

## インスリン受容体シグナル伝達機構の特異性とリガンド非占拠下での意義の解明

長尾 博文

申請時：大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学

現在：大阪大学大学院医学系研究科 代謝血管学寄附講座

### 要旨

インスリン受容体(IR)と IGF-1 受容体(IGF1R)は非常に相同性が高く、類似のシグナル伝達系を共有しているが、IR は主に代謝恒常性を調節し、IGF1R は主に増殖シグナルを調節していることが、これまでの数多くの研究で示されている。両受容体シグナル伝達機構の違いとそのメカニズムの解明は、肥満や糖尿病などの病態の詳細やそれらに対するアプローチに繋がるため積年の課題である。まず細胞工学的手法とリン酸化プロテオミクスを組み合わせ、IR と IGF1R による詳細なシグナル伝達様式の違いを明らかにした。さらに IR における細胞内 juxtamembrane 領域の Leucine-973 が、IR と IGF1R のシグナル伝達の主要な相違を規定する重要なアミノ酸残基であることを、*in vitro* と *in vivo* の双方で明らかにした。さらに、IR の細胞内シグナル伝達の詳細な検討を行う中で、リガンド作用下での細胞内シグナル伝達経路に加え、リガンド非占拠下での受容体の役割（アポトーシス感受性の制御や細胞老化制御）が示唆された。

### 内容

#### ■ 本研究の背景

IR は IGF1R と高い相同性を有し、下流のシグナル伝達の多くを共有し相補的に作用している。IR は主に代謝恒常性(PI3K/Akt)を調節し、IGF1R は主に増殖シグナル(Shc/MAPK)を調節していることが、これまでの数多くの研究で示されている<sup>1,2</sup>。両受容体の発現量は種々の臓器・細胞種によって異なり、肥満や慢性炎症などの病態によっても変化しうる。肥満・内臓脂肪蓄積状態では各種臓器において、IR の代謝調節に関わるシグナルが減弱するインスリン抵抗性が引き起こされ、高血糖や糖尿病に繋がる一方で、高血糖は成長・増殖シグナル活性化を介して血管障害や糖尿病合併症の進展に結びついていることが知られており、両受容体シグナル伝達様式の違いとそのメカニズムの解明は、肥満や糖尿病などの病態の詳細やそれに対するアプローチに繋がるため積年の課題である。また IR・IGF1R シグナルは癌の発症や進展にも密接に関係しており、各々の受容体特異的シグナル伝達経路の解明は、肥満・糖尿病のみならず癌領域においてもその複雑な病態を理解する上で重要である。

IR・IGF1R の juxtamembrane 領域内の NPEY モチーフは、IRS-1 や Shc 等の主要なアダプタータンパク質のリクルートに必須であるが<sup>3</sup>、派遣先研究室では、ヒト IR の Leucine-973 を IGF1R 配列と同様の phenylalanine に置換すると(L973F-IR)、インスリン作用下で細胞増殖シグナル優勢

(IRS-1 のリン酸化が低下する一方で、Shc のリン酸化が亢進する) に変化することを見出している<sup>4</sup>。この IR-Leucine-973 が両受容体におけるシグナル伝達の違いに大きく寄与している可能性がある。

また、派遣先研究室ではこれまでに、IR 及び IGF1R をダブルでノックアウトしたマウスから作製した前駆脂肪細胞株を用い、ダブルノックアウト細胞では野生型と比しアポトーシス耐性になること<sup>5</sup>や、様々なインプリント遺伝子の発現が著減すること<sup>6</sup>を報告してきた。これらはリガンド非存在下の培養条件でも観察され、チロシナーゼ活性に依存しない受容体シグナルとその機能の存在が想定された。インスリン作用による IR とその下流のシグナル伝達は、様々な臓器・細胞において広範に解明されているが、このリガンドが結合していない“Unoccupied state”における IR の役割・意義についてはほとんど解明されておらず、糖尿病を含む代謝疾患研究において新たな観点をもたらす可能性がある。

