

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17488

研究課題名（和文）新規バイオアッセイ法を用いたグルカゴン及びグルカゴン関連ペプチドの生理活性の評価

研究課題名（英文）Evaluation of bioactivity of glucagon and glucagon-related peptides using a novel bioassay method

研究代表者

柳町 剛司（YANAGIMACHI, Tsuyoshi）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：20596275

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）：オキシントモジュリン（OXM）はグルカゴンとアミノ酸配列が高い相同性を有した消化管ホルモンで、申請者はグルカゴンはDPP-4及びNepriylisin（NEP）によって不活化されるが、OXMはNEPによって不活化されないことを確認しており、NEPがOXMに及ぼす影響をLC-MS/MSを用いて検討した。NEP存在下でOXMは大きなピークが1つのみ確認され、OXM（1-37）からOXM（1-35）が生成されることが確認できた。OXM（1-35）はOXM（1-37）と同等の血糖降下及びインスリン分泌亢進作用を示した。OXMは不活化を受けにくいことから、従来の糖尿病治療より有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オキシントモジュリン（OXM）は37個のアミノ酸から構成され、グルカゴンと非常に高い相同性を有したホルモンで、血糖値を上げるグルカゴンと血糖値を下げるGLP-1の二つのホルモンの受容体活性を有している。OXMは血糖降下作用を示すことが報告されているが、詳細な検討は非常に少ない。今回我々は分解酵素の一つであるNepriylisinによって、OXMは37個（OXM（1-37））から35個（OXM（1-35））のアミノ酸配列に変化し、この分解産物であるOXM（1-35）も血糖降下作用を有することを明らかにした。OXMは他のホルモンより不活化を受けにくく、従来の糖尿病治療薬より有効な可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oxyntomodulin (OXM) is a gastrointestinal hormone with high amino acid sequence homology to glucagon, and we observed that glucagon was inactivated by DPP-4 and neprilysin (NEP), but OXM, unlike glucagon, was not inactivated by NEP. The effect of NEP on glucagon and OXM was examined using LC-MS/MS. 3 peaks were observed for glucagon in the presence of NEP, but only one large peak was observed for OXM, confirming the formation of OXM(1-35) from OXM(1-37). OXM(1-35) lowered blood glucose levels and promoted insulin secretions as well as OXM(1-37), suggesting that OXM may be more effective than conventional diabetes treatment because it is less likely to be inactivated.

研究分野：糖尿病

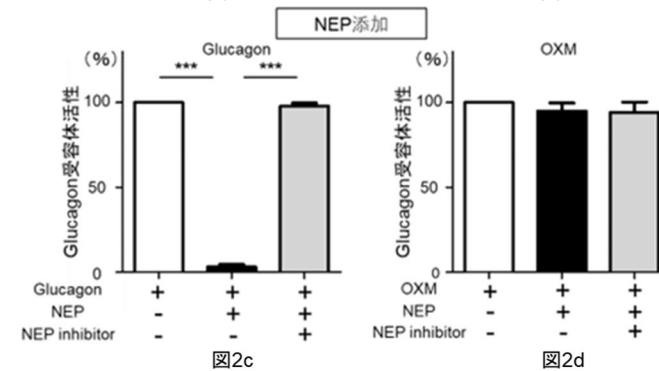
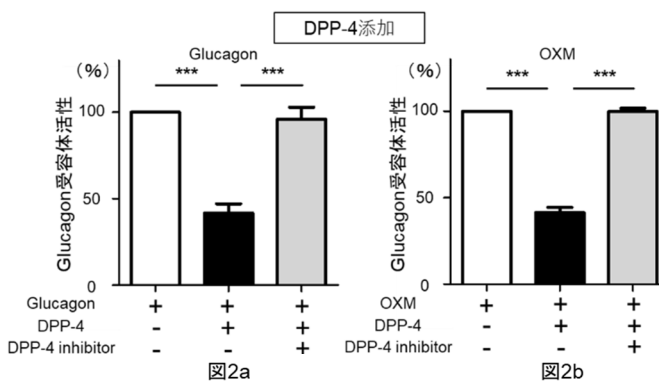
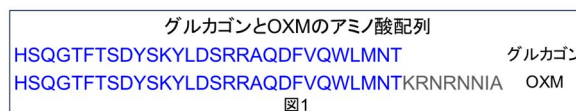
キーワード：グルカゴン GLP-1

