

インスリン抵抗性発症における促進性及び
抑制性PTPaseの意義

(研究課題番号 08671148)

平成8－9年度科学研究費補助金(基盤研究C)
研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者

前川 聡

(滋賀医科大学医学部助手)

研究組織

研究代表者：前川 聡（滋賀医科大学医学部助手）
研究分担者：なし

研究経費

| | |
|-------|---------|
| 平成8年度 | 1,500千円 |
| 平成9年度 | 700千円 |
| 計 | 2,200千円 |

研究発表

(1) 学会誌等

Ugi S, Maegawa H, Kashiwagi A, Adachi M, Olefsky JM and Kikkawa R. Expression of dominant negative mutant SHPTP2 attenuates phosphatidylinositol 3'-kinase activity via modulation of phosphorylation of insulin receptor substrate-1. **J.Biol.Chem.** 271, 12595-12602,1996

Obata T, Kashiwagi A, Maegawa H, Nishio Y, Ugi S, Hidaka H, Kikkawa R. Insulin-signaling and its regulation of system A amino acid uptake in cultured rat vascular smooth muscles cells. **Circulation Research**, 79, 1167-1176,1996

Maegawa H, Kashiwagi A, Fujita T, Ugi S, Hasegawa M, Obata T, Nishio Y, Kojima H, Hidaka H and Kikkawa R. SHPTP2 serves adapter protein linking between Janus kinase 2 and insulin receptor substrates, **Biochem Biophys Res Commun.** 228, 122-127, 1996

長谷川雅昭、前川 聡、柏木厚典、須貝智司、吉川隆一 Dominant negative SHPTP2 トランスジェニックマウスの作成 **糖尿病** 40:115-122, 1997

長谷川雅昭、前川 聡、小畑利之 藤田俊樹 日高秀樹 柏木厚典、吉川隆一 Dominant negative SHP-2 発現トランスジェニックマウスにおけるインスリン抵抗性の分子機構 **分子糖尿病** 8, 131-135, 1997

Obata T, Maegawa H, Kashiwagi A, Pillay TS and Kikkawa R. High-glucose-induced abnormal Epidermal growth factor signaling. **J. Biochem.** (Tokyo) (in press)

(2) 口頭発表

Ugi S, Maegawa H, Fujita T, Hasegawa M, Obata T, Kashiwagi A. Jak tyrosine kinase family associate with insulin receptor and insulin receptor substrate 1 in response to insulin. 56th annual meeting of American Diabetes Association, June 8-11,1996

滋賀医科大学附属図書館



1997024040

Hasegawa M, Maegawa H, Sugai S, Sakamoto T, Kitagawa K, Tajima H, Ugi S, Fujita T, Obata T and Kikkawa R. Expression of a dominant negative SHPTP2 in transgenic mice induces insulin resistance. 56th annual meeting of American Diabetes Association, June 8-11,1996

Maegawa H, Kashiwagi A, Obata T, Egawa K, Hasegawa M, Fujita T, Ugi S, Hidaka H, Kikkawa R. Thiazolidine derivatives improve insulin resistance but not restore dysfunction of Epidermal growth factor in high glucose condition. 56th annual meeting of American Diabetes Association, June 8-11,1996.

Fujita T, Maegawa H, Obata T, Hidaka H, Kikkawa R. Insulin induces dephosphorylation of Crk-associated substrate. 57th annual meeting of American Diabetes Association, June 21-24, 1997

Obata T, Maegawa H, Fujita T, Shibata T, Kashiwagi A, Kikkawa R. A new antidiabetic agent (JTT-501) acutely stimulates glucose disposal rates by enhancing insulin signal transduction. 57th annual meeting of American Diabetes Association, June 21-24, 1997

前川 聡 柏木厚典 ブドウ糖毒性とインスリン抵抗性 第70回日本内分泌学会総会ワークショップ 平成9年6月1-3日(1997)

