

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22590974

研究課題名（和文）

プログルカゴン遺伝子由来ペプチドの糖代謝における役割の解明

研究課題名（英文）

To elucidate the role of proglucagon-derived peptides in glucose metabolism

研究代表者

尾崎 信暁 (OZAKI NOBUAKI)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・特任准教授

研究者番号：70378082

研究成果の概要（和文）：

グルカゴンや glucagon-like peptide-1 (GLP-1) はそれぞれ膵  $\alpha$  細胞や腸管内分泌 L 細胞においてプログルカゴンから産生され、糖代謝に重要な役割を果たす。そこで、プログルカゴン由来ペプチドを欠失した  $Gcg^{GFP/GFP}$  マウスの糖代謝及び膵  $\beta$  細胞機能について解析を行った。 $Gcg^{GFP/GFP}$  マウスは、良好な耐糖能とインスリン分泌、glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) 分泌の亢進を示した。また、膵島の形態学変化(膵  $\alpha$  細胞過形成、膵島数増加)と膵  $\beta$  細胞における GIP の異所性発現をみとめた。さらに、単離膵島からグルコース応答性に GIP を分泌することを示した。単離膵島からのグルコース応答性インスリン分泌の亢進は cAMP アンタゴニストで抑制された。さらに、GIP 受容体欠損マウスとのダブルノックアウトマウスを作製し、 $Gcg^{GFP/GFP}$  マウスで認められたインスリン分泌の亢進がキャンセルされることを明らかにした。 $Gcg^{GFP/GFP}$  マウスはインスリン分泌亢進を伴う良好な耐糖能を示した。その機序に膵島由来の GIP が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Glucagon and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) are produced in pancreatic  $\alpha$ -cells and enteroendocrine L-cells, respectively, in a tissue-specific manner from the same precursor, proglucagon, that is encoded by glucagon gene (*Gcg*), and play critical roles in glucose homeostasis. Here we studied glucose homeostasis and  $\beta$ -cell function of *Gcg*-deficient mice that are homozygous for a *Gcg*-GFP knock-in allele ( $Gcg^{GFP/GFP}$ ).  $Gcg^{GFP/GFP}$  mice displayed improved glucose tolerance and enhanced insulin secretion, as assessed by both oral and intraperitoneal glucose tolerance tests. Responses of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) to both oral and intraperitoneal glucose loads were unexpectedly enhanced in  $Gcg^{GFP/GFP}$  mice and immunohistochemistry localized GIP to pancreatic  $\beta$ -cells of  $Gcg^{GFP/GFP}$  mice. Furthermore secretion of GIP in response to glucose was detected in isolated islets of  $Gcg^{GFP/GFP}$  mice. Blockade of GIP action *in vitro* and *in vivo* by cAMP antagonism and genetic deletion of the GIP receptor, respectively, almost completely abrogated enhanced insulin secretion in  $Gcg^{GFP/GFP}$  mice. These results indicate that ectopic GIP expression in  $\beta$ -cells maintains insulin secretion in the absence of proglucagon-derived peptides, revealing a novel compensatory mechanism for sustaining incretin hormone action in islets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：内分泌学、糖尿病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、代謝学

キーワード：インスリン分泌、グルカゴン、glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)

### 1. 研究開始当初の背景

プログルカゴン遺伝子には、グルカゴンのみならず、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や GLP-2 がコードされ、膵 $\alpha$ 細胞から主にグルカゴンが分泌され、腸管の L 細胞からは、主に GLP-1 が分泌される。また、GLP-1 は膵島においてもその発現が確認されており、膵 $\beta$ 細胞の増殖・維持に関与すると考えられている。

耐糖能における GLP-1 及びグルカゴンの役割については、GLP-1 受容体及びグルカゴン受容体欠損マウス (*Glp1r<sup>-/-</sup>* と *Gcgr<sup>-/-</sup>*) における解析から明らかになりつつある。*Glp1r<sup>-/-</sup>* では、血中グルカゴンは正常で、単離膵島からのグルコース応答性インスリン分泌は保たれているが、ブドウ糖負荷試験で耐糖能障害とインスリン分泌反応の低下を認め、GLP-1 作用の欠損によるものと考えられる<sup>1)</sup>。一方、*Gcgr<sup>-/-</sup>* は、血中グルカゴン高値、血中 GLP-1 高値を示す。血糖値は、対照群に比べ低値で、ブドウ糖負荷によるインスリン分泌は対照群に比べ増強しているが、単離膵島において、様々な分泌刺激は、インスリン分泌を低下させた<sup>2)</sup>。これらの結果から、GLP-1 は、インスリン分泌に重要な役割を果たし、グルカゴンは、空腹時の血糖維持に重要であることが示唆されている。

グルカゴン、GLP-1、GLP-2 などプログルカゴンに由来するすべてのペプチドを欠損するモデル動物 (*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>*) の表現型解析を進めている。ホモ個体は、膵島 $\alpha$ 細胞の過形成、膵島数の増加など膵島の形態学的異常を示す。空腹時血糖及び空腹時インスリン値は、対照と差を認めない。さらに、経口ブドウ糖負荷試験において、試験期間を通じてホモ個体の血糖値は野生型に比べ低値を示す。この結果は、グルカゴンの欠損による肝糖新生の低下のみ

では説明できず、他の機序の関与を示唆するものであり、GLP-1 及びグルカゴンの新たな役割が示唆される。

### 2. 研究の目的

*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウスは、良好な糖代謝と膵 $\alpha$ 細胞の過形成を示す。そこで、プログルカゴン由来ペプチドの欠如が糖代謝に及ぼす影響について、膵 $\beta$ 細胞機能に焦点を絞り、その機序について解析すること本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* マウス及び *Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* と GIP 受容体欠損マウス (*Gipr<sup>-/-</sup>*) のダブル欠損マウス (*Gcg<sup>gfp/gfp</sup> Gipr<sup>-/-</sup>*) は、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) および経腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) を行い、耐糖能を評価した。インスリン、GIP は ELISA 法を用いて測定した。対照マウスは *Gcg<sup>gfp/+</sup>* 及び *Gcg<sup>+/+</sup>* マウスを用いた。

単離膵島実験は 5-7 カ月齢雄マウスを用いた。コラゲナーゼ法を用いて膵島を単離した。インスリン分泌評価は 30 分間各グルコース濃度下で培養して行った。GIP 分泌評価は、16.7mM グルコース下で 16 時間培養し行った。

*Gcg<sup>+/+</sup>*、*Gcg<sup>gfp/+</sup>*、*Gcg<sup>gfp/gfp</sup>*、*Gcg<sup>gfp/gfp</sup> Gipr<sup>-/-</sup>*、グルカゴン受容体欠損マウス (*Gcgr<sup>-/-</sup>*)、GLP-1 受容体欠損マウス (*Glp1r<sup>-/-</sup>*)、*Gcgr<sup>-/-</sup> Glp1r<sup>-/-</sup>* の膵臓を 4%PFA 固定の後、パラフィン切片とし、各免疫染色を行った。詳細な膵島形態分析は *Gcg<sup>+/+</sup>* と *Gcg<sup>gfp/gfp</sup>* の 9 週齢雄マウスで行った。

各組織から RNA を抽出し、定量 real-time

RT-PCR 法で発現量を検討した。

#### 4. 研究成果

*Gcggfp/gfp* は OGTT において、対照群と比較して耐糖能の改善とブドウ糖負荷 15 分後のインスリン分泌亢進を認めた。小腸からのインクレチン分泌が関与しない IPGTT でも、*Gcggfp/gfp* ではインスリン分泌が亢進しており、β細胞機能の亢進が示唆された (図 1)。単離膵島実験では、*Gcggfp/gfp* のグルコース応答性インスリン分泌の亢進を認めた。

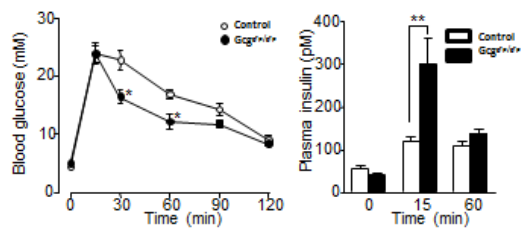


図 1 IPGTT

膵島形態分析では、*Gcggfp/gfp* はα細胞過形成を認め、α/β細胞比は増加していた。単位面積当たりの膵島面積や膵島数の増加を認めたが、β細胞領域は対照群と差は認めなかった。電子顕微鏡所見で、β細胞内のインスリン分泌顆粒の分布に違いは認められなかった。したがって、*Gcggfp/gfp* のβ細胞機能亢進は、β細胞の増加によるものではないと考えられた。

OGTT では小腸由来 GIP 分泌が刺激されるため、対照群、*Gcggfp/gfp* とも、糖負荷後に血中 GIP レベルは上昇を認めるが、*Gcggfp/gfp* で有意に上昇が大きかった。IPGTT では小腸由来 GIP 分泌は刺激されないと考えられており、実際対照群では負荷前後で血中 GIP レベルの変化は認めなかった。しかし *Gcggfp/gfp* では有意に血中 GIP レベルの上昇を認めた。小腸での GIP mRNA 発現は *Gcggfp/gfp* と対照群で差は認めなかった。膵島の GIP および GIP 受容体の mRNA 発現は *Gcggfp/gfp* で著明

に増加していた。GIP 含量は *Gcggfp/gfp* で有意に増加しており、単離膵島実験において高グルコース濃度下で、*Gcggfp/gfp* の膵島から GIP の分泌が確認された (図 2)。

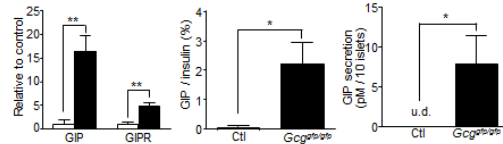


図 2 GIP expression in pancreatic islets

単離膵島実験で cAMP 拮抗薬を用いると、*Gcggfp/gfp* で認めたインスリン分泌亢進は有意に抑制された。

免疫染色では、対照群で GIP は既報同様、膵α細胞に発現することを確認した。興味深いことに、*Gcggfp/gfp* では GIP は膵α細胞ではなくβ細胞に発現していた。*Gcgr<sup>-/-</sup>*、*Glp1r<sup>-/-</sup>*、*Gcgr<sup>-/-</sup>Glp1r<sup>-/-</sup>*でも、GIP はα細胞に発現していた。

*Gipr<sup>-/-</sup>*との交配により、*Gcggfp/gfp Gipr<sup>-/-</sup>*を作成し、膵島形態分析およびインスリン分泌能の検討を行った。膵島免疫染色で、*Gcggfp/gfp Gipr<sup>-/-</sup>*では *Gcggfp/gfp* と同様にα細胞過形成を認め、GIP はβ細胞に発現を認めた。*Gcggfp/gfp* で認めた糖負荷後のインスリン分泌亢進は、*Gcggfp/gfp Gipr<sup>-/-</sup>*では対照群と同等レベルまで抑制された。単離膵島実験においても、*Gcggfp/gfp* で認めたグルコース応答性インスリン分泌の亢進は、*Gcggfp/gfp Gipr<sup>-/-</sup>*で著明に抑制された (図 3)。

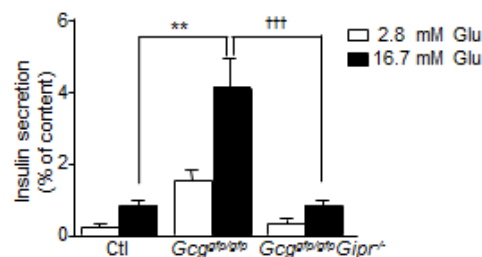


図 3 Glucose-induced insulin secretion

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 1 件)

Ectopic expression of GIP in pancreatic  $\beta$ -cells maintains enhanced insulin secretion in mice with complete absence of proglucagon-derived peptides. Fukami A, Seino Yus, Ozaki N (責任著者), Yamamoto M, Sugiyama C, Sakamoto-Miura E, Himeno T, Takagishi Y, Tsunekawa S, Ali S, Drucker DJ, Murata Y, Seino Yut, Oiso Y, Hayashi Y (責任著者). *Diabetes* 62:510-518, 2013 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① プログルカゴン遺伝子GFPノックインマウスにおける膵 $\beta$ 細胞由来GIPの分泌機構の解明 清野祐介、尾崎信暁、深見亜也子、飯田淳史、尾方秀忠、藤谷淳、泉本貴子、石川孝太、上西栄太、恒川新、三木隆司、清野進、林良敬、大磯ユタカ、濱田洋司 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集 2013 年 5 月 熊本
- ② Ectopic GIP in pancreatic  $\beta$ -cells enhances insulin secretion in mice deficient for proglucagon-derived peptides. Seino Y, Fukami A, Ozaki N, Tsunekawa S, Hayashi Y. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress 2012 年 11 月 京都
- ③ 新しいGIP分泌調節機構の解明-プログルカゴンノックアウトマウスによる検討 - 清野祐介、深見亜也子、尾崎信暁、恒川新、林良敬、大磯ユタカ 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 2012 年 5 月 横浜
- ④ 膵島由来GIPはプログルカゴン遺伝子GFPノックインマウスにおける膵 $\beta$ 細胞機能を改善する。深見亜也子、清野祐介、尾崎

信暁、三浦英里子、石川孝太、尾方秀忠、上西栄太、恒川新、林良敬、清野裕、山田祐一郎、大磯ユタカ 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 名古屋

- ⑤ グルカゴン由来ペプチドの欠如は膵 $\beta$ 細胞機能を改善する。深見亜也子、清野祐介、三浦江里子、尾崎信暁、恒川新、林良敬、大磯ユタカ 第 23 回分子糖尿病学シンポジウム 2011 年 11 月 熊本
- ⑥ Evaluation of  $\beta$ -cell function in proglucagon-EGFP knock-in mice. Fukami A, Seino Y, Ozaki N, Kato J, Sakamoto E, Tsunekawa S, Hayashi Y, Murata Y, Oiso Y. The 47<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association for the Study of Diabetes 2011 年 9 月 ポルトガル
- ⑦ プログルカゴン遺伝子GFPノックインマウスにおけるインスリン分泌亢進の機序の解明 深見亜也子、尾崎信暁、坂本英里子、清野祐介、恒川新、林良敬、大磯ユタカ 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 2011 年 5 月 札幌
- ⑧ プログルカゴン遺伝子GFPノックインマウスにおける膵 $\beta$ 細胞機能と形態学的評価 深見亜也子、尾崎信暁、坂本英里子、福山貴広、水谷直広、清野祐介、林良敬、大磯ユタカ 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010 年 5 月 岡山

①

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎 信暁 (OZAKI NOBUAKI)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・

特任准教授

研究者番号：70378082

### (2) 研究分担者

大磯 ヌタカ (OISO YUTAKA)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40203707

林 良敬 (HAYASHI YOSHITAKA)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：80420363

清野 祐介 (SEINO YUSUKE)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：80534833

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：