

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591291

研究課題名(和文) short-form GIPの分泌機構および糖代謝改善機序を解明する

研究課題名(英文) Short-form GIP; Its Secretion and Glucose homeostasis

研究代表者

藤田 征弘 (FUJITA, YUKIHIRO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20451461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：GIPは、小腸から分泌されるインクレチンホルモンで糖代謝にかかわっているが、アミノ酸の一部を欠いたshort-form GIPは膵細胞でも発現する。糖尿病状態では、膵島での過剰なGIPの発現を認めた。一方、short-form GIPを改変した遅効型のペプチドを作成し、マウスに投与して、生理活性があるのを確認した。さらに、糖尿病モデルマウスに投与したところ、血糖値の上昇が抑制された。

研究成果の概要(英文)：GIP is an incretin hormone, which is released from the gut and involved in homeostasis of glucose metabolism though glucose-dependent insulin secretion from pancreatic beta cells. Interestingly, c-terminal truncated short-form GIP is expressed in pancreatic alpha cells. We found expanded short-form GIP expression in the islet of several diabetic animal models. We synthesized modified short-form GIP and confirmed the peptide to be biologically active by the administration to the normal mice. Finally we treated STZ induced diabetic mice with modified short-form GIP and observed the peptide showed potential to suppress the progression to chronic hyperglycemia in the diabetic model.

研究分野：臨床内科学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：GIP インクレチン 膵島 細胞

1. 研究開始当初の背景

小腸から分泌される腸管ペプチドの GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) と GLP-1 (glucagon-like peptide-1) は、食事由来の糖や脂肪酸などの刺激により小腸の K 細胞 (GIP) と L 細胞 (GLP-1) から門脈血中に分泌され、それぞれの G 蛋白共役性受容体を介して血糖依存性に膵細胞でのインスリンの分泌を促進する。この作用はインクレチン作用といわれている。食後のインスリン分泌の約 50% はこれらインクレチンを介すると考えられており、糖代謝調節に非常に重要である。さらに GLP-1 は細胞でのインスリン遺伝子の転写促進やアポトーシスを抑制することが知られており、中枢性の食欲抑制にも関連している。一方 GIP も細胞で同様の作用を持つが、脂肪細胞での脂肪の蓄積や骨芽細胞を介する骨量の増加にも関連すると報告されている。

GLP-1 受容体のアゴニストである exendin-4 や liraglutide が 2 型糖尿病患者に臨床応用され、インスリン治療の際に問題となる体重増加を認めず、低血糖も単独では誘発しないことから有効性が高いと評価されている。GIP と GLP-1 は血液中のジペプチダーゼである DPP (dipeptidyl peptidase)-4 の作用によって速やかに不活化されるが、DPP-4 阻害剤は GLP-1 及び GIP の不活化を抑制することでインクレチン作用を増強し血糖を低下させる。GLP-1 受容体アゴニストや DPP-4 阻害剤は齧歯類で細胞の保護作用が報告されているが、申請者らも DPP-4 阻害剤が、糖尿病モデル動物で細胞保護のみだけでなくグルカゴン分泌および細胞増殖の抑制を介して高血糖を抑制していることを日本・米国糖尿病学会で報告している。

申請者は、これまでインクレチンの遺伝子転写機構や分泌機構について興味深い研究報告をしてきた。転写機構の解明では、ヒト・ラット小腸組織および培養細胞を用いて、GIP 発現には転写因子の Pdx1, Pax6 両方の発現が重要であることを見いだした。回腸の L 細胞の 30% は GIP 共発現しており Pdx1 の有無が腸内分泌細胞の性質を変え得ることを、培養細胞におけるアデノウイルスによる Pdx1 の過剰発現にて明らかにした。また、Pdx1 と Pax6 が近位 GIP プロモーター (-193/-138) に結合し転写活性を亢進させることをゲルシフト法及びルシフェラーゼ法にて明らかにした。さらにプログルカゴンの転写には Pax6 のみが重要であることを示した (Fujita Y, et al. AJP 2008)。分泌機構では、舌の甘味受容体と同じ受容体 (T1R2+T1R3) が L 細胞や K 細胞に発現し gustducin を介したシグナル系がインクレチンの分泌に重要であることが報告されているが、申請者のラットを用いた実験では、免疫組織法で小腸に GIP と gustducin の共発現を認めるものの、甘味受容体のアゴニストであるスク

ラロースなどの甘味料が、正常ラットまたは糖尿病モデルラットにおいて糖代謝には影響せず、GIP や GLP-1 の分泌も促進しないことを報告した。

申請者は単離膵島で GIP の mRNA が発現していることを RT-PCR 法で確認し、さらに in situ hybridization 法で膵島の辺縁部に発現していることを確認した。さらに免疫組織学検討では GIP1-42 の C 端を認識する GIP 抗体では検出できないが、window 部 (中間部) を認識する抗体で膵細胞に GIP を検出した。小腸 K 細胞では、GIP (GIP1-42) は PC (prohormone convertase) 1/3 でプロセッシングを受けるが、PC2 欠損マウスのデータから膵細胞では GIP は PC2 によりプロセッシングを受けた short-form (GIP1-30) として発現していることを報告した。GIP 中和抗体と GIP 受容体抗体による実験で、単離膵島からのインスリン分泌が抑制されることより、short-form GIP は膵島内でパラクリンとして細胞からのインスリン分泌の調節にかかわっていることも明らかにした。さらに小腸でも PC2 と short-form GIP の共発現を認め、既知の GIP1-42 を分泌する K 細胞とは異なる内分泌細胞を見いだした。

2. 研究の目的

本研究の目的は short-form GIP のインクレチンとしての作用やその分泌機構を生理学的に明らかし、既知の GIP および GLP-1 との相違を明らかにすることである。加えて、short-form GIP のアミノ酸を改変し、GLP-1 の受容体にも結合する dual agonist を作成する。dual agonist の膵作用、膵外作用を検討し、得られた知見を糖尿病治療のアプローチに応用する。short-form GIP の生理学的役割や分泌機構を明らかにすることで、糖尿病の新しい病態・病因を見つけだすことに繋がる可能性があり、これらの研究課題の探求とメカニズムの解明は、内分泌代謝学の分野で画期的で非常に独創的なものであると考えられる。また、DPP-4 耐性 short-form GIP による糖代謝改善効果、高血糖是正効果につき検討し、GIP を用いた糖尿病治療の新たな治療戦略を立てる。

3. 研究の方法

DPP-4 耐性 Short-form GIP の治療薬としての可能性の検討

GIP のアミノ酸配列のうち N 端 2 番目のアラニンが DPP-4 で分解を受ける部位であり、分解を避けるためアラニン、プロリン以外のアミノ酸 (Aib) へ置換した新しい short-form GIP を合成した。(ConoundA) 今回の検討に用いる DPP-4 耐性 short-form GIP は in vivo でより長い血中半減期を期待できるため、高い血中濃度の持続が可能である。動物実験に用いる前に、この化合物が GIP 受容体に結合するか、またインスリン分泌促進

作用をもつかどうか、単離膵島または膵細胞株を用いて確認する。

糖尿病マウス (LD-STZ, db/db, Akita, KKy) と対照マウスに DPP-4 耐性 short-form GIP を週 1 回皮下投与し、体重、血圧、血糖値、HbA1c をモニターする。一定期間(4-12 週)飼育後、経口ブドウ糖負荷試験、インスリン感受性試験を行い耐糖能の改善効果の評価する。血漿インスリン値やグルカゴンを EIA にて測定する。さらにマウスを屠殺後、膵臓を摘出する。膵島の形態についてはインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、PP など膵島ホルモンの免疫染色を行う。さらに膵組織を酸エタノール法で処理し、膵臓あたりのインスリンやグルカゴンの含有量を EIA にて測定し比較する。

short-form GIP の生理学的、病態生理学的影響の検討

short-form GIP がどのような刺激で分泌されるかは未だ不明である。申請者は今までの検討で、アルギニン刺激により分泌されることを明らかにしたが、生理学的な刺激とは考えにくい。

分泌機構に関しては、単離膵島を用いて検討する。また、状況に応じて膵細胞株 (TC) も使用する。各種アミノ酸、脂肪酸 (リノール酸、リノレン酸、オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、DHA、EPA)、胆汁酸 (コール酸、タウロコール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸) や膵・消化管ホルモン (インスリン、グルカゴン、GLP-1、GLP-2、ソマトスタチン、グレリン、CCK、PYY など) を培養液に添加後、培養液を回収し、short-form GIP を測定する。

short-form GIP は C 端が欠失しているために、既存の GIP ELISA 法では測定できない。したがって、short-form GIP に特異的な抗体を作成し RIA の系を樹立する。また、それまでに GIP 受容体を過剰発現したヒト胎児腎細胞を用い、細胞内の cAMP を測定することで short-form GIP の濃度を測定する。

さらに、正常と糖尿病状態において発現・分泌がどう変化するか、糖尿病発症動物の膵組織を免疫組織学的に GIP の染色性につき正常動物と検討する。また、糖尿病状態の動物より膵島を単離し酸エタノール抽出を行い、short-form GIP の濃度を測定する。

4. 研究成果

DPP-4 耐性 Short-form GIP の治療薬としての可能性の検討

short-form GIP:GIP 1-30 のアミノ酸を一部改変した compound A を作成した。Compound A は、DPP-4 酵素を加えて分解しても、分解されにくく、GIP 受容体に結合し、in vitro で細胞内 cAMP を増加させることが明らかになった。マウスに投与した実験では、投与後 1 時間での有意な血中濃度の上昇を認めた。

compound A は、残念ながら投与後 1 日目以降の血中濃度に対照マウスと比較して差を認めず、long-acting agonist としての作用を認めなかった。次に、DPP-4 抵抗性の GIP(1-30)アナログを合成し ([D-Ala2] GIP (1-30))、C 末端を PEG 化した。血漿からの消失時間を検討するため、PEG 化及び非 PEG 化のアナログを正常耐糖能マウスの皮下に単回投与し (350-7000pmol/body)、投与後 60 分から 7 日目まで採血を行い、レセプターを介したバイオアッセイを用いて GIP の血中濃度を測定した。正常耐糖能マウスに非 PEG 化アナログを用いて IPGTT(3g/kg)を施行し、十分な血糖降下作用を示す GIP の血中濃度を検討した。その際の GIP の血中濃度を維持できる PEG 化 GIP の投与条件を検討後、非糖尿病マウス(N)と STZ 糖尿病マウス(S)を、PEG 化 GIP アナログ投与群(G)・非投与群(C)の 4 群に分け、体重、随時血糖、HbA1c の測定及び IPGTT で耐糖能の評価を行い、膵の組織学的検討も行った。PEG 化アナログを 7000pmol/body で投与した際には 7 日目の時点でも検出可能であり、半減期は約 60 時間であった。一方、非 PEG 化アナログは投与 24 時間後には消失していた。非 PEG 化アナログを用いて行った IPGTT では最低でも 100pmol/l 程度の GIP の血中濃度が必要と考えられた。PEG 化アナログを 3 日毎の投与で血中濃度を維持できると判断し、長期的な GIP 投与を開始した。正常耐糖能群においては随時血糖、HbA1c、IPGTT、体重に変化は無かった。STZ 群においては GIP 投与群で随時血糖は低く、HbA1c は有意に改善していた。IPGTT においても GIP 投与群で耐糖能が有意に改善していた。膵島の組織像では STZ 群で細胞の減少と細胞の増殖が見られたが、GIP 投与によってその異常が軽減していた。以上より、PEG 化した short-form GIP アナログは忍容性があり、STZ 糖尿病マウスにおいて糖尿病の進行を抑制し得ることが示唆された。

short-form GIP の生理学的、病態生理学的影響の検討

short-form GIP の生理学的、病態生理学的影響の検討:研究代表者らは糖尿病状態において膵細胞機能が異常に亢進してグルカゴが過剰分泌であることを示した。その際、膵島において細胞領域の拡大と細胞数の増加を認め、その一因が糖尿病状態における細胞の増殖亢進であることを見いだした。その後の検討で、膵 GIP がグルカゴンと共に過剰発現をしていることが糖尿病モデルで明らかになった。さらに、膵島内 GIP 受容体の発現が逆に低下していることを見いだした。またその変化が DPP-4 阻害薬により改善されることも確認した。

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 1 件)

1. Takeda Y, Fujita Y, Honjo J, Yanagimachi T, Sakagami H, Takiyama Y, Makino Y, Abiko A, Kieffer TJ, Haneda M. 'education of both beta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice.' Diabetologia 55:404-412, 2012

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 柳町剛司、藤田征弘、本庄潤 他 . ' 持効型 short-form GIP 投与は低用量 STZ 誘発糖尿病モデルマウスの耐糖能を改善する。' 日本糖尿病学会 第 57 回年次学術集会, 2014.
2. Yukihiro Fujita. 'New Aspect of GIP' The 5th AASD Scientific meeting, Seoul, Korea, 2013.
3. Tsuyoshi Yanagimachi, Yukihiro Fujita et al. 'The long-acting analogue of short-form GIP suppress the progression of hyperglycaemia in a streptozotocin -induced diabetic model' World Diabetic Congress (IDF), Melbourne, Australia, 2013.
4. Tsuyoshi Yanagimachi, Yukihiro Fujita et al. 'Expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide is increased concomitantly with alpha-cell expansion in diabetic models.' The 3th AASD & 9th IDF-WPR Scientific meeting, Kyoto Japan, 2012.
5. 藤田征弘 . 日本糖尿病学会 第 54 回年次学術集会, 2012.
6. Yasutaka Takeda, Yukihiro Fujita, Jun Honjo, Tsuyoshi Yanagimachi, Hiroya Kitsunai, Yumi Takiyama, Yuichi Makino, Atsuko Abiko, Masakazu Haneda. 'Early DPP-4 inhibition suppresses the progression of diabetes in low-dose STZ mice via alleviation of beta cell death and alpha cell proliferation.' EASD 47th Annual Meeting. Lisbon, Portugal, 2011.
7. Yukihiro Fujita. 'Short-form GIP is expressed in pancreatic alpha cells and gut endocrine cells' 2011 International Conference on Diabetes and Metabolism, Seoul, Korea, 2011.
8. 藤田征弘. 'short-form GIP は膵α細胞で発現し、インスリン分泌を促進する' 日本糖尿病学会 第 53 回年次学術集会, 2011.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者：藤田 征弘

(FUJITA YUKIHIRO)

研究者番号：20451461

旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野 助教

(2) 研究分担者：本庄 潤

(HONJO JUN)

研究者番号：30451462

旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野 特任助教

(3) 連携研究者

()

研究者番号：