

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660238

研究課題名(和文)すべてのネコが保有するインスリン親和性IgGの機能解析

研究課題名(英文)Function analysis of immunoglobulin G with affinity for insulin in 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：すべての健康な成イエネコにおいて血漿抗インスリンIgG濃度は80-1578 mcg/mlにあった。抗インスリンIgGはインスリンとの親和性から2分画(1と2)に分かれ、インスリンに対する結合親和性は共に中等度であった。分画1と2の結合性はインスリン分子B鎖のカルボキシ末端とB鎖の6-15アミノ酸残基に対しても高く、抗インスリンIgGがインスリンとインスリン受容体の結合阻害と多分子複合体形成の可能性を示した。分画1は、ネコ成熟脂肪細胞のAktをリン酸化し、グルコース取込を増加させた。ネコの抗インスリンIgGには、インスリン作用を増強する分画があった。

研究成果の概要(英文)：All healthy adult cats had plasma anti-insulin IgG concentrations between 80-1578 mcg/ml. Anti-insulin IgGs were fractionated into 2 fractions; 1 and 2, and their affinities for insulin were moderate degree. The affinitas was most strong with the carboxyl terminal and secondary with 6-15 amino-acid residues of insulin B chain, suggesting binding inhibition of insulin and it's receptors and forming of macromolecule complex. Fraction 1 made to increase phosphorylated Akt and uptake of glucose by matured cat adipose cells. Cats have a anti-insulin IgG with increases in insulin action.

研究分野：獣医内科学

キーワード：抗インスリンIgG ネコ 結合親和性 インスリン

1. 研究開始当初の背景

ネコ(イエネコ)はアミノ酸をエネルギーとする動物であり、特殊な糖代謝機能をもつ。ネコ科動物がインスリンと結合する「インスリン親和性免疫グロブリン G (IgG)」を保有することが明らかとなってきた。インスリンと結合する IgG はヒトやイヌでは有害な働きをする場合が多く、I 型糖尿病やインスリン抵抗性、自己免疫性インスリン症候群等の原因となる。いっぽう、ネコにおける抗インスリン抗体については、ヒトまたはブタ由来のインスリン製剤を投与された経験のある糖尿病ネコで検出されたが、正常ネコからは検出されないことが報告され、ネコは抗インスリン自然抗体を保有しないと考えられてきた。しかし、2010 年に健康ネコが抗インスリン IgG を自然抗体として保有することが我々によって報告され、検討したすべてのネコが抗インスリン IgG を保有すること、抗インスリン IgG は、血漿インスリン濃度と比較してネコ血漿中に多量に存在すること、インスリンとの親和性の異なる分画が存在することが推察されていた。しかし、ネコにおける抗インスリン IgG の生理学的あるいは病理学的な機能、特にインスリン作用に及ぼす影響については全く未知の状態にあった。

2. 研究の目的

ネコでは、健康な個体が抗インスリン IgG を保有することから、抗インスリン IgG が糖尿病などの疾患の原因となる可能性は低く、ネコにおける抗インスリン IgG の機能はヒトやイヌとは異なる可能性がある。この研究は、(1)健康ネコおよび疾患ネコ、ネコ科動物、さらにグルコース負荷試験における血漿抗インスリン IgG 濃度測定、(2)抗インスリン IgG をインスリンに対する親和性を基に分画し、(3)それらのインスリンに対する親和性を解析すること、(4)エピトープ解析および(5)脂肪細胞におけるグルコース取り込み能等に対する抗インスリン IgG の影響を検討することによって、ネコが保有する抗インスリン IgG の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血漿濃度測定

健康ネコ 84 頭と各種疾患ネコ 58 頭から空腹時の末梢血を採取した。血漿抗インスリン IgG 濃度を、シバヤギ(株)と共同で開発した酵素免疫抗体法(ELISA)で測定し、血液検査結果、肥満度等との関係を検討した。さらに、静脈性グルコース負荷試験時に抗インスリン IgG 濃度が変化するかどうかを検討した。

