

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 5 月 15 日現在

| | |
|-----------|--|
| 機関番号： | 34401 |
| 研究種目： | 基盤研究(C) |
| 研究期間： | 2009～2011 |
| 課題番号： | 21591150 |
| 研究課題名（和文） | 劇症 1 型糖尿病患者血清の蛋白質間相互作用解析を用いた新規インスリン様分子の同定 |
| 研究課題名（英文） | Identifying a novel insulin-like hormone in a patient with fulminant type 1 diabetes using protein-protein interaction methods |
| 研究代表者 | |
| | 寺前 純吾 (Terasaki Jungo) |
| | 大阪医科大学・医学部・助教 |
| 研究者番号： | 90351395 |

研究成果の概要（和文）：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。

研究成果の概要（英文）：In patients with fulminant diabetes, the blood glucose levels are generally difficult to control because their endogenous insulin secretion are depleted from the onset. A patient with fulminant type 1 diabetes shows excellent glycemic control with small amount of exogenous insulin injection. This rare case leads us to hypothesize that an unknown insulin-like hormone will exist in this patient's blood. To explore this hypothesis, we have performed preliminary experiments of protein-protein interaction using human recombinant insulin receptor, although the results were not expected.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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、インスリン様物質、タンパク質間相互作用分析、血清

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。

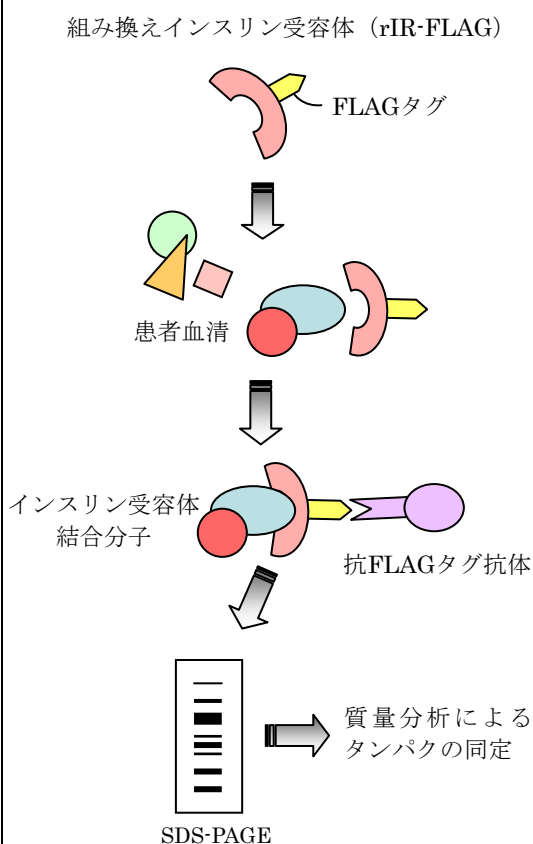
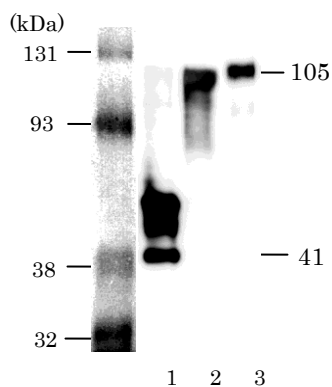


Figure 1. Strategy for protein identification

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

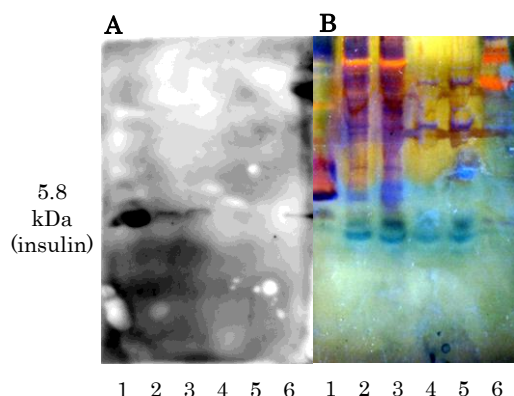
rIR-FLAG の安定発現細胞株を培養し、上清を 100 倍に濃縮、保存した。しかし、100 倍濃縮後でも、rIR-FLAG の濃度は 0.1mg/ml 程度であった。Bait としての rIR-FLAG は理想的には 1mg/ml 以上必要であることが判明したため、次に rIR-FLAG の plasmid vector を組み込んだ組み換えウイルスを作製し、カイコ幼虫に感染させてその体液から大量に rIR-FLAG を回収するという方法を試みた。感染カイコ幼虫の体液中で、rIR-FLAG の mRNA レベルの発現は確認できたが、タンパクの発現には至らなかったため、1mg/ml 以上の rIR-FLAG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

(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：³⁵S-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 μ g
3. IP with anti-FLAG M2 affinity gel to a mixture of rIR-FLAG (0.1mg) and insulin 1 μ g
4. IP with anti-FLAG M2 affinity gel to insulin 10 μ g (negative control)
5. IP with anti-FLAG M2 affinity gel to insulin 1 μ 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。今後は、小麦胚芽等を宿主とした他の発現系も検討する。同時に、タンパク質間相互作用分析の先にあるマスマスペクトロメトリーに関しても、より検出力の高い手法を検討していくことにより、本研究を推進していく。

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8件)

- ① Tanimoto K, Hiraiwa T, Iбата R, Terasaki J, Soyama A, Katsumata T, Hanafusa T. Intravascular and intra-atrial extension of follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 21, 2011, 1281-1282, 査読有
- ② Haseda F, Imagawa A, Murase-Mishiba Y, Sano H, Hirano-Kuwata S, Ueda H, Terasaki J, Hanafusa T. Low CTLA-4 expression in CD4+ helper T-cells in patients with fulminant type 1 diabetes. *Immunology Letters* 39, 2011, 80-86, 査読有
- ③ Tanimoto K, Onda S, Sawaki H, Hiraiwa T, Sano H, Ohnishi M, Terasaki J, Hanafusa T. Hypopituitarism in a patient with transsphenoidal cephalocele: longitudinal changes in endocrinological abnormalities. *Endocr J* 58, 2011, 193-198, 査読有
- ④ Sano H, Terasaki J, Mishiba Y, Imagawa A, Hanafusa T. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, suppresses pancreatic β -cell destruction induced by encephalomyocarditis virus. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 2011, 756-761, 査読有
- ⑤ 長谷田文孝、寺前純吾、花房俊昭、ここまでわかった自己免疫性疾患、臨床検査、第55巻、臨床検査、2011、1280-1287、査読無
- ⑥ 大西峰樹、寺前純吾、花房俊昭、劇症1型糖尿病—病因と診断の最新知見—、内分泌・糖尿病・代謝内科、32巻、2011、562-570、査読無
- ⑦ Shibasaki S, Imagawa A, Terasaki J, Hanafusa T. Endogenous insulin secretion even at a very low level contributes to the stability of blood glucose control in fulminant type 1 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation* 1, 2010, 283-285, 査読有
- ⑧ 長谷田文孝、寺前純吾、花房俊昭、糖尿病の成因と治療戦略—1型糖尿病の成因—、*Medical Science Digest*、35

巻、2009、121-125、査読無

〔学会発表〕(計8件)

- ① 長谷田文孝、今川彰久、三柴裕子、佐野寛行、上田裕紀、寺前純吾、花房俊昭、劇症1型糖尿病患者におけるCD4+ ヘルパーTリンパ球内のCTLA-4発現の検討、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月21日、札幌
- ② 佐野寛行、寺前純吾、長谷田文孝、堤千春、大西峰樹、三柴裕子、今川彰久、花房俊昭、Exendin-4はEMCウイルスによる β 細胞破壊を抑制する、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19日、札幌
- ③ 忌部 尚、三柴裕子、宮里 舞、藤澤玲子、宮脇正博、高本晋吾、長谷田文孝、堤 千春、佐野寛行、大西峰樹、寺前純吾、花房俊昭、性同一性障害に対するテストステロン療法中に糖尿病を発症し、リラグルチドが有効であった一例、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19日、札幌
- ④ 長澤紗詠子、忌部 尚、宮里 舞、宮脇正博、高本晋吾、堤 千春、佐野寛行、三柴裕子、大西峰樹、寺前純吾、花房俊昭、インターフェロン α +リバビリン併用療法中に1型糖尿病と間質性肺炎を発症した一例、第47回日本糖尿病学会近畿地方会、2010年11月13日、大阪
- ⑤ Tanimoto K, Hizuka N, Hiraiwa T, Terasaki J, Hanafusa T. Response of growth hormone compared between growth hormone-releasing peptide-2 test and glucagon stimulation test in adults. The Fifth International Congress of the GRS and IGF Society. 2010年10月4日. New York, USA
- ⑥ Haseda F, Imagawa A, Kuwata S, Mishiba Y, Terasaki J, Hanafusa T. Reduced expression of intracellular CTLA-4 in regulatory T-cells from patients with fulminant type 1 diabetes. 70th scientific sessions of American Diabetes Association. 2010年6月26日. Orlando, Florida, USA
- ⑦ 堤千春、今川彰久、長谷田文孝、谷本啓爾、佐野寛行、中川聖子、澤木秀明、

三柴裕子、平岩哲也、大西峰樹、寺前純吾、花房俊昭、CGMを用いた1型糖尿病における血糖変動指標の評価、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010年5月29日、岡山

- ⑧ 大西峰樹、市原登、酒井聡至、上田博文、谷本啓爾、佐野寛行、澤木秀明、平岩哲也、寺前純吾、花房俊昭、上田一仁、高齢者SPIDDM患者における Subcutaneous insulin resistance (SIR) の1例、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010年5月29日、岡山

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺前 純吾 (Terasaki Jungo)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：90351395

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし