



Alterations of GTP-binding proteins (Gs α and Gq/11 α) in gastric smooth muscle cells from streptozotocin-induced and WBN/Kob diabetic rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 林, 升 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1124

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 271号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏名	林 升		
論文題目	Alterations of GTP-binding proteins (Gs α and Gq/11 α) in gastric smooth muscle cells from streptozotocin – induced and WBN/Kob diabetic rats (ストレプトゾトシン誘発及び自然発症糖尿病ラットの胃平滑筋細胞膜における GTP 結合蛋白の変化)		

博士(医学) 林 升

論文題目

Alterations of GTP-binding proteins (Gs α and Gq/11 α) in gastric smooth muscle cells from streptozotocin-induced and WBN/Kob diabetic rats

(ストレプトゾトシン誘発及び自然発症糖尿病ラットの胃平滑筋細胞膜における GTP 結合蛋白の変化)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

これまでに、胃平滑筋ムスカリン性アセチルコリン受容体（ムスカリン受容体）を検討し、5種類のサブタイプのうち m2、m3 受容体が胃平滑筋に発現していること、及び M3 選択的拮抗剤投与より、心拍数増加をきたさず、胃運動、胃排出の抑制が観察され、M3 受容体刺激がおもに胃運動、胃排出に関与していることを報告した。(Lin S, et al. Dig. Dis. Sci. 42: 907-14, 1997.)。糖尿病患者にみられる糖尿病性胃アトニー (gastroparesis) は、胃運動機能低下により胃内容の排出遅延をきたし、腹部膨満感、悪心、嘔吐等の症状を示す。自律神経障害が、その原因として考えられてきたが、胃平滑筋のムスカリン性受容体刺激によるフォスフォイノシトール代謝回転及び、C-キナーゼの細胞膜へのトランスローケションの低下が報告され、長期にわたる高血糖が胃平滑筋自体に影響を与えていることが推測される。(Takahashi T, et al. Am. J. Physiol. 270:G411-417, 1996.)

今回、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット (STZラット) と WBN/Kob 糖尿病自然発症ラット (WBN/Kob ラット) の二つのモデルを用いて、高血糖状態下の胃平滑筋におけるムスカリン性受容体の量、親和性、G 蛋白質量、アデニレートサイクラーゼ活性の変化と胃運動低下への関与を検討した。

〔材料ならびに方法〕

STZラットは、10週齢の雄性 Wistarラットに 0.1M ストレプトゾトシンを尾静脈より 35mg/kg を投与し作製した。コントロールは溶解液のみを投与した。投与24時間後の血糖値が 300mg/dl 以上に達したラットを10週間後に実験に使用した。WBN/Kob ラットは血糖値が 300mg/dl に達したもの (11-12ヶ月齢) を糖尿病発症と認め、10週間後に実験に使用した。コントロールは同月齢の雄性 Wistarラットを用いた。胃運動はバルーンを胃内に留置し圧トランスデューサより胃内圧を測定した。胃平滑筋細胞膜のムスカリン性受容体の変化は [³H] quinuclidinyl benzilate ([³H] QNB) による結合実験で評価した。GTP 結合蛋白はウエスタンブロット法で量的検討を行った。アデニレートサイクラーゼ活性は cAMP 産生量を指標としラジオイムノアッセイで測定した。

〔結果〕

(1) 胃運動

STZラット (n=15) とコントロールラット (n=15) の胃運動頻度はそれぞれ 42 \pm 5 と 81 \pm 3 回/20分、胃内圧は 13 \pm 2 と 44 \pm 3 cmH₂O であり、ともにコントロールと比較し有意に低下していた。WBN/Kobラット (n=9) 及びコントロールラット (n=4) においても、それぞれ胃運動頻度は 62 \pm 10 と 92 \pm 2 回/20分、胃内圧は 23 \pm 3 と 45 \pm 5 cmH₂O を示し、WBN/Kobラットにおいてもコントロールと比較し胃運動頻度及び胃内圧が有意に低下していた (Mean \pm SE, P<0.05)。

(2) [³H] QNB結合実験

STZラット (n=6) と WBN/Kobラット (n=5) とともにムスカリン性受容体の量 (Bmax 545–588 fmol/mg protein)、および [³H] QNB に対する親和性 (Kd 0.064–0.065 nM) は各コントロールラット (n=5 and n=4) (Bmax 559–573 fmol/mg protein, Kd 0.062–0.069 nM) と比較し有意な変化はみられなかった (Mean±SE)。

(3) GTP結合蛋白

ラット胃平滑筋細胞膜におけるGTP結合蛋白量を検討したところ、STZラットではGsα (n=6) の量は32±8で、コントロール (n=6) の47±6と比較し有意に増加していたが、Gq/11α (n=6)、Giα (n=8) の量は有意な変化を認めなかった。WBN/KobラットではGq/11α (n=7) の量は36±4で、コントロール (n=4) の57±7と比較し有意に減少していた、Gsα (n=6)、Giα (n=8) の量は有意な変化がなかった。(デンストメーターにて測定した正常ラット全脳細胞膜の同種蛋白濃度を100%として、各バンドの濃度は脳細胞膜G蛋白と比較しパーセンテージで表した。Mean±SE, P<0.05)。

(4) アデニレートサイクラーゼ活性 (cAMP産生量)

ラット胃平滑筋細胞膜では、STZラット (n=5) のcAMP産生量は基礎産生量および100μM isoproterenol, forskolin 刺激下での産生量はそれぞれ10±2、20±3、83±2 pmol/mg protein/minであり、コントロールラット (n=5) の3±0.2、7±0.7、68±5 pmol/mg protein/minと比較し増加していた。100μM GTPγS 存在下でのcAMP産生量は58±6であり、コントロールの46±2 pmol/mg protein/minと比較し有意差を認めなかった。WBN/Kobラット (n=5) では基礎産生量及び刺激下の産生量ともにコントロール (n=4) と比較し変化がみられなかった (Mean±SE, p<0.05)。

[考察]

- 1) STZラットではGTP結合蛋白のGsαとアデニレートサイクラーゼ活性が増加していることから、細胞内cAMPの産生増加が平滑筋の収縮低下をきたし胃運動低下を引きおこす可能性が推測された。
- 2) WBN/KobラットではM3ムスカリン性受容体に共役するGTP結合蛋白のGq/11αが減少していたことより、ムスカリン性受容体刺激後のイノシトール燐酸化経路の活性低下が一因である可能性が推測された。

[結論]

STZラットとWBN/Kobラットともに胃運動が低下していた。両モデルともムスカリン性受容体の数及び[³H] QNBに対する親和性の変化がなかったが、GTP結合蛋白以下の細胞内情報伝達系の変化に違いがあり、二つのモデルは異なる機序により胃運動の低下をきたしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

糖尿病患者にみられる胃アトニーの原因として自律神経障害が考えられてきたが、最近胃平滑筋のムスカリン性受容体 (以下m受容体) 刺激系の関与が疑われるようになった。

申請者らはストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット (STZラット) とWBN/Kob糖尿病自然発症ラット (WBN/Kobラット) を用いて胃平滑筋のm受容体、GTP結合タンパク (以下Gタンパク) の性質あるいは量、またcAMP生成量についても検討し胃運動低下との関連について考察を加えた。

方法としては、STZラットは10週令のウイスターラットを用いて作製し、血糖値が300mg/dlに達して

から10週後に、WBN/Kob ラットも血糖値が同じレベルに達してから10週後に使用した。胃運動の測定は胃内バルーン法によった。m 受容体の解析は放射性リガンドを用いて解析し、G タンパクのそれはウエスタンブロット法によった。cAMP 生成量はラジオイムノアッセイによった。

STZ ラット、WBN/Kob ラットの両方において胃運動、胃内圧ともに対照に比べ低下していた。m 受容体の量及び性質（リガンド親和性）は両モデルとも有意の変化はみられなかった。G タンパクについてはSTZ ラットのGs α は増加していたがGq/11 α に変化はみられなかった。WBN/Kob ラットではGq/11 α が減少しGs α に変化はみられなかった。cAMP 生成量はSTZ ラットで増加し、WBN/Kob ラットで変化がみられなかった。

以上のように、STZ ラットではGs α とcAMP 生成量の増加がみられ、WBN/Kob ラットではGq/11 α の低下がみられた。これらは二つの糖尿病モデルにおける胃運動低下の機序を考える上で基礎となる知見である点が評価された。

本研究の発表に際して以下の質問を行った。

- 1) 胃運動測定時の意識状態について
- 2) 収縮運動の評価の仕方について
- 3) m₂系の作用について
- 4) m₂, m₃ の存在比について
- 5) WBN/Kob ラットはNIDDMモデルと言えるのか
- 6) WBN/Kob ラットとNODマウスの比較
- 7) WBN/Kob ラットの対照ラットについて
- 8) WBN/Kob ラットで発症後も体重不変の理由は
- 9) STZ ラットで高血糖に達してから10週待つ理由は
- 10) STZ ラットの作製でSTZ投与量が少くないか
- 11) 中枢性の因子をどのように評価するか
- 12) 血糖値が回復すると胃運動も回復するか

これらの試問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 藤田 道也

副査 教授 梅村 和夫 副査 教授 中村 浩淑