

膵臓内分泌細胞の分化とホルモン分泌を調節する新規分子の発見とその作用機序の解明

岡 孝己,^{*,a} 大谷 政博,^b 鈴木順一朗^c

Identification of Novel Molecules Regulating Differentiation and Hormone Secretion and Clarification of Their Functional Mechanisms in Pancreatic Endocrine Cells

Takami OKA,^{*,a} Masahiro OHTANI,^b and Jun-ichiro SUZUKI^c

^aResearch Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University, 1-1-20 Shinmachi, Nishi-Tokyo, Tokyo 202-8585, Japan, ^bDepartment of Pharmacology, Osaka Dental University, 8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata, Osaka 573-1121, Japan, and ^cSignaling Molecules Research Group, Neuroscience Research Institute, AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki, 305-8568, Japan

(Received November 6, 2009)

In order to find novel bioactive molecules regulating differentiation and hormone secretion of pancreatic endocrine cells, the effects of various substances including purinergic receptor agonists and inhibitors of polyamine biosynthesis were examined in pancreatic islets and several pancreatic cell lines. The nicotinic alpha3beta4 receptor was found to be present and capable of increasing cytoplasmic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) and insulin secretion in mouse pancreatic Beta-TC6 cells. Activation of both nicotinic and muscarinic M₃/M₄ receptors resulted in reduction of insulin release when compared with stimulation of muscarinic receptor alone in Beta-TC6 cells. In mouse islets, purinergic P2Y₁ and P2Y₆ receptors, which are coupled to Gq proteins, were expressed and appeared to regulate insulin secretion through Ca²⁺ mobilization from intracellular stores. Similar results were observed in Beta-TC6 cells. Spermidine, one of polyamines, was found to modulate insulin synthesis and [Ca²⁺]_i in Beta-TC6 cells by use of a specific spermidine synthesis inhibitor, *trans*-4-methylcyclohexylamine (MCHA). Antizyme, which binds to ornithine decarboxylase (ODC) and thereby reduces the cellular polyamine level, was found to be necessary for conversion of ASPC-1 cells, a pancreatic ductal tumor cell line, into alpha-cells forming the islet-like structure and expressing glucagon gene. These findings help advance our understanding of the complex mechanisms involved in the regulation of pancreatic endocrine cell function and develop new therapeutic agents in diabetes mellitus.

Key words—pancreas; receptor; calcium; polyamine; insulin; glucagon

1. はじめに

加齢に伴って発症する2型糖尿病の主な原因として、膵臓におけるβ細胞数の減少やインスリン分泌能の低下、筋や脂肪組織におけるインスリン効力の低下などが挙げられる。2型糖尿病は生活習慣病であり、食生活の豊かさや運動不足による肥満も遺伝的要因とともに発症の危険因子となる。厚生労働省の平成19年度の調査によると、糖尿病患者数は

予備軍を含めると約2200万人に達していると推定され、欧米だけではなく日本でも近年増加の一途をたどっている。したがって現在、2型糖尿病の有効な新しい治療法及び治療薬の早期の開発が望まれている。

筆者(岡)は、米国立衛生研究所(National Institute of Health, NIH)で乳腺細胞の増殖・分化を制御するホルモンなどの作用機構の解明を目指して約30年間にわたり研究を行ってきた。その後、2004年に武蔵野大学薬学部遺伝子学研究室の教授として赴任した。その際、NIH在籍当時から興味を持っていた糖尿病の新規の治療法又は治療薬の開発を目指した研究に取り組むこととし、NIH博士研究員をしていた大谷政博博士とともに研究グループを形成し、グルカゴンやインスリンなど血糖値の調節に必要な不可欠なホルモンを生合成・分泌するαやβ細胞などからなる膵臓ランゲルハンス島(膵

武蔵野大学薬学研究所 (〒202-8585 東京都西東京市新町1-1-20)

現所属：^a湧永製薬株式会社中央研究所 (〒739-1195 広島県安芸高田市甲田町下甲立1624番地)、^b大阪歯科大学薬理学講座 (〒573-1121 大阪府枚方市楠葉花園町8-1)、^c独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門シグナル分子研究グループ (〒305-8568 茨城県つくば市梅園1-1-1)

*e-mail: oka_tm@wakunaga.co.jp

本総説は、平成20年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

島) や, β 細胞由来の数種の細胞株を用いて細胞レベルでの基礎的研究を開始した. 大谷博士がムスカリン性及びニコチン性アセチルコリン受容体に結合するコリン作動薬の研究に従事していたことから, 最初に様々なアゴニストの薬理作用を網羅的に調べた. その結果, ニコチンが β 細胞株からのインスリン分泌を促進することなど興味ある知見を得ることができた. その後も, ATP などのヌクレオチドが結合するプリン作動性受容体の新規のサブタイプや, 細胞の増殖や分化に必須の働きを持つ塩基性ポリカチオンであるポリアミン, またその生合成を調節するアンチザイムなどが, β 細胞からのインスリン分泌や α 細胞の分化の制御に係わっていることを明らかにすることができた. 本稿では, 武蔵野大学在籍時に行った研究成果を中心にその研究背景と概略を述べたい.

2. β TC6 細胞におけるニコチン性アセチルコリン受容体によるインスリン分泌の調節¹⁾

膵島 β 細胞は, 血中グルコース濃度 (血糖値) の上昇に反応してペプチドホルモンであるインスリンを生合成し, 血中に分泌する. 分泌されたインスリンは, 標的器官である筋組織や肝臓等に作用し, 筋肉細胞内へのグルコースの取り込みや代謝の促進, また肝細胞でのグリコーゲン合成の促進や糖新生の抑制などを引き起こすことによって血糖値を低下させる. β 細胞からのインスリン分泌は, 血中グルコース濃度の増加により上昇し, アセチルコリン, ノルアドレナリンやアミノ酸などの様々な神経伝達・生理活性物質によって調節されていることが知られている.²⁾ 膵島に神経分布している副交感神経終末から放出されるアセチルコリンは, 膵島 β 細胞膜上に存在するムスカリン性アセチルコリン受容体の Gq タンパク連結型 M_3 サブタイプに結合してインスリン分泌を促進することが, 単離した膵島や β 細胞株及び M_3 ノックアウトマウスを用いた研究により明らかにされている.²⁻⁷⁾ また, 膵島でのホルモン分泌の調節においては, 細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) がグルコースや M_3 受容体^{2,8)} の刺激によって上昇する. 以下に, これらの刺激によって β 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ が上昇するメカニズムについて述べる.

