

博 士 論 文

モノアミン受容体阻害による膵 β 細胞からの
インスリン分泌抑制機序に関する研究

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

病院薬剤学研究室

平成 28 年度入学 長田 麻央

主指導教員 松尾 裕彰

目次

序論	1
本論	
1. ハムスター由来膵β細胞株 (HIT-T15) 細胞における各モノアミン受容体の発現解析	7
2. HIT-T15 細胞を用いたインスリン分泌変動の評価	10
3. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におよぼすオランザピンの影響	11
4. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におよぼすオランザピン 30 日間曝露の影響	13
5. HIT-T15 細胞におけるオランザピンによる細胞毒性の確認	15
6. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるドパミン受容体の関与	16
7. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるセロトニン受容体の関与	22
8. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるヒスタミン受容体の関与	27
9. HIT-T15 細胞における各モノアミン受容体関連薬による細胞毒性の確認	31
結論	33
謝辞	34
実験方法	35
論文目録	42
参考文献	43

略号一覽

AC	: adenylyate cyclase
ADP	: adenosine diphosphate
ANOVA	: analysis of variance
ATP	: adenosine triphosphate
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
BSA	: bovine serum albumin
DAG	: diacylglycerol
DNA	: deoxyribonucleic acid
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DPA	: dopamine partial agonist
DTP	: guanosine triphosphate
EC ₅₀	: half maximal effective concentration
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: enzyme-linked immuno sorbent assay
Epac2	: exchange protein directly activated by cAMP 2
ER	: endoplasmic reticulum
FBS	: fetal bovine serum
GDP	: guanosine diphosphate
GIP	: gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	: glucagon-like peptide-1
GLU	: glucose
GLUT	: glucose transporter
G6P	: glucose-6-phosphate
Ham's F12K	: Nutrient Mixture F-12 Ham Kaighn's modification
HBSS	: Hank's balanced salts
HRP	: horseradish peroxidase
IP ₃	: inositol trisphosphate
Kir	: inward-rectifier potassium channel
LMW	: low molecular weight
MARTA	: multi-acting receptor targeted antipsychotics
mRNA	: messenger ribonucleic acid
NMDA	: N-methyl-D-aspartate
PBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
PC	: prohormone convertase
PCR	: polymerase chain reaction
2-PEA	: 2-pyridylethylamine
PIP ₂	: phosphatidylinositol biphosphate
PKA	: protein kinase A
PKC	: protein kinase C
PLC	: phospholipase C
PMS	: N-methyl dibenzopyrazine methylsulfate
PNGase	: peptide-N-glycosidase
PVDF	: polyvinylidene difluoride
SD	: standard deviation
SDA	: serotonin-dopamine antagonist

SDS-PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
SNAP25 : synaptosomal nerve-associated protein 25
SUR : sulfonylurea receptor
TAE : Tris-acetate-EDTA
TBS : Tris buffered saline
UV : ultraviolet
VDCC : voltage-dependent Ca²⁺ channel
XTT : sodium 3'-[1(-phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate

序論

統合失調症は 10～30 代の青年期に好発する内因性精神疾患の一種である。McGrath らの調査によると、統合失調症の生涯罹患率は 0.7%と報告されている (1)。また、厚生労働省による 2017 年の患者調査では、統合失調症により医療機関を受診している患者の数は 79.2 万人に相当すると推測されている (2)。統合失調症の病態は明らかにされていないところも多いが、これまでに、統合失調症の治療に用いられる抗精神病薬の臨床用量とドパミン D_2 受容体の遮断作用に対する力価の相関性が高いことや (3)、ドパミン受容体刺激薬であるアンフェタミンやメタンフェタミンの中毒者が統合失調症様の症状を呈し、その症状は抗精神病薬の投与によって抑制されることなどが報告されている (4, 5)。また、Laruelle らは、統合失調症患者は健常者と比較してドパミンの放出量が約 2 倍に増加していることを実証している (6)。これらの報告から、現在では「ドパミン仮説」が統合失調症の病態を説明する最も有力な説と考えられている。「ドパミン仮説」は、脳幹部に存在するドパミン系神経の神経核から脳の各部位に投射するドパミン経路における伝達障害が統合失調症の症状を惹起することを提唱した説である。例えば、中脳腹側被蓋野から辺縁系の側坐核に至るドパミン経路 (中脳辺縁系) における D_2 受容体の過剰な刺激亢進は、妄想や幻覚などの陽性症状を惹起するのに対し、中脳腹側被蓋野から前頭葉皮質に至るドパミン経路 (中脳皮質系) における D_1 受容体の刺激抑制は、意欲の低下や感情の鈍麻、無為などの陰性症状や認知機能障害を惹起する要因と考えられている。ドパミン仮説に加えて、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体の非競合的拮抗薬であるフェンシクリジンやケタミンの中毒者が統合失調症様の症状を呈することや (7)、グルタミン酸が NMDA 受容体に結合することから、ドパミンに依存しない神経伝達の調節不全によって統合失調症の症状が発症することを提唱した「グルタミン酸伝達低下仮説」(8) や「NMDA 受容体機能低下仮説」(9) も統合失調症の病態を説明する説と考えられている。

統合失調症の治療は、抗精神病薬を用いた薬物療法が中心となる。最も古い抗精神病薬であるクロルプロマジンが 1951 年に合成され、翌 1952 年にはインド蛇木 (*Rauwolfia serpentina*) よりレセルピンがアルカロイドとして抽出されている (10)。その後、クロルプロマジンを含むフェノチアジン誘導体はドパミン D_2 受容体に対する遮断作用、レセルピンはドパミンやノルアドレナリンなどのモノアミンをシナプス小胞内で枯渇させる作用を示すことが明らかになった。クロルプロマジンやレセルピンが開発されて以降、ブチロフェノン誘導体であるハロペリドールなど強力な D_2 受容体遮断作用を有する定型抗精神病薬が多く開発され、臨床現場で使用されるに至った (Table 1) (11-13)。定型抗精神病薬の強力な D_2 受容体遮断作用は、統合失調症の陽性症状に対して良好な改善効果をもたらすのに対して、陰性症状や認知機能障害に対する改善効果は低い。また、定型抗精神病薬は黒質線条体系や漏斗下垂体系など統合失調症の症状と関連が低いドパミン経路の機能も強く抑制することで、錐体外路症状や高プロラクチン血症などの副作用を惹起する

ことから忍容性が低いことが問題として挙げられる。これらの問題を解決するきっかけとなったのは、1958年のクロザピンの合成であった。クロザピンは定型抗精神病薬の欠点であった錐体外路症状の予防と陰性症状・認知機能障害などの症状に対する改善作用をある程度克服した薬剤である。その後の薬理学的研究により、クロザピンは D_2 受容体の遮断作用に加えて、セロトニン $5-HT_{2A}$ 受容体に対する遮断作用を有していることが明らかとなった。この発見をもとに、定型抗精神病薬と同等以上の陽性症状改善作用を維持し、錐体外路症状の予防と陰性症状・認知機能障害に対する改善作用を有する薬剤の開発が行われ、1984年にセロトニン・ドパミン遮断薬 (SDA) であるリスペリドンが合成された。その後、ドパミンやセロトニンの受容体遮断作用に加えて、ヒスタミンやアドレナリンなどのモノアミン受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体に対する遮断作用を付与した多元受容体標的抗精神病薬 (MARTA) やドパミン受容体部分作動薬 (DPA) などの非定型抗精神病薬が開発され、現在では統合失調症の第一選択薬として使用されている (Table 1)。

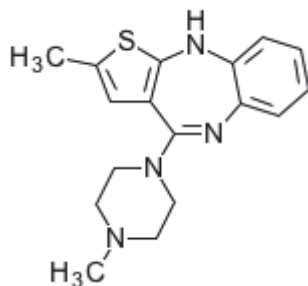


Fig. 1. Structure of olanzapine.

オランザピン (Fig. 1) は MARTA の一つであり、モノアミン受容体やムスカリン性アセチルコリン受容体を遮断することで陽性症状と陰性症状、認知障害の改善効果を示す (Table 2)。2013年に行われた処方解析調査で、オランザピンは日本とカナダで最も使用されている非定型抗精神病薬であると報告されている (14-16)。一方、オランザピンの投与はしばしば高血糖に起因する重篤な糖尿病性ケトアシドーシスを惹起することが報告されている (17)。本邦では、オランザピンを服用した 3753 例中 8 例で糖尿病性ケトアシドーシスが惹起され、そのうち 2 例の患者が死亡したことが報告されている。この事態を受けて、厚生労働省は 2002 年にオランザピンの投与による重篤な高血糖のリスクに関する緊急安全性情報を発表している (18)。抗精神病薬の使用による血糖値異常の発症については、糖尿病の既往歴を有する患者を中心に定型、非定型に関係なく報告されている (17, 19-22)。しかしながら、クエチアピンやオランザピンなどの MARTA は他の抗精神病薬よりも血糖値異常の発症頻度が高い (23)。オランザピンによる高血糖の発症機序は未だ明らかでない。過去の研究で、オランザピンの反復投与が食欲の亢進や体重増加、肥満を引き起こし、インスリン抵抗性を増加させることで 2 型糖尿病を惹起することが示唆されている (24-28)。実際、死亡例を含む重篤な高血糖症状を呈した患者の背景には肥満や症状の発現直前の過食、糖

Table 1. Classification of antipsychotic agents.

typical antipsychotic agent	atypical antipsychotic agent
phenothiazine derivatives	serotonin-dopamine antagonists (SDA)
Chlorpromazine	Risperidone
Levomepromazine	Perospirone
Perphenazine	Blonanserin
Fluphenazine	multi-acting receptor targeted antipsychotics (MARTA)
Prochlorperazine	Clozapine
Trifluoperazine	Quetiapine
Propericiazine	Olanzapine
butyrophenone derivatives	Asenapine
Haloperidol	dopamine partial agonist
Siperone	Aripiprazole
diphenylbutylpiperadine derivatives	
Pimozide	
benz amide derivatives	
Sulpiride	
Tiapride	
Nemonapride	
iminodibenzyl derivatives	
Carpipramine	
Clocapramine	
Mosapramine	
thiepine derivatives	
Zotepine	

分の多い清涼飲料水の大量摂取が報告されており、過剰な糖の摂取によりインスリンの作用や分泌の低下が惹起されたと推測されている。オランザピンによる食欲の亢進や体重の増加の発症機序については、脳内の満腹中枢で生理的な食欲の抑制調節に関与するヒスタミン H₁ 受容体をオランザピンが遮断することに由来すると考えられている (29)。しかしながら、オランザピンにより

Table 2. Ki values of olanzapine against monoamine and acetylcholine muscarinic receptors (30).

receptor	Ki (nM)	receptor	Ki (nM)
D ₁	31	5-HT ₆	2.5
D ₂	11	5-HT ₇	104
D ₃	16	M ₁	1.9
D ₄	26	M ₂	18
D ₅	51	M ₃	25
5-HT _{1A}	>1000	M ₄	13
5-HT _{1B}	1355	M ₅	6
5-HT _{1D}	800	α ₁	19
5-HT _{2A}	2.5	α ₂	230
5-HT _{2B}	11.8	β	>10000
5-HT _{2C}	28.6	H ₁	7
5-HT ₃	57	GABA _A	>10000
5-HT ₄	>1000	Benzodiazepine	>10000

惹起される高血糖には体重の増加を伴わない症例報告もあることから (31-33)、高血糖の惹起には H₁ 受容体の遮断作用による食欲亢進以外の機序も関与することが示唆されている。例えば、Ozasa らはオランザピンの曝露がインスリンの分泌を担う膵臓 β 細胞のアポトーシスを誘導することを報告している (34)。他にも、オランザピンの処置により肝臓でのグルコース産生が亢進されることや (35, 36)、末梢でのグルコーストランスポーターを介した細胞内への糖取り込みが阻害されること (37, 38)、アドレナリンの分泌亢進を介した高血糖の誘発などが報告されている (39)。

ヒトインスリンは、21 個のアミノ酸からなるペプチド A 鎖と 30 個のアミノ酸からなるペプチド B 鎖が二つの S-S 結合で連結したホルモンである (Fig. 2)。膵 β 細胞において、インスリンのもととなる 110 個のアミノ酸からなるプレプロインスリンは 24 個のアミノ酸からなるシグナルペ

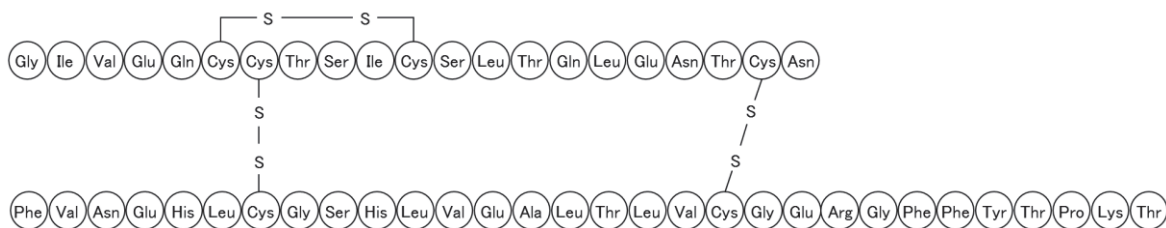


Fig. 2. Structure of human insulin.

プチドが切断され、フォールディングを受けることでプロインスリンになる。プロインスリンはさらにプロホルモン変換酵素 (PC2 および PC3) (40, 41) とカルボキシペプチダーゼ H (42) の活性によりプロセッシングを受けて、インスリンと C ペプチドとなり、ともに分泌顆粒中に貯蔵される。グルコース存在下におけるインスリン分泌のメカニズムについては Fig. 3 のような経路が考えられている。すなわち、血中のグルコースが上昇すると、グルコース輸送担体 (GLUT) を介した促進拡散により β 細胞内にグルコースが取り込まれる (43-45)。取り込まれたグルコースは、解糖系の律速酵素であるグルコキナーゼによりグルコース 6-リン酸 (G6P) に代謝される (46)。生成した G6P は解糖系でさらに代謝されるが、この過程において ATP が産生され、細胞内 ATP/ADP 比が上昇することで ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネルが閉口し、細胞膜が脱分極する。 K_{ATP} チャンネル閉口による細胞膜の脱分極により膜電位が L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel, L-type VDCC) の閾膜電位まで達すると L-type VDCC が活性化され、細胞外の Ca^{2+} が流入する。その後、小胞体からの Ca^{2+} 放出が続き、 Ca^{2+} 濃度の上昇によりインスリン分泌顆粒は細胞膜へトランスロケートし、インスリンはエキソサイトーシスにより開口分泌される (47)。

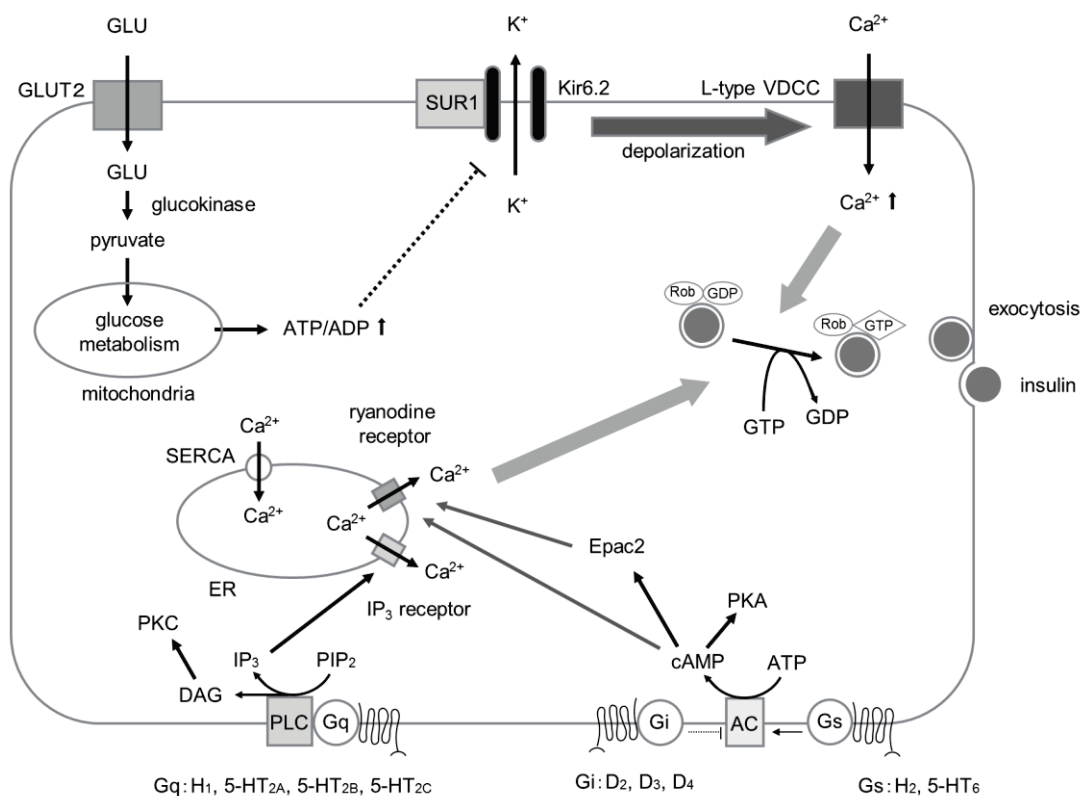


Fig. 3. Mechanism of physiological insulin secretion from pancreatic β -cell.

