

2084

ラット腓ラ氏島電位依存性カルシウムチャンネル 遺伝子発現とインスリン分泌反応

課題番号：07671098

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2) 研究実績報告書



平成10年2月

研究代表者 岩島保法
(旭川医科大学医学部助手)

1：研究課題

ラット腓ラ氏島電位依存性カルシウムチャンネル遺伝子発現とインスリン分泌反応

2：課題番号 07671098

3：研究組織

研究代表者：岩島保法（旭川医科大学医学部助手）

研究協力者：安孫子亜津子（旭川医科大学大学院生）

4：研究経費

平成7年 900千円

平成8年 800千円

計 1700千円

目次

研究結果

I. 緒言	2
II. 対象と方法	
1 : 動物	4
2 : 膵ラ氏島の単離	6
3 : RNAの抽出および cDNA の合成	6
4 : 膵ラ氏島mRNAの定量	7
5 : 膵灌流実験	8
6 : 統計	9
III. 結果	
1 : 動物の特徴	10
2 : 膵灌流実験におけるインスリン分泌反応	12
3 : VDCC サブユニット、インスリンおよび β -アクチンmRNAレベル	17
IV. 考察	34
V. 結語	37
VI. 参考文献	38
研究発表	
1) 論文	44
2) 学会発表	46
3) 出版物	57

1. 緒言

『研究の背景』日本人の糖尿病患者の大部分を占めるインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) では、ブドウ糖によるインスリン分泌が選択的に障害されているものが多く¹⁾、その成因を考えるにはブドウ糖によるインスリン分泌機構を分子レベルで解明することが重要と考えられる。膵β細胞のインスリン分泌には、L型電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) を介した Ca^{2+} の流入による細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の増加が重要であり、インスリン分泌の trigger となることが知られている^{2, 3)}。したがって、VDCC の発現とその活性の調節は、インスリン分泌において重要な役割を演じているものと考えられ、糖尿病におけるインスリン分泌障害とこれら Ca^{2+} シグナリングとの関連性が注目される。骨格筋型 VDCC 蛋白の詳細な検討により、VDCC は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2/\delta$ 、 β 、 γ サブユニットから構成される糖蛋白であることが知られている^{4, 5)}。Seino ら⁶⁾は、ヒトおよびラット膵ラ氏島で発現が認められるVDCC $\alpha 1$ -サブユニットをコードする cDNA を同定したことから、催糖尿病候補遺伝子である VDCC の構造と機能について関連性を明らかにすることが可能になった。最近、筆者らは、膵ラ氏島には2種類の VDCC $\alpha 1$ -サブユニットが発現していることを証明してきた⁷⁾。ひとつは膵β細胞/神経内分泌型^{6, 8)}であり、もうひとつは心臓型^{9, 10)}であった。すなわち、ブドウ糖刺激に対して選択的にインスリン分泌障害をきたし、desensitization のモデルとして汎用される高濃度ブドウ糖を48時間持続注入した正常ラットにおいて、competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて、膵ラ氏島における VDCC $\alpha 1$ -サブユニット mRNA の発現レベルを検討した結果、これら2種類の VDCC $\alpha 1$ -サブユニット mRNA レベルの低下と16 mM ブドウ糖および

L 型 VDCC agonist である Bay K8644 に対するインスリン分泌反応低下との関連性を見出した。同様に、高濃度ブドウ糖に24 時間曝された豚ラ氏島では、ブドウ糖に対するインスリン分泌反応が低下するとともに、豚 β 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度（以下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）が低下することが報告されている¹¹⁾。このことは β 細胞のブドウ糖刺激に対する desensitization の機序を解明する上で興味深い。また、対照ならびにブドウ糖注入ラットのいずれにおいても β 細胞型が心臓型より約 2.5 倍多く発現していることから、 β 細胞型がインスリン分泌により重要である可能性を明らかにしてきた⁷⁾。さらに、より生理的ブドウ糖レベルにおけるこれら遺伝子発現の変化について検討するために、72 時間の絶食ラットを用いて同様の検討を行った結果、インスリン、 β 細胞型 VDCC α_1 -サブユニット、グルコーストランスポーター-2 (GLUT2) およびグルコキナーゼ (GK) mRNA レベルの低下とともにブドウ糖ならびに Bay K8644 に対するインスリン分泌反応は著明に低下し、再摂食によりこれらの mRNA レベルが正常化するとともに、インスリン分泌反応も回復した。また、各群より得られた単離ラ氏島を用いたインキュベーション実験の結果、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みとインスリン分泌反応との間に強い正の相関が認められた。従って、絶食時に認められたこれら遺伝子発現の低下とインスリン分泌反応の低下とは、密接な関連性を有することが示唆された¹²⁾。以上のように、各種病態における VDCC α_1 -サブユニット遺伝子発現の変化とインスリン分泌反応とは密接に関連している可能性があり、糖尿病で認められるブドウ糖によるインスリン分泌反応低下の原因の一つとして VDCC の発現異常あるいは機能異常が関与している可能性が考えられる。実際、streptozotocin (STZ) 誘発 NIDDM ラットから単離した豚ラ氏島では、ブドウ糖に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が選択的に障害されていた¹³⁾。以上の事実から、VDCC の機能異常は、NIDDM でみられるインスリン分泌異常と関連している可

能性がある。一方、 β -サブユニットにも、複数の分子種が存在することが知られている¹⁴⁾。Seinoらは正常ラット膵ラ氏島においても β_2 ¹⁵⁾および β_3 -サブユニット¹⁶⁾が発現していることを見出し、膵 β 細胞では α_1 -サブユニットだけではなく、少なくとも β -サブユニットの機能的な発現が重要であることを示している¹⁷⁾。筆者らも RT-PCR を用いた予備実験で、膵ラ氏島においてこれらの β -サブユニット mRNA の発現を確認している。しかしながら、糖尿病を初めとした各種病態における VDCC 各サブユニットの遺伝子発現については、十分には知られていない。それゆえ、本研究では、competitive RT-PCR 法^{7, 12)}により、糖尿病を初めとした各種病態における膵ラ氏島 VDCC 各サブユニットの遺伝子発現について検討した。さらに、これら遺伝子発現と膵 β 細胞機能の間に、機能的な相関が認められるか否かを検討するために、膵灌流によりインスリン分泌反応を検討した。

II. 対象と方法

1 : 動物

(1) 高濃度ブドウ糖注入ラット : 体重 250 g 前後の正常 Wistar 系雄性ラットを用いて、非絶食状態で外頸静脈より 50 % ブドウ糖を 48 時間持続注入 (2 ml/h) した (G 群)。対照として 0.45 % 生食を注入したもの (S 群) を用いた。(a) 高濃度ブドウ糖注入ラットにおいて認められた VDCC α_1 -サブユニット mRNA の downregulation が、各 β -サブユニットにおいても認められるか否かについて検討した。(b) ジアゾキサイドはブドウ糖代謝に影響を与えることなく膵 β 細胞の ATP 感受性 K^+ チャネルを開口し、細胞膜を過分極させることによりインスリン分泌を抑制する¹⁸⁾。また、ジアゾキサイドと高濃度ブドウ糖

を同時に注入することにより、膵 β 細胞のブドウ糖刺激に対するインスリン分泌反応が回復することが知られている¹⁹⁾。すなわち、ジアゾキサイド投与によりインスリンの過剰分泌が抑えられ、膵内インスリン含量が保持されることがその一つの機序と考えられているが²⁰⁾、ATP感受性K⁺チャネルに対してジアゾキサイドと逆の作用をするトルブタマイドがブドウ糖に対する膵 β 細胞の感受性を悪化させることから、膜脱分極を介した機序も想定されている¹⁹⁾。そこで、ジアゾキサイド (5mg/kg/h) と50 % ブドウ糖 (2 ml/h) を48 時間同時に注入 (GD 群) してインスリンの過剰分泌を抑制したときのインスリン、VDCC α_1 ならびに β -サブユニットの遺伝子発現の変化について解析した。

(2) Neonatally STZ-induced diabetic (NSZ) ラット²¹⁻²³⁾ : 正常 Wistar 系雄性ラットに対して、生後2日目に90 mg/kg 体重のストレプトゾトシンを背側皮下に注射してNIDDM ラットを作製した。対照として0.05 mol/l クエン酸バッファーのみを皮下注したものを用いた。実験には、12~16 週令のものを用い、得られた結果について自然発症糖尿病ラットの結果と比較検討した。

(3) 自然発症糖尿病ラット : NSZ ラットにおいて認められた変化が糖尿病状態において普遍的なものか否かを確認するために、自然発症糖尿病ラットを用いて同様の検討を行った。肥満型自然発症糖尿病動物として大塚製薬より提供されたOLETF ラット²⁴⁾および対照としてLETO ラット(当大学動物実験施設で飼育中)を用いた。

採血は、尾静脈より行い、50 mg/kg 体重の Nembutal (sodium pentobarbital, Abbott) を腹腔内注射して麻酔後、実験を施行した。動物はすべて温度 22 ± 1 °C、湿度 50~60 %、照明時間 5 : 00~19 : 00 の安定した条件下で維持し、固形飼料 MF (オリエンタル酵母社) と水を常時供給した。

Cetus, Norwalk, CT) と表 1 に示された各 primer を含む total 25 μ l の反応液に、2 ~20 ng の total RNA に相当する cDNA を加えて PCR を行うことにより定量された。反応は、DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) を用いて、以下のサイクル条件で行った。すなわち、94 $^{\circ}$ C、10 分間の initial denaturation、65 $^{\circ}$ C、2 分間の annealing と extension、94 $^{\circ}$ C、1 分間の denaturation、72 $^{\circ}$ C、10 分間の final extension。サイクル数は、インスリンは 15 回、 β -アクトチンは 24 回、VDCC の各サブユニットはそれぞれ 30 回であった。100 pmol の upstream primer の 5' 端は、T4 polynucleotide kinase (Toyobo Co., Osaka, Japan) を用いて、10 μ Ci の [γ - 32 P]ATP (6000 Ci/mmole, Amersham, Arlington, Heights, IL) により標識した。各 cDNA の増幅反応は、[γ - 32 P]ATP により標識した 2 pmol の upstream primer を反応液に加えて行った。PCR 産物は、5% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。ゲルをゲルドライヤーにより乾燥後、PCR の特異的産物に一致するバンドをゲルから切り取り、その放射活性を液体シンチレーションを用いて測定した。以上の各実験で各 α_1 -サブユニット mRNA と平行して増減する β -サブユニット mRNA があれば、それが各 VDCC を構成する β -サブユニットである可能性が高いと言える。

5 : 腓灌流実験

NSZ ラットおよびコントロールラットを用いた腓灌流実験³³⁾により、段階的なブドウ糖濃度の上昇および 1 μ M Bay K8644 に対するインスリン分泌反応を検討した。灌流液として、4% dextran T70 (Sigma, St. Louis, MO)、0.25% (W/V) bovine serum albumin (Fraction V, Sigma, St.

Louis, MO) を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRBB, pH 7.4) を使用した。灌流液は、温浴槽中で 37 °C に維持され、95 % O₂ および 5 % CO₂ の混合ガスで持続的に酸素化し、2 ml/分の流量で灌流した。2 つの実験プロトコールを用いて、両群のラットのインスリン分泌反応を比較した。1 つめのプロトコールは、NSZ ラットで従来より報告されている、ブドウ糖に対するインスリン分泌反応の低下¹⁻⁴⁾ が認められる否かについて検討するために行った。各々の実験は、5 mM のブドウ糖を含む灌流液で 40 分間基礎灌流を行い、平衡化した後に行った。基礎灌流後、段階的にブドウ糖濃度を 8、11、16 mM と上昇させてそれぞれ 20 分間灌流し、再び基礎灌流を 20 分間行った。2 つめのプロトコールは、糖尿病による VDCC 活性の変化が、インスリン分泌に及ぼす影響を与えるかについて検討するために、L 型 VDCC アゴニストである Bay K8644 を用いてインスリン分泌反応を比較した。上記と同様の基礎灌流後、5 mM ブドウ糖と 1 μM Bay K8644 を含む KRBB で 20 分間灌流し、再び基礎灌流を 20 分間行った。腓灌流液は、1 分毎に採取し、インスリンのアッセイまで -20 °C で冷凍保存した。

6 : 統計処理

データ分析および統計処理は、既報のごとく行った^{7, 12)}。すなわち、各実験毎に標準曲線を作製して、mRNA を定量した。PCR の反応液に加えられた IS の DNA 量 (濃度は spectrophotometer : OD260 を用いて測定した) を X 軸に、液体シンチレーションで測定された IS と、それぞれの cDNA の放射活性比を Y 軸にプロットした。これらの比が 1 となる標準曲線上の点が、IS の DNA 量と cDNA 量が一致する点であることを表わす。求める cDNA レベルは、モル数に Avogadro 数 (6×10^{23}) を乗じ、分子数/μg RNA として mean ±

SE で表わし、一部は β -アクトチンで補正後、各 mRNA 比として算出した。
 統計は Student's t-test を用いて検定し、危険率 5 % 以下を有意とみなした。

III. 結果

1 : 動物の特徴

図 1 : 48 時間持続注入ラットにおける血糖値と血中インスリン濃度の推移

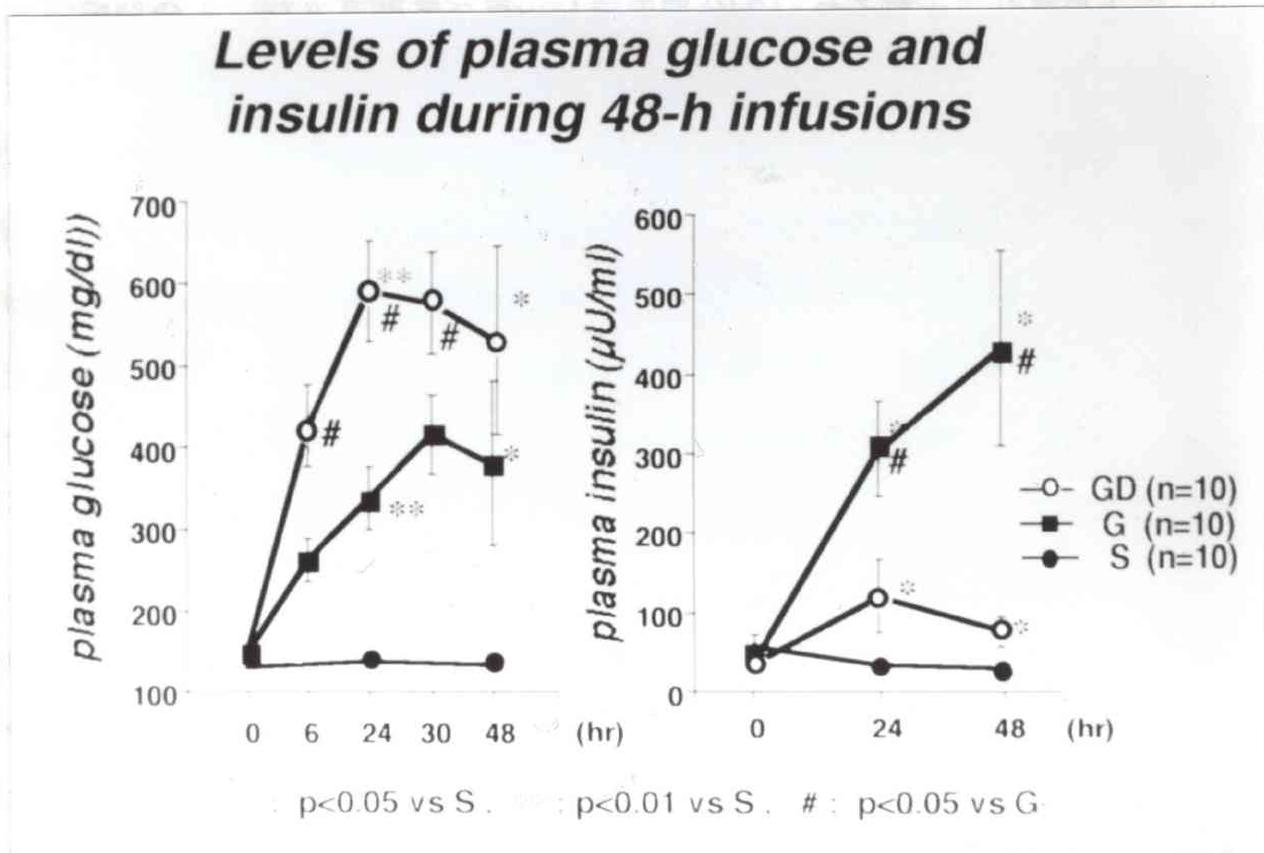


図 1 は、0.45 % 生食、50 % ブドウ糖、およびジアゾキサイドと 50 % ブドウ糖を 48 時間持続注入したときの血糖値と血中インスリン濃度の推移を示す。
 S 群 (n=10) の血糖値は 132 ± 5 (前値)、 140 ± 7 (24 時間後)、 131 ± 6

(48 時間後) mg/ml と明らかな変化が認められなかったのに対し、G 群 (n = 10) の血糖値は 133 ± 4 (前値)、255 ± 22 (6 時間後)、326 ± 47 (24 時間後)、418 ± 48 (30 時間後)、377 ± 98 (48 時間後) mg/dl、GD 群 (n=10) の血糖値は 131 ± 6 (前値)、410 ± 67 (6 時間後)、595 ± 55 (24 時間後)、582 ± 58 (30 時間後)、527 ± 126 (48 時間後) mg/dl G 群は S 群に対し、また GD 群は S 群および SG 群に対し有意な血糖値の上昇を示した。一方、S 群の血中インスリン値は 43 ± 7 (前値)、38 ± 4 (24 時間後)、26 ± 4 (48 時間後) μU/ml と明らかな変化が認められなかったのに対し、G 群の血中インスリン値は 40 ± 6 (前値)、306 ± 59 (24 時間後)、415 ± 140 (48 時間後) μU/ml、GD 群の血中インスリン値は 29 ± 6 (前値)、115 ± 51 (24 時間後)、83 ± 12 (48 時間後) μU/ml と GD 群は S 群に対し有意な血糖値の上昇を示したが、G 群に比べてインスリン分泌反応が著明に低下し、ジアゾキサイドによるインスリン分泌の抑制効果が認められた。

表 2 : NSZ ラットの特徵

	Control	NSZ
体重 (g)	327.3 ± 8.2 (n=24)	332.8 ± 9.2 (n=21)
血糖 (mM)	8.2 ± 0.4 (n=24)	13.8 ± 1.2 (n=21)*
HbA1c (%)	5.2 ± 0.1 (n=16)	12.2 ± 1.1 (n=13)*
血中インスリン (pM)	54.3 ± 3.2 (n=24)	37.5 ± 1.7 (n=21)*

* Statistically different from the controls at $p < 0.001$.