1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリン分泌の低下に加え、血糖上昇作用のあるグルカゴン分泌が相対的に亢進しており、糖尿病の病態形成においてグルカゴンも非常に重要なホルモンである。これまでグルカゴンは ELISA 法等の免疫学的方法で測定されてきたが、血中濃度が低いことやアミノ酸配列の相同性が高いホルモンと交差性を有している等、感度・特異度の点で正確に測定することが困難であり、確立された測定法が長年存在していなかった。申請者はこれまでにグルカゴン VIP ファミリーホルモンの glucagon-like peptide-1(GLP-1) や glucose-dependent insulinotropic polypeptide(GIP)について受容体結合に基づく生理活性を測定するバイオアッセイを樹立しており(Yanagimachi T et al. Mol Metab 6:226-231, 2017)、グルカゴンにおいても同様の測定法を確立している。Proglucagon から膵α細胞ではグルカゴンが、腸管では GLP-1 やオキシントモジュリン(OXM)が産生される。

OXM はグルカゴン/GLP-1 の dual agonist として報告されているが、グルカゴンとは C 末端側のアミノ酸配列が 8 個異なるのみで、非常に類似したアミノ酸配列を有している(図 1)。

申請者はバイオアッセイ法で OXM がグルカゴンとほぼ同等の強さでグルカゴン受容体を活性化するが、ELISA 法では高濃度条件下でも OXM は 5%程度の交差性しか示さなかったことを報告している(Yanagimachi T et al. Front Endocrinol 11:214, 2020)。さらに DPP-4 によってグルカゴン及び OXM の受容体活性は低下するが、NEP によって活性が低下するのはグルカゴンのみで、OXM の活性はほぼ低下しないことをバイオアッセイ法で確認している(図 2a-d)。以上より既存の測定法ではグルカゴン活性を有する全ての物質を検出できず、生理学的及び病態生理学的にグルカゴン作用を十分に解明できていないのではないかという着想に至った。



2. 研究の目的

本研究の目的は既存の測定法では検出できていないグルカゴンの生理活性を、グルカゴン受容体を介したバイオアッセイ法で評価することである。GLP-1 や GIP は Dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)によって分解されるが、グルカゴンや OXM に関してはほぼ検討されていない。近年 GLP-1 は DPP-4 以外に Neutral endopeptidase(NEP)によって分解されることが報告されたが (Johanne A Windeløv et al. Diabetologia 60:2066-2075, 2017)、グルカゴン、OXM に関してわずかな検討があるのみである。更に DPP-4 や NEP による影響を考慮されずに測定されてきた報告が国内外共に多い。これらを踏まえ、DPP-4 及び NEP がグルカゴンの生理活性に及ぼす影響をバイオアッセイ法と既存の ELISA 法と比較し、我々がこれまで見逃していたと考えられる OXM も含めたグルカゴンの生理活性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* 及び *ex vivo* で DPP-4 や NEP がグルカゴン測定値に及ぼす影響の評価

DPP-4 欠損ラットにグルカゴン(±NEP 阻害薬)を投与した際のグルカゴンの血中濃度を、バイオアッセイ法で評価する。

内因性のホルモン分泌を刺激するためマウスにアルギニンを投与し、採取した血液サンプル中のグルカゴン受容体活性及びグルカゴンの血中濃度を NEP の有無に分けて検証する。

(2) NEP 存在下のグルカゴン、OXM の分解代謝過程の検証

NEP で処理した際のグルカゴンや OXM の分解産物を LC-MS/MS で解析する。

(3) OXM 分解産物の受容体活性及び OXM の血中濃度の評価

LC-MS/MS で確認された OXM の分解産物を合成し、バイオアッセイ法及び既存の OXM の ELISA 法で評価する。

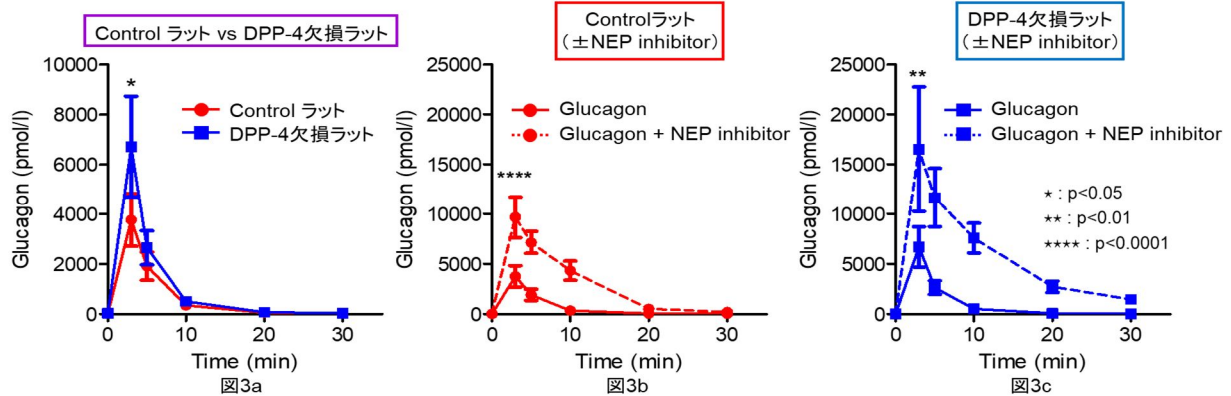
OXM の ELISA 測定キットを用いて、NEP 存在下の OXM の血中濃度を評価する。

(4) OXM が代謝及びインスリン分泌に及ぼす効果の検討

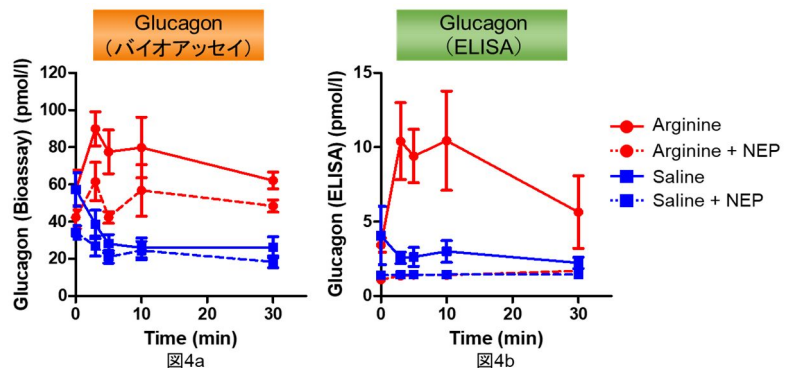
グルカゴン/GLP-1 受容体活性を有する OXM 及び NEP によって産生される OXM の分解産物をマウスに投与し、グルカゴン、GLP-1 と比較検討する。

