

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659232

研究課題名（和文）

腸管上皮・内分泌細胞をターゲットとした新規治療戦略の創出

研究課題名（英文）

Development of novel therapeutic strategies that targets intestinal epithelial endocrine cells

研究代表者

林 良敬 (HAYASHI YOSHITAKA)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：80420363

研究成果の概要（和文）：インスリン分泌刺激作用を有する GLP-1 は腸管の L 細胞において産生される。L 細胞は腸管に散在する性質を持つため、L 細胞を選択的に単離することは困難である。L 細胞の分化・増殖機構や GLP-1 の分泌制御機構を解明すれば、内在性 GLP-1 の産生の制御を作用機序とする新しい糖尿病治療薬開発が可能となる。本研究では L 細胞の選択的単離を可能とするため、同細胞で緑色蛍光蛋白を発現する遺伝子組換え動物を作成した。同マウスの腸管より L 細胞を細胞ソーティングにより選択的に回収し、L 細胞で特異的に発現する遺伝子群の同定に成功した。この遺伝子群の機能解析を進めることにより新しい糖尿病薬の開発に結びつくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), which stimulates insulin secretion from islet β -cells, is produced in enteroendocrine L cells. As L cells are distributed in a scattered manner in intestinal epithelium, selective isolation of L cells has been difficult. Elucidation of mechanisms regulating differentiation and proliferation of L cells, and regulatory mechanism of GLP-1 secretion, should contribute to development of novel drugs to treat diabetes, which regulate production of endogenous GLP-1. In the present study, we developed a novel gene-modified animal model, in which green fluorescent protein is expressed in an L cell specific manner. We succeeded in selective isolation of L cells and identification of genes expressed in an L cell specific manner. Functional analyses of such genes should lead to development of novel drugs to treat diabetes mellitus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

1. 研究開始当初の背景

GLP1 はインスリン分泌刺激作用・ β 細胞増殖促進作用を有し、この点に着目して開発された GLP1 アナログおよび、GLP1 の分解

を阻害して血中濃度を上昇させる DPPIV (dipeptidyl peptidase 4) 阻害薬が糖尿病の治療薬として注目を集めている。しかしながら GLP1 の主要分泌細胞である腸管 L

細胞は腸管上皮内に散在する。そのため L 細胞を選択的に単離することは、これまで不可能で、GLP1 の分泌制御機構の詳細な解析の障壁となっていた。

2. 研究の目的

(1) GLP-1 はグルカゴン遺伝子にコードされるプログルカゴンが L 細胞においてプロホルモンコンバーターゼ 1 によるプロセッシングを受けて産生される。一方、膵臓ランゲルハンス島の α 細胞においてはプロホルモンコンバーターゼ 2 によるプロセッシングによりグルカゴンが産生される。そこでグルカゴン遺伝子の発現制御機構のもと緑色蛍光蛋白 (Green Fluorescent Protein: GFP) を発現するモデル動物を作成し、Fluorescence-assisted-cell-sorting により L-細胞を選択的に単離すること。

(2) プログルカゴンに由来するペプチドによる L 細胞の分化・増殖の制御を解析すること。

(3) 単離した L-細胞において選択的に発現する遺伝子を同定し、その機能を解明し、L-細胞の増殖制御や GLP1 分泌の促進を作用機序とする新しい糖尿病薬開発のターゲット分子を同定すること。

3. 研究の方法

(1) グルカゴン遺伝子の第二エクソンの一部より第三イントロンの一部に至る領域を、GFP をコードする cDNA とポリ A シグナル、および G418 耐性遺伝子発現カセットに置換するターゲティングベクターを作成し、胚性幹細胞に導入、相同的組換えをおこした細胞株を選別した。同細胞株をマウス受精卵に移植することによりキメラマウスを得た。キメラマウスを C57B16 系統のマウスと交配し、生殖系列へ組換え遺伝子が伝播していることを確認した。このモデル動物、Gcg-gfp/+、の腸管を切除、生理食塩水により洗浄した後、腸管を開き、絨毛を剃刀により回収した上で、トリプシン-EDTA により細胞を分散した。分散した細胞より蛍光を示す細胞を FACS Aria2 を用いて単離した。

(2) Gcg-gfp/+ のホモ接合体 Gcg-gfp/gfp はグルカゴン及び GLP-1 を含むプログルカゴンに由来するペプチド全てを欠損する。この動物モデルにおいて L 細胞数を FACS Aria2 を用いて解析した。また腸管における遺伝子発現を定量 PCR 法により解析した。

(3) 単離した細胞より RNA を抽出し、マイクロアレイ法により遺伝子発現プロファイルを解析し、L 細胞で特異的に発現する遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1) 本研究において作出したモデル動物 (Gcg-gfp/+; Gcg-tm Yhys1 として理化学研究

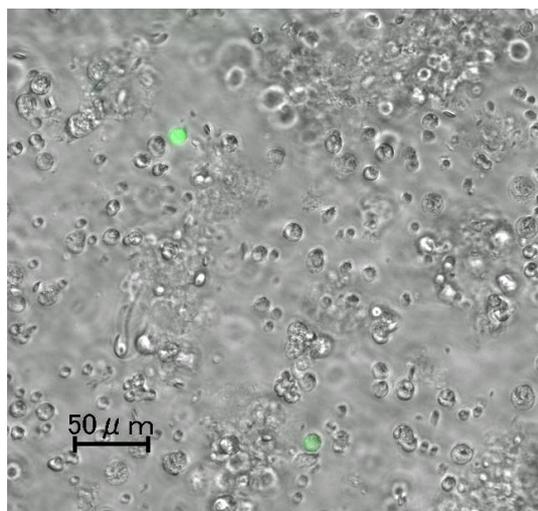


図1 L細胞の GFP 蛍光による同定：腸管上皮細胞をトリプシンで分散した。位相差画像に、GFP 蛍光をオーバーレイした。

所パイオリソースセンターに寄託した)では、その設計意図に沿って、グルカゴン遺伝子の発現調節機構を用いて GFP が発現することを確認した。すなわち、膵臓ランゲルハンス島の α 細胞および腸管 L 細胞において GFP が発現することが、グルカゴンあるいは GLP-2 に対する抗体を用いた蛍光免疫組織化学解析により確認した。

そこで、Gcg-gfp マウスの腸管を切除、上皮細胞をトリプシン処理により分散した。図1に分散した細胞の画像を示した。

この細胞群より、細胞ソーティング装置 FACS Aria2 を用いて、蛍光を示す細胞を選択的に回収することに成功した。

(2) Gcg-gfp/+ のホモ接合体 Gcg-gfp/gfp はグルカゴンを欠損するにも関わらず正常の血糖値を維持する。膵臓ランゲルハンス島においては GFP を発現する “ α ” 細胞 (グルカゴンは欠損するため定義上は α 細胞とは呼べない) の過形成を示した。Gcg-gfp/gfp における GFP 遺伝子の発現は Gcg-gfp/+ における発現の 100 倍以上に達した。すなわち、グルカゴンあるいはその他のプログルカゴンに由来するペプチドが α 細胞の増殖とグルカゴン遺伝子の発現を抑制的に制御していることが明らかとなった。

一方、の腸管における GFP 陽性細胞の割合は、Gcg-gfp/+ および Gcg-gfp/gfp の間で差を認めなかった。遺伝子発現解析の結果、Gcg-gfp/+ における GFP 遺伝子の発現は、Gcg-gfp/gfp の概ね半分、グルカゴン遺伝子の発現は、野生型 (Gcg-+/+) の概ね半分であった。すなわち、腸管におけるグルカゴン遺伝子の発現は遺伝子のコピー数と比例しており、L 細胞における遺伝子発現はグルカゴンあるいはその他のプログルカゴンに由来するペプチドの欠損の影響を受けないこと

が明らかとなった。この結果は GLP-1 の発現制御機構の新しい側面を明らかとしたものである。Gcg-gfp/gfp の表現型解析は発表論文 1-3 において報告した。

(3) FACS Aria2 を用いて選択的に回収した Gcg-gfp/+ に由来する L 細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法により解析した。非 L 細胞に比べて L 細胞で特異的に発現しているものとして最上位にグルカゴン遺伝子が認められたことから、細胞単離および遺伝子発現解析が予測通り機能していることが確認できた。

