

令和元年6月6日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09373

研究課題名(和文) 受容体結合活性に基づくグルカゴン測定法によって糖尿病を再検証する。

研究課題名(英文) Re-evaluation of pathophysiology in diabetes by the receptor-mediated glucagon assay

研究代表者

藤田 征弘 (Fujita, Yukihiro)

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：20451461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、受容体に基づくグルカゴンおよびインクレチンの測定法を樹立した。この測定法は既存のELISA法より生理活性を反映できる測定法であることを、in vitro と正常耐糖能者および2型糖尿病患者にミール負荷試験を行いそのサンプルを測定することで見出した。さらに、小腸のプログルカゴン陽性細胞をマウスから採取する方法を確立し、膵臓以外でも消化管にグルカゴンが存在することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてグルカゴン受容体結合活性に基づき、より生理的なグルカゴン作用を反映するグルカゴン測定系を樹立すること、その測定系を用いて血液や細胞・組織抽出物などを測定すること、さらに既存の免疫アッセイ法と比較検討することは、基礎研究のみならず糖尿病の病態を臨床的に再確認する上で必須であり、かつ学術的に重要で、糖尿病治療へ新たなアプローチへ応用できると確信している。

研究成果の概要(英文)：We established novel methods to measure glucagon, GIP and GLP-1 beaded on cell-based receptor-mediated assays. We strongly speculate that these assays can reflect to physiological actions of those hormones through studies in vitro and in vivo, measuring samples during meal tolerance tests from non-diabetic and diabetic subjects. Furthermore, we established the method for selective collection of proglucagon-positive cells and identified glucagon expression in the gastrointestinal tract other than the pancreas.

研究分野：糖尿病学、内分泌学

キーワード：グルカゴン 膵島 測定法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵α細胞と分泌ホルモンのグルカゴンが、糖代謝の重要な因子として再注目されている。インクレチン関連薬はグルカゴン分泌を抑制することで食後過血糖を是正することが示されており、グルカゴン分泌の調節機構の解明は重要な課題である。一方、グルカゴン測定法には問題点が指摘されている。今まで用いられてきた免疫反応による測定法は、使用される抗体のプログルカゴンや遊離ペプチド断片への交差反応性が指摘されており、より生理的なグルカゴン（受容体を介した）活性を反映する測定系を樹立する必要がある。さらに、膵α細胞以外の胃や消化管から膵グルカゴンが分泌されることも報告されているが、その発現制御や糖尿病における病態生理についてはまだ解明されていない。

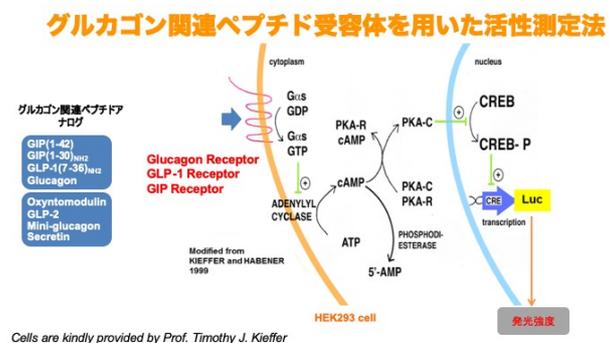
### 2. 研究の目的

グルカゴン受容体結合活性に基づいたグルカゴン測定法を確立し、糖尿病状態におけるグルカゴン分泌の異常を再検証する。さらにグルカゴンの血中濃度に対する消化管/胃の役割を我々の測定法で検討する。我々は高血糖状態、インスリン作用の低下した糖尿病状態下で、α細胞が数量的に増加し、α細胞の増殖自体が亢進していることを見いだしているが、詳細なメカニズムは不明である。本研究では、その病態生理を解明する。また、数量的異常のほかに別の機序、特に **dedifferentiation** の関与があるのかを追求する。α細胞の機能変化として、グルコースに対するグルカゴン分泌調節の異常、α細胞から分泌されるインクレチンの変化との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

グルカゴン受容体と Cre-Luc ベクターを共発現させた HEK293 細胞を用い、ルシフェラーゼ発光活性を測定し、cAMP 産生能よりグルカゴン濃度を算出する。2型糖尿病患者でのグルカゴン分泌について、食事負荷を行い、新規測定法と既存のイムノアッセイを比較し再検証する。プログルカゴン遺伝子のプロモーター下に蛍光蛋白 Venus を発現するマウスを導入した。胃や消化管でのグルカゴン遺伝子の発現を確認し、分泌タンパクの活性を新規測定法で確認する。糖尿病状態におけるα細胞の機能的異常や増殖能亢進のメカニズムについて、膵島から venus 陽性α細胞を選択的に回収し、分化増殖にかかわる転写因子などの遺伝子解析や、分泌機能の変化の有無、dedifferentiation の可能性を解明する。

バイオアッセイに用いる細胞は、HEK293 細胞にグルカゴン受容体と CRE プロモーター下にルシフェラーゼを発現するベクターを共トランスフェクションさせ、ピューロマイシンとハイグロマイシンで選択した **permanent stable cell line** を用いる。この細胞を96穴プレートに培養し、スタンダードまたは、希釈したサンプル(血清、培養液上清、組織抽出液など)を KRB Buffer で希釈し5時間培養後、Bright-Glo ルシフェラーゼキットにて発光強度を測定する。(右図)



健常者に食事負荷試験 (MTT) を行い、血液サンプルのバイオアッセイとイムノアッセイ (RIA, ELISA) によるグルカゴン測定を行い、特性を比較する。入院中の2型糖尿病患者に MTT を行い、血糖・インスリン、GIP、GLP-1 に加え、同様にグルカゴンの測定を行う。さらに、インスリン分泌能、インスリン抵抗性との関連性を検討する。血糖コントロール改善前後のグルカゴン分泌を比較する。

Cambridge 大学の Reimann 教授より、マウスプログルカゴン遺伝子プロモーター下に、蛍光蛋白である Venus (YFP) を発現する **mGluVenus** マウスの供与を受け、飼育している。同マウスより膵島を単離後、さらに膵島の細胞をコラゲナーゼで分離させ、FACS にて YFP を発現している細胞を回収する方法を確立する。膵外での YFP 陽性細胞の検索は、直接蛍光や YFP 抗体を用いた免疫組織化学で確認する。消化管粘膜から FACS 陽性細胞を回収する方法を確立する。**mGluVenus** マウスに STZ を腹腔内投与して糖尿病モデルを作成し、膵島や胃での YFP の発現の変化を確認する。

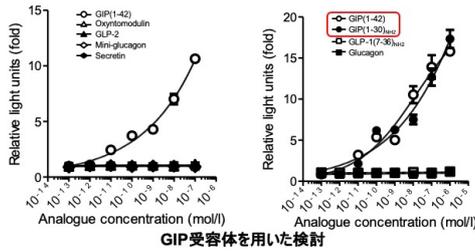
### 4. 研究成果

#### 1) 受容体結合活性に基づくグルカゴンおよび関連ペプチドの測定法の確立

受容体結合を介した bioassay 法は、各受容体と CREB-Luc を共発現した HEK293 細胞を用い、受容体に結合後増加する cAMP 濃度を luciferase の発光強度として活性を測定し、Active GIP、Active GLP-1、glucagon に加え、オキシントモデュリン (OXM)、GLP-2、miniglucagon、セク

レチンを比較検討した。

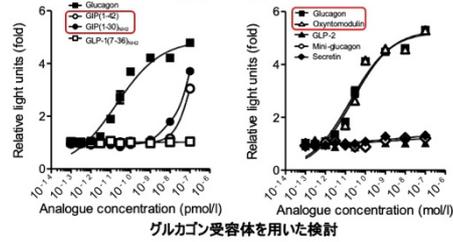
**GIP受容体はGIP1-42, GIP1-30のみが活性化**



GIP受容体を用いた検討

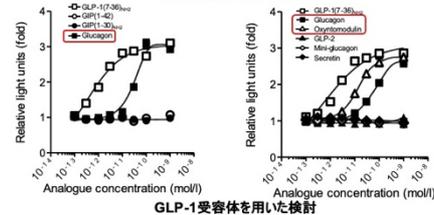
GIP 受容体に対しては、GIP1-42 と GIP1-30 が濃度依存性に発光度を上昇させたが、他の類縁ペプチドでは、受容体を活性化しなかった。グルカゴン受容体に対して、グルカゴン及び OXM はほぼ同等の発光強度の増加を認めた。一方、グルカゴンの ELISA 法では OXM は約 20% の反応性を示した。GLP-1 受容体に対する GLP-1 に比し OXM の反応性は右方ヘシフトしていたが、グルカゴンに比し、低濃度から luciferase の発光強度を上昇させており、グルカゴンよりも GLP-1 受容体活性が強いことが示された。

**Glucagon受容体はGlucagon≧Oxyntomodulin>>>GIPの順で活性化される**



グルカゴン受容体を用いた検討

**GLP-1受容体はGLP-1>Oxyntomodulin>Glucagonの順で活性化される**



GLP-1受容体を用いた検討

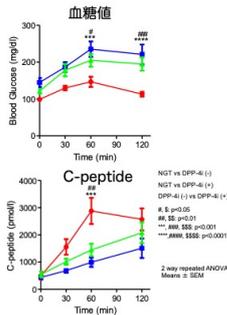
2) 正常耐糖能者(NGT) 及び糖尿病患者(T2DM)のミール負荷試験(MTT)下の血中濃度

正常耐糖能者(NGT) および 2 型糖尿病患者(T2DM) (DPP-4 阻害薬内服群、非内服群) を対象としてミール負荷試験(MTT)を施行後、受容体結合を介した新規 bioassay 法を用いて GIP、GLP-1、glucagon の血中濃度を測定し、ELISA 法と比較した。対象者の年齢と血糖値、C ペプチドの推移を示す。

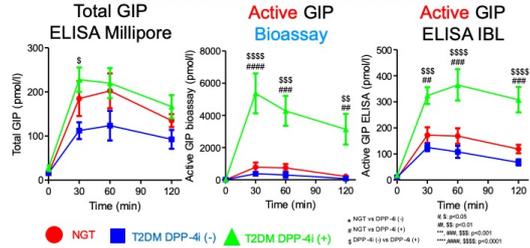
外来通院中の2型糖尿病患者 (DPP-4 阻害薬無、DPP-4阻害薬有) および非糖尿病患者に対して、ミール負荷試験を施行

	正常耐糖能者	2型DM DPP-4阻害薬 (-)	2型DM DPP-4阻害薬 (+)
N	9	7	9
年齢 (歳)	65.4 ± 13.6	66.6 ± 9.6	66.1 ± 10.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.1 ± 4.5	26.0 ± 2.5	26.9 ± 4.5
HbA1c (%)	5.7 ± 0.3	8.6 ± 2.3	6.6 ± 0.4

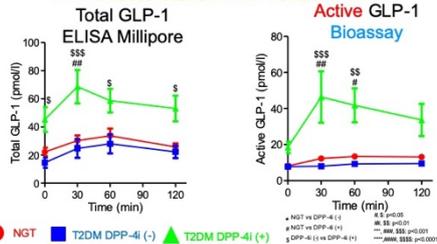
Mean ± SD  
 ● NGT  
 ■ T2DM DPP-4 (-)  
 ▲ T2DM DPP-4 (+)  
 共四研究者  
 帯広 機山内科クリニック  
 本上 潤 先生  
 機山 宏樹 先生



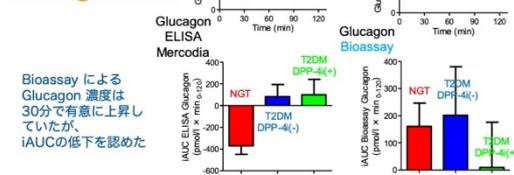
**2型糖尿病患者でもDPP-4阻害薬はGIP受容体をより強く活性化**



**DPP-4阻害薬によるGLP-1受容体活性化はGIP受容体活性化に比べ軽度である**



**Glucagonの検討**



NGT、T2DM とも MTT で Active GIP は ELISA、bioassay 共に 30~60 分でピークを示した。T2DM において、Active GIP (ELISA) は DPP-4i 投与群、非投与群で、空腹時および 30 分値とも同程度だったが、Active GIP (bioassay) は ELISA 法よりも MTT 後の増加率が高く、DPP-4i 群で顕著であった。T2DM では DPP-4i 群によって血糖の改善は認められたが、インスリンは増加しなかった。また、glucagon (ELISA) のは DPP-4i 投与によって低下傾向を認めたが、有意差はなかった。一方 glucagon (bioassay) の iAUC<sub>0-120min</sub> は有意に低下した。

3) mGluVenus マウスからのプログルカゴン遺伝子発現細胞の検討

mGluVenus-STZ マウスより小腸をコラゲナーゼで処理し、フローサイトメトリーYFP 陽性 α 細胞を回収する方法を確立した。さらに、マウス各組織から、タンパク/ペプチドを酸エタノール法で抽出し、膵臓のみならず、消化管でもグルカゴンは発現することを確認した。現在、糖尿病マウスモデルで検討中である。

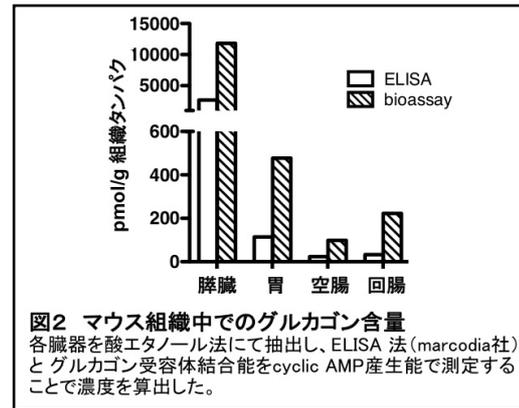
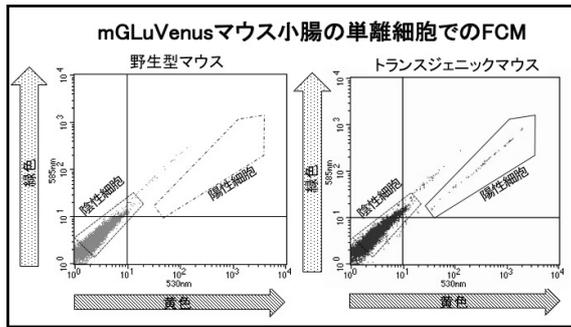


図2 マウス組織中でのグルカゴン含量  
各臓器を酸エタノール法にて抽出し、ELISA 法 (marcodia社) とグルカゴン受容体結合能をcyclic AMP産生能で測定することで濃度を算出した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Yanagimachi T, Fujita Y, Takeda Y, Honjo J, Atageldiyeva KK, Takiyama Y, Abiko A, Makino Y, Kieffer TJ, Haneda M. Pancreatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) (1-30) expression is upregulated in diabetes and PEGylated GIP(1-30) can suppress the progression of low-dose-STZ-induced hyperglycaemia in mice. *Diabetologia* 2016;59(3):523-41
2. Yanagimachi T, Fujita Y, Takeda Y, Honjo J, Sakagami H, Kitsunai H, Takiyama Y, Abiko A, Makino Y, Kieffer TJ, Haneda M. *Mol Metab.* 2014; 6:226-231

### 〔学会発表〕 (計 4 件)

1. 柳町剛司、藤田征弘、竹田安孝、坂上英充、別所瞭一、滝山由美、安孫子亜津子、太田嗣人。DPP-4 と Neutral endopeptidase 24.11 (NEP) がオキシントモデュリンの生理活性に与える影響は異なる。第62回日本糖尿病学会年次学術集会, 仙台, 2019年
2. 柳町剛司、藤田征弘、本庄潤、竹田安孝、坂上英充、別所瞭一、滝山由美、安孫子亜津子、横山宏樹、太田嗣人、羽田勝計。レセプター統合に基づく bioassay 法による活性型インクレチン及びグルカゴン測定の有用性の検討。第61回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京, 2018年
3. Tsuyoshi Yanagimachi, Yukihiro Fujita, Jun Honjo, Yasutaka Takeda, Hidemitsu Sakagami, Atsuko Abiko, Tsuguhito Ota, Hiroki Yokoyama, Masakazu Haneda. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor has a much great impact on bioactive glucose-dependent insulinotropic polypeptide in type 2 diabetes. 2018 Asia Islet Biology & Incretin Symposium, Seoul, Korea, 2018
4. Tsuyoshi Yanagimachi, Yukihiro Fujita, Jun Honjo, Yasutaka Takeda, Hidemitsu Sakagami, Atsuko Abiko, Tsuguhito Ota, Hiroki Yokoyama, Masakazu Haneda. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor has a much great impact on bioactive glucose-dependent insulinotropic polypeptide in type 2 diabetes. 12th IDF-WPR Congress /10th AASD Scientific Meeting, Kuala Lumpur, Malaysia, 2018

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：柳町剛司

ローマ字氏名：YANAGIMACHI, Tsuyoshi

研究協力者氏名：竹田安孝

ローマ字氏名：TAKEDA, Yasutaka

研究協力者氏名：本庄潤

ローマ字氏名：HONJO, Jun

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。