



Insulin receptor and postbinding defects in KK mouse adipocytes and improvement by ciglitazone

武富, 滋久

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-03-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1262

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001262>

※ 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・(本籍)	武 管 滋 久 (大阪府)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1062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	平成元年3月9日
学位論文題目	Insulin receptor and postbinding defects in KK mouse adipocytes and improvement by ciglitazone (遺伝性糖尿病KKマウスの脂肪細胞におけるインスリン受容体およびpostbindingの異常とシグリタゾンによる改善)
審査委員	主査 教授 馬 場 茂 明 教授 田 中 千 賀 子 教授 西 塚 泰 美

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

インスリン非依存型糖尿病では、インスリンの標的組織におけるインスリン耐性が重要な特性と考えられている。特に、インスリン受容体の結合能の低下に加え、postbindingの異常も見出されており、しかも後者がインスリン耐性に大きく影響しているという成績が集積されつつある。

今回、本疾患におけるpostbinding異常の機構を解明するため、遺伝性糖尿病KKマウスを使用した。KKマウスは、6～8週齢では血糖および血中インスリンとも高値を示し、著明なインスリン耐性を呈するインスリン非依存型糖尿病のモデル動物である。本研究では、まずKKマウス脂肪細胞におけるインスリン受容体およびpostbindingの変化を解析した。さらに、インスリン感受性上昇物質 {シグリタゾン: 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy) benzyl] thiazolidine-2,4-dione} をこのKKマウスに投与して、本薬剤のインスリン受容体とpostbinding調節機構に及ぼす影響についても検討した。

材料と方法

6週齢の雄性KKマウスおよび対照としてC57BL/6マウスを使用した。シグリタゾン (0.1% 混餌投与、約120mg/kg/day) は、4週齢のKKマウスに2週間投与した。脂肪細胞は副睾丸脂肪組織をコーラゲナーゼ処理により調製し、グルコースの膜透過および細胞内のグルコース代謝系 (グルコース酸化と脂肪合成) の、インスリンまたはインスリン様作用物質 (ビタミンK₃、過酸化水素) に対する反応性を検討した。また、脂肪組織片を、インスリンやインスリン様作用物質存在下に24時間反応させた後、脂肪細胞を単離してそのインスリン結合能を測定した。

成績

1. KK マウス脂肪細胞のインスリン受容体および postbinding の特性

KK マウスにおいては、対照の C57BL/6 マウスに比して軽度の肥満傾向があり、血糖および血漿インスリンは高値を示した。また、脂肪細胞の肥大を認めた。この条件下において、両マウス脂肪細胞のインスリンに対する反応性を検討した。

3-O-³H-メチルグルコースを用いてグルコースの膜透過性を両マウスで比較したところ、3-O-メチルグルコースの細胞への取り込みの基礎値は両マウスで同等であった。しかし、反応液中へのインスリン添加により C57BL/6 マウスにおいては有意な取り込みの促進が認められたのに対し、KK マウスにおいてはインスリンによる促進効果はほとんど認められなかった。以上より、KK マウス脂肪細胞においては、インスリン感受性および反応性が著明に低下していることが示唆された。

細胞内のグルコース代謝活性を検討するため、10 mM グルコース存在下に [U-¹⁴C] グルコースからの ¹⁴CO₂ 産生 (グルコース酸化)、グリセライド・グリセロール合成および脂肪酸合成を測定した。いずれの代謝系においても、インスリン非添加時の基礎活性は C57BL/6 マウスと KK マウスの両者において差違を認めなかった。しかし、KK マウスにおいては、インスリン添加によるグリセライド・グリセロール合成および脂肪酸合成の促進は対照マウスとほぼ同等であったが、グルコース酸化のインスリンによる促進は有意に低下していた。

そこで、KK マウス脂肪細胞のグルコース酸化におけるインスリン作用低下の原因を代謝経路上より明らかにするため、[1-¹⁴C] または [6-¹⁴C] グルコースを基質とした。KK マウスでは、[1-¹⁴C] または [6-¹⁴C] グルコース酸化の基礎活性は C57BL/6 マウスのそれと同等であった。しかし、インスリン添加による [6-¹⁴C] グルコース酸化は KK マウスにおいて対照マウスと同様に促進されたが、[1-¹⁴C] グルコース酸化に対するインスリン作用は KK マウスにおいて有意に低下していた。

KK マウス脂肪細胞の postbinding の変化を検討するため、インスリン受容体には結合せずにインスリン様作用を発現するビタミン K_s と過酸化水素に対する [1-¹⁴C] グルコース酸化の反応性を検討したが、KK マウスではやはり有意に低下していた。

次に、KK マウス脂肪細胞におけるインスリン受容体の調節能を C57BL/6 マウスと比較した。マウスの脂肪組織片をインスリン、ビタミン K_s、過酸化水素とそれぞれ 24 時間反応させた後、脂肪細胞を調製してインスリン受容体の変化を測定した。C57BL/6 マウスにおいては、インスリン、ビタミン K_s、過酸化水素の作用によりインスリン受容体数は減少した。一方、KK マウスではインスリンやこれらのインスリン様作用物質によるインスリン結合能の変化は認められなかった。

2. KK マウスに対するシグリタゾン投与の影響

KK マウスにシグリタゾンを投与し、脂肪細胞の代謝変化を検討した。シグリタゾンを投与した

KK マウスでは、体重と脂肪細胞の大きさに変化はなかったが、血糖と血漿インスリン値は有意に低下した。

シグリタゾンを投与したKK マウス脂肪細胞では、無処理のKK マウスの細胞に比して、3-O-メチルグルコース取り込みの基礎値は高い傾向にあり、インスリン刺激時の取り込みも有意に高値を示し、インスリンによる用量反応曲線は左方へ偏移した。さらに、シグリタゾンはグルコース10mM存在下で、[U-¹⁴C] グルコース酸化の基礎活性およびインスリン刺激時の活性を高め、この場合もインスリンの用量反応曲線は左方へ偏移した。

シグリタゾンを投与したKK マウス脂肪細胞のグルコース酸化は、インスリンの場合と同様にビタミンK₃や過酸化水素添加によっても高い反応性を示した。

最後に、シグリタゾンを投与したKK マウス脂肪細胞では、インスリン受容体数の増加が認められ、さらに無処理のKK マウスの場合とは異なり、インスリン、ビタミンK₃、過酸化水素によるインスリン受容体数の減少が出現するようになった。

結 論

遺伝性糖尿病 KK マウスの脂肪細胞におけるインスリン受容体および postbinding の変化を対照の C57BL/6 マウスと比較検討し、以下の結論を得た。

1) KK マウス脂肪細胞では、インスリンによるグルコースの膜透過および [1-¹⁴C] グルコース酸化の促進効果が低下していたが、インスリンの脂肪合成促進作用は正常であった。

2) KK マウス脂肪細胞では、インスリン受容体に結合せずにインスリン様作用を発現するビタミンK₃や過酸化水素刺激による [1-¹⁴C] グルコース酸化能も低下していた。

3) C57BL/6 マウス脂肪細胞のインスリン結合能は、インスリン、ビタミンK₃、過酸化水素添加により減少したが、KK マウスにおいては、このような現象は認められなかった。

4) インスリン感受性上昇物質：シグリタゾンを投与したKK マウス脂肪細胞においては、インスリン受容体数の増加およびグルコースの膜透過とグルコース酸化に対するインスリン感受性と反応性の上昇を認めた。また、インスリン、ビタミンK₃、過酸化水素によるインスリン受容体数の減少も認められた。

