

氏 名 (国籍)	JAROENPORN Sukanya (タイ王国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第260号
学 位 授 与 年 月 日	平成20年9月12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	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Regulatory Mechanism of Prolactin in Secretion of Steroid Hormones in Adrenal Gland of the Rat (ラット副腎におけるプロラクチンのステロイドホルモン 分泌調節機構に関する研究)
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 田 谷 一 善 副査 帯広畜産大学 教授 三 宅 陽 一 副査 岩 手 大 学 教授 橋 爪 一 善 副査 東京農工大学 教授 下 田 実 副査 岐 阜 大 学 教授 志 水 泰 武

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

副腎皮質からのコルチコステロン分泌に関しては、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)が主要な分泌促進ホルモンとして知られている。一方、副腎皮質にプロラクチン(PRL)リセプターの局在が明らかにされている。プロラクチン(PRL)は、ストレス刺激により下垂体前葉から分泌されるタンパク質ホルモンであるが、PRLの副腎に対する作用については、未解明である。本研究では、副腎のステロイドホルモン分泌調節におけるPRLの生理作用についてラットを用いて検討した。

第1章では、諸論として、プロラクチンの分泌、リセプターの構造と作用機序ならびに視床下部・下垂体・副腎軸について概説し、研究の目的を記述した。

第2章では、本研究に共通する実験材料と方法について記述した。

第3章では、拘束ストレス負荷時の副腎皮質反応に及ぼすPRLの生理作用に関する研究結果を記述した。本研究では、実験的に雄ラットにCB154を投与して作製した低PRLモデルと腎皮膜下に雌ラットの下垂体2個を移植して作製した高PRLモデルに拘束ストレスを負荷して、血中ACTH、PRL、コルチコステロンおよびプロジェステロン濃度を測定した。その結果、高PRLラットでは、血中ACTH濃度が対照群よりも低く、血中コルチコステロンとプロジェステロン濃度は高い値を示した。副腎細胞初代培養実験において、高PRLラットの副腎細胞から高濃度のコルチコステロンとプロジェステロン分

泌が認められた。ACTHにより分泌を刺激した場合にも高PRLラットの副腎細胞からのコルチコステロンとプロジェステロン分泌量は低プロラクチンラットよりも高値を示した。また、PRLは、いずれのモデルラット由来の副腎細胞に対してもACTHによるコルチコステロンとプロジェステロン分泌を増強させる効果が認められた。以上の結果から、血中のPRL濃度の違いによってストレス負荷時における視床下部・下垂体・副腎軸の反応が異なる事実および高プロラクチンモデルの副腎皮質細胞は、ACTHのコルチコステロンとプロジェステロン分泌反応性が高い事実を明らかにした。

第4章では、副腎皮質細胞のステロイドホルモン分泌調節系におけるプロラクチンの直接作用に関する研究結果を記述した。本研究では、雄ラット副腎細胞の初代培養系を用いて、コルチコステロンおよびプロジェステロン分泌に対するPRLの直接作用について検討した。副腎細胞の初代培養系ジェステロン、テストステロンおよびデヒドロテストステロンのいずれによってもコルチゾールの増加は認められなかった。一方、ACTH、PRL、エストラジオールとプロジェステロンでは、5日間の培養により細胞増殖作用が認められた。以上の結果から、PRLはヒト副腎細胞に対してコルチゾール分泌亢進と細胞増殖促進の作用を有する事実が判明した。

本研究において、PRLの新しい生理作用として副腎への作用が重要である事実を初めて明らかにした。また、プロラクチンの副腎への作用は、ラット以外の動物においても基本的な生理作用であろうと推察された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

動物に様々なストレスが負荷された場合、「視床下部・下垂体・副腎皮質軸」が主要な生体反応経路として知られている。視床下部からは、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)、下垂体前葉からは、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、副腎皮質からはグルココルチコイドが分泌される。一方、副腎皮質には、プロラクチン(PRL)リセプターの局在が明らかにされている。プロラクチン(PRL)は、ストレス刺激により下垂体前葉から分泌されるホルモンであるが、副腎に対する作用については未解明である。本研究では、副腎のステロイドホルモン分泌調節におけるPRLの生理作用についてラットを用いて検討した。

