

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461327

研究課題名(和文) 新開発グルカゴン測定系を用いた糖尿病における膵細胞調節破綻機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of physiological disfunctions of pancreatic alpha cell in diabetes mellitus by newly developed glucagon sandwich ELISA

研究代表者

小林 雅樹 (Kobayashi, Masaki)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：80373041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞機能、特にグルカゴン分泌に関する研究の問題点の一つに現行のグルカゴン測定系の信頼性の低さがある。申請者はこの問題を克服するため、グルカゴンN末端およびC末端に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法を開発した。この新規開発測定系は従来の測定系に比べ感度、特異性ともに大きく向上していることを確認した。血漿中のグルカゴン濃度の変化について、従来の測定系との比較検討を行ったところ、新規開発測定系と従来の測定系の測定結果の間に相関は認められなかった。今後様々な生理条件下におけるグルカゴンの分泌動態を改めて解析していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Many discrepancies exist between studies of glucagon secretion. The most critical issue that has hindered glucagon research is the poor specificity and low sensitivity of current assay systems. Thus, we developed a new glucagon sandwich ELISA that has higher specificity and sensitivity than conventional assays, including competitive RIA. New sandwich ELISA exhibited accurate and precise measurement of glucagon in plasma samples. We also confirmed the specificity of new sandwich ELISA for glucagon by using various proglucagon products. Cross-reactivity with other peptides except glucagon were less than 0.1%, which did not seem to affect the results for glucagon concentration. We found no correlation between the glucagon values by new sandwich ELISA and other glucagon assays available commercially. We propose that glucagon should be re-evaluated using the newly developed sandwich ELISA method in order to understand the true physiological and pathological functions of glucagon.

研究分野：糖尿病

キーワード：グルカゴン 膵細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病においては、インスリン分泌の障害に加えてグルカゴン分泌抑制の障害も認められる。そのために生じるグルカゴンの過剰な分泌は、肝臓からの糖新生を亢進させることで血糖値の更なる上昇を引き起こすと考えられる。近年では、膵細胞破壊を行った膵細胞欠損マウス (Hancock et al. Mol Endocrinol 2010)、およびグルカゴン受容体欠損マウス (Conarello et al. Diabetologia 2007, Lee et al. Diabetes 2011) がインスリン分泌低下にもかかわらず正常血糖を維持することが明らかされるとともに、グルカゴン分泌異常こそが糖尿病の原因であるとする、グルカゴン中心説が提唱されている (Unger and Cherrington. J Clin Invest 2012)。糖尿病における膵細胞機能調節の破綻に関わる分子機構を明らかにすることは、糖尿病の発症機構を理解するとともに、新しい糖尿病治療法を開発する上で欠かすことのできないものとなっている。

グルカゴンは前駆体であるプログルカゴンがプロセッシングされて産生されるため、グルカゴンと共通のアミノ酸配列を持つ分子が複数存在する。そのため、現在の一般的なグルカゴン測定は、グルカゴンの C 末端構造がオキシントモデュリンやグリセンチンと異なることを利用し、グルカゴン C 末端特異的抗体による競合法イムノアッセイにより行われている。しかし、血漿をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離し、各分画ごとにアッセイを行うと、分子量の異なるグルカゴン免疫陽性分画が複数存在するという、血中グルカゴンの分子多様性 (Glucagon heterogeneity) が知られている (Valverde et al. J Clin Endocrinol Metab 1974)。さらに、

細胞株 (TC1.6 細胞) においてグルカゴンと共通の C 末端をもつグリセンチン 1-61 の産生と分泌が行われていることが報告されていることから (Rouille et al. PNAS 1994)、Glucagon heterogeneity は in vivo、in vitro のどちらの実験系にも存在しており、従来のグルカゴン C 末端特異的抗体による競合法イムノアッセイではグルカゴンの正確な測定は行われていなかったものと考えられる。そのため、反応特異性のより高いグルカゴン測定系の開発が求められている (Holst et al. Diabet Obest Metab 2011) と同時に、様々な刺激に対するグルカゴンの分泌変化について、改めて検証しなくてはならない状況であった。このような背景の下、申請者はグルカゴン C 末端および N 末端それぞれに特異的なモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法に基づく、グルカゴン ELISA を開発した。この測定系は、従来のグルカゴン測定系に比べ高感度であり、さらにグリセンチン 1-61 の標準品とは反応しないという高い反応特異性も確認していた (未発表データ)。

そこで、この新しいグルカゴン測定系を用いることで、糖尿病の進行に伴う真のグルカ

ゴン分泌の変化を明らかにするとともに、グルカゴン分泌異常の分子メカニズムを明らかにしようとする本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

