

令和元年6月16日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19527

研究課題名(和文) short-form GIPの測定系の確立による分泌機構と生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Development of specific ELISA for short-form GIP and elucidation of its secretion in human

研究代表者

竹田 安孝 (Takeda, Yasutaka)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：90431402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：short-form GIPである、GIP (1-30)のヒトにおける分泌動態は明らかではない。今回GIP (1-30)に特異的なELISA系を開発し、その分泌動態を検証した。正常耐糖能者、2型糖尿病患者で経口糖負荷試験、クッキー試験を行い、末梢血中のGIP (1-30)濃度を測定した。糖負荷およびクッキー負荷によりGIP (1-30)の分泌が増加することが明らかとなった。またGIP (1-42)に比しGIP (1-30)の末梢血中濃度は低値であることが明らかとなった。既知のインクレチンと同様にGIP (1-30)の分泌はDPP-4阻害薬により増加することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてGIP (1-30)のELISA系を確立し、さらにヒトにおけるGIP (1-30)の分泌動態を世界に先駆けて明らかにした。GIP (1-30)が経口での糖の摂取や糖・蛋白質・脂質混成食の摂取により分泌が促進されること、即ち経口でのこれらの負荷がGIP (1-30)の分泌刺激となることや、GIP (1-42)とは末梢血中濃度が大きく異なること、既知のインクレチンと同様にDPP-4阻害薬によって分泌が増加することを見出した。以上の知見は、糖代謝における新たな調節因子としてのGIP (1-30)の役割の一端を明らかにするもので、糖尿病の病態や病因の解明の一助となる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：The secretion of short-form gastric inhibitory polypeptide (GIP) (1-30) in human remains unclear. We developed an ELISA specific for GIP (1-30) and measured GIP (1-30) secretion during oral glucose tolerance test and cookie meal test in non-diabetics and type 2 diabetics. After both glucose and cookie load, GIP (1-30) blood levels increased. Interestingly, the increases of GIP (1-30) were much lower than those of GIP (1-42). Similarly to known incretins, the DPP-4 inhibitor increased blood GIP (1-30) levels.

研究分野：代謝・内分泌

キーワード：GIP (1-30) インクレチン ELISA 糖代謝

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

### 1. 研究開始当初の背景

GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) と GLP-1 (glucagon-like peptide-1) は、食事摂取に伴い小腸より分泌され、血糖依存性に膵細胞におけるインスリン分泌を促進する腸管ペプチドで、インクレチンとして知られている<sup>1)</sup>。摂食後のインスリン分泌の約 50% はインクレチンを介したものと考えられており、糖代謝において重要な役割を担っている。

GIP は 42 アミノ酸配列を有するペプチドホルモンで、小腸の K 細胞より分泌される。近年、30 アミノ酸配列を有する、'short-form GIP' である GIP (1-30) が膵細胞に発現し、パラクラインでインスリン分泌を促進することが報告された<sup>2)</sup>。また我々は外因性 GIP (1-30) の投与が糖尿病動物モデルの膵細胞死および膵細胞増生を抑制することで、高血糖を是正することを報告した<sup>3)</sup>。このように GIP (1-30) が糖代謝において重要な役割を果たしていることが想定されるが、GIP (1-30) の測定系は確立されておらず、ヒトにおける分泌動態や分泌調節機構は明らかではない。

### 2. 研究の目的

GIP (1-30) に対する特異的抗体を作成することで新規 ELISA 法を作成、GIP (1-30) の測定系を確立し、ヒトにおける GIP (1-30) の分泌動態を明らかにするとともに、糖尿病状態における分泌異常の有無およびその機序を探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) GIP (1-30) に高い特異性を有する ELISA 法の開発

既存の GIP (1-42) の N 端を認識する抗体に加え、新たに GIP (1-30) の C 端を特異的に認識する抗体を作成し、これら 2 種の抗体を用いたサンドイッチ法による特異的 ELISA 測定系を作成する。

#### (2) ヒトにおける GIP (1-30) の生理的分泌動態および糖尿病状態における分泌動態の検証

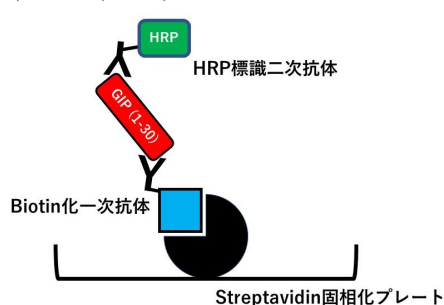
健常者、2 型糖尿病患者において 75g 経口糖負荷試験 (75g OGTT)、食事負荷試験、クッキーミール負荷試験 (CMT) を行い、得られた血液検体を本研究で確立した ELISA 法を用いて GIP (1-30) の血中濃度を測定する。また同様に既存のイムノアッセイ法 (RIA, ELISA)、バイオアッセイ法でも測定し、差異について検証する。HOMA- $\beta$ 、Insulinogenic index 等のインスリン分泌指標、Disposition index 等の細胞機能、HOMA-IR、QUICKI、Matsuda index 等のインスリン感受性の指標を算出し、GIP (1-30) の分泌動態との関連を検討する。

#### (3) GIP (1-30) の分泌機構、他臓器との関連について検証する

培養細胞および単離膵島を用いて、各種アミノ酸、脂肪酸、胆汁酸や膵・消化管ホルモン (インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、GLP-1、GLP-2、ガストリン、グレリン、CCK、PYY 等) を培養液に添加後、培養液を回収し、本研究で確立したアッセイ法で GIP (1-30) を測定する。正常耐糖能動物および糖尿病動物モデル間における膵および腸管組織における GIP の発現を免疫組織学的に検討するとともに、動物モデルからの単離膵島や摘出膵・腸管等における GIP (1-30) の組織・臓器含量を測定、比較する。

### 4. 研究成果

#### (1) GIP (1-30) に高い特異性を有する ELISA 法の開発

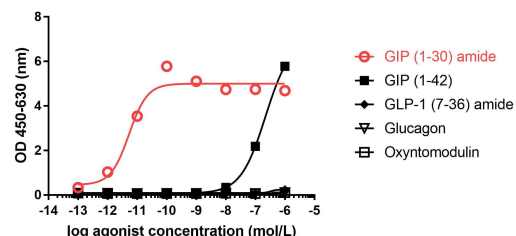


GIP (1-30) に特異性の高い ELISA 法を構築する上で、既存の GIP (1-42) の N 端を認識する抗体に加え、新たに GIP (1-30) の C 端を特異的に認識する抗体を作成し、これら 2 種の抗体によるサンドイッチ法による特異的 ELISA 系を作成する方針とした。

GIP (1-30) の C 末端ペプチドとして、GIP (24-30) ペプチド (8mer, CNWLLAQK-NH<sub>2</sub>, 分子量 974.2) を合成した。ウシサイログロブリンをキャリア蛋白として GIP (24-30) を BDF1 マウス、BALB/c マウス、Wister Rat に免疫を行い、いずれにおいても抗原固

相 ELISA にて抗体価上昇が確認された。

最終免疫、細胞融合に進み、スクリーニングアッセイにおいて Wister Rat においてのみ  $\beta$  GIP (1-30) amide の C 端特異的抗体をクローニングした。最終的に 2 種の特異抗体を樹立し、同クローン由来 IgG を用いたサンドイッチ ELISA を構築した (上図)。



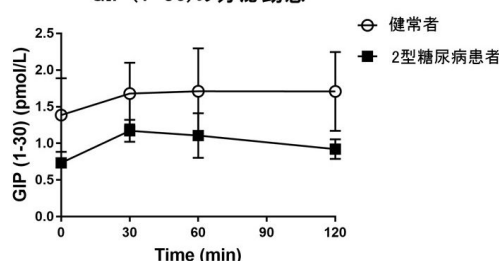
次に, GIP (1-30) amide のほか, 既知のインクレチンである GIP (1-42)、GLP-1 (7-36) amide, またグルカゴン関連 peptide としてグルカゴン, oxyntomodulin を用いて交差性を検証した。前頁末尾の図の通り, 交差性の検証において, GIP (1-42), GLP-1 (7-36) amide, グルカゴン関連 peptide の添加による吸光度上昇は観察されず, GIP (1-30) amide の添加でのみ, 用量依存性の吸光度上昇を認めた (前頁末尾の図)。本結果より, GIP (1-30) に高い特異性を有する ELISA を開発したと言える。

## (2) ヒトにおける GIP (1-30) の生理的分泌動態および糖尿病状態における分泌動態の検証

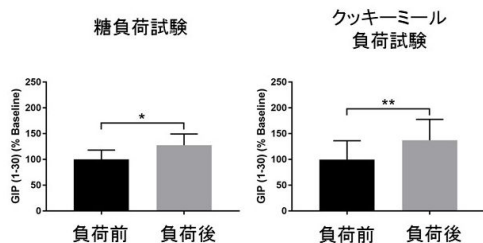
健常者 2 型糖尿病患者を対象とし, 75g OGTT, CMT (糖質 75g, 脂質 28.5g, 蛋白質 8.5g) を行い, 負荷前後での末梢血中 GIP (1-30) 濃度を本研究で開発した ELISA を用いて測定した。また, GIP (1-42) 濃度, GLP-1 濃度を測定し, GIP (1-30) 濃度と比較・検証した。

75g OGTT, CMT において健常者, 2 型糖尿病患者とともに, 負荷後の GIP (1-30) 濃度の有意な増加がみられた。即ち, 経口での糖負荷や, 糖・脂質・蛋白質の混成食の負荷が, GIP (1-30) の分泌促進因子であることが示唆された (右図および下図)。

クッキーミール負荷試験における GIP (1-30) の分泌動態



さらに興味深いことに, 75g OGTT における健常者の負荷前, 負荷後頂値の GIP (1-42) 濃度は  $9.5 \pm 0.5$  pmol/L,  $95.5 \pm 9.5$  pmol/L であったのに対し, GIP (1-30) 濃度はそれぞれ  $1.2 \pm 0.2$  pmol/L,  $1.5 \pm 0.3$  pmol/L と低値であった。また CMT においても, 健常者の負荷前, 負荷後頂値の GIP (1-42) 濃度は  $8.2 \pm 0.1$  pmol/L,  $204.0 \pm 35.2$  pmol/L であったのに対し, GIP (1-30) 濃度はそれぞれ  $1.4 \pm 0.5$  pmol/L,  $1.9 \pm 0.6$  pmol/L と同様に低値であった。この結果より, 末梢血中の GIP (1-42) 濃度と GIP (1-30) 濃度の間には大きな差異があることが明らかとなった。



また, area under the curve (AUC) でみた CMT における GIP (1-30) の分泌は, 健常者  $199.5$  pmol/L  $\times$  min に対し, 2 型糖尿病患者では  $123.6$  pmol/L  $\times$  min と低下傾向を示した。これは, 耐糖能の差異により GIP (1-30) の分泌動態が異なる可能性が示唆されたもので, 非常に興味深い。

さらに, 正常耐糖能者および 2 型糖尿病患者とともに DPP-4 阻害薬の服用による GIP (1-30) 濃度の有意な増加がみられ, GIP (1-30) もまた, 既知のインクレチンと同様, DPP-4 による調節を受けている可能性が示唆された。

本研究において, 新たなインクレチンとも言うべき GIP (1-30) の ELISA 系を確立した。さらに本 ELISA を用いてヒトにおける GIP (1-30) の分泌動態を世界に先駆けて明らかにした。

GIP (1-30) は, おそらくパラクラインを中心に膵細胞におけるインスリン分泌を促進し, 糖代謝の恒常性維持に寄与している可能性がある<sup>2)</sup>ほか, 我々の研究<sup>3)</sup>からも GIP (1-30) は膵島に対する保護作用を有するものと考えられている。

本研究において, GIP (1-30) が経口での糖の摂取や糖・蛋白質・脂質混成食の摂取により分泌が促進されること, 即ち, 経口でのこれらの負荷が GIP (1-30) の分泌刺激となること, GIP (1-42) とは末梢血中の濃度が大きく異なること, 既知のインクレチンと同様に DPP-4 阻害薬によって分泌が増加すること, さらに耐糖能の差異により分泌動態が異なる可能性があることを明らかにした。

以上の知見は, 生体の恒常性維持, 特に糖代謝における新たな調節因子としての GIP (1-30) の役割の一端を明らかにしたのみならず, 糖尿病における病態, 病因の解明の一助となる可能性を有するものと考えられる。

今後の展望として, 本研究を発展する形で *in vitro* での検討により GIP (1-30) の分泌調節因子を解明すること, さらにそれらを応用した新規糖尿病治療薬候補の探索を掲げたい。この研究は, 糖尿病患者の健康寿命の延伸に寄与する可能性を有するものと考えている。

本研究で得られた GIP (1-30) の分泌動態に関する新たな知見について, 第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会 (仙台市, 2019 年), および American Diabetes Association 79<sup>th</sup> Scientific Sessions (San Francisco, 2019) にて発表した。現在, 学術論文としての投稿準備中である。

<引用文献>

- 1) Baggio LL, Drucker DJ. *Gastroenterology* 132: 2131-2157, 2007
- 2) Fujita Y, Wideman RD, Asadi A, Yang GK, Baker R, Webber T, Zhang T, Wang R, Ao Z, Warnock GL, Kwok YN, Kieffer TJ. *Gastroenterology* 138: 1966-1975, 2010
- 3) Yanagimachi T, Fujita Y, Takeda Y, Honjo J, Atageldiyeva KK, Takiyama Y, Abiko A, Makino Y, Kieffer TJ, Haneda M. *Diabetologia* 59: 533-541, 2016

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 竹田安孝, 他 . short-form GIP の測定系の確立とヒトにおける分泌動態の検討 . 第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会 ( 仙台市 ), 2019 年
- 2) Takeda Y et al. Secretion of the short-form gastric inhibitory polypeptide in non-diabetic and diabetic subjects. American Diabetes Association 79<sup>th</sup> Scientific Sessions, San Francisco, 2019

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。