



著明なインスリン抵抗性を呈した糖尿病患者におけるインスリン作用障害発症機構の解析

上田, 容生

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-11-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2464

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002464>

※ 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。



【149】

氏 名・(本 籍) 上田 容生 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博ろ第1756号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成12年11月8日

【学位論文題目】

著明なインスリン抵抗性を呈した糖尿病患者における
インスリン作用障害発症機構の解析

審 査 委 員

主査 教授 春日 雅人

教授 千原 和夫 教授 米澤 一仁

【緒言】

2 型糖尿病の病態は膵 β 細胞からのインスリン分泌障害と肝、骨格筋、脂肪といった末梢インスリン感受性組織におけるインスリン抵抗性に特徴づけられる。2 型糖尿病の発症においてインスリン分泌障害とインスリン抵抗性のどちらが第一義的な異常であるかについては見解の一致をみないが、いずれの障害が先行しても糖、脂質代謝異常を介した二次的なインスリン分泌低下、二次的なインスリン感受性の低下が生じ、糖尿病の病態が完成すると考えられる。一方、著しいインスリン抵抗性が第一義的な病因と考えられる一群の糖尿病が存在する。その代表的なものはインスリン抵抗症 A 型およびインスリン抵抗症 B 型であり、前者はインスリン受容体の遺伝子異常に起因する受容体の機能異常がその病態の本質であり、後者は血中の抗インスリン受容体抗体によりインスリン抵抗性が招来されることで発症する。インスリン抵抗症は共通して著しい高インスリン血症、外因性インスリンに対する反応性の低下に加え、多毛、黒色表皮腫、多嚢胞性卵巣などの高インスリン血症により二次的に惹起される特異な臨床所見に特徴づけられる。このようなインスリン抵抗症と類似した臨床的特徴を有する患者の中にインスリン受容体遺伝子異常や抗インスリン受容体抗体が検出されない症例が存在し、そのインスリン抵抗性はインスリン受容体以後の細胞内情報伝達障害に起因すると推測されている。しかし、このような症例における細胞内インスリン情報伝達障害の生化学的、分子生物学的検索を行った報告は少なく、その障害の本態は明らかではない。

本研究では著しいインスリン抵抗性を呈するものの、抗インスリン受容体抗体やインスリン受容体機能の異常が存在しない糖尿病症例より皮膚線維芽細胞を得て、そのインスリン情報伝達機構における障害部位の解析を試みた。

【方法】

(1) 細胞培養

皮膚生検および培養皮膚線維芽細胞を用いての病因・病態解析についてのインフォームドコンセントを得た後、局所麻酔下に上腕内側部より 2 × 2 cm の真皮組織を切除し、15 %牛胎児血清、50 U/ml ペニシリン、50 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L- グルタミンを添加した Dulbecco's minimum essential medium にて培養し、初代培養皮膚線維芽細胞を得た。皮膚線維芽細胞は 6 cm 径もしくは 10 cm 径培養プレートにて培養し、confluent となった時点で細胞数比 1 : 3 で継代を行い、10 世代までの細胞を実験に供した。

また、2名の正常耐糖能者より同様の処置にて皮膚線維芽細胞を得て対照実験に供した。

(2) インスリン受容体及び IGF-I 受容体機能の検討

患者末梢赤血球インスリン受容体のインスリン結合能およびインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性を測定した。5名の正常耐糖能者より得た赤血球を対照実験に供した。IGF-I (insulin-like growth factor-I) 受容体のチロシンキナーゼ活性は 10cm 径培養プレートに confluent に培養した患者または対照皮膚線維芽細胞を 24 時間の血清除去の後、IGF-I にて刺激し細胞を可溶化した後、単クローン性抗フォスフォチロシン抗体 (PY20) にて免疫沈降し、SDS-PAGE 後、多クローン性抗フォスフォチロシン抗体 (α PY) にて Western blot に供した。

