

氏名(本籍) 村 上 学

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 博 第 1053 号

学位授与年月日 平 成 2 年 3 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学研究科
(博士課程) 内科学系専攻

学位論文題目 Amylin (糖尿病関連ペプチド) のB細胞機能への影響

(主 査)
論文審査委員 教授 豊 田 隆 謙 教授 平 則 夫
教授 岡 本 宏

論文内容要旨

【序 文】

Noninsulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) の膵ランゲルハンス島内に、アミロイド様物質が蓄積することは、NIDDMの一般的かつ特徴的の病理所見であることが知られている。またアミロイド様沈着は、インスリン産生腫瘍においてもみられることが知られている。近年、このアミロイド様物質が単離され、そのアミノ酸構造が明らかにされた。この物質は、amylinとか、diabetes-associated peptide (糖尿病関連ペプチド)、あるいはislet amyloid polypeptide (IAPP) と呼ばれている。

Amylinは、免疫学的手法により、膵ランゲルハンス島B細胞の分泌顆粒内にインスリンとともに存在することが証明されている。さらに、amylinのcDNAのクローンも既に明らかとなっており、現在ではランゲルハンス島のB細胞からインスリンとともに分泌されるホルモンと考えられている。

Amylinのアミノ酸構造は、37個のアミノ酸で構成され、calcitonin-gene related peptide (CGRP) と46%の一致を示す。既にCGRPが膵B細胞のインスリン分泌を抑制することが報告されていることと、NIDDMの悪化とともにアミロイド様物質の蓄積がおこることから、amylinがNIDDMの原因物質の可能性があると考え、以下の実験を行った。

【方 法】

1. マウス尾静脈よりの負荷試験

(1) 4.25nmol/kgのamylinを生理食塩水にて溶解し、DDYYマウス(25-35g)に尾静脈より投与した。投与後2分、6分、10分の時点で、採血し、血糖と血清中インスリン濃度を測定した。対照群には生理食塩水のみ投与した。

(2) 4.25nmol/kgのamylinを(1)の実験と同様の方法にて、glucose 2.8 mmol/kgとともにDDYYマウスに投与した。ブドウ糖刺激に対する初期インスリン分泌相にあたる投与後2分の時点で採血し、血糖と血清中インスリン濃度を測定した。対照群には、glucose 2.8 mmol/kgを生理食塩水に溶解し投与した。

2. Rin m 5 F細胞のインスリン分泌に対する影響

X線照射ラット由来のインスリンノーマ細胞であるRin m 5 F細胞を、RPMI-1640, 10% fetal calf serum, 37°C, 5%CO₂にて継代培養した。Modified KRBB (Krebs-Ringer-bicarbonate-buffer) に、種々のインスリン分泌刺激物質を混じてamylin存在下、非存在下にてRin m 5 F細胞

胞からのインスリン分泌を比較検討した。

【結 果】

1. マウス尾静脈負荷試験

(1) amylinはインスリン基礎分泌を、投与後10分の時点で、対照群に比して $64.6 \pm 13.3\%$ と有意に抑制した ($p < 0.05$)。血糖値には有意差は認められなかった。

(2) amylinはマウス経静脈ブドウ糖負荷試験において、インスリン分泌を抑制する傾向を示し、血糖値を有意に上昇させた。(amylin投与群 $175.4 \pm 12.5\text{mg/dl}$ vs. 対照群 $92.6 \pm 8.0\text{mg/dl}$, $p < 0.01$)

2. Rin m 5 F細胞のインスリン分泌に対する影響

Glucoseの中間代謝産物でD-glyceraldehyde (10mM), L-arginine (20mM) 刺激によるインスリン分泌 促進作用を、amylinは有意に抑制した。

次に、amylinのインスリン分泌抑制作用機序を調べる目的で、carbachol (0.1mM), forskolin (1 μM), isoproterenol (1 μM), isobutylmethylxanthine (IBMX, 1mM), dibutyryl-cyclic-adenosine-monophosphate (db-cAMP, 1mM) を用いた。forskolin, isoproterenolによるインスリン分泌促進作用をamylinは有意に抑制した。carbachol, IBMX, db-cAMPによるインスリン分泌促進作用には、amylinは影響しなかった。

【考 察】

Amylinはマウス尾静脈負荷試験において、インスリン基礎分泌を抑制し、耐糖能を悪化させた。Amylinがブドウ糖負荷試験において、軽度のインスリン分泌抑制作用と、有意な血糖上昇作用を示したことから、インスリン抵抗性の憎悪が耐糖能悪化の主因と考えられた。

Amylinは、Rin m 5 F細胞のD-glyceraldehyde, L-arginine, isoproterenol, forskolinによるインスリン分泌促進作用を抑制したが、IBMX, db-cAMP, carbacholによるインスリン分泌作用には影響しなかった。Isoproterenolが β 受容体を介して細胞内cyclic-adenosine-monophosphate (cAMP) を上昇させること、forskolinがadenylate cyclase促進作用を有すること、IBMXがphosphodiesterase (PDE) の阻害物質であること、db-cAMPがPDEで代謝されないことよりamylinによるインスリン分泌抑制作用は、adenylate cyclase抑制作用によるものと考えられた。

審査結果の要旨

ヒトのインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) において高頻度に膵ラ島にアミロイド沈着が認められる。Amylin (Islet amyloid poly-peptide) はヒトNIDDM症例の膵ラ島アミロイド沈着物より単離されたホルモンである。Amylinはラット筋肉においてグリコーゲン合成とブドウ糖膜透過を阻害し、インスリン抵抗性をきたすことが報告されている。NIDDMにおいては、インスリン抵抗性とインスリン分泌異常は共存する。本研究はAmylinのin vivoでの糖代謝への作用を検討し、かつin vitroでRINm 5 F細胞のインスリン分泌への作用を調べて、まだ報告の少ないAmylinの生理作用を明らかにしようとしたものである。

DDYマウスにAmylin (4.28mmol/kg) を静注すると、血糖は変化しないが、血漿インスリン値は有意に低下した。IVGTT時にAmylinを同時に静注すると、耐糖能は有意に増悪し血漿インスリン値も低下する傾向を示した。この成績はAmylinのインスリン分泌抑制作用と耐糖能悪化作用をはじめてin vivoで実証したものである。

RINm 5 F細胞のインスリン分泌に対するAmylinの作用の検討では Amylin単独では作用を示さないが、D-glyceraldehyde, L-arginine, isoproterenol, farskolin刺激インスリン分泌反応を抑制することがはじめて明らかとなった。AmylinはIBMX, dibutyl-cyclic AMP, およびcarbacol刺激インスリン分泌反応には有意の作用を示さなかった。これらの成績から、Amylinのインスリン分泌抑制作用はアデニル酸シクラーゼの活性化を伴う分泌刺激物質のインスリン分泌にのみ認められることから、Amylinの作用部位としてこの酵素の抑制作用に基づくことが想定された。

本研究により、in vivoでAmylinがインスリン分泌を抑制し、耐糖能を悪化させることがはじめて実証された。またRINm 5 F細胞を用いた検討から、Amylinがアデニル酸シクラーゼの活性化を伴うインスリン分泌反応を抑制することをはじめて明らかにした。本研究から、NIDDMに認められるインスリン抵抗性だけでなく、インスリン分泌異常にもAmylinが関与することが想定された。

本研究は以上の意味で、新発見の発見の多い、独創的な研究であり、充分学位論文に値するものと考えられる。