

令和元年6月14日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09775

研究課題名(和文)新規グルカゴン様血糖調節ペプチドの同定と生理機能の解析

研究課題名(英文)Identification and functional analysis of novel glucagon-like peptide

研究代表者

小林 雅樹 (Kobayashi, Masaki)

群馬大学・生体調節研究所・講師

研究者番号：80373041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プログルカゴン遺伝子欠損マウスの血漿に対しグルカゴンのイムノアッセイを行ったところ、サンドイッチELISAではグルカゴンは検出されなかったのに対し、2つの異なる競合法イムノアッセイキットにおいてはグルカゴンが検出された。一方で、プログルカゴン遺伝子欠損マウスの胃抽出物において、イムノアッセイの陽性反応が観察された。さらに、プログルカゴン欠損マウスの様々な臓器において様々な抗グルカゴン抗体を用いて免疫染色を行った結果、現在までに胃の一部においてグルカゴン陽性細胞が観察されている。プログルカゴンに由来しないグルカゴン様の構造を有する分子が胃で産生されている可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルカゴンは血糖調節に重要な働きをしているにもかかわらず、測定系の精度が低かったため、プログルカゴン由来の関連ペプチドとの交差反応により不正確な値が測定されると考えられていた。本研究によりプログルカゴンに由来しない、グルカゴン様の構造を有する分子が生体内に存在する可能性が明らかになった。この分子はグルカゴンに似た構造を有することでグルカゴン受容体を介して血糖調節に関わる可能性もあり、新しい血糖調節メカニズムの発見につながる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：When glucagon immunoassays were performed on plasma of proglucagon gene-deficient mice, positive reaction was undetected by sandwich ELISA, whereas detected in two different competitive immunoassay kits. On the other hand, in the gastric extract from proglucagon gene-deficient mice, positive reaction of the immunoassay was detected. Furthermore, by immunohistological analyses using various anti-glucagon antibodies in proglucagon-deficient mice, glucagon-positive cells have been observed in stomach. It is suggested that a glucagon like-molecule underived from proglucagon may be synthesized in the stomach.

研究分野：糖尿病

キーワード：グルカゴン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病においては、インスリン分泌の障害に加えてグルカゴン分泌抑制の障害も認められる。そのために生じるグルカゴンの過剰な分泌は、肝臓からの糖新生を亢進させることで血糖値の更なる上昇を引き起こすと考えられる。特に、細胞破壊動物は高血糖と共に高グルカゴン血症を示すことが知られているが、抗グルカゴン抗体の投与(Brand et al. Diabetes. 1996)、レプチンや GLP-1 製剤によるグルカゴン分泌抑制(Yu et al. PNAS. 2008; Wang et al. PNAS 2015)により血糖値が低下することが報告されている。さらには細胞破壊を行った膵細胞欠損マウス(Hancock et al. Mol Endocrinol 2010)、およびグルカゴン受容体欠損マウス(Conarello et al. Diabetologia 2007, Lee et al. Diabetes 2011) がインスリン分泌低下にもかかわらず正常血糖を維持することが明らかにされ、グルカゴン分泌異常こそが糖尿病の原因であるとする「グルカゴン中心説」が提唱されている(Unger and Cherrington. J Clin Invest 2012)。

糖尿病におけるグルカゴンシグナリングの重要性が認識されている一方で、膵細胞研究(グルカゴン分泌研究)は細胞研究(インスリン分泌研究)に比べ非常に遅れている。その最大の理由として、現行のグルカゴン測定系の信頼性が低いことが挙げられる。グルカゴンは前駆体であるプログルカゴンがプロセッシングされて産生されるため、グルカゴンと共通のアミノ酸配列を持つ分子が複数存在する。そのため、従来のグルカゴン測定は、グルカゴンの C 末端構造がオキシントモジュリンやグリセチンと異なることを利用し、グルカゴン C 末端特異的抗体を用いたイムノアッセイにより行われている(以下、従来法)。しかし、血漿をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離し、各分画ごとに従来法で測定を行うと、グルカゴンとは分子量の異なる免疫陽性分画が複数存在することが知られている(Valverde et al. J Clin Endocrinol Metab 1974)。そのため従来法ではグルカゴンとは異なる分子も同時に測定していたという問題点が指摘されており(Edgerton and Cherrington. Nat Med 2013; Campbell and Drucker. Nat Rev Endocrinol 2015)、より精度の高い測定系によるグルカゴン分泌動態の検証が求められている。

そのため申請者はグルカゴンの C 末端と N 末端それぞれに対するモノクローナル抗体を用いることで反応特異性を大きく向上させたグルカゴンサンドイッチ ELISA を開発した(以下、新開発法)。この新開発法により測定したヒトやマウスの血中グルカゴンの変動は、従来法による測定結果とは大きく異なるものであった。特に、ストレプトゾトシンによる細胞破壊マウスについて新開発法による血中グルカゴンの測定を行った結果、従来法で測定される高グルカゴン血症は認められず、逆にコンロトールマウスより低値を示すことが明らかになった(未発表データ)。さらに自己免疫機序により 1 型糖尿病を発症する NOD マウスも同様の結果となった(未発表データ)。これらの結果より、細胞破壊によるグルカゴンの C 末端抗体に結合する分子の増加がグルカゴン血症として認識されていたと考えられる。

先に述べたゲル濾過クロマトグラフィーによる分離血漿のグルカゴン免疫陽性分画の分布(Valverde et al. J Clin Endocrinol Metab 1974; Bajorunas et al. Diabetes 1986) よりグルカゴン C 末端抗体結合分子はペプチドであると推測されるが、このペプチドはこれまでに同定されておらず、生理機能についても不明である。しかし、グルカゴンの C 末端構造は受容体との結合に重要であることから(Huang et al. Diabetes 1986) このペプチドがグルカゴン受容体を介して膵細胞破壊マウスの高血糖に関わっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまでグルカゴンとして測定されてきたグルカゴン抗体結合分子を同定するとともに、その生理機能、特に血糖調節に関わる役割を明らかにを行う。

3. 研究の方法

グルカゴン抗体結合分子を多く含む組織を明らかにし、その組織を材料としてグルカゴン抗体を用いたアフィニティカラム精製および逆相 HPLC による目的分子の単離と、質量分析器による同定を行う。グルカゴン抗体結合分子の生理的な機能を、マウスによる *in vivo* の実験系と培養細胞による *in vitro* の実験系により明らかにする。さらに、同定した分子の特異的抗体を作製し、作製した抗体とグルカゴン C 末端抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法に基づく特異的な測定系を作製する。この測定系を用いて、個体の栄養状態の変化や糖尿病モデルマウスの糖尿病状態の推移に伴うグルカゴン C 末端抗体結合ペプチドの変化を測定し、血糖値の変化との関連を解析する。

4. 研究成果

サンドイッチ ELISA であっても抗体による非特異的な反応を完全に除外することが不可能なため、測定結果の信頼性についての評価を行うことが困難であり、このことはグルカゴン抗体に交差するグルカゴン類似分子の同定を目指す本研究課題においても大きな問題であった。そこで抗体を用いない新たな測定系として、質量分析装置を用いたグルカゴン測定系を開発した。血漿中のグルカゴン濃度について質量分析装置と既存のイムノアッセイとの比較検討を行ったところ、サンドイッチ ELISA の測定値とは一致はしないものの比較的良好的な相関を示す一方で、競合法イムノアッセイとの相関は低いものであった。

さらにプログルカゴン遺伝子欠損マウスの血漿に対しイムノアッセイを行ったところ、サン

ドイツ ELISA ではグルカゴンは検出されなかったのに対し、2つの異なる競合法イムノアッセイキットにおいてはグルカゴンが検出された。一方で、プログルカゴン遺伝子欠損マウスの胃抽出物において、サンドイッチ ELISA に交差するペプチドが存在している可能性が明らかになった。さらに、プログルカゴン欠損マウスの様々な臓器において様々な抗グルカゴン抗体を用いて免疫染色を行った結果、現在までに胃の一部においてグルカゴン陽性細胞が観察されている。プログルカゴンに由来しないグルカゴン様の構造を有する分子が胃で産生されている可能性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

小林雅樹、菊池司、稲垣貴之、河野大輔、三重野園理、宮地淳、林良敬、佐々木努、北村忠弘、新規開発測定系を用いた血糖変化に伴う血中グルカゴン変動の再検証、第 60 日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年

小林雅樹、三重野園理、宮地淳、稲垣貴之、菊池司、河野大輔、林良敬、佐々木努、北村忠弘、グルカゴンの新規測定系開発および血糖変化に伴う分泌変動、第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017 年

小林雅樹、三重野園理、宮地淳、稲垣貴之、菊池司、河野大輔、林良敬、佐々木努、北村忠弘、グルカゴンの新規測定系開発および血糖変化に伴う分泌動態の解析、第 41 回日本比較内分泌学会大及びシンポジウム、2016 年

小林雅樹、井田隆徳、菊池司、林良敬、佐々木努、北村忠弘、新規開発測定系を用いた血糖変化に伴うグルカゴン分泌動態の解析、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
群馬大学生体調節研究所 代謝シグナル解析分野
<http://taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。