

主論文の要旨

**Fertility and Pregnancy-Associated β -Cell Proliferation
in Mice Deficient in Proglucagon-Derived Peptides**

〔 グルカゴン遺伝子由来ペプチド欠損マウスにおける
妊孕性と妊娠に伴う膵島 β 細胞増殖 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

杉山 知里

【目的】

グルカゴン遺伝子由来ペプチドとは、グルカゴン遺伝子にコードされたペプチドホルモンの総称で、その前駆体であるプログルカゴンが組織特異的にプロセッシングを受けて合成される。膵島 α 細胞で合成されるグルカゴンは、肝臓でのグリコーゲン分解や糖新生を刺激して血糖値を上げる作用を持つ。一方小腸 L 細胞で合成される GLP-1 (glucagon like peptide-1) は、血糖上昇時に膵島 β 細胞のインスリン分泌を刺激して血糖値を下げる作用を持つ。妊娠中の母体では、増大するインスリン抵抗性に対して膵島 β 細胞が増殖しインスリン分泌量を増大させることで血糖を維持する。グルカゴン受容体ノックアウトマウス(*Gcgr*^{-/-})の仔は生後 24 時間以内に死亡することから、グルカゴンの作用は妊娠に必須であると考えられてきた。しかし *Gcgr*^{-/-}では、GLP-1 の発現亢進に起因した低血糖が認められるため、その妊孕性異常がグルカゴン作用の欠損に起因したものであるかは明らかではない。本研究では、グルカゴンと GLP-1 のいずれの発現をも欠損したグルカゴン遺伝子ノックアウトマウスを用いて、妊娠時にグルカゴン遺伝子由来ペプチドの果たす役割について検討した。

【方法】

グルカゴン遺伝子(*Gcg*)の一部を GFPcDNA へと置換したグルカゴン遺伝子ノックアウトマウス(*Gcg*^{gfp/gfp})を用いて、*Gcg*^{+/+} *Gcg*^{+/gfp}を対照群とした妊孕性の統計学的調査を行った。また非妊娠時・妊娠時の血糖値、血清インスリン値、膵臓総インスリン含有量の測定、経口糖負荷試験、膵臓の免疫組織染色を行い、比較検討した。また仔の体重、血糖値を測定し比較検討した。

【結果】

Gcg^{gfp/gfp}は満期で生仔を出産後、離乳まで育児することが可能であった。また生仔の genotype 比はメンデルの法則で予測される比に従っていた(表 1)。*Gcg*^{gfp/gfp}の妊娠率は有意に低かった(図 1A)。また *Gcg*^{gfp/gfp}の出産仔数は有意に少なかった(図 1B)。在胎 9.5 日(G9.5)では生胎仔数に有意な差は見られなかったが、G15.5 では *Gcg*^{gfp/gfp}の生胎仔数は有意に少なかった(図 1C-E)。また *Gcg*^{gfp/gfp}では産後 36 時間以内に全仔を死亡させた母獣の割合が経産マウスでも有意に高く、対照群のような改善はみられなかった(図 1F)。*Gcg*^{gfp/gfp}の仔の出生時体重は有意に大きかったが、血糖値に有意な差は認められなかった(表 2)。出生体重の有意な差は *Gcg*^{gfp/gfp}の出産仔数が少ないことによると思われた。

妊娠中の血糖値と血清インスリン濃度を経時的に測定し比較した(図 2)。妊娠後期において対照群では血清インスリン濃度は上昇し、随時血糖は低下した。しかし *Gcg*^{gfp/gfp}でその変化は認められず、妊娠後期の *Gcg*^{gfp/gfp}の随時血糖は有意に高く、血清インスリン濃度は有意に低かった。空腹時も同様で妊娠後期の *Gcg*^{gfp/gfp}の血糖は有意に高く、血清インスリン濃度は有意に低かった。

経口糖負荷試験(図 3)では、非妊娠時の血糖値に有意な差は見られなかったが、

*Gcgsfp/gfp*ではインスリンの過剰分泌が見られた。しかし妊娠時に対照群ではインスリン抵抗性増大に伴う血糖値上昇がみられた一方、*Gcgsfp/gfp*では血糖値上昇は見られず、妊娠時はインスリンの過剰分泌がさらに増大した。

膵臓インスリン含有量と膵臓の β -cell massに明らかな差は見られず、*Gcgsfp/gfp*でも対照群と同様に妊娠時増大が見られた(図 4A および 4B)。Ki-67 陽性 β 細胞数も*Gcgsfp/gfp*においても妊娠時増大が認められた(図 4C および 4E)。また妊娠中のインスリン分泌能増大に関与するとされるセロトニンの発現も、*Gcgsfp/gfp*の膵島 β 細胞において対照群と同様に妊娠時増大が認められた(図 4D および 4F)。

【考察】

本研究において *Gcgsfp/gfp* は、満期で生存を出産後、離乳まで育児することが可能であった。このことからグルカゴンは妊娠に必須の要素ではないと考えられる。母体の低血糖が胎児の発育遅延を引き起こすことは知られており、*Gcgr*^{-/-}に見られる妊孕性異常は、グルカゴン作用欠損のみならず、GLP-1の発現亢進に起因した低血糖にも影響を受けていると考えられる。

また *Gcgsfp/gfp* では、妊娠時に対照群と同様に膵島 β 細胞の増殖が認められた。GLP-1はPancreas duodenal homeobox 1 (Pdx-1)の発現を誘導して β 細胞の増殖を刺激するが、妊娠中の β 細胞増殖に関与するプロラクチン(PRL)はPdx-1の発現を誘導しないとされる。またいくつかの論文でGLP-1とPRLはそれぞれ異なるシグナル伝達経路を介して β 細胞の増殖を刺激すると報告されている。今回の我々の結果はこれらに一致するもので、GLP-1は妊娠に伴う β 細胞の増殖には関与してないと考えられる。

しかし *Gcgsfp/gfp* では、妊娠に伴う膵島 β 細胞の増殖とインスリン産生量増大が起こっているにも関わらず、普通摂食下において妊娠後期にインスリン分泌不全と高い血糖値が見られた。糖負荷試験において *Gcgsfp/gfp* ではインスリンの過剰分泌が見られることから、*Gcgsfp/gfp* ではインスリン分泌の調節に異常が起こっていると考えられ、GLP-1は普通摂食下のような緩徐な血糖上昇に対応したインスリン分泌の調節に関与していると考えられる。

本研究において *Gcgsfp/gfp* は離乳まで育児することが可能ではあったが、低い妊娠率、妊娠後期の生存数の減少、少ない出産仔数といった異常が見られた。*Gcgr*^{-/-}においても妊娠後期に胎仔の半数が死亡し、*Gcgr*^{-/-}では胎盤のIGF-1、IGF-1レセプターとGLP-1の発現が有意に低下していると報告されている。IGF-1は胎盤の輸送機構に重要な役割を果たすとされる。*Gcgsfp/gfp*と*Gcgr*^{-/-}にはともにアミノ酸代謝異常が見られ、高アミノ酸血症を呈するが、コントロール不良の妊娠糖尿病でも高アミノ酸血症が見られ、児の予後に影響すると考えられている。グルカゴン遺伝子由来ペプチドは妊娠に必須の要素ではないが、その作用欠損