

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659156

研究課題名（和文） 血中インスリンは可溶性インスリン受容体と結合し一部不活化されている？

研究課題名（英文） Is insulin inactivated by the binding with serum soluble insulin receptor (sIR)?

研究代表者

蛭名 洋介 (EBINA YOUSUKE)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：00112227

研究成果の概要（和文）：超高感度インスリン測定系は完成させることができた。そこで sIR-インスリン結合物を沈降させるため、この両者の結合に影響を与えない抗体を得ることができれば、sIR と結合しているインスリンを測定することは可能となる。βサブユニット N 末端に特異的に結合する抗体 18-44 を使用すれば受容体に対するインスリン結合能を阻害することなく、sIR-インスリン結合物を沈降できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We have established ultrasensitive ELISA insulin assay system. With the anti-IR antibody which does not inhibit the binding of sIR with insulin, we could measure the insulin which binds to sIR. We have succeeded to precipitate sIR-insulin complex by the monoclonal antibody 18-44 without affecting sIR-insulin complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：生体分子医学

### 1. 研究開始当初の背景

インスリンは生体必須のホルモンであり、その作用メカニズムを解明することは極めて

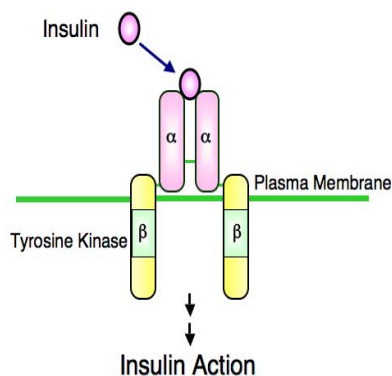


図1. インスリンシグナル伝達

て重要な課題である(図1)。我が国には約890万人の2型糖尿病患者と1,320万人の「糖尿病予備軍」があり、4大疾患の1つに指定されている。40歳以上の3人に1人が糖尿病かその予備軍である。それは標的細胞のインスリン作用不全に1つの主要原因があると考えられており、その病因の解明が緊急の課題となっている。

### 2. 研究の目的

申請者らのグループは、“糖尿病になるとインスリン受容体細胞外ドメイン (soluble Insulin Receptor: sIR (可溶性インスリン受容体)) が切断され、血中に遊離される”という予想外の発見をした(図2, Diabetes, 2007)。これはインスリン結合部

位である $\alpha$ サブユニットを含み、インスリンと結合してインスリンを不活化していると考えられ、糖尿病の病態における意義は大きい(図 3)。本研究は血中インスリンが sIR と結合し不活化されていることを明らかにし、かつ不活化インスリン量を正確に求める超高感度 ELISA 測定系を確立し糖尿病病態との関連性を明らかにすることを目的としている。

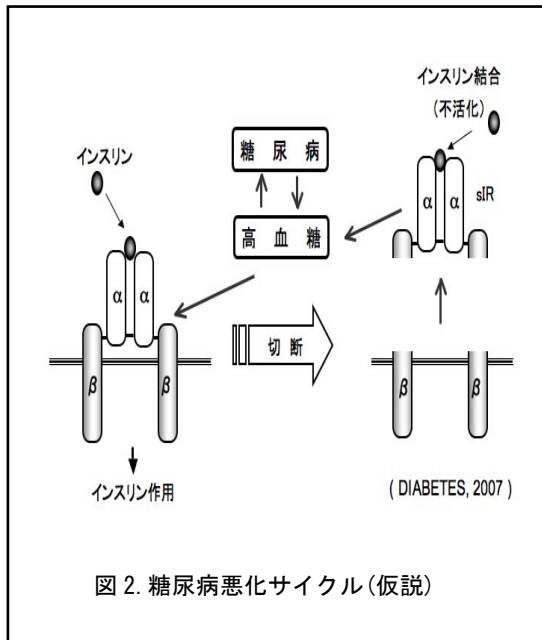


図 2. 糖尿病悪化サイクル(仮説)

