

平成30年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09391

研究課題名(和文) インスリン受容体2段階切断機構がもたらす病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Pathological mechanism of sequential cleavage model of insulin receptor

研究代表者

湯浅 智之 (YUASA, Tomoyuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・特任准教授

研究者番号：50304556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：可溶性インスリン受容体(soluble Insulin Receptor; sIR)はヒト血液中に存在し、その濃度は血糖値に比例する。我々はカルパイン2がエクソソーム系を介して細胞外でインスリン受容体サブユニットを切断し、さらにセクレターゼが細胞膜通過ドメインを切断することを明らかにした。インスリン受容体の切断はインスリンシグナルを抑制し、切断の阻害はインスリンシグナルを回復した。抗糖尿病薬であるメトホルミンはインスリン受容体の切断を抑制した。さらに、2型糖尿病患者において血中sIR値はインスリン感受性と負に相関した。一方で、女性ホルモンがインスリン受容体の切断を促進する可能性も示した。

研究成果の概要(英文)：Soluble insulin receptor (sIR), the ectodomain of IR, was detected in human plasma and its concentration paralleled that of blood glucose. We have previously developed an in vitro model using HepG2 liver-derived cells, which mimics changes in sIR levels in plasma from patients with diabetes. Using the in vitro model, we determined that calpain 2, which is secreted into the extracellular space associated with exosomes, cleaved the ectodomain of IR subunit, which in turn promoted the intramembrane cleavage of IR subunit by γ -secretase. IR cleavage impaired insulin signalling, and the inhibition of IR cleavage restored it. The antidiabetic drug, metformin, prevented IR cleavage. In patients with type 2 diabetes, plasma sIR levels inversely correlated with insulin sensitivity. Furthermore, female hormone was also shown to promote insulin receptor cleavage.

研究分野：生化学 分子生物学 糖尿病学

キーワード：可溶性インスリン受容体 インスリン抵抗性 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

我々はインスリン受容体の細胞外ドメインが切断された可溶性インスリン受容体 (soluble Insulin Receptor; sIR) が血清中に存在していることを世界で初めて報告した (*Diabetes*, 2007)。この分子の ELISA 測定法を確立し、糖尿病患者群において健常者群より血中の sIR が有意に増加していることを見出した。血中 sIR 値は、糖尿病患者の血糖値および血糖値指標 (HbA1c, グリコアルブミン) と有意な正の相関を示し新規のマーカーとしての可能性を有しているが、sIR 値と他の血糖値指標との根源的な違いは、sIR がインスリン受容体という糖代謝を担う分子そのものに由来することである。この事実は、インスリン受容体が切断され sIR が産生されることに高血糖を招く要因があることを示唆している。我々は、ヒト培養肝細胞株 (HepG2) を用いることにより高ブドウ糖処理によるインスリン受容体切断の促進を再現する *in vitro* 系の構築に成功し、O 型糖鎖付加反応とカルシウム依存性蛋白分解酵素が関与することを明らかにした (*BBRC*, 2014)。

一方、75 g ブドウ糖負荷試験では、血中 sIR 値は負荷後血糖値と有意な正の相関を示した。これは、sIR と耐糖能に因果関係が存在することを示唆するものであるが、負荷後血糖値が正常域にもかかわらず sIR 値が高値を示す群があり、そのほとんどが閉経前の女性であった。

2. 研究の目的

本研究では、インスリン受容体の切断を担うカルシウム依存性蛋白分解酵素を同定し、切断の分子機構の全容を解明するとともに、本事象がインスリンシグナルに与える影響を *in vitro* 及び *in vivo* で検証する。また、高血糖以外のインスリン受容体の切断を促進する因子について探索する。

3. 研究の方法

(1) インスリン受容体切断機構の全容解明

とインスリンシグナルへの影響

カルシウム依存性蛋白分解酵素としてカルパイン 2 に注目する。インスリン受容体の切断を再現する *in vitro* 系を用いて siRNA によるカルパイン 2 のノックダウンによるインスリン受容体切断への関わりを検討する。また、切断酵素を同定したのちにインスリンシグナルへの影響を確認する。

(2) インスリン受容体切断とインスリン抵抗性

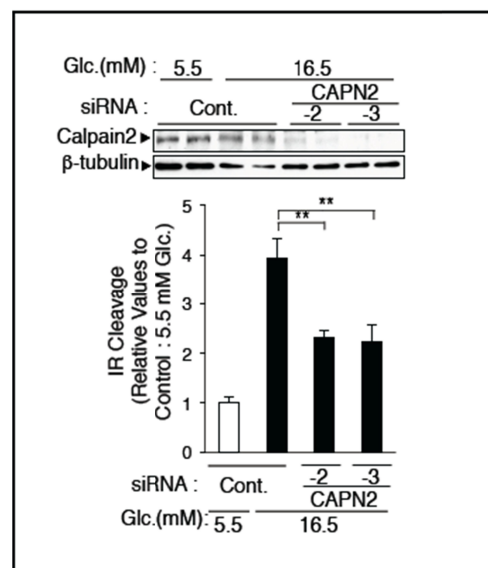
2 型糖尿病患者を対象にインスリンランブ法を実施し、インスリン感受性と血中 sIR 値を評価する。

