

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	D1-D2ヘテロ多量体を介したドーパミンによるマウス膵 細胞の機能調節の解明
Title(English)	
著者(和文)	上船史弥
Author(English)	Fumiya Uefune
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12172号, 授与年月日:2022年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:糸 昭苑,白木 伸明,木村 宏,廣田 順二,徳永 万喜洋,北口 哲也
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12172号, Conferred date:2022/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論 文 要 旨

(和文2000字程度)

Dissertation Summary (approx. 2000 characters in Japanese)

報告番号 For administrative use only	乙 第 号	氏 名 Name	上船 史弥
<p>(要 旨)</p> <p>【背景・目的】膵臓の膵β細胞はインスリンを産生・分泌することで血糖値を下げる役割を有する。遺伝的あるいは環境的要因によってインスリンの機能不全・分泌不全が生じると、慢性的な高血糖を呈する糖尿病を発症する。β細胞は食後の血中グルコース濃度の上昇に応答して2相性のインスリン分泌を示す。急峻な第1相と持続的な第2相からなる2相性インスリン分泌は血糖値の急激な上昇を防ぐとともに、安定的に保つ働きがある。このような規則的なβ細胞のインスリン分泌は内分泌細胞間のパラクラインやオートクラインが重要な役割を持つ。神経伝達物質の1つであるドーパミン (DA) はインスリン分泌を負に調節することが知られている。β細胞自身がDAの合成・貯蔵能を有することから、パラクラインやオートクラインを介してβ細胞の機能を調節すると考えられている。私の所属の研究室ではこれまでにDAの正常な分泌小胞への貯蔵がβ細胞の機能を長期間維持するために重要であることを明らかにした。一方で、β細胞が合成・貯蔵したDAがインスリン分泌を調節する詳細な機構には不明な点も多く、本研究ではDAによるインスリン分泌調節機構解明を目的とした。</p> <p>【方法】本研究では主にマウス生体から単離した膵島、および膵島を分散培養したマウス初代β細胞を用いた。β細胞のインスリン分泌を調べるため、アデノウイルスを用いてヒトpreproinsulinと蛍光タンパク質Venusの融合タンパク質をマウス膵島の分散培養系において強制発現させ、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いて分泌小胞の開口放出を観察した。また、インスリン分泌を引き起こすセカンドメッセンジャーであるCa²⁺およびcAMPの動態をそれぞれの可視化プローブを用いた蛍光細胞で光観察により解析した。さらにDAおよびDA受容体による調節機構を探るため、受容体に対する特異的なアゴニストとアンタゴニストを添加し、応答性を調べた。</p> <p>【結果】まず、マウス膵臓組織の免疫組織化学により、DA合成酵素のtyrosine hydroxylaseは一部のβ細胞で、Aromaric L-amino acid decarboxylaseはほとんどのβ細胞で発現することを確認した。また、DAはβ細胞のインスリン分泌小胞に局在していた。TIRFMによるインスリン分泌動態実験から、β細胞内で生合成・貯蔵されたDAがインスリン分泌2相目を抑制することがわかった。DAによる分泌調節機構を調べたところ、細胞外にDAを添加すると細胞内Ca²⁺およびcAMP蓄積量が減少し、インスリンの開口放出数を減少させた。さらに、DAの作用はドーパミンD1受容体アンタゴニストによって阻害されたことから、D1の関与が示唆された。そこで、DA受容体のうち、D1受容体 (D1) とD2受容体 (D2) の効果を調べるため、マウスβ細胞に対してアデノウイルスを用いて強制発現した。D1強制発現 (D1OE) はグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) 能を示したが、DAを添加しても分泌阻害を示さなかった。一方でD2OEによりGSIS能は失われた。異種のGタンパク質共役型受容体同士が会合することで下流のシグナルが変化し調節されることが知られており、神経細胞などではD1とD2が</p>			

