

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09831

研究課題名（和文）グルカゴン関連ペプチドの測定法の確立とそれらの病態生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Establishment of quantification method of glucagon-related peptides and elucidation of pathophysiological role of the peptides

研究代表者

南 幸太郎（Minami, Kohtarō）

神戸大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：80334176

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ペプチドホルモンは生体における種々の生理機能を担うばかりでなく、それらの分泌あるいは作用の障害は様々な疾患の発症や病態と密接に関係している。従って、生体中のペプチドホルモンを正確に測定することは、疾患の正確な診断や病態評価、治療効果の判定に不可欠である。本研究では、プログルカゴンから産生されるグルカゴンおよび種々のグルカゴン関連ペプチドを対象として、血液サンプルからグルカゴン関連ペプチドを濃縮・精製する方法を確立するとともに質量分析計を用いた新規測定法を確立した。さらに、肥満や糖尿病の動物モデルやヒトから採取した血液サンプルを用いて本法が適用可能であることを確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において確立されたペプチドホルモンの測定法は、従来の免疫学的な測定法では回避することが困難である抗体の交差性の問題が解消できること、複雑なプロセッシングを受けるホルモンでも高精度な測定が可能であることなど、これまでの測定法と比較して優位性かつ独創性が高いものであり、微量な生体ペプチドを定量性・特異性を担保し迅速・効率的に測定する普遍的な方法の確立に直結する。また、本測定法により新規グルカゴン関連ペプチドの病態生理学的意義が解明されれば、糖尿病などの糖代謝疾患の病態解明に大きく寄与し、その新規診断法確立の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Peptide hormones exert various physiological roles and dysfunction of their secretion and action closely relate with the onset and pathophysiology of various diseases. Therefore, precise quantification of peptide hormones is essential for the disease diagnosis, pathophysiological evaluation, and assessment of therapeutic effect. In this study, we established an extraction method for glucagon and glucagon-related peptides from plasma samples, and also developed a quantification method by using mass spectrometry. We further confirm the usefulness of the method by using blood samples from animal models of obesity and diabetes and humans.

研究分野：分子糖尿病学

キーワード：ペプチドホルモン グルカゴン 質量分析計 固相抽出法 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペプチドホルモンは生体における種々の生理機能を担うばかりでなく、それらの分泌あるいは作用の障害は様々な疾患の発症や病態と密接に関係している。従って、生体中のペプチドホルモンを正確に測定することが、疾患の正確な診断や病態評価、治療効果の判定に不可欠である。従来、ペプチドホルモンの測定には測定対象とするペプチドに対する特異的抗体を用いた免疫学的測定法(ラジオイムノアッセイ、RIAやEnzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISAなど)が広く使用されてきた。しかし、多くのペプチドホルモンは前駆体から翻訳後プロセッシングにより複数の異なるペプチドが産生され、それらの血中の存在様式が多様であるだけでなく生理作用も異なる。特に、グルカゴンやGLP-1は、前駆体であるプログルカゴンから切り出される類似のペプチド(グリセンチン、オキシントモデュリン、GLP-2など)が存在するため、抗体と類似ペプチドとの交差反応により定量性や特異性に問題があること、免疫学的測定に広く用いられてきた抗体が枯渇したことなどから(グルカゴン抗体)正確な測定法の確立が望まれている。近年、質量分析計を用いたプロテオミクスやペプチドミクスの技術進展が目覚ましく、ペプチドホルモンなど生体ペプチドの測定にも応用されつつある。しかし、質量分析計を用いても微量なペプチドホルモンを同定・定量することは容易でなく、実用化には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、プログルカゴンから産生されるグルカゴンおよび種々のグルカゴン関連ペプチドを対象として、質量分析計を用いた新規測定法を確立するとともに動物モデルやヒトのサンプルを用いた解析から正常および糖尿病状態におけるグルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチドの動態とその病態生理学的意義を解明することを目的とし、下記の項目について研究を実施する。

(1) 質量分析によるグルカゴン関連ペプチドの測定法の確立

血中および膵島のグルカゴン関連ペプチドを濃縮・精製する方法ならびに質量分析計を用いて高精度に同定・定量する方法を確立する。

(2) グルカゴン関連ペプチドの動態と病態生理学的意義の解明

培養細胞、単離膵島、肥満や糖尿病の動物モデル、正常、耐糖能異常および糖尿病のヒトから採取したサンプル中のグルカゴン関連ペプチドを測定し、それらの動態とその病態生理学的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) 質量分析によるグルカゴン関連ペプチドの測定法の確立

固相抽出法あるいは免疫沈降法により血中および膵島のグルカゴン関連ペプチドを濃縮・精製する方法ならびに液体クロマトグラフ・トリプル四重極型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて高精度に同定・定量する方法を確立する。

(2) グルカゴン関連ペプチドの動態と病態生理学的意義の解明

培養細胞、単離膵島、肥満や糖尿病の動物モデル、正常、耐糖能異常および糖尿病のヒトから採取したサンプル中のグルカゴン関連ペプチドを測定し、それらの動態とその病態生理学的意義を解明する。