(3) インスリン受容体切断と女性ホルモン

in vitro 系を用いて女性ホルモンによるインスリン受容体切断系を確立し、切断促進とインスリン抵抗性の分子機構を明らかにする。また、正常妊娠及び妊娠糖尿病の経過における血中 sIR 値の変動を検証する。

4. 研究成果

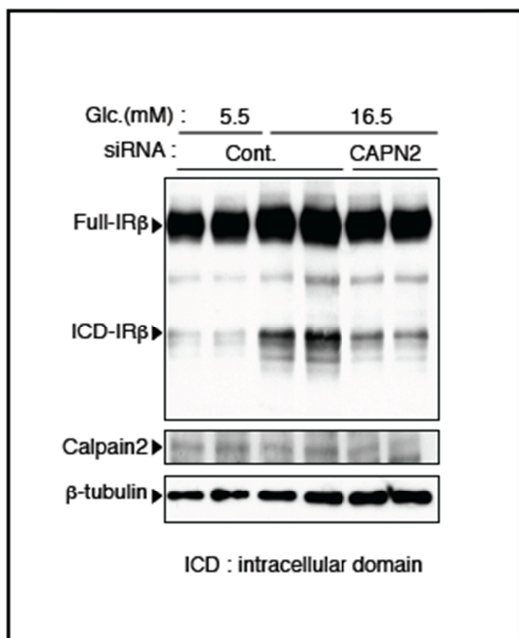
(1) インスリン受容体切断機構の全容解明とインスリンシグナルへの影響



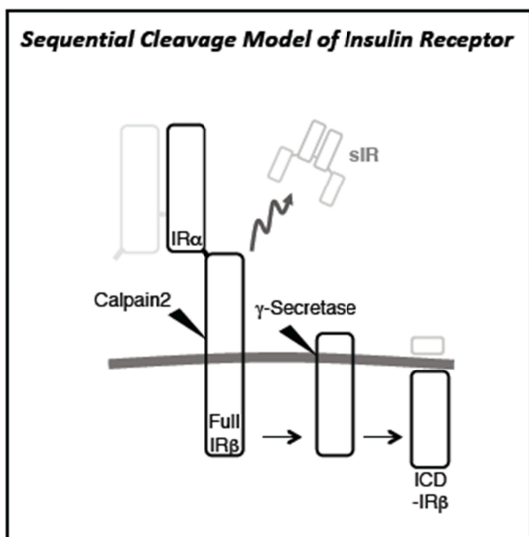
in vitro 系において、siRNA を用いてカルパイン 2 をノックダウンすると培養液中の sIR は有意に低下しており、カルパイン 2 がインスリン受容体を切断することが示された。さ

らに、カルパイン2はインスリン受容体を直接切断することも確認した。

次に、カルパイン2によるインスリン受容体の切断に続いてセクレターゼがインスリン受容体細胞膜通過ドメインを切断し、インスリン受容体細胞内ドメインを産生していることを示した。