L 細胞で高い発現レベルを示す遺伝子としては内分泌系細胞の分化制御に関わる転写因子や調節性分泌に関与する分子が認められた。このほかに細胞表面に存在して細胞が暴露される環境のセンシングに関与する受容体型蛋白質や輸送体型蛋白質をコードする遺伝子を複数同定することに成功した。

現在、これら遺伝子にコードされる分子の機能解析を行っており、今後の新しい糖尿病薬の開発へ結びつくことが期待される。

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 3 件)

1. Watanabe, C., Seino, Y., Miyahira, H., Yamamoto, M., Fukami, A., Ozaki, N., Takagishi, Y., Sato, J., Fukuwatari, T., Shibata, K., Oiso, Y., Murata, Y., and Hayashi, Y. Remodeling of hepatic metabolism and hyperaminoacidemia in mice deficient in proglucagon-derived peptides. *Diabetes* 61 74-84, 2012 査読有
2. Hayashi, Y., Metabolic impact of glucagon deficiency. *Diabetes Obes. Metab.* 13, s151-157, 2011 査読有
3. Hayashi, Y., Yamamoto, M., Mizoguchi, H., Watanabe, C., Ito, R., Yamamoto, S., Sun, X. Y., and Murata, Y. Mice deficient for glucagon gene-derived peptides display normoglycemia and hyperplasia of islet α -cells but not of intestinal L-cells. *Mol. Endocrinol.* 23, 1990-1999, 2009 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 深見亜也子, 清野祐介, 尾崎 信暁, 三浦英里子, 恒川新, 林 良敬, 大磯ユタカ プログルカゴン遺伝子欠損マウスは膵島由来の GIP を介してグルコース応答性インスリン分泌を増強する 第 3 回 東海インクレチン研究会 2012. 2. 24. 名古屋(愛知県)
2. Fukami, A., Seino, Y., Ozaki, N.,

Sakamoto, E., Kato, J., Tsunekawa, S., Hayashi, Y., Murata, Y., Oiso, Y. Evaluation of b-cell function in proglucagon-EGFP knock-in mice. 2011. 9. 14. 47th EASD annual meeting, Lisbon, Portugal.

3. 深見亜也子, 尾崎信暁, 坂本英里子, 清野祐介, 恒川新, 林 良敬, 大磯ユタカ プログルカゴン遺伝子 GFP ノックインマウスにおけるインスリン分泌更新の機序の解明 第 54 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2011. 5. 19 札幌(北海道)
4. Watanabe, C., Hayashi, Y., Oiso, Y., Murata, Y. Hepatic gene expression profile in mice deficient for glucagon gene-derived peptides. *SERVIER International Group of Insulin Secretion Symposia XII* 2011. 4. 3. Saint-Jean-Cap-Ferrat, France.
5. Hayashi, Y., Metabolic impact of glucagon deficiency. *SERVIER International Group of Insulin Secretion Symposia XII* 2011. 4. 2. Saint-Jean-Cap-Ferrat, France.
6. 林 良敬 グルカゴン遺伝子ノックアウトマウスとプログルカゴン由来ペプチドによる代謝制御 第 16 回 OSAKA BAY DIABETES FORUM 2011. 3. 6. 大阪(大阪府)
7. 林 良敬 グルカゴン遺伝子ノックアウトマウスとプログルカゴン由来ペプチドによる代謝制御 第 7 回 群馬大学生体調節研究所名古屋大学環境医学研究所合同シンポジウム 2010. 11. 19. 名古屋(愛知県)
8. 深見亜也子, 尾崎信暁, 坂本英里子, 福山貴広, 水谷直広, 清野祐介, 林 良敬, 大磯ユタカ プログルカゴン遺伝子 GFP ノックインマウスにおける膵 β 細胞機能と形態学的評価 第 53 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2010. 5. 28 岡山(岡山県)
9. Watanabe C. Hepatic gene expression profile in mice deficient for glucagon gene-derived peptides. 14th International Congress of Endocrinology 2010. 3. 27. 京都(京都府)
10. 林 良敬, 伊藤諒一, 山本美智代, 渡邊千香, 孫暁陽, 村田善晴 グルカゴン-GFP ノックインマウスの作成と解析 第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009. 4. 25. 前橋(群馬県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 良敬 (HAYASHI YOSHITAKA)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号：80420363

(2) 研究分担者

澤田 誠 (SAWADA MAKOTO)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号：10187297

(3) 連携研究者：なし