

ウシ副腎皮質細胞における cyclic AMP による 糖質コルチコイド産生への Ca^{2+} の関与に関する研究

松本 康訓 利田 美幸

東京慈恵会医科大学薬理学講座第1

(受付 平成16年7月21日)

INVOLVEMENT OF Ca^{2+} ON CYCLIC AMP-INDUCED CORTICOIDOGENESIS IN BOVINE ADRENOCORTICAL CELLS

Yasunori MATSUMOTO and Miyuki KAGATA

Department of Pharmacology (I), The Jikei University School of Medicine

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and calcium ion (Ca^{2+}) play important roles as intracellular messengers in the corticoidogenic effects of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in bovine adrenocortical (BA) cells. However, which messenger has a greater effect on ACTH remains controversial. The nonhydrolyzable cAMP derivative dibutyryl cyclic AMP (Bt_2cAMP) stimulates corticoidogenesis even in the absence of extracellular Ca^{2+} . Therefore, we examined the effect of nicardipine and EGTA on Bt_2cAMP -induced corticoidogenesis in the absence of extracellular Ca^{2+} in isolated BA cells. We also measured the mobilization of intracellular concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) by Bt_2cAMP in a primary cultured BA cell using the Ca^{2+} -imaging system. We found that: Bt_2cAMP (1 mM) and forskolin (10 μM) each enhanced corticoidogenesis time-dependently even in the absence of extracellular Ca^{2+} . However, the addition of nicardipine (2 μM) markedly inhibited corticoidogenesis induced by Bt_2cAMP or forskolin in the absence of extracellular Ca^{2+} . In addition, the Bt_2cAMP -induced corticoidogenesis was markedly inhibited by the addition of 1 mM EGTA. This inhibitory effect of EGTA was observed after 10 minutes' incubation. In the presence of extracellular Ca^{2+} ; Bt_2cAMP -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses increased slowly, with a time lag at 7 to 12 minutes, and peaked after approximately 20 minutes; in the absence of extracellular Ca^{2+} ; the gradual increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to Bt_2cAMP were observed with the Ca^{2+} -imaging system. Our results suggest that cAMP releases Ca^{2+} from BA cells to the extracellular space and Ca^{2+} follows to influx intracellularly via the cAMP-activated calcium channels. Our results also suggest that both cAMP and Ca^{2+} are required for on ACTH-induced corticoidogenesis.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2005; 120: 1-8)

Key words: adrenal cortex, corticoidogenesis, cyclic AMP, Ca^{2+}

I. 緒 言

ウシ副腎皮質束状層細胞 (BA 細胞) において, cyclic AMP (cAMP) が副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH) による糖質コルチコイド産生 (ステロイド産生) に必須

であることはよく知られている¹⁾²⁾. ACTH は ACTH レセプターに結合すると, それと連関している Gs タンパクを介して adenylyl cyclase を活性化し, cAMP 産生を刺激する. 産生された cAMP は protein kinase A 活性化を介してステロイド産生を促進する. 一方, Ca^{2+} が ACTH の

細胞内メッセンジャーであり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が cAMP 上昇よりもステロイド産生促進に重要な役割を持っているという報告がある³⁾⁴⁾。柳橋らはウシ副腎皮質束状層細胞において、細胞内 cAMP 濃度の上昇を生じない生理的低濃度の ACTH により、細胞外 Ca^{2+} 存在下でステロイド産生が刺激されること³⁾、そして ACTH の作用が dihydropyridines により抑制されることを示した⁴⁾。

