

# Inhibitory Effect of Cyclosporin A on Prolactin Synthesis in GH3 Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8556">http://hdl.handle.net/2297/8556</a>

## シクロスポリンAの下垂体細胞における プロラクチン産生抑制効果についての研究

—培養 GH<sub>3</sub> 細胞を用いた検討—

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

永 井 幸 広

シクロスポリンA (cyclosporin A, CsA) は、免疫抑制作用のみならず、下垂体、副腎皮質、睪丸、膵ラ氏島などの内分泌器官にも作用し、それらの機能に影響を及ぼすことが知られている。本研究では、CsA の下垂体細胞におけるプロラクチン (prolactin, PRL) 放出および産生に及ぼす影響を知る目的で、培養ラット下垂体腫瘍細胞株 GH<sub>3</sub> 細胞に対する同薬剤の直接作用につき検討した。飽和状態の GH<sub>3</sub> 細胞を種々の濃度の CsA にて24時間培養したところ、培地内 PRL 含量は CsA 非存在下に比して、100ng/ml CsA では 71.5% ( $p < 0.01$ ), 2000ng/ml CsA では 54.2% ( $p < 0.0005$ ) と用量依存性に抑制された。一方、CsA により細胞内 PRL 含量には有意な変化は認められなかった。CsA の PRL 分泌抑制作用は 100ng/ml CsA 添加後 12時間以降で有意であった。また、100ng/ml CsA 存在下で24時間培養後に CsA を除去し、さらに培養した細胞では、PRL 分泌量は CsA 非添加対照と同程度まで回復したことより、CsA の PRL 分泌抑制作用は可逆性の変化であると考えられた。次に、種々の PRL 分泌刺激、すなわち甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone, TRH), 血管作動性腸ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP), ホルボールエステル (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA), ジブチリルサイクリック AMP (N<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3': 5'-monophosphate, Bt<sub>2</sub>cAMP), カルシウムイオノフォア (A23187) 等を加えた場合の GH<sub>3</sub> 細胞の PRL 放出あるいは生合成に対して、CsA がいかなる影響を及ぼすかについて検討した。TRH, VIP, TPA, Bt<sub>2</sub>cAMP, A23187 の PRL 放出促進効果に対しては、CsA は特に影響を及ぼさなかった。一方、TRH, VIP, TPA, Bt<sub>2</sub>cAMP により誘導される PRL 生合成は、明らかに CsA により抑制された。PRL mRNA に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションでは、CsA により PRL mRNA の発現量は減少することが示された。以上より、CsA は PRL 遺伝子の発現を抑制することにより PRL の生合成を低下させ、その結果として GH<sub>3</sub> 細胞の PRL 分泌を低下させるものと考えられた。

**Key words** cyclosporin A, prolactin synthesis, prolactin release, prolactin mRNA, GH<sub>3</sub> cell

シクロスポリンA (cyclosporin A, CsA) は、真菌の一種である *Tolypocladium inflatum Gams* から抽出された11個のアミノ酸からなる分子量1203の環状ポリペプチドであり<sup>1)</sup>、強力な免疫抑制効果を有することから、臓器移植における拒絶反応予防<sup>2)3)</sup>や、難治性ネフローゼ症候群<sup>4)5)</sup>、1型糖尿病<sup>6)7)</sup>、ベーチェット病<sup>8)</sup>などの治療に用いられている。CsA は、ヘルパーT細胞におけるインターロイキン2 (interleukin 2, IL-2) 遺伝子の転写を抑制することにより免疫抑制効果を発揮することが知られていた<sup>9)10)</sup>が、1984年、CsA が最初に作用する細胞内標的蛋白質、シクロフィリン (cyclophilin, CyP) が同定されたことにより、同薬剤の作用機序に関する研究に急速な進展が見られた<sup>11)</sup>。すなわち、CsA は CyP と複合体を形成し、Ca<sup>2+</sup> とカルモジュリンの存在下に CsA-CyP 複合体はカルモジュリン依存性の蛋白質脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (calcineurin) に結合し、その脱リン酸化酵素活性を阻害する<sup>12)13)</sup>。カルシニューリン

の基質である転写因子 (nuclear factor of activated T cells, NF-AT) は、脱リン酸化がうけられず核内への移行が阻害され、その結果 IL-2 遺伝子の転写が抑制されることが明らかとなってきた<sup>14)15)</sup>。興味深いことに、CyP およびカルシニューリンは免疫担当細胞だけでなく、神経細胞や、脳下垂体、副腎等の内分泌細胞にも存在することが分かっており、それらの蛋白質が免疫系以外の細胞でも何らかの生理的機能を担っている可能性が考えられる<sup>16)~18)</sup>。事実、CsA は睪丸でのアンドロゲン合成の抑制<sup>19)20)</sup>、副腎皮質機能の抑制<sup>21)22)</sup>、膵ラ氏島β細胞におけるインスリン分泌の抑制<sup>23)</sup>等、各種内分泌機能にも影響を及ぼすことが報告されている。著者も、CsA 投与中に著明な性腺機能低下を生じた症例を経験し<sup>24)</sup>、また、CsA 投与ネフローゼ症候群患者において、CsA の下垂体ホルモン分泌に及ぼす影響を検討した結果、甲状腺刺激ホルモン (thyrotropin, TSH)、プロラクチン (prolactin, PRL) の有意な低下と黄体刺激ホルモン

平成6年3月29日受付, 平成6年4月19日受理

Abbreviations: Bt<sub>2</sub>cAMP, N<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3': 5'-monophosphate; CsA, cyclosporin A; CyP, cyclophilin; DAG, diacylglycerol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FSH, follicle stimulating hormone; IL-2, interleukin 2; IP3, inositol triphosphate; LH, luteinizing hormone; NF-AT, nuclear factor of activated T

(luteinizing hormone, LH) および卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone, FSH) の低下傾向が認められたことを報告してきた<sup>25)</sup>。しかし、これまでの報告はすべて、生体内での検討結果であり、CsA の内分泌細胞に対する直接作用を検討した報告は少ない。そこで本研究では、培養ラット下垂体腫瘍細胞株 GH<sub>3</sub>細胞を用い、CsA の下垂体細胞における PRL 放出および産生に及ぼす直接的影響の有無について検討を行った。

#### 材料および方法

##### I. 試薬類

CsA はサンド薬品 (東京) より供与を受けた。[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (比活性 3000Ci/mmol) はアマシヤム・ジャパン (東京) の製品を用いた。ノニドット P-40, ホルボールエステル (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA), ジブチリルサイクリック AMP (N<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3': 5'-monophosphate, Bt<sub>2</sub>cAMP), カルシウムイオノフォア (A23187), トリパンブルーは Sigma (St. Louis, USA) 製を用いた。甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone, TRH) および血管作動性腸ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) はペプチド研究所 (箕面) より購入した。これ以外の試薬で特に会社名の記載のないものはいずれも和光純薬 (大阪) の製品を用いた。

