

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 4 月 4 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658099

研究課題名（和文） 正常ネコに存在する抗インスリン自然自己抗体の臨床的意義

研究課題名（英文） Clinical significance of auto natural anti-insulin antibodies in normal cats

研究代表者

北川 均 (KITAGAWA HITOSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70144003

研究成果の概要（和文）：

ネコにおいて抗インスリン自然自己抗体が存在し、それがIgGであることが明らかとなってきた。この抗インスリンIgGの意義を検討する目的で、ネコにおいて抗インスリンIgGを定量するためのサンドイッチELISAを開発し、その精度を検討した結果、インスリン結合IgGを十分に測定できることが確認された。この測定法を使用して、成イエネコ130例および他のネコ科動物（ライオン、ヒョウ、ユキヒョウ、ボブキャットおよびリンクス）11例について血漿抗インスリンIgG濃度を測定した。イエネコおよびネコ科動物のすべての検体から80～4884 µg/mlの抗インスリンIgGが検出された。抗インスリンIgG濃度は、痩せ型のネコにおいて高く、総IgG濃度と正の相関関係にあったが、血糖値や血漿インスリン濃度とは無関係であった。糖尿病ネコでは、抗インスリンIgGは若干高い濃度を示したが、正常ネコの範囲内に含まれていた。新生児ネコの臍帯血には、抗インスリンIgGはほとんど存在せず、哺乳後に抗インスリンIgG濃度が上昇した。この抗インスリン移行抗体は、哺乳期間中に徐々に減少したが、離乳期（食物が乳からキャットフードに変わる時期）に抗体濃度が上昇した。

ウシインスリンを固定したカラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより、抗インスリンIgGを分画した。分画された抗インスリンIgGに対してプレートに結合させたウシインスリンの部分ペプチドを競合させ、抗原認識部位を決定した（エピトープマッピング）。抗原認識部位は、A鎖およびB鎖の両端の親水性の高い部位であることが推定された。

高速液体クロマトグラフィーにより、ネコ血清中の抗インスリンIgGを分画し、4つのピークが検出された。このうち最も濃度の高い分画を用いてネコ由来培養脂肪細胞におけるリン酸化チロシンタンパク質を検出したところ、IgGと結合したインスリンを加えた場合は、遊離インスリンを加えた場合よりも強いリン酸化反応が検出され、抗インスリンIgGがインスリンの働きを強める可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It has been revealed that there have been anti-insulin natural auto anti-insulin antibodies in serum of cats, and those were the IgG. To clarify the significance of anti-insulin IgGs, we developed a sandwich ELISA for determination of the IgGs in serum of cats. The accuracy of the ELISA was sufficient for determination of insulin-bound IgG concentrations. By used of this ELISA, we determined plasma anti-insulin IgG concentrations in 130 domestic cats and 11 other felidae (lions, leopards, snow leopards, bobcats and lynx). Anti-insulin IgGs were detected in ranges from 80 to 4,884 µg/ml in all individuals. Anti-insulin IgG concentrations were high in lean cats, and correlated positively with total IgG concentrations, but not with plasma glucose and insulin concentrations. In cats with diabetes mellitus, plasma anti-insulin IgG concentrations were slightly high, but within the range of normal cats. Anti-insulin IgGs were not detected in cord blood of newborn kittens, and increased after suckling. These maternal antibodies decreased gradually during suckling period, and reversed the falling trend at weaning.

Anti-insulin IgGs were fractionated by affinity chromatography with a column fixed

bovine insulin. Epitope mapping was carried out by use of partial peptides of bovine insulin. The antigen-recognition parts were extrapolated hydrophilic terminals of A and B chains of insulin molecule.

Serum anti-insulin IgGs were divided into 4 fractions by high performance liquid chromatography. By use of a fraction with highest peak, we detected a phosphorylated tyrosine proteins in cultured adipocytes derived from the cat. The phosphorylation was stronger after addition of the IgG-binding insulin than free insulin, suggesting that the anti-insulin IgG might enhance the action of insulin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	420,000	3,020,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学 畜産学・臨床獣医学

キーワード：ネコ、抗インスリン抗体、自然自己抗体

1. 研究開始当初の背景

「自己抗体」は自己免疫疾患の発症に重要な役割を演ずる。ヒトでは、抗インスリン抗体は1型糖尿病の原因となるが、ネコの糖尿病は自己免疫疾患ではないとされ、ネコにおける自然自己抗体に関する報告はない。我々はネコにおける血清インスリン濃度のELISAを確立する過程で、正常ネコ血清中に自己インスリンと結合する抗体が存在することを発見した。アフィニティークロマトグラフィーを用いたネコ血清中のインスリン結合タンパク質精製により、IgGのH鎖とL鎖に対応する分子量にバンドを認め、さらに抗ネコIgG抗体を用いたELISAにより、精製タンパク質中にIgGの存在を確認した。

これらの結果は、正常ネコ血清中にインスリンと結合するIgGが存在することを示す。自己抗原を認識するIgGは細胞障害性がある。しかしネコでは、自己免疫性膵島炎は観察されない。このことは、ネコでは抗インスリン自己IgGが細胞障害性がないか、あるいは膵島細胞の保護機構が存在する可能性を示唆する。逆に、インスリンの半減期延長等、抗インスリン抗体が生理的に有用である可能性もある。いずれにしても、ネコにおいて抗インスリン自然自己抗体が無駄に存在するとは考えられず、何らかの機能を有すると思われるが、現時点ではまったく不明である。

2. 研究の目的

正常ネコ血清には、抗インスリン自然自己抗体が多量に存在する。抗インスリン抗体は、ヒトやイヌでは一般にI型糖尿病の原因となるが、ネコでは健康個体が抗インスリン抗体を保有することから、ヒト等とは異なる機能を有すると考えられる。本課題は、ネコにおける抗インスリン自然自己抗体の生理的役割や臨床的意義を解明することを目的とする。この研究により、ネコの糖代謝機構を解明できると共に、糖尿病の病態解明に貢献できる。

3. 研究の方法

- 1) 抗インスリン自然自己抗体の結合親和性および結合特異性を検討する。
- 2) 抗インスリン抗体が認識する抗原部位を決定する。
- 3) 抗インスリン抗体と結合したインスリンの生物活性を検討する。
- 4) 新生児ネコから継時的に採血し、その発育課程における抗インスリン抗体の変化を検討する。
- 5) 各種疾病ネコにおける抗インスリン抗体の差異を検討する。特に肥満あるいは糖尿病などのインスリン関連疾病を重点的に検討する。
- 6) ライオン、トラ、ヤマネコ等のネコ科動物における抗インスリン抗体保有の有無を検討する。

4. 研究成果

1) 抗インスリン自然自己抗体を定量するためのサンドイッチELISAを開発し、その精度を検討した結果、インスリンと結合しているIgGを十分に測定できることが確認された。この測定法を使用して、成イエネコ130例および他のネコ科動物（ライオン、ヒョウ、ユキヒョウ、ボブキャットおよびリンクス）11例について血漿抗インスリンIgG濃度を測定した。すべての検体から80～4884 µg/mlの抗インスリンIgGが検出された。抗インスリンIgG濃度は、痩せ型のネコにおいて高く、総IgG濃度と正の相関関係にあったが、血糖値や血漿インスリン濃度とは無関係であった。糖尿病ネコでは、抗インスリンIgGは若干高い濃度を示したが、正常ネコの範囲内に含まれていた。

2) 新生児ネコから継時的に採血し、抗インスリン自己抗体の変化をELISAにより測定した。臍帯血には、抗インスリンIgGはほとんど存在せず、哺乳後に抗インスリンIgG濃度が上昇した。この抗インスリン移行抗体は、哺乳期間中に徐々に減少したが、離乳期（食物が乳からキャットフードに変わる時期）に抗体濃度が上昇した（論文投稿中）、

3) ウシインスリンをカラムに固定し、ネコ血清を流すことでネコ抗インスリン自己抗体を結合させ、溶出液のPHの変化等によるアフィニティークロマトグラフィーを行った。各分画の抗インスリン自己抗体に対してプレートに結合させたウシインスリンの部分ペプチドを競合させ、抗原認識部位を決定（エピトープマッピング）した。抗原認識部位は、A鎖およびB鎖の両端の親水性の高い部位であることが推定された。

4) 高速液体クロマトグラフィーにより、ネコ血清中の抗インスリンIgGを分画し、4つのピークが検出された。このうち最も濃度の高い分画を用いてネコ由来培養脂肪細胞におけるリン酸化チロシンタンパク質を検出したところ、IgGと結合したインスリンを加えた場合は、遊離インスリンを加えた場合よりも強いリン酸化反応が検出され、抗インスリンIgGがインスリンの働きを強める可能性が示唆された。

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）

投稿中1件

〔学会発表〕（計7件）

1. 高島 諭, 西飯直仁, 高木 充, 蜂巢達之, 大場恵典, 北川 均: ネコにおける抗インスリン自然抗体のELISAによる抗体価測定. 平成22年度日本小動物獣医学会(中部)2010年9月, 長野)
2. 保田恭志, 高島 諭, 高木 充, 大場恵

典, 北川 均: アルギニン負荷試験による糖尿病ネコのインスリン分泌能検査. 平成22年度日本小動物獣医学会(中部)2010年9月, 長野

3. 保田恭志, 高嶋 諭, 高木 充, 大場恵典, 北川 均: ネコにおけるアミノ酸、脂肪酸のインスリン分泌刺激性. 第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月, 帯広

4. 高島 諭, 小川静子, 西飯直仁, 高木 充, 大場恵典, 蜂巢達之, 北川 均: ネコにおける抗インスリンIgG抗体濃度. 第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月, 帯広

5. 高島 諭, 木村太思, 多和田怜奈, 前田美香, 鈴木貴文, 大場恵典, 北川 均: ネコにおけるアルギニンの胃内投与によるインスリン分泌刺激性. 第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月, 堺

6. 保田恭志, 高嶋 諭, 高木 充, 大場恵典, 北川 均: 肥満ネコにおけるアルギニン負荷試験によるインスリン分泌機能検査. 第152回日本獣医学会学術集会, 2011年9月, 堺

7. 多和田怜奈, 高島 諭, 鈴木貴文, 大場恵典, 木暮恵美, 小島正章, 蜂巢達之, 北川均: ネコにおけるアルギニン胃内投与後のGLP-1の変化. 第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月, 堺

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

なし

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 均 (KITAGAWA HITOSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70144003

(2) 研究分担者

大場 恵典 (OHBA YASUNORI)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20377691

西飯 直仁 (NISHII NAOHITO)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：20508478

(3)連携研究者
なし