4. 研究成果

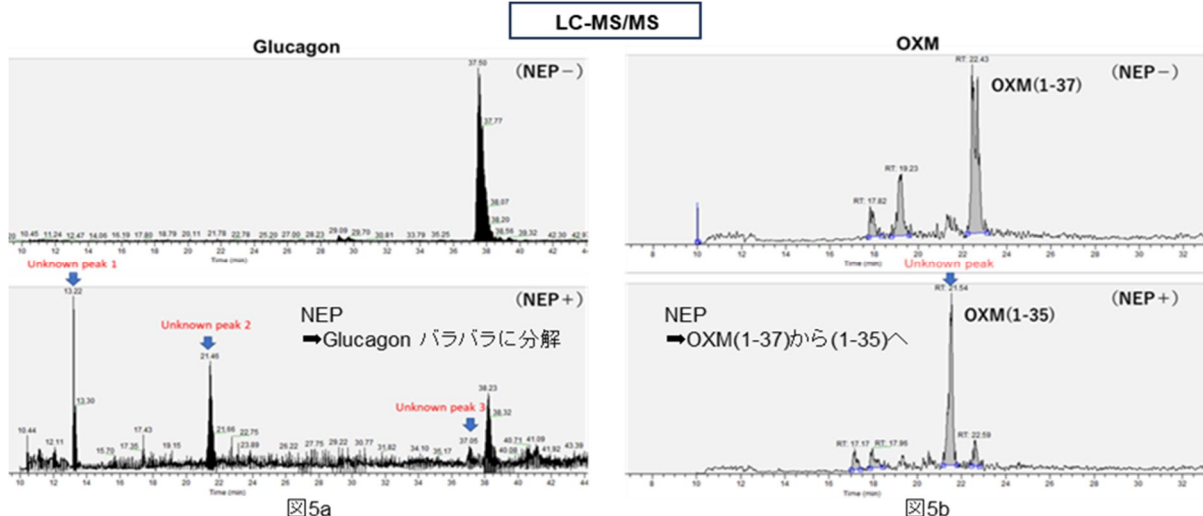
(1) DPP-4 欠損ラット(F344/DuCr1Cr1j)及びコントロールラットにグルカゴン(±NEP 阻害薬)を投与し、尾静脈から採取したグルカゴン血中濃度をバイオアッセイ法で評価した。グルカゴン投与後の DPP-4 欠損ラットのグルカゴンの血中濃度はコントロールラットに比べ有意に高値であり(図 3a)、NEP 阻害薬投与群は DPP-4 欠損ラット、コントロールラット共に NEP 非投与群よりも有意に高値であった(図 3b-c)。これにより、グルカゴン測定値に DPP-4、NEP が影響を及ぼすことが示された。



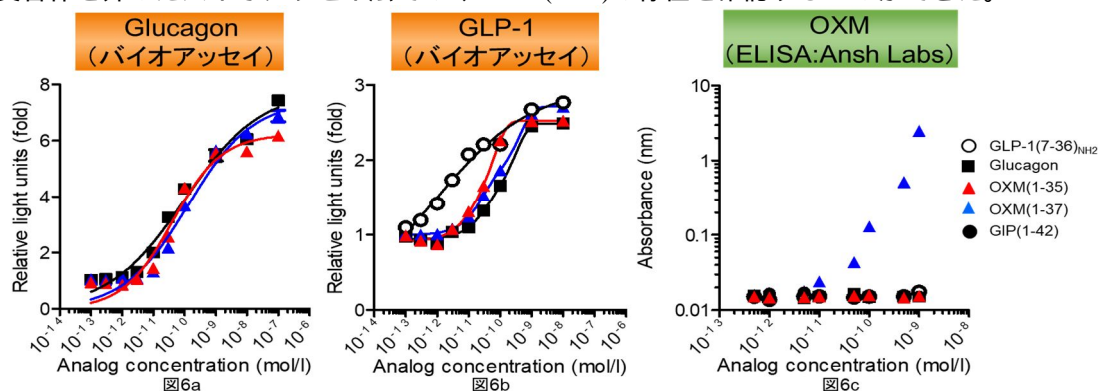
C57BL/6 マウスをアルギニン投与群、非投与群に分け、それぞれ尾静脈から採血後、採取した血液サンプルに NEP を添加し、グルカゴンの血中濃度をバイオアッセイ法及び ELISA 法で評価した。アルギニン投与群のグルカゴンの血中濃度はバイオアッセイ法、ELISA 法どちらにおいても非投与群より上昇していたが、NEP を添加した同じサンプルを測定すると、バイオアッセイ法では約 50~80%のグルカゴン受容体活性が残存していたが、ELISA 法で評価すると、アルギニン非投与群とほぼ同等の測定値に低下した(図 4a-b)。これらの結果から、グルカゴンは NEP によって分解されるが、グルカゴン以外にグルカゴン受容体活性を有する物質が生体内には存在していることが判明した。NEP 存在下でグルカゴン受容体活性を示す有力な生理活性物質として、我々が以前行った *in vitro* の検討から(図 2d)、NEP 存在下で OXM がグルカゴン受容体活性を示している可能性が考えられた。



