

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16137

研究課題名(和文)腸管グルカゴンの機能及び糖新生器官としての腸管の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of intestinal glucagon and the role of the intestine as a gluconeogenic organ

研究代表者

柳町 剛司 (Yanagimachi, Tsuyoshi)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：20596275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：グルカゴン発現の確認にプログルカゴン遺伝子のプロモーター下に蛍光蛋白Venus (YFP)を発現するマウスを用いた。膵、胃、小腸を摘出後、受容体を介した方法を用いて各臓器のグルカゴンを測定した。各臓器ともSTZ糖尿病モデル群で高値であった。今回測定に用いた方法ではグルカゴンとオキシントモジュリン(OXM)を区別することができないため、グルカゴンを分解するNEPを添加し、評価したところ、膵及び胃のグルカゴン活性は大きく低下した。一方小腸では糖尿病状態で60%程活性が保持されており、OXMが増加した可能性が示唆された。今後腸管での糖新生にグルカゴン及びOXMが及ぼす影響を解析していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵グルカゴンと異なり、膵外グルカゴンの分泌調節機構や生理学的な役割については検討されていない。既報では膵全体的患者で経口ブドウ糖負荷後に免疫法で測定したグルカゴンの上昇を認めている。糖尿病状態での食後のグルカゴン分泌亢進に膵だけでなく、腸管グルカゴンが関与している可能性がある。この腸管グルカゴンの分泌機構を解明することが、糖尿病の病態を理解する上で重要と考えられる。さらに腸管での糖新生に関してはほとんど注目されておらず、報告も非常に少ない。腸管でのグルカゴン分泌や糖新生調節機構を明らかにすることは糖尿病の病態に新しい知見をもたらすことが期待され、新規治療法へのアプローチと成り得ると確信する。

研究成果の概要(英文)：Mice expressing the fluorescent protein Venus (YFP) under the promoter of the pro-glucagon gene were used to confirm glucagon expression. After the pancreas, stomach, and small intestine were removed, the glucagon of each organ was measured using a receptor-mediated method. Those organs glucagon levels of STZ mice were more elevated than that of control. Since the method used in this study can not distinguish between glucagon and oxyntomodulin (OXM), NEP, which degrades glucagon, was added and evaluated. Glucagon activity in the pancreas and stomach was greatly reduced. On the other hand, in the small intestine, about 60% of the activity was retained in the diabetic state, suggesting that OXM may have been increased. We will analyze the effects of glucagon and OXM on glycogenesis in the intestinal tract.

研究分野：糖尿病

キーワード：グルカゴン 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖新生は生理的には絶食時や飢餓状態で亢進する。これは元来血糖値が低い状態、空腹時において脳へブドウ糖を供給するメカニズムで生命の維持に必須であると考えられている。糖新生はグルカゴンやカテコラミンで促進され、インスリンで抑制される。生理的にグルカゴンは糖新生を飢餓や絶食時に促進する。一方糖尿病ではインスリン分泌不全のみならず、グルカゴンの分泌が食後に抑制されずむしろ亢進し、糖新生を亢進し高血糖を助長する。

我々は、低用量 STZ 糖尿病マウスにおいて、膵臓あたりのグルカゴン含量の増加や α 細胞陽性面積・細胞数の増加を確認しており、興味深いことに著明な慢性高血糖に至る前段階より α 細胞の増殖が亢進していることを見いだした (Takeda Y et al. Diabetologia 2012)。さらに、 α 細胞量増加に伴う高グルカゴン血症は、経口糖尿病薬で内因性インクレチンの不活化を抑制する DPP-4 阻害薬や我々が開発した持効型 glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) の投与によって、改善することを報告している (Yanagimachi T et al. Diabetologia 2016)。

グルカゴン (glucagon 1-29) は膵 α 細胞から分泌されるが、膵全摘患者においても免疫法によって測定したグルカゴンの分泌が報告されている。以前から膵外グルカゴンの存在が胃や小腸といった消化管で示唆されていたが、これまで使用されてきた免疫法によるグルカゴンの測定系の感度や特異性の点で問題が指摘されており、生理活性を有したグルカゴンを特異的に検出できる測定系が必要と考えられる。申請者はこれまでグルカゴン VIP ファミリーのホルモンである GIP や glucagon-like peptide 1 (GLP-1) について受容体結合に基づく生理活性を測定するバイオアッセイを樹立している (Yanagimachi T et al. Diabetologia 2016)。受容体と Cre-Luc を HEK293 細胞に共発現させ、リガンドによる細胞内 cAMP 濃度を反映したルシフェラーゼ活性測定する。グルカゴンにおいても同様の測定法を確立しており、膵全摘患者からの血液サンプルが、グルカゴン受容体を活性化させることを確認している。さらにマウス胃や腸管の粘膜の抽出物にグルカゴン活性が存在していることを確認しているが、腸管のグルカゴンが膵グルカゴンと同等の機能を有しているかは明らかではない。