すなわち、生理的濃度の ACTH は電位依存性カルシウムチャネル (voltage-operated Ca^{2+} channel: VOC) を活性化することにより細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進し、その結果ステロイド産生が刺激されることを示唆した⁴⁾。一方、Sala らは高感度の測定法を用いて、ラット副腎皮質細胞における ACTH による cAMP 産生を測定し、ステロイド産生能と比較検討した結果、低濃度 ACTH でも細胞内 cAMP 濃度を上昇させることを報告し、ACTH の作用は cAMP が中心となり発現するものと考えた⁵⁾。しかしながら、彼等の実験は細胞外 Ca^{2+} の存在下で行われたため、cAMP による細胞外からの Ca^{2+} 流入によりステロイド産生が促進した可能性も考えられる。この様に ACTH のステロイド産生促進作用に対し、cAMP と Ca^{2+} のどちらが主として関与しているのかははまだ明確にされていない。一方、膜透過性 cAMP 誘導体である dibutyryl cyclic AMP (Bt_2cAMP) が、細胞外 Ca^{2+} 非存在下でもステロイド産生を刺激することが報告されている⁴⁾。この場合、細胞外 Ca^{2+} 非存在下において Bt_2cAMP がステロイド産生に関与しているとするならば、 Bt_2cAMP による直接的なステロイド産生刺激と、 Bt_2cAMP 刺激によって細胞内から細胞外へ放出された Ca^{2+} が、カルシウムチャネルを介して細胞内へ再流入することによる Ca^{2+} を介したステロイド産生刺激の 2 つが考えられる。そこで後者の可能性の有無を知るために、我々は BA 細胞を用い、細胞外 Ca^{2+} 非添加条件下において、 Bt_2cAMP 刺激によるステロイド産生に対する VOC 阻害薬である nifedipine⁶⁾ やカルシウムキレーターである EGTA の効果を検討した。また、単一培養 BA 細胞を用いた Bt_2cAMP 刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変動の観察も行った。

II. 方 法

1. ウシ副腎皮質遊離束状層細胞の採取

遊離 BA 細胞はウシ副腎皮質組織から trypsin 処理法で得た³⁾。この方法を簡潔に述べると、可及的速やかに屠畜場から運んできたウシ副腎皮質を細切し試料として用いた。緩衝液として Ca^{2+} を含まない Krebs-Ringer-bicarbonate-glucose-albumin 緩衝液 (123 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25.0 mM NaHCO_3 , 2 mg/ml glucose, 3 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 0.01 mM EGTA; pH 7.4) (Ca^{2+} -free KRBGA) に 0.25% trypsin を加えて使用した。37°C, 95% O_2 -5% CO_2 気相下で、副腎皮質を Ca^{2+} -free KRBGA でインキュベーションし、採取した細胞浮遊液を遠心した。その細胞を trypsin 阻害薬含有の Ca^{2+} -free KRBGA で懸濁し、trypsin 作用を停止させ実験に用いた。細胞は $13\text{-}36 \times 10^4$ cells/0.5 ml になるよう調整し、ステロイド産生実験に用いた。

2. ステロイド産生の測定

Trypsin 処理によって得られた遊離 BA 細胞 ($13\text{-}36 \times 10^4$ cells/0.5 ml) に Bt_2cAMP , nifedipine 等を添加し、95% O_2 -5% CO_2 気相下、37°C の条件下でインキュベーションし、dichloromethane で反応を止めステロイドを抽出した³⁾。ステロイドホルモン定量は Slavinski らの方法⁷⁾ を用いて行い、cortisol を標準ステロイドとした。

3. ウシ副腎皮質束状層細胞の初代培養

BA 細胞は collagenase 処理法にて無菌的に調整し初代培養した⁸⁾。方法を簡潔に述べると、屠畜場から運んできたウシ副腎を周囲の脂肪を除去後、火炎滅菌した。滅菌済み Ca^{2+} -free KRBGA にて洗浄、髄質を除去し皮質を細切した。この皮質細切片を 0.1% collagenase I, 0.005% deoxyribonuclease I および 1.2 mM CaCl_2 含有の KRBGA 中で 37°C, 5% CO_2 気相下でインキュベートし、その後ピペッティングにより細胞を遊離し、副腎皮質束状層細胞を採取した。得られた細胞を 5% fetal calf serum, 10% newborn calf serum, 2.5% horse serum および抗生物質を含有する滅菌 Ham F-10 培養液に懸濁し、Cellmatrix で処理したカバーグラスに播種し、37°C, 5% CO_2

培養器で初代培養した。実験には3~4日培養した細胞を使用した。

4. カルシウムイメージング

カバーガラスに播種した初代培養 BA 細胞を用いて実験を行った。まず, Krebs-Ringer-HEPES-glucose-緩衝液 (123 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 10.0 mM HEPES, 2 mg/ml glucose, 0.01 mM EGTA, 1.2 mM CaCl₂; pH 7.4) (KRHG) に cremophor EL と蛍光性カルシウム指標薬である fura 2/acetoxymethyl ester (fura 2/AM) を添加し, 10% cremophor EL, 5 mM fura 2/AM 含有 KRHG を調整した。この緩衝液で 37°C, 90 分インキュベートし, 細胞に fura 2 を負荷して実験に用いた⁸⁾。

