TITLE:

Sustained enhancement of Ca^{2+} influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Iwakura, Toshio

CITATION:

Iwakura, Toshio. Sustained enhancement of Ca^{2+} influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells. 京都大学, 2001, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2001-11-26

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/150204>

RIGHT:

氏 名	いわ くら とし お 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がら、 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がら、 Ca^{2+} 流入の持続的上

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。