

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08856

研究課題名（和文）グルカゴン関連ペプチドの糖尿病、肥満における病態生理的意義の解明

研究課題名（英文）Pathophysiological significance of glucagon related peptide in diabetes and obesity

研究代表者

橋本 博美（横田博美）（Hashimoto, Hiromi）

群馬大学・生体調節研究所・助手

研究者番号：30323372

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：プログルカゴンからはグリセンチンやオキシントモジュリンといったグルカゴン関連ペプチドも産生されている。これらのグルカゴン関連ペプチドの血中濃度を正確に測定できるサンドイッチ ELISA 系の開発を行なった。まず、オキシントモジュリンの N 末端をエピトープ認識する高感度、高特異性のモノクローナル抗体の獲得に成功した。次に、オキシントモジュリンとグリセンチンの C 末端を認識する抗体の作成を試みてきたが、高感度、高特異性抗体の獲得に至らず、現在も挑戦中である。今後はこれらのホルモンの生理的動態、及び 2 型糖尿病患者や肥満との関連を解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、グルカゴン関連ペプチドの血中濃度の正確な測定系は存在せず、その生理動態や病態生理的意義は全く不明であった。さらに、2 型糖尿病や肥満病態との関連性も分かっておらず、これらを明らかにすることができれば、糖尿病、肥満に対する新しい診断法や予防法、治療法の開発につながる可能性があり、社会的意義が大きい。本研究は高感度、高特異性抗体の作成途中であり、今後も継続する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Glucagon-related peptides such as glicentin and oxyntomodulin are also produced from proglucagon. We tried to develop sandwich ELISA systems that can accurately measure plasma levels of these glucagon-related peptides. First, we succeeded to obtain highly sensitive and highly specific monoclonal antibodies that recognizes the N-terminal epitope of oxyntomodulin. Next, we attempted to create antibodies that recognize the C-terminals of oxyntomodulin and glicentin, but we were unable to obtain highly sensitive and highly specific antibodies, and therefore we are still trying to do so. In the future, we plan to analyze the physiological dynamics of these hormones and their relationship with type 2 diabetes and obesity.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：グリセンチン オキシントモジュリン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

血糖上昇作用をもつグルカゴンと、逆に血糖降下作用を持つ GLP-1 はともにプログルカゴンから産生されているが、両者は食欲抑制、体重減少作用に関しては同じである。一方、図1に示すようにプログルカゴンからはグリセンチンやオキシントモジュリンといったグルカゴン関連ペプチドも産生されているが、その生理的動態や病態生理的意義はほとんど未解明であった。その最大の理由は、これらのホルモンを正確に測定できていなかったからである。すなわち、図1に示すようにグルカゴン関連ペプチドはグルカゴンとアミノ酸配列の多くが重複しており、現在用いられているイムノアッセイでは抗体の交叉反応を避けられず、反応特異性が低くなる。実際、市販されている3つのオキシントモジュリン測定キットは全て不正確であることが報告されている（Bak et al. Eur Soc Endocrinol, 2014）。そこで、申請者が所属する研究室で最近開発に成功したグルカゴンに対する質量分析（LC-MS/MS）を用いた測定法（Miyachi et al Anal Bioanal Chem 2017）と、サンドイッチ ELISA 法の技術を応用し、グルカゴン関連ペプチドの血中濃度を正確に測定できる系の開発を行なった。

2. 研究の目的

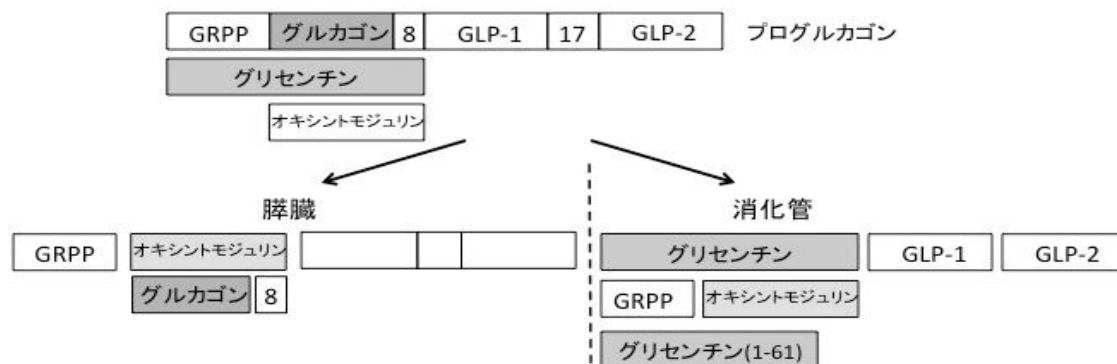


図1 膵臓と消化管におけるプログルカゴンから産生されると予想されるホルモン

これまで、グルカゴンや GLP-1 に比べると、グルカゴン関連ペプチドはほとんど研究されて来なかった。特に測定系に関しては、特異性の問題から正確に測定できる系は存在していなかった。従って、本研究はこれまで生理動態や病態生理的意義が未解明であったグルカゴン関連ペプチドについて、申請者らが既に開発中のグルカゴン・サンドイッチ ELISA 法の原理に基づいて、新たな測定方法を確立し、検討するものである。さらに、糖尿病 / 肥満モデルマウス、あるいは2型糖尿病患者や肥満者を用いた解析を行うことで、これらの疾患との関連性を明らかにすることができれば、それを基にして、糖尿病、肥満に対する新しい診断法や予防法、治療法の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