カルシウム測定には超高感度 CCD カメラを備えた倒立顕微鏡 (ニコン TE300), 蛍光画像解析プログラム (浜松ホトニクス Aquacosmos) を使用した。まず, 細胞を播種したガラス板とチェンバーをグリースで接着, 固定し顕微鏡にセットする。細胞が乾燥しないように, 常に KRHG で灌流した。そして Bt₂cAMPm など刺激して, fura 2 蛍光強度を蛍光波長 (510 nm) と励起二波長 (380 nm と 340 nm) により測定した。細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) の変動は 340 nm および 380 nm で励起した時の蛍光強度の比 (I₃₄₀/I₃₈₀) で表した⁸⁾。

5. 試薬

Bt₂cAMP, nifedipine, forskolin, deoxyribonuclease I, Ham F-10, ウシおよびウマ血清は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) より, collagenase I はフナコシ社 (東京) より, fura 2/AM は Dojindo Lab (熊本) より, Cellmatrix は新田ゼラチン社 (大阪) より購入した。その他の試薬はすべて特級を用いた。

III. 結 果

1. Bt₂cAMP 刺激によるステロイド産生に対する nifedipine の効果

遊離 BA 細胞における Bt₂cAMP 刺激ステロイド産生に対する VOC 阻害薬である nifedipine の効果を検討した。細胞外に添加した Bt₂cAMP は細胞内に移行し, 細胞外に Ca²⁺ を添加しなくてもステロイド産生を刺激する⁴⁾。そこで, 細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下で 1 mM Bt₂cAMP

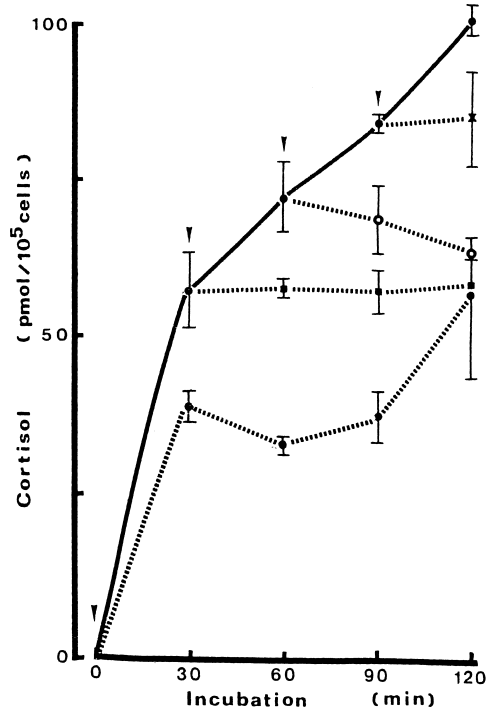


Fig. 1. Effect of nifedipine on Bt₂cAMP-induced corticoidogenesis in BA cells in the absence of extracellular Ca²⁺.

BA cells were incubated with 1 mM Bt₂cAMP in Ca²⁺-free KRBGA for the times shown (●—●). After BA cells were started to incubate, these were added 2 μM nifedipine at 0 (··●··), 30 (··■··), 60 (··○··) and 90 min (··x··), respectively. Each value represents the mean ± S.E. of triplicate determinations.

によりステロイド産生刺激を行ったところ, インキュベーション時間依存的にステロイド産生を促進した (Fig. 1)。そして, インキュベーション開始 30 分後, 60 分後, 90 分後に 2 μM nifedipine を添加したところ, すべてにおいて Bt₂cAMP 刺激によるステロイド産生は nifedipine 添加後, 完全に抑制された。また, インキュベーション開始と同時に nifedipine を添加した場合, 30 分インキュベーション後の Bt₂cAMP によるステロイド産生量は nifedipine 無添加時と比べて約 30% の抑制を示したが, 30 分以後は著しい抑制傾向が観られた。

2. Bt₂cAMP および nifedipine 前処理 BA 細胞における Bt₂cAMP によるステロイド産生の動向

細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下で 1 mM Bt₂cAMP または 1 mM Bt₂cAMP + 2 μM nifedipine により 30 分間前処理した後, 細胞を Ca²⁺-free KRBGA で洗浄した. その細胞を用いて Bt₂cAMP の効果を検討した. Fig. 2 に示す様に, 細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下において Bt₂cAMP で 30 分間前処理した場合, Bt₂cAMP 刺激によるステロイド産生はインキュベーション 30 分, 60 分それぞれ約 110 pmol/10⁵ cells, 約 160 pmol/10⁵ cells であった. また, Bt₂cAMP とともに nifedipine を添加し 30 分間前処理した結果, 30 分, 60 分インキュベーション時の Bt₂cAMP によるステロイド産生はそれぞれ約 50 pmol/10⁵ cells, 約 100 pmol/10⁵ cells であり, Bt₂cAMP 単独前処理に比べて, Bt₂cAMP によるステロイド産生活性は弱かった.

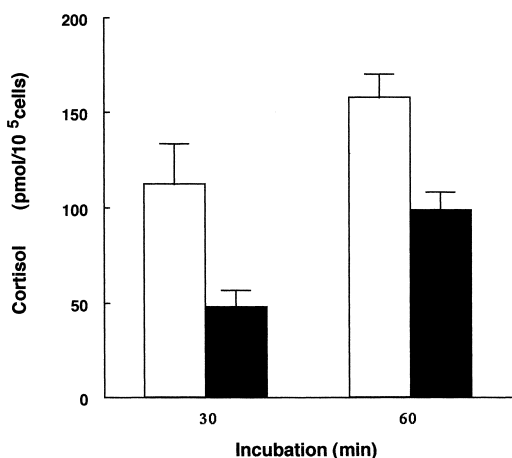


Fig. 2. Effect of Bt₂cAMP on corticoidogenesis in Bt₂cAMP- or Bt₂cAMP and nifedipine-pretreatment in BA cells.

BA cells were pretreated by 1 mM Bt₂cAMP (□) or 1 mM Bt₂cAMP + 2 μM nifedipine (■) for 30 min in Ca²⁺-free KRBGA, followed by wash with Ca²⁺-free KRBGA. The washed cells were incubated with 1 mM Bt₂cAMP in Ca²⁺-free KRBGA at 30 and 60 min. Each value represents the mean ± S.E. of triplicate determinations.

3. Forskolin 刺激によるステロイド産生に対する nifedipine の効果

Forskolin は直接 adenylyl cyclase に作用し, その活性を促進することによって細胞内 cAMP を増加させることは知られている⁹⁾. そこで 10 μM forskolin によるステロイド産生に対する nifedipine の効果を検討した. まず, 細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下で forskolin 単独刺激を行った. Fig. 3 に示す様に, インキュベーション時間依存的にステロイド産生は増加した. そこで forskolin で刺激し, インキュベーション開始 30 分後, 60 分後, 90 分後にそれぞれ 2 μM nifedipine を添加したところ, 以後のステロイド産生において強い抑制傾向が観られた. しかしながら, インキュベー

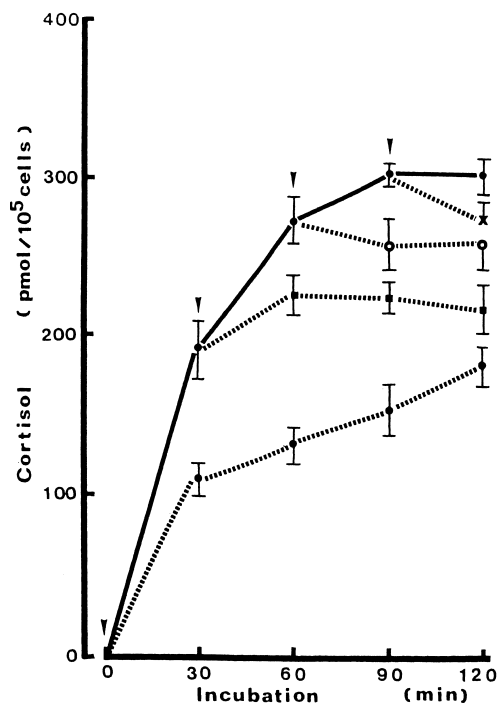


Fig. 3. Effect of nifedipine on forskolin-induced corticoidogenesis in BA cells in the absence of extracellular Ca²⁺.

BA cells were incubated with 10 μM forskolin in Ca²⁺-free KRBGA for the times shown (●—●). After BA cells were started to incubate in the above condition, these were added 2 μM nifedipine at 0 (··●··), 30 (··■··), 60 (··○··) and 90 min (··x··), respectively. Each value represents the mean ± S.E. of triplicate determinations.

ション開始時に nicardipine を添加すると、添加後 30 分間の forskolin 刺激によるステロイド産生は抑制されたが約 30% であった。そして 30 分以後は forskolin の作用を強く抑制した。

4. Bt₂cAMP 刺激によるステロイド産生に対する EGTA の効果

Bt₂cAMP によるステロイド産生に対する EGTA の効果を検討した (Fig. 4)。1 mM Bt₂cAMP と 1 mM EGTA を同時添加すると、インキュベーション開始 10 分間のステロイド産生にはほとんど影響が観られなかったが、それ以後のステロイド産生は完全に抑制された。

5. Bt₂cAMP 刺激による細胞内 Ca²⁺ 濃度の変動

初代培養 BA 細胞とカルシウムイメージング装置を用いて、細胞外 1.2 mM Ca²⁺ 添加および、無添加条件下で Bt₂cAMP 刺激による単一細胞

内カルシウム濃度の変化を検討した。細胞外 Ca²⁺ 添加時において、測定開始 30 秒後に 1 mM Bt₂cAMP で刺激したところ、Fig. 5 に示すように Bt₂cAMP 刺激後、7 分頃から [Ca²⁺]_i がゆるやかに上昇し始め 18 分前後でピークに達し、その後は徐々に基線に戻った。一方、細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下において、上記と同様に 1 mM Bt₂cAMP で刺激すると、弱いながら緩やかな [Ca²⁺]_i の上昇が観られた。この実験には単一細胞を用いて、少なくとも 4 つの細胞で観察された。そして、細胞外 1.2 mM Ca²⁺ 添加条件では、Bt₂cAMP 添加後 [Ca²⁺]_i の上昇時間が 7~12 分、ピークに達するのに 18~25 分と個々の細胞によって差が観られた。

IV. 考 察

ウシ副腎皮質束状層細胞を用いて、細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下における膜透過性 Bt₂cAMP 刺激ステロイド産生に対する L 型 VOC の特異的阻害薬である nicardipine およびカルシウムキレーターである EGTA の効果を検討し、間接的ではあるが、cAMP により刺激されるステロイド産生において Ca²⁺ が重要な役割を果たしていることの証明を試みた。細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下において Bt₂cAMP および forskolin により、細胞内 cAMP 濃度を上昇させた時のステロイド産生に対する nicardipine の効果を検討した結果、Bt₂cAMP および forskolin 単独刺激では時間依存的にステロイド産生が増加した。そしてインキュベーション開始 30 分後、60 分後、90 分後にそれぞれ nicardipine を添加すると、それ以後、ステロイド産生において強い抑制傾向が観られた。このことは、少なくとも Bt₂cAMP および forskolin 刺激 30 分以後は、細胞外に放出された Ca²⁺ が VOC を介して再び細胞内へ流入し、ステロイド産生に参画していることを示唆している。一方、インキュベーション開始時に nicardipine を添加した場合、Bt₂cAMP および forskolin によるステロイド産生はやや抑制されたものの、完全な抑制は示されなかった。したがって、この結果から少なくともインキュベーション開始後 30 分間のステロイド産生において、cAMP が重要な役割を果たしていることが示される。しかしながら、細胞

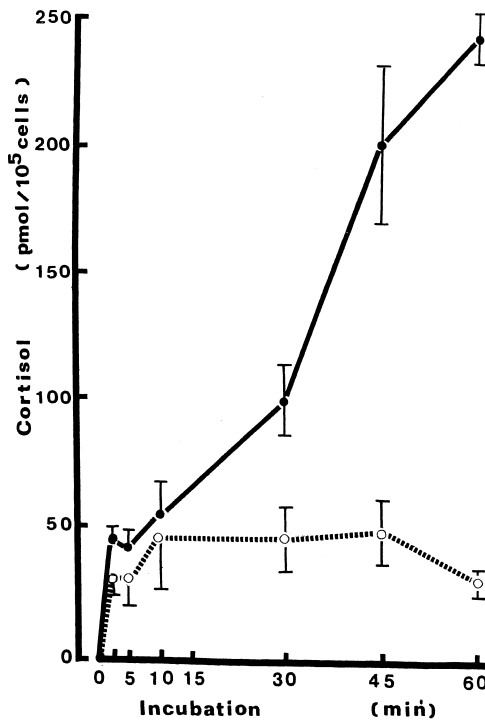


Fig. 4. Effect of EGTA on Bt₂cAMP-induced corticoidogenesis in BA cells in the absence of extracellular Ca²⁺. BA cells were incubated with 1 mM Bt₂cAMP in the presence (●-●) or absence (○-○) of 1 mM EGTA in Ca²⁺-free KRBGA for the times shown. Each value represents the mean ± S.E. of triplicate determinations.

