

ネコの抗インスリン自然自己抗体 (IgG) に関する研究

2013年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(岐阜大学)

高島 諭

目次

略語一覧	1
背景	2
第1章	
緒言	4
材料および方法	5
結果	9
考察	17
小括	20
第2章	
緒言	21
材料および方法	23
結果	31
考察	38
小括	42
第3章	
緒言	43
材料および方法	44
結果	47
考察	53
小括	55
総括	56
謝辞	57
引用文献	58

略語一覧

- IgG・・・Immunoglobulin G (免疫グロブリン G)
- ELISA・・・Enzyme-linked immunosorbent assay (酵素結合免疫吸着測定法)
- RTK・・・Receptor tyrosine kinase (受容体チロシンキナーゼ)
- RIA・・・Radioimmunoassay (放射免疫測定法)
- HRP・・・Horseradish peroxidase (西洋ワサビペルオキシダーゼ)
- SDS-PAGE・・・SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法)
- CBB・・・Coomassie brilliant blue (クーマシーブリリアントブルー)
- PBS・・・Phosphate-buffered saline solution (リン酸緩衝食塩水)
- BCS・・・Body condition score (ボディコンディションスコア)
- BSA・・・Bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
- CV・・・Coefficient of variation (変動係数)
- HPLC・・・High pressure liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
- GLUT4・・・Glucose transporter 4 (グルコース輸送担体 4)
- HSBS・・・HEPES salts buffer solution (HEPES 塩緩衝液)
- [³H]-2-DOG・・・[1,2-³H]-2-Deoxy-D-glucose
- TBS・・・Tris-buffered saline solution (トリス緩衝食塩水)
- IRS-1・・・Insulin receptor substrate 1 (インスリン受容体基質 1)
- IRβ・・・Insulin receptor β subunit (インスリン受容体βサブユニット)
- EGF・・・Epidermal growth factor (上皮成長因子)

背景

抗インスリン抗体は、自己免疫性膵島炎に関連する 1 型糖尿病のヒトにおいて、膵島炎を起こす直接的な原因となる[39]。また、異種動物（ウシおよびブタ）由来のインスリン投与歴のあるヒトやイヌの糖尿病患者の血中から検出される抗インスリン抗体[12, 43]は、投与インスリンの効果を減ずる[44]。さらに、インスリン投与歴に関係なく抗インスリン抗体が出現するヒトのインスリン自己免疫症候群[9]では、抗体と自己分泌インスリンとの結合によりインスリンの効果が減ずるが、突発的な結合の解除により低血糖を引き起こす[4]。一般的に抗インスリン抗体は、疾患の病因として認識されている。

ネコの抗インスリン抗体は、異種動物（ヒトおよびブタ）由来のインスリン投与歴のある糖尿病患者の血清から検出されたことが 2000 年に Hoening ら[17]により報告されている。しかし Hoening らは、インスリン投与歴のないネコ（健康、糖尿病および糖尿病以外の病気）からは、 β 細胞抗原やインスリンに対する自己抗体が検出されないことを併せて報告している。この報告をもとにして、ネコは抗インスリン抗体を自然に保有することはないと考えられてきた。しかし 2010 年になって、Nishii ら[36]は、臨床的に健康なネコの血清中に自己分泌インスリンに親和性を示す IgG（抗インスリン IgG）が存在することを報告した。抗インスリン IgG が血清から検出されたネコにインスリン投与歴のなかったことから、Nishii らは、抗インスリン IgG は外来性インスリンに対して産生された抗体ではなく、自己分泌インスリンに結合能を示す自然自己抗体であると考えた。

自己抗体は、一般的に自己免疫疾患の発生要因となることが知られている。生体の免疫システムは、本来、細菌やウイルス、腫瘍細胞などの異物を認識してそれを排除するために働く。しかし、自己免疫疾患では自己抗体が自己の細胞や組織に対して過剰な免疫反応をし、これらを傷害することが病因となる[2]。いっぽうで、健康なヒトにおいても血清タンパク質や細胞表面物質、あるいは細胞内物質に反応する自己抗体が自然に産生されることが報告されている[27]。自然自己抗体は、外部からの特別な抗原刺激を受けなくても自然に産生される抗体[11, 27, 31, 32]であり、新生児の臍帯血中[31]や、成人の血中から[11, 30] 生涯を通して検出される。自然自己抗体は、自己抗原に反応したリンパ球が分化の早い段階で排除されるクローン選択説に矛盾するが、正常な免疫系とみなされている[27]。自然自己抗体は、自己免

疫疾患の病因となる自己抗体とは異なり、B リンパ球分化の抑制を介した免疫調節[3, 23]や老化および変性した自己抗原の排除[15]などにより生体の恒常性を維持する働きを担うと考えられている[30]。健康なネコの血清から発見された抗インスリン IgG については、その生理的役割は不明であるが、自己インスリンに結合する自然自己抗体として、ネコの生命活動に有用な働きを担っている可能性がある。

Nishii ら[36]の報告において、抗インスリン IgG を保有する健康なネコが、血糖コントロールの異常である極端な高血糖や低血糖を示さないことを考慮すると、ネコの抗インスリン IgG がインスリンの作用におよぼす効果は、ヒトやイヌにおいて病因性を持つ抗インスリン抗体とは本質的に異なる可能性がある。ネコを静脈内グルコース負荷試験により実験的に高血糖に誘導すると、インスリンの分泌は、ヒト[28, 42]やイヌ[29]に比べて持続時間が長く、かつ二峰性を示す[24, 34, 37, 49]ため、ネコは血糖値上昇に対するインスリン分泌パターンがヒトやイヌとは異なると考えられている。現時点で明確な根拠はないが、抗インスリン自然自己抗体は、ネコの特徴的なインスリン分泌パターンを補う役割を担う可能性がある。

この研究では、ネコの抗インスリン自然自己抗体の生理的役割の解明を目的として、以下の実験を実施した。第1章では、ネコの血漿中に含まれる抗インスリン IgG 濃度を測定する ELISA を作製し、それを用いてネコの血漿濃度を測定した。さらに血漿抗インスリン IgG 濃度と性別や年齢、肥満度、血漿ホルモン濃度等の各種パラメーターとの関係性を分析した。第2章では、健康なネコの血清から分離した抗インスリン IgG と培養ネコ成熟脂肪細胞を用いて、抗インスリン IgG がインスリンの主な作用である糖の取り込み能とそれに関わる RTK シグナルの活性化に与える効果を検討した。また第3章では、第2章において認められた抗インスリン IgG の一部の分画がインスリンの作用を増強する効果に、抗インスリン IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係するかどうかを検討した。

第 1 章

ELISA によるネコの血漿抗インスリン IgG 濃度の測定

緒言

Nishii ら[36]は、インスリン投与歴のない臨床的に健康なネコ 10 頭の血清からインスリンに親和性を示す IgG を検出した。この抗インスリン IgG は、外来性インスリンに反応して産生された IgG ではないことから、自己分泌インスリンに結合能を示す自然自己抗体と考えられた。しかし、抗インスリン IgG の検出に供したネコは 10 頭であり、すべての健康なネコが抗インスリン IgG を自然に保有していることを証明するためには、より大規模な例数について確認する必要がある。また、抗インスリン IgG と個別のネコの持つ各種パラメーター（性別、年齢、体格、ホルモン濃度および疾患）との関係性の分析は、ネコにおける抗インスリン自然自己抗体の生理的役割の解明にとって重要な情報となる。ネコの抗インスリン IgG の ELISA の作製は、多くの試料の効率よい測定と血漿濃度としての客観的な評価を可能にするために必要である。

自然自己抗体は、動物の正常な生命活動を補助する働きを担うと考えられている[30]が、インスリンを認識する自然抗体については、ヒト[40]やげっ歯類[41]において血清中に存在することが報告されているにすぎない。ネコの抗インスリン自然自己抗体が、血中において自己分泌インスリンと結合することでインスリンの作用を調節していると仮定するならば、ネコの血漿抗インスリン IgG 濃度の測定は、血糖コントロールをはじめとしたインスリンの作用を評価するために必須の検査項目となる。

第 1 章では、ネコの血漿抗インスリン IgG 濃度を測定する ELISA を作製し、測定精度を検討するとともに、健康なネコの血漿濃度を測定し、さらに性別や年齢、体型、血漿ホルモン濃度等との関係を分析した。加えて、疾患ネコ（糖尿病、泌尿器、内分泌、消化器疾患等）の血漿抗インスリン IgG 濃度を測定し、健康ネコの測定値と比較した。特に、糖尿病に罹患したネコについては、血漿抗インスリン IgG の過不足がないかに注目した。作製した ELISA は、プレートの固相化抗原にネコの膵臓から精製したインスリンを用いることで、自己分泌インスリンに親和性を示す IgG を検出できるように工夫した。

材料および方法

1. 材料

ELISA プレーートの固相化に用いるインスリンとして、1頭の健康な成ネコの膵臓から分離精製したインスリンを用いた。分離精製に用いた膵臓は摘出後直ちに-80°Cで凍結し、精製まで保存した。膵臓組織10gにethanol/0.7M HClを加え、4°Cでホモジナイズし(3:1 v/v, 4 ml/g tissue)、懸濁液を37°Cで2時間攪拌した。遠心分離後(4°C, 10000g, 20分)、上清をFractgel EMD-SO3-650 column (Merck, Darmstadt, Germany)を用いてイオン交換クロマトグラフィーに供した。Resource RPC column (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)を用いた逆相HPLCにより0.1%トリフルオロ酢酸で溶出される分画を得た。カラム結合物質は、60%アセトニトリルを含有する0.1%トリフルオロ酢酸を用いて溶出した。インスリンを含有する分画(アセトニトリル濃度約50%で溶出)は、分画試料(1.5 µl)をナイロンメンブレン(Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)上にスポットするドットブロット分析により確認した。メンブレンはブロックエース(大日本住友製薬, 大阪)でブロッキングした後に、ビオチン標識抗ラットインスリン抗体(シバヤギ, 渋川, 群馬)とともに4°Cで一晩反応し、アビジン標識HRP(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA)を加えて30分間静置した。インスリンと抗体の複合体は4-chloro-1-naphtholで可視化した。

ELISA標準物質として健康な成ネコの血清からアフィニティ精製した抗インスリンIgGを用いた。ウシインスリン(Sigma, St. Louis, MO, USA)を固定したカップリングゲル(CNBr-activated Sepharose 4B, GE Healthcare)を用いて、仕様書にしたがって血清中のインスリン結合物質を分離した。分離されたインスリン結合物質を確認するために4%-20%グラジエントSDSアクリルアミドゲル(SDS-PAGE Gradient Gel, TEFCO, Tokyo, Japan)を用いて電気泳動し、続いてCBB染色を施した。抗インスリンIgGをさらに純化するためにHiTrap Protein A HP column (GE Healthcare)を用いて得られたインスリン結合物質を精製した。IgG濃度は吸光係数から決定した(280 nmにおける吸光度1.4がIgG 1.0 gに相当する)。ELISAの捕捉抗体としては、HRP標識ウサギ抗ネコIgGを用いた(R1308 HRP, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany)。

2. 動物および血液採取

第1章では、84頭（未去勢雄6頭、去勢雄38頭、未避妊雌9頭、避妊雌31頭）の健康な成イエネコを用いた。これらのネコは、身体検査、血球数、血液生化学および尿検査により臨床的に健康であることを確認した。年齢は1から13歳の範囲にあり、中央値は6歳であった。9段階評価BCSは2から9であり、中央値は5であった。ネコの性別は、雌雄および去勢、卵巣摘出の有無によって未去勢雄、去勢雄、未避妊雌、避妊雌に分類して分析した。また血漿抗インスリンIgG濃度と疾患との関係を分析するために、岐阜大学応用生物科学部附属動物病院および鳥取大学農学部附属動物医療センターに来院した58頭（未去勢雄20頭、去勢雄16頭、未避妊雌8頭、避妊雌14頭）の疾患ネコを用いた。血液検査や画像検査所見などのそのネコの疾患に関する情報は、診療記録および飼い主からの聞き取り調査ならびに身体検査により得た。疾患の内訳は、泌尿器疾患22頭（慢性腎臓病18頭、尿石症3頭、膀胱炎1頭）、内分泌疾患20頭（糖尿病18頭、甲状腺機能亢進症2頭）、消化器疾患6頭（炎症性腸疾患3頭、細菌性腸炎3頭）、その他（腫瘍など）10頭であった。糖尿病ネコ18頭（未去勢雄9頭、去勢雄5頭、未避妊雌2頭、避妊雌2頭）のうち3頭（未去勢雄2頭、未避妊雌1頭）はインスリン投与歴のない症例であった。血液は12時間絶食状態で頸静脈から採取し、インスリン失活を防ぐためにEDTA-2Naとアプロチニンを含むチューブに採取した。採血後、直ちに遠心分離し（4℃, 1000 g, 15 min）、-80℃で保存し、3ヶ月以内に測定した。この研究は、岐阜大学実験動物ガイドラインに沿って実施した（承認番号: 09044 および 09075）。

3. 血漿抗インスリンIgG濃度の測定

96 ウェルマイクロプレート（NUNC MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, NY, USA）にネコインスリン（500 ng/well）を分注し、2時間室温下で固相化した。プレートをPBS（10 mM PBS containing 0.025% Tween20）で洗浄した後、BSA 10 mg/ml（A8022, Sigma）を含むPBSにより室温下で18時間ブロッキングした。洗浄後、標準および血漿試料をウェルに加え、室温下で2時間培養した。洗浄後、PBSで50000倍に希釈されたHRP標識ウサギ抗ネコIgGを加え、さらに室温下で2時間培養し、洗浄

後に 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Dako, Produktionsvej, Glostrup, Denmark) を含む基質溶液を加えた。40 分間培養後、停止液 (2N H₂SO₄) を加え、マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad, Hercules, USA) により主波長 450 nm 副波長 620 nm で吸光度を測定した。

ELISA の精度確認のために、希釈直線性試験と添加回収試験を実施した。希釈直線性試験においては、臨床的に健康な 2 頭のネコから採取した血漿を PBS で連続希釈し (希釈比; 試料:PBS = 0: 1, 1: 1, 1: 2, 1: 4), それぞれ抗インスリン IgG 濃度を定量した。添加回収試験は、既知濃度の抗インスリン IgG をネコ血漿試料に添加することで実施した。アッセイ内 CV は高濃度と低濃度の 2 種類の血漿試料を用いた同じプレートによる 4 回の測定から算出した。アッセイ間 CV は 2 種類の血漿試料を用いた異なるプレートによる 4 回の測定から算出した。

この研究では、血漿試料は採取後 3 ヶ月間 -80°C で凍結してから抗インスリン IgG 濃度を測定した。抗インスリン IgG の凍結による濃度の変化を確認するために、2 個体の血漿試料について採取直後および 3 ヶ月間保存した後の測定値を比較した。

4. 血漿総 IgG およびインスリン濃度の測定

血漿総 IgG 濃度は市販のサンドイッチ ELISA キット (Cat IgG ELISA Quantitation Set, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) を用いて Campbell ら[10]の方法にしたがって測定した。血漿インスリン濃度は 0.1 から 3.6 ng/ml の範囲で血漿濃度が測定可能な[33]市販のサンドイッチネコ用 ELISA キット (ネコインスリン測定キット, 森永生科学研究所, 横浜, 神奈川) を用いて測定した。

5. 静脈内グルコース負荷試験

3 頭の健康で正常体型 (BCS: 5/9) のネコを用いて静脈内グルコース負荷試験を実施した。最初の血液採取後に、グルコース溶液 (50%, w/v, 1 g/kg 体重) を静脈投与した。採血はグルコース投与後 10, 30, 60, 90, 120 分後に実施した。血漿グルコース濃度はドライケミストリー法 (富士ドライケム, 東京) で測定した。

6. 統計分析

データは、中央値と範囲で表記した。凍結保存性の確認のために、採取直後と3ヵ月凍結保存後における測定値分布の正規性を確認した後に平均値を対応のある *t*-test で比較した。性別と血漿抗インスリン IgG 濃度との関係は、データ分布の非正規性を確認した後、Kruskal-Wallis test を用いて分析した。血漿インスリン IgG 濃度と年齢、BCS、総 IgG 濃度およびインスリン濃度の相関関係については、Spearman's correlation coefficient or by rank test により分析した。静脈内グルコース負荷試験における、血漿グルコース、インスリンおよび抗インスリン IgG 濃度は、Bartlett's test により分散の比較をした。グルコース投与前と投与後における血漿濃度については、single-factor ANOVA と Dunnett test により分析した。健康ネコと疾患ネコにおける血漿抗インスリン IgG 濃度の比較は、ともに測定値分布の正規性が確認されなかったため Mann-Whitney's U test によりお互いの中央値を比較し、 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

結果

1. 抗インスリン IgG 測定用 ELISA の精度

Figure 1-1 には抗インスリン IgG を測定する ELISA における典型的な標準曲線を示す。曲線の直線性は、33.8 ng/ml から 2160 ng/ml の範囲で維持されていた。PBS で連続希釈された 2 種類の血漿試料を用いた希釈直線性試験の回帰直線 (Fig. 1-2) は、ともにほぼ原点を通る直線であった。血漿試料に 3 種類の既知量抗インスリン IgG を添加した場合の回収率は、それぞれ 92.2%, 91.9% および 92.0% と高かった。アッセイ内 CV は、血漿濃度 799 ng/ml では 4.0%、66 ng/ml では 3.7% であった。2 種類の血漿試料の測定から求められたアッセイ間 CV (n=4) は、血漿濃度 799 ng/ml において 5.1%、72 ng/ml において 6.9% だった。血漿試料の凍結保存性は、保存前に 390 ± 17 (平均値 \pm 標準誤差) $\mu\text{g/ml}$ と $209 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ であった測定値は、3 ヶ月の凍結保存後には $403 \pm 15 \mu\text{g/ml}$ と $203 \pm 11 \mu\text{g/ml}$ であり、両測定値の間に有意差はなかった。

2. 血漿抗インスリン IgG 濃度の測定およびその値と性別や年齢、体型、血漿ホルモン濃度との関係

臨床的に健康なネコにおいて、血漿抗インスリン IgG 濃度は、80 $\mu\text{g/ml}$ (0.5 μM) から 1578 $\mu\text{g/ml}$ (10.8 μM) の範囲内にあり、中央値は 221 $\mu\text{g/ml}$ (1.5 μM) であった (Fig. 1-3)。Table 1-1 は性別によって分類されたネコの血漿抗インスリン IgG 濃度を示す。雌雄および去勢、卵巣摘出の有無において、ネコの血漿抗インスリン IgG 濃度に差はなかった。また血漿抗インスリン IgG 濃度は、年齢および BCS と有意の相関関係になかった (年齢: n=84, $r=0.19$, $p=0.09$; BCS: n=84, $r=-0.01$, $p=0.76$)。

血漿抗インスリン IgG 濃度を測定した健康なネコの血漿の総 IgG 濃度とインスリン濃度を Table 1-2 に示す。血漿抗インスリン IgG 濃度は、総 IgG 濃度と有意な正の相関関係が認められたが (Fig. 1-4; n=84, $r=0.383$, $p<0.01$)、インスリン濃度とは有意の相関関係が認められなかった (n=84, $r=-0.100$, $p=0.67$)。

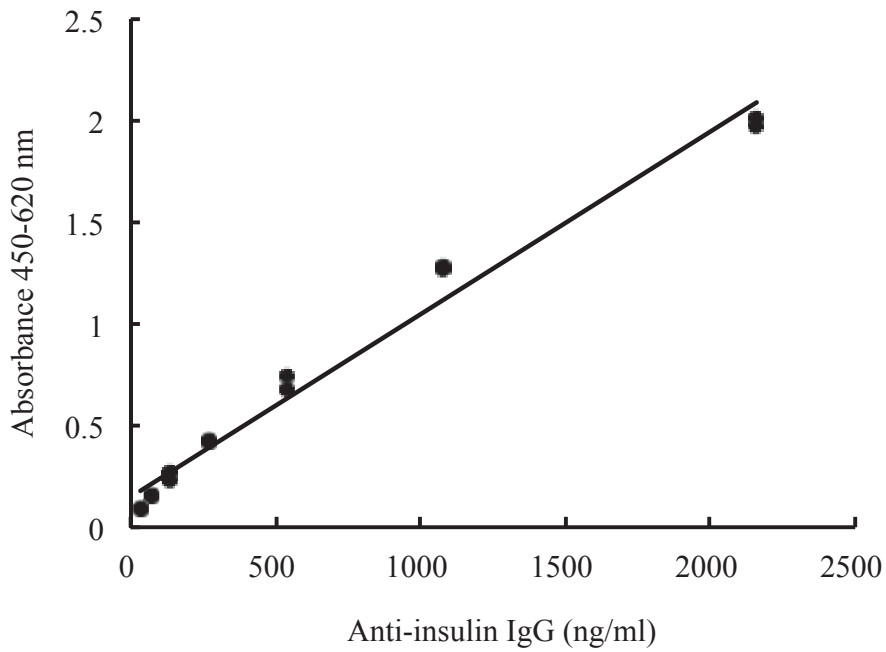


Fig. 1-1. A typical standard curve of anti-insulin IgG concentration for the ELISA.