申請者らが開発中のグルカゴン・サンドイッチ ELISA 法の原理に基づいて、グリセンチンやオキシントモジュリンに対する特異抗体を作製し、それらの抗体を組み合わせることで種々のグルカゴン関連ペプチドを正確に測定できる系を確立する。次に、食事や糖負荷後の生理的動態、及び糖尿病 / 肥満モデルマウス、あるいは2型糖尿病患者や肥満者の血中濃度を測定し、グルカゴン関連ペプチドとこれらの病態との関連を解析する。具体的な研究計画を以下に示す。

(i) 各種グルカゴン関連ペプチドに対するサンドイッチ ELISA 法の開発

オキシントモジュリンやグリセンチンの末端認識抗体を組み合わせることで、これらのグルカゴン関連ペプチドをそれぞれ特異的に測定する系ができる。作製した測定系は精度

(Precision) の確認としてアッセイ内変動とアッセイ間変動が 5 % 以下であることを検証し、さらに真度 (Accuracy) の確認として希釈直線性試験と添加回収試験を行う。また、他のグルカゴン関連ペプチドに対する交叉反応試験も行い、特異性が高いことを確認する。Mercodia 社は既に同様の原理でグルカゴンサンドイッチ ELISA を発売しているが、申請者らの検討ではグルカゴン以外の関連ペプチドとも交叉反応が認められ、特異性は不十分である。従って、特異性を高めた正確なサンドイッチ ELISA 法の開発が求められる。

(ii) 糖尿病 / 肥満マウスや 2 型糖尿病患者、肥満者におけるグルカゴン関連ペプチドの血中濃度解析

以前から、血糖上昇作用を持つグルカゴンと血糖降下作用を持つ GLP-1 がなぜ同じプログルカゴンから産生されるのかは謎とされてきた。しかしながら最近、糖尿病病態では膵細胞からも GLP-1 が分泌されていることが明らかとなり (Nie et al. J Clin Invest, 2000) 生体は様々な代謝状態の変化に効率的に対応するために、プロセッシングの変化を介してプログルカゴン由来の種々のペプチドホルモンの分泌量を調節していると考えられる。従って、グルカゴン関連ペプチドの分泌も様々な代謝状態で変化している可能性が高い。本研究では、遺伝性糖尿病 (db/db) 肥満 (ob/ob) 食事誘導性肥満 (高脂肪食飼育) 薬剤誘導性糖尿病 (ストレプトゾトシン投与) モデルマウスを用いて、各種グルカゴン関連ペプチドの血中濃度を解析する。さらに、ヒト用の抗体を用いたサンドイッチ ELISA によって 2 型糖尿病患者や肥満者の検体を測定し、各種グルカゴン関連ペプチドの血中濃度に健常者との違いが認められるか検討する。グリセンチンやオキシントモジュリンは弱いながらもグルカゴン受容体とアフィニティがあることや、中枢や脂肪組織に作用して食欲抑制やエネルギー消費亢進を介し、体重減少効果を持つことが示唆されており、糖尿病や肥満の病態との関連が予想される。従って、本研究の成果は糖尿病、肥満に対する新しい診断法や予防法、治療法の開発につながる可能性が期待できる。

4. 研究成果

血糖上昇作用をもつグルカゴンと、逆に血糖降下作用を持つ GLP-1 はともにプログルカゴンから産生されているが、両者は食欲抑制、体重減少作用に関しては同じである。一方、プログルカゴンからはグリセンチンやオキシントモジュリンといったグルカゴン関連ペプチドも産生されているが、その生理的動態や病態生理的意義はほとんど未解明であった。その最大の理由は、これらのホルモンを正確に測定できなかったからである。そこで、申請者が所属する研究室で最近開発に成功したグルカゴンに対する質量分析 (LC-MS/MS) を用いた測定法と、サンドイッチ ELISA 法の技術を応用し、種々のグルカゴン関連ペプチドの血中濃度を正確に測定できる系の開発を行なった。まず、オキシントモジュリンとグルカゴンは N 末端が共通であるため、グルカゴンの N 末端をエピトープ認識するモノクローナル抗体をラットを免疫することで 18 個獲得し、交叉反応試験や希釈直線性試験を行なって、そのうちの 1 つが高感度、高特異性抗体であることを確認した。次に、オキシントモジュリンとグリセンチンの C 末端は共通であることから、この C 末端を認識する抗体の作成を試みてきたが、高感度、高特異性抗体の獲得に至らず、現在も挑戦中である。今後はこれらの抗体を組み合わせるグルカゴン関連ペプチドを正確に測定できるサンドイッチ ELISA 系を確立し、食事負荷や糖負荷後のこれらのホルモンの生理的動態、及び糖尿病 / 肥満モデルマウス、あるいは 2 型糖尿病患者や肥満者の血中濃度を測定し、グルカゴン関連ペ

プチドとこれらの病態との関連を解析する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------