

機関番号：16101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21790279
研究課題名（和文） 糖尿病でのインスリン受容体細胞外ドメイン切断の分子メカニズムとその生理的意義
研究課題名（英文） Mechanism of secreting soluble insulin receptor in diabetes

研究代表者
長屋 寿雄 (NAGAYA HISAO)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
研究者番号：60464343

研究成果の概要（和文）：

インスリンは糖尿病における重要なタンパク質の一つである。その受容体のインスリン受容体もまた同様に重要なタンパク質である。我々は、糖尿病においてインスリン受容体が切断されることを見出した。本研究では、それが培養細胞を使っても再現することができることを確認し、そのメカニズム解明の手がかりを手に入れることができた。

研究成果の概要（英文）：

Insulin is one of the key proteins in diabetes. Insulin receptor is also important in diabetes. We found that soluble insulin receptor in serum is increased in diabetes. In this study, we reconstructed that insulin receptor is released using human cultured cell line and human insulin receptor overexpression cell line. This system will be contributed the uncovering diabetes mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

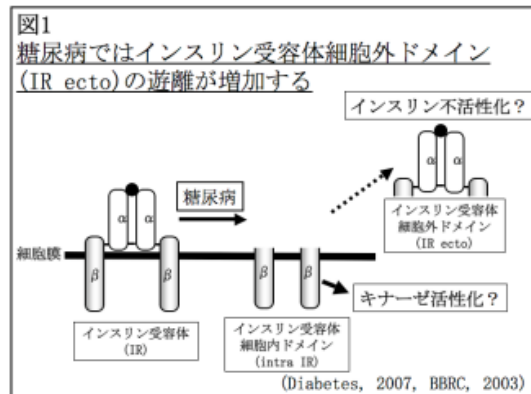
科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学、インスリンシグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

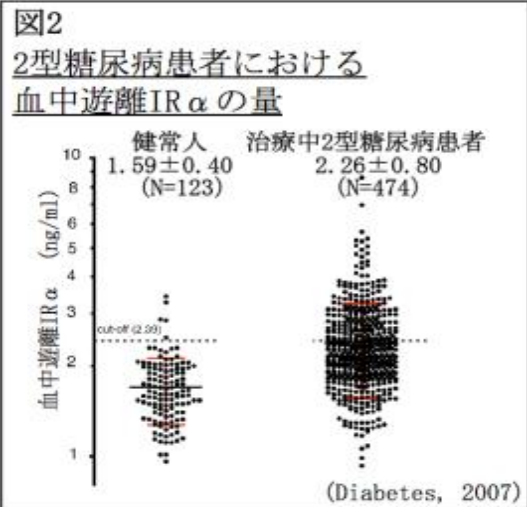
糖尿病は、世界的に患者数が増加しており、我が国においてもその予備軍を含めると全人口の10%を既に超えている。糖尿病の予防法や治療法の開発は急務であり、そのためには、発症、悪化の分子メカニズムを解明することが非常に重要な鍵となる。

糖尿病はインスリン作用の低下やインスリン分泌の不足から発症する。その受容体であるインスリン受容体(IR)の分子構造は、インスリン結合ドメインがある α サブユニット(IR α)、膜貫通ドメインとチロシンキナーゼドメインがある β サブユニット(IR β)からなり、一本のポリペプチドとして合成された後、ジスルフィド結合を介して、インスリン受容体のホモダイマーを形成する。その後、*furin*プロテアーゼによりIR α とIR β に切断され、結果的にテトラマーを形成する(図1)。