新開発の ELISA を用いたグルカゴンアッセイ系により、生体試料中の真のグルカゴンのみを特異的に測定できることを明らかにするとともに、糖尿病モデル動物を用いて、個体の健康状態が糖尿病潜在期、そして糖尿病発症後と推移していくに伴い、グルカゴン分泌がどのように変化していくのかを明らかにする。次に糖尿病モデル動物と、膵細胞において GFP を発現するマウスを組み合わせ、グルカゴン分泌異常の生じている個体の膵細胞を GFP シグナルを指標にセルソーターを用いて回収し、グルカゴン分泌に関わるシグナル分子の発現解析を行うことで、糖尿病に伴う膵細胞機能異常の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

血漿や細胞培養液を各種クロマトグラフィーにより分離し、各分画についてサンドイッチ ELISA を行い、グルカゴン分画のみで反応が起こることを示すと同時に、Big Plasma Glucagon 分画に存在するグルカゴン分解活性抑制の為にプロテアーゼインヒビターの選択を行う。サンドイッチ ELISA と試料へのプロテアーゼインヒビター添加を併用することで、真のグルカゴンのみを正しく測定ができることを示す。この測定系を用いて、糖尿病モデル動物における真の血漿グルカゴン濃度の変化を測定し、糖尿病に伴う真のグルカゴンの分泌様式の変化を明らかにする。糖尿病モデルマウスと、膵細胞にて GFP を発現する遺伝子改変マウスとを組み合わせ、糖尿病状況下の膵細胞をセルソーターにより分離、回収し、グルカゴン分泌等に関わるシグナル分子の発現解析を行うことで、糖尿病に伴う膵細胞機能異常の分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) Big Plasma Glucagon 分画におけるグルカゴン分解活性抑制の為にプロテアーゼインヒビターの選択

競合法イムノアッセイを行う場合、インキュベーション中に血漿中に含まれるプロテアーゼにより標識グルカゴンが分解されれば、抗体と結合する標識グルカゴンが減少し、見かけ上高いグルカゴン値が検出されることとなる。そのため、グルカゴン測定においてはプロテアーゼインヒビターとしてアプロチニンが反応系に添加されるが (Eisentraut et al., Am J Med Sci 1968)、アプロチニンにより阻害されないグルカゴン分解活性が存在しており、これが Big

Plasma Glucagon 分画の正体である可能性が報告されている。同時にこのプロテアーゼ活性がパラクロロマーキュリフェニルスルホン酸(PCMS)とロイペプチンにより抑制できることが報告されている(Tsubouchi et al., Endocrinology 1986)。しかし、PCMSは有機水銀化合物であるため使用に際し大きな制限を受けるといった問題がある。そこで、本研究実施当初はPCMSに代わるプロテアーゼインヒビターの選択を計画していた。

しかし、研究開始後にグルカゴン測定用のプロテアーゼインヒビターカクテルを含む真空採血管(BD P800、ベクトン・ディッキンソン社製)が発表され、この採血管により採血を行った場合、室温において少なくとも96時間はグルカゴンが安定であると報告された。本研究においても、BD P800採血管を用いて得た血漿について、採血後直ちに遠心分離を行ったものと、室温で12時間静置後に遠心分離を行ったもの間で新規開発ELISAによるグルカゴン測定値に大きな差は認められないことを確認した。また、BD P800採血管を用いずアプロチニン添加のみで得たマウス血漿においては、アッセイ精度試験であるグルカゴン添加回収試験の結果、グルカゴン回収率は95%以上であった。これらの結果より、新規開発ELISAでグルカゴンを測定する上でBD P800採血管を使用、また特にマウス血漿については氷上での操作を行えばアプロチニンの添加のみで反応中のグルカゴン分解は抑制できると結論付けた。

(2) 新開発のグルカゴンサンドイッチELISAによる血中グルカゴンの特異的な測定の証明

現在までにグルカゴンを含むプログルカゴン由来ペプチド13種、グルカゴンと同じセクレチン・グルカゴンファミリーであるセクレチン、VIP、グルカゴンとの相同性の高いGIP、そしてインスリンについて交差性試験を行った結果、グルカゴン以外のペプチドとの交差率は0.1%未満であった。さらに、新規開発ELISAが生体試料中においてもグルカゴンのみを特異的に検出することを検討するため、血漿をSepPakカラムにより脱塩後、SP Sephadexにより得た弱塩基性分画を逆相HPLCにて分離し、各分画ごとに測定を行うとグルカゴンの溶出位置に当たる分画のみで反応が認められた。

一方で、本研究開始後にMercodia社よりグルカゴンELISAキットが発表された。このELISAについては、現在市販されているグルカゴン測定キットの中で最も特異性、精度、感度において信頼性の高い測定系であると報告されている(Bak et al., Eur J Endocrinol 2014; Wewer Albrechtsen et al., Diabetologia 2014)。しかし、オキシントモジュリンやグリセチン1-61との交差性が5-16%の値を示すことが報告されており(稲垣ら、医学と薬学 2015)、逆相HPLC分画