アドレナリンやアセチルコリンなどの神経伝達物質、グルカゴン様ペプチド (GLP-1) などのインクレチンはカルシウムシグナルを介したインスリン分泌を亢進させることが知られている (48)。例えば、アドレナリンやノルアドレナリンは膵 β 細胞のアドレナリン α_2 受容体を刺激することでインスリン分泌を抑制し (49, 50)、 β_2 受容体を刺激することで分泌を促進する (51)。また、アセチルコリンはムスカリン性アセチルコリン M_3 受容体を刺激することでインスリン分泌を亢進する (52)。さらに、GLP-1 や消化管抑制ペプチド (GIP) はグルコース刺激下で各受容体を刺激することによりインスリンの分泌を促進する (53, 54)。これらの報告は、膵 β 細胞からのインスリン分泌の調節に膵 β 細胞に発現するモノアミンやアセチルコリン、インクレチンなどの受容体が直接関与することを示唆するものである。オランザピンは種々のモノアミン受容体に対して拮抗作用を示すことから、オランザピンが膵 β 細胞におけるモノアミン受容体の遮断作用を介することでインスリン分泌を抑制し、高血糖症状を惹起する可能性が推察される。しかしながら、膵 β 細胞からのインスリン分泌におけるアドレナリン受容体以外のモノアミン受容体の関与については明らかでない。本研究では、ハムスター由来膵 β 細胞株である HIT-T15 細胞を用いて、膵 β 細胞からのインスリン分泌におけるドパミン、セロトニンおよびヒスタミン受容体の関与を解明することを目的とした。

本論

1. ハムスター由来膵 β 細胞株 (HIT-T15) 細胞における各モノアミン受容体の発現解析

1-1. 目的

本研究で使用した HIT-T15 細胞は、Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) の膵ランゲルハンス島細胞を simian virus 40 でトランスフォームすることにより樹立したインスリノーマ細胞株である (55)。HIT 細胞にはいくつかのサブクローンが存在するが、その中でも HIT-T15 細胞はインスリン含有量が多く、グルコース濃度依存的なインスリン分泌作用だけでなく、グルカゴンやスルホニル尿素薬によるインスリン分泌の亢進やソマトスタチンによる分泌の抑制が報告されている (56-58)。また、正常の膵島と同様に HIT-T15 細胞内の cAMP 濃度と細胞外の K^+ 濃度の増加はインスリンの分泌を亢進する (56)。このような理由から、HIT-T15 細胞は多くのインスリン分泌実験に用いられている。

膵島や膵 β 細胞におけるモノアミン受容体の発現については、いくつかの報告がある。例えば、ラット膵島にドパミン D_2 , D_3 および D_4 受容体が発現していること (59-61)、マウス膵島に D_2 , D_3 受容体 (61) およびセロトニン 5-HT_{2C} 受容体が発現していること (62)、ラット由来膵 β 細胞株である INS-1 細胞に D_2 , D_3 受容体 (59, 63) および 5-HT_{2B} 受容体が発現していること (64)、マウス由来膵 β 細胞株である MIN6 細胞に D_2 受容体 (61)、5-HT_{2B} 受容体が発現していること (65) が報告されている。一方、本研究で使用した HIT-T15 細胞においては、これらのモノアミン受容体の発現に関する報告はない。そこで、オランザピンの主要な作用部位であるモノアミン受容体の mRNA 発現が HIT-T15 細胞で確認できるか否かを RT-PCR 法で確認した。さらに、特異的な抗体が入手できたドパミン D_2 およびセロトニン 5-HT_{2A} 受容体に関しては、タンパク質の発現を western blot 法で解析した。

1-2. 結果

各モノアミン受容体に対する特異的なプライマーを設計し、RT-PCR で cDNA を増幅した後、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。その結果、 D_2 受容体およびヒスタミン H_1 受容体について目的長のバンドが検出されたが、その他の受容体の発現は確認できなかった。そこで、発現が確認できなかった D_3 , D_4 受容体や 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} および 5-HT₆ 受容体、 H_2 受容体に対して 2段階 PCR を行った。その結果、全ての受容体について mRNA の発現が確認できた (Fig. 4)。さらに、 D_2 および 5-HT_{2A} 受容体タンパク質の発現を western blot 法で解析した結果、ペプチド-N-グルコシダーゼ (PNGase) 処理後のホモジネート中でそれぞれの受容体の分子量に相当する約 60 kDa および約 48 kDa にバンドが確認できた (Fig. 5)。

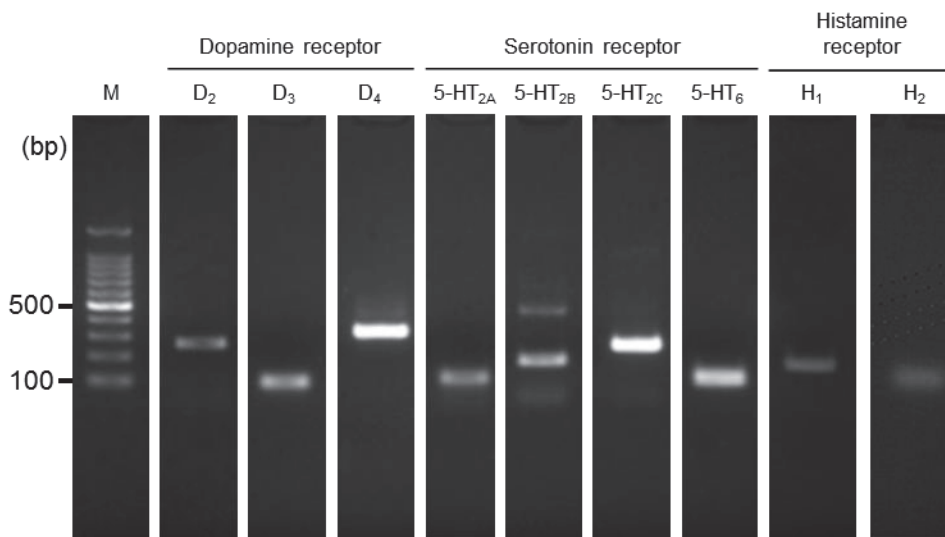


Fig. 4. mRNA expression of dopamine (D_2 , D_3 and D_4), serotonin (5-HT_{2A} , 5-HT_{2B} , 5-HT_{2C} and 5-HT_6) and histamine (H_1 and H_2) receptors in HIT-T15 cells. Total RNA extracted from HIT-T15 cells was reverse-transcribed, and first-strand cDNA was synthesized. Target genes were amplified with a set of specific primers (shown in Table 5). For expression analysis of dopamine D_3 and D_4 , all serotonin, and histamine H_2 receptors, two-step PCR was performed using nested primers (shown in Table 5). PCR products were separated by electrophoresis using a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. M, 100-bp ladder size marker.

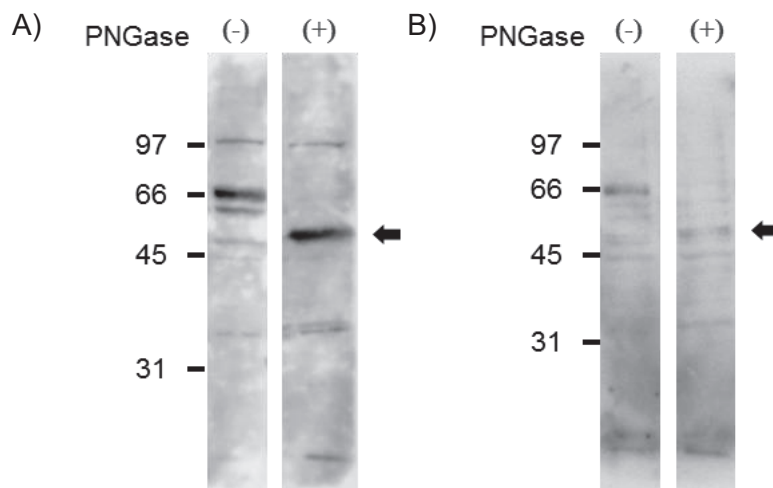


Fig. 5. Western blot analysis of dopamine D_2 (A) and serotonin 5-HT_{2A} (B) receptor proteins in HIT-T15 cells. Proteins from HIT-T-15 cells were treated with a solution containing PNGase or without PNGase. Arrows represent the bands of D_2 and 5-HT_{2A} receptors.

1-3. 考察

本研究で、HIT-T15 細胞にはドパミン D₂, D₃, D₄ 受容体やセロトニン 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ 受容体、ヒスタミン H₁ および H₂ 受容体 mRNA の発現が確認された (Fig. 4)。また、D₂ および 5-HT_{2A} 受容体についてはタンパク質の発現も確認できた (Fig. 5)。ヒト膵臓におけるこれらのモノアミン受容体の発現についてはいくつかの報告がある。Rubí らはヒト膵島に D₂ や D₄ 受容体の mRNA が発現していることを報告している (59)。また、Bonhaus らはヒト膵臓に 5-HT_{2A} や 5-HT_{2B}、5-HT_{2C} 受容体の mRNA が発現していることを報告している (66)。一方、ヒト膵臓におけるヒスタミン受容体の発現については報告がないが、Szukiewicz らはヒト羊膜上皮細胞をニコチンアミドで処置することで膵 β 細胞様に分化させた細胞に H₁ や H₂ 受容体タンパク質が発現していると報告している (67)。これらの報告から、HIT-T15 細胞で認められたインスリン分泌におけるモノアミン受容体の関与はヒト膵臓においても同様に観察されると推察される。

2. HIT-T15 細胞を用いたインスリン分泌変動の評価

2-1. 目的

これまでの研究により、Nutrient Mixture F-12 Ham Kaighn's modification (Ham's F12K) で培養した HIT-T15 細胞からのインスリン分泌量は、培地中に 10 mM のグルコースを添加したときに最大値を示すことが明らかになっている (55)。しかし、10 mM グルコース共存化での薬剤の影響を確認した例がないことから、本実験では HIT-T15 細胞を用いたインスリン分泌評価系での妥当性を確認するため、Ham's F12K 培地 に 10 mM グルコースを添加した条件下で臨床で使用される糖尿病治療薬であるトルブタミドが HIT-T15 細胞からのインスリン分泌をどの程度変化させるかを解析した。

2-2. 結果

Ham's F12K 培地中にトルブタミドを添加した結果、インスリン分泌はコントロールの約 1.5 倍程度まで増加した (Fig. 6)。

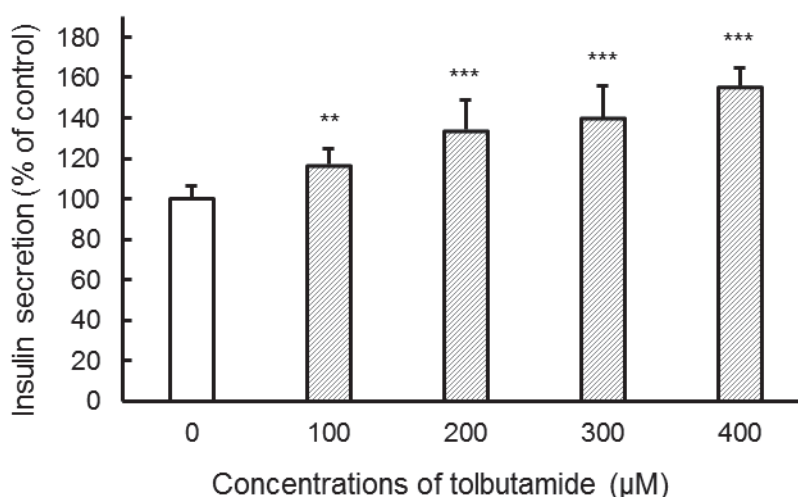


Fig. 6. Effect of tolbutamide on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control) or tolbutamide for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of four to eight trials. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ with respect to control.

2-3. 考察

トルブタミドを曝露することによりインスリン分泌が増加することから、10 mM グルコース存在下で HIT-T15 細胞からのインスリン分泌の変動を評価できることが確認できた。

3. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におよぼすオランザピンの影響

3-1. 目的

ICR マウスや C57BL6 マウスにオランザピン (5 mg/kg) を単回投与した場合、血中のインスリン濃度は非投与群と同程度であったが血糖値は約 2 倍に上昇したことが報告されている (68, 69)。また、ラットにオランザピンを 2.5~10 mg/kg 単回投与した場合、血中のインスリン濃度は約 6 倍に上昇したことが報告されている (39, 70)。一方、ラットにおいてオランザピン 3 mg/kg の投与 90 分後にグルコース負荷試験を行うとインスリン分泌は著しく低下したことも報告されている (71)。*In vitro* 実験では食後の血糖値に相当する 16.7 mM グルコース存在下で INS-1 細胞に 10 μ M のオランザピンを添加した場合、インスリン分泌量は有意に増加したと報告されている (72)。これらの矛盾した結果を説明する一因として、オランザピンの投与量や濃度が臨床投与量や臨床血中濃度 (64~160 nM) よりも高いことなどが考えられる (73)。本実験では、HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におよぼすオランザピンの濃度依存的な影響を解析した。

3-2. 結果

オランザピンを 1~1000 nM の濃度で培地中に添加した場合、インスリン分泌量はコントロールの約 20% 有意な低下を示した (Fig. 7A)。前述のように、オランザピンの臨床血中濃度は 64~160 nM と報告されていることから (73)、臨床血中濃度に相当するオランザピンは膵 β 細胞からのインスリン分泌を直接抑制することが明らかとなった。一方、高濃度 (10 μ M および 30 μ M) のオランザピンを曝露した場合、インスリン分泌量はコントロールの約 1.2 倍に上昇した (Fig. 7B)。

3-3. 考察

過去の症例報告において、インスリン分泌が 25% 増加した場合、食後の血糖値は 20% 低下することが示されている (74)。本実験ではオランザピンの処置によりインスリン分泌は 20% 程度の低下を示したことから、オランザピンによる膵 β 細胞からの直接的なインスリン分泌の抑制が血糖値の上昇に寄与していることを示唆するものである。