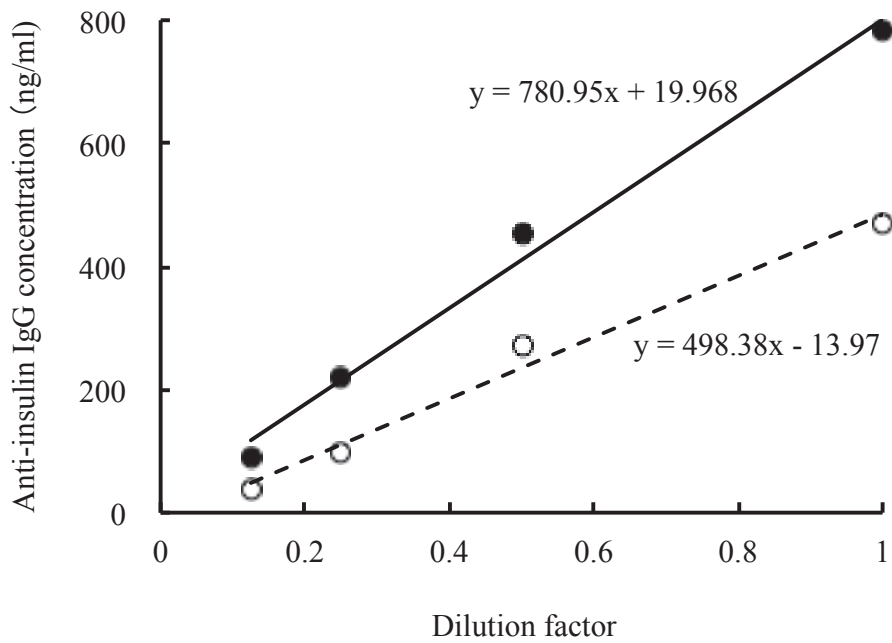


Fig. 1-2. The dilution curves of plasma anti-insulin IgG concentrations.

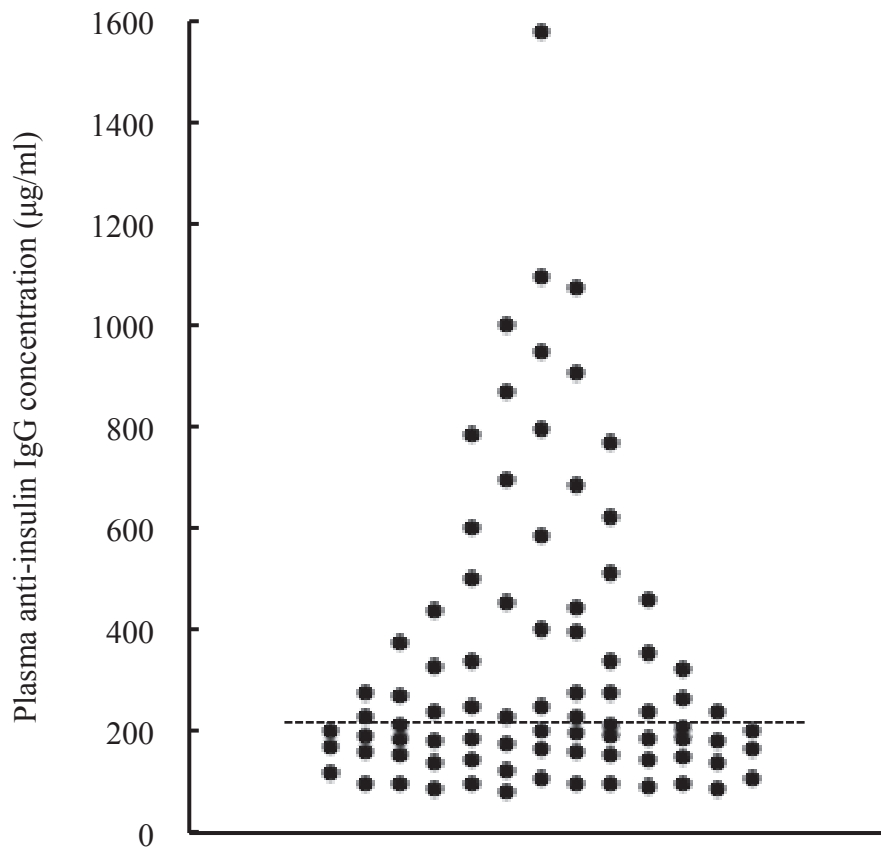


Fig. 1-3. The plasma anti-insulin IgG concentrations in 84 clinically healthy cats. The plasma anti-insulin IgG concentrations ranged from 80 to 1578 µg/ml, with a median concentration of 221 µg/ml (broken line).

Table 1-1. Plasma anti-insulin IgG concentrations in 84 clinically healthy cats categorized by gender.

Variable	Category	Plasma anti-insulin IgG concentration (µg/ml)		
		n	Median	Minimum-Maximum
Gender	Male			
	Intact	6	234	161 - 908
	Castrated	38	188	80 - 831
	Female			
Intact	9	397	85 - 1094	
Spayed	31	237	86 - 1578	

Table 1-2. Plasma concentrations of anti-insulin IgG, total IgG and insulin in 84 healthy cats.

Variable	Median	Minimum-Maximum
Anti-insulin IgG (µg/ml)	221	80 - 1578
Total IgG (mg/ml)	25.4	11.9 - 59.3
Insulin (ng/ml)	0.54	0.27 - 2.3

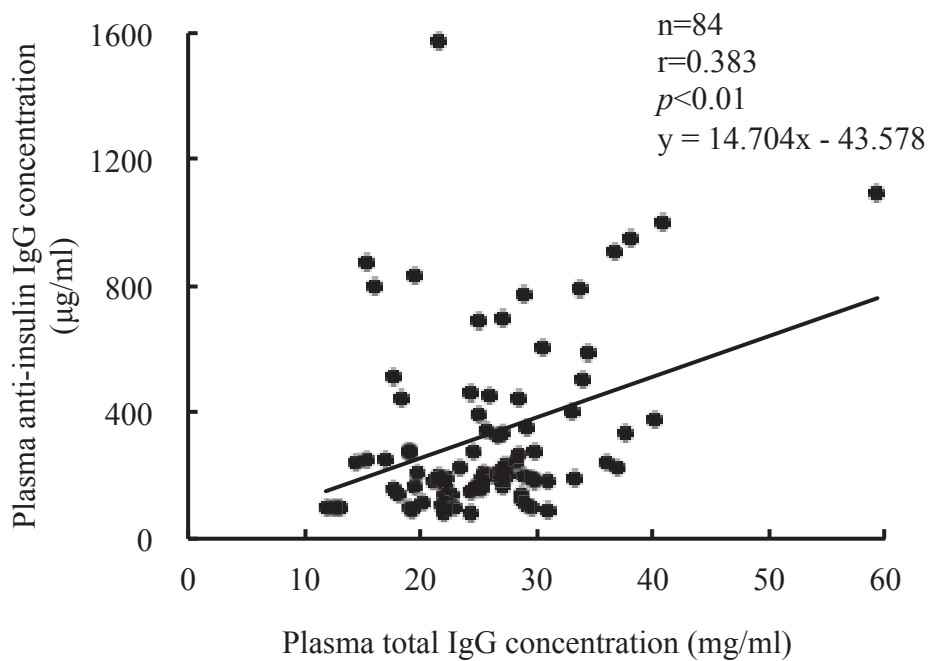


Fig. 1-4. Correlation between plasma anti-insulin IgG and total IgG concentrations. Plasma anti-insulin IgG concentrations were correlated significantly ($p<0.01$) with total plasma IgG concentrations.

3. 静脈内グルコース負荷試験における血漿グルコース、インスリンおよび抗インスリン IgG 濃度の変化

血漿グルコース濃度は、グルコース溶液の静脈内投与 10 分後に著しく上昇 ($p<0.01$) し、30 分後 ($p<0.01$)、60 分後 ($p<0.05$) までは投与前の濃度よりも有意に高値であったが、その後徐々に減少し、90 分で投与前濃度に戻った (Fig. 1-5A)。血漿インスリン濃度はグルコース溶液投与 60 分後に最大濃度を示した (投与前濃度と比較して $p<0.01$)。しかし、血漿抗インスリン IgG 濃度は 120 分の観察時間中変動しなかった (Fig. 1-5B)。

4. 疾患ネコにおける血漿抗インスリン IgG 濃度

Figure 1-6 に疾患ネコにおける血漿抗インスリン IgG 濃度を健康なネコの結果と併せて示す。測定した疾患保有ネコ 58 頭の血漿抗インスリン IgG 濃度は、80 $\mu\text{g/ml}$ から 2749 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内にあり、中央値 251 $\mu\text{g/ml}$ は、健康なネコの血漿濃度と差がなかった。疾患ネコのうち 2 例において健康ネコの最高測定値を大きく上回る高値を示したが、これらは慢性腎不全と高ガンマグロブリン血症を併発している個体であった。いっぽう、糖尿病ネコ 18 頭の血漿抗インスリン IgG 濃度は、80 $\mu\text{g/ml}$ から 1428 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で、健康なネコの測定値の範囲内に分布しており、中央値 143 $\mu\text{g/ml}$ は、健康なネコの血漿濃度と差がなかった (Fig. 1-7)。しかし、インスリン投与歴のない糖尿病症例 3 頭の血漿抗インスリン IgG 濃度はそれぞれ 86 $\mu\text{g/ml}$ 、95 $\mu\text{g/ml}$ 、84 $\mu\text{g/ml}$ であり、健康なネコおよび糖尿病ネコの最低値に近い濃度であった。

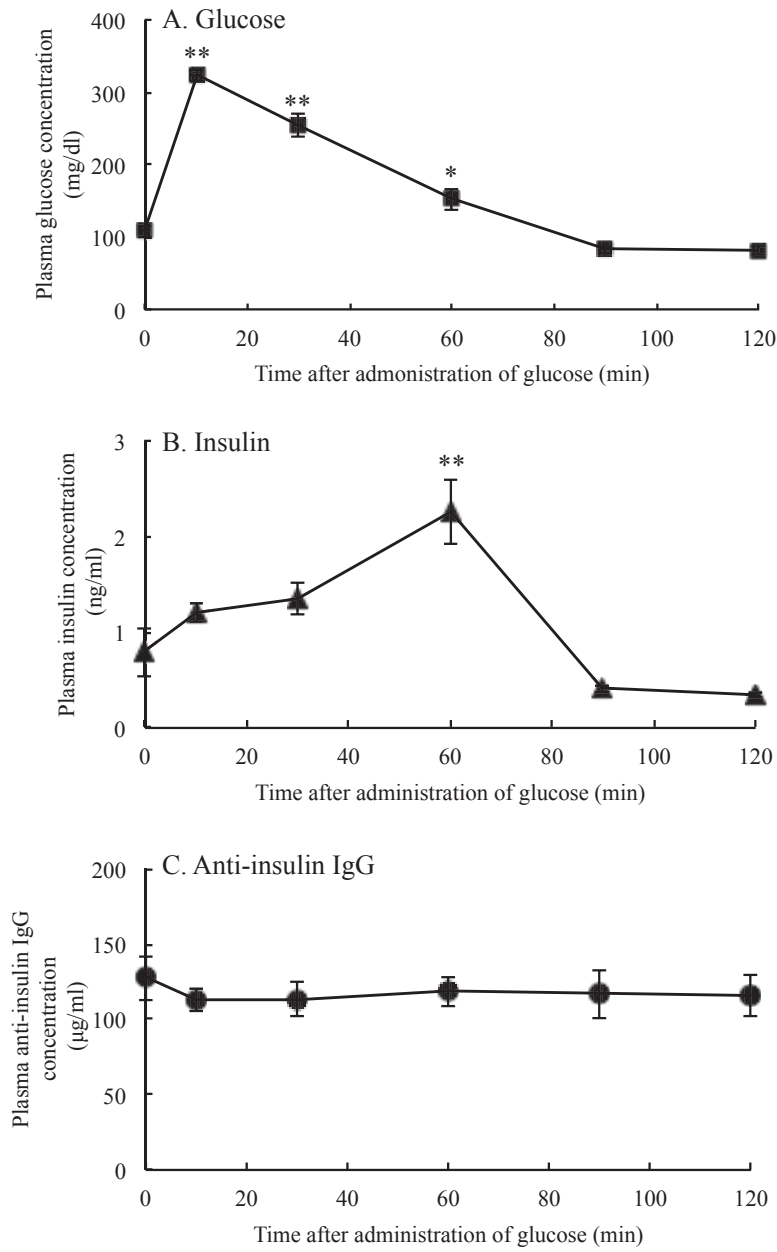


Fig. 1-5. The results of intravenous glucose tolerance test (1 g/kg) in three normal domestic cats. Data are expressed as means±SEMs (vertical bar).

* and ** denote significant differences from pretreatment level at $p<0.05$ and $p<0.01$.

A: Plasma glucose concentrations (■).

B: Plasma insulin concentrations (▲).

C: Plasma anti-insulin IgG concentrations (●).

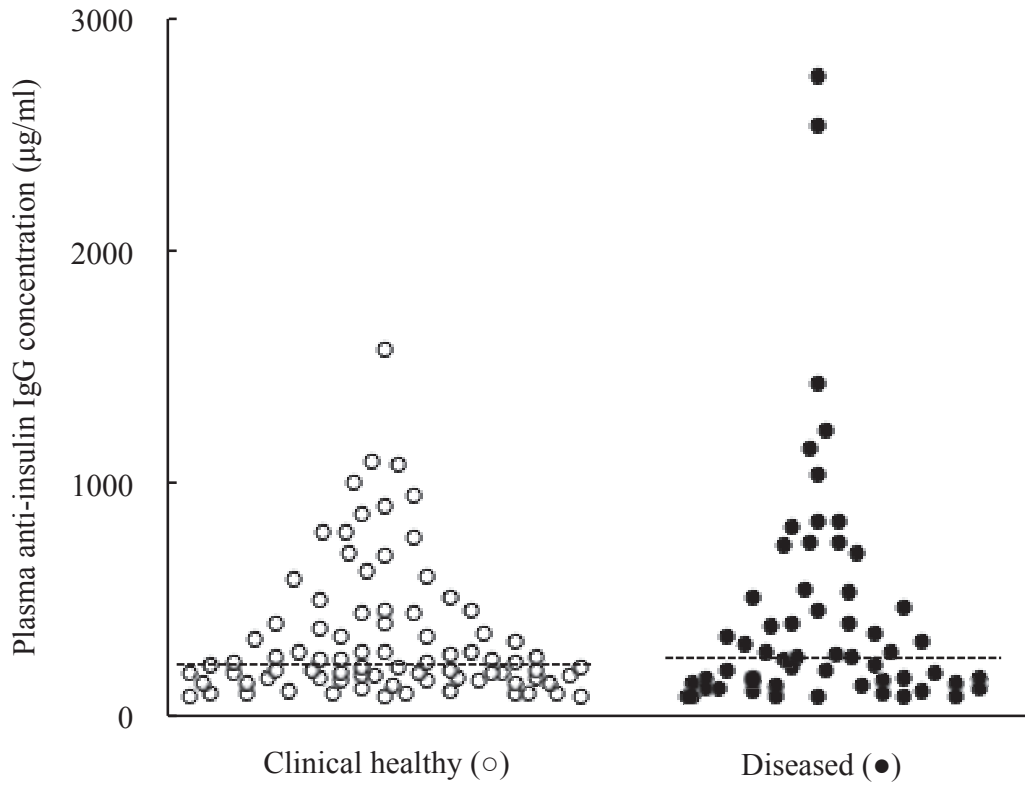


Fig. 1-6. The plasma anti-insulin IgG concentrations in 84 clinically healthy cats (broken line shows median: 221 µg/ml) and 58 diseased cats (broken line shows median: 251 µg/ml).

No difference between medians of both groups by Mann-Whitney's U test.