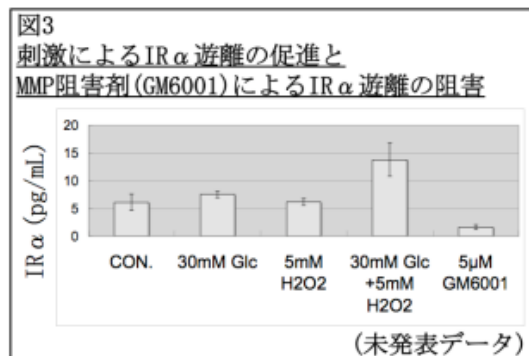
申請者のグループは、最近、MBL社と共同で血中sIRを定量するヒト特異的IR α 測定用ELISAキットを開発した。そして、糖尿病患者では血中の可溶性インスリン受容体(sIR)値が有意に増加し、それは血糖値と相関しているという予想外の発見をした(図1, 2, Diabetes, 2007)。また、*in vitro*においてsIRがインスリンと結合すること、マウスでの実験によりsIRがインスリン作用を阻害していることを報告した(BBRC, 2003)。

最近、申請者はCHO細胞にヒトIRを安定



発現させたCHO hIR細胞株を用いて、培地への30mM glucose, 5mM H₂O₂の共添加によりsIRの遊離が促進されること、また、マトロプロテアーゼの広域な阻害剤であるGM6001などにより、sIRの遊離が阻害されることを見出した(図3, 未発表)。

国内外において、血中に遊離するsIRに関する研究の報告は、この10年間では、申請者のグループ以外はなく、sIR測定試薬を開発した申請者のグループは他の追随を許さない。



2. 研究の目的

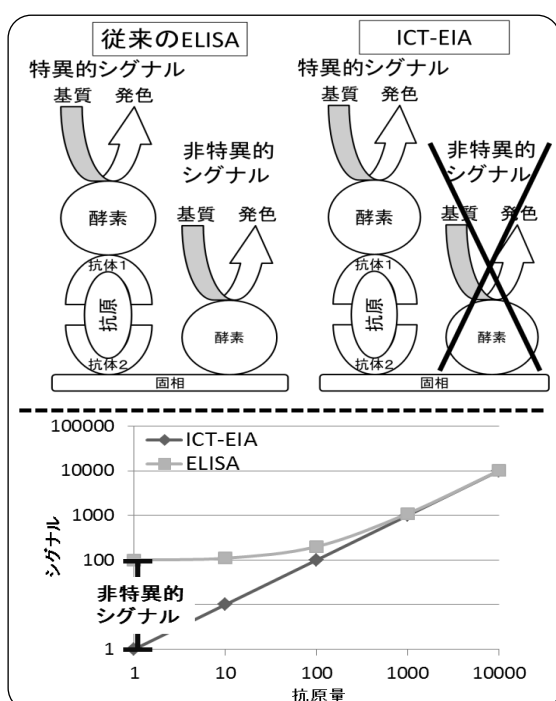
申請者のグループは、糖尿病患者において、IRの切断により生じた可溶性インスリン受容体(sIR)が増加していることを発見した。また、*in vitro*においてsIRがインスリンと結合すること、マウスを用いた*in vivo*実験

において sIR がインスリン作用を阻害していることを報告した。そこで、本研究では、糖尿病におけるインスリン受容体細胞外ドメインの切断の分子メカニズムとその生理的意義の解明を目的とする。

3. 研究の方法

可溶性インスリン受容体を遊離するヒト培養細胞株の探索

申請者のグループは超高感度イムノアッセイ測定法（原理：下図）を用いて、従来の ELISA では検出限界以下であったヒトインス



リン受容体安定発現 CHO 細胞株から sIR の遊離を検出した (図 3)。そこで、その遊離に関与する MMP を同定するためにノックダウン実験を行おうと試みたが、ハムスターではその解析は進んでいなかった。そこで、解析が進んでいるヒト MMP の網羅的なノックダウン解析を行うために、ヒト由来細胞株において可溶性インスリン受容体の放出する細胞株の探索を試みる。

sIR 遊離ヒト培養細胞株における薬剤依存性

について

特定のヒト培養細胞株においてのみ、sIR の放出が観察された。そこで、その細胞におけるグルコース感受性及び MMP 阻害剤感受性について、超高感度イムノアッセイを用いて sIR の測定をおこなった。

