



# Effects of sulfonylureas and clofibrate on insulin receptors in cultured human lymphocytes

曾, 淑範

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-07-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1095

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001095>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(国籍)	曾 淑 範 (中華人民共和国)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第935号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和62年7月22日
学位論文題目	EFFECTS OF SULFONYLUREAS AND CLOFIBRATE ON INSULIN RECEPTORS IN CULTURED HUMAN LYMPHOCYTES (スルフォニルウレア剤およびクロフィブレードの培養ヒトリンパ球インスリンレセプターに及ぼす影響について)
審査委員	主査 教授 馬場 茂 明 教授 西塚 泰 美 教授 福崎 恒

## 論文内容の要旨

### 目 的

インスリン非依存性糖尿病の治療において経口血糖降下剤であるスルフォニルウレア剤が広く使用されている。その作用機序には膵B細胞よりのインスリン分泌を促進する作用に加えて、膵外性作用も存在することが古くから知られていた。その膵外性作用の主たる因子としてこの薬剤の標的組織のインスリンレセプターに対する影響が注目されている。しかし、今までの多くの研究にかかわらず、この影響について一致した見解が得られていない。それは主として実験条件の差によるものと考えられる。そこで今回、二種の培養ヒトリンパ球を用いて種々の実験条件下で、二種のスルフォニルウレア剤(トルブタミド、グリクラジド)と抗高脂血症剤のひとつで抗糖尿病作用を有するといわれているクロフィブレードのインスリンレセプターに対する影響を明らかにしようとした。

### 材料と方法

25 mlの培養フラスコ内で、培養ヒトリンパ球 IM-9 細胞又は Bri-7 細胞  $5 \times 10^5$  個を種々の濃度の薬剤 ( $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$  M) を含む RPMI-1640 medium 中で18時間培養した後、1% BSAを含む DMEM (pH 7.4) で細胞を二度洗浄し、 $0.5 \sim 1 \times 10^6$  /ml 細胞濃度に再浮遊した。一方、長時間の薬剤添加の影響を検討するため、各細胞を24時間毎に新鮮な薬剤を含む medium 中で計72時間培養し、同様に細胞数を調整した。これらの各細胞に  $0.3$  ng/ml の  $^{125}$ I-insulin を加え、 $15^\circ\text{C}$ 、2時間 incubate し、細胞に結合している放射活性を測定した。なお、 $33 \mu\text{g/ml}$  の非標識イ

ンスリン存在下における細胞の放射活性を非特異的結合として全結合より差し引くことにより  $^{125}\text{I}$ -insulin の特異的結合率を算出した。

Scatchard 解析は  $10^{-5}$  M 濃度の薬剤存在下に72時間、IM-9 細胞を培養し、前述のように細胞数を調整し、 $^{125}\text{I}$ -insulin とともに種々の濃度の非標識インスリン ( $0.2 \text{ ng/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ ) を加え、 $15^\circ\text{C}$ 、2 時間 incubate 後、細胞の放射活性を測定することにより算出した。

薬剤によるリンパ球のインスリン結合の増加機序を明らかにするために蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサミドの影響を検討した。IM-9 細胞を  $1 \times 10^{-5}$  M 濃度の薬剤を含む培養液中で72時間培養時に、 $5 \times 10^{-6}$  M 濃度のサイクロヘキサミドを添加し、 $^{125}\text{I}$ -insulin 結合能に及ぼす影響を検討した。

## 成 績

$10^{-5}$  M 濃度のスルフォニルウレア剤であるトルブタミドとグリクラジド、また抗高脂血症剤であるクロフィブレートを追加後、18時間培養した IM-9 細胞と Bri-7 細胞においては、明らかなインスリン結合能の増加は認められなかった。しかし、72時間培養後の両細胞においては明らかなインスリン結合能の増加が認められ、トルブタミドは IM-9 細胞におけるインスリン結合をコントロールの  $34 \pm 11\%$  (mean  $\pm$  SD)、Bri-7 細胞では  $12 \pm 7\%$ 、グリクラジドは IM-9 細胞で  $44 \pm 15\%$ 、Bri-7 細胞で  $37 \pm 12\%$ 、クロフィブレートは Bri-7 細胞に影響を与えなかったが IM-9 細胞では  $27 \pm 13\%$  と各々増加させた。次に 72 時間培養時における各薬剤濃度 ( $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$  M) の検討を行った。IM-9 細胞におけるインスリン結合能の増加は  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$  M の各薬剤濃度によって認められ、この濃度はこれら薬剤の常用量服用時に認められる血中濃度とほぼ一致した。

Scatchard 解析により、トルブタミドおよびグリクラジドの IM-9 細胞におけるインスリン結合増加作用はインスリンレセプター数の増加によるものであり、一方、クロフィブレートによる増加作用はインスリンレセプターの親和性の増加によるものであることが示唆された。

