

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790317

研究課題名(和文) インスリン受容体切断の分子機構とその病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) The study of molecular mechanism of insulin receptor cleavage

研究代表者

湯浅 智之 (YUASA, Tomoyuki)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：50304556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：可溶性インスリン受容体(sIR: soluble insulin receptor)は、ヒト血中に存在し糖尿病患者ではその濃度が上昇している。sIRの病態生理学的意義を解明するため、in vitro系を構築した。培養液中のsIRは当初の24時間の高グルコース培養では増加しなかったが、さらに長時間の培養を行うと有意に増加し、さらに本反応は低グルコース培養により抑制され可逆性が認められた。本モデルによりO型糖鎖負荷反応とカルシウム依存性蛋白分解酵素がインスリン受容体の切断に関与することが明らかとなり、さらなる分子機構の解明に繋がる成果となった。

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. 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. Additionally, glucose-dependent increment of sIR was reversible in this model. 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：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：可溶性インスリン受容体 インスリン抵抗性 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

我々は、インスリン受容体細胞外ドメインが切断され可溶性インスリン受容体(sIR)が血清中に存在していることを世界で初めて報告した(*Diabetes*, 2007)。この分子はインスリン受容体サブユニットとサブユニットの一部から構成されており、細胞膜表面上のインスリン受容体がある種の蛋白分解酵素により切断され遊離していると考えられる。我々はこの分子(sIR)の ELISA 測定法を確立することにより、治療中を含む糖尿病患者群において健常者群より血中の sIR が有意に増加していることを見出した。糖尿病の病態解明において極めてユニークな全く新規の発見である。インスリン結合部位(サブユニット)を含む sIR が血中に遊離することはインスリンが sIR に結合すると推測され、"インスリン抵抗性"の一因と成りうる。事実、申請者らのグループは、精製したインスリン受容体細胞外ドメインをマウスに投与すると血糖値が上昇することを確認している(*BBRC*, 2000)。我々はヒト由来培養細胞株を用いてブドウ糖濃度依存的にインスリン受容体が切断される事象を培養細胞系で再現することに成功した。さらに、培養液中の sIR は極めて低濃度であるため新たに超高感度 sIR 測定用 ELISA 系も独自に構築した。

2. 研究の目的

生体は高血糖時にはインスリンによる血糖値降下作用が必須であるが、それ故に高血糖によってインスリン受容体が切断されることは生体の血糖値調節機構にとって極めて非合理的な事象であると言える。本系を用いてインスリン受容体切断の分子機構を明らかにする。

第一に、インスリン受容体の切断には何らかの細胞膜上の蛋白分解酵素が関わっていると推測される。様々な蛋白分解酵素阻害化合物を用いて切断酵素を同定する。

第二に、高濃度のブドウ糖濃度が引き起こすいかなる生化学的反応が sIR の産生を促すかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) インスリン受容体切断酵素の同定

膜蛋白は MMP (matrix metalloproteinase) / ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリーに属する蛋白分解酵素により切断されることが知られている。これらに対する阻害化合物や細胞由来の阻害蛋白を培養細胞系に供し、インスリン受容体切断に関わる蛋白分解酵素の候補を絞り込む。

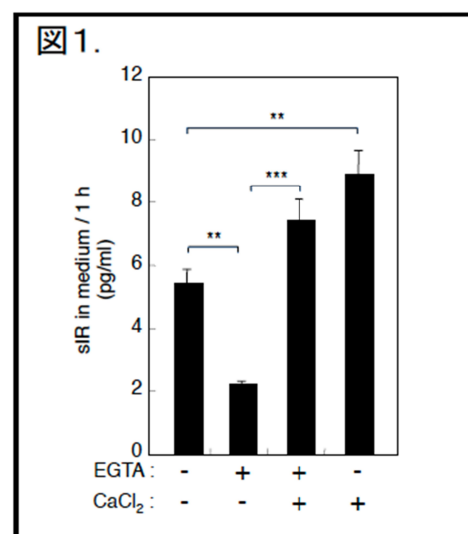
(2) 高グルコースによる生化学的反応の探索

一般に、高血糖下に活性化される生化学的経路として、ポリオール代謝経路、ヘキサミン合成経路、プロテインキナーゼ C 経路、終末糖化産物 (AGE) 産生経路が知られている。これらの候補経路からインスリン受容体の切断に関与する生化学的反応を同定する。

4. 研究成果

(1) インスリン受容体切断酵素の同定

MMP/ADAM に対する各種阻害剤を in vitro 系に供しその影響を検討したが、インスリン受容体の切断は抑制されなかった。これらの酵素はその活性に亜鉛を要求するため特異的なキレート剤を用いても検討したがやはり影響は認められなかった。そこで、膜上で働く蛋白分解酵素が他の金属イオンを要求している可能性を考え、EGTA で細胞培養液を処理したのちに培養液中の sIR 量を定量し、

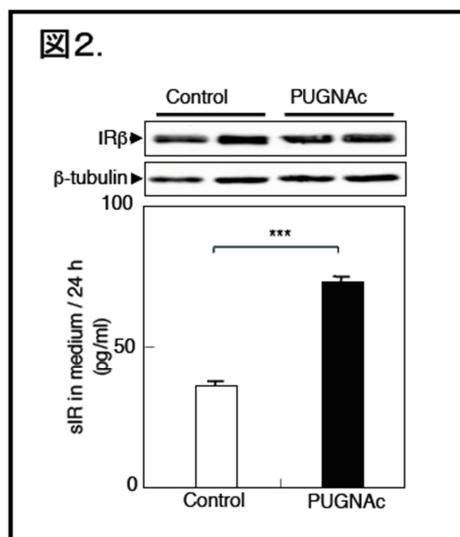


インスリン受容体切断に対する影響を検討した。結果、EGTAは顕著に培養液中sIR量を減少させ、すなわちインスリン受容体の切断が抑制されていることが明らかとなった。そこで、培養液中に含まれる金属イオンを一つずつ調べたところカルシウムイオンがインスリン受容体の切断に必須であることが明らかとなった(図1)。さらに、このカルシウムは細胞内で作用しているのではなく細胞外で必要とされていることからインスリン受容体は細胞外で切断されていることが示された。

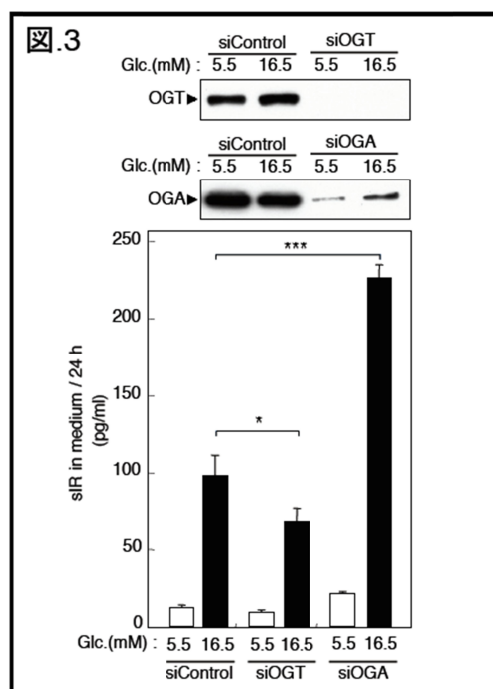
以上の結果から、我々は「カルシウム依存性蛋白分解酵素によるインスリン受容体の切断が担うインスリン作用調節機構」を提唱するに至った。これまでにない全く新しい概念である。ヒトの糖代謝にカルシウムが関与することはキレート剤(EDTA)を静脈投与する治療(キレーション療法)において低血糖を起こすことから明らかであるが、既知の糖代謝メカニズムでは説明できない。一方で、本事象はこの臨床的事実を合理的に説明するものであり、即ちインスリン受容体の切断が個体の糖代謝をダイナミックに調整する可能性を示すものである。

(2) 高グルコースによる生化学的反應の探索

ヘキソサミン合成経路により供給される基質(UDP-GlcNAc)は、O型糖鎖付加反応によりセリン/トレオニンの水酸基に付加される。この糖鎖を除去する酵素(OGA)を特異



的に阻害する化合物がPUGNAcである。この阻害剤をin vitro系に供すると著明に培養液中のsIRが増加した(図2)。この結果はO型糖鎖付加反応がインスリン受容体の切断機構に深く関与していることを示唆するものであった。そこで、さらに本反応の関与を明らかにするため、ヘキソサミン合成経路の律速酵素GFATの阻害剤(DON)添加による影響を培養液中sIR量で検討したところ有意に減少した。さらに、分子生物学的に検討するためOGAとO型糖鎖結合に関する糖鎖転移酵素(OGT)をsiRNAを用いてノックダウンしたところ、前者でsIR量は増加し後方で減少した(図3)。以上の結果はいずれもO型糖鎖付加反応がインスリン受容体切断機構の一部であることを証明するものであった。次の課題としてこのO型糖鎖付加反応の標的分子であるが、我々のこれまでの検討ではインスリン受容体そのものではなく、インスリン受容体切断酵素そのもの、あるいは切断酵素を修飾する別の因子であることが示唆された。



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 1 件)

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. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Feb 28;445(1):236-43.doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.187.

〔学会発表〕(計 1 件)

湯浅智之, 松久宗英, 橋田誠一, 蛭名洋介

可溶性インスリン受容体が担うインスリン抵抗性の可能性、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 特別シンポジウム 3、2013 年 5 月 17 日 熊本ホテルキャッスル(熊本県)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：糖尿病治療薬の新規なスクリーニング方法

発明者：湯浅智之, 蛭名洋介, 橋田誠一, 松久宗英

権利者：徳島大学

種類：特許権

番号：特願 2013-086477

出願年月日：2013 年 4 月 17 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

湯浅 智之 (YUASA, Tomoyuki)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：50304556