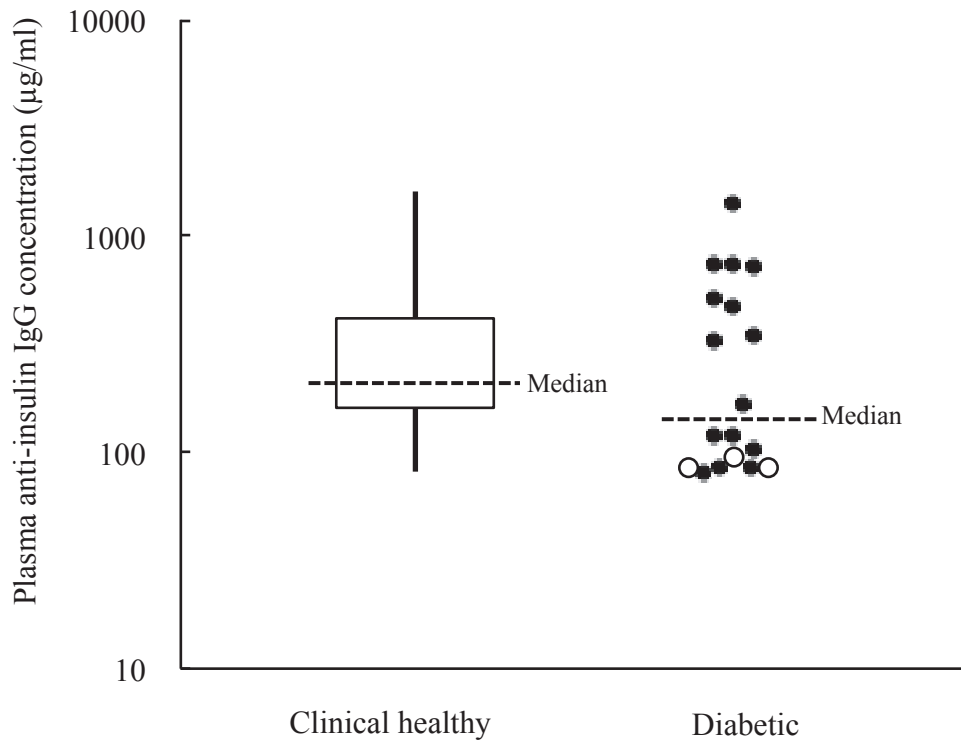


Fig. 1-7. The plasma anti-insulin IgG concentrations in 84 clinically healthy cats (box; 25th and 75th percentiles, whiskers; 25th percentile minus and 75th percentiles plus 1.5 times the interquartile range or the minimum and maximum, the median: 221 µg/ml) and 18 diabetic cats (15 closed and 3 opened circles indicate the data of cats with and without insulin treatment, respectively, median: 143 µg/ml). No difference between medians of both groups by Mann-Whitney's U test.

考 察

第1章では、ネコの血漿中のネコインスリンに親和性を示す IgG 濃度を測定する ELISA を作製し、その測定精度を検討した。この測定系は、直線性の高い標準直線を有し、低いアッセイ内およびアッセイ間 CV を示した。また希釈試験や添加回収試験において、優良な結果を得た。作製した ELISA が、ネコの血漿抗インスリン IgG 濃度の測定において十分な性能を示すことが確認された。また、作製したネコ抗インスリン IgG の ELISA を用いて、健康なネコ 84 頭の血漿濃度を測定し、すべてのネコの血漿からネコのインスリンに親和性を示す IgG を検出した。この結果は、健康なネコが血中に自己インスリンを抗原として認識する IgG を自然抗体として保有するとした Nishii らの報告[36]を支持した。さらに、健康なネコの血漿抗インスリン IgG 濃度が 80 $\mu\text{g/ml}$ から 1578 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、中央値が 221 $\mu\text{g/ml}$ であることを示した結果は、今後、ネコ抗インスリン自然自己抗体の生理的役割を解明していく上での貴重な基礎データとなる。

ネコにおいて抗インスリン抗体は、Hoenig ら[17]により、ブタ由来インスリンおよびブタ由来インスリンとアミノ酸配列の1カ所 (B30) のみ異なったヒト由来インスリン[16]の投与歴のあるネコから検出されている。しかし、第1章において作製した ELISA によるインスリン投与歴のない84頭の健康なネコの血漿試料の測定では、すべての試料から抗インスリン IgG を検出した。作製した ELISA は、ネコの膵臓から抽出されたインスリンを捕捉した IgG を抗インスリン IgG として検出しているため、測定に供した84頭の健康なネコが自己分泌インスリンに親和性を示す自然自己抗体を保有していることに間違いはない。Hoenig ら[17]の RIA は、使用した抗インスリン抗体がブタインスリンを捕捉する設計であった。ブタインスリンはネコインスリンと A8、A10 および A18 の3カ所でアミノ酸配列が異なっている[16]。このため Hoenig らの RIA では、ネコインスリンに親和性を示す抗インスリン自然自己抗体を検出できなかった可能性がある。この可能性は、Hoenig らの RIA において、ブタおよびヒト由来のインスリンの投与歴のないネコ（健康、糖尿病および糖尿病以外の病気）の血清試料から抗インスリン抗体が検出されていない結果から裏付けられる。

ネコの抗インスリン自然自己抗体がインスリンの作用を調節していると仮定すると、血中の抗インス

リン IgG の不足や過剰が糖尿病の病態に関係する可能性があるため、糖尿病 18 症例の抗インスリン IgG の血漿濃度を測定した。しかし、糖尿病ネコの抗インスリン IgG 濃度はすべて健康なネコの測定値の範囲内であり、健康なネコと糖尿病ネコの抗インスリン IgG 濃度に統計的な差はなかった。糖尿病 18 症例には、インスリン治療中の個体が 15 例含まれた。インスリン治療中のネコは、投与インスリンに対する抗体を産生することがある[17]。インスリン治療中の糖尿病ネコでは、血漿中にネコインスリンに親和性を示す IgG と投与されているインスリン製剤に対する抗体が混在する可能性があり、第 1 章で作製した ELISA において、両方の抗体を区別できなかったと考えられた。ネコにおいて、糖尿病と抗インスリン自然自己抗体の関係を理解するためには、投与インスリンに反応して産生された抗インスリン抗体の関与を排除するために、インスリン投与歴のない糖尿病症例について評価する必要がある。第 1 章においては、3 例のインスリン投与歴のない糖尿病ネコの血漿抗インスリン IgG 濃度を測定したが、84 $\mu\text{g/ml}$ 、86 $\mu\text{g/ml}$ 、95 $\mu\text{g/ml}$ であり、これらは健康なネコの測定値の範囲内（80 $\mu\text{g/ml}$ から 1578 $\mu\text{g/ml}$ ）であったが、健康なネコの最低に近い濃度であった。この結果は、糖尿病症例がわずか 3 例と少ないため不確定ではあるが、インスリンの正常な作用に抗インスリン自然自己抗体が関わる可能性を示している。このことについては、さらに測定例数を増やして、検証する必要がある。

Nishii ら[35, 36]は、インスリンの α 鎖または β 鎖を認識する 2 種類の抗ラットインスリンモノクローナル抗体を用いたネコインスリン測定用サンドイッチ ELISA の開発過程において、無処置の血漿では不可能であったインスリン濃度の測定が、血漿を酸-アルコール処置によりグロブリンを除去することで測定可能となったことを報告している。この事実は、ネコ血漿中のほとんどのインスリンにグロブリンが結合していることを示唆する。また第 1 章において、健康なネコの血漿抗インスリン IgG のモル濃度（範囲: 0.5 μM -10.8 μM ）が、インスリンのモル濃度（範囲: 0.05 nM-0.9 nM）を遥かに上回っていた。この事実は、ネコの血中にはインスリン分子をすべて結合することの可能な量の抗インスリン IgG 分子が存在していることを示唆する。ネコの抗インスリン IgG とインスリンの血中濃度の関係と同様に、ホルモンの輸送や保存の役割を担っている血中の結合グロブリン[8]である甲状腺ホルモン結合グロブリン[19]やコルチコステロイド結合グロブリン[45]の血中濃度は、各々の結合するホルモンの血中濃度に比して著

しく高いことが知られている。ネコの血中においては、血中を遊離している抗インスリン IgG が分泌されたインスリンと結合して、IgG-インスリン複合体として末梢を循環している可能性が考えられた。第1章において、血漿抗インスリン IgG 濃度は総 IgG 濃度との間に正の相関関係が認められたが、血漿インスリン濃度との間には認められなかった。このことは、総 IgG には一定の割合で抗インスリン IgG が含まれ、血中の抗インスリン IgG の量はインスリンに関係なく、総 IgG の増減に依存して変動する可能性を示した。

げっ歯類では線維芽細胞や脂肪細胞において、抗インスリン抗体がインスリンの受容体への結合やインスリンの作用[18, 46]を増強することが報告されている。また糖尿病のイヌにおいて、抗インスリン抗体が、投与されたインスリンの半減期の延長に関係している可能性が報告されている[12]。Nishii らの研究[36]およびこの研究の第1章までにおいて、ネコの抗インスリン自然自己抗体に関する知見は血中における存在のみであり、抗インスリン自然自己抗体の生理的機能、特に自己分泌インスリンの作用に与える効果を理解するには情報が十分でない。ネコの抗インスリン自然自己抗体の生理的な役割を解明するためには、健康なネコの血清から精製した抗インスリン IgG とネコ由来のインスリン標的組織を用いた *in vitro* 実験により、抗インスリン自然自己抗体の存在が生体に対するインスリンの作用に与える効果を検討する必要がある。

小 括

第 1 章では、ネコインスリンに親和性を示す IgG の血漿濃度を測定可能な ELISA を作製した。この ELISA を用いて、インスリン投与歴のない健康なネコ 84 頭の血漿濃度を測定し、測定したすべてのネコが抗インスリン IgG を保有すること、その濃度が 80 $\mu\text{g/ml}$ から 1578 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、中央値が 221 $\mu\text{g/ml}$ であることを示した。この結果は、健康なネコが血中に自己インスリンを抗原として認識する IgG を自然抗体として保有することの証拠となる。いっぽう、ネコの血漿抗インスリン IgG 濃度は、ネコの性別、年齢、体型および血漿インスリン濃度との関係がなく、さらに糖尿病などの疾病のネコにおいて高濃度あるいは低濃度を示すことはなかった。健康なネコの持つ抗インスリン自然自己抗体は、ヒトやイヌにおいて疾患の病因となる抗インスリン抗体とは本質的に異なるが、インスリンの働きを調節する自然自己抗体として正常な生命活動の維持に貢献する可能性がある。

第 2 章

ネコの抗インスリン IgG がインスリンの作用に与える効果

緒言

Nishii ら[36]によって、健康なネコが保有することを確認された抗インスリン IgG は、インスリン投与歴のない健康なネコ 10 頭の血清から検出されたことから、外来性インスリンに反応して産生された抗体ではなく、自己インスリンに結合能を示す自然自己抗体であると考えられた。また第 1 章において、ネコインスリンに親和性を持つ IgG を検出する ELISA により、測定したインスリン投与歴のない健康なネコ 84 頭の血漿すべてから抗インスリン IgG が検出したが、この結果はネコが抗インスリン自然自己抗体を保有することを証明している。

異種動物（ウシ、ブタ）由来のインスリン投与歴を持つヒトの糖尿病患者では、抗インスリン抗体が投与インスリンの受容体結合部位に競合的に結合することで、治療抵抗性の原因となることが報告されている[6, 7, 44]。いっぽうで、マウス由来の培養細胞を用いた研究において、モルモットにブタ由来インスリンを投与して産生させた抗インスリン抗体が、インスリンの受容体結合と RTK シグナル活性化を増強することが報告されている[18, 21, 46]。インスリンを認識する自然自己抗体の存在については、ネコ以外でもヒト[40]やマウス[41]において報告されているが、インスリンの作用に与える効果に関する情報は無い。健康なネコの持つ抗インスリン IgG は、ヒトにおいて疾患の病因となる抗インスリン抗体とは本質的に異なると考えられるが、一生を通じ安定して血中に存在することで正常な生命活動を維持する働きを担う自然自己抗体[30]であることを考慮すると、ネコにとって有用な生理的役割を持つ可能性がある。ネコ科動物は、真性肉食動物であり[5]、炭水化物ではなく、アミノ酸と脂質を中心とした特有の栄養代謝を持つ。この特有の栄養代謝に適応するために、明確な根拠はないが、ネコが抗インスリン自然自己抗体を利用している可能性が推定される。

第 2 章では、ネコの抗インスリン自然自己抗体の生理的役割を解明するために、ネコの抗インスリン IgG がインスリンの作用に及ぼす効果を評価した。健康なネコの血清からインスリンに対する親和性を

基に分離した抗インスリン IgG とネコの培養成熟脂肪細胞を用いて、抗インスリン IgG の存在が、インスリン添加による細胞内への糖取り込み能とそれに関わる受容体シグナル活性化に与える効果を検討した。

材料および方法

1. ネコ血清からの抗インスリン IgG の分離

インスリン投与歴のない 8 頭の健康な成ネコから採取した血液から血清を分離し、混合血清中に含まれる IgG を Melon™ Gel Chromatography Cartridge (Thermo Fisher Scientific) を用いて分離した。カラム溶出液中の IgG にはインスリンをはじめとするペプチドが結合しているため、溶出液 1 ml に対し 1N の HCl 溶液を 150 μ l 加えることによって IgG とのペプチドの結合を解き、解離したペプチドを限外濾過ユニット (Vivaspin20-30K, GE Healthcare) で除去した。限外濾過ユニットに残留した IgG を含む沈渣には、免疫グロブリンの変性を避けるために、0.01 M の PBS 20 ml を加えて中和した。中和した IgG 沈渣は、さらに限外濾過ユニットで濃縮し、総 IgG 分画とした。

総 IgG 分画は、インスリンに対する親和性に基づいたアフィニティークロマトグラフィーに供することにより抗インスリン IgG を分離した。アフィニティカラム (HiTrap NHS-activated HP, GE Healthcare) に固相化するインスリンとして、入手困難なネコインスリンの代わりにウシインスリン (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA) を用いた。ウシインスリンは、ネコインスリンとアミノ酸配列が A18 の 1 カ所異なるのみ[16]である。アフィニティカラムの仕様書に従い、インスリンの固相化と総 IgG 分画の添加を実施し、分画の溶出は HPLC (TOSO HPLC system, TOSO, Tokyo, Japan) により、3 M NaCl, 1.5 M glycine buffer solution (buffer A, pH 8.5) と 0.05 M phosphate buffer solution (buffer B, pH 7.2) を用いた以下の線形グラジエントプログラムに従って実施した; 0 分~25 分, 100% buffer A; 25 分~35 分, 100%-50% buffer A + 0%-50% buffer B; 35 分~40 分, 50% buffer A + 50% buffer B; 40 分~50 分, 50%-0% buffer A + 50%-100% buffer B。溶出速度は 0.5 ml/分に設定し、溶出分画の吸光度は単波長 280 nm でモニターした (Fig. 2-1; UV-8010, TOSO)。

HPLC による溶出分画において、吸光度の上昇を示す分画には抗インスリン IgG が含まれ、溶出条件を buffer A を 100%から 50%に、buffer B を 0%から 50%に変更していく過程で溶出される第 1 分画と buffer A を 50%から 0%に、buffer B を 50%から 100%に変更していく過程で溶出される第 2 分画を得た。HPLC により分画した第 1 分画および第 2 分画のインスリンに対する結合親和性は、表面プラズ

モン共鳴技術 (BIAcore™ J, GE Healthcare) により算出された結合速度定数 (ka) および解離速度定数 (kd) から BIA evaluation (ver. 3.1) software (GE healthcare) を用いて K_D 値 ($K_D = kd/ka$) として得た。第 1 分画および第 2 分画のインスリンに対する結合親和性は、それぞれ、 $1.61 \times 10^{-4} \text{ M}$, $2.00 \times 10^{-5} \text{ M}$ であった。

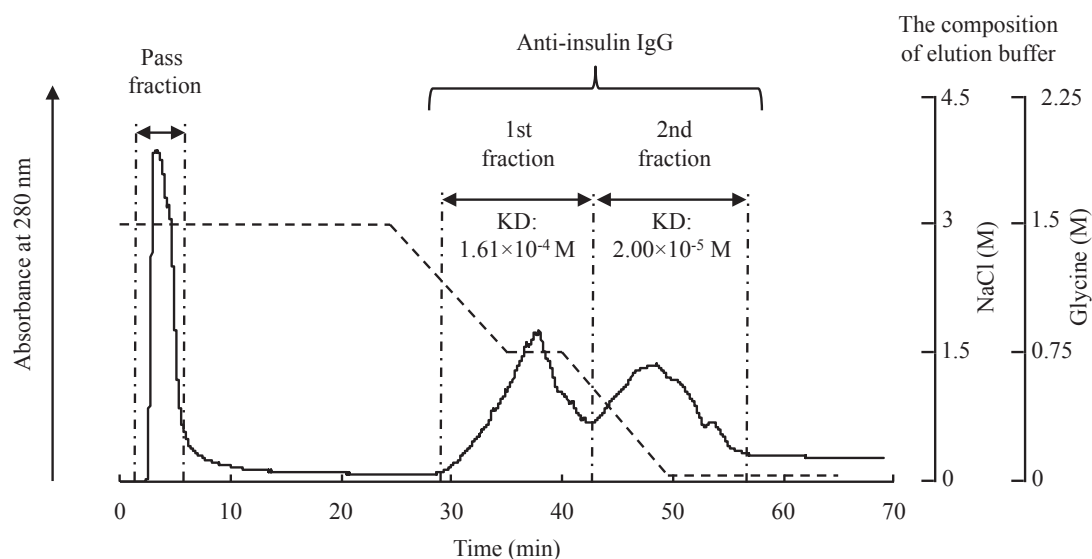


Fig. 2-1. Representative elution pattern of anti-insulin IgG from sera of cats by affinity chromatography on immobilized bovine insulin.

