

氏名(本籍)	山本 眞由美(愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 989 号
学位授与日付	平成 7 年 7 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	ラット脂肪細胞における、グルココルチコイドによるプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化について
審査委員	(主査)教授 安田 圭吾 (副査)教授 野澤 義則 教授 武藤 泰敏

### 論文内容の要旨

グルココルチコイド過剰状態で、耐糖能低下が生ずることは、日常臨床でしばしば経験される。この耐糖能異常は、インスリン分泌不全ではなくインスリン抵抗性増大が主因とされているが、その詳細な発症機序はいまだ明らかではない。一方、細胞膜成分のリン脂質のみならず、ジアシルグリセロールや、発癌プロモーターとして知られるホルボールエステル (TPA) がプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することが明らかになり、イノシトールリン脂質代謝回転を介する情報伝達機構における、PKC の役割が近年注目されている。我々は、既に、インスリン受容体結合後のインスリン情報伝達機構において、インスリンによって PKC の活性化がおこること、そして、インスリンによる糖輸送能の発現には PKC の活性化が不可欠であることを報告してきた。また、ラットの培養肝細胞で、デキサメサゾンが  $\text{Ca}^{2+}$  存在下に、TPA や diolein と同様に PKC を活性化することが知られている。そこで、我々は、グルココルチコイドによるインスリン感受性低下機序が、PKC の活性化とどのように関係しているかをグルココルチコイドの PKC に対する作用を中心に検討した。

#### 方法

ウィスターラットの傍精巣脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、遊離脂肪細胞を作成した。

- ① インスリンによる糖輸送能：脂肪細胞を各種濃度のデキサメサゾン (DEX) ( $10^{-12}$ ~ $10^{-7}$ M) またはプレドニゾン (PSL) ( $10^{-11}$ ~ $10^{-6}$ M) と 60 分間インキュベーションした後、インスリンで 30 分間刺激し、 $[\text{H}]$  2-DOG の細胞内への取り込み能を測定した。
- ② PKC の酵素活性と免疫活性：脂肪細胞を  $10^{-7}$ M DEX または  $10^{-6}$ M PSL とともに 0 分、10 分、30 分、60 分間インキュベーション後、細胞質画分と膜画分を採取、各画分の PKC 酵素活性を測定した。各画分の PKC 免疫活性は、western blot 法により PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  の抗体を使用して検討した。
- ③ 脂肪細胞のインスリン結合能： $10^{-7}$ M DEX または  $10^{-6}$ M PSL と 60 分間プレインキュベーション後、 $[\text{I}^{125}]$  標識インスリンと各種濃度の非標識インスリン (1 nM~1000 nM) を加え、脂肪細胞への結合  $[\text{I}^{125}]$  活性を測定した。
- ④ インスリン受容体自己リン酸化反応：脂肪細胞を  $10^{-7}$ M DEX または  $10^{-6}$ M PSL で 60 分間インキュベーション、膜画分を採取し、95 kDa 蛋白質リン酸化反応および外因性基質に対するインスリン受容体チロキシンキナーゼ活性を測定した。
- ⑤ PKC 基質蛋白質リン酸化反応の検討：脂肪細胞より細胞質画分と膜画分を採取し、各画分に、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下、非存在下で、リン脂質、 $10^{-7}$ M DEX、 $10^{-6}$ M PSL または、 $10^{-7}$ M TPA を添加、蛋白質リン酸化反応を検討した。
- ⑥ 部分精製 PKC 活性化に対する影響：ラット大脳より部分精製 PKC を採取し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP とともに、リン脂質、 $10^{-7}$ M DEX、 $10^{-6}$ M PSL と、各種  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (0~1 mM) を加え、インキュベーション、PKC の活性変化を検討した。

## 結 果

- ① インスリンによる糖輸送能：DEX, PSL は、インスリンによる [ $^3\text{H}$ ] 2-DOG 取り込みを濃度依存性に抑制した。
- ② PKC の酵素活性と免疫活性：PKC 酵素活性は、 $10^{-7}\text{M}$  DEX とのインキュベーションにより細胞質画分は52%まで減少、膜画分で250%まで増加した。 $10^{-6}\text{M}$  PSL とのインキュベーションでは、細胞質画分は54%まで減少、膜画分は300%まで増加した。PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  免疫活性も、細胞質画分で経時的に低下、膜画分で増加した。
- ③ インスリンによる PKC のトランスロケーション： $10^{-7}\text{M}$  DEX,  $10^{-6}\text{M}$  PSL との60分間のプレインキュベーションにより、インスリンによる PKC のトランスロケーションは明らかに抑制された。
- ④ 脂肪細胞のインスリン結合能：対象群, DEX 群, PSL 群間に有意な差を認めなかった。
- ⑤ インスリン受容体自己磷酸化反応：インスリンによるインスリン受容体の磷酸化に対して、DEX, PSL 前処置の影響はなかった。
- ⑥ PKC 基質蛋白質磷酸化反応の検討：DEX, PSL 添加により、80 kDa および50 kDa 蛋白質の磷酸化が、リン脂質や TPA 添加時と同様、増強した。
- ⑦ 部分精製 PKC 活性化に対する影響：DEX や PSL 添加により、リン脂質を添加した際と同様の PKC 活性増加がみられた。

## 考 察

今回の我々の検討で、グルココルチコイドの前処置により、インスリンによる糖輸送能促進効果は濃度依存性に抑制され、グルココルチコイドによるインスリン感受性低下は明らかであった。しかし、同様のグルココルチコイドによる前処置では、インスリン受容体とインスリンとの結合能やインスリン受容体の自己磷酸化反応に、有意な変化を示さなかった。今回の検討で、グルココルチコイド単独刺激が、インスリンや TPA と同様に PKC のサブタイプを活性化し、さらにグルココルチコイド添加は、80 kDa および50 kDa の蛋白質磷酸化、および部分精製 PKC 活性の増加を惹起することが明らかとなった。以上の成績より、グルココルチコイドが、リン脂質や TPA 同様、単独で、PKC を活性化し、この PKC 活性化が、引き続きインスリンによる PKC の活性化を減弱させることが示唆された。グルココルチコイドによる PKC の活性化は、PKC のダウンレギュレーションをもたらし、細胞質内 PKC が涸渇し、インスリン作用の減弱とインスリン感受性の低下が発現するものと考えられた。

## 結 語

ラット脂肪細胞において、グルココルチコイドは単独で、TPA やリン脂質同様、PKC を活性化する。この PKC の活性化によって、引き続きインスリン刺激によっても、インスリンによる PKC の活性化および糖輸送能促進作用が減弱され、結果としてインスリン抵抗性が惹起されるものと推察された。グルココルチコイドによるインスリン抵抗性のひとつの要因として、グルココルチコイドによる PKC の活性化が、大きな役割を担っていると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 山本真由美は、ラット脂肪細胞において、グルココルチコイドが単独でプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することを明らかにした。この事実により、インスリンによる PKC の活性化が減弱し、インスリン作用の減弱を引き起こす可能性が示唆された。この事実は、グルココルチコイドによるインスリン抵抗性の発現機序を解明する上で、新しい方向性を提供した。グルココルチコイドによるインスリン抵抗性の発現は、NIDDM のモデルとも考えられ、今後の糖尿病の病因解明や治療開発に、少なからず寄与するものと認める。

### [主論文公表誌]

ラット脂肪細胞における、グルココルチコイドによるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化について  
平成 7 年 5 月発行 岐阜大医紀 43(3) : 416~425 (1995)