(2) アフィニティークロマトグラフィー

カラムにウシインスリンを固相化したカラムを用いて、溶出液の塩化ナトリウム濃度

やグリシン濃度を変化させるグラジエント溶出法を行い、インスリン親和性の差を利用した抗インスリン IgG の分画を試みた。

(3) ピアコア解析

表面プラズモン共鳴分析法(ピアコア解析)によってネコの保有する抗インスリン IgG とインスリンの親和性を解析した。

(4) エピトープ解析

ネコインスリンのアミノ酸配列をもとに 10 アミノ酸残基からなる 16 種類のペプチドを作製し、ビオチン修飾した。この合成ペプチドに対する抗インスリン IgG 分画 1 と分画 2 の親和性を ELISA で測定し、抗インスリン IgG の各分画がインスリン分子のどの部位との親和性を有すのかを検討した。

(5) 脂肪細胞におけるグルコース取り込み能等に対する抗インスリン IgG の影響

培養ネコ脂肪細胞と正常ネコの血清からアフィニティー精製した抗インスリン IgG を用いて、脂肪細胞にインスリンを単独、またはインスリンと抗インスリン IgG を混合して添加した場合において、抗インスリン IgG の存在がインスリンの働きに与える影響を比較した。抗インスリン IgG の存在の有無におけるインスリンの働きは、細胞へのグルコース取り込み能 ($[^3\text{H}]$ - 2-deoxy-D-glucose (2-DOG)を用いた Glucose uptake assay)と、細胞内のインスリン受容体シグナル伝達分子のリン酸化の程度(細胞抽出タンパク質のウエスタンブロットリング)を比較することにより評価した。さらに、抗インスリン IgG がインスリンと形成する多分子複合体の形成がインスリン機能に関係する可能性を検討する目的で、パパイン処理により「抗インスリン IgG の Fc フラグメント」を除去し、多分子複合体の形成を阻害した状態の分画 1 をインスリンと共に脂肪細胞に添加し、 $[^3\text{H}]$ -2-DOG の取り込み能を検討した。

4. 研究成果

(1) 血漿濃度測定

健康ネコの抗インスリン IgG 濃度は 80 ~ 1578 mcg/ml の範囲にあり、その中央値は 221 mcg/ml であった。疾患ネコでは、血漿抗インスリン IgG 濃度は、個体差が大きかったが、健康ネコとほぼ同じ範囲の濃度を示した。著しく高い血漿抗インスリン IgG 濃度を示したのは、高ガンマグロブリン血症と慢性腎臓病の個体であった。糖尿病ネコも健康ネコとほぼ同じような血漿抗インスリン IgG 濃度を示したが、インスリン未投与の糖尿病ネコ 3 頭は、他の糖尿病個体より低い抗インスリン IgG 濃度を示す傾向にあった。抗インスリン IgG 濃度は、ネコのボディコンディションスコア(肥満度)と負の有意の相関関係を示し、血漿総 IgG 濃度とは正の有意の相関関係を示した。グルコースを静脈内に負荷し、

血漿インスリン濃度を上昇させても、血漿抗インスリン濃度は変化しなかった。ライオン、ヒョウ、ジャガー等のネコ科動物においてもイエネコとはほぼ同じ濃度の抗インスリン IgG が血漿中に検出された。

(2) アフィニティークロマトグラフィー

抗インスリン IgG はアフィニティークロマトグラフィーによってインスリン親和性のある2つの分画(分画1と2)に分けることができた。分画1の溶出条件は、3 M NaCl・5 M glycine から10分間グラジエント溶出をし、溶出液の50%が0.05 M phosphate buffer に置き換わった1.5 M NaCl, 0.75 M glycine となった条件であり、分画2ではさらに10分間グラジエント溶出をして溶出液が100% 0.05 M phosphate buffer に置き換えた条件であった。ウエスタンブロット法によりこれら2つの分画にIgGが存在することを確認した。このことは、抗インスリン IgG が異なる結合特性を持つ多クローン性のIgG分子群から構成されることを示唆し、アフィニティークロマトグラフィーによって分画された2つのIgG分子群は、溶出液の塩濃度とグリシン濃度の違いから、インスリンとの疎水性相互作用(親和性)に違いがあると考えられた。

(3) ピアコア解析

アフィニティークロマトグラフィーによって分画された分画1の解離定数(KD値)は 1.61×10^{-4} であり、分画2の解離定数は 2.00×10^{-5} であり、分画1(低親和性分画)は分画2よりも10倍低い親和性を示した。解離定数から、この2つの抗インスリン IgG 分画はインスリンと中等度の親和性を有することが明らかとなった。分画2(高親和性分画)のインスリンに対する親和性は、インスリン注射と関係なく低血糖発作を起こすヒトの糖尿病患者が保有する抗インスリン抗体と同等である。このヒトの低血糖発作は、低親和性の抗インスリン抗体とインスリンが解離して発症する。しかし、健康なネコでは、抗インスリン IgG を保有しているにもかかわらず、低血糖症状を認めることはない。抗インスリン抗体とインスリンの突発的解離は考えられない。ピアコア解析の結果から、ネコの抗インスリン IgG は、血液中でインスリンと結合しているが、その機能はヒトとは異なるように考えられた。

(4) エピトープ解析

エピトープ解析において、ネコの抗インスリン IgG の分画1と分画2は、インスリン分子のB鎖のカルボキシル末端にあたる合成ペプチドに対する親和性が最も高かった。また、分画1と2の両方とも、インスリン分子B鎖の16から25アミノ酸残基、B鎖の6から15アミノ酸残基、B鎖の1から10アミノ酸残基およびA鎖の7から16アミノ酸残基に比較的高い親和性を示した。また、インスリンB

鎖のカルボキシル末端はインスリンとインスリン受容体の結合初期段階の立体構造変化において重要な役割を演ずるとされており、抗インスリン IgG がインスリンの受容体結合部位に結合し、インスリンとインスリン受容体の結合に影響する可能性がある。また、ネコ抗インスリン IgG は、分画1と2の両方とも、インスリンに対して複数の認識部位を持つ(多反応性)ことが明らかになった。このことは、抗インスリン IgG が、インスリンの複数部位と結合することによってインスリンと架橋し、多分子複合体を形成することが推定された。ネコの保有する抗インスリン IgG には、インスリンへの結合特性が異なる複数の分画があり、インスリン作用に異なる影響を与える可能性がある。

(5) 脂肪細胞におけるグルコース取り込み能等に対する抗インスリン IgG の影響

抗インスリン IgG の存在は検討したすべての濃度においてインスリンの働き(細胞内へのグルコース取り込み能とインスリン受容体シグナル伝達タンパク質のリン酸化)に影響しなかった。しかし、インスリンに対する親和性により抗インスリン IgG を2種類に分画すると、分画1(低親和性分画)の存在下においてインスリンの働きが増強されたが、分画2(高親和性分画)では増強されなかった。ネコが保有する抗インスリン IgG は、多クローン性および多反応性であることから、複数の抗原部位を有するインスリンに複数のIgGが同時に結合して多分子複合体を形成すると考えられた。抗インスリン IgG の分画1についてパパイン処理を行い、IgGのFcフラグメントを除去することにより分画1とインスリンとの多分子複合体形成を阻害したところ、インスリンの働きの増強効果は消失した。分画1の存在下でインスリンの働きが増強された理由として、インスリンと形成する多分子複合体の形状の違いが関係している可能性がある。以上のように、抗インスリン IgG にはインスリン作用を増強する分画と増強しない分画があることが明らかとなったが、その作用機序の詳細は不明である。

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1件)

Suzuki T, Nishii N, Takashima S, Matsubara T, Iwasawa A, Takeuchi H, Tahara K, Hachisu T, Kitagawa H: Ligand-binding characterization of feline insulin-binding immunoglobulin G. J Vet Med Sci 査読有 77: 1379-1383, 2015.

[学会発表](計0件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~naikahp/>

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

西飯直仁 (NISHII Naohito)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：20508478

(3) 連携研究者

()

研究者番号：