総 IgG 分画とアフィニティクロマトグラフィーにおける素通り分画および溶出分画である第 1 分画と第 2 分画を 15% SDS アクリルアミドゲル (SuperSep™ Ace; 和光純薬, 大阪) による電気泳動と CBB 染色に供した。抗インスリン IgG の第 1 分画および第 2 分画には、アフィニティクロマトグラフィーにおける捕捉抗原として用いたウシインスリンの混入がないことを確かめた (Fig. 2-2)。実験には、抗インスリン IgG として第 1 分画および第 2 分画を用いた。第 1 分画および第 2 分画の IgG 濃度は、ネコ IgG 測定用 ELISA (Cat IgG ELISA Quantitation Set, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) を用いて確認した。

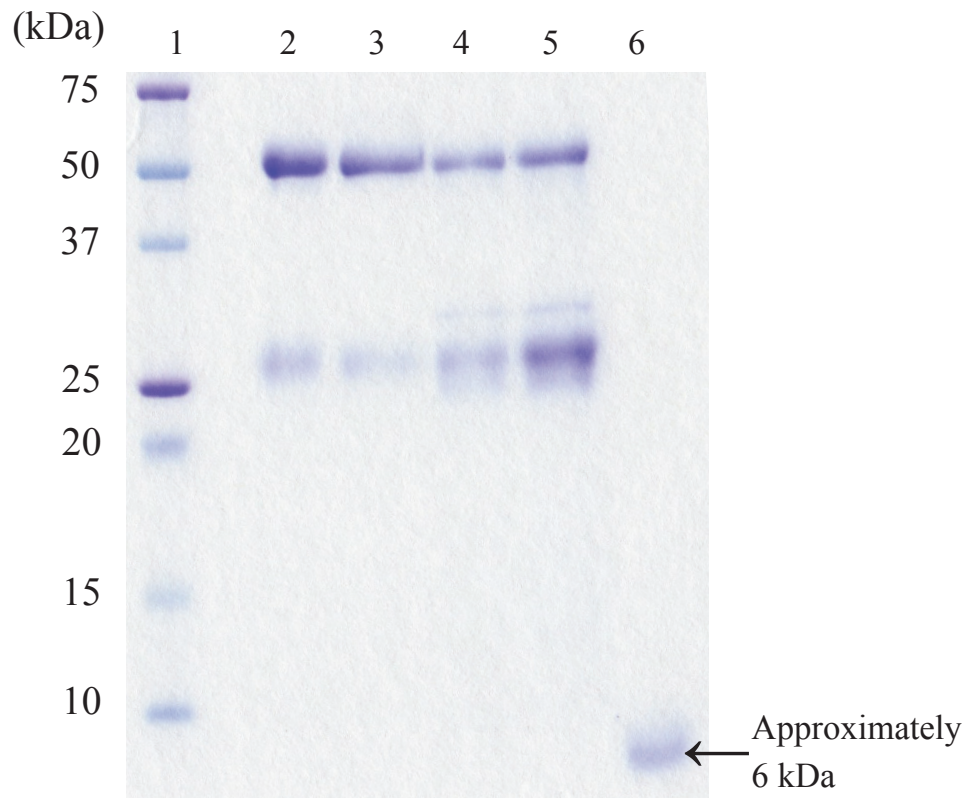


Fig. 2-2. SDS-PAGE results of purified IgG from sera of healthy domestic cats. SDS-PAGE show clear biphasic bands 25 and 50 kDa in size, which is consistent with immunoglobulin.

Lane 1: Molecular weight marker.

Lane 2: Purified whole IgG.

Lane 3: Passed fraction.

Lane 4: 1st fraction of affinity chromatography on immobilized bovine insulin.

Lane 5: 2nd fraction of affinity chromatography on immobilized bovine insulin.

Lane 6: Bovine insulin.

2. 脂肪細胞の培養と分化

ネコ由来の脂肪前駆細胞 (Primary Normal Feline Preadipocytes, Zen-Bio, Research Triangle, NC, USA) は, 市販の発育, 分化, 維持培地 (Zen-Bio) を使って成熟培養したが, すべての培養工程を, 37°C, 5% CO₂ 下で実施した。成熟脂肪細胞は, 実験前に血清とインスリンの影響を除去するために 4 時間, 血清とインスリンを含まない維持培地で飢餓培養した。

3. 2-Deoxy-D-glucose uptake assay

ネコ成熟脂肪細胞への糖取り込み能の評価は, Klip ら[25]の方法に従って実施した。グルコーストレーサーとして[³H]-2-DOG (PerkinElmer, Boston, MA, USA) を用いた。グルコーストレーサーは, 0.1 mM [³H]-2-DOG と 10.2 mM 非標識 2-DOG を PBS で希釈して, 0.2 μCi に調整して使用した。また, 添加するインスリンとしてウシインスリンを用いた。飢餓培養した脂肪細胞は, 生理条件に安定させるために, グルコースを含まない 0.1% BSA 含有 HSBS (pH 7.4) を加えて 37°C, 5% CO₂ 下で 30 分間前培養した。その後, 細胞に HSBS で総量 100 μl に調整した以下の 5 種類の溶液を以下の濃度で添加し, さらに 30 分間培養した; 1) 無処理, 2) 前培養に使用した HSBS (vehicle), 3) インスリン 10⁻⁷ M の単独, 4) 抗インスリン IgG の第 1 分画および第 2 分画 10⁻¹² M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M の単独, 5) インスリン 10⁻⁷ M と抗インスリン IgG の第 1 分画および第 2 分画 10⁻¹² M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M の混合。添加するインスリンの適用濃度には, 予備試験において無処理の細胞の約 2.5 倍の [³H]-2-DOG 取り込み量を認めた 10⁻⁷ M を採用した (Fig. 2-3)。トレーサー溶液を細胞に加えて 10 分間培養した後, 氷冷した PBS を 1 回あたり 0.5 ml 用いて, 4 回洗浄した。その後, 0.5 ml の NaOH で細胞を溶解して, 全量をシンチレーションバイアルに移した。さらに 0.5 ml の HCl を加えて細胞溶解液を中和した後に, 9 ml の液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold, PerkinElmer) を加えて, [³H]-2-DOG の取り込み量を radioactivity として液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb2900TR; Packard, Meriden, CT, USA) で測定した。得られた値は, BCA 法で測定した細胞溶解液のタンパク質濃度 (Pierce BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific) で補正した。結果は無処理の細胞の糖取り込み量を 100%とした百分率 (%) で表示

した。実験は1試験群あたり3回繰り返し、結果は平均値±標準偏差で示した。

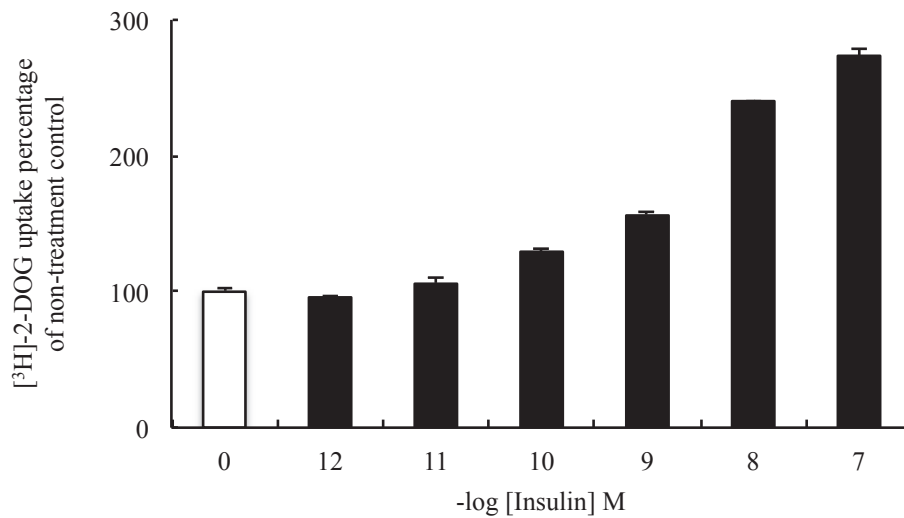


Fig. 2-3. Mean (+SD) percentages of the insulin-induced [1,2-³H]-2-Deoxy-D-glucose ([³H]-2-DOG) uptake in adipocytes derived from cats. Results (n=3) describe non-treatment control as 100%.

4. 脂肪細胞におけるリン酸化チロシンタンパク質の検出

ネコ成熟脂肪細胞を用いて、インスリンおよび抗インスリン IgG の第1分画または第2分画の存在が RTK シグナル活性化に与える効果を評価するために、リン酸化チロシンタンパク質の経時的変化をウェスタンブロットにより検出した。リン酸化チロシンタンパク質の検出には、マウス抗リン酸化チロシン抗体 (p-Tyr (PY20): sc-508, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いた。抗リン酸化チロシン抗体はマウス由来の単クローン抗体のため、インスリンを添加したネコ脂肪細胞から抽出した細胞溶解液における反応性を予備試験で確認した。インスリンを添加したマウス由来の細胞から経時的に抽出した細胞溶解液に抗リン酸化チロシン抗体を感作すると、リン酸化した IRS-1 (185 kDa), IR8 (95 kDa), Akt (60 kDa) の3種のリン酸化チロシンタンパク質が検出される[47]。予備試験において、ネコ脂肪細胞から抽出した細胞溶解液にマウス抗リン酸化チロシン抗体を感作すると、時間および濃度依存性に検出されたリン酸化チロシンタンパク質は、リン酸化 IRS-1 のみであった (Fig. 2-4)。そこで、検出するリン酸化チロシンタンパク質としてリン酸化 Akt を加えた。検出には、Ser473 をリン酸化した

Akt を特異的に検出するウサギ抗リン酸化 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を用いた。用いたウサギ抗リン酸化 Akt 抗体はネコのリン酸化 Akt に対する交差反応性が確認されていなかったため、インスリン 10^{-7} M を添加したネコ成熟脂肪細胞から抽出した細胞溶解液における交差反応性を予備的に検討し、時間依存性の反応を確認した (Fig. 2-5)。また、ハウスキーピングタンパク質の検出には、抗 β -actin 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。

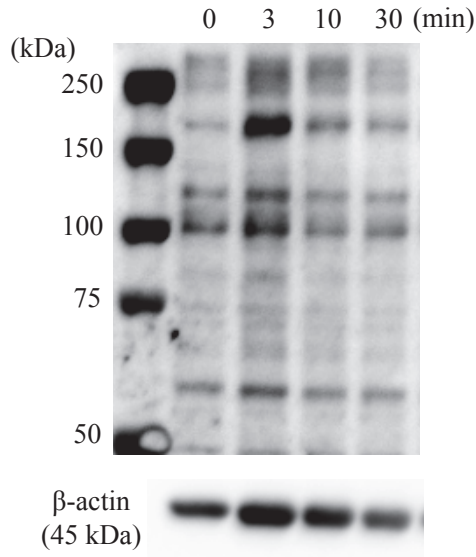
飢餓培養した脂肪細胞に、飢餓培養に用いた血清とインスリンを含まない維持培地で総量 100 μ l に調整した以下の 4 種類の溶液を以下の濃度で添加し、さらに 0 分, 1 分, 3 分, 5 分, 15 分, 30 分, 60 分間培養した; 1) 飢餓培養に用いた維持培地 (vehicle), 2) インスリン 10^{-7} M の単独, 3) 抗インスリン IgG の第 1 分画または第 2 分画 10^{-10} M の単独, 4) インスリン 10^{-7} M と抗インスリン IgG の第 1 分画または第 2 分画 10^{-10} M の混合。培養後の細胞は、リン酸化酵素阻害剤 (PhosSTOP; Roche Applied Science, Basel, Switzerland) 入りの細胞タンパク質抽出キット (Complete Lysis-M; Roche) により溶解した。溶解した細胞は、SDS-PAGE 用サンプルバッファー (0.125 M Tris-HCl, 4.3% SDS, 30% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue [pH 6.8]; コスモバイオ, 東京) と等量混合し、2 分間ボイルした後に、10% SDS ポリアクリルアミドゲル (SuperSepTM Ace; 和光純薬) により電気泳動した。分離したタンパク質は、ニトロセルロース膜 (AmershamTM HybondTM -ECL; GE healthcare) に 80 V, 3 時間通電の条件で転写した。転写後のニトロセルロース膜は 2% ウシ血清アルブミンを加えた 0.2% Tween 20-TBS でブロッキング (4°C, overnight) した。0.2% Tween 20-TBS で洗浄後、Can Get SignalTM (東洋紡, 東京) で希釈した一次抗体 (抗リン酸化チロシン抗体, 1:200, 抗リン酸化 Akt 抗体, 1:3000, 抗 β -actin 抗体, 1:1000) で反応した (室温, 1 時間)。一次抗体反応後、0.2% Tween 20-TBS でニトロセルロース膜を洗浄し、Can Get SignalTM で 4000 倍に希釈した HRP 標識二次抗体 (anti-mouse or rabbit HRP conjugate, GE Healthcare) で反応した。ニトロセルロース膜は 0.2% Tween 20-TBS で洗浄した後、ECL system (Western Lightning ECL Pro; PerkinElmer) で抗体反応を検出した。検出したシグナル強度は ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で数値化し、 β -actin の検出量で補正した後、結果は培養時間 0 分の細胞における検出量を 100% とした百分率 (%) で表示し

た。実験は1試験群あたり3回繰り返し、結果は平均値±標準偏差で示した。

5. 統計分析

ネコ脂肪細胞へのインスリン、抗インスリン IgG 分画の第1分画および第2分画の単独添加による細胞への³H]-2-DOG 取り込み量は、各実験群のデータの等分散性を Bartlett 検定により確認した後に、vehicle 添加による取り込み量との差を一元配置分散分析と Dunnett 法により比較した。また、抗インスリン IgG の第1分画または第2分画の存在によるインスリン添加後の細胞の³H]-2-DOG 取り込み量は、各実験群のデータの等分散性を Bartlett 検定により確認した後に、インスリン単独添加による取り込み量との差を一元配置分散分析と Dunnett 法により比較した。さらに、検討した抗インスリン IgG の第1分画および第2分画において添加濃度 (10⁻¹² M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M) 間の³H]-2-DOG 取り込み量の差は、一元配置分散分析と Tukey-Kramer 法によりそれぞれ比較した。細胞への抗インスリン IgG の第1分画または第2分画のネコ脂肪細胞への単独添加によるリン酸化チロシンタンパク質 (リン酸化 IRS-1 およびリン酸化 Akt) の検出量は、添加後の経過時間 (分) 毎に *F* 検定によりデータの等分散性を確認した後に、vehicle 添加による検出量との差を Student の *t*-検定により比較した。また、抗インスリン IgG の第1分画または第2分画の存在によるインスリン添加後の細胞におけるリン酸化チロシンタンパク質の検出量は、添加後の経過時間毎に *F* 検定によりデータの等分散性を確認した後に、インスリン単独添加による検出量との差を Student の *t*-検定により比較した。*p*<0.05 を統計的に有意とした。

A) Time dependent responses after addition of insulin 10^{-7} M



B) Insulin dose dependent responses

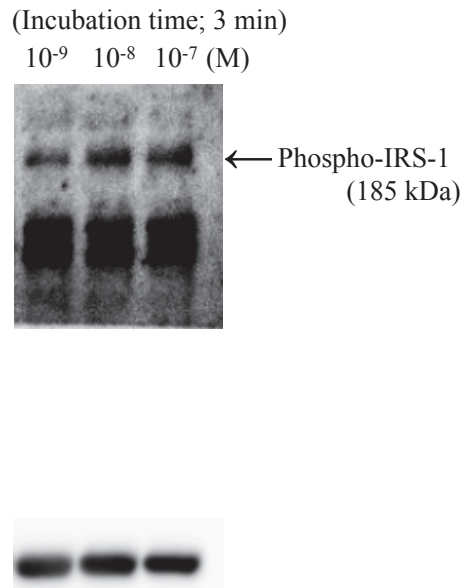


Fig. 2-4. Effect of insulin on tyrosine-phosphorylated proteins in adipocytes derived from cats. Matured adipocytes were treated with bovine insulin for indicated times (A) and indicated concentrations (B). Cells were lysed, and phosphorylated proteins were detected with immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody (PY20; mouse monoclonal antibody designed to specially detect phosphorylated tyrosine residues). Although PY20 can detect three major phosphoproteins (phospho-IRS-1, -IR β and -Akt) observed after insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes derived from mouse, only phosphorylated IRS-1 are detectable on adipocytes derived from cats.

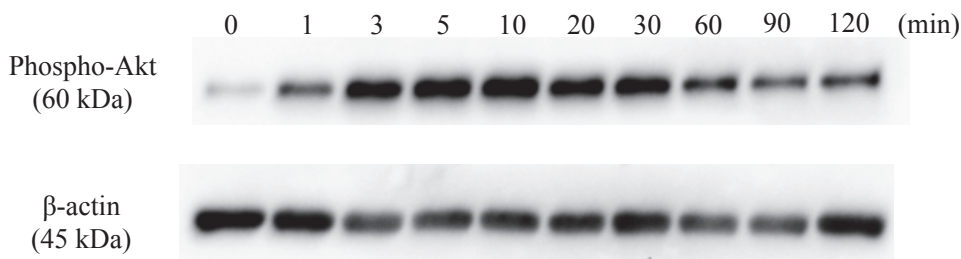


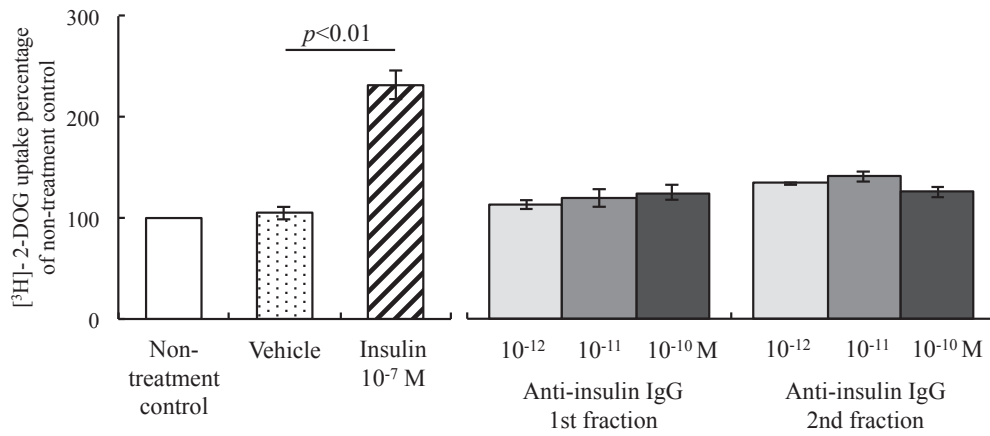
Fig. 2-5. Effect of insulin 10^{-7} M on phosphorylated Akt and β -actin in adipocytes derived from cats. Matured adipocytes were treated with bovine insulin for indicated times. Cells were lysed, and phosphorylated Akt and β -actin were detected with immunoblotting with anti-phosphorylated Akt antibody and anti- β -actin antibody. Anti-phosphorylated Akt antibody detected a time dependent response of phosphorylated Akt in insulin-treated cells.

結果

1. ネコ抗インスリン IgG がインスリン添加によるネコ脂肪細胞への[1,2-³H]-2-Deoxy-D-glucose 取り込みに与える効果

Vehicle として用いた HSBS の添加によるネコ脂肪細胞への[³H]-2-DOG の取り込み量は、無処理の細胞における取り込み量 (100%) とほぼ同等 (105.4±6.6%) であり、vehicle 添加による取り込み量増加はなかった。インスリン 10⁻⁷ M の単独添加による細胞への [³H]-2-DOG の取り込み量は、vehicle 添加による取り込み量に比べて著しく増加した ($p<0.01$, Fig. 2-6A)。いっぽう、第 1 分画および第 2 分画の単独添加による細胞への [³H]-2-DOG の取り込み量は、検討した濃度 (10⁻¹² M, 10⁻¹¹ M および 10⁻¹⁰ M) において vehicle 添加による取り込み量と同等で、糖取り込み量を増加させなかった (Fig. 2-6A)。インスリン添加による細胞への[³H]-2-DOG の取り込み量は、第 1 分画をともに添加することで著しく増加した ($p<0.01$) が、増加量は用量依存性ではなかった (Fig. 2-6B)。しかし、インスリン添加による細胞への[³H]-2-DOG の取り込み量は、第 2 分画をともに添加しても、検討したすべての濃度で、インスリン単独添加による取り込み量と同等であった (Fig. 2-6B)。

A) Insulin alone and anti-insulin IgG fractions alone



B) Insulin with or without anti-insulin IgG fractions

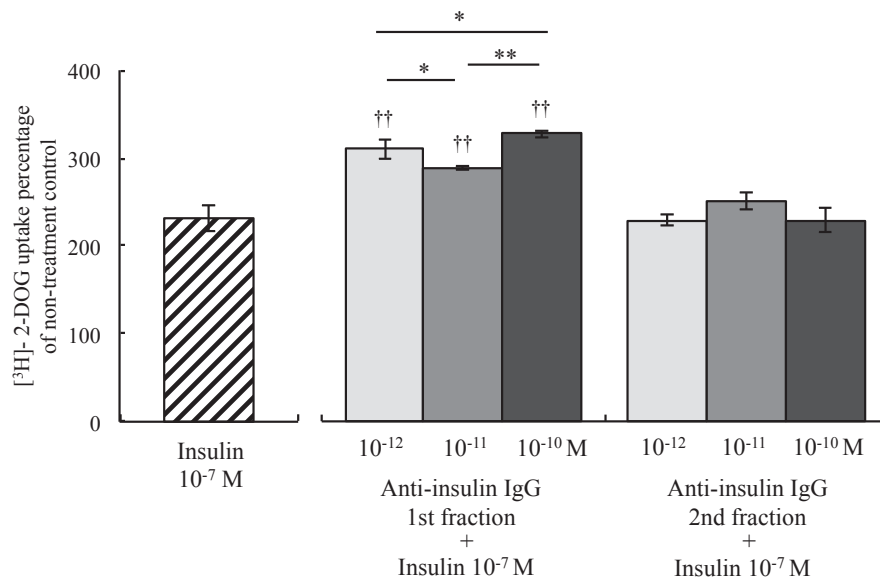


Fig. 2-6. Mean (\pm SD) percentages of [1,2-³H]-2-Deoxy-D-glucose ([³H]-2-DOG) uptake in feline adipocytes. Results (n=3) describe non-treatment control as 100%.

†† denote significant differences from insulin alone at $p < 0.01$.

* and ** denote significant differences from other concentration at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively.

A) Insulin alone and anti-insulin IgG fractions alone.

B) Insulin with or without anti-insulin IgG fractions.

2. ネコ抗インスリン IgG がインスリン添加によるネコ脂肪細胞の RTK シグナル活性化に与える効果

Vehicle として用いた HSBS のネコ脂肪細胞への添加によるリン酸化 IRS-1 の検出量は、添加から 60 分間変化しなかった (Fig. 2-7 A)。脂肪細胞へのインスリンの単独添加によるリン酸化 IRS-1 の検出量は、1分から3分において vehicle 添加による検出量よりも有意に多かった ($p<0.05$) が、5分以降において同様に变化した (Fig. 2-7 B)。抗インスリン IgG の第1分画および第2分画の脂肪細胞への単独添加によるリン酸化 IRS-1 の検出量は、60分間を通して、vehicle 添加による検出量と同様に变化した (Fig. 2-7C および D)。いっぽう、脂肪細胞へのインスリン添加によるリン酸化 IRS-1 の検出量は、第1分画をともに添加すると、5分後に最大に達して、それ以降、徐々に減少したが、添加から30分までインスリン単独添加による検出量より有意に多かった (Fig. 2-8B)。また、脂肪細胞にインスリンと第2分画をともに添加すると、リン酸化 IRS-1 の検出量は、60分間を通して、インスリン単独添加による検出量と同様に变化した (Fig. 2-8C)。

Vehicle として用いた HSBS のネコ脂肪細胞への添加によるリン酸化 Akt の検出量は、添加から 60 分間変化しなかった (Fig. 2-9A)。脂肪細胞へのインスリンの単独添加によるリン酸化 Akt の検出量は、5分で最大に達した後、徐々に低下したが、添加から 60 分間を通して、vehicle 添加による検出量より有意に多かった (Fig. 2-9B)。抗インスリン IgG の第1分画の脂肪細胞への単独添加によるリン酸化 Akt の検出量は、15分 ($p<0.05$) と 30分 ($p<0.01$) において、vehicle 添加による検出量よりそれぞれ多かった (Fig. 2-9C)。また、第2分画の脂肪細胞への単独添加によるリン酸化 Akt の検出量は、5分 ($p<0.05$) と 15分 ($p<0.01$) において、vehicle 添加による検出量よりそれぞれ多かった (Fig. 2-9D)。いっぽう、脂肪細胞へのインスリン添加によるリン酸化 Akt の検出量は、第1分画をともに添加すると、1分後の検出量はインスリン単独添加よりも有意に少なかった ($p<0.01$) が、その後増加し、5分後に最大に達した (Fig. 2-10B)。しかし、脂肪細胞へのインスリン単独添加による検出量が減少し始めた15分以降、インスリンと第1分画の添加によるリン酸化 Akt の検出量は添加から30分後までインスリン単独添加より有意に多かった ($p<0.05$)。また、脂肪細胞にインスリンと第2分画をともに添加すると、リン酸化 Akt の検出量は60分間を通して、インスリン単独添加と同様に变化した (Fig. 2-10C)。

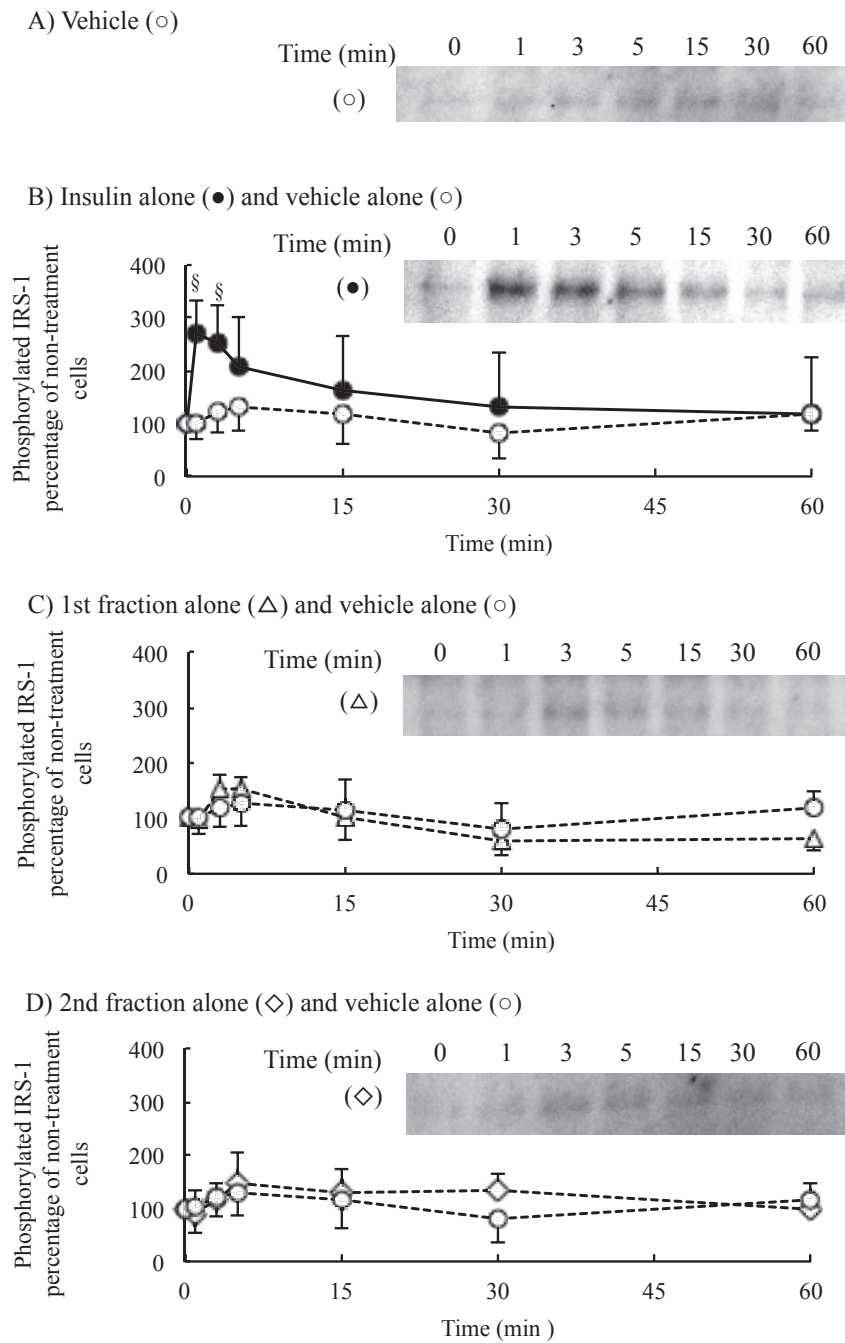


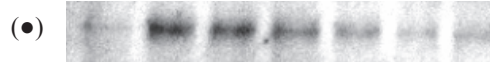
Fig. 2-7. Mean (\pm SD) percent changes and representative western blots of phosphorylated IRS-1 in feline adipocytes. Results ($n=3$) describe time 0 as 100%.

§ denote significant differences from vehicle at $p<0.05$.

- A) Vehicle alone (○).
- B) Insulin 10^{-7} M alone (●) and vehicle alone (○).
- C) 1st fraction 10^{-10} M alone (△) and vehicle alone (○).
- D) 2nd fraction 10^{-10} M alone (◇) and vehicle alone (○).

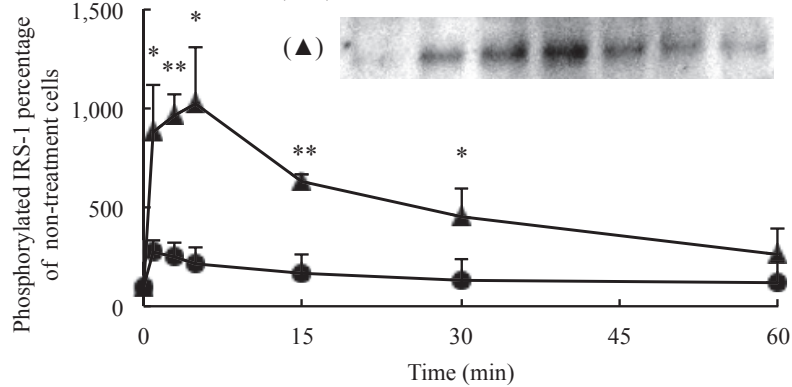
A) Insulin (●)

Time (min) 0 1 3 5 15 30 60



B) 1st fraction + insulin (▲) and insulin (●)

Time (min) 0 1 3 5 15 30 60



C) 2nd fraction + insulin (◆) and insulin (●)

Time (min) 0 1 3 5 15 30 60

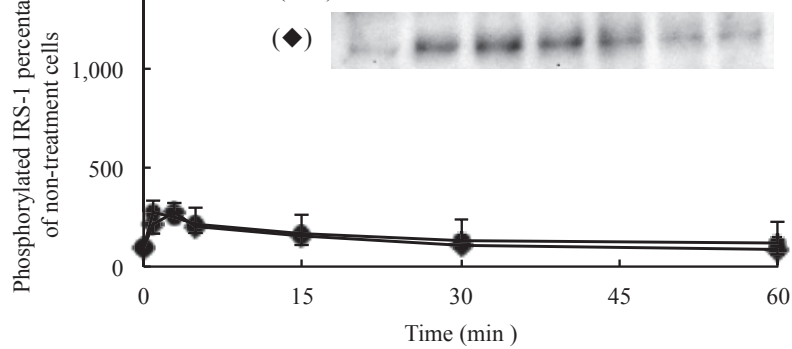


Fig. 2-8. Mean (\pm SD) percent changes and representative western blots of phosphorylated IRS-1 in feline adipocytes. Results ($n=3$) describe time 0 as 100%.

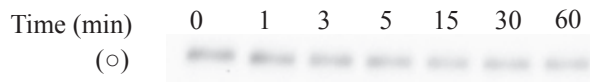
* and ** denote significant differences from insulin alone at $p<0.05$ and $p<0.01$ respectively.

A) Insulin 10^{-7} M alone (●).

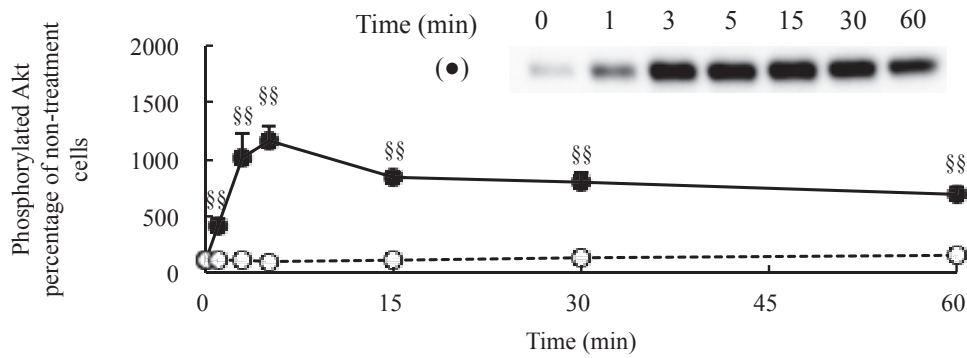
B) 1st fraction 10^{-10} M + insulin 10^{-7} M (▲) and insulin 10^{-7} M alone (●).

C) 2nd fraction 10^{-10} M + insulin 10^{-7} M (◆) and insulin 10^{-7} M alone (●).

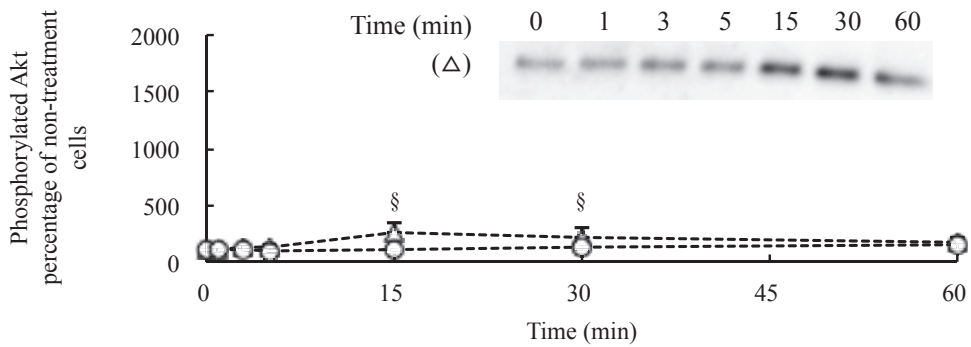
A) Vehicle (○)



B) Insulin alone (●) and vehicle alone (○)



C) 1st fraction alone (△) and vehicle alone (○)



D) 2nd fraction alone (◇) and vehicle alone (○)

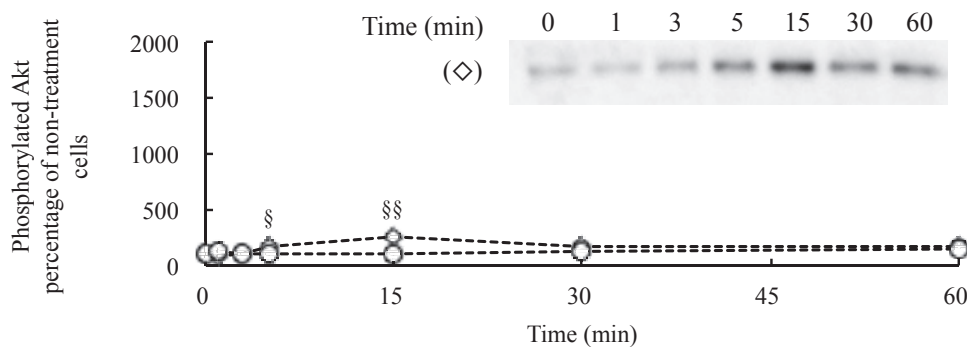


Fig. 2-9. Mean (\pm SD) percent changes and representative western blots of phosphorylated Akt in feline adipocytes. Results ($n=3$) describe time 0 as 100%.

§ and §§ denote significant differences from vehicle at $p<0.05$ and $p<0.01$ respectively.

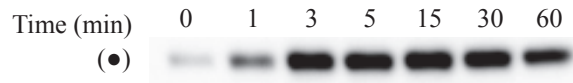
A) Vehicle alone (○).

B) Insulin 10^{-7} M alone (●) and vehicle alone (○).

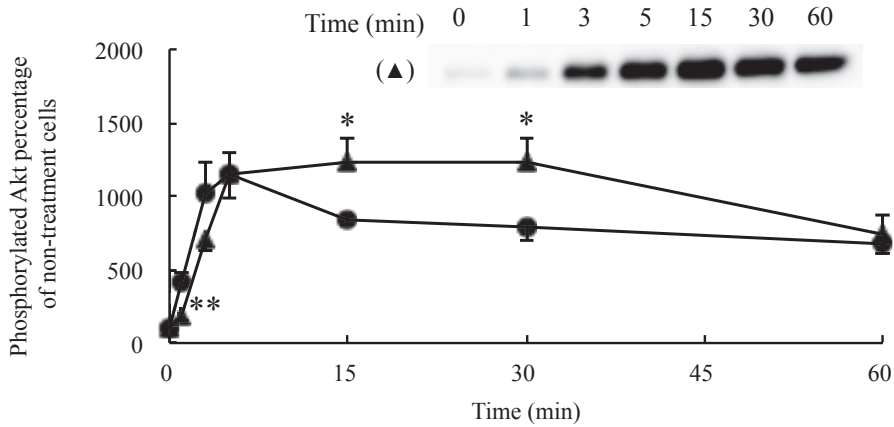
C) 1st fraction 10^{-10} M alone (△) and vehicle alone (○).

D) 2nd fraction 10^{-10} M alone (◇) and vehicle alone (○).

A) Insulin alone (●)



B) 1st fraction group + insulin (▲) and insulin alone (●)



C) 2nd fraction + insulin (◆) and insulin alone (●)

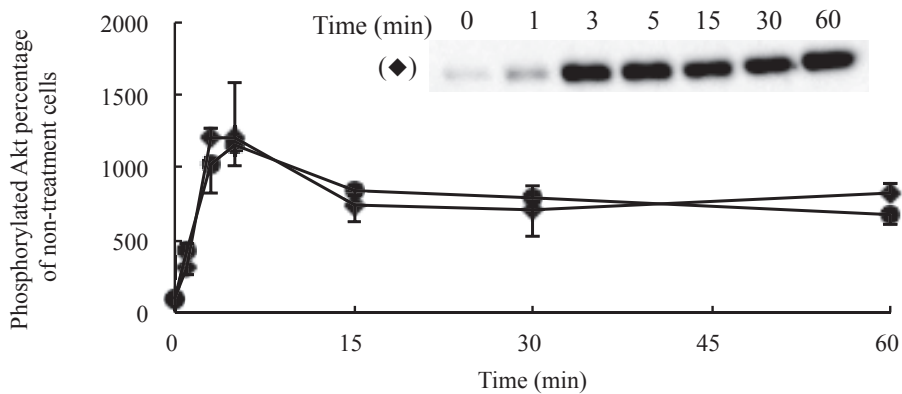


Fig. 2-10. Mean (\pm SD) percent changes and representative western blots of phosphorylated Akt in feline adipocytes. Results ($n=3$) describe time 0 as 100%.

* and ** denote significant differences from insulin alone at $p<0.05$ and $p<0.01$ respectively.

A) Insulin 10^{-7} M alone (●).

B) 1st fraction 10^{-10} M + insulin 10^{-7} M (▲) and insulin 10^{-7} M alone (●).

C) 2nd fraction 10^{-10} M + insulin 10^{-7} M (◆) and insulin 10^{-7} M alone (●).

考 察

第2章では、健康なネコの血清からアフィニティクロマトグラフィーと HPLC によりインスリンに対する結合親和性 (K_D 値) の低い第1分画と、高い第2分画に分離した抗インスリン IgG を用いて、ネコの抗インスリン自然自己抗体の存在がインスリンの作用に与える効果を検討した。抗インスリン IgG の第1分画は、インスリンとともにネコ成熟脂肪細胞に添加すると、インスリン単独で添加した時より細胞への糖取り込み量が増加し、またそれに関わる RTK シグナルであるリン酸化 IRS-1 とリン酸化 Akt の検出量も増加した。抗インスリン IgG の第1分画の存在により細胞内への糖の取り込み能が増強した理由は、インスリンの受容体結合後における RTK シグナル活性化の増強にともなった原形質膜表面への GLUT4 translocation 促進の結果[14, 20]であると推察された。いっぽうで、抗インスリン IgG の第2分画は、インスリンとともに細胞に添加しても、インスリン単独で添加したときと同等の細胞内への糖取り込みと RTK シグナル活性化を示した。ネコの抗インスリン自然自己抗体にインスリンの作用を増強する分画と、増強しない分画があることが明らかとなった。

ネコの抗インスリン自然自己抗体とインスリンの形成する抗原抗体複合体がどのような仕組みでインスリンの作用に効果を及ぼすのかは不明である。Nishii らによるネコの抗インスリン IgG に関する研究[36]において、健康なネコの血清から分離された抗インスリン IgG が多クローン性および多反応性であった結果を考慮すると、ネコの抗インスリン IgG は、インスリン分子上に複数存在する抗原部位に同時に結合することで多分子複合体を形成する可能性がある (Fig. 2-11)。マウスの肝膜や線維芽細胞を用いた研究[18, 46]において、ブタインスリンを抗原としてモルモットに産生させた抗インスリン抗体 (自然自己抗体ではない) が、その存在下においてインスリンの作用と受容体結合能を増強することが報告されている。この効果は、インスリンと抗インスリン抗体の形成する多分子複合体の誘導する受容体凝集に起因すると推定されている。また 3T3 線維芽細胞を用いた研究[46]において、EGF に親和性を示す抗 EGF 抗体が EGF と複合体を形成することで、EGF の効果を増強することが報告されている。第2章におけるネコの抗インスリン IgG の第1分画によるインスリンの作用増強効果には、IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関与し、インスリン受容体凝集の誘導などを通して、RTK シグナルの活性化を

強め、細胞内への糖取り込み能を増強した可能性がある。

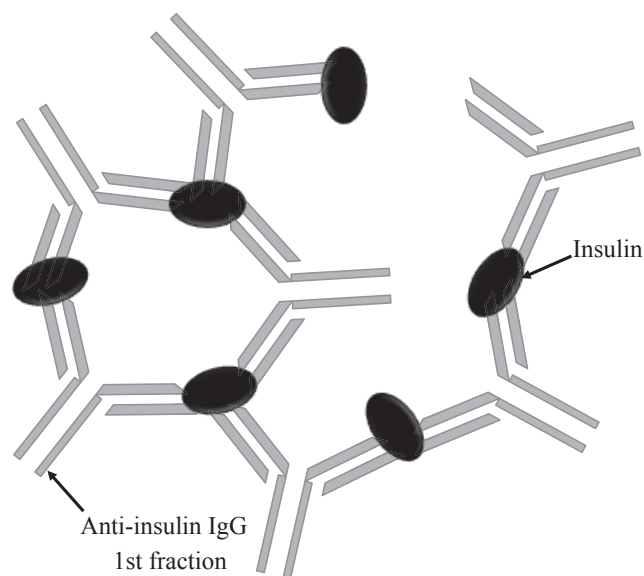


Fig. 2-11. The presumed multivalent complex formed of insulin and 1st fraction of anti-insulin IgG. Anti-insulin IgGs are bound with insulin as polyvalent antigen by binding to multiple antigenic sites at a time.

ネコの抗インスリン IgG の第 1 分画と第 2 分画におけるインスリンの作用に与える効果の違いは、それぞれの分画を構成する IgG がインスリンと形成する抗原抗体複合体の構造的特徴に起因する可能性がある。一般的な抗原抗体複合体の構造決定には、抗原の抗体結合エピトープの位置や分布密度、結合親和性、抗体の可動範囲 (segmental flexibility) や結合力 (avidity) などが関係すると考えられている[38]。このうち、ネコの血清から分離した抗インスリン IgG の第 1 分画と第 2 分画において情報があるのはインスリンに対する結合親和性のみであった。インスリンと抗インスリン抗体の結合が解離することによる低血糖発作を経験した糖尿病患者において、表面プラズモン共鳴技術により測定した抗インスリン抗体とインスリンの K_D 値は $5.44 \pm 10.3 \times 10^{-5}$ (平均値 \pm 標準偏差) M であり、低親和性に分類された[26]。ネコの抗インスリン IgG の第 1 分画と第 2 分画とインスリンの K_D 値は、それぞれ 1.61×10^{-4} M, 2.00×10^{-5} M であり、ともに低親和性に分類できたが、インスリンの作用増強効果の認められた第 1 分画の親和性は、第 2 分画より低かった。インスリンに対する結合親和性以外の抗原抗体間の分子間相互作用

の違いが、インスリンと形成する抗原抗体複合体の構造決定に関与している可能性もある。また、第 2 章では、抗インスリン IgG の第 1 分画と第 2 分画がインスリンの作用に与える効果を別々に評価したが、第 1 分画と第 2 分画が混在する場合には、混在しない場合とインスリンと形成する複合体の構造が異なり、さらにはインスリンの作用に与える効果が異なる可能性が考えられる。この情報は、ネコの血中における抗インスリン自然自己抗体がインスリンの作用に与える効果を考える上で必要となるため、さらに検討する必要がある。

異種動物由来のインスリン投与に反応して産生された抗インスリン抗体については、投与インスリンの受容体結合の阻害[6, 7, 13]、あるいは受容体結合と RTK シグナル活性化の増強[18, 21, 46]といった、インスリン作用の減弱と増強の両方の効果が報告されている。しかし、ネコの抗インスリン自然自己抗体は、異種動物由来インスリン投与に反応して産生された抗体とは、成り立ちが本質的に異なるため、インスリンの作用に与える効果も異なる可能性がある。自然抗体は、動物の正常な生命活動の維持を担うと考えられている[30]ため、ネコの抗インスリン自然自己抗体がネコの生命維持に有用な効果を持つ可能性がある。第 2 章において認められたネコの抗インスリン IgG の第 1 分画によるインスリンの作用増強効果は、抗インスリン自然自己抗体がインスリンの作用に与える効果の一つであるが、生体内においてこの分画がどのように有用に機能しているか検討する必要がある。ネコが真性肉食動物であることを考慮すると、抗インスリン自然自己抗体がアミノ酸と脂質を中心としたネコ科動物特有の栄養代謝[5]に関わる役割を持つ可能性が推定される。

ネコ成熟脂肪細胞に添加したインスリン濃度は、予備試験において無処理の細胞の約 2.5 倍量の [³H]-2-DOG 取り込みを刺激した 10^{-7} M を採用した。インスリン刺激による細胞への糖取り込み能を明瞭に評価できる濃度として 10^{-7} M を採用したが、第 1 章において血漿中の抗インスリン IgG のモル濃度がインスリンよりも著しく高かったことを考慮すると、抗インスリン IgG 分画の最大濃度 10^{-10} M は、インスリンとの混合割合として生理的な条件から解離していた可能性がある。また、抗原抗体反応において、抗原の割合が抗体に比して著しく高いと複合体の形成が阻害されることがある[1]。次の検討課題として、インスリンと IgG の生体内における存在比を反映した混合条件による実験が必要である。

RTK シグナルタンパク質の検出において、第 1 分画および第 2 分画の単独添加によりリン酸化 Akt の検出量がわずかに増加したが、リン酸化 IRS-1 の検出量は全く変化せず、細胞内への糖の取り込みも増加しなかった。検討された濃度の抗インスリン IgG 分画の単独添加は、細胞における Akt を直接活性化できる可能性はあるが、Akt 活性化の程度は弱く、GLUT4 の translocation を介して細胞内への糖取り込みを促すことができない、生理学的には意味を持たないリン酸化 Akt の発現量増加と考えられた。

小 括

第2章では、健康なネコの血清からアフィニティークロマトグラフィーと HPLC により得られたインスリンに対する親和性の異なる 2 種類の抗インスリン IgG 分画の存在が、インスリンの作用に与える効果についてネコ成熟脂肪細胞を用いて検討した。インスリンに対する親和性の低い抗インスリン IgG の第 1 分画は、細胞へのインスリン添加に誘導される RTK シグナルの活性化を増強することにより糖取り込み能を増強したが、親和性の高い第 2 分画は同様の効果を示さなかった。健康なネコが血清中に保有する抗インスリン自然自己抗体には、インスリンの作用を増強する効果のある分画と、増強する効果のない分画があることが明らかとなった。ネコの抗インスリン IgG は多クローン性および多反応性であることから、抗インスリン IgG と複数の結合部位を有するインスリンは分子上の抗原部位に抗インスリン IgG を同時に結合して、多分子複合体を形成すると推定される。ネコの抗インスリン IgG の第 1 分画と第 2 分画において、インスリンの作用に与える効果が異なった理由として、IgG とインスリンにより形成される多分子複合体の構造的特徴の違いが関係している可能性が考えられた。

第3章

ネコの抗インスリン IgG とインスリンによる複合体形成がインスリンの作用増強効果に及ぼす影響

緒言

第2章では、ネコの抗インスリン自然自己抗体の生理的役割を解明するために、健康なネコの血清からアフィニティクロマトグラフィーと HPLC により分画したインスリンに親和性を示す IgG を用いて、抗インスリン IgG がインスリンの作用に与える効果を検討した。分画した2種類の抗インスリン IgG のうち、インスリンに対する親和性の低い第1分画は、インスリンの作用を増強する効果を示した。ネコの抗インスリン IgG の第1分画が、どのようにしてインスリンの受容体結合以降のシグナル伝達を活性化したのか、その機序については不明である。

ネコの抗インスリン IgG は多クローン性および多反応性である[36]ことから、インスリンと多分子複合体を形成すると考えられる (Fig. 2-11)。抗体が抗原との複合体形成により抗原の作用を増強する効果については、抗 EGF 抗体[46]や抗コンカナバリン A 抗体[48]、また異種動物由来インスリン投与に反応して産生される抗インスリン抗体[18, 46]において報告されている。抗インスリン IgG の第1分画においても、インスリンの作用増強効果に、IgG とインスリンにより形成される多分子複合体が関係している可能性がある。

第3章では、第2章において認められた抗インスリン IgG の第1分画によるインスリンの作用増強効果に、IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係するかどうかを検討した。IgG は、パパイン処理によりヒンジ部 N 末端側が切断され、1分子当たり2つの Fab フラグメントと1つの Fc フラグメントに分離する。Fab フラグメント化した IgG は、抗原を架橋した多分子複合体を形成することができなくなる。ネコ成熟脂肪細胞と Fab フラグメント化した抗インスリン IgG の第1分画を用いて、インスリン作用が増強するかどうかを検討した。

材料および方法

1. 抗インスリン IgG の第 1 分画の Fab フラグメント化

第 2 章において、健康なネコの血清からアフィニティクロマトグラフィーと HPLC によって分画した抗インスリン IgG の第 1 分画を使用した。実験には無処置の第 1 分画とパパイン処理により Fab フラグメント化した第 1 分画を用いた。パパイン処理は、Pierce Fab Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) を用いて仕様書に従って実施し、1 分子当たり 2 つの Fab フラグメントと 1 つの Fc フラグメントに分離した (Fig. 3-1)。分離した Fab および Fc フラグメント分子の存在を確認するために、無処置の第 1 分画とパパイン処理後の第 1 分画の Fab フラグメント分画および Fc フラグメント分画を 15% SDS アクリルアミドゲル (SuperSep™ Ace; 和光純薬) による電気泳動と CBB 染色に供した。

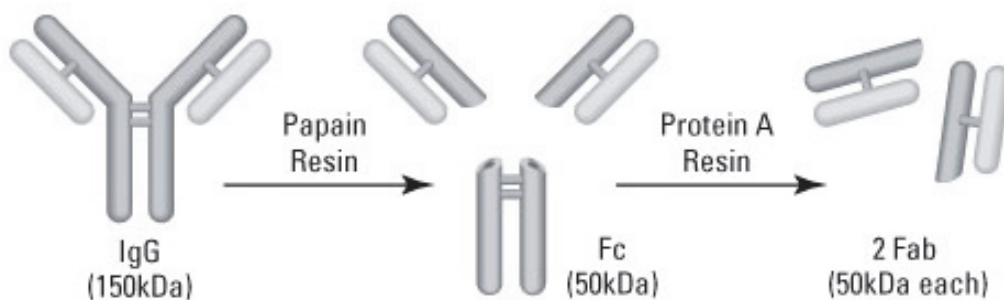


Fig. 3-1. Schematic for preparation and purifying Fab using papain and protein A. The Fab generation of anti-insulin IgG by Pierce Fab Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific). Digestion by papain produces 50 kDa Fab and Fc fragments.

2. 脂肪細胞の培養と分化

ネコ由来の脂肪前駆細胞 (Primary Normal Feline Preadipocytes, Zen-Bio, Research Triangle, NC, USA) は、市販の発育、分化、維持培地 (Zen-Bio) を使って成熟培養した。すべての培養工程は、5% CO₂, 37°C の条件下で行った。成熟脂肪細胞は、実験前に血清とインスリンの影響を除去するために、4 時間、血清とインスリンを含まない維持培地で飢餓培養した。

3. 2-Deoxy-D-glucose uptake assay

ネコ成熟脂肪細胞への糖取り込み能の評価は、第 2 章と同様の方法で実施した。飢餓培養した脂肪細胞に、HSBS で総量 100 μ l に調整した以下の 7 種類の溶液を以下の濃度で添加し、さらに 30 分間培養した; 1) 無処理, 2) 前培養に使用した HSBS (vehicle), 3) インスリン 10^{-7} M の単独, 4) 無処置の第 1 分画 10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-10} M 単独, 5) インスリン 10^{-7} M と無処置の第 1 分画 10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-10} M の混合, 6) Fab フラグメント化した第 1 分画 10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-10} M 単独, 7) インスリン 10^{-7} M と Fab フラグメント化した第 1 分画 10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-10} M の混合。

4. 脂肪細胞におけるリン酸化チロシンタンパク質 (Akt) の検出

Fab フラグメント化した抗インスリン IgG の第 1 分画の存在が、ネコ成熟脂肪細胞へのインスリン添加による RTK シグナル活性化に与える効果を評価するために、第 2 章と同様の方法で細胞のリン酸化 Akt の経時的な検出量の変化を調べた。飢餓培養した脂肪細胞に、飢餓培養に用いた血清とインスリンを含まない維持培地で総量 100 μ l に調整した以下の 6 種類の溶液を添加し、さらに 0 分, 1 分, 3 分, 5 分, 15 分, 30 分, 60 分間培養した; 1) 飢餓培養に使用した維持培地 (vehicle), 2) インスリン 10^{-7} M 単独, 3) 無処置の第 1 分画 10^{-10} M 単独, 4) インスリン 10^{-7} M と無処置の第 1 分画 10^{-10} M の混合, 5) Fab フラグメント化した第 1 分画 10^{-10} M 単独, 6) インスリン 10^{-7} M と Fab フラグメント化した第 1 分画 10^{-10} M の混合。

5. 統計分析

ネコ脂肪細胞へのインスリン、無処置の第 1 分画および Fab フラグメント化した第 1 分画の単独添加による細胞への ^3H -2-DOG 取り込み量は、各実験群のデータの等分散性を Bartlett 検定により確認した後に、vehicle 添加による取り込み量との差を一元配置分散分析と Dunnett 法により比較した。また、無処置の第 1 分画または Fab フラグメント化した第 1 分画の存在によるインスリン添加後の細胞の ^3H -2-DOG 取り込み量は、各実験群のデータの等分散性を Bartlett 検定により確認した後に、インス

リン単独添加による取り込み量との差を一元配置分散分析と Dunnett 法により比較した。さらに、検討した無処置の第 1 分画および Fab フラグメント化した第 1 分画において添加濃度 (10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-10} M) 間の ^{3}H -2-DOG 取り込み量の差は、一元配置分散分析と Tukey-Kramer 法によりそれぞれ比較した。細胞への無処置の第 1 分画および Fab フラグメント化した第 1 分画のネコ脂肪細胞への単独添加によるリン酸化 Akt の検出量は、添加後の経過時間 (分) 毎にデータを F 検定により等分散性を確認した後に、vehicle 単独添加による検出量との差を Student の t -検定により比較した。また、無処置の第 1 分画または Fab フラグメント化した第 1 分画の存在によるインスリン添加後の細胞におけるリン酸化 Akt の検出量は、添加後の経過時間毎に F 検定によりデータの等分散性を確認した後に、インスリン単独添加による検出量との差を Student の t -検定により比較した。 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