4. 研究成果

(1) グルカゴン関連ペプチドの濃縮・精製法の確立

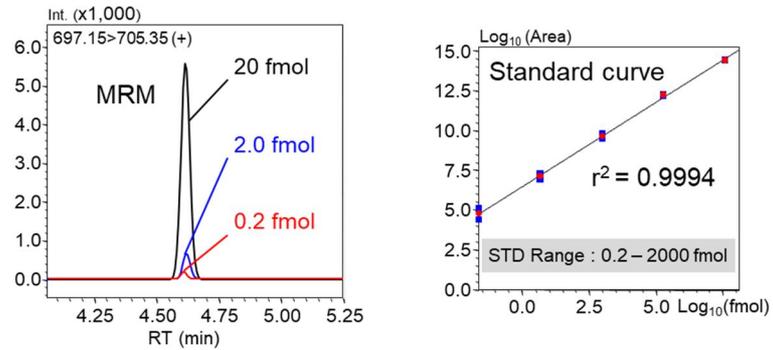
血中および膵島のグルカゴン関連ペプチドを濃縮・精製する方法として、固相抽出法と免疫沈降法の両者を検討した。入手可能な固相抽出プレートとグルカゴンの標品を用いて吸着剤の種類と量、洗浄液や溶出液の種類と量について検討した結果、グルカゴン関連ペプチドを濃縮・精製するために最適と考えられる方法を確立した。また、グルカゴンを特異的に認識する入手可能なモノクローナル抗体を用いて免疫沈降法を検討した結果、グルカゴンの回

収量が極めて少ないことがわかった。以上の結果から、グルカゴン関連ペプチドを濃縮・精製する方法として固相抽出法を用いることとした。

(2) 質量分析によるグルカゴン関連ペプチドの測定法の確立

トリプシン消化しない丸ごとのグルカゴンの標品および固相抽出法により血液から濃縮・精製したグルカゴンをサンプルとして、液体クロマトグラフ・トリプル四重極型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて高精度に同定・定量する方法を検討した。グルカゴンの標品をスパイクインした血漿サンプル

LC-MS/MSによるグルカゴンの検出



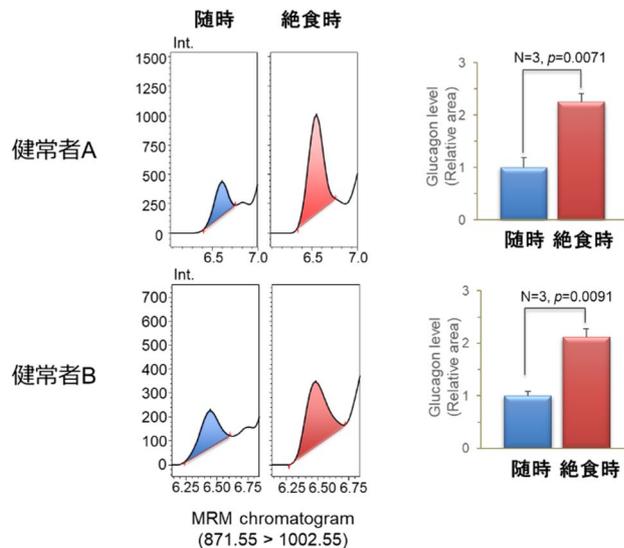
を用いて LC-MS/MS による分析パラメータなどを最適化し、固相抽出法により血中から濃縮・精製したグルカゴンの検出および定量に成功した（上図）。

トリプシン消化しない丸ごとのグルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチドの標品、上記(1)において確立した固相抽出法を用いて血中および豚島から濃縮・精製したグルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチド、グルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチドの標品をスパイクインした血漿サンプルを用いて、質量分析計により同定・定量するための分析パラメータを最適化し、グルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチドを検出および定量する方法を確立した。

(3) グルカゴン関連ペプチドの動態と病態生理学的意義の解明

正常 Wistar ラット、肥満 Zucker fatty ラット、非肥満糖尿病モデル Goto-Kakizaki ラット、分担者らが確立した新規肥満糖尿病モデル Zucker fatty diabetes mellitus ラット等から単離した豚島や各種負荷試験時に採取した血液サンプル、さらに健常者から採取した血液サンプル（右図）を用いて、従来の免疫学的な測定法（ELISA）と本測定法との比較・検証を行った。その結果、同一のペプチドの測定においては本測定法の優位性は特に認められなかった。本測定法は、新規ペプチドなど免疫学的な測定法が確立されていないペプチドの測定や同一サンプルにおける複数種類のペプチドの測定の場合に有用と考えられた。

