

|           |                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | 梶 川 まりこ                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2318 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    | An insulintropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular $\text{Ca}^{2+}$ concentration in pancreatic $\beta$ -cells through nongenomic signal transduction<br>(膵 $\beta$ 細胞におけるビタミン D 類似化合物の遺伝子非制御下細胞内情報伝達を介する細胞内カルシウム濃度の上昇を伴うインスリン分泌増強効果) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 井 上 一 知      教 授 野 間 昭 典      教 授 清 野 裕                                                                                                                                                                                                         |

### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】ビタミン D は脂溶性ビタミンの一種で、カルシウムホメオスターシスを調節するホルモンである。核レセプター (nVDR) を介した遺伝子賦活を伴う遺伝子制御下に発現する作用と (genomic action), 細胞膜上のレセプター (mVDR) を介し、遺伝子の賦活を伴わない非遺伝子制御下の作用 (non-genomic action) が存在する。ビタミン D は non-genomic 作用を介して Rat insulinoma cell line (RIN) を含め種々の細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を短時間で増加させることが報告されている。細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入は膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌を惹起する重要なシグナルであることから、膵 $\beta$ 細胞に対するビタミン D の non-genomic 作用について明らかにするため、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  analog で、mVDR にのみ結合しビタミン D の non-genomic 作用のみを誘導する  $1\alpha, 25(\text{OH})_2$  lumisterol<sub>3</sub> (アナログコード JN) を用いて正常膵ラ氏島におけるブドウ糖によるインスリン分泌に対する影響とその機序について検討した。

【方法】ラットより膵ラ氏島を単離後、static incubation 法及び perfusion 法にて分泌されたインスリンを測定した。electrical permeabilization によって細胞に微少な穴をあけた膵ラ氏島 (permeabilized islets) を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、細胞内 ATP 濃度を固定した条件下でのインスリン分泌を測定した。単離した膵ラ氏島を単一細胞とした後、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬である fura2-AM を負荷し、顕微鏡的分光光度計で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を測定した。

【結果】JN は 16.7mM ブドウ糖によるインスリン分泌を濃度依存的に増強したが、3.3mM ブドウ糖によるインスリン分泌には影響を与えなかった。JN は 16.7mM ブドウ糖による 2 相性インスリン分泌の第 2 相のみを有意に増強し、この増強効果は 30 分間の JN の除去によって消失した。JN は 200 $\mu\text{M}$  ジアゾキサイド (Dz), 30mMK<sup>+</sup> 存在下 (ATP 依存性 K<sup>+</sup> チャネルを介さず脱分極している条件下) で 16.7mM ブドウ糖によるインスリン分泌は増強したが 3.3mM ブドウ糖によるインスリン分泌は増強しなかった。JN は 16.7mM ブドウ糖, 30mMK<sup>+</sup>, 200 $\mu\text{M}$  MDz 存在下での  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を有意に増強したが 3.3mM ブドウ糖, 30mMK<sup>+</sup>, 200 $\mu\text{M}$  MDz 存在下での  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  には影響を与えなかった。以上の JN によるインスリン分泌,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増強効果は non-genomic 作用の特異的拮抗物質である  $1\beta, 25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  及び電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (VDCC) blocker である nitrendipine によって消失した。30nM, 300nM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下での permeabilized islets からのインスリン分泌は JN によって増強されなかった。

【結論】ビタミン D の non-genomic 作用を介したインスリン分泌に対する増強効果の存在が示された。JN のインスリン分泌増強効果は高濃度ブドウ糖存在下で認められ、ATP 依存性 K<sup>+</sup> チャネル非依存性インスリン分泌に対しても認められた。その機序は、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性の増強によるのではなく、ブドウ糖代謝と関連した VDCC からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入の増加によることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

膵 $\beta$ 細胞に対するビタミンDの遺伝子の賦活を伴わない非遺伝子制御下の作用 (non-genomic action) について明らかにするため、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitamin D}_3$  誘導体で、細胞膜上のレセプターにのみ結合し、ビタミンDの非遺伝子制御下の作用のみを誘導する  $1\alpha,25(\text{OH})_2 \text{ lumisterol}_3$  (アナログコード JN) を用いて正常膵ラ氏島におけるブドウ糖によるインスリン分泌に対する影響とその機序について検討を行った。その結果ビタミンDの非遺伝子制御下の作用を介したインスリン分泌に対する増強効果が認められた。JNのインスリン分泌増強効果は高濃度ブドウ糖によるものだけでなく、ATP感受性 $\text{K}^+$ チャネル非依存性のインスリン分泌も増強した。その機序は、インスリン分泌の開口放出機構の $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の増強によるのではなく、ブドウ糖代謝と関連したVDCCからの $\text{Ca}^{2+}$ 流入の増加によることが示された。

以上の研究は、インスリン分泌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のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成13年1月30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。