一方、Nagata らは、ラットにオランザピン 2.5~10 mg/kg の用量で単回投与した場合、血清中のインスリン濃度が上昇したことを報告している (39)。彼らの研究では、投与 15 分後の血清中オランザピン濃度は 1.26~8.84 μ M を示している。本研究において HIT-T15 細胞に 10 μ M および 30 μ M のオランザピンを曝露した場合、インスリン分泌はコントロールの約 1.2 倍に上昇した (Fig. 7)。この結果は、Nagata らの報告にあるオランザピンが血清中インスリン濃度を上昇させたという結果を説明し得るものである。

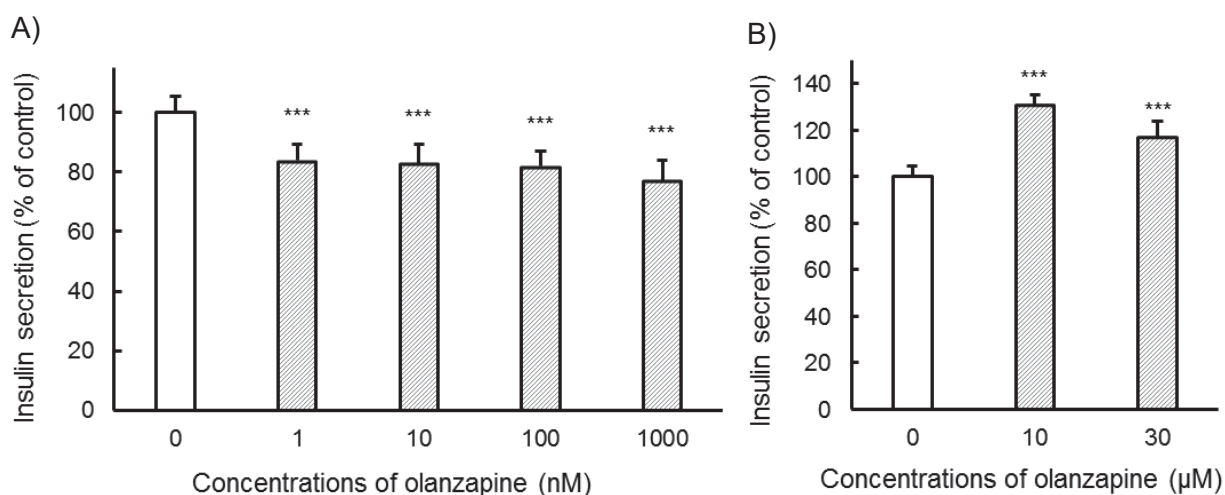


Fig. 7. Effect of olanzapine on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control) or low (A) or high (B) concentrations of olanzapine for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of eight trials. ***P<0.001 with respect to control.

本実験結果から、オランザピンは濃度によってインスリン分泌に与える影響が異なり、臨床濃度のオランザピンは膵 β 細胞での直接作用によりインスリン分泌を抑制することが示唆された。さらに、オランザピンによるインスリン分泌の抑制にモノアミン受容体の遮断作用が関与すると考えられた。

本実験は、Bennet や Zhang らの報告 (62, 75) をもとに培地中にドパミンやセロトニン、ヒスタミンなどのモノアミンを添加しない条件、つまり、膵 β 細胞が生合成および分泌する各種モノアミン受容体遮断薬の影響を解析した。実際に、ラットやマウス、ニワトリの膵 β 細胞には L-チロシンを L-ドーパに変換するチロシンヒドロキシラーゼ (76, 77) や L-ドーパをドパミンに変換する芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ (72, 78, 79) などの酵素が発現していることが報告されている。また、ドパミンと同様に、ラットやマウス、ニワトリの膵 β 細胞にはトリプトファンを 5-ヒドロキシトリプトファンに変換するトリプトファンヒドロキシラーゼ (80, 81, 82) や 5-ヒドロキシトリプトファンをセロトニンに変換する芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ (78, 79) が発現している。さらに、ヒトの膵 β 細胞で L-ヒスチジンをヒスタミンに変換する L-ヒスチジンデカルボキシラーゼの発現が確認されている (83)。これらの報告から、膵 β 細胞はドパミンやセロトニン、ヒスタミンなどのモノアミンを合成し、培地中に分泌すると推察される。しかし、本実験では培地中に含まれるモノアミン量を測定していないため、各種モノアミンがインスリン分泌にどの程度関与しているかは不明である。

4. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におよぼすオランザピン 30 日間曝露の影響

4-1. 目的

前述 3 の実験で臨床血中濃度に相当するオランザピンの単回曝露は膵 β 細胞からのインスリン分泌を直接抑制することを明らかにした。一方、統合失調症患者がオランザピンを単回で使用したのみでは高血糖が惹起されないのに対して、数週間反復して使用した場合に重篤な高血糖を発症したいくつかの症例が報告されている (17, 19-22)。また、健常人に 10 mg/kg のオランザピンを 14 日間連続投与した場合にインスリンの分泌が抑制されたことや (84)、15~17 日間連続投与してもインスリン分泌は変化しなかったことを示した報告がある (85)。このことから、オランザピンの曝露時間によってインスリン分泌に異なる影響を与える可能性があると考えた。当研究室では以前オランザピンを 9 日間曝露した場合、ベースラインのインスリン分泌が低下することを確認したが、実際に重篤な高血糖が引き起こされた症例では 2 週間~1 か月とさらに長期間の投与で症状が見られていることから、本項では、インスリン分泌におよぼすオランザピン 30 日間曝露の影響について解析を行った。

4-2. 結果

HIT-T15 細胞を 100 nM のオランザピンを含む Ham's F12K 培地で 30 日間培養した結果、オランザピンを含んでいない培地で培養した群と比べて、約 15% の有意なインスリン分泌の低下が認められた (Fig. 8)。また、30 日間溶媒のみを処置した細胞に 0.1 および 1 μ M のオランザピンを単回曝露した場合、インスリン分泌は有意な低下を示したが、30 日間オランザピンを処置した細胞においてはオランザピンの単回曝露によるインスリン分泌の低下は認められなかった。

4-3. 考察

オランザピンを 30 日間曝露した HIT-T15 細胞におけるインスリン分泌はオランザピン非曝露群よりも低下した (Fig. 8)。これらの結果から、オランザピンの長期曝露はオランザピンに対するモノアミン受容体の感受性を低下させることで、インスリン分泌能を低下させる可能性が考えられる。Ohara-Imaizumi らは、5-HT₃ 受容体を介したインスリン分泌が妊娠時に増加することを示し、その理由として膵 β 細胞におけるモノアミン受容体発現量や機能が変化した可能性を述べている (86)。本実験においてもオランザピンの 30 日間曝露によって、モノアミン受容体の発現量や機能が変化し、インスリン分泌に対するオランザピンの作用が変動した可能性が考えられる。今後、これらの要因を解析することで、オランザピンによるインスリン分泌量の変動機構がさらに明確になるものと考えられる。

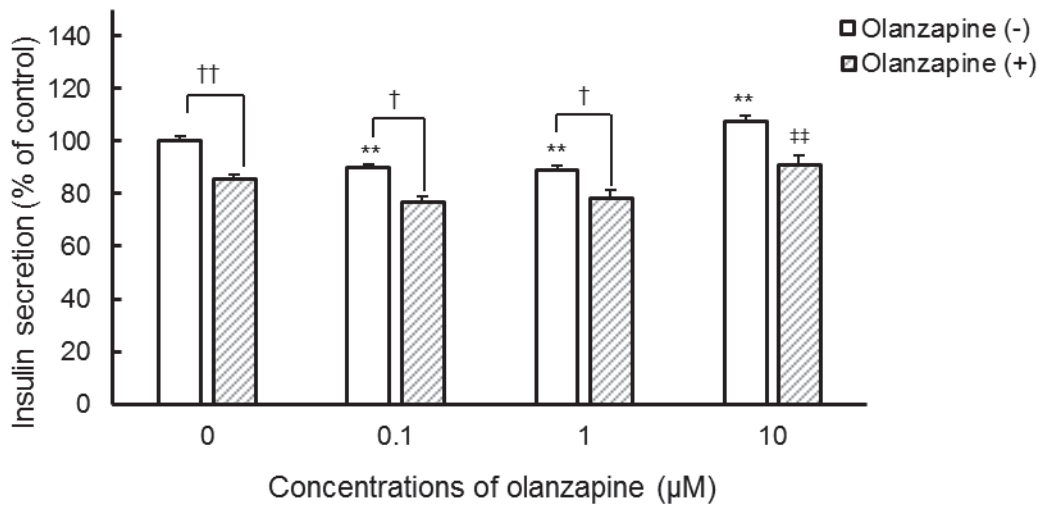


Fig. 8. Effect of 30-day treatment with olanzapine on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were cultured with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control) or 100 nM olanzapine for 30 days. These cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control) or various concentrations of olanzapine for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of eight trials. **P<0.01 with respect to control group without olanzapine. ††P<0.01 with respect to olanzapine-treated group without olanzapine. †P<0.05, ††P<0.01 with respect to control group with each concentration of olanzapine.

5. HIT-T15 細胞におけるオランザピンによる細胞毒性の確認

5-1. 目的

これまでの実験で、オランザピンは HIT-T15 細胞からのインスリン分泌を抑制することを明らかにした。オランザピンによるインスリン分泌の低下が細胞死に由来するものでないことを確認するため、オランザピン含有培地で 1 および 24 時間インキュベーションした HIT-T15 細胞の生存率を XTT 試験で評価した。コントロールには、オランザピンの溶媒である 1% ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

5-2. 結果

本研究で用いた 30 μM よりも高い濃度である 100 μM のオランザピンに 1 時間 (単回投与実験のインキュベーション時間) および 24 時間曝露しても細胞の生存率に有意な変化は観察されなかった (Table 3)。

Table 3. Effect of olanzapine (100 μM) on HIT-T15 cell viability. Results represent the mean \pm SD of five trials.

	Incubation time (h)	
	1	24
Cell viability (% of control)	101.2 \pm 9.1	90.9 \pm 2.6

5-3. 考察

本実験条件ではオランザピンによる細胞毒性は認められず、オランザピンによるインスリン分泌の低下は細胞毒性に由来するものでないことが確認できた。

6. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるドパミン受容体の関与

6-1. 目的

1～5 までの実験で、臨床濃度に相当するオランザピンは細胞毒性を生じることなく、HIT-T15 細胞からのインスリン分泌を直接阻害することを明らかにした。序論で記したように、オランザピンは D₂, D₃, D₄ 受容体や 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ 受容体、H₁ 受容体などのモノアミン受容体に対して高い親和性を示す。このことから、オランザピンは膵 β 細胞に発現するドパミン受容体を直接阻害することによってインスリン分泌を低下させる可能性が考えられる。

インスリン分泌とドパミンとの関連についてはいくつかの研究報告がある。例えば、Ustione らは、マウスより単離した膵島をドパミン処理するとインスリン分泌が低下することを報告している (61)。また、ドパミン処理によるインスリン分泌の低下は、ヒト膵島や INS-1 細胞でも同様に報告されている (61, 87)。さらに、健常人にドパミンを投与した場合、インスリン分泌が抑制された報告もある (88)。

一方、インスリン分泌とドパミン受容体サブタイプとの関連性については、ラット膵島に D₂ 受容体刺激薬であるクインピロールを曝露してもインスリン分泌は変動しないとする報告に対して (60)、マウス膵島に D₂ 受容体遮断薬である L-741626 を曝露した場合にはインスリン分泌が抑制されることが報告されている (61)。しかしながら、ヒト膵島に D₂ 受容体遮断薬であるハロペリドールを曝露した場合にはインスリン分泌が亢進することを示した報告もあり (87)、インスリン分泌と D₂ 受容体との関連性については明確な結論が出ていない。また、他のサブタイプについて、マウス膵島に D₃ 受容体遮断薬である GR103691 を曝露することでインスリン分泌が亢進することが報告されている (61)。これらの報告は全て膵島を用いた解析である。

膵島はインスリン分泌を担う β 細胞だけでなく、グルカゴンの分泌を担う α 細胞やソマトスタチンの分泌を担う δ 細胞も含んでいる。グルカゴンやソマトスタチンは β 細胞に直接作用してインスリン分泌を変動させることから (89-91)、インスリン分泌と各受容体サブタイプとの関連性を膵島で解析した場合、グルカゴンやソマトスタチンの分泌に対する各受容体サブタイプの関与も考慮する必要があり、解析は困難となる。これまでに培養膵 β 細胞を用いて、インスリン分泌におけるドパミン受容体サブタイプの関与を網羅的に解析した報告はない。本項では、HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるドパミン受容体の関与を解析した。

6-2. 結果

最初に HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におよぼすドパミン曝露の影響を調べた。その結果、ドパミンは 0.1～100 μM の範囲で濃度依存的にインスリン分泌を抑制した (Fig. 9)。この結果は、上述した膵島や INS-1 からのインスリン分泌はドパミン曝露により抑制されるという過去の報告と一致している (61, 87)。

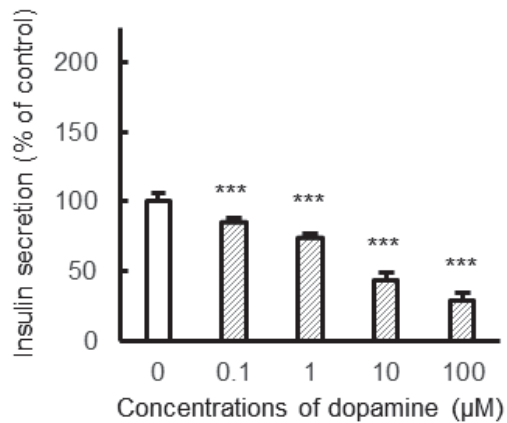


Fig. 9. Effect of dopamine on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), dopamine for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of four to eight trials. ***P<0.001 with respect to control.

次に、オランザピンとの親和性が高い D_2 , D_3 および D_4 受容体に着目して、インスリン分泌とドパミン受容体サブタイプとの関連性を解析した。HIT-T15 細胞からのインスリン分泌における D_2 受容体の関与について調べるため、 D_2 受容体刺激薬であるブロモクリプチンと D_2 受容体遮断薬であるハロペリドールの曝露がインスリン分泌におよぼす影響を調べた。その結果、ブロモクリプチンは濃度依存的にインスリン分泌を抑制し、100 nM 以上の濃度ではコントロールの約 40% 程度の分泌量を示した (Fig. 10A)。一方、ハロペリドールは 30 nM 以上の濃度でインスリン分泌を有意に増加した (Fig. 10B)。

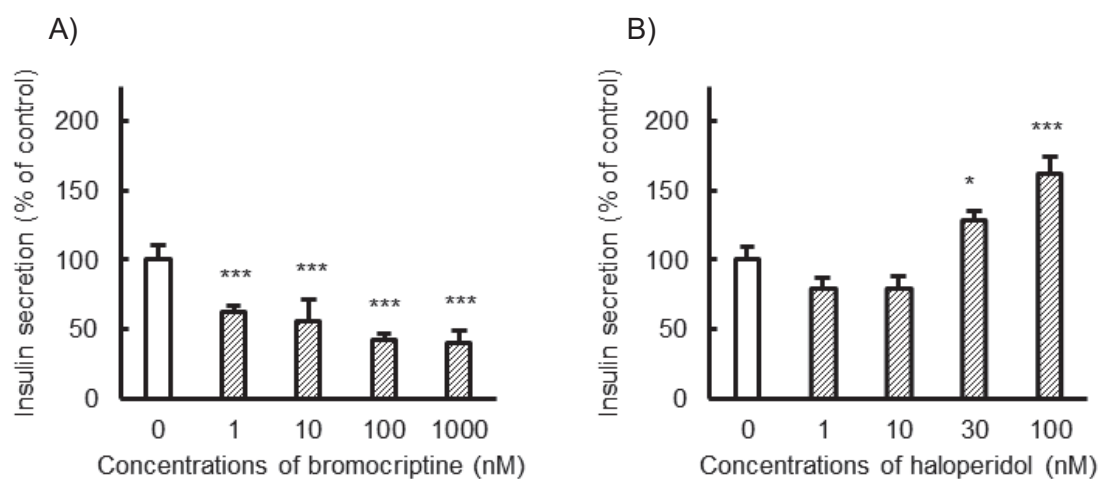


Fig. 10. Effects of dopamine D₂ receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), bromocriptine (A, D₂ agonist) or haloperidol (B, D₂ antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of four to eight trials. *P<0.05, ***P<0.001 with respect to control.

