

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間： 2008 ～ 2009

課題番号：20890011

研究課題名（和文） 小腸インクレチン細胞における転写および分泌調節機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of Transcriptional and Secretary Regulation in Gut Incretin Producing Cells.

研究代表者

藤田 征弘（ YUKIHIRO FUJITA ）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20451461

研究成果の概要（和文）：GIP を産生する K 細胞では Pdx1 と Pax6 がその転写に重要であることを見だし、転写活性機構を明らかにした。また、GLP-1、GIP の分泌機構に甘味受容体の関与が報告されているが、ブドウ糖以外の甘味料がインクレチン分泌を促さないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Two transcription factors Pdx1 and Pax6 play pivotal roles for GIP gene regulation. Some reports showed that the sweet taste receptor is involved in sugar-induced incretin secretion, however, we indicated that sweeteners, which surly bind to the receptor, do not enhance incretin release in rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：

インクレチン、GIP、GLP-1、転写因子、小腸糖代謝、甘味受容体

1. 研究開始当初の背景

GLP-1(Glucagon-like peptide-1) と GIP(Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) は小腸から分泌される腸管

ホルモンで、これらのホルモンは食事由来の刺激により小腸の L 細胞(GLP-1)と K 細胞(GIP)から門脈血中に分泌され、膵臓ランゲルハンス島のβ細胞からそれぞれの G

蛋白共役性受容体を介して血糖依存性にインスリンの合成及び分泌を促進する。この作用は“インクレチン”作用といわれる。インクレチン分泌細胞の発生・分化のメカニズムに関する研究は発展途上である。L 細胞は下部小腸→大腸に多く発現する。GLP-1 は腸管増殖因子である GLP-2 とともに前駆ペプチドのプログルカゴンが切断酵素である PC1 (Prohormone Convertase 1) で切断され分泌される。なお膵 α 細胞から分泌されるグルカゴンは同じプログルカゴンが PC2 で切断され分泌される。プログルカゴンの遺伝子発現には様々な転写因子がかかわっており、それが膵 α 細胞や L 細胞の発生・分化にかかわっていると考えられる。GIP の遺伝子発現には膵臓の発生に重要な転写因子である Pdx1 が重要と報告されているが、詳細の転写機構は明らかでない。

一方インクレチンの分泌は食事由来のブドウ糖等の糖質や脂質によって誘発されるが、内因性のインクレチンの分泌を促進させる機構は明らかにされていない。したがって内因性のインクレチンの分泌を促進させて糖代謝を改善させるアプローチは基礎的にも臨床的にもまだ行われていない。

2. 研究の目的

インクレチン分泌細胞の分化・転写メカニズムを解明し、さらに分泌促進のメカニズムを明らかにして糖尿病を代表とする糖代謝異常の治療の新しいアプローチに応用することである。

3. 研究の方法

転写メカニズムについて以下の検討を行った。まず、ヒト十二指腸及びラット全小腸について Pax6 及び Pdx1 の免疫組織的検討を行い、GIP 分泌細胞と GLP-1 分泌細胞で比較検討した。プロモーター活性機構の探求のため、ヒト GIP プロモーターを BAC ライブラリーから単離し pGL4 ルシフェラ

ーゼベクターにクローニングした。小腸未分化株である IEC-6 と GIP 陽性小腸内分泌細胞株である STC-1 を用いて Pax6 及び Pdx1 の GIP 転写活性作用を、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。さらにゲルシフト法にてこれらの転写因子がヒト近位 GIP プロモーターに結合するか検討した。

分泌メカニズムについては以下の検討を行った。まず、小腸における甘味刺激のシグナル分子である α -gustducin の発現について免疫組織的検討を行った。生理学的検討を行うため、正常ラットに経口ブドウ糖負荷試験 (1 g/kg)、腹腔ブドウ糖 (1 g/kg) 単独負荷試験または経口甘味料+腹腔ブドウ糖負荷試験を行い経時的に血糖値を測定し比較した。また 2 型糖尿病モデルである Zucker diabetic fatty ラットに甘味料を経口投与し血糖値の変化を観察した。さらに正常ラットに経口ブドウ糖投与または経口甘味料投与を行い、血中 GIP および GLP-1 濃度を ELISA にて測定し比較した。

