を高め、さらに卵胞顆粒層細胞においては LH によるプロジェステロンの産生を抑制することにより、卵殻形成期におけるカルシウム代謝を調節していることを示唆した。

審 査 結 果 の 要 旨

雌鶏において、ステロイドホルモンを産生する組織は主に副腎と卵巣である。これらの組織において産生されるステロイドホルモンのうち、副腎の皮質から分泌されるコルチコステロンは脳下垂体前葉から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によって産生が刺激され、カルシウムの恒常性維持に関与していることが知られている。また、卵巣の顆粒層細胞から放出されるプロジェステロンは脳下垂体前葉から放出される黄体形成ホルモン (LH) によって産生が刺激され、卵管の子宮部 (卵殻腺部) に作用して卵殻の形成を制御している可能性が示唆されている。カルシトニン (CT) は鳥類においては鰓後腺から分泌され、骨 (破骨細胞)、卵管子宮部および腎臓に直接作用して、血中のカルシウムイオン濃度を低下させることが知られている。カルシウム代謝において CT と相補的な生理作用を有する副甲状腺ホルモン (PTH) は、副腎皮質に直接作用し、ACTH によるコルチコステロン産生量を増加させることが報告されている。しかしながら、CT については、カルシウム代謝にかかわるステロイドホルモンの産生を制御するかどうかは不明であった。

そこで本博士論文は、副腎皮質細胞と卵巣果粒層細胞のそれぞれにおいて、CTが直接作用するかどうかを検討するためにCTのレセプター（受容体）と見なしうる物質が存在するかどうかを明らかにし、さらに副腎皮質細胞においてはACTHによるコルチコステロンの産生を、また卵巣果粒層細胞においてはLHによるプロゲステロンの産生を制御しているかどうかを検討した。その結果、副腎皮質細胞におけるCT結合物質は、CTに対して結合特異性と結合飽和性を有し、高い結合親和性と限定的な結合容量を持った1種類の物質であることを明らかにした。したがって、産卵鶏の副腎皮質にはCTのレセプターと見なしうる物質が存在し、CTは副腎皮質に直接作用するものと推察された。次に、産卵鶏の副腎皮質細胞を得た後、*in vitro*で培養実験を行なった。培養液にCTを単独で加えてもコルチコステロンの産生は見られないが、CTをACTHとともに加えるとコルチコステロン産生量に対するACTHの反応性を高めることを明らかにした。以上のようにCTは産卵鶏の副腎皮質細胞に直接作用し、コルチコステロン産生に対するACTHの反応性を増強することを明らかにした。また、産卵周期中におけるCTレセプターの解離定数と結合量の変動から、CTが副腎皮質細胞に対して最もその生理作用を発揮すると考えられるのは、卵殻形成終了時期の放卵3時間前から放卵3時間後であることを明らかにした。

次に本論文では、産卵鶏の卵巣のうちプロゲステロンを最も多く産生する最大卵胞（F1）の顆粒層細胞において $[^{125}\text{I}]$ CTに対する結合実験を行なった。その結果、ニワトリの最大卵胞の顆粒層細胞にはCTに対して結合特異性と結合飽和性を有し、高い結合親和性と限定的な結合容量を持った、1種類のCTレセプターと見なしうる物質が存在することを明らかにした。*in vitro*でF1の顆粒層細胞の培養を行なった場合、CTを単独で培養液に加えてもプロゲステロンの産生は見られないが、CTをLHと一緒に加えるとプロゲステロン産生におけるLHの感受性を低下させ、プロゲステロン産生量は減少させた。このことから、CTはニワトリのF1の顆粒層細胞に直接作用することにより、LHによるプロゲステロン産生を抑制することを明らかにした。

学術論文や本論文を通して水谷内香里は、雌鶏においてCTは副腎皮質細胞に作用してACTHによるコルチコステロンの産生を高めることと、卵巣顆粒層細胞においてLHによるプロゲステロンの産生を抑制することにより、卵殻形成におけるカルシウム代謝を調節しているのではないかと示唆した。このように、本博士論文は鳥類のみならず哺乳類のカルシウムイオン代謝ホルモンの一つであるカルシトニンの内分泌学や繁殖生理学に貢献する基礎研究として高く評価されている。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値があるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下の通りである。

- Calcitonin directly increases adrenocorticotrophic hormone-stimulated corticosterone production in the hen adrenal gland. *Poult. Sci.* 2009, 88(10):2199-2205, K. Nakagawa-Mizuyachi, T. Takahashi, and M. Kawashima.
- Calcitonin Directly Inhibits Luteinizing Hormone-Stimulated Progesterone Production in Granulosa Cells of the Largest Follicle of Hens. *J. Poult. Sci.* In press, K. Nakagawa-Mizuyachi, T. Takahashi, S. Kasai, H. Nakayama, and M. Kawashima.