I. インスリン抵抗性発症機構における抑制性チロシン脱リン酸化酵素の活性異常に関する研究

緒言

インスリン抵抗性は、Syndrome Xと呼ばれる糖尿病、高血圧、高脂血症、冠動脈疾等の動脈硬化性病変を伴う成人病を形成する疾病の根幹をなす病態と考えられ、このインスリン感受性改善の試みは、動脈硬化性疾患の発症進展予防の面からも重要であると考えられている。しかし、未だこのインスリン抵抗性発症の機構は解明されておらず、インスリンのシグナル伝達機構の解明とともに重要な研究課題である。

近年、Pima Indiansにおいて、糖尿病の発症に先だってインスリンの主要な標的組織である骨格筋で、インスリン受容体キナーゼの逆反応であるチロシン蛋白脱リン酸化酵素(PTPase)の活性異常が報告された(1)。興味深いことは、このPTPase活性異常はインスリン受容体キナーゼの異常に先だって出現するようであり、そのためインスリン抵抗性の発症に大きく関与している可能性が考えられる。またインスリン非依存型糖尿病患者の骨格筋においてもPTPase活性の障害が報告され、高血糖等の糖尿病に伴う糖代謝異常もPTPaseの異常をきたす可能性が示唆されている(2)。

そこで、我々はPTPaseに注目し、インスリン抵抗性状態に於けるPTPase活性の変化を、またPTPaseのインスリンシグナル伝達及びインスリン抵抗性発症における意義を明らかにし、更にインスリン作用増強剤の作用点を、受容体キナーゼ活性の調節機構とともに併せて明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. インスリン受容体キナーゼに対する高ブドウ糖濃度培養の影響

ヒトインスリン受容体を過剰に発現させたRat 1 fibroblast (HIRc) 細胞を高ブドウ糖濃度で4日間培養後、インスリン受容体キナーゼ活性を測定し、高ブドウ糖濃度のインスリン受容体機能に対する影響を検討した。

2. 高ブドウ糖濃度培養がインスリン抵抗性を発症するか否かの検討

高ブドウ糖培養がもたらすインスリン受容体キナーゼ活性の低下が、実際の細胞に於いてインスリン作用の低下(インスリン抵抗性)を惹起するかをインスリンのアミノ酸取り込み(AIB)促進作用で検討した。

3. 高ブドウ糖培養によるインスリン受容体キナーゼ活性低下機能の検討

高ブドウ糖培養のインスリン抵抗性発症の分子機構を解明するために、Haringらが脂肪細胞に於いてprotein kinase C (PKC) 活性の異常が短時間の高ブドウ糖曝置で起こり、それが受容体キナーゼの低下に関与する(3)と報告していることから、まず我々の実験系において、PKCが変化しているかを、ELISA法による活性の検討、更にPKC活性とよく相関する膜結合型PKCをPDBu結合を用いて検討した。更に、前述のPTPase活性が、このような条件下で変化しているかを、リン酸化したインスリン受容体を基質に用いて、また、ホスフォチロシン抗体PY20を用いるImmuno-Emzymic assayを用いて検討した。

4. インスリン作用増強剤のインスリン受容体及びインスリン抵抗性に対する影響

我々は、高ブドウ糖培養がHIRc細胞に於いてインスリン受容体キナーゼ活性を障害し、更にインスリン作用増強剤の一つであるチアゾリジン誘導体であるPioglitazoneが培養条件下で、高ブドウ糖培養により障害されたインスリン受容体キナーゼ活性を改善することを見いだした(4)。そこで、まず、同実験系において、他のチアゾリジン誘導体であるtroglitazoneが同様にインスリン受容体キナーゼを改善するかを検討した。次に高ブドウ糖培養によるインスリン受容体作用の低下をこれらのインスリン作用増強が改善するかを検討した。

