

博士課程用 (甲)

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(和田 恵梨) 印

(学位論文のタイトル)

Disordered branched chain amino acid catabolism in pancreatic cells is associated with postprandial hypersecretion of glucagon in diabetic mice.

(膵島の分岐鎖アミノ酸代謝障害は糖尿病の食後のグルカゴン分泌亢進に関与する)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

2型糖尿病では高グルカゴン血症が認められており、高血糖の一因と考えられている。実際にグルカゴン受容体拮抗薬の投与で高血糖が改善される報告もあり、グルカゴンを抑えることが病態改善に有用であると考えられる。しかしながら、糖尿病のグルカゴン分泌異常の機序は不明である。所属研究室では、糖尿病患者に対して食事負荷試験を行い、空腹時よりも食後に高グルカゴン血症が顕著となることを明らかとした。食後に高グルカゴン血症となる原因として、栄養素に対するグルカゴンの過剰分泌が起こっていると考えた。そこで本研究では、グルカゴン過剰分泌に関連する栄養素の特定および、そのメカニズムの解明を目的とした。

糖尿病モデルマウスを4種類作製し、食事前後でのグルカゴン濃度を測定した。糖尿病患者と同様に、すべての糖尿病モデルマウスで食後高グルカゴン血症が認められた。そこで、単独栄養素の負荷を行い、グルカゴン濃度を測定した。3大栄養素(たんぱく質、脂質、炭水化物)をそれぞれ負荷したところ、たんぱく質の負荷後にすべての糖尿病モデルマウスで高グルカゴン血症が認められた。そこで、更にグルカゴン過剰分泌関連栄養素を特定するため、3種のアミノ酸溶液(分岐鎖アミノ酸、分岐鎖アミノ酸以外の必須アミノ酸、非必須アミノ酸)を作製し、それぞれ投与した。すると分岐鎖アミノ酸(BCAA)投与後にのみ、糖尿病モデルマウスで高グルカゴン血症となることが認められた。

続いて、BCAAが膵 α 細胞に直接作用しているか検証した。グルカゴン分泌は細胞内カルシウム流入によって起こることが知られている。そこで、Glucagon-Cre/tdTomatoマウスより単離した膵島を単一細胞にして、細胞内カルシウムプローブであるFura2を取り込ませた上でBCAAの灌流を行い、tdTomato陽性細胞のカルシウム濃度を測定した。その結果、BCAA添加でカルシウム流入の増加が認められ、BCAAが膵 α 細胞に直接作用し、カルシウム流入を伴ってグルカゴン分泌を促している可能性が考えられた。続いてBCAAの主要輸送体であるL型アミノ酸輸送体の阻害剤を用いて、BCAA取り込みを阻害した際のグルカゴン分泌を評価した。単離膵島に対してBCAAを添加するとグルカゴン分泌が認められたが、L型アミノ酸輸送体の添加でグルカゴン分泌が抑制された。以上より、BCAAはL型アミノ酸を介して細胞内に取り込まれ、グルカゴン分泌を促進していることが考えられた。

次に、糖尿病病態でグルカゴンが過剰分泌となるメカニズムの解明を試みた。糖尿病モデルマウスの膵島では健常モデルマウスの膵島に比べ、BCAA添加時のグルカゴン分泌過剰が認められた。糖尿病モデルマウス膵島の遺伝子発現を解析し、BCAA代謝促進酵素であるBCAT2の発現低下、お

よびBCAA代謝抑制酵素であるBCKDKの発現増加を確認した。即ち、糖尿病モデルマウス膵島では、BCAAの代謝異常が起こっている可能性が示された。実際に膵島のBCAA代謝産物を調べると、BCAA異化で産生される分岐鎖ケト酸や分岐鎖アシルCoAの含量は糖尿病モデルマウス膵島で減少していた。そこで、BCKDK阻害剤であるBT2を糖尿病モデルマウス膵島に添加したうえで、BCAA添加を行ったところ、グルカゴンの過剰分泌は改善された。糖尿病の膵島障害の一因として脂肪酸曝露が知られている。そこで、健常マウスの膵島を単離してパルミチン酸を添加し、脂肪毒性によるグルカゴン分泌障害を検証した。すると、パルミチン酸負荷膵島において、BCAA添加によるグルカゴン過剰分泌が認められた。遺伝子の発現解析を行ったところ、BCAA異化酵素であるBCKDHaの発現抑制および、その阻害酵素であるBCKDKの発現増加が認められた。そこで、BT2の添加を行うと、糖尿病モデルマウスの膵島同様に、BCAAによるグルカゴン過剰分泌は改善された。以上より、糖尿病モデルマウスで認められたBCAA応答性高グルカゴン血症は、膵島細胞のBCAA代謝異常が関与していることを明らかとした。

糖尿病ではBCAAの血中濃度が高くなっており、実際に本研究で用いた糖尿病モデルマウスの血中BCAA濃度も高値となっている。その原因として糖尿病の肝細胞や脂肪細胞におけるBCAA代謝異常が報告されている。本研究では膵島でも同様にBCAA代謝異常が起こっており、それが糖尿病における食後グルカゴン分泌亢進に関与していることを初めて明らかとした。