結果

1. ネコ抗インスリン IgG の第 1 分画の Fab フラグメント化

Figure 3-2 は、抗インスリン IgG の無処置の第 1 分画およびパパイン処理により Fab フラグメントと Fc フラグメントに分離した第 1 分画の SDS-PAGE および CBB 染色の結果を示す (Fig. 3-2)。無処置の第 1 分画の結果は、IgG の H 鎖を示す 50 kDa 付近と L 鎖の 25 kDa 付近に二相性のバンドを認めた。パパイン処理した抗インスリン IgG の第 1 分画において、Fab フラグメント分画の結果は Fab フラグメントと L 鎖を示す 25 kDa 付近の一相性のバンドを認めた。また、Fc フラグメント分画の結果は Fc フラグメントを示す 28-30 kDa 付近の一相性のバンドを認めた。パパイン処理により、抗インスリン IgG の第 1 分画を Fab フラグメントと Fc フラグメントに分離したことが確認できた。

2. ネコ抗インスリン IgG の第 1 分画の Fab フラグメントがインスリン添加によるネコ脂肪細胞への

[1,2-³H]-2-Deoxy-D-glucose 取り込みに与える効果

Vehicle として用いた HSBS の添加によるネコ脂肪細胞における [³H]-2-DOG の取り込み量は、無処置の細胞における取り込み量 (100%) とほぼ同等 (96.4±3.4%) であり、vehicle 添加による取り込み量増加はなかった。インスリン 10⁻⁷ M の単独添加による細胞への [³H]-2-DOG の取り込み量は、vehicle 添加による取り込み量に比べて著しく増加した ($p<0.01$, Fig. 3-3A)。いっぽう、抗インスリン IgG の無処置の第 1 分画および Fab フラグメント化した第 1 分画の単独添加による細胞への [³H]-2-DOG の取り込み量は、検討した濃度 (10⁻¹² M, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M) において vehicle 添加による取り込み量と同等で、糖取り込み量を増加させなかった (Fig. 3-3A)。インスリン添加による細胞への [³H]-2-DOG の取り込み量は、無処置の第 1 分画をともに添加することで著しく増加した ($p<0.01$) が、増加量は用量依存性ではなかった (Fig. 3-3B)。しかし、インスリン添加による細胞への [³H]-2-DOG の取り込み量は、Fab フラグメント化した第 1 分画をともに添加しても、検討したすべての濃度で、インスリン単独添加による取り込み量と同等であった (Fig. 3-3B)。

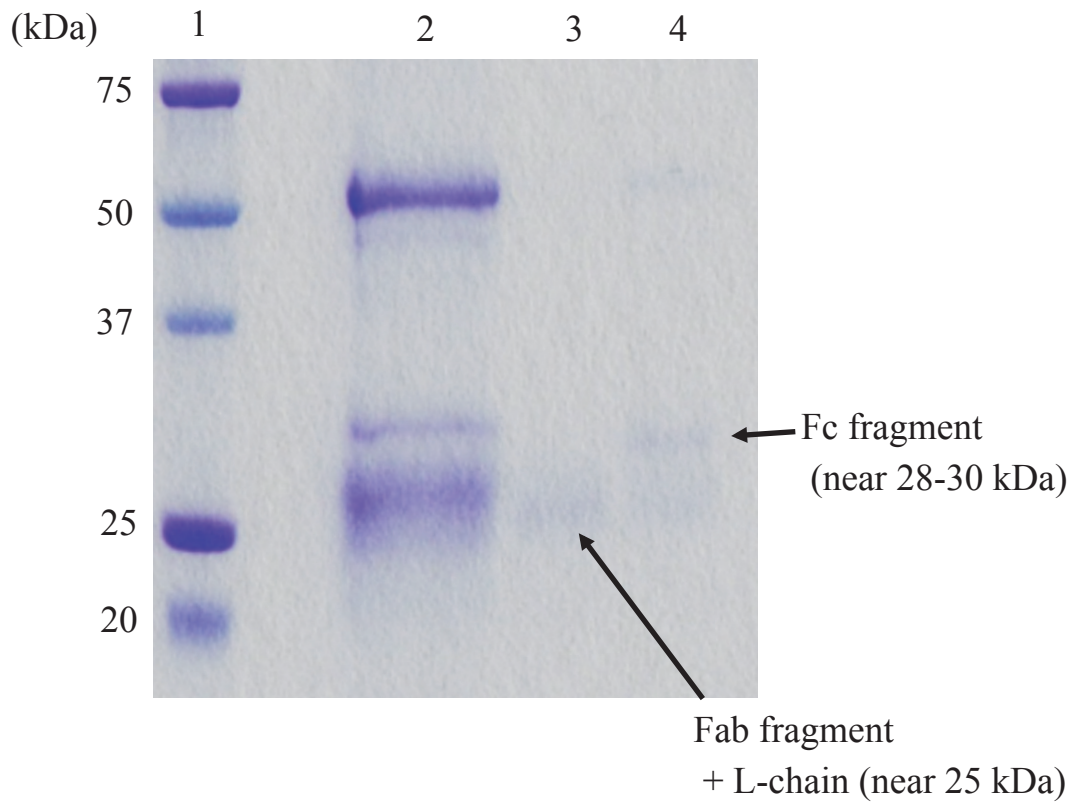


Fig. 3-2. SDS-PAGE results of reduced intact and papain-treated 1st fraction of anti-insulin IgG. Fab fragments migrated near 25 kDa and Fc fragments migrate at 28-30 kDa.

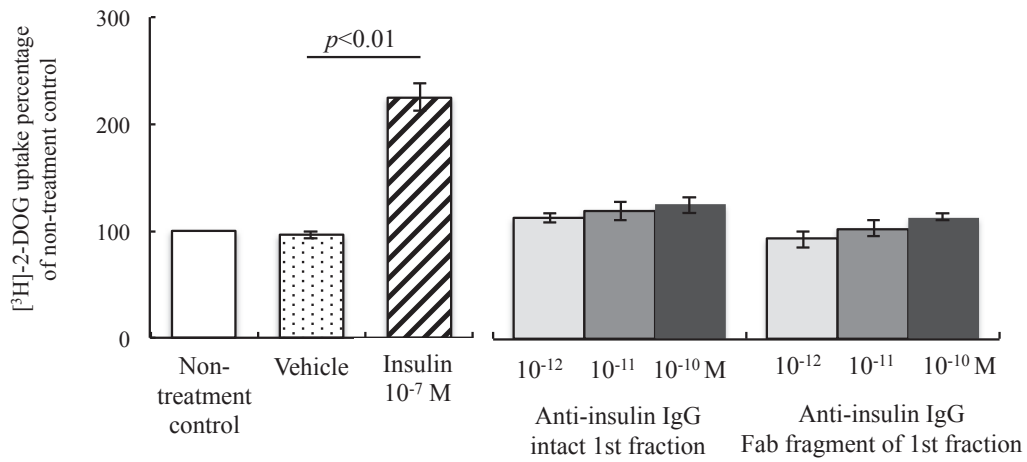
Lane 1: Molecular weight marker.

Lane 2: Intact 1st fraction.

Lane 3: Fab fragment + L-chain (papain-treated 1st fraction).

Lane 4: Fc fragment (papain-treated 1st fraction).

A) Insulin alone and intact or Fab fragmentary 1st fraction of anti-insulin IgG alone



B) Insulin with or without intact or Fab fragmentary 1st fraction of anti-insulin IgG

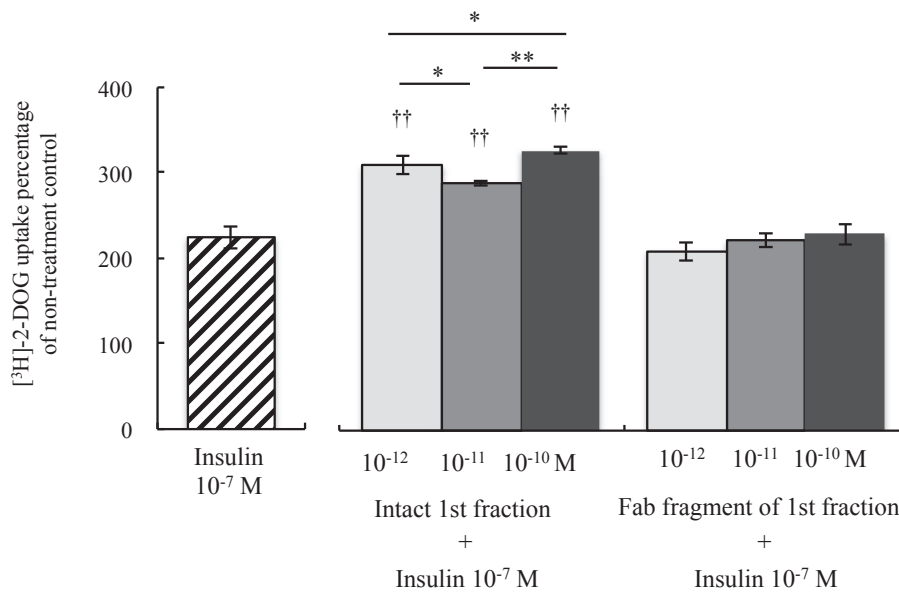


Fig. 3-3. Mean (+SD) percentages of [1,2-³H]-2-Deoxy-D-glucose ([³H]-2-DOG) uptake in feline adipocytes. Results (n=3) describe non-treatment control as 100%.

†† denote significant differences from insulin alone at $p < 0.01$.

* and ** denote significant differences from other concentration at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively.

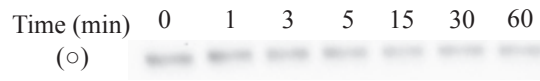
A) Insulin alone and intact or Fab fragmentary 1st fraction of anti-insulin IgG alone.

B) Insulin with or without intact or Fab fragmentary 1st fraction of anti-insulin IgG.

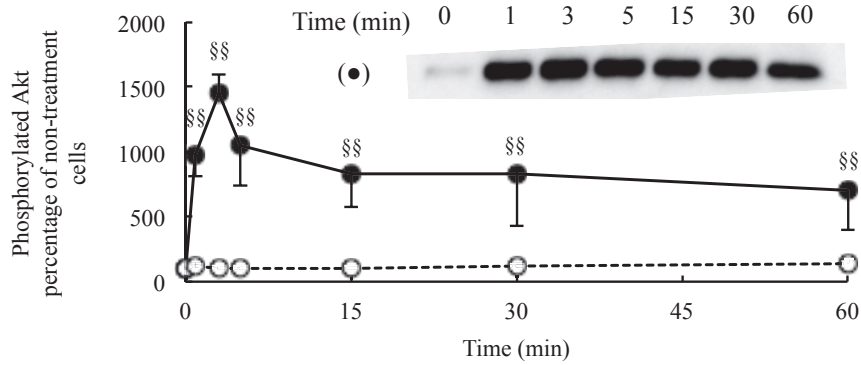
3. ネコ抗インスリンIgGの第1分画のFabフラグメントがインスリン添加によるネコ脂肪細胞のRTKシグナル活性化に与える効果

Vehicleとして用いたHSBSの添加によるネコ脂肪細胞のリン酸化Aktの検出量は、60分間変化しなかった (Fig. 3-4A)。インスリンの単独添加によるリン酸化Aktの検出量は、1分で増加し、3分で最大に達した後、徐々に低下したが、60分間を通して vehicle 添加による検出量よりも有意に多かった (Fig. 3-4B)。無処置の第1分画の単独添加によるリン酸化Aktの検出量は、15分 ($p<0.05$) と30分 ($p<0.01$) において、vehicle 添加による15分と30分の検出量よりそれぞれ多かった (Fig. 3-4C)。Fabフラグメント化した第1分画の単独添加によるリン酸化Aktの検出量は、vehicle 添加による検出量と同等であった (Fig. 3-4D)。いっぽう、インスリン添加によるリン酸化Aktの検出量は、無処置の第1分画とともに添加すると、インスリン単独添加による検出量よりも、1分 ($p<0.01$) と3分 ($p<0.01$) で有意に少なかったが、5分で同等のレベルに増加した (Fig. 3-5B)。しかし、インスリン単独添加による検出量が減少し始めた15分以降も、インスリンと無処置の第1分画の添加によるリン酸化Aktの検出量は、増加した状態を保ち ($p<0.05$)、30分で同等のレベルとなった。Fabフラグメント化した第1分画をインスリンとともに添加すると、リン酸化Aktの検出量は、60分間を通して、インスリン単独添加による検出量と同様の変化を示した (Fig. 3-5C)。

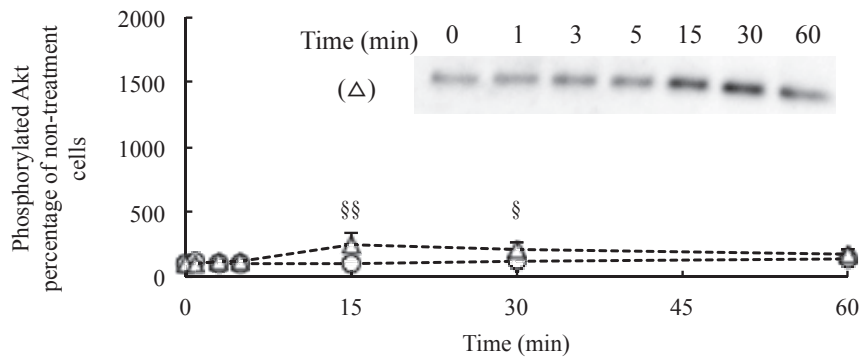
A) Vehicle (○)



B) Insulin alone (●) and vehicle alone (○)



C) Intact 1st fraction alone (△) and vehicle alone (○)



D) Fab fragmentary 1st fraction alone (□) and vehicle alone (○)

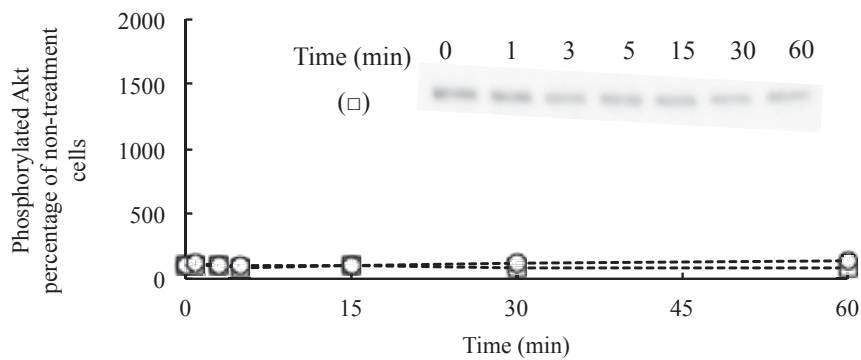


Fig. 3-4. Mean (\pm SD) percent changes and representative western blots of phosphorylated Akt in adipocytes derived from cats. Results ($n=3$) describe time 0 as 100%.

§ and §§ denote significant differences from vehicle at $p<0,05$, $p<0.01$ respectively.

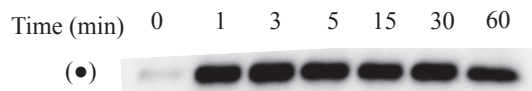
A) Vehicle alone (○).

B) Insulin 10^{-7} M alone (●) and vehicle alone (○).

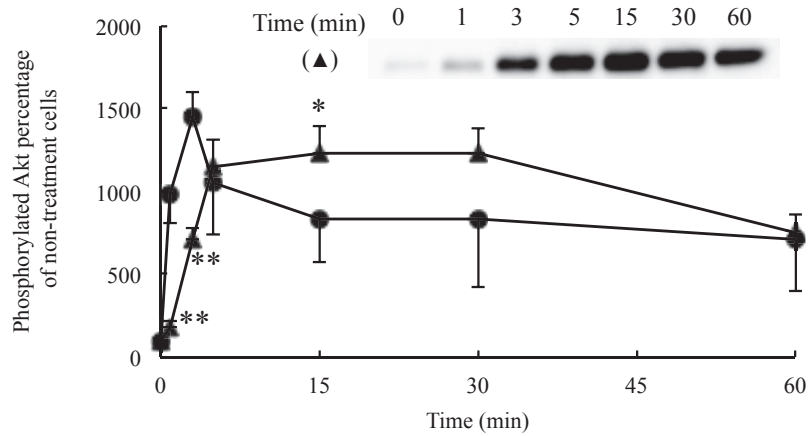
C) Intact 1st fraction 10^{-10} M alone (△) and vehicle alone (○).

D) Fab fragmentary 1st fraction 10^{-10} M alone (□) and vehicle alone (○).

A) Insulin alone (●)



B) Intact 1st fraction + insulin (▲) and insulin alone (●)



C) Fab fragment of 1st fraction + insulin (■) and insulin alone (●)

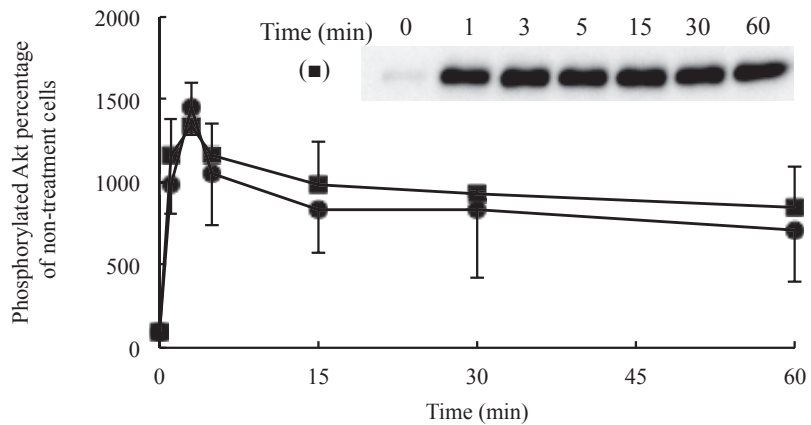


Fig. 3-5. Mean (\pm SD) percent changes and representative western blots of phosphorylated Akt in adipocytes derived from cats. Results ($n=3$) describe time 0 as 100%.

* and ** denote significant differences from vehicle at $p<0,05$, $p<0.01$ respectively.

A) Insulin 10^{-7} M alone (●).

B) Intact 1st fraction 10^{-10} M + insulin (▲) and insulin 10^{-7} M alone (●).

