

C-ペプチドフラグメントのインスリン作用に及ぼす影響

Effect of C-peptide fragment on insulin action in STZ-induced diabetic rats

李 玲* 押田 芳治** 羅 偉 権***
大 竹 康 敬**** Bo-Lennart JOHANSSON***** John WAHREN*****
矢内原 昇*** 佐 藤 祐 造**

Ling LI*, Yoshiharu OSHIDA**, Weiquan LUO***
Yasutaka OHTAKE****, Bo-Lennart JOHANSSON*****, John WAHREN*****
Noboru YANAIHARA***, Yuzo SATO**

Our previous studies suggest that C-peptide augments glucose utilization in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. The present study was undertaken to determine the influence of human C-peptide fragment (11-22) on in vivo glucose utilization in STZ-induced diabetic rats by using the sequential euglycemic clamp technique. Two different insulin infusion rates, 3.0 (low-dose) and 30.0 (high-dose) mU/kg/min were employed in the awake condition. Rat C-peptide I or human C-peptide fragment was infused at a rate of 0.05 nmol/kg/min, which increased plasma levels from 0.2 ± 0.1 to 12.3 ± 5.2 ng/ml, from 0.6 ± 0.1 to 22.5 ± 2.2 ng/ml, respectively. (fasting levels in controls were 4.7 ± 1.0 ng/ml). Plasma insulin level during the low-dose and high-dose insulin infusion were 30 and 400 μ U/ml, respectively, and blood glucose was clamped at 140 mg/dl by periodic adjustment of i.v. glucose infusion rate. Glucose metabolic clearance rate (MCR) in diabetic rats given rat C-peptide I during the low-dose insulin clamp was 17.4 ± 2.9 ml/kg/min ($n = 6$) as compared to 8.3 ± 0.7 ml/kg/min ($n = 6$) in diabetic control rats ($p < 0.05$). Likewise, MCR in diabetic rats infused with human C-peptide fragment (11-22) (13.0 ± 3.2) tended to be 50% greater than in control diabetic rats, but not statistically significant. Rat C-peptide I and human C-peptide fragment (11-22) did not significantly influence MCR at the high-dose insulin clamps. It could be concluded that human C-peptide fragment (11-22) also has biological activity in glucose utilization.

はじめに

膵B細胞内で生合成されたプロインスリンは等モルのインスリンとC-ペプチドに分解され、血中に放出される。これまで、C-ペプチドに生物学的活性は有さないと考えられてきた

が、最近、インスリン依存型糖尿病 (IDDM) 患者にC-ペプチドをインスリン治療に併用することで、ミクロアルブミン尿の減少や、血中グリコヘモグロビン A1c の低下、腎尿管細胞の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性の改善などが報告されている^{2), 3), 4), 6)}。すでに、われわれは生理的

- * 名古屋大学大学院医学研究科健康増進科学 I
- ** 名古屋大学総合保健体育科学センター
- *** 矢内原研究所
- **** 名古屋大学医学部
- ***** Department of Clinical Physiology, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden
- * First Division of Health Promotion Science, Graduate Nagoya University School of Medicine
- ** Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University
- *** Yanaihara Institute Incorporation, Research and Development
- **** School of Medicine, Nagoya University
- ***** Department of Clinical Physiology, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden

血中濃度の 10 倍以上に達するヒト C- ペプチドを streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットに投与し、減弱していたインスリン感受性が改善された事実を認めている¹¹⁾。さらに、生理的血中濃度に至るラット C- ペプチドの投与が STZ 誘発糖尿病ラットのインスリン感受性を健常ラットのレベルまで増加させた成績も報告している⁹⁾。

インスリンのアミノ酸配列は哺乳動物間では若干の差異を認められるが、類似性が高い。それに比して、C- ペプチドのアミノ酸配列は動物種により大きな差がある。しかしながら、C- ペプチドの中央部位のアミノ酸配列は類似性が高く、中央部位のアミノ酸フラグメントが C- ペプチドの生物活性にとって、重要な部分であることが推定されている^{1,10)}。そこで、今回、われわれは *in vivo* で、C- ペプチドのアミノ酸配列のうちの中央部位フラグメントのインスリン作用に及ぼす影響について、STZ 誘発糖尿病ラットに、覚醒下で既報の sequential euglycemic clamp 法⁷⁾を実施し、検討を加えた。

対象および方法

Animal: 8 ～ 10 週齢の体重 200 ～ 250g の雄性 Wistar 系ラット 24 匹を対象とした。ラットは室温 20℃ ～ 22℃、明暗サイクルが 12 時間の環境で、自由に餌と水を摂取する個別ケージにて飼育された。

Pretreatment of animal: euglycemic clamp 実施 5 ～ 7 日前に、pentobarbital (40 mg/kg.ip.) 麻酔下で、ラットの右頸静脈と左頸動脈にカテーテルを挿入した。すなわち、前頸部に切開を加え、右頸静脈と左頸動脈を露出し、サイラステックカテーテルをそれぞれに挿入した。なお、前者がインスリンとグルコースおよび C- ペプチドまたは生理的食塩水 (生食) 注入用であり、後者が採血用である。カテーテル内での凝固防止のために、ヘパリンで溶解していた polyvinylpyrrolidone (PVP-30, NACALAI TESQUE INC) を充填した。また、術後感染を防ぐ目的で、pencillin G (1 万単位/kg) を静注し、

gentamycin (0.5 mg/kg) を筋注した。糖尿病は STZ (55 mg/kg, Sigma, USA) を静注し作製した。一方、非糖尿病 (健常) 群は生食を静注した。頸動脈と頸静脈に挿入されたカテーテルの末端をピンで封じ、その末端を頭頸部皮下を経由させ、頭頂部に露出させた。

Euglycemic insulin clamp technique: 5 ～ 7 日の回復期間を経て、16 時間の絶食後、ラットを蓋なしのケージに移し、頸静脈カテーテルを介して速効型インスリン (Actrapid MC, NOVO Nordisk, Denmark) を 3.0 mU/kg/min (low-dose) と 30.0 mU/kg/min (high-dose) の速度で、各 90 分毎注入した。さらに頸静脈カテーテルより、ラット C- ペプチド I、ヒト C- ペプチドフラグメント (11-22, Fig. 1) あるいは生食を 0.05 nmol/kg/min の注入率で投与した。また頸動脈カテーテルからは 10 分毎に採血し血糖値を測定した。糖尿病ラットでは、インスリン注入開始後、血糖値が 140 mg/dl に達した時点より、20% (w/v) グルコース液の注入を行い、血糖値を 140 mg/dl に維持した。一方、健常ラットでは、インスリン注入と同時にグルコースの補充を行い、血糖値を空腹時レベルに保持した。血糖値が安定した各 clamp 後半 30 分のブドウ糖の注入量により、ブドウ糖注入率 (glucose disposal rate, GDR) を求めた。さらに糖尿病ラットと健常ラットにおける血糖値の相違の影響を除外するために、GDR を clamp 中の血糖値で補正し、ブドウ糖代謝率 (metabolic clearance rate of glucose, MCR) を算出し、インスリン作用の指標とした。また、clamp 前および各 clamp 終了直後に採血し、血漿 C- ペプチドおよびインスリンを測定した。

Analytical methods: 血糖値は電極法にて、血漿インスリン濃度は RIA 法にて、血漿 C- ペプチド濃度および C- ペプチドフラグメント濃度は C- ペプチド enzyme immunoassay 法 (開発: 矢内原研究所) にて各々測定した⁵⁾。

数値は平均値 ± 平均誤差で示し、統計学的な処理は one-way analysis of variance (ANOVA) 検定で行った。

Table 1 Body weight, and plasma glucose, insulin, and C-peptide levels before and immediately after the euglycemic clamp procedure at the low-dose (3.0 mU/kg/min) and the high-dose (30.0 mU/kg/min) insulin infusions

	Body wt (g)	Glucose (mg/dl)			Insulin (μ U/ml)			C-peptide(ng/ml)		
		Basal	Low-dose	High-dose	Basal	Low-dose	High-dose	Basal	Low-dose	High-dose
Normal Saline(6)	208 \pm 6	70 \pm 2	67 \pm 3	61 \pm 2	15 \pm 3	34 \pm 2	414 \pm 45	4.7 \pm 1.0	3.4 \pm 0.7	5.5 \pm 0.8
Diabetic Saline(6)	198 \pm 5	210 \pm 5**	139 \pm 7	137 \pm 5	7 \pm 1**	31 \pm 1	430 \pm 42	0.6 \pm 0.2**	0.3 \pm 0.1**	0.7 \pm 0.2**
C-peptide I (6)	199 \pm 5	235 \pm 9**	140 \pm 9	129 \pm 4	7 \pm 1**	29 \pm 4	351 \pm 43	0.2 \pm 0.1**	11.3 \pm 3.2*	12.3 \pm 5.2*
C-peptide fragment(6)	211 \pm 4	214 \pm 9**	145 \pm 7	137 \pm 3	7 \pm 1**	32 \pm 5	380 \pm 39	0.6 \pm 0.1**	12.2 \pm 4.9*	22.5 \pm 2.2*

Values are means \pm SEM. The number of rats is shown in parentheses. *: $p < 0.05$ vs. pre-infusion (basal) level. **: $p < 0.01$ vs. normal

Table 2 Glucose disposal rates (GDRs) for the last 30 min during the eulycemic clamp procedure at the low-dose (3.0 mU/kg/min) and the high-dose (30.0 mU/kg/min) insulin infusions.

	GDRs (mg/kg/min)	
	Low-dose insulin infusion	High-dose insulin infusion
Normal Saline(6)	12.4 \pm 1.5	38.5 \pm 0.7
Diabetic Saline(6)	11.2 \pm 0.8	43.6 \pm 3.5
C-peptide I (6)	21.2 \pm 2.2**	50.1 \pm 2.4
C-peptide fragment(6)	18.1 \pm 4.0	42.7 \pm 5.3

Values are means \pm SEM. The number of rats is shown in parentheses. **: $p < 0.01$ vs. diabetic with saline.

成 績

1、体重、血糖値、血漿インスリン濃度およびC-ペプチド濃度 (Table 1)

Table 1 に示したように、各群における体重に有意差はなかった。糖尿病群の空腹時血糖値は健常群より有意に高く ($p < 0.01$)、一方、糖尿病群の空腹時インスリン濃度は健常群より有意に低かった ($p < 0.01$)。また、clamp 中の血糖値は健常群では空腹時レベルに保たれ、糖尿病群では 140 mg/dl 前後に維持された。各群において、low-dose clamp 中のインスリン濃度は約 30 μ U/ml に至り、physiological hyperinsulinemia となった。high-dose clamp 中のインスリン濃度は 350 ~ 430 μ U/ml に達し、supraphysiological なレベルに相当した。ラット

C-ペプチド I の注入により、糖尿病ラットにおいて、健常群に比し有意に低下していた C-ペプチド濃度は ($p < 0.01$) 生理的な高濃度レベルに至った。ヒト C-ペプチドフラグメント投与は、血漿 C-ペプチド濃度を Table 1 のごとく生理的高濃度水準までに増大させた。

2、GDR (Table 2)

low-dose clamp において、糖尿病 C-ペプチド I 投与群の GDR は糖尿病生食投与群に比し有意に大であった ($p < 0.01$)。糖尿病 C-ペプチドフラグメント投与群では、糖尿病生食投与群に比し増加傾向を示し、C-ペプチド I 投与群の 85% のレベルに達したが、有意差はなかった。一方、high-dose clamp では、C-ペプチド I の投与により、GDR は増加傾向を示したが、糖尿病生食投与群との間に有意差はな

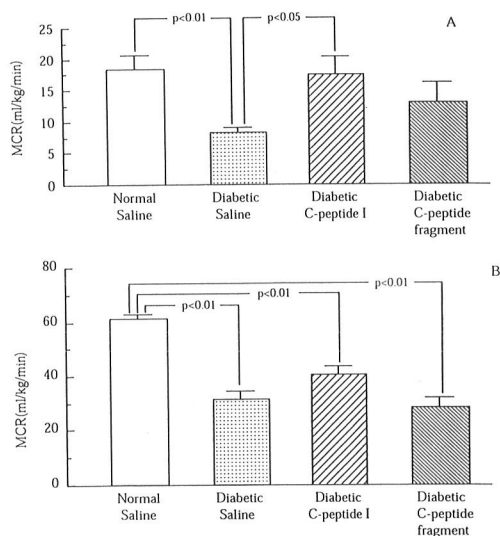


Fig. 2 Metabolic clearance rates of glucose (MCR) for the last 30 min during the euglycaemic clamp procedure at the low-dose (3.0 mU/kg/min) insulin infusion (A) and the high-dose (30.0 mU/kg/min) insulin infusion (B). In the low-dose insulin infusion (A), rat C-peptide I and human C-peptide fragment (11-22) elicited increases of MCR in the diabetic rats, and the MCR, which was mediated by Rat C-peptide I, reached to the levels of normal rats, while, the MCR, which was mediated by human C-peptide fragment (11-22), was lower than the that of normal rats. In the high-dose insulin infusion (B), the MCR were still lower than those of the normal rats. Data are means \pm SEM.

かった。また、C-ペプチドフラグメントの効果は認めなかった。

3、MCR (Fig. 2)

low-dose clampにおいて、健常群 (18.4 ± 2.2 ml/kg/min) に比し、糖尿病生食投与群 (8.3 ± 0.7 ml/kg/min) は有意に低値であったが ($p < 0.01$)、C-ペプチド I の投与により、 17.4 ± 2.9 ml/kg/min となり、健常群レベルに至った ($p < 0.05$)。糖尿病 C-ペプチドフラグメント投与群の MCR は 13.0 ± 3.2 ml/kg/min とな

り、50%の改善傾向がみられたが、有意差はなかった。一方、high-dose clamp では、C-ペプチド I (40.4 ± 3.1 ml/kg/min)、C-ペプチドフラグメント (28.4 ± 3.6 ml/kg/min) の投与は生食投与群 (31.2 ± 3.4 ml/kg/min) と比して有意差が認められず、健常群 (61.4 ± 1.4 ml/kg/min) より有意に低値であった ($p < 0.01$)。

考 察

これまで、C-ペプチドは内分泌代謝学上生물의活性を有さず、IDDMなどで内因性インスリン分泌能の指標として利用されてきたにすぎなかった。しかしながら、最近 IDDM 患者に C-ペプチドを投与し、短期的にはミクロアルブミン尿の消失や腎機能の改善効果が、長期的には、グリコヘモグロビン A1c の低下がそれぞれ報告され、その有効性が注目されている^{2-4,6)}。また、我々はすでに糖尿病ラットにヒト C-ペプチドを投与し、血中濃度が生理的レベルの10倍以上に達した際に、インスリン抵抗性が改善された成績を報告している¹¹⁾。さらに、最近、糖尿病ラットに、ラット C-ペプチド I、II を投与し、血中濃度を生理的高濃度までに上昇させると、インスリン感受性が増大する成績も認めている⁹⁾。

本研究では、C-ペプチドフラグメントのインスリン感受性に及ぼす効果を検討したところ、有意ではなかったが、ラット C-ペプチド I 投与群の75%に達し、インスリン抵抗性は MCR で50%改善された。これまで、C-ペプチドフラグメントの生理活性に関しては、Ido ら¹⁾、Ohtomo ら⁸⁾の報告がある。Ido ら¹⁾の用いたフラグメントは、今回検討したフラグメントより2個アミノ酸が多いヒト C-ペプチドフラグメント (11-24) (Fig. 1) であり、糖尿病で減弱した網膜、神経、大動脈の血流改善に効果が認められたという。一方、Ohtomo ら⁸⁾は、われわれのフラグメントに比して、2個のアミノ酸配列が異なるラット C-ペプチド I フラグメント (11-22) (Fig. 1) の効果を検索し、腎尿細管細胞の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性の増大を報告し

Rat C-peptide I 1-31 EVEDPQVPQLELGGGPEAGDLQTLALEVARQ
 Human C-peptide fragment 11-22 ELGGGPGAGSLQ
 Human C-peptide fragment 11-24 ELGGGPGAGSLQPL
 Rat C-peptide I fragment 11-22 ELGGGPEAGDLQ

Fig. 1 Amino acid sequence of rat C-peptide I, human C-peptide fragment (11-22), human C-peptide fragment (11-24) (by Ido, Y. et al.¹⁾) and rat C-peptide I fragment (11-22) (by Ohtomo, Y. et al.⁸⁾)

ている。C-ペプチドの生理活性発現に関する詳細なメカニズムは現在のところほとんど解明されていないが、C-ペプチドアミノ酸配列の中央部位に生理活性を有すると推定されている。Idoら¹⁾、Ohtomoら⁸⁾、そして本研究で用いられたC-ペプチドフラグメントのアミノ酸配列には若干の相違が見られるが、glycine-rich区域を有することが共通している。したがって、C-ペプチドのアミノ酸配列の中央部分のglycine-rich区域が生理活性の主要部位と推察される。今後、さらに、多種のC-ペプチドフラグメントを用い、検討を加える予定である。

結 語

ヒトC-ペプチドフラグメント(11-22)のインスリン作用に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、有意ではないが、糖尿病によるインスリン抵抗性が50%改善し、ラットC-ペプチドI効果の75%に相当した。

以上の結果は、C-ペプチドのアミノ酸配列の中央部分のglycine-rich区域にC-ペプチドの生理活性が存在する可能性を示唆している。

参 考 文 献

1) Ido, Y., Vindigni, A., Chang, K., Stramm, L., Chance,

- R., Heath, W.F., DiMarchi, R.D., Di Cera, E. and Williamson, J.R.: Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science* 277: 563-566, 1997.
- 2) Johansson, B.-L., Sjöberg, S. and Wahren, J.: The influence of human C-peptide on renal function and glucose utilization in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 121-128, 1992.
- 3) Johansson, B.-L., Linde, B. and Wahren, J.: Effects of C-peptide on blood flow, capillary diffusion capacity and glucose utilization in exercising forearm of Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 1151-1158, 1992.
- 4) Johansson, B.-L., Kernell, A., Sjöberg, S. and Wahren, J.: Influence of combined C-peptide and insulin administration on renal function and metabolic control in diabetes Type 1. *J Clin Endocrinol & Metab* 77: 976-981, 1993.
- 5) 李 玲、押田芳治、羅偉權、中尾千登世、B.-L. JOHANSSON、J. WAHREN、矢内原昇、佐藤祐造：ラットC-ペプチドのエンザイムノエッセイ測定法の確立。総合保健体育科学 20 (1): 85-90, 1997.
- 6) Ohtomo, Y., Aperia, A., Sahlgren, B., Johansson, B.-L. and Wahren, J.: C-peptide stimulates rat renal tubular $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity in synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia* 39: 199-205, 1996.
- 7) Oshida, Y., Ohsawa, I., Sato, J. and Sato, Y.: Effects of adrenalectomy on in vivo insulin-stimulated glucose utilization in relation to glycolysis in rat peripheral tissue. *Endocrine Journal* 40: 99-106, 1993.
- 8) Ohtomo, Y., Bergman, T., Johansson, B.-L., Jörnvall, H. and Wahren, J.: Biological effects of C-peptide fragments. Personal communication 1997.
- 9) Sato, Y., Oshida, Y., Li, L., Sato, J., Johansson, B.-L. and Wahren, J.: Effect of rat C-peptide on in vivo insulin action in diabetic rats. *Diabetologia* 39: A181, 1996.
- 10) Steiner, D.F. and Rubenstein, A.H.: Proinsulin C-peptide-biological activity? *Science* 277: 531-532, 1997.
- 11) Wu, W., Oshida, Y., Yang, W.-P., Li, L., Ohsawa, I., Sato, J., Iwao, S., Johansson, B.-L., Wahren, J. and Sato, Y.: Effect of C-peptide administration on whole body glucose utilization in STZ-induced diabetic rats. *Acta Physiol Scand* 157: 253-258, 1996.

(1997年12月12日受付)