グルコース刺激では, 血中のグルコース濃度が上昇すると, グルコーストランスポーター 2 (GLUT2)

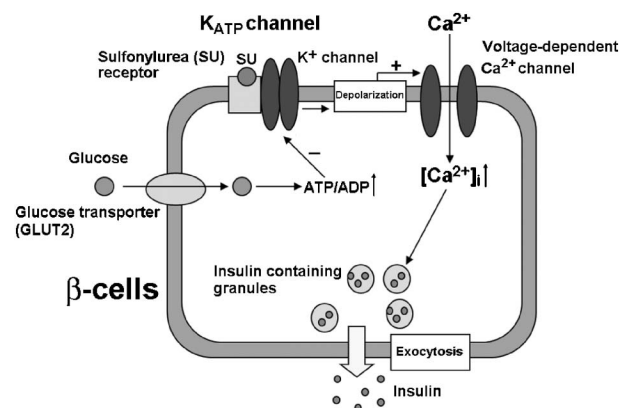


Fig. 1. Signaling Pathway Involved in Insulin Secretion Induced by Glucose in Pancreatic β -cells

The processes in which the increase in the ratio of ATP/ADP closes K_{ATP} channels and the subsequent membrane depolarization opens voltage-dependent Ca^{2+} channels are indicated by - and +, respectively. ADP: adenosine 5'-diphosphate. $[Ca^{2+}]_i$: cytoplasmic Ca^{2+} concentration.

を介して β 細胞内にグルコースが取り込まれ, 代謝されて ATP 産生が亢進し, ATP/ADP 比が上昇する (Fig. 1). この比の上昇によって ATP 感受性カリウムチャンネルが閉鎖して細胞膜が脱分極し, 続いて電位感受性カルシウムチャンネルが開き細胞内に Ca^{2+} が流入して $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する. 次に, この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き金となってインスリンを含む顆粒が exocytosis によって細胞外へ放出される. 一方, M_3 受容体刺激の場合は, まず, リガンドの受容体への結合によって三量体 G タンパクから解離した $Gq\alpha$ サブユニットがホスホリパーゼ $C\beta$ ($PLC\beta$) を活性化する. 次に, 活性化された $PLC\beta$ の作用によって, ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP_2) からセカンドメッセンジャーとして働くイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) が産生される. 次に, IP_3 が細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位である小胞体膜上に存在する IP_3 受容体に結合して, 細胞質へ Ca^{2+} が動員されることによって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する. このように, β 細胞からのインスリン分泌において, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が重要な要因の 1 つとなっているので, これをホルモン分泌に影響を及ぼす物質のスクリーニングの指標として用いることとした. また, 膵島は 1 個体のマウスやラットからは微量しか単離できず, さらに培地中で増殖せず, かつ長期間の維持も難しいので, β 細胞株の一種で市販されているマウス由来の β TC6 細胞を用いることとした. この実験系で既知の様々なリガ

ンドの $[Ca^{2+}]_i$ に対する薬理作用を調べたところ、ムスカリン性アゴニストだけではなく、ニコチン性レセプターのアゴニストであるニコチンが、 $10 \mu M$ 以上で濃度依存的に $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる作用を示すことを見出した。これは、膵臓 β 細胞にニコチン性レセプターが存在し、機能していることを示唆する最初の知見であり、興味深いものであった。また、ニコチン性レセプターに最も高い親和性を持つカエル皮膚由来の epibatidine⁹⁾ の EC_{50} 値は 20 nM であり、これはニコチンの値よりも約 1000 倍低いものであった。さらに、ニコチンが $\beta TC6$ 細胞の細胞膜電位を $1 \mu M$ 以上で脱分極させることもわかった。次に、アンタゴニストや阻害剤を用いてニコチンの作用機構を調べてみると、ニコチンの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は、ムスカリン性レセプターの非特異的アンタゴニストであるアトロピンやスコポラミンによってはほとんど阻害を受けなかったが [Fig. 2(A)], ニコチン性レセプターの非特異的アンタゴニストであるメカミルアミンによって完全に抑制された [Fig. 2(B)]. これらの結果から、ニコチンがムスカリン性ではなく、ニコチン性レセプターを介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こしていることが示唆された。

ニコチン性レセプターは、 $\alpha, \beta, \delta, \varepsilon$ (成人) そして γ (胎児) の 5 つのサブユニットの組み合わせからなり、神経型と筋肉型に大別される。¹⁰⁾ 神経型は、9 種の α ($\alpha 2-10$) と 3 種の β ($\beta 2-4$) サブユニットから構成される五量体であると考えられており、¹⁰⁾ これらの組み合わせの多様性から、様々なユニット構成を持つレセプターが同一又は複数の細胞や組織にまたがって存在していることが予想される。したがって、レセプターサブタイプのサブユニットの組

み合わせを特定することは、特異的なアゴニストやアンタゴニストがこれまで十分に開発されていないことも相まって非常に困難であった。そこで、特定のサブタイプしか発現していない細胞や、決まった種類の組み合わせからなるレセプターのみを発現させた chinese hamster ovary (CHO) 細胞などを用いて、リガンドの結合様式からサブユニットの組み合わせを類推する試みがなされている。われわれは、ニコチン性レセプターの種々のアゴニストの作用機序と、他の研究者の報告^{11,12)} を基にわれわれの得たデータを解析した結果、 $\beta TC6$ 細胞に発現しているニコチン性レセプターは $\alpha 3\beta 4$ タイプであることを示唆する知見を得た。さらに、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって $\beta TC6$ 細胞で $\alpha 3$ と $\beta 4$ のサブユニットの mRNA が存在していることを確認し、 $\alpha 3\beta 4$ タイプのレセプターが発現していることを裏付ける証拠を得ることができた。また、ニコチン性レセプターを刺激することによって、グルコースによって引き起こされるインスリン分泌がどのように影響されるかを調べたところ、ニコチン濃度の増加に依存してインスリン分泌が促進されることが明らかとなった。これらの研究結果により、ニコチン性レセプターが β 細胞におけるインスリン分泌の調節に係わっている可能性が示唆された。

3. $\beta TC6$ 細胞におけるインスリン分泌に関するニコチン性レセプターとムスカリン性レセプターとの相互作用¹³⁾

上で述べたように、ムスカリン性レセプターが正常 β 細胞で機能していることはよく知られていたため、われわれは $\beta TC6$ 細胞におけるその発現を調べた。RT-PCR を行ったところ、 M_3 とともに M_4

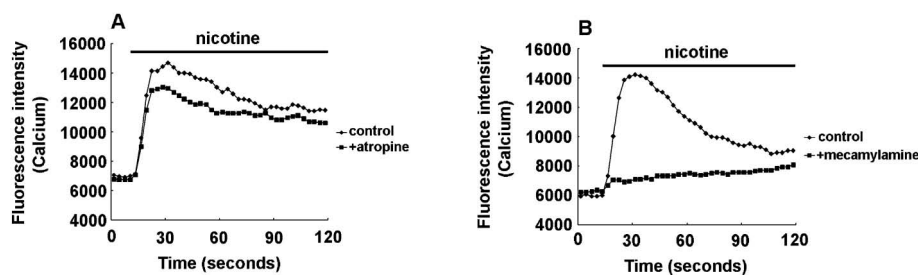


Fig. 2. Effect of Muscarinic and Nicotinic Antagonists on the Rise in $[Ca^{2+}]_i$ Induced by Nicotine in Beta-TC6 Cells

The temporal $[Ca^{2+}]_i$ response to nicotine ($100 \mu M$) was measured in Hanks/HEPES buffer (pH 7.4) for 120 s in the absence (control) or presence of (A) a nonspecific muscarinic antagonist, atropine ($10 \mu M$) or (B) a nonspecific nicotinic antagonist, mecamylamine ($10 \mu M$). Each reagent was present during the period indicated by bar.

