

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461345

研究課題名(和文) グルカゴン分泌修飾におけるインクレチンGIPの役割の直接的解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of GIP in pancreatic glucagon secretion.

研究代表者

濱崎 暁洋 (HAMASAKI, Akihiro)

公益財団法人田附興風会・医学研究所第3研究部・部長

研究者番号：40456900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病・肥満状態におけるグルカゴン分泌修飾に関わるインクレチン；Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) の役割を解明するために、基礎及び臨床両面からの研究を行った。基礎研究では、遺伝子改変によって組織特異的にGIP受容体を欠失させるマウスを作製し、その表現型を解析した。臨床研究では、とくに食後の血糖値上昇に関連するグルカゴン分泌にGIPが関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We performed basic experiments and clinical studies to elucidate the role of glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) in modification of glucagon secretion in diabetes and obesity. We generated and analysed tissue-specific GIP receptor knock-out mice in basic study. We also investigated the relation between glucagon secretion and incretin secretion, and clarified that GIP affected the glucagon secretion especially in postprandial state.

研究分野：医歯薬学

キーワード：グルカゴン インクレチン GIP 膵島 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に応じた膵細胞からのインスリン分泌に関連した経路が関わるの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、これは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。また、2 型糖尿病患者においてはブドウ糖などの栄養素負荷後、本来ならばグルカゴン分泌の抑制が見られるべきところに奇異性のグルカゴン分泌上昇が認められることも以前より知られている (Muller et al. 1970)。しかし何がこの膵細胞のグルカゴン分泌抑制への抵抗性やグルカゴン分泌動態の修飾を形成しているかはあまり明らかとされていない。

膵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て、栄養素の取り込みに合わせたインスリン分泌が増強される。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。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 insulinotropic 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、特に GIP に対する膵細胞の感受性の低下が示唆されている (Nauck et al. 1993)。

また、高脂肪食負荷時には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 (Harada et al. 2008)。このように、代謝異常時における膵細胞の機能修飾にインクレチンである GIP が大きく関わる事が知られている。

膵細胞に関して、インクレチンとグルカゴン分泌との関係を検討する知見にはこれまで乏しかったが、最近、健常人における検討で、GIP は血糖値が低い場合にのみグルカゴン分泌を促すことがグルコースクランプを用いた直接的な手法で示された (Christensen et al. 2011)。ところが、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は、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報告されている (Vollmer et al. 2008)。われわれの健常人に対する検討でも、経口糖負荷後のグルカゴン分泌が負荷後の GIP 分泌と有意な相関を持つことを明らかとしている (Harada, Hamasaki et al. 2011)。

これらから、膵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 のシグナルに何らかの修飾が関わっていることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、代謝異常時に認められる細胞のグルカゴン分泌異常における、インクレチン、とりわけ GIP の役割について明らかにすることである。

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 シグナルの修飾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直接的に関わっていることを明らかとするために、GIP 受容体の発現を組織特異的に欠失させた動物モデルによる解析を行う。

さらに実際にヒトにおける経口負荷後グルカゴン動態と糖代謝へのインクレチンの関わりを検証し、糖尿病、肥満状態の膵島機能修飾におけるインクレチンの役割の意義を明らかとすることも本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) **組織特異的 GIP 受容体欠損マウスの解析** Cre-lox P システムを用いたコンディショナル 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細胞 (beta) 特異的 GIP 受容体欠損マウス (GIPRbeta^{-/-}) の解析を行う。遺伝子改変マウスおよび野生型マウスにおける、血中 GIP 濃度の変化、および糖負荷後グルカゴン

分泌動態を解析する。また、膵島組織の解析もあわせておこなう。

(2) **経口負荷時のグルカゴン分泌とその抑制、およびインクレチン効果の関連の解析** 正常耐糖能と2型糖尿病の両状態において経口糖負荷試験および経静脈糖負荷試験を行い、その際のグルカゴン分泌(抑制)動態とインクレチンとの関連を検討した。