ヘテロ多量体を形成し、その下流には新たなシグナルを活性化することが報告されている。今回、野生型とD1OEのDAに対する応答の違いから、D1とD2の相互作用に着目した。D1-D2ヘテロ多量体を特異的に活性化することが知られているSKF83959を10 μ Mの濃度で加えると細胞内Ca²⁺とインスリンの開口放出数が一過性的に減少した。D1-D2同時に強制発現 (D1D2OE) させると、濃度依存的に細胞内Ca²⁺減少することが確認された。また、 β 細胞におけるD1-D2ヘテロ多量体形成がDuolink in-situ近接アッセイによって確認されたことから、 β 細胞内でのD1-D2ヘテロ多量体の形成がインスリン分泌を調節することを示した。さらに、D1およびD2が β 細胞の維持に関わるかを調べたところ、DA 10 μ MはD2OEにおいて細胞死を誘導するが、D1を同時に発現させると細胞死が防がれることが分かった。

【考察】 β 細胞内のDA生合成・貯蔵がインスリン分泌2相目を抑制することが示され、DAがインスリンとともに放出され、パラクライン/オートクラインを介して分泌を調節することが示唆された。長期的なD2ホモ多量体の活性化は β 細胞の機能不全と細胞死を引き起こし、D1が発現してD1-D2ヘテロ多量体を形成することで β 細胞の機能を維持していることが示唆された。

【結論】本研究により、マウス β 細胞におけるDA生合成と貯蔵によるインスリン分泌調節を示した。DAによる分泌調節機構にはD1とD2の2種類の受容体が関与し、D1-D2ヘテロ多量体の形成を示した。D1-D2ヘテロ多量体の活性化は短時間の細胞内Ca²⁺減少を介してインスリン分泌を阻害するとともに、D2ホモ多量体の過剰な活性化による細胞死から防ぐ作用を持つことを明らかにした。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

Dissertation Summary (approx. 300 words in English)

報告番号 For administrative use only	乙 第 号	氏 名 Name	上船 史弥
<p>(要 旨) (Summary)</p> <p>Pancreatic beta-cells produce and secrete insulin that plays a key role in glucose homeostasis. Insulin secretion in response to high glucose exhibits a biphasic manner and is tightly regulated by various mechanisms including paracrine and autocrine manners. Dopamine has been identified as a negative regulator of insulin secretion in beta-cells. However, the underlying mechanism remains unknown. Here, to elucidate the mechanism that dopamine regulates insulin secretion, we used total internal reflection fluorescent microscopy (TIRFM) and monitored the exocytosis of insulin granules in mouse primary beta-cells. We also monitored the dynamics of intracellular Ca^{2+} and cAMP by using fluorescent probes to examine the underlying mechanisms.</p> <p>Firstly, I confirmed the expression of enzymes related to dopamine synthesis in mouse beta-cells by immunohistochemistry. I found that dopamine is stored in the secretory vesicles containing insulin. The TIRFM observation revealed that DA synthesized and stored in beta-cells inhibited the second phase of insulin secretion in response to glucose challenge.</p> <p>Secondly, I attempted to investigate the mechanism of DA inhibited insulin secretion. The addition of dopamine in the medium decreased the number of fusion events of insulin granules. Dopamine D1 receptor antagonist reversed the dopamine effects, which suggests that dopamine's negative effects are mediated by the D1 receptor rather than the D2 receptor. Overexpression of D2 (D2OE) abolished glucose-stimulated Ca^{2+} influx and insulin secretion. Meanwhile, D1OE did not mimic wild type in term of dopamine response. Then I hypothesized the involvement of D1-D2 heteromer in beta-cells. The D1-D2 heteromer agonist SKF83959 transiently decreased Ca^{2+} influx in wild-type and D1-D2 simultaneously overexpressed beta-cells (D1D2OE). Duolink proximity ligation assay showed the formation of D1-D2 heteromer in primary beta-cells.</p> <p>Furthermore, D2OE showed a toxic effect in the presence of DA that was recovered by D1D2OE. In conclusion, D1 and D2 forms heteromer in beta-cells and transiently inhibits insulin secretion. The results suggest that D1 plays a protective role through D1-D2 heteromer formation from the toxic effects of D2 activation.</p>			

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.