

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790929

研究課題名(和文)可溶性インスリン受容体による血中インスリンの不活化と糖尿病

研究課題名(英文)Binding of soluble insulin receptor to insulin

研究代表者

石倉 周平 (ISHIKURA, Shuhei)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：40336631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト血中に、インスリン受容体の切断により、その細胞外ドメインから構成される可溶性インスリン受容体(Soluble Insulin Receptor, sIR)が存在し、糖尿病患者の血中では、その量が増加している。sIR産生の生理的意義を明らかにするために、HepG2細胞を用いてsIR産生のin vitroモデルを構築した。HepG2細胞におけるsIRの産生は培養液中のグルコース濃度依存的であり、O型糖鎖修飾が重要であった。また、カルシウム依存性のプロテアーゼがIRの切断酵素である可能性が示唆された。HepG2細胞を用いてsIR産生の分子メカニズムをin vitroで解析することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Soluble insulin receptor (sIR), the ectodomain of IR, has been detected in human plasma, and its concentration parallels that of blood glucose in patients with diabetes. To elucidate the physiology of sIR, we developed an in vitro model mimicking the changes in sIR levels in plasma from patients with diabetes. Among four human cell lines, spontaneous cleavage of IR occurred only in HepG2 cells. The concentration of sIR in the medium did not differ between basal and high-glucose conditions in the initial 24-h period, but increasing the duration of pre-stimulation (>48 h) led to a significant increase in sIR levels in cells exposed to high glucose. Using this model, O-linked N-acetylglucosamine modification was determined to be involved in high-glucose-induced IR cleavage. A calcium-dependent protease was shown to cleave IR extracellularly. These findings show that this in vitro model could be useful for determining the molecular mechanism underlying IR cleavage.

研究分野：代謝学

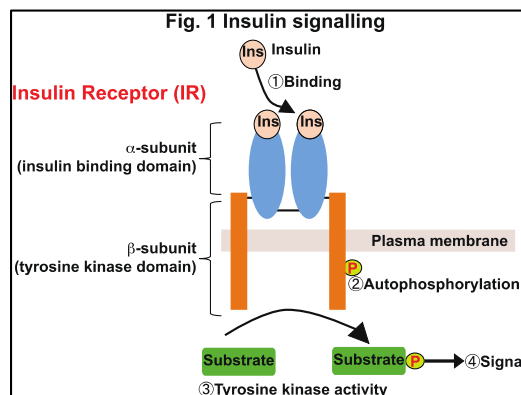
科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：インスリン受容体 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

我が国には約 890 万人の 2 型糖尿病患者と約 1320 万人の「糖尿病予備軍」が存在し、糖尿病の病因の解明と治療法の確立が緊急の課題である。糖尿病の発症及び進展には、主要な血糖降下ホルモンであるインスリンの標的細胞における作用不全、インスリン抵抗性が重要であることが明らかとなってきたが、その分子機構についてはよく分かっていない。

インスリン受容体は細胞外に存在するサブユニットと細胞膜を貫通するサブユニットが S-S 結合で結ばれたヘテロ 4 量体である。インスリンがサブユニットに結合すると、サブユニットのチロシンキナーゼ活性が刺激され、受容体自身のチロシン残基のリン酸化が起こる。受容体の自己リン酸化により基質に対するキナーゼ活性が増強され、情報が細胞内へ伝達される。



申請者のグループはサブユニットとサブユニットの一部から構成されるインスリン受容体の細胞外ドメイン、可溶性インスリン受容体 (sIR) がヒト血中に存在していること、および糖尿病患者において血中の sIR 値が上昇していることを報告した。実際、sIR を全身で発現するトランスジェニックマウスでは糖代謝能に異常が見られ、sIR をマウスに投与すると血糖値が上昇することからも、sIR が糖尿病の発症または進展に関与していると示唆される。sIR はインスリン結合ドメインであるサブユニット全長を有し

ているため、インスリンと結合できると推定されることから、血中に遊離した sIR がインスリンと結合し、不活化することによって、インスリン抵抗性の一因となっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

血中の総インスリン中で、sIR と結合している不活性型インスリンとフリーの活性型インスリンを区別して定量する必要がある。しかし、現在のインスリン定量法で使われている抗インスリン抗体のインスリンに対する親和性は、sIR のインスリンに対する親和性よりも非常に高いので、sIR とインスリンの結合を阻害して総インスリン量を測定していると推定される。糖尿病病態を解明する上で、sIR と結合している不活化インスリン量を定量し、活性型インスリン量を知ることが重要となる。

本研究では、高血糖により切断され、血中に遊離された sIR が、(1) インスリンと結合し、(2) 不活化することにより、インスリンシグナル伝達系を阻害していることを明らかにする。また、(3) sIR に結合しているインスリン量の定量法を開発するとともに、(4) マウスにおける sIR の超高感度定量法を開発し、糖尿病モデルマウスを使って sIR 産生と糖尿病発症・進展との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) sIR とインスリンの結合: sIR はインスリン結合ドメインであるサブユニットを有しているためインスリンと結合できると推定されるが、それを示す直接的なデータはまだない。sIR を定常的に過剰発現し、培地中に分泌する CHO 細胞株 (CHO-sIR 細胞) の培地から得られた sIR とインスリンをインキュベーション後、化学架橋剤である DTSSP (3,3'-dithiobis[sulfosuccinimidyl]propi

onate]) を反応させる。DTSSP はその構造中に 2 つの *N*-hydroxysulfosuccinimide 基を持つことから、タンパク質中のリジン残基や N 末端に存在するアミノ基と共有結合を形成する。sIR をインスリンとインキュベーション後、DTSSP で架橋し、インスリンに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、sIR と結合したインスリンを検出する。

(2) sIR によるインスリンシグナル伝達系の阻害：申請者のグループは sIR をマウスに投与することにより、血糖値が上昇することを報告しているが、そのメカニズムは不明であり、実際に sIR がインスリンシグナル伝達系を阻害するかは不明である。そこで申請者は培養細胞を用いて、sIR のインスリンシグナルへの影響を検討する。肝細胞における主要なインスリン作用である Akt のリン酸化への影響を調べる。さらに、脂肪細胞及び筋肉細胞におけるインスリンの主要な作用であるインスリン調節性グルコーストランスポーター GLUT4 の細胞膜へのトランスロケーションによる糖取り込みの促進作用に対する sIR の影響について検討する。以上、インスリンの主要な標的組織である肝、筋肉、脂肪におけるインスリンの作用が sIR によって阻害されるかを主に細胞生物学的手法を用いて検討する。

(3) sIR と結合したインスリンの定量：現在のインスリンの定量法では、sIR と結合した、すなわち不活化されたインスリンも併せて測定されている可能性がある。標的細胞が利用可能なインスリンの濃度を知るためには、sIR と結合しているインスリン量の測定系の確立が重要である。アミコンウルトラ-0.5 100 kDa 遠心式フィルターを用いて、sIR 結合型と非結合型にインスリンを分離後、定量する方法を開発する。この遠心式フィルターを使うと、分子量 100 kDa 以下の物質はフィルターを素通りできるが、それ以上の分子量のものはフィルター上に保持される。sIR

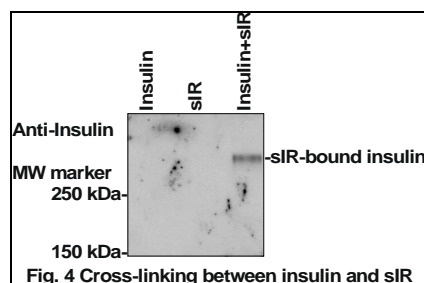
とインスリンをインキュベーション後、遠心式フィルターを用いることにより、約 5 kDa の非結合型インスリンは素通画分に回収されるが、約 300 kDa の sIR と結合しているインスリンはフィルターを通ることが出来ずに、濃縮画分に回収される。この濃縮画分に回収されてくるインスリン量を超高感度 ELISA 法を用いて定量することにより、sIR と結合しているインスリン量を定量をする。

(4) マウス sIR の同定と定量：マウスにおいてもヒト同様に sIR が産生され、血中に遊離されていると推定されるが、その同定及び定量は行われていない。マウスインスリン受容体の cDNA をクローニングし、さらに、サブユニットの細胞外ドメイン C 末端に終止コドンを導入することにより、マウス sIR 発現ベクターを作成する。また、これを CHO 細胞にトランスフェクションし、マウス sIR を恒常的に発現する CHO 細胞株を樹立する (CHO-msIR 細胞)。今後、この CHO-msIR 細胞培養培地から得られるマウス sIR を標準品として ELISA 系を確立する。

4 . 研究成果

(1) sIR とインスリンの結合

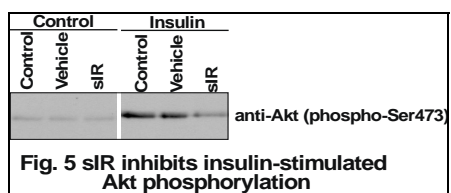
インスリンを sIR とインキュベーション後、DTSSP を用いて化学架橋を行うと、本来 分子量 5 kDa であるインスリンが、約 300 kDa 付近に検出され、sIR がインスリンとの結合を有していることが生化学的に示された。



(2) sIR によるインスリンシグナル伝達系の阻害

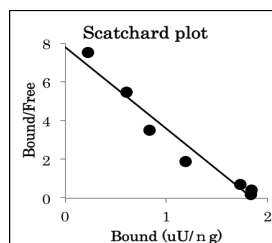
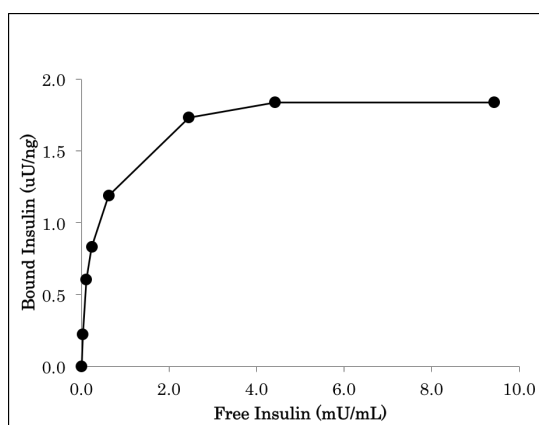
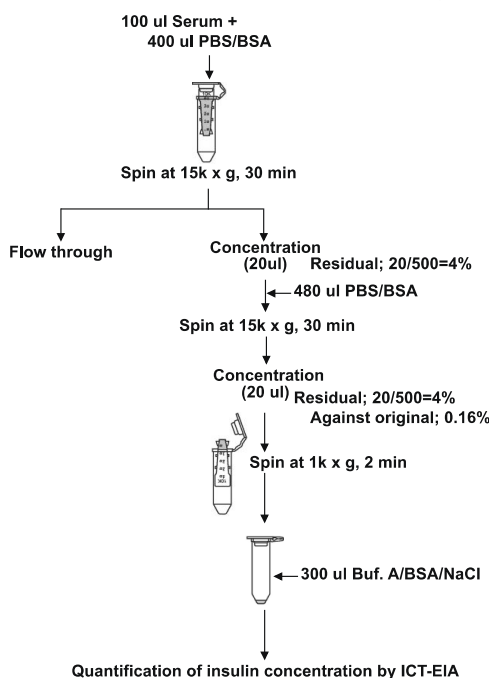
ヒト肝由来の培養細胞である HepG2 細胞では

インスリン処理により、Akt のリン酸化が観察される。HepG2 細胞への添加前に、インスリンを sIR とインキュベーションすることにより、Akt のリン酸化が抑制されたことから、sIR が HepG2 細胞でインスリンシグナル伝達系を阻害していることが示された。



(3) sIR と結合したインスリンの定量

下に示すプロトコールでアミコンウルトラ-0.5 100 kDa 遠心式フィルターを用いて、sIR 結合型と非結合型にインスリンを分離後、定量する方法を開発することができた。



インスリンと sIR との結合は特異的であり、1 分子の sIR 当たり、2 分子のインスリンが結合することが示された。

本法を用いて、ヒト血清中の sIR 結合インスリン量を定量したところ、正常ヒト血清においては、約 5% のインスリンが sIR と結合していることが示された。sIR が高値を示す糖尿病患者においては sIR と結合するインスリンの割合が増加すると予想される。今後、糖尿病患者血清を用いて、検討を行う。

(4) マウス sIR の同定と定量

マウスインスリン受容体の cDNA をクローニングし、さらに、サブユニットの細胞外ドメイン C 末端に終止コドンを導入することにより、マウス sIR 発現ベクターを作成し、CHO 細胞にトランスフェクションし、その発現を確認した。今後、これをマウス sIR を恒常的に発現する CHO 細胞株 (CHO-msIR 細胞) を樹立していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yuasa T, Amo K, Ishikura S, Nagaya H, Uchiyama K, Hashida S, Ebina Y. Development of in vitro model of insulin receptor cleavage induced by high glucose in HepG2 cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2014, 445, pp. 236-243. 査読有り。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石倉 周平 (ISHIKURA, Shuhei)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：4 0 3 3 6 6 3 1