#### ■ 本研究の目的

IR と IGF1R による詳細なシグナル伝達様式の違いを明らかにする。さらに IR における juxtamembrane 領域の Leucine-973 が、IR と IGF1R のシグナル伝達の主要な相違を規定している可能性があり、詳細なシグナル伝達変化とその意義を *in vitro* と *in vivo* の双方のモデルで検証する。また、リガンド刺激下での IR シグナル伝達経路のみならず、リガンド非占拠性の IR シグナルとその役割について明らかにする。

#### ■ 本研究の成果

##### ① IR 及び IGF1R 特異的シグナル伝達経路の解明

IR と IGF1R による詳細なシグナル伝達様式の違いを明らかにするため、IR 及び IGF1R をダブルノックアウトしたマウス前駆脂肪細胞株(DKO)に、IR、IGF1R、IR の細胞外ドメインと IGF1R の細胞内ドメインをもつキメラ受容体 (IR\_IGF1R)、IGF1R の細胞外ドメインと IR の細胞内ドメインをもつキメラ受容体 (IGF1R\_IR) を安定発現させた細胞株を作製した(図 1)。これらを用いることで、IR と IGF1R 及びそれらのリガンドによる相補的な相互作用がない、純粋な実験系で検討を行った。インスリン (IR と IR\_IGF1R に対し) と IGF-1 (IGF1R と IGF1R\_IR に対し) による刺激の有無で、包括的なリン酸化プロテオミクスを施行したところ、リガンド存在下における、IR と IGF1R に共通するシグナル伝達経路及び、受容体特異的なシグナル伝達経路が明らかとなった。IR でよりリン酸化レベルが高いリン酸化サイトの解析により、mTORC1 シグナルや PI3K/Akt シグナルといった代謝経路が IR で IGF1R に比し亢進していた。また IGF1R でよりリン酸化レベルが

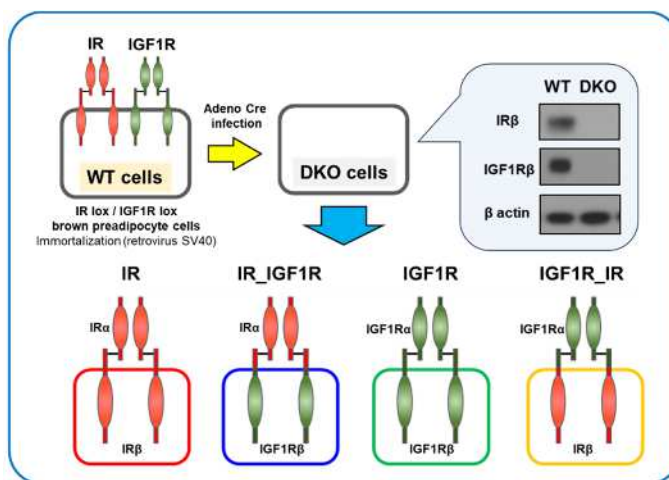


図1. IR、IGF1R及びキメラ受容体(IR\_IGF1R及びIGF1R\_IR)発現細胞の作製

高いリン酸化サイトの解析により、細胞周期や有糸分裂、Rho-GTPases などの細胞増殖シグナルが IGF1R で亢進していることを見出した。

また、キメラ受容体 (IR\_IGF1R 及び IGF1R\_IR) の解析を追加することで、これらの受容体特異的なシグナル伝達経路が、細胞外ドメインと細胞内ドメインのどちらに依存しているのかを詳細に解析した。IR 及び IGF1R 特異的なシグナル伝達経路は大部分が細胞内ドメインに依存しているが、一部細胞外ドメインを介していることが明らかとなった。

