

学 位 論 文 題 名

cAMP 誘導性グルコース応答インスリン分泌のメカニズム

学位論文内容の要旨

膵β細胞からのインスリン分泌は、栄養素、ホルモン、神経系入力など様々な因子による調節を受けている。その中で、グルコースによるインスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) とその増強機構は最も基本的かつ重要な制御機構である。GSIS については、現在以下のようなモデルが広く受け入れられている。すなわち、血中のグルコース濃度が上昇すると、グルコースはβ細胞膜表面にあるグルコーストランスポーターを介してβ細胞内に取り込まれ、代謝された後 ATP が産生される。細胞内 ATP 濃度 ($[ATP]_i$) の増加は、ATP 感受性カリウムチャネル (K_{ATP} チャネル) の閉鎖を引き起こし、β細胞の膜を脱分極させる。膜の脱分極は電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) を開口させ、細胞内にカルシウムイオン (Ca^{2+}) を流入させる。この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が引き金となりインスリン分泌が惹起される。一方、消化管ホルモンである gastric inhibitory polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は、それぞれ腸内分泌細胞である K 細胞と L 細胞から分泌され、膵β細胞膜上に存在する 7 回膜貫通 G 蛋白共役型のレセプターに作用し、β細胞における cAMP のシグナル伝達系を活性化させることによって GSIS を増強する。このインクレチン作用の特徴として、細胞外グルコースが一定の濃度以上のときにのみインスリン分泌を惹起させることが挙げられる。近年、この点に着目して、GLP-1 のアナログや GLP-1 の分解阻害剤が低血糖の危険性の低い 2 型糖尿病の治療薬として着目されつつある。興味深いことに、グルコース刺激によるインスリン分泌能が失われてしまった 2 型糖尿病患者においても、GLP-1 によりグルコース応答性のインスリン分泌増強と血糖降下作用が認められる。GLP-1 のインスリン分泌増強メカニズムとして、ATP に対する K_{ATP} チャネル閉鎖の感受性を上げることが示されているが、その詳細なメカニズムはいまだ解明されていない。

正常な膵β細胞では、グルコース濃度依存性に GSIS が起こり、6 mM 以上のグルコース濃度が GSIS の誘導には必要と言われている。 K_{ATP} チャネル欠損マウスでは、GSIS がほとんど認められないことから、GSIS には K_{ATP} チャネルが極めて重要な役割を果たすことが明らかにされた。ところが最近、 K_{ATP} チャネル欠損マウス ($Kir6.2^{-/-}$) では、GSIS およびスルホニル尿素剤によるインスリン分泌がともに消失しているにもかかわらず、GLP-1 または GIP 処置により GSIS が誘導されることが報告された。この事実は、cAMP シグナルを介した、しかし K_{ATP} チャネルの閉鎖によらないグルコース応答性インスリン分泌機構が存在することを示唆している。本研究は cAMP による GSIS のメカニズムを解明することを目的として行われた。

まず GLP-1 や GIP のインクレチン効果が cAMP のシグナルを介しているかどうかを検討するため、cAMP のアナログである 8-Br-cAMP を用いて $Kir6.2^{-/-}$ マウスにおける膵灌流実験を行った。 $Kir6.2^{-/-}$ マウスでは、8-Br-cAMP によってインクレチンと同様にグルコースによるインスリン分泌が惹起されたことから、インクレチンによる GSIS の誘導は cAMP シグナルを介していることが示された。次にアジ化ナトリウムを用いた膵灌流実験により、 $Kir6.2^{-/-}$ マウスでみられた 8-Br-cAMP による GSIS の誘導には ATP が重要であることも明

らかになった。さらに、この cAMP 誘導性グルコース応答が L 型 VDCC の阻害薬であるニフェジピンあるいは Cl⁻チャンネルの阻害剤であるニフルム酸と N-phenylanthranilic acid (DPC)により阻害されることを示した。これらの実験から、cAMP と ATP のシグナルがβ細胞に存在する Cl⁻チャンネルを活性化させ、細胞外への Cl⁻流出を引き起こし、それにより生じた膜の脱分極が VDCC を活性化するのではないかと考えた。

Cl⁻チャンネル阻害剤であるニフルム酸と DPC は transient receptor potential (TRP) チャンネルも阻害することが知られており、TRP チャンネルからの Na⁺流入が cAMP とグルコースによる膜の発火とそれにつづくインスリン分泌に関わる可能性が否定できない。そこで、Na⁺を N-methyl-D-glucamine に置き換えた条件下での腓膵流実験を行った。その結果、cAMP とグルコースによるインスリン分泌の惹起（第1相）には Na⁺は必須ではないが、その維持（第2相）には細胞外の Na⁺が必要であることが判明した。