##### II. 細胞培養

培養ラット下垂体腫瘍細胞株 GH<sub>3</sub>細胞は、1968年に Tashjian らにより樹立された細胞株であり<sup>26)</sup>、成長ホルモン (growth hormone, GH) および PRL を産生、分泌することが知られている<sup>27)</sup>。この細胞を12穴培養プレートに1穴あたり 2×10<sup>6</sup>個の密度となるように播種し、15% ウマ血清 (GIBCO, New York, USA), 2.5% 牛胎仔血清 (GIBCO) および 50U/ml ペニシリンと 50mg/ml ストレプトマイシンを含んだハム F-10 培地 (GIBCO) で培養し、飽和状態に達した後、以下の実験に供した。

##### III. CsA の PRL 分泌に対する影響

###### 1. 各種 CsA 濃度における培地中への PRL 分泌に対する効果

CsA は非親水性であるため、エタノールにて溶解し実験に用いた。また、対照としてエタノールを用いた。1, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000ng/ml の CsA 存在下あるいは非存在下にて24時間培養後、培地中の PRL 含量を測定した。

###### 2. 各種 CsA 濃度における細胞内 PRL 含量に及ぼす効果

1, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000ng/ml の CsA 存在下あるいは非存在下にて24時間培養後、培地を採取し、細胞をノニドット P-40 存在下に可溶化後、超音波破碎処理、アルカリ処理等により細胞内 PRL を抽出し (Walker らの方法<sup>28)</sup>), 細胞内 PRL 含量を測定した。また細胞内蛋白質量を市販の蛋白定量キット (BCA Protein assay reagent, Pierce, Rockford, USA) を用いて定量した。

###### 3. 培地中への PRL 分泌に及ぼす CsA の時間的効果

100ng/ml CsA 存在下あるいは非存在下にて 4, 8, 12, 24, 36, 48時間培養した際の培地中の PRL 含量を測定した。また、CsA の PRL 分泌に及ぼす影響が可逆性を有するか否かを

検討する目的で以下の実験を行った。すなわち、100ng/ml CsA 存在下あるいは非存在下にて24時間培養した後、培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて2回洗浄後、新たに CsA を含まない培地にて24時間ごと72時間まで培養し、各24時間ごとの培地中への PRL 分泌量を測定した。

##### 4. ラット PRL の測定

ラット PRL の測定は、市販のラットプロラクチン [<sup>125</sup>I] アッセイシステム (アマシヤム・ジャパン) を用いて測定した。本アッセイシステムの感度は 0.7ng/ml であり、測定内変動係数は 3.2%, 測定間変動係数は 7.9~8.1% であった。

##### 5. CsA の GH<sub>3</sub> 細胞に対する細胞毒性の有無の検討

CsA の GH<sub>3</sub> 細胞に対する細胞毒性の有無について、100ng/ml または 2,000ng/ml の CsA 存在下あるいは非存在下にて24時間培養した後、培地を除去し、PBS で細胞表面を洗浄した後、トリプシン/エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 液 (GIBCO) を用い、細胞を遊離させ細胞浮遊液を作成し、トリパンブルーを用いた色素排除法<sup>29)</sup>により、生細胞の割合を算出した。

##### IV. 各種 PRL 放出刺激に対する CsA の影響

CsA の作用機序をさらに検討する目的で、まず、細胞内貯蔵 PRL の放出レベルに対する CsA の影響について以下の実験を行った。すなわち、100ng/ml CsA 存在下あるいは非存在下にて5分間培養した後、各種 PRL 放出刺激薬剤を投与し、30分間培養後に培地内に放出された PRL 量を測定した。PRL 放出刺激薬剤として、0.2mM TRH, 0.2mM VIP, 100nM TPA, 0.5mM Bt<sub>2</sub>cAMP および 40mM A23187 を用いた。

##### V. 各種 PRL 生合成刺激作用に対する CsA の影響

次に、CsA が PRL 生合成に及ぼす影響について検討した。すなわち、100ng/ml CsA 添加あるいは非添加培地に、同時に各種 PRL 生合成刺激作用を有する薬剤を加え、24時間培養した後、培地中の PRL 含量を測定した。PRL 生合成刺激薬剤として、0.2mM TRH, 0.2mM VIP, 100nM TPA および 0.5mM Bt<sub>2</sub>cAMP を用いた。また、CsA の前処置により、その後の PRL 生合成系が影響を受けるか否かにつき以下の実験を行った。すなわち、あらかじめ 100ng/ml CsA 存在下あるいは非存在下にて24時間培養後、一旦培地を除去し、PBS にて細胞を3回洗浄した後、新たに 100ng/ml CsA 添加あるいは非添加培地を加え、同時に各種薬剤を添加させ、5時間後に培地を採取し PRL 含量を測定した。

##### VI. ノーザン (Northern) 法による RNA 解析

対数増殖期にある GH<sub>3</sub>細胞に 100ng/ml CsA 添加あるいは非添加し、24時間培養した後培地を除去し、チオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) 法<sup>30)</sup>により総 RNA を抽出した。すなわち、D液 (4M グアニジンチオシアン酸, 0.5%N-ラウオイルサルコシウムナトリウム, 25mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0), 0.1M 2-メルカプトエタノール) 500μl により細胞を溶解しチューブに移し変えた。2M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) 50μl, 水飽和フェノール 500μl, クロロホルム-イソアミルアルコール

cells; PBS, phosphate-buffered saline; PRL, prolactin; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, standard saline citrate; SSPE, standard saline phosphate EDTA buffer; TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; TRH, thyrotropin-releasing hormone; TSH, thyrotropin; VIP, vasoactive intestinal peptide

100 $\mu$ l を順次加え、添加ごとに10秒以上かけてよく混和し、15分間氷冷後、4 $^{\circ}$ Cで10000 $\times$ g、20分間遠心した。遠心後水層(上層)を別のチューブに移し、再び上記のフェノール抽出を行い得られた水層と等量のイソプロパノールを加え、よく混和し、-20 $^{\circ}$ Cに1時間おいた。その後、4 $^{\circ}$ Cで10000 $\times$ g、10分間遠心し上清を捨て、RNAの沈殿を75%エタノールで洗浄、さらに遠心後上清を吸引し、乾燥させた。得られたRNAを蒸留水500 $\mu$ lで溶解させてRNAの定量を行った。10 $\mu$ gあるいは20 $\mu$ gのRNA試料を1.1Mホルムアルデヒドを含む1.5%アガロースゲルで泳動し、ニトロセルロース膜BA85 (Schleicher & Schuell, New York, USA) にプロットングを行った後、80 $^{\circ}$ Cで2時間処理し固定した。プレハイブリダイゼーションはプレハイブリダイゼーション溶液 [50%ホルムアミド, 5 $\times$ 標準食塩リン酸ソーダ EDTA 緩衝液 (standard saline phosphate EDTA buffer, SSPE) (20 $\times$ SSPE: 3M塩化ナトリウム, 0.2M 磷酸二水素ナトリウム一水和物, 0.025M EDTA), 0.1% 牛血清アルブミン, 0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% フィコール, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 100 $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA] の中で37 $^{\circ}$ C, 2時間行った。ハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド, 5 $\times$ SSPE, 0.1% 牛血清アルブミン, 0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% フィコール, 0.1% SDS, 100 $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA および  $^{32}$ P 標識オリゴヌクレオチドプローブ) を加え、37 $^{\circ}$ Cで12時間以上ハイブリダイゼーションを行った。フィルターの洗浄は、まず3 $\times$ 標準クエン酸加食塩水 (standard saline citrate, SSC) (20 $\times$ SSC: 3M塩化ナトリウム, 0.3Mクエン酸ナトリウム), 0.1% SDS で室温下に30分間行い、次に0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS で室温下に30分間行った後、0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS で37 $^{\circ}$ C, 30分間行った。洗浄後、オートラジオグラフィは増感スクリーンを用い、-80 $^{\circ}$ Cで24時間行った。プローブとして、ラット PRL mRNA<sup>31</sup> の転写開始点より数えて121~162番目の42塩基に対して相補的となる合成オリゴヌクレオチド (5'-GTAGTGAGAAAGCATGACCACACGGTCAA-ACAGCTCCGGGAG-3') (宝酒造, 東京) を用いた。プローブの標識は [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP を標識基質として、5'末端標識法により

$^{32}$ P 標識し (比活性 1~2 $\times$ 10<sup>8</sup>cpm/ $\mu$ gDNA), ハイブリダイゼーション液中のプローブ濃度は10ng/mlとした。

#### Ⅶ. 統計学的処理

各測定値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (mean $\pm$ SD) で表わした。得られたデータの2群間の有意差検定は、Student の対応のないt検定法を用い、p<0.05を有意差ありとした。

### 成 績

#### Ⅰ. CsA の PRL 分泌に与える影響

24時間培養後の培地内 PRL 含量は、CsA によって用量依存性に抑制された。すなわち、CsA 非存在下培養後の PRL 含量 1668 $\pm$ 262ng/ウェルに比して、100ng/ml CsA 存在下では 1192 $\pm$ 153ng/ウェル (p<0.01), 2000ng/ml CsA 存在下では 904 $\pm$ 107ng/ウェル (p<0.0005) と有意に抑制されていた (図1)。CsA の PRL 分泌抑制効果の経時的推移を図2に示す。100ng/ml CsA を添加12時間後の培地中 PRL 含量は、CsA 非添加のその 79.8% と有意に低下し (p<0.05), 24時間後で 71.5% (p<0.01), 36時間後で 70.4% (p<0.05), 48時間後では 59.2% (p<0.05) であった。一方、細胞内 PRL 含量は、CsA 非存在下に比して、1~50ng/ml の CsA 存在下では、若干増加傾向を、500~2000ng/ml の CsA 存在下では逆に低下傾向を認められたが、いずれも有意な変化ではなかった (図3)。また、細胞内 PRL 含量の変化は、培地内 PRL 含量のそれに比べると極めて軽微であった。

次に、CsA により抑制された PRL 分泌能が、CsA 除去後に回復するか否かを検討した。CsA 除去・洗浄後24時間培養したものは、CsA で前処置した方が有意に培地内 PRL 含量は低下していたが (p<0.01), 除去後24~48時間の間に培地中に分泌された PRL 含量には低下傾向は認めるものの有意差はなく、除去後48~72時間のそれでは CsA 非前処置のものと同レベルであった (図4)。すなわち、CsA の PRL 分泌抑制効果は、CsA 除去後48時間以降には消失していたことから、可逆性の変化であると思われた。

#### Ⅱ. CsA の GH<sub>3</sub> 細胞に対する細胞毒性の有無

CsA が GH<sub>3</sub> 細胞に対して細胞毒性を有するか否かについて、

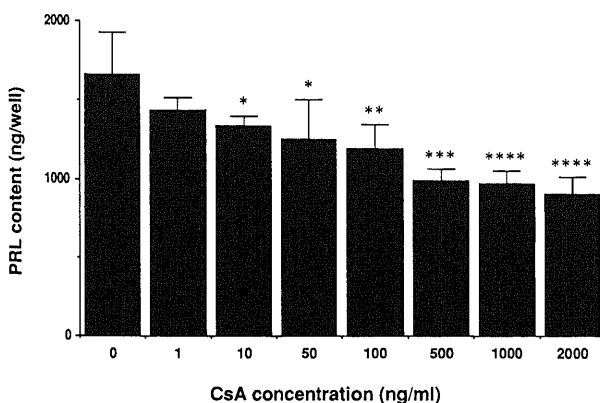


Fig. 1. Dose-dependent effect of cyclosporin A (CsA) on prolactin (PRL) secretion from GH<sub>3</sub> cells. After the incubation of confluent GH<sub>3</sub> cells with various concentrations of CsA for 24 hr, PRL released into the media were measured by radioimmunoassay (RIA). The values represent the mean $\pm$ SD (N=5). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0005 compared with control.

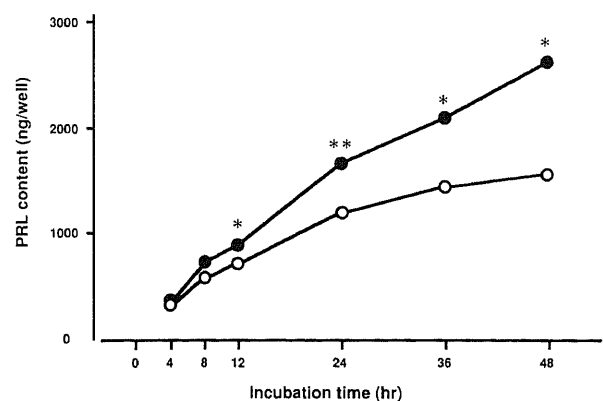


Fig. 2. Time course of the effect of CsA on PRL secretion from GH<sub>3</sub> cells. From the 0-time, the cells were maintained in the medium with (○) or without (●) 100 ng/ml CsA. The PRL contents in the media at 4, 8, 12, 24, 36 and 48 hr were measured by RIA. Each point is mean of triplicate samples. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared with control.

トリパングルーを用いた色素排除法で検討したところ、CsA 非添加では生細胞の割合は  $94.6 \pm 2.9\%$  であったが、100ng/ml CsA 添加にて  $93.1 \pm 2.4\%$ 、2000ng/ml CsA 添加では  $91.2 \pm 1.8\%$  と、CsA が高濃度になるほど生細胞の割合は減じたが、有意差は認めなかった (各々  $N=3$ )。また、細胞内蛋白量も CsA 添加および非添加では、有意差は認められなかった (図 5)。以上より、今回用いた CsA 濃度では、有意な細胞毒性は認められなかったといえる。

### Ⅲ. 各種 PRL 放出刺激に対する CsA の影響

まず、GH<sub>3</sub> 細胞内に貯蔵された PRL の放出刺激となるホルモンあるいは細胞内セカンドメッセンジャーの効果に、CsA が及ぼす影響を及ぼすか検討してみた。刺激薬剤を投与しないコントロール群では、30分間の培養時間中に培地中に放出された PRL 量は、CsA 非添加で  $5.5 \pm 0.3$ ng/ウェル、CsA 添加で

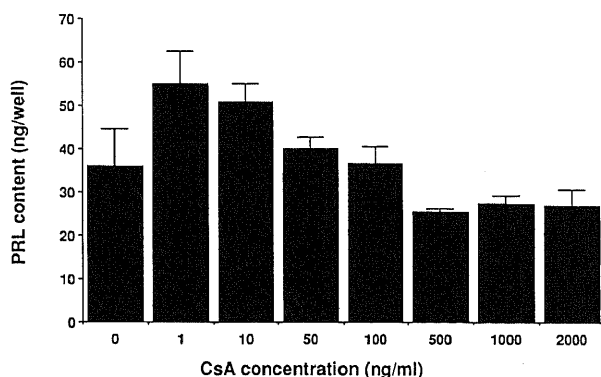


Fig. 3. Dose-dependent effect of CsA on the intracellular PRL contents in GH<sub>3</sub> cells. After the incubation of confluent GH<sub>3</sub> cells with various concentrations of CsA for 24 hr, the intracellular PRL contents were measured by RIA, as described in Materials and Methods. The values represent the mean  $\pm$  SD ( $N=3$ ).