表 2 は、NSZ ラットおよびコントロールラットの特徴を示す。NSZ ラット

における飽食時血糖および HbA_{1c} は、コントロールラットに比べてそれぞれ有意に高値であった ($p < 0.001$)。逆に、NSZ ラットにおける飽食時インスリン濃度は、コントロールラットに比べて有意に低値であった ($p < 0.001$)。両群で、体重に有意差は認められなかった。

表 3 : LETO および OLETF ラットの 特徴

	BW(g)	BS(mg/dl)	IRI(μ U/ml)
12週齢 OLETF ラット (n=7)	435.0 \pm 7.6*	139 \pm 3	174.9 \pm 24.3*
12週齢 LETO ラット (n=7)	379.1 \pm 5.7	138 \pm 3	115.0 \pm 22.3
30週齢 OLETF ラット (n=12)	614.0 \pm 14.9**	223 \pm 8**	149.0 \pm 14.8
30週齢 LETO ラット (n=11)	509.6 \pm 3.8	140 \pm 3	104.5 \pm 21.1

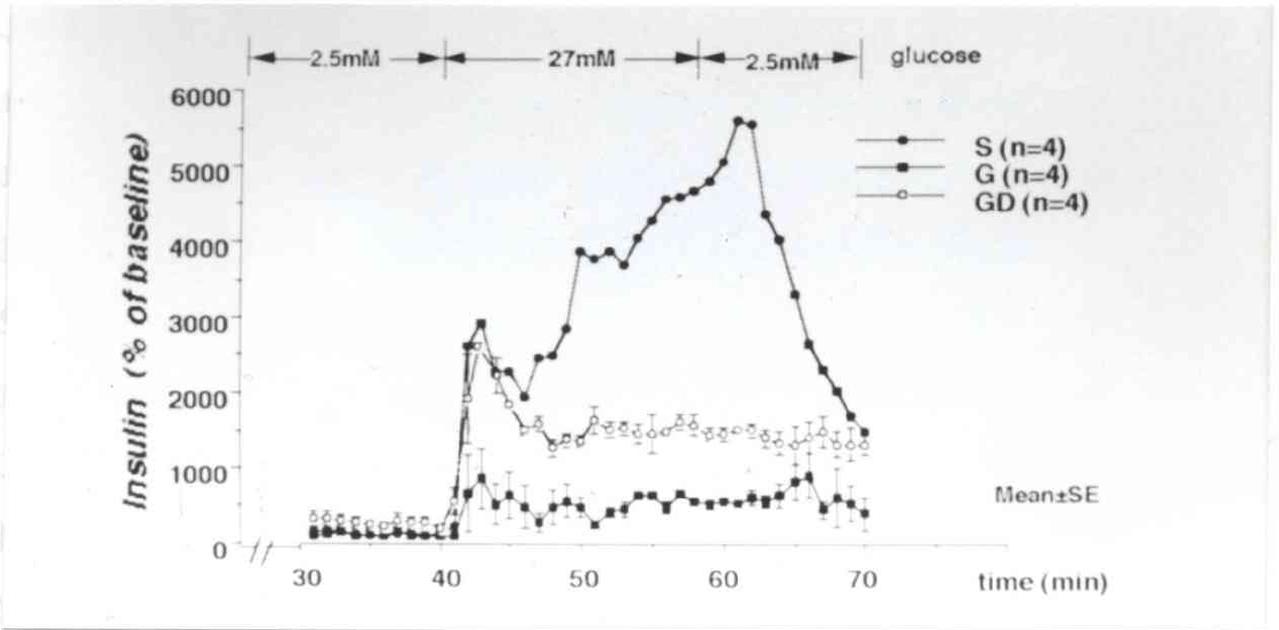
$p < 0.05$ vs 12週齢 LETO ラット、 $p < 0.001$ vs 他群

表3は、LETO ラットおよび OLETF ラットの特徴を示す。12週齢の OLETF ラットにおける体重および血中インスリン値は、同齢の LETO ラットに比べてすでに有意に高値であった ($p < 0.05$)。30週齢の OLETF ラットでは、12週齢の OLETF ラットに比べて体重と血糖値の有意な上昇が認められたが ($p < 0.001$)、血中インスリン値は逆に低値を示した。

2 : 脘灌流実験におけるインスリン分泌反応

(1) 高濃度ブドウ糖注入ラット : 図 2は、S 群、G 群、および GD 群におけるブドウ糖に対する相対的インスリン分泌反応を示す。S 群では、27 mM ブドウ糖に対して典型的な二相性のインスリン分泌反応が認められたが、G 群のイン

図 2 : 48 時間注入ラットにおけるブドウ糖に対する膵灌流実験



スリン分泌反応は第一相、第二相とも著明に低下し、S 群に比べて 84.6 % 減少していた。しかしながら、GD 群のインスリン分泌反応は第一相、第二相とも回復し、G 群に比べて約 2.5 倍増加したが、S 群に比べてまだ 61.5 % の減少が認められた。

(2) NSZ ラット : 図 3 : ブドウ糖に対する膵灌流実験

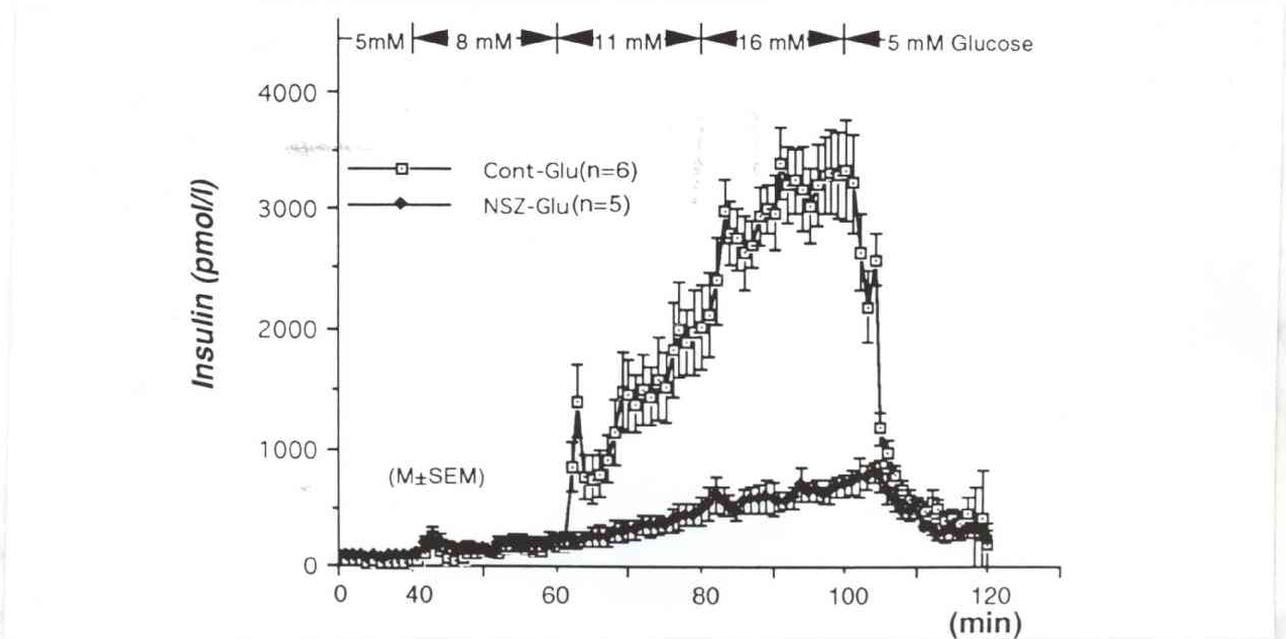


図3は、NSZ ラットおよびコントロールラットにおけるブドウ糖に対するインスリン分泌反応を示す。NSZ ラットでは、5 mM ブドウ糖に対するインスリンの基礎分泌 79.3 ± 6.6 pmol/l (基礎分泌における10ポイントの平均値) は、コントロールラットの 67.5 ± 3.2 pmol/l に比べて軽度の上昇していた。しかし、8、11、16 mM と段階的なブドウ糖濃度の上昇に対しては、コントロールラットのインスリン分泌は 675.4 ± 81.5 、 1458.0 ± 330.5 、 2797.1 ± 251.8 pmol/l へと、ブドウ糖濃度の上昇に対してS字状のインスリン分泌反応の上昇を示したのに対して、NSZ ラットのインスリン分泌は 137.0 ± 58.6 、 240.6 ± 55.8 、 513.6 ± 117.6 pmol/l へと、コントロールラットに比べてブドウ糖刺激に対するインスリン分泌刺激閾値の上昇と74.8%の総インスリン分泌量の低下が認められた。

図4：NSZ ラットにおけるBay K8644 に対する腓灌流実験

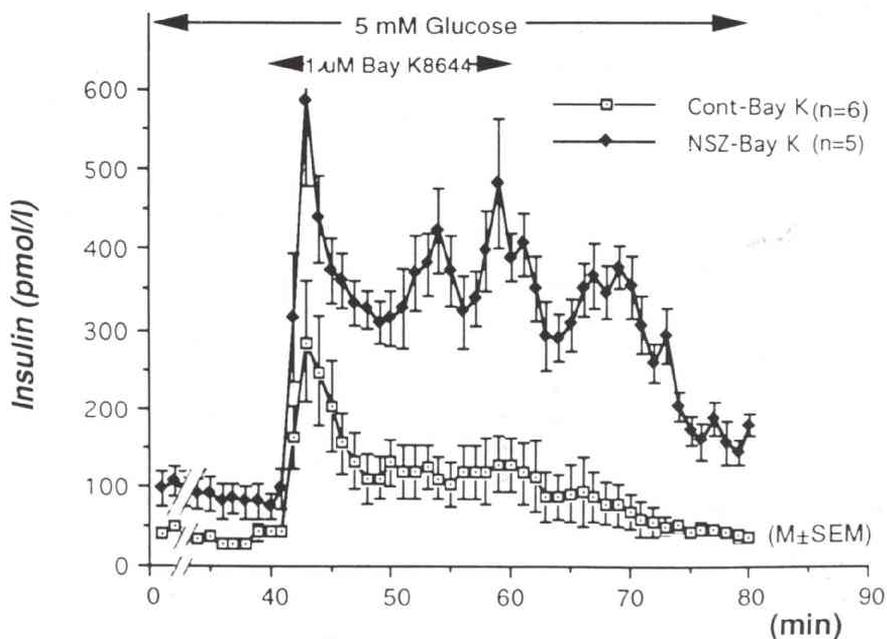


図4は、NSZ ラットおよびコントロールラットにおけるBay K8644 に対するインスリン分泌反応を示す。コントロールラットでは、基礎分泌の $39.5 \pm$

4.9 pmol/l (基礎分泌における10ポイントの平均値) から頂値の 282.0 ± 75.2 pmol/l へと、迅速なインスリン分泌反応が認められた。一方、NSZ ラットでは、基礎分泌の 87.8 ± 3.0 pmol/l から頂値の 585.0 ± 105.2 pmol/l へと、コントロールラットに比べて2.6 倍のインスリン分泌反応が認められ、基礎分泌 および刺激後ともにインスリン分泌の過剰反応を示した。

(3) 自然発症糖尿病ラット：

図5：LETO ラットにおけるブドウ糖に対する膵灌流実験

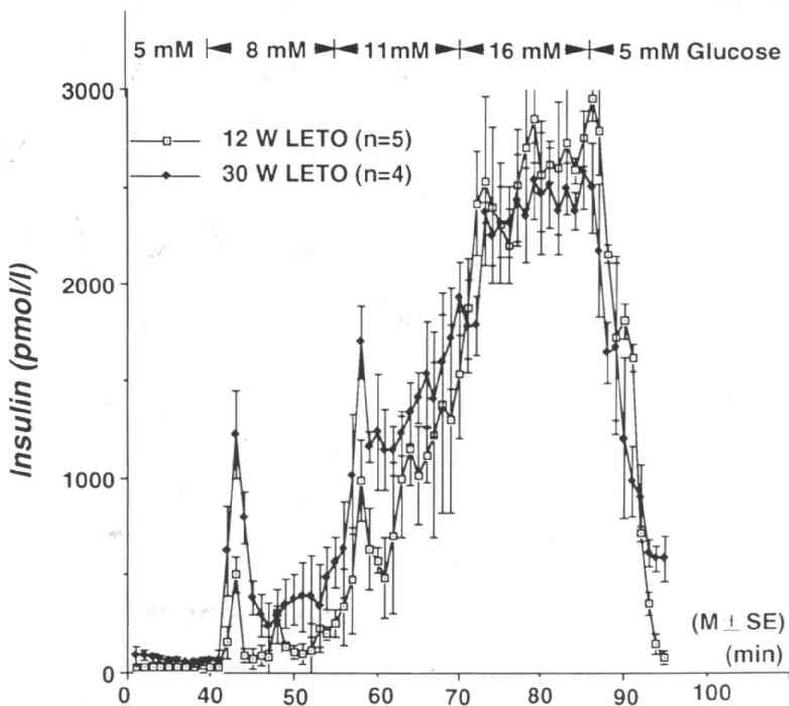
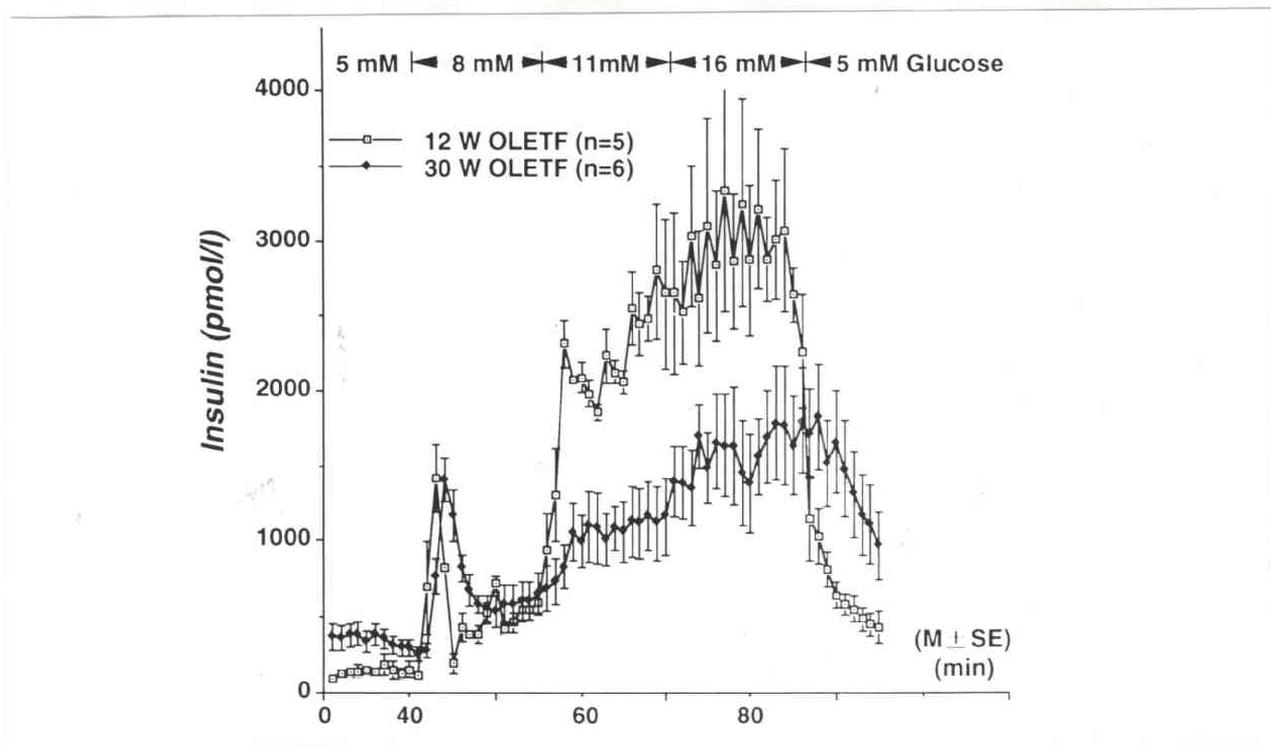