### 1. 拘束ストレス負荷時の副腎皮質反応に及ぼすPRLの生理作用

雄ラットにCB154を投与して作製した低PRLモデルと腎皮膜下に下垂体を移植して作製した高PRLモデルに拘束ストレスを負荷して、血中ACTH、PRL、コルチコステロンおよびプロジェステロン濃度を測定した。その結果、高PRLラットにおいて、血中ACTH濃度は低値を示し、血中コルチコステロンとプロジェステロン濃度は、高値を示した。副腎細胞初代培養実験では、高PRLラットの副腎細胞から高濃度のコルチコステロンとプロジェステロン分泌が認められた。ACTHにより分泌を刺激した場合にも高PRLラットの副腎細胞からのコルチコステロンとプロジェステロン分泌量は低プロラクチンラットよりも高値を示した。以上の結果から、高プロラクチンモデルの副腎皮質細胞は、コルチコステロンとプロジェステロン分泌反応性が高い事実を明らかにした。

### 2. 副腎皮質細胞のホルモン分泌調節系におけるプロラクチンの直接作用

副腎細胞の初代培養系にPRLを作用させた結果、コルチコステロンとプロジェステロン分泌量の容量依存的増加が認められた。また、ACTHとPRLの併用投与により、コルチコステロンとプロジェステロン分泌刺激作用の増強が認められた。PRLとJanus Kinase2(JaK2)阻害剤(AG490)を併用投与により、両ホルモンの分泌が抑制された。以上の結果から、PRLがラット副腎細胞からのコルチコステロ

ンとプロジェステロン分泌を直接刺激する事実が判明した。また、PRLの刺激作用は、JaK2活性を介する事実を明らかにした。

### 3. Hatano高回避系(HAA)および低回避系(LAA)ラットの副腎皮質細胞におけるACTHとPRLによるステロイドホルモン分泌能

HAAとLAA由来の初代副腎細胞にACTHとPRLを作用させるとLAAがHAAに比較してコルチコステロンとプロジェステロンの分泌量が多い事実が明らかとなった。ステロイドホルモン分泌に関与する細胞内因子であるStARとプロラクチンリセプター(PRLR-L)mRNAは、LAAが高い値を示した。ACTHによる刺激によりHAAラットの副腎細胞では、MC2RmRNAが上昇し、LAAではPRL刺激によりPRL-LmRNAが上昇した。ACTHあるいはPRLの刺激により両系統共にStARとCYP11A1が上昇したが、HAAよりLAAがStARmRNAの発現量が高値を示し、逆にCYP11A1の発現は低値であった。以上の結果から、LAAの副腎皮質細胞は、HAAに比べてストレス反応性が高いことが判明した。

### 4. ストレス負荷時におけるHatanoラットのPRLシグナリング

拘束ストレス負荷時における血中ACTH濃度は、HAAで高く、PRLはLAAで長期間分泌された。しかし、血中コルチコステロンとプロジェステロン濃度には両群間で差は認められなかった。リアルタイムPCRによる検討の結果、HAAでは、MC2RmRNAの発現が高くPRLRmRNAの発現が低かった。STAT5のリン酸化について検討した結果、両系統に差は認められなかった。次いで、CB-154により、PRL分泌を抑制した低プロラクチン状態で比較検討した結果、両系統共STAT5リン酸化は抑制された。HAAラットでは、CB-154投与によりコルチコステロンとプロジェステロン分泌に変化は認められなかったが、LAAラットでは、CB-154投与によりコルチコステロンとプロジェステロン分泌量が有意に低下した。以上の結果から、LAAの副腎皮質からコルチコステロンとプロジェステロン分泌にプロラクチンは重要な役割を演ずることが判明した。これらの結果は、ストレス時に分泌が亢進するプロラクチンは、LAAの副腎皮質からのコルチコステロンやプロジェステロンの分泌を促進することにより、ストレス耐性を増加すると推察された。

### 5. ヒト副腎ガン細胞由来細胞株(H295R)のコルチゾール分泌および細胞増殖活性における各種ホルモンの作用

H295Rを用いて各種ホルモンの作用を比較検討した結果、ACTHとPRLの添加によりコルチゾール分泌が促進されたが、エストラジオール、プロジェステロン、テストステロンおよびデヒドロテストステロンのいずれによってもコルチゾールの増加は認められなかった。一方、ACTH、PRL、エストラジオールとプロジェステロンでは、5日間の培養により細胞増殖作用が認められた。以上の結果から、PRLはヒト副腎細胞に対してコルチゾール分泌亢進と細胞増殖促進の作用を有する事実が判明した。

本研究において、PRLの新しい生理作用として副腎への作用が重要である事実を初めて明らかにした。

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獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Direct effects of prolactin on adrenal steroid release in male Hatano high-avoidance (HAA) rats may be mediated through Janus kinase 2 (Jak2) activity

著 者 名: Jaroenporn, S., Nagaoka, K., Ohta, R., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名: The Journal of Reproduction and Development

巻・号・頁・発行年: 53 (4): 887-893, 2007

- 2) 題 目: Physiological roles of prolactin in the adrenocortical response to acute restraint stress

著 者 名: Jaroenporn, S., Nagaoka, K., Kasahara, C., Ohta, R., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名: Endocrine Journal

巻・号・頁・発行年: 54(5): 703-711, 2007

- 3) 題 目: Comparative effects of prolactin vs. ACTH, estradiol, progesterone, testosterone and dihydrotestosterone on cortisol release and proliferation of the adrenocortical carcinoma cell line H295R

著 者 名: Jaroenporn, S., Furuta, C., Nagaoka, K., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名: Endocrine

巻・号・頁・発行年: 33(2): 205-209, 2008

- 4) 題 目: Differences in adrenocortical secretory and gene expression responses to stimulation *in vitro* by ACTH or prolactin between high- and low-avoidance Hatano rats

著 者 名: Jaroenporn, S., Nagaoka, K., Ohta, R., Shirota, M., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名: Stress

巻・号・頁・発行年: 13(3): 1-8, 2008

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目: Body temperature and circulating progesterone levels before and after parturition in killer whales (*Orcinus orca*)

著 者 名: Katsumata, E., Jaroenporn, S., Katsumata, H., Konno, S., Maeda, Y., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名: Journal of Reproduction and Development

巻・号・頁・発行年: 52(1): 65-71, 2006

- 2) 題 目: Effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on reproductive organs and fertility of adult male mice

著 者 名: Jaroenporn, S., Malaivijitnond, S., Wattanasirmkit, K., Trisomboon, H., Watanabe, G., Taya, K. and Cherdshewasart, W.

学術雑誌名: Endocrine

巻・号・頁・発行年: 30(1): 93-101, 2006

- 3) 題 目: Inhibition of stress-induced adrenocorticotropin and prolactin secretion mediating hypophysiotropic factors by antagonist of AMPA type glutamate receptor

著 者 名: Kusakawa, S., Tohei, A., Jaroenporn, S., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名: Journal of Reproduction and Development

巻・号・頁・発行年: 53(3): 545-554, 2007

- 4) 題 目: Assessment of fertility and reproductive toxicity in adult female mice after long-term exposure to *Pueraria mirifica* herb

著 者 名: Jaroenporn, S., Malaivijitnond, S., Wattanasirmkit, K., Watanabe, G., Taya, K. and Cherdshewasart, W.

学術雑誌名: Journal of Reproduction and Development

巻・号・頁・発行年: 53(5): 995-1005, 2007

- 5) 題 目: Effects of pantothenic acid supplementation on adrenal steroid secretion from male rats

著 者 名: Jaroenporn, S., Yamamoto, T., Itabashi, A., Nakamura, K., Azumano, I., Watanabe, G. and Taya, K.

学術雑誌名: Biological & Pharmaceutical Bulletin

巻・号・頁・発行年: 31(6): 1205-1208, 2008