

主論文の要旨

**Ectopic Expression of GIP in Pancreatic β -Cells
Maintains Enhanced Insulin Secretion in Mice With
Complete Absence of Proglucagon-Derived Peptides**

〔 膵 β 細胞での異所性 GIP 発現は、プログルカゴン由来ペプチド完全
欠損マウスにおいて、インスリン分泌亢進を維持する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：大磯 ヌタカ 教授)

深見 亜也子

【緒言】

グルカゴンは主要なインスリン拮抗ホルモンであり、低血糖時に、肝臓での糖産生を促し血糖を上昇させる。不適切なグルカゴン分泌による肝臓での糖産生増加が、糖尿病の病態に悪影響を及ぼしているため、グルカゴン作用を抑制することが糖尿病の新たな治療戦略として注目されている。

糖代謝におけるグルカゴンの重要性は、グルカゴン受容体欠損マウスや薬理的にグルカゴン作用を抑制した動物モデルで示されてきた。それらの動物モデルでは、グルカゴン作用の抑制により血中のグルカゴン、glucagon-like peptide-1(GLP-1)の濃度が上昇しており、増加した GLP-1 の作用で膵β細胞機能が改善された。

我々は近年、GFP の挿入によりグルカゴン遺伝子を破壊したマウス ($Gcg^{gfp/gfp}$) を作成した。 $Gcg^{gfp/gfp}$ では、グルカゴン遺伝子由来ペプチドホルモンであるグルカゴン、GLP-1、GLP-2 は産生されないが、もう一つのインクレチンである glucose-dependent insulintropic polypeptide(GIP)はインタクトである。

この研究では、グルカゴン遺伝子由来ペプチドの欠損が膵島機能や糖代謝に及ぼす影響を検討するため、 $Gcg^{gfp/gfp}$ における耐糖能と膵β細胞機能を評価した。

【対象及び方法】

グルカゴン-EGFP ノックインマウス ($Gcg^{gfp/gfp}$) の 12-26 週齢雄マウスで、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) を行った。

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。

$Gcg^{+/+}$ 、 $Gcg^{gfp/+}$ 、 $Gcg^{gfp/gfp}$ 、 $Gcg^{gfp/gfp}$ と GIP 受容体欠損マウス ($Gipr^{-/-}$) のダブル KO マウス ($Gcg^{gfp/gfp}Gipr^{-/-}$)、グルカゴン受容体欠損マウス ($Gcgr^{-/-}$)、GLP-1 受容体欠損マウス ($Glp1r^{-/-}$)、 $Gcgr^{-/-}Glp1r^{-/-}$ 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 $Gcg^{+/+}$ と $Gcg^{gfp/gfp}$ 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。

統計学的処理は Student's *t* 検定または ANOVA で行い、 $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

【結果】

$Gcg^{gfp/gfp}$ 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 (Fig.1A、1B)。小腸からのインクレチン分泌が関与しない IPGTT でも、 $Gcg^{gfp/gfp}$ 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 (Fig.1D)。単離膵島実験では、 $Gcg^{gfp/gfp}$ のグルコース応答性インスリン分泌の亢進を認めた (Fig.1E)。

膵島形態分析では、 $Gcg^{gfp/gfp}$ 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 (Fig.2)。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 (Fig.3A)。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 (Fig.3B)。小腸での GIP mRNA 発現は *Gcggfp/gfp* と対照群で差は認めなかった (Fig.3C)。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 (Fig.3D)。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 (Fig.3E、3F)。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 (Fig.3G)。

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 (Fig.4A)。*Gcgr^{-/-}*、*Glp1r^{-/-}*、*Gcgr^{-/-}Glp1r^{-/-}*でも、GIP は α 細胞に発現していた (Fig.4B)。

*Gipr^{-/-}*との交配により、*Gcggfp/gfp Gipr^{-/-}*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^{-/-}*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 (Fig.5A)。*Gcggfp/gfp* で認めた糖負荷後のインスリン分泌亢進は、*Gcggfp/gfp Gipr^{-/-}*では対照群と同等レベルまで抑制された (Fig.5C、5E)。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^{-/-}*で著明に抑制された (Fig.5F)。

【考察】

この研究では、グルカゴン、GLP-1 を含むグルカゴン遺伝子由来ペプチドを欠損したマウスの β 細胞機能を評価した。グルカゴンシグナルを薬理的または遺伝子学的に欠損させた場合、GLP-1 産生が増加することによって、 β 細胞機能が改善することが報告されている。*Gcggfp/gfp* では、GLP-1 を欠損するにも関わらず、 β 細胞機能が改善した。

GIP は小腸 K 細胞だけでなく、膵 α 細胞にも発現していることが報告されている。*Gcggfp/gfp* では膵 α 細胞ではなく、 β 細胞に GIP が発現していた。ブドウ糖負荷試験、単離膵島実験の結果から、その β 細胞由来 GIP はグルコース応答性に分泌され、*Gcggfp/gfp* のインスリン分泌能亢進に重要な役割を果たしていると考えられた。

GIP が β 細胞に発現する機序は明らかでない。*Gcgr^{-/-}*、*Glp1r^{-/-}*、*Gcgr^{-/-}Glp1r^{-/-}*では、GIP は α 細胞に発現しており、グルカゴンや GLP-1 シグナルは関係ないと考えられた。

Gcggfp/gfp では、内因性 GIP 作用の増強があっても、 β 細胞量は対照群と同等であった。この結果は、 β 細胞増殖や生存においては、GIP より GLP-1 の方が強く作用する

という報告と一致すると考えられた。

この研究では、*Gcggfp/gfpGipr^{-/-}*の耐糖能は、GLP-1 と GIP の両方の作用を欠損させたマウス (*Glp1r^{-/-}Gipr^{-/-}*) より良いという結果が得られた。*Glp1r^{-/-}Gipr^{-/-}*において、グルカゴンシグナルを欠損させると、膵島でのコレシストキニン A 受容体や G 蛋白結合受容体 119 の発現が増加し、耐糖能が改善するという報告があり、*Gcggfp/gfpGipr^{-/-}*でも、そのようなメカニズムで耐糖能が改善した可能性が考えられる。

グルカゴン作用を欠損させた動物モデルでは、膵 α 細胞の過形成がみられるが、そのメカニズムは明らかではない。肝特異的 $G\alpha$ 欠損マウスは膵 α 細胞の過形成を示すことから、グルカゴンが、標的臓器を介して間接的に α 細胞増殖抑制に作用することが示唆される。他にも、肝臓でのアミノ酸代謝や、自律神経系が膵島細胞の増殖や機能に作用すると報告されており、これらのメカニズムが *Gcggfp/gfp* の β 細胞での GIP 発現に関与した可能性が考えられる。

【結語】

グルカゴン遺伝子由来ペプチドの欠損は、膵 β 細胞に GIP を発現することにより、 β 機能亢進を来すことを示した。 β 細胞由来 GIP は、消化管経路の栄養素投与と関係なく、血糖値上昇時に分泌され、インスリン分泌を促進する。 β 細胞に GIP が発現する機序を明らかにできれば、さらに詳細な病態の解明、治療への展開が可能となることから、さらなる研究が必要であると考えられる。