図5は、12 週齢および 30 週齢の LETO ラットのブドウ糖に対するインスリン分泌反応を示す。30 週齢の LETO ラットでは、5 mM ブドウ糖に対するインスリンの基礎分泌 60.2 ± 15.3 pmol/l (基礎分泌における10ポイントの平均値) は、12 週齢の LETO ラットの 24.7 ± 7.1 pmol/l に比べて軽度の上昇していた。しかし、8、11、16 mM と段階的なブドウ糖濃度の上昇に対しては、30 週齢の LETO ラットのインスリン分泌は 1228.2 ± 221.1 、 1700.6 ± 184.9 、 2378.4 ± 51.8 pmol/l へ、12 週齢の LETO ラットのインスリン分

分泌は 500.7 ± 90.2 、 993.6 ± 213.9 、 2536.4 ± 432.7 pmol/l へと、ブドウ糖濃度の上昇に対して両群ともS字状にインスリン分泌反応の上昇が認められ、総インスリン分泌量は両群で有意差は認められなかった。

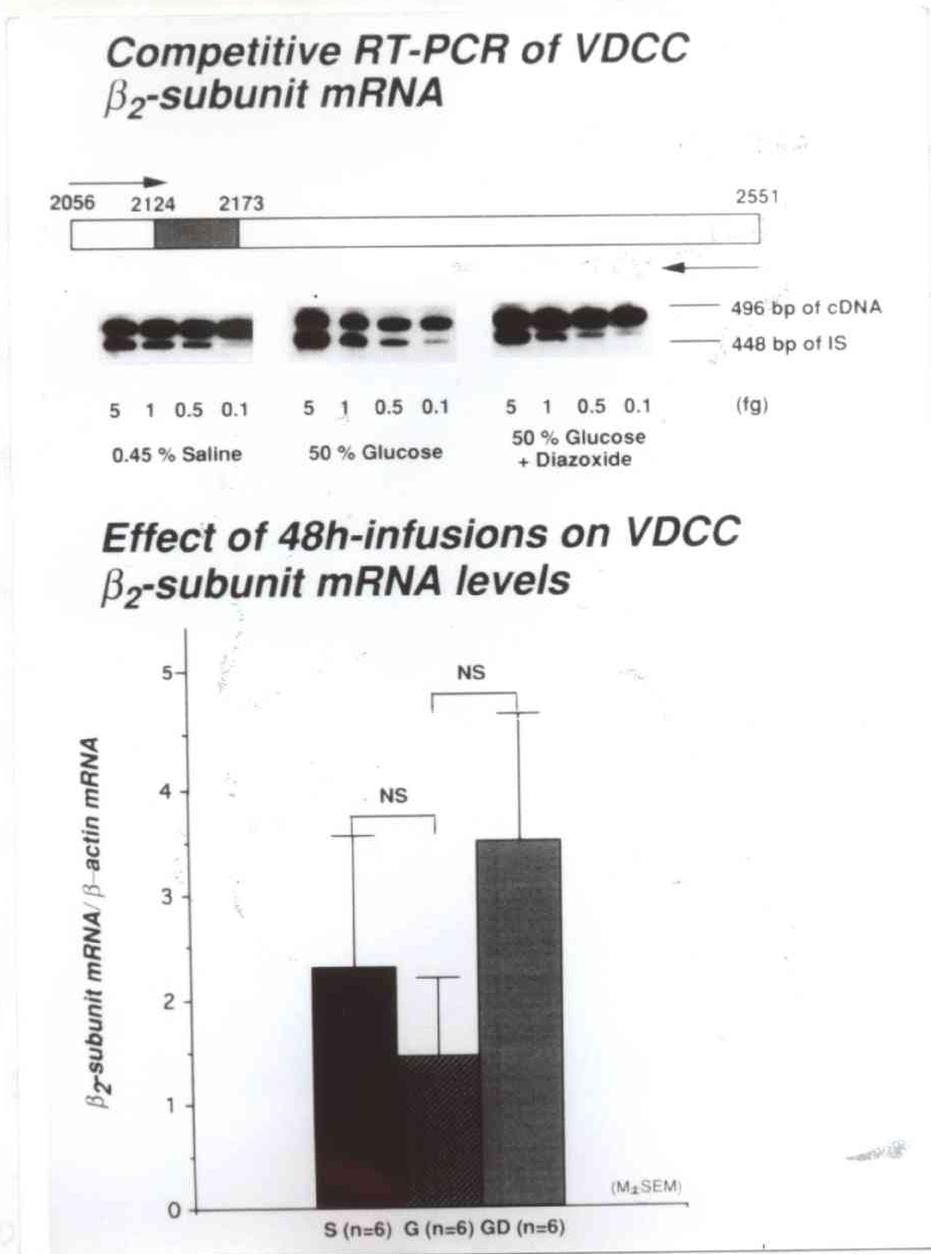
図6：OLETFラットにおけるブドウ糖に対する静灌流実験



一方、図6は、12週齢および30週齢のOLETFラットのブドウ糖に対するインスリン分泌反応を示す。30週齢の糖尿病発症OLETFラットでは、5 mMブドウ糖に対するインスリンの基礎分泌 321.2 ± 59.6 pmol/l（基礎分泌における10ポイントの平均値）は、12週齢の糖尿病未発症OLETFラットの 144.2 ± 43.0 pmol/l に比べて有意に亢進していた ($p < 0.05$)。また、OLETFラットの基礎インスリン分泌は、肥満を反映してLETOラットに比べて有意に亢進していた ($p < 0.01$)。しかし、8、11、16 mMと段階的なブドウ糖濃度の上昇に対しては、12週齢のOLETFラットのインスリン分泌は 1415.4 ± 231.6 、 2315.3 ± 156.7 、 3036.4 ± 473.1 pmol/l へと、ブドウ

図9：48時間注入ラット各群の睥ラ氏島におけるVDCC

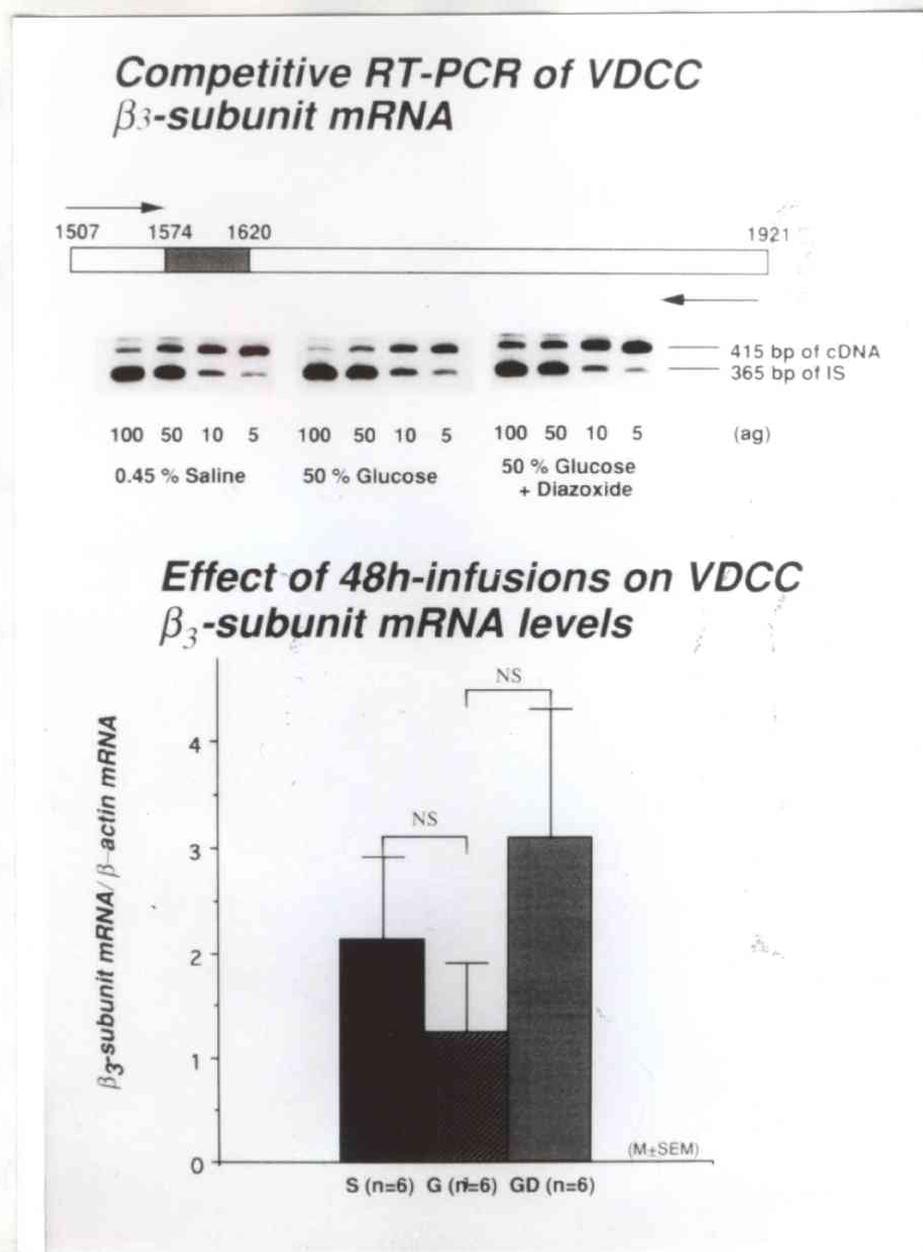
β_2 -サブユニット mRNA 分子数比



同様に、図10に示されるように、G群のVDCC β_3 -サブユニットの mRNA 分子数は、S群に比べて減少傾向を示し、GD群では逆に増加傾向を認めた。

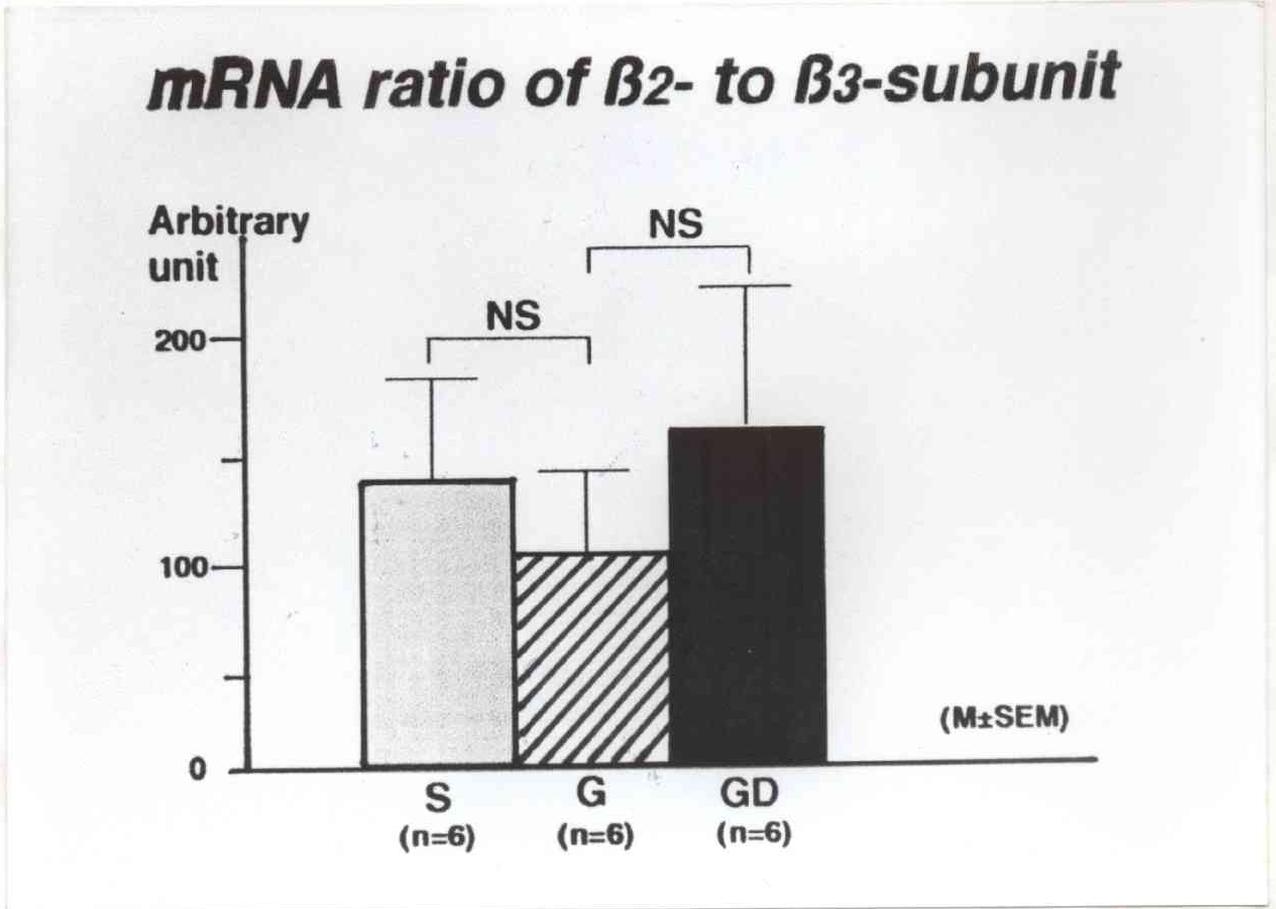
図 10 : 48 時間注入ラット各群の膵ラ氏島におけるVDCC

β_3 -サブユニット mRNA 分子数比



一方、図 11 に示されるように、膵ラ氏島においてはいずれの群においても β_2 -サブユニット mRNA が β_3 -サブユニットに比べて、100~150 倍多く発現していた。

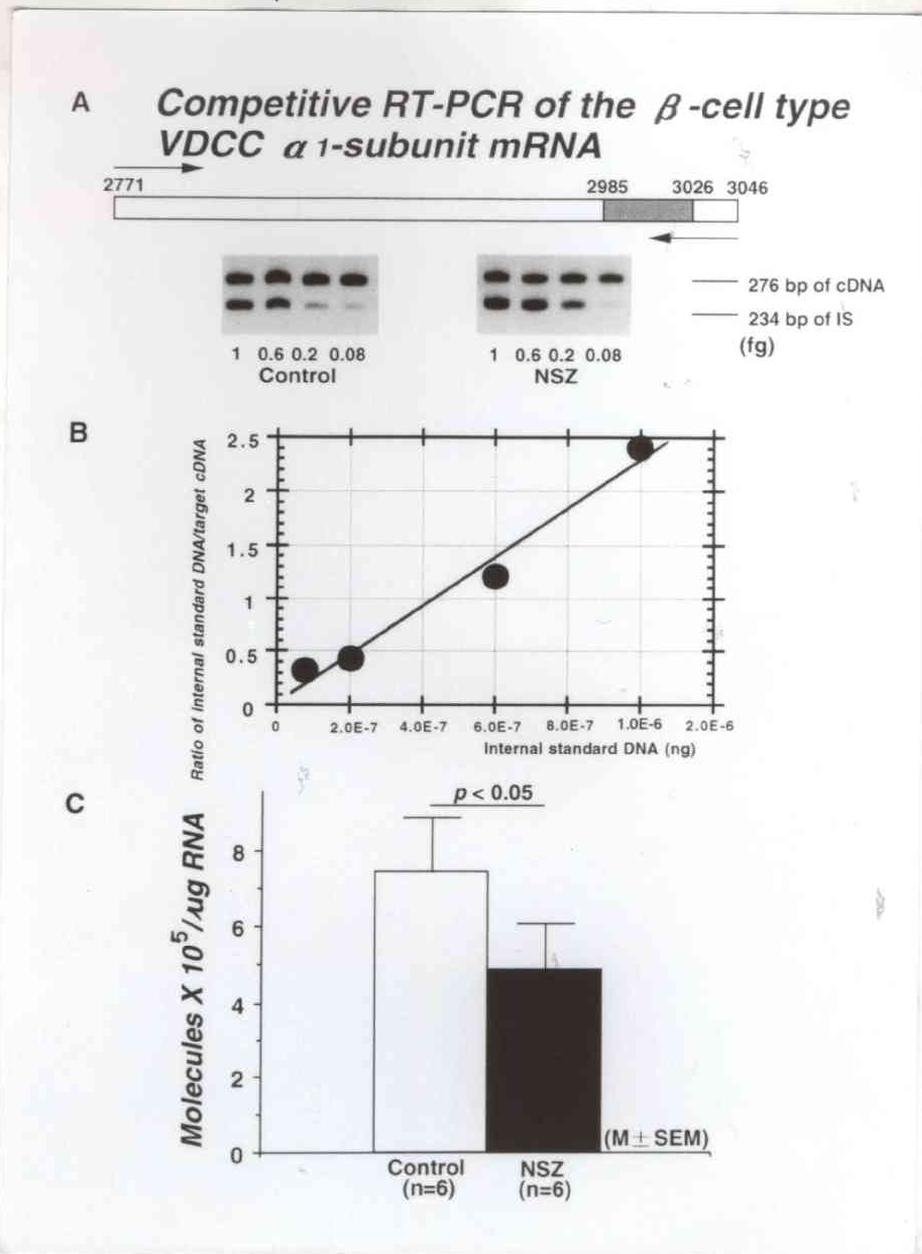
図1 1 : 48 時間注入ラット各群の膵ラ氏島におけるVDCC β_2 -サブユニットの β_3 -サブユニット に対する mRNA 分子数比