(3) PI 3-キナーゼ活性、Akt/ PKB (以下 Akt と略す) 活性の測定

インスリン、IGF-I、PDGF (platelet-derived growth factor) にて刺激した患者または対照皮膚線維芽細胞を可溶化し、抗 PI 3-キナーゼ抗体、抗 IRS (insulin receptor substrate)-1 抗体、抗 IRS-2 抗体、PY20 もしくは抗 PDGF 受容体抗体免疫沈降分画中の PI 3-キナーゼ活性を測定した。また、IGF-I 刺激した細胞の可溶化分画を抗 Akt 抗体にて免疫沈降し、Histon2B を基質として免疫沈降分画中のキナーゼ活性を測定した。

(4) IRS-1 の機能解析及び遺伝子解析

IGF-I にて刺激した患者または対照皮膚線維芽細胞を可溶化し PY20 にて免疫沈降し、SDS-PAGE 後、単クローン性抗フォスフォチロシン抗体 (RC20) にて Western blot に供した。さらに皮膚線維芽細胞の IRS-1 mRNA 及び IRS-1 蛋白の発現を各々 Northern blot 及び Western blot にて患者・対照者間で比較検討した。また、患者皮膚線維芽細胞からの genomic DNA をテンプレートにした PCR・subcloning 法により IRS-1 遺伝子の全長をシークエンスした。

【結果および考察】

生体でのインスリン作用は、肝、骨格筋、脂肪といった標的細胞上に存在するインスリン受容体を通じて発揮される。インスリンの結合により受容体チロシンキナーゼが活性化すると、IRS 蛋白がチロシンリン酸化を受け、IRS 蛋白上のリン酸化チロシン残基を認識して種々の SH2 (Src homology region 2) ドメイン含有情報伝達分子が結合する。IRS 蛋白に結合する分子の中では脂質リン酸化酵素である PI 3-キナーゼが、糖輸送、グリコーゲン合成酵素の活性

化、脂肪分解抑制、アミノ酸輸送、蛋白合成といったインスリンの代謝調節作用を媒介することが明らかとなっている。PI 3-キナーゼがインスリンの代謝調節作用の主要な部分を媒介する事実を考慮するに、PI 3-キナーゼの活性化の障害によりインスリン抵抗性の発症する可能性が強く示唆される。そこで、本研究では著明なインスリン抵抗性を呈する糖尿病症例において、特に PI 3-キナーゼの活性化機構を中心にその情報伝達障害部位の解析を試みた。

患者は 42 才女性で、32 才時に初めて高血糖を指摘された。75g 経口ブドウ糖負荷試験にて著しい血糖上昇と著明な高インスリン血症を認めたが、他の内分泌学的異常、抗インスリン抗体、抗インスリン受容体抗体等のインスリン感受性障害を惹起し得る原因は認めなかった。患者赤血球のインスリン結合能は正常対照に比して有意な低下はなかった。患者皮膚線維芽細胞のインスリンまたは IGF-I 依存性の 95 kDa 蛋白のチロシンリン酸化能には異常がなかったことから、これらの受容体の機能には障害がないことが推察された。ところが、インスリンまたは IGF-I 刺激後の抗フォスフォチロシン抗体免疫沈降分画中の PI 3-キナーゼ活性は正常対照に比して約 60%に低下しており、さらに Akt 活性も対照の約 60%に低下していた。Akt は糖代謝に関与する PI 3-キナーゼの下流のエフェクターのひとつであり、PI 3-キナーゼ—Akt の情報伝達経路の障害が本症例のインスリン抵抗性の原因である可能性が示唆された。また、細胞を PDGF で刺激した後の抗 PDGF 受容体抗体免疫沈降分画中の PI 3-キナーゼ活性は患者・対照間で差はなかった。このことは、本症例ではインスリンおよび IGF-I の情報伝達に特異的な機構が障害されている可能性を示唆する。インスリン受容体と同様に IGF-I 受容体も IRS 蛋白を基質とし細胞を IGF-I で刺激した場合、IRS 蛋白と結合することにより PI 3-キナーゼが活性化される。一方、細胞を PDGF で刺激した場合は PI 3-キナーゼはチロシンリン酸化した PDGF 受容体に直接結合することにより活性化される。これらのことから、本症例では 1) PI 3-キナーゼ自体には異常がないこと、および 2) IRS 蛋白と PI 3-キナーゼの結合が特異的に障害されていることが推察された。実際、IGF-I 刺激による抗 IRS-1 抗体、抗 IRS-2 抗体免疫沈降分画中の PI3-キナーゼ活性も正常の約 60%以下に低下していた。さらに、IGF-I 刺激の細胞から抗フォスフォチロシン抗体により免疫沈降される IRS-1 と考えられる分子量約 185kDa 蛋白のチロシンリン酸化は患者細胞において著しく低下していたこと、患者・対照者間で IRS-1 の mRNA および蛋白の発現量に差がなかったことを考えあわせると、本症例におけるインスリンおよび IGF-I 刺激による PI 3-キナーゼ

活性化の特異的な抑制は IRS 蛋白のチロシンリン酸化障害によることが推察された。ここで、IGF-I 刺激前後の抗 PI 3-キナーゼ抗体免疫沈降分画中の PI3-キナーゼ活性について、IGF-I 刺激後の PI3-キナーゼ活性増加が IRS 蛋白のチロシンリン酸化依存性であれば、当然 IRS 蛋白のチロシンリン酸化の著明な低下のため、患者・対照間で差がみられるところであるが、そうでなかったことに注目すべきである。IGF-I 刺激による PI3-キナーゼ直接の活性化による可能性も考えられるが、それ以上の正確な説明は困難である。

ヒト IRS-1 にはアミノ酸多型性が存在し、ある種の多型性は PI 3-キナーゼとの結合を低下させることが報告されている。本症例の IRS-1 遺伝子には既報の Gly972Arg 変異が見い出されたが、この変異によっては IRS-1 自体のリン酸化の低下は生じない。また、Gly972Arg 変異は糖尿病患者のみならず正常耐糖能者にも見い出されており、この変異が本症例の PI 3-キナーゼ活性化障害およびインスリン抵抗性の原因とは考えにくい。また、本症例では IRS-1 のみならず IRS-2 の PI 3-キナーゼ結合の低下も認めていることから、IRS 蛋白に共通したなんらかの機構の異常の存在が推察される。

IRS 蛋白のチロシンリン酸化に影響を与える因子として、1) IRS 蛋白のセリン残基のリン酸化と、2) IRS 蛋白特異的チロシン脱リン酸化酵素の活性化があげられる。PKC (protein kinase C)、ラパマイシン感受性キナーゼ、さらには $\text{TNF}\alpha$ により活性化されるキナーゼ等により IRS 蛋白のセリン残基がリン酸化すると、IRS 蛋白のチロシンリン酸化の低下や PI 3-キナーゼとの結合が阻害されることが知られている。また、チロシン脱リン酸化酵素活性増強が原因と考えられる糖尿病モデルマウスも存在し、逆にチロシン脱リン酸化酵素遺伝子の欠損によりインスリン感受性が増強することも報告されている。今後これらの分子の機能異常の有無を検討することにより本症例のインスリン抵抗性の本態が明らかになるものと思われる。

【結語】

著明なインスリン抵抗性を呈する糖尿病患者のインスリン情報伝達機構における障害部位の解析において、IRS 蛋白のチロシンリン酸化の障害に起因する PI 3-キナーゼ活性化の異常が本症例におけるインスリン抵抗性の原因である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1757号	氏 名	上田 容生
論文題目	著明なインスリン抵抗性を呈した糖尿病患者における インスリン作用障害発症機構の解析		
審査委員	主 査 春日 雅人 副 査 千原 和夫 副 査 米澤 一 仁		
審査終了日	平成 12 年 10 月 10 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