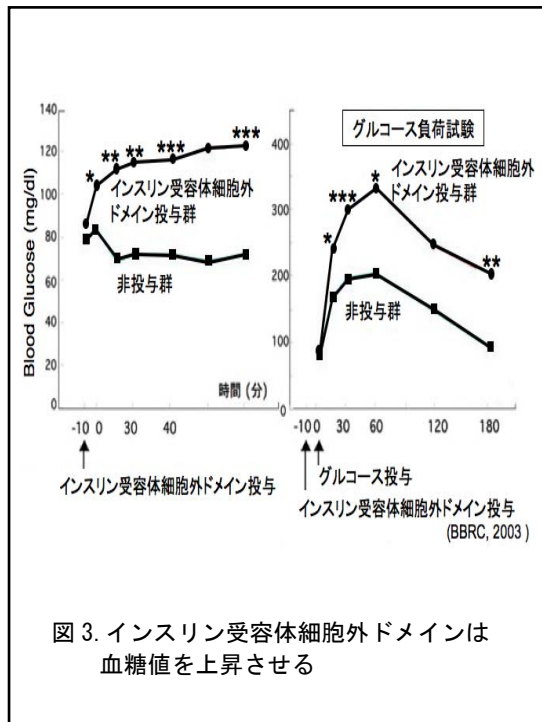


図 3. インスリン受容体細胞外ドメインは血糖値を上昇させる

### 3. 研究の方法

- (1) 可溶性インスリン受容体細胞外ドメイン (sIR) に結合しているインスリン量を定量する
- (2) 可溶性インスリン受容体細胞外ドメイン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いう。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、その原因はいまだ明らかではない。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(7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(図 4)。今後症例数を増やすことにより、またグルコスクランプ法などを使用することにより、この知見を確実なものとし、血中 sIR がインスリン抵抗性の一因となっていることを明らかにしたい。

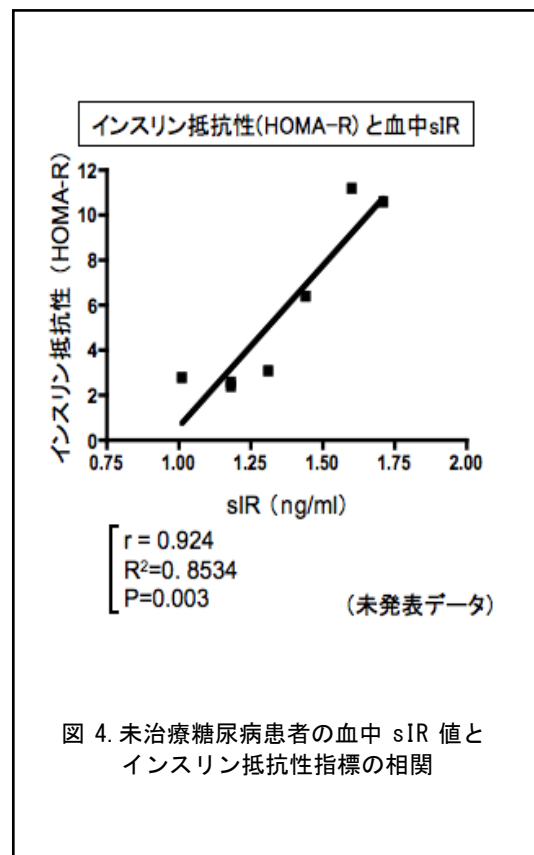


図 4. 未治療糖尿病患者の血中 sIR 値とインスリン抵抗性指標の相関

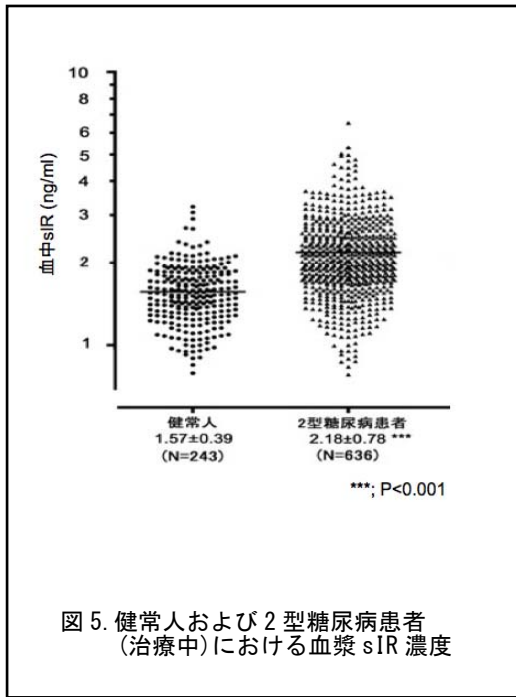


図 5. 健康人および 2 型糖尿病患者 (治療中) における血漿 sIR 濃度

#### 4. 研究成果

申請者らのグループは、“糖尿病になるとインスリン受容体細胞外ドメイン (soluble Insulin Receptor: sIR (可溶性インスリン受容体)) が切断され、血中に遊離される”という予想外の発見をした (Diabetes, 2007)。これはインスリン結合部位である  $\alpha$  サブユニットを含み、インスリンと結合してインスリンを不活化していると考えられ糖尿病の病態における意義は大きい。本研究は血中インスリンが sIR と結合し不活化されている事を明らかにし、かつ不活化インスリン量を正確に求める ELISA 測定系を確立し糖尿病病態との関連性を明らかにすることを目的としている。

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る (血清 100ml に 2ng/ml の sIR が存在するとしてこれに結合している全インスリン量は 0.075mIU)。このため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。申請者は免疫複合体転移測定法 (ICT-EIA; Immuno-complex transfer-enzyme immuno assay) による超高感度インスリン測定法を開発した (未発表)。この系では、非特異的シグナルが最小化し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 (図 7)。

インスリン結合部位である  $\alpha$  サブユニットに対する抗体 3 種を用いて実験を行ったが、いずれもインスリンとの結合に影響を与えることが明らかとなった。そこで  $\beta$  サブユニットの細胞外ドメインに対する抗体 18-44 を

使用した、ヒト血清そのものに 18-44 を加えても、sIR は免沈できないが 40 倍希釈すると免沈できることが分かった。しかし、高倍率の希釈では sIR と結合しているインスリンは測定不能であった。1/25 希釈だとなんとか sIR と結合している Ins を測定できる。アルブミン、グロブリンを除くカラムを使用した、同時に sIR もインスリンも吸着してしまうことが分かった。今後低希釈で sIR を沈降させる方法を考える必要がある。

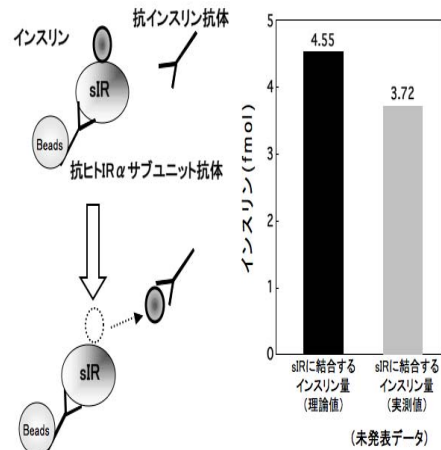


図 6. sIR よりも抗インスリン抗体の方がインスリンに対する親和力が大きいいため Beads で免疫沈降した sIR に結合するインスリンを直接測定できる

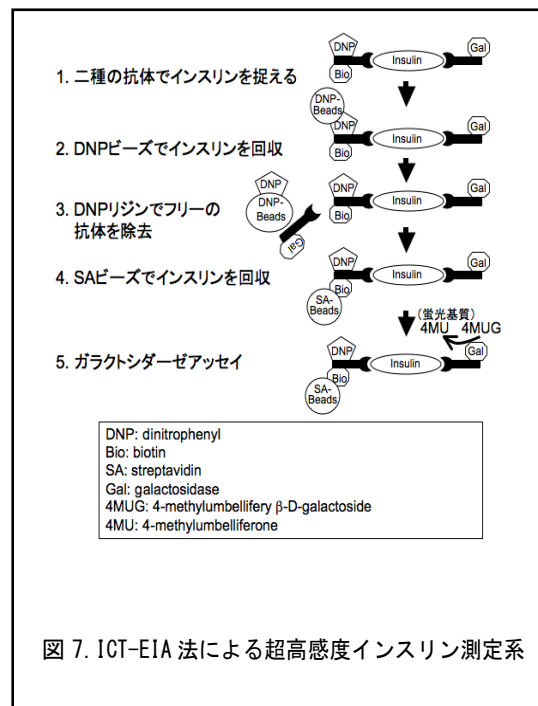
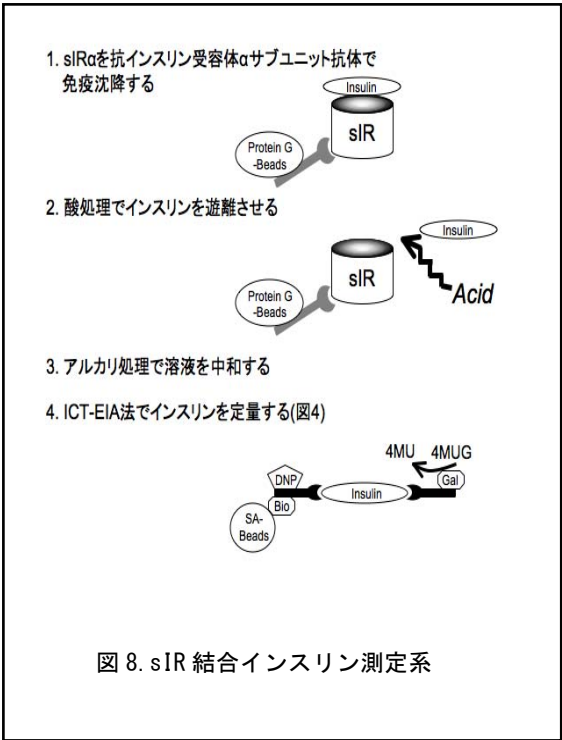


図 7. ICT-EIA 法による超高感度インスリン測定系



[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蛭名 洋介 (EBINA YOUSUKE)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：00112227

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

湯浅 智之 (YUASA TOMOYUKI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

授

研究者番号：50304556

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：