研究成績

1. 高ブドウ糖培養のインスリン受容体キナーゼ活性に対する影響

高ブドウ糖濃度培養にてインスリン受容体キナーゼの活性は、約50%に抑制され、これはブドウ糖に特異的であり、時間・容量依存性であった。高ブドウ糖濃度培養によるインスリン受容体キナーゼの活性の障害は、0.1 μ M pioglitazone或いは1~5 μ Mのtroglitazoneの共孵置にて改善した。

2. 高ブドウ糖培養のインスリン作用に対する影響

高ブドウ糖培養のインスリン受容体キナーゼ活性障害が実際にインスリン抵抗性を惹起するかをアミノ酸の取り込みにおけるインスリン促進作用にて検討した。その結果、高ブドウ糖濃度培養にて基礎値及び最大反応値共に低下した。また、インスリンの容量反応曲線はインスリン結合に差を認めないものの、曲線の右方移動を認めた。つまり、アミノ酸取り込みにおけるインスリンのED50は、正常群 3 nMに対して高ブドウ糖群 30 nMであった(5)。一方、高ブドウ糖群に比し、インスリン作用増強剤群はED50は5 nMと改善傾向を示し、インスリン非添加及び最大刺激時のアミノ酸取り込みも改善した。これは受容体のインスリン結合以降、すなわち受容体キナーゼを含む異常によるものと考えられ、これらの薬剤がなんらかの機構でインスリン抵抗性を改善したと考えられる。

3. 高ブドウ糖培養下のPKC活性の検討とチアゾリジン誘導体の影響

4日間27 mMのブドウ糖培養にてELISA法で検討したPKC活性には変化を認めなかった。また、チアゾリジン誘導体との共孵置もPKC活性には影響を与えなかった。

4. 高ブドウ糖培養のPTPase活性に対する影響

高ブドウ糖濃度培養のインスリン受容体機能異常発症機構として、PTPase活性異常が関与する可能性について検討したところ、高ブドウ糖培養にて、細胞質PTPase活性の亢進を認めた。更にこの上昇とPTPase1Bの酵素量の増加は相関した。興味深いことにインスリン作用増強剤との共孵置にて、高ブドウ糖培養で認められるPTPase活性の亢進およびPTPase1Bの酵素量の増加は抑制された。

考案

我々は、Zucker Fatty Rat にチアゾリジン誘導体であるtroglitazoneを投与する事により、後肢筋インスリン受容体キナーゼの障害が改善すること(6)、また、同種の化合物であるpioglitazoneにて、高血糖及び高インスリン血症を伴うWistar Fatty Rat に於いても(7)、また高血糖を伴わない高脂肪食によるインスリン抵抗性ラットに於いても(8)、後肢筋

