

ヒト正常インスリン受容体を発現した トランスジェニックマウス作製とその応用

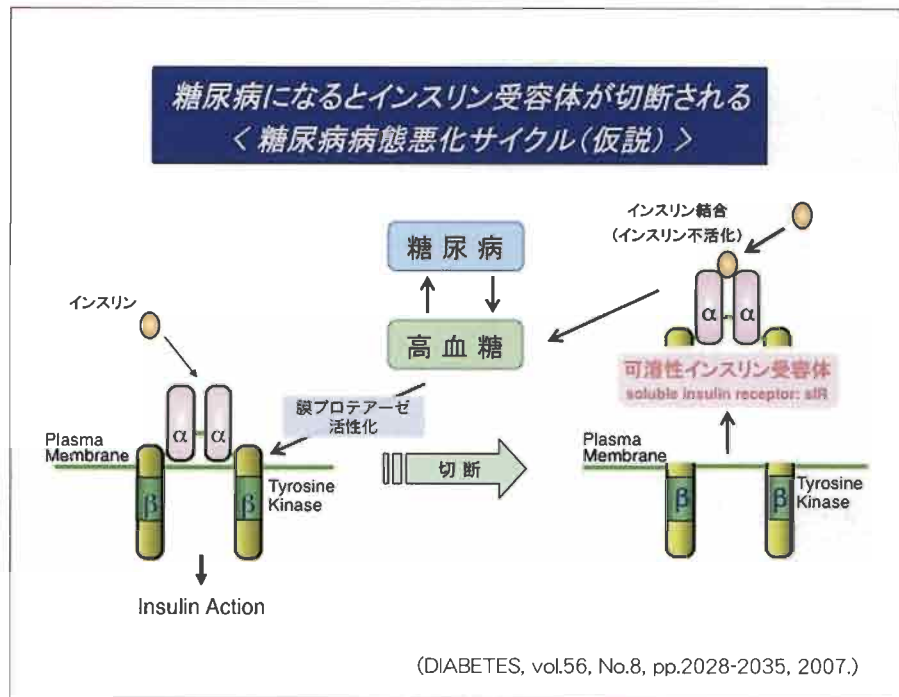
徳島大学疾患酵素学研究センター
シグナル伝達と糖尿病研究部門

教授
蛭名 洋介



はじめに

インスリンは細胞表面に存在するインスリン受容体に結合することでその作用が開始する (Cell, 1985, Ebina et al.)。膜タンパク質であるインスリン受容体は細胞膜外にインスリン結合ドメインを持つ分子量約135kDaの α サブユニット、細胞内にチロシンキナーゼドメインを持つ分子量約95kDaの β サブユニットから成り、各々のサブユニット2分子が



ジスルフィド結合によって細胞膜上でヘテロ4量体を形成している(図)。 α サブユニットのインスリン結合ドメインにインスリンが結合すると、 β サブユニットに内在するチロシンキナーゼが活性化され情報が細胞内に伝達され、血中から細胞内へのグルコース取り込み促進などのインスリン作用が発現する。

我々はヒトインスリン受容体細胞外ドメイン(以下sIR; soluble Insulin Receptor)を高感度に検出するELISAをMBL社と共同で開発し、血中にsIRが遊離して存在することを見出し、糖尿病患者ではそれが増加していることを発見した(図;Diabetes, 2007, Obata, Ebina et al.)。

sIRは遊離した状態でもインスリンとの結合能を保持しており、血中でインスリンと結合することにより実質的な血中インスリン濃度を下げ、結果的に血中グルコース濃度を上昇させるように働くことをマウス実験ですでに報告している。

血中sIRが糖尿病を増悪させる因子として機能している可能性が考えられる(図)。

当研究室で既に確立されているELISA系はヒトのsIRを特異的に認識する抗体を用いているため、マウスのインスリン受容体は認識せず、マウス本来の血中遊離sIRを測定することができない。

そこで、本研究では、ヒトインスリン受容体(Insulin Receptor: IR)を全身の臓器に多量に発現させたトランスジェニックマウスを作製した。

ヒトインスリン受容体発現トランスジェニック (TG) マウスの作製、解析と応用

ヒトインスリン受容体を全身に発現したマウスを得るため、導入したい遺伝子をほぼ全身性に過剰発現させることができると予想されるCAGプロモーターサイト(遺伝子発現を強力に誘導するCMV-IE enhancer配列と AG promoter)を持つpCXNベクターにヒトインスリン受容体cDNAを挿入し、そこから切り出したDNA断片を用いてマイクロインジェクションを行った。

ウェスタンブロットでIRタンパク発現量の検討を行った。その結果、膵臓、骨格筋、脳、心臓、肺での発現が認められた。また、最もグルコースを多く必要とする組織である脳での発現も多く見られた。しかし、肝臓、脂肪細胞、腎臓、脾臓における発現は確認することができなかった。

血糖値の増減による血中sIR値への影響を検討するため、ストレプトゾトシンにより1型糖尿病(急性高血糖モデル)マウスを作製した。ストレプトゾトシン投与によって急性高血糖状態を誘導することでTGマウスはストレプトゾトシン投与前と比較して明らかな血中sIR値の増加が認められた。加えて4日間のインスリン治療を施すことで血中sIR値はほぼストレプトゾトシン投与前と同程度まで減少した。

マウス血中ではsIRの半減期は約6時間であり、他の糖尿病の指標であるグリコヘモグロビンHbA1c(半減期約30日)やグリコアルブミン(半減期約17日)と比べると非常に短いことが分かった。

まとめ

これまでの研究により、ヒトにおける臨床的な知見では健常人と比較して1型糖尿病、2型糖尿病患者ともに血中遊離sIRの値が有意に上昇していること、また、血中sIR値は、糖尿病の指標である血糖値やグリコヘモグロビン(HbA1c)やグリコアルブミン(GA)と相関性があることを明らかにした。

現時点では血中sIRはインスリン抵抗性の一因となっている可能性が高いと考えられる。sIR切断阻害化合物は新規糖尿病改善薬(インスリン抵抗性改善薬)になる可能性がある。これは全く新しい糖尿病薬になると予想される。培養細胞系でも高グルコースによる培養液中のsIR増加も明らかにしている。また切断酵素も明らかにしつつある。この系を用いるとsIR切断阻害化合物をスクリーニングできる可能性があり、本TGマウスを用い個体全体での効果を検討することも可能となる。

更に、本TGマウスは、糖尿病モデル動物としての用途以外に薬の脳内輸送のテストに使用できる可能性が見出され、昨年、本TGマウスに関する特許のライセンス契約を製薬企業と締結した。脳は、現在薬の最も大きな標的の一つである。しかし、脳の血液関門が存在するため、小分子のくすりの98%はこの関門を通過できない。大きな分子の薬は100%通過できない。この問題を解決するため、“トロイの木馬による脳での運搬(Trojan horse brain delivery)”という方法が開発された。この方法はヒトインスリン受容体を介して血液から脳内に輸送する方法である。このテストのためにヒトに最も近いサルを用いていた。しかし、本TGマウスは脳内でヒトインスリン受容体を多く発現しているため、薬の脳内輸送のテストに使用することが可能となるかもしれない。現在この目的のため企業で本マウスが使用されている。