

氏名	伊藤 聖 学
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 516 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 21 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	生理学的濃度のアドレナリンによる膵 β 細胞非選択性陽イオンチャネル (TRPM2 チャネル) を介したインスリン分泌制御機構
論文審査委員	(委員長) 教授 武藤 重明 (委員) 准教授 中田 正範 准教授 興水 崇鏡

論文内容の要旨

1 研究目的

アドレナリン (Adr : Adrenaline) は cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 産生抑制を介してインスリン分泌を抑制することが知られているが、過去の研究の多くが薬理学的高濃度の Adr を用いて検討が行われてきた。また我々は、インスリン分泌刺激過程で、グルコースやインクレチンホルモン刺激が、cAMP の下流に位置し、非選択性陽イオンチャネルの一つである TRPM2 (transient receptor potential melastatin 2) チャネルを介して、非選択性陽イオンチャネル電流 (背景電流) を増加させることにより、相加的にインスリン分泌を引き起こすことを報告した。しかしながら、これまで Adr と cAMP/TRPM2 伝達経路との関連についての報告はない。本研究では、Adr の作用が TRPM2 チャネルを介してインスリン分泌抑制を引き起こしているか否か、さらにこれまで詳細に検討されていない生理学的濃度の Adr が TRPM2 チャネルに対してどのような影響を与えているかについて検討することを目的とした。

2 研究方法

マウスの単離膵島を用いて、インスリン分泌測定および cAMP 測定を行った。さらに単離膵 β 細胞の培養細胞を用いて、穿孔パッチによるホールセルモードパッチクランプ法により、背景電流 (ボルテージクランプモード) (保持電位 : -70mV、100 μ M トルブタミド存在下) および膜電位 (カレントクランプモード) を測定した。 α 2 受容体拮抗薬 (ヨヒンビン) 投与下で野生型 (WT : wild-type) マウスおよび TRPM2-knock out (KO) マウスでの腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT : Intraperitoneal glucose tolerance test) を行った。

3 研究成果

WT マウスにおいて、Adr はグルコース刺激 (16.6 mmol/L glucose (mMG)) およびグルコース (16.6 mMG) /exendin-4 (Ex-4) 刺激によるインスリン分泌の増加を濃度依存性に抑制した。さらに、低濃度 Adr (1 nmo/L (nM)) は高濃度 Adr (5 μ mol/L (μ M)) と同様に、16.6 mMG および 0.1 nM Ex-4 刺激によるインスリン分泌促進作用および背景電流増加作用を抑制した。一方、TRPM2-KO マウスにおいては、高濃度 Adr はインスリン分泌を抑制したが、低濃度 Adr (1 nM) においては抑制しなかつ

た。これらの結果から、低濃度 A_{dr} のインスリン分泌抑制作用は、TRPM2 チャンネルを介していることが示唆された。また低濃度 A_{dr} は高濃度 A_{dr} と同様、cAMP 産生を抑制した。A_{dr} による cAMP 産生の抑制は TRPM2-KO マウスにおいてもみられたことから、A_{dr} によるインスリン分泌抑制は、cAMP 産生より下流の作用機序の関与が考えられた。cAMP アナログ (db-cAMP : dibutyryl-cAMP) を用いた背景電流に関する検討では、高濃度 A_{dr} が db-cAMP による背景電流増加作用を抑制する一方で、低濃度 A_{dr} は db-cAMP による背景電流増加作用を抑制しなかった。背景電流に対する低濃度 A_{dr} の抑制に関与するアドレナリン受容体を特定するため、Ex-4 と各種アドレナリン受容体拮抗薬を用いて検討した。 α 1、 α 2c、 β 受容体拮抗薬投与下では、低濃度 A_{dr} による Ex-4 刺激背景電流増加抑制作用は不変であったが、 α 2 受容体拮抗薬ヨヒンビンおよび α 2A 受容体拮抗薬投与下では、低濃度 A_{dr} による Ex-4 刺激背景電流増加抑制作用は解除された。これらの結果から、低濃度 A_{dr} によるインスリン分泌抑制作用は、 α 2A 受容体-cAMP 産生抑制を介した背景電流抑制作用によると考えられた。膜電位については、高濃度 A_{dr} は、既報通り、グルコースおよび Ex-4 刺激による脱分極を再分極させたのに加え、100 μ M トルブタミドによる脱分極も再分極させた。低濃度 A_{dr} は、Ex-4 による脱分極を完全に抑制した。グルコース刺激に対して低濃度 A_{dr} の先行投与を行うと、部分的な活動電位の抑制に加え、活動電位誘発までの潜時の延長と、脱分極した細胞膜で再分極が観察され、これらは α 2A 受容体拮抗薬存在下で消失した。WT および TRPM2-KO マウスに対しヨヒンビン投与下、非投与下で IPGTT を行った。まずヨヒンビン投与の有無に関わらず、TRPM2-KO マウスでは WT マウスに比較し、耐糖能障害を認めた。さらに WT マウスでは、ヨヒンビン投与で 30 分、60 分、120 分後における血糖値が低下したが、TRPM2-KO マウスではヨヒンビン投与による血糖値の低下は認めなかった。これらの結果から、低濃度の A_{dr} は cAMP/TRPM2 伝達経路を介して作用していることが示唆された。