サブタイプも発現していることが明らかとなった。これらの結果から、 β TC6細胞にニコチン性とムスカリン性の両方のレセプターが発現していることがわかり、この細胞株は β 細胞におけるインスリン放出過程における両レセプターの相互作用を調べるのに適した細胞モデルの1つであると考えられた。そこで、ムスカリン性レセプターに特異的なアゴニストである oxotremorine M、ニコチン性レセプターのアゴニストであるニコチン、両レセプターに結合し得るアセチルコリンのアナログであるカルバコールを用いて、 $[Ca^{2+}]_i$ とインスリン分泌に及ぼす作用を調べた。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇反応についてはカルバコールが最も強く、ついで oxotremorine M、ニコチンの順であった。また、カルバコールの効果は、アトロピンとメカミルアミンの両方によって阻害されたが [Fig. 3 (A)], oxotremorine M の効果はメカミルアミンによっては阻害されなかった [Fig. 3 (B)]。この阻害様式から、カルバコールは、ムスカリンとニコチン性の両レセプターを刺激することにより $[Ca^{2+}]_i$ の上昇作用を引き起こすことが示唆された。この作用はニコチンあるいは oxotremorine M 単独での作用より若干強いものであった。さらに、カルバコールと oxotremorine M の両方の効果が M_3 及び M_4 レセプターの選択的アンタゴニストや、PLC、ホスホリパーゼ A_2 (PLA₂) やプロテインキナーゼ C (PKC) の各種阻害剤によって抑制されたことから、PLC/IP₃ 経路やアラキドン酸代謝経路などが M_3 又は M_4 レセプター (あるいは両方のレセプター) 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇反応に関与している可能性が考えられた。一方、ニコチンの場合と同様に、インスリン分泌はカルバコール及び oxotremorine M の添加に

よって濃度依存的に増大したが、 $100 \mu\text{M}$ での分泌量は、カルバコール刺激の方が oxotremorine M 単独刺激に比べて少なかった。このことは、ムスカリン性レセプターを単独で刺激した場合よりも、ニコチン性及びムスカリン性の両レセプターを刺激した場合の方がインスリン分泌量が減少することを示している。したがって、両レセプターの刺激により生じる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇後のシグナル伝達の過程で、なんらかの負 (negative) の相互作用が起きている可能性が考えられた。これらの詳細なメカニズムは今後調べていきたいと考えている。

上述したニコチンの効果が β TC6 細胞だけに特有なものかどうかを明らかにするために、他の動物種の β 細胞株や初代培養膵島を用いた実験を行った。その結果、ラット由来の RINm5F 細胞、ハムスター由来の HIT-T15 細胞そしてマウス膵島いずれにおいて、ニコチン及び数種のニコチン性アゴニストを作用させても $[Ca^{2+}]_i$ に全く影響はみられなかった。また、マウスの膵島から total RNA を抽出して RT-PCR を行ったところ、ニコチン性レセプターのいずれのサブユニットも検出されなかった。したがって現時点では、上で述べたニコチンの作用は β TC6 細胞に特有のものであると考えられる。しかしながら、ラットやヒトから単離した膵島におけるインスリン分泌がニコチン添加によって抑制されるという報告がなされていることから、¹⁴⁾ マウス以外の動物の β 細胞にニコチン性レセプターが存在し、インスリン放出の調節に係わっている可能性が考えられる。また一方、 β TC6 細胞は、サルのがんウイルスの一種である SV40 ウイルスのラージ T 抗原遺伝子を導入することにより樹立された腫瘍 β 細胞株 (インスリノーマ) の一種であるので、¹⁵⁾ 正

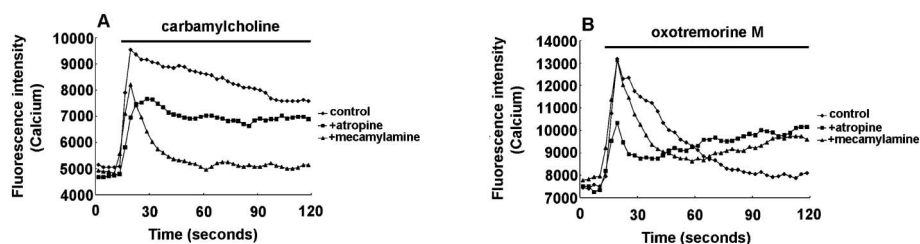


Fig. 3. Effect of Muscarinic and Nicotinic Antagonists on the Rise in $[Ca^{2+}]_i$ Induced by Carbamylcholine or Oxotremorine M in Beta-TC6 Cells

The temporal $[Ca^{2+}]_i$ response to carbamylcholine or oxotremorine M ($100 \mu\text{M}$) was measured in Hanks/HEPES buffer (pH 7.4) for 120 s in the absence (control) or presence of (A) a nonspecific muscarinic antagonist, atropine ($10 \mu\text{M}$) or (B) a nonspecific nicotinic antagonist, mecamylamine ($10 \mu\text{M}$). Each reagent was present during the period indicated by bar.

常な β 細胞が腫瘍化したことでニコチン性レセプターが発現し、インスリン分泌の調節に関与している可能性も考えられる。

4. 膵島でのインスリン分泌におけるプリン作動性レセプターの役割¹⁶⁾

ATP はエネルギー通貨とも呼ばれ、すべての細胞で生合成され、様々な代謝反応に用いられるエネルギー供給物質としてよく知られている。しかし近年、ATP やその関連ヌクレオチドが神経伝達物質やホルモンとともに細胞外へ放出され、autocrine や paracrine 様式により細胞膜に存在するプリン作動性 (P2) レセプターに結合して、種々の生理作用を発現することがわかってきた。¹⁷⁾ P2 レセプターは、イオンチャネル型の P2X と G タンパク連結型の P2Y レセプターに大別され、P2X は 7 種類 (P2X₁₋₇)、P2Y は 8 種類 (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) のサブタイプに分けられる。¹⁸⁾ P2 レセプターは、ほぼすべての動物細胞や組織に存在しており、神経系、免疫系や循環器系などでその働きが研究されて多くの興味ある知見が得られている。^{19,20)} しかし、本研究を開始した当時は、膵臓でのインスリン分泌に伴い顆粒中の ATP が細胞外に放出されることは知られていたが、²¹⁾ β 細胞における P2 レセプターサブタイプに関する知見は少なく、その機能と生理的意義はわかっていなかった。そこでわれわれは、まず、マウスから単離した膵島を用いて、数種の P2 レセプターのアゴニストの $[Ca^{2+}]_i$ とインスリン分泌に関する作用を調べてみた。その結果、ATP 及び P2Y_{1,12,13} レセプターの内因性アゴニストである ADP やその合成アゴニストである 2-methylthioADP (2-MeSADP)、そして P2Y₆ レセプターの選択的アゴニストである uridine 5'-diphosphate (UDP) 等が通常血中グルコース濃度 (5.5 mM) 下で $[Ca^{2+}]_i$ を一過性に上昇させることが明らかとなった。しかし一方、P2Y_{2,4} レセプターに親和性の高い uridine 5'-triphosphate (UTP) や P2X レセプターのアゴニストである α,β -methyleneATP は同様の効果を示さなかった。これらの実験結果から、P2Y_{1,6,12,13} レセプターが膵島で $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に係わっている可能性が示唆された。

細胞外の ATP は、細胞膜や血中に存在するヌクレオチド分解酵素によって、ADP や adenosine 5'-monophosphate (AMP) を経て、最終的にアデノ

シンに急速に分解されることが知られている。^{17,22)} またアデノシンについても細胞膜上にアデノシンレセプター (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) が存在するので、²⁰⁾ 添加した ATP や ADP がアデノシンに変換されて、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、アデノシンレセプターの非特異的な合成アゴニストである 5'-N-ethylcarboxamide adenosine (NECA) を用いて実験を行ったところ、 $[Ca^{2+}]_i$ に対しては全く効果を示さなかったため、上述の可能性は低いと考えられた。次に RT-PCR 解析を行った結果、P2Y₁ と P2Y₆ レセプターの mRNA の膵島での発現が明らかとなったので、これら 2 種のレセプターが膵島で機能していることが考えられた。また、他の組織や細胞において、これらレセプターが Gq タンパクと連結していることが報告されていたので、^{20,23)} われわれは PLC/IP₃ 経路の阻害剤を用いた実験を行い、これらレセプターの刺激に伴ってこの経路が活性化していることを示唆するデータを得た。以上の結果から、通常グルコース濃度 (5.5 mM) の存在下で、マウス膵島中の P2Y₁ 又は P2Y₆ レセプターが刺激されると PLC/IP₃ 経路が活性化されて、次に小胞体から細胞質への Ca²⁺ の流出が促進されることにより $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが明らかとなった (Fig. 4)。また、インスリン分泌について調べた結果、通常濃度のグルコース存在下では両レセプターの刺激による分泌量の上昇はごく限られたものであり、一方高濃度グルコース (16.7 mM) 存在下では、逆にインスリン分泌が抑制された。これらの結果は、ラット²⁴⁻²⁷⁾ やヒト²⁸⁾ の膵島では P2 レセプター刺激によってインスリン分泌が促進される現象とは異なったものであった。現在のところ動物種によってなぜこのような違いがみられるかの原因は明らかではない。また β TC6 細胞を用いて同様の実験を行ったところ、マウス膵島での結果とほぼ一致した結果が得られた。したがって、ニコチンの作用とは異なり、P2 レセプターに対する応答に関して β TC6 細胞は正常なマウス β 細胞の性質を保持していることが明らかとなった。なお、膵島での P2Y₁ レセプターの存在についてはこれまでにいくつかの報告がなされていたが、^{29,30)} P2Y₆ レセプターについては全くなく、新規の機能性レセプターであると考えられた。さらにほぼ同じ時期に、Parandeh らのグループが P2Y₆

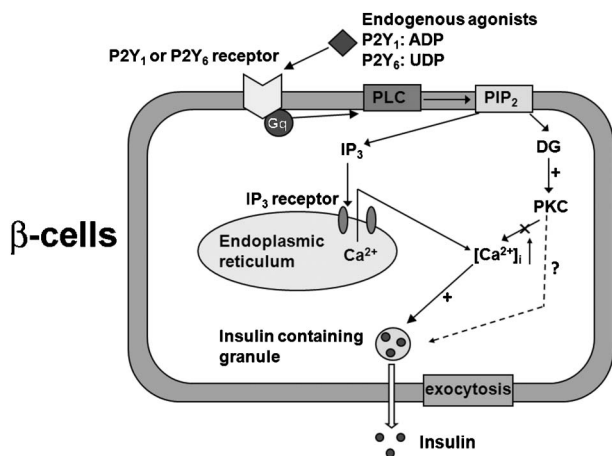


Fig. 4. Signaling Pathway Involved in Insulin Secretion through P2Y Receptor Activation in Mouse Pancreatic Islet β -cells

It is proposed that P2Y₁ or P2Y₆ receptor activation elicits insulin secretion *via* Ca²⁺ mobilization in the presence of 5.5 mM glucose. The processes in which the rise in [Ca²⁺]_i triggers exocytosis of insulin containing granules and diacylglycerol (DG) activates protein kinase C (PKC), which does not influence [Ca²⁺]_i (indicated by ×), are indicated by +. UDP: uridine 5'-diphosphate. Gq: Gq subclass of GTP-binding protein α subunit. PLC: phospholipase C. IP₃: inositol-1,4,5-triphosphate. PIP₂: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

レセプターのアゴニストが nM レベルでマウスの膵島のインスリン分泌を促進することを報告したことから,³¹⁾ このレセプターサブタイプは膵島でのインスリン分泌の調節に関与している可能性が考えられる。

5. 通常 β 細胞のモデル細胞としての β TC6 細胞の有用性と発現レセプターの特性の比較

正常 β 細胞のモデル系細胞として、非市販のマウス由来の MIN6 細胞とラット由来の INS-1 細胞がこれまで頻繁に使われてきた。この理由の1つとして、これらの細胞は市販の培養細胞 (RINm5F や HIT-T15 細胞なども含む) に比べてグルコースに反応して起こるインスリン分泌反応が正常 β 細胞の特性に近いことが挙げられる。つまり、細胞外のグルコース濃度を 5.5 mM から 20 mM に上げると分泌量が大幅に増大する。³²⁾ 一方、 β TC6 細胞では、グルコース濃度を 0 mM から 1.3 mM に上げるとインスリン分泌が急激に促進され、5.5 mM で最大値に達した。¹⁾ つまり、 β TC6 細胞は膵島 β 細胞に比べて、グルコース応答の閾値濃度が低いことがわかった。また、膵島における [Ca²⁺]_i はグルコース濃度の増加に反応して上昇するが、その反応は二相性である。第一相では一過性のピークがみられ、

