Osaka University Knowledge Archive

Title	Cellular Hypoxia of Pancreatic β-Cells Due to High Levels of Oxygen Consumption for Insulin Secretion in Vitro
Author(s)	佐藤, 叔史
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59000
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【1】

氏　　名	佐　藤　叔　史（さとう よしふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第　24815　号
学位授与年月日	平成23年4月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Cellular Hypoxia of Pancreatic β-Cells Due to High Levels of Oxygen Consumption for Insulin Secretion in Vitro （膵β細胞はインスリン分泌による高い酸素消費により低酸素に陥る）
論文審査委員	（主査） 教　授　下村伊一郎 （副査） 教　授　伊藤　壽記　　教　授　宮崎　純一

論文内容の要旨

［目　的］

酸素消費は酸素供給と共に細胞内酸素分圧の規定因子である。膵β細胞からのインスリン分泌時にはミトコンドリア呼吸が高まり、短時間に大量の酸素が消費される。酸素供給が十分でなければ細胞が低酸素に陥る可能性が推測された。細胞の低酸素を考える上で酸素消費に着目した研究は少なく、膵β細胞についてはこれまで検討されていない。我々はインスリン分泌に伴う酸素消費の亢進が細胞内の酸素分圧に与える影響を in vitro, ex vivo と in vivo において検証した。

［方　法　ならびに　成　績］

2つの方法を用いて細胞内の酸素状態をモニターした。①低酸素下で起こる低酸素プローブ pimonidazole (pimo) と細胞内 macromolecule との adduct 形成を細胞（組織）染色法、ウエスタンブロッティング法、フローサイトメトリーにより検出した。②低酸素下で誘導される Hypoxia inducible factor-1α（HIF-1α）の発現をウエスタンブロッティング法により検出した。

まず膵β細胞株 MIN6 (MIN6) を用いて、pimo 陽性を示す、あるいは HIF-1αが誘導される条件を検討した。高グルコースでインスリン分泌を促進した条件下で酸素供給を低下させた時、MIN6 は軽度な低酸素下 (7% O_2) から pimo 陽性細胞が増加し、10% O_2 から HIF-1αの発現が増強した。膵外分泌細胞 PANC-1 ではこのような現象を認めなかった。次に細胞内の酸素分圧における酸素消費の寄与を調べた。呼吸鎖の阻害剤 (antimycin, rotenone) で酸素消費を抑制した場合、MIN6 の低酸素化は抑制された。一方、脱共役剤で酸素消費を亢進させた場合には細胞の低酸素化は促進された。

続いて、インスリン分泌量はグルコース依存的に増加するので、細胞の低酸素化がグルコース濃度依存的であるかを検討した。5% O_2 条件下での高グルコース刺激は低グルコースの場合と比較して細胞が低酸素化され、10% O_2 条件下での高グルコース刺激は HIF-1αの発現誘導を増強した。更に単離・初代培養したマウス膵島を用い、低あるいは高グルコース条件下での低酸素化の程度の違いを比較した。単離膵島は通常酸素下でも高グルコース刺激により細胞が低酸素化され、HIF-1αの発現誘導も増強された。

最後に、高グルコース刺激による膵島の低酸素化が生体内で起こる可能性を検討するため C57BL/6J マウスに糖負荷 (2 g/kg 体重) し、膵島における pimo の adduct 形成を比較検討した。しかしながら糖負荷の有無で pimo の染色性に変化を認めなかった。また、持続的な高血糖への暴露は膵β細胞のインスリン需要を高めると考えられるので、肥満・糖尿病マウス (ob/ob マウス) を用いて、糖負荷前の慢性高血糖状態と更に糖負荷しインスリン需要を高めた状態の両方の条件下で、膵島における pimo の adduct 形成を比較検討した。その結果、糖尿病マウス膵島は糖負荷で著明に低酸素化され、また糖負荷の有無に関わらず対照マウス膵島より低酸素化されていた。

［総　括］

In vitro, ex vivo での高グルコース刺激は膵β細胞の低酸素化を促進した。しかしながら、in vivo では非糖尿病マウスへの糖負荷では膵島は低酸素化されなかった。この差異から、生体内では酸素供給量あるいは酸素消費量が厳密に調節され、細胞の低酸素化を回避する機構の存在が示唆された。一方、糖尿病マウス膵島は糖負荷により膵島が著明に低酸素化された。持続的高血糖に暴露された膵島では何らかの機序により酸素の供給と消費のバランスが崩れ、膵島が低酸素状態にあることが推測された。以上のことから、インスリン分泌時の酸素消費の亢進は酸素供給を補償する機構が存在しなければ、膵β細胞の低酸素化を促進させることが明らかになった。膵β細胞における酸素消費は細胞内酸素分圧を決める重要な要因であると結論付けられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、膵β細胞がインスリン分泌時に有する高い酸素消費能に着目し、インスリン分泌に伴う酸素消費の亢進が細胞内酸素濃度に与える影響を膵β細胞株MIN6、マウス単離膵島、非糖尿病マウス膵島および肥満・糖尿病モデルマウス膵島を用いて検討したものである。申請者は膵β細胞株MIN6、マウス単離膵島においてグルコース濃度依存的に細胞内低酸素化を引き起こすこと、また生体内においてはグルコース刺激による細胞内低酸素化を非糖尿病マウス膵島では認めないものの、肥満・糖尿病マウス膵島においては認めることを明らかにした。これらの知見は膵島細胞がインスリン分泌に伴う酸素消費の亢進によって細胞内低酸素に陥ること、また糖尿病マウス膵島において低酸素状態が存在することを初めて示したものであり、膵β細胞における細胞内低酸素の生理的・病態的意義を考える上で重要なものである。よって学位に値すると考える。