

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870483

研究課題名(和文) カルパインはインスリン受容体を切断し糖尿病発症に関与するのか？

研究課題名(英文) Dose calpain cleave insulin receptor, leading to the development of diabetes ?

## 研究代表者

椎木 幾久子(阿望幾久子)(SHIINOKI, Kikuko)

山口大学・医学部・学術研究員

研究者番号：60609692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：可溶性インスリン受容体(sIR)は、インスリン受容体の細胞外ドメインが切断されて血中に遊離したものである。本研究ではヒト肝癌細胞由来HepG2細胞を用いて、高濃度グルコース刺激によってsIR産生が促進されること、加えてこの現象にO型糖鎖付加反応が関与していることを発見した。さらに、インスリン受容体切断にはカルシウムイオンが必要であり、切断酵素はカルパイン2である可能性が示唆された。sIRの産生を抑制することにより、インスリン受容体の下流シグナルの回復も認められ、sIRは糖毒性によるインスリン抵抗性を担う新規の分子機構である可能性が考えられた。

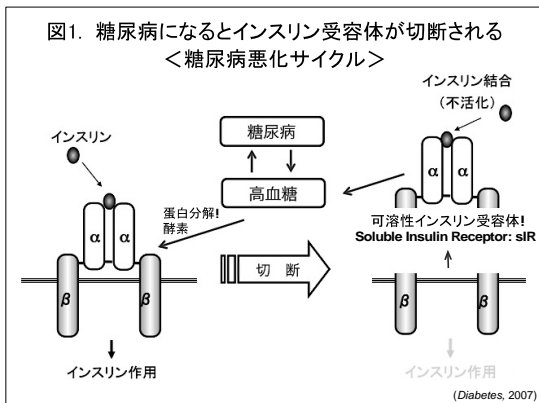
研究成果の概要(英文)：Soluble insulin receptor (sIR), the ectodomain of insulin receptor (IR), is detected in human plasma, and its concentration parallels that of blood glucose in patients with diabetes. The present study demonstrated cleavage of IR in HepG2 cells treated with high glucose, and O-linked N-acetylglucosamine modification was involved in high-glucose-induced IR cleavage. Additionally, this study showed ectodomain shedding of IR is dependent on the presence of calcium-ion, raised the possibility that calpain 2, a calcium-dependent protease, is a cleavage enzyme of IR. This model also demonstrated that IR cleavage is partially responsible for the impaired insulin signaling induced by high glucose. These findings suggests that cleavage of IR is a possible component of insulin signaling in cells, and may offer considerable insight into insulin resistance-related disease.

研究分野：分子病態学

キーワード：インスリン受容体切断 インスリン抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

申請者のグループはヒトインスリン受容体 cDNA のクローニングに成功して以来 (Cell, 1985, Ebina et al.)、これまでインスリン作用の分子機構と糖尿病の解明に取り組んで来た (Science, 1989; Nature Genetics, 1998; Cell Metab, 2008)。申請者のグループはインスリン受容体の細胞外ドメインが切断され、可溶性インスリン受容体 (soluble insulin receptor: sIR) として、血中に存在することを世界で初めて報告した (Diabetes, 2007; 図 1)。この現象は糖尿病病態において全く新規の機序である。



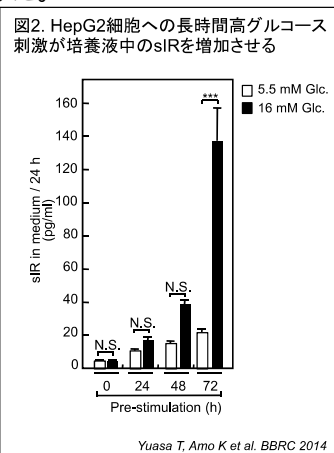
この分子は、インスリン結合部位である  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットの一部から構成されており、細胞膜表面上のインスリン受容体がある種のタンパク分解酵素によって切断されて遊離していると考えられる。申請者らは sIR の ELISA 測定法を確立し、糖尿病患者の血清中で sIR が有意に増加していること、血中 sIR 値は血糖値、すなわち糖尿病の本体である高血糖と強い相関を示すことを見出した。加えて、精製した sIR をマウスに投与すると血糖値が上昇することを確認している (BBRC, 2000)。血中に sIR が存在することがインスリン作用の減弱、つまりはインスリン抵抗性の一因となっていると考えられる。事実、新規未治療糖尿病患者において血中 sIR 値がインスリン抵抗性指標 (HOMA-IR) と相関することを発見した。インスリン受容体の切断は高血糖により促進され、遊離した可溶性インスリン受容体がさらに高血糖を招くといった糖尿病悪化サイクルを形成していることが推察される (図 1)。sIR のインスリン作用にもたらす影響を鑑みると、細胞膜表面上でのインスリン受容体の切断酵素の同定を中心とした切断分子機構の解明は、糖尿病病態の解明および新規治療戦略において重要である。