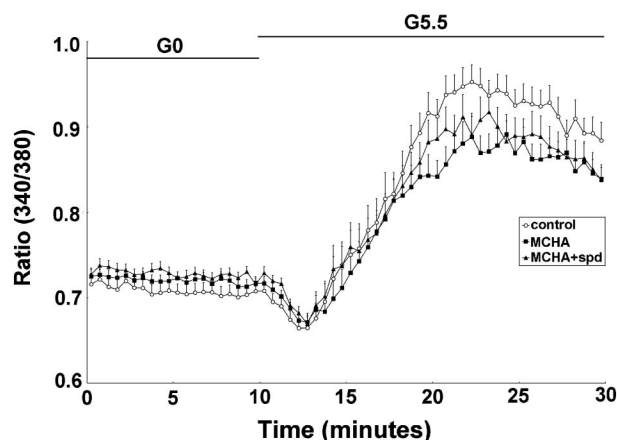


Fig. 5. Effect of Spermidine Synthesis Inhibitor MCHA on [Ca²⁺]_i in Beta-TC6 Cells

The cells were untreated (control) or treated with MCHA (250 μ M) alone or both MCHA and spermidine (25 μ M) for 3 days. The change in [Ca²⁺]_i was monitored for 30 min using excitation at 340 and 380 nm and emission at 510 nm wavelengths after cells were loaded with a Ca²⁺ indicator, fura-2 acetoxymethyl ester (1 μ M) in Krebs/HEPES buffer (pH 7.4) and then incubated for 10 min in the absence of glucose (0 mM, G0). Cells were then incubated in the buffer containing 5.5 mM glucose (G5.5) for 20 min as indicated by bar. Each value of the ratio (340/380 nm) measured at every 30 s represents the mean \pm S.E.M. ($n=40$). The figure was quoted from our recent publication³⁴⁾ and presented as an altered version.

これに引き続いてベースラインより高い [Ca²⁺]_i 値で上下に変動して持続するオシレーションパターンが観察される。⁸⁾ 一方 β TC6 細胞では、第一相のピークは明確でないが持続的な [Ca²⁺]_i の上昇が観察され、膵島と類似したグルコース応答がみられた (Fig. 5)。このように、 β TC6 細胞は膵島 β 細胞と比較して、インスリン分泌及び [Ca²⁺]_i の上昇反応に関してはいくつか異なる性質を有するが、グルコース濃度の上昇に反応して [Ca²⁺]_i が持続的に上昇し、インスリン分泌が促進されるという点に関しては、正常 β 細胞と似た特性を保持していることが明らかとなった。

上で述べたように、 β TC6 細胞ではニコチン性レセプター、ムスカリン性レセプター及びプリン作動性 (P2) レセプターが発現し、[Ca²⁺]_i やインスリン分泌の調節に関与していることが明らかとなった。一方、膵島と比較するといくつかの相違点が判明し、中でも最も大きな違いはニコチン性レセプターの遺伝子発現の有無である。これ以外のレセプターは膵島にも発現しており、リガンドのレセプターへの結合からインスリン分泌や [Ca²⁺]_i の上昇に至る応答については大きな違いはみられなかった。ムスカリン性レセプターに関しては、M₃ レセ

プターの mRNA は両方で発現しているが、これに加えてマウス膵島では M₁ レセプターが、⁶⁾ β TC6 細胞では M₄ レセプターが発現しており、遺伝子発現パターンに違いがみられた。現在、膵島における M₁ レセプターの機能についてはまだよくわかっていない。M₁ レセプターも Gq タンパク連結型レセプターであるので、M₃ レセプターと相互作用してその機能を調節したり、また β 細胞以外の α や δ 細胞などに存在して膵島でのホルモンの分泌に関与している可能性が考えられる。M₄ レセプターについては RINm5F 細胞でも発現しているの、³³⁾ 培養細胞に特有のレセプターである可能性が考えられる。また、 β TC6 細胞では M₄ レセプターが $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とインスリン分泌の過程に関与していることから、このレセプターの作用機構と M₃ レセプターとの相互作用メカニズムを調べるのに適したモデル系あると考えられる。

一方 P2 レセプターについては、 β TC6 細胞での P2Y_{1,2,4,6} レセプターの発現パターンは膵島と同じであった。また、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に関しても、アゴニストに対する反応性及びレセプター刺激によるシグナル伝達様式に違いがみられなかった。また、グルコースによってインスリン分泌が促進される条件下では、どちらの細胞系においても程度の違いはあるが P2 レセプター刺激によってインスリン分泌が抑制された。したがって、両細胞系における P2 レセプターの特性は非常に似ていることが明らかとなった。先に述べたように、 β TC6 細胞はグルコースに対する反応性が非生理的であるため、グルコース応答に関するメカニズムを調べる系としては適さないと思われる。しかしこの細胞では、発現しているレセプターの薬物に対する反応性を迅速かつ網羅的に調べることができるので、インスリン分泌に関して有用なモデル細胞であると考えられる。また、インスリン分泌の調節に関与しているレセプター間の相互作用を調べる研究にも適している。

6. β TC6 細胞におけるインスリンの生合成・分泌におけるポリアミンの作用³⁴⁾

プトレシン、スペルミジン、スペルミンはすべての細胞中に存在し、細胞の増殖や分化などにおいて必須の働きをするポリアミンと呼ばれる塩基性の生理活性物質である。³⁵⁾ 膵島 β 細胞におけるポリアミンの働きは、ポリアミンの生合成経路を触媒するい

くつかの酵素に対する阻害剤を用いて調べられてきた。^{36,37)} 特にポリアミン生合成の律速酵素である ornithine decarboxylase (ODC) の阻害剤である α -difluoromethylornithine (DFMO) は種々の細胞、組織や個体でのポリアミンの生理作用を明らかにする実験に用いられてきた。³⁸⁾ しかし、DFMO によってマウス膵島ではプトレシンとスペルミジンが、^{36,39)} また RINm5F 細胞ではプトレシン、スペルミジンそしてスペルミンのすべてが細胞中で減少することから、^{40,41)} 個々のポリアミンの役割が不明瞭であった。近年、城西大学薬学部の鮫島啓二郎教授（現武蔵野大学薬学部客員教授）のグループによって、スペルミジン合成酵素とスペルミン合成酵素の活性をそれぞれ特異的に阻害する *trans*-4-methylcyclohexylamine (MCHA) と *N*-(3-aminopropyl)cyclohexylamine (APCHA) の作用が明らかにされた。⁴²⁾ これらの阻害剤を用いた動物細胞、組織での研究は数例報告されていたが、⁴³⁻⁴⁹⁾ β 細胞における効果は調べられていなかった。そこでわれわれは、スペルミジン、スペルミンそれぞれの持つ機能を明らかにする目的で、 β TC6 細胞におけるインスリン分泌に及ぼすこれら阻害剤の影響を調べることとした。

最初に、MCHA と APCHA が β TC6 細胞の増殖や細胞ポリアミン量にどのような影響を及ぼすかを調べた結果、MCHA (250 μ M) 又は APCHA (100 μ M) で 3 日間処理することによって、細胞の増殖が抑えられることがわかった。しかし、4 日間培養しても最初に播いた細胞数は維持されていたので、どちらの阻害剤も細胞毒性は示さないと考えられた。また、これらの阻害剤で細胞を 2-4 日間処理すると、MCHA により細胞中のスペルミジン量が 50-90%、そして APCHA によりスペルミン量が 40-80% 減少することがわかった。これらの実験結果等から、2つの阻害剤はそれぞれ細胞中でのスペルミジンとスペルミン濃度を特異的に減少させることが確かめられた。しかし一方、MCHA 処理により細胞中のスペルミン量が、そして APCHA によりスペルミジン量がそれぞれ増加することがわかった。また、細胞中のスペルミジンとスペルミンの総量は変化しなかったため、細胞中のポリアミン量を一定に保つための補填機構が働き、その結果、それぞれもう一方のポリアミン量が増加したと推測され

た。また、MCHA 又は APCHA で 3 日間処理した細胞にスペルミジン又はスペルミンを培養液中に添加した場合、濃度依存的に細胞中のポリアミン量が増加した。

次にわれわれは、グルコース刺激によるインスリン分泌におけるスペルミジン及びスペルミンの役割を MCHA と APCHA の存在下で β TC6 細胞を培養して調べた。どちらの阻害剤によっても、2-4 日間の処理で細胞のインスリン分泌量が約 50% 減少することが観察された。次に、この減少が細胞中のポリアミン量の低下によるものかどうかを調べる目的で、MCHA とスペルミジン又は APCHA とスペルミンの共存下でそれぞれ 3 日間培養した細胞でのインスリン分泌量を調べた。その結果、MCHA とスペルミジンで同時に処理した細胞では、スペルミジンの濃度の増加に依存してインスリン分泌の減少が軽減した。また、スペルミジン (100 μ M) を単独で添加した場合は、未処理の細胞と比較してインスリン分泌が若干増加していた。これらの実験結果から、細胞中のスペルミジン量が減少するとインスリン分泌が低下することが明らかとなった。一方 APCHA の場合は、スペルミン添加による改善効果はほとんどみられず、またスペルミンを単独で添加してもインスリン分泌量の増加はみられなかったため、APCHA によるインスリン分泌の減少はスペルミン以外の副作用が原因であると考えられた。以上の結果から、スペルミジンがインスリン分泌の調節に重要であることが示唆された。

MCHA 処理によって β TC6 細胞でのインスリン分泌量が低下する原因として、2 つの可能性が考えられた。1 つは、細胞中のスペルミジン量が減少することによりインスリン遺伝子の転写 (transcription) や翻訳 (translation)、そして翻訳後プロセシングが低下するため、2 つ目は、グルコース刺激によるインスリン分泌に必要なシグナル伝達経路のどこかに障害が生じるため、という仮説である。まず、1 つ目の仮説を検証するために、インスリン遺伝子の発現量を半定量的 RT-PCR 法で調べたところ、MCHA で 3 日間処理した細胞と未処理の細胞との間での発現量に差はみられなかった。次に、細胞中のインスリンペプチド量を調べたところ、MCHA 処理によって約 50% 減少していることがわかった。しかし、スペルミジンと MCHA で同時に処理

した場合に MCHA の抑制効果が軽減された。また、スペルミジン (100 μ M) を単独で添加した場合には変化がみられなかった。したがって、インスリン mRNA の翻訳若しくは翻訳後修飾の過程にスペルミジンが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。2 つ目の仮説については、上で述べたように、グルコースによって刺激されるインスリン分泌の過程において $[Ca^{2+}]_i$ が重要なファクターの 1 つであることから、MCHA によるスペルミジン量の低下が及ぼす $[Ca^{2+}]_i$ への影響を調べた。Figure 5 に示した実験結果から、3 日間 MCHA で処理した細胞では、グルコースによる $[Ca^{2+}]_i$ の持続的な上昇が若干抑制され、またこの抑制がスペルミジンの同時添加によりある程度軽減することがわかった。一方 MCHA の影響は、高濃度の KCl (40 mM)、カルバコール、ニコチン等によるインスリン分泌の刺激の際に起こる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇についてはみられなかった。したがって、スペルミジンはグルコースによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に選択的に関与するなんらかの因子に影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかし、現時点ではその詳細については不明である。

以上の実験から、インスリン分泌の調節にスペルミジンが重要であることが明らかとなった。今後は、このスペルミジンの作用機序について調べ、膵島あるいは他の細胞株、また生体を用いてその生理的意義を明らかにしていきたいと考えている。

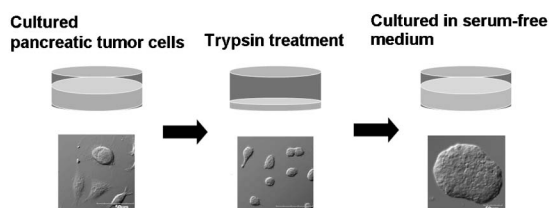
7. 膵臓がん細胞のグルカゴン産生細胞への分化誘導におけるアンチザイムの重要性⁵⁰⁾

糖尿病の新たな治療法として、膵島の再生医療が注目されこの分野での研究が近年盛んに行われているが、膵島細胞の増殖と分化調節機構についてはまだ不明な点が多い。膵島 α 細胞は、血糖値を上昇させる主要なホルモンの 1 つであるグルカゴン (29 アミノ酸残基) を生合成・分泌する。グルカゴンは、glucagon-like peptide 1/2 (GLP-1/2) のアミノ酸配列を含む前駆体タンパクであるプログルカゴンから prohormone convertase 2 (PC2) によりプロセシングを受けて α 細胞で生合成、分泌される。⁵¹⁾ また、消化管から分泌される GLP-1 は膵島の分化や成熟に重要な役割を果たしているだけでなく、インスリン分泌や β 細胞の増殖を促進する作用等を持っていることから、糖尿病治療薬の有望な候補物質と

して注目され、近年盛んに研究されてきた。⁵²⁾しかし、膵島 α 細胞の増殖及び機能的分化の調節機構はまだ解明されていない点が多い。近年、ヒト膵がん PANC-1 細胞をトリプシンで短時間処理した後、無血清培地で培養することにより、がん細胞が膵ホルモンを産生する膵島様細胞に変化することが報告されていた。^{53,54)} われわれは同様の現象を他のいくつかの膵がん細胞株でも見出し、膵島での細胞分化の調節機構を探るためのモデル系として研究を行った。

われわれの実験から、ヒト膵がん細胞株である AsPC-1 細胞は、短時間のトリプシン処理後 6 日間無血清培地での培養により膵島様の形態の細胞へと分化し、また分化した細胞が α 細胞に特異的なグルカゴンを産生することが明らかになった [Fig. 6 (A)]. グルカゴン産生については、RT-PCR 法によるグルカゴン遺伝子の発現の有無と、抗グルカゴン抗体を用いたフローサイトメトリー法及び蛍光免疫染色法で確認した。また同様の培養手法と条件によって、PANC-1 など 4 種類のヒト膵がん細胞株をインスリンとグルカゴンの両方のホルモンを産生する細胞へと分化誘導することができた [Fig. 6 (B)]. AsPC-1 細胞が膵島様細胞に分化する過程に

A Differentiation of pancreatic tumor cells



B

Pancreatic tumor cells	Formation	Insulin	Glucagon
AsPC-1	+	-	+
PANC-1	+	+	+
KP1	+	+	+
MIA paca2	+	+	+
KP59	+	+	+

Fig. 6. Induction of Differentiation of Human Pancreatic Tumor Cells into Endocrine-like, Hormone-producing Cells

(A) Five human pancreatic tumor cell lines, AsPC-1, PANC-1, KP1, MIA paca2 and KP59, grown in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) were briefly treated with trypsin and then cultured in chemically defined Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F10 medium (17.5 mM glucose, 1% bovine serum albumin) in the absence of FBS for 6 days. The cultured cells became differentiated and formed islet-like aggregates as shown. Scale bars: 50 μ m. (B) The list of human pancreatic tumor cells and their differentiation property to form islet-like aggregates and synthesize pancreatic hormones, insulin and glucagon.

において、グルカゴン遺伝子の発現に関与する Pax6 や PDX-1 などの転写因子や PC2, そして膵島様構造への形態変化及びその形成に必要な接着因子である E-カドヘリンなどの mRNA の発現が増加することも認められた。また分化誘導した AsPC-1 細胞は、通常の膵島 α 細胞と同様に、グルカゴンの産生量が低濃度グルコース存在下においては増加し、高濃度グルコースでは減少した。また膵島 α 細胞において、グルカゴン産生はインスリンの作用により低下するが、^{55,56)} 分化した AsPC-1 細胞におけるグルカゴンの産生もインスリンの作用により減少した。これらの結果より、分化誘導された AsPC-1 細胞は生体内の膵島 α 細胞に近い特性を有していることが示唆された。

次に、この細胞系を用いてグルカゴン産生細胞への分化誘導のメカニズムを明らかにするため、細胞内の制御分子の探索を行った。その結果、プロテアソームを介して ODC の分解を引き起こし、細胞内ポリアミン量を負に調節する機能を持つタンパク質であるアンチザイム 1^{57,58)} が分化誘導の過程で増加し、さらにその局在が核から細胞質へと変わることを見出した。次に AsPC-1 細胞の分化におけるアンチザイム 1 の必要性を調べるために、small interfering RNA (siRNA) を用いてアンチザイム 1 の発現を低下させ、分化誘導への影響を検討した。その結果、アンチザイム 1 の発現が減少した細胞では、分化誘導に伴う形態変化が不完全でグルカゴンは産生されず、また Pax6 や E-カドヘリンの発現も同時に低下していた。一方、アンチザイム 1 を過剰発現させた場合、グルカゴン産生が促進されることがわかった。また、siRNA を用いた同様の実験を他のインスリンを産生する PANC-1 等のがん細胞株を用いて行った結果、アンチザイム 1 の発現低下はインスリン産生に影響を及ぼさなかった。したがって、アンチザイム 1 は β 細胞の分化誘導には必要でないことが示唆された。

アンチザイム 1 が細胞中のポリアミン量を調節する機能を持つことから、分化誘導に伴う細胞中のポリアミン量の変化を調べた。その結果、分化誘導の過程でプトレシン量は減少するが、スペルミジンとスペルミン量は変化しないことがわかった。次に、細胞中のプトレシン量の低下と AsPC-1 細胞の分化との関係を調べるために、細胞外からプトレシンを

添加し細胞中の量を増加させた場合の細胞分化への影響を検討したところ、グルカゴン産生等の分化発現は影響を受けなかった。これらの実験結果から、アンチザイム 1 によるプトレシン量の減少は AsPC-1 細胞の分化に直接影響を及ぼしていないことが示唆された。以上の結果から、ヒト膵がん細胞のグルカゴン産生細胞への分化誘導にはアンチザイム 1 が必須であり、またその働きはプトレシン産生とは異なった標的機構を介して発現することが示唆された。

アンチザイムの生体における膵島分化での役割は明らかにされていないが、われわれは生体内の膵島におけるアンチザイムの発現の有無を調べ、アンチザイムが膵島 α 及び β 細胞に発現していることを見い出している。現在、このタンパク質が生体の膵島 α 細胞の機能発現において果たしている役割を明らかにし、さらにその作用機序の解明を行うための研究を計画中である。

8. おわりに

以上に述べた研究を通じてわれわれは、膵臓内分泌細胞の機能の調節に係わる新規の分子を見い出し、それらの働き的一端を解明することができた。これら分子が新規の糖尿病治療薬の開発のためのリード化合物となり得るかどうかについては、今後 P2Y₆ レセプター、スペルミジンやアンチザイム 1 などについて、初代培養膵島やマウス等の動物を用いて、生体内での各分子の機能を解明する研究を行う必要がある。またわれわれは、複数のヒト膵がん細胞株を一定の培養条件下でホルモン産生細胞へと分化誘導できることを見い出した。今後はこの研究をさらに発展させて、「分化誘導による膵がん細胞の正常化によるがんの治療法」の開発に役立つ知見を得るように努力していきたい。

謝辞 以上の研究を遂行するにあたって、NIH の故 John W. Daly 博士、Kenneth A. Jacobson 博士、Jürgen Wess 博士、Georgetown University の Kenneth J. Kellar 博士、Yingxian Xiao 博士をはじめ、武蔵野大学薬学部の鮫島啓二郎客員教授、村上安子客員教授（現慈恵医科大学客員教授）、湧永製薬の水野郁子研究員及び武蔵野大学薬学部遺伝子学研究室の学部生の方々に協力して頂いたことに心より感謝を申し上げたい。また、本研究は、科学研究