(2) NSZ ラットにおける膵ラ氏島VDCC 遺伝子発現に関する検討 :

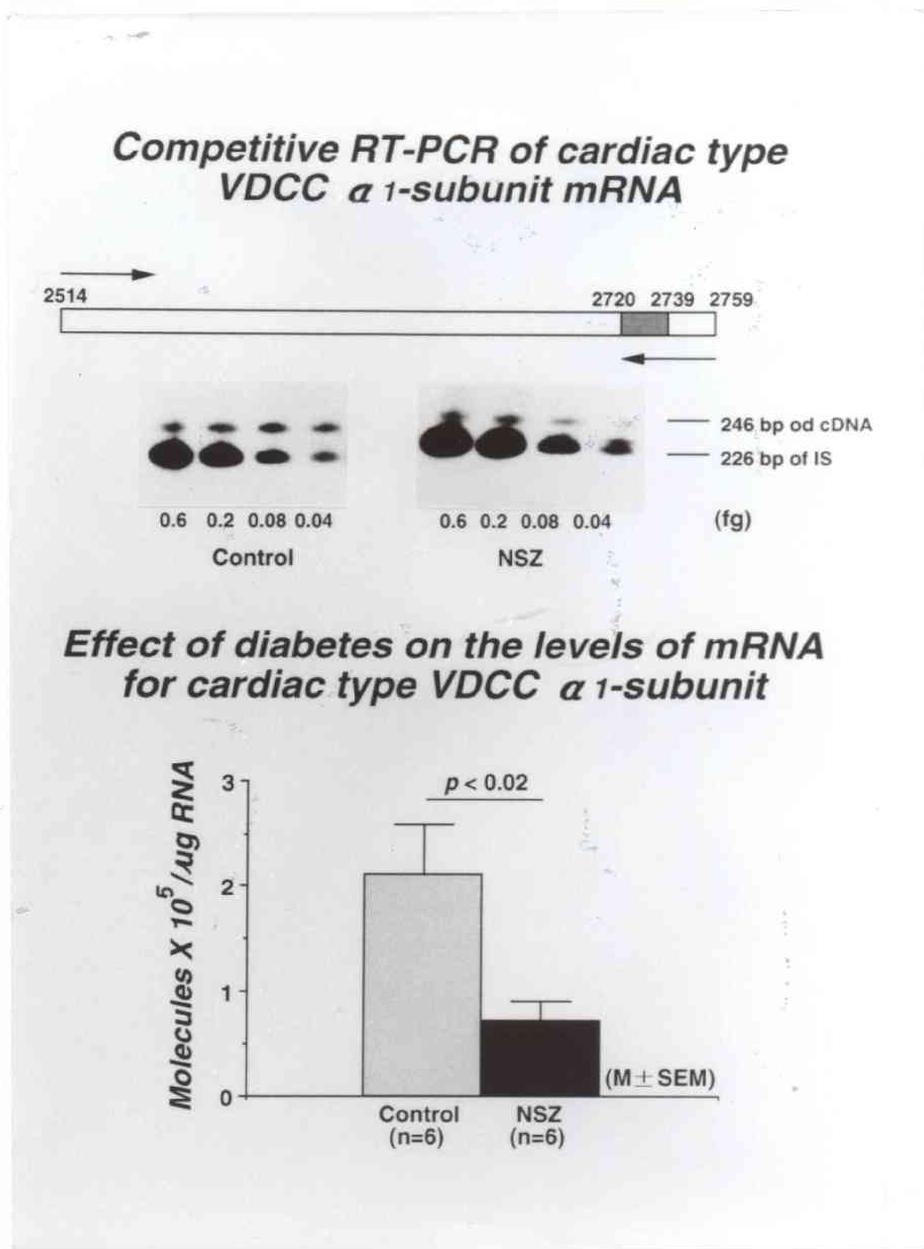
図1 2-A は、NSZ ラットにおける膵 β 細胞/神経内分泌型 α_1 -サブユニットの RT-PCR の典型的な例を、図1 2-B は、その標準曲線を、図1 2-C は、その結果を示す。NSZ ラットの膵 β 細胞/神経内分泌型 α_1 -サブユニット mRNA の分子数 $4.90 \pm 0.42 \times 10^5$ molecules/ μ g RNA は、コントロールラットの $7.45 \pm 0.74 \times 10^5$ molecules/ μ g RNA に比べて34.3 %の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。

図 1 2 : VDCC 脾 β 細胞/神経内分泌型 α 1-サブユニットの遺伝子発現



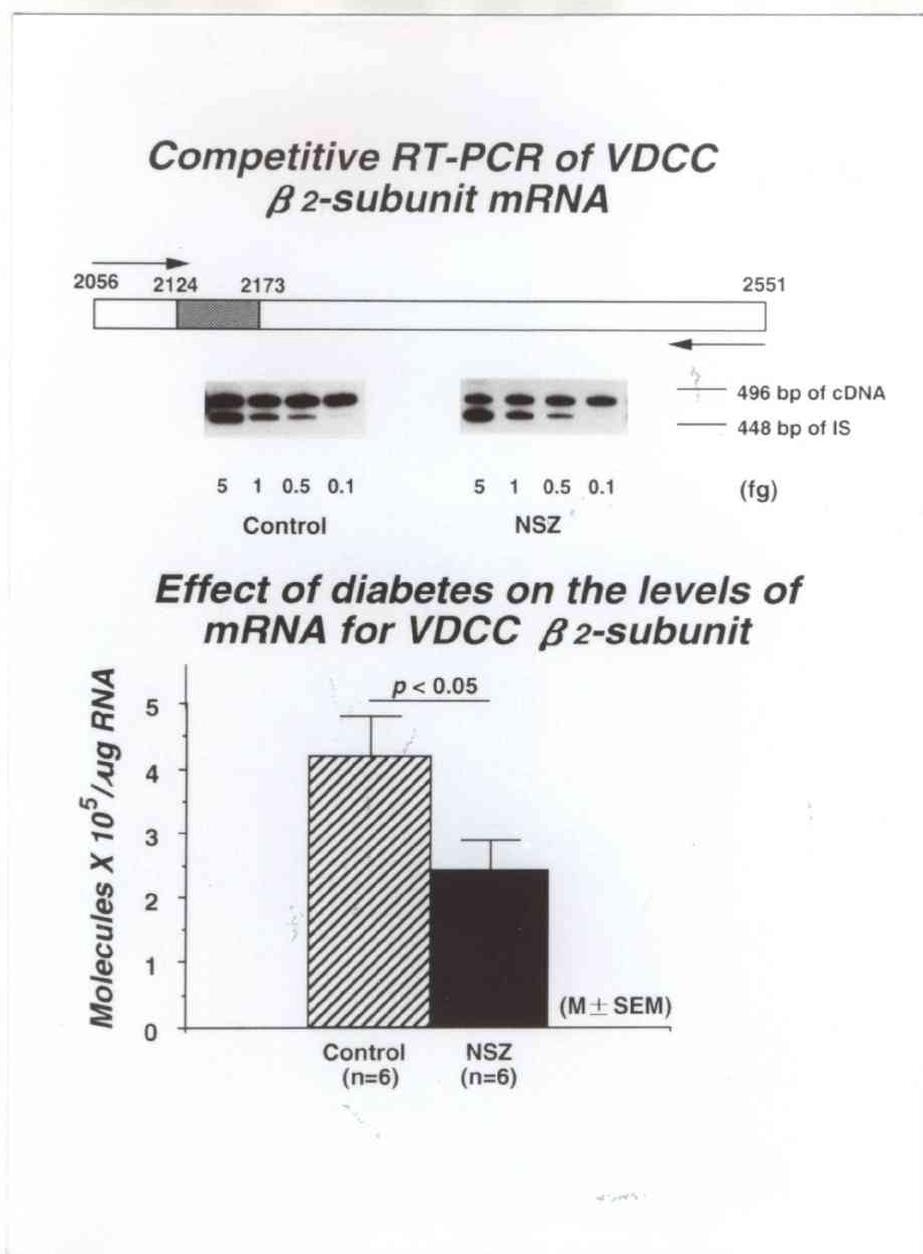
同様に、図 1 3 に示されるように、NSZ ラットの心臓型 α 1-サブユニット mRNA 分子数 $0.72 \pm 0.18 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ は、コントロールラットの $2.12 \pm 0.48 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ に比べて 66.0 % の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。

図 1 3 : VDCC 心臓型 $\alpha 1$ -サブユニットの遺伝子発現



一方、 β -サブユニットに関しては、図 1 4 に示されるように、NSZ ラットの $\beta 2$ -サブユニット mRNA の分子数 $4.90 \pm 0.42 \times 10^5$ molecules/ μg RNA は、コントロールラットの $7.45 \pm 0.74 \times 10^5$ molecules/ μg RNA に比べて 34.3 % の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。

図 1 4 : VDCC $\beta 2$ -サブユニットの遺伝子発現



同様に、図 1 4 に示されるように、NSZ ラットの $\beta 3$ -サブユニットの mRNA 分子数 $0.72 \pm 0.18 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ は、コントロールラットの $2.12 \pm 0.48 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ に比べて 66.0 % の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。

図 1 5 : VDCC β 3-サブユニットの遺伝子発現

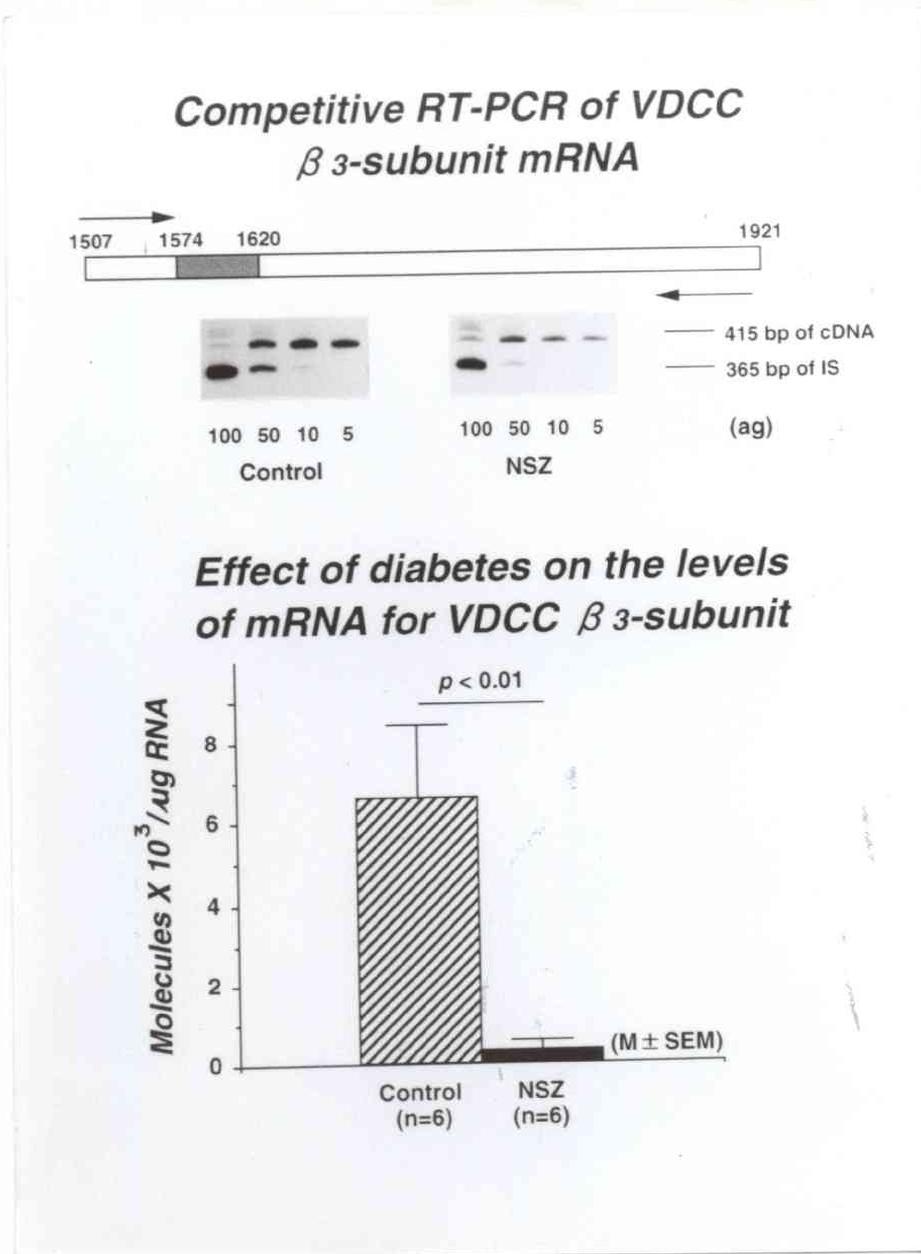


図 1 6 は膵ラ氏島におけるインスリンの遺伝子発現を示す。NSZ ラットのインスリン mRNA の分子数 $1.61 \pm 0.22 \times 10^{10}$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ は、コントロールラットの $3.12 \pm 0.39 \times 10^{10}$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ に比べて48.4%の有意な減少を示した ($p < 0.02$)。

図 1 6 : 腓ラ氏島におけるインスリンの遺伝子発現

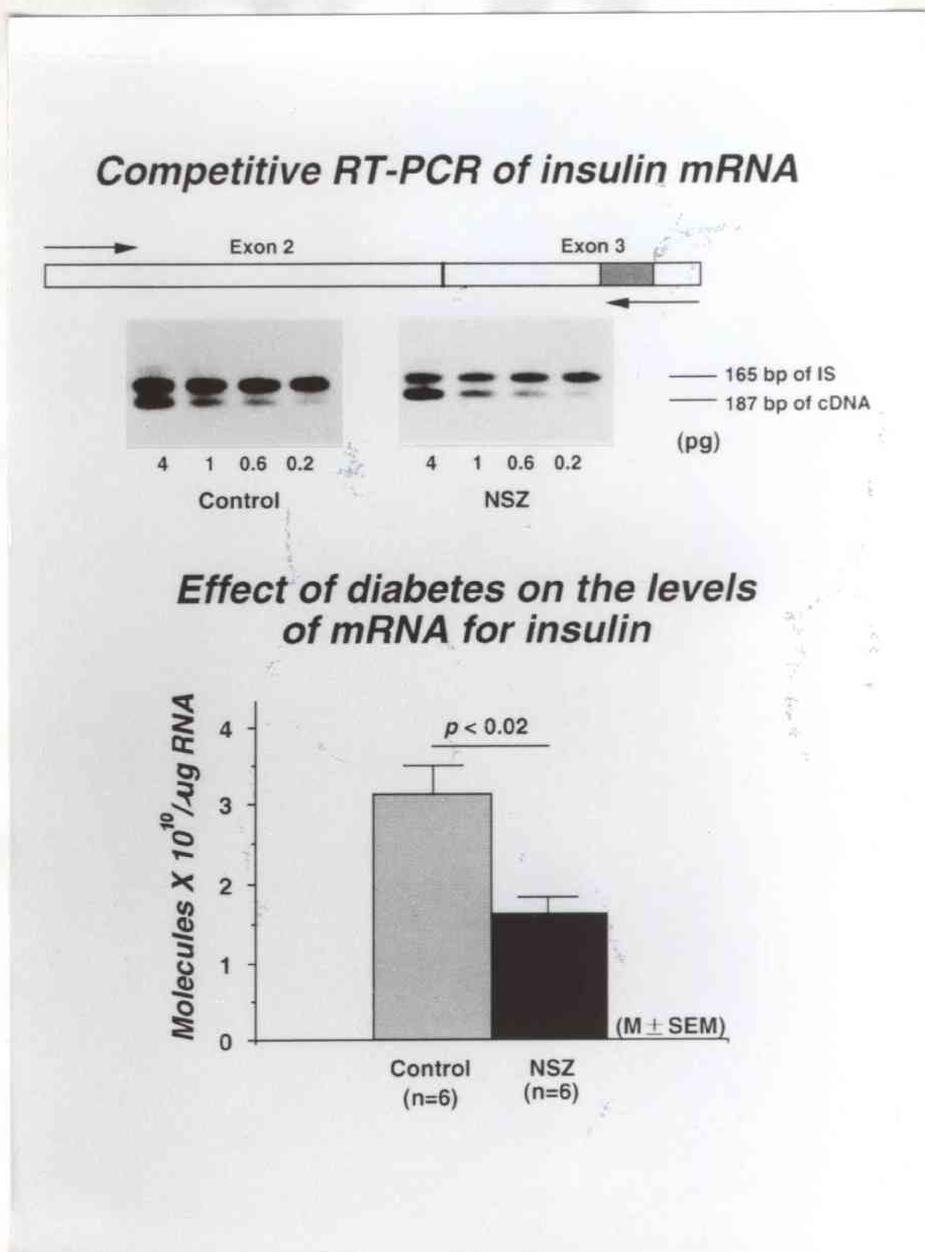
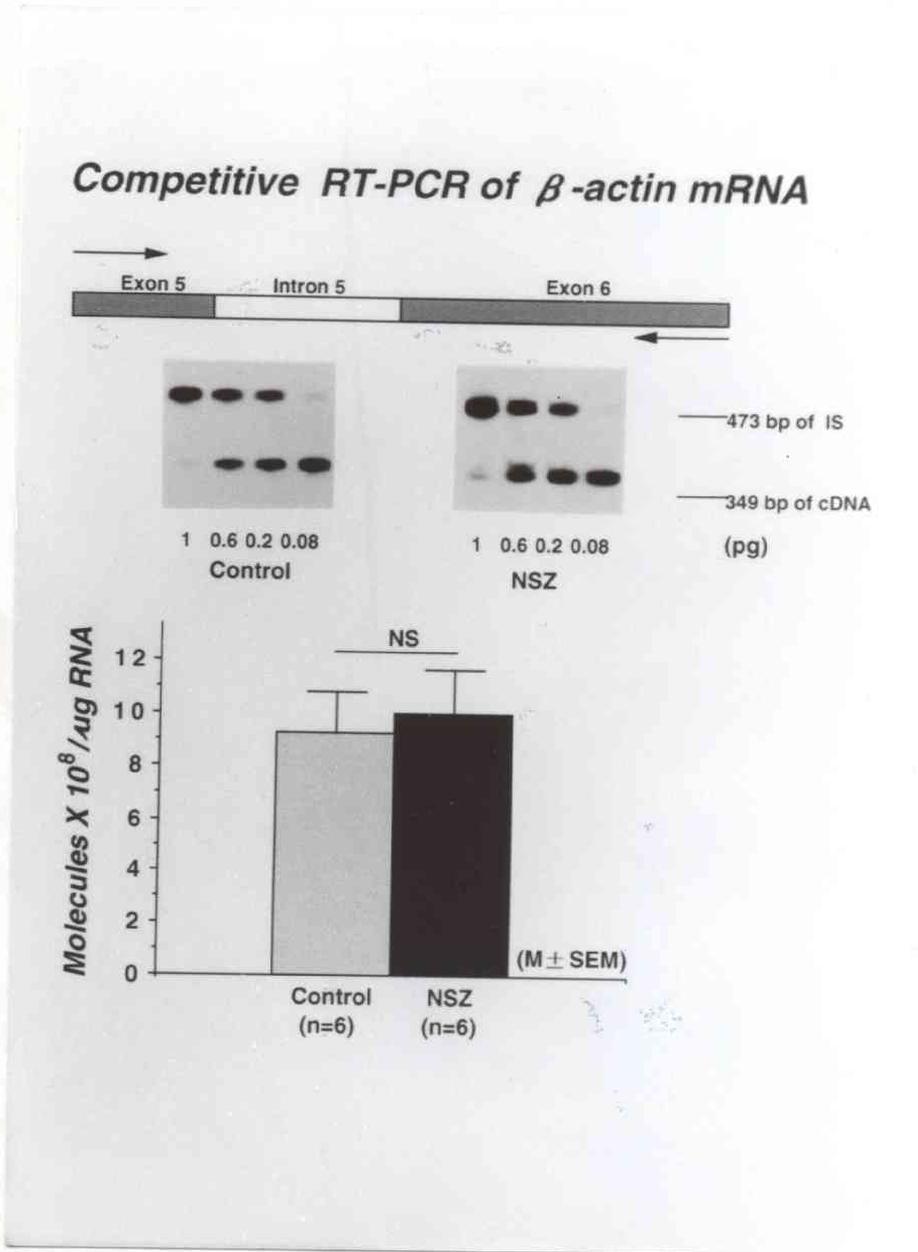


図 1 7 は、腓ラ氏島における β -アクチンの遺伝子発現を示す。 β -アクチンの mRNA 分子数は、コントロールラット ($0.94 \pm 0.17 \times 10^9$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$) と NSZ ラット ($1.05 \pm 0.18 \times 10^9$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$) の間に有意差は認められなかった。

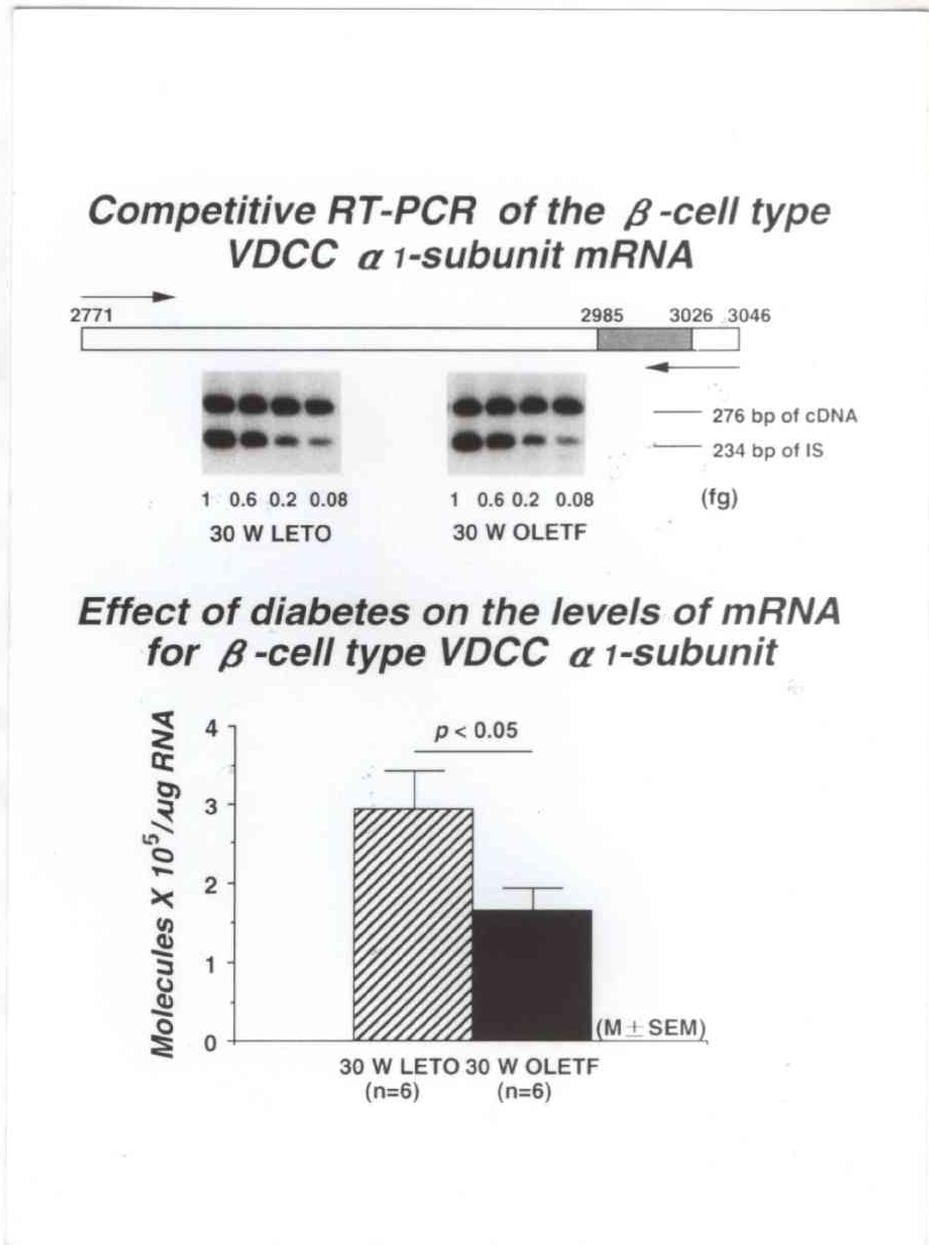
図 1 7 : 腓ラ氏島における β -アクチンの遺伝子発現



(3) LETO および OLETF ラットにおける腓ラ氏島

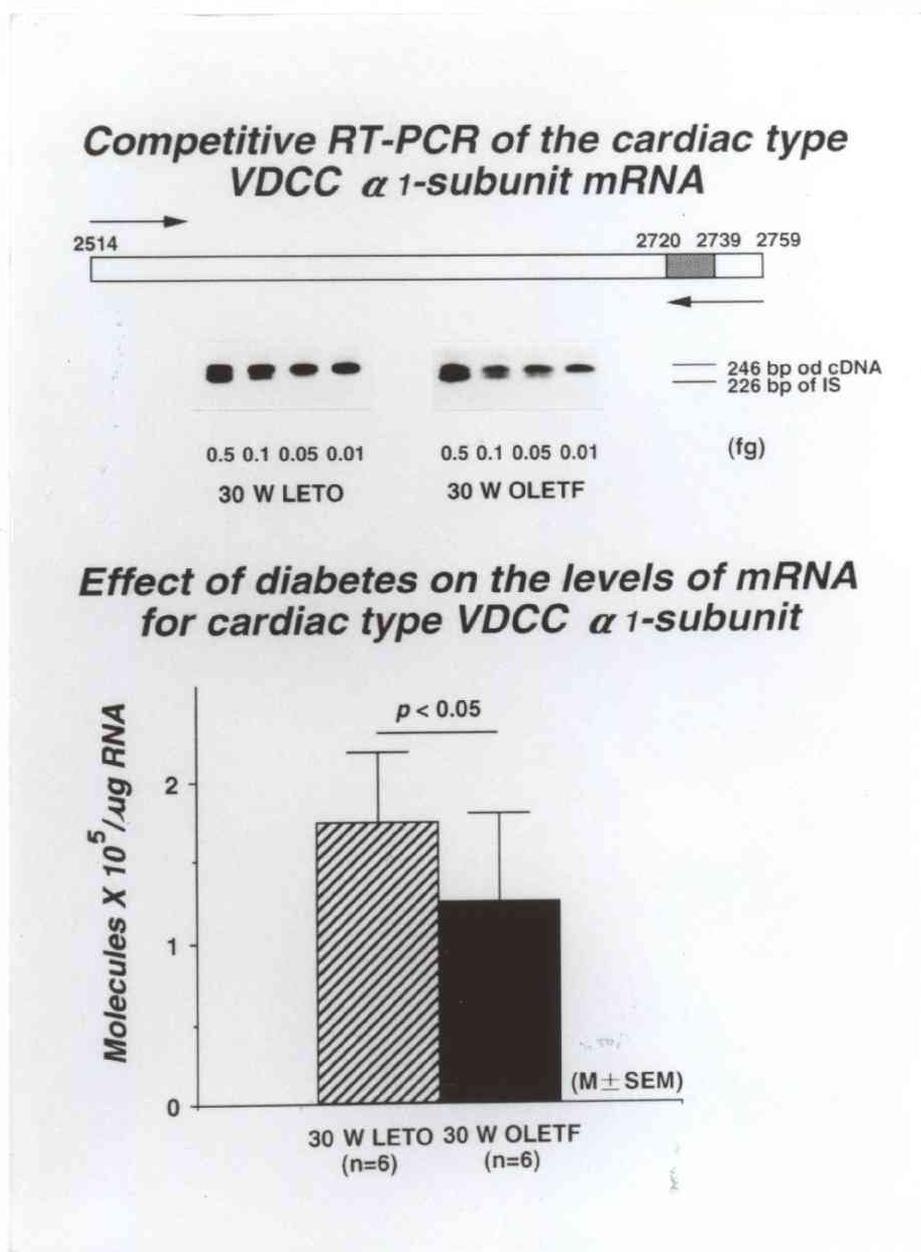
VDCC 遺伝子発現に関する検討:

図 1 8 : VDCC 膵β細胞/神経内分泌型α1-サブユニットの遺伝子発現



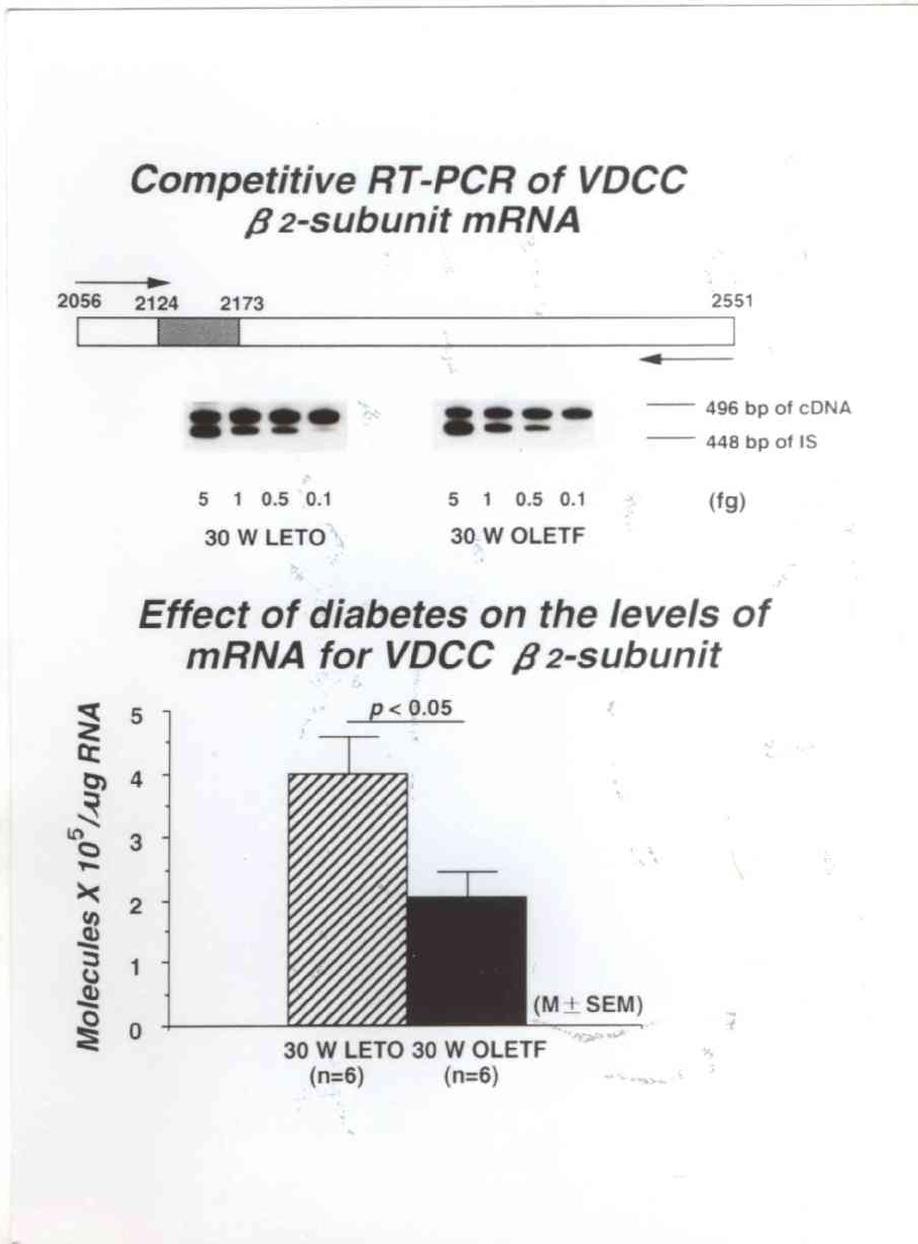
30 週齢の OLETF ラットの膵β細胞/神経内分泌型α1-サブユニット mRNA の分子数 $1.63 \pm 0.30 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ は、同週齢の LETO ラットの $2.95 \pm 0.50 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ に比べて44.8% の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。

