

## 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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2011

課題番号：22790857

研究課題名（和文）代謝異常時の膵島内分泌細胞修飾におけるインクレチン GIP の役割の解明

研究課題名（英文）Role of gastric inhibitory polypeptide in modifying pancreatic islet function

研究代表者

濱崎 暁洋 (HAMASAKI AKIHIRO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40456900

研究成果の概要（和文）：インクレチンである GIP (gastric inhibitory polypeptide) 受容体を組織特異的に遺伝子欠損させる遺伝子改変マウスを作成し、他の遺伝子改変マウスとの交配により、膵臓の  $\beta$  細胞で特異的に GIP 受容体を欠失させたマウスを得た。GIP が糖尿病や肥満といった代謝異常時に、膵島の内分泌細胞においてどのような役割を果たしているのか、膵島の  $\beta$  細胞から分泌されるインスリンと独立した作用を解明することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：We generated gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor conditional knockout mice, and obtained pancreatic beta-cell specific GIP receptor knockout mice. These models enable us to investigate the roles of GIP on pancreatic islet endocrine cells in obesity and diabetes directly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：エネルギー・糖質代謝異常

キーワード：インクレチン、GIP、膵内分泌細胞、グルカゴン、糖尿病、肥満

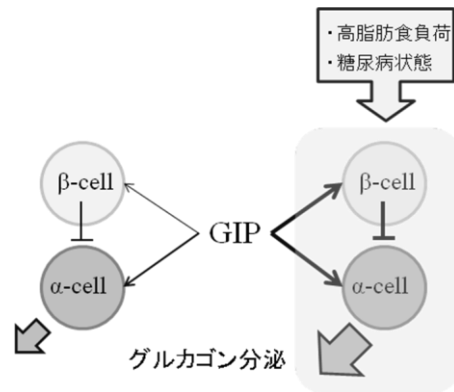
## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病患者では空腹時および食後における肝からの糖放出の増加がみられ、これにはインスリンの作用不足にあわせてグルカゴン分泌の抑制不全が寄与していることが知られている。インスリンの作用不足を説明する膵β細胞からのインスリン分泌不全や抹消組織でのインスリン感受性の低下については多くの知見が集積されている一方で、膵α細胞からのグルカゴン分泌抑制不全については未解明な点が多く残されている。膵島からのグルカゴン分泌は低血糖時に亢進し、高血糖時に抑制される。この制御には血糖値が直接関わるのではなく、血糖値に応じた膵β細胞からのインスリン分泌に関連した経路が関わっていることが近年示されている。この機序からは、インスリンが多く分泌される状態でグルカゴン分泌はよく抑制されるとの相関をみるることとなる。ところが2 型糖尿病患者においてはこの相関が成立せず、肥満度、インスリン抵抗性の増大に応じて、インスリン分泌とグルカゴン分泌が増加しており、インスリン分泌に対するグルカゴン分泌抑制効果への抵抗性が存在していることを示唆する報告がなされた。しかし何がこの膵α細胞の抵抗性を形成しているかは明らかとなっていない。

膵β細胞は経口摂取により血中に取り込まれた栄養素の刺激によってインスリンを分泌するが、その際、消化管から分泌される液性因子を介した、栄養素の取り込みに合わせたインスリン分泌の増強を示す。この液性因子を「インクレチン」と称し、インクレチンによるインスリン分泌の増強効果をインクレチン効果という。食後のインスリン分泌の約半分がインクレチン効果によるものとされる。現在、上部小腸を中心に存在する腸管内分泌細胞である K 細胞から分泌される GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) と下部小腸を中心に存在する腸管内分泌細胞である L 細胞から分泌される GLP-1 (glucagon-like peptide-1) の二つの消化管ホルモンが主なインクレチンとして知られている。2 型糖尿病においては特に経口負荷後早期のインスリン分泌の減弱がみられるが、耐糖能の悪化時にはこのインクレチン効果が減弱しており、食後のインスリン分泌不全の一翼を担うことが明らかとされている。インクレチンホルモンを2 型糖尿病患者に外因性に投与した検討では、GLP-1 投与によってブドウ糖応答性のインスリン分泌に改善がみられたが GIP にはそうした改善効果がみられず、ここから特に GIP に対する膵β細胞の感受性の低下が示唆されている。また、高脂肪食負荷時には代謝の恒常性をはかるべくインスリン分泌の増強がみら

れるが、この増強には GIP に対する膵β細胞の感受性の増大が寄与していることを当研究室で示している。このように、代謝異常時における膵β細胞の機能修飾にはインクレチンである GIP が大きく関わるということが知られている。

近年ヒトでの糖代謝異常とインクレチン濃度を検討した報告の中で、2 型糖尿病で高値を示し負荷後抑制が不十分なグルカゴン濃度に対して、血中 GIP 濃度が有意な相関をみることが示されるようになった。また、gip 遺伝子プロモーター下にジフテリア毒素を発現させて GIP 陽性 K 細胞を欠失させた遺伝子改変マウスの検討の中で、高脂肪食負荷時に惹起された高グルカゴン血症が GIP 欠失下ではみられないとのデータも示されている。これらから、膵α細胞からのグルカゴン分泌抑制不全にインクレチンホルモンである GIP が関わることを示唆される。



【図】代謝異常時のグルカゴン分泌増大と GIP シグナルの増強の関連モデル

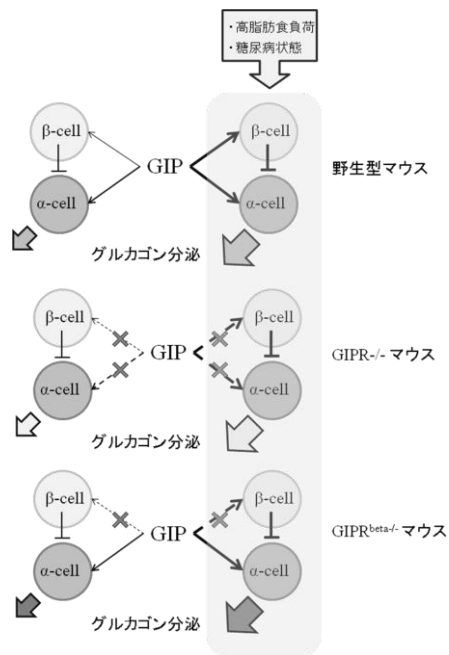
## 2. 研究の目的

糖尿病状態あるいは高脂肪食負荷時といった代謝異常状態において、GIP シグナルが高グルカゴン血症、糖負荷時のグルカゴン抑制不全の形成に関わっていることを明らかにする。

高脂肪食負荷下においては血中 GIP 濃度が上昇するが、同条件下に置いた、GIP シグナルが遮断されたモデルでのグルカゴン分泌を解析する。この際、GIP によるα細胞機能の修飾が、β細胞からのインスリン分泌の修飾を介したものと独立したものであることを証明する。そのために、膵β細胞特異的に GIP 受容体をノックアウトしたコンディショナルノックアウトマウスを確立する。

### 3. 研究の方法

これまでに当研究室で作成し GIP がインクレチンホルモンであることを証明した GIP 受容体欠損マウス (GIPR<sup>-/-</sup>) の知見をもとに、確立する Cre-loxP システムを用いた組織特異的 GIP 受容体欠損マウスと rat insulin プロモーター下 Cre トランスジェニックマウス (rip-Cre) とを交配させて作成した膵β細胞 (beta) 特異的 GIP 受容体欠損マウス (GIPR<sup>beta-/-</sup>) の解析を行う。



【図】 GIP シグナル増強時のグルカゴン分泌の増大 (上段) が GIP シグナルを遮断するとみられなくなることが予想される (中断)。この GIP シグナルによるグルカゴン分泌への修飾が、膵β細胞からのインスリン分泌を介した経路とは独立して膵α細胞に直接 GIP が働くことによって生じることを膵β細胞で特異的に GIP 受容体をノックアウトしたマウスによって検証する (下段)。

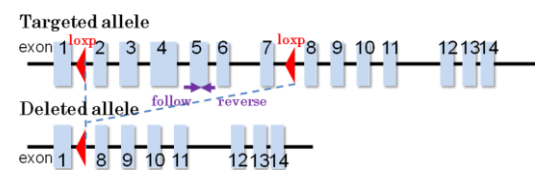
### 4. 研究成果

Cre-Loxp 手法による組織特異的 GIP 受容体欠損マウスを作成した。さらに作成した組織特異的 GIP 受容体欠損マウスと、rat insulin プロモーター下 Cre トランスジェニックマウス (rip-Cre) を交配させてることにより、膵β細胞 (beta) 特異的 GIP 受容体欠損マウス (GIPR<sup>beta-/-</sup>) を作成した。作成した膵β細胞 (beta) 特異的 GIP 受容体欠損マウス (GIPR<sup>beta-/-</sup>) から単離した膵島に発

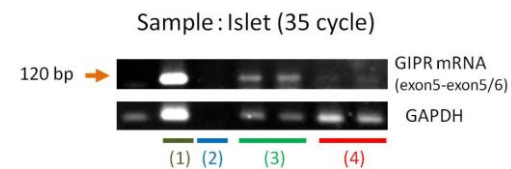
現する mRNA を抽出し、PCR により解析したところ、rat insulin プロモーター下 Cre トランスジェニックマウス (rip-Cre) と交配させた組織特異的 GIP 受容体欠損マウスでのみ、改変遺伝子設計時の GIP 受容体遺伝子の exon2 から exon7 の欠失をみとめ、同マウスと交配させていない組織特異的 GIP 受容体欠損マウスは同部位の exon が mRNA に残存していることを確認した。さらに、膵β細胞 (beta) 特異的 GIP 受容体欠損マウス (GIPR<sup>beta-/-</sup>) 由来の膵島以外の組織 (脳組織、脂肪組織、腸管組織) から抽出した mRNA においては、GIP 受容体遺伝子の exon の欠失は認められなかった。以上より本研究の目的通りの遺伝子改変マウスを得たことを確認した。

同マウスにおいて各種代謝負荷を含めた状態でグルカゴン分泌や関連遺伝子発現等の解析を行うことにより、グルカゴン分泌に対するインクレチン GIP の直接の役割が明らかとなる。国内外でこれまでの研究を通して、臓器、個体単位で GIP のα細胞に対する直接の役割は評価し得ず、それらを解析する手段を得た意義は非常に大きい。

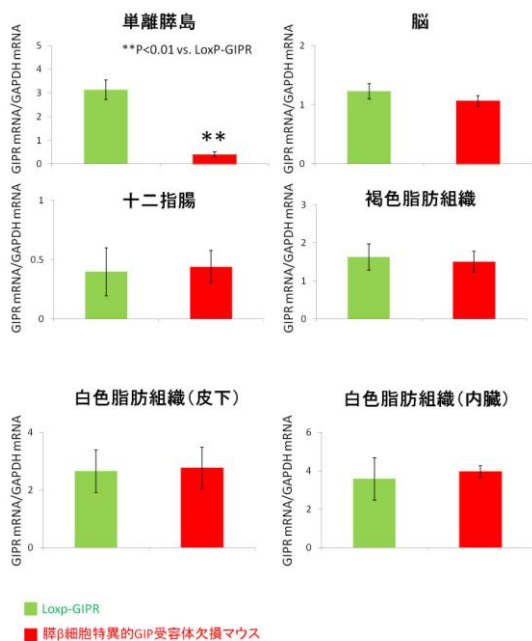
(a)



(b)



【図】 作成した組織特異的 GIP 受容体ノックアウトマウス (a) Cre-Loxp システムを用いることにより、GIP 受容体の exon2 から exon7 が組織特異的に欠損するマウス (Loxp-GIPR) を作成した。 (b)膵β細胞で Cre を発現する rip-Cre 遺伝子導入マウスと交配させることにより、膵β細胞特異的に GIP 受容体を欠損させた。野生型マウス (1)、作成した Loxp-GIPR マウス (3) が GIP 受容体のメッセンジャー RNA を発現しているのに対して、膵β細胞特異的に GIP 受容体欠損マウス (4) ではその発現がみられない。(2)はネガティブコントロール。)



【図】膵β細胞特異的GIP受容体欠損マウスにおけるGIP受容体遺伝子発現。作成したLoxp-GIPRマウスをコントロールとして、単離膵島、腸管組織、脳、脂肪組織におけるGIP受容体のメッセンジャーRNA発現レベルを評価した。膵β細胞特異的GIP受容体欠損マウスでは、膵島組織でのみGIP受容体のメッセンジャーRNAの発現量が有意に低下していた。

## 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3件)

- (1) Yamane, S., Harada, N., Hamasaki, A., Muraoka, A., Joo, E., Suzuki, K., Nasteska, D., Tanaka, D., Ogura, M., Harashima, S., Inagaki, N. Effects of glucose and meal ingestion on incretin secretion in Japanese subjects with normal glucose tolerance. *Journal of Diabetes Investigation*. 査読有、vol3. 2012. 80-85.  
DOI: 10.1111/j.2040-1124.2011.00143.x

- (2) Funakoshi, S., Fujimoto, S., Hamasaki, A., Fujiwara, H., Fujita, Y., Ikeda, K., Takahara, S., Seino, Y., Inagaki, N. Analysis of factors influencing postprandial C-peptide levels in Japanese patients with type 2 diabetes: Comparison with C-peptide

levels after glucagon load. *Journal of Diabetes Investigation*. 査読有、vol2. 2011. 429-434.

DOI: 10.1111/j.2040-1124.2011.00126.x

- (3) Harada, N., Hamasaki, A., Yamane, S., Muraoka, A., Joo, E., Fujita, K., Inagaki, N. Plasma gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 levels after glucose loading are associated with different factors in Japanese subjects. *Journal of Diabetes Investigation*. 査読有、vol2. 2011. 186-192.  
DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00078.x

[学会発表] (計4件)

- (1) 濱崎暁洋、原田範雄、山根俊介、稲垣暢也。GIPの基礎と臨床。日本糖尿病学会近畿地方会(シンポジウム)。2011/10/29.
- (2) Nasteska, D., Harada, N., Hamasaki, A., Inagaki, N., et al. Effects of inhibited GIP secretion on high fat diet-induced obesity and insulin secretion. Annual Meeting of the European Society for the Study of Diabetes (EASD) 2011/9/13.
- (3) Hamasaki, A., Harada, N., Muraoka, A., Inagaki, N., et al. Not glucose tolerance but obesity impairs the numerical incretin effect in Japanese subjects. Annual Meeting of the European Society for the Study of Diabetes (EASD) 2011/9/13.

[その他]

ホームページ等

<http://metab-kyoto-u.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱崎暁洋 (HAMASAKI AKIHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 40456900