インスリン受容体キナーゼの障害が改善することを報告してきた。しかしこれらの動物実験に於いて、薬剤の投与により著明な高インスリン血症、高血糖及び高脂血症の改善が認められ、薬剤が直接インスリン受容体に働いたのか、或いは著明な糖脂質代謝改善が2次的に受容体に作用した可能性も否定できない。我々の検討では部分精製したインスリン受容体とこれらの薬剤を *in vitro* で孵置しても効果なく、培養リンパ球と長期間培養しても、そのインスリン受容体キナーゼに対する効果は僅かであり、薬剤の作用点を明らかにするために、適切な系が望まれていた。最近、我々は、ヒトインスリン受容体を発現させたラット1線維芽細胞(HIRc)を高ブドウ糖濃度下で4日間培養すると、インスリン受容体キナーゼ活性が障害されることを報告した。この効果はブドウ糖濃度時間及び時間依存的で、更に浸透圧対照のラフィノースにて効果がないことからブドウ糖に特異的な作用であることが推測された。さらにチアゾリジン誘導体のpioglitazoneが、このインスリン受容体キナーゼの障害を改善する事を見いだした(4)。ドイツのHaringらは、高ブドウ糖濃度がラット単離脂肪細胞において、PKCの活性化を介してインスリン受容体キナーゼを障害することを報告しており(3)、我々と同様にHIRc細胞においても、インスリン受容体キナーゼが高ブドウ糖により障害され(9)、troglitazoneとの共孵置により、それらの障害がPKC活性の正常化とともに改善することを報告している(10)。しかし、彼らの検討は、ブドウ糖と孵置30分という短時間の効果であり、我々の比較的長期間のブドウ糖効果とはその機構が異なる可能性が考えられる。我々の検討では、ELISA法によるPKC活性の測定でも、また、膜分画のPKC活性を表すと考えられるPDBu結合の検討でも、ブドウ糖培養4日間では、PKC活性の変化は認められず、また、チアゾリジン誘導体もPKC活性に影響しなかった。一方、インスリン受容体キナーゼの逆反応として注目されているPTPase活性については、高ブドウ糖濃度培養条件下では、細胞質分画PTPase活性の亢進を認め、骨格筋等で主に発現しているPTPaseのひとつであるPTPase1Bの蛋白量が、細胞質分画で増加してことを見いだした(11)。興味深いことに、チアゾリジン誘導体がこの増加したPTPase活性を抑制し、更に細胞質分画で増加したPTPase1Bの蛋白量を正常化した。最近 Kusariらがインスリン非依存型糖尿病患者骨格筋において、膜分画PTPaseの活性の低下を認め、これが、PTPase1Bの蛋白量の減少と一致していたと報告しており、インスリン抵抗性状態や糖尿病状態にて、これらのPTPaseの発現調節機構が、臓器により異なる可能性(Isozyme等の存在)も考えられる。少なくとも、当実験系では高ブドウ糖培養によってインスリン抵抗性が惹起され、それはインスリン受容体キナーゼの障害によるものであり、この障害過程にPTPaseが何らかの役割を果たしていると考えられる。また、インスリン作用増強剤がこれらの高ブドウ糖培養によってもたらされるインスリン抵抗性発症機構の何れかの過程に作用しそれを軽減すると考えられる。今後の課題としては、臓器によるPTPaseの発現調節機構とインスリン作用増強剤の効果等につき更に検討が必要と考えられる。

参考文献

1. McGuire, MC., Fields, RM., Nyomba, BL., Rat, I., Bogardus, C., Tonks, NK. and Sommercorn, J.: 1991 Abnormal regulation of protein tyrosine phosphatase activities in skeletal muscles of insulin-resistant humans. *Diabetes* 40: 939-42.
2. Kusari, J., Kenner, K.A., Suh, K-II., Hill, D.E., and Henny R.R. (1994) Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase activity and tyrosine phosphatase 1B protein content are associated with insulin action and resistance. *J. Clin. Invest.* 93, 1156-1162.
3. Muller H.K., Kellerer, M., Ermel, B., Muhlhofer, A., Obermaier-Kusser, B., Vogt, B. and Haring, HU. 1991 Prevention by protein kinase C inhibitors of glucose-induced insulin-receptor tyrosine resistance in rat fat cell. *Diabetes* 40: 1440-1448.
4. Maegawa, H., Tachikawa-Ide, R., Ugi, S., Iwanishi, M., Egawa, K., Kikkawa, R., Shigeta, Y., and Kashiwagi, A. 1993 Pioglitazone ameliorates high glucose induced desensitization of insulin receptor kinase in Rat 1 fibroblasts in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 197:

1078-1082.