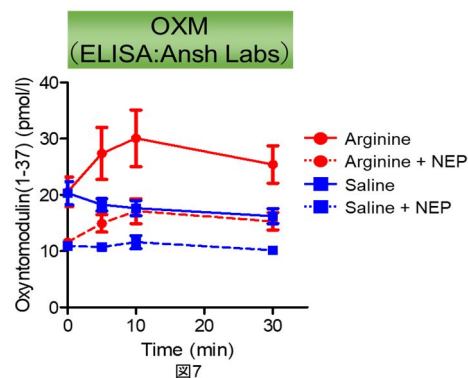
(2) LC-MS/MS を行うと、NEP 存在下でグルカゴンは大きな 3 つのピークが確認された。一方、OXM はグルカゴンと異なり、NEP 存在下で大きなピークが 1 つのみ確認された。更に詳細に検討すると、分子量が 184 小さい分解産物が存在していることがわかり、NEP 存在下では OXM(1-37)の C 末端側の 2 つのアミノ酸が欠失した OXM(1-35)が産生されることが予想された(図 5a-b)。



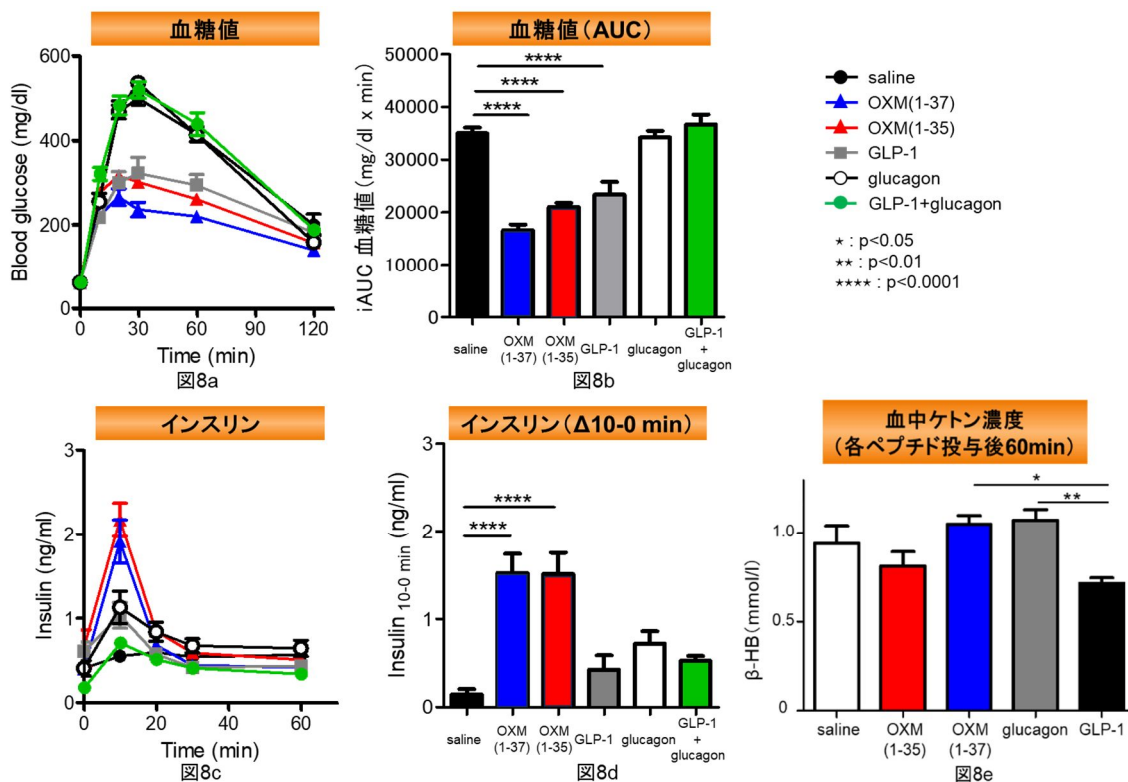
(3) OXM(1-35)を合成し、グルカゴン/GLP-1 の dual agonist である OXM(1-37)と各受容体活性を比較検討した。OXM(1-35)は OXM(1-37)とほぼ同等のグルカゴン及び GLP-1 受容体活性を示した(図 6a-b)。既存の OXM の ELISA 測定キットを用いて OXM(1-35)との交差性も確認したが、OXM(1-37)のみ交差性を示し、既存の測定法では OXM(1-35)は検出できず(図 6c)、我々が用いた受容体を介したバイオアッセイ法でのみ OXM(1-35)の存在を確認することができた。



(1) と同様に C57BL/6 マウスをアルギニン投与群・非投与群に分け、それぞれ NEP の有無で OXM を ELISA 法で測定した。アルギニン投与群は非投与群より OXM の血中濃度は高値であったが、NEP を添加すると、OXM の血中濃度は約 50% 低下し、アルギニン非投与群とほぼ同等の値を示した(図 7)。(1) の検討で NEP 存在下でもアルギニン投与群のグルカゴン受容体活性は残存していたが、これらの検討から、NEP 存在下ではグルカゴンそのものではなく、OXM(1-37)や OXM(1-35)がグルカゴン受容体を刺激していると考えられた。



(4) マウスを用いて IPGTT を行い血糖及びインスリン分泌に及ぼす影響を評価した。OXM(1-35)は OXM(1-37)とほぼ同等の血糖改善効果、インスリン分泌亢進作用を示し、GLP-1 と遜色のない血糖改善効果を示した。一方、グルカゴンと GLP-1 の同時投与では血糖値低下作用は認められず、グルカゴン/GLP-1 の dual agonist である OXM に特異的な作用であることが示された(図 8a-d)。更にグルカゴン有する異化亢進作用を確認するために、OXM 投与後のケトン体の血中濃度を測定した。GLP-1 投与群に比べ、グルカゴン及び OXM(1-37)投与群のケトンは有意に高値であったが、GLP-1 投与群と OXM(1-35)投与群の血中ケトン濃度には有意差はなく(図 8e)、OXM(1-35)は OXM(1-37)ほどグルカゴン作用を有していない可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳町 剛司, 藤田 征弘, 楠井進之介, 川原 良介, 森野勝太郎, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 Glucagon関連ペプチドの生理活性評価には受容体を介するBioassay法が有用である
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳町 剛司, 藤田 征弘, 楠井 進之介, 川原 良介, 井田 昌吾, 村田 幸一郎, 佐藤 大介, 森野 勝太郎, 久米 真司
2. 発表標題 Glucagon/GLP-1 dual agonistであるオキシントモジュリンの新規糖尿病治療薬の可能性について
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳町 剛司, 藤田 征弘, 楠井 進之介, 久米 真司
2. 発表標題 消化管ホルモンであるオキシントモジュリンの新規糖尿病治療薬の可能性について
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------	---------