

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790317

研究課題名（和文）インスリン受容体細胞外ドメイン切断とその臨床的意義の解明

研究課題名（英文）The study of the insulin receptor cleavage and its clinical significance

研究代表者 湯浅 智之（YUASA TOMOYUKI）

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：50304556

研究成果の概要（和文）：ヒト血中には可溶性インスリン受容体(sIR)が存在し、糖尿病患者で有意に増加している。本研究では、ヒト培養細胞株と超高感度 ELISA 測定法を用いて sIR の産生を再現する *in vitro* 系を構築した。本系は培養液中のブドウ糖濃度とブドウ糖処理時間に依存して sIR 濃度が増減するが、高浸透圧効果ではなくブドウ糖が何らかの生化学的分子生物学的機構により sIR を産生していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Soluble insulin receptor (sIR) was found to exist in human plasma and its amount was elevated in patients with diabetes. In this study, we have developed an *in vitro* cell model system, which mimics the sIR generation in humans, by using human cell line and an ultra-sensitive enzyme immunoassay for sIR. The sIR generation was positively correlated with the glucose concentration in the medium as well as the duration of the cell culture. In contrast, the identical osmolarity with sorbitol, mannitol or sodium chloride solutions did not stimulate the sIR generation. Therefore, glucose is thought to work as a stimulant for sIR after it is absorbed and metabolized in the cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

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

我々はヒトにおいてインスリン受容体の細胞外ドメインが切断され可溶化していることを発見した。この分子はインスリン受容

体 α サブユニットと β サブユニットの一部から構成されており、細胞膜表面上のインスリン受容体がある種のタンパク分解酵素により切断されていると考えられる。我々はこの分子を可溶性インスリン受容体(soluble

Insulin Receptor;sIR)と名付け、ELISA 測定法を確立することにより、治療中を含む糖尿病患者群において健常者群より血液中の sIR が有意に増加していることを見出した (Diabetes, 2007)。インスリン受容体は生体のインスリン作用を担っており、血糖値の調節には不可欠な分子である。故に、インスリン受容体が切断される事実は、生体の血糖値調節機構にとっては極めて非合理的な事象であると考えられる。特に、高血糖が続くときインスリン結合部位である α サブユニットを含む sIR が遊離することは、血中インスリンが sIR に結合し生体におけるインスリン作用を阻害すると推測され、多様な因子により構成されるインスリン抵抗性の一端を担っている可能性がある。事実、申請者らのグループは、精製したインスリン受容体細胞外ドメインをマウスに投与すると血糖値が上昇することを確認している。

2. 研究の目的

- 1) 可溶性インスリン受容体(sIR)とインスリン抵抗性の相関を明らかにする。：申請者らは sIR の発見以降、sIR に血中のインスリンが結合し不活化され、インスリン抵抗性の一因である可能性を提唱してきた。インスリン抵抗性とはインスリンにより高血糖が改善されにくい現象を言う。これは、糖尿病ばかりではなくメタボリックシンドロームなどの根底にある重要な現象であるが、その原因は未だ明らかではない。sIR とインスリン抵抗性指標の真の関係性を評価するには未治療糖尿病患者を検討する必要がある。申請者らは一部少数例の未治療糖尿病患者で解析を行ったところ、sIR 値とインスリン抵抗性指標に極めて強い相関を認めた。症例数を増やし、血中 sIR がインスリン抵抗性の一因となっている可能性を検証する。
- 2) 可溶性インスリン受容体(sIR)に結合しているインスリン量を定量する。：糖尿病におけるインスリン抵抗性の発現にインスリンの sIR への結合が関与しているとするれば、sIR に結合するインスリン量の定量化は病態を解明するうえで不可欠である。特に、糖尿病末期ではイン

スリン分泌が低下することは一般によく知られた事実であるが、絶対量が減少しているインスリンが血中の sIR に結合しさらに不活化されるとすると、悪化した糖尿病病態では重要な意味を持ってくると考えられる。さらに、日常診療で測定されているインスリン値が sIR に結合したインスリン (不活化インスリン) も測定した結果である可能性も示唆している。従って、この sIR に結合するインスリンの正確な定量は糖尿病臨床に重要な意味を持つ。

- 3) インスリン受容体細胞外ドメインの切断を再現する培養細胞系を確立する。：インスリン受容体細胞外ドメイン(sIR)が血中に存在しインスリン抵抗性の一因であるとするれば、細胞膜表面上でのインスリン受容体の切断の分子メカニズムの解明は重要である。培養細胞系でインスリン受容体の切断及びsIRの遊離を再現する。これまでの検討において、4種のヒト由来培養細胞株では、インスリン受容体が発現しているにもかかわらず、その培養液中に sIR が存在するものと存在しないものがあることが判明している。由来する組織によってインスリン受容体の切断が起きるものと起きないものがあることは、生体においてどの臓器あるいは組織に sIR が由来するのかを明らかにする上でも重要な知見となる。さらに、適当な培養細胞系の確立に成功すれば、何が引き金で切断が起きるのか解明できるようになる。

3. 研究の方法

- 1) 可溶性インスリン受容体 (sIR) とインスリン抵抗性: 未治療糖尿病患者を解析する。大学病院に通院する糖尿病患者は既に治療を受けており、倫理上、それを中断することはできない。従って、頻度は低い健康診断受診者を中心に新規に診断される未治療糖尿病患者を見出し、様々なデータと血清 sIR 値からインスリン抵抗性との関係を明らかにする。
- 2) 可溶性インスリン受容体(sIR)に結合

しているインスリンの定量化：sIR に結合するインスリン量を超高感度インスリン測定系を用いて正確に測定する系を確立する。sIR に結合しているインスリンは極めて微量であると予測され、従来使用されているインスリン測定系では正確な定量はできない。既に共同研究により、免疫複合体転移測定法による超高感度インスリン測定法のプロトタイプを開発している。この系では、2種類のビーズを用いて抗体とインスリンの複合体を移し換えて非特異的シグナルを最小化し、その結果測定バックグラウンドを格段に低下させられることから従来の ELISA 法の数百倍から千倍の感度でインスリンの定量が可能となる。sIR を抗ヒト特異的インスリン受容体抗体で免疫沈降し、sIR に結合するインスリンを二種類の抗インスリン抗体で測定するが、受容体がインスリンと結合する親和力より抗インスリン抗体がインスリンと結合する親和力が強いことにより測定されると考えられる。この測定系の有利な点は、ICT-EIA 法で用いる抗体は Fc 部分を除去しており、免疫沈降の際に用いる抗体吸着蛋白ビーズに干渉されることなく sIR に結合するインスリンを測定できるところである。in vitro の予備実験系での検討を経て、その後血清検体での測定法を確立する。

- 3) インスリン受容体細胞外ドメイン切断を再現する培養細胞系の確立：sIR を産生する培養細胞株を用いてヒトで観察されるようなグルコース濃度依存性のインスリン受容体細胞外ドメインの切断を再現する培養細胞系を確立する。これにより、sIR の産生がインスリン受容体を発現する細胞に普遍的なものであるのか、あるいは一部の組織に特異的なものなのかを示し、sIR が生体のどこに由来するものかを推定する、また、本系の確立によりインスリン受容体の切断機構を生化学的、分子生物学的に明らかにする。

4. 研究成果

sIR とインスリン抵抗性との関係を明らかにするため、未治療糖尿病患者における血中sIR 値とインスリン抵抗性指標を検討したところ両者の関係性を示唆する結果が得られた。そこで、インスリンクランプ法はインスリン抵抗性を最も正確に評価する方法論として確立しており、インスリンクランプ法によるインスリン抵抗性の評価とsIR 値の関連について症例数を増やしつつ検討している。

sIR に結合するインスリンを定量するため、種々の抗インスリン受容体抗体を用いてsIR を免疫沈降させる検討を行った。結果、多くの抗体はインスリン受容体との結合によりインスリンを遊離させるため、sIR を効率よく免疫沈降できる抗体は限定されることが判明した。この抗体を用いた定量法の開発を継続している。

次に、ヒト培養細胞株を用いてsIR の産生を再現する in vitro 系を構築した。本系では培養液中にsIR が存在するが、そのsIR はヒト血中に存在するsIR と分子的構造においてほぼ同一であることが確認できた。本系は培養液中のブドウ糖濃度に依存してsIR 濃度が増減するなど in vitro 系としての正当性を確認できた。さらに本系を用いることにより、sIR の産生は細胞内で短いインスリン受容体が産生されるのではなく、細胞膜表面上に存在する完全なインスリン受容体が切断されていることをほぼ実証できた。さらに本事象は高ブドウ糖によりもたらされる高浸透圧効果でないことも確認され、細胞内で代謝されたブドウ糖が何らかの生化学的分子生物学的機構によりインスリン受容体の切断を促進していることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 湯浅 智之、新規糖尿病関連分子 可溶性インスリン受容体の基礎と臨床、第 57 回日本臨床検査医学会中国・四国支部総会、第 152 回日本臨床化学会中国支部例会・総会、第 22 回日本臨床化学会四国支部例会・総会、第 8 回合同地方会、2012 年 2

月 5 日、岡山大学（岡山市）

- ② 本島 寛之、湯浅 智之 他、短期血糖コントロール指標としての血中可溶性インスリン受容体-ステロイドによる糖代謝悪化を検出できるのか？-、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 19 日、ロイトン札幌（札幌市）
- ③ 湯浅 智之、Soluble insulin receptor ectodomain is elevated in the plasma of patients with diabetes. XI
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INSULIN RECEPTORS AND INSULIN ACTION、2010 年 10 月 28 日、Royal Continental Hotel（イタリア・ナポリ）
- ④ 本島 寛之、湯浅 智之 他、短期血糖コントロール指標としての血中可溶性インスリン受容体 α サブユニットの有用性、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010 年 5 月 28 日、ホテルグランヴィア岡山（岡山市）
- ⑤ 梅原 麻子、湯浅 智之 他、尿中成長ホルモンを指標とした運動評価の検討、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010 年 5 月 27 日、ホテルグランヴィア岡山（岡山市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 智之（YUASA TOMOYUKI）
徳島大学・疾患酵素学研究センター・
准教授 研究者番号：50304556