

氏名	奈部 浩一郎 なべ こういちろう
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第3036号
学位授与の日付	平成19年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Diphenylhydantoin suppresses glucose-induced insulin release by decreasing cytoplasmic H ⁺ concentration in pancreatic islets (Diphenylhydantoin は膵ラ氏島において細胞質 pH のアルカリ化によりインスリン分泌を抑制する)
論文調査委員	(主査) 教授 千葉 勉 教授 横出 正之 教授 中尾 一和

論 文 内 容 の 要 旨

Diphenylhydantoin (DPH) は生体内でインスリン分泌を抑制し、膵ラ氏島においてもグルコースによるインスリン分泌を抑制するが、その機序の詳細は不明であった。膵β細胞においては、細胞内グルコース代謝とインスリン分泌を密接に関連づける代謝-分泌連関が存在し、グルコースによる細胞内 ATP 濃度上昇により、K_{ATP} チャンネルが閉鎖し、細胞膜脱分極を介して細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇し、インスリン分泌が惹起される。さらに ATP は開口放出機構における Ca²⁺ 感受性を増強してインスリン分泌を増強する。申請者は単離ラット膵ラ氏島を用い DPH が膵β細胞代謝-分泌連関に及ぼす影響を検討し、グルコースによるインスリン分泌を抑制する機序の解明を試みた。

DPH は 16.7mM グルコースによるインスリン分泌を濃度依存性に抑制した。さらに 16.7mM グルコース、30mM K⁺、ジアゾキサイド存在下では、細胞内 Ca²⁺ 濃度に影響をあたえずインスリン分泌を抑制した。したがって、DPH のインスリン分泌抑制効果は細胞内 Ca²⁺ 濃度減少を介さなくても発揮される。DPH は 16.7 mM グルコースによる ATP 含量の増加を抑制し、ATP 産生抑制効果が示唆された。DPH は、グルコースによるミトコンドリア膜電位の過分極を抑制したが、glucose oxidation (TCA 回路での代謝の指標)、glucose utilization (解糖系での代謝の指標)、NAD(P)H 蛍光強度には影響を与えなかった。したがって、DPH は、呼吸鎖に対する NADH の供給を減少させることなく、NADH のミトコンドリア内膜での H⁺ 勾配形成効率を減少させることにより、ATP 産生低下をきたすことが示唆された。その機序として、細胞質アルカリ化の影響を検討した。DPH は 16.7mM グルコース存在下において膵ラ氏島 pH をアルカリ化することを明らかにした。細胞外に Na⁺ や HCO₃⁻ が存在しない条件下では DPH による pH の変化は認めず、その作用に Na⁺、HCO₃⁻ の細胞内外の交換が関連することが示された。さらに NH₄⁺ による膵ラ氏島細胞質アルカリ化も DPH と同様にグルコースによるインスリン分泌増加、ATP 含量増加、ミトコンドリア膜電位の過分極を抑制した。ミトコンドリア分画を用いた ATP 産生実験では、ピルビン酸、コハク酸を基質にして TCA 回路を経て NADH を産生させた場合、グリセロール 3 リン酸を基質にしてグリセロールリン酸シャトルを経て FADH₂ を産生させた場合、どちらでもアルカリ化により ATP 産生が抑制された。したがって細胞質アルカリ化は呼吸鎖への還元代謝産物の供給には影響を与えず、ミトコンドリア ATP 産生を低下させることが明らかになった。さらに permeabilized islet を用いた実験では pH のアルカリ化が開口放出機構における ATP 濃度固定条件での Ca²⁺ 感受性を低下させることも示された。

したがって DPH は細胞質アルカリ化によりミトコンドリアでの ATP 産生低下をきたし、開口放出機構の Ca²⁺ 感受性を低下させ、さらに細胞質アルカリ化自体も Ca²⁺ 感受性を低下させることによりインスリン分泌を抑制する。このことは、DPH が細胞内 Ca²⁺ 濃度の低下なしにインスリン分泌を抑制することを説明できる。これら新知見は生体において細胞内 pH を変化させる条件がミトコンドリア H⁺ 勾配の変化による ATP 産生の変化、開口放出機構の Ca²⁺ 感受性の変化をきたしインスリン分泌へ影響する可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

Diphenylhydantoin (DPH) は生体内でインスリン分泌を抑制し、膵島からのグルコース刺激インスリン分泌を抑制するがその機序の詳細は不明であった。申請者は DPH によるインスリン分泌抑制機序の解明を単離ラット膵島を用いて試みた。DPH のグルコース刺激インスリン分泌の抑制作用は、必ずしも細胞内 Ca^{2+} 濃度の減少を伴わなくても発現することを見出し、その作用が DPH のグルコースによる ATP 含量の増加に対する抑制効果に基づくことを証明した。DPH の ATP 増加抑制作用は、ミトコンドリア膜電位の過分極抑制作用に起因するが、この現象は、ミトコンドリア内還元物質の呼吸鎖への供給の減少によるものではなく、細胞質の H^+ 濃度の減少（アルカリ化）によりミトコンドリア内膜 H^+ 勾配を減弱させるためであると考えられた。これら一連の現象は、一般的な細胞質アルカリ化剤である NH_4^+ でも観察された。さらに、細胞質のアルカリ化は、ミトコンドリアでの ATP 産生低下に起因する ATP 濃度の低下によってだけでなく、ATP 濃度の低下を介さずに開口放出機構における Ca^{2+} 有効性を低下させることにより、インスリン分泌を抑制することを示した。

以上の研究は、細胞質 pH の膵 β 細胞代謝 - 分泌連関に対する重要な役割を明らかにし、糖尿病学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18年12月13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もある。