5. Ide, R., Maegawa, H., Kikkawa, R., Kashiwagi, A. and Shigeta, Y. High glucose concentration desensitizes insulin action at the levels of receptor kinase. *Endocrine J.* (in press).
6. Kobayashi, M., Iwanishi, M., Egawa, K., Maegawa, H. and Shigeta, Y. A new oral antidiabetic agent (CS-045) increases kinase activity of insulin receptors from skeletal muscles of Zucker fatty rats. *New directions in research and clinocal works for obesity and diabetes.* Sakamoto, N., Angel, N. and Hotta, N. eds. 181-185, 1990.
7. Kobayashi, M., Iwanishi, M., Egawa, K., and Shigeta, Y. 1992 Pioglitazone increases insulin sensitivity by activating insulin receptor kinase *Diabetes.* 41,476-83.
8. Iwanishi, M. and Kobayashi, M. 1993 Effect of Pioglitazone on insulin receptors from skeletal muscle from high-fat-fed rats *Metabolism* 42, 1017-1021.
9. Berti, L., Mosthaf, L., Kroder, G., Kellerer M., Tippmer, S., Mushack, J., Seffer E., Seedor, K., and Haring H. 1994 Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in Rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem* 269 : 3381-3386.
10. Kellerer, M., Kroder, G., Tippmer, S., Berti, L., Kiehn R., Mosthaf, L., and Haring, H. 1994 Troglitazone prevents glucose-induced insulin resistance of insulin receptor in Rat-1 fibroblasts. *Diabetes*, 43, 447-53.
11. Ide, R., Maegawa, H., Kikkawa, R., Shigeta, Y., and Kashiwagi, A. (1994) High glucose condition activates protein tyrosine phosphatases and deactivates insulin receptor function in insulin-sensitive Rat 1 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 201, 71-77.

4

II. Dominant Negative SHP-2発現トランスジェニックマウスの作成とインスリン抵抗性発症の分子機構

緒言

近年インスリン抵抗性を有する患者や糖尿病モデル動物にて種々のチロシンホスファターゼ (PTPase) の活性異常が報告され、同酵素群が糖尿病の発症進展に関わっている可能性が示唆されている (1-4)。

PTPaseは現在までに多くのアイソザイムがクローニングされ、受容体型と非受容体型の二種類に分類されるスーパーファミリーを形成していることが報告されている (5)。SHP-2は分子量約68kDaの非受容体型PTPaseであり (6)、そのcDNAより予想される構造はN末端に2つのSH2ドメイン (7) を、中央部に1つのPTPaseドメインを、さらにC末端側には種々のキナーゼによりリン酸化を受けると考えられる領域を有している。SHP-2の機能に関して血小板由来成長因子や上皮成長因子の増殖シグナルの下流に促進的に働くことが報告されている (8、9)。我々はSHP-2及びそのPTPaseドメインを欠失した変異型SHP-2(Δ PTP)を過剰発現させた細胞株での検討により、SHP-2がインスリン受容体やIRS-1のリン酸化状態を調節しその下流に位置するMAPキナーゼ活性のみならずPI3キナーゼ活性をも調節すること、また変異型SHP-2が内因性の野生型SHP-2の機能を障害すること (dominant negative Effect) を見だし、報告した (10)。

しかし、生体内でのSHP-2の役割については不明な点が多く、本研究ではPTPaseドメインを欠失した変異型SHP-2(Δ PTP)を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作成し、野生型のSHP-2の機能を障害する事でそのマウスにおける糖代謝の変化を検討し、生体内でのSHP-2の役割について明らかにすることを目的とした。

研究方法

1) 発現ベクターの構築

SHP-2の2つのSH2ドメインを含む648bp (アミノ酸番号1-216) を既報のごとくPCR法にて合成、塩基配列を決定後、pCAGGSベクター (11) (東北大学宮崎純一教授より提供) のEcoRIサイトに挿入した。発現ベクターをSalI、BamHIの2つの制限酵素で切断して直線化した。変異型SHP-2の上流にcytomegalovirus IE エンハンサーおよびchicken β actin プロモーターを、下流にpoly Aシグナルを接続した全長約3.1Kbpの発現ベクターを作成した。

2) Tgマウスの作成

既報のごとくBDF1雌マウスより受精卵を採取し、既報のマイクロインジェクション法にて受精卵への発現ベクターの注入を行った (12)。胚を偽妊娠雌マウスの卵管内に移植し、Tgマウスの作成を試みた。