4 考察

ヒトにおける安静時の血漿 A_{dr} 濃度は 0.2-0.4 nM、健常男性運動時には 1 nM を十分に超えると報告されており、本研究で用いた 1 nM A_{dr} は生理学的濃度に近いと考えられる。その低濃度 A_{dr} は、WT マウスにおけるインスリン分泌、cAMP 産生、背景電流、細胞膜脱分極をそれぞれ抑制した。一方で TRPM2-KO マウスにおいて 1 nM A_{dr} は、cAMP 産生を抑制したにも関わらず、インスリン分泌を抑制できなかった。さらにヨヒンビンを用いた IPGTT で、WT マウスのヨヒンビン投与群は非投与群に比較して耐糖能の改善を認めたが、TRPM2-KO マウスではその作用が消失した。これらの知見から、生理学的濃度 A_{dr} は cAMP/TRPM2 伝達経路を抑制的に制御することにより、cAMP 依存性のインスリン分泌に対して抑制的に作用していると考えられた。さらに 1 nM A_{dr} 投与下における細胞膜脱分極における検討では、グルコース刺激による活動電位誘発までの潜時を延長し、このことは低濃度 A_{dr} がグルコース応答性に関与していることを示唆すると考えられる。対照的に高濃度 A_{dr} が、グルコース刺激、Ex-4 刺激およびトルブタミド刺激等の様々なインスリン分泌促進作用に対して抑制的に作用したことは、既報と同様で、高濃度 A_{dr} が cAMP 依存性の抑制作用だけでなく、複数のメカニズムによって cAMP 非依存性に、インスリン分泌に対して抑制作用を有していると推測された。

5 結論

本研究によって、生理学的濃度の Adr が cAMP の下流に位置する TRPM2 チャンネルを制御していることが示された。さらに生理学的濃度の Adr は、 $\alpha 2A$ 受容体を介して cAMP/TRPM2 伝達経路に対して抑制的に作用し、グルコースおよびインクレチンホルモン刺激インスリン分泌を抑制することが示された。また、Adr は薬理学的高濃度と生理学的濃度では、その作用機序に明確な違いを有していることも明らかとなった。膵 β 細胞におけるこの経路に対するアプローチは、臨床における適切な糖尿病診療への応用や新規糖尿病治療薬開発における潜在的な可能性を有していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

薬理学的高濃度のアドレナリン(Adr)は、膵 β 細胞からのインスリン分泌を抑制し、血糖値を上昇させることが知られているが、生理学的低濃度の Adr の作用については不明である。一方、膵 β 細胞がグルコース刺激に対しインスリンを分泌するまでの一連の過程で重要なのが細胞膜の脱分極で、これには ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネルの閉鎖と、一過性受容器電位 (TRP) チャンネルの開口が関与している。申請者の教室では、 K_{ATP} チャンネルを閉鎖した状態で、膵 β 細胞にグルコース刺激やグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体刺激を行うと、cAMP 産生を介して TRP チャンネルの一つである一過性受容器電位メラストチン 2 (TRPM2) チャンネルが活性化し、細胞膜が脱分極することによってインスリン分泌を刺激することを報告している。そこで、申請者は生理学的濃度の Adr に着目し、1) 薬理学的高濃度の Adr と同様に、膵 β 細胞のインスリン分泌を抑制するのか、2) 抑制するならば、TRPM2 チャンネルがどのような機序で関与しているのかを、薬理学的高濃度の Adr と比較し検討した。方法は、多岐にわたり、1) マウスより単離した膵 β 細胞を用いたインスリン分泌や cAMP の測定、2) マウスから単離した膵 β 細胞の初代培養系における種々の条件下での穿孔パッチクランプ法による背景電流や膜電位の測定と、3) $\alpha 2$ アドレナリン受容体拮抗薬ヨヒンビン投与の有無で TRPM2-knock out マウスおよびその野生型マウスに対する腹腔内ブドウ糖負荷試験であった。その結果、膵 β 細胞において、1) 生理学的濃度の Adr は、 $\alpha 2A$ 受容体を介して cAMP/TRPM2 チャンネル経路を阻害することで、高濃度グルコースや GLP-1 受容体刺激によるインスリン分泌増加を抑制するのにに対し、低濃度グルコース下ではインスリン分泌に影響を与えないこと、2) Adr は、生理学的濃度と薬理学的高濃度のいずれの場合もインスリン分泌を抑制するが、その機序は異なることが明らかになった。

本論文は、申請者の教室が長年にわたり行ってきた膵 β 細胞のインスリン分泌におけるイオンチャンネルの役割に関するこれまでの知見をさらに発展させたもので、新規性が極めて高く、臨床的意義も大きい。本論文は *Diabetes* 誌に電子掲載されており、今後 $\alpha 2A$ 受容体活性化によって生じる 2 型糖尿病の新たな発症機序の解明や新規糖尿病治療薬開発に大きな貢献を果たすことが期待される。一方、審査の結果、緒言や研究方法の記載、研究成果の解析と考察などに多数の問題があることが判明し、申請者に再検討を求めた。必要な修正を加えることを条件として、審査委員全員一致で合格と判定した。なお、修正部分の確認は審査委員全員で行い、後日適切な修正が行われたことが確認された。

最終試験の結果の要旨

申請者は、研究背景、目的、方法、結果、考察を決められた時間内に要領よく説明し、理解しやすい内容であった。一方、審査委員からは1時間以上にわたり、研究方法、結果の解釈、考察に関する質問が出された。これらに対し、真摯な態度で誠実に応答した。しかし、研究方法、結果の表示方法とその解釈、考察に関する不備が数多くみられた。加えて、細胞膜の脱分極の生理学的意味付けなど基礎知識の不足も指摘された。その他、字句の表記の誤りや用語の不適切な使用なども多数みられた。審査委員から指摘された諸点に従って、学位論文および論文要旨が適切に修正、加筆された。以上より、審査委員全員一致で申請者が医学博士号を受けるに値すると判断し、最終試験に合格とした。