

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07689

研究課題名(和文) グルカゴン様ペプチドの分泌制御機構の解明とその動物生産への応用

研究課題名(英文) Clarification of glucagon-like peptide secretion system and its application to the animal production

研究代表者

平松 浩二 (HIRAMATSU, KOHZY)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：80238386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ小腸において、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) はニューロテンシン (NT) と同一細胞内に共局在する。しかし、これらの細胞群は主に小腸の陰窩に存在し、絨毛上皮ではNTのみを産生・分泌する細胞へと特殊化する。GLPの前駆体であるプログルカゴンのmRNA発現は、食餌中のアミノ酸の影響を受ける。また、全卵粉添加飼料の給餌により、小腸の吸収上皮細胞及び杯細胞が増殖傾向を見せることから、GLP-2分泌に食餌中のタンパク質が関与することが示唆された。これらの結果より、食餌中のタンパク質及びアミノ酸は、小腸L細胞からのGLP分泌を刺激することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Glucagon-like peptide (GLP)-1 coexisted with neurotensin (NT) in the same cell of the chicken small intestine. These cells mainly appeared in the crypt. They, however, specialized in cells which produce only NT in the villous epithelium. Amino acids in the diet influenced the expression of mRNA of proglucagon which is the precursor of GLP. Addition of whole egg powder induced the proliferation of enterocytes and goblet cells in small intestine. These results indicate that protein and amino acids in the diet stimulate the secretion of GLP from L cells in the chicken intestine.

研究分野：動物組織学

キーワード：グルカゴン様ペプチド 組織形態 内分泌 ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

グルカゴン様ペプチド(以下 GLP)には、GLP-1 と GLP-2 が存在する。GLP-1 は、インスリン分泌を刺激し、近年、2 型糖尿病の治療への応用が進められている(Baggio and Drucker, 2007)。また、GLP-2 は、腸管の吸収上皮細胞の増殖刺激作用やアポトーシス抑制作用を有しており、小腸機能の刺激因子として注目されている(Martin et al., 2004)。GLP は、食餌刺激により分泌される。その詳細を解明することは、臨床応用だけではなく、飼料効率を向上させ効率的な動物生産への応用にも有益であると考えた。研究代表者は、2000 年頃よりニワトリにおいて消化管内分泌細胞に関する形態学的な研究を行ってきた。特に GLP-1 についての研究を中心にを行い、以下の点を明らかにしている。

家禽の腸管では空腸及び回腸にのみ GLP-1 含有細胞が見られる (Hiramatsu et al., 2003)

空腸及び回腸の中では、肛門側になるほど分布密度が高くなる (Hiramatsu et al., 2005)

制限給餌により、回腸遠位部における GLP-1 含有細胞の分布密度は有意に減少する (Monir et al., 2013)

食餌中のタンパク質含量を低下させると回腸における GLP-1 含有細胞の分布密度も有意に減少した (Monir et al., 2014)

メチオニンやリジンを無タンパク質飼料に添加した食餌の強制投与は、通常飼料を摂取した際と同じ影響を回腸の GLP-1 含有細胞に示す(投稿準備中、日本畜産学会において口頭発表)。

以上の結果から、GLP-1 の産生・分泌には食餌の量と質の双方が影響することが明らかとなった。また、アミノ酸単独でも GLP-1 の分泌刺激を起こしうることを示唆された。さらに最近、研究代表者は、GLP-1 含有細胞の一部が、消化管の運動制御に関わる消化管ホルモンのひとつであるニューロテンシンと共存することを突き止めた。しかし、GLP と他のホルモンの細胞内の局在様式については未だ不明である。また、腸管壁の内在神経も腸管内分泌細胞とクロストークを持っていると言われているが、GLP-1 含有細胞との関連は不明である。これらの背景及び予備実験の中で今回の研究の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者は、インスリン分泌刺激や吸収上皮細胞の発達促進などの作用をもつグルカゴン様ペプチド(GLP)の分泌が食餌中のタンパク質量やアミノ酸添加に影響されることを形態学的手法により明らかにした。また、GLP がニューロテンシンと同一細胞内に共局在することも発見した。吸収上皮細胞の増殖にも関わるホルモンである GLP の分泌制御機構を解明し、飼料効率の向上など動物生産へ

の応用を目的として本研究は計画された。具体的には次の3点を研究項目として挙げる。

・GLP と他のホルモンの共局在を光学顕微鏡及び電子顕微鏡レベルで解明する

・アミノ酸添加飼料を与えた後の共局在の変化を解析する

・腸管の壁内神経と GLP 含有細胞との相関を解明する

3. 研究の方法

研究代表者は、インスリン分泌刺激や吸収上皮細胞の発達促進などの作用をもつグルカゴン様ペプチド(GLP)の分泌が食餌中のタンパク質量やアミノ酸添加に影響されることを形態学的手法により明らかにした。また、GLP がニューロテンシンと同一細胞内に共局在することも発見した。吸収上皮細胞の増殖にも関わるホルモンである GLP の分泌制御機構を解明し、飼料効率の向上など動物生産への応用を目的として本研究は計画された。具体的には次の3点を研究項目として挙げる。

・GLP と他のホルモンの共局在を光学顕微鏡及び電子顕微鏡レベルで解明する

・アミノ酸添加飼料を与えた後の共局在の変化を解析する

・腸管の壁内神経と GLP 含有細胞との相関を解明する

4. 研究成果

平成 27 年度は、GLP と他のホルモンの共局在の解明およびアミノ酸添加飼料を与えた後の共局在の変化の解析を目標として研究を行った結果、次の様な成果を得るに至った。

(1) . ニワトリ小腸において GLP-1 は、ニューロテンシンと共存するが、両者の生合成及び分泌の時機は異なることが免疫組織化学法、免疫細胞化学法及び in situ ハイブリダイゼーション法により明らかとなった。この結果は、生物科学系国際誌に投稿準備中である。また、この研究から派生した実験より、GLP-1 は小腸陰窩において生合成され、絨毛上皮では分泌されるのみであることが判明し、GLP 分泌細胞の陰窩-絨毛軸での動態が解明された。この結果は、Domestic Animal Endocrinology 誌 (IF2.171, Vol.56, 2016 年, pp70-74) に掲載された。

(2) . 無タンパク質飼料にメチオニンまたはリジンを添加した実験飼料を供試鶏に給与した後に、小腸における GLP の前駆体であるプログルカゴンの遺伝子発現を in situ ハイブリダイゼーション法で解析したところ、メチオニン及びリジン添加飼料群で無タンパク質飼料群よりも発現細胞数が増加し、通常飼料群と同程度となった。この結果は、獣医系国際誌に投稿準備中である。またこの研究から派生した実験より、全卵粉を飼料に添加し給与すると小腸の吸収上皮細胞及び杯細胞の増殖に影響することが明らかとなった。この結果は、北信越畜産学会報 (Vol.112, 2016 年, pp37-42) に掲載された。

(3) .GLP-1 とソマトスタチンまたは膵ポリペプチドとの共存について、免疫組織化学法及び免疫細胞化学法を用いて、解析中であるが、ソマトスタチンは GLP と共存しないことが現在までに判明している。

平成 28 年度は、次の様な成果を得た。

(1) .ニワトリ小腸の粘膜上皮には、GLP-1 とニューロテンシン(以下 NT)が共局在する内分泌細胞が存在する。これらの細胞群は、陰窩に主に存在し、絨毛上皮では NT のみを産生・分泌する細胞へと特殊化することが明らかになった。この結果は、Cell and Tissue Research 誌(IF2.948, Vol.368, pp277-286, 2017)に掲載されるに至っている。無タンパク質飼料およびこれにメチオニンまたはリジンを添加した飼料を給餌したニワトリにおける GLP-1 と NT の共存については、対照鶏と大きな変異を見せない傾向にあった。

(2) .メチオニンおよびリジンを無タンパク質飼料に添加した飼料を給餌したニワトリの回腸においてプログルカゴンの遺伝子発現を調べたところ、遺伝子を発現している細胞の分布密度は、対照群>メチオニン群>リジン群>無タンパク質群の順で高くなっていった。

(3) .GLP-1、NT、ソマトスタチン(以下 SOM)およびコレシストキン(以下 CCK)について共存関係を多重蛍光抗体法により調べたところ、GLP-1/NT/CCK と SOM/NT の 2 種類の内分泌細胞系に分けられることが分かった。

(4) .GLP-1 含有細胞と神経ペプチドのひとつである血管作用性腸ペプチド(以下 VIP)および酸化窒素作動性神経のマーカー酵素である一酸化窒素合成酵素(以下 NOS)を多重蛍光抗体法により回腸で検出したところ、GLP-1 含有細胞の近隣に VIP 免疫反応陽性神経線維が見出された。NOS 免疫反応陽性神経線維は筋層に主に認められ、GLP-1 含有細胞との連絡は認められなかった。

平成 29 年度には、次の様な成果を上げるに至った。

(1) .リジンまたはメチオニン添加がニワトリ回腸におけるプログルカゴン mRNA 発現に影響を与えることを明らかにした。また、この変化はグルカゴン様ペプチド(GLP)-2 の発現とほぼパラレルに推移することを明らかにした。

(2) .ニワトリ回腸において、神経ペプチド(VIP, NPY, SOM)および一酸化窒素合成酵素(NOS)の分布を免疫組織化学法により調べたところ、VIP 免疫反応陽性神経線維は粘膜上皮直下の固有層に豊富に見出された。NPY 免疫反応陽性神経線維は固有層に、SOM 免疫反応陽性神経線維は平滑筋層にそれぞれ見出された。また、NOS 免疫反応陽性神経線維が固有層と平滑筋層に見出された。VIP 免疫反応陽性神経線維が、GLP-1 免疫反応陽性細胞の近傍に見出されたが、直接の終末像は観察されなかった。

(3) .VIP 免疫反応陽性神経線維と GLP-1 免疫

反応陽性細胞の関連について、電子顕微鏡レベルで解析を行ったが、両者の間にシナプス構造は見出されなかった。

(4) .本研究からの派生実験として、ニワトリ、コリンウズラ及びダチョウの 3 種類の鳥類において膵臓における GLP-1 受容体の局在を免疫組織化学法により調べたところ、どの鳥類においても膵 D 細胞に GLP-1 受容体の局在が確認され、鳥類における GLP-1 の効果組織は、哺乳類とは異なり膵 D 細胞であることが明らかになった。この結果は、Journal of Poultry Science 誌に投稿し、掲載許可された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Watanabe T, Hiramatsu K, Nishimura K, Ono T, Expression of glucagon-like peptide-1 receptor in pancreatic D cells of three avian species; white leghorn chickens, Bobwhite quail and common ostriches. The Journal of Poultry Science (2018) in press. 査読有 .
2. Nishimura K, Hiramatsu K*, Watanabe T, Kita K. Glucagon-like peptide-1 is co-localized with neurotensin in the chicken ileum. Cell and Tissue Research (2017) 368:277-286. 査読有 .
3. 仁木小春・平松浩二・西村佳・渡邊敬文・伊藤謙・喜多一美・ホエイ投与がニワトリ消化管粘膜に与える影響 . 北信越畜産学会報(2016)112:37-42 . 査読有 .
4. Nishimura K, Hiramatsu K*, Watanabe T. Dynamics of L cells along the crypt-villous axis in the chicken ileum. Domestic Animal Endocrinology (2016) 56:70-74. 査読有 .

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1 . 平松浩二・渡邊亮・渡邊敬文 . 食餌中のタンパク質がニワトリ小腸におけるプログルカゴン mRNA 発現に与える影響 . 日本畜産学会第 124 回大会, 2018.3.28 .
- 2 . 平松浩二・渡邊敬文・岩田誠 . ニワトリ小腸におけるペプチドホルモンの共局在 . 日本畜産学会第 123 回大会, 2017.9.7 .
- 3 . 平松浩二・Monir Mohammad M・渡邊敬文 . 飼料中蛋白質含量がニワトリ小腸の GLP-2 含有細胞に与える影響 . 日本畜産学会第 122 回大会 2017.3.28 .
- 4 . 平松浩二・八木暁大・西村佳・渡邊敬文 . ニワトリ小腸における味覚受容細胞の分布 . 日本家禽学会 2016 年秋季大会 2016.9.16 .
- 5 . 西村佳・平松浩二・渡邊敬文 . ニワトリ回腸におけるグルカゴン様ペプチド 1 及びニューロテンシンの共局在に関する定量解析 . 第 159 回日本獣医学会学術集会 . 2016.9.8 .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 浩二 (HIRAMATSU, Koji)
信州大学・学術研究院農学系・教授
研究者番号：80238386

(2) 連携研究者

喜多 一美 (KITA, Kazumi)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：20221913

渡邊 敬文 (WATANABE, Takafumi)
酪農学園大学・獣医学部・准教授
研究者番号：50598216