健常者における血漿中グルカゴンの検出



本研究において確立されたペプチドホルモンの測定法は、従来の免疫学的な測定法では回避することが困難である抗体の交差性の問題が解消できること、複雑なプロセッシングを受けるホルモンでも高精度な測定が可能であることなど、これまでの測定法と比較して優位性かつ独創性が高いものであり、微量な生体ペプチドを定量性・特異性を担保し迅速・効率的に測定する普遍的な方法の確立に直結する。また、本測定法により新規グルカゴン関連ペプチドの病態生理学的意義が解明されれば、糖尿病を代表とする糖代謝疾患の病態解明に大きく寄与し、その新規診断法確立の基盤となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hashim Mahira, Yokoi Norihide, Takahashi Harumi, Gheni Ghupurjan, Okechi Oduori S., Hayami Tomohide, Murao Naoya, Hidaka Shihomi, Minami Kohtaro, Mizoguchi Akira, Seino Susumu	4. 巻 67
2. 論文標題 Inhibition of SNAT5 Induces Incretin-Responsive State From Incretin-Unresponsive State in Pancreatic β -Cells: Study of β -Cell Spheroid Clusters as a Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1795 ~ 1806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db17-1486	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Murao Naoya, Yokoi Norihide, Honda Kohei, Han Guirong, Hayami Tomohide, Gheni Ghupurjan, Takahashi Harumi, Minami Kohtaro, Seino Susumu	4. 巻 12
2. 論文標題 Essential roles of aspartate aminotransferase 1 and vesicular glutamate transporters in β -cell glutamate signaling for incretin-induced insulin secretion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0187213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0187213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Harumi, Hidaka Shihomi, Seki Chihiro, Yokoi Norihide, Seino Susumu	4. 巻 828
2. 論文標題 Characteristics of repaglinide effects on insulin secretion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 52 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2018.03.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Seino Susumu, Sugawara Kenji, Yokoi Norihide, Takahashi Harumi	4. 巻 19
2. 論文標題 β -Cell signalling and insulin secretagogues: A path for improved diabetes therapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Diabetes, Obesity and Metabolism	6. 最初と最後の頁 22 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.12995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Carmean Christopher M., Yokoi Norihide, Takahashi Harumi, Oduori Okechi S., Kang Christie, Kanagawa Akiko, Kirkley Andrew G., Han Guirong, Landeche Michael, Hidaka Shihomi, Katoh Miki, Sargis Robert M., Seino Susumu	4. 巻 316
2. 論文標題 Arsenic modifies serotonin metabolism through glucuronidation in pancreatic β -cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E464 ~ E474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00302.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayami Tomohide, Yokoi Norihide, Yamaguchi Takuro, Honda Kohei, Murao Naoya, Takahashi Harumi, Wang Shujie, Seino Yusuke, Kamiya Hideki, Yabe Daisuke, Sweet Ian R., Mizoguchi Akira, Nakamura Jiro, Seino Susumu	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor-like features of gene expression and metabolic profiles in enlarged pancreatic islets are associated with impaired incretin-induced insulin secretion in obese diabetes: a study of ZFDM rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 TAKAHASHI Harumi, YOKOI Norihide, SEINO Susumu	4. 巻 95
2. 論文標題 Glutamate as intracellular and extracellular signals in pancreatic islet functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 246 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.95.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Oduori S. Okechi, Kenju Shimomura, Harumi Takahashi, Norihide Yokoi, Kohtaro Minami, Yuko Maejima, and Susumu Seino
2. 発表標題 GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors both normalize diabetes caused by deletion of β -cell KATP channels in mice
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井伯英、村尾直哉、高橋晴美、清野 進
2. 発表標題 Incretin and beta-cell metabolic signaling
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村尾直哉、横井伯英、韓 桂栄、グブルジャン ゲニ、清野 進
2. 発表標題 膵 細胞グルタミン酸シグナルのインスリン分泌における役割の解明 -CRISPR/Cas9による遺伝子改変 膵 細胞株を用いた検討
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 グブルジャン ゲニ、横井伯英、波多野直哉、韓 桂栄、高橋晴美、清野 進
2. 発表標題 インクレチン応答性インスリン分泌増強機構の解明：インスリン顆粒内グルタミン酸の役割
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 マヒラ アシム、横井伯英、グブルジャン ゲニ、金川章子、星川律子、高橋晴美、清野 進
2. 発表標題 膵 細胞のインクレチン応答性獲得におけるアミノ酸トランスポーター-SNAT5の役割
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 速水智英, 横井伯英, 日高志保美, 川畑綾子, グブルジャン ゲニ, マヒラ アシム, 高橋晴美, 神谷英紀, 清野 裕, 中村二郎, 清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病の膵島におけるインクレチン応答性障害 オミクス解析による検討
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 速水智英, 横井伯英, 本田洸平, 高橋晴美, 神谷英紀, 溝口明, 中村二郎, 清野 進
2. 発表標題 肥満2型糖尿病における肥大膵島は未分化細胞や癌細胞に類似した代謝様式に変化し、インクレチン応答性障害を呈する
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 速水智英, 横井伯英, 吉田 舞, 本田洸平, 高橋晴美, 神谷英紀, 溝口 明, 中村二郎, 清野 進
2. 発表標題 肥満糖尿病の膵島におけるインクレチン応答性障害の発症機序
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学大学院医学研究科分子代謝医学部門ホームページ
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	横井 伯英 (Yokoi Norihide) (70311610)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	