

平成 21 年 4 月 6 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2007～2008
課題番号：	19790641
研究課題名(和文)	劇症1型糖尿病患者血清の解析による新規インスリン様分子の同定
研究課題名(英文)	Identify new insulin mimicking molecules from serum of fulminant type 1 diabetes
研究代表者	
	三柴 裕子(村瀬裕子) (Mishiba Yuko)
	大阪医科大学・医学部・非常勤医師
	研究者番号： 80377415

研究成果の概要：劇症1型糖尿病は、発症時より内因性インスリンが枯渇するため、血糖管理に難渋する。少量の外來性インスリンにて血糖コントロールが良好な稀有な劇症1型糖尿病患者の血清中に、未知のインスリン様物質が存在する、という作業仮説を立て、その分子の同定を試みた。予備実験として、組み換えインスリン受容体とインスリンとのタンパク質間相互作用分析を行い、最終産物中のインスリンの確認を試みたが、期待した結果が得られなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：劇症1型糖尿病、プロテオーム、生体分子、血清、インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 劇症1型糖尿病患者においては、発症時より内因性インスリン分泌が枯渇するために、強化インスリン療法を用いても血糖コントロールに難渋することが多い。

(2) 極めて稀ではあるが、劇症1型糖尿病患者の中に、少量の混合型インスリン製剤の2回注射にて血糖コントロールが良好に維持されている患者が存在することを、申請者らは見い出した。

(3) この患者においては、内因性インスリン

分泌能は全く低下しており、血清インスリン濃度が感度以下 ( $<1\mu\text{U/ml}$ ) であったが、本症例の血清を 3T3-L1 脂肪細胞に投与したところ、健常人血清にほぼ匹敵するレベルの 2-deoxy-glucose による糖の取り込み能の亢進が認められた。そればかりではなく、この患者血清には、インスリンシグナル伝達の増強反応が認められた。また、この症例の IGF-1 などの既知のインスリン様作用を示す血中濃度はいずれでも正常範囲であった。

(4) 生体内でインスリンに匹敵する血糖降下作用を有するインスリン様物質は、未知の

物質である可能性が高い。したがって、本劇症1型糖尿病患者の血中には、インスリン受容体を介して作用するIGF以外のインスリン様物質が存在する、と考えられた。

(5) 以上のことから、この劇症1型糖尿病患者の血清を用いて、新規インスリン様分子を同定する研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、この劇症1型糖尿病患者の血清中の、インスリン受容体に結合するタンパクを同定し、その機能を解析することを目的とする。

(2) 同定したタンパクが実際に血糖降下作用を有するかを、in vitro および in vivo にて確認する。

## 3. 研究の方法

(1) rIR-FLAG 分泌タンパクの作成：組み換えインスリン受容体 (FLAG エピトープタグを付けたインスリン受容体 (以下 rIR-FLAG)) の cDNA (Dr. Brandt (Brandt J, et al. Dimeric fragment of the insulin receptor alpha-subunit binds insulin with full holoreceptor affinity. J Biol Chem 276:12378-84, 2001) から譲与されたもの) を、BHK 細胞株に遺伝子導入し、薬剤選択後に安定形質発現細胞株を得る。その後、細胞培養液中に分泌タンパクとして抽出される rIR-FLAG を 100 倍に濃縮し、-80°C で保存する。

(2) タンパク質間相互作用分析：上記の手法により得られた rIR-FLAG とインスリンによる pull-down 法等のタンパク質間相互作用分析を用いて、最終産物でインスリンを検出可能かどうか、の予備実験を行う。予備実験が成功すれば、条件検討を行い、rIR-FLAG を bait、-80°C で保存されていた当該劇症1型糖尿病患者の血清を prey として、タンパク質間相互作用分析を行い、最終産物を銀染色でバンドとして確認した後、マスマスペクトロメトリー (LC-MS/MS 等) で未知のインスリン受容体結合タンパクを同定する。

組み換えインスリン受容体 (rIR-FLAG)

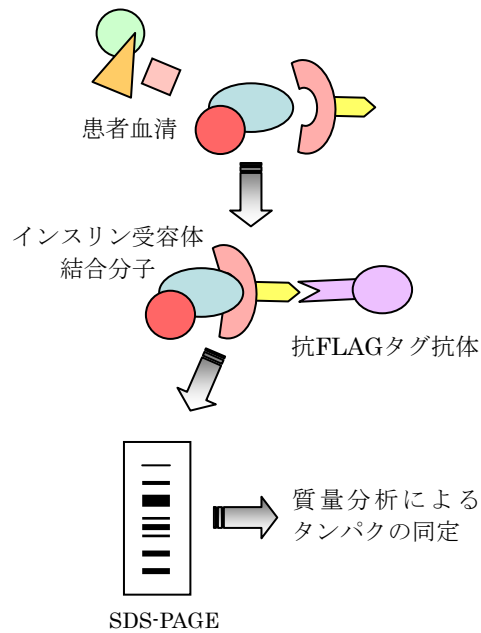
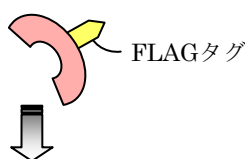
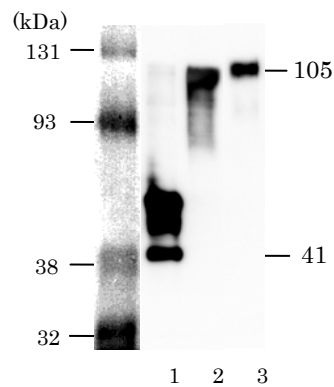


Figure 1. Strategy for protein identification

## 4. 研究成果

(1) リポフェクションによる遺伝子導入後に、rIR-FLAG を安定的に発現する細胞株を得ることが出来た。このことは、ウエスタンブロット法によって、細胞培養中に抗 FLAG 抗体陽性の分泌タンパク (rIR-FLAG タンパク; 105kDa) が存在することによって確認された。



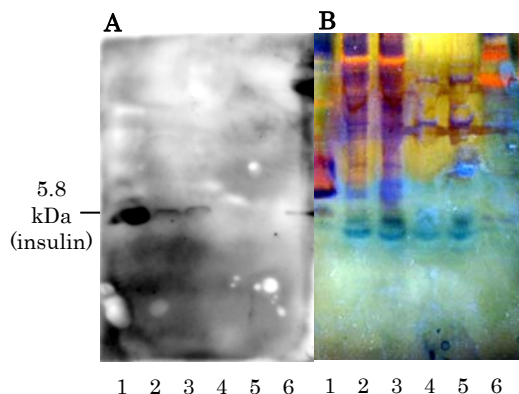
1. FLAG-BAP コントロールタンパク
2. rIR-FLAG 安定発現細胞株の培地 (5 倍濃縮)
3. rIR-FLAG 安定発現細胞株の培地 (濃縮なし)

Figure 2. Immunoblotting using anti-FLAG antibody in BHK cell culture medium, transfected with rIR-FLAG expression vector

rIR-FLAG の安定発現細胞株を培養し、上清を 100 倍に濃縮、保存した。しかし、100 倍濃縮後でも、rIR-FLAG の濃度は 0.1mg/ml 程度であった。Bait としての rIR-FLAG は理想的には 1mg/ml 以上必要であることが判明したため、次に rIR-FLAG の plasmid vector を組み込んだ組み換えウイルスを作製し、カイコ幼虫に感染させてその体液から大量に rIR-FLAG を回収するという方法を試みた。感染カイコ幼虫の体液中で、rIR-FLAG の mRNA レベルの発現は確認できたが、タンパクの発現には至らなかったため、1mg/ml 以上の rIR-FLAG を得ることは出来なかった。

(2) インスリンと rIR-FLAG とのタンパク質間相互作用分析の予備実験を、アフィニティークロマトグラフィー、Far-Western プロット法、Pull-down 法にて検討した。

- ① アフィニティークロマトグラフィー：リガンド分子として固定する rIR-FLAG の十分量の確保や精製が困難であったこと等により、中断を余儀なくされた。
- ② Far-Western プロット法：<sup>35</sup>S-Met 標識した rIR-FLAG をプローブタンパクとして、インスリンとの反応を行ったが、プローブ結合因子としてインスリンを検出することが出来なかった。
- ③ Pull-down 法：抗 FLAG M2 affinity beads を用いてインスリンと rIR-FLAG を pull-down したところ、最終産物におけるインスリンの確認が、インスリンが高濃度である際には成功することもあったが、再現性のある結果は得られなかった。また、プレクリア等を繰り返しても最終産物内に認められる多数の夾雑タンパク（銀染色で確認）の存在も、問題となった。



1. Size marker
2. IP (immunoprecipitation) with anti-FLAG M2 affinity gel to a mixture of rIR-FLAG (0.1mg) and insulin 10  $\mu$ g
3. IP with anti-FLAG M2 affinity gel to a mixture of rIR-FLAG (0.1mg) and insulin 1  $\mu$ g
4. IP with anti-FLAG M2 affinity gel to insulin 10  $\mu$ g (negative control)
5. IP with anti-FLAG M2 affinity gel to insulin 1  $\mu$ g (negative control)
6. Insulin 200ng (positive control)

**Figure 3.** (A) Immunoblotting using anti-insulin antibody and (B) silver staining

以上の予備実験の結果を踏まえて、当該患者血清を使用してのタンパク質間相互作用分析までには至っていない。

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 4 件)