C) Fab fragmentary 1st fraction 10^{-10} M + insulin (■) and insulin 10^{-7} M alone (●)

考 察

第3章では、第2章において認められた抗インスリン IgG の第1分画によるインスリンの作用増強効果に、IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係しているかどうかを検討した。Fab フラグメント化した抗インスリン IgG の第1分画は、インスリンを架橋した多分子複合体を形成できない。抗インスリン IgG の第1分画によるインスリンの作用増強効果に、IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関与しているのであれば、Fab フラグメント化した第1分画にはインスリンの作用増強効果がないことになる。第3章において、Fab フラグメント化した抗インスリン IgG の第1分画はインスリンの作用を増強しなかった (Fig. 3-6)。ネコの抗インスリン IgG の第1分画によるインスリンの作用増強効果には、第1分画を構成する IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関与する可能性が示された。

抗インスリン自然自己抗体ではないが、異種動物由来のインスリン投与に反応して産生された抗原特異性の高い抗インスリン抗体は、インスリンとの複合体形成によりインスリンの受容体結合と作用を増強することが報告されている[18, 46]。これらの報告では、予想される抗インスリン抗体のインスリン作用増強の原因として、抗体とインスリンの形成する複合体による細胞膜上におけるインスリン受容体凝集の誘導を挙げている。この仮説は、細胞膜上のペプチドホルモン受容体が生理的な温度下において可動性であり、ホルモン結合後にクラスター状およびパッチ状の形状をとって凝集することを示した報告[22]を根拠としている。インスリン受容体の凝集が必ず RTK シグナルの活性化を増強するかどうかは確かめられていない。しかし、ネコの抗インスリン IgG の第1分画がインスリンと形成する多分子複合体が、細胞膜上のインスリン受容体の凝集を誘導することが確認されれば、RTK シグナル活性化増強の有力な原因として挙げることができる。ネコの抗インスリン IgG とインスリンにより形成された多分子複合体の存在下において、ネコのインスリン標的細胞膜上のインスリン受容体凝集誘導の有無を可視的に観察する必要がある。

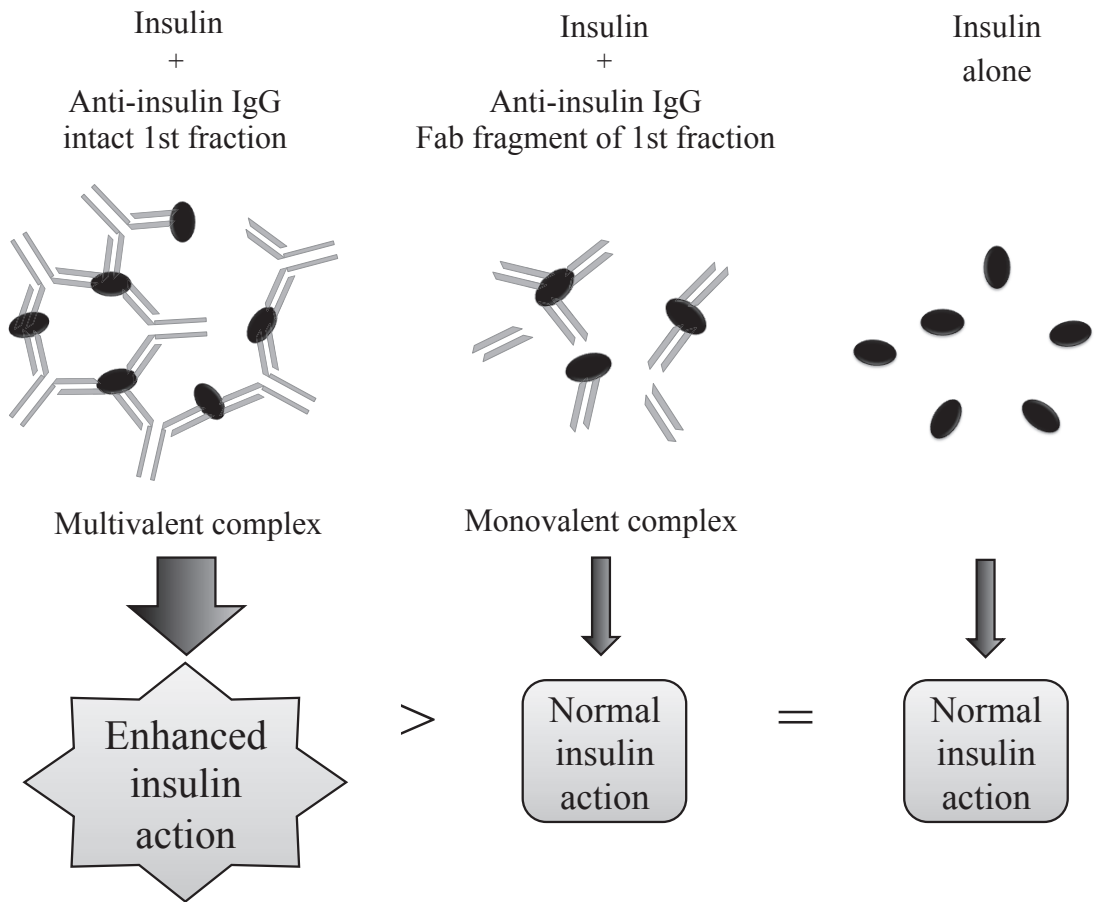


Fig. 3-6. Diagrammatic representation of insulin-induced reaction with or without intact 1st fraction or Fab fragment of 1st fraction of anti-insulin IgG in feline adipocytes. Intact 1st fraction enhanced insulin-induced reaction in feline adipocytes, but Fab fragment of 1st fraction did not enhance insulin-induced action.

小 括

第3章では、第2章において認められたネコの抗インスリン IgG の第1分画によるインスリンの作用増強効果に、第1分画を構成する IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係する可能性を示した。しかし、IgG とインスリンの形成する多分子複合体が、細胞膜上のインスリン受容体にどのような効果を及ぼすことで、受容体以下のシグナル伝達の活性化が高まるのか、その機序については不明である。

総括

ヒトの自然抗体が正常な生命活動の維持に機能していること[30]を考慮すると、ネコの抗インスリン自然自己抗体がインスリンに結合することでネコの生命活動に有用な役割を担う可能性を考えることができる。本研究は、ネコの抗インスリン自然自己抗体の生理的役割の解明を目的として実施した。

第1章からは、インスリン投与歴のない健康なネコがすべて血漿中に抗インスリン IgG を自然に保有していること、血漿濃度が 80 $\mu\text{g/ml}$ から 1578 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、中央値が 221 $\mu\text{g/ml}$ であることを示した。第2章では、健康なネコの血清からインスリンに対する結合親和性に基づいて分画した抗インスリン IgG において、親和性の低い分画はインスリンの作用を増強する効果を持つが、親和性の高い分画はインスリンの作用を増強する効果を持たないことを示した。第3章では、第2章において認められたネコの抗インスリン IgG のインスリンに対する結合親和性の低い分画によるインスリンの作用増強効果に、IgG とインスリンによる多分子複合体形成が関係する可能性を示した。健康なネコの血清から分画した抗インスリン IgG において、インスリンに対する結合親和性によりインスリンの作用に与える効果が異なった原因として考えられたのは、それぞれの IgG 分画がインスリンと形成する多分子複合体の構造的特徴の違いであった。ネコの抗インスリン IgG の一部の分画によるインスリンの作用増強効果は、インスリン受容体において受容体凝集のような RTK シグナルの活性化を増強することのできる多分子複合体をインスリンと形成することで成立すると推定された。

インスリンの作用を増強する抗インスリン IgG 分画が、細胞への栄養供給や血糖値の恒常性維持といったインスリンの役割にどのような生理的意義を持つのかは、今後解明していく必要のある課題である。第1章において、インスリン投与歴のない糖尿病ネコ3頭の血漿抗インスリン IgG 濃度が、健康なネコの測定濃度範囲のなかでも低値に近似した事実は、例数が少ないので不確定ではあるが、インスリンの正常な作用に抗インスリン自然自己抗体が必要である可能性を示している。ネコが他の動物と異なり、必須の栄養素として炭水化物ではなく、タンパク質と脂質を選択した真性肉食動物であることを考慮すると、ネコ科動物特有の栄養代謝機構を支えるために抗インスリン自然自己抗体が機能している可能性が推察される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導およびご高閲を賜りました岐阜大学獣医内科学研究室、北川均教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始ご指導を賜りました岐阜大学産業動物臨床研究室、大場恵典教授、比較生化学研究室、岩澤淳教授、獣医内科学研究室、西飯直仁准教授に、研究遂行にあたりご助力いただいた獣医内科学研究室ならびに産業動物臨床研究室の大学院生および学部学生の皆様に深謝いたします。最後になりましたが、学位論文を指導、審査していただきました岐阜大学、志水泰武教授、帯広畜産大学、猪熊壽教授、岩手大学、佐藤れえ子教授、東京農工大学、渡邊元教授に深謝いたします。

引用文献

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. 2007. Laboratory techniques commonly used in immunology. pp. 525-537. *In: Cellular and Molecular Immunology*, 6th ed. (Abbas, A. K. ed.), Saunders, Philadelphia.
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. 2007. Diseases caused by immune responses: Hypersensitivity and autoimmunity. pp. 419-440. *In: Cellular and Molecular Immunology*, 6th ed. (Abbas, A. K. ed.), Saunders, Philadelphia.
3. Adib, M., Ragimbeau, J., Avrameas, S. and Ternynck, T. 1990. IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM. *J Immunol* **145**: 3807-3813.
4. Archambeaud-Mouvier, F., Huc, M. C., Nadalon, S., Fournier, M. P. and Canivet, B. 1989. Autoimmune insulin syndrome. *Biomed Pharmacother* **43**: 581-586.
5. Armstrong, P. J., Gross, K. L., Becvarova, I. and Debraekeleer, J. 2010. Introduction to feeding normal cats. pp. 361-372. *In: Small animal clinical nutrition*, 5th ed. (Hand, M., S., Thatcher, C. D., Remillard, R. L., Roudebush, P. R. and Novotny, B. J. eds.), Mark Morris Institute, Topeka.
6. Berson, S. A., Yalow, R. S., Bauman, A., Rothschild, M. A. and Newerly, K. 1956. Insulin-¹³¹I metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J Clin Invest* **35**: 170-190.
7. Berson, S. A. and Yalow, R. S. 1959. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* **38**: 1996-2016.
8. Bolander, F. F. 2004. Molecular bases of endocrinopathies. pp. 513-556. *In: Molecular Endocrinology*. Elsevier, San Diego, California.
9. Burch, H. B., Clement, S., Sokol, M. S. and Landry, F. 1992. Reactive hypoglycemic coma due to insulin autoimmune syndrome: case report and literature review. *Am J Med* **92**:

- 681-685.
10. Campbell, D. J., Rawlings, J. M., Koelsch, S., Wallace, J., Strain, J. J. and Hannigan, B. M. 2004. Age-related differences in parameters of feline immune status. *Vet Immunol Immunopathol* **100**: 73-80.
 11. Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. and Avrameas, S. 1995. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* **7**: 812-818.
 12. Davison, L. J., Walding, B., Herrtage, M. E. and Catchpole, B. 2008. Anti-insulin antibodies in diabetic dogs before and after treatment with different insulin preparations. *J Vet Intern Med* **22**: 1317-1325.
 13. De Pirro, R., Fusco, A., Spallone, L., Magnatta, R. and Lauro, R. 1980. Insulin antibodies prevent insulin-receptor interactions. *Diabetologia* **19**: 118-122.
 14. Frevert, E. U. and Kahn, B. B. 1997. Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* **17**: 190-198.
 15. Galili, U., Clark, M. R. and Shohet, S. B. 1986. Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. *J Clin Invest* **77**: 27-33.
 16. Hallden, G., Gafvelin, G., Mutt, V. and Jornvall, H. 1986. Characterization of cat insulin. *Arch Biochem Biophys* **247**: 20-27.
 17. Hoenig, M., Reusch, C. and Peterson, M. E. 2000. Beta cell and insulin antibodies in treated and untreated diabetic cats. *Vet Immunol Immunopathol* **77**: 93-102.
 18. Kahn, C. R., Baird, K. L., Jarrett, D. B. and Flier, J. S. 1978. Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4209-4213.

19. Kaneko, J. J. 1997. Thyroid function. pp. 571-588. *In: Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th ed. (Kaneko, J. J., Harvey, J. W. and Bruss, M. L. eds.), Academic press, San Diego.
20. Katagiri, H., Asano, T., Ishihara, H., Inukai, K., Shibasaki, Y., Kikuchi, M., Yazaki, Y. and Oka, Y. 1996. Overexpression of catalytic subunit p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase increases glucose transport activity with translocation of glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **271**: 16987-16990.
21. Keilacker, H., Knosp, S., Ziegler, M. and Whittaker, J. 1985. Effect of antibody-mediated crosslinking of insulin on its bioactivity and receptor binding. *Exp Clin Endocrinol* **85**: 38-46.
22. King, A. C. and Cuatrecasas, P. 1981. Peptide hormone-induced receptor mobility, aggregation, and internalization. *N Engl J Med* **305**: 77-88.
23. Kiss, K., Uher, F. and Gergely, J. 1994. A natural IgM antibody does inhibit polyclonal and antigen-specific IgM but not IgG B-cell responses. *Immunol Lett* **39**: 235-241.
24. Kitamura, T., Yasuda, J. and Hashimoto, A. 1999. Acute insulin response to intravenous arginine in nonobese healthy cats. *J Vet Intern Med* **13**: 549-556.
25. Klip, A., Li, G. and Logan, W. J. 1984. Induction of sugar uptake response to insulin by serum depletion in fusing L6 myoblasts. *Am J Physiol* **247**: E291-296.
26. Kure, M., Katsura, Y., Kosano, H., Noritake, M., Watanabe, T., Iwaki, Y., Nishigori, H. and Matsuoka, T. 2005. A trial to assess the amount of insulin antibodies in diabetic patients by surface plasmon resonance. *Intern Med* **44**: 100-106.
27. Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V., Mouthon, L., Ayoub, A., Malanchere, E., Coutinho, A. and Kazatchkine, M. D. 1998. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Meth* **216**: 117-137.

28. Lerner, R. L. and Porte, D., Jr. 1971. Relationship between intravenous glucose loads, insulin responses and glucose disappearance rate. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 409-417.
29. Ling, G. V., Lowenstine, L. J., Pulley, L. T. and Kaneko, J. J. 1977. Diabetes mellitus in dogs: a review of initial evaluation, immediate and long-term management, and outcome. *J Am Vet Med Assoc* **170**: 521-530.
30. Lutz, H. U. and Miescher, S. 2008. Natural antibodies in health and disease: an overview of the first international workshop on natural antibodies in health and disease. *Autoimmun Rev* **7**: 405-409.
31. Mouthon, L., Nobrega, A., Nicolas, N., Kaveri, S. V., Barreau, C., Coutinho, A. and Kazatchkine, M. D. 1995. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3839-3843.
32. Mouthon, L., Lacroix-Desmazes, S., Nobrega, A., Barreau, C., Coutinho, A. and Kazatchkine, M. D. 1996. The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scand J Immunol* **44**: 243-251.
33. Nakaya, M., Kito, Y., Matsuki, N., Shibata, H., Touhata, Y., Tamahara, S. and Ono, K. 2009. A novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for feline insulin. *J Vet Med Sci* **71**: 1005-1007.
34. Nelson, R. W., Himsel, C. A., Feldman, E. C. and Bottoms, G. D. 1990. Glucose tolerance and insulin response in normal-weight and obese cats. *Am J Vet Res* **51**: 1357-1362.
35. Nishii, N. 2007. Measurement of feline plasma insulin concentrations by use of ELISA. *Jpn Vet Med Assoc* **60**: 290-293.
36. Nishii, N., Takasu, M., Kojima, M., Hachisu, T., Wakabayashi, K., Iwasawa, A., Maeda, S.,

- Ohba, Y. and Kitagawa, H. 2010. Presence of anti-insulin natural autoantibodies in healthy cats and its interference with immunoassay for serum insulin concentrations. *Domest Anim Endocrinol* **38**: 138-145.
37. O'Brien, T. D., Hayden, D. W., Johnson, K. H. and Stevens, J. B. 1985. High dose intravenous glucose tolerance test and serum insulin and glucagon levels in diabetic and non-diabetic cats: relationships to insular amyloidosis. *Vet Pathol* **22**: 250-261.
38. Oda, M. and Azuma, T. 2000. Reevaluation of stoichiometry and affinity/avidity in interactions between anti-hapten antibodies and mono- or multi-valent antigens. *Mol Immunol* **37**: 1111-1122.
39. Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K. and Paquette, T. L. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* **222**: 1337-1339.
40. Quintana, F. J., Getz, G., Hed, G., Domany, E. and Cohen, I. R. 2003. Cluster analysis of human autoantibody reactivities in health and in type 1 diabetes mellitus: a bio-informatic approach to immune complexity. *J Autoimmun* **21**: 65-75.
41. Quintana, F. J., Buzas, E., Prohaszka, Z., Biro, A., Kocsis, J., Fust, G., Falus, A. and Cohen, I. R. 2004. Knock-out of the histidine decarboxylase gene modifies the repertoire of natural autoantibodies. *J Autoimmun* **22**: 297-305.
42. Reaven, G. M. and Olefsky, J. M. 1974. Relationship between insulin response during the intravenous glucose tolerance test, rate of fractional glucose removal and the degree of insulin resistance in normal adults. *Diabetes* **23**: 454-459.
43. Reeves, W. G. and Kelly, U. 1982. Insulin antibodies induced by bovine insulin therapy. *Clin Exp Immunol* **50**: 163-170.
44. Rendell, M., Hamilton, R. G., Drew, H. M. and Adkinson, N. F., Jr. 1981. Exacerbation of

- diabetes mellitus by antibodies to exogenous insulin. *Am J Med Sci* **282**: 18-26.
45. Rijnberk, A. and Mol, J. A. 1997. Adrenocortical function. pp. 553-570. *In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. (Kaneko, J. J., Harvey, J. W. and Bruss, M. L. eds.), Academic press, San Diego.
46. Shechter, Y., Chang, K. J., Jacobs, S. and Cuatrecasas, P. 1979. Modulation of binding and bioactivity of insulin by anti-insulin antibody: relation to possible role of receptor self-aggregation in hormone action. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 2720-2724.
47. Shimizu, Y., Kielar, D., Minokoshi, Y. and Shimazu, T. 1996. Noradrenaline increases glucose transport into brown adipocytes in culture by a mechanism different from that of insulin. *Biochem J* **314**: 485-490.
48. Suyu, H., Abe, Y., Tanaka, I., Ishii, S. and Itaya, K. 1982. Insulin-like activity of photochemically obtained monovalent monomeric concanavalin A in the presence of anti-concanavalin A antibodies: dependence on multivalency for stimulation of glucose oxidation of rat fat cells. *J Biochem* **92**: 1251-1257.
49. Yasuda, K., Takashima, S., Takagi, M., Nishii, N., Ohba, Y. and Kitagawa, H. 2011. Insulin responses to administrations of amino acids and fatty acids in healthy cats. *J Vet Med Sci* **73**: 1281-1286.