(3) **肥満状態におけるインクレチン効果の検討** 肥満状態のインクレチン効果を経口糖負荷試験、経静脈糖負荷試験により実際に算出し、肥満度との関連を検討した。あわせて、肥満状態からの改善がインクレチン効果に及ぼす変化を同一個体(同被験者)間の比較によって直接的に検証した。

また肥満状態を反映する代謝指標と胃クレチン効果との関連についての検討も行った。

(4) **栄養素負荷後の血糖値上昇、糖処理能力に関わる因子としてのグルカゴンとインクレチンの検討** 経口糖負荷後の血中糖処理能力についてインクレチン効果評価時の検査から算出してグルカゴン分泌との関連、インクレチン濃度との関連を検証した。

4. 研究成果

(1) **組織特異的 GIP 受容体欠損マウスの解析**

コンディショナル 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細胞(beta)特異的 GIP 受容体欠損マウス(GIPRbeta^{-/-})の耐糖能、膵島・腸管ホルモン(インクレチン)分泌動態を検討し以下の結果が得られた。

膵細胞 GIP 受容体欠損マウスでは経口糖負荷後の耐糖能悪化がみられた。膵細胞 GIP 受容体欠損マウスでは経口糖負荷後のインスリン分泌の低下が認められた。膵細胞 GIP 受容体欠損マウスでは経口糖負荷後のグルカゴン分泌が減弱(より抑制)されている傾向が観察された。膵細胞 GIP 受容体欠損マウスでは経口糖負荷後の GIP 分泌の亢進が観察された。腹腔内への糖負荷試験もを行い、からの検討をおこなったところ、同様の血糖、インスリン、グルカゴン、インクレチン動態が観察された。

膵細胞 GIP 受容体欠損マウスの膵組織評価では明らかな膵島の組織学的変化は観察されなかった。

これらの結果から、GIP シグナルは膵細胞からの糖応答性のインスリン分泌を増幅するのみでなく、膵細胞 GIP 受容体欠損マ

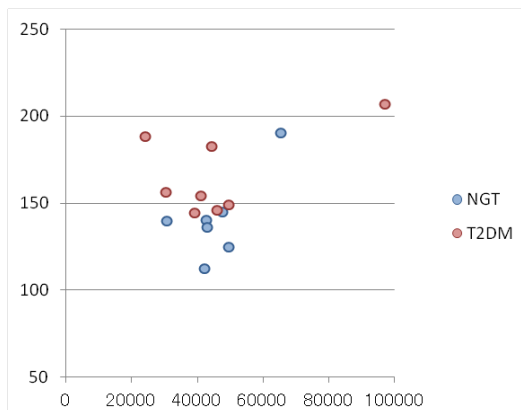
ウスではインスリン分泌が減弱していたにもかかわらずグルカゴン分泌がより抑制される傾向がみられたことから、膵島で GIP 受容体を介したグルカゴン分泌を直接的に増強している機序に何らかの障害を生じている可能性も示唆された。

[今後の展望]今回得られた遺伝子改変モデルマウスとその糖負荷時の表現型とから、本研究で示した、糖尿病あるいは肥満状態のグルカゴン動態(後述)へのインクレチン作用(GIP の作用)機序の解明への応用が期待される。

(2) **経口負荷時のグルカゴン分泌とその抑制、およびインクレチン効果の関連の解析**

正常耐糖能者(NGT)および2型糖尿病患者を解析した。75g ブドウ糖経口負荷試験(OGTT)およびその血糖値推移を再現する経静脈糖負荷試験(IVGTT)を施行し、負荷後180分間の血糖値、インスリン値、Cペプチド値(CPR)、血漿グルカゴン濃度、総 GIP 濃度、総 GLP-1 濃度を測定して、インクレチン効果を算出した。これらの解析から、以下が明らかとなった。

OGTT での血中グルカゴン濃度は、基礎値に差はなかったが、負荷後30、60、90分後に T2DM 群において有意に高く、曲線下面積も有意に大きかった($p < 0.05$)。IVGTT では両群間にこれらの差は認めなかった。インスリン、インクレチン分泌・効果との関連の検討では、OGTT および IVGTT におけるグルカゴン濃度と両負荷時の差に対して、インスリン分泌、インクレチン効果は有意な相関を認めなかった。経口負荷初期60分の GIP 分泌とグルカゴン濃度曲線下面積との間に有意な正の相関を認めた($p < 0.05$)【図1】。