② IR における Leucine-973 は IGF1R とのシグナル伝達の主要な違いを規定するアミノ酸残基である

続いて、IR における細胞内 juxtamembrane 領域の Leucine-973 が、IR と IGF1R のシグナル伝達の主要な相違を規定している可能性を先行研究で見出しており<sup>4</sup>、IR の Leucine-973 を IGF1R 配列と同様の phenylalanine に置換し (L973F-IR)、詳細なシグナル伝達変化とその意義を *in vitro* と *in vivo* の双方のモデルで検討した。*in vitro* においては、IR 及び IGF1R をダブルノックアウトしたマウス前駆脂肪細胞 (DKO) に、野生型ヒト IR (WT-IR) あるいは L973F-IR を安定発現させた細胞株 (L973F-IR) を樹立した (図 2)。これらを用いてインスリン刺激下でのシグナル伝達をウェスタンブロット法で検討したところ、WT-IR に比し L973F-IR 細胞では、IRS-1、Akt 及び mTOR のリン酸化が低下し、一方で Shc や Gab-1 のリン酸化が著明に亢進していた。つまり、IR の L973F 変異はインスリン作用下で代謝シグナルが減弱し細胞増殖シグナル優勢 (IGF1R 様) に変化をもたらした。さらに、L973F-IR 細胞はインスリン刺激下での Glycolysis の低下、グルコース取り込みの低下、そして細胞増殖速度の亢進を認めた。リン酸化プロテオーム解析では、L973F-IR 細胞でリガンド刺激下において、IRS-1/PI3 キナーゼ/Akt/mTOR 経路の障害、そして Shc/MAPK シグナル及び細胞周期関連蛋白のリン酸化亢進がみられた。

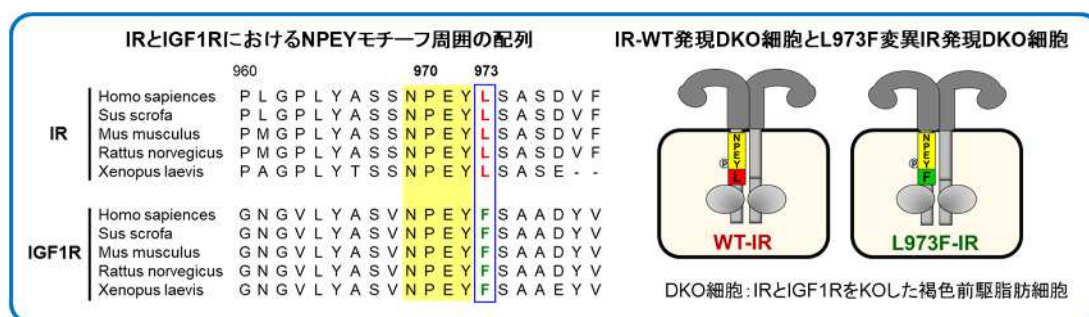


図2. IRとIGF1RにおけるNPEYモチーフ周囲の配列とL973F変異IR発現細胞の作製

続いて L973F-IR 変異ホモ接合体ノックインマウス (L973F-IR マウス) を作製し (図 3)、*in vivo* での影響について解析を行った。L973F-IR マウスは野生型マウスと比し、通常食下で血糖値や体重に変化はみられなかったが、グルコース負荷試験において軽度の耐糖能障害、インスリン負荷試験においてインスリン感受性の低下を認めた。下大静脈からインスリンを投与し、各組織におけるインスリン下流シグナルを評価したところ、*in vitro* での結果と同様に、IRS-1 や Akt のリン酸化が低下し、一方で Shc の

リン酸化が著明に亢進していた。L973F-IR マウスでは、肝臓でのコレステロール含量及び血中コレステロール量の低下を認めた。また、高脂肪食負荷による体重増加が L973F-IR マウスで低下しており、皮下白色脂肪組織の有意な重量低下と肝重量の低下を認めた。両群間で摂餌量には変化はみられず、インスリンシグナルの（代謝面での）障害に基づくものと考えられた。以上より、IR における Leucine-973 は、IR と IGF1R とのシグナル伝達の違いを特徴づける重要なアミノ酸残基であると考えられた(図 4)。

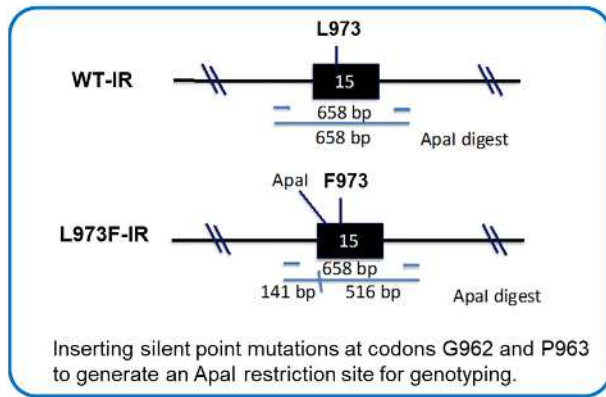


図3. L973F変異IRノックインマウスの作製

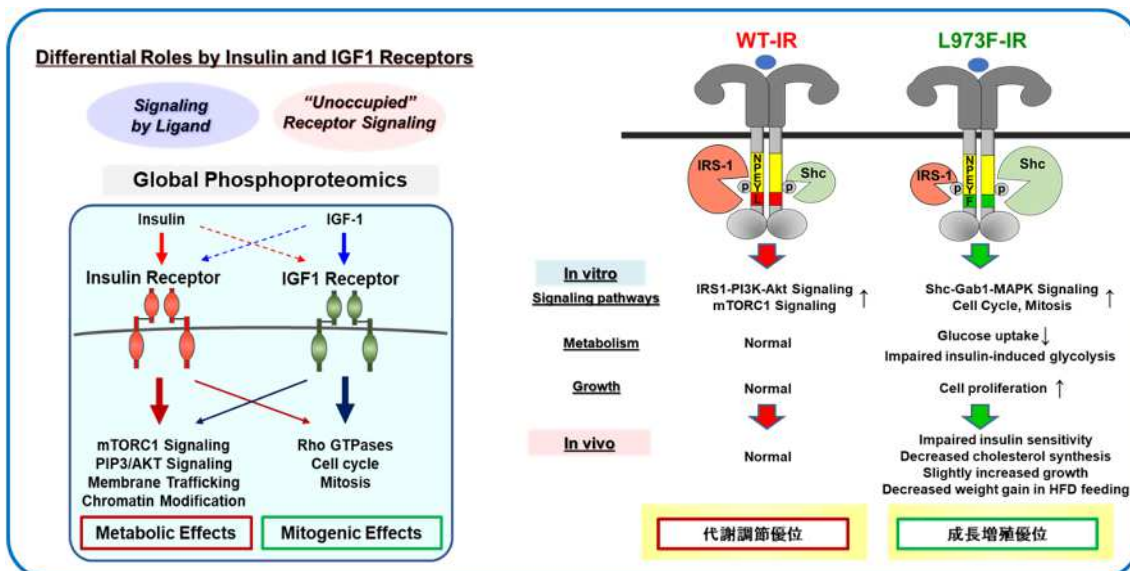


図4. IRとIGF1Rによるシグナル伝達様式の違い(左)とIR-WTとL973F変異IRでの代謝・増殖調節の変化(右)

### ③ “Unoccupied state”におけるインスリン受容体の役割・意義

最後に、リガンド刺激下での IR シグナル伝達経路に加えて、リガンド非占拠性の IR シグナルとその役割について検討を行った。DKO 細胞に、野生型ヒト IR(WT-IR)、kinase-dead IR(K1030R 変異)、ΔCT-IR(C 末端なし)、JMO-IR(チロシンキナーゼ領域と C 末端なし)を安定発現させた細胞株を作製した。これらの細胞を用いてインスリンによる刺激の有無(100nM で 15 分)でリン酸化プロテオーム解析を行い、従来から明らかとなっているインスリン刺激下での IR のチロシンキナーゼ活性に基づくシグナル伝達経路に加え、リガンドとチロシンキナーゼ活性非依存性のシグナルネットワークを見出した。その多くは IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及びΔCT-IR によって同様に引き起こされ、C 末端を除く IR の細胞内ドメインがこれらの変化に関わっていると考えられた。具体的には、IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及びΔCT-IR 発現細胞で、DKO や JMO-IR 発現細胞と比し、細胞と細胞外マトリックス相互作用に関連するタンパク質リン酸化の増加、JAK/STAT/インターフェロンシグナルの低下、ATM シグナルの低下、