3) 導入遺伝子の検定

離乳後仔マウス(4週齢)の尾よりSDS-フェノール法にてDNAを抽出した。抽出後導入遺伝子内に切断点を持つ制限酵素1)SalIとScaI、2)Hinc II とScaIの2種類の組み合わせで抽出DNAを切断し、アガロース電気泳動を行いナイロン膜に転写した。Fig.1に示す2種類の導入DNA断片 (A、B) をprobeとして用い、マルチプライム法で標識した後、DNA転写膜をRapid-hyb液中で68°C、4時間ハイブリダイゼーションした。フィルターを58°Cの2×SSC/0.1%SDS液中で洗浄しBAS2000システムを用いて解析した。使用した2種類のprobeで共に遺伝子の挿入を確認できた個体をTgマウスとした。

導入遺伝子のコピー数はprobe Bを用いた場合に認められる内因性の1.2Kbpのバンド(マ

ウスSHP-2遺伝子の一部と推定される)と、導入遺伝子の断片である560bpのバンドの濃度差をBAS2000システムで解析して算出した。

4) 各種臓器への導入遺伝子産物発現の検討

上記の方法にて高コピーと考えられたS6、S161の2系統についてF1マウスを作成し以下の検討を行った。また性差の影響を除外するため雄個体のみを使用した。

マウス各臓器を摘出し、既報のRIPAバッファー中でホモゲナイザーにて粉碎可溶化後、 $100,000\times g$ 、30分間遠心した。その上清を12.5% SDS-polyacrylamide gelにて電気泳動後、Immobilon polyvinylidene difluoride膜に転写した。抗PTP1D抗体にてイムノブロット後、ECLキットにて検出した。

5) インスリン負荷によるSHP-2のIRS-1への結合の検討

マウスを早朝摂餌中止4時間後ペントバルビタール麻酔下に開腹し下大静脈よりインスリン5単位静注90秒後にマウス肝尾状葉を摘出し直ちに液体窒素で凍結した。2mM sodium orthovanadateを添加した上述のRIPAバッファー中でホモゲナイズ後 $100,000\times g$ 、30分間遠心し、上清の蛋白濃度測定し蛋白3.5mg上清を抗IRS-1抗体で免疫沈降しIRS-1に結合したSHP-2を同様にウェスタンブロット法にて検出した。

6) 血糖値及び血清インスリン値の測定

マウスを早朝摂餌中止4時間後麻酔下に開腹し下大静脈より採血を行った。血糖の測定にはグルコースオキシダーゼ法を、また血清インスリンの測定にはELISA法によるラットインスリン測定キットを使用した。

7) 腹腔内ブドウ糖負荷試験

マウスを12時間絶食後ペントバルビタール麻酔下に3mg/gのブドウ糖を負荷し負荷後0,30,60,120分後にマウス尾静脈より採血し前述の方法で血糖値を測定した。

研究成績

総計230匹のF0マウスDNAをサザンブロット法にてスクリーニングし、16匹のTgマウスを同定した。導入遺伝子のコピー数は1コピーから最高17コピーの個体を得られた。

今回検討した2系統について成長曲線はTgマウス群、対照群間に差異を認めず、また外表上明らかな奇形を認めなかった。両系統について各種臓器への導入遺伝子の蛋白質レベルでの発現を検討したところ、骨格筋、肝臓、脂肪組織などのインスリン感受性組織の他、検討を加えた全組織での発現を確認した。特に骨格筋においては28kDaの変異型SHP-2はマウス内因性SHP-2の約10倍の発現量を確認した。生体においてインスリン負荷前でもIRS-1とSHP-2の結合を認め、両群間に差を認めなかった。しかしインスリン負荷によりSHP-2のIRS-1への結合は対照群では負荷前に比し4倍に増加した。一方Tgマウス群では1.6倍の増加を認め培養細胞への発現(10)と同様にTgマウスにおいてもインスリンによるSHP-2のIRS-1への結合でみる限りdominant negative効果を示した。

