

【背景】

グルコースなどの糖とアミノ酸（タンパク質）が非酵素的に結合することにより、アマドリ産物が産生される。これらの反応は、メイラード反応と呼ばれている。ヘモグロビンの場合、生体内のアマドリ産物は、HbA1c と言われ、糖尿病の診断・治療効果判定として使用されている。また、グルコースとアルブミンが結合した糖化アルブミン (GA: glycated albumin) も高血糖の標識として使われている。申請者らは GA 自体が膵ランゲルハンス氏島（膵ラ氏島）からのインスリン分泌を阻害することを指摘した。そして、アマドリ産物は長期間を経ると不可逆的な結合となり、advanced glycation end products (AGEs) を形成する。AGEs は実際にヒト血液中中に存在しており、AGEs のレセプターは、RAGE (receptor of AGEs) と言われ、すべての臓器に存在している。それらが各臓器のレセプターに結合することによって糖尿病合併症、アルツハイマー病、NASH (nonalcoholic ateohepatitis) 等の慢性疾患の原因となる。AGEs はいくつかの種類があることが報告されており、今回の実験はグルコース由来の AGE (Glu-AGE) とグリセルアルデヒド由来の AGE (Gly-AGE) を使用した。

【目的】

Glu-AGE と Glycer-AGE による膵ラ氏島からのインスリン分泌に対する作用を調べ、そのメカニズムを同定することを目的とした。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認後、指針に従って行った。9-10 週齢の Wistar rat (♂) から collagenase 法を用いて膵ラ氏島を単離した。膵ラ氏島は、10% RPMI-1640 培地で終夜培養後に、bovine serum albumin (BSA)、Glu-AGE、Glycer-AGE をそれぞれ 0.1 mg/mL の濃度になる様に添加し、48 時間接触させた。膵ラ氏島からのインスリン分泌量は、3 種類のグルコース濃度 (3mM: G3, 7mM: G7, 15mM: G15) 下で、培養後上清中のインスリン量を測定した。インスリン量は Mean \pm SEM μ U/ 3 islets/60 min で、BSA (Control)、Glu-AGE、Glycer-AGE の順で表記した。また、インスリン分泌の信号伝達系を駆動する NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) シヤトルの遺伝子発現を RT-PCR を用いて調べた。

【結果】

インスリン分泌量は G3 において 32.5 \pm 2.3 (BSA), 31.1 \pm 2.8 (Glu-AGE) ($P=0.70$), and 35.3 \pm 2.8 (Glycer-AGE) ($P=0.42$) とほぼ同じであった。G15 においては 164.1 \pm 6.0 (BSA)、124.4 \pm 4.4 (Glu-AGE) ($P<0.05$)、119.8 \pm 7.1 (Glycer-AGE) ($P<0.05$) と Glu-AGE、Glycer-AGE で有意に低下していた。細胞外高カリウム濃度 (30mM K⁺)、tolbutamide (10 mM)、 α -KIC (α -ketoisocaproic acid) (10 mM) 添加で分泌抑制が拮抗された。また、解糖系における中間物質の glyceraldehyde (10 mM)、dihydroxyacetone (10 mM)、TCA サイクルの中間物質の methylpyruvate (10 mM)、インクレチンである GLP-1 (glucagon-like peptide-1) (10 nM) 添加におけるインスリン分泌促進刺激時においても抑制効果が認められた。Glu-AGE、Glycer-AGE 添加によって NADH シヤトルを担っている MDH (*malate dehydrogenase*) 1/2 の遺伝子発現が低下していた。

【考察】

グルコースが細胞内に入り解糖系ならびにミトコンドリアの電子伝達系を経て ATP が

産生されることでK-ATPチャネルが閉鎖する。細胞膜の脱分極が起こり電位依存性L型Ca²⁺チャネルから、細胞外Ca²⁺が流入して細胞質のCa²⁺濃度が上昇することにより、インスリンが分泌される。このカスケードの中間代謝産物を添加することで、AGEsの作用点を同定するレスキュー実験を行った。細胞外高カリウム、tolbutamide添加によってインスリン分泌抑制が拮抗されたことは、K_{ATP}チャネルよりも上流に作用点があることを証明している。DHAとglyceraldehydeは解糖系に直接作用してインスリンを分泌させるが、レスキューされなかったため作用部位は解糖系よりも下流にあると考えられた。また、ミトコンドリアの燃料であるmethylpyruvateの結果からも、ミトコンドリアよりも下流で作用することを示している。α-KICはミトコンドリアの代謝に入り、NADPHを生成する。α-KIC添加によって分泌抑制がレスキューされたことは、作用点がTCA回路に作用することの証明である。NADHはミトコンドリアの内膜を通過することができないためNADHシャトルという機構を利用して輸送する。それらはMdh1とMdh2によって構成されており、*Mdh1/2*遺伝子の発現レベルが低下していた。

【結論】

Glucose濃度（15 mM）刺激による膵ラ氏島からのインスリン分泌は、Glu-AGE、Glycer-AGEによって抑制される。Glycer-AGEは毒性を持つことが報告されているが、Glu-AGEとのインスリン分泌抑制の程度に差は認められなかった。Glu-AGE、Glycer-AGEは、エネルギー産生系にかかわるNADHシャトルに作用し、膵ラ氏島からのインスリンの分泌を低下させる。