

氏名	いわくらとしお夫 岩倉敏夫
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	論医博第1768号
学位授与の日付	平成13年11月26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	Sustained enhancement of Ca^{2+} influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells. (SU剤グリベンクラミド負荷による膵β細胞株(RINm5F)へのアポトーシス誘導)
論文調査委員	(主査) 教授 中尾一和 教授 成宮周 教授 清野裕

論文内容の要旨

自己免疫性糖尿病(1型糖尿病)における膵β細胞死の機序の一つとしてフリーラジカルやサイトカインによる apoptosis の誘導が関与することが報告されている。最近になり1型糖尿病だけでなく、2型糖尿病に見られる膵β細胞の機能低下にも膵島細胞の apoptosis が関与しているとする報告がいくつかある。

トルブタミドやグリベンクラミドなどのスルフォニルウレア(SU)薬は2型糖尿病の治療に広く使われている。SU薬は膵β細胞の細胞膜上に存在するSU receptor(SUR)を介して K_{ATP} チャネルを閉鎖して細胞膜脱分極を引き起こし、細胞膜電位依存性 Ca^{2+} チャネル(VDCC)を介する細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こし、インスリン分泌を促すと考えられている。 Ca^{2+} 流入上昇による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がapoptosis誘導に関与することが神経細胞など多くの細胞で認められていることから、 Ca^{2+} 流入の持続的上昇が膵β細胞のapoptosisに関与するかどうかは臨床的にも興味深い点であるが、まだ充分解明されていない。

そこで本研究では、膵β細胞と同様にSURや K_{ATP} チャネルを有し、SU薬による細胞内への Ca^{2+} 流入が確認されている膵β細胞株(RINm5F)を用いて、グリベンクラミドの長期負荷による Ca^{2+} 流入の持続的上昇がapoptosisの誘導に関与するかを検討した。

RINm5Fに100nMから1mMのグリベンクラミドを8時間負荷してcell viabilityをMTT法で検討したところ、グリベンクラミド濃度依存性にcell viabilityは低下した。さらにグリベンクラミドを負荷した細胞はapoptosisの特徴を示すDNAラダーが確認された。またTUNEL染色によってDNA断片化も確認された。さらにHoechst33342とpropidium iodideの同時染色により、クロマチン凝集や断片化する細胞数がグリベンクラミドの濃度依存性に増加することが蛍光顕微鏡下で確認された。cell viabilityの低下及びapoptosisを起こす細胞数の増加は蛋白合成阻害薬であるcycloheximideの前処置により一部抑制された。

グリベンクラミドによるcell viabilityの低下やapoptosisの誘導はグリベンクラミド負荷時にVDCCブロッカーであるnitrendipineの同時投与や細胞外液の Ca^{2+} 濃度を減少させることにより一部抑制された。このことはグリベンクラミドが細胞内への Ca^{2+} 流入増加という機序によりapoptosisを誘導する可能性を示唆した。さらにfura-2を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、各条件下でのグリベンクラミド負荷時の細胞内 Ca^{2+} 濃度に比例してnecrosisではなくapoptosisが増加することが確認された。

以上の結果より、膵β細胞にみとめられるapoptosisの誘導に細胞内への Ca^{2+} 流入の持続的上昇が重要な役割を示す可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

2型糖尿病の治療薬であるSU薬は膵β細胞内に Ca^{2+} 流入を引き起こし、インスリン分泌を促す。 Ca^{2+} 流入上昇による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がアポトーシス誘導に関与することが神経細胞などで認められることから、 Ca^{2+} 流入の持続的

昇が膵β細胞のアポトーシスに関与する可能性が指摘されているが、まだ充分解明されていない。そこで本研究では、膵β細胞株 (RINm5F) を用いて、SU薬グリベンクラミドの長期負荷によるCa²⁺流入の持続的上昇がアポトーシスの誘導に関与するかを検討した。

負荷した細胞の多くにアポトーシスの特徴を示すDNAラダー及びTUNEL染色によるDNA断片化が確認された。さらにDNA染色により、クロマチン凝集や断片化する細胞数がグリベンクラミド濃度依存性に増加することが確認された。アポトーシスの誘導は負荷時にCa²⁺チャネルブロッカーの同時投与や細胞外液のCa²⁺濃度減少により一部抑制された。さらにFura-2を用いて細胞内Ca²⁺濃度を測定し、細胞内Ca²⁺濃度に比例してアポトーシスが増加することが確認された。これらより膵β細胞にみとめられるアポトーシスの誘導にSU薬による細胞内へのCa²⁺流入の持続的上昇が重要な役割を示す可能性が示唆された。

以上の研究は糖尿病治療における膵β細胞障害の機序解明に貢献し、糖尿病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13年10月23日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識認識のための試問を受け、合格と認められたものである。