- ① Murase-Mishiba Y, Imagawa A, Hanafusa T. Fulminant type 1 diabetes as a model of nature to explore the role of C-peptide. *Exp Diab Res* 2008, 2008, 819123, 査読有
- ② 三柴裕子, 今川彰久, 花房俊昭, GAD 抗体、インスリン自己抗体ほか、総合臨床、57 巻、2008、1934-1937、査読無
- ③ 村瀬裕子, 今川彰久, 花房俊昭, 1 型糖尿病の現状と未来、最新医学、62 巻、2007、880-884、査読無
- ④ Katsuda Y, Asano A, Murase Y, Chujo D, Yagi K, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. Association of genetic variation of the adiponectin gene with body fat distribution and carotid atherosclerosis in Japanese obese subjects. *J Atheroscler Thromb* 14, 2007, 19-26, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 堤千春, 松本浩明, 三柴裕子, 山本直宗, 寺前純吾, 今川彰久, 花房俊昭, 持続血糖モニター (CGMS) にて血糖変動を検討し得た劇症 1 型糖尿病の 1 例、第 45 回日本糖尿病学会近畿地方会、2008 年 11 月

- 22日、神戸
- ② 堤千春、三柴裕子、寺前純吾、今川彰久、花房俊昭、劇症1型糖尿病におけるClass II HLA 遺伝子型の検討、第51回日本糖尿病学会年次学術集会、2008年5月23日、東京
  - ③ 忌部尚、山本直宗、松本浩明、佐々木一郎、平岩哲也、三柴裕子、石田志門、寺前純吾、今川彰久、花房俊昭、低血糖昏睡後高次機能障害が持続しアルツハイマー型の脳血流低下を認めた糖尿病の1例、第184回日本内科学会近畿地方会、2007年12月1日、京都
  - ④ 高本晋吾、山本直宗、三柴裕子、松本浩明、佐々木一郎、寺前純吾、今川彰久、花房俊昭、48,XXX,+18/47,XXX,のdouble trisomyのmosaicismに併発した糖尿病の一例、第44回日本糖尿病学会近畿地方会、2007年11月3日、大阪
  - ⑤ 中矢絵里、杉立紗綾、三柴裕子、佐々木一郎、松本浩明、寺前純吾、今川彰久、花房俊昭、インスリン導入後に内因性インスリン分泌の枯渇をきたした糖尿病の一例、第44回日本糖尿病学会近畿地方会、2007年11月3日、大阪
  - ⑥ 堤千春、三柴裕子、寺前純吾、今川彰久、花房俊昭、データベースを用いた劇症1型糖尿病におけるClass II HLA 遺伝子の検討、第5回1型糖尿病研究会、2007年10月14日、高野山
  - ⑦ 井畑蘭子、平岩哲也、中辻文彦、辻本直之、谷本啓爾、三柴裕子、佐々木一郎、寺前純吾、今川彰久、花房俊昭、バソプレッシン反応性を認めたコルチゾール産生副腎腺腫の一例、第8回日本内分泌学会近畿支部学術集会、2007年9月29日、京都
  - ⑧ 宮脇正博、小野万里子、杉立紗綾、村瀬裕子、佐々木一郎、寺前純吾、今川彰久、花房俊昭、小澤英樹、勝間田敬弘、厳格な血糖コントロールにより良好な転帰をたどった2型糖尿病合併感染性大動脈瘤の1例、第183回日本内科学会近畿地方会、2007年9月1日、神戸
  - ⑨ 澤木秀明、杉立紗綾、貞廣克彦、佐野寛行、山本直宗、平岩哲也、村瀬裕子、大西峰樹、寺前純吾、今川彰久、花房俊昭、劇症1型糖尿病類似の発症様式を示したが少量のインスリン補償で血糖コントロールが良好な1型糖尿病の一例、第50回日本糖尿病学会年次学術集会、2007年5月26日、仙台

- ⑩ 松本浩明、山本直宗、寺前純吾、村瀬裕子、大西峰樹、貞廣克彦、澤木秀明、佐野寛行、柴崎早枝子、今川彰久、花房俊昭、グリコアルブミン値に及ぼす血糖不安定性の影響、第50回日本糖尿病学会年次学術集会、2007年5月25日、仙台

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三柴 裕子 ( Mishiba Yuko )  
大阪医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：80377415

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

今川 彰久 ( Imagawa Akihisa )  
大阪大学大学院医学系研究科・内分泌・代謝内科学・講師  
研究者番号：80373108

中西 豊文 ( Nakanishi Toyofumi )  
大阪医科大学・臨床検査医学教室・准教授  
研究者番号：10247843

寺前 純吾 ( Terasaki Jungo )  
大阪医科大学・第一内科・助教  
研究者番号：90351395

花房 俊昭 ( Hanafusa Toshiaki )  
大阪医科大学・第一内科・教授  
研究者番号：60164886