

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15345

研究課題名(和文) グルカゴンC末抗体を用いた新規血糖調節因子の同定と生理機能の解明

研究課題名(英文) Identification of novel glucagon-related peptides by using C-terminal anti-glucagon antibody

研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA, TADAHIRO)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：グルカゴンのC末抗体を用いたアフィニティー精製で、マウスの血液検体から新規グルカゴン関連ペプチドの同定を試みたが、試料が少ないために同定ができなかった。そこで、現在はマウスの膵臓、あるいは消化管を用いて分子同定を試みている。一方、独自に開発したLC/MS/MSを用いたグルカゴン測定法を元にイムノアッセイを評価した所、従来の競合法RIAよりもサンドイッチELISAの方が特異性に優れていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify novel glucagon-related peptides by using affinity chromatography with C-terminal anti-glucagon antibody and mouse plasma samples. However, due to insufficient sample volume, we failed to identify such molecules. Then we are now trying to do it using mouse pancreas or intestine. We also evaluated currently commercially available immunoassays for glucagon by comparing with our newly developed LC/MS/MS system and found that Mercodia sandwich ELISA has much higher correlation with LC/MS/MS compared to conventional RIA.

研究分野：代謝学

キーワード：グルカゴン

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の病態にグルカゴンの異常が深く関わっていることが明らかとなった (Unger and Cherrington, J Clin Invest, 2012)。しかしながら、従来グルカゴン測定法は特異性が低く、使用されているグルカゴン C 末抗体の交叉反応が問題視されてきた (Bak et al Eur J Endocrinol, 2014)。実際に複数のグルカゴン類似ペプチドが存在しており、そのいくつかはアミノ酸配列がグルカゴンと重複している。そこで申請者はグルカゴンの C 末抗体と N 末抗体の両方を用いたグルカゴン・サンドイッチ ELISA を独自に開発した。新規サンドイッチ ELISA と従来法を、逆相液体クロマトグラフィーを用いて比較検討したところ、従来法はグルカゴン以外に複数のペプチドと交叉反応していることが明らかとなった。さらに、糖負荷後の血中濃度を測定したところ、サンドイッチ ELISA では上昇するが、従来法では低下していたことから、C 末抗体が認識するグルカゴン以外のペプチドが糖代謝調節に何らかの生理作用を有している可能性が示唆された。

従来グルカゴン測定系が不正確であることは以前から指摘されており (Rouille PNAS 3242, 1994, Edgerton Nat Med 674, 2013)。その原因はイムノアッセイで用いるグルカゴン C 末抗体による交叉反応であると考えられていたが、交叉するペプチドは未だ同定されておらず、そのペプチドが何らかの生理作用を有しているかも不明である。また、交叉ペプチドと糖尿病病態との関連についても全く不明である。その様な背景の中、申請者は新しいグルカゴン・サンドイッチ ELISA 法を開発し、健常者の糖負荷後の血液検体や 2 型糖尿病患者の血液検体をサンドイッチ ELISA と従来法で比較した結果、グルカゴン C 末抗体が反応するグルカゴン以外のペプチドが糖代謝調節に生理的に関わっているのではないかという知見を得た。そこで、逆相液体クロマトグラフィーや質量分析といった高精度解析系を用いてこの新規ペプチドの同定を試みる。また、同定した新規ペプチドを合成し、野生型マウスや糖尿病などの代謝疾患モデルマウスに投与することで生理作用を明らかにする。さらに、新規ペプチドを特異的に測定できるアッセイ系をサンドイッチ ELISA 法で新たに確立し、糖負荷後の血液サンプルや糖尿病等の代謝疾患モデル動物における血中濃度を解析することで、新規ペプチドの生理的動態や各種代謝疾患における病態生理的役割を解明しようと試みる。糖尿病などの代謝疾患に対する将来の新しい治療法開発のシーズになる可能性がある本研究課題は新規性が高く、かつ意義も大きいと考えた。