【図1】負荷後 GIP とグルカゴンとの関連

これらの結果から、経口糖負荷時に腸管因子を介したグルカゴン分泌調節の存在が確認でき、糖尿病状態における経口負荷後グルカゴンの奇異性上昇の機序の一つとして GIP

への応答の変化がある可能性が示唆される。

[今後の展望]これまであまり知見のないグルカゴン分泌機序とその制御についての説明が期待される。

(3) 肥満状態におけるインクレチン効果の検討

正常耐糖能者に 75g 経口ブドウ糖負荷 (OGTT) をおこない、血漿血糖・血清 C ペプチド (CPR)、総 GIP、総 GLP-1 濃度を測定した。その後血糖値推移を再現した経静脈ブドウ糖負荷試験 (IVGTT) を行い、同項目を測定しインクレチン効果を算出した。また、BMI 25 以上の Case では 5% 以上の減量後にインクレチン効果を再評価した。また、血中脂肪酸との関連解析も行い、以下の結果を得た。

インクレチン効果と BMI は有意な負の相関を示した。減量した Case のインクレチン効果の上昇をとらえた。総 GIP、総 GLP-1 分泌は前後で有意差はなかった。インクレチン効果は、負荷前脂肪酸分画中パルミトレイン酸 (C16:1-7) とオレイン酸 (C18:1-9) との間に有意な負の相関を示し、負荷後 120 分時にはより強い相関がみられた。インクレチン効果と -3 系不飽和脂肪酸との明らかな相関は認めなかった。【表】

	分画濃度				質量%			
	BMI		IE		BMI		IE	
	r	p	r	p	r	p	r	p
C12:0	0.180	0.504	-0.117	0.666	-0.029	0.915	0.067	0.806
C14:0	0.455	0.077	-0.541	0.030	0.310	0.242	-0.397	0.128
C14:1 ω 5	—	—	—	—	—	—	—	—
C16:0	0.353	0.179	-0.409	0.115	-0.636	0.008	0.480	0.060
C16:1 ω 7	0.358	0.173	-0.626	0.010	0.132	0.625	-0.526	0.036
C18:0	0.339	0.199	-0.446	0.083	-0.398	0.127	0.179	0.506
C18:1 ω 9	0.449	0.081	-0.601	0.014	0.378	0.149	-0.617	0.011
C18:2 ω 6	0.509	0.044	-0.311	0.240	-0.032	0.906	0.373	0.155
C18:3 ω 6	0.460	0.073	-0.467	0.068	0.343	0.194	-0.327	0.217
C18:3 ω 3	0.407	0.118	-0.404	0.121	0.177	0.511	-0.071	0.793
C20:0	0.388	0.138	-0.015	0.957	-0.412	0.113	0.534	0.033
C20:1 ω 9	0.343	0.194	-0.510	0.044	0.011	0.969	-0.234	0.394
C20:2 ω 6	0.433	0.094	-0.536	0.032	-0.102	0.708	-0.009	0.973
C20:3 ω 9	0.326	0.217	-0.438	0.089	-0.007	0.979	-0.160	0.554
C20:3 ω 6	0.556	0.025	-0.595	0.015	0.392	0.133	-0.472	0.065
C20:4 ω 6	0.409	0.115	-0.429	0.097	0.062	0.819	-0.168	0.534
C20:5 ω 3	-0.104	0.701	0.038	0.890	-0.383	0.143	0.257	0.337
C22:0	0.538	0.032	-0.146	0.590	-0.076	0.779	0.395	0.130
C22:1 ω 9	-0.031	0.908	-0.128	0.637	—	—	—	—
C24:0	0.559	0.024	-0.541	0.030	0.371	0.157	-0.336	0.203
C25:0	0.330	0.212	-0.361	0.169	0.015	0.957	0.024	0.930
C24:0	0.575	0.020	-0.240	0.370	-0.049	0.856	0.363	0.167
C22:6 ω 3	0.345	0.191	-0.287	0.281	0.026	0.924	0.035	0.896
C24:1 ω 9	0.579	0.019	-0.426	0.100	-0.119	0.681	0.185	0.493

