

研究論文題目

膵β細胞上の新たな受容体—グルコース感知受容体 T1R3—の機能解析

1 背景と目的

糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌低下とその作用不足により高血糖をきたす疾患であり、インスリン分泌機構の解明は糖尿病の病態解明や新たな治療法を確立する上で重要である。インスリン分泌の制御機構についてはこれまで多くの研究がなされてきていた。1970年代には作用機構として、グルコースはグルコース輸送体 Glut2 を介して細胞内に取り込まれ、解糖系やミトコンドリアで代謝されるという糖代謝経路を経てインスリン分泌を促進する「代謝説」とβ細胞膜上に糖濃度を感知する受容体が発現しておりこれを介してインスリン分泌が促進されるという「レセプター説」が提唱されていたが、現在は前者が定説とされている。

近年、舌の味蕾に存在する甘味受容体(T1R2+T1R3)が全身の臓器にも存在することが明らかとなった。そして、β細胞においても甘味受容体のサブユニット T1R3 からなる受容体が発現しており、代謝を受けない甘味物質においても膵β細胞を刺激すると、インスリン分泌が促進されることが明らかになってきた。

非「糖代謝経路」によるインスリン分泌機構は甘味受容体サブコンポーネント T1R3 からなる「グルコース感知受容体」によるものと想定される。本研究の目的は、この受容体の機能・生理学的意義を明らかにすることである。グルコース感知受容体のシグナル伝達機構は複雑でいまだ不明な点が多く、特異的な阻害薬があればその機能や生理学的意義の解明に有用である。甘味阻害剤ラクチゾールはヒト T1R3 に結合し、その機能を抑制する。本研究では、まずラクチゾールがグルコース感知受容体の機能を抑制するかどうかを検討し、さらにそれを用いてグルコース作用におけるグルコース感知受容体の意義の検証を行った。

2 対象並びに方法

マウス膵β細胞株 MIN6 細胞、マウス単離膵島、マウス T1R3(以下 mT1R3)を導入した HEK293 細胞を用いて、甘味物質(スクラロース・アセスルファム K・グリチルリチン)で刺激し、細胞内の Ca^{2+} ・ATP・cAMP・NADH 濃度の変化とインスリン分泌量を測定した。また、これらがラクチゾール存在下で抑制されるかどうかを検討した。

HEK293 細胞への mT1R3 導入は電気穿孔法を用いて行い、 Ca^{2+} 応答のあるコロニーを選択的に単離して得た細胞株を解析に用いた。細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)の測定は蛍光インジケータ fluo-8 を導入し、細胞内 ATP 濃度($[\text{ATP}]_i$)測定はルシフェラーゼ遺伝子を導入し、細胞内 cAMP

濃度($[cAMP]_c$)は EPac1-camps を導入し、蛍光あるいは燐光強度の変化を測定した。NADH は自家蛍光強度の変化を測定した。インスリン濃度は radioimmunoassay 法を用いて測定した。

3 成績

マウス膵 β 細胞株 MIN6 細胞において、グルコース感知受容体を刺激する甘味物質投与により $[Ca^{2+}]_c$ 増加がみられ、インスリン分泌が促進された。この反応はラクチゾールにより抑制されたが、KCl 脱分極刺激による $[Ca^{2+}]_c$ 増加及びインスリン分泌は抑制されなかった。 $[cAMP]_c$ 増加作用に対する効果を検討したところ、ラクチゾールはスクラロースやアセスルファム K による $[cAMP]_c$ 上昇を抑制しなかった。mT1R3 を導入した HEK293 細胞をスクラロースで刺激した場合においても $[Ca^{2+}]_c$ 及び $[cAMP]_c$ の上昇がみられ、ラクチゾールにより上記同様に前者は抑制されたが、後者は抑制されなかった。MIN6 細胞において、ラクチゾールは高濃度グルコース刺激による NADH 上昇・ $[ATP]_c$ 上昇・インスリン分泌を抑制した。単離膵島において、ラクチゾールは KCl 脱分極刺激によるインスリン分泌を抑制しなかったが、高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌を抑制した。

4 考察

本研究により、MIN6 細胞に対し、甘味物質の刺激により $[Ca^{2+}]_c$ ・ $[NADH]$ ・ $[ATP]_c$ の上昇及びインスリン分泌増加がみられ、甘味阻害剤ラクチゾールにより、グルコース感知受容体を介して起こるこれらのシグナル及びインスリン分泌を顕著に抑制したことを示した。この結果及び非代謝性ブドウ糖アナログ 3-O-methylglucose の刺激により第 1 相目の素早い ATP 応答がみられるものの「糖代謝経路」による第 2 相目の応答はみられないという既報の結果と合わせて考察すると、膵 β 細胞におけるインスリン分泌は、現在定説の「糖代謝経路」による機構と、T1R3 からなる「グルコース感知受容体」を介する「レセプター経路」による機構の、両者が相互的に作用して制御される可能性が示唆された。また味覚研究の分野において、ラクチゾールはヒトの味覚は阻害するがげっ歯類の味覚は阻害しないことが定説となっている。しかし本研究の結果から、mT1R3 に対しても 5 mM まで濃度を上げるとラクチゾールが T1R3 に作用し、グルコース感知受容体の抑制薬として機能することが明らかになった。

5 結論

本研究では、グルコース感知受容体 T1R3 が各種甘味物質に対し応答することを示した。そして、ラクチゾールはマウス膵 β 細胞のグルコース感知受容体の阻害薬として機能し、甘味物質やグルコース刺激によるインスリン分泌を抑制することを示した。グルコース感知受容体の解明は、インスリン分泌機構解明の鍵となり、糖尿病の病態解明及び治療の橋渡しとなることが期待される。