4. 研究成果

転写メカニズム

GIP 陽性細胞は常に Pax6、Pdx1 を共発現していた。ヒト、ラット十二指腸において Pdx1 は GIP 陽性細胞だけでなく多くの粘膜上皮細胞で陽性であった。このことは、Pdx1 のみでは、GIP 発現に不十分であることを示唆している。一方 Pax6 の発現はほぼ GIP 陽性細胞に限定されていた。ラット空腸では、Pdx1 は GIP 陽性細胞にのみ発現していた。回腸では約 30% の GLP-1 陽性細胞が GIP を共発現しており、それらは Pax6、Pdx1 とも陽性であった。このことは Pdx1 が GLP-1 の発現を抑制しないことを示している。一方、GLP-1 陽性 GIP 陰性細胞では Pax6 のみ陽性で、Pdx1 は発現していなかった。興味あることにマウス網膜でも GIP の免疫染色陽性細胞を認め、GIP 陽性細胞は Pax6 と Pdx1 を共発現していた。小腸内分泌細胞株 STC-1 では、GIP、Pax6、

Pdx1 の発現を免疫染色および RT-PCR で認めたが、小腸未分化細胞株 IEC-6 ではすべて陰性だった。STC-1 は IEC-6 に比較し 40 倍の GIP 転写活性を示した。IEC-6 では Pax6 及び Pdx1 の強制発現によって、それぞれ 6 倍及び 4 倍の GIP 転写活性が上昇した。また、STC-1 において優性阻害型 Pax6 の強制発現は GIP 転写活性を約 70% 抑制した。STC-1 において GIP-184 から GIP-145 のプロモーター切断によって転写活性は 90% 低下した。ゲルシフト法により Pax6 及び Pdx1 が近位 GIP プロモーター (-193/-138) に結合することを確認した。

Pax6 の強制発現はプログルカゴンの転写活性を 25 倍上昇させたが、Pdx1 は上昇させなかった。STC-1 において優性阻害型 Pax6、Pdx1 の強制発現は GIP 転写活性をそれぞれ約 70%、20% 抑制した。優性阻害型 Pax6 はプログルカゴン転写活性を約 70% 抑制したが、優性阻害型 Pdx1 は転写活性に影響を与えなかった。以上のことより、Pax6 は GIP およびプログルカゴン両方の転写活性に重要であることが明らかになった。一方 Pdx1 はプログルカゴンの転写活性には影響を及ぼさなかった。

分泌メカニズム

α -gustducin は小腸でも発現しており、GIP 陽性 K 細胞の約 1/3 は α -gustducin を共発現していた。正常ラットにおいて種々の経口甘味料 + 腹腔ブドウ糖共負荷では腹腔ブドウ糖単独負荷と血糖値の推移は変わらず、経口ブドウ糖負荷と比較して 15 分と 30 分で有意に血糖値が高値であり、甘味料によるインクレチン効果を認めなかった。一方、スクラロールとステビアの経口投与は Zucker diabetic fatty ラットの随時血糖値に有意な変化を与えなかった。正常ラットにおいてブドウ糖は経口負荷後 10 分で GIP と GLP-1 の血中濃度をそれぞれ約 4 倍と約 2.5 倍負荷前に比較して有意に上昇させたが、甘味受容体のアゴニストである甘味料はインクレチンの

血中濃度を上昇させなかった。これらの結果から、甘味受容体のアゴニストである甘味料の単回投与によって糖代謝におけるインクレチン効果、GIP および GLP-1 分泌の促進効果は認めなかった。少なくとも甘味受容体が急性のインクレチン分泌に関与していないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Fujita Y, Wideman RD, Speck M, Asadi A, King DS, Webber TD, Haneda M, Kieffer TJ. 'Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo.' **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Mar ;296(3):E473-9, 2009

2. Fujita Y, Chui JWY, King DS, Zhang T, Seufert J, Pownall S, Cheung AT, Kieffer TJ. 'Pax6 and Pdx1 are required for production of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in proglucagon-expressing L cells.' **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 295:E648-657, 2008

[学会発表] (計 3 件)

1. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術総会
平成 20 年 5 月 22-24 日 東京 東京フォーラム

転写因子 Pax6 と Pdx1 はともに GLP-1 分泌細胞 (L 細胞) における GIP 共発現に重要である

藤田征弘、羽田勝計、Timothy J Kieffer

2. American Diabetes Association, 68th Scientific Sessions
San Francisco, California, June 6-10, 2008

Incretin Release from Gut is Enhanced by Sugar but Not by Sweeteners In Vivo

Fujita Y, Speck S, Asadi A, Webber TD, Kieffer TJ.

3. 第52回日本糖尿病学会年次学術総会
平成21年5月21-24日 大阪 国際
会議場

甘味受容体アゴニストは糖質と異なり GIP
および GLP-1 の分泌を促進しない

藤田 征弘, Wideman RD, Asadi A, Speck
M, 羽田 勝計, Kieffer TJ.

〔図書〕(計1件)

藤田 征弘、羽田 勝計。月刊糖尿病 別
冊インクレチン；インクレチンの分泌機構
20-28 医学出版、2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 征弘 (YUKIHIRO FUJITA)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：20451461

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：