細胞周期関連のタンパク質リン酸化低下がみられた。これらのシグナルネットワークの多くは、プロテオーム解析に基づく各々のタンパク質量で補正しても保持されていた。

また、同様の条件下でプロテオーム解析及びトランスクリプトーム解析を行ったところ、リガンド非刺激下での細胞株間のタンパク質・遺伝子発現の変化の大部分が IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び  $\Delta$ CT-IR によって同様に引き起こされていた。プロテオーム解析では、IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び  $\Delta$ CT-IR 発現細胞で、DKO や JMO-IR 発現細胞と比し、コラーゲンを含む細胞外マトリックス蛋白の増加、JAK/STAT/インターフェロニンシグナルに関連する免疫システム関連蛋白の減少がみられ(NF- $\kappa$ B シグナル含む)、これらの変化の 70-80%は mRNA 発現の変化を伴っていた。またトランスクリプトーム解析では、これらの遺伝子発現変化に加え、SASP 関連遺伝子の発現が DKO や JMO-IR 発現細胞に比較し、IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び  $\Delta$ CT-IR 発現細胞で低下していることを見出した。

IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び  $\Delta$ CT-IR 発現細胞では、DKO や JMO-IR 発現細胞と比し、細胞増殖が亢進していた。さらに、各種刺激下によるアポトーシス感受性、細胞生存率を検討したところ、興味深いことに、IR(WT-IR)、

K1030R 変異 IR 及び  $\Delta$ CT-IR の再発現によりアポトーシス感受性が回復したが、JMO-IR の再発現ではほぼ回復はみられなかった。SASP 関連遺伝子の発現が IR(WT-IR)、K1030R 変異 IR 及び  $\Delta$ CT-IR 発現細胞と比し、DKO や JMO-IR 発現細胞で増加を示していることも含め、IR の細胞内ドメインが細胞老化のフェノタイプを抑制しているものと考えられた。以上より、リガンド非占拠下での IR の役割（アポトーシス感受性の制御や細胞老化制御）が示唆された(図 5)。

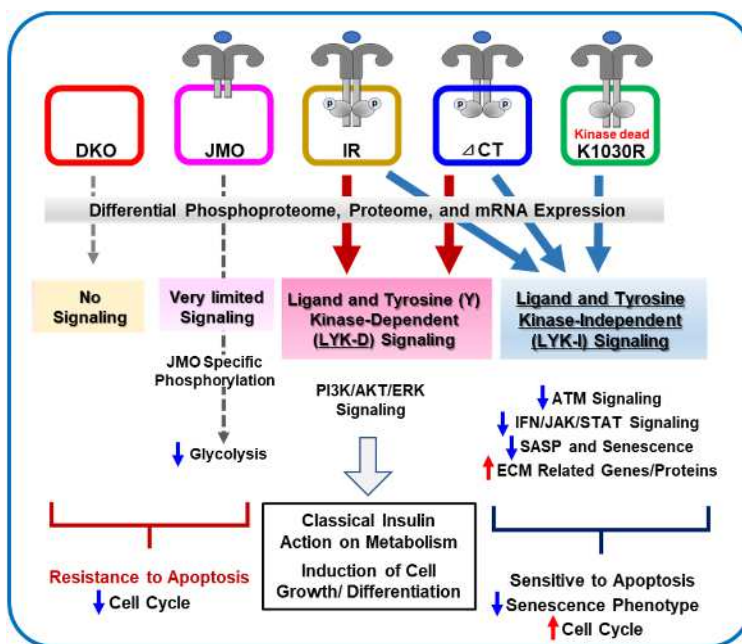


図5. リガンド占拠・非占拠下でのインスリン受容体の役割予想図

#### 引用文献

1. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(1):a00919.
2. White MF, Kahn CR. Insulin action at a molecular level — 100 years of progress. Mol Metab. 2021;52:101304.

3. He W, O'Neill TJ, Gustafson TA. Distinct modes of interaction of SHC and insulin receptor substrate-1 with the insulin receptor NPEY region via non-SH2 domains. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23258–23262.
4. Cai W, Sakaguchi M, Kleinridders A, Gonzalez-Del Pino G, Dreyfuss JM, O'Neill BT, Ramirez AK, Pan H, Winnay JN, Boucher J, Eck MJ, Kahn CR. Domain-dependent effects of insulin and IGF-1 receptors on signalling and gene expression. *Nat Commun*. 2017;8:14892.
5. Boucher J, Macotela Y, Bezy O, Mori MA, Kriauciunas K, Kahn CR. A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Sci Signal*. 2010;3(151):ra87.
6. Boucher J, Charalambous M, Zarse K, Mori MA, Kleinridders A, Ristow M, Ferguson-Smith AC, Kahn CR. Insulin and insulin-like growth factor 1 receptors are required for normal expression of imprinted genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(40):14512–14517.

#### 発表業績一覧

##### ■論文

1. **Hirofumi Nagao**, Ashok Kumar Jayavelu, Weikang Cai, Hui Pan, Jonathan M Dreyfuss, Thiago M Batista, Bruna B Brandão, Matthias Mann, C Ronald Kahn. Unique ligand and kinase-independent roles of the insulin receptor in regulation of cell cycle, senescence and apoptosis. *Nature communications* 14(1) 14:57, 2023.
2. **Hirofumi Nagao**, Weikang Cai, Bruna B Brandão, Nicolai J Wewer Albrechtsen, Martin Steger, Arijeet K Gattu, Hui Pan, Jonathan M Dreyfuss, F Thomas Wunderlich, Matthias Mann, C Ronald Kahn. Leucine-973 is a crucial residue differentiating insulin and IGF-1 receptor signaling. *The Journal of clinical investigation* 133(4): e161472, 2023.
3. **Hirofumi Nagao**, Weikang Cai, Nicolai J Wewer Albrechtsen, Martin Steger, Thiago M Batista, Hui Pan, Jonathan M Dreyfuss, Matthias Mann, C Ronald Kahn. Distinct signaling by insulin and IGF-1 receptors and their extra- and intracellular domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(17): e2019474118, 2021.

##### ■受賞

1. 第96回日本内分泌学会学術総会「愛・内分泌。」賞(優秀演題賞) 2023年6月
2. ADA Presidents' Select Abstract (The American Diabetes Association's 82nd Scientific Sessions) 2022年6月

## ■ 学会発表

1. **長尾 博文**, C. Ronald Kahn, 下村 伊一郎. インスリン受容体における Leucine-973 は IGF-1 受容体とのシグナル伝達の違いを規定するアミノ酸残基である 第 96 回日本内分泌学会 学術総会 2023 年 6 月
2. **Hirofumi Nagao**, Weikang Cai, Hui Pan, Thiago M Batista, Bruna B Brandão, C Ronald Kahn. Novel Ligand and Kinase-Independent Signaling by the Insulin Receptor, ADA 82nd Scientific Sessions, 223-OR, New Orleans, LA, USA, 2022 年 6 月
3. **Hirofumi Nagao**, Weikang Cai, Thiago M Batista, Hui Pan, Jonathan M Dreyfuss, C Ronald Kahn. Defining Distinct Actions of Insulin and IGF-1 Receptors and Their Extra-and Intra-Cellular Domains at the Level of the Phosphoproteome, ADA 80th Scientific Sessions, 1737-P, Chicago, IL, USA, 2020 年 6 月