図 19 : VDCC 心臓型 $\alpha 1$ -サブユニットの遺伝子発現



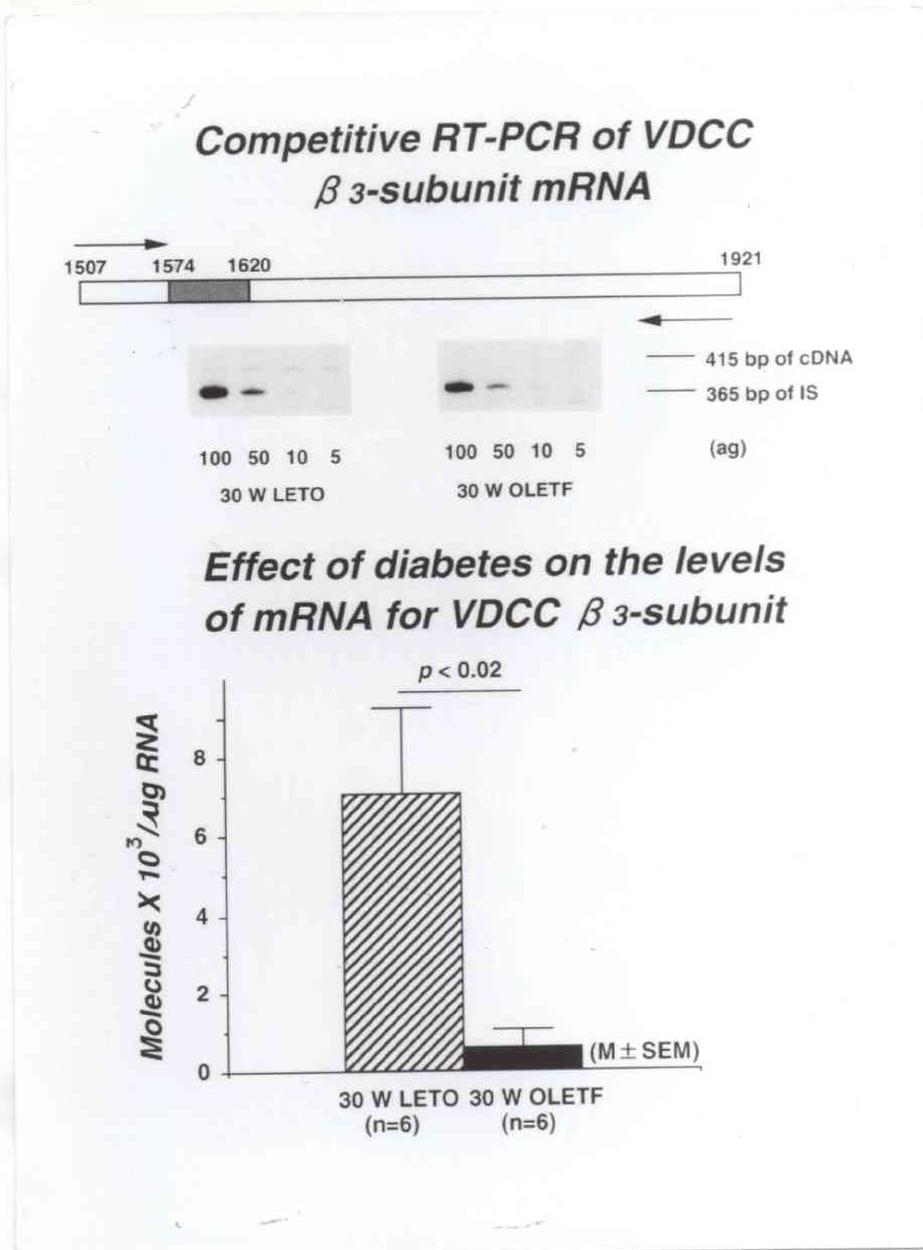
同様に、30 週齢の OLETF ラットの心臓型 $\alpha 1$ -サブユニットの mRNA 分子数 $1.24 \pm 0.56 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ は、同週齢の LETO ラットの $1.74 \pm 0.41 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ に比べて 28.7 % の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。

図 20 : VDCC $\beta 2$ -サブユニットの遺伝子発現



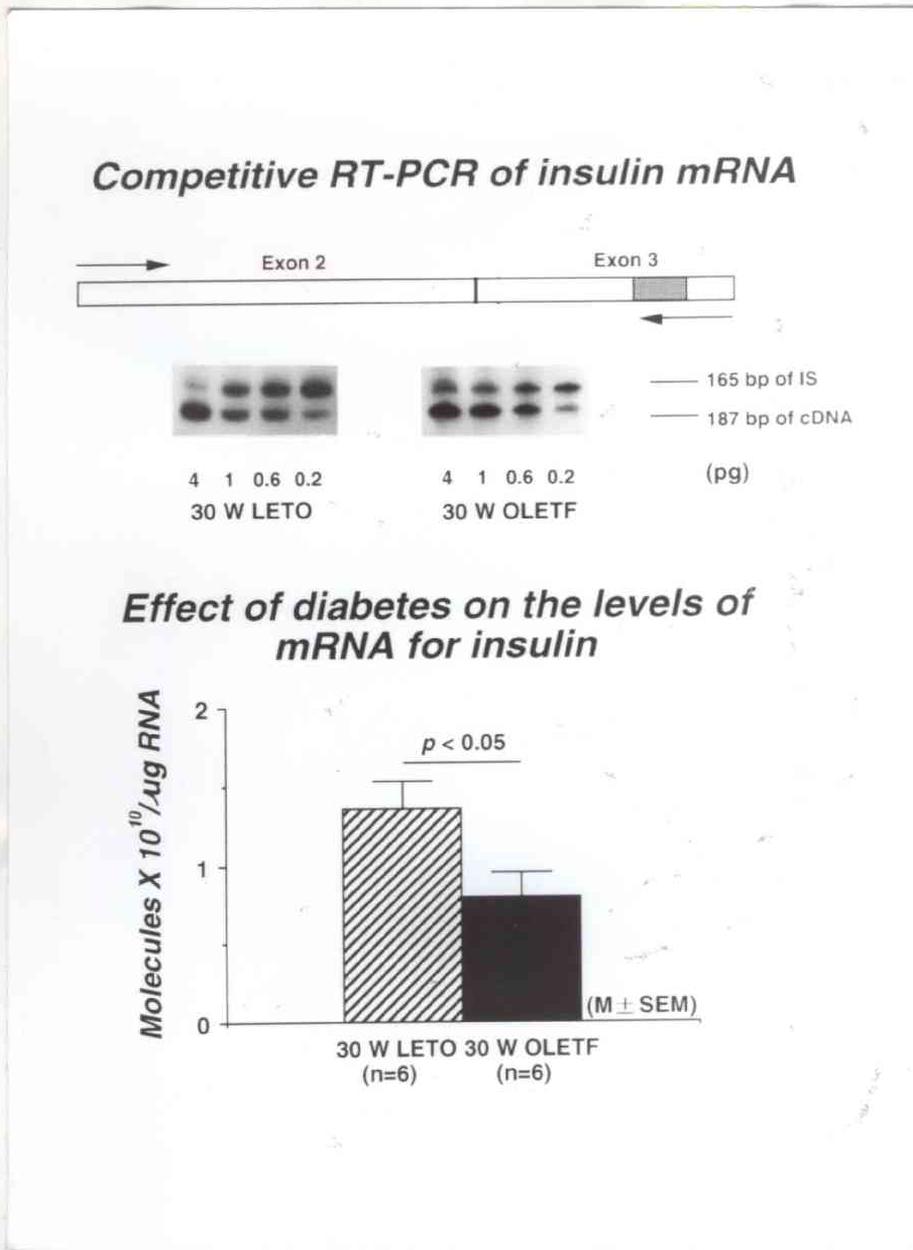
一方、 β -サブユニットに関しては、30 週齢の OLETF ラットの $\beta 2$ -サブユニット mRNA の分子数 $2.05 \pm 0.41 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ は、同週齢の LETO ラットの $3.98 \pm 0.60 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ に比べて 48.5% の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。

図 2 1 : VDCC β 3-サブユニットの遺伝子発現



同様に、30 週齢の OLETF ラットの β 3-サブユニットの mRNA 分子数 $0.59 \pm 0.44 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ は、同週齢の LETO ラットの $7.06 \pm 2.11 \times 10^5$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ に比べて 91.7 % の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。

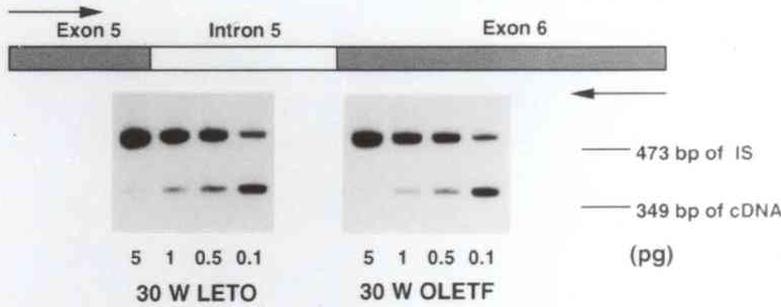
図 2 2 : 腓ラ氏島におけるインスリンの遺伝子発現



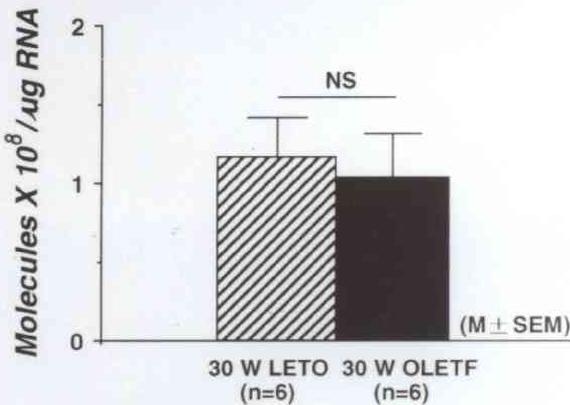
30 週齢の OLETF ラットのインスリン mRNA の分子数 $0.79 \pm 0.16 \times 10^{10}$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ は、同週齢の LETO ラットの $1.36 \pm 0.17 \times 10^{10}$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$ に比べて 42.0 % の有意な減少を示した ($p < 0.02$)。12 週齢の OLETF ラット、LETO ラットおよび 30 週齢の LETO ラットのインスリン mRNA の分子数の間には、有意差は認められなかった。

図 2 3 : 豚ラ氏島における β -アクチンの遺伝子発現

Competitive RT-PCR of β -actin mRNA



Effect of diabetes on the levels of mRNA for β -actin



β -アクチンのmRNA 分子数は、30 週齢の LETO ラット ($1.16 \pm 0.26 \times 10^9$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$) と同週齢の OLETF ラット ($0.83 \pm 0.23 \times 10^9$ molecules/ $\mu\text{g RNA}$) の間に有意差は認められなかった。

IV. 考察

膵 β 細胞における VDCC のサブユニット構造については未だ明らかにされておらず、糖尿病の病態や成因における膵 β 細胞の VDCC の意義についても在のところ十分には明らかにされていない。骨格筋型 VDCC とは異なり、膵細胞では α_1 -サブユニットだけでなく、少なくとも β -サブユニットの機能な発現が重要であり、それらがインスリン分泌に重要な L 型 VDCC を構成していることが示唆されている¹⁷⁾。しかしながら、糖尿病を初めとする各種病態におけるこれらサブユニットの遺伝子発現とインスリン分泌反応についての系統的検討は、十分にはなされていない。そこで本実験の主要な目的は、種々の病態における α_1 -サブユニットと β -サブユニットの遺伝子発現について明らかにし心臓型および膵 β 細胞/神経内分泌型 α_1 -サブユニットとどの β -サブユニットが対応しているのかを検討することにより、いずれの β -サブユニットがインスリン分泌において主要な役割を演じているのかを明らかにすることであった。しかしながら、膵 β 細胞における遺伝子発現とインスリン分泌機構の研究にはいくつかの障害が存在した。その最大のものとはブドウ糖に反応してインスリン分泌する膵 β 細胞を大量に入手することができず、十分な解析ができなかった。そこで筆者らは、膵ラ氏島から得られる RNA 量が少量であることによる困難を解消するために PCR を用いた mRNA 定量法を確立した。その結果一匹のラットから得られた 1 μ g の RNA より、従来の Northern blotting では検出が困難であった発現量の少ない VDCC を初めとした多数の催糖尿病補遺伝子について、同時に解析することが可能となった^{7, 12)}。この方法を用い種々の動物モデルの VDCC α_1 および β -サブユニット mRNA 発現レベルを

検討することにより、糖尿病を初めとした種々の病態における VDCC の遺伝子発現とインスリン分泌反応との普遍的な関連性について明らかにすることが可能となった。初めに、S 群、G 群、および GD 群の各群における膵ラ氏島の VDCC $\alpha 1$ -サブユニットと β -サブユニットの mRNA レベルを検討した結果、いずれの群においても VDCC の $\beta 2$ -サブユニットは、 $\beta 3$ -サブユニットに比べて100~150 倍前後多く発現しており、 $\beta 2$ -サブユニットが膵 β 細胞/神経内分泌型 $\alpha 1$ -サブユニットとともに、膵 β 細胞の L 型 VDCC を構成する主要なサブユニットである可能性が示唆された。しかしながら、 $\beta 2$ -サブユニットの mRNA 分子数は膵 β 細胞/神経内分泌型 $\alpha 1$ -サブユニットの分子数よりも数十倍多く、1 対 1 の関係は認められなかった。このことは膵 β 細胞の L 型 VDCC は、1 個の $\alpha 1$ -サブユニットに対して複数個の $\beta 2$ -サブユニットが対応しているものなのか、あるいは $\beta 2$ -サブユニットが複数の L 型 VDCC の構成要素となっているものなのか、現段階では不明である。また、 $\beta 3$ -サブユニットの mRNA 分子数も心臓型 $\alpha 1$ -サブユニットよりも多く認められる傾向にあった。次に、高濃度ブドウ糖注入ラットにおいて認められた VDCC $\alpha 1$ -サブユニット mRNA の downregulation⁷⁾が、各 β -サブユニットにおいても認められるか否かについて検討するとともに、高濃度ブドウ糖とジアゾキサイドを同時に注入してインスリンの過剰分泌の影響を排除したときの、これら遺伝子発現の変化とインスリン分泌反応との関連性について検討した。その結果、G 群では S 群に比べて $\alpha 1$ -サブユニット mRNA レベルの有意な減少が認められたが、GD 群では逆に S 群、G 群に比べて有意な上昇が認められた。同様に、G 群では S 群に比べて $\beta 2$ 、 $\beta 3$ -サブユニットの mRNA レベルの減少傾向が認められたが、GD 群では逆に S 群、G 群に比べて上昇傾向が認められた。すなわち、VDCC の $\alpha 1$ -サブユニットと β -サブユニットは高濃度のブドウ糖刺激に対し

て、同様な遺伝子発現機構を示すとともに、各サブユニット mRNA レベルの downregulation の原因の一つとして、インスリンの過剰分泌が関与している可能性が示唆された。また、VDCC 各サブユニットの mRNA レベルが減少するとともに、ブドウ糖刺激に対するインスリン分泌反応は低下し、mRNA レベルが増加するとともにインスリン分泌反応の回復が認められたことから、VDCC 遺伝子発現とインスリン分泌反応との関連性が示唆された。

次に、糖尿病状態における VDCC 遺伝子発現とインスリン分泌反応との関連性を明らかにするために、肥満型自然発症糖尿病ラット（高インスリン血症型糖尿病）ならびに NSZ ラット（低インスリン血症型糖尿病）について、これら遺伝子発現の変化とインスリン分泌反応との関連性について検討した。その結果、糖尿病ラットでは OLETF ラットおよび NSZ ラットのいずれにおいても、対照のラットに比べて VDCC 各サブユニットの mRNA レベルの減少が認められ、 α_1 -サブユニットに関しては従来報告と一致する結果が得られた^{7, 34)}。特に、 β_3 -サブユニットに関しては NSZ ラットならびに糖尿病発症 OLETF ラットのいずれにおいても、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いた RT-PCR 法でもバンドが検出できない現象がしばしば認められた。その原因として、正常でもその発現レベルが低いためなのか、あるいは実際にその発現が消失したためなのかは現段階では不明である。すなわち、血中インスリンレベルの増減にかかわらず各サブユニットの mRNA レベルの減少が認められたことから、その原因として糖尿病状態あるいは高血糖そのものが影響を与えている可能性も示唆された。したがって、インスリン治療後^{35, 36)}、あるいはフロリジン³⁷⁻⁴⁰⁾により血中インスリン濃度を変化させることなく高血糖を是正した後の VDCC 遺伝子発現を検討することにより、これらの影響について知ることが可能になるものと考えられる。

