

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目 Hexaminecobalt(III) chloride のインスリン分泌阻害作用に関する研究

－ インスリン分泌阻害作用の発見と阻害機構の解析 －

氏 名 鏑 本 義 治

インスリン分泌不全は 2 型糖尿病の原因となる遺伝因子の一つであり、他の遺伝因子や環境因子と重なることによって 2 型糖尿病を引き起こす。このため、グルコース応答性インスリン分泌機構やその異常を明らかにすることは糖尿病の成因や病態の解明に大きな手がかりを与えると考えられる。膵β細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌経路では、まず膵β細胞に取り込まれたグルコースが代謝され、ATP が生成して ATP 感受性 K⁺チャネル(K_{ATP}チャネル)が閉鎖する。その結果、細胞膜の脱分極が起きて電位依存性の Ca²⁺チャネル(VDCC)が開口し、細胞外 Ca²⁺が細胞内に流入する。この細胞質 Ca²⁺濃度の上昇が最終的な引き金となってインスリンの開口放出が起こる。従って、グルコース代謝阻害による ATP 生成の阻害や、Ca²⁺チャネル阻害による細胞外 Ca²⁺流入の阻害等は、結果としてグルコース応答性インスリン分泌を抑制する。グルコース代謝からインスリン分泌に至る過程をそれぞれ固有の段階で阻害する阻害剤はこれまでに多くの研究で使用され、グルコース応答性インスリン分泌経路の詳細な解明に大きく貢献してきた。

最近、 β 細胞にグルコース刺激が与えられると、ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度が細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇と共に上昇し、インスリン分泌に何らかの関与をすることが報告された。このミトコンドリア Ca^{2+} 濃度変化のグルコース応答性インスリン分泌における意義を検討する手段として有効な道具となる阻害剤を探索する過程で、Hexamminecobalt(III) (HAC) chloride が膵島からのグルコース応答性インスリン分泌に対する強力な阻害作用を有することを見出した。HACは22.2 mMグルコース刺激による単離マウス膵島からのインスリン分泌を濃度依存的に抑制し、その抑制率は2 mM HAC 添加時で約90%であった。さらに、HACのグルコース応答性インスリン分泌抑制作用を perfusion 法により検討した結果から、2 mM HACはグルコース応答性インスリン分泌の第一相を約80%、第二相についてはほぼ完全に抑制することが明らかになった。ここで灌流液からHACを除くと、直ちにインスリン分泌の回復が起こり、対照群を超える一過性の分泌ピークを示した後に対照群と同等のインスリン分泌量に回復して、HACによるインスリン分泌阻害作用が可逆的であることが示された。これらのグルコース応答性インスリン分泌に対する阻害作用とは対照的に、HACはインスリンの基礎分泌に対して有意な抑制作用を示さず、HACの作用がグルコース等の刺激に応答したインスリン分泌経路に特異的であることが示唆された。

HACのグルコース応答性インスリン分泌阻害作用の作用機序を解明するため、まずグルコース代謝によるATP合成経路に対するHACの作用を検討した。その結果、HACはグルコース刺激時のD-[6- ^{14}C]glucose酸化亢進、細胞内NAD(P)H濃度上昇、ミトコンドリア内膜電位の過分極、及び細胞内ATP含量増加を阻害せず、HACのグルコース応答性インスリン分泌阻害作用がグルコース代謝からATP合成に至る過程の阻害に起因しないことが明らかになった。さらに、インスリン分泌に直接影響する細胞内 Ca^{2+} の変動に対するHACの作用を検討した結果、HACはグルコース刺激時の細胞膜の活動電位、L型 Ca^{2+} チャネル経由の Ca^{2+} 電流、細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇、及びミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度の上昇についても阻害作用を示さなかつ

た。これらのグルコース応答性インスリン分泌経路の主要な要素に影響を与えない一方で、HAC は KCl を用いた脱分極刺激と、細胞外 Ca^{2+} 非存在下での mastoparan 刺激によるインスリン分泌に対しても共に阻害作用を示した。これらの結果は、HAC のグルコース応答性インスリン分泌に対する阻害作用の作用点が細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇より先の段階に存在することを示唆するものであった。特に、HAC がグルコース及び KCl 刺激による Ca^{2+} 依存性のインスリン分泌と、mastoparan 刺激による GTP 結合蛋白質を介した Ca^{2+} 非依存性のインスリン分泌を共に阻害したことは、HAC のインスリン分泌阻害作用が、 Ca^{2+} 依存、 Ca^{2+} 非依存両経路共通の、開口放出自体かまたは開口放出にごく近い段階で作用していることを示唆している。また HAC は、cAMP-dependent protein kinase の活性化、或いは cAMP センサーとの結合を介し、 K_{ATP} チャネル非依存的な経路でインスリンの開口放出に作用する cAMP のインスリン分泌促進作用に対しても阻害作用を示し、この結果からも HAC の開口放出過程周辺への作用が示唆された。

β 細胞におけるインスリンの開口放出の過程においては、神経伝達物質の分泌の場合と同様に、SNARE 複合体と呼ばれる複合体が形成・解離して、膜の融合過程を調節している。このため、botulinum toxin による SNARE 複合体構成蛋白質の非可逆的な切断は、結果としてグルコース応答性インスリン分泌を抑制する。グルコース応答性インスリン分泌に伴う SNARE 複合体の形成・解離に対する HAC の作用を共免疫沈降法により検討した結果、HAC は非刺激時の SNARE 複合体の量には影響を与えず、グルコース刺激に伴う複合体の減少を阻害することが明らかになった。この結果は、HAC が SNARE 複合体の形成については阻害せず、グルコース刺激による SNARE 複合体の解離を特異的に抑制することを示している。共免疫沈降法により検出される SNARE 複合体の増減は、細胞膜内面に結合した分泌顆粒の増減を反映しているため、HAC を用いた SNARE 複合体の共免疫沈降実験の結果は、HAC が分泌顆粒の細胞膜内面への結合は阻害せず、結合以降の開口放出過程に作用していることを

示している。これらの結果から、HAC の作用点は開口放出における膜の融合及び SNARE 複合体の解離過程そのものか、または、膜の融合及び SNARE 複合体の解離の引き金となる経路にあると考えられた。

これまでに報告されているインスリン開口放出過程の特異的な阻害剤は、SNARE 複合体に対する特異抗体を除けば、SNARE 複合体構成蛋白質を非可逆的に切断する botulinum toxin のみであった。これらの作用とは対照的に HAC の作用は可逆的であり、低分子、水溶性でもあるため、HAC は β 細胞におけるインスリンの開口放出過程を研究する上での有用な道具となり、開口放出過程に関する知見を飛躍的に進展させる可能性がある。インスリン分泌に対して特異な阻害作用を示す HAC に関する研究は、グルコース応答性インスリン分泌機構の詳細な解析に貢献することが期待される。