

氏 名	加 藤 雅 之
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2045 号
学位授与の日付	平 成 10 年 7 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 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	インスリノーマにおけるカルシウム感受性を介する情報伝達機構

(主査)

論文調査委員 教授 清野 裕 教授 成宮 周 教授 今村正之

論 文 内 容 の 要 旨

通常の画像検査では描出できない不顕性膵インスリノーマの術前局在診断に選択的動脈内カルシウム注入試験(今村-D oppman法)が開発され、臨床において利用されている。本試験は、インスリノーマと正常膵ではカルシウム(Ca)刺激に対する反応が異なることに着目して開発された検査法であるが、この刺激分泌機構については未だ解明されていない。本研究は、Ca刺激に対するインスリノーマの細胞内情報伝達機構を明らかにしたものである。

グルコースを含む灌流液中のCa濃度を2.54mMより10mMに上昇させたとき、ヒト・インスリノーマ細胞よりのインスリン分泌量は一相性に増加し直ちに刺激前値に復した。このとき細胞質内Ca濃度($[Ca^{2+}]_i$)も瞬時に上昇しはじめ数10秒以内に頂値をとった後、徐々に減衰し刺激前値よりやや高い値で定常状態になった。一方、正常膵B細胞モデルであるMIN 6細胞においては、10mMのCa刺激に対してインスリン分泌量や $[Ca^{2+}]_i$ の増加を認めなかった。このインスリノーマ細胞において観察された $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は細胞膜に存在するCaチャンネルの阻害剤であるNifedipine (10 μ M) やLanthanum (0.5mM) を灌流液中に添加しても抑制されなかった。一方、イノシトールリン脂質代謝回転を阻害するNeomycin (10mM) を灌流液中に添加したときや小胞体内に貯蔵されている Ca^{2+} をThapsigargin (5 μ M) で枯渇せしめたのちには、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制された。小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵庫には2つのプール、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出機構(CICR; Ca^{2+} induced- Ca^{2+} release) が関与する Ca^{2+} プールとイノシトール三リン酸(IP_3)による Ca^{2+} 放出機構(HICR; IP_3 induced- Ca^{2+} release) が関与する Ca^{2+} プールが存在するが、CICRをRyanodine (200 μ M) で修飾しても10mMの細胞外液中Ca ($[Ca^{2+}]_o$) による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には全く影響をあたえなかった。他方、Carbachol (500 μ M) を前投与することにより後者の Ca^{2+} プール内の Ca^{2+} を枯渇せしめたのちでは、10mM $[Ca^{2+}]_o$ を添加しても $[Ca^{2+}]_i$ は上昇しなかった。次に、ヒト・インスリノーマ組織におけるカルシウム感受性受容体(CaR)遺伝子の発現の有無をSouthern blot法で検討した。インスリノーマ組織よりRNAを抽出しCaRに特異的なprimersをもちいRT-PCRを行なったところ、682bpのバンドを認めた。これをシーケンスしたところ既知のヒト副甲状腺のそれと一致した。続いて行なったPCR-Southern blotにより3検体においてCaR遺伝子の発現を確認した。

以上の結果より、高濃度の $[Ca^{2+}]_o$ に惹起されるヒト・インスリノーマ細胞よりのインスリン分泌量の増加は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によるものであり、この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には小胞体内のHICRからの Ca^{2+} 放出が中心的役割をになっていることが明らかになった。また、この情報伝達の最初の段階にはCaR汲が関わっていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

灌流実験において、ヒト・インスリノーマ細胞が高濃度のカルシウム (Ca) 刺激により10秒以内の細胞質内Ca濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇とインスリン分泌を惹起することを見出した。正常膵B細胞モデルであるMIN 6細胞においては、Ca刺激に対して無反応であった。この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はneomycin, thapsigargin, carbacholを灌流液中に添加することにより抑制されたが、細胞膜上のCaチャンネルブロッカー (nifedipine, lanthanum) やryanodineでは抑制されなかった。また、RT-PCR, Southern blot法によりヒト・インスリノーマ組織において上皮小体相同のCa感受性受容体 (CaR) 遺伝子の発現を確認した。従って、高濃度のCa刺激に惹起されるヒト・インスリノーマ細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は小胞体内の Ca^{2+} 放出が関与すると共に、この情報伝達の初期にはCaRが関わりイノシトール三リン酸系の経路も関与していることが明らかになった。

本研究はインスリノーマにおける新たなCa情報伝達機構の存在を明らかにしたものであり、本症の病態生理の解明に寄与するところが多い。

従って、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10年6月29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。