V. 結語

正常ラットや糖尿病未発症ラットにおいては、膵 β 細胞／神経内分泌型 $\alpha 1$ -サブユニットが心臓型 $\alpha 1$ -サブユニットよりも数倍多く発現していること、 $\beta 2$ -サブユニットが $\beta 3$ -サブユニットよりも100~150倍前後多く発現していることより、膵 β 細胞／神経内分泌型 $\alpha 1$ -サブユニットとともに $\beta 2$ -サブユニットが、膵 β 細胞のL型VDCCを構成する主要なサブユニットである可能性が示唆された。しかしながら、 $\beta 2$ -サブユニットのmRNA分子数は膵 β 細胞／神経内分泌型 $\alpha 1$ -サブユニットの分子数よりも数十倍多く、1対1の関係は認められなかった。このことは膵 β 細胞のL型VDCCは、1個の $\alpha 1$ -サブユニットに対して複数個の $\beta 2$ -サブユニットが対応しているものなのか、あるいは $\beta 2$ -サブユニットが複数のL型VDCCの構成要素となっているものなのか、現段階では不明である。高濃度ブドウ糖注入ラットおよび自然発症糖尿病ラットにおいては、対照に比べて β 細胞型 $\alpha 1$ -サブユニットとともに $\beta 2$ ならびに $\beta 3$ -サブユニットmRNAレベルの減少が認められ、高血糖によるVDCC遺伝子発現の低下が示された。それが転写レベルでの調節によるものなのか、あるいはmRNAのdegradationが関与しているものなのかは現段階では不明である。また、VDCC遺伝子発現の低下が、インスリン分泌に与える影響についても、現段階では不明である。

VI. 参考文献

- 1) 津田謹輔：日本人の糖尿病、欧米人との対比：2. インスリン分泌の立場から。
糖尿病記録号、医学図書出版、東京、pp 30-32、1995
- 2) Ashcroft FM, Rorsman P: Electrophysiology of the pancreatic γ -cell.
Prog. Biophys. Molec. Biol. 54: 87-143, 1989
- 3) Mislser S, Barnett DW, Gillis KD, Pressel DM: Electrophysiology of
stimulus-secretion coupling in human γ -cells. Diabetes 41:
1221-1228, 1992
- 4) Catterall WA: Structure and function of voltage-sensitive ion
channels. Science 242 : 50-61, 1988
- 5) Catterall WA: Functional subunit structure of voltage-gated calcium
channels. Science 253: 1499-1500, 1991
- 6) Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI:
Cloning of the $\alpha 1$ subunit of a voltage-dependent calcium channel
expressed in pancreatic γ -cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:
584-588, 1992
- 7) Iwashima Y, Pugh W, Depaoli AM, Takeda J, Seino S, Bell GI, Polonsky
KS: Expression of calcium channel mRNAs in rat pancreatic islets and
down-regulation following glucose infusion. Diabetes 42: 948-955,
1993
- 8) Hui A, Ellinor T, Krizanov O, Wang J-J, Diebold RJ, Schwartz A:
Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform

of the $\alpha 1$ subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Neuron* 7: 35-44, 1991

- 9) Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S: Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340: 230-233, 1989
- 10) Slish DF, Engle DB, Varadi G, Lotan I, Singer D, Dascal Schwartz A: Evidence for the existence of a cardiac specific isoform of the $\alpha 1$ subunit of the voltage-dependent calcium channel. *FEBS Lett* 250: 509-514, 1989
- 11) Okamoto Y, Ishida H, Taminato T, Tsuji K, Kurose T, Tsuura Y, Kato S, Imura H, Seino Y: Role of cytosolic Ca^{2+} in impaired sensitivity to glucose of rat pancreatic islets exposed to high glucose in vitro. *Diabetes* 41: 1555-1561, 1992
- 12) Iwashima Y, Kondoh A, Seino S, Takeda J, Eto M, Polonsky KS, Makino I: Reduced levels of mRNA for calcium channel, GLUT2 and glucokinase are associated with impaired insulin secretion in fasted rats. *Endocrinology* 135: 1010-1017, 1994
- 13) Tsuji K, Taminato T, Ishida H, Okamoto Y, Tsuura Y, Kato S, Kurose T, Okada Y, Imura H, Seino Y: Selective impairment of the cytoplasmic Ca^{2+} response to glucose in pancreatic β -cells of streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rats. *Metabolism* 42: 1424-1428, 1993
- 14) Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F,

- Flockerzi V: Calcium channel β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J* 11: 885-890, 1992
- 15) Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda AE, Wei X, Birnbaumer L: Cloning and expression of a cardiac/brain β subunit of the L-type calcium channel. *J. Biol. Chem* 267: 1792-1797, 1992
- 16) Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E: Cloning and expression of a third calcium channel β subunit. *J Biol Chem* 268: 3450-3455, 1993
- 17) Ihara Y, Yamada Y, Fujii Y, Gono T, Yano H, Yasuda K, Inagaki N, Seino Y, Seino S: Molecular diversity and functional characterization of voltage-dependent calcium channels (CACN4) expressed in pancreatic β -cells. *Mol Endocrinol* 9: 121-130, 1995
- 18) Trube G, Porsman P, Ohno-Shosaku T: Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic β -cells. *Pflugers-Arch* 407: 493-499, 1986
- 19) Sako Y, Grill V: Coupling of β -cell desensitization by hyperglycemia to excessive stimulation and circulating insulin in glucose-infused rats. *Diabetes* 39: 1580-1583, 1990
- 20) Leahy JL, Bumbalo LM, Chen C: Diazoxide causes recovery of β -cell glucose responsiveness in 90 % pancreatectomized diabetic rats. *Diabetes* 43: 173-179, 1994

- 21) Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G: Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 23: 889-895, 1974
- 22) Weir GC, Clore ET, Zmachinski CJ, Bonner-Weir S: Islet secretion in a new experimental model for non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 30: 590-595, 1981
- 23) Giroix MX, Portha B, Kergoat M, Bailbe D, Picon L: Glucose insensitivity and amino acid hypersensitivity of insulin release in rats with non-insulin-dependent diabetes: a study with the perfused pancreas. *Diabetes* 32: 445-451, 1983
- 24) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T: Spontaneously long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Strain. *Diabetes* 41: 1422-1428, 1992
- 25) Lacy PE, Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39, 1967
- 26) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987
- 27) Lomedico P, Rosenthal N, Efstratiadis A, Gilbert W, Kolodner R, Tizard R: The structure and evolution of the two nonallelic rat preproinsulin genes. *Cell* 18: 545-558, 1979
- 28) Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D: The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic β -actin gene. *Nucleic Acid Res* 11:

1759-1771, 1983

- 29) Wang AM, Doyle MV, Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9717-9721, 1989
- 30) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF: Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantity by competitive polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2725-2729, 1990
- 31) Vallette F, Mege E, Adesnik M: Construction of mutant and chimeric genes using the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 17: 723-733, 1989
- 32) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977
- 33) Grodsky GM, Batts AA, Bennett LL, Vcella C, McWilliams NB, Smith DF: Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. J. Physiol. 205: 638-644, 1963
- 34) Tokuyama Y, Sturis J, Depaoli AM, Takeda J, Stoffel M, Tang J, Sun X, Polonsky KS, Bell GI: Evolution of β -cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. Diabetes 44: 1447-1457, 1995
- 35) Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC: Abnormal insulin secretion in a streptozocin model of diabetes. Effects of insulin treatment. Diabetes 34: 660-666, 1985

- 36) Kerkoat M, Bailbe D, Portha B: Insulin treatment improves glucose-induced insulin release in rats with NIDDM induced by streptozotocin. *Diabetes* 36: 971-977, 1987
- 37) Starke A, Grundy S, McGarry JD, Unger RH: Correction of hyperglycemia with phloridzin restores the glucagon response to glucose in insulin-deficient dogs: Implications for human diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1544-1546, 1985
- 38) Impaired insulin secretion associated with near normoglycemia. Study in normal rats with 96-h in vivo glucose infusions. *Diabetes* 36: 459-464, 1987
- 39) Rossetti L, Smith D, Shulman GI, Papachristou D, DeFronzo RA: Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest* 79: 1510-1515, 1987
- 40) Rossetti L, Shulman GI, Zawulich W, DeFronzo RA: Effect of hyperglycemia on in vivo insulin secretion in partially pancreatectomized rats. *J Clin Invest* 80: 1037-1044, 1987

研究発表

(1) 論文

- 1) Iwashima Y, Sato T, Watanabe K, Ohshima E, Hiraishi S, Ishii H, Kazama M: Elevation of plasma thrombomodulin level in diabetic patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes* 39: 983-988, 1990
- 2) Horita K, Eto M, Nakata H, Iwashima Y, Ito H, Takahashi M, Kondo A, Morikawa A: Effects of apolipoprotein E polymorphism on plasma lipoprotein (a) levels. *Artery* 20 (6): 324-336, 1993
- 3) Iwashima Y, Pugh W, Depauli AM, Takeda J, Seino S, Bell GI, Polonsky KS: Expression of calcium channel mRNAs in rat pancreatic islets and down-regulation following glucose infusion. *Diabetes* 42: 948-955, 1993
- 4) Iwashima Y, Kondoh A, Seino S, Takeda J, Eto M, Polonsky KS: Reduced levels of mRNA for calcium channel, GLUT2 and glucokinase are associated with impaired insulin secretion in fasted rats. *Endocrinology* 135: 1010-1017, 1994
- 5) 岩島保法、安孫子亜津子、清野 進、武田 純、Polonsky KS、衛藤雅昭：絶食ラット膵ラ氏島における電位依存性カルシウムチャンネル、GLUT2 およびグルコキナーゼ遺伝子発現とインスリン分泌反応に関する検討 分子糖尿病学研究会編集、医学図書出版株式会社発行、分子糖尿病学 5 : 57-66、1994
- 6) Eto M, Horita K, Morikawa A, Nakata H, Okada M, Nomura M, Abiko A, Iwashima Y, Ikoda A: Increased frequency of apolipoprotein epsilon 2

- allele in non-insulin dependent diabetic (NIDDM) patients with nephropathy. *Clinical Genetics* 48 (6): 288-292, 1995
- 7) Eto M, Okada M, Iwashima Y: Remnant-like particles (RLP) from NIDDM patients with apolipoprotein E3/3 phenotype stimulate cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Artery* 22 (3): 155-163, 1996
- 8) 松本 啓、岩島保法：NIDDM 患者における細小血管合併症とアンギオテンシン変換酵素（ACE）遺伝子多型との検討 糖尿病性合併症 9、pp51-58、糖尿病性合併症研究会編、メディカル・ジャーナル社、1996
- 9) 岩島保法：糖尿病性細小血管障害と Lp(a)、特に増殖性網膜症の危険因子としての可能性について 糖尿病性合併症 9、pp215-226、糖尿病性合併症研究会編、メディカル・ジャーナル社、1996
- 10) 岩島保法：糖尿病性腎症の進行に伴う高レムナント血症と血液凝固能の亢進、糖尿病腎症研究会編、糖尿病性腎症 8：56-61、1997
- 11) 岩島保法：糖尿病性腎症の進行に伴う高レムナント血症と血液凝固能の亢進、糖尿病性合併症 10、pp256-265、糖尿病性合併症研究会編、メディカル・ジャーナル社、1997
- 12) 岩島保法：アンギオテンシン変換酵素（ACE）遺伝子多型と糖尿病性網膜症、糖尿病性合併症 10、pp293-299、糖尿病性合併症研究会編、メディカル・ジャーナル社、1997
- 13) 岩島保法：培養ラット腎メサンギウム細胞における Advanced glycation end products (AGEs) による転写因子 NF- κ B および AP-1 の活性化 糖尿病性合併症 11、印刷中、糖尿病性合併症研究会編、メディカル・ジャーナル社、1998

(2) 学会発表

1993

- (1) 衛藤雅昭、高橋正行、中島克己、岩島保法、森川秋月：Monosodium glutamate (MSG) 誘発 Chinese hamster の発症前後における血糖、インスリンの変化、第7回糖尿病動物研究会、2月5日、仙台市、仙台国際センター、1993
- (2) 衛藤雅昭、岡田瑞穂、中田宏志、堀田和敏、岩島保法、近藤亜津子、森川秋月：III型高脂血症に関する研究、厚生省特定疾患原発性高脂血症調査研究班会議、2月10日、大阪市、国立循環器病センター、1993
- (3) 岩島保法、武田 純、清野 進、Gl Bell、Polonsky KS：Quantitative PCR (Q-PCR) によるラット腓ラ氏島における電位依存性Ca²⁺チャネル (VDCC) mRNA の定量、第36回日本糖尿病学会年次学術集会、5月13～15日、仙台市、仙台国際センター、1993
- (4) 衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、堀田和敏、岡田瑞穂、中島克己、近藤亜津子：ヒト単球マクロファージによりるアポE 分泌に対するグルコースの影響
第36回日本糖尿病学会年次学術集会、5月13～15日、仙台市、仙台国際センター、1993
- (5) 森川秋月、衛藤雅昭、岩島保法、堀田和敏、岡田瑞穂、中島克己、近藤亜津子、林由紀子：尿中飽和型遊離脂肪酸の増加と糖尿病性腎症進展との関連、
第36回日本糖尿病学会年次学術集会、5月13～15日、仙台市、仙台国際センター、1993
- (6) 高橋正行、中島克己、衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、堀田和敏、岡田瑞穂、近藤亜津子、大島英二：自然発症糖尿病チャイニーズハムスターにおける発症後早期の肝糖産生異常の検討、第36回日本糖尿病学会年次学術集会、5月

13～15日、仙台市、仙台国際センター、1993

- (7) 堀田和敏、衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、岡田瑞穂、中島克己、近藤亜津子：
糖尿病性腎症の進展に伴う血漿脂質およびリポ蛋白の変化、第36回日本糖尿病学会年次学術集会、5月13～15日、仙台市、仙台国際センター、1993
- (8) 中島克己、衛藤雅昭、岩島保法、堀田和敏、岡田瑞穂、近藤亜津子、伊藤博史：
自然発症糖尿病チャイニーズハムスター旭川コロニーにおけるB細胞機能障害の経時変遷について、第36回日本糖尿病学会年次学術集会、5月13～15日、仙台市、仙台国際センター、1993
- (9) 衛藤雅昭、堀田和敏、岡田瑞穂、森川秋月、岩島保法、中島克己、近藤亜津子：
当科で経験したⅢ型高脂血症症例、第25回日本動脈硬化学会総会、5月21、22日、福岡市、電気ビル、1993
- (10) 岡田瑞穂、衛藤雅昭、堀田和敏、森川秋月、岩島保法、中島克己、近藤亜津子：
高脂肪食負荷に対する血漿中性脂肪(TG)の反応パターン；TG低反応群のリポ蛋白について、第25回日本動脈硬化学会総会、5月21、22日、福岡市、電気ビル、1993
- (11) Yasunori Iwashima, Susumu Seino, Alex Depaoli, KS Polonsky：
Down regulation of calcium channel mRNAs in rat pancreatic islets after glucose infusion. 53th Annual Meeting and Scientific Sessions of American Diabetes Association, June 12～15, Las Vegas, World Congress Center, 1993
- (12) 岩島保法、安孫子亜津子、衛藤雅昭：糖尿病性腎症(DN)とAtrial Natriuretic Peptide (ANP)、Angiotensin 2 (AG2)
第69回日本内分泌学会学術総会、7月3日～5日、大阪市、大阪城ホール・ホテルニューオータニ大阪、1993

- (13) 岩島保法、近藤亜津子、衛藤雅昭、清野 進：絶食ラットおよび Neonatally Streptozotocin-induced diabetic ラット (NSZ ラット) におけるインスリン分泌に関する検討、第27回日本糖尿病学会北海道地方会、11月6日、札幌市、札幌メデイカルホール、1993
- (14) 森川秋月、衛藤雅昭、岩島保法、伊藤博史、近藤亜津子：早期糖尿病腎症患者における尿中トランスフェリンの測定意義、第27回日本糖尿病学会北海道地方会、11月6日、札幌市、札幌メデイカルホール、1993
- (15) 堀田和敏、衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、伊藤博史、中田宏志、岡田瑞穂、近藤亜津子：糖尿病性腎症とアポ E 遺伝子頻度、第27回日本糖尿病学会北海道地方会、11月6日、札幌市、札幌メデイカルホール、1993
- (16) 近藤亜津子、衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、伊藤博史、荒木令江、堀内正公：自然発症糖尿病チャイニーズハムスターの臓器 AGE 量の免疫学的測定、第27回日本糖尿病学会北海道地方会、11月6日、札幌市、札幌メデイカルホール、1993
- (17) 近藤亜津子、衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、伊藤博史、荒木令江、堀内正公：自然発症糖尿病チャイニーズハムスターの腎 AGE 量の免疫学的測定、第5回糖尿病性腎症研究会、11月27～28日、東京都、全社協ホール、1993
- (18) 岩島保法、清野 進、武田 純、Polonsky KS、衛藤雅昭：ラット腓ラ氏島における電位依存性Ca²⁺チャンネル、GLUT2 およびグルコキナーゼ遺伝子発現とインスリン分泌反応に関する検討、第5回分子糖尿病学研究会、12月11日、大阪市、千里ライフサイエンスセンター、1993

1994

- (1) Yasunori Iwashima, Atsuko Abiko, Masaaki Eto, Susumu Seino :
Reduced levels of mRNA for calcium channels, GLUT2 and glucokinase
are associated with impaired insulin secretion in fasted rats.
54th Annual Meeting and Scientific Sessions of American
Diabetes Association, June 10~13, Anaheim, Anaheim Convention
Center, 1994
- (2) Yasunori Iwashima, Atsuko Abiko, Masaaki Eto :
Starvation-induced gene expression for calcium channels, GLUT2
and glucokinase in pancreatic islets and insulin secretion in rats.
15th International Diabetes Federation Congress, Nov. 7-11,
Kobe, Kobe International Exhibition Hall, 1994
- (3) Yasunori Iwashima, Atsuko Abiko, Masaaki Eto : Gene expression
for calcium channels in pancreatic islets in neonatally
streptozotocin-induced diabetic rats. 15th International Diabetes
Federation Congress, Satellite Symposium, Pancreatic Beta-Cell.
November 13-15, Kyoto, Kyoto Research Park, 1994
- (4) Eto M, Chiba H, Horita M, Iwashima Y, Morikawa A, Kondo A : Plasma
apo E-rich HDL and triglyceride in NIDDM.
15th International Diabetes Federation Congress, Nov. 7-11,
Kobe, Kobe International Exhibition Hall, 1994
- (5) Morikawa A, Eto M, Iwashima Y, Sekiguchi M, Miyamoto Y, Kondo A :
Effects of glycemic control on transferrin, albumin, NAG, and B2-
microglobulin in NIDDM patients with normo- and microalbuminuria.

15th International Diabetes Federation Congress, Nov. 7-11,
Kobe, Kobe International Exhibition Hall, 1994

- (6) Ito H, Morikawa A, Yoneda M, Eto M, Iwashima Y, Sekiguchi M, Miyamoto Y, Kondo A : Rapid gastric emptying and morphometric changes of the vagus nerves in the spontaneously diabetic Chinese hamsters. 15th International Diabetes Federation Congress, Nov. 7-11, Kobe, Kobe International Exhibition Hall, 1994
- (7) Kondoh A, Arai N, Eto M, Morikawa A, Iwashima Y, Horiuchi S : Increased level of AGE in the kidney from spontaneously diabetic Chinese hamsters determined by immunochemical assay. 15th International Diabetes Federation Congress, Nov. 7-11, Kobe, Kobe International Exhibition Hall, 1994
- (8) 岩島保法、安孫子亜津子、衛藤雅昭 : Streptozotocin NIDDM モデルラットにおける電位依存性カルシウムチャンネル遺伝子発現とインスリン分泌反応に関する検討、第8回糖尿病動物研究会、東京都、野口英世記念会館、2月4日、1994
- (9) 岡田瑞穂、衛藤雅昭、堀田和敏、岩島保法、中田宏志、森川秋月、千葉仁志、秋田治邦 : ホモ型 CETP 欠損症における高脂肪負荷に対する血漿脂質の反応パターン、第12回リポ蛋白研究会、2月26日、札幌市、共済サロン、1994
- (10) 岩島保法、安孫子亜津子、衛藤雅昭 : NSZ ラット豚ラ氏島における VDCC 遺伝子発現とインスリン分泌反応に関する検討、第37回日本糖尿病学会年次学術集会、徳島市、クレメント徳島、5月11日~13日、1994
- (11) 森川秋月、衛藤雅昭、岩島保法、関口雅友、伊藤博史、近藤亜津子 : 尿中ト

ランスフェリンは Microalbuminuria 以前の早期腎症の指標となりうるか
(血糖変動の影響)、第37回日本糖尿病学会年次学術集会、徳島市、クレメント徳島、5月11日～13日、1994

- (12) 堀田和敏、衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、伊藤博史、中田宏志、岡田瑞穂、近藤亜津子：糖尿病患者におけるアポ E 遺伝子頻度—特に腎症との関係
第37回日本糖尿病学会年次学術集会、徳島市、クレメント徳島、5月11日～13日、1994
- (13) 近藤亜津子、衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、伊藤博史、荒木令江、堀内正公：自然発症糖尿病チャニーズハムスターの臓器 AGE 量の免疫学的測定
第37回日本糖尿病学会年次学術集会、徳島市、クレメント徳島、5月11日～13日、1994
- (14) 岩島保法、安孫子亜津子、衛藤雅昭、清野 進：絶食ラット腓ラ氏島における電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) 遺伝子発現とインスリン分泌反応に関する検討、第67回日本内分泌学会学術集会、長崎市、長崎市公会堂、6月1日～3日、1994
- (15) 岩島保法：ラット腓ラ氏島における電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) 遺伝子発現とインスリン分泌反応に関する検討、第12回北海道インスリン研究会、6月4日、札幌市、グランドホテル、1994
- (16) 岡田瑞穂、衛藤雅昭、森川秋月、堀田和敏、岩島保法、関口雅友、伊藤博史、近藤亜津子：リパーゼ阻害剤 (FL386) の高脂肪負荷に対する血漿中性脂肪への影響、第26回日本動脈硬化学会総会、6月9日～10日、横浜市、パシフィコ横浜、1994
- (17) 森川秋月、岩島保法、宮本義博、安孫子亜津子、野村雅宏、松本 啓、衛藤雅昭：糖尿病性腎症早期における各種尿中微量蛋白の動態、第28回日本糖

尿病学会北海道地方会、11月19日、札幌市、タケダ札幌ビル、1994

- (18) 安孫子亜津子、森川秋月、岩島保法、衛藤雅昭、荒木令江、堀内正公：ヒ
糖尿病性腎症糸球体における AGE の発現、糖尿病性腎症早期における各種
尿中微量蛋白の動態、第28回日本糖尿病学会北海道地方会、11月19日、
札幌市、タケダ札幌ビル、1994
- (19) 野村雅宏、衛藤雅昭、森川秋月、岩島保法、宮本義博、安孫子亜津子、松本
啓、千葉仁志：糖尿病 (NIDDM) におけるアポ E-rich HDL
糖尿病性腎症早期における各種尿中微量蛋白の動態、第28回日本糖尿病学
会北海道地方会、11月19日、札幌市、タケダ札幌ビル、1994

1995

- (1) 岩島保法、安孫子亜津子、清野 進、衛藤雅昭：OLETFラットにおける腓ラ氏
島遺伝子発現とインスリン分泌反応、第38回日本糖尿病学会年次学術集会、
5月24～26日、大宮市、大宮ソニックビル、1995
- (2) 岩島保法、安孫子亜津子、藤井康和、清野 進、衛藤雅昭：ラット腓ラ氏島電
位依存性カルシウムチャネル (VDCC) α_1 および β -サブユニット遺伝子発現
第68回日本日本内分泌学会学術総会、6月1日～3日、東京都、日本都市セ
ンター、1995
- (3) Yasunori Iwashima, Atsuko Abiko, Yasukazu Fujii, Susumu
Seino, Masaaki Eto : Gene expression of voltage-dependent
calcium channels (VDCCs) in pancreatic islets of diabetic OLETF
rats. 55th Annual Meeting and Scientific Sessions of American
Diabetes Association, June 10～13, Atlanta, Georgia, Georgia
World Congress Center, 1995

- (4) 岩島保法、安孫子亜津子、松本 啓、岡田瑞穂、衛藤雅昭：糖尿病患者の細小血管障害とLp(a)、特に増殖性網膜症の危険因子としての可能性について
第9回糖尿病性合併症研究会、10月7日、8日、名古屋市、愛知県産業貿易館西館10階 大会議場、1995
- (5) 岩島保法、安孫子亜津子、松本 啓、岡田瑞穂、衛藤雅昭：糖尿病患者(NIDDM)における細小血管障害と血中Lp(a)、第197回日本内科学会北海道地方会、11月11日、札幌市、タケダ札幌ビル2階大会議室、1995
- (6) 岩島保法、安孫子亜津子、松本 啓、岡田瑞穂、衛藤雅昭：糖尿病患者の細小血管障害とLp(a)、第29回日本糖尿病学会北海道地方会、11月18日、札幌市、タケダ札幌ビル2階大会議室、1995
- (7) 岩島保法、安孫子亜津子、松本 啓、岡田瑞穂、野村雅宏、衛藤雅昭：糖尿病性細小血管障害とLp(a)：AGEとの接点、第29回日本糖尿病学会北海道地方会、11月18日、札幌市、タケダ札幌ビル2階大会議室、1995
- (8) 松本 啓、岩島保法、衛藤雅昭：アンギオテンシン変換酵素遺伝子多型と糖尿病性腎症、第29回日本糖尿病学会北海道地方会、11月18日、札幌市、タケダ札幌ビル2階大会議室、1995

1996

- (1) 岩島保法、安孫子亜津子、松本 啓：絶食ラット豚ラ氏島における電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)、Glucose transporter 2 (GLUT2) および Glucokinase (GK) 遺伝子発現とインスリン(I)分泌反応に関する検討、第63回北海道ホルモン同好会、2月24日、札幌市、KKR札幌、1996
- (2) 岩島保法：糖尿病とLp(a)、第16回リポ蛋白研究会、4月6日、札幌市、共済サロン、1996

- (3) 岩島保法、安孫子亜津子、松本 啓、岡田瑞穂、野村雅宏、衛藤雅昭：糖尿病性血管合併症と Remnant like particles-cholesterol (RLP-C) に関する検討。第39回日本糖尿病学会年次学術集会、5月15～17日、福岡市、アクロス福岡、1996
- (4) 松本 啓、岩島保法、安孫子亜津子、岡田瑞穂、野村雅宏、衛藤雅昭：糖尿病性腎症とアンギオテンシンII受容体、アンギオテンシン変換酵素、アンギオテンシノゲン遺伝子多型との関連性、第39回日本糖尿病学会年次学術集会、5月15～17日、福岡市、アクロス福岡、1996
- (5) 野村雅宏、衛藤雅昭、岡田瑞穂、岩島保法、安孫子亜津子、松本 啓：糖尿病(NIDDM)におけるアポE4/4遺伝子型と高脂血症、第39回日本糖尿病学会年次学術集会、5月15～17日、福岡市、アクロス福岡、1996
- (4) 岩島保法、安孫子亜津子、衛藤雅昭：糖尿病性腎症(DN)とAtrial Natriuretic Peptide (ANP)、Angiotensin 2 (AG2) 第69回日本内分泌学会学術総会、7月3日～5日、大阪市、大阪城ホール・ホテルニューオータニ大阪、1996
- (5) Yasunori Iwashima, Mizuho Okada, Masaaki Eto: Remnant like particles-cholesterol (RLP-Ch) is associated with the progression of diabetic nephropathy. 56th Annual Meeting and Scientific Sessions of American Diabetes Association, June 8～11, San Francisco, California, Moscone Center, 1996
- (6) Eto M, Horita K, Morikawa A, Okada M, Iwashima Y, Abiko A: Apolipoprotein e2 allele and nephropathy in NIDDM. 56th Annual Meeting and Scientific Sessions of American Diabetes Association, June 8～11, San Francisco, California, Moscone Center, 1996

- (7) Matsumoto A, Iwashima Y, Abiko A, Eto M : Lack of synergistic effects on risk of diabetic nephropathy between angiotensin II -type 1 receptor (AT1R) and angiotensin-converting enzyme (ACE), and angiotensinogen (AGN) gene polymorphisms in Japanese NIDDM subjects. 56th Annual Meeting and Scientific Sessions of American Diabetes Association, June 8 ~11, San Francisco, California, Moscone Center, 1996
- (8) 岩島保法、安孫子亜津子、松本 啓、岡田瑞穂、野村雅宏、衛藤雅昭 : 糖尿病性細小血管障害と Lp(a)、第28回日本動脈硬化学会総会、6月13、14日、1996
- (9) 岩島保法、松本 啓、岡田瑞穂、安孫子亜津子、衛藤雅昭 : 糖尿病性腎症と Remnant like particles-cholesterol (RLP-C)、第30回日本糖尿病学会北海道地方会、11月18日、札幌市、タケダ札幌ビル2階大会議室、1995

1997

- (1) 岩島保法、松本 啓、岡田瑞穂、安孫子亜津子、衛藤雅昭 : 培養メサンギウム細胞におけるAdvanced Glycation End Products (AGEs) による NF-kB、AP-1 の活性化、第39回日本糖尿病学会年次学術集会、5月22~24日、東京都、東京国際フォーラム、1997
- (2) 岩島保法、衛藤雅昭 : 培養メサンギウム細胞における Advanced Glycation End Products (AGEs) による NF-kB、AP-1の活性化 第11回糖尿病性合併症研究会、10月15日~17日、名古屋市、愛知県産業貿易館 西館10階 大会議場、1997
- (3) 岩島保法、佐野博昭 : CS-045 (ノスカール) の使用経験 : minimal

model によるインスリン抵抗性の検討、第31回日本糖尿病学会北海道地方会、11月15日、札幌市、タケダ札幌ビル2階大会議室、1997

- (4) 野村雅宏、衛藤雅昭、岡田瑞穂、岩島保法、伊藤博史、宮本義博、網頭慶太、松本 啓、上林哲子：糖尿病（NIDDM）におけるアポ E 4 遺伝子と高コレステロール血症、第39回日本糖尿病学会年次学術集会、5月22～24日、東京都、東京国際フォーラム、1997
- (5) 網頭慶太、伊藤博史、上林哲子、松本 啓、野村雅宏、宮本義博、岡田瑞穂、岩島保法、衛藤雅昭：培養感覚神経細胞における痛覚伝達物質と神経成長因子、第39回日本糖尿病学会年次学術集会、5月22～24日、東京都、東京国際フォーラム、1997
- (6) 上林哲子、伊藤博史、米田政志、網頭慶太、松本 啓、野村雅宏、宮本義博、岡田瑞穂、岩島保法、衛藤雅昭：後根神経節における神経伝達物質の糖尿病による変化、第39回日本糖尿病学会年次学術集会、5月22～24日、東京都、東京国際フォーラム、1997
- (7) 宮本義博、米田政志、伊藤博史、岩島保法、網頭慶太、松本 啓、野村雅宏、岡田瑞穂、衛藤雅昭：糖尿病ラットにおける胃排泄能と Calcitonin gene-related peptide との関連について、第39回日本糖尿病学会年次学術集会、5月22～24日、東京都、東京国際フォーラム、1997

1998

- (1) 岩島保法、衛藤雅昭：インスリン抵抗性とレプチン、第30回日本動脈硬化学会総会、6月11～12日、東京都、京王プラザホテル、1998
- (2) 岩島保法、衛藤雅昭：培養メサングウム細胞における advanced glycation end products (AGE) による thioredoxin (Trx) 遺伝子発現、

第30回日本動脈硬化学会総会、5月15～17日、東京都、京王プラザホテル、1998

- (3) 岩島保法、衛藤雅昭：培養メサングウム細胞における advanced glycation end products (AGE) による thioredoxin (Trx) 遺伝子発現、第12回糖尿病性合併症研究会、10月発表予定、名古屋市、愛知県産業貿易館 西館 10階 大会議場、1998

(3) 出版物

- (1) 岩島保法、第3部 動物実験モデル：3-8 STZ
糖尿病研究ストラテジー（清野 進、岡 芳知 監修）、秀潤社、
378-379、1995
- (2) 岩島保法、第3部 動物実験モデル：3-10 旭川コロニー
糖尿病研究ストラテジー（清野 進、岡 芳知 監修）、秀潤社、
383-384、1995
- (3) 岩島保法：ブドウ糖毒性とインスリン分泌 分子糖尿病学の進歩、pp98-112、
矢崎義雄 監修、渥美義仁、門脇 孝、春日雅人、清野 進 編集、金原出版、
1997
- (4) 岩島保法、XXIV：糖尿病関連諸検査—測定法と臨床的意義、
46) RLP-C 糖尿病3：pp262-268、諏訪庸夫 編集、日本臨床社、1998
- (5) 岩島保法、XXVII：糖尿病の実験モデル 3.1) ケミカル物質による誘発性糖尿病
(ストレプトゾトシン単回投与、頻回投与)、糖尿病3：pp732-737、
諏訪庸夫 編集、日本臨床社、1998