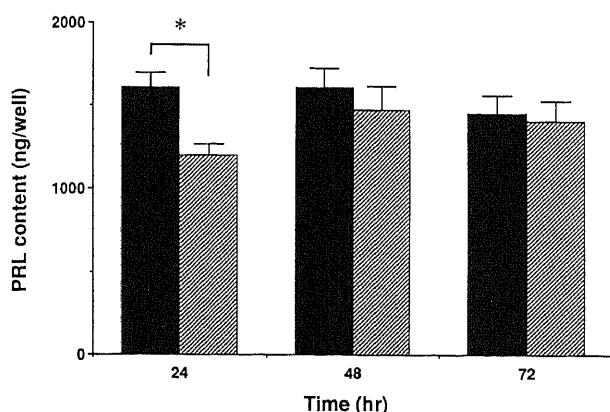


Fig. 4. Reversibility of the effect of CsA on PRL secretion from GH<sub>3</sub> cells. After the incubation of confluent GH<sub>3</sub> cells in the medium with (hatched column) or without (closed column) 100 ng/ml CsA for 24 hr, the medium was removed, and the cells were washed twice by phosphate-buffered saline. Then the cells were maintained with the fresh medium without CsA, and the medium was exchanged every 24 hr until 72 hr. The PRL contents released into the media every 24 hr were measured by RIA. The values represent the mean  $\pm$  SD ( $N=3$ ). \* $p < 0.01$  compared with control.

$5.6 \pm 0.8$ ng/ウェルであり、有意差は認めなかった。また、30分間の PRL 分泌量は、CsA 非添加対照に比し、TRH で10.4倍、VIP で9.7倍、TPA で9.9倍、Bt<sub>2</sub>cAMP で8.3倍、A23187 で14.2倍と各々明らかな増加を認めたが、それらは CsA 添加による影響を受けなかった (図 6)。すなわち、CsA は各種薬剤の PRL 放出刺激効果にはほとんど影響を与えなかった。

### Ⅳ. 各種 PRL 生合成刺激に対する CsA の影響

次に、PRL 生合成刺激作用を有するホルモンあるいは細胞内セカンドメッセンジャーの効果に、CsA が及ぼす影響を及ぼすか検討してみた。24時間の培養時間中に培地中に分泌された PRL 量は CsA 非添加で 1800ng/ウェル、CsA 添加で  $1367 \pm 42$ ng/ウェルであり、CsA は有意に PRL 分泌量を低下させた ( $p < 0.0005$ )。24時間の PRL 分泌量は、CsA 非添加対照に比し、TRH で1.8倍、VIP で1.2倍、Bt<sub>2</sub>cAMP で1.9倍、

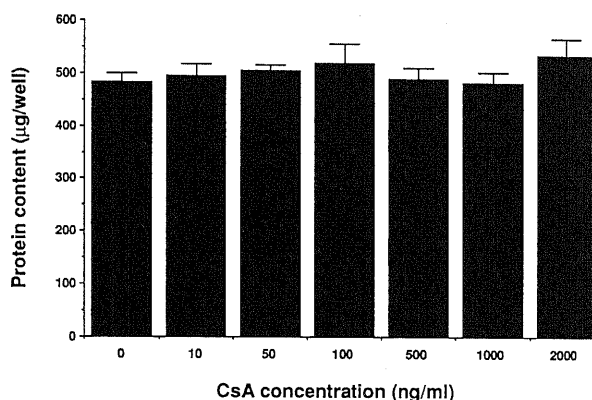


Fig. 5. Influence of CsA on cellular protein contents. After the incubation of confluent GH<sub>3</sub> cells with various concentrations of CsA for 24 hr, cellular protein was quantitated as described in Materials and Methods. The values represent the mean  $\pm$  SD ( $N=3$ ).

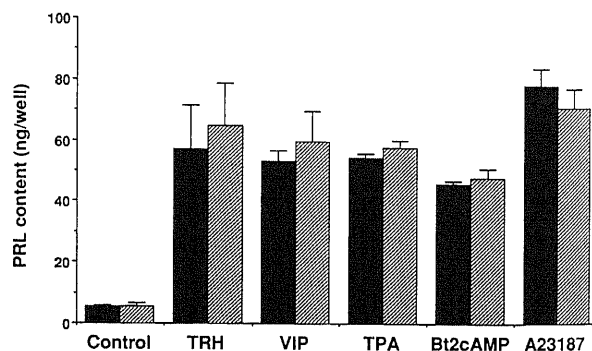


Fig. 6. Influences of CsA on PRL releases stimulated by various secretagogues. After the incubation of confluent GH<sub>3</sub> cells in the medium with (hatched column) or without (closed column) 100 ng/ml CsA for 5 min, various secretagogues, i.e., 0.2 mM thyrotropin-releasing hormone (TRH), 0.2mM vasoactive intestinal peptide (VIP), 100 nM 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), 0.5 mM dibutyl cAMP (Bt<sub>2</sub>cAMP) or 40 mM calcium ionophore A23187, were added, and the cells were incubated for 30 min. The PRL contents in the media were measured by RIA. The values represent the mean  $\pm$  SD ( $N=3$ ).

TPA で2.7倍と各々明らかな増加を認めた(図7)。一方、CsA は各種薬剤により増加した PRL 分泌量を、TRH で 69.6%、VIP で 69.3%、Bt<sub>2</sub>cAMP で62.1%と各々明らかに減少させたが、TPA のそれには影響を及ぼさなかった(図7、TRH; p<0.0005, VIP, Bt<sub>2</sub>cAMP; p<0.001)。しかし、PRL 分泌量は、CsA 添加対照に比し、TRH で1.7倍、VIP で1.1倍、Bt<sub>2</sub>cAMP で1.5倍であり、CsA 非添加の場合とほぼ同等であった。すなわち、CsA は、各種 PRL 生合成刺激に対する細胞の反応性には影響を及ぼさないと考えられた。

さらに、24時間の CsA 前処置の有無が、各種薬剤の PRL 生合成刺激作用に影響を及ぼすか否かにつき検討した。5時間の培養時間中に培地中に分泌された PRL 量は、CsA 非添加で 333±20ng/ウェル、CsA 添加で 138±8.7ng/ウェルであり、CsA は PRL 分泌量を有意に低下させた(p<0.0005)。5時間の