以上より、KK マウスの脂肪細胞では、インスリンの作用に heterogeneity が認められた。すなわち、グルコースの膜透過と五炭糖リン酸回路におけるインスリン作用は低下しているが、解糖系、クレブス回路および脂肪合成へのインスリン作用は正常であることが明らかとなった。このインスリン作用の低下には、postbinding の異常が関与していると考えられ、さらにこの postbinding の異常はインスリン受容体の調節能と密接に関連している可能性が推定された。

論文審査の結果の要旨

インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) の病態特性に、インスリンの標的組織におけるインスリン耐性が大きく関与していると考えられている。特に標的細胞表面に存在するインスリン受容体の数や親和性の低下に加え、受容体以降の情報伝達系 (postbinding) の異常も報告されており、最近では後者がインスリン耐性に大きく影響しているという成績が集積されつつある。

本研究は NIDDM のモデル動物である KK マウスよりインスリンの標的細胞のひとつである脂肪細胞を分離し、本単離細胞系を用いて、インスリン受容体及び postbinding の変化を検索した。加えて、インスリン感受性上昇物質として注目されているシグリタゾンを KK マウスに投与し、同マウスの脂肪細胞におけるインスリン反応性等を解析することにより、本物質の NIDDM 治療における臨床的有用性についても検討したものである。

研究の結果得られた知見として、まず、KK マウス脂肪細胞ではインスリンによるグルコースの膜透過性及びグルコース酸化能に対する促進作用が対照マウスと比較して低下していることを明らかにした。この KK マウスにおけるグルコース酸化能の低下は、インスリン受容体に結合せずにインスリン様作用を発揮するビタミン K₃ や過酸化水素を用いた場合も認められたことより、本マウスにおけるインスリン作用の低下がインスリン受容体の異常よりもむしろそれ以降の postbinding の defect にある可能性を指摘した。

しかし、KK マウス脂肪細胞においてはもうひとつの重要なインスリン作用である脂肪合成は正常であった。以上の結果は本モデルマウスの脂肪細胞においては、インスリン作用に heterogeneity が認められることが推定され、NIDDM のモデルとしてユニークなものと考えられる。さらに本マウスにおいては、正常のマウスに認められるインスリンやビタミン K₃ 添加による脂肪細胞表面のインスリン受容体数の減少 (down regulation と呼ばれる) が認められなかった。本マウスにおける postbinding defect と down regulation の消失との関連は間接的ではあるが受容体以降の情報伝達系がインスリン受容体の調節機構に密接に関与している可能性を示唆するものとして極めて興味深い。

次にシグリタゾンを投与した KK マウスにおいては有意な血糖とインスリン値の低下が認められ、まず本物質が *in vivo* において有効であることが示された。次いで本物質投与マウスの脂肪細胞を用いて同様の検討が行われ、シグリタゾン投与によりインスリン受容体数の増加及びグルコースの膜透過とグルコース酸化に対するインスリン感受性と反応性の上昇を認めた。さらに、本物質投与により消失していた down regulation が回復した。この結果はシグリタゾンがインスリン受容体レベルのみならず postbinding defect に対しても何らかの効果を有することを示すものと思われる。

以上の成績を総括すると、KK マウス脂肪細胞においてはインスリン受容体の異常よりも postbinding の異常が推定され、本マウスが NIDDM のモデル動物として有用であることが明らかにされた。次いで postbinding の異常がインスリン受容体の調節能と密接に関連している可能

性が本研究より推定された。最後にインスリン感受性上昇物質であるシグリタゾンがインスリン受容体と postbinding 調節機構の両者に対して有効であることが示唆された。

本研究は、モデル動物を用いて NIDDM の病態特性を明らかにするとともに、シグリタゾンの本疾患に対する有効性を立証したもので、最近特に注目されている標的細胞レベルにおけるインスリン作用機構を解明する上でも極めて重要な知見を提示したもので価値ある集積とみなされる。よって、本研究者は、医学博士の学位を得る資格を有するものと認める。