4. 研究成果

可溶性インスリン受容体を遊離するヒト培養細胞株の探索

複数のヒト組織由来の培養細胞株において、それぞれの培養液上清中の sIR を測定したところ、特定の細胞株のみ検出が可能であることを観察した。

sIR 遊離ヒト培養細胞株における薬剤依存性

申請者らのグループは、ヒト個体において、糖尿病つまり高血糖により sIR の遊離が促進することが報告されている (2007, BBRC)。そこで、前述の培養細胞株 D におけるグルコース依存性を調べたところ、濃度依存的に培養液中に遊離してくる sIR 量が増加することを観察した。

また、ヒトインスリン受容体安定発現 CHO 細胞において、sIR が MMP 阻害剤により有意に減少することを確認したことから、同様の実験をある細胞株に対して行なったところ、CHO 培養細胞で観察された結果とは逆の結果になることを観察した。現在は、sIR 遊離能を有する培養細胞株における分子メカニズムを解析中である。

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 1 件)

長屋寿雄, 田村拓, 小胞体内分泌タンパク質のダイナミクスの制御機構, 生化学 (日本生

化学会) , July, 2009; Vol. 81, Issue 7, page 605-609 査読無

〔学会発表〕 (計6件)

1. Yuasa Tomoyuki, Nagaya Hisao, Hashida Seiichi, Asako Umehara, Yokota Ichiro, Obata Toshiyuki, Ebina Yousuke, Soluble insulin receptor ectodomain is elevated in the plasma of patients with diabetes., XI INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INSULIN RECEPTORS AND INSULIN ACTION, Naples, Oct. 2010.

2. 湯浅 智之, 小畑 利之, 横田 一郎, 岡本 英治, 長屋 寿雄, 橋田 誠一, 前川 聡, 柏木 厚典, 松本 満, 松本 俊夫, 岸 和弘, 蛭名 洋介, 可溶性インスリン受容体細胞外ドメイン(sIR α)は高血糖に相関して血中濃度が高まる, 1型糖尿病研究会, 第7回 1型糖尿病研究会, 日光, 2009年11月.

3. Yuasa Tomoyuki, Yano Seiji, Nishioka Yasuhiko, Kubo Yoshiaki, Takahashi Masayuki, Nakatsuji Hiroyoshi, Nagaya Hisao, Kanayama Hiro-omi, Arase Seiji, Sone Saburo, Ebina Yousuke, Soluble insulin receptor ectodomain in the plasma is a possible broad-spectrum tumor marker, The Japanese Cancer Association, 第68回 日本癌学会学術総会記事, pp. 450-450, Yokohama, Oct. 2009.

4. 湯浅 智之, 小畑 利之, 矢野 聖二, 岡本 英治, 西岡 安彦, 久保 宜明, 高橋 正幸, 中達 弘能, 長屋 寿雄, 金山 博臣, 荒瀬 誠治, 曾根 三郎, 蛭名 洋介, 可溶化インスリン受容体細胞外ドメイン(sIR)は癌患者血清中で増加している, 第29回 日本分子腫瘍マーカー研究会事務局, 第29回 日本分

子腫瘍マーカー研究会 プログラム, pp. 70-71, 横浜, 2009年9月.

5. Yuasa Tomoyuki, Obata Toshiyuki, Yokota Ichiro, Okamoto Eiji, Kanazaki Yoshiko, Maegawa Hiroshi, Hirota Fumiko, Kishi Kazuhiro, Hashida Seiichi, Nagaya Hisao, Yuko Ogura, Kazuhiko Masuda, Matsumoto Mitsuru, Matsumoto Toshio, Kashiwagi Atsunori, Ebina Yousuke, Soluble insulin receptor ectodomain is elevated in the plasma of patients with diabetes., International Symposium on Diabetes - Kickoff of Hannover-Tokushima Research Communion, Mar. 2009.

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)
なし

○取得状況 (計0件)
なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長屋 寿雄 (NAGAYA HISAO)

徳島大学・疾患酵素学研究中心・助教
研究者番号: 60464343

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし