

Title	培養ヒト線維芽細胞におけるインスリン作用
Author(s)	日高, 秀樹
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33768">https://hdl.handle.net/11094/33768</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	ひ 日	だか 高	ひで 秀	き 樹
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6 1 1 5	号	
学位授与の日付	昭和 58 年 6 月 1 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	培養ヒト線維芽細胞におけるインスリン作用			
論文審査委員	(主査)			
	教授	阿部	裕	
	(副査)			
	教授	垂井清一郎	教授	田中 武彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

インスリン作用の検討には従来より主にラット脂肪組織、筋肉を用いて研究が行なわれてきた。ヒト組織におけるインスリン作用は材料の入手が困難なこともあり、研究は十分にはなされていない。私たちは、ヒト組織におけるインスリン作用研究の新しい方法を確立することを目的として、少ない侵襲により長期間かつ、比較的大量に実験試料として利用可能である培養ヒト線維芽細胞におけるインスリン作用を検討した。

#### (方法ならびに成績)

ヒト線維芽細胞は、10%ウシ胎仔血清を含む Eagle の Minimal Essential Medium 中にて継代培養した。実験には、ペトリ皿上に 0.05%トリプシン、0.02%EDTAを用いて細胞を播種し、1週間後 confluent となった細胞を用いた。インスリン作用の検討には、BMEアミノ酸、ビタミン、1mg/ml ウシ血清アルブミン、21mM NaHCO<sub>3</sub>を含む Dulbecco のリン酸緩衝食塩水にて、ブドウ糖、血清なしの前処置を18時間行なった細胞を用いた。

インスリン作用の指標としては、細胞へのブドウ糖とり込みの亢進、およびグリコーゲン合成の律速酵素であり、脂肪組織、筋肉、肝臓においてインスリンによる調節を受けることが知られているグリコーゲン合成酵素 (EC 2.4.1.11) の活性化を用いた。ブドウ糖とり込みは、細胞と 0.1 mM (U-<sup>14</sup>C) Glucose を10分間反応後、細胞を洗浄して細胞内の放射能活性を測定し、酵素活性は細胞ホモジネート上清を用いて Thomas らの filter paper 法にて測定した。

グリコーゲン合成酵素の活性型である I 活性 (ブドウ糖 6 リン酸非依存型) はインスリン処置 5 分後

にはすでに上昇し、30分以降には最大反応を示した。

インスリンによる容量応答性の検討では  $2 \times 10^{-10}$  M の生理的インスリン濃度よりインスリン作用は認められ、半最大応答に必要なインスリンは  $3 \times 10^{-9}$  M であった。この時、酵素の総活性には変化を認めなかった。

ブドウ糖および血清なしの細胞前処置をより長時間行なうことにより、グリコーゲン合成酵素の総活性は低下したが、I 活性のインスリンに対する応答性は増大した。一方、半最大応答に必要なインスリン濃度には変化を認めず、細胞個有のインスリン感受性をより正確に検討することが可能となった。

細胞とインスリンの反応時に反応液中の pH を低下させるとインスリンによる最大応答は、ブドウ糖とり込みの亢進、グリコーゲン合成酵素の活性化、ともに減少し、容量応答曲線は、右方へ偏位した。この時インスリンの受容体への結合は、親和性の低下により減少していた。このことは、培養線維芽細胞におけるインスリン作用は、インスリンの受容体への結合を介して調節を受けていることを示唆している。しかし、受容体の親和性が低下しても、インスリン高濃度時のインスリン受容体結合量には大きな影響はないと考えられることから、pH 低下時の最大応答の低下には、受容体以降の機序も関与していると考えられた。

in vitro における細胞老化のインスリン作用に及ぼす影響を長期間継代培養した細胞を用いて検討したが、酵素総活性の減少を認めるものの、インスリンに対する応答性、感受性ともに変化は認められず、培養線維芽細胞のインスリン感受性は、培養条件により変化を受けないと考えられた。

#### (総括)

1. 培養ヒト線維芽細胞においてインスリンによるグリコーゲン合成酵素の活性化が認められた。この作用はブドウ糖なしの前処置を行なうことにより、増幅された。
2. インスリン作用は  $1 - 2 \times 10^{-10}$  M の生理的インスリン濃度より認められ、半最大応答には  $3 \times 10^{-9}$  M のインスリンを必要とした。
3. pH 低下時には、インスリン作用は低下し、容量応答曲線は右方に偏位した。この時、インスリン結合は低下していた。
4. in vitro の細胞老化は酵素活性の減少を伴ったが、インスリンに対する応答性、感受性に変化を与えなかった。

以上の結果は、培養ヒト線維芽細胞がインスリンに应答する組織であり、その作用はインスリン受容体を介して調節を受けていることを示している。また、この実験系は、ヒト個体の遺伝的インスリン感受性の in vitro での検討が可能のみならず、各種ホルモン、代謝産物のインスリン作用に及ぼす影響を、ヒト組織を用いて観察しうることから、糖尿病をはじめとする様々なインスリン作用不全を示す疾患の病態解明に有用な手段であると考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

血糖調節系においては、インスリン分泌特性と作用特性が重要な意義をもってくるが、ヒト組織におけるインスリン作用の検討は、試料の入手が困難なため十分な説明はなされていない。

本論文は、培養ヒト線維芽細胞がインスリン応答組織であり、その作用はインスリン受容体を介して調節を受けている事を明らかとし、ヒト組織におけるインスリン作用発現機序、個体特性に一致したインスリン作用特性などの解明に極めて有用な実験系を確立した。