

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08498

研究課題名(和文) 消化管からもグルカゴンが分泌されるか？糖尿病におけるプログルカゴン細胞の役割

研究課題名(英文) Role of proglucagon positive cells in pathophysiology of diabetes.

研究代表者

藤田 征弘 (Fujita, Yukihiro)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20451461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グルカゴン遺伝子は膵臓の細胞や消化管内分泌細胞であるL細胞で発現しているが、その遺伝子産物であるプログルカゴンは膵細胞ではグルカゴンとして分泌され、消化管ではGLP-1やGLP-2として分泌される。われわれはグルカゴン遺伝子を発現している細胞が蛍光を発するマウスを用いて、プログルカゴン陽性細胞を特異的に採集する方法を見出した。その上で、消化管と膵臓でどのようなホルモン、転写因子がプログルカゴン陽性細胞で発現しているかを検討し、細胞とL細胞の分化誘導・機能発現を決定づける様々な因子は明らかにした。さらに高脂肪食といった代謝ストレスで、どのような変化が起こるか明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同じく膵臓から分泌されるインスリンに加えて、グルカゴンや消化管由来のGLP-1は糖尿病の発症や治療の領域で注目されている。同じ遺伝子から作られるグルカゴンとGLP-1がどのような機構でそれぞれ別のホルモンとして分泌されるがさらに解明されれば、糖尿病の新しい治療法の開発や病態の解明に役に立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Alpha cells in the pancreatic islets and L cells, an enteroendocrine cells in the intestinal tract, identically express glucagon gene and a pro-hormone proglucagon. However differently from proglucagon, glucagon is released in the pancreatic alpha cells and GLP-1/GLP-2 is secreted in the intestinal tract. We have established a method to specifically collect proglucagon-positive cells using the transgenic mice in which glucagon gene-expressing cells fluoresce. We then investigated which hormones and transcription factors are expressed in proglucagon-positive cells in the gastrointestinal tract and the pancreas, and identified various factors that determine the induction of differentiation and functional expression of alpha cells and L cells. In addition, we have clarified how metabolic stress, such as high-fat diet, induces changes in these proglucagon-positive cells.

研究分野：糖尿病学、内分泌学

キーワード：グルカゴン GLP-1 膵細胞 腸管内分泌細胞

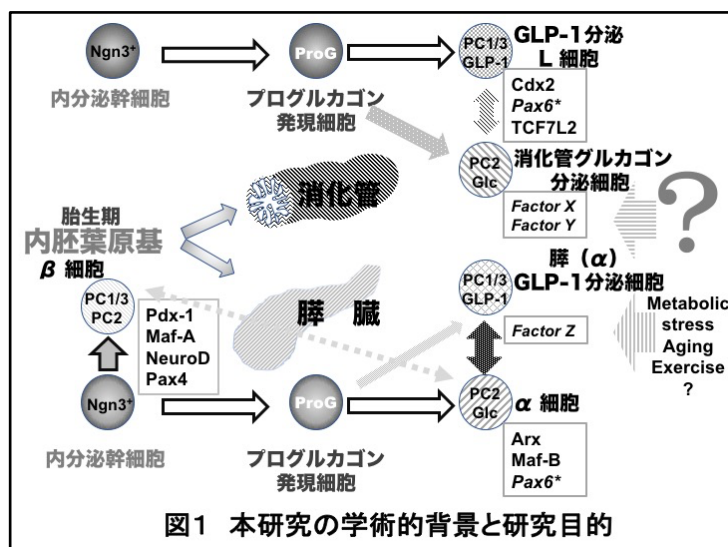
1. 研究開始当初の背景

糖尿病は慢性高血糖を主徴とする症候群である。その病態は、膵β細胞からのインスリン分泌不全と肝臓からのブドウ糖産生つまり糖新生の亢進、骨格筋や脂肪細胞といったインスリン感受性臓器でのインスリン抵抗性が中心であると考えられてきた。しかし近年では、膵α細胞からのグルカゴン分泌亢進、消化管から分泌されるインクレチン作用の低下、腎臓からの過剰のブドウ糖再吸収などが高血糖を引き起こす因子として注目されてきた。インクレチンである GLP-1 は食後インスリン分泌の促進のみならず、グルカゴン分泌を抑制し、間接的に糖新生を抑制し、血糖値を降下させる。