早朝食餌中止4時間後の血糖値はTgマウス群、対照群間に差異を認めなかった。しかし、S6系統においては血清インスリン値がTg群、 $142\pm 14\mu\text{U/ml}$ (n=4)、対照群 $42\pm 6\mu\text{U/ml}$ (n=3)とTg群が3倍高値(p<0.01)を示した。同様にS161系統においても、Tg群 $106\pm 15\mu\text{U/ml}$ (n=3)、対照群 $45\pm 8\mu\text{U/ml}$ (n=3)とTg群においてに血清インスリン値が2.3倍高値(p<0.01)を示し、インスリン抵抗性の存在が示唆された。

腹腔内ブドウ糖負荷試験では、Tgマウスでは30分後より血糖値は対照群に比し有意に

高く、120分後においても対照群の1.5倍高値を示し (Tg群、 $252 \pm 14 \text{mg/dl}$ ($n=4$)、対照群 151 ± 11 ($n=5$)、 $P < 0.01$)、耐糖能障害の存在を認めた。

考案

インスリンの受容体への結合により受容体キナーゼが活性化され種々の細胞内タンパク質がチロシンリン酸化される。その一つであるIRS-1は13個のチロシンリン酸化部位を持ち(13)、SH2ドメインを有するPI3キナーゼ、Grb2、Nck(14)など種々のシグナル分子と結合することが報告されている。チロシンホスファターゼの一つであるSHP-2もIRS-1の1172番目のチロシンにインスリン刺激依存性に結合することが報告されている(15)。インスリン刺激伝達機構におけるSHP-2の役割に関しては、これまで主としてCHO-IRや3T3細胞を用いた系で、IRS-1下流のp21ras蛋白近傍に作用しp21ras蛋白下流のMAPキナーゼ経路を正に調節していると報告されている(16-18)。最近我々は、インスリン受容体過発現Rat1線維芽細胞(HIRc細胞)に野性型及び変異型SHP-2を過剰発現させたところSHP-2がIRS1のリン酸化状態を調節し、MAPキナーゼ経路のみならずPI3キナーゼ経路をも調節していることを報告した(10)。このように用いた培養細胞によりそのSHP-2の発現効果が異なっており、生体内での糖代謝調節におけるSHP-2の役割については現在までのところ解決されていない。Tgマウスを用いる方法は導入遺伝子の発現による種々の物質の個体全体の生理機能に与える効果を知ることができるのみならず、個体発生を通して正常の発生分化過程での導入遺伝子の機能解析が可能である。そこで我々は生体内でのSHP-2の意義を検討するため、培養細胞でdominant negative効果を示したPTPaseドメイン欠失SHP-2を過剰発現したTgマウスの作成を試みた。興味深いことにインスリン負荷前においてもSHP-2のIRS-1への結合を認めた。同様な成績は最近Arrandaleらも報告している(19)。しかしTgマウス群においてインスリン負荷後のSHP-2のIRS-1への結合は対照群に比し50%に低下しPTPaseドメインを欠失したSHP-2はTgマウスにおいてもdominant negative効果を示すことが示唆された。既にSHP-2は卵母細胞での検討により卵の成熟に必須であり、その障害により卵の分化が障害されること(20)、また同遺伝子のノックアウトマウスは致死性であるとの報告がある(19)。しかし、我々のdominant negative Tgマウスは外表上正常な個体が誕生し、またその成長曲線も対照マウスとの間に差を認めなかった。今回S6及びS161系統について対照群とTgマウス群間で血糖値及び血清インスリン値を比較した。4時間絶食後の血糖値には両群に有意差を認めなかった。しかし血清インスリン値がTgマウスでS6系統においては対照群の3.4倍、またS161系統においても2.3倍高値を認めた。すなわちTgマウスにインスリン抵抗性が存在し、SHP-2が生体内の糖代謝調節機構において重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらに、ソマトスタチンを用いた恒常血糖値法によるインスリン感受性試験において、Tgマウスは血糖値の有意な高値を示し、インスリン抵抗性を認めた。我々の作成したTgマウスはin vivoでのインスリン抵抗性を研究する上で新たなモデル動物になる可能性があり、現在さらにその分子機構を検討している。稿を終えるにあたり発現ベクターを供与頂いた東北大学加齢医学研究所、宮崎純一教授に深謝致します。