### 2. 研究の目的

可溶性インスリン受容体研究の中核を成すインスリン受容体切断酵素の同定を行い、インスリン受容体切断抑制を利用した新たな糖尿病治療法を展開するための基盤となる研究を行う。

### 3. 研究の方法

(1) これまでに申請者らのグループは、血清中濃度に比べて極微量である細胞培養液中の sIR 濃度を測定することが出来る超高感度 ELISA 測定法を開発した (Clin Biochem, 2009)。加えて、ヒト肝癌細胞由来の HepG2 細胞の培養液中に sIR が存在することを発見し、高濃度グルコース刺激によるインスリン受容体切断の促進を再現する培養細胞系を確立した (図 2)。本研究では、この培養細胞系を用いてインスリン受容体切断酵素の同定を試みた。



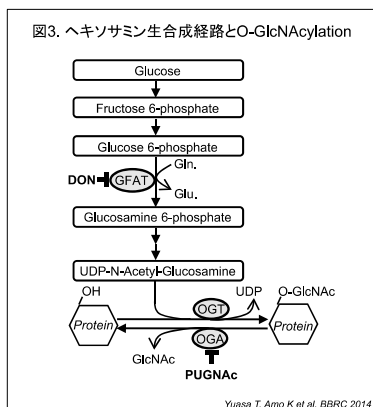
一般的に膜蛋白は MMP (matrix metalloproteinase) / ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain) ファミリープロテアーゼにより切断 (shedding) を受け、細胞外ドメインが遊離することが知られている。これらプロテアーゼがインスリン受容体の切断にも関与し得るのかについて、MMP/ADAM の阻害化合物 GMNC, GM6001, Batimastat, TAPI-1, TAPI-2、細胞由来の阻害蛋白質 TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) 1~4 および、MMP 活性化剤 APMA を上述の sIR 産生培養細胞系に供し、培養液中の sIR 量の変化を測定した。

MMP/ADAM はそのプロテアーゼ活性に金属イオンを必要とする。MMP/ADAM のインスリン受容体切断反応への関与を検証するため、金属イオンキレート剤である EDTA、EGTA または、カルシウムイオンなど各種金属イオンを sIR 産生培養細胞系に供し、と同様に検討した。

の実験結果より、インスリン受容体切断酵素の候補分子を絞り、当該分子について siRNA を用いて HepG2 細胞での発現をノックダウンさせた。その後高濃度グルコース刺激を行い、細胞培養液中の sIR 濃度を測定した。

(2) ヒトやマウスにおいて高血糖と sIR 増加の相関が認められたが、培養細胞系においても高濃度のグルコース処理により sIR 産生が高まることから、高グルコースが sIR 産生を促進する機序の一つとして、O 型糖鎖付加反応の関与を考えた。インスリン受容体切断酵素またはインスリン受容体が O 型糖鎖修飾されて切断活性が上昇することが考えられ

る。そこで、HepG2 細胞を用いた sIR 産生培養細胞系に対し、O 型糖鎖 (O-GlcNAc) 付加反応およびその上流のヘキソサミン合成経路を担う酵素の阻害剤を供し、培養液中の sIR 濃度を測定し、sIR 産生への O 型糖鎖付加反応の関与を検証した。阻害剤は、GFAT (Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase) 阻害剤である DON および OGA (O-GlcNAcase) 阻害剤である PUGNAc を用いた (図 3)。加えて、OGT (O-GlcNAc transferase) と OGA の siRNA を用いて O 型糖鎖付加反応を担う分子の発現をノックダウンし、阻害剤と同様に sIR 産生への影響を確認した (図 3)。



(3) インスリン受容体切断によるインスリンシグナルへの影響を検証した。(1)の検証において sIR 産生が抑制された条件を用いて、培養液中の sIR 定量と合わせてインスリンシグナル (Akt や ERK のリン酸化) の変動をウエスタンブロットにて確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) インスリン受容体切断酵素の同定

HepG2 細胞への長時間高グルコース刺激により増加した培養液中の sIR 量は、MMP/ADAM の阻害剤の影響を受けなかった。MMP/ADAM 活性化剤による sIR 産生促進効果も認められなかった。

EDTA, EGTA によって HepG2 細胞の高グルコース刺激時の sIR の産生が有意に抑制された。一方、HepG2 細胞培養液中にカルシウムイオンを添加すると、濃度依存的に培養液中の sIR 量が増加した。その他の金属イオン (鉄、マグネシウム) は、sIR 産生に影響を与えなかった。

の結果より、インスリン受容体切断酵素は、一般的に膜蛋白切断を担っている MMP/ADAM 以外でカルシウム要求性プロテアーゼであると考え、カルパインに着目した。カルパインは特定の基質蛋白質を限定分解し、その構造や機能を制御するモジュレータープロテアーゼであるが、未だその基質など不明な点が多い。カルパインファミリーの中でもカルパイン 10 は 2 型糖尿病の感受性遺伝子として同定されている (Nat Genet, 2000)。一方、カルパイン 2 は細胞外で作用するという報告があり (Arch Histol Cytol,

