

学 位 論 文 題 名

ラット膵島B細胞の刺激－放出連関の温度依存性に関する研究

学位論文内容の要旨

1) 本研究では、膵島B細胞の刺激－放出連関の温度依存性に関する機構を探る目的で、i) ふどう糖刺激による2相性のインスリン分泌反応と、膵島の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の相関を検討し、ii) 低温が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の過程とそれ以降の開口放出の過程に及ぼす影響を解析した。

2) 摘出膵血管灌流標本を、16.7 mMのふどう糖を含む灌流液で灌流すると、2相性のインスリン分泌が引き起こされた；インスリン分泌反応は、第1相の急速な上昇と下降、及びその後続く緩やかで持続的な2相目の上昇から構成されていた。

3) 膵島を、16.7 mMのふどう糖を含む、35-37°Cに保った灌流液で灌流すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は最初値かに減少した。その後 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は急速な一過性の上昇を示し、ついで緩やかな上昇、あるいは振動性変動に移行するという、2相性の上昇反応を示した。膵島から記録された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の第1相および第2相は、膵血管灌流標本からのインスリン分泌の第1相および第2相と時間的に一致していなかった。そこで、インスリン分泌を、膵島の表面灌流標本から記録して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と比較した。

4) 30-60個の膵島を、35°Cにおいて15 mMのふどう糖で刺激すると、第1相の急速な上昇と下降、及びその後続く緩やかで持続的な上昇から成る2相性のインスリン分泌が引き起こされた。個々の膵島を、35°Cにおいて15 mMのふどう糖で刺激すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は最初値かに減少した後、2相性の上昇反応を示した。膵島から記録されたインスリン分泌の第1相、第2相の上昇は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の第1相、第2相の上昇と時間的に一致しており、二相性のインスリン分泌が二相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応によって引き起こされることを確認した。

5) 低温がインスリン分泌反応に及ぼす影響を調べるために、灌流液の温度を低下させて膵島を灌流した。灌流温度を30°Cに低下すると、ふどう糖刺激 (15 mM) によるインスリン分泌反応は遅延し、第1相及び第2相の分泌はどちらも抑制された。温度をさらに低下させ25°Cにすると、インスリン分泌反応は、ほぼ完全に抑制された。ふどう糖刺激によるインスリン分泌反応の温度係数 (Q_{10}) は11.6と計算された。

6) 低温が膵島の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応に及ぼす影響を検討する目的で、灌流液の温度を低下して膵島を灌流した。灌流温度を30°Cに低下すると、2相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反

応は遅延し、抑制された。灌流温度をさらに25°Cに低下すると、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応はさらに遅延し、2相性の上昇反応が不明瞭となった。ぶどう糖刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} は1.8と計算された。

7) B細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がインスリンの開口放出を引き起こす効率の温度依存性を定量化するために、ぶどう糖刺激期間中の、平均 $[Ca^{2+}]_i$ に対する平均インスリン分泌量の比 (IS/Ca) の Q_{10} を求めた。IS/Ca比の Q_{10} は6.6で、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} の約3.7倍であった。以上の結果から、ぶどう糖刺激による2相性のインスリン分泌の抑制は、主にB細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応以降の開口放出の過程の温度依存性によることが示唆された。

8) B細胞の刺激-放出連関の温度依存性をさらに詳しく調べるために、高濃度 K^+ 、ムスカリン様アセチルコリン受容体の作動薬であるカルバミルコリン (CCh)、及びATP感受性 K^+ チャンネルを閉鎖させるグリベンクラミド刺激による膵島からのインスリン分泌反応、及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に及ぼす温度の影響を調べた。

9) 高濃度 K^+ (30 mM) 刺激による刺激期間中 (3分間) のインスリン分泌反応及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} は、それぞれ6.5及び1.2と計算された。高濃度 K^+ による刺激期間中のIS/Ca比の Q_{10} は5.6で、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} の4.6倍大きかった。

10) CCh (100 μ M) 刺激による刺激期間中 (3分間) のインスリン分泌反応及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} は、それぞれ5.4及び1.4と計算された。CChによる刺激期間中のIS/Ca比の Q_{10} は3.8で、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} の2.7倍大きかった。

11) グリベンクラミド (2 μ M) 刺激による刺激期間中 (5分間) のインスリン分泌反応及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} は、それぞれ26.7及び1.8と計算された。グリベンクラミドによる刺激期間中のIS/Ca比の Q_{10} は13で、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} の7.2倍大きかった。高濃度 K^+ 、CCh、及びグリベンクラミドいずれの刺激を用いた場合でも、IS/Ca比の Q_{10} が、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の Q_{10} よりも大きかったことから、低温によるインスリン分泌の抑制は、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の経路に係わらず、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降の温度依存性に起因することが示唆された。

12) 以上の結果から、膵島B細胞のインスリン分泌と $[Ca^{2+}]_i$ の関係、及び膵島B細胞の刺激-放出連関の温度依存性について、次の結論を得た：1, 膵島の集合をぶどう糖刺激したときに観察される2相性のインスリン分泌反応は、個々の膵島の2相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の総和を反映している；2, 低温は、ぶどう糖の刺激による膵島B細胞の刺激-放出連関のうち、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に至る過程と、それ以後の開口放出の過程の両方を抑制してインスリン分泌を減少させる；3, 前者の過程より後者の過程が温度に対する感受性は大きく、低温によるインスリン分泌の抑制は、主として開口放出の過程の温度感受性に帰せられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	菅野	富夫
副査	教授	中里	幸和
副査	教授	斉藤	昌之
副査	助教授	葉原	芳昭

学位論文題名

ラット膵島B細胞の刺激－放出連関の温度依存性に関する研究

膵島B細胞の刺激－放出連関の温度依存性は、膵島A細胞などのペプチド内分泌細胞やニューロンの連関の温度依存性に比べて際だって大きいことが知られている。

膵島B細胞の刺激－放出連関の温度依存性の機構を解明する目的で、ぶどう糖刺激による2相性のインスリン分泌反応と、膵島の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の相関を検討し、低温が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の過程とそれ以降の開口放出の過程に及ぼす影響を解析し、申請者は46頁の本論文にまとめ学位論文として提出し、参考論文4編を付している。

膵島を、 35°C において15 mMのぶどう糖で刺激すると、1相目の急速な上昇と下降、及びその後につづく緩やかで持続的な上昇から成る2相性のインスリン分泌が引き起こされた。個々の膵島を、 35°C において15 mMのぶどう糖で刺激すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は最初僅かに減少した後、2相性の上昇反応を示した。膵島から記録されたインスリン分泌の1相目、2相目の上昇は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の1相目、2相目の上昇と時間的に一致しており、2相性のインスリン分泌が二相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応によって引き起こされることを確認した。灌流温度を 30°C に低下させると、ぶどう糖刺激 (15 mM) によるインスリン分泌反応は遅延し、1相目、2相目の分泌はどちらも抑制された。温度を 25°C にさらに低下させると、インスリン分泌反応は、ほぼ完全に抑制された。灌流温度を 30°C に低下させると、2相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応は遅延し、抑制された。灌流温度をさらに 25°C に低下させると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応はさらに遅延し、2相性の上昇反応が不明瞭となった。ぶどう糖刺激による2相性のインスリン分泌の抑制は、主にB細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応以降の開口放出の過程の温度依存性によることが示された。

膵島B細胞のインスリン分泌と $[Ca^{2+}]_i$ の関係、及び膵島B細胞の刺激-放出連関の温度依存性について、次の結論を得た：1, 膵島の集合をぶどう糖刺激したときに観察される2相性のインスリン分泌反応は、個々の膵島の2相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の総和を反映している；2, 低温は、ぶどう糖の刺激による膵島B細胞の刺激-放出連関のうち、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に至る過程と、それ以後の開口放出の過程の両方を抑制してインスリン分泌を減少させる；3, 前者の過程よりも後者の過程のほうが温度に対する感受性が大きく、低温によるインスリン分泌の抑制は、主として開口放出の過程の温度感受性に帰せられる。

この研究は膵島B細胞の刺激-放出連関の温度依存性の機構について新しい知見を提供するものであり、B細胞に特徴的な温度依存性開口放出とその生理的意義に関する今後の研究の基礎となるものと思われる。よって審査員一同は丹羽光一氏が博士（獣医学）を受ける資格があるものと認めた。