

論文内容の要旨

応用動物科学専攻
平成16年度博士課程進学
氏名 岡嶋 裕志
指導教員名 高橋 伸一郎

論文題目 インスリン受容体基質-2を介した インスリン様成長因子の生理作用調節機構の解析

インスリン様成長因子 (IGF)は多くの細胞の増殖・分化の誘導、細胞死の抑制など長期作用から、運動能の亢進や代謝制御など短期作用に至るまで、さまざまな生理活性を発現することが知られているペプチドホルモンである。更に、動物の生理状態に応じて、時期特異的、そして組織・細胞特異的に IGF の適切な生理活性が発現することによって、正常な生命活動を営むことができることが明らかにされつつある。IGF の生理作用調節の特徴として、IGF 結合タンパク質 (IGFBP)により生理活性が調節される、他のホルモンや成長因子などの存在下で IGF シグナルが調節され特定の生理活性が発現される点などが挙げられる。したがって、IGF の生理的意義を明らかにするためには、IGF 作用調節の分子メカニズムの解明が必須である。

そこで本研究では、トロピックホルモンにより IGF-I の細胞増殖活性が増強される内分泌細胞のモデルとして甲状腺細胞を、IGF-I により細胞の増殖と運動という異なる作用が誘導され、この活性が IGFBP により修飾されるモデルとして乳腺上皮細胞を用い、IGF-I の生理作用調節機構について解析を行った。一般に、IGF は標的細胞の細胞膜上の IGF-I 受容体に結合すると、内蔵されたチロシンキナーゼが活性化、主要な基質であるインスリン受容体基質 (IRS)をチロシンリン酸化し作用を発現することが報告されている。IRS のアイソフォームである IRS-1 と IRS-2 は、分子構造はよく似ているものの、各基質のノックアウトマウスは異なる表現型を示しており、両基質が異なる機能を有することが示唆されている。そこで、本研究では特に両基質の制御や機能を比較解析し、IGF-I の生理作用調節機構の解析を進めた。

IGF-I 刺激した甲状腺細胞の細胞増殖誘導における IRS の機能

我々は、ラット甲状腺由来正常細胞 FRTL-5 を予め甲状腺刺激ホルモン (TSH) をはじめとした cAMP 経路を活性化する薬剤で長時間処理 (cAMP 前処理) すると、IGF-I に誘導される細胞増殖が相乗的に増強されることを見出している。

この細胞系をモデルとして cAMP 前処理による IGF-I シグナルの増強機構の解析を進めたところ、cAMP 前処理に応答して細胞当たりの IRS-1 発現量が減少し、逆に IRS-2 は増加した。続いて IRS-1、IRS-2 の発現抑制が IGF-I の DNA 合成誘導活性に与える影響を解析した結果、IRS-2 siRNA により IGF-I に応答した DNA 合成が抑制されたのに対して、IRS-1 siRNA 処理により DNA 合成は影響を受けなかった。更に、IGF-I 刺激に応答した IRS-2 のチロシンリン酸化は cAMP 前処理によって増強され、他の結果も併せると、IRS-2 のチロシンリン酸化の増強が細胞増殖の相乗的誘導に必須であることが明らかとなった。

続いて、IRS-2 のチロシンリン酸化増強機構を調べるため、cAMP 前処理した FRTL-5 細胞より調製した IRS-2 免疫沈降物を、活性型 IGF-I 受容体と ATP の存在下で *in vitro* リン酸化反応に供したところ、対照細胞より調製した IRS-2 と比較して、チロシンリン酸化が増強されることが明らかとなった。同様に調製した IRS-2 を高塩濃度の緩衝液で洗浄して IRS-2 と結合している分子を除去後 *in vitro* リン酸化反応を行うと、cAMP 処理による IRS-2 チロシンリン酸化の増強が抑制された。他の結果も併せると、cAMP 経路の長時間刺激に応答して IRS-2 と他の分子が相互作用し、IRS-2 が受容体キナーゼによりチロシンリン酸化されやすくなると考えられた。

そこで、cAMP 長時間処理に応答して IRS-2 と相互作用する分子を探索することにした。cAMP 処理した FRTL-5 細胞から調製した mRNA を用いて cDNA library を作成し、これを prey、IRS-2 を bait とした yeast two-hybrid screening を行った結果、IRS-2 と相互作用する分子をコードする遺伝子を複数取得することに成功した。取得した分子のうち、IRS-2 と強く相互作用する gC1qR (補体因子 C1q の受容体) に注目して解析を進め、cAMP 処理した FRTL-5 において gC1qR が IRS-2 と相互作用し、さらに IGF-I 受容体とも相互作用しうることが明らかとなった。そこで、gC1qR を過剰発現させた 293T 細胞を IGF-I 刺激したところ、gC1qR を過剰発現させた細胞では対照細胞と比較して IGF-I 依存的な IRS-2 のチロシンリン酸化が増強され、この際 IGF-I 受容体の自己リン酸化は gC1qR 過剰発現により変化せず、gC1qR は IGF-I 受容体ではなく IRS に作用することにより IGF-I シグナルを修飾する分子であると考えられた。

これらの結果より、FRTL-5 細胞の cAMP 経路を長時間刺激すると、IRS-1 の発現量が減少、IRS-2 の発現量が増加し、さらに gC1qR と IRS-2 の相互作用が起これ、IRS-2 が IGF-I 受容体と相互作用しやすくなるなどして、IRS-2 の IGF-I 依存性チロシンリン酸化が増強されるという新しい機構の存在が考えられた。

IGF-I 刺激した乳腺上皮細胞の運動能亢進における IRS の機能

妊娠に伴って誘導される乳腺組織の発達は、乳腺上皮細胞の増殖、運動が亢進されることにより大きな細胞集団が形成されることから始まり、これらの変化は IGF-I によって誘導され、IGFBP の一つ IGFBP-5 によって抑制されることが知られている。また、運動性の高い乳癌細胞では IRS-2 の発現量が多く、IRS-2 が IGF-I の細胞運動能亢進作用に重要な役割を担っている可能性が考えられる。

そこで、IGF-I 刺激に応答して移動形態を示す乳癌組織由来細胞 MCF-7 を用いて IGF-I、あるいは IGFBP-5 で処理した際の細胞運動・細胞接着について検討した。その結果、MCF-7 細胞は IGF-I で刺激すると仮足を形成して細胞が移動し、大きな細胞集団を形成するのに対して、IGFBP-5 で処理した細胞では敷石状に強く接着することが分かった。更に、IGF-I と IGFBP-5 で同時処理した細胞では IGF-I による細胞集団形成が抑制され、他の結果も併せると、IGFBP-5 は IGF-I の生理活性を抑制すると同時に、単独で細胞接着を誘導する作

用があることを発見した。

続いて、IRS-1、IRS-2 が IGF-I の細胞集団形成誘導に果たす役割を解析した。siRNA を用いて IRS-1 の発現を抑制すると細胞増殖が抑制され、逆にアデノウイルスベクターを用いて IRS-1 を過剰発現すると細胞増殖が亢進された。一方、IRS-2 の発現を抑制すると仮足形成が観察されなくなり、上皮細胞特有の敷石状の形態を示した。更に、IRS-2 を過剰に発現すると顕著な運動能亢進を示し、大きな細胞集団を形成するようになった。

そこで、IGF-I 刺激に応答した IRS-1、IRS-2 の細胞内局在変化について解析した。IRS-1 は細胞質全体および細胞質内に斑点状に存在し、IGF-I 刺激に応答した局在変化は観察されなかった。これに対して、IRS-2 は無刺激状態では細胞質全体に存在するものの、IGF-I 刺激に応答して膜が波打ち運動を起こす部位および伸長した仮足の先端、すなわち細胞膜直下のアクチン重合が盛んな部位に移動することが明らかとなった。更に、最近アクチン重合への関与が明らかになってきている p38 MAP kinase についても、IRS-2 と同様な局在変化が観察され、IGF-I 刺激に応答して p38 MAP kinase は活性化、また、p38 MAP kinase 阻害剤を添加すると、IGF-I に応答した形態変化が抑制されることも見出した。

他の結果も併せると、IRS-2 は IGF-I に応答して細胞内局在を変え、p38 MAP kinase の活性化などを介して、細胞膜直下でのアクチン重合の活性化、仮足の形成、ひいては細胞運動を亢進させるという作業仮説が考えられた。

IRS-1、IRS-2 は、いずれもインスリン受容体/IGF-I 受容体の基質であり、分子構造も類似していることから、これまでの研究ではお互いが相補的な機能を果たしているという報告がほとんどである。今回の研究成果から、IRS-1、IRS-2 はそれぞれ異なる発現制御・修飾を受け、さらにそれぞれが異なる生理活性を仲介している、そして、お互いが競合的に機能している例もあることが明らかとなった。これらの機構を介して、動物の生理状態に応答した時期特異的、組織特異的な IGF-I の特定の生理活性の誘導が可能となると考えている。本研究の成果が、IGF を用いた臨床研究や応用研究に役立つことを期待している。