

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16118

研究課題名(和文) バソプレシンとグルカゴン様ペプチド-1の相互作用による糖代謝維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis on the mechanism of glucose metabolism by interaction between vasopressin and glucagon-like peptide-1

研究代表者

原田 一貴 (Harada, Kazuki)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：60830734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルギニンバソプレシン(arginine vasopressin: AVP)は抗利尿ホルモンとして作用するほか、インスリンやグルカゴンの分泌制御にも関与する。AVP受容体遺伝子欠損マウスは、小腸内分泌L細胞から分泌されるグルカゴン様ペプチド-1(glucagon-like peptide-1: GLP-1)とペプチドYY(peptide YY: PYY)の分泌が著しく低下している一方、高インスリン・低血糖傾向を示し、軽微な栄養分吸収障害を示していると示唆された。今後はフローサイトメトリーによってL細胞を単離回収し、RNA-seqを用いてGLP-1とPYYの分泌不全をもたらす原因の特定を試みる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GLP-1はインスリン分泌を促進し、PYYは食欲を抑制することが知られているにもかかわらず、本研究においてAVP受容体遺伝子欠損マウスはL細胞からのGLP-1やPYYの分泌が低下していた一方で低血糖・高インスリン傾向という表現型を示した。これは一般的なGLP-1やPYYの役割とは一致しておらず、AVPとGLP-1、PYYが従来知られていなかった複雑なメカニズムにより糖代謝に関与していることを示唆する。ヒトにおいてV1aRとV1bRの遺伝子多型は糖尿病リスクとの相関が示されており、今後さらなる解析を行うことで、新たなメタボリックシンドローム治療に結びつく可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Arginine vasopressin (AVP) is an antidiuretic hormone, and also involved in the regulation of insulin and glucagon secretion. We found that AVP receptor-deficient mice show significant decrease in the secretion of enteroendocrine L cells-derived glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY) but also show hyperinsulinemia and hypoglycemia, suggesting that they develop mild malfunction of nutrient absorption. We will identify the cause of altered secretion of GLP-1 and PYY by RNA-seq analysis of isolated L cells using flow cytometry.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：グルカゴン様ペプチド-1 アルギニンバソプレシン インクレチン

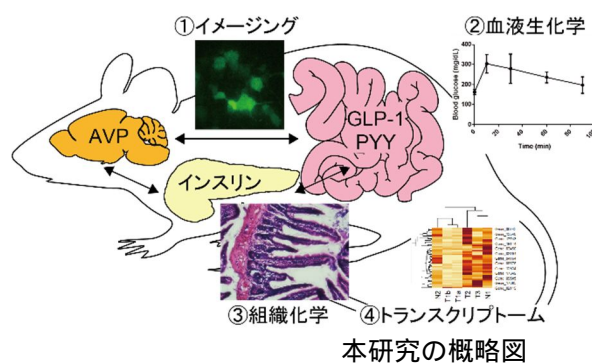
## 1. 研究開始当初の背景

アルギニンバソプレシン (arginine vasopressin: AVP) は脳下垂体から分泌されるペプチドホルモンとして知られ、概日リズムや社会行動も制御する(文献 1、2)。さらに、**AVP は膵ランゲルハンス島からのインスリンやグルカゴンの分泌も制御し、糖代謝に関与する**。AVP 受容体には、V1aR、V1bR、V2R がある。V1aR 遺伝子欠損マウス (V1aR<sup>-/-</sup>マウス) は高血糖と脂質代謝異常、V1bR 遺伝子欠損マウス (V1bR<sup>-/-</sup>マウス) は低血糖と低インスリン血症、V1aR・V1bR 遺伝子二重欠損マウス (V1aR<sup>-/-</sup>・V1bR<sup>-/-</sup>マウス) は高脂肪食下での高血糖と肥満症状を発症する(文献 3-5)。しかし、これらの発症メカニズムは不明である。

インスリン分泌を制御し糖代謝にかかわるホルモンとして、消化管の小腸内分泌 L 細胞 (以下、L 細胞) から分泌されるグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1) がある。GLP-1 は、膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進するほか、迷走神経を介して摂食行動を抑制する(文献 6)。先行研究において、GLP-1 が AVP 分泌を抑制することから(文献 5)、**AVP と GLP-1 の分泌に相互作用が存在し、これがインスリン分泌や血糖値の制御を司っているのではないかと考えた**。

## 2. 研究の目的

申請者は、AVP と GLP-1 の相互作用が糖代謝に果たす役割とその破綻がもたらす影響を、生細胞イメージングおよび 3 種の AVP 受容体遺伝子欠損マウス (V1aR<sup>-/-</sup>マウス、V1bR<sup>-/-</sup>マウス、V1aR<sup>-/-</sup>・V1bR<sup>-/-</sup>マウス) の生理学的解析から解明することを目的とした。



## 3. 研究の方法

### (1) L 細胞からの GLP-1 分泌に AVP が与える影響の解析

マウス L 細胞株 GLUTag 細胞での AVP 受容体の発現を RT-PCR 法により解析した。GLUTag 細胞に AVP を投与し、ELISA 法により GLP-1 分泌量を測定した。また、細胞膜付近の微小領域における蛍光を観察できる全反射蛍光顕微鏡を用い、GLUTag 細胞において AVP 投与時の GLP-1 分泌小胞の動態をリアルタイムで観察した。