2. 研究の目的

まず、C 末抗体が認識するグルカゴン以外

のペプチドを同定する。まず、このペプチドが多く含まれる組織を明らかにする為に、様々な状態のマウス (若年、高齢、糖尿病、肥満など) から膵臓と消化管の抽出物を準備し、従来法とサンドイッチ ELISA によって測定値が大きく異なる組織を選択する。この組織からグルカゴン C 末抗体を用いたアフィニティーカラム精製と逆相液体クロマトグラフィーによりペプチドを分離していき、最終的に質量分析を用いて構造決定する。同定したペプチドを合成し、マウスに投与して血糖値やインスリン、グルカゴン、GLP-1 等の血中濃度に対する影響を調べる。さらに、同定したペプチドを特異的に測定可能なアッセイ系を新たにサンドイッチ ELISA 法で確立する。この測定法を用いて、糖負荷後の新規ペプチドの血中濃度変化を解析し、糖代謝調節に生理的に関与しているか検証する。次に、糖尿病や肥満といった代謝異常のマウスにおける血中濃度を解析し、このペプチドの病態生理的な意義を明らかにする。

健常人の糖負荷後の血中グルカゴン濃度が従来測定法と新規開発グルカゴン・サンドイッチ ELISA で全く異なるパターンが得られたことから、申請者は従来法が交叉反応するグルカゴン以外のペプチドが糖負荷後に生理的に変動していると考えた。さらに、申請者の予備検討では 2 型糖尿病患者の血中グルカゴン濃度は従来法では健常者の 1.2 倍程度であったが、新規サンドイッチ ELISA では 1.87 倍に増加していたことから、従来法が交叉反応する新規ペプチドが糖尿病病態と関わっている可能性が示唆された。この様な新規ペプチドの生理的、あるいは病態生理的意義を解明する。本研究の成果として、新たな糖代謝調節に重要なペプチドを同定できた場合、そのペプチドに対する活性化剤や阻害剤が種々の代謝疾患 (糖尿病、肥満、高脂血症など) の治療に応用できる可能性があり、新薬開発における標的ペプチドとしても魅力的である。現在、予備軍も含めると国内に 2000 万人を超え、国民病となっている糖尿病に対し、現状の治療法では不十分なことは明白であり、本研究の成果は新しい糖尿病薬の開発という卓越した成果につながることを期待できる。

3. 研究の方法

まず、グルカゴン C 末抗体が認識するグルカゴン以外の新規ペプチドの同定を、アフィニティーカラム精製と逆相液体クロマトグラフィー、並びに質量分析法を用いて行う。次に、同定した新規ペプチドを合成し、野生型マウスやグルカゴンノックアウトマウスに投与することで、生理作用を解明する。さらに、肝細胞や脂肪細胞の培養細胞に添加することで、糖代謝や脂質代謝における影響を検討する。次に、新たに同定したペプチドを特異的に検出できる測定系を

サンドイッチ ELISA 法で開発し、糖負荷後の新規ペプチドの血中濃度変動を明らかにする。この測定法の開発には既に申請者が開発に成功しているグルカゴン・サンドイッチ ELISA の原理を用いる。最後に、糖尿病、肥満、高脂血症といった代謝疾患のモデル動物を用いて、新規ペプチドの血中濃度を解析する。

(1) グルカゴン C 末抗体を用いた新規ペプチドの同定

グルカゴン C 末抗体が認識するグルカゴン以外の新規ペプチドの単離、同定を行うにあたり、まず、このペプチドを多く含む組織を明らかにする。マウスの様々な臓器(膵臓、消化管など)について、煮沸処理により内因性のペプチダーゼを失活させた後に組織の可溶化を行い、SepPak カラムによる脱塩、ペプチドの回収を行う。各組織より得たペプチドについて、従来測定法と新規サンドイッチ ELISA による測定比較を行い、新規ペプチド含有量が多いと考えられる組織を明らかにする。この組織の抽出物を用いて、グルカゴン C 末抗体を用いたアフィニティカラム精製および逆相液体クロマトグラフィーにより、ペプチドを単一な状態まで分離、回収する。回収した各ペプチドについて質量分析を用いた解析により、構造決定を行うことで新規ペプチドを同定する。

(2) 新たに同定したペプチドの生理作用の解明

上記計画(1)で同定したペプチド配列をもとに、合成ペプチドを作製する。In vivo の実験系においては、合成ペプチドをマウス個体に対し、注射による単回投与や浸透圧ポンプを用いた持続投与を行い、血糖値、遊離脂肪酸、血中インスリン濃度、血中グルカゴン濃度等の代謝パラメータへの影響を検討する。次に、野生型マウスに加え、グルカゴンノックアウトマウス(GcgK0 マウス、Hayashi et al. Mol Endocrinol 2009、名古屋大学環境医学研究所の林良敬博士より供与済み)を使用する。GcgK0 マウスはプログルカゴン遺伝子が GFP に置換されているため、内因性のグルカゴンおよびプログルカゴン由来ペプチドの影響を受けずに、新規ペプチドを投与した影響を調べることができる。In vitro の実験系においては、肝細胞、脂肪細胞等の培養系(細胞株および初代培養細胞)に合成ペプチドを添加し、グリコーゲン量や脂肪蓄積量への影響を解析するほか、細胞中の cAMP、カルシウムイオン濃度等の変化、糖産生や脂肪合成に関わる PEPCK、G6Pase、FAS、ACC、SREBP-1c などの因子への影響を RT-PCR やウェスタンブロットにより定量解析する。

(3) 新規同定ペプチドの測定系の開発

申請者らが開発したグルカゴン・サンドイッチ ELISA はグルカゴンに対する C 末抗体を固相化抗体として、N 末抗体を検出用抗

体として用いたものである。従って、同様の原理を利用して、今回は新たに新規ペプチドの N 末端に対する特異抗体を作製し、それを検出用抗体として用いることで、新規ペプチドを特異的に検出、定量測定できるサンドイッチ ELISA 系を開発する。次に、この新規ペプチド・サンドイッチ ELISA を用いて、糖負荷後の血液サンプルを測定し、生理的な新規ペプチドの血中動態を明らかにする。同時にインスリンやグルカゴンなどの他の血糖調節ホルモンとの関連についても検討する。

4. 研究成果

まず、本研究を提案した際に見出していた、申請者らが独自に開発したサンドイッチ ELISA を用いた糖負荷後の血中グルカゴン濃度の推移は誤りであることが判明した。具体的には、我々のサンドイッチ ELISA はグルカゴンに対する特異性は最も優れていたが、恐らくグルカゴンの構造変化体を認識できていない可能性がある。本研究課題と同時に進行させていた質量分析装置を用いた新しいグルカゴン測定系(LC/MS/MS)の開発に成功し、これを用いて我々のサンドイッチ ELISA と市販されているサンドイッチ ELISA の測定値間相関を検証した結果、相関が高いのは Mercodia 社のサンドイッチ ELISA という結果になった。さらに、Mercodia 社のサンドイッチ ELISA を用いて健常者の糖負荷試験時のグルカゴン濃度を測定すると、従来法の競合法 RIA と同じく、有意に低下した(未発表データ)。なお、LC/MS/MS との比較検証では従来法 RIA よりも Mercodia サンドイッチ ELISA の方に明らかに相関が高かったことから、その後のグルカゴン測定は全て Mercodia サンドイッチ ELISA を用いて行った。一方、グルカゴン C 末抗体が認識するグルカゴン以外の新規ペプチドの同定を、アフィニティカラム精製と逆相液体クロマトグラフィー、並びに質量分析法を用いて試みたが、試料が少な過ぎた為、分子の同定ができなかった。そこで、現在はマウスの膵臓、あるいは消化管の試料から、上記の方法で分子同定を試みている。また、上記の LC/MS/MS によるグルカゴン測定法を用いて、サンドイッチ ELISA 法の測定値と解離する検体を見つけ出し、その差を産み出す交叉反応分子を新規に分子同定すべく、検討を重ねている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

<http://taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村忠弘 (KITAMURA TADAHIRO)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()