

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 β 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- α) 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 α 、 β 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 β 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。