### (2) AVP 受容体遺伝子欠損マウスの血液生化学測定

野生型および 3 種の AVP 受容体遺伝子欠損マウスにおいて、安静時および摂食時の血糖値、血中 AVP、GLP-1、グルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド (glucose-dependent insulinotropic polypeptide: GIP)、インスリン濃度を測定した。さらにマルチプレックスホルモン測定により、グレリン、レプチン、ペプチド YY (peptide YY: PYY)、グルカゴンの濃度も測定した。

### (3) AVP 受容体遺伝子欠損マウスの組織化学的解析

野生型および AVP 受容体遺伝子欠損マウスで小腸組織切片を採取し、抗 GLP-1 抗体で L 細胞を免疫染色して切片中の L 細胞密度を比較した。

### (4) フローサイトメトリーを用いた L 細胞の単離回収解析

マウス小腸を酵素処理して上皮細胞をシングルセル化して回収し、L 細胞に特異的な膜タンパク質 Claudin-4 抗体で蛍光標識したのちフローサイトメトリーで回収した。回収した L 細胞を RNA-seq 解析し、AVP 受容体遺伝子欠損マウスの L 細胞で GLP-1 と PYY の分泌低下を引き起こす原因の特定を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) L 細胞からの GLP-1 分泌に AVP が与える影響

GLUTag 細胞に AVP を投与すると、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が AVP 投与濃度依存的に上昇し、GLP-1 分泌量が増加した。一方、cAMP センサーFlamindo2 を用いて AVP 投与時の cAMP 応答を解析したところ、有意な変化は見られなかった。また、全反射蛍光顕微鏡を用いた解析から、AVP 投与により GLUTag 細胞からの GLP-1 開口分泌頻度が増加することを見出した。

### (2) AVP 受容体遺伝子欠損マウスの血液生化学測定

GLP-1 分泌を強く促進する粉末ミルクを投与すると、AVP 受容体遺伝子欠損マウスは野生型マウスと異なり GLP-1 分泌が促進されなかったほか、PYY の分泌が安静時から顕著に低下して

いた。一方、グルコース耐性テストにより血糖値とインスリン分泌動態を解析した結果、AVP 受容体遺伝子欠損マウスは野生型マウスよりも高インスリン・低血糖傾向にあった。また GLP-1 と同様にインスリン分泌を促進するホルモンの一種であるグルコース依存性インスリン分泌ポリペプチド ( glucose-dependent insulintropic peptide: GIP ) の血中濃度を比較したが、野生型マウスと比べて有意な差は見られなかった。

### (3) AVP 受容体遺伝子欠損マウスの組織化学的解析

小腸で免疫染色を行った結果、小腸下部における L 細胞密度は野生型マウスと AVP 受容体遺伝子欠損マウスとで差がなかったため、AVP 受容体遺伝子欠損マウスでは L 細胞そのものの減少ではなく、摂食刺激感受時の GLP-1 分泌能が低下していると考えられた。(2) で見られた高インスリン・低血糖をもたらす原因として、小腸上皮におけるグルコーストランスポーター GLUT2 および SGLT1 の発現と局在を比較したが、野生型マウスと比べて有意な差は見られなかった。

### (4) フローサイトメトリーを用いた L 細胞の単離回収解析

マウス小腸を EDTA およびコラゲナーゼで処理し、上皮細胞をシングルセル化して単離回収した。さらに血球マーカー標識抗体、吸収上皮細胞および内分泌細胞マーカー標識抗体と Caludin-4 標識抗体を組み合わせ、フローサイトメトリーにより L 細胞を回収した。現在 RNA-seq を行っており、得られたデータから AVP 受容体遺伝子欠損マウスで発現変動した遺伝子の同定とパスウェイ解析を行う予定である。

先行研究において、AVP が GLP-1 と PYY の分泌促進を介して小腸上皮からの陰イオン流出を抑制するという報告があり ( 文献 6 ) また消化管内分泌細胞がすべて欠損したノックアウトマウスは重篤な水分、栄養分吸収障害を示す ( 文献 7 ) 。本研究の結果から、AVP 受容体遺伝子欠損マウスは L 細胞からの GLP-1 および PYY 分泌が低下することで、軽微な栄養分吸収障害を起こし、低血糖傾向やグルコース感受性の増加に伴う高インスリン傾向を示すと推測される。今後は L 細胞に加え、膵細胞のトランスクリプトーム解析を行い、グルコース代謝に及ぼす影響を分子レベルで理解する。

## 文献

- 1 . Tobin et al. An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature* 18, 413-417, 2010.
2. Yamaguchi et al. Mice Genetically Deficient in Vasopressin V1a and V1b Receptors Are Resistant to Jet Lag. *Science* 342, 85-90, 2014.
3. Aoyagi et al. Alteration of Glucose Homeostasis in V1a Vasopressin Receptor-Deficient Mice. *Endocrinology* 148, 2075-2084, 2007.
4. Oshikawa et al. Vasopressin Stimulates Insulin Release from Islet Cells through V1b Receptors: a Combined Pharmacological/Knockout Approach. *Mol Pharmacol* 5, 623-629, 2004.
5. Nakamura et al. Both V<sub>1A</sub> and V<sub>1B</sub> vasopressin receptors deficiency result in impaired glucose tolerance. *Eur J Pharmacol* 613, 182-188, 2009.
6. Pais et al. Role of enteroendocrine L-cells in arginine vasopressin-mediated inhibition of colonic anion secretion. *J Physiol* 594, 4865-4878, 2016.
7. Mellitzer et al. Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J Clin Invest* 120, 1708-1721, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuki Harada, Takashi Tsuboi
2. 発表標題 Regulation of glucose metabolism is mediated by arginine vasopressin and glucagon-like peptide-1 in mice
3. 学会等名 第21回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------