1990; BBRC, 1989) カルパイン 2 のペプチド配列嗜好性のデータを基にサーチエンジンを用いてインスリン受容体サブユニットをバイオインフォマティカルに検索したところ、細胞膜通過ドメインの直上 (細胞外側、N 末端側) に切断の可能性の高いペプチド配列が見出された。そこで、HepG2 細胞のカルパイン 2 (m-Calpain) をノックダウンすると培養液中の sIR 濃度は有意に低下した。カルパイン 2 がインスリン受容体切断酵素である可能性が示された。

(2) HepG2 細胞への長時間高グルコース刺激による sIR 産生増加は、DON の添加または、OGT のノックダウンにより抑制された。一方、PUGNAc の添加または、OGA のノックダウンによって sIR 産生は増加した。O-GlcNAc 付加反応のインスリン受容体切断促進への関与が示唆された。この事象は高グルコース時にインスリン受容体切断が促進される一因となり得ると考えられるが、O-GlcNAc の標的は、現時点では明らかにできなかった。

(3) HepG2 細胞への高グルコース刺激によってインスリン刺激時のインスリン受容体下流シグナル Akt のリン酸化 (Thr308, Ser473) および ERK1/2 のリン酸化 (Thr202/Tyr204) が減弱したが、EGTA の添加またはカルパイン 2 のノックダウンにより、Akt のリン酸化が回復した。sIR の産生を抑制することにより、インスリン受容体の下流シグナルが回復したと考えられ、sIR は高グルコース (糖毒性) によるインスリン抵抗性を担う新規の分子機構である可能性が考えられた。

成果(1)、(2)については、論文発表した (BBRC 2014)。成果(1)、(3)については、現在論文投稿準備中である。

#### 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 3 件)

Yusa 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 and biophysical research communications. 査読有、445 巻、2014、236-243

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.187

Ohminami H, Amo K, Taketani Y, Sato K, Fukaya M, Uebanso T, Arai H, Koganei M, Sasaki H, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, Takeda E. Dietary combination of sucrose and linoleic acid causes skeletal muscle metabolic abnormalities in Zucker fatty rats through specific modification of fatty acid

composition. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 査読有、55 巻、2014、15-25  
DOI: 10.3164/jcfn.14-11

Wanjihia VW, Ohminami H, Taketani Y, Amo K, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, Takeda E. Induction of the hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 gene in offspring after isocaloric administration of high fat sucrose diet during gestation. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 査読有、53 巻、2013、150-157  
DOI: 10.3164/jcfn.13-48

〔学会発表〕(計 7 件)

Kikuko Shiinoki, Katsuya Tanabe, Masayuki Hatanaka, Yasuharu Ohta, Yukio Tanizawa. Wfs1-deficiency causes beta-cell dedifferentiation associated with enhanced ER stress and oxidative stress, independently of hyperglycemia. American Diabetes Association 75<sup>th</sup> Scientific Sessions. 2015 年 6 月 5-9 日 Boston (USA)

椎木幾久子、田部勝也、幡中雅行、永尾優子、太田康晴、谷澤幸生、Wfs1 欠損膵島における膵細胞脱分化機構の解析、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、2015 年 5 月 21-24 日、海峡メッセ下関(山口県・下関市)

田部勝也、椎木幾久子、松永仁恵、幡中雅行、谷澤幸生、Wolfram 症候群の実態と糖尿病発症機構の解明、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、2015 年 5 月 21-24 日、海峡メッセ下関(山口県・下関市)

椎木幾久子、田部勝也、近藤学、永尾優子、秋山優、太田康晴、谷澤幸生、GLP-1 受容体作動薬は Wfs1 欠損マウスにおけるインスリン分泌障害を改善する、第 64 回日本体質医学会総会、2014 年 9 月 6-7 日、中央電気倶楽部(大阪府・大阪市)

椎木幾久子、田部勝也、近藤学、永尾優子、秋山優、太田康晴、谷澤幸生、Wfs1 欠損による細胞機能障害とインクレチンの効果に関する研究、Front Runner of Future Diabetes Research 第 3 回研究発表会、2014 年 7 月 19-20 日、ホテル椿山荘(東京都・文京区)

椎木幾久子、田部勝也、永尾優子、秋山優、太田康晴、谷澤幸生、膵島炎症に対する n-3 PUFA の抑制効果とその発現機構の解明、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 22-24 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

Katsuya Tanabe, Yuko Nagao, Kikuko Amo-Shiinoki, Permjt MA, Yukio

Tanizawa. Role of GSK3 in the development of beta cell failure、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年 5 月 22-24 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎木 幾久子 (SHIINOKI, Kikuko)  
山口大学・医学部・学術研究員  
研究者番号：60609692

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし