

| | |
|--------------|---|
| Title | Augmented growth response to IGF-1 via increased IRS-1 in Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing kinase-negative insulin receptors |
| Author(s) | 井上, 聡 |
| Citation | 大阪大学, 2001, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42740 |
| 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 | 井上 聡 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 第 15864 号 |
| 学位授与年月日 | 平成13年2月13日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文名 | Augmented growth response to IGF-1 via increased IRS-1 in Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing kinase-negative insulin receptors (キナーゼ活性を欠くインスリン受容体を表出する CHO 細胞での IRS-1 増加による IGF-1 反応性の増加) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 堀 正二 教授 荻原 俊男 |

論文内容の要旨

(目的)

糖尿病性腎症、網膜症、動脈硬化症などの合併症は、増殖因子を介した細胞増殖と密接に関わっていることがわかっている。高血糖や高インスリン血症による細胞増殖のメカニズムについてはいくつか報告されている。一方糖尿病では、インスリン作用不足がベースにあり、インスリンシグナルは低下していると考えられる。しかし、インスリンシグナルの低下と細胞増殖の関与については、よく知られていない。そこで、今回インスリンシグナルの低下に新たに注目し、糖尿病患者から見出されたインスリン変異受容体を用いて、インスリンシグナル低下の細胞増殖能に対する影響を明らかにすることを目的とした。

(方法ならびに成績)

インスリン受容体チロシンキナーゼ領域¹¹³⁴Ala→Thrの変異受容体は、インスリン抵抗性をもつ糖尿病患者から見出され、インスリン刺激によるインスリン受容体の自己リン酸化およびチロシンキナーゼの活性化がみられない。この変異受容体の cDNA フラグメントを pEF-BOS に組み込んだ後、リポフェクション法で CHO 細胞にトランスフェクトした。この細胞を用いて、細胞増殖および増殖因子に対する反応性の変化について検討した。レセプターの binding study は¹²⁵I-インスリン、¹²⁵I-IGF-1 を使用。DNA 合成は³H-thymidine の取り込み、グリコーゲンの合成は¹⁴C-グルコースのグリコーゲンへの合成、グルコースの細胞内への取り込みは、¹⁴C-2DOG の取り込みを測定。蛋白発現量、チロシンリン酸化、MAPK、P13K 活性は immunoblotting を使用。P13K 活性については γ -³²P-ATP を用いた in vitro kinase assay も行った。mRNA の発現量は Northern blotting を使用した。

インスリン受容体発現量はコントロール株で 700/cell に対して、変異株 1、2 で 59000/cell、67000/cell と著明に増加し、変異受容体の過剰発現が確認できた。一方 Kd には差がなかった。

インスリン刺激によるグリコーゲン合成、グルコースの取り込み、DNA 合成はいずれもコントロール株に比べて、変異株では低下しており、キナーゼ活性を欠く変異受容体の発現により、インスリンシグナルが低下していることが確かめられた。

増殖因子に対する DNA 合成を調べたところ、PDGF、b-FGF、HB-EGF に対する反応性には差がなかったが、IGF-1 に対する DNA 合成が変異株において有意に増加し、IGF-1 に対する細胞増殖能が亢進していることが明らかになった。

そこで IGF-1 受容体の変化があるか調べたが、IGF-1 受容体の発現量および IGF-1 に対する Kd には両細胞間で差はみられず、IGF-1 刺激による IGF-1 受容体のリン酸化にも差はなかった。

次に IGF-1 刺激に対する IRS-1 のリン酸化について Western blotting で調べた。IRS-1 のリン酸化は変異株において増加していた。また、IRS-1 の蛋白発現量を Western blotting で、mRNA の発現量を Northern blotting で測定したところ、いずれも変異株において増加がみられた。

一方、IRS-1 と同様にインスリン受容体と IGF-1 受容体の基質である IRS-2、Shc についても同様の検討を行ったが、IGF-1 刺激によるリン酸化、蛋白発現量ともに両細胞間で差はみられなかった。

次に IGF-1 シグナル経路において、より下流に位置する MAPK、PI3K の活性化について検討を行った。IGF-1 刺激による MAPK の活性化、PI3K の IRS-1 への結合および活性化はいずれも変異株において有意に増加していた。このことから、IGF-1 に対する増殖反応性の増加は IRS-1 発現量の増加が関与しているものと考えられた。

(総括)

糖尿病患者から見出されたチロシンキナーゼ活性を欠く変異インスリン受容体の発現により、インスリンシグナルの障害された細胞において、IRS-1 蛋白量増加にともなう IGF-1 に対する増殖反応性の亢進が認められた。このことが糖尿病性合併症でみられる細胞増殖能の亢進にともなう病変と関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

糖尿病性合併症は、増殖因子を介した細胞増殖と密接に関わっていることがわかっている。高血糖や高インスリン血症による細胞増殖のメカニズムについては、いくつか報告されている。しかし糖尿病では、インスリン作用不足がベースにあり、細胞内レベルではむしろインスリンシグナルは低下していることが考えられる。これまでインスリンシグナルの低下と細胞増殖の関与については、よく知られていないため、本申請者はインスリンシグナルの低下に新たに注目し、糖尿病患者から見出されたチロシンキナーゼ活性を欠く変異インスリン受容体を CHO 細胞に導入し、インスリンシグナルの障害された細胞を作成した。その細胞において、IGF-1 に対する増殖反応性の亢進、およびその機序として IRS-1 蛋白発現量が増加していることを見出した。本研究は、糖尿病性合併症でみられる細胞増殖能の亢進にともなう病変発症の新たなメカニズムを提唱した意味において、学位に値すると考えられる。