

氏名・(本籍) 小畑利之(福井県)  
学位の種類 博士(医学)  
学位記番号 博士第273号  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位授与年月日 平成10年3月24日  
学位論文題目 Insulin signaling and its regulation of system A amino acid uptake in cultured rat vascular smooth muscle cells  
(ラット培養血管平滑筋細胞におけるインスリン情報伝達とシステムAアミノ酸取込の調節)

審査委員 主査 教授 佐伯行一  
副査 教授 堀池喜八郎  
副査 教授 吉川隆一

## 論文内容の要旨

### 【目的】

インスリン抵抗性状態において認められる高インスリン血症は、疫学的な研究により、動脈硬化の独立した危険因子と考えられているが、その機序は未だ不明である。そこで本研究では、動脈硬化の成因における高インスリン血症の意義を明らかにする為に、インスリンによる培養平滑筋細胞(VSMCs)の増殖調節機構を検討し、更にインスリン様増殖因子(IGF-I)の情報伝達との比較検討も行った。増殖調節に関与するインスリン情報伝達系としてインスリンによるInsulin receptor substrate 1 (IRS-1)のチロシンリン酸化以後の過程として、1) IRS-1依存性Phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)より70kDaS6キナーゼ(p70S6K)へ至る経路、2) Mitogen-activated protein kinase (MAPK)、90kDaのS6キナーゼ(p90RSK)へ至る経路が存在する。今回我々は、培養ラット血管平滑筋細胞を用いて生理的インスリンによるこれら2つの情報伝達による $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB)輸送系の活性化調節機構を明らかにした。

### 【方法】

ラジオアイソトープ標識インスリン及びIGF-Iを用い、それぞれのVSMCsへの特異的結合能を測定した。次に、VSMCsを1-10nMインスリン刺激後可溶化分画を抗IRS-1抗体にて免疫沈降し、SDS-PAGEにて分離後、抗ホスホチロシン抗体を用いたimmunoblot法にてIRS-1のリン酸化を同定した。また、同沈降物中のPI3K活性を測定した。MAPK、p70S6K及びp90RSKの活性化(リン酸化)をSDS-PAGEでの泳動度の遅延をそれぞれ特異的抗体を用いたimmunoblot法にて同定した。更にp70S6K及びp90RSK活性を、それぞれの特異的抗体を用いた40Sリボソーム蛋白及びRSKペプチドのリン酸化活性により測定した。AIBの取り込みの検討のために、インスリン刺激後のRI標識AIB取り込み速度を測定し、更にRapamycin, Wortmannin, Cycloheximide及びActinomycin DによるAIB取り込みの抑制効果を検討した。Actinomycin Dの効果の確認をオルニチン脱炭酸酵素(ODC)mRNA合成抑制にて(Northern Blot法)にて確認した。

### 【結果】

インスリン及びIGF-1結合実験によりVSMCsにおいてインスリン及びIGF-1の特異的受容体が発現していることが確認され、それらへの結合能はそれぞれ $12.8 \pm 0.86$ ,  $1200 \pm 170$  fmol/0.5 mg proteinであった。1-10nMのインスリンにより用量依存的にインスリン特異的受容体を介してIRS-1がリン酸化され、IRS-1依存性P13K活性化及びp70S6Kの活性化が促進された。一方、MAPK及びp90RSK活性はインスリンにより促進されなかった。それとは対照的に、10nMのIGF-Iはこれら全ての系を活性化した。最後に10nMのインスリンは、AIBの取り込みを有意に促進(非刺激時 $1.47 \pm 0.04$ 、刺激時 $1.89 \pm 0.09$  nmol AIB/mg/12min,  $p < 0.05$ )し、このAIBの取り込み促進はWortmannin (100nM)及びCycloheximide (10  $\mu$ g/ml)により抑制されたが、Rapamycin

(20nM) 及び Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) による影響は受けなかった。(Rapamycinはp70S6K活性を、Actinomycin DはODCのmRNA合成を完全に抑制した。)

WortmanninのP13Kの阻害効果とAIB取り込みに対する阻害効果は同様な阻害曲線を示した(IC<sub>50</sub>: 1-10nM)。また、AIB取り込みにおけるIGF-I効果はインスリンの効果より強かったが(非刺激時1.47 $\pm$ 0.04、10nM刺激時2.16 $\pm$ 0.13nmol AIB/mg/12min)、各阻害剤による抑制効果はインスリンと同様であった。

#### 【考 察】

これまでに10nMのインスリンはチミジンの取り込み促進を行わないと報告されているが、それ以下の濃度のインスリンがVSMCsにおけるIRS-1-PI3K-p70S6Kへと続く経路を活性化し、AIB取り込みを促進した。しかしながら、MAPK-p90RSKへと至る経路は活性化されなかった。また、AIB取り込み促進はPI3Kの阻害剤であるWortmanninにより完全に抑制されたが、p70S6Kの阻害剤であるRapamycinによる影響は認めず、このインスリンによるAIB取り込み促進にPI3K以下でp70S6Kより上流もしくは異なった情報伝達経路の関与が示唆された。また、このAIB取り込み促進は、転写阻害剤のActinomycin Dの影響は認めず、翻訳阻害剤のCycloheximideにより抑制されたことより少なくともこの促進機序に蛋白合成が必須である可能性が示唆された。

#### 【結 論】

高インスリン血症下でVSMCsにおけるIRS-1-PI3K-p70S6Kへと続く経路が活性化され、特にPI3Kの活性化はアミノ酸取り込み促進に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

本研究は、ラット血管平滑筋細胞培養系を用い、糖尿病に伴う高インスリン血症と動脈硬化の成因との関連について、ラジオアイソトープならびに抗体を用いた生化学的手法によって細胞増殖に関与する情報伝達系を解析したものである。

その結果、血管平滑筋におけるインスリンからインスリン受容体基質、PI 3'キナーゼを経てp70<sup>S6</sup>キナーゼに至る経路を明らかにし、また、インスリン様増殖因子のシグナル伝達系の一端をも明らかにした。さらに、インスリンはPI 3'キナーゼの活性化を介してアミノ酸取り込みを活性化し、これにはタンパク合成が必須であることも指摘している。

これらの成果は、糖尿病に伴う血管平滑筋細胞の機能異常に関与する情報伝達系を明らかにするうえで大きく寄与し得る極めて優れたものである。

よって、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月6日実施の論文内容と、それに関連した試問を受け、合格と認められたものである。