

氏 名	むかい え り 向 英 里
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2334 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 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	The effect of metabolic inhibition on ATP-sensitive K ⁺ channel block by sulfonylurea and cibenzoline in pancreatic β -cells. (膵 β 細胞における薬剤による ATP 感受性カリウムチャネル閉鎖に対する代謝阻害の効果)
論文調査委員	(主 査) 教 授 乾 賢 一 教 授 千 葉 勉 教 授 清 野 裕

論 文 内 容 の 要 旨

膵 β 細胞 ATP 感受性 K⁺チャネル (K_{ATP} チャネル) は、ブドウ糖によるインスリン分泌機構において重要な役割を果たしている。細胞内に取り込まれたブドウ糖は代謝され ATP を産生し、K_{ATP} チャネルを閉鎖する。それにより細胞膜の脱分極がおこり、電位依存性 Ca²⁺ チャネルが開口し細胞外から Ca²⁺ が流入する。このような細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が引き金となって、インスリンが分泌される。膵 β 細胞 K_{ATP} チャネルはスルフォニル尿素受容体 (SUR1) とチャネルポア蛋白 (Kir6.2) の少なくとも 2 つのサブユニットから成ることが知られており、2 型糖尿病の経口血糖降下薬であるスルフォニル尿素薬 (SU 薬) は、この K_{ATP} チャネルに作用してインスリン分泌を刺激する。心筋の K_{ATP} チャネルも膵 β 細胞と同様 ATP や SU 薬により閉鎖されるが、ジニトロフェノール (DNP) などで細胞内代謝阻害を誘発させると、SU 薬のチャネル活性抑制効果が減少することが報告されている。

そこで、SU 薬 (グリベンクラミド) による膵 β 細胞 K_{ATP} チャネルの閉鎖に対する細胞内代謝阻害の効果を検討した。単離ラット膵ランゲルハンス島より単一細胞を作製し、電気生理学的手法であるパッチクランプ法により K_{ATP} チャネル電流を測定した。グリベンクラミドのチャネル活性抑制効果は 100 μ M DNP 存在下、ならびに低濃度の ATP (0.1 μ M) 存在下で減少していた。 [³H]-グリベンクラミドを用いて細胞膜蛋白の結合実験を行ったところ、グリベンクラミドの結合親和性は 100 μ M DNP 存在下で変化を認めなかった。

一方、膵 β 細胞からのインスリン分泌を刺激することが知られている抗不整脈薬であるシベンゾリンは、K_{ATP} チャネルを閉鎖するが SU 薬とは結合部位が異なることが報告されている。そこで、代謝阻害下でのシベンゾリンの効果を同様に検討した。シベンゾリンによる K_{ATP} チャネルの閉鎖は、100 μ M DNP 存在下ならびに低濃度 ATP 存在下でも変化は認められなかった。SUR1 ならびに Kir6.2 を発現させた細胞膜分画を用いて結合実験を行ったところ、グリベンクラミドの特異的結合は SUR1 にのみ認められたのに対し、シベンゾリンの特異的結合は Kir6.2 に有意に認められた。

Kir6.2 は単独発現させてもチャネル活性を生じないが、C 末端を切除することにより単独でもチャネル活性を生じることが報告されている。そこで次に、シベンゾリンのチャネル作用部位をより直接的に証明する目的で、COS7 細胞に Kir6.2 末端切除蛋白 (Kir6.2 Δ C26) を単独発現ならびに SUR1 と共発現させたチャネルを作製し、シベンゾリンとグリベンクラミドによるチャネル活性抑制を測定した。グリベンクラミドは Kir6.2 Δ C26 単独発現チャネルには影響を及ぼさず、共発現チャネルには抑制効果を示した。一方、シベンゾリンは共発現チャネルと同様、単独発現チャネルにも抑制効果を発揮した。また、結合実験においてシベンゾリンは Kir6.2 Δ C26 蛋白に結合することが認められた。

グリベンクラミドによる K_{ATP} チャネルの閉鎖は代謝阻害ならびに低濃度 ATP 存在下で障害された。その障害機序において、グリベンクラミドの SUR1 への結合は障害されていなかったこと、および Kir6.2 に直接結合するシベンゾリンによるチャネル活性抑制は障害されなかったことから、SUR1 と Kir6.2 間のシグナル伝達機構に機能的な破綻が生じていることが示された。また、シベンゾリンは Kir6.2 に作用してチャネルを閉鎖することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

膵β細胞 ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP} チャンネル) は、ブドウ糖によるインスリン分泌機構に重要な役割を果たしている。膵β細胞 K_{ATP} チャンネルは SU 受容体 (SUR1) とチャンネルポア (Kir6.2) の複合体より構成され、ATP 濃度 (ATP/ADP 比) の上昇により閉鎖するが、経口血糖降下薬のスルフォニル尿素薬 (SU 薬) によっても閉鎖する。申請者は、SU 薬 (グリベンクラミド: GLB) による膵β細胞 K_{ATP} チャンネル閉鎖に対する細胞内代謝阻害の効果を検討した。パッチクランプ法により測定したところ、GLB のチャンネル活性抑制は代謝阻害状態下で減弱した。同様に K_{ATP} チャンネルを閉鎖するが SU 薬とは結合部位が異なる抗不整脈薬シベンゾリン (CBZ) による K_{ATP} チャンネルの閉鎖は、代謝阻害状態下でも変化しなかった。SUR1 と Kir6.2 を発現させた細胞膜分画結合実験では、GLB は SUR1 にのみ特異的に結合したが、CBZ は Kir6.2 に有意に特異的に結合した。C 末端を切除した Kir6.2 (Kir6.2ΔC26) を単独発現させたチャンネルを作製し、CBZ の抑制効果を調べたところ、SUR1 との共発現チャンネルと同様に単独発現チャンネルに抑制効果を示した。よって、代謝阻害状態下では SUR1 と Kir6.2 間のシグナル伝達機構に機能的な破綻が生じていること、シベンゾリンは Kir6.2 に作用してチャンネルを閉鎖することが明らかとなった。

以上の研究は、膵β細胞 K_{ATP} チャンネル制御機構の解明に貢献し、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13年2月14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。