膵細胞ではプログルカゴンから prohormone convertase 2 (PC2) によるプロセッシングを受け、グルカゴンが生じる。一方、腸管にもプログルカゴン遺伝子が存在しているが、腸管の L 細胞では PC1/3 によるプロセッシングを受けて GLP-1、GLP-2、glicentin などが産生される。興味深いことに高脂肪食や高血糖状態において膵 α 細胞で PC1/3 が誘導され、プログルカゴンが PC1/3 によってプロセッシングを受け、GLP-1 が分泌されることが報告されている。一方、腸管にも PC2 が発現していることが報告されている。GIP は通常 PC1/3 によるプロセッシングを受けるが、小腸でも PC2 によりプロセッシングを受け C 末端を欠いた short-form GIP になることが報告されている。もし、腸管のプログルカゴン陽性細胞でもプロセッシングが PC1/3 から PC2 へ変化すれば、そこから分泌されるホルモンは GLP-1 からグルカゴンへ変化する。つまり腸管で L 細胞の膵細胞化が起こる可能性がある。糖尿病では前述のごとく膵 α 細胞が増殖しているが、腸管グルカゴンの発現が変化するかについては詳細な検討はされていない。

糖新生における最も主要な臓器は肝臓であるが、一部は腎臓や小腸においても行われている。われわれは、正常耐糖能マウスにおいて薬理的に腎臓からのブドウ糖再吸収を抑制すると腎臓での糖新生が亢進し、低炭水化物食で肝へのブドウ糖流入を抑制すると肝臓での糖新生が亢進することを見出した (Kuralay A et al. PLoS One 2016)。一方、糖尿病状態では高血糖にも関わらずインスリン作用不足から糖利用が低下し、相対的なグルカゴン分泌上昇のため糖新生が亢進している。興味深いことに肝臓のみならず腎臓での糖新生も亢進しているとの報告もある。しかし、これまで腸管の糖新生について生理的意義や病態生理について検討している研究は少ない。われわれは飢餓状態や糖尿病状態で腸管の糖新生やブドウ糖吸収能が亢進していると仮定した。さらに糖尿病状態では、グルカゴンを介した腸管での糖新生の亢進などが高血糖を助長しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

グルカゴンは糖新生を絶食時に促進する。糖尿病では高血糖にもかかわらず、グルカゴン分泌が抑制されず糖新生は亢進し、高血糖を助長する。グルカゴンは膵細胞から分泌されるが、最近膵全摘患者でもグルカゴン分泌が報告されており、腸管グルカゴンの存在が示唆されている。本研究では腸管グルカゴンの発現・分泌機構や生理的作用を明らかにし、糖尿病状態での膵 α 細胞との関連、発現量の変化を検討する。さらに、糖新生は肝臓だけでなく、腎臓や腸管でも行われているが、腸管での糖新生に関しては不明な点が多く、その調節機構について解明する。