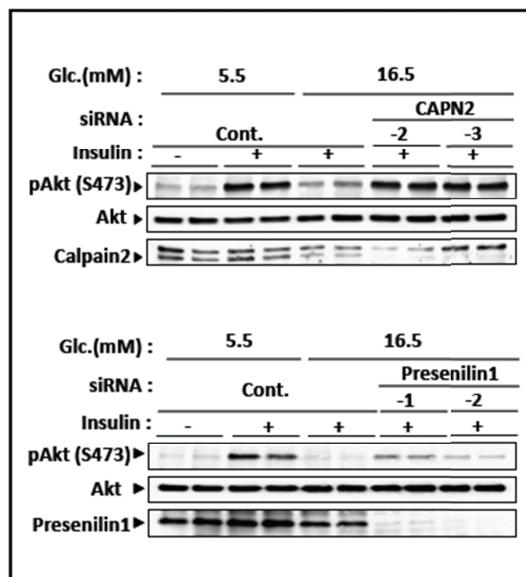


すなわち、インスリン受容体はカルパイン2により細胞外で切断されたのちに細胞膜通過ドメインで切断されるという二段階の切断を受けていることを示した。

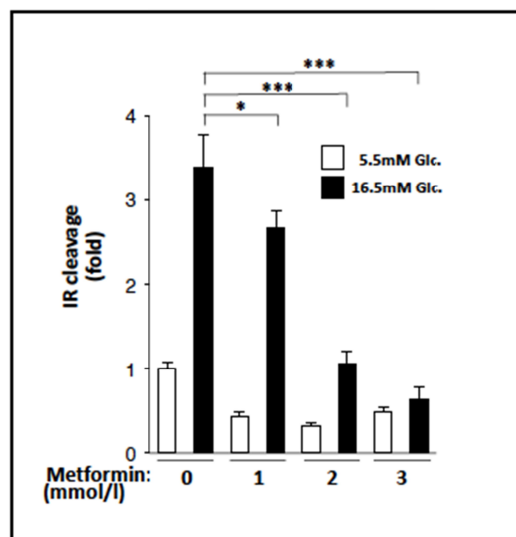


同時にインスリン受容体の切断はインスリン刺激によるAktのリン酸化を抑制しており、これはカルパイン2とセクレターゼのノック

ダウンにより改善することからインスリン受容体の切断がインスリンシグナルを負に制御していることが明らかとなり、インスリン抵抗性の一因になっていると考えられた。



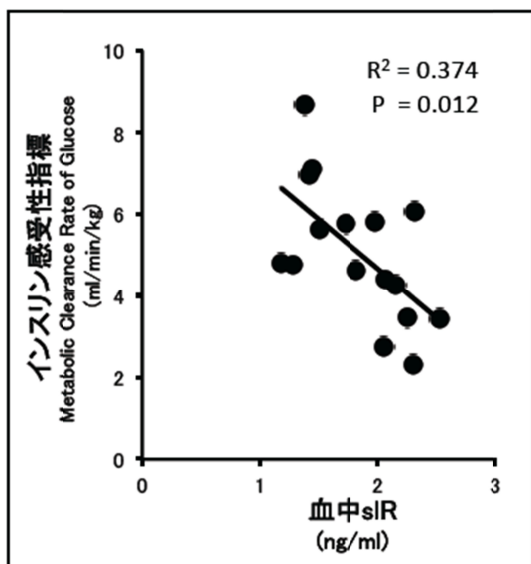
また、本来細胞内に局在するカルパイン2はexosome系によって細胞外に分泌されていること、さらにインスリン抵抗性改善薬として既に利用されているメトホルミンがインスリン受容体の切断を濃度依存性に抑制していることを見出した。



(2) インスリン受容体切断とインスリン抵抗性

インスリンクランプ法を用いて血中sIR値が2型糖尿病患者のインスリン感受性と負に相関することを示した。すなわち、インスリン受容体の切断は*in vitro*系の結果から予測

されるように、生体においてもインスリンシグナルを負に制御し、インスリン抵抗性の一因となることが示された。



(3) インスリン受容体切断と女性ホルモン
インスリン受容体切断と女性ホルモンの関係について基礎的検討を行った。糖負荷試験において血中sIR値が血糖値非依存性に高値を示す群が女性優位であることから、月経周期によりsIR値が変動する可能性を見出した。さらに、妊婦血清中のsIR値は女性ホルモンと正に相関し、血糖値や体重といった他のマーカーとは相関を認めなかった。*in vitro*系では、女性ホルモンが培養液中sIRを増加させている可能性が示された。すなわち、女性ホルモンがインスリン受容体の切断を介してインスリン感受性を調節するメカニズムが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Yuasa T, Amo-Shiinoki K, Ishikura S, Takahara M, Matsuoka T, Kaneto H, Kuroda A, Matsuhisa M, Hashida S. Sequential cleavage of insulin receptor by calpain 2 and γ -secretase impairs insulin signalling. 査読有, *Diabetologia*. 59, 2711-2721, 2016

Sasaki T, Kuroko M, Sekine S, Matsui S, Kikuchi O, Susanti VY, Kobayashi M, Tanaka Y, Yuasa T, Kitamura T. Overexpression of insulin receptor partially improves obese and diabetic phenotypes in db/db mice. *Endocr J*. 査読有, 62, 787-796, 2015

[学会発表](計 2 件)

湯浅智之

インスリン受容体の切断が担う新規インスリン抵抗性分子機構、脳心血管抗加齢研究会 2015、2015年11月29日、梅田スカイビル(大阪府)

湯浅智之、橋田誠一、蛭名洋介

インスリン受容体二段階切断が担う新規インスリン抵抗性分子機構、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月22日、グランプラスセントヴァレンタイン(山口県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 智之 (YUASA, Tomoyuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・特任准教授 研究者番号: 50304556