次に、HIT-T15 細胞からのインスリン分泌における D₃ 受容体の関与について調べるため、D₃ 受容体刺激薬である 7-ヒドロキシ PIPAT と D₃ 受容体遮断薬である NGB2904 の曝露がインスリン分泌におよぼす影響を調べた。その結果、7-ヒドロキシ PIPAT は 5 μ M 以上の濃度でインスリン分泌を増加し (Fig. 11A)、NGB2904 は 0.1 nM 以上の濃度でインスリン分泌をコントロールの約 20% 低下させた (Fig. 11B)。

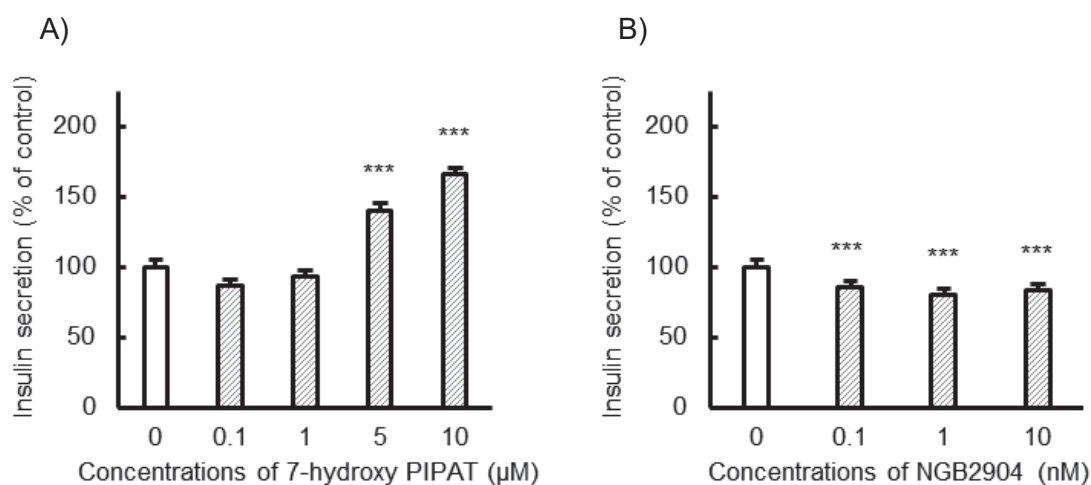


Fig. 11. Effects of dopamine D₃ receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), 7-hydroxy PIPAT (A, D₃ agonist) or NGB2904 (B, D₃ antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean ± SD of four to eight trials. ***P<0.001 with respect to control.

最後に HIT-T15 細胞からのインスリン分泌における D₄受容体の関与について調べるため、D₄受容体刺激薬である ABT724 と D₄受容体遮断薬であるソネピプラゾールの曝露がインスリン分泌におよぼす影響を確認した。その結果、インスリン分泌は 1 nM 以上の ABT724 または 10 nM 以上のソネピプラゾールのいずれを曝露した場合でも、コントロールの約 20%低下した (Fig. 12)。

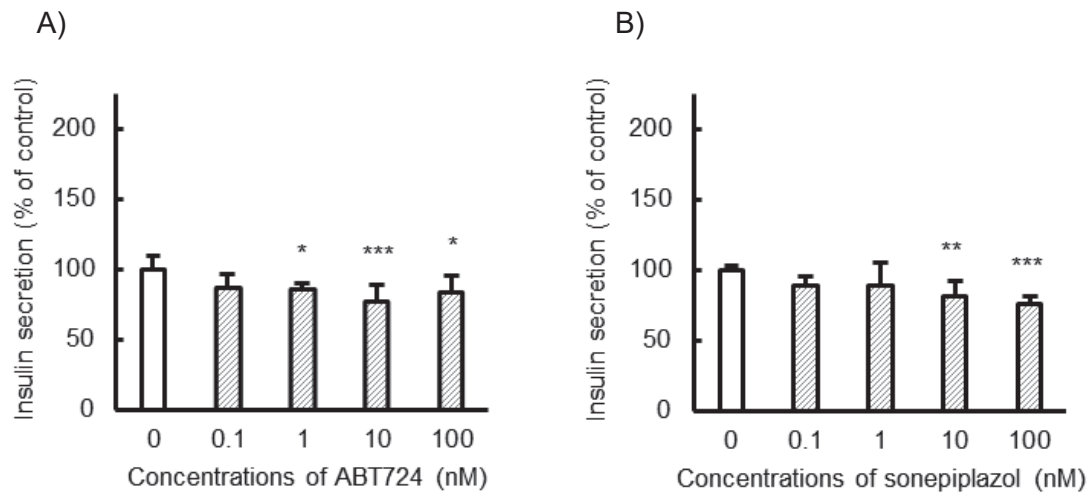


Fig. 12. Effects of dopamine D₄ receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), ABT724 (A, D₄ agonist), or sonepiplazole (B, D₄ antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean ± SD of four to eight trials. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 with respect to control.

6-3. 考察

本実験結果から、ドパミン D₂ および D₄ 受容体の刺激は膵β細胞からのインスリン分泌を抑制するのに対して、D₃ 受容体はインスリン分泌を促進することが明らかになった。ヒト血漿中のドパミンの濃度は 6.5 nM と報告されていることから (92)、本研究で解析したドパミンの濃度 (0.1 ~ 100 μM) は、生理的な濃度よりも高いと考えられる。

D₂ 受容体の刺激は HIT-T15 細胞からのインスリン分泌を抑制し、D₂ 受容体の遮断はインスリン分泌を促進した (Fig. 10)。この結果は、0.5~500 nM のプロモクリプチンによる D₂ 受容体の刺激が INS-1 細胞からのインスリン分泌を抑制したという報告や (93)、D₂ 受容体の阻害がヒト膵島からのインスリン分泌を促進させたという報告と一致している (87)。また、D₂ 受容体をノックアウトした INS-1 細胞では、ドパミンを曝露した場合に認められるインスリン分泌の抑制が観察されないという報告もある (63)。本研究の結果とこれらの報告から、膵β細胞における直接的な D₂ 受容体の刺激はインスリン分泌を抑制すると考えられる。さらに、マウスに 25 mg/kg の用量でプロモクリプチンを投与した場合、インスリン分泌の抑制を伴った血糖値の上昇が確認されている (93)。この報告は D₂ 受容体の刺激によるインスリン分泌の低下は *in vitro* だけではなく、*in vivo* においても認められることを示すものである。

D₂ 受容体とは異なり、D₃ 受容体の刺激はインスリン分泌を促進したのに対して、D₃ 受容体の遮断はインスリン分泌を抑制した (Fig. 11)。一方、D₄ 受容体に対する刺激薬や遮断薬はともにイ

ンスリン分泌を抑制した (Fig. 12)。本研究で用いた D₄ 受容体刺激薬 ABT724 の D₄ 受容体に対する EC₅₀ 値は 12.4 nM と報告されており (94)、この値は D₂ 受容体に対する EC₅₀ 値 (>10 μM) と比較して約 1000 分の 1 である。また、D₄ 受容体遮断薬ソネピプラゾールの D₄ 受容体に対する K_i 値は 10 nM であるのに対し、その他のモノアミン受容体に対する K_i 値は >2 μM である (95)。したがって、本実験条件において両薬剤は D₄ 受容体特異的に作用したと考えられる。D₄ 受容体の刺激薬と遮断薬がともにインスリン分泌を抑制した理由として、D₂ 受容体と D₃ 受容体の発現量の差が関与する可能性が考えられる。PCR 法による各ドパミン受容体 mRNA の発現解析の結果、HIT-T15 細胞における D₂ 受容体の発現は通常の一段階 PCR で確認できたのに対して、D₃ 受容体の発現は二段階 PCR でのみ確認できた (Fig. 4)。この結果から、HIT-T15 細胞における D₃ 受容体 mRNA の発現量は D₂ 受容体よりも少ない可能性が考えられる。したがって、D₄ 受容体を遮断した場合、ドパミンは D₂ および D₃ 受容体を刺激し、発現量の多い D₂ 受容体の刺激によるインスリン分泌の低下が主に観察されたと推察される。

神経細胞において、D₂ や D₄ 受容体の刺激は G_i タンパク質の活性化を介して、細胞内 cAMP の産生を抑制する。細胞内 cAMP 量の減少はプロテインキナーゼ A (PKA) の活性を抑制する (96)。PKA は開口放出関連タンパク質の一種である SNAP25 の活性化に関与する (47)。また、PKA は Epac2 を介して小胞体上のリアノジン受容体を活性化し、細胞質内の Ca²⁺濃度を増加させることや (97)、Ca²⁺チャネルのリン酸化を促進し、Ca²⁺の細胞内流入を促進させる作用を有している。したがって、D₂ や D₄ 受容体の刺激は cAMP の産生を介した細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制することで、インスリン分泌を抑制する可能性が考えられる。一方、D₃ 受容体の刺激も D₂ や D₄ 受容体の刺激と同様に cAMP-PKA カスケードを介したシグナル伝達を惹起することが知られている。本研究で D₃ 受容体の刺激のみがインスリン分泌を抑制した理由は不明である。近年、D₂ 受容体には上述したカスケードの他に Gβγ を介したホスホリパーゼ C (PLC) の活性化により細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させるカスケードの存在も明らかにされている。このことから、D₂ や D₄ 受容体の刺激時には D₃ 受容体と共通する cAMP-PKA カスケード以外のカスケードでインスリン分泌を促進する可能性がある。膵 β 細胞におけるドパミン受容体の刺激がどのようなカスケードを介してインスリン分泌を促進させているのかについては、今後、さらに詳細な解析を行う必要がある。

7. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるセロトニン受容体の関与

7-1. 目的

マウス由来の膵 β 細胞株である MIN6 細胞やラット由来の膵 β 細胞株である INS-1 細胞、ラットインスリノーマ由来 RINm5F 細胞、ヒト膵島にセロトニンを曝露した場合、インスリン分泌は低下することが報告されている (65, 87, 98, 99)。一方、2 型糖尿病患者の膵島を用いた解析において、セロトニンはインスリン分泌を亢進することも報告されている (75)。また、インスリン分泌とセロトニン受容体サブタイプとの関連性については、5-HT_{2A} 受容体刺激薬がヒト膵島からのインスリン分泌を亢進することや (75)、5-HT_{2B} 受容体刺激薬 (65) および 5-HT_{2C} 受容体刺激薬 (62) が MIN6 細胞からのインスリン分泌を抑制すること、5-HT_{2C} 受容体遮断薬がマウス膵島からのインスリン分泌を亢進する (62) ことが報告されている。これらの研究報告は膵 β 細胞からのインスリン分泌にセロトニン受容体サブタイプが関連することを示唆するものである。しかしながら、これらの研究で用いられた膵島の動物種や細胞株、セロトニン関連薬の曝露時間などの実験条件が異なっていること、5-HT_{2C} 受容体刺激薬と遮断薬とともにインスリン分泌が亢進していることなどの理由から、膵 β 細胞株におけるインスリン分泌とセロトニン受容体サブタイプとの関連性は明確になっておらず、統一した実験条件下でインスリン分泌とセロトニン受容体サブタイプとの関連性を解析する必要がある。さらに、ヒト膵島において 5-HT₆ 受容体の発現が報告されているが (82)、インスリン分泌と 5-HT₆ 受容体との関連性は不明である。本項では、HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるセロトニン受容体サブタイプの関与を解析した。

7-2. 結果

HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におよぼすセロトニンの影響を調べた結果、セロトニンは 0.1~1000 μ M の範囲で濃度依存的にインスリン分泌を抑制した (Fig. 13)。この結果は、Cataldo ら (65) や Simpson ら (87) が示したセロトニン曝露が MIN6 細胞やヒト膵島からのインスリン分泌を抑制するという報告と一致している。次に、オランザピンとの親和性が高い 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ 受容体に着目して、HIT-T15 細胞からのインスリン分泌とセロトニン受容体サブタイプとの関連性を解析した。5-HT_{2A} 受容体刺激薬である TCB2 (1~1000 nM) と受容体遮断薬である MDL11939 (0.1~100 nM) の曝露はともにインスリン分泌に影響を与えなかった (Fig. 14)。5-HT_{2B} 受容体刺激薬である BW723C86 は 1000 nM の濃度で曝露した場合のみ、わずかにインスリン分泌を増加させた (Fig. 15A)。一方、5-HT_{2B} 受容体遮断薬である SB204741 はいずれの濃度においてもインスリン分泌に影響を与えなかった (Fig. 15B)。さらに、セロトニン 5-HT_{2C} 受容体刺激薬である Ro60-0175 は 10000 nM の濃度で曝露してもインスリン分泌に影響を与えなかったが (Fig. 16A)、5-HT_{2C} 受容体遮断薬である SB242084 は 1 nM 以上の濃度でわずかにインスリン分泌を低下させた

(Fig. 16B)。5-HT₆受容体の刺激薬である WAY181187 (10~10000 nM) と遮断薬である SB399885 (0.1~100 nM) の曝露はともにインスリン分泌に影響を与えなかった (Fig. 17)。

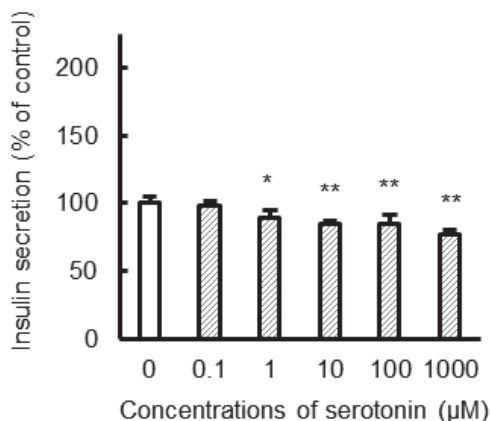


Fig. 13. Effect of serotonin on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), serotonin for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of eight trials. *P<0.05, **P<0.01 with respect to control.

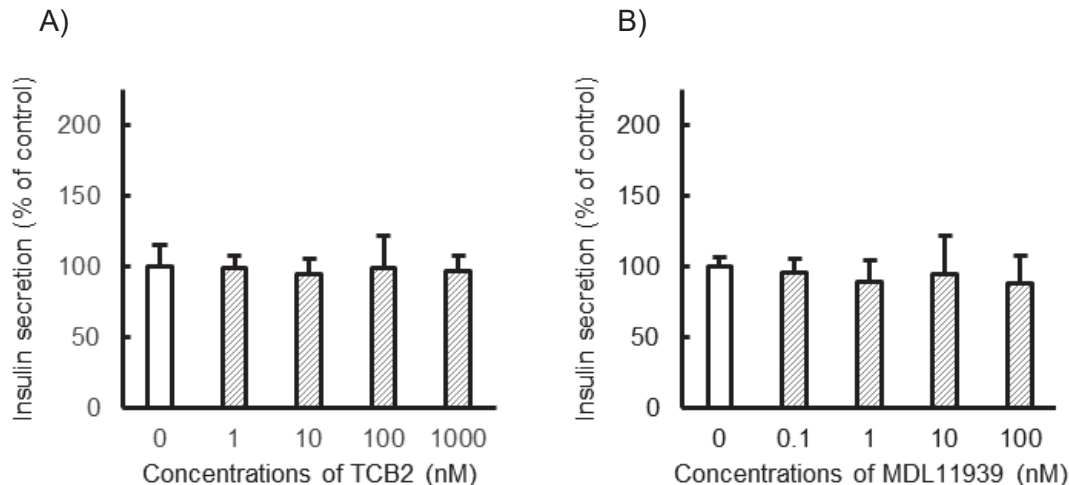


Fig. 14. Effects of serotonin 5-HT_{2A} receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), TCB2 (A, 5-HT_{2A} agonist), MDL11939 (B, 5-HT_{2A} antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of eight trials.

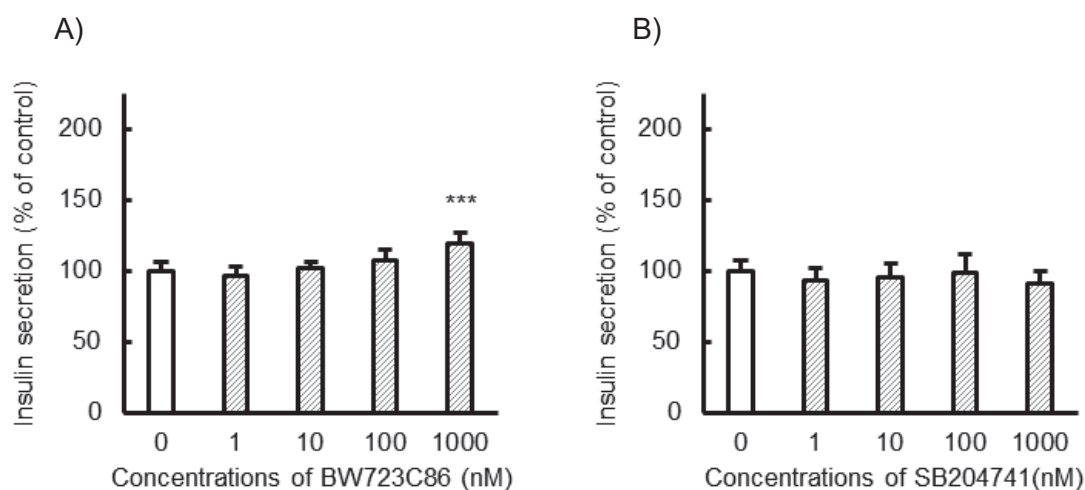


Fig. 15. Effects of serotonin 5-HT_{2B} receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), BW723C86 (A, 5-HT_{2B} agonist), SB204741 (B, 5-HT_{2B} antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of eight trials. *** P<0.001 with respect to control.

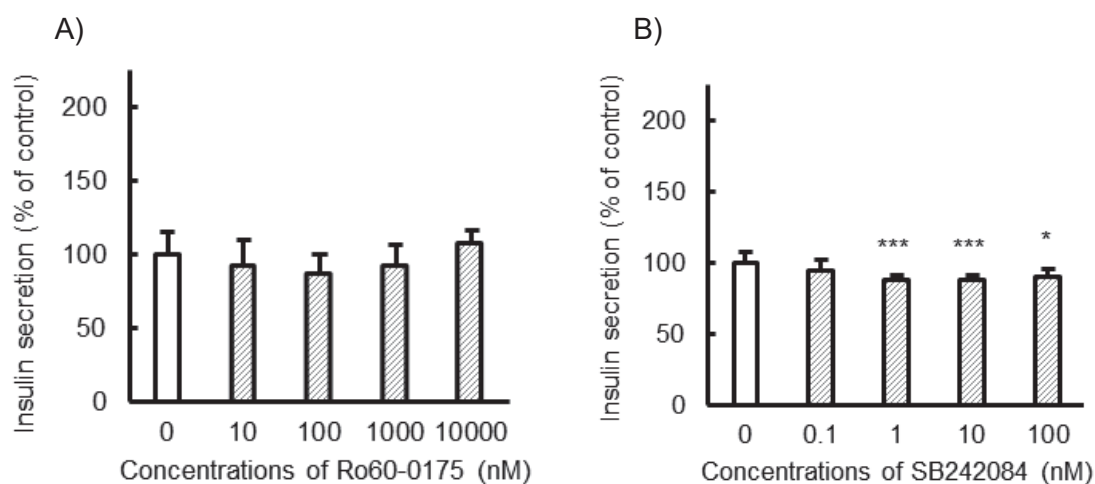


Fig. 16. Effects of serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), Ro60-0175 (A, 5-HT_{2C} agonist), SB242084 (B, 5-HT_{2C} antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of eight trials. * P<0.05, *** P<0.001 with respect to control.

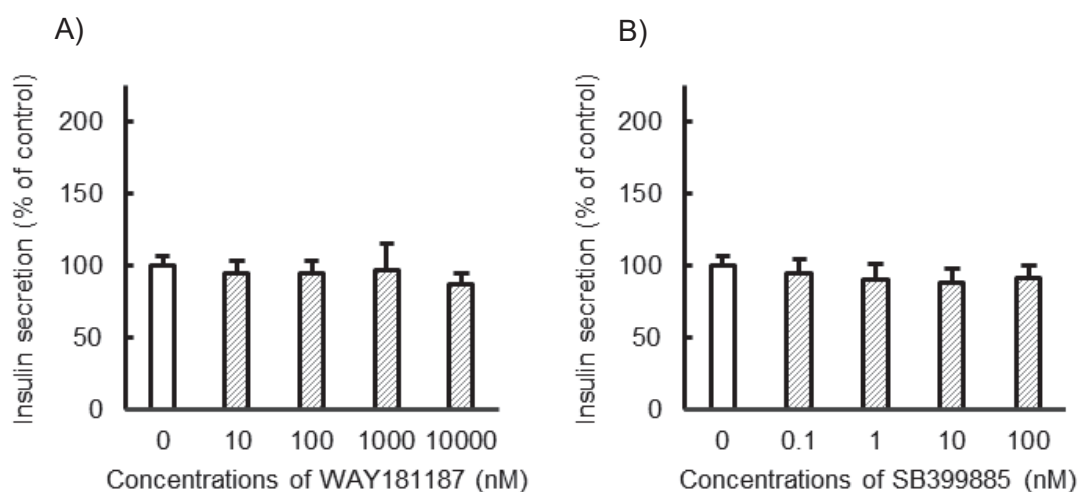


Fig. 17. Effects of serotonin 5-HT₆ receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), WAY181187 (A, 5-HT₆ agonist), SB399885 (B, 5-HT₆ antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean ± SD of eight trials.

7-3. 考察

セロトニン (1~1000 μM) は HIT-T15 細胞からのインスリン分泌をわずかに減少させた (Fig. 13)。この結果は、30~500 μM のセロトニンが MIN6 細胞や INS-1 細胞、RINm5F 細胞からのインスリン分泌を抑制した過去の報告と一致している (67, 95, 100)。インスリン分泌におよぼす内因性セロトニンの役割については報告がないが、セロトニンがドパミンと同様に膵 β 細胞からインスリン分泌時に分泌されることから、セロトニンもインスリン分泌量の調整に関与していると推察される (62)。本研究では、セロトニンの濃度を 0.1~100 μM とした。ヒト血漿中のセロトニンの濃度は 0.6 pM と報告されていることから、生理的な濃度よりも高い (101)。したがって、今後、生理的濃度のモノアミンを用いてインスリン分泌における内因性モノアミンの役割を解明する必要がある。

本研究で、セロトニン受容体サブタイプのうち、5-HT_{2A} 受容体と 5-HT₆ 受容体に対する刺激および遮断はいずれもインスリン分泌を変化させなかった (Figs. 14 and 17)。これまでに、ヒト膵島からのインスリン分泌は 10 μM の TCB2 (5-HT_{2A} 受容体刺激薬) を曝露することで亢進され、100 μM の EMD281014 (5-HT_{2A} 受容体遮断薬) を曝露することで抑制されることが報告されている (75)。前述のように、膵島には膵 β 細胞だけでなく、膵 α 細胞も存在し、EMD281014 はグルカゴンの分泌を亢進することが報告されている (75)。したがって、5-HT_{2A} 受容体遮断時に膵島で見られたインスリン分泌の低下は β 細胞への直接的な作用ではなく、α 細胞より分泌されたグルカゴンによる間接的なインスリン分泌の抑制の結果であると推察される。

5-HT_{2B} 受容体刺激薬である BW723C86 の曝露はインスリン分泌をわずかに促進した (Fig. 15)。この結果は、Bennet らの報告したマウスやヒトの β 細胞における 5-HT_{2B} 受容体の刺激が小胞体上の IP₃ 受容体を刺激し、細胞内 Ca²⁺ の量を増加させることでグルコース依存性インスリン分泌を増加させるという報告と一致している (64)。また、5-HT_{2B} 受容体をノックアウトした INS-1 細胞では、グルコース依存性インスリン分泌が抑制されることや (64)、5-HT_{2B} 受容体の機能不全を呈する遺伝子変異をもつ非社会性パーソナリティ障害の患者では変異を持たないヒトと比べてインスリン分泌が低いことから (102)、本研究の結果が示すように 5-HT_{2B} 受容体の刺激はインスリン分泌を促進させると考えられる。本研究で、5-HT_{2C} 受容体遮断薬である SB242084 はインスリン分泌を有意に抑制した (Fig. 16)。これまでに、マウス膵島を 5-HT_{2B}/5-HT_{2C} 受容体非選択的的刺激薬 mCPP で刺激した場合には、グルコース依存性インスリン分泌が抑制されるが、SB242084 を曝露してもインスリン分泌は変化しないことが報告されている (103)。過去の結果と本研究の結果が一致しない理由として、過去の報告では解析に膵島が用いられていることが考えられる。また、本研究の結果、セロトニン自体の影響がドパミンを曝露した場合と比較して小さく、5-HT_{2B} や 5-HT_{2C} 受容体の刺激および遮断によるインスリン分泌量の変動はドパミン受容体関連薬を曝露した場合と比較してわずかであった。したがって、HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるセロトニン受容体の直接的な寄与は低いと考えられる。

8. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるヒスタミン受容体の関与

8-1. 目的

オランザピンによる血糖値上昇のメカニズムの一つとして、オランザピンが脳内の H_1 受容体を遮断し過食や肥満を惹起することが知られている (24)。また、前述の実験 1 で HIT-T15 細胞には H_1 受容体や H_2 受容体が発現していることを明らかにした。しかしながら、過去の研究において、膵 β 細胞からのインスリン分泌とヒスタミン受容体サブタイプとの関連性を示す報告はほとんどない。本項では、HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におけるヒスタミン受容体の関与について解析した。

8-2. 結果

HIT-T15 細胞からのインスリン分泌におよぼすヒスタミンの影響を調べた結果、ヒスタミンは 1~100 nM の範囲で濃度依存的にインスリン分泌を抑制した (Fig. 18)。

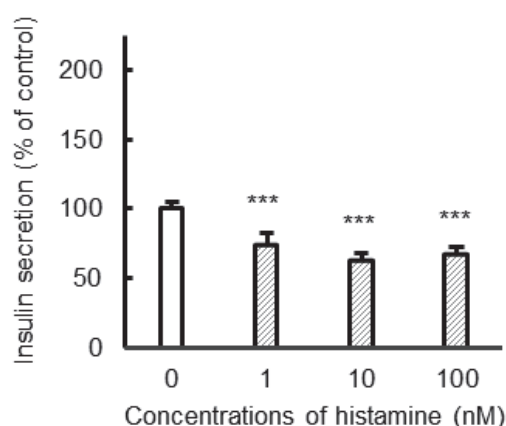


Fig. 18. Effect of histamine on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), histamine for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean \pm SD of eight trials. ***P<0.001 with respect to control.

次に HIT-T15 細胞からのインスリン分泌における H_1 受容体の関与について調べるため、 H_1 受容体刺激薬である 2-PEA と H_1 受容体遮断薬であるトランス-トリプロリジンの曝露がインスリン分泌におよぼす影響を調べた。その結果、2-PEA は 100 μ M 以上の濃度でコントロールの 1.5~2.0 倍程度の有意なインスリン分泌の上昇を示した (Fig. 19A)。一方、10~100 nM のトランス-トリプロリジンの曝露はインスリン分泌を有意に抑制した (Fig. 19B)。

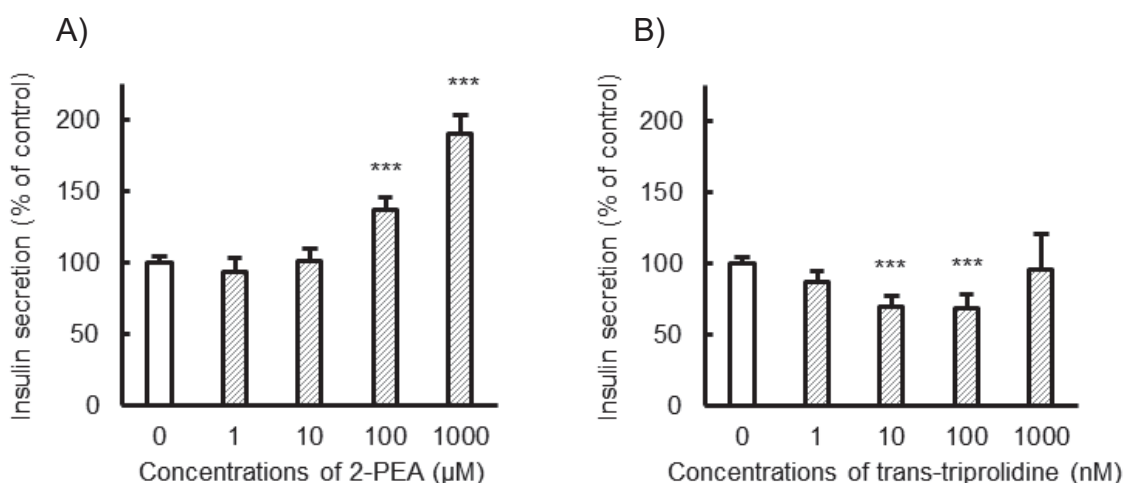


Fig. 19. Effects of histamine H₁ receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), 2-pyridylethylamine (A, H₁ agonist), or trans-triprolidine (B, H₁ antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean ± SD of eight trials. ***P<0.001 with respect to control.

ヒスタミンが HIT-T15 細胞からのインスリン分泌を有意に抑制したのに対し、H₁ 受容体刺激薬である 2-PEA はインスリン分泌を有意に亢進した。これらの結果から、H₁ 受容体以外のヒスタミン受容体サブタイプがインスリン分泌の抑制に関与していると推察された。そこで、インスリン分泌における H₂ 受容体の関与について解析を試みた。HIT-T15 細胞からのインスリン分泌は、H₂ 受容体刺激薬であるアンタミンの濃度依存的に低下した (Fig. 20A)。一方、H₂ 受容体遮断薬であるチオチジンは 0.1 nM のみインスリン分泌をわずかに低下させたが、他の濃度ではインスリン分泌に影響を与えなかった (Fig. 20B)。

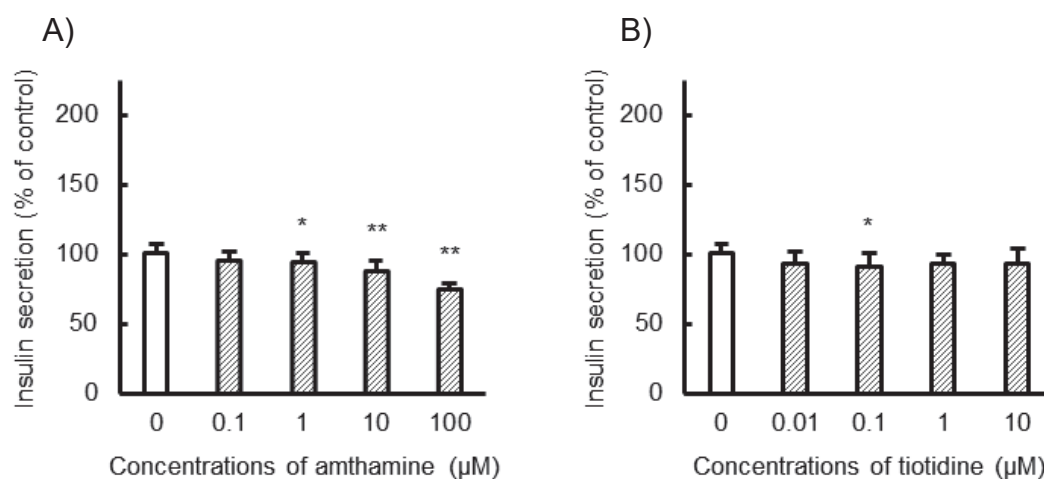


Fig. 20. Effects of histamine H₂ receptor agonist and antagonist on insulin secretion from HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were incubated with medium containing 1% dimethylsulfoxide (control), amthamine (A, H₂ agonist) or tiotidine (B, H₂ antagonist) for 1 h at 37°C. Concentrations of insulin released into the medium were determined using a rat insulin ELISA kit. Amounts of insulin secretion were normalized to the total protein content of each well. Each value represents mean ± SD of eight trials. *P<0.05, **P<0.01 with respect to control.