最後に、このニフルム酸感受性チャンネルを介した cAMP 誘導性のグルコース応答インスリン分泌が、K_{ATP} チャンネルが機能する正常な膵β細胞でどのような役割を担っているかを検討した。その結果、cAMP は僅かなグルコース濃度の上昇を感知し、それに応じてインスリン分泌を引き起こす役割を担っていることが明らかになった。ところが、2.8 mM から 17.6 mM というグルコース濃度変化に対する早期のインスリン分泌応答はニフルム酸で阻害されなかったことから、急激なグルコース濃度の変化の際には、K_{ATP} チャンネルの閉鎖がインスリン分泌を引き起こしていると考えられた。一方、ニフルム酸処理により、インスリン分泌の第2相が阻害されたのは、ニフルム酸が Na⁺透過性の陽イオンチャンネル（あるいは TRP チャンネル）を阻害することに由来すると考えられた。

cAMP あるいはグルコースによってインスリン分泌細胞の Cl⁻電流が増強することは、β細胞株や単離β細胞を用いた研究によって、これまでも報告されている。しかし、本研究は、「cAMP 存在下での僅かなグルコース濃度変化に対する応答性」にはニフルム酸感受性のイオンチャンネルが非常に重要であることを初めて明らかにした。健常人の食前の血糖が 4~5 mM、食後の血糖が 8 mM 前後である事実と食後には GLP-1 や GIP などのインクレチンが分泌される事実を考慮すると、生理的条件下では僅かなグルコース濃度の変化によるインスリン分泌応答に対してはニフルム酸感受性チャンネルが重要な役割を担っていると考えられる。今後、ニフルム酸の標的となるイオンチャンネルの分子実体や、糖尿病状態での本メカニズムの役割を明らかにすることが重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 神 谷 温 之

副 査 教 授 渡 邊 雅 彦

学 位 論 文 題 名

cAMP 誘導性グルコース応答インスリン分泌のメカニズム

膵β細胞において、グルコースによるインスリン分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) は基本的な制御機構である。一方、消化管ホルモンである GIP と GLP-1 は、膵β細胞における cAMP シグナル伝達系を活性化させることによって GSIS を増強する。興味深いことに、グルコース刺激によるインスリン分泌能が失われてしまった2型糖尿病患者においても、GLP-1 により GSIS 増強が認められる。GLP-1 のインスリン分泌増強機構として、ATP 感受性カリウムチャネル (K_{ATP} チャネル) 閉鎖の感受性を上げることが示されているが、その詳細なメカニズムは解明されていない。最近、 K_{ATP} チャネル欠損マウス ($Kir6.2^{-/-}$) では、GSIS およびスルホニル尿素剤によるインスリン分泌がともに消失しているにもかかわらず、GLP-1 または GIP 処置により GSIS が誘導されることが報告された。この事実は、cAMP シグナルを介した、しかし K_{ATP} チャネルの閉鎖によらない GSIS が存在することを示唆している。本研究は $Kir6.2^{-/-}$ マウスおよび野生型マウスの膵灌流標本を用いて、cAMP 誘導性 GSIS のメカニズムを解明することを目的として行われた。

$Kir6.2^{-/-}$ マウスに cAMP のアナログである 8-Br-cAMP を投与することにより、インクレチンによる GSIS の誘導は cAMP シグナルを介していること、この誘導には ATP が必要であることを示した。また、この cAMP 誘導性 GSIS は L 型電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) の阻害薬であるニフェジピンあるいは Cl^{-} チャネルの阻害剤であるニフルム酸と *N*-phenylanthranilic acid (DPC) により阻害された。これらの実験から、cAMP と ATP のシグナルがβ細胞の Cl^{-} チャネルを刺激して細胞外への Cl^{-} 流出を引き起こし、それにより生じた膜の脱分極が VDCC を活性化すると考えた。

Cl^{-} チャネル阻害剤は transient receptor potential (TRP) チャネルも阻害することが知られており、TRP チャネルからの Na^{+} 流入がインスリン分泌に関わる可能性が否定できない。このことを検証した実験において、cAMP とグルコースによるインスリン分泌の惹起 (第1相) には Na^{+} は必須ではないが、その維持 (第2相) には細胞外 Na^{+} が必要であることが判明した。最後に、このニフルム酸感受性チャネルを介した cAMP 誘導性 GSIS が K_{ATP} チャネルが機能する正常な膵β細胞でどのような役割を担っているかを検討した。その結果、cAMP シグナル伝達系は僅かなグルコース濃度の上昇を感知し、それに応じてインスリン分泌を引き起こすことがわかった。急激なグルコース濃度変化に対する早期のインスリン分泌応答はニフルム酸で阻害されず、この場合には、 K_{ATP} チャネルの閉鎖がインスリン分泌を引き起こしていると考えられた。一方、ニフルム酸処理によりインスリン分泌の第2相が阻害されたのは、ニフルム酸が Na^{+}

透過性の陽イオンチャネル（あるいは TRP チャネル）を阻害することによると予想された。

健常人の食前の血糖が 4~5 mM、食後の血糖が 8 mM 前後であり、食後にはインクレチンが分泌される事実を考慮すると、生理的条件下では僅かなグルコース濃度の変化によるインスリン分泌応答に対してはニフルム酸感受性チャネルが重要であると考えられた。

公開発表会では、渡辺教授より、(1) K_{ATP} チャネルを介する経路とインクレチンを介する経路において VDCC は共通しているか、(2) β 細胞が 2 タイプの血糖感知機構をもつことの生理学的意義はなにか、神谷教授より、(3) cAMP が直接 Cl^- チャネルに作用しているのか、それとも PKA リン酸化酵素を介しているか、(4) 消化管内分泌細胞のインクレチン分泌にも血糖値に反応する機構があるか、岩永教授より、(5) Cl^- チャネルの分子同定はできたか、などについて質問があった。申請者は、これらの質問に的確に答え、意義のある質疑応答がなされた。

この論文は、 β 細胞の分泌調節に関して新しいメカニズムを提唱した点で高く評価され、糖尿病の発症機序解明や治療法開発に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。