についても、Mercodia Glucagon ELISAはグルカゴンの溶出位置の分画とは異なる分画においても有意な反応が認められた。

以上の結果より、新規開発ELISAは現行の測定系より非常に高い反応特異性を示す測定系であると考えられる。

(3) 糖尿病モデルマウスにおけるグルカゴン分泌様式の変化の解析

ストレプトゾトシン(STZ)による細胞破壊マウスでは高血糖と共に血中グルカゴンの増加も認められるが、グルカゴン受容体ノックアウトマウスは細胞破壊を行っても高血糖を呈さないこと(Lee et al., Diabetes, 2011)、細胞破壊動物への抗グルカゴン抗体の投与(Brand et al., Diabetes, 1996)、またはレプチン投与による血中グルカゴンの抑制(Yu et al., PNAS, 2008)により血糖値は低下することから、近年ではこのグルカゴン増加が高血糖の原因であると考えられている(Unger and Cherrington, J Clin Invest, 2012)。そこでC57BL/6マウスにSTZによる細胞破壊を行い、血中グルカゴンの変化を調べた。従来の測定系では高血糖を呈した個体のうち高グルカゴン血漿であった個体はおよそ半数であり、残りの個体は正常血糖マウスと同じレベルであった。これに対し、新規開発測定系により細胞破壊マウスの血中グルカゴンの測定を行ったところ、逆にコンロトールマウスよりグルカゴンが低下しているという結果を示した。新規開発測定系と従来の測定系の測定結果の間に相関がないだけでなく、細胞破壊に伴う高血糖に高グルカゴン血漿が関わっていない可能性も考えられた。血中グルカゴン濃度は食事に含まれる栄養素(アミノ酸や脂肪酸)による分泌刺激や、飢餓状態の進行により大きく変化するため、糖尿病モデルマウスの採血条件についてさらに厳格に検討を行ったうえで、糖尿病の進行に伴うグルカゴン分泌の変化について解析する必要がある。

(4) 単離細胞を用いた膵細胞機能解析

プログルカゴン遺伝子ヘテロ欠損マウス($Gcg^{Gfp/+}$ マウス、Hayashi et al., Mol Endocrinol 2009)はプログルカゴン遺伝子をGFPに置換したことにより、プログルカゴン産生細胞(膵細胞、小腸L細胞等)においてGFPを発現する。このマウスの膵ラ氏島よりGFPシグナルを指標として細胞を単離する実験条件の検討を行った。

その結果、単離ラ氏島を分散させる方法としてEGTA処理の後にAccutase消化を組み合わせることにより、細胞の生存率を維持した状態で細胞の分散ができることをイメージングフローサイトメーター(ImageStream Mk II System, Merck Millipore)にて確認した。

今後はセルソーターによりGFP陽性細胞を回収、培養のための条件を検討するとともに、他の細胞のコンタミネーション率をPCRによ

る非 細胞のマーカー遺伝子の発現を調べることで明らかにしていく。そして糖尿病モデルマウスと Gcg^{gf/+}マウスを組み合わせ、得られた単離 細胞について、グルカゴン分泌や細胞機能調節に関わる分子についてウェスタンブロットやリアルタイム PCR を用いた発現解析を行い、糖尿病に伴う 細胞機能異常の分子メカニズムを明らかにする。

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 1 件)

北村忠弘、小林雅樹、 概論 グルカゴンが糖尿病学・医療にもたらした“革命”とは？、実験医学、 査読無、 33、 2015、 872-879.

〔学会発表〕(計 4 件)

Kobayashi M、 Ida T、 Kikuchi O、 Sasaki T、 Kitamura T、 Plasma glucagon levels determined by newly developed glucagon ELISA、 第 40 回日本比較内分泌学会、 2015 年 12 月 11 日～2015 年 12 月 13 日、 J M S アステールプラザ(広島県広島市)

小林雅樹、井田隆徳、菊池司、佐々木努、北村忠弘、 グルカゴンの新規開発測定系による分泌動態の検証、 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、 2015 年 05 月 21 日～2015 年 05 月 24 日、 海峡メッセ下関(山口県下関市)。

小林雅樹、井田隆徳、菊池司、佐々木努、北村忠弘、 グルカゴンの新規開発測定系の開発と分泌動態の検証、 第 88 回 日本内分泌学会学術総会、 2015 年 04 月 23 日～2015 年 04 月 25 日、 ホテルニューオータニ東京(東京都千代田区)。

Kobayashi M、 Ida T、 Kikuchi O、 Suga T、 Morita K、 Sasaki T、 Kitamura T、 Development of highly-specific glucagon sandwich ELISA and validation of plasma glucagon duration in mice、 第 39 回 日本比較内分泌学会大会、 2014 年 11 月 07 日～2014 年 11 月 09 日、 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/metsi/g/index>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 雅樹 (KOBAYASHI, Masaki)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：8 0 3 7 3 0 4 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし