

糖尿病性ケトアシドーシスにおけるインスリン 抵抗性: β -ヒドロキシ酪酸の効果

大塚 弘 巳

信州大学医学部老年医学教室

(主任: 山田 隆司教授)

Insulin Resistance in Diabetic Ketoacidosis : Effects of β -Hydroxybutyrate

Hiromi OHTSUKA

Department of Geriatrics, Endocrinology and Metabolism,

Shinshu University School of Medicine

(Director : Prof. Takashi YAMADA)

It is generally accepted that the action of insulin diminishes in patients with diabetic ketoacidosis. However, the detailed mechanism of the insulin resistance in this condition is not thoroughly understood.

In this study, the effects of ketone bodies on insulin action were investigated *in vitro*. Treatment of soluble insulin receptors prepared from rat liver at a low pH (7.0~7.2) decreased the insulin binding activity. In contrast, treatment of these receptors with β -hydroxybutyrate (B-OH-butyrate) increased the insulin binding activity in terms of affinity for insulin, but not maximal binding capacity. The increased binding was diminished by treatment of the receptors at a low pH. Treatment of the receptors with acetoacetic acid did not affect insulin binding. B-OH-butyrate did not affect the autophosphorylation of the insulin receptor. Further, the oxidation of glucose was not affected by B-OH-butyrate. These results suggest that the insulin resistance observed in diabetic ketoacidosis is not caused by an interaction between ketone bodies and the insulin receptor. On the other hand, the uncoupling between insulin binding and autophosphorylation of the receptors observed in the presence of B-OH-butyrate suggests the existence of abnormalities after the binding of insulin to its receptor. *Shinshu Med. J.*, 39 : 587-600, 1991

(Received for publication April 24, 1991)

Key words : diabetic ketoacidosis, β -hydroxybutyrate, insulin binding, autophosphorylation, insulin receptor

糖尿病性ケトアシドーシス, β -ヒドロキシ酪酸, インスリン結合, 自己燐酸化, インスリン受容体

I 緒 言

糖尿病性ケトアシドーシスは、相対的なインスリン不足によっておこり、進行すれば昏睡・死亡にいたる重篤な病態であり、脂肪組織から放出される遊離脂肪酸の増加に伴う高ケトン体血症と血中水素イオン濃度

の上昇 (pH の低下) を特徴とする。これは、末梢組織でインスリン作用が低下していることが原因であり、その治療はインスリン投与が基本である。しかし、治療開始当初には、しばしばインスリン抵抗性を示す。このような事実は古くから知られているが^{1)~4)}、インスリン抵抗性出現の詳細な機序は不明である。pH の

低下, ケトン体, インスリン拮抗ホルモンなどがインスリン抵抗性に関与すると考えられている⁹⁾。たとえば, pHの低下は, インスリンの受容体への結合を低下させ⁹⁻¹⁰⁾, さらにインスリンの受容体結合後のインスリン作用に対しても抑制的に作用すると考えられている⁹⁾¹⁰⁾。一方, リンパ球や線維芽細胞を用いた実験で, ケトン体はインスリン結合に対し促進的に働くという報告がみられるが¹¹⁾¹²⁾, 諸家の報告は必ずしも一致していない。それゆえに, ケトアシドーシスの治療という観点から, pHおよびケトン体のインスリン作用に対する効果の解析はきわめて重要である。

本研究は, ケトアシドーシスに特徴的な低pH, ケトン体を取り上げ, これらのインスリン作用機序に対する効果を観察することを目的とした。

II 材料および方法

A 症例

ケトアシドーシスで入院したインスリン依存性糖尿病患者 (IDDM) 3名について, 血液ガス, 血糖値 (静脈血) を経時的に観察した。ケトアシドーシスに対しブドウ糖およびインスリンの投与を行ったが, これらの投与開始から血糖値が正常化するまで, ブドウ糖静脈内注入量, 速効型インスリン静脈内注入量を計測し, インスリン抵抗性を検討した。

症例1は20歳男性で発症直後のI型糖尿病患者, 症例2は21歳女性で持続皮下インスリン注入療法 (CSII) 治療中のI型糖尿病患者, 症例3は65歳男性でCSII治療中のbrittleなII型糖尿病患者であった。ケトアシドーシス発症の原因としては, 症例1および2に先行感染を認め, 症例3はCSIIの不調によるインスリン不足と考えられた。3例とも, 血中にC-ペプチドは検出できず, 内因性のインスリン分泌はほとんどないと考えられた。

B 動物実験

1 材料

[¹²⁵I]iodoinsulin (3.7MBq/ μ g) および [γ -³²P] ATP (148TBq/mmol) はNew England Nuclear (Boston MA, USA) 製を, D-[1-¹⁴C]glucose (11.37MBq/mg) はAmersham Int. (Buckinghamshire, England) 製を用いた。非標識インスリンはEli-Lilly Co. (Indianapolis IN, USA) 製のヒト型インスリン (28IU/mg) を用いた。牛血清アルブミン (BSA), コラゲナーゼ (Type II), β -ヒドロキシ酪酸およびフェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF)

はSigma Chem Co. (St. Louis MO, USA) 製を用いた。BSAは透析膜で4°C, 24時間透析し, インスリン作用に影響を与えられとされる低分子を除いた後使用した。なお, 透析後のBSA分画には, 糖酸化で観察する限りインスリン作用は認められなかった。N-acetylglucosamine, dinonyl phthalate (DNP), Triton X-100, ハイアミン (methylbenzethonium), dithiothreitol (DTT) およびsodium dodecyl sulfate (SDS) はNacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan) 製を, wheat germ agglutinin agarose (WGA agarose) はVector Lab. Inc. (Burlingame CA, USA) 製を用いた。電気泳動装置および陰イオン交換レジン (Dowex 1-X8, 200-400mesh) はBio-Rad Lab. (Richmond CA, USA) 製を用いた。モノクローナル抗ラットインスリン受容体抗体はAmersham Int. (Buckinghamshire, England) 製を用いた。レントゲンフィルム (XAR-5) および現像液はEastman Kodak Co. (Rochester NY, USA) 製を用いた。放射活性測定には, Packard Instrument Co. (Downersgrove IL, USA) 製のAuto Gamma Spectrometer およびLiquid Scintillation Spectrometerを用いた。

2 脂肪細胞の分離

脂肪細胞はRodbell¹³⁾の方法に従い, 体重150gのウイスター系雄ラットの睾丸周囲脂肪組織からコラゲナーゼを用い分離した。切離した脂肪組織を, コラゲナーゼを2 mg/mlの濃度に溶解した2% BSA, 0.40 mM Dextroseを含むKrebs-Ringer-Phosphate緩衝液 (KRP-BSA), pH7.4で, 37°C, 1時間振とう後遊離した脂肪細胞をナイロンメッシュで濾過した。濾過した脂肪細胞はKRP-BSAで3回洗浄し, コラゲナーゼを除去した後使用した。

3 脂肪細胞の前処理

インスリンの結合に対する β -ヒドロキシ酪酸の効果を観察するため, 脂肪細胞に次のような前処理を加えた。

pH7.4の β -ヒドロキシ酪酸を含まないKRP-BSA, あるいは20mMの β -ヒドロキシ酪酸を加えた同緩衝液で, 分離した脂肪細胞 (3×10^6 cells/ml) を37°Cで60分間インキュベーションした。

4 標識インスリンの脂肪細胞への結合

YamauchiとHashizume¹⁴⁾の方法に若干の変更を加え, [¹²⁵I]iodoinsulinの脂肪細胞への結合を観察した。前処理した脂肪細胞 (3×10^6 cells/ml) を, final $0 \sim 10^{-10}$ Mの濃度の非標識インスリン存在下で, [¹²⁵

[I]iodoinsulin (5×10^{-11} M) を加えて 37°C で 20 分間 インキュベーションした。インキュベーション後 DNP を加え、microcentrifuge で脂肪細胞層を分離し、Auto Gamma Spectrometer で細胞に結合した [^{125}I]iodoinsulin を測定した。 10^{-6} M の非標識インスリン存在下での [^{125}I]iodoinsulin の結合を非特異的結合として Scatchard 解析¹⁵⁾を行った。

5 脂肪細胞のブドウ糖酸化に対する pH および β -ヒドロキシ酪酸の効果

Rodbell¹³⁾の方法に若干の変更を加えて、脂肪細胞のブドウ糖酸化を観察した。

pH7.0 または 7.6 の KRP-BSA で前処理した、あるいは 20mM の β -ヒドロキシ酪酸を含む pH7.0 または 7.6 の同緩衝液で前処理した脂肪細胞 (2×10^5 cells/tube) に、final 10^{-7} M の非標識インスリンおよび 18.5kBq の D- $[1-^{14}\text{C}]$ glucose を加え 37°C で 60 分間 インキュベーションした。インキュベーション後、8N 硫酸を加えて 30 分間 [^{14}C]O₂ を発生させ、これをハイアミンに吸着させてこの分画に含まれる放射活性を 0.4% PPO-POPOP Toluene を scintillator として Liquid Scintillation Spectrometer で測定した。

6 インスリン受容体の分離・可溶化

Fujita-Yamaguchi ら¹⁰⁾の方法に従い、ラットの肝臓からインスリン受容体を分離・可溶化した。

ウイスター系雄ラットの肝臓から遠心分離法で得た microsome 分画を Triton X-100 (final 1%) で可溶化し、この可溶化分画を WGA agarose column に吸着させた。この column から N-acetylglucosamine を用い可溶化インスリン受容体を溶出した。次に、insulin-Sephrose を用いた affinity column chromatography でこの溶出液に含まれる受容体を分離した。分離した受容体は Centricon 30 microconcentrators で濃縮し、 -70°C で冷凍保存した。

7 分離したインスリン受容体の前処理

分離したインスリン受容体へのインスリンの結合に対する pH および β -ヒドロキシ酪酸の効果を観察するために、次のような前処理を加えた。

a 0 から 200mM の濃度に β -ヒドロキシ酪酸を溶解した 1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 0.1% BSA を含む 50mM Hepes 緩衝液でインスリン受容体を $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製し、 22°C で 50 分間 インキュベーションした。

b pH7.0 から 7.8 の 1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 0.1% BSA を含む 50mM Hepes 緩衝液または β -ヒド

ロキシ酪酸 (20mM) を含む同緩衝液で分離したインスリン受容体を $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製し、 22°C で 20 分間または 50 分間 インキュベーションした。

c アセト酢酸 (10^{-5} M もしくは 10^{-3} M) を溶解した同緩衝液で調製したインスリン受容体を、 22°C で 50 分間 インキュベーションした。

インキュベーション後、 β -ヒドロキシ酪酸およびアセト酢酸を除くために、陰イオン交換レジン (500 mg/ml) を加え 5 分間振とうした後、遠心してレジンを除去し上清を次の実験に使用した。コントロールの緩衝液では、このレジン処理後もインスリン結合活性は 96.5% が保たれた。

8 [^{125}I]iodoinsulin のインスリン受容体への結合の測定

前処理したインスリン受容体を 0.4ml の 1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 0.1% BSA を含む 50mM Hepes 緩衝液 (pH7.4) で $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製し、final $0 \sim 10^{-6}$ M の非標識インスリン存在下で 5×10^{-11} M の [^{125}I]iodoinsulin と 22°C で 20 分間 反応させた。受容体と結合した [^{125}I]iodoinsulin は、ポリエチレングリコール法¹⁷⁾により遊離インスリンより分離し、Auto Gamma Spectrometer で測定した。

final 10^{-6} M の非標識インスリン存在下での結合を非特異的結合として、Scatchard 解析を行った。蛋白濃度は Lowry ら¹⁸⁾の方法により、BSA を標準蛋白として測定した。

9 インスリン受容体の自己磷酸化の観察

Roth と Cassell¹⁹⁾の方法に若干の変更を加え、インスリン受容体の自己磷酸化の程度を観察した。20mM の β -ヒドロキシ酪酸の有無で前処理したインスリン受容体を、5mM MnCl₂, 5mM MgCl₂, 50mM NaF を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 100 μl で $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製し、final $0 \sim 10^{-6}$ M のインスリンで受容体磷酸化酵素を活性化した。インスリン刺激による特異的な磷酸化を観察する目的で、インスリンを加える前に非標識 ATP を final 10^{-5} M になるように加え、 22°C で 30 分間 インキュベーションして非特異的 ATP 結合部位を飽和させた。その後レジン (500mg/ml) を加え非結合 ATP を吸着させた後、1,000 $\times g$ で 5 分間遠心してレジンを除去した。この上清に final $0 \sim 10^{-6}$ M のインスリンを加え 22°C で 30 分間 インキュベーションした後、0.5MBq の [γ - ^{32}P]ATP を添加し磷酸化反応を開始した。 22°C で 10 分間 反応させた後、100mM DTT を含む Laemmli's sample

bufferを加え、10分間煮沸し反応を停止させた。

10 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) と autoradiography

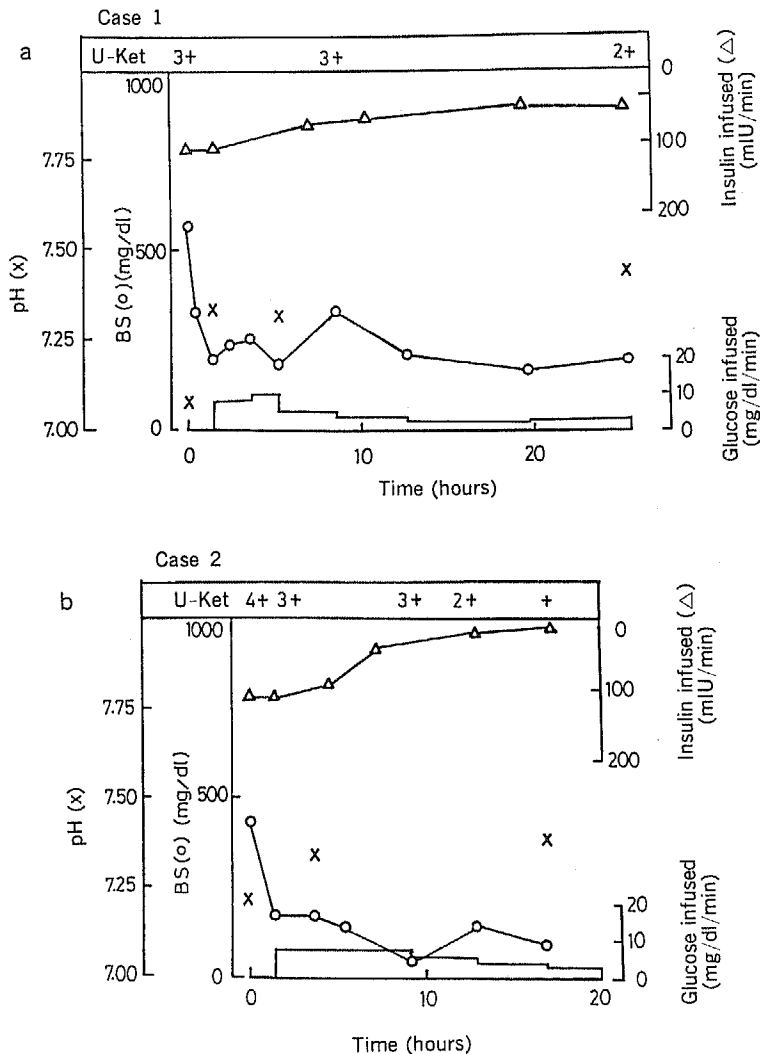
反応を停止させたサンプルを Laemmli²⁰⁾の方法により8% polyacrylamide slab gelで泳動分離した後、Coomassie brilliant blue Gで染色固定し、酢酸とエタノールの混合液で脱色後、乾燥させた。そのゲルを -70°C でレントゲンフィルムに感光させ、ゲル上の放射活性を観察した。また、95kDaバンド(インスリン受容体 β -サブユニット)への ^{32}P の取り込みの量的評価は、ゲルから目的のバンドを切り取り、Cerenkov効果を利用しLiquid Scintillation Spectrometerで測定して定量化した。

III 結 果

A ケトアシドーシス患者におけるインスリン抵抗性

ケトアシドーシスにおけるインスリン抵抗性がどの様に推移するか、著者の経験した患者でこれをまとめてみた。

症例1は、意識混濁で来院した患者で、血糖は高値を示し、血漿pHは7.071と著明に低下、尿中ケトン体排泄の増加が認められた。このため直ちに静脈内インスリン持続注入と重炭酸ナトリウム投与を開始した。Fig.1aに示した様に、pHは7.329まで一過性に上昇したがその後再び低下し、完全に正常化するまで長時間を必要とした。インスリン注入速度は13時間後から



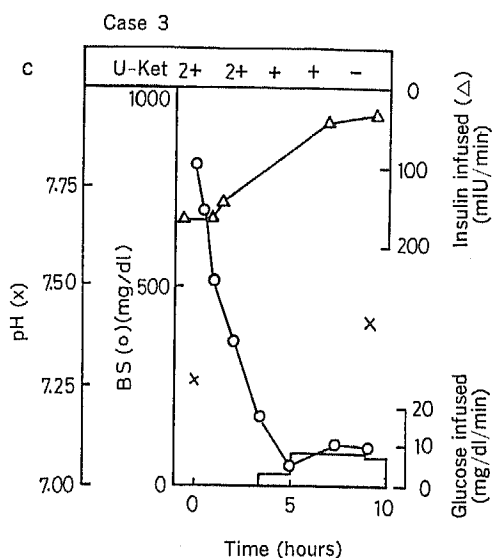


Fig. 1 Time course of the treatment in the patients with diabetic ketoacidosis

a, b and c represent the time course of case 1, 2 and 3, respectively.

"Time" means hours after the beginning of insulin treatment. "BS" means measured venous glucose concentration at the time. "Insulin Infused" was calculated as infused dose of insulin/time of infusion. "Glucose Infused" was calculated as infused dose of glucose/time of infusion \times calculated plasma volume (dl). Ketone bodies in the urine (U-Ket) were measured semi-quantitatively by "Ketosticks".

低下したが、pHの正常化した25時間後も他の2例に比し大量のインスリン注入を必要とした。このインスリン注入量の低下と尿中ケトン体との関係は明瞭でなかった。

症例2も、症例1と同様な症状で来院したが、

Fig.1bに示したようにpHの上昇に平行して、インスリン注入量の減少がみられた。本例でも経過中に尿中ケトン体を認めたが、インスリン抵抗性との関連を示唆する情報は得られなかった。

症例3は、CSIIの不調からインスリン不足となり

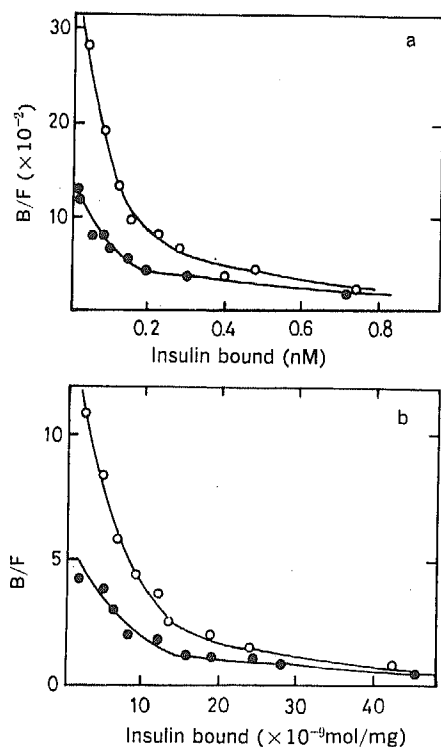


Fig. 2 Scatchard plots of insulin binding to rat epididymal adipocytes (a) or to solubilized insulin receptors prepared from rat liver (b)

a: Adipocytes (1.5×10^6 cells/tube) prepared as described in "Materials and Methods" were preincubated in the absence (●) or presence (○) of 20mM B-OH-butyrate. After preincubation, the cells were transferred to fresh tubes and [125 I]iodoinsulin (5×10^{-11} M added) binding was measured in the presence of various concentrations of unlabeled insulin. Each value indicates the mean of triplicate determinations.

b: Solubilized insulin receptors (0.2 μ g protein) were preincubated in the absence (●) or presence (○) of 20mM B-OH-butyrate. After preincubation, B-OH-butyrate was removed by adding resin as described in "Materials and Methods". [125 I]iodoinsulin (5×10^{-11} M added) binding to the receptors recovered in the supernatant after centrifugation at 100,000 \times g was measured. Each value indicates the mean of triplicate determinations.

高血糖を来し、意識混濁状態で来院した。インスリン注入開始から3時間まで、インスリン注入量は高いにもかかわらず高血糖値を示した。そして、この間のpHは低値を示した。しかし、それ以後の血糖値の正常化に要するインスリン注入速度は低下し、注入開始9時間後にはpHもほぼ正常化した (Fig.1c)。一方、本例でもインスリン注入速度は尿中のケトン体排泄量に比例しなかった (Fig.1c)。

B 脂肪細胞へのインスリン結合に対する β -ヒドロキシ酪酸の効果

Scatchard 解析すると、インスリンの脂肪細胞への結合は、curvilinearを示した。しかし、これはnegative cooperativityというよりも、2 binding sitesを示し、high affinityとlow affinityの2種類の結合が存在すると考えられた。 β -ヒドロキシ酪酸で前処理した細胞では、インスリンの結合は結合のaffinityが上昇したが、maximal binding capacityには変化が認め

られなかった (Fig.2a)。また、結果は示していないが、低pHの緩衝液で前処理すると脂肪細胞へのインスリン結合は低下した。

C 脂肪細胞のブドウ糖酸化に対するpHおよび β -ヒドロキシ酪酸の効果

Fig.3に示すように、インスリン刺激のない状態ではpHを7.6から7.0に下げてもD-[1- 14 C]glucoseからの 14 C O_2 の産生に有意の変化を認めなかった。pH7.6で前処理した細胞をインスリン (10^{-7} M) で刺激すると発生する 14 C O_2 は増加したが、これに比しpH7.0で前処理した細胞ではインスリン刺激による産生が減少した。一方、20mMの β -ヒドロキシ酪酸で脂肪細胞を前処理しても、pHに関係なく、コントロールと比べ発生する 14 C O_2 に差は認められなかった。

D インスリン受容体へのインスリン結合に対する β -ヒドロキシ酪酸の効果

pH7.4での 125 I iodinsulinの結合は、コントロー

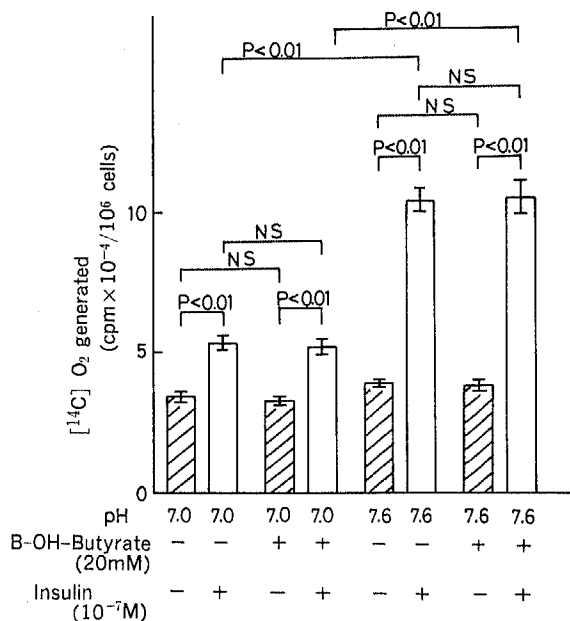


Fig. 3 Effect of pH and B-OH-butyrate on glucose oxidation in rat epididymal adipocytes

Isolated rat adipocytes were preincubated in the absence or presence of 20mM B-OH-butyrate at pH 7.0 or 7.6. After preincubation, adipocytes were incubated at 37°C for 60 min with 18.5kBq D-[1- 14 C]glucose in the absence or presence of 10^{-7} M insulin. The 14 C O_2 generated was measured as described in "Materials and Methods".

There were no significant differences between the absence and presence of 20mM B-OH-butyrate. In two additional experiments similar results were obtained.

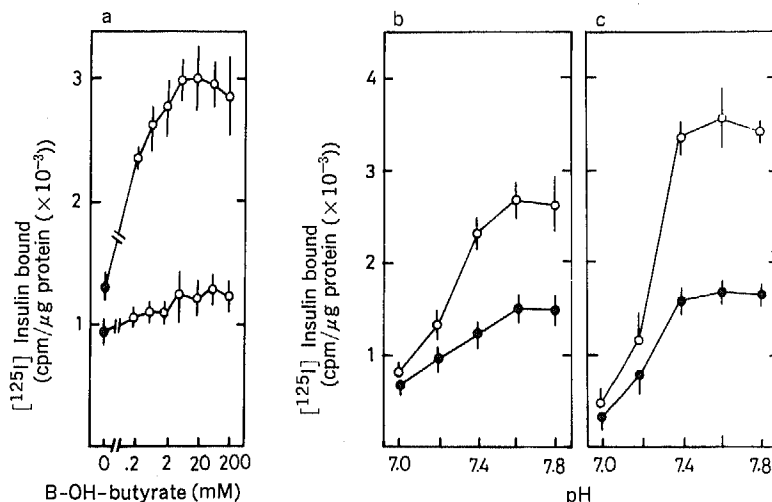


Fig. 4 Effect of B-OH-butyrate on [125 I]iodoinsulin binding to solubilized insulin receptors

a: Effect of various concentrations of B-OH-butyrate on [125 I]iodoinsulin binding to solubilized insulin receptors. Solubilized insulin receptors ($0.2\mu\text{g}$ protein) were preincubated in the absence (●) or presence (○) of various concentrations of B-OH-butyrate at pH 7.4 (upper line) or at pH 7.0 (lower line). After preincubation, B-OH-butyrate was removed from the medium by resin, then [125 I]iodoinsulin (5×10^{-11} M added) binding was measured. Each value indicates the mean \pm SEM of four determinations of specific binding, and there is a significant difference ($P<0.01$) between the two groups at every concentration of B-OH-butyrate. Statistical analysis was performed by Student's t-test.

b and c: Effect of pH on [125 I]iodoinsulin binding to solubilized insulin receptors. Solubilized insulin receptors ($0.2\mu\text{g}$ protein) were preincubated in the absence (●) or presence (○) of 20mM B-OH-butyrate at various pHs for 20min (b) or for 50min (c). After preincubation, the mixture was treated with resin as described in "Materials and Methods". After the treatment [125 I]iodoinsulin (5×10^{-11} M added) binding was measured. Non specific binding was defined as [125 I]iodoinsulin bound in the presence of 10^{-6} M unlabeled insulin. Specific binding was illustrated. Each value indicates the mean \pm SEM of four determinations, and there is a significant difference ($p<0.01$) between the two groups at every pH except for pH 7.0.

ルに比べ、20mM の β -ヒドロキシ酪酸で前処理したインスリン受容体で高かった。これを Scatchard 解析すると、 β -ヒドロキシ酪酸で前処理した受容体で affinity の上昇が認められた。しかし、maximal binding capacity には変化が認められなかった (Fig. 2b)。また、インスリン結合は、0.2~20mM の β -ヒドロキシ酪酸処理で濃度依存的に増加したが、20mM を越える濃度で処理した受容体ではむしろ減少した (Fig. 4 a)。一方、受容体を低 pH で前処理するとインスリンの結合が低下したが、 β -ヒドロキシ酪酸による有意

なインスリン結合の上昇は認められなかった (Fig. 4 a)。 β -ヒドロキシ酪酸非処理受容体では、pH7.6~7.8にインスリン結合の最高値が認められた (Fig. 4b, 4c)。一方、pH7.0で20分間前処理すると結合は最高値の50%、50分間では20%にまで低下した。 β -ヒドロキシ酪酸による結合上昇も高 pH で最高値を認めた。この上昇も低 pH で処理することにより著明に低下した (Fig. 4b, 4c)。

E インスリン受容体へのインスリン結合に対するアセト酢酸の効果

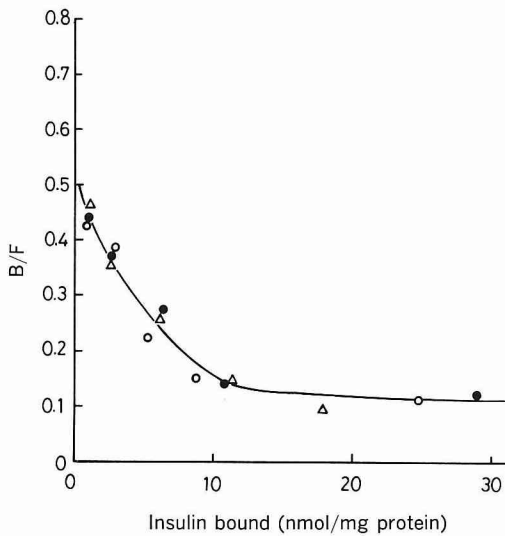


Fig. 5 Effect of acetoacetic acid on $[^{125}\text{I}]$ iodoinsulin binding to solubilized insulin receptors

Solubilized insulin receptors ($0.2\mu\text{g}$ protein) were preincubated in the absence (●) or presence of 10^{-5}M (△) or 10^{-3}M (○) acetoacetic acid. After preincubation, acetoacetic acid was removed by resin. Then, $[^{125}\text{I}]$ iodoinsulin ($5 \times 10^{-11}\text{M}$ added) binding was measured in the presence of various concentrations of unlabeled insulin. Non-specific binding was defined as $[^{125}\text{I}]$ iodoinsulin bound in the presence of 10^{-6}M unlabeled insulin. Each value indicates the mean of triplicate determinations of specific binding.

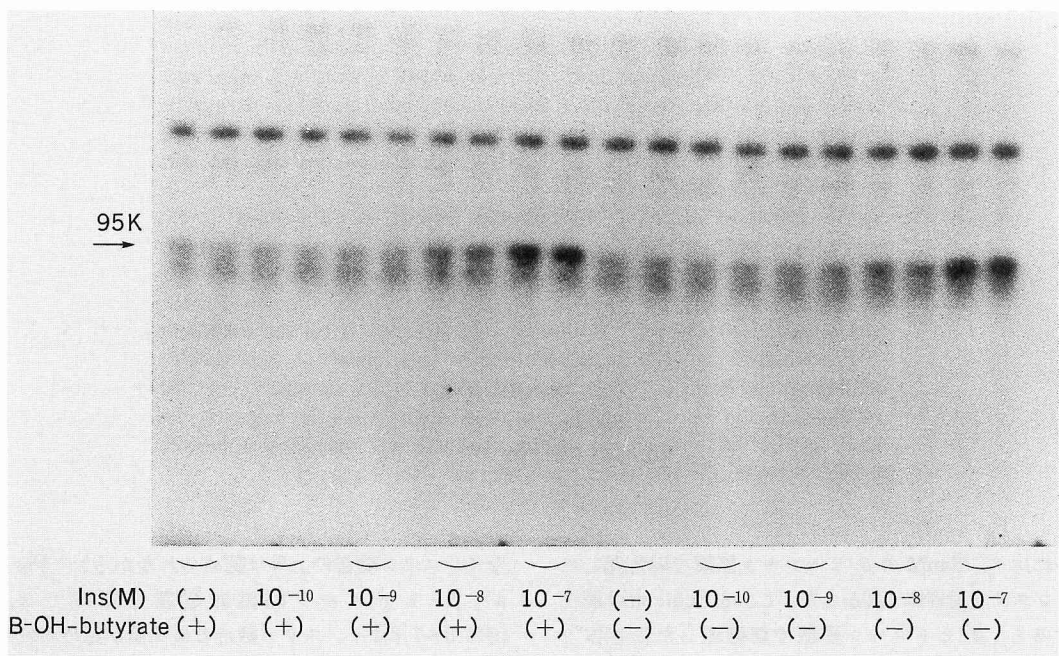


Fig. 6 Effect of B-OH-butyrate on autophosphorylation of insulin receptors

Solubilized insulin receptors ($0.2\mu\text{g}$ protein) were preincubated in the absence or presence of 20mM B-OH-butyrate. After preincubation, the receptors were incubated with various concentrations of insulin for 30min at 22°C . After incubation, the phosphorylation reaction was performed by adding $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($2\mu\text{M}$). Phosphorylated proteins were analyzed by autoradiography revealed on SDS-PAGE.

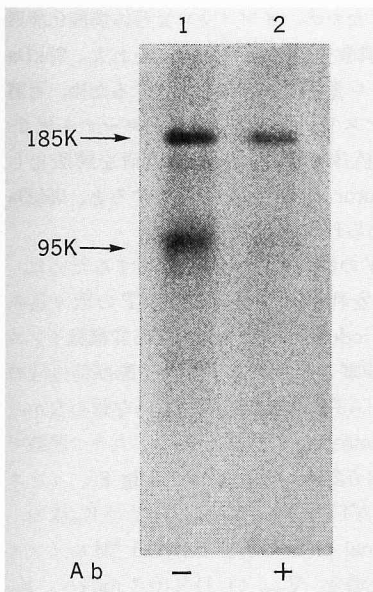


Fig. 7 Immunoprecipitation of insulin receptor with monoclonal anti-insulin receptor antibody

Solubilized insulin receptors ($0.2\mu\text{g}$ protein) were precipitated by monoclonal anti-insulin receptor antibody. After precipitation, the supernatant was phosphorylated in the presence of 10^{-6}M insulin by adding $2\mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Phosphorylated proteins were analyzed by autoradiography revealed on SDS-PAGE (lane 2). Insulin receptors treated without the antibody were phosphorylated and applied to SDS-PAGE as control (lane 1). 95kDa protein was not detected in lane 2.

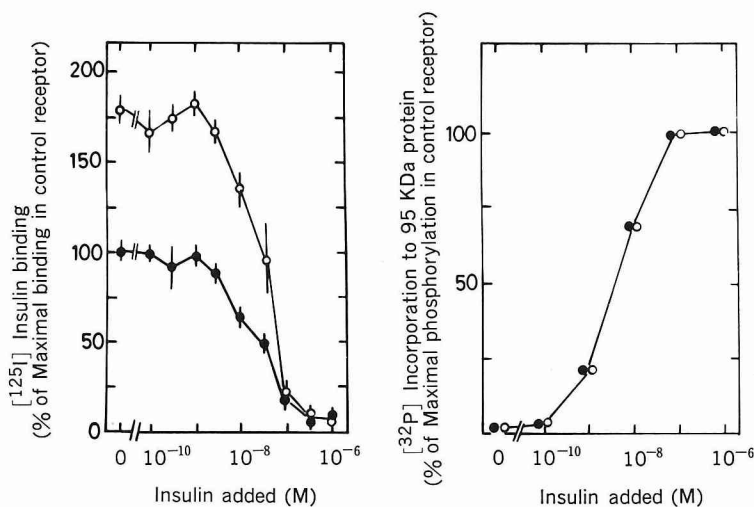


Fig. 8 Effect of various concentrations of insulin on $[\text{I}^{125}]$ iodoinsulin binding to solubilized insulin receptors and autophosphorylation of insulin receptors

Solubilized insulin receptors ($0.2\mu\text{g}$ protein) were preincubated in the absence (●) or presence (○) of 20mM B-OH-butyrate at pH 7.4 for 50 min. After preincubation, B-OH-butyrate was removed by resin, and $[\text{I}^{125}]$ iodoinsulin binding (left panel) or autophosphorylation (right panel) in the presence of various concentrations of unlabeled insulin was examined. In the experiment on insulin binding, each value indicates the mean \pm SEM of four determinations. Results obtained in Fig. 6 were analyzed by means of the Cerenkov's effect, and are shown in the right panel. Each value indicates the mean of duplicate determinations. In additional two experiments, similar results were obtained.

10^{-3}M および 10^{-5}M のアセト酢酸 (pH7.4) で前処理したインスリン受容体へのインスリンの結合を Scatchard 解析したが、コントロールとの間に差を認めなかった (Fig. 5)。また、結果は示していないが、アセト酢酸は 10^{-3}M から 10^{-5}M の濃度で pH7.4 でのインスリンの結合に影響しなかった。

F インスリン刺激によるインスリン受容体の自己磷酸化に対する β -ヒドロキシ酪酸の効果

インスリン受容体の自己磷酸化は、インスリンの作用発現の第一段階と考えられている。インスリン作用に対する β -ヒドロキシ酪酸の効果を受容体レベルで検討する目的で、 20mM の β -ヒドロキシ酪酸で前処理した受容体と非処理の受容体で、この自己磷酸化反応を観察した。

インスリン濃度依存性に、 95kDa の蛋白バンドが磷酸化されるのが観察されたが、これは β -ヒドロキシ酪酸前処理により影響を受けなかった (Fig. 6)。 95kDa 以外に、 185kDa 付近にも磷酸化蛋白が認められたが、この蛋白の磷酸化はインスリン濃度によって影

響を受けなかったため、インスリン受容体磷酸化酵素で促進される磷酸化ではないと考えられた。 95kDa 蛋白がインスリン受容体か否かを検討するため、可溶化受容体をインスリン受容体のモノクローナル抗 β -サブユニット抗体で沈降後、この上清を磷酸化し SDS-PAGE autoradiography で観察すると、 95kDa のバンドは認められなかった (Fig. 7)。

95kDa バンドの磷酸化を量的に評価するために、Cerenkov 効果を利用して $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取り込みを、また $[\text{I}^{125}\text{I}]\text{iodoinsulin}$ 結合に対する非標識インスリンの効果を観察した。 β -ヒドロキシ酪酸前処理の有無で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取り込みに差異を認めなかったが、 $[\text{I}^{125}\text{I}]\text{iodoinsulin}$ の結合は β -ヒドロキシ酪酸で処理した受容体で高値が認められた (Fig. 8)。インスリン受容体の ATP に対する V_{max} および K_m 値を、double reciprocal plots で解析した。 10^{-8}M のインスリンで刺激した場合、 V_{max} (1.11×10^{-9} moles), K_m ($1.33 \times 10^{-5}\text{M}$) の両者が β -ヒドロキシ酪酸で影響を受けなかった。インスリンで刺激していない状態では、

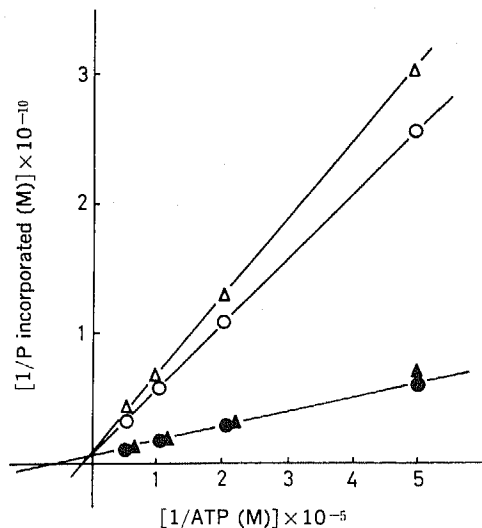


Fig. 9 Double reciprocal analysis of the effect of B-OH-butyrate on the insulin-induced phosphorylation of 95kDa insulin receptor

The phosphorylation reaction was performed in the presence of various concentrations of ATP. Each value was obtained from the calculation of the radioactivity in the phosphorylated band. Open symbols indicate the phosphorylation in the absence of insulin ($K_m = 5.01 \times 10^{-5}\text{M}$ ATP, $V_{\text{max}} = 1.10 \times 10^{-9}$ moles phosphorylated insulin receptor) and closed symbols indicate the phosphorylation in the presence of 10^{-8}M insulin ($K_m = 1.33 \times 10^{-5}\text{M}$ ATP, $V_{\text{max}} = 1.11 \times 10^{-9}$ moles phosphorylated insulin receptor). Circles indicate the values obtained in the receptors pretreated without B-OH-butyrate, and triangles indicate the values obtained in the receptors pretreated with B-OH-butyrate (20mM).

K_m 値 ($5.01 \times 10^{-8} M$) は $10^{-8} M$ のインスリンで活性化した場合と比べて高かったが、この値に対しても β -ヒドロキシ酪酸による影響は認められなかった。しかし、インスリン非存在下での V_{max} は β -ヒドロキシ酪酸で前処理した受容体でわずかな減少がみられた (Fig. 9)。

IV 考 察

糖尿病性ケトアシドーシスでは、血糖値を正常化するためのインスリンの必要量が増加し、インスリン抵抗性が生じているということは広く認められている¹¹⁻¹⁴⁾。しかし、このインスリン抵抗性発症の詳細な機序はよく判っていない。

糖尿病性ケトアシドーシスの患者でインスリン拮抗ホルモン、特にグルカゴンが増加するという報告がある²¹⁾。そして、このインスリン拮抗ホルモンの上昇が、インスリン抵抗性の原因の1つと考えられている²²⁾。以前我々も、グルカゴン等のインスリン拮抗ホルモンがcAMPの生成を介して、インスリンのその受容体への結合を抑制することを報告した¹⁴⁾²³⁾²⁴⁾。しかし、膵全摘後のIDDM患者においても、ケトアシドーシス時には同様のインスリン抵抗性がみられることから、インスリン拮抗ホルモンに加えて、低pHや高ケトン血症もインスリン抵抗性に関与する可能性が高い。

糖尿病性ケトアシドーシスで来院した3例のIDDM患者について、インスリン投与量、ブドウ糖投与量、血糖変化を経時的に観察したが、治療開始直後のpH低下時にはいずれもインスリン抵抗性を示した。また、3例ともpHの正常化に少し遅れてインスリン抵抗性の程度が減少した。症例1では、pH正常化まで長時間を要し、しかもpH正常化後も他の2例に比べ大量のインスリンを必要とした。これが、症例1でみられた著しい低pHによるものか、単なるインスリン感受性の個体差なのかはこのデータからは判別できなかった。また、尿中へのケトン体排泄量とインスリン注入量との間に関連は認められず、高ケトン血症によるインスリン抵抗性が存在するか否かは、これらの臨床データのみでは判別が不可能であった。

本研究では、まず *in vitro* で、インスリンの主要な標的細胞である脂肪細胞を使って、pHおよびケトン体のインスリン作用に対する効果を検討した。pHの低下に伴い、インスリンの細胞への結合は減少し、インスリン刺激による糖酸化作用も低下した。一方、主要なケトン体である β -ヒドロキシ酪酸はインスリン

結合性を低下させず、糖酸化作用にも影響を与えなかった。また、他のケトン体(アセト酢酸)もインスリン受容体へのインスリンの結合を低下させなかった (Fig. 5)。以上の結果から、ケトン体、少なくとも β -ヒドロキシ酪酸が増加することよりも、pHが低下することがインスリンの作用を低下させる一因であると結論し得た。本研究では、インスリンの作用の主要な標的細胞を用いた結果を示したが、同様な結果はリンパ球、線維芽細胞においても観察されている⁹⁾¹¹⁾。

β -ヒドロキシ酪酸は、アセト酢酸と異なり、インスリンの結合を増加させるという結果が脂肪細胞および可溶性インスリン受容体で観察された。それにもかかわらず、 β -ヒドロキシ酪酸はインスリン作用を増強させなかった事実は、インスリンのその受容体への結合と活性化との間に解離が生じていることが示唆される。

インスリン受容体では、受容体の α -サブユニットにインスリンが結合すると β -サブユニットのチロシン残基の磷酸化が生じ、このことが多くのインスリン作用発現の引き金となることが指摘されている²⁵⁾²⁶⁾。しかし、 β -ヒドロキシ酪酸はインスリン結合を増加させたにもかかわらず、受容体の自己磷酸化に影響を与えなかった。このことは、 β -ヒドロキシ酪酸で処理した受容体では、インスリンの結合に伴う受容体の活性化レベルで解離が存在することを示唆する。何故この様な解離が生ずるのかは不明である。しかし、磷酸化が β -ヒドロキシ酪酸処理によって影響を受けなかったことは、結合後の情報を受容体磷酸化機構に伝達し得ないインスリン結合が存在することを示している。また、インスリン受容体の α -サブユニットのC-末端を変異させると結合親和性が変化するという報告があり²⁷⁾、ヒドロキシ酪酸が受容体の構造を変えて親和性を増加させている可能性がある。さらに、インスリン受容体には2つ以上の異なったインスリン結合部位の存在が示唆されており²⁸⁾²⁹⁾、これはインスリン受容体には磷酸化を経由する機構とは異なった情報伝達経路のあることを示唆する³⁰⁾⁻³⁵⁾。一方、チロシン残基の磷酸化はインスリンによる糖代謝に関与していることが示唆されているが³⁶⁾、他の作用についてはチロシン残基の磷酸化に直接関連するかしないか未だ不明である。この様な報告から考えると、 β -ヒドロキシ酪酸によるインスリン結合の増加が、自己磷酸化を介さないで細胞になんらかの作用を及ぼしている可能性は否定できない。 β -ヒドロキシ酪酸の作用部位を同

定できれば、インスリン受容体の作用に対する新しい知見を得られるかも知れないが、今のところ不明である。

V 結 論

- 1 ケトアシドーシス患者では、インスリン抵抗性が存在することが確認された。
- 2 pHの低下は、インスリン結合性の低下をもたらす、インスリン刺激による脂肪細胞の糖酸化作用を抑制した。このことから、pHの低下はインスリン抵抗性の一因と考えられた。
- 3 β -ヒドロキシ酪酸は、自己リン酸化に影響を与えず、インスリン刺激による糖代謝にも影響しない。このため、 β -ヒドロキシ酪酸はケトアシドーシス時のインスリン抵抗性の原因とはならないと考えら

れた。

- 4 しかし、 β -ヒドロキシ酪酸はインスリン受容体のインスリンに対する親和性を上昇させることから、インスリン受容体には受容体のリン酸化と独立した情報伝達機能があることが示唆された。

本論文の要旨は、8th International Congress of Endocrinology (July, 1988 in Kyoto) において発表した。

稿を終わるにあたり、懇切なる御指導、御校閲を賜りました恩師山田隆司教授に深く感謝の意を表します。また、実験の遂行に際し、終始御指導、御助言を頂きました橋爪潔志講師、ルイジアナ州立大学山内恵史博士に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Walker, B. G., Phear, D. N., Martin, F. I. R. and Baird, C. W.: Inhibition of insulin action by acidosis. *Lancet*, 2: 964-965, 1963
- 2) Cuthbert, C. and Alberti, K. G. M. M.: Acidemia and insulin resistance in the diabetic ketoacidotic rat. *Metabolism*, 27: 1903-1916, 1978
- 3) Whittaker, J., Cuthbert, C., Hammond, V. and Alberti, K. G. M. M.: Impaired insulin binding to isolated adipocytes in experimental diabetic ketoacidosis. *Diabetologia*, 21: 563-568, 1981
- 4) Barrett, E. J., DeFronzo, R. A., Bevilacqua, S. and Ferrannini, E.: Insulin resistance in diabetic ketoacidosis. *Diabetes*, 31: 923-928, 1982
- 5) Ginsberg, H. N.: Investigation of insulin resistance during diabetic ketoacidosis: Role of counter-regulatory substances and effect of insulin therapy. *Metabolism*, 26: 1135-1146, 1977
- 6) Sorge, L. K. and Hilf, R.: Effect of environmental hydrogen ion concentration on regulation of insulin receptors in cultured R3230AC mammary carcinoma cells. *Endocrinology*, 112: 1964-1972, 1972
- 7) Shafie, S. M., Cech, J. M., Livingston, J. N. and Hilf, R.: Effect of pH and buffers on insulin binding to normal and neoplastic mammary cells, fat cells and membrane preparations. *Cancer Biochem Biophys*, 4: 51-57, 1979
- 8) Waelbroeck, M.: The pH dependence of insulin binding: A quantitative study. *J Biol Chem*, 257: 8284-8291, 1982
- 9) Hidaka, H., Howard, B. V., Ishibashi, F., Kosmakos, F. C., Craig, J. W., Bennett, P. H. and Lerner, J.: Effect of pH and 3-hydroxybutyrate on insulin binding and action in cultured human fibroblasts. *Diabetes*, 30: 402-406, 1981
- 10) Sonne, O., Gliemann, J. and Linde, S.: Effect of pH on binding kinetics and biological effect of insulin in rat adipocytes. *J Biol Chem*, 256: 6250-6254, 1981
- 11) Merimee, T. J., Pulkkinen, A. J. and Lofton, S.: Increased insulin binding by lymphocyte receptors induced by β -OH butyrate. *J Clin Endocrinol Metab*, 43: 1190-1192, 1976
- 12) van Putten, J. P. M., Wieringa, T. J. and Krans, H. M. J.: Low pH and ketoacids induce insulin receptor binding and postbinding alterations in cultured 3T3 adipocytes. *Diabetes*, 34: 744-750, 1985
- 13) Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis.

J Biol Chem, 239 : 375-380, 1964

- 14) Yamauchi, K. and Hashizume, K. : Glucagon alters insulin binding to isolated rat epididymal adipocytes : Possible role of adenosine 3', 5'-monophosphate in modification of insulin action. *Endocrinology*, 119 : 218-223, 1986
- 15) Scatchard, G. : The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci*, 51 : 660-672, 1949
- 16) Fujita-Yamaguchi, Y., Choi, S., Sakamoto, Y. and Itakura, K. : Purification of insulin receptor with full binding activity. *J Biol Chem*, 258 : 5045-5049, 1983
- 17) Cuatrecasas, P. : Isolation of the insulin receptor of liver and fat-cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 69 : 318-322, 1972
- 18) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 : 265-275, 1951
- 19) Roth, R. A. and Cassell, D. J. : Insulin receptor : Evidence that it is a protein kinase. *Science*, 219 : 299-301, 1983
- 20) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685, 1970
- 21) Unger, R. H. and Orci, L. : Glucagon : secretion, transport, metabolism, physiologic regulation of secretion, and derangement in diabetes. In : DeGroot, L. J., Cahill, G. F., Odell, V. D., Martini, D. H., Steinberger, E. and Winegrad, A. I. (eds.), *Endocrinology*, pp. 959-980, Grune and Stratton, New York, 1979
- 22) Unger, R. H. : Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia*, 28 : 574-578, 1985
- 23) Yamauchi, K., Hashizume, K., Miyamoto, T., Ohtsuka, H., Ichikawa, K., Nishii, Y. and Yamada, T. : Selective alterations of insulin actions by glucagon in isolated rat epididymal adipocytes. *Endocrinology*, 123 : 2800-2804, 1988
- 24) Yamauchi, K., Ohtsuka, H., Miyamoto, T., Ichikawa, K., Nishii, Y. and Hashizume, K. : Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase regulation of phosphorylation of insulin receptor. 8th International Congress of Endocrinology, (Abstract) No. 17-19-035, 1988
- 25) Kahn, C. R. and White, M. F. : The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest*, 82 : 1151-1156, 1988
- 26) Rosen, O. M. : After insulin binds. *Science*, 237 : 1452-1458, 1987
- 27) McClain, D., Mosthaf, L. and Ullrich, A. : Properties of the two naturally occurring alternate forms of the insulin receptor (Abstract). *Diabetes*, 38 [Suppl 2] : 1A, 1989
- 28) Yip, C. C., Hsu, H., Patel, R. G., Hawley, D. M., Maddux, B. A. and Goldfine, I. D. : Localization of the insulin-binding site to the cysteine-rich region of the insulin receptor α -subunit. *Biochem Biophys Res Commun*, 157 : 321-329, 1988
- 29) De Meyts, P., Gu, J.-L., Shymko, R. M., Kaplan, B. E., Bell, G. I. and Whittaker, J. : Identification of a ligand-binding region of the human insulin receptor encoded by the second exon of the gene. *Mol Endocrinol*, 4 : 409-416, 1990
- 30) McClain, D. A., Maegawa, H., Levy, J., Huecksteadt, T., Dull, T. J., Lee, J., Ullrich, A. and Olefsky, J. M. : Properties of a human insulin receptor with a COOH-terminal truncation. I. Insulin binding, autophosphorylation, and endocytosis. *J Biol Chem*, 263 : 8904-8911, 1988
- 31) Maegawa, H., McClain, D. A., Freidenberg, G., Olefsky, J. M., Napier, M., Lipari, T., Dull, T. J., Lee, J. and Ullrich, A. : Properties of a human insulin receptor with a COOH-terminal truncation. II. Truncated receptors have normal kinase activity but are defective in signaling metabolic effects. *J Biol Chem*, 263 :

- 8912-8917, 1988
- 32) Thies, R. S., Ullrich, A. and McClain, D. A. : Augmented mitogenesis and impaired metabolic signaling mediated by a truncated insulin receptor. *J Biol Chem*, 264 : 12820-12825, 1989
 - 33) Marshall, S. : Kinetics of insulin action on protein synthesis in isolated adipocytes. Ability of glucose to selectively desensitize the glucose transport system without altering insulin stimulation of protein synthesis. *J Biol Chem*, 264 : 2029-2036, 1989
 - 34) Sbraccia, P., Wong, K.-Y., Brunetti, A., Rafaeloff, R., Trischitta, V., Hawley, D. M. and Goldfine, I. D. : Insulin down-regulates insulin receptor number and up-regulates insulin receptor affinity in cells expressing a tyrosine kinase-defective insulin receptor. *J Biol Chem*, 265 : 4902-4907, 1990
 - 35) Takata, Y., Webster, N. J. G. and Olefsky, J. M. : Augmented mitogenic and metabolic signaling by a mutant insulin receptor lacking the two tyrosines of the carboxy-terminus (Abstract). *Diabetes*, 39 [Suppl 1] : 114A, 1990
 - 36) Debant, A., Clauser, E., Ponzio, G., Filloux, C., Auzan, C., Contreres, J.-O. and Rossi, B. : Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 does not alter the mitogenic effect of the hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 8032-8036, 1988

(3. 4. 24 受稿)