8-3. 考察

HIT-T15 細胞にヒスタミンを曝露した結果、1~100 nM のヒスタミンはインスリン分泌を抑制した (Fig. 18)。一方、H₁ 受容体刺激薬である 2-PEA はインスリン分泌を亢進したのに対して、H₁ 受容体遮断薬であるトランス-トリプロリジンはインスリン分泌を抑制した (Fig. 19)。これらの結果は、ヒスタミン刺激によるインスリン分泌の抑制は H₁ 受容体の刺激では説明できないことを示している。そこで、H₁ 受容体とは別のヒスタミン受容体サブタイプである H₂ 受容体に着目し、H₂ 受容体とインスリン分泌との関連性を解析した。その結果、10 nM 以上のアンタミンの刺激によりインスリン分泌は抑制された (Fig. 20A)。一方、0.1 nM のチオチジンによる H₂ 受容体の遮断はインスリン分泌を有意に抑制したが、他の濃度での有意な変動は認められなかった (Fig. 20B)。これらの結果から、ヒスタミン刺激によるインスリン分泌の抑制に H₂ 受容体の刺激が一部関与することが示唆された。しかしながら、インスリン分泌における H₂ 受容体の寄与は低いと推察される。近年、マウス膵島や MIN6 細胞に H₃ 受容体が発現していることが報告されている (100)。また、H₃ 受容体刺激薬であるイメチットはインスリン分泌を抑制し、H₃ 受容体遮断薬である JNJ-5207852 はインスリン分泌を亢進することも明らかになっている (100)。これらの報告は、ヒスタミン刺激によるインスリン分泌の低下に H₃ 受容体の刺激が関与することを示唆するものである。今後、HIT-T15 細胞における H₃ 受容体の発現やインスリン分泌との関連性について、解析を行う必要がある。

H₁受容体の刺激は Gq タンパク質を介して PLC と共役し、ジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸の合成を促進する。イノシトール三リン酸は小胞体上の IP₃ 受容体を刺激することで細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させることから、本カスケードが H₁受容体の刺激によるインスリン分泌の亢進に関与している可能性が考えられる。一方、H₂受容体の刺激は Gs タンパク質の活性化を介して細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させることが知られている (104)。本研究の結果、H₂受容体の刺激はインスリン分泌を抑制したことから、この現象には cAMP-PKA カスケード以外の経路が関与する可能性が考えられる。

9. HIT-T15 細胞における各モノアミン受容体関連薬による細胞毒性の確認

9-1. 目的

本実験に用いた各モノアミン受容体関連薬の曝露が HIT-T15 細胞の細胞生存率に影響を与えないことを確認するため、5 と同様に XTT 試験で細胞の生存率を評価した。

9-2. 結果

XTT 試験の結果、各モノアミン受容体関連薬の曝露は 24 時間までに有意な細胞生存率の低下を惹起しなかった (Table 4)。

9-3. 考察

HIT-T15 細胞に各モノアミン受容体関連薬を曝露した際にみられるインスリン分泌の変動が、細胞障害の結果ではなく、各受容体への直接的な影響によるものであると考えられた。

Table 4. Effects of chemicals on HIT-T15 cell viability.
 Results represent the mean \pm SD of five trials.

Chemicals	Cell viability (% of control)
Bromocriptine	104.0 \pm 6.4
Haloperidol	103.1 \pm 2.9
7-hydroxy PIPAT	96.5 \pm 2.8
NGB2904	104.0 \pm 2.2
ABT724	102.9 \pm 2.0
Sonepiprazole	99.8 \pm 5.0
TCB2	100.5 \pm 4.4
MDL11939	113.2 \pm 14.8
BW723C86	97.4 \pm 3.8
SB204741	102.2 \pm 7.5
Ro60-0175	92.3 \pm 3.7
SB242084	99.8 \pm 3.4
WAY181187	97.9 \pm 6.1
SB399885	106.5 \pm 4.2
2-PEA	102.5 \pm 3.5
Trans-triprolidine	101.3 \pm 1.7
Amthamine	89.1 \pm 21.2
Tiotidine	93.5 \pm 17.2

結論

オランザピンは種々のモノアミン受容体に対して拮抗作用を示すことから、オランザピンが膵 β 細胞におけるモノアミン受容体の遮断作用を介することでインスリン分泌を抑制し、副作用である高血糖症状を惹起する可能性が考えられる。しかしながら、膵 β 細胞からのインスリン分泌におけるアドレナリン受容体以外のモノアミン受容体の関与については明らかでない。本研究では、ハムスター由来膵 β 細胞株である HIT-T15 細胞を用いて、膵 β 細胞からのインスリン分泌におけるドパミン、セロトニンおよびヒスタミン受容体の関与を解明することを目的として解析を行った。その結果、以下の知見を得た。

1. HIT-T15 細胞にドパミン D_2 , D_3 , D_4 受容体やセロトニン 5-HT_{2A} , 5-HT_{2B} , 5-HT_{2C} , 5-HT_6 受容体、ヒスタミン H_1 および H_2 受容体 mRNA が発現していることを確認した。また、 D_2 および 5-HT_{2A} 受容体についてはタンパク質の発現も確認した。
2. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌は、ドパミン D_2 および D_4 受容体の刺激により抑制され、 D_3 の刺激により促進される。
3. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌は、セロトニン 5-HT_{2B} 受容体の刺激により促進されるが、インスリン分泌における両受容体の寄与は低い。一方、 5-HT_{2A} 受容体、 5-HT_{2C} 受容体および 5-HT_6 受容体の刺激はインスリン分泌に影響しない。
4. HIT-T15 細胞からのインスリン分泌は、ヒスタミン H_1 受容体の刺激により促進され、 H_2 受容体の刺激により抑制される。
5. オランザピンは、臨床血中濃度で HIT-T15 細胞からのインスリン分泌を抑制する。

本研究の結果は、オランザピンが膵 β 細胞に発現する D_3 受容体や 5-HT_{2B} 、 H_1 受容体を遮断することでインスリン分泌を直接的に抑制する可能性があることを示すものである。本研究で得られた成果が、MARTA による高血糖症状の予防法の開発や高血糖症状を起こさないモノアミン受容体遮断薬の開発を行う際の有用な基礎的知見となることを期待する。

謝辞

終わりに臨み、本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学病院薬剤部 松尾 裕彰 教授をはじめ、埜越 崇範 助教、広島大学大学院医系科学研究科 横大路 智治 准教授、広島大学病院薬剤部 富田 隆志 先生に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、有益なる御助言を賜りました広島大学大学院医系科学研究科 森川 則文 教授、森岡 徳光 教授、高野 幹久 教授、木下 英司 准教授に深謝いたします。

本研究を行うに際し、有益なる御助言を賜りました姫路獨協大学薬学部医療薬学科 杉本 由美 教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、お世話になりました 中井 智恵 学士、三浦 悠美香 学士、長谷川 琢哉 氏をはじめ、広島大学大学院医系科学研究科 病院薬剤学研究室の皆様、同研究室卒業生の皆様、広島大学病院薬剤部の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、学生生活を支えてくださった家族、友人に心より感謝いたします。

2020年3月

実験方法

1. 使用薬物およびキット

Olanzapine	和光純薬工業
Dopamine hydrochloride	Sigma-Aldrich
Serotonin	Sigma-Aldrich
Histamine	Sigma-Aldrich
2-Bromo- α -ergocryptine methanesulfate salt (bromocriptine)	Sigma-Aldrich
Haloperidol	和光純薬工業
7-Hydroxy-PIPAT maleate	Tocris Bioscience
NGB2904	Tocris Bioscience
ABT724 trihydrochloride	Tocris Bioscience
Sonepiprazole	Tocris Bioscience
TCB2	Tocris Bioscience
MDL11939	Tocris Bioscience
BW723C86 hydrochloride	Tocris Bioscience
SB204741	Tocris Bioscience
Ro60-0175	Tocris Bioscience
SB242084	Toront Research Chemicals, Inc.
WAY181187 oxalate	Tocris Bioscience
SB399885 hydrochloride	Tocris Bioscience
2-Prydylethylamine dihydrochloride	Tocris Bioscience
trans-Triprolidine hydrochloride	Tocris Bioscience
Amthamine dihydrobromide	Tocris Bioscience
Tiotidine	Tocris Bioscience
Nutrient mixture F-12 Ham Kaighn's modification (Ham's F12K)	Sigma-Aldrich
Fetal bovine serum (FBS)	HyClone
Penicillin (10,000 IU/mL)-Streptomycin (10 mg/mL) solution	Sigma-Aldrich
0.25% Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (-)	日水製薬
Hank's balanced salts (HBSS)	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	ナカライテスク
XTT sodium salt	Sigma-Aldrich
ラットインスリン測定キット	森永生科学研究所
1-Methoxy-5-methylphenazium methylsulfate	同仁化学研究所

RNeasy Plus Mini kit	QIAGEN
ReverTra Ace qPCR RT kit	TOYOBO
KOD -plus-	TOYOBO
アガロース	TaKaRa
6×Loading buffer	TaKaRa
100 bp Ladder	TaKaRa
プロテアーゼ阻害剤カクテル (一般用)	ナカライテスク
分子量マーカー (Low Range)	ナカライテスク
Western lighting ECL pro	Perkin Elmer

その他の試薬は市販特級品を用いた。プライマーおよび抗体は各実験の項で示す。

2. 使用器具・機器

器具・機器名	製品名	会社
100 mm dish	150466	Thermo SCIENTIFIC
24-well plate	142475	Thermo SCIENTIFIC
96-well plate	167008	Thermo SCIENTIFIC
安全キャビネット	SCV-1303ECIIA	HITACHI
CO ₂ インキュベーター	MCO-175	SANYO
光学顕微鏡	CK2	OLYMPUS
アスピレーター	DAP-15	ULVAC
遠心分離機	テーブルトップ遠心機	KUBOTA
	インバータマイクロ冷却遠心機	KUBOTA
ヘモサイトメーター	ノイバウエル計算盤	Erma TOKYO
マイクロプレートリーダー	Multiskan GO	Thermo Fisher Scientific
紫外可視分光光度計	MTP-310	CORONA
PCR 装置	iCycler	Bio-Rad
DNA 泳動装置	Mupid-2plus	Adbance
検出装置 UV	AE-9020 E-Shot II	ATTO
電源装置	PowerStation 1000VC/AE-8450	ATTO
電源装置	myPower500/AE-8150	ATTO
ミニスラブ電気泳動装置	ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 /AE-6500	ATTO
ブロッキング装置	TRANS-BLOT [®] SD SEMI-DRY TRANSFER CELL	Bio-Rad
イメージアナライザー	LAS4000 mini	GE healthcare

電気泳動解析ソフトウェア	Image Quant TL	GE healthcare
ポリトロン	T18 ULTRA-TURRAX	IKA

3. 使用細胞

HIT-T15 細胞 DS ファーマバイオメディカル

4. 細胞培養

HIT-T15 細胞は 10% ウシ胎児血清、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 、100 IU/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを添加した 10 mM グルコース含有 Ham's F12K 培地を用い、37°C、5% CO_2 の条件で培養した。細胞の継代は、0.25% trypsin-EDTA solution を用いて細胞を剥離し、Ham's F12K 培地に懸濁した後、継代用として 100 mm dish に 2.5×10^5 cells/dish となるように播種した。なお、培地交換は 2 日ごとに行った。使用した細胞の passage は 80~100 とした。

5. RT-PCR

HIT-T15 細胞を 100 mm dish に 2.5×10^6 cells/dish で播種し、24 時間培養した。氷冷した PBS(-) 5 mL で 2 回洗浄し、0.25% trypsin-EDTA solution 2 mL で細胞を剥離した。細胞懸濁液に Ham's F12K 培地 8 mL を加えて 50 mL チューブに回収した後、1,000 rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を吸引除去することで細胞ペレットを得た。得られた細胞ペレットから RNeasy Plus Mini Kit を用いて、全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA は 260 nm での吸光度をもとに濃度を決定し、ReverTra Ace qRNA RT Kit を用いて cDNA を作製した。これらの操作は各キットのマニュアルに従って行った。次に、作製した cDNA より Kod -plus-を用いて iCycler にて PCR を行った。PCR の反応は、以下に示す条件で 35 サイクル行った: 初期熱変性 94°C (2 分)、熱変性 94°C (30 秒)、アニーリング (30 秒)、伸長反応 68°C (1 分)。各受容体特異的プライマー、アニーリング温度および予測される産物のサイズを Table 5 に示す。さらに、D₃、D₄、セロトニンおよび H₂ 受容体についてはネステッドプライマー (Table 5) を用いて 2 段階 PCR を行った。なお PCR の条件は 1 段階目と同様に行った。

6. アガロース電気泳動

TAE 緩衝液に 2% (w/v) アガロースを加えて、加熱溶解した後、エチジウムブロマイドを加えて、アガロース溶液を作製した。ゲル作製用プレートにアガロース溶液を注ぎ、室温で固化するまで静置した後、4°C でさらに固化させた。泳動槽に TAE 緩衝液を満たし、ゲルを泳動装置にセットして、6×Loading Buffer を 1/6 倍量加えた DNA 試料 5 μL をウェルにアプライした。分子量マーカーは、100 bp Ladder (TaKaRa) を用いた。電圧 100V で電気泳動を行った後、312 nm の UV 照射により DNA のバンドを検出した。

7. Western blot 解析

7-1. タンパク質試料の調製

HIT-T15 細胞を 100 mm dish に 2.5×10^6 cells/dish で播種し、7 日間培養した。氷上で培地を除去した後、氷冷した PBS(-) 5 mL で 2 回洗浄した。プロテアーゼ阻害剤カクテルを 1% 添加した lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1% TritonX-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) 250 μ L を加えて、スクレイパーで細胞を剥離し 15 mL チューブに回収した。氷冷下、ポリトロン 5,000 rpm で 2 分間ホモジナイズした後、4°C, 12,000 rpm で 20 分間遠心分離した。得られた上清 をタンパク質試料とした。得られたタンパク質試料は BSA を標準品として Lowry 法によりタンパク量を測定した。調製したタンパク質試料は、使用するまで -80°C で保存した。

7-2. SDS-PAGE

タンパク質試料を 3×サンプルバッファーと混合し、10% ポリアクリルアミドゲルに 1 lane あたり 10 μ g をアプライした。分子量マーカーには LMW Marker Kit for SDS Electrophoresis を用いた。泳動はゲル 1 枚当たり濃縮ゲル部分において定電流 20 mA、分離ゲル部分において定電流 40 mA で行った。

7-3. Western blot

SDS-PAGE 後のゲルを転写バッファー中で約 15 分間平衡化した後、ブロッティング装置を用いて 25 V の定電圧で 1 時間、ニトロセルロース膜 (Bio Trace™ N, Pall Corporation) に転写した。5% (w/v) スキムミルク含有 TBS-0.1% Tween 20 (TBST) で 1 時間ブロッキングした後、TBST で 3 回振盪洗浄した。洗浄後に TBST で 800 倍希釈した D2DR (B-10) (SC-5303, Santa Cruz Biotechnology) を添加して、4°C で一晩インキュベートした。反応終了後、ニトロセルロース膜を TBST で 2 回洗浄した後、TBST による 10 分間の振盪洗浄を 1 回、5 分間の振盪洗浄を 2 回行った。5-HT_{2A} 受容体の検出には、ニトロセルロース膜の代わりに PVDF 膜 (Immobilon-P membrane, Merck) を使用した。転写後の PVDF 膜はブロッキング後、TBST で 500 倍に希釈した Anti 5HT_{2A} receptor antibody (ab140824, Abcam) を添加して、4°C で一晩インキュベートした。反応終了後に PVDF 膜を洗浄した後、TBST で 20,000 倍希釈した Donkey Anti Goat IgG H&L (HRP) (ab97110, Abcam) 溶液中で、室温にて 1 時間振盪した。洗浄した各膜上に western lighting ECL pro をかけ、1 分間反応させた後、LAS-4000 により膜上の IgE 抗体と結合したタンパク質を検出した。画像解析には、Image Quant TL ソフトウェア (GE healthcare) を用いた。

Table 5. Primer sequences, annealing temperatures, and product sizes.

gene	primer sequence	annealing temperature (°C)	product size (bp)
dopamine D ₂	forward: 5'-TCGCCATTTGTCTGGGTCTCTG-3' reverse: 5'-TGCCCTTTGAGGGGGGTCTTC-3'	65	261
dopamine D ₃ (1 st PCR)	forward: 5'-GTCTGGAATTTTCAGCCGCATTTGCTGTGA -3' reverse: 5'-ATGACCACTGCTGTGTACCTGTCTATGCTG-3'	62	119
(2 nd PCR)	forward: 5'-CAGCCGCATTTGCTGTGATG-3' reverse: 5'-GTACCTGTCTATGCTGATGGCA-3'	62	94
dopamine D ₄ (1 st PCR)	forward: 5'-GTCCGCTCATGCTACTGCT-3' reverse: 5'-GACTCTCATTGCCTTGCGCTC-3'	60	344
(2 nd PCR)	forward: 5'-GCTACTGCTTTACTGGGCCAC-3' reverse: 5'-TCATTGCCTTGCGCTCCCTT-3'	60	329
serotonin 5-HT _{2A} (1 st PCR)	forward: 5'-CTGGTCATCATGGCAGTGTCCCTAGAGAA-3' reverse: 5'-GGTTCTGGAGTTGAAGCGGCTATGGTGGGA-3'	67	291
(2 nd PCR)	forward: 5'-TGATGTCACTTGCCATAGCTG-3' reverse: 5'-AGAGCTTGCTGGGCAAAG-3'	55	105
serotonin 5-HT _{2B} (1 st PCR)	forward: 5'-ATGCCGATTGCCCTCTTGAC-3' reverse: 5'-CGGGAGTTGCACTGATTGG-3'	67	185
(2 nd PCR)	forward: 5'-GCCGATTGCCCTCTTGACA-3' reverse: 5'-GGGAGTTGCACTGATTGGC-3'	62	182
serotonin 5-HT _{2C} (1 st PCR)	forward: 5'-GGGTCCTTCGTGGCATTCTTCATCCCG-3' reverse: 5'-CTTTTCGTTGTTGATAGCTTGCATGGTGCC-3'	65	273
(2 nd PCR)	forward: 5'-GTGGCATTCTTCATCCCGTTG-3' reverse: 5'-TTGATAGCTTGCATGGTGCT-3'	62	254
serotonin 5-HT ₆ (1 st PCR)	forward: 5'-ATGCTGAACGCGCTGTATGG-3' reverse: 5'-GAGAGGATGAGCAGGTAGCG-3'	60	140
(2 nd PCR)	forward: 5'-GTATGGGCGCTGGGTGCTA-3' reverse: 5'-GTAGCGGTCCAGGCTGATG-3'	60	112
histamine H ₁	forward: 5'-ACTTGAACCGAGAGCGGAAG-3' reverse: 5'-GGGTTTCAGCGTGGAGTTGAT-3'	60	178
histamine H ₂ (1 st PCR)	forward: 5'-CCAGCTCCTGTGACTCCAGA-3' reverse: 5'-GGGTTTGGGAAGGTCTGATG-3'	60	353
(2 nd PCR)	forward: 5'-GATCCCTTGACAAAACCCAAC-3' reverse: 5'-TCCTGGTCTGTAGTGTGCGT-3'	60	97

8. インスリン分泌実験

8-1. 単回曝露実験

HIT-T15 細胞を 24-well plate に 1.0×10^5 cells/well で播種し、72 時間培養した。培地を除去した後、1% ジメチルスルホキシド (DMSO) 含有 Ham's F12K 培地で 30 分間プレインキュベーションした後、細胞をオランザピンまたは各受容体刺激薬または遮断薬 (Table 6) を含む 10 mM グルコース含有 Ham's F12K 培地で 1 時間インキュベーションした。コントロールには 1% DMSO のみを加えた Ham's F12K 培地を用いた。培地中に分泌されたインスリン量はラットインスリン測定キットにより測定し、Lowry 法により測定した各ウェル中の総タンパク量で補正した。なお、実験は各 3 回繰り返し行い、再現性を確認した。

Table 6. Agonists and antagonists specific for dopamine, serotonin, or histamine receptors used in this study.

Receptor	Agonist	Antagonist
dopamine D ₂	bromocriptine	haloperidol
dopamine D ₃	7-hydroxy PIPAT	NGB2904
dopamine D ₄	ABT724	sonopiprazole
serotonin 5-HT _{2A}	TCB2	MDL11939
serotonin 5-HT _{2B}	BW723C86	SB204741
serotonin 5-HT _{2C}	Ro60-0175	SB242084
serotonin 5-HT ₆	WAY181187	SB399885
histamine H ₁	2-pyridylethylamine	trans-triprolidine
histamine H ₂	amthamine	tiotidine

8-2. オランザピン 30 日間曝露実験

HIT-T15 細胞を 100 mm dish に 2.5×10^5 cells/dish で播種し、24 時間培養した。培地を除去した後、100 nM オランザピンを含む 0.1% DMSO 含有 Ham's F12K 培地 10 mL に培地を交換した。以降、2 日ごとにオランザピン含有培地で培地交換を行い、7 日ごとに継代を 3 回繰り返し返した。27 日間培養を行った細胞を 24-well plate に 1.0×10^5 cells/well で播種し、72 時間培養した。1% DMSO 含有 Ham's F12K 培地で 30 分間プレインキュベーションした後、細胞を各濃度のオランザピンを含む 10 mM グルコース含有 Ham's F12K 培地で 1 時間インキュベーションした。コントロールには 1% DMSO のみを加えた Ham's F12K 培地を用いた。培地中に分泌されたインスリン量はラットインスリン測定キットにより測定し、Lowry 法により測定した各ウェル中の総タンパク量で補正した。なお、実験は各 3 回繰り返し行い、再現性を確認した。

9. XTT 試験

HIT-T15 細胞を 96-well plate に 1.5×10^4 cells/well で播種し、24 時間培養した。培地を除去した後、オランザピンまたは各受容体刺激薬または遮断薬を含む 10 mM グルコース含有 Ham's F12K 培地で 37°C、1 時間インキュベーションした。コントロールには 1% DMSO のみを加えた Ham's F12K 培地を用いた。インキュベーション後に培地を除去し、225 μ M XTT および 48 μ M 1-methoxy PMS を加えた 200 μ L Hank's Balanced Salt Solution を各ウェルに添加した。37°C で 4 時間インキュベートした後、450 nm および 650 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

10. 統計解析

各実験のデータは、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。統計処理は Kruskal-Wallis または ANOVA test を用いて平均値の差を評価し、続いて 2 群間比較は Student's t-test、多重比較は post hoc Tukey test, Dunnett's test および Bonferroni test を行った。P<0.05 を統計的有意差ありと判断した。

論文目録

本論文の基礎となる原著を以下に記す。

Nagata M, Yokooji T, Nakai T, Miura Y, Tomita T, Taogoshi T, Sugimoto Y, Matsuo H. Blockade of multiple monoamines receptors reduce insulin secretion from pancreatic β -cells. *Sci Rep.* 9 (1):16438 (2019)

参考文献

1. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: A Concise Overview of Incidence, Prevalence, and Mortality. *Epidemiol Rev.* 30:67-76 (2008)
2. 厚生労働省. 平成 29 年度患者調査の概況.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/dl/05.pdf> (2019)
3. Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic Drug Doses and Neuroleptic/Dopamine Receptors. *Nature.* 261(5562):717-719 (1976)
4. Carlsson A, Lindqvist M. EFFECT OF CHLORPROMAZINE OR HALOPERIDOL ON FORMATION OF 3-METHOXYTYRAMINE AND NORMETANEPHRINE IN MOUSE BRAIN. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 20:140-144 (1963)
5. van Rossum JM. The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 160(2):492-494 (1966)
6. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(17):9235-9240 (1996)
7. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry.* 51(3):199-214 (1994)
8. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett.* 20(3):379-382 (1980)
9. Farber NB. The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1003:119-130 (2003)
10. Kline NS. USE OF RAUWOLFIA SERPENTINA BENTH. IN NEUROPSYCHIATRIC CONDITIONS. *Ann N Y Acad Sci.* 59(1):107-132 (1954)
11. López-Muñoz F, Alamo C, Cuenca E, Shen WW, Clervoy P, Rubio G. History of the Discovery and Clinical Introduction of Chlorpromazine. *Annals of Clinical Psychiatry,* 17(3):113-135 (2005)
12. Delay J, Deniker P. Le traitement de psychoses par une méthode neurolytique dérivée de l'hibernothérapie: le 4560 RP utilisée seule en cure prolongée et continue. *CR Congr Med Alien Neurol.* 50:497-502 (1952)
13. Ban TA. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 3(4):495-500 (2007)
14. 福山 雄卯介, 後藤 史子, 福山 順子, 福嶋 翔, 鈴木 浩孝, 西野 隆. 入院および外来治療中の統合失調症患者における薬物療法の比較検討. *日本病院薬剤師会雑誌.* 50(11):1314-1318 (2014)
15. 野田 幸裕, 天正 雅美, 宇野 準二, 黒沢 雅広, 高橋 結花, 加藤 剛, 中川 将人, 宮原 佳希, 本多 智子, 三輪 高市, 柴田 木綿, 吉尾 隆. 統合失調症入院患者の薬物療法に関する処方実態調査 (2011 年) 全国 149 施設の調査から. *日本社会精神医学会雑誌.* 24(4):349-359 (2015)

16. Pringsheim T, Gardner DM. Dispensed prescriptions for quetiapine and other second-generation antipsychotics in Canada from 2005 to 2012: a descriptive study. *CMAJ Open*. 2(4):E225-232 (2014)
17. Kinoshita H, Miyagatani Y, Murao M, Kamimura Y. Regular Follow-up of Olanzapine Blood Levels and Impaired Glucose Tolerance in Olanzapine-induced Diabetic Ketoacidosis: A Case Report. *Clin Neuropsychopharmacol Ther*. 5:1-4 (2014)
18. 日本イーライリリー株式会社：緊急安全性情報「抗精神病薬ジプレキサ錠（オランザピン）投与中の血糖値上昇による糖尿病性ケトアシドーシス及び糖尿病性昏睡について」.
<https://www.pmda.go.jp/files/00147314.pdf> (2002)
19. Vuk A, Kuzman MR, Baretic M, Osvatic MM. DIABETIC KETOACIDOSIS ASSOCIATED WITH ANTIPSYCHOTIC DRUGS: CASE REPORTS AND A REVIEW OF LITERATURE. *Psychiatr Danub*. 29(2):121-135 (2017)
20. Nakamura M, Nagamine T. Severe Hyperglycemia Induced by Olanzapine was Improved with a Recovery of Insulin Secretion after Switching to Risperidone and Introducing Insulin Therapy. *Intern Med*. 49(23):2635-2637 (2010)
21. Nakamura M, Masaoka Y, Nagamine T. Olanzapine-induced severe hyperglycemia was completely reversed by the restoration of insulin secretion after switching to aripiprazole and initiating insulin therapy. *Clin Neuropsychopharmacol Ther*. 5: 29-33 (2014)
22. Liebrecht KA, Markowitz JS, Caley CF. New onset diabetes and atypical antipsychotics. *Eur Neuropsychopharmacol*. 11(1):25-32 (2001)
23. Dossenbach MI, Treuer T, Kryzhanovskaya L, Saylan M, Dominguez S, Huang X; HGCQ, HGDQ, HGDT, and HGDV Study Team. Olanzapine versus chlorpromazine in the treatment of schizophrenia: a pooled analysis of four 6-week, randomized, open-label studies in the Middle East and North Africa. *J Clin Psychopharmacol*. 27(4):329-337 (2007)
24. Baptista T, Araujo de Baptista E, Ying Kin NM, Beaulieu S, Walker D, Joob R, Lalonde J, Richard D. Comparative effects of the antipsychotics sulpiride or risperidone in rats. I: bodyweight, food intake, body composition, hormones and glucose tolerance. *Brain Res*. 957(1):144-151 (2002)
25. Li R, Ou J, Li L, Yang Y, Zhao J, Wu R. The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 Mediates Olanzapine-Induced Weight Gain and Insulin Resistance. *Front Pharmacol*. 9:379 (2018)
26. Engl J, Laimer M, Niederwanger A, Kranebitter M, Starzinger M, Pedrini MT, Fleischhacker WW, Patsch JR, Ebenbichler CF. Olanzapine impairs glycogen synthesis and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells. *Mol Psychiatry*. 10(12):1089-1096 (2005)
27. Hardy TA, Henry RR, Forrester TD, Kryzhanovskaya LA, Campbell GM, Marks DM, Mudaliar S. Impact of olanzapine or risperidone treatment on insulin sensitivity in schizophrenia or schizoaffective disorder. *Diabetes Obes Metab*. 13(8):726-735 (2011)
28. Schoemaker J, Stet L, Vrijland P, Naber D, Panagides J, Emsley R. Long-term efficacy and safety of asenapine or olanzapine in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder: an extension study. *Pharmacopsychiatry*. 45(5):196-203 (2012)
29. He M, Deng C, Huang XF. The role of hypothalamic H1 receptor antagonism in antipsychotic-induced weight gain. *CNS Drugs*. 27(6):423-434 (2013)
30. 日本イーライリリー株式会社：ジプレキサ錠インタビューフォーム改訂第22版。
https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/530471_1179044F1029_1_28F_1F.pdf (2018)

31. Deng C. Effects of antipsychotic medications on appetite, weight, and insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 42(3):545-563 (2013)
32. Li H, Fang M, Xu M, Li S, Du J, Li W, Chen H. Chronic Olanzapine Treatment Induces Disorders of Plasma Fatty Acid Profile in Balb/c Mice: A Potential Mechanism for Olanzapine-Induced Insulin Resistance. *PLoS One.* 11(12):e0167930 (2016)
33. Hägg S, Joelsson L, Mjörndal T, Spigset O, Oja G, Dahlqvist R. Olanzapine-induced destabilization of diabetes in the absence of weight gain. *J Clin Psychiatry.* 59(6):294-299 (1998)
34. Ozasa R, Okada T, Nadanaka S, Nagamine T, Zyryanova A, Harding H, Ron D, Mori K. The Antipsychotic Olanzapine Induces Apoptosis in Insulin-secreting Pancreatic β Cells by Blocking PERK-mediated Translational Attenuation. *Cell Struct Funct.* 38(2):183-195 (2013)
35. Fatemi SH. Olanzapine increases glucogenesis by multiple pathways in brain and muscle. *Mol Psychiatry.* 11(6):524-525 (2006)
36. Ikegami M, Ikeda H, Ohashi T, Ohsawa M, Ishikawa Y, Kai M, Kamei A, Kamei J. Olanzapine increases hepatic glucose production through the activation of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Diabetes Obes Metab.* 15(12):1128-1135 (2013)
37. Shu S, Liu H, Wang M, Su D, Yao L, Wang G. Subchronic olanzapine treatment decreases the expression of pancreatic glucose transporter 2 in rat pancreatic β cells. *J Endocrinol Invest.* 37(7):667-673 (2014)
38. Babkin P, George Thompson AM, Iancu CV, Walters DE, Choe JY. Antipsychotics inhibit glucose transport: Determination of olanzapine binding site in *Staphylococcus epidermidis* glucose/H(+) symporter. *FEBS Open Bio.* 5:335-340 (2015)
39. Nagata M, Nakajima M, Ishiwata Y, Takahashi Y, Takahashi H, Negishi K, Yasuhara M. Mechanism Underlying Induction of Hyperglycemia in Rats by Single Administration of Olanzapine. *Biol Pharm Bull.* 39(5):754-761 (2016)
40. Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Madsen O, Vassalli JD, Perrelet A. Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells. *Cell.* 42(2):671-681 (1985)
41. Davidson HW, Rhodes CJ, Hutton JC. Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature.* 333(6168):93-96 (1988)
42. Halban PA, Irminger JC. Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem J.* ;299 (Pt 1):1-18 (1994)
43. Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem.* 219(3):713-725 (1994)
44. Orci L, Unger RH, Ravazzola M, Ogawa A, Komiya I, Baetens D, Lodish HF, Thorens B. Reduced beta-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats. *J Clin Invest.* 86(5):1615-1522 (1990)
45. Johnson JH, Ogawa A, Chen L, Orci L, Newgard CB, Alam T, Unger RH. Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science.* 250(4980):546-549 (1990)
46. Matschinsky FM, Ellerman JE. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 243(10):2730-2736 (1968)
47. Seino S, Shibasaki T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev.* 85(4):1303-1342 (2005)

48. Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther.* 113(3):546-593 (2007)
49. Ito K, Dezaki K, Yoshida M, Yamada H, Miura R, Rita RS, Ookawara S, Tabei K, Kawakami M, Hara K, Morishita Y, Yada T, Kakei M. Endogenous α 2A-Adrenoceptor-Operated Sympathoadrenergic Tones Attenuate Insulin Secretion via cAMP/TRPM2 Signaling. *Diabetes.* 66(3):699-709 (2017)
50. Fain JN. Insulin secretion and action. *Metabolism.* 33(7):672-679 (1984)
51. Lacey RJ, Cable HC, James RF, London NJ, Scarpello JH, Morgan NG. Concentration-dependent effects of adrenaline on the profile of insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *J Endocrinol.* 138(3):555-563 (1993)
52. Ahrén B. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 8(5):369-385 (2009)
53. Scrocchi LA, Brown TJ, MaClusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, Drucker DJ. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med.* 2(11):1254-1258 (1996)
54. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 87(4):1409-1439 (2007)
55. Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, Wilson CP. Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(7):4339-4343 (1981)
56. Ashcroft SJ, Hammonds P, Harrison DE. Insulin secretory responses of a clonal cell line of simian virus 40-transformed B cells. *Diabetologia.* 29(10):727-733 (1986)
57. Hill RS, Boyd AE 3rd. Perfusion of a clonal cell line of Simian virus 40-transformed beta cells. Insulin secretory dynamics in response to glucose, 3-isobutyl-1-methylxanthine, and potassium. *Diabetes.* 34(2):115-120 (1985)
58. Lambert DG, Hughes K, Atkins TW. Insulin release from a cloned hamster B-cell line (HIT-T15). The effects of glucose, amino acids, sulphonylureas and colchicine. *Biochem Biophys Res Commun.* 140(2):616-625 (1986)
59. Rubí B, Ljubicic S, Pournourmohammadi S, Carobbio S, Armanet M, Bartley C, Maechler P. Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin secretion. *J Biol Chem.* 280(44):36824-36832 (2005)
60. Chen Y, Hong F, Chen H, Fan RF, Zhang XL, Zhang Y, Zhu JX. Distinctive expression and cellular distribution of dopamine receptors in the pancreatic islets of rats. *Cell Tissue Res.* 357(3):597-606 (2014)
61. Ustione A, Piston DW. Dopamine Synthesis and D3 Receptor Activation in Pancreatic β -Cells Regulates Insulin Secretion and Intracellular $[Ca^{2+}]$ Oscillations. *Mol Endocrinol.* 26(11):1928-1940 (2012)
62. Zhang Q, Zhu Y, Zhou W, Gao L, Yuan L, Han X. Serotonin receptor 2C and insulin secretion. *PLoS One.* 8(1):e54250 (2013)
63. Farino ZJ, Morgenstern TJ, Maffei A, Quick M, De Solis AJ, Wiryasermkul P, Freyberg RJ, Aslanoglou D, Sorisio D, Inbar BP, Free RB, Donthamsetti P, Mosharov EV, Kellendonk C, Schwartz GJ, Sibley DR, Schmauss C, Zeltser LM, Moore H, Harris PE, Javitch JA, Freyberg Z. New roles for

dopamine D2 and D3 receptors in pancreatic beta cell insulin secretion. *Mol Psychiatry* (2019)

64. Bennet H, Mollet IG, Balhuizen A, Medina A, Nagorny C, Bagge A, Fadista J, Ottosson-Laakso E, Vikman P, Dekker-Nitert M, Eliasson L, Wierup N, Artner I, Fex M. Serotonin (5-HT) receptor 2b activation augments glucose-stimulated insulin secretion in human and mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 59(4):744-754 (2016)
65. Cataldo LR, Mizgier ML, Bravo Sagua R, Jaña F, Cárdenas C3,4,5, Llanos P, Busso D, Olmos P, Galgani JE, Santos JL, Cortés VA. Prolonged Activation of the Htr2b Serotonin Receptor Impairs Glucose Stimulated Insulin Secretion and Mitochondrial Function in MIN6 Cells. *PLoS One*. 12(1):e0170213 (2017)
66. Bonhaus DW, Bach C, DeSouza A, Salazar FH, Matsuoka BD, Zuppan P, Chan HW, Eglen RM. The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine2B (5-HT2B) receptor gene products: comparison with 5-HT2A and 5-HT2C receptors. *Br J Pharmacol*. 115(4):622-628 (1995)
67. Szukiewicz D, Szewczyk G, Mittal TK, Rongies W, Maslinski S. Involvement of histamine and histamine H2 receptors in nicotinamide-induced differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing cells. *Inflamm Res*. 59 Suppl 2:S209-211 (2010)
68. Ikegami M, Ikeda H, Ishikawa Y, Ohsawa M, Ohashi T, Kai M, Kamei A, Kamei J. Olanzapine induces glucose intolerance through the activation of AMPK in the mouse hypothalamus. *Eur J Pharmacol*. 718(1-3):376-382 (2013)
69. Castellani LN, Pepler WT, Sutton CD, Whitfield J, Charron MJ, Wright DC. Glucagon receptor knockout mice are protected against acute olanzapine-induced hyperglycemia. *Psychoneuroendocrinology*. 82:38-45 (2017)
70. Boyda HN, Procyshyn RM, Asiri Y, Wu C, Wang CK, Lo R, Pang CC, Honer WG, Barr AM. Antidiabetic-drug combination treatment for glucose intolerance in adult female rats treated acutely with olanzapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 48:170-176 (2014)
71. Chintoh AF, Mann SW, Lam L, Lam C, Cohn TA, Fletcher PJ, Nobrega JN, Giacca A, Remington G. Insulin Resistance and Decreased Glucose-Stimulated Insulin Secretion After Acute Olanzapine Administration. *J Clin Psychopharmacol*. 28(5):494-499 (2008)
72. Melkersson K. Clozapine and olanzapine, but not conventional antipsychotics, increase insulin release in vitro. *Eur Neuropsychopharmacol*. 14(2):115-119 (2004)
73. Mauri MC, Paletta S, Maffini M, Colasanti A, Dragogna F, Di Pace C, Altamura AC. Clinical pharmacology of atypical antipsychotics: an update. *EXCLI J*. 13:1163-1191 (2014)
74. Tanimoto M, Kanazawa A, Hirose T, Yoshihara T, Kobayashi-Kimura S, Nakanishi R, Tosaka Y, Sasaki-Omote R, Kudo-Fujimaki K, Komiya K, Ikeda F, Someya Y, Mita T, Fujitani Y, Watada H. Comparison of sitagliptin with nateglinide on postprandial glucose and related hormones in drug-naïve Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: A pilot study. *J Diabetes Investig*. 6(5):560-566 (2015)
75. Bennet H, Balhuizen A, Medina A, Dekker Nitert M, Ottosson Laakso E, Essén S, Spégel P, Storm P, Krus U, Wierup N, Fex M. Altered serotonin (5-HT) 1D and 2A receptor expression may contribute to defective insulin and glucagon secretion in human type 2 diabetes. *Peptides*. 71:113-120 (2015)
76. Iturriza FC, Thibault J. Immunohistochemical investigation of tyrosine-hydroxylase in the islets of Langerhans of adult mice, rats and guinea pigs. *Neuroendocrinology*. 57(3):476-480 (1993)
77. Watanabe T, Nagatsu I. Immunohistochemical colocalization of insulin, aromatic L-amino acid decarboxylase and dopamine beta-hydroxylase in islet B cells of chicken pancreas. *Cell Tissue Res*.

263(1):131-136 (1991)

78. Takayanagi M, Watanabe T. Immunocytochemical colocalizations of insulin, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase, S-100 protein and chromogranin A in B-cells of the chicken endocrine pancreas. *Tissue Cell.* 28(1):17-24 (1996)
79. Lindström P. Aromatic-L-amino-acid decarboxylase activity in mouse pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta.* 884(2):276-281 (1986)
80. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der Hart M, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H, German MS. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med.* 16(7):804-808 (2010)
81. Zhang Y, Deng R, Yang X, Xu W, Liu Y, Li F, Zhang J, Tang H, Ji X, Bi Y, Wang X, Zhou L, Ning G. Glucose potentiates β -cell function by inducing Tph1 expression in rat islets. *FASEB J.* 31(12):5342-5355 (2017)
82. Schraenen A, Lemaire K, de Faudeur G, Hendrickx N, Granvik M, Van Lommel L, Mallet J, Vodjdani G, Gilon P, Binart N, in't Veld P, Schuit F. Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia.* 53(12):2589-2599 (2010)
83. Tanimoto A, Matsuki Y, Tomita T, Sasaguri T, Shimajiri S, Sasaguri Y. Histidine decarboxylase expression in pancreatic endocrine cells and related tumors. *Pathol Int.* 54(6):408-412 (2004)
84. Chiu CC, Chen KP, Liu HC, Lu ML. The early effect of olanzapine and risperidone on insulin secretion in atypical-naïve schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol.* 26(5):504-507 (2006)
85. Sowell MO, Mukhopadhyay N, Cavazzoni P, Shankar S, Steinberg HO, Breier A, Beasley CM Jr, Dananberg J. Hyperglycemic clamp assessment of insulin secretory responses in normal subjects treated with olanzapine, risperidone, or placebo. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(6):2918-2923 (2002)
86. Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Okamura T, Uchida T, Fujitani Y, Akagawa K, Kakei M, Watada H, German MS, Nagamatsu S. Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic β cells during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(48):19420-19425 (2013)
87. Simpson N, Maffei A, Freeby M, Burroughs S, Freyberg Z, Javitch J, Leibel RL, Harris PE. Dopamine-Mediated Autocrine Inhibitory Circuit Regulating Human Insulin Secretion in Vitro. *Mol Endocrinol.* 26(10):1757-1772 (2012)
88. Underland LJ, Mark ER, Katikaneni R, Heptulla R. The Impact of Dopamine on Insulin Secretion in Healthy Controls. *Indian J Crit Care Med.* 22(4):209-213 (2018)
89. Svendsen B, Larsen O, Gabe MBN, Christiansen CB, Rosenkilde MM, Drucker DJ, Holst JJ. Insulin Secretion Depends on Intra-islet Glucagon Signaling. *Cell Rep.* 25(5):1127-1134.e2 (2018)
90. Huising MO, van der Meulen T, Huang JL, Pourhosseinzadeh MS, Noguchi GM. The Difference δ -Cells Make in Glucose Control. *Physiology (Bethesda).* 33(6):403-411 (2018)
91. Hauge-Evans AC1, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson IC, Low MJ, Christie MR, Persaud SJ, Jones PM. Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes.* 58(2):403-411 (2009)
92. LeBlanc J, Ducharme MB. Plasma dopamine and noradrenaline variations in response to stress. *Physiol Behav.* 91(2-3):208-211 (2007)

93. de Leeuw van Weenen JE, Parlevliet ET, Maechler P, Havekes LM, Romijn JA, Ouwens DM, Pijl H, Guigas B. The dopamine receptor D2 agonist bromocriptine inhibits glucose-stimulated insulin secretion by direct activation of the α 2-adrenergic receptors in beta cells. *Biochem Pharmacol.* 79(12):1827-1836 (2010)
94. Brioni JD, Moreland RB, Cowart M, Hsieh GC, Stewart AO, Hedlund P, Donnelly-Roberts DL, Nakane M, Lynch JJ 3rd, Kolasa T, Polakowski JS, Osinski MA, Marsh K, Andersson KE, Sullivan JP. Activation of dopamine D4 receptors by ABT-724 induces penile erection in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(17):6758-6763 (2004)
95. Merchant KM, Gill GS, Harris DW, Huff RM, Eaton MJ, Lookingland K, Lutzke BS, Mccall RB, Piercey MF, Schreur PJ, Sethy VH, Smith MW, Svensson KA, Tang AH, Vonvoigtlander PF, Tenbrink RE. Pharmacological characterization of U-101387, a dopamine D4 receptor selective antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 279(3):1392-1403 (1996)
96. Keibian JW. Multiple classes of dopamine receptors in mammalian central nervous system: the involvement of dopamine-sensitive adenylyl cyclase. *Life Sci.* 23(5):479-483 (1978)
97. Holz GG. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes.* 53(1):5-13 (2004)
98. Heimes K, Feistel B, Verspohl EJ. Impact of the 5-HT₃ receptor channel system for insulin secretion and interaction of ginger extracts. *Eur J Pharmacol.* 624(1-3):58-65 (2009)
99. Paulmann N, Grohmann M, Voigt JP, Bert B, Vowinkel J, Bader M, Skelin M, Jevsek M, Fink H, Rupnik M, Walther DJ. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol.* 7(10):e1000229 (2009)
100. Nakamura T, Yoshikawa T, Noguchi N, Sugawara A, Kasajima A, Sasano H, Yanai K. The expression and function of histamine H₃ receptors in pancreatic beta cells. *Br J Pharmacol.* 171(1):171-185 (2014)
101. Hervé P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med.* 99(3):249-254 (1995)
102. Tikkanen R, Saukkonen T, Fex M, Bennet H, Rautiainen MR, Paunio T, Koskinen M, Panarsky R, Bevilacqua L, Sjöberg RL, Tiihonen J, Virkkunen M. The effects of a HTR2B stop codon and testosterone on energy metabolism and beta cell function among antisocial Finnish males. *J Psychiatr Res.* 81:79-86 (2016)
103. Nichols CD, Sanders-Bush E. Serotonin Receptor Signaling and Hallucinogenic Drug Action. *Heffer Rev. Psychadelic Res.* 2:73-79 (2001)
104. Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev.* 49(3):253-278 (1997)