

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591343

研究課題名(和文) グルカゴン分泌制御機構とその糖尿病薬による修飾メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of glucagon secretion mechanisms and its modulation by anti-diabetes drugs

研究代表者

石原 寿光 (ISHIHARA, Hisamitsu)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60361086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞のグルカゴン分泌の亢進は、2型糖尿病の病態の根幹の一つであるが、その分泌制御にスルホニル尿素受容体を介する亜鉛やGLP-1の関与が重要である可能性を示し、そのメカニズム解明への一歩を踏み出すことができた。また、臨床研究により、インスリン注射が必要なほど膵島の障害がおこり、糖尿病が進行した患者でも、DPP-4阻害薬はグルカゴン分泌を抑制することで血糖コントロールを改善することを明らかにすることができた。並行して、グルカゴン測定方法についても検討し、新しい測定法では、よりダイナミックなグルカゴン分泌応答の変化が捉えられることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Increased glucagon secretion is an essential pathogenic abnormality found in type 2 diabetes patients. In this study, we have conducted several experiments aiming to elucidate mechanisms of glucagon secretion and to apply the results for analyzing pathogenesis of type 2 diabetes in humans. We found that modulation of the sulfonylurea receptor signaling by zinc and GLP-1 could be involved in glucagon secretion, providing insights for further analysis on its mechanisms. We have also conducted a clinical study in which type 2 diabetes patients on insulin monotherapy were treated either with sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, or metformin, a biguanide compound. We have demonstrated that sitagliptin improved glycemic control by reducing glucagon secretion. In parallel, we have compared glucagon immunoassays, and found that a newly developed glucagon ELISA revealed more dynamic changes in glucagon after a meal challenge test.

研究分野：代謝学

キーワード：グルカゴン インクレチン スルホニル尿素受容体 DPP-4阻害薬 メトホルミン

1. 研究開始当初の背景

膵α細胞のグルカゴン分泌の亢進は、インスリン分泌障害とともに、2型糖尿病の病態の根幹の一つである。1970年代に、グルカゴンに対する抗体が作製され、糖代謝異常を有する多くの患者で血清グルカゴン値の異常が見出されると、グルカゴンの糖代謝における重要な役割が叫ばれた。しかし、グルカゴンを分泌するα細胞が少ないこともあって、基礎的研究の進展が乏しく経過する中で、グルカゴン分泌の糖代謝における役割は、不問に伏せられていた。ところが、2000年以降インクレチン関連薬が臨床の現場に登場し、インクレチンホルモンの一つ GLP-1 によるグルカゴン分泌の抑制が、血糖降下作用の主体の一つであることが明らかになるにつれ、グルカゴンの役割に注目が集まりつつあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、グルカゴン分泌のパラクリンシグナルを介する制御メカニズムと内在性シグナルを介する制御メカニズムを解明し、得られる知見を糖尿病患者の病態解明に応用することである。

この目的のために、以下の課題を遂行した。

- 1) 遺伝子改変動物および細胞株を用いたグルカゴン分泌機構の解析
- 2) 2型糖尿病における血糖降下薬のグルカゴン分泌制御への作用の解析

3. 研究の方法

- 1) スルホニル尿素受容体 (SUR1) 欠損マウスを用いた解析。
- 2) Arx 過剰発現細胞におけるグルカゴン分泌の解析。
- 3) 2型糖尿病患者における血糖降下薬のグルカゴン分泌修飾作用の解析。

4. 研究成果

1) SUR1 はα細胞にも発現し、グルカゴン分泌に重要な役割を担っていると考えられている。そこで、SUR1 欠損マウスを用い、グルカゴン分泌を検討した。既報の通り、SUR1 欠損マウスでは、グルコース刺激によるインスリン分泌がほぼ欠如し、またグルカゴン分泌の抑制も認められなかった。さらに、このマウスに GLP-1 を腹腔内注射投与すると、遷延する低血糖を認めた。この際に、グルカゴン分泌の増加は認められなかった。現在そのメカニズムを解析中である。

次に、このマウスの膵α細胞に SUR1 の発現を戻した場合の効果を検討する目的で、基礎実験を行った。グルカゴン分泌においてもインスリン分泌においても、SUR1 の役割は同様であるとの仮定に基づいて、マウス由来インスリン分泌細胞である MIN6 細胞を用いて、SUR1 の野生型 (正常型) と SUR1 の亜鉛結合部位のアミノ酸に変換をおこして亜鉛が結合できなくなった SUR1 を発現させて、インスリン分泌に対する影響を検討した。図1に示すように、野生型の SUR1 を発現させた場合には、SU 薬である glimepiride 刺激によるインスリン分泌が亜鉛添加で抑制されたのに対し、変異型 SUR1 を発現させた場合には、亜鉛による抑制が認められなかった。SUR1 の

亜鉛結合部位が実際の細胞活動においても、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、本 SUR1 変異体を用いた実験をマウスを用いて進めていく。

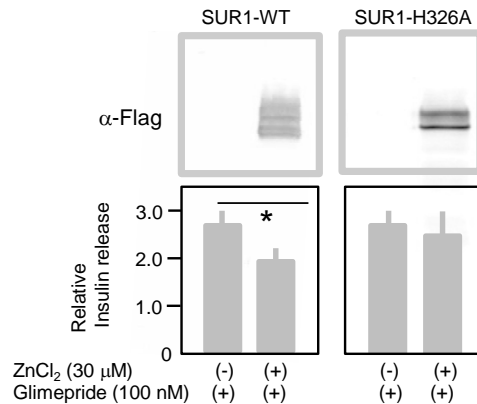


図1 変異SUR1受容体を発現させたMIN6細胞では、Zn²⁺によるGlimepiride刺激インスリン分泌の抑制が欠如した。

2) これまでにトランスジェニックマウスの手法でマウスβ細胞に転写因子 Arx を発現させる、あるいは MIN6 細胞に Arx を強制発現させることにより、グルカゴン産生が誘導される、あるいはごく少なかったグルカゴン産生が増加したとの報告があったので、我々も MIN6 細胞において、薬剤誘導的に Arx を強制発現させることを試みた。Flag タグを付加した Arx の薬剤誘導性の発現は確認されたが、グルカゴン産生の有意な増加を認めることができなかった。我々が所有している MIN6 細胞が高度に分化していることによる可能性が考えられたが、既報との相違の理由は明らかではない。

そこで、グルカゴン分泌細胞として知られているが、α細胞への分化が不十分と考えられているαTC1細胞(クローン6)に強力なプロモーターである CAG 発現ユニットを用いて Arx を発現させたクローンを選別・作製した。現在これらのクローンの解析を進めているところである。

3) 2型糖尿病治療薬がグルカゴン分泌に及ぼす影響を検討した。まず、日本大学板橋病院糖尿病・代謝内科外来通院中で、食事療法あるいは経口血糖降下薬単剤で治療中の患者において空腹時のグルカゴンおよび C-ペプチド(インスリン分泌量を反映)を測定した(図2)。HbA1c が7%前後で各群22~39人の患者で検討されたが、スルホニル尿素薬で治療中の患者で最も血中のグルカゴン値は低い傾向を認め、グルカゴン/C-ペプチドの比で見ると有意に低かった。スルホニル尿素薬単剤で良好な血糖コントロールを保っている場合には、十分膵β細胞が保たれており、保たれたβ細胞の機能により、α細胞活動、すなわちグルカゴン分泌が抑制されていた可能性が考えられた。同様の検討をインスリン製剤のみで治療中(製剤の種類は問わず)で行うと、血中グルカゴン濃度は高い値

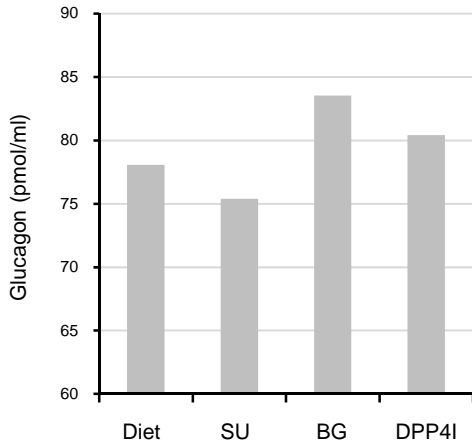


図2 食事療法あるいは経口血糖降下薬単剤で治療中の2型糖尿病患者の空腹時グルカゴン値

を示した。そこで、次にβ細胞が減少し、血糖コントロールにインスリン注射が必要となっている患者において検討を進めた。

DPP-4 阻害薬は、インスリン分泌のみならず、グルカゴン分泌を抑制して、血糖低下作用を発揮することが示唆されている。そこで、インスリン単独で治療中の患者に DPP-4 阻害薬の一つであるシタグリプチンを追加投与した場合のグルカゴン分泌について解析した。

インスリン注射のみで治療中であり、経口の糖尿病治療薬は使用していない患者 25 人（平均 HbA1c 約 8.3%）に文書による同意のもと 13 人にはシタグリプチンを 12 人にはメトホルミン（ピグアナイド薬）を投与した。途中、様々に理由により両群とも 2 名が試験継続ができず、最終的に 11 人と 10 人が本臨床試験を完遂した。

図3に示すように DPP-4 阻害薬の予測される効果として、シタグリプチン投与により活性型 GLP-1 と活性型 GIP の血中濃度の増加が認められた。興味深いことに総 GLP-1 あるいは総 GIP 濃度は、シタグリプチン投与により低下した。

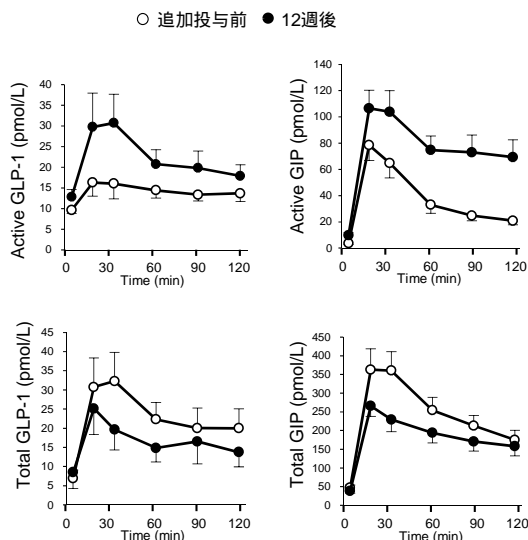


図3 インスリン治療中の2型糖尿病患者への Sitagliptin追加がGLP-1、GIPに及ぼす効果

これらの喧嘩はメトホルミン投与では変化を認めなかった。

12 週間後の食事負試験時のグルカゴン分泌応答を投薬開始前と比較すると、図4に示すように、両群とも約 0.8%と同等な HbA1c の低下、したがって同等な血糖コントロールの改善が認められたが、グルカゴン分泌応答の変化には大きな違いを認めた。すなわち、シタグリプチン投与では、グルカゴン分泌が減少したのに対し、メトホルミン投与では変化が認められず、両群間の差は有意であった。

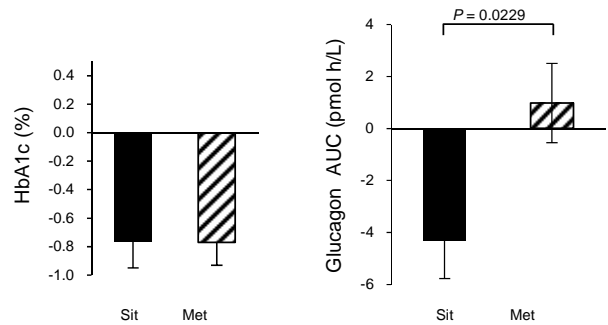


図4 インスリン治療中の2型糖尿病患者への Sitagliptin1(Sit) あるいはMetformin(Mit)追加が HbA1c、Glucagon分泌に及ぼす効果

これらの研究と並行して、グルカゴン測定方法についても検討した。グルカゴンには類縁の蛋白がいくつかあり、そのために正確にグルカゴンのみを測定することが困難とされている。世界中で測定法の改良が続けられているところである。最近になって、Mercodia社から ELISA 法に基づく新たな測定キットが発売された。2 型糖尿病患者の食事負試験時の検体を従来の RIA 法に基づく方法と比較した。

図5に示すように、新しい測定法を用いた場合には、全体として値が低く出た。このため、グルカゴン分泌応答の変化としては、よりダイナミックなものとなった。従来の RIA 法では抗体を一種類のみ使用するため、夾雑物を測定している可能性が考えられる。一方 ELISA 法では 2 種類の抗体を用いているためよりグルカゴンのみを測定することが可能となったと思われる。

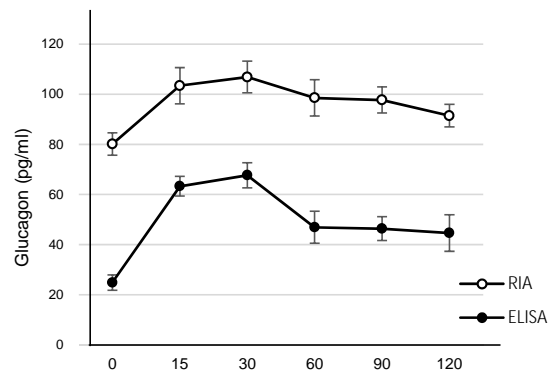


図5 Linco社のRIAとMercodia社のELISAを用いた 2型糖尿病患者の食時負試験でのグルカゴン値の比較

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 6件)

1. Yamaguchi S, Ikejima M, Furukawa A, Abe M, Nakazaki M, Ishihara H. Octreotide for hypoglycemia caused by sulfonylurea and DPP-4 inhibitor. *Diabet Res Clin Pract.* in press. 2015. 査読有.
2. Tanji Y, Yamaguchi S, Ishigaki Y, Katagiri H, Oka Y, Ishihara H. DPP-4 inhibition ameliorates pancreatic β -cell failure and improves glucose tolerance in the mouse model of Wolfram syndrome. *J Diabetes Mellitus* 5: 72-80, 2015. DOI: 10.4236/jdm.2015.52009. 査読有.
3. Otsuka Y, Yamaguchi S, Furukawa A, Kosuda M, Nakazaki M, Ishihara H. Addition of sitagliptin or metformin to insulin monotherapy improves blood glucose control via different effects on insulin and glucagon secretion in hyperglycemic Japanese patients with type 2 diabetes. *Endocrine J* 62, 133-143, 2015. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0148. 査読有.
4. Ishihara H. The cutting-edge of medicine: glucagon renaissance. *Nihon Naika Gakkai Zasshi* 102: 3237-3243, 2013. https://www.jstage.jst.go.jp/article/naika/102/12/102_3237/_pdf. 査読無.
5. Sakata N, Goto M, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M. Clinical experiences in the treatment of pancreatic arteriovenous malformation by total pancreatectomy with islet autotransplantation. *Transplantation* 96: e38-40, 2013. doi: 10.1097/TP. 0b013e3182a01333. 査読有.
6. Tsukita S, Yamada T, Uno K, Takahashi K, Kaneko K, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, Ishihara H, Oka Y, Katagiri H. Hepatic glucokinase modulates obesity predisposition by regulating BAT thermogenesis via neural signals. *Cell Metab* 16: 825-832, 2012. doi: 10.1016/j.cmet.2012.11.006. 査読有.

[学会発表](計 11件)

1. 小須田南, 江頭富士子, 大塚雄一郎, 大川原奈々, 東海林忍, 山口賢, 石原寿光. オクトレオチドとジアゾキシド治療に抵抗し、低血糖の対応が困難であったインスリンノーマの一例. 第 612 回日本内科

学会関東地方会例会. 2015年2月14日. 日内会館(東京都・文京区).

2. 山口賢, 小須田南, 田中彩, 古川麻美, 大塚雄一郎, 中崎満浩, 石原寿光. 2型糖尿病患者における血漿グルカゴン値の新規 ELISA 法と従来型 RIA 法を用いた測定と比較検討. 第 15 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会. 2014年9月6日. ラレフさいたま(埼玉県・さいたま市).
3. Yamaguchi S, Otsuka Y, Ishihara H. Modulation of glucagon and insulin secretion by DPP-4 and DPP-4 inhibitors. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014年5月22日~24日. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市).
4. 古川麻美, 山口賢, 池島碧, 田中彩, 上野のぶ子, 東海林 忍, 江頭富士子, 岡本真由美, 吉田好徳, 阿部雅紀, 石原寿光. DPP-4 阻害薬と SU 薬による遷延性低血糖に対してオクトレオチド投与が奏効した症例. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014年5月22日~24日. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市).
5. 岡本真由美, 江頭富士子, 東海林忍, 山口賢, 荒井秀仁, 小須田南, 石原寿光. 低炭水化物食が腎機能を悪化させたと考えられた 2 型糖尿病の 2 症例. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014年5月22日~24日. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市).
6. 大塚雄一郎, 山口賢, 東海林忍, 古川麻美, 田中彩, 小須田南, 上野のぶ子, 大川原奈々, 江頭富士子, 岡本真由美, 石原寿光. インスリン療法中の患者へのシタグリプチン併用による血糖コントロール改善のメカニズム. 第 51 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会. 2014年1月18日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
7. Otsuka Y, Kosuda M, Ueno N, Yamaguchi S, Nakazaki M, Ishihara H. Sitagliptin improves blood glucose control by suppressing glucagon secretion in insulin-treated type 2 diabetic patients. The 49th European Association for Study of Diabetes Annual Meeting. 2013年9月23日~27日. Barcelona (Spain).
8. Ishihara H, Otsuka Y, Yamaguchi S, Furukawa A, Nakazaki M. Zinc regulates insulin secretion through interaction with histidine residues of SUR1. The 73rd Scientific sessions of American Diabetes Association. 2013年6月21日~25日. Chicago (U.S.A.).
9. 古川麻美, 大川原奈々, 上野のぶ子, 大塚雄一郎, 東海林 忍, 山口賢, 江頭富士子, 岡本真由美, 中崎満浩, 武市奈緒美, 杉原仁, 及川真一, 石原寿光. グルコース反応性インスリンノーマの一例. 2013年5月16日~18日. ホテル日航熊本他(熊

- 本県・熊本市).
10. 石原寿光. DPP-4 阻害薬と GLP-1 受容体作動薬. インスリン・グルカゴン分泌機構からみた 2 型糖尿病治療. 第 47 回糖尿病学の進歩 2013 年 2 月 15~16 日. 四日市市文化会館他(三重県・四日市市).
 11. Ishihara H, Yamaguchi S, Otsuka Y, Furukawa A, Nakazaki M. Regulation of islet hormone secretion by intracellular and intercellular mechanisms. The 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress. 2012 年 11 月 24 日~27 日. 国立京都国際会館(京都府・京都市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/dmet>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 寿光 (ISHIHARA HISAMITSU)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60361086

(2) 研究分担者

山口 賢 (YAMAGUCHI SUGURU)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：70451614

(3) 連携研究者

岡本 真由美 (OKAMOTO MAYUMI)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：80349993