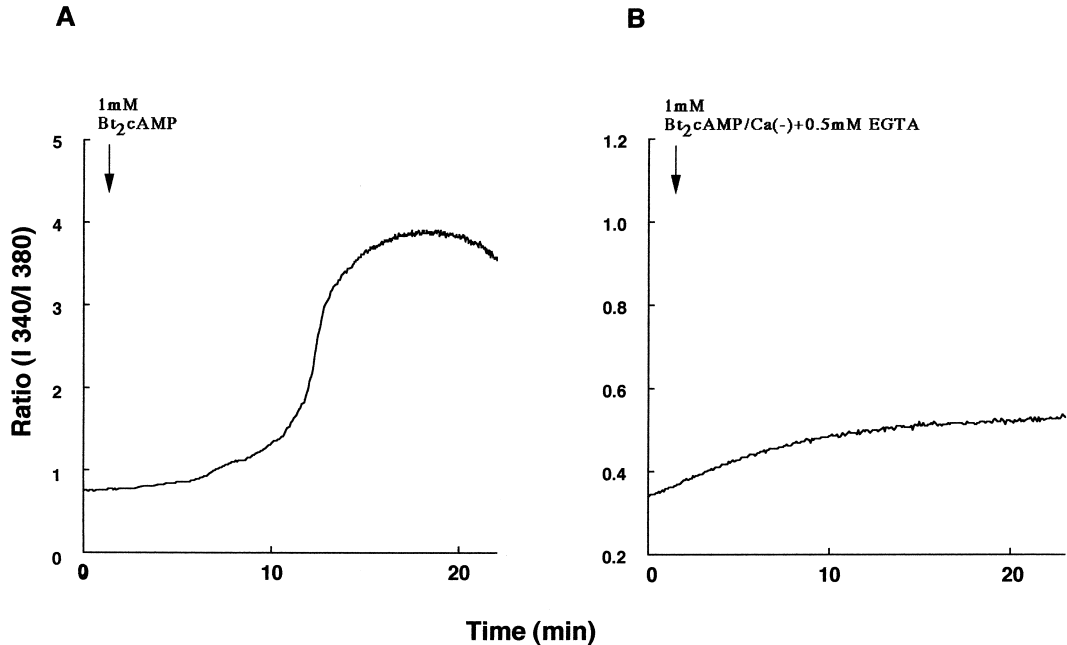


Fig. 5. Effect of Bt₂cAMP on the [Ca²⁺]_i mobilization in BA cell.

Fura 2-loaded BA cell was stimulated by 1 mM Bt₂cAMP at 30 sec after the start of recording in the presence (A) or absence (B) of extracellular Ca²⁺. The result is the trace of typical experiment. Four such experiments were performed.

外へ放出された Ca²⁺ を EGTA 添加によりキレートし、細胞内への Ca²⁺ の再流入を阻害した実験においては、インキュベーション開始 10 分間はほとんどステロイド産生は抑制されず、10 分以降は完全に抑制された。したがって、cAMP が主として直接ステロイド産生に関与しているのは、刺激開始後 10 分間であり、その後 cAMP により VOC が活性化し、細胞外に放出された Ca²⁺ が再流入しステロイド産生をさらに促進したものと考えられる。実際、細胞内 Ca²⁺ 濃度変動に対する Bt₂cAMP の影響をみたところ、明らかな Ca²⁺ 流入が観察された。cAMP により細胞外からの Ca²⁺ 流入が促進されることは MDCK 細胞¹⁰⁾、ウシ副腎皮質顆粒層細胞¹¹⁾、MIN6 細胞およびヒトランゲルハンス細胞¹²⁾ で報告されている。cAMP によるカルシウムチャネルの活性化機序については、cAMP が直接 L 型 VOC を活性化するという報告¹³⁾ や cAMP 依存性の protein kinase A によるリン酸化を介して L 型 VOC の活性化がおこるとい報告¹⁴⁾ がある。ウシ副腎皮質細胞において、cAMP による VOC の活性化がどちらの機序

により発現するかは現在のところ不明である。しかしながら、cAMP 添加 7~12 分後に Ca²⁺ 流入が観察されたことから、protein kinase A によるリン酸化を介する活性化の可能性が高いが、今後、更なる検討が必要である。

それでは、細胞外へ放出された Ca²⁺ の起源はどこにあるかという問題が残されている。今回の実験で Bt₂cAMP 単独および、Bt₂cAMP + nicardipine 同時添加により 30 分間前処置を行い、その後細胞を洗浄し Bt₂cAMP で刺激した結果、Bt₂cAMP 単独前処理と比べて Bt₂cAMP + nicardipine 同時前処理では、ステロイド産生は著しく少なかった。これは Bt₂cAMP と nicardipine を同時に前処置することにより、Bt₂cAMP の刺激によって Ca²⁺ ストアからの Ca²⁺ が細胞外に放出され、再び細胞内へ流入するのを nicardipine が阻害したと考えられる。この結果もまた、Bt₂cAMP によるステロイド産生には細胞外の Ca²⁺ が重要な役割を果たしていることを示唆している。すなわち、Ca²⁺ は Bt₂cAMP によって細胞が刺激されることにより、細胞内 Ca²⁺ ストア

から放出が起こり、Ca²⁺ が細胞外へ放出される。その Ca²⁺ が再度細胞内へ入りステロイド産生を持続されると考えられる。この可能性については、ウシ副腎皮質遊離細胞を用いた研究で cAMP が細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位からの Ca²⁺ 放出を促進することを間接的に示唆した報告がある¹⁵⁾ が、今回、我々は Bt₂cAMP が細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位からの Ca²⁺ 放出を刺激することを Ca²⁺ イメージングにより、直接的に示した。

細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位として考えられるのは小胞体、ミトコンドリア、核などがあるが、現在最も活発に細胞内 Ca²⁺ 動態に影響を与えているのは小胞体であり、おそらく cAMP は小胞体からの Ca²⁺ 放出を促進すると思われる。小胞体からの Ca²⁺ 放出に関与しているのは inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) の受容体 (IP₃R) および Ca²⁺-induced Ca²⁺ release を引き起こす ryanodine 受容体 (RZR) である¹⁶⁾。cAMP は protein kinase A 活性化を介して IP₃R をリン酸化し、IP₃ の結合性を高める可能性が示されているが¹⁷⁾¹⁸⁾、一方では膵 β 細胞において、cAMP はある種のタンパクと結合し、その複合体が小胞体の RZR を介して小胞体から Ca²⁺ を放出するという報告もある¹⁹⁾。我々の用いた BA 細胞に IP₃R が存在することは明らかにされている²⁰⁾。また、今回データに示さないが、我々は RT-PCR により RZR の存在を示唆する結果も得ている。しかしながら現在のところ、cAMP による細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位からの Ca²⁺ 放出機構に、どちらの受容体が関与しているのかは不明である。今後の検討が必要である。

結 語

- 1) ウシ副腎皮質細胞におけるステロイド産生と Ca²⁺ イメージングを指標にして cAMP によるステロイド産生と Ca²⁺ の連関について検討した。
- 2) 細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下で、Bt₂cAMP および、forskolin 刺激では時間依存的にステロイド産生を促進したが、インキュベーション開始 30 分後、60 分後、90 分後に nicardipine を添加すると、以後のステロイド産生は強い抑制傾向が観察された。
- 3) 細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下で、Bt₂cAMP お

よび nicardipine 前処置した細胞に対する Bt₂cAMP によるステロイド産生は Bt₂cAMP 単独前処置よりも弱かった。

4) 細胞外 Ca²⁺ 無添加条件下における EGTA 添加により、Bt₂cAMP によるステロイド産生は抑制された。

5) Ca²⁺ イメージングにおいて、細胞外 Ca²⁺ 存在および非存在下で 1 mM Bt₂cAMP は細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させた。

6) 以上の結果より、ウシ副腎皮質細胞において、cAMP により Ca²⁺ ストアから遊離した Ca²⁺ が細胞外へ放出され、VOC を介して細胞内へ再流入しステロイド産生に関与していることが示唆された。

本論文を作成するにあたり、御指導、御校閲を賜りました川村将弘教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また、本研究に御協力いただきました東京慈恵会医科大学薬理学講座第 1 の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Moyle WR, Kong YC, Ramachandran J. Steroidogenesis and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in rat adrenal cells: divergent effects of adrenocorticotropin and its o-nitrophenylsulfeny derivative. *J Biol Chem* 1973; 248: 2409-17.
- 2) Schimmer BP. Cyclic nucleotides in hormonal regulation of adrenocortical function. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1980; 13: 181-214.
- 3) Yanagibashi K. Calcium ion as "second messenger" in corticoidogenic action of ACTH. *Endocrinol Jpn* 1979; 26: 227-32.
- 4) Yanagibashi K, Kawamura M, Hall PF. Voltage-dependent Ca²⁺ channels are involved in regulation of steroid synthesis by bovine but not rat fasciculata cells. *Endocrinology* 1990; 126: 311-8.
- 5) Sala GB, Hayashi K, Catt KJ, Dufau ML. Adrenocorticotropin action in isolated adrenal cells. The intermediate role of cyclic AMP in stimulation of corticosterone synthesis. *J Biol Chem* 1979; 254: 3861-5.
- 6) Matsuda T, Kurata Y. Effect of nicardipine and bupivacaine on early after depolarization in rabbit sinoatrial node cells: a possible

- mechanism of bupivacaine-induced arrhythmias. *Gen Pharmacol* 1999; 33: 115-25.
- 7) Slavinski EA, Jull JW, Auersperg N. Steroidogenic pathways and trophic response to adrenocorticotrophin of cultured adrenocortical cells in different states of differentiation. *J Endocr* 1976; 69: 385-94.
 - 8) Kawamura M, Terasaka O, Ebisawa T, Kondo I, Masaki E, Ahmed A, Kagata M. Integrity of actin-network is involved in uridine 5'-triphosphate evoked store-operated Ca^{2+} entry in bovine adrenocortical fasciculata cells. *J Pharmacol Sci* 2003; 91: 23-33.
 - 9) Seamon KB, Daly JW. Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 1986; 20: 1-150.
 - 10) Chase HS JR, Wong SME. Isoproterenol and cyclic AMP increase intracellular free [Ca] in MDCK cells. *Am J Physiol* 1988; 254: 374-84.
 - 11) Tremblay E, Payet M-D, Gallo-Payet N. Effect of ACTH and angiotensin II on cytosolic calcium in cultured adrenal glomerulosa cells: role of cAMP production in the ACTH effect. *Cell Calcium* 1991; 12: 655-73.
 - 12) Al-Majed HT, Jones PM, Persaud SJ, Sugden D, Huang GC, Amiel S, Whitehouse BJ. ACTH stimulates insulin secretion from MIN6 cells and primary mouse and human islets of langerhans. *J Endocrinol* 2004; 180: 155-66.
 - 13) Carbone E, Carabelli V, Cesetti T, Baldelli P, Hernandez-Guijo JM, Giusta L. G-protein- and cAMP-dependent L-channel gating modulation: a manyfold system to control calcium entry in neurosecretory cells. *Eur J Physiol* 2001; 442: 801-13.
 - 14) Gromada J, Dissing S, Bokvist K, Renstrom E, Frokjaer-Jensen J, Wulff BS, Rorsman P. Glucagon-like peptide I increases cytoplasmic calcium in insulin-secreting β TC3-cells by enhancement of intracellular calcium mobilization. *Diabetes* 1995; 44: 767-74.
 - 15) Noguchi A, Takamura M, Yamada K, Tou S, Kawamura M. Procaine inhibits cyclic AMP-induced steroidogenesis in isolated bovine adrenocortical cells. *Jpn J Pharmacol* 1990; 52: 81-5.
 - 16) Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 1998; 21: 13-26.
 - 17) Chatton J-Y, Cao Y, Lin H, Stucki JW. Permissive role of cAMP in the oscillatory Ca^{2+} response to inositol 1, 4, 5-trisphosphate in rat hepatocytes. *Biochem J* 1998; 330: 1411-6.
 - 18) Bugrim AE. Regulation of Ca^{2+} release by cAMP-dependent protein kinase: a mechanism for agonist-specific calcium signaling? *Cell Calcium* 1999; 25: 219-26.
 - 19) Kang G, Chepurny OG, Holz GG. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in INS-1 pancreatic β -cells. *J Physiol* 2001; 536.2: 375-85.
 - 20) Nishi H. Two different P2Y receptors linked to steroidogenesis in bovine adrenocortical cells. *Jpn J Pharmacol* 1999; 81: 194-9.