申請者らは、インクレチンや膵α細胞について独創的な研究成果を世界に発信してきた。①糖尿病マウスにおいて、膵臓のグルカゴン含量の増加やα細胞陽性面積・細胞数が増加しており、著明な慢性高血糖に至る前段階よりα細胞の増殖が亢進することを示した(Takeda Y, Fujita Y et al. Diabetologia 2012)。②α細胞量増加に伴う高グルカゴン血症は、内因性インクレチンの不活化を抑制するDPP-4阻害薬や申請者が開発したインクレチンアゴニスト持効型 glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)の投与によって、有意に改善した(Yanagimachi T, Fujita Y et al. Diabetologia 2016;)。③受容体結合に基づく新規インクレチン測定法を樹立し、DPP-4阻害薬治療時のGIPの重要性を証明した。(Yanagimachi T, Fujita Y et al. Mol Metab 2017)

グルカゴンとGLP-1は共通の前駆体プログルカゴンから生成される。プログルカゴン遺伝子からプログルカゴンが転写・翻訳されたのちに、プロホルモン変換酵素(PC)-2で修飾を受けグルカゴンが生成されるが、PC-1/3で修飾を受けると glucagon-like peptide (GLP)-1 や GLP-2、グリセチン、オキシントモデュリンなどグルカゴン関連ペプチドが産生される(Cho Y, Fujita Y, Kieffer TJ. Annu Rev Physiol, 2014)。プログルカゴン遺伝子は、膵臓だけでなく消化管にも多く発現しているが、プロホルモン(PC)変換酵素が臓器特異的に発現することで、膵臓ではグルカゴンが、小腸・大腸ではGLP-1などが分泌されるとされていた。

しかし最近では、本来グルカゴンのみを分泌する膵α細胞において、代謝ストレス、加齢、運動によるサイトカインの刺激によりGLP-1が分泌されることが明らかにされ、DPP-4阻害薬の治療標的は膵GLP-1であるという報告もある。(図1)逆に、本来消化管ではGLP-1がL細胞から分泌されるが、グルカゴンも分泌される可能性が示唆されている。グルカゴン分泌が欠損していると考えられていた膵全摘出患者に経口ブドウ糖負荷をおこなうと、グルカゴンが上昇することが報告されている(Lund A, et al. Diabetes 2016)。しかし、消化管におけるグルカゴンの発現メカニズムや生理作用、糖尿病など代謝異常へ関わりについて検討された研究は行われていない。



2. 研究の目的

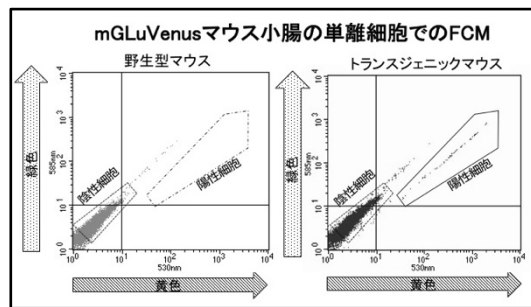
プログルカゴン遺伝子プロモータ下に蛍光蛋白 Venus を発現する mGluVenus マウスを用いて胃粘膜を含む消化管においてグルカゴン分泌細胞が存在するかを細胞レベルで再確認する。その上で、発現メカニズムや生理作用、糖尿病など代謝異常へ関わりについて転写調節の視点から明らかにする。

具体的には、α細胞とL細胞において、プログルカゴン遺伝子の発現を制御する転写因子やプログルカゴンのプロセッシングに関わる酵素、また併存するホルモン発現の類似性や独自性を明らかにする。更に、代謝ストレス状態として高脂肪食摂餌下での遺伝子発現の変化を確認する。

3. 研究の方法

1)プログルカゴン陽性細胞の特性を遺伝子発現レベルで検証する。

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(mGluVenus マウス)は Prof. Frank Reimann (University of Cambridge) から供与を受けており、滋賀医科大学動物実験施設で繁殖させている。単離膵島や遊離腸管からコラゲナーゼで消化後、フローサイトメリー(FCM)を用いて、蛍光陽性細胞を分離する。申請者は Venus 陽性細胞を FCM で選択に分離する方法をすでに確立している。(右 上図)



①膵島、小腸から Venus 陽性の細胞を分取し、分取した細胞から RNA を抽出後、RNAseq 法で網羅的に発現している遺伝子を両組織で比較している(右 下図)。既知の分子については免疫組織法で両組織におけるタンパク発現の差異を確認する。

②グルカゴンと GLP-1 の細胞内含有量を ELISA 法と受容体結合 cAMP 産生能に基づく測定法で測定し比較する。

③消化管内分泌細胞は複数のホルモンを分泌していることが多く、他の消化管ホルモンの遺伝子発現についてもリアルタイム PCR で測定し、さらに免疫組織法でも確認する。

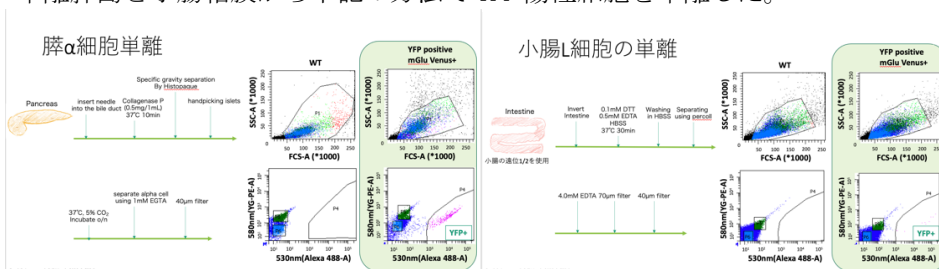
2) 糖尿病状態や代謝ストレスは、膵α細胞や腸管 L 細胞で転写因子、タンパク修飾酵素、ブドウ糖輸送担体・脂肪酸受容体の発現をどのように調節するか？

mGluVenus マウスに、①高脂肪食負荷 ②高果糖食負荷 ③カロリー制限 ④低用量ストレプトゾトシン投与を行い、高血糖、代謝ストレスのモデルマウスを作成する。その上で膵島や小腸の Venus 陽性細胞での遺伝子発現の差異について正常マウスと比較するとともに膵臓と小腸での変化についても検証する。代謝ストレスで、膵α細胞で GLP-1 が分泌されることが報告されており、正常飼育と①～④飼育下でのマウス膵島でグルカゴン分泌や GLP-1 が変化するか ELISA や免疫組織学的な検討で比較する。さらに、腸管 L 細胞の質的・機能的変化について検討する。

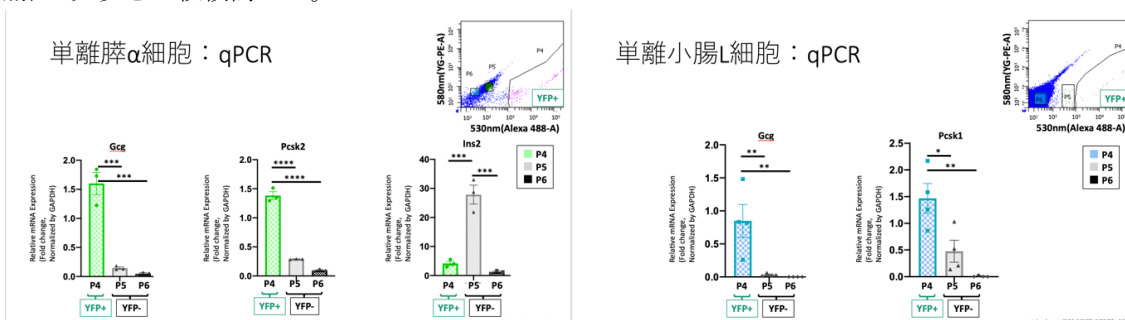
4. 研究成果

1) 膵島、小腸からの YFP 陽性細胞の分取法の確立

単離膵島と小腸粘膜から下記の方法で YFP 陽性細胞を単離した。

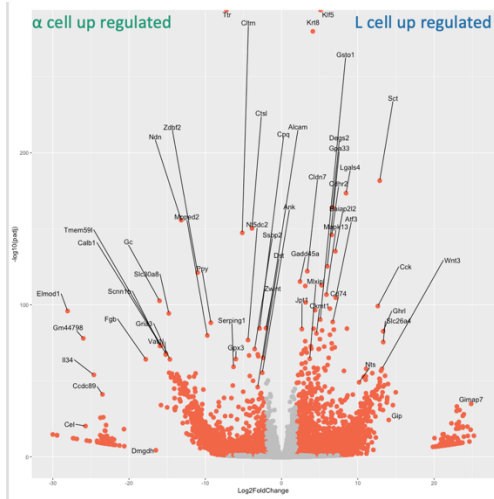


それぞれの細胞がグルカゴン遺伝子を発現しているかを確認するために、YFP 陽性細胞と非陽性細胞分画から RNA を抽出し、RT-qPCR でグルカゴン、インスリン・Pcsk2 (膵島)、Pcsk1 (小腸) の発現を比較検討した。



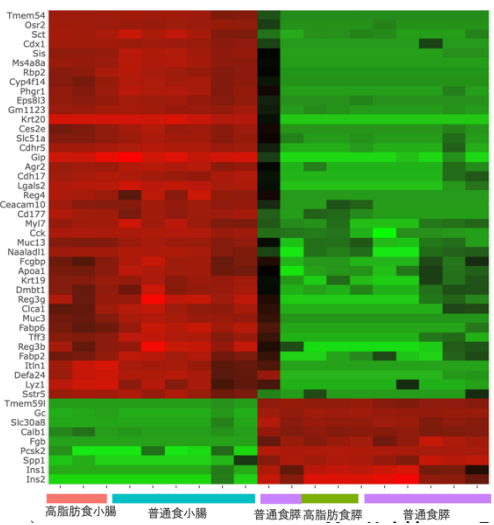
上左が単離後のα細胞の結果である。P4がYFP陽性細胞の集団である。YFP陽性細胞にて、Gcg, Pcsk2も同様に上昇を認め、グルカゴン産生を示唆した。逆にYFP陰性細胞ではインスリンの発現が高かった。上右が単離後のL細胞の結果である。P4がYFP陽性細胞の集団である。YFP陽性細胞でGcgは高度発現を示し、また同様にPcsk1も高発現を示し、GLP-1産生を示唆した。

次に同じプログルカゴン遺伝子を発現している膵α細胞と小腸L細胞における遺伝子発現の違いについてRNA-Seq法を用いて検討した。次図は遺伝子発現のvolcano plotを示す。ホルモンではGip、Cck、Ghr1は小腸で、Ppyは膵臓で有意に多く発現している。さらに、転写因子などについて比較検討した。



転写因子においてL細胞ではCdx1、Cdx2の、α細胞ではMafB、Nkx6-1の遺伝子発現が、他方と比較し特異的に発現していた。α細胞特異的とされるPax6、Arxは、L細胞でも遺伝子発現を認め、両者に発現差はなかった。また、β細胞特異的とされるMafA、Pax4の発現は双方で殆ど認めなかった。プログルカゴンの修飾酵素であるPCSK関連遺伝子の発現を確認した。特に変化があったのがPcsk1とPcsk1n、Pcsk2でした。いずれも他方と比べて、L細胞でPcsk1、α細胞ではPcsk2の高発現を認めた。PCSK1nはPcsk1の阻害を行うタンパクで、α細胞において他方と比べて高発現を示した。

2) 高脂肪食による代謝ストレスが与える遺伝子発現にどのような影響をあたえるか？

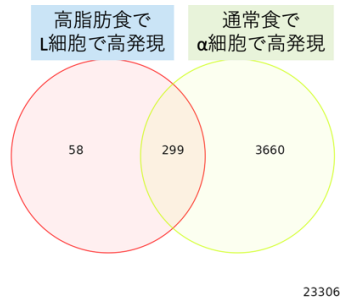
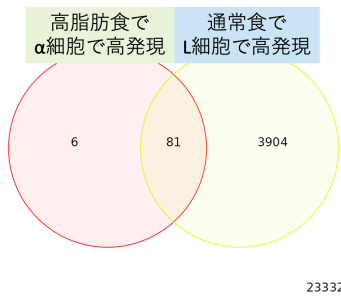


mGluVenusマウスに普通食または高脂肪食(60%脂肪)を4週間与えたのち、膵島・小腸からYFP陽性細胞を分取し、RNAを抽出し同様の検討を行った。左図は普通食小腸、普通食膵、高脂肪食小腸、高脂肪食膵臓での遺伝子発現のヒートマップ(高発現50)をh左に示す。

ホルモンの発現において、普通食摂食下では、L細胞ではGip、Ghr1、Gckの遺伝子が特異的に発現し、α細胞ではins1/2、Ppy(の遺伝子が、特異的に発現していた。Sstは双方ともに高発現を認めますが、ソマトスタチン受容体サブタイプの発現強度に違いを認めた。高脂肪食摂餌下により、L細胞では、Gcg、Cckの発現は増加を認め、Sstの発現量は低下を認めました。Pyy、Ppyは、α細胞とL細胞で発現は増加を認めた。転写因子の発現として普通食摂食下では、L細胞ではcdx1、cdx2、

α細胞ではmafB、nkx6-1が、特異的に発現していた。高脂肪食摂餌にて、転写因子としてarxの発現増加を双方で認め、cdx1、cdx2、pax4はL細胞でのみ発現が増加しました。プログルカゴンの修飾酵素であるPCSK関連酵素は普通食摂食下では、pcsk1はL細胞で、pcsk2はα細胞で高発現を確認しました。pcsk1を阻害するpcsk1n、pcsk2を阻害するscg5(セクレトログレイン5)は、ともに発現を示し、α細胞で高値を認めた。一方既報とは異なり、高脂肪食摂食下のマウスでは、α細胞でGLP-1へプロセッシングを行うpcsk1の発現量が増加することが期待されたが、pcsk1の発現低下を認めました。また、L細胞でもグルカゴンへプロセッシングを行うpcsk2の発現低下を認めた。

現在、それぞれの細胞で増加・減少があった遺伝子について検討している。(下図)



通常食でL細胞で高発現：L細胞に特徴的な遺伝子

通常食でα細胞で高発現：α細胞に特徴的な遺伝子



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yanagimachi Tsuyoshi, Fujita Yukihiro, Takeda Yasutaka, Honjo Jun, Yokoyama Hiroki, Haneda Masakazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Receptor-Mediated Bioassay Reflects Dynamic Change of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide by Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Treatment in Subjects With Type 2 Diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2020.00214	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 Tsuyoshi Yanagimachi, Yukihiro Fujita, Yasutaka Takeda, Jun Honjo, Hiroki Yokoyama, Masakazu Haneda	4. 巻 0
2. 論文標題 Receptor-Mediated Bioassay Reflects Dynamic Change of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide by Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Treatment in Subjects With Type 2 Diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2020.00214	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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------