費補助金及び文部科学省の「ハイテクリサーチ整備事業 (MEXT-HAITEKU)」からの支援金により遂行されたものであり、ここに厚く御礼申し上げたい。

REFERENCES

- Ohtani M., Oka T., Badyuk M., Xiao Y., Kellar K. J., Daly J. W., *Mol. Pharmacol.*, **69**, 899–907 (2006).
- Gilon P., Henquin J. C., *Endocr. Rev.*, **22**, 565–604 (2001).
- Henquin J. C., Nenquin M., *FEBS Lett.*, **236**, 89–92 (1988).
- Karlson S., Ahrén B., *J. Auton. Pharmacol.*, **13**, 439–446 (1993).
- Boschero A. C., Szipak-Glasman M., Carneiro E. M., Bordin S., Paul I., Rojas E., Atwater I., *Am. J. Physiol.*, **268**, 336–342 (1995).
- Duttaroy A., Zimlik C. L., Gautam D., Cui Y., Mears D., Wess J., *Diabetes*, **53**, 1714–1720 (2004).
- Gautam D., Han S. J., Hamdan F. F., Jeon J., Li B., Li J. H., Cui Y., Mears D., Lu H., Deng C., Heard T., Wess J., *Cell Metab.*, **3**, 449–461 (2006).
- Kakei M., Dezaki K., Yada T., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **124**, 345–352 (2004).
- Daly J. W., *Cell Mol. Neurobiol.*, **25**, 513–552 (2005).
- Jensen A. A., Frølund B., Liljefors T., Krogsgaard-Larsen P., *J. Med. Chem.*, **48**, 4705–4745 (2005).
- Parker M. J., Beck A., Luetje C. W., *Mol. Pharmacol.*, **54**, 1132–1139 (1998).
- Xiao Y., Kellar K. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 98–107 (2004).
- Ohtani M., Daly J. W., Oka T., *Eur. J. Pharmacol.*, **604**, 150–157 (2009).
- Yoshikawa H., Hellström-Lindahl E., Grill V., *Metabolism*, **54**, 247–254 (2005).
- Poitout V., Stout L. E., Armstrong M. B., Walseth T. F., Sorenson R. L., Robertson R. P., *Diabetes*, **44**, 306–313 (1995).
- Ohtani M., Suzuki J., Jacobson K. A., Oka T., *Purinergic Signal.*, **4**, 365–375 (2008).
- Burnstock G., *Br. J. Pharmacol.*, **147**, 172–181 (2006).
- Lazarowski E. R., Boucher R. C., Harden T. K., *Mol. Pharmacol.*, **64**, 785–795 (2003).

- 19) Burnstock G., Knight G. E., *Int. Rev. Cytol.*, **240**, 31–304 (2004).
- 20) Relavic V., Burnstock G., *Pharmacol. Rev.*, **50**, 413–492 (1998).
- 21) Obermüller S., Lindqvist A., Karanauskaite J., Galvanovskis J., Rorsman P., Barg S., *J. Cell Sci.*, **118**, 4271–4282 (2005).
- 22) Franke H., Illes P., *Pharmacol. Ther.*, **109**, 297–324 (2006).
- 23) Jacobson K. A., Jarvis M. F., Williams M., *J. Med. Chem.*, **45**, 4057–4093 (2002).
- 24) Blachier F., Malaisse W. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **970**, 222–229 (1988).
- 25) Petit P., Hillarie-Buys D., Manteghetti M., Debrus S., Chapal J., Loubatières-Mariani M. M., *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 1368–1374 (1998).
- 26) Chevassus H., Roig A., Belloc C., Lajoix A. D., Broca C., Manteghetti M., Petit P., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **366**, 464–469 (2002).
- 27) Farret A., Vignaud M., Dietz S., Vignon J., Petit P., Gross R., *Diabetes*, **53**, S63–S66 (2004).
- 28) Fernandez-Alvarez J., Hillarie-Buys D., Loubatières-Miriani M. M., Gomis R., Petit P., *Pancreas*, **22**, 69–71 (2001).
- 29) Poulsen C. R., Bokvist K., Olsen H. L., Høy M., Capito K., Gilon P., *Diabetes*, **48**, 2171–2181 (1999).
- 30) Léon C., Freund M., Latchoumanin O., Farret A., Petit P., Cazenave J.-P., Gachet C., *Purinergic Signal.*, **1**, 145–151 (2005).
- 31) Parandeh F., Abaraviciene S. M., Amisten S., Erlinge D., Salehi A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **370**, 499–503 (2008).
- 32) Buchanan C. M., Phillips A. R., Cooper G. J., *Biochem. J.*, **360**, 431–439 (2001).
- 33) Tang S. H., Sharp G. W., *Diabetes*, **46**, 1419–1423 (1997).
- 34) Ohtani M., Mizuno I., Kojima Y., Ishikawa Y., Sodeno M., Asakura Y., Samejima K., Oka T., *Cell Struct. Funct.*, **34**, 105–113 (2009).
- 35) Thomas T., Thomas T. J., *J. Cell. Mol. Med.*, **7**, 113–126 (2003).
- 36) Welsh N., Sjöholm A., *Biochem. J.*, **252**, 701–707 (1988).
- 37) Sjöholm A., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **270**, C1105–C1110 (1996).
- 38) Marton L. J., Pegg A. E., *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.*, **35**, 55–91 (1995).
- 39) Welsh N., *Biochem. J.*, **271**, 393–397 (1990).
- 40) Sjöholm A., Welsh N., Hoftiezer V., Bankston P. W., Hellerström C., *Biochem. J.*, **277**, 533–540 (1991).
- 41) Sjöholm A., Arkhammar P., Welsh N., Bokvist K., Rorsman P., Hallberg A., Nilsson T., Welsh M., Berggren P. O., *J. Clin. Invest.*, **92**, 1910–1917 (1993).
- 42) Shirahata A., Morohoshi T., Fukai M., Akatsu S., Samejima K., *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 205–212 (1991).
- 43) Shirahata A., Takahashi N., Beppu T., Hosoda H., Samejima K., *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1897–1903 (1993).
- 44) Chu P. J., Shirahata A., Samejima K., Saito H., Abe K., *Eur. J. Pharmacol.*, **256**, 155–160 (1994).
- 45) Beppu T., Shirahata A., Takahashi N., Hosoda H., Samejima K., *J. Biochem.*, **117**, 339–345 (1995).
- 46) Chu P. J., Shirahata A., Samejima K., Saito H., Abe K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **69**, 311–315 (1995).
- 47) Haider N., Eschbach M. L., Dias Sde S., Gilberger T. W., Walter R. D., Lüersen K., *Mol. Biochem. Parasitol.*, **142**, 224–236 (2005).
- 48) Nishimura K., Murozumi K., Shirahata A., Park M. H., Kashiwagi K., Igarashi K., *Biochem. J.*, **385**, 779–785 (2005).
- 49) Kobayashi M., Takao K., Shiota Y., Sugita Y., Takahashi M., Nakae D., Samejima K., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 863–867 (2006).
- 50) Suzuki J., Murakami Y., Samejima K., Kohda K., Ohtani M., Oka T., *Endocr. Relat. Cancer*, **16**, 649–659 (2009).
- 51) Vincent M., Guz Y., Rozenberg M., Webb G., Furuta M., Steiner D., Teitelman G., *Endocrinology*, **144**, 4061–4069 (2003).
- 52) Winzell M. S., Ahrén B., *Pharmacol. Ther.*, **116**, 437–448 (2007).
- 53) Hardikar A. A., Marcus-Samuels B., Geras-Raaka E., Raaka B. M., Gershengorn M. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 7117–7122 (2003).
- 54) Gershengorn M. C., Hardikar A. A., Wei C., Geras-Raaka E., Marcus-Samuels B., Raaka

-
- B. M., *Science*, **306**, 2261–2264 (2004).
- 55) Maruyama H., Hisatomi A., Orci L., Grodsky G., Unger R., *J. Clin. Invest.*, **74**, 2296–2299 (1984).
- 56) Philippe J., *J. Clin. Invest.*, **84**, 672–677 (1989).
- 57) Hayashi S., Murakami Y., Matsufuji S., *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 27–30 (1996).
- 58) Coffino P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 188–194 (2001).