最後に、スルフォニルウレア剤によるインスリンレセプター数の増加が新たなレセプター蛋白の合成促進を介しているのか否かを明らかにするため、サイクロヘキサミドを用いた実験を行った。 $5 \times 10^{-6}$  M 濃度のサイクロヘキサミドの添加により、グリクラジドによる IM-9 細胞のインスリン結合能の増加は有意に抑制された。

## 結 論

二種のスルフォニルウレア剤とクロフィブレートの培養ヒトリンパ球インスリンレセプターに対する影響を検討した。その結果は以下のごとくである。

(1) 各薬剤とも短時間 (18時間) の細胞との培養では、インスリン結合能に明らかな影響を与えなかった。

(2) 長時間 (72時間) の培養により、三種の薬剤ともインスリン結合能の増加を導き、その至適濃度は  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$  M と治療上の血中濃度に近い値を示した。

(3) Scatchard 解析によりこのインスリン結合能の増加は、スルフォニルウレア剤ではレセプター数の増加に、一方、クロフィブレートではその親和性の増加に起因することが明らかとなった。

(4) サイクロヘキサミドを用いた実験より、グリクラジドによるレセプター数の増加作用はレセプター蛋白の合成促進を介している可能性が考えられた。

以上より、スルフォニルウレア剤およびクロフィブレートによる血糖降下機序のひとつに、標的細胞におけるインスリンレセプターを介した腭外性作用が存在する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

インスリン非依存性糖尿病の治療において経口血糖降下剤であるスルフォニルウレア剤が広く使用されている。その作用機序には膵ラ島B細胞からのインスリン分泌促進作用に加えて、腭外性作用も存在することが古くから知られている。しかし、今まで多くの研究に拘らず、この影響について一致した見解がえられていない。それは主として実験条件 (in vivo, in vitro) の差異によるものと考えられる。そこで本研究者は二種類のヒト培養リンパ球を用いて種々の実験条件下で、二種のスルフォニルウレア剤、第一世代のトルブタマイド、第2世代のグリクラジドについて、また抗脂血剤の一つであり血糖降下作用を有するといわれるクロフィブレートを対照薬としてインスリンレセプターに対する影響を明らかにし、スルフォニルウレア剤の腭外性作用を解明することを目的とした。

実験条件の特徴：培養ヒトリンパ球は細胞系列の確立された IM-9 と Bri-7 細胞を用いた。この両細胞はインスリンレセプター数が正常リンパ球よりも多く受容体研究に最適と考えられた。とくに、Bri-7 細胞は健康人末梢リンパ球から分離された diploid B-リンパ球である。

本研究では in vitro における薬剤の長時間添加の影響を検討する必要から以下のごとくした。すなわち、25mlの培養フラスコ内で、培養ヒトリンパ球 IM-9, Bri-7 細胞を  $5 \times 10^5$  個を  $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$  M の種々の濃度の薬剤中で18時間培養した後、1% BSA を含む DMEM (pH 7.4) で細胞を2度洗浄し、 $0.5 \sim 1 \times 10^6$  /ml 細胞数濃度に再浮遊した。さらに各細胞を24時間毎に新鮮な薬剤を含む medium 中で計72時間培養した後、同様に細胞数を調整した後、インスリンのレセプターへの特異的結合率を算出した。

結果と総括：二種のスルフォニルウレア剤とクロフィブレートの培養ヒトリンパ球インスリンレセプターに対する影響を検討した結果、次のことが証明された。

(1) 各薬剤とも短時間 (18時間) の細胞培養条件下では、インスリン結合能に対して明らかな影響を与えなかった。

(2) 長時間 (72時間) の培養によって、三種の薬剤ともインスリン結合能の増加を導き、その至適濃度は  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$  M と治療上の血中濃度に近い値を示した。

(3) Scatchard 解析によりこのインスリン結合能の増加は、スルフォニルウレア剤ではレセプター数の増加にあり、一方、クロフィブレートではその親和性の増加に起因することが明らかとなった。

(4) そこで、蛋白合成抑制剤サイクロヘキサミドを用い、インスリンレセプター結合能への影響を検討した。その結果、スルフォニルウレア剤のレセプター数の増加作用はレセプター蛋白の合成促進を介している可能性が考えられた。

以上の結果から、スルフォニルウレア剤およびクロフィブレートによる血糖降下機序のひとつに標的細胞におけるインスリン・レセプターを介した腭外性作用が存在する可能性が示唆された。

これらの成績は、臨床的に長期間投与したスルフォニルウレア剤の有効性が、薬剤の腭ウ島よりのインスリン分泌促進作用にもとづくものでないとする見解について、本剤の腭外作用、とくにインスリン受容体結合能の増加の実態を証明したものであり、かつまた、in vitro の薬剤の長時間観察についての実験条件をも創意工夫した研究である。

臨床治療薬の作用機序について重要な知見をえたものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、医学博士の学位をうる資格があると認める。