PRL 分泌量は、CsA 非添加対照に比し、TRH で1.3倍、Bt<sub>2</sub>cAMP で1.5倍、TPA で1.5倍と各々明らかに増加したが、VIP のそれは1.1倍であり明らかな変化はみられなかった。一方、CsA は各種薬剤により増加した PRL 分泌量を、TRH で 39.6%、VIP で 46.2%、TPA で 43.5% と各々明らかに減少させたが(図8、TRH, VIP; p<0.0005, TPA; p<0.005)、Bt<sub>2</sub>cAMP のみ有意な減少ではなかった(76.8%, p=0.10)。しかし、PRL 分泌量は、CsA 添加対照に比し、TRH で1.2倍、VIP で1.2倍、Bt<sub>2</sub>cAMP で2.8倍、TPA で1.5倍であり、CsA 非添加の場合に比して明らかな反応性の低下は認められなかった。以上より、特に CsA 前処置を加えても、CsA は各種試薬に対する細胞の反応性を低下させないと考えられた。

V. CsA の PRL mRNA レベルに対する影響

ノーザン法による CsA の PRL mRNA レベルに対する影響

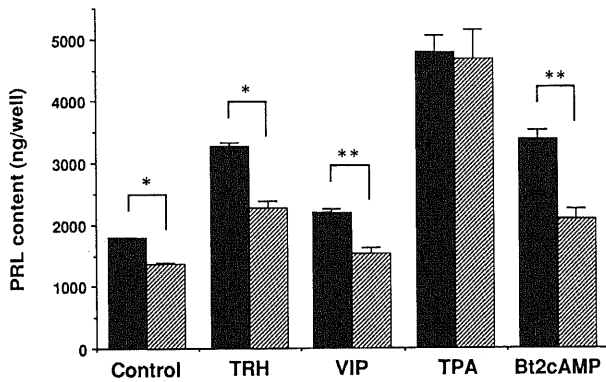


Fig. 7. Influences of CsA on the stimulated PRL syntheses by various secretagogues. Confluent GH<sub>3</sub> cells were incubated in the medium with (hatched column) or without (closed column) 100 ng/ml CsA and with various secretagogues, i.e., 0.2 mM TRH, 0.2 mM VIP, 100 nM TPA or 0.5 mM Bt<sub>2</sub>cAMP, for 24 hr. The PRL contents in the media were measured by RIA. The values represent the mean±SD (N=3). \*p<0.0005, \*\*p<0.001.

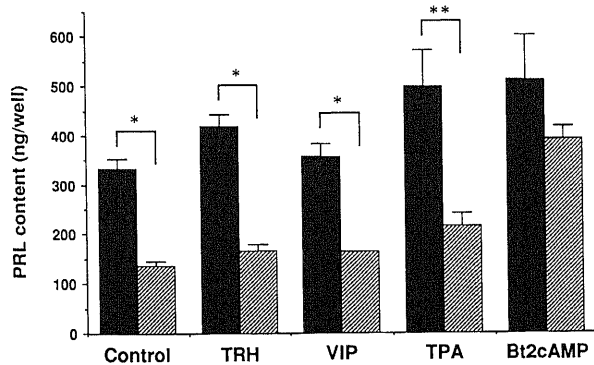


Fig. 8. Influences of pretreatment of CsA on PRL syntheses stimulated by various secretagogues. After the incubation of confluent GH<sub>3</sub> cells in the medium with (hatched column) or without (closed column) 100 ng/ml CsA for 24 hr, the medium was removed, and the cells were incubated in the fresh medium with or without 100 ng/ml CsA and with various secretagogues, i.e., 0.2 mM TRH, 0.2 mM VIP, 100 nM TPA or 0.5 mM Bt<sub>2</sub>cAMP, for 5 hr. The values represent the mean±SD (N=4). \*p<0.0005, \*\*p<0.005.

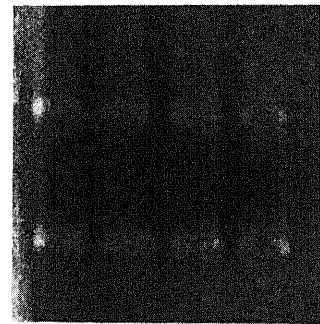
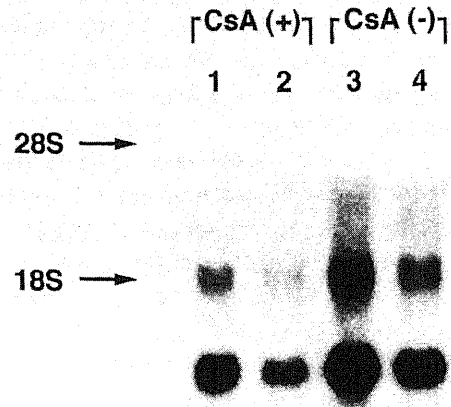


Fig. 9. Effects of CsA on PRL mRNA contents in GH<sub>3</sub> cells. After the incubation with or without 100 ng/ml CsA for 24 hr, the cells were harvested, and total cellular RNA was isolated by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction as described in Materials and Methods. Both 10 (lanes 2 and 4) and 20 μg (lanes 1 and 3) of total RNA were subjected to 1% formaldehyde-agarose gel electrophoresis and transferred to a piece of nitrocellulose filter for hybridization with oligonucleotide cDNA probe to rat PRL mRNA. Arrows indicate the relative migration of 28S and 18S RNAs run on the same gel. An RNA species comigrating with 18S RNA is a possible precursor of PRL mRNA. UV transillumination demonstrated equal quantities of RNA applied to ethidium bromide stained agarose gel (lower). CsA (+), with 100 ng/ml CsA; CsA (-), with buffer only.

の検討では、明らかに CsA 100ng/ml 添加の方が、非添加に比して PRL mRNA の発現は減少していた (図 9)。

### 考 察

PRL 分泌に及ぼす CsA の影響について検討した報告は極めて少ない。Cardon らは、ラットを用いた実験で、CsA 腹腔内投与 1 時間後に血清 PRL 濃度は約 4 倍に増加したと報告している<sup>29</sup>。しかし Davenport らは、ラットに CsA 15mg/kg を 21 日間投与したところ、血清 PRL 濃度および下垂体 PRL 含量に特に変化は認めなかったと述べている<sup>30</sup>。著者は以前、ネフローゼ症候群患者に対してその治療目的に CsA を一日 6mg/kg を 4~12 週間投与した際に、CsA の下垂体ホルモン分泌に及ぼす影響について検討したところ、PRL 分泌は CsA により有意に抑制されることを報告した<sup>29</sup>。これまでの検討はすべて生体内での CsA の効果を評価したものであり、間接的な因子の関与、すなわち視床下部での変化を介した可能性や、CsA による腎障害が何らかの因子を介して PRL 分泌に影響を及ぼした可能性等も考えられる。そこで今回著者は、CsA が直接下垂体に影響を及ぼすか否かを調べる目的で、培養ラット下垂体腫瘍細胞 GH<sub>3</sub>細胞を用いて、PRL 分泌に及ぼす CsA の直接効果の有無につき検討した。今回用いた GH<sub>3</sub>細胞は、1968 年 Tashjian らによりラット下垂体腫瘍細胞から株化された培養細胞であり<sup>29</sup>、GH および PRL を産生・分泌することが知られており、PRL 分泌に関しては、酵素処理によって分離された培養系の正常下垂体細胞と同様な分泌調節機構を備えていることが確認されている<sup>29</sup>。

今回の実験結果を要約すると以下のごとくである。すなわち、1) CsA は GH<sub>3</sub>細胞からの PRL 分泌を用量依存性に抑制した。2) CsA は細胞内 PRL 含有量には有意な変化を及ぼさなかった。3) CsA は GH<sub>3</sub>細胞における細胞内 PRL mRNA レベルを低下させた。4) CsA は GH<sub>3</sub>細胞からの PRL 放出を刺激する各種因子 (TRH, VIP, TPA, Bt<sub>2</sub>cAMP, A23187) の作用に対して、短時間 (30分) のインキュベーションでは影響を与えなかった。5) TRH, VIP, TPA, Bt<sub>2</sub>cAMP 等の PRL 生合成促進効果に対して CsA は抑制効果を示した。

まず、これらの結果を解釈する前に、PRL の生合成あるいは分泌に対して CsA が抑制効果を及ぼした場合に、その効果が CsA による単なる細胞障害の結果である可能性を検討しておく必要がある。結果に示した様に、トリパンブルーを用いた色素排除法での検討および細胞内蛋白量の検討では、今回用いた濃度の CsA では有意な変化を認めなかったこと、CsA 除去後に PRL 分泌能の回復が認められたこと、さらに CsA 存在下でも各種 PRL 分泌刺激に対する反応性が保持されていたこと等から CsA の細胞障害の結果を見ていることは否定的と思われる。また、実際に臨床で用いられている CsA は、血中濃度 (trough level) が 100~150ng/ml になるように投与量の設定がなされており、以前著者が PRL 分泌低下を報告したネフローゼ症候群症例においても同程度の投与量であったことから、今回用いた CsA の濃度は同薬剤が下垂体 PRL 産生細胞の機能に及ぼす直接効果を検討するために適したものであると思われる。

したがって、上述の結果は、CsA は GH<sub>3</sub>細胞において PRL 遺伝子の発現を抑制することにより選択的に PRL の生合成・分泌を低下させることを示唆する。PRL mRNA の減少に

も拘わらず細胞内 PRL 含有量には有意な変化が認められなかったことは、GH<sub>3</sub>細胞は生合成された PRL を細胞内に分泌顆粒として貯蔵することなく速やかに細胞外に放出するとされている<sup>29</sup>ことから、特に矛盾するものではないと思われる。

一方、TRH, VIP, TPA, Bt<sub>2</sub>cAMP, A23187 などの刺激に対して、30分という短時間では影響を与えずに、24時間の培養実験では抑制効果を示したことも、PRL の放出ではなく生合成が主に CsA により抑制されることを示唆すると共に、CsA による抑制効果は、それらの刺激因子が作用する細胞内情報伝達経路とは異なる経路を介して発現したものである可能性を推定させる結果と考えられる。一般に、TRH は細胞膜受容体と関連したホスホリパーゼ C を活性化し、1) ジアシルグリセロール (diacylglycerol, DAG) の増加による蛋白リン酸化酵素 C キナーゼの活性化および、2) イノシトール 3 リン酸 (inositol triphosphate, IP3) の増加による Ca-カルモジュリン系の活性化という二つの細胞内情報伝達系を介して PRL の放出および生合成を亢進させる<sup>30-36</sup>。一方、VIP は細胞膜受容体と結合後、アデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP を増加させることにより蛋白リン酸化酵素 A キナーゼを活性化し、PRL の放出および生合成を亢進させる<sup>37</sup>。細胞内セカンドメッセンジャーである TPA および Bt<sub>2</sub>cAMP は、各々 C キナーゼおよび A キナーゼを直接刺激することで<sup>38</sup>、またカルシウムイオンフォア A23187 は細胞内遊離 Ca 濃度を上昇させることにより PRL 放出および生合成を亢進させる<sup>39</sup>。各種刺激後短時間での PRL 分泌は、貯蔵 PRL を放出するまでの細胞内情報伝達系の変化を表わしていると考えられるが、それには CsA は特に影響を及ぼさないという今回の結果は、CsA が細胞内情報伝達系に関与する IP3 代謝、Ca<sup>2+</sup>濃度、各種プロテインキナーゼ活性等に影響を及ぼさないとする、これまでの報告<sup>40</sup>に矛盾しないものである。PRL の生合成を主に反映すると考えられる 24 時間の培養実験において、培地中に分泌された PRL 量は明らかにどの薬剤においても CsA で抑制された。PRL mRNA の発現が CsA により抑制されたことを考えあわせると、CsA は PRL 遺伝子の転写レベルを阻害している可能性が強いと思われる。遺伝子転写レベルにおける CsA の抑制的作用に関しては、T リンパ球の IL-2 遺伝子発現で研究が進んでおり、以下の機序が明らかとなっている。すなわち、CsA は細胞内 CsA 結合蛋白である CyP に結合し、CsA-CyP 複合体を形成する<sup>41</sup>。CyP は、分子量 18 キロダルトン、163 残基のアミノ酸からなる可溶性蛋白で、哺乳類では殆どすべての組織に総蛋白量 0.1~0.4% の存在比で存在しており<sup>42</sup>、ヒト T リンパ球、ラット脳より単離されずそのアミノ酸配列も解明されている<sup>43</sup>。また、CyP は細胞内ペプチジル・プロリル・シストランズ・イソメラーゼ (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) と同一であることも判明している<sup>17,18</sup>。この CsA-CyP 複合体が、Ca<sup>2+</sup>とカルモジュリン存在下でカルシニューリンに結合し、その脱リン酸化酵素活性を阻害する<sup>12,13</sup>。IL-2 遺伝子の転写因子 NF-AT の細胞質成分は脱リン酸化を受けられず、その結果核内への移行が阻害され、IL-2 遺伝子の転写が抑制されると考えられている<sup>14,15</sup>。GH<sub>3</sub>細胞においても、これと類似した機序により PRL 遺伝子の転写が阻害されていることが可能性の一つとして考えられ、本実験系はホルモン産生・分泌細胞で CyP やカルシニューリンが果たしている役割を検討する上でも興味深い系であると思われる。

