

氏 名	橋 恵
(ふりがな)	(たちばな めぐみ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 1 月 7 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
学 位 論 文 題 名	Possible contribution of taurine to distorted glucagon secretion in intra-islet insulin deficiency: A metabolome analysis using a novel α -cell model of insulin-deficient diabetes (インスリン欠乏状態の膵島におけるグルカゴン分泌異常に対するタウリンの役割：インスリンが枯渇した糖尿病の膵 α 細胞モデルにおけるメタボローム解析を通して)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 矢 野 貴 人 教授 高 井 真 司 教授 朝 日 通 雄

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背 景》

インスリン分泌が枯渇した糖尿病患者は、しばしば血糖変動が大きく、このことは臨床
上深刻な問題である。これまでに我々は、インスリン分泌能が枯渇した1型糖尿病にお
けるグルカゴン分泌能は、残存膵 β 細胞機能とは独立した血糖変動への寄与因子であるこ
とを報告してきた (Bessho M et al. Diabetes Res Clin Pract, 2013)。健常者では生理的に、
膵 α 細胞は低グルコースによりグルカゴン分泌が刺激され、高グルコースによりグルカゴ
ン分泌が抑制されるが、糖尿病患者ではこの調節機構が破綻しているといわれている。イ
ンスリン分泌が枯渇している糖尿病患者では、膵島レベルで慢性的なインスリン欠乏状態

にあるといえるが、慢性的なインスリン欠乏がグルカゴン分泌に与える影響については明らかではない。近年、膵島においてグルコース濃度がグルカゴン分泌に影響しているという報告や、膵 α 細胞におけるインスリンレセプターの発現ないしインスリンシグナルが、適切なグルカゴン分泌反応に重要であるという報告がある。これらの報告は、膵 α 細胞でのインスリンによるパラクライン効果の欠如がグルカゴン分泌異常に寄与することを示唆しているが、その機序を膵 α 細胞の細胞内代謝の観点から検討した報告はない。

《目 的》

In vitro でインスリン作用の慢性的に欠乏した α 細胞モデルを作製し、グルコース応答性のグルカゴン分泌動態について検討する。さらに、細胞内代謝物の網羅的解析を行い、インスリン作用の欠乏による細胞内代謝の変化がグルカゴン分泌に与える影響について検討する。

《方 法》

マウス膵 α 細胞株である α TC1-6細胞のインスリンレセプター遺伝子を、short hairpin RNA 発現レンチウイルスベクターを用いて安定的にノックダウンした細胞（IRKD細胞）を作製した。継代後、KRB buffer（5.6 mM グルコース濃度）に置換し、その後、グルコース濃度を 1.5 mM、5.6 mM、30 mM とした時のグルカゴン分泌を ELISA 法にて測定し、コントロール細胞と比較した。インスリン受容体をノックダウンすることによる細胞内代謝の変化を検討すべく、IRKD細胞とコントロール細胞の細胞内代謝産物のメタボローム解析（CE-TOFMS）を行った。解析結果において IRKD細胞とコントロール細胞間で有意差の得られた物質を選出し、各物質の細胞内での合成酵素の遺伝子発現と、トリチウムでラベルした各物質の細胞内への取り込みを検討した。

《結 果》

IRKD細胞ではインスリンレセプターは約 80%ノックダウンされていた。IRKD細胞に

おけるグルカゴン分泌は、コントロール細胞に比し、低グルコース時に抑制傾向にあり、高グルコース時に亢進していた。メタボローム解析の結果において IRKD 細胞とコントロール細胞間で有意差を認めたタウリン、アルギニン、グルタミン、ロイシンの、細胞内での合成酵素の遺伝子発現と細胞内への取り込み能を検討した。IRKD 細胞では、タウリン合成酵素の発現と細胞内へのタウリンの取り込みが亢進していた。一方、IRKD 細胞ではアルギニン合成酵素の発現と、アルギニンの取り込みは低下していた。その他の結果には有意差を認めなかった。これらの結果より、タウリンがグルカゴン分泌に影響を及ぼす可能性が考えられた。10 mM のタウリンを 1.5 mM、5.6 mM、30 mM のグルコース濃度下で IRKD 細胞とコントロール細胞に添加すると、IRKD 細胞でのみ、タウリン存在下で高グルコース時のグルカゴン分泌が刺激された。インスリンレセプターノックダウン膵島でも同様の検討を行うと、タウリン存在下で高グルコース時のグルカゴン分泌が刺激された。

《考 察》

本研究の結果、インスリン作用が慢性的に欠乏した膵 α 細胞においてグルカゴンの奇異性分泌が認められ、その一因として細胞内代謝の変化、とくにタウリンの上昇が関与している可能性が示唆された。タウリンがグルカゴン分泌異常を引き起こすという報告は今までにない。しかしこれまでに、タウリンが膵 β 細胞や筋細胞で K_{ATP} チャネル活性を阻害するという報告や、膵 β 細胞においてタウリンの添加により細胞内カルシウム濃度が上昇し、インスリン分泌が亢進したという報告がある。これらのことより、IRKD 細胞において、タウリンは K_{ATP} チャネル活性の阻害や細胞内カルシウム濃度の上昇を介してグルカゴン分泌を刺激している可能性が考えられる。

《結 論》

インスリンレセプターをノックダウンした膵 α 細胞は、コントロールの α 細胞と比較して、奇異性のグルカゴン分泌動態を示し、その一因として細胞内タウリンの増加が示唆さ

れた。これらの知見は、インスリン分泌が枯渇した 1 型糖尿病患者の病態解明および治療の一助となる可能性がある。

論文審査結果の要旨

糖尿病患者ではインスリン分泌異常が存在するが、インスリンはグルカゴン分泌の重要な調節因子である。そのため、インスリンの分泌低下はグルカゴン分泌異常を来し、血糖の不安定性に寄与する可能性がある。しかし、インスリン分泌低下がグルカゴン分泌異常をきたす機序については未だ解明されていない。申請者は、本研究においてマウス膵 α 細胞株を用い、インスリンレセプターをノックダウンした、即ち *in vitro* でインスリン作用が慢性的に欠乏している α 細胞 (IRKD 細胞) を作製し、IRKD 細胞におけるグルカゴン分泌動態をコントロール細胞と比較検討した。さらに IRKD 細胞において細胞内代謝産物の網羅的解析 (メタボローム解析) を行い、グルカゴン分泌異常に及ぼす影響のある因子を、膵 α 細胞の細胞内代謝の変化という観点から検討した。その結果、IRKD 細胞のグルカゴン分泌は低グルコース時には抑制傾向にあり、高グルコース時に刺激されるという奇異性分泌を呈した。またメタボローム解析の結果から、タウリンがグルカゴン分泌異常に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで IRKD 細胞にタウリンを添加すると、高グルコース時にグルカゴン分泌の刺激を認めた。また、同様の結果は、インスリンレセプターをノックダウンした膵島にても得られた。これらのことより、インスリン作用が慢性的に欠乏した膵 α 細胞は奇異性のグルカゴン分泌動態を示し、その一因として、細胞内タウリンの増加が示唆された。

今回の研究は、インスリン分泌が枯渇した 1 型糖尿病におけるグルカゴン分泌異常メカニズムの一端を明らかにしたもので、1 型糖尿病における血糖不安定性の原因解明に有益な示唆を与える研究といえる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

PLOS ONE 9(11): e113254, 2014 Nov 13,
doi:10.1371/journal.pone.0113254