

機関番号 : 34519

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591075

研究課題名 (和文) GLP-1 産生 L 細胞の分化・増殖機構の解明とそれに基づく
新規糖尿病治療法の開発研究課題名 (英文) Study on the differentiation and proliferation of GLP-1-producing
L cells and the development of new incretin-based therapy for
diabetes mellitus

研究代表者

宮川潤一郎 (MIYAGAWA JUN-ICHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 00127721

研究成果の概要 (和文) :

糖尿病におけるインクレチン治療で注目される消化管ホルモン GLP-1(glucagon-like peptide-1)は多面的な生理活性により薬効を発揮し、インクレチン作用に加え、ヒトでは実証されていないが膵β細胞量維持～増加作用の存在が期待されている。そこで、GLP-1 産生 L 細胞機能や細胞数の制御機構を解明するため、L 細胞の発生・分化および糖尿病状態における変化について検討した。マウスにおいて GLP-1 陽性細胞は胎生期に殆ど存在せず、多くは授乳期後半に発生してくることが明らかにしたが、胎生期よりも分化誘導機構は複雑でその詳細は不明であり、GLP-1 分泌促進因子(GLP-1-secretory factors: GLPSF)およびL細胞増殖促進因子(L-cell proliferation factors: LCPF)の最終的な同定には至らなかった。ヒト糖尿病におけるL細胞数の変化については不明であるが、マウスにおいては糖尿病状態の持続によりL細胞が増加する可能性が高いことを明らかにした。日本人における食後のインクレチンホルモンの動態についての検討においては、GLP-1 は GIP と異なりインクレチン作用よりむしろグルカゴン分泌抑制や消化管運動抑制作用により、血糖を含めたエネルギー摂取・蓄積の制御に関わっているものと考えられた。

研究成果の概要 (英文) :

Incretin hormone GLP-1(glucagon-like peptide-1) secreted from gastrointestinal tract has multi-potent physiological actions including increase or maintenance of beta cell mass (promotion of proliferation and neogenesis, and inhibition of apoptosis in beta cells). In addition to the incretin action, these effects that have not been demonstrated in human, are also important in view of regenerative medicine in diabetes mellitus.

We studied on the development and differentiation of GLP-1 secreting L cells in mice, and the change in the number of L cells in model mice of type 2 diabetes mellitus. In the intestinal tract, GLP-1-positive cells are difficult to detect in fetal period, and most of them appear in post-natal period, suggesting complicated mechanism for differentiation of L cells requiring endogenous and exogenous factors. Both in vivo and in vitro (GLP-1 secreting L cell line NCI-H716) studies, it was difficult and failed in detecting GLP-1-secretory factors (GLPSF) and L-cell proliferation factors (LCPF) suitable for the development of anti-diabetic drugs. In diabetic mice (*db/db* mice), relative L cell number appeared to be increased compared to that of control mice which showed the trend to decrease with aging.

In human study on the secretory response of incretin hormones (GIP and GLP-1) to oral glucose intake (75g OGTT) in Japanese subjects with normal glucose tolerance, both incretin hormones showed different actions to the change of plasma concentrations of glucose and insulin. The secretory response of GIP correlated positively to insulin secretion, while that of GLP-1 did not, and appeared to be involved at least in part in inhibition glucagon secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インクレチン、膵β細胞、GLP-1 (glucagon-like peptide-1)、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

消化管ホルモンの1種である glucagon-like peptide-1(GLP-1)は、膵β細胞に対してグルコース濃度依存性のインスリン分泌促進作用(インクレチン作用)を有している他、膵グルカゴン分泌抑制作用、胃排泄運動抑制、摂食抑制(満腹感増強)作用等、糖代謝やエネルギーバランスの制御に多面的作用を發揮して血糖改善効果を示すことから、GLP-1レセプターアゴニストは従来にない糖尿病治療薬として開発が進められている。さらにGLP-1は、膵β細胞増殖作用に加え、分化・新生促進作用を有していることが実験的に明らかにされ、私どもは糖尿病動物における長期的な耐糖能改善作用の一部は、これらのβ細胞再生促進作用とアポトーシス抑制作用によるものであることを明らかにしてきた(Diabetologia 50:1900-1909, 2007)。これまでに、糖尿病の再生医療の一端を担うべく、種々のβ細胞再生促進因子の検索を進めてきたが、私どものこれまでの研究成果と比較検討すると、in vivoにおける膵β細胞増殖促進作用についてはGLP-1の作用が最も強力であり再生医学的見地からも非常に興味深い因子である。一方、2型糖尿病状態においては消化管上皮配列内に存在するGLP-1産生L細胞の分泌能が低下していることが報告されており、内因性GLP-1分泌能の低下は2型糖尿病における病態形成や成因にも深く関わっているものと考えられている。これらの事実はopen-typeの消化管内分泌細胞であるL細胞の数を増やし、経消化管(経口的)に内因性GLP-1分泌能を増加させることにより個体の耐糖能を改善しうる可能性を示している。しかしながら、L細胞の発生・分化・増殖機構についての詳細は不明であり、同機構が解明を進展させることにより、それに基づく新たな糖尿病治療法の開発も期待される。

2. 研究の目的

GLP-1産生L細胞の発生・分化・増殖機構に関わる因子を明らかにし、経消化管的(経口

的)な投与手段による、L細胞増殖ないしは分化・新生促進機構に基づく膵β細胞再生促進療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) GLP-1産生L細胞の発生・分化機構の解析

L細胞はβ細胞などと同様に内胚葉由来であるが、未だその発生・分化機構は明らかにされていない。In vitroないし細胞株を用いた検討によるとGLP-1(proglucagon)遺伝子発現にはWntシグナルおよび転写因子TCF-4(T cell factor-4)が必須であることが明らかにされているが、L細胞の発生・分化機構にそれらが実際に関わっているかは不明である。成体消化管上皮に局在するL細胞の分化維持・増殖促進機構を明らかにするため、これらの点を含め、マウス胎生組織を用いてL細胞の発生・分化機構の解明を試みる。

(2) 糖尿病動物におけるL細胞の数的・質的変動とGLP-1分泌能の解析

ヒト2型糖尿病においてはインクレチン効果が減弱しており、内因性GLP-1分泌能が低下していることが報告されているが異論もあり成因については未解明である。そこで、糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)を用いて、糖尿病状態における、内因性GLP-1分泌能低下の成因を解明する。

(3) L細胞分離法の確立と分離L細胞を用いた増殖促進因子の検索

エリートリエーター等による細胞分離手段を用いて、成体消化管よりL細胞単離法を確立し、L細胞の発生・分化機構の解明過程で得られた成果を参考にしつつ、同細胞の分化維持・増殖活性に関わる因子群を検索、その中で最も効率的かつ糖尿病治療応用可能なGLP-1分泌促進因子(GLP-1-secretory factors: GLPSFs)およびL細胞増殖促進因子(L-cell proliferation factors: LCPFs)を同定する。

(4) 個体 (マウス) を用いた、GLP-1 分泌促進、および L 細胞増殖促進効果の証明
GLPSF および LCPF を正常マウスに投与、血中活性型 GLP-1 濃度の測定、消化管上皮内 L 細胞数の増加を組織学的、分子生物学的に確認する。

(5) 個体 (マウス) を用いた、膵β細胞増殖および分化・新生促進効果の証明
血中活性型 GLP-1 濃度の上昇、消化管上皮内 L 細胞数の増加が確認された GLPSF および LCPF をマウスに投与し、GLP-1 を介した膵β細胞数 (β cell mass) の増加を確認する。

(6) GLPSF、LCPF の経口投与を可能とする drug delivery system の構築

L 細胞は消化管内腔に対し open-type の内分泌細胞であるため、臨床応用の可能性を有する GLPSF および LCPF は L 細胞特異的に作用かつ経口投与可能であることが望ましい。GLPSF および LCPF の受容体が細胞基底側に存在する場合には、消化管上皮易吸収型の安定型リポソームにこれらの因子を内包化するとともに、管腔側に受容体ないしセンサーが存在する場合、GLPSF および LCPF を標的 L 細胞に作用させるため、L 細胞特異的細胞表面糖鎖抗原の解析を行い、そのリガンドを表面に付着させた「GLPSF ないし LCPF 内包化リポソーム」を作成する。

(7) 糖尿病動物における GLPSF ないし LCPF による糖尿病治療効果の確認と臨床応用の可能性をめざした検討

2 型糖尿病モデル動物を用い、「GLPSF ないし LCPF 内包化リポソーム」を投与、膵の組織学的変化および耐糖能の改善作用に関する評価およびそれ以外の多面的作用について評価を行い、臨床応用への可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) L 細胞の発生・分化機構については、マウスを用い、胎生期の L 細胞の発生について胎生期後半 (F10, 15, 18 日) および生後 (D5, 10, 15, 18, 20 日) および 5~6 週) 下部小腸および上部結腸における GLP-1 陽性細胞の出現について検索したところ、胎生期には GLP-1 陽性細胞は殆ど存在せず、多くは授乳期後半 (離乳前) に発生してくることが明らかになった。そのため、胎生期ではなく、授乳開始後~離乳時期の消化管環境が L 細胞の発生・分化に重要な役割を演じている可能性が示された。Wnt シグナルおよび転写因子 TCF-4 (T cell factor-4) と L 細胞の発生については明確な関連性を確認することはできていない。

(2) 糖尿病動物における L 細胞の数的・質的変動と GLP-1 分泌能の解析

2 型糖尿病におけるインクレチン効果の減弱が、L 細胞の機能低下や細胞数の減少など GLP-1 分泌異常によるものか否か、長期間高血糖状態を維持できる 2 型糖尿病モデルを用いて検討した。db/db ホモマウス (BKS. Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jc1) と対照 db/m ヘテロマウス (BKS. Cg-m+/+Lepr^{db}/Jc1) を用いて、各群 6、12 および 18 週齢における結腸中間部の L 細胞数を計測し、比較検討した。L 細胞数の計測は切片 (輪状断) の粘膜層面積あたりの細胞個数を算出した結果、6 週齢では 2 群間に差を認めなかったが、12 週齢以降では 2 型糖尿病モデルマウスでは対照群に比べ粘膜層面積あたりの L 細胞数が増加する傾向を認めた。すなわち、高血糖状態が持続する 2 型糖尿病モデルマウスにおいては、GLP-1 産生 L 細胞の数が増加することが明らかになった。一方、GLP-1 分泌については、測定キットに信頼できるものが存在しないことが判明、糖尿病モデルマウスにおける GLP-1 の血中濃度の変化を確認することはできなかった。以上の結果から、糖尿病状態が持続した場合、GLP-1 の分泌については不明であるが、L 細胞は増加する、ないしは少なくとも減少しないと考えられ、学会発表 (第 53 回日本糖尿病学会年次総会) を行い、投稿準備中である。

(3) L 細胞が糖尿病状態で増加する可能性があるという結果に基づき、その機構などを解析するため、L 細胞分離法の確立と分離 L 細胞を用いた増殖促進因子の検索を試みた。マウスを用い、腸管上皮細胞を分離し、分散状態にて GLP-1 免疫活性陽性細胞数を調べると 2000~3000 個に 1 個程度の頻度であった。また、エルートリエーターを用いた分離法では他の消化管内分泌細胞との区別が困難であることが判明した。L 細胞を確実に認識できるマーカーを利用する必要があると考えられ、正常マウスから十分な量の L 細胞を分離することは現状では不可能と判断した。

今回の主要検討項目である GLP-1 分泌促進因子 (GLP-1-secretory factors: GLPSFs) および L 細胞増殖促進因子 (L-cell proliferation factors: LCPFs) の同定については、マウス正常消化管 L 細胞の十分な分離が困難であるため、その後の検討に着手できなかったが、どのような検討を GLP-1 産生 L 細胞株 (NCI-H716) を用いた in vitro の実験系により検討を継続している。

なお、研究の一環として実施した、正常耐糖能者における糖負荷試験 (75g OGTT) におけるインクレチンホルモン (GLP-1 および GIP) 反応と血糖、インスリンの動向との関連についての検討では、インクレチン作用については GIP が主たる役割を演じていること、GLP-1

はグルカゴン分泌抑制や消化管運動抑制などに主要な役割を演じている可能性が存在することを見出し、報告した(inpress)。

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 7 件)

1. Katsuno T, Watanabe N, Nagai E, Hamaguchi T, Miyagawa J-I, Namba M., Comparison of efficacy of concomitant administration of mitiglinide with voglibose and double dose of mitiglinide in patients with type 2 diabetes mellitus. J. Diab. Invest. 査読有, (in press),
2. Nagai E., Katsuno T., Miyagawa J., Konishi K., Miuchi M., Ochi F., Kusunoki Y., Tokuda M., Murai K., Hamaguchi T., Namba M., Incretin responses to oral glucose load in Japanese healthy subjects. Diabetes Ther. 査読有, (in press)
3. Konya H., Hasegawa Y., Hamaguchi T., Satani K., Umehara A., Katsuno T., Ishikawa T., Miuchi M., Kohri K., Suehiro A., Kakishita E., Miyagawa J-I, Namba M., Effects of gliclazide on platelet aggregation and the plasminogen activator inhibitor type 1 level in patients with type 2 diabetes mellitus. Metabolism, 査読有, 59, 2010, 1294-1299
4. Konya M., Miuchi M., Konishi K., Nagai E., Ueyama T., Kusunoki Y., Kimura Y., Nakamura Y., Ishikawa T., Inokuchi C., Katsuno T., Hamaguchi T., Miyagawa J., Namba M. Pleiotropic effects of mitiglinide in type 2 diabetic patients. J. Int. Med. Res. 査読有, 37, 2009, 1904-1912
5. Inoguchi C., Ueda H., Hamaguchi T., Miyagawa J., Shinohara M., Okamura H., Namba M., Role of macrophages in the development of pancreatic islet injury in spontaneously diabetic Torii rats. J. Exp. Anim. 査読有, 58(4), 2009, 383-394
6. 宮川潤一郎, 美内雅之, 難波光義, 糖尿病：診断と治療の進歩 IV. 最近の話題 2. インクレチン関連治療、日本内科学会雑誌、査読無、98(4)、2009、809-816
7. 宮川潤一郎, 難波光義, 医学と医療の最前線、インクレチンの糖尿病治療への応用、日本内科学会雑誌、査読無、97(4)、2008、827-835

[学会発表] (計 13 件)

1. 宮川潤一郎, インクレチン系の機序とその糖尿病治療への応用. GLP-1 の分泌調節と膵内および膵外作用 (シンポジウム)、第 45 回糖尿病学の進歩(2011. 2. 19、福岡市)
2. Nagai E., Miyagawa J., Konishi K., Miuchi M., Katsuno T., Kusunoki Y., Tokuda M., Murai K., Hamaguchi T., Namba M. : Incretin responses to oral glucose load in Japanese non-obese healthy subjects. The 8th IDF WPR Conference (2010. 10. 20、Busan, Korea)
3. 宮川潤一郎, GLP-1 シグナルに基づく最新の糖尿病治療－基礎と臨床 (特別講演)、第 55 回日本臨床検査医学会近畿支部例会 (2010. 6. 5、神戸市)
4. 小西康輔, 宮川潤一郎, 永井悦子, 美内雅之, 勝野朋幸, 神谷麻衣, 楠 宜樹, 徳田八大, 村井一樹, 浜口朋也, 難波光義, 2 型糖尿病における結腸 L 細胞の変化～2 型糖尿病モデルマウスを用いた分析～第 53 回日本糖尿病学会年次総会 (2010. 5. 27、岡山市)
5. 美内雅之, 宮川潤一郎, 永井悦子, 小西康輔, 勝野朋幸, 神谷麻衣, 楠 宜樹, 徳田八大, 村井一樹, 浜口朋也, 難波光義, 日本人 2 型糖尿病膵島における α 、 β 両細胞の組織形態学的変化、第 53 回日本糖尿病学会年次総会 (2010. 5. 27、岡山市)
6. Miuchi M., Miyagawa J., Konishi K., Nagai E., Katsuno T., Hamaguchi T., Namba M. : Morphologic changes of the endocrine pancreas in Japanese non-obese type 2 diabetes with special reference to the relative β -cell area, so-called " β -cell mass", 14th International Congress of Endocrinology. (2010. 3. 30、Kyoto, Japan)
7. 宮川潤一郎, GLP-1 シグナルに基づく新しい糖尿病治療と心血管系 (ランチャタイムセミナー). 第 74 回日本循環器学会・学術集会(2010. 3. 7、京都市)
8. 宮川潤一郎. GLP-1 シグナルを利用した新しい糖尿病治療－基礎と臨床－ (ランチャタイムセミナー)、第 8 回日本フットケア学会年次学術集会 (2010. 2. 28、東京都)
9. 宮川潤一郎, インクレチン関連薬と 1 型糖尿病－臨床応用の可能性－ (教育講演)、第 7 回 1 型糖尿病研究会(2009. 11. 6、日光市)
10. 宮川潤一郎, 糖尿病治療での規律と寛容 (シンポジウム)、第 46 回日本糖尿病学会近畿地方会 (2009. 11. 3、京都市)
11. Miuchi M., Konya H., Kataoka S., Konishi K., Nagai E., Nakamura Y., Katsuno T., Hamaguchi T., Miyagawa J., Namba M. : Asymmetric dimethylarginine (ADMA) a predictor of the

diabetic cardiovascular diseases?"
. 20th International Diabetes Federation Congress (2009.10.20, Montreal, Canada)

12. Miuchi M., Miyagawa J., Konishi K., Nagai E., Katsuno T., Kataoka S., Konyah H., Hamaguchi T., Namba M.: Morphologic changes of the endocrine pancreas in Japanese non-obese type 2 diabetes. 45th EASD Annual Meeting (2009.10.2, Vienna, Austria)
13. 浜口朋也、宮川潤一郎、難波光義、高齢者糖尿病患者における慢性腎臓(CKD)一進行例の特徴と対策一、第51回日本老年医学会学術集会(2009.6.10、横浜市)

[図書] (計6件)

1. 宮川潤一郎、診断と治療社、糖尿病研修ノート(永井良三 総監集):第3章 検査. Cペプチド(血清、尿)、2010、pp 169-172
2. 宮川潤一郎、難波光義、先端医学社、インクレチンとDPP-4阻害薬のすべて(清野 裕編):Part 6 糖尿病治療の問題点とインクレチン・DPP-4への期待をさぐる. 2. 2型糖尿病とインクレチン作用、2010、pp131-137
3. 宮川潤一郎、南江堂、糖尿病最新の治療2010~2012、II. 糖尿病治療の基本. 2. 1型糖尿病、2009、pp 47-51
4. 難波光義、宮川潤一郎、フジメディカル出版、インクレチン治療 GLP-1受容体作動薬とDPP-4阻害薬による新たな糖尿病治療、6. インクレチン治療の展開 1) GLP-1誘導体、エキセセンジン-4のポジショニング、2009、pp 62-70
5. 宮川潤一郎、美内雅之、難波光義、フジメディカル出版、GLP-1受容体作動薬とDPP-4阻害薬による新たな糖尿病治療、2. GIP, GLP-1の多彩な作用 2) GLP-1、2009、pp 26-40
6. 宮川潤一郎、日本臨床社、新時代の糖尿病学(1)一病因・診断・治療研究の進歩一、B. 糖尿病基礎研究の進歩、I. 糖代謝とその調節機序、膵の発生とβ細胞の機能、膵島の構造と機能、2008、pp111-114

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮川 潤一郎 (MIYAGAWA JUN-ICHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号:00127721

(2)研究分担者

難波 光義 (NAMBA MITSUYOSHI)
兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号:00183533

浜口 朋也 (HAMAGUCHI TOMOYA)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号:60330461

勝野 朋幸 (KATSUNO TOMOYUKI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号:30441257

美内雅之 (MIUCHI MASAYUKI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号:90434951

村井一樹 (MURAI KAZUKI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号:40588373

紺屋浩之 (KONYA HIROYUKI)
市立芦屋病院・糖尿病内科部長
研究者番号:50340956