

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 5 月 24 日現在

機関番号：32409
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590992
 研究課題名（和文） インスリン分泌及びβ細胞増加促進作用を持つ
 新規消化管ホルモン IBCAP の研究
 研究課題名（英文） Functional analysis of the novel intestinal hormone, IBCAP with
 incretin-like activity.
 研究代表者
 豊島 秀男（TOYOSHIMA HIDEO）
 埼玉医科大学・医学部・客員准教授
 研究者番号：20197966

研究成果の概要（和文）：新規消化管ホルモン候補として IBCAP を同定し、その解析を進めてきた。今回、IBCAP の評価系として膵β細胞の増殖を指標とした新たな Assay 系を開発し、IBCAP の活性体候補ペプチド候補を複数個得た。また、遺伝子改変マウスの解析の結果、IBCAP が膵臓β細胞増殖促進作用を持つことが判明した。以上より IBCAP は糖尿病治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We identified a gene of IBCAP with an incretin-like activity. We developed to assessment of IBCAP activity as an indexing of beta-cells proliferation, and we identified candidate of sequences activated peptides of IBCAP gene. Also, transgenic mice over-expressing IBCAP was demonstrated to have increased amount of pancreatic β-cells, whereas gene-knockouts of the factor resulted in a marked decrease of pancreatic islets. Our findings strongly suggested IBCAP as a major player in the control of the amount of pancreatic islets and β-cells. Our results demonstrated that we assume that IBCAP can be another potential therapeutic target for diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：糖尿病

1. 研究開始当初の背景

エネルギー摂取過多、運動不足などの生活様式の変化により、世界中で生活習慣病、特に糖尿病患者数が増加の一途をたどっていることから治療法の確立が急務となってい

る。これまでの様々な糖尿病・肥満研究から、消化管ホルモンはエネルギー代謝や摂食行動などに密接に関わっていることが明らかとなっている。また、消化管ホルモンであるインクレチン GLP-1、GIP に関連する糖尿病治療薬である GLP-1 アナログや GLP-1 分解酵

素 DPP-IV の阻害薬は最近新しい糖尿病治療薬として臨床で使われ始めており、今後の糖尿病の治療を大きく変える可能性が注目されている。

我々は、以前より消化管に注目し、新規消化管特異的分泌タンパクを探索し、Oligo-cap SST (Signal Sequence Trap) 法で新規消化管特異的分泌タンパク遺伝子 IBCAP

(Intestine-derived Beta-Cell Augmenting Promoter) を同定しその解析を進めてきた。

この消化管特異的分泌タンパク IBCAP は機能の一部として、膵臓β細胞増殖促進作用およびアデノウイルスによる強制発現の結果、糖尿病改善作用を持つことが明らかとなっている。そのため、この IBCAP は糖尿病治療や膵再生医療への臨床応用が考えられることから、その機能や生理的意義を解明することが重要である。

2. 研究の目的

我々が独自に発見した新規消化管ホルモン IBCAP はβ細胞増加作用を持つことから、糖尿病に対し重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

この膵β細胞増殖促進作用の詳細を解析することは、将来的な膵臓・膵β細胞再生への臨床応用につながる。この作用は、IBCAP から切断を受けてできたペプチド活性体によって引き起こされている可能性が示唆されている。

そこで本研究では、①まずこの IBCAP の活性体の 1 次構造を解析し、②そのシグナル伝達や受容体の解析を行うことで、膵β細胞増殖に関わる分子メカニズムを明らかにすることで、将来的な臨床応用へ向けた基礎的な分子基盤の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、この IBCAP の未だに解明されていない作用、生理的意義の全貌を明らかにし、基礎的な基盤の確立を目的に以下の方法で検討を行った。

(1) IBCAP の 1 次構造の決定

IBCAP 活性体の 1 次構造を決定させるために、IBCAP 強制発現培養上清を HPLC で精製し LC-MS/MS にかけることによって活性体およびその前駆体など切断されたペプチドを解析した。

(2) IBCAP の評価系の開発

IBCAP の膵β細胞の増殖促進作用をより詳細に明らかにするために、適切な評価系を持つことは重要である。そのため、活性の評価を行い、その作用機序や意義についても検討

を行った。

(3) IBCAP-Tg および IBCAP-KO マウスの解析
より生理的な条件での機能を明らかにするために、IBCAP-Tg マウスや IBCAP-KO マウスを作製し、表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1) IBCAP の精製と 1 次構造解析

今回、IBCAP 活性体ペプチドの 1 次構造の決定を目指し、IBCAP 強制発現細胞培養上清から限外濾過、透析後、HPLC 精製（イオン交換カラム、逆相カラム）で精製を行った。この精製 Fraction を LC-MS/MS にて解析し、複数個のペプチド断片を決定させた。今後、このペプチド断片に本当に活性があるか否かについての検定が必要であり、修飾や誘導体化などの最適化が必須である。

(2) IBCAP の評価系の開発

in vitro の系でも IBCAP により膵β細胞の増殖を示すかどうかについて膵β細胞の培養細胞株である MIN6 細胞を用いて検討を行った。その結果、*in vivo* と同じく、IBCAP には膵β細胞増殖刺激作用を持つと言う事を強く示唆する結果を得た。

このことは、*in vitro* においても膵β細胞の増殖が見られることから、IBCAP は GLP-1 等のインクレチンと比べてもより強力な膵β細胞増殖作用を有していると言える。このように、IBCAP は第 3 のインクレチンとなる可能性があるが、膵β細胞増殖に関しては、既存のインクレチンよりもアドバンテージを持っていると考えられる。

さらに、IBCAP による膵β細胞増殖効果について解析し、細胞増殖を指標とした新しい簡便な IBCAP の評価系を開発した。この開発により、従来より簡便に正確な評価が可能となり、活性の検定が出来るようになった。今後、さらに別の評価系として血中 IBCAP 濃度が測定できるようになると、将来的には診断や検査に臨床応用出来るためにその開発が待たれる。

(3) IBCAP-遺伝子改変マウスの解析

先行研究の結果、アデノウイルスを用いて IBCAP を強制発現させたマウスでは膵臓ラ氏島に作用し、ラ氏島の増殖や保護作用など形態学変化を起し、糖尿病改善作用を持つことが考えられた。

そこで、今回、IBCAP の Gain/Loss of Function による膵β細胞増殖作用を確認するために、IBCAP-Tg/ KO マウスの膵臓切片のアルデヒドフクシン染色を観察した。その結果、IBCAP の機能として膵ラ氏島の増殖と深く関与する可能性を示唆していた。この結果

は、糖尿病治療や再生治療に結びつく可能性が考えられる。その他の表現型については今後の解析が待たれる。

現在世界中で急増している糖尿病は、絶対的、相対的に膵β細胞の機能または細胞数の不足によって起こる。我々が独自に同定した新規消化管ホルモン IBCAP は機能として膵臓β細胞増殖促進などインクレチン様作用を持つため、IBCAP は糖尿病の治療標的となり得る可能性が考えられ、遺伝子治療、膵臓再生医療への応用も含め、特に1型糖尿病の治療薬になり得る可能性があり今後の解析が期待される。

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 Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Kawakami M, Yamada N, Okazaki Y, Toyoshima H, Expression of IBCAP (intestine-derived beta-cell augmenting promoter), an intestine specific secretory factor, induces insulin positive cells in the liver., *Diabetologia*, 55(Suppl1), S182 (2012) DOI: 10.1007/s00125-012-2688-9, 査読有
- ② Asano T, Aoki A, Sasaki M, Ikoma A, Toyoshima H, Kawakami M, Fujisawa I, Ishikawa SE, Central diabetes insipidus and hypothalamic type of hypopituitarism associated with atypical location of Rathke's cleft cyst., *Intern Med.*, 51, 189-94. (2012) DOI: 10.2169/internalmedicine.51.5646, 査読有
- ③ Yokoo T, Suzuki H, Shimano H, Watanabe K, Kawakami M, Yamada N, Okazaki Y, Toyoshima H, IBCAP, Intestine-specific Secretory Protein with Incretin-like Activity., *Diabetes*, 60(Suppl1), A549 (2011) DOI: 10.2337/db11-1929-2041, 査読有
- ④ Saito T, Kimoto M, Nakai S, Ikoma A, Toyoshima H, Kawakami M, Nokubi M, Ishikawa SE, Ectopic ACTH syndrome associated with large cell neuroendocrine carcinoma of the thymus., *Intern Med.*, 50, 1471-5. (2011) DOI: 10.2169/internalmedicine.50.5160, 査読有
- ⑤ Ikoma A, Saito T, Murata M, Toyoshima H, Nakamura Y, Kawakami M, Sasano H, Ishikawa SE, Bilateral aldosteronoma

associated with secondary aldosteronism in a chronic hemodialysis subject., *Intern Med.*, 49, 1017-21. (2010) DOI: 10.2169/internalmedicine.49.2808, 査読有

- ⑥ Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Ishikawa SE, Kawakami M, Yamada N, Okazaki Y, Toyoshima H, Transgenic mice expressing an intestine-specific secretory protein, IBCAP, demonstrates pancreatic beta cell augmenting activity., *Diabetologia*, 53(Suppl1), S218 (2010) DOI: 10.1007/1007/s00125-010-1872-z, 査読有
- ⑦ Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Ishikawa SE, Kawakami M, Yamada N, Toyoshima H, Transgenic Mice Expressing an Intestine-Specific Secretory Protein, IBCAP (Formerly CF266), Demonstrates Pancreatic β-Cell Augmenting Activity., *Endocrine Reviews*, 31(3) Suppl 1, S540 (2010) http://www.endojournals.org/site/abstracts/P1-1_to_P1-729.pdf, 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Kawakami M, Yamada N, Okazaki Y, Toyoshima H, Expression of IBCAP (intestine-derived beta-cell augmenting promoter), an intestine specific secretory factor, induces insulin positive cells in the liver., 48th EASD Annual Meeting, (Berlin, Germany), 2012.10.2
- ② Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Kawakami M, Yamada N, Okazaki Y, Toyoshima H, Demonstration of IBCAP as a Novel Intestine-specific Secretory Protein with Incretin-like Activity., 第34回日本分子生物学学会年会 (横浜市), 2011.12.14
- ③ Toyoshima H [invited speaker], IBCAP; discovery of another intestinal hormone with beta cell augmenting activity., The 2011 International Conference on Diabetes and Metabolism, (Seoul, Korea), 2011.11.11
- ④ 横尾友隆、渡邊和寿、飯田薫子、鈴木浩明、島野仁、石川三衛、川上正舒、山田信博、岡崎康司、豊島秀男, 新規消化管ホルモン因子 IBCAP による膵β細胞増加作用の解析, 第26回日本糖尿病合併症学会 (さいたま市), 2011.10.14
- ⑤ Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Ishikawa SE, Kawakami M,

Yamada N, Okazaki Y, Toyoshima H,
IBCAP, Intestine-specific Secretory Protein
with Incretin-like Activity., The 71st
Scientific Sessions of America Diabetes
Association (San Diego, USA), 2011.6.27

- ⑥ 横尾友隆、渡邊和寿、飯田薫子、鈴木浩明、島野仁、石川三衛、川上正舒、山田信博、岡崎康司、豊島秀男、膵β細胞増加作用を持つ新規消化管特異的分泌タンパク IBCAP の機能解析, 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (札幌市), 2011.5.19
- ⑦ 豊島秀男 [招待演者]、横尾友隆、鈴木浩明、石川三衛、川上正舒、島野仁、山田信博、岡崎康司、新規消化管特異的分泌因子 IBCAP の機能解析および糖尿病治療への可能性, 第84回日本内分泌学会学術総会 (神戸市), 2011.4.22
- ⑧ Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Ishikawa SE, Kawakami M, Yamada N, Okazaki Y, Toyoshima H, Transgenic mice expressing an intestine-specific secretory protein, IBCAP, demonstrates pancreatic beta cell augmenting activity., 46th EASD Annual Meeting, (Stockholm, Sweden), 2010.9.22
- ⑨ Yokoo T, Watanabe K, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, Ishikawa SE, Kawakami M, Yamada N, Toyoshima H, Transgenic Mice Expressing an Intestine-Specific Secretory Protein, IBCAP (Formerly CF266), Demonstrates Pancreatic β-Cell Augmenting Activity., ENDO 2010: The 92nd Annual Meeting & Expo, (San Diego, USA), 2010.6.19

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 膵臓内分泌細胞の生産方法
発明者: 豊島秀男、岡崎康司、横尾友隆、菅原泉
権利者: 埼玉医科大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-120281
出願年月日: 平成 24 年 5 月 25 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
豊島 秀男 (TOYOSHIMA HIDEO)
埼玉医科大学・医学部・客員准教授
研究者番号: 20197966

- (2) 研究分担者
なし

- (3) 連携研究者
岡崎 康司 (OKAZAKI YASUSHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80280733
横尾 友隆 (YOKOO TOMOTAKA)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80400688