近年、免疫担当細胞で産生、放出される多くのサイトカインが末梢あるいは中枢の内分泌細胞に直接作用しホルモン分泌に影響を及ぼすこと、下垂体や視床下部における内分泌細胞自体が各種サイトカインを分泌すること、また免疫担当細胞自体が種々のホルモンを分泌すること等が明らかとなり、いわゆる「神経-内分泌-免疫相関」という概念が提唱されている<sup>40)</sup>。PRLと免疫系に関しては、1989年Russellらによって、Tリンパ球およびBリンパ球の細胞膜にPRL受容体が存在することが示され<sup>41)</sup>、PRLはリンパ球の成長因子、免疫反応の刺激因子として認識されるようになった<sup>42)</sup>。実際、PRLが免疫調節作用を有することを示す成績として、Nagyらは、下垂体摘除ラットのリンパ球で羊赤血球に対する抗体産生が低下し、PRL投与によって回復することを報告している<sup>43)</sup>。また、Palestineらは、自己免疫性ブドウ膜炎にプロモクリプチンを投与し血清PRL濃度を低下させた場合、治療成績は改善しCsAの持つ免疫抑制効果が増強したと報告し<sup>44)</sup>、同様に、Larsonらは、心臓移植後患者にCsAを投与したところ、術後血清PRL濃度の低い群の方が、移植された心臓に拒絶反応が認められなかったと報告している<sup>45)</sup>。今回著者はCsAがPRL分泌を抑制することを報告したが、このことは臨床的には、CsAが生体内ではTリンパ球に対する直接作用に加えて、さらにPRL分泌低下を介する間接的な免疫抑制効果も発揮している可能性を示唆する事実とも考えられ興味深い。

## 結 論

培養ラット下垂体腫瘍細胞株GH<sub>3</sub>細胞を用いて、CsAの下垂体細胞におけるPRL分泌に及ぼす直接的影響を検討し、以下の結論を得た。

1. CsAは、GH<sub>3</sub>細胞におけるPRL分泌を添加後12時間以降において用量依存性に抑制した。一方、CsAは、細胞内PRL含量には影響を与えなかった。
2. CsAによるPRL分泌抑制効果は、CsA除去後48時間以降では消失したことより、可逆性の変化であると思われた。
3. CsAは、TRH、VIP、TPA、B<sub>2</sub>cAMP、A23187による細胞内貯蔵PRL放出には影響を及ぼさなかった。
4. CsAは、TRH、VIP、TPA、B<sub>2</sub>cAMPによるPRL生合成促進効果を抑制した。
5. CsAにより、細胞内PRL mRNA発現量は減少した。
6. 以上の結果は、CsAはGH<sub>3</sub>細胞におけるPRLの放出能には影響を及ぼさないが、PRL遺伝子発現を抑制することによりPRLの生合成を低下させることを示唆する。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表わします。また、終始直接の御指導を賜りました金沢大学第一内科宮腰久嗣前講師ならびに大沢謙三講師に深く感謝致します。さらに、本研究の遂行に多大な御協力を戴きました金沢大学第一内科第一研究室の諸先生に御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第63回日本内分泌学会学術総会(大阪、1990)において発表した。

## 文 献

1) Borel, J. F., Feurer, C., Gublerk, H. U. & Stahelin, H.: Biological effects of cyclosporin A: A new anti-lymphocytic agents. *Agents Action*, 6, 468-475 (1976).

2) European Multicentre Trial Group: Cyclosporin A as sole immunosuppressive agent in recipient of kidney allografts from cadaver donors. *Lancet*, 2, 57-60 (1982).

3) European Multicentre Trial Group: Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicentre trial. *Lancet*, 2, 986-989 (1983).

4) Tejani, A., Butt, K., Suthanthiran, M., Rosenthal, C. J., Trachtman, H. & Fusi, M.: Cyclosporin (CY) induced remission of relapsing nephrotic syndrome (RNS) in children. *Kidney Int.*, 29, 206 (1986).

5) 田辺達雄, 深沢佐和子, 安田卓二, 中村桜子, 松橋尚生, 東 徹, 中川昌一: Cyclosporine Aの難治性ネフローゼ症候群における臨床効果についての検討. *腎と透析*, 24, 459-464 (1988).

6) Stiller, C. R., Dupre, J., Gent, M., Jenner, M. R., Keown, P. A., Laupacis, A., Rodger, N. W., Graffenried, B. V. & Wolfe, B. M.: Effects of cyclosporin immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science*, 223, 1362-1367 (1984).

7) Assan, R., Feutren, G., Debray-Sachs, M., Quiniou-Debrie, M. C., Laborie, C., Thomas, G., Chatenoud, L. & Bach, J. F.: Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed type I diabetes mellitus. *Lancet*, 1, 67-71 (1985).

8) 稲葉午朗, 大野重昭, 浦山 晃, 桜木章三, 中島 章, 増田寛次郎, 小暮美津子: 非感染性眼内炎症を主徴とする疾患のシクロスポリン治療-ベージェット病を中心とする long-term open trial の成績-。 *炎症*, 6, 189-198 (1986).

9) Kronke, M., Leonard, W. J., Depper, J. M., Arya, S. K., Wong-Staal, F., Gallo, R. C., Waldmann, T. A. & Greene, W. C.: Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5214-5218 (1984).

10) Elliott, J. F., Lin, Y., Mizel, S. B., Bleackley, R. C., Harnish, D. G. & Paetkau, V.: Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by Cyclosporin A. *Science*, 226, 1439-1441 (1984).

11) Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J. & Speicher, D. W.: Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporine A. *Science*, 226, 544-547 (1984).

12) Liu, J., Farmer, Jr. J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. & Schreiber, S. L.: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66, 807-815 (1991).

13) McKeon, F.: When worlds collide: Immunosuppressants meet protein phosphatases. *Cell*, 66, 823-826 (1991).

14) Emmel, E. A., Verweij, C. L., Durand, D. B., Higgins, K. M., Lacy, E. & Crabtree, G. R.: Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science*, 246, 1617-1620 (1989).

15) DeFranco, A. L.: Immunosuppressants at work. *Nature*, 352, 754-755 (1991).

16) Dalgarno, D. C., Harding, M. W., Lazarides, A.,



- Handschumacher, R. E. & Armitage, I. M.:** <sup>1</sup>H NMR studies on bovine cyclophilin: Preliminary structural characterization of this specific cyclosporin A binding protein. *Biochemistry*, **25**, 6778-6784 (1986).
- 17) **Takahashi, N., Hayano, T. & Suzuki, M.:** Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, **337**, 473-475 (1989).
- 18) **Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. & Schmid, F. X.:** Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical protein. *Nature*, **337**, 476-478 (1989).
- 19) **Rajfer, J., Sikka, S. C., Lemmi, C. & Koyle, M. A.:** Cyclosporine inhibits testosterone biosynthesis in the rat testis. *Endocrinology*, **121**, 586-589 (1987).
- 20) **Sikka, C. S., Coy, D. C., Lemmi, C. A. E. & Rajfer, J.:** Effect of cyclosporine on steroidogenesis in rat Leydig cells. *Transplantation*, **46**, 886-890 (1988).
- 21) **Hirano, T., Yamada, K. & Oka, K.:** Effects of cyclosporine on adrenocortical stress response of Wistar rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **60**, 3-17 (1988).
- 22) **Rebuffat, P., Kasprzak, A., Andreis, P. G., Mazzocchi, G., Gottardo, G., Coi, A. & Nussdorfer, G. G.:** Effects of prolonged cyclosporine-A treatment on the morphology and function of rat adrenal cortex. *Endocrinology*, **125**, 1407-1413 (1989).
- 23) **Robertson, R. P.:** Cyclosporin-induced inhibition of insulin secretion in isolated rat islets and HIT cells. *Diabetes*, **35**, 1016-1019 (1986).
- 24) 永井幸広, 宮腰久嗣, 家城恭彦, 番度行弘, 臼田里香, 宮本市郎, 大沢謙三, 横山 仁, 友杉直久, 小林健一: シクロスポリンA投与後, 著明なゴナドトロピンの低下を示したKlinefelter症候群の一例. 日内分泌会誌, **67**, 33-41 (1991).
- 25) **Nagai, Y., Miyakoshi, H., Ohsawa, K., Ieki, Y., Takamura, T. & Kobayashi, K.:** Cyclosporine A inhibits the secretion of certain anterior pituitary hormone in patients with nephrotic syndrome. *Endocrinol. Jpn.*, **39**, 129-132 (1992).
- 26) **Tashjian, A. H., Yasumura, Y., Lawrence, L., Sato, G. H. & Parker, M. L.:** Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormones. *Endocrinology*, **82**, 342-352 (1968).
- 27) **Tashjian, A. H., Bancroft, F. & Levine, L.:** Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cell.: Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J. Cell. Biol.*, **47**, 61-70 (1970).
- 28) **Walker, A. M. & Farquhar, M. G.:** Preferential release of newly synthesized prolactin granules is the result of functional heterogeneity among mammatrophs. *Endocrinology*, **197**, 1095-1104 (1980).
- 29) 小山秀機: 細胞数計数法. 組織培養の技術 (日本組織培養学会編), 第2版, 25-28頁, 朝倉書店, 東京, 1988.
- 30) **Chomczynski, P. & Sacchi, N.:** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987).
- 31) **Cooke, N. E., Coit, D., Weiner, R. I., Baxter, J. D. & Martial, J. A.:** Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6502-6510 (1980).
- 32) **Cardon, S. B., Larson, D. F. & Russell, D. H.:** Rapid elevation of rat serum prolactin concentration by cyclosporine, a novel immunosuppressive drug. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **120**, 614-618 (1984).
- 33) **Davenport, A. T. & Hodson, C. A.:** Effect of cyclosporin treatment on luteinizing hormone and prolactin. *Life Sciences*, **50**, 1001-1006 (1992).
- 34) **White, B. A.:** Evidence for a role of calmodulin in the regulation of prolactin gene expression. *J. Biol. Chem.*, **260**, 1213-1217 (1985).
- 35) **Murdoch, G. H., Waterman, M., Evans, R. M. & Rosenfeld, M. G.:** Molecular mechanism of phorbol ester, thyrotropin-releasing hormone, and growth factor stimulation of prolactin gene transcription. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11852-1-1858 (1985).
- 36) **Bandyopadhyay, C. K. & Bancroft, C.:** Calcium induction of the mRNAs for prolactin and c-fos independent of protein kinase C activity. *J. Biol. Chem.*, **264**, 14216-14219 (1989).
- 37) **O'Dorisio, M. S., Wood, C. L., Wenger, G. D. & Vassallo, L. M.:** Cyclic AMP-dependent protein kinase in molt 4b Lymphoblasts: Identification by photoaffinity labeling and activation in intact cells by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and peptide histidine isoleucine (PHI). *J. Immunol.*, **134**, 4078-4086 (1985).
- 38) **Nishizuka, Y.:** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, **308**, 693-698 (1984).
- 39) **Laverriere, J. N., Tixier-Vidal, A., Buisson, N., Morin, A., Martial, J. A. & Gourdji, D.:** Preferential role of calcium in the regulation of prolactin gene transcription by thyrotropin-releasing hormone in GH3 pituitary cells. *Endocrinology*, **122**, 333-340 (1988).
- 40) **Isakov, N., Mally, M. I., Scholz, W. & Altman, A.:** T-lymphocyte activation: The role of protein kinase C and bifurcating inositol phospholipid signal transduction pathway. *Immunol. Rev.*, **95**, 89-111 (1987).
- 41) **Harding, M. W., Handschumacher, R. E. & Speicher, D. W.:** Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J. Biol. Chem.*, **261**, 8547-8555 (1986).
- 42) **Blalock, J. E.:** A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.*, **69**, 1-32 (1989).
- 43) **Russell, D. H., Kibler, R., Matrisian, L., Larson, D. F., Poulos, B. & Magun, B. E.:** Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: antagonism of prolactin binding by cyclosporine. *J. Immunol.*, **134**, 3027-3031 (1985).
- 44) **Jara, L. J., Lavalle, C., Fraga, A., Gomez-Sanchez, C., Silveira, L. H., Martinez-Osuna, P., Germain, B. F.**

- & Espinoza, L. R.: Prolactin, immunoregulation, and autoimmune diseases. *Semin. Arthritis Rheum.*, **20**, 273-284 (1991).
- 45) Nagy, E., Berczi, I. & Friesen, H. G.: Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **102**, 351-357 (1983).
- 46) Palestine, A. G., Nussenblatt, R. B. & Gelato, M.:

Therapy for human autoimmune uveitis with low-dose cyclosporine plus bromocriptine. *Transplant. Proc.*, **20**, 131-135 (1988).

- 47) Larson, D. F., Copeland, J. G. & Russell, D. H.: Prolactin predicts cardiac allograft rejection in cyclosporin immunosuppressed patient. *Lancet*, **2**, 53 (1985).

**Inhibitory Effect of Cyclosporin A on Prolactin Synthesis in GH<sub>3</sub> Cells** Yukihiro Nagai, Department of Internal Medicine ( I ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **103**, 585—593 (1994)

**Key words** cyclosporin A, prolactin synthesis, prolactin release, prolactin mRNA, GH<sub>3</sub> cell

#### Abstract

Cyclosporin A (CsA), a potent immunosuppressant, is known to have various effects on the endocrine systems including the pituitary gland, the adrenal cortex, the testes, and the pancreatic islets. In this study, the direct effects of CsA on prolactin release and synthesis in GH<sub>3</sub> cells, a clonal strain of rat pituitary tumor, were investigated. After the incubation of confluent GH<sub>3</sub> cells with various concentrations of CsA for 24 hr, prolactin levels in the media decreased in a dose-dependent manner: by 28.5% with 100 ng/ml CsA ( $p < 0.01$ ) and by 45.8% with 2000 ng/ml CsA ( $p < 0.0005$ ) compared with control cells. On the other hand, no significant changes were observed in the intracellular contents of prolactin. After removal of CsA from the medium, GH<sub>3</sub> cells fully recovered the secretory activity in the next 24-48 hr, thus indicating the reversibility of the inhibitory effects of CsA on prolactin secretion. The effects of various secretagogues, i.e., thyrotropin-releasing hormone (TRH), vasoactive intestinal peptide (VIP), 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), dibutyryl cAMP (Bt<sub>2</sub>cAMP), or calcium ionophore A23187, on prolactin release in GH<sub>3</sub> cells were not influenced by CsA. However, the stimulatory effects of TRH, VIP, TPA, or Bt<sub>2</sub>cAMP on prolactin synthesis were significantly inhibited by CsA. Northern blot analysis revealed a decrease in the prolactin mRNA level in the cells treated with CsA. In conclusion, it is suggested that CsA inhibits prolactin secretion by reducing the rate of biosynthesis, and its site of action may be on prolactin gene expression.