参考文献

- 1) McGuire MC, Fields RM, Nyomba BL, Raz I, Bogardus C, Tonks NK, Sommercorn J (1991) Abnormal regulation of protein tyrosine phosphatase activities in skeletal muscle of insulin-resistant humans. *Diabetes* 40:939-942
- 2) Ahmad F, Considine RV, Goldstein BJ (1995) Increased abundance of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects. *J. Clin. Invest.* 95:2806-2812

- 3) Ahmad F, Goldstein BJ (1995) Alterations in specific protein-tyrosine phosphatase accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. *Am. J. Physiol.* 268: E932-E940
- 4) Ahmad F, Goldstein BJ (1995) Increased abundance of specific skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes mellitus. *Metabolism* 44:1175-1184
- 5) Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. (1991) Protein tyrosine phosphatase: A diverse family of intracellular and transmembrane enzyme. *Science* 253:401-406
- 6) Freeman Jr RM, Plutzky J, Neel BG(1992) Identification of a human src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase: A putative homolog of *Drosophila* corkscrew. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11239-11243
- 7) Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T (1991) SH2 and SH3 domains: Elements that control interaction of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252: 668-674
- 8) Bennett AM, Tang TL, Sugimoto S, Walsh CT, Neel BG (1994) Protein tyrosine phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor b to Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7335-7339
- 9) Feng GS, Hui CC, Pawson T (1993) SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 259: 1607-1611
- 10) Ugi S, Maegawa H, Kashiwagi A, Adachi M, Olefsky JM, Kikkawa R (1996) Expression of dominant negative mutant SHPTP2 attenuates phosphatidylinositol 3'-kinase activity via modulation of phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J. Biol.Chem.* 271:12595-12602
- 11) Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 108: 193-200
- 12) Saitou M, Sugai S, Tanaka T, Shimouchi K, Fuchs E, Narumiya S, Kakizuka A. (1995) Inhibition of skin development by targeted expression of a dominant negative retinoic acid receptor. *Nature* 374: 159-162
- 13) Kahn CR (1994) Banting Lecture. Insulin action, diabetes and cause of type 2 diabetes. *Diabetes* 43: 1066-1084
- 14) Lee CH, Li W, Nishimura R, Zhou M, Batzer AG, Myers MG, White MF (1993) Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin stimulated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11713-11717
- 15) Kuhne MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GS (1993) The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing Phosphotyrosine Phosphatase Syp. *J. Biol.Chem.* 268: 11479-11481
- 16) Noguchi T, Matozaki T, Horita K, Fujioka Y, Kasuga M (1994) Role of SHPTP2, a protein tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin stimulated Ras activation. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6674-6682
- 17) Yamauchi K, Milarski K, Saltiel AR, Pessin JE (1995) Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 664-668
- 18) Kim LM, Saltiel AR (1994) Expression of catalytically inactive Syp Phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen activated protein kinase by insulin. *J. Biol.Chem.* 269: 21239-21243
- 19) Arradale J, Gorewillse A, Rocks S, Ren JM, Zhu J, Davis A, Livingston J, Rabin DU, Haven W (1996) Insulin signaling in mice expressing reduced levels of syp. *J. Biol.Chem.* 271: 21353-21358
- 20) Tang TL, Freeman Jr RM, O'Relly AM, Neel BG, Sokol SY (1995) The SH2-containing protein tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early *Xenopus* development. *Cell* 80: 473-483