生体でのインスリン作用は、肝、骨格筋、脂肪といった標的細胞上に存在するインスリン受容体を通じて発揮される。インスリンの結合により受容体チロシンキナーゼが活性化すると、insulin receptor substrate 蛋白（以下 IRS 蛋白）がチロシンリン酸化を受け、IRS 蛋白上のリン酸化チロシン残基を認識して種々の Src homology region 2 ドメイン含有情報伝達分子が結合する。IRS 蛋白に結合する分子の中では脂質リン酸化酵素である phosphoinositide 3-kinase（以下 PI 3-キナーゼ）が、糖輸送、グリコーゲン合成酵素の活性化、脂肪分解抑制、アミノ酸輸送、蛋白合成といったインスリンの代謝調節作用を媒介することが明らかとなっている。PI 3-キナーゼがインスリンの代謝調節作用の主要な部分を媒介する事実を考慮するに、PI 3-キナーゼの活性化の障害によりインスリン抵抗性の発症する可能性が強く示唆される。本研究では著明なインスリン抵抗性を呈する糖尿病症例において、特に PI 3-キナーゼの活性化機構を中心にインスリン情報伝達機構における障害部位の解析を試みた。

症例は 42 才女性で、32 才時に初めて高血糖を指摘され、同時に著しい高インスリン血症を認めたが、他の内分泌学的異常、抗インスリン抗体、抗インスリン受容体抗体等のインスリン感受性障害を惹起し得る原因は認めなかった。患者赤血球インスリン受容体のインスリン結合能および受容体自己リン酸化能は対照に比して差はみられず、さらに患者皮膚線維芽細胞の insulin-like growth factor-I (IGF-I) 受容体のチロシンキナーゼ活性も対照に比して差がなかったことから、これらの受容体の機能には障害がないことが推察された。ところが、患者皮膚線維芽細胞のインスリン、IGF-I 刺激後の抗フォスフォチロシン抗体免疫沈降分画中の PI 3-キナーゼ活性は対照に比して約 60%に低下しており、さらに糖代謝に関与する PI 3-キナーゼの下流のエフェクターのひとつである Akt/PKB の活性も対照の約 60%に低下していた。また、platelet-derived growth factor (PDGF) で刺激した後の抗 PDGF 受容体抗体免疫沈降分画中の PI 3-キナーゼ活性は対照に比し差はなかった。このことは、本症例ではインス

リン及び IGF-I の情報伝達に特異的な機構が障害されている可能性が示唆された。インスリン受容体と同様に IGF-I 受容体も IRS 蛋白を基質とし細胞を IGF-I で刺激した場合、IRS 蛋白と結合することにより PI 3-キナーゼが活性化される。一方、細胞を PDGF で刺激した場合は PI 3-キナーゼはチロシンリン酸化した PDGF 受容体に結合することにより活性化される。以上のことから、本症例では ① PI 3-キナーゼ自体には異常がないこと、② IRS 蛋白と PI 3-キナーゼの結合が特異的に障害されていることが推察された。実際、IGF-I 刺激による抗 IRS-1 抗体、抗 IRS-2 抗体免疫沈降分画中の PI 3-キナーゼ活性も対照に比して約 60%に低下していることから、IRS 蛋白に共通したなんらかの機構の異常の存在が推察された。さらに、① IGF-I 刺激の細胞から抗フォスフォチロシン抗体により免疫沈降される IRS 蛋白と考えられる分子量約 185kDa 蛋白のチロシンリン酸化は患者において著しく低下していたこと、② 患者・対照間で IRS-1 の mRNA および蛋白の発現量に差がなかったことを考えあわせると、本症例におけるインスリン及び IGF-I 刺激による PI 3-キナーゼ活性化の特異的な抑制は IRS 蛋白のチロシンリン酸化障害によることが推察された。また、ヒト IRS-1 にはアミノ酸多型性が存在し、ある種の多型性は PI 3-キナーゼとの結合を低下させることが報告されている。本症例の IRS-1 遺伝子には既報の Gly972Arg 変異が見い出されたが、この変異によっては IRS-1 自体のリン酸化の低下は生じない。また、Gly972Arg 変異は糖尿病患者のみならず正常耐糖能者にも見い出されており、この変異が本症例の PI 3-キナーゼ活性化障害およびインスリン抵抗性の原因とは考えられなかった。

本研究は著明なインスリン抵抗性を呈する症例において細胞内インスリン情報伝達障害の生化学的・分子生物学的検索を行い、IRS 蛋白のチロシンリン酸化の障害に起因する PI 3-キナーゼ活性化の異常が本症例におけるインスリン抵抗性の原因となる可能性を示し、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。