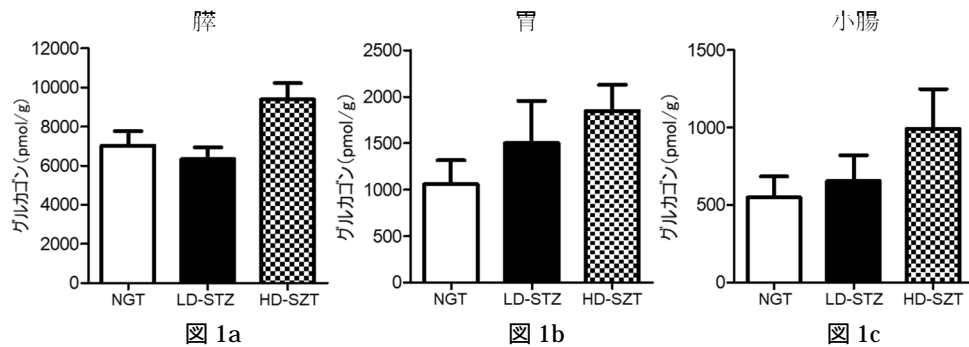
3. 研究の方法

正常耐糖能及び糖尿病モデルマウスの絶食、非絶食時で糖新生の律速酵素である G6Pase 等の遺伝子発現について小腸・肝臓・腎臓で検討する。膵及び膵外グルカゴンの発現の確認には、プログルカゴン遺伝子発現時に蛍光蛋白 Venus (YFP) を発現する mGluVenus マウスを用いて行う。単離膵島や腸管からコラゲナーゼで消化後、フローサイトメトリーで膵及び腸管の YFP 陽性細胞を回収する。回収した細胞の PC1/3 や PC2 の発現や、グルカゴン関連ペプチドである GIP や GLP-1 の発現に及ぼす影響を評価する。膵外グルカゴンの生理活性は HEK293 に glucagon receptor と Cre-luc を transfectinon した細胞を用い、cAMP 濃度依存性に上昇するルシフェラーゼの発光強度からグルカゴン濃度を算出することで活性を確認する。

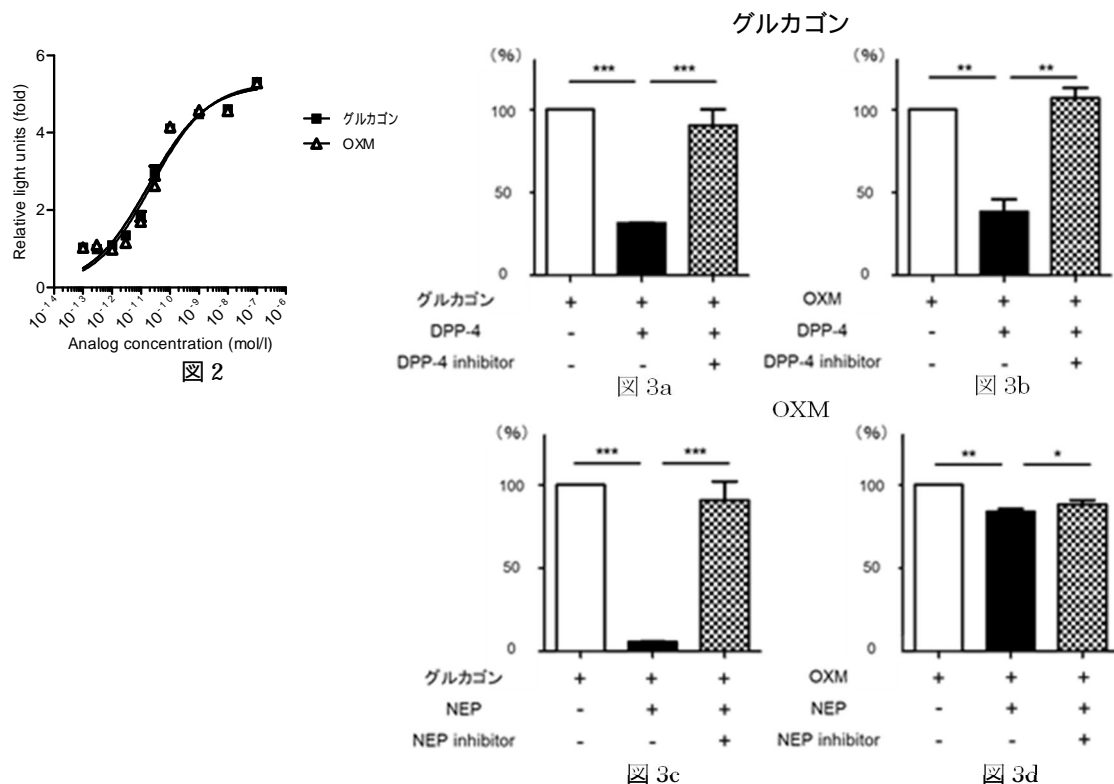
4. 研究成果

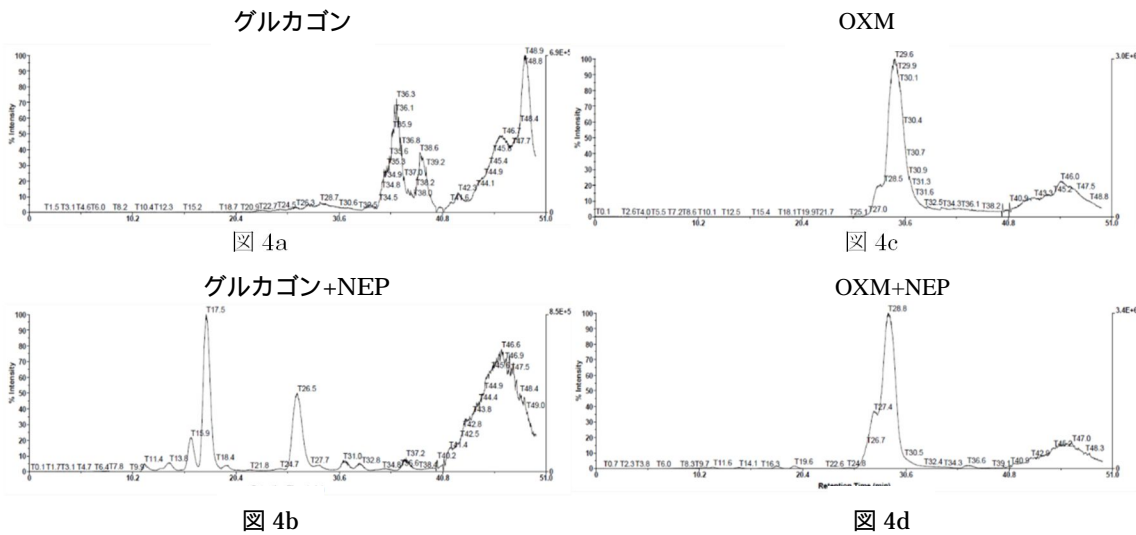
膵及び膵外グルカゴンの発現の確認に、mGlu Venus マウスを用いた。膵外グルカゴンが存在する臓器として、プログルカゴン遺伝子が多く発現している腸管に着目した。対照群として正常耐糖能 mGlu Venus マウス、糖尿病モデルマウスとして mGlu Venus に膵 β 細胞を特異的に破壊する streptozotocin (STZ) を投与し、低用量投与群 (Low dose STZ: 50mg/kg、連続 5 日間 (mGlu Venus LD-STZ))、高用量投与群 (High dose STZ: 200 mg/kg、1 日投与 (mGlu Venus HD-STZ)) をそれぞれ作成した。膵、胃、小腸を摘出後、酸エタノール法でタンパクを抽出し、各臓器のグルカゴン測定に用いた。LD-STZ は血糖値が上昇する前に各臓器を摘出した。グルカゴンの測定は、ヒトグルカゴン受容体と Cre-luciferase を HEK293 細胞に co-transfection した細胞を作製し、受容体に結合後上昇する細胞内の cAMP 濃度依存性に増加するルシフェラーゼの発光強度を測定することで受容体活性を評価した。

LD-STZ、HD-STZ 共に胃及び小腸のグルカゴンは正常耐糖能マウスより高値であったが、膵に関しては HD-STZ のみ正常耐糖能マウスよりも高値であった (図 1a-c)。

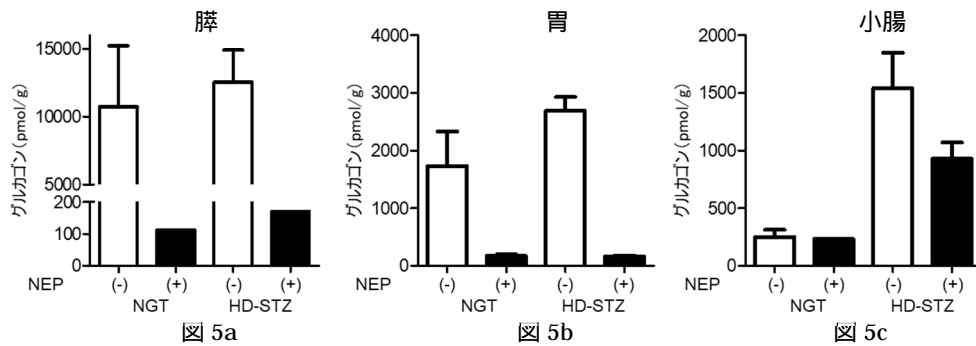


今回グルカゴン測定に用いた受容体を介した方法ではグルカゴン以外に、グルカゴン受容体活性を有しているホルモンの活性を区別することが困難である。特に Proglucagon から腸管で PC1/3 によって生成されるオキシントモジュリン (OXM) は、グルカゴンと C 末端側のアミノ酸配列が 8 個異なるのみで、非常に類似したアミノ酸配列を有しており、グルカゴンとほぼ同等のルシフェラーゼ活性を有していることを確認している (Yanagimachi T et al. Front Endocrinol 2020、図 2 (一部改変))。受容体を介した測定法ではグルカゴンと OXM を区別することが困難であり、今回糖尿病モデルとして用いた STZ マウスで増加した膵、胃及び小腸のグルカゴン含有量の増加の一部は、OXM である可能性は否定できない。我々はグルカゴンは dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 及び Neutral endopeptidase (NEP) によって分解されるが、OXM は DPP-4 によって分解されるが NEP による分解をほとんど受けないという違いがあることを受容体を介した方法及び HPLC で確認している (図 3a-d、図 4a-d)。





そこで HD-STZ マウスの各臓器の抽出液に NEP を添加することで、STZ マウスで上昇しているグルカゴン活性に対して OXM が及ぼす影響を評価した。NEP を添加することによって、膵及び胃のグルカゴン活性は 90% 以上低下したが、小腸のグルカゴン活性は 60% 程度残存しており (図 5) 糖尿病状態において、膵や胃ではグルカゴンが増加しているが、小腸ではグルカゴンのみならず、OXM も増加している可能性が考えられた。既報で腸管グルカゴンの存在が報告されているが (Lund A et al. Diabetes 2016) 今回の結果から腸管グルカゴンの主な産生部位としては小腸ではなく、胃が主要な臓器である可能性が示唆された。



続いて腸管でのケトン体について検討した。肝臓においては飢餓状態でグルカゴン作用が増強し、糖新生が亢進する。更に上昇したグルカゴンが脂肪組織中から遊離脂肪酸と肝臓でのケトン体産生を増加させる。一方腸管でのケトン体産生についてはほとんど検討されていない。そこでケトン体合成に関わるヒドロキシメチルグルタリル CoA 合成酵素 (HMGCS2) の発現を絶食時及び非絶食時でウェスタンブロット法及び qRT-PCR で検討した。その結果絶食時には HMGCS2 の発現が増加していることが明らかとなった (図 6a, b)。肝臓ではグルカゴンが糖新生に非常に重要であるが、小腸で測定できたグルカゴンは前述で示したように OXM が半分程度を占めている可能性があり、ケトン体産生は亢進しているが、肝臓ほど糖新生においてグルカゴンが関与していない可能性が考えられた。

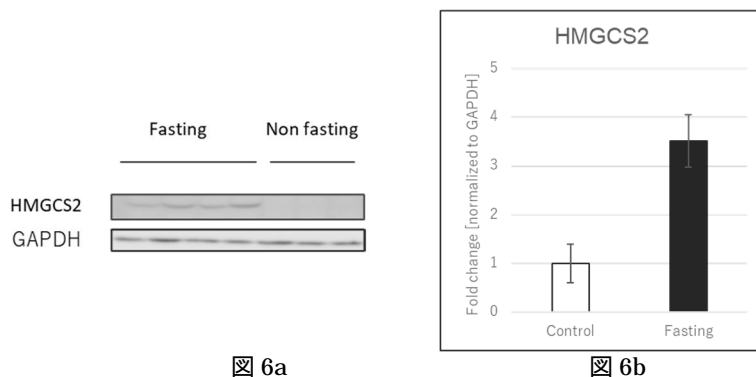


図 6a

図 6b

C57BL/6 及び mGlu Venus マウスの小腸上皮細胞を単離し、フローサイトメトリーを行った。mGlu Venus マウスで YFP 陽性細胞を確認しているが(図 7a,b) 現時点ではソーティングは未実施である。今後 mGlu Venus マウスの小腸上皮 YFP 陽性細胞のソーティングを糖尿病及び非糖尿病状態でい、糖新生の律速酵素である G6Pase や PEPCK、グルカゴンや GLP-1 の産生に関わる PC1/3 や PC2 の発現、 α 細胞特異的に発現する MafB や ARX 等の転写因子の遺伝子発現を解析し、本来膵 α 細胞で産生されるグルカゴンが、腸管でも産生されている可能性について今後検討していく予定である。また胃のほうが小腸よりもグルカゴン活性が高かったことから、今後胃についても小腸と同様に検討を行う予定である。

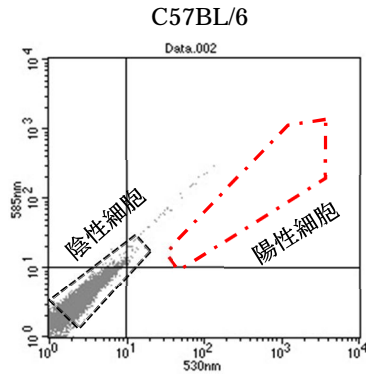


図 7a

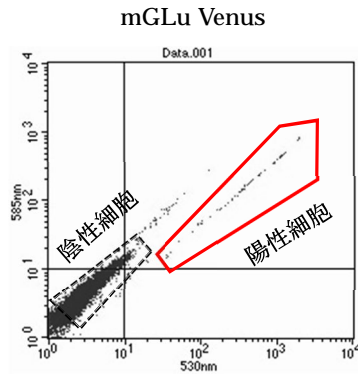


図 7b

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----