【表】脂肪酸分画とインクレチン効果との関係

これらの結果により肥満状態におけるインクレチン効果の減弱と肥満解消にともなってインクレチン効果が改善する可能性を示した。さらには脂肪酸分画との比較からは食生活との関連も考えられた。

[今後の展望]本知見は、糖尿病治療において広く応用されているインクレチン関連薬治療がより効果を発揮するために重要な背景を示し、これらをもとにした有効な療養指導応用への発展が期待される。

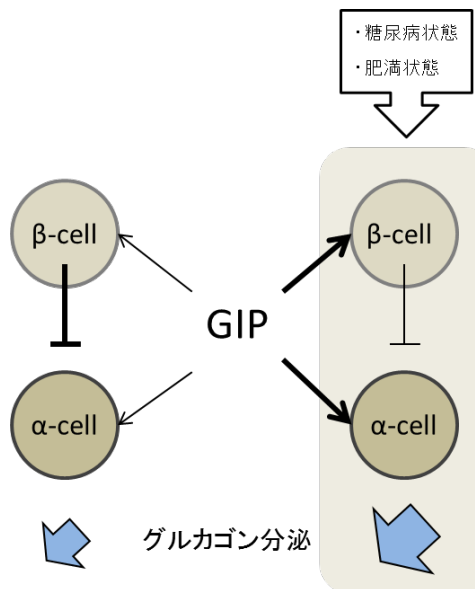
(4) 栄養素負荷後の血糖値上昇、糖処理能

力に関わる因子としてのグルカゴンとインクレチンの検討

正常耐糖能者および 2 型糖尿病において、経口糖負荷後血糖値を経静脈ブドウ糖投与で再現するために必要な注入ブドウ糖量を経時的に算出した。75g 経口ブドウ糖負荷 (OGTT) の血糖値経過の再現に必要な経静脈投与ブドウ糖量の合計の経口負荷 75g に対する比率を gastrointestinally mediated glucose disposal (GIGD) として算出した。GIGD を経口負荷後の全身の糖処理能力の統合的指標として、インスリンとグルカゴン、インクレチンとの関連を検討し以下の結果を得た。

GIGD は 2 型糖尿病において有意に高値であった。GIGD は負荷後インスリンではなく負荷後グルカゴンと有意な相関を示し、とりわけ負荷後早期のグルカゴンとの関連がみられた。

これらの結果から、2 型糖尿病の負荷後血糖値上昇の病態として、初期インスリン分泌の低下にあわせて、とりわけ負荷後早期におけるグルカゴン分泌抑制不全が重要であることが示唆された。前述の研究成果 (1) (2) とともに、こうした糖尿病状態における膵島機能異常に、インクレチン、とりわけ GIP のグルカゴン分泌修飾が関わる可能性が考察される。また研究成果 (3) の、肥満状態におけるインクレチン効果修飾もあわせ、これら代謝異常時の膵島機能におけるインクレチン GIP の意義が考察された【図 2】。



【図 2】糖尿病・肥満状態におけるグルカゴン分泌 GIP による修飾

さらに、インクレチン効果の可塑性、関連因子の解析で得られた結果から、膵島機能の改善方法を、インクレチンによる機能修飾の観点から検討するための新たな知見が本課題研究によってえられたものとする。

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 5 件)

1) Joo E, Muraoka A, Hamasaki A, Harada N, Yamane S, Kondo Y, Suzuki K, Nasteska D, Shibue K, Harada T, Iwasaki K, Tsuji H, Shide K, Inagaki N. Enteral supplement enriched with glutamine, fiber, and oligosaccharide modulates incretin and glucagon-like peptide-2 secretion. *J Diabetes Investig.* 6: 302-308, 2015 (査読有) doi: 10.1111/jdi.12289

2) Shibue K, Yamane S, Harada N, Hamasaki A, Suzuki K, Joo E, Iwasaki K, Nasteska D, Harada T, Hayashi Y, Adachi Y, Owada Y, Takayanagi R, Inagaki N. Fatty acid-binding protein 5 regulates diet-induced obesity via GIP secretion from enteroendocrine K cells in response to ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 308: E583-91, 2015 (査読有) doi: 10.1152/ajpendo.00543.2014

3) Nasteska D, Harada N, Suzuki K, Yamane S, Hamasaki A, Joo E, Iwasaki K, Shibue K, Harada T, Inagaki N. Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high-fat diet conditions. *Diabetes.* 63: 2332-2343, 2014 (査読有) DOI: 10.2337/db13-1563

4) Joo E, Yamane S, Hamasaki A, Harada N, Matsunaga T, Muraoka A, Suzuki K, Daniela N, Fukushima T, Hayashi T, Tsuji H, Shide K, Tsuda K, Inagaki N. Enteral supplement enriched with glutamine, fiber, and oligosaccharide attenuates experimental colitis in mice. *Nutrition* 29: 549-55, 2013 (査読有) doi: 10.1016/j.nut.2012.09.007

5) Suzuki K, Harada N, Yamane S, Nakamura Y, Sasaki K, Nasteska D, Joo E, Shibue K, Harada T, Hamasaki A, Toyoda K, Nagashima K, Inagaki N. Transcriptional Regulatory Factor X6 (Rfx6) Increases Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) Expression in Enteroendocrine K-cells and Is Involved in GIP Hypersecretion in High Fat Diet-induced Obesity. *J Biol Chem.* 288: 1929-1938, 2013 (査読有) doi: 10.1074/jbc.M112.423137

[学会発表](計 6 件)

1) Hamasaki A, Muraoka A, Harada N, Yamane S, Joo E, Suzuki K, Shibue K, Harada T,

Iwasaki K, Inagaki N. Early phase glucagon secretion associated with GIP reflects preferentially glucose disposal after oral glucose loading. 7th AASD Scientific Meeting, Oct. 21-22, 2015, Hong Kong

2) 村岡 敦、濱崎暁洋、原田範雄、山根俊介、城尾恵里奈、鈴木和代、渋谷公尊、原田貴成、山本泰三、稲垣暢也 肥満時のインクレチン効果修飾因子としての脂肪酸分画の検討 第112回日本内科学会総会・講演会平成27年4月10-12日 みやこめっせ(京都)

3) Hamasaki A, Muraoka A, Harada N, Yamane S, Joo E, Suzuki K, Kondo Y, Shibue K, Harada T, Iwasaki K, Inagaki N. Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) Is Involved in Inappropriate Glucagon Secretion in Response to Oral Glucose Loading in Type 2 Diabetes. 10th IDF-WPR CONGRESS 2014 | 6th AASD Scientific Meeting, Nov. 21-24, 2014, Singapore

4) Muraoka A, Hamasaki A, Harada N, Yamane S, Joo E, Suzuki K, Konodo Y, Shibue K, Harada T, Iwasaki K, Inagaki N. Relationship between Fatty Acid Profile and Incretin Effect in Normal Glucose Tolerance. 10th IDF-WPR CONGRESS 2014 | 6th AASD Scientific Meeting, Nov. 21-24, 2014, Singapore

5) 村岡 敦、濱崎暁洋、原田範雄、山根俊介、城尾恵里奈、Daniela Nasteska、渋谷公尊、鈴木和代、稲垣暢也 肥満者の減量によるインクレチン効果の改善についての検討 第57回日本糖尿病学会年次学術集会 平成26年5月22日-24日 大阪国際会議場(大阪)

6) Iwasaki K, Harada N, Sasaki K, Yamane S, Iida K, Suzuki K, Hamasaki A, Joo E, Nasteska D, Shibue K, Harada T, Hirasawa A, Inagaki N. Free fatty acid receptor GPR120 is highly expressed in enteroendocrine K cells of upper small intestine and has a crucial role in GIP secretion after fat ingestion. 50th EASD annual meeting, Sep. 15-19, 2014, Vienna

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱崎 暁洋 (HAMASAKI, Akihiro)
公益財団法人田附興風会・医学研究所第3
研究部・部長
研究者番号: 40456900