

氏名	河本 泉
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	論医博第 1859 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Expression and Function of Calcium-Sensing Receptor in Pancreatic Islet and Insulinoma Cells (膵ラ島とインスリノーマ細胞におけるカルシウム感受性受容体の発現と機能)
論文調査委員	(主査) 教授 武藤 誠 教授 清野 裕 教授 今村 正之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (緒言)

カルシウム感受性受容体 (CaR) が 1993 年にウシ副甲状腺よりクローニングされて以来、ヒトにおいて副甲状腺をはじめとする様々な組織に発現しており、生体内カルシウム (Ca) の恒常性に重要な働きをしていることが示唆されている。Ca 刺激によりインスリノーマからインスリンが分泌されることが知られており、この反応を利用して臨床的に Ca 刺激によるインスリノーマの局在診断が行われている。Ca 刺激によるインスリノーマからのインスリン分泌は CaR を介していることが明らかにされている。正常膵ラ島における CaR の発現は未確認である。本研究では正常  $\beta$  細胞とインスリノーマ細胞における CaR の発現とカルシウムに対する反応性について検討を行った。

#### (材料と方法)

正常組織として手術にて得られたヒト正常膵組織及びコラゲナーゼ法にて得られたラット正常膵ラ島を用いた。比較対照としてヒト・インスリノーマ組織とその短期培養細胞を用いた。CaR 発現の対照としてヒト副甲状腺組織を用いた。抗 CaR 抗体は米国 NPS 社研究室より供与された。CaR の発現は免疫染色と RT-PCR にて検討した。PCR 産物は大腸菌 (DH5- $\alpha$ ) を用いて増幅し、シーケンスを行った。Ca 刺激に対する正常膵ラ島及びインスリノーマ細胞の反応性は fura-2 を導入した細胞の細胞質内 Ca 濃度を蛍光顕微装置で測定した。Ca 刺激による正常ラ島からのインスリン分泌の検討には還流実験系を用いた。

#### (結果)

(1) 抗 CaR 抗体を用いたインスリノーマの免疫組織染色では陽性対照と同程度の染色性であった。また、蛍光二重染色で正常膵では膵ラ島内の  $\alpha$ 、 $\beta$  細胞共に CaR の発現を認めた。CaR 特異的に作製した 3 組のプライマーに対する RT-PCR によりインスリノーマ及び正常膵組織において CaR の発現を認めた。PCR 産物のシーケンスでは遺伝子異常を認めなかった。(2) 蛍光顕微装置を用いた Ca 刺激による細胞質 Ca 濃度変化では、インスリノーマが細胞外 Ca 濃度を 0.5 から 2.5mM に上昇した時に細胞質内 Ca 濃度が上昇したのに対して膵ラ島では細胞質内 Ca 濃度の上昇を認めなかった。細胞外 Ca 濃度を 0.5 から 5mM に上昇した時にはインスリノーマ及び膵ラ島ともに細胞質内 Ca 濃度の上昇を認めた。この反応は電位依存性 Ca チャンネル阻害薬であるニフェジピンで抑制されなかった。一方、PI-3kinase 阻害薬である wortmannin ではインスリノーマにおける細胞質内 Ca 濃度上昇が抑制されたのに対して、ラ島においては抑制されなかった。(3) 還流実験で細胞外 Ca 刺激により正常ラ島からのインスリン分泌を認めた。

#### (結論)

正常膵ラ島  $\beta$  細胞において、インスリノーマと同様 CaR が発現しているにもかかわらず、低濃度の細胞外 Ca 刺激において細胞質内 Ca の反応性の程度に違いを認めた。正常膵ラ島とインスリノーマの両方で高濃度の細胞外 Ca 刺激では細胞質内 Ca 上昇を認めた。また、この反応が共にニフェジピンで阻害されないことより電位依存性 Ca チャンネルを介していないこ

とが示唆されるものの、wortmannin に対しては反応性が異なっていた。臨床的に用いられている Ca 刺激によるインスリノーマの局在診断が有用なのは、このような細胞外 Ca に対する正常ラ島とインスリノーマ細胞の反応性の違いによることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

カルシウム (Ca) に対するインスリノーマ (Ins) のインスリン分泌反応を利用した Ins の局在診断法、選択的動脈内 Ca 注入法が普及している。申請者は膵ラ島 (ラ島) と Ins 細胞における Ca 感受性受容体 (CaR) の存在と Ca 刺激に対する反応性を免疫組織染色法と CaR の RT-PCR、培養細胞を用いた蛍光顕微法で検討した。

(1) 抗 CaR 抗体を用いた免疫組織染色法でラ島と Ins 細胞の両方に CaR が染色されて、RT-PCR で副甲状腺と同様の CaR の存在が証明された。(2) ラ島細胞は還流実験系で細胞外 Ca 上昇に反応して、インスリンを分泌した。(3) 培養細胞系での蛍光顕微法を用いた細胞質内 Ca 測定では、還流液の Ca 濃度を 0.5mM から 2.5mM に上昇させると Ins 細胞のみに有意な細胞質内 Ca の上昇を認めた。Ca 濃度を 0.5mM から 5mM に上昇させるとラ島でも有意な細胞質内 Ca の上昇を認めた。この反応はニフェジピンで抑制されず、wortmannin では Ins 細胞の反応は抑制されたが、ラ島では抑制されなかった。以上の結果から、インスリノーマと膵ラ島では Ca 刺激に対する細胞質内 Ca 上昇反応が異なり、それは CaR の感受性と情報伝達系の相違によることが示唆された。

以上の研究は、CaR 機能の解明に貢献し、膵消化管内分泌腫瘍のホルモン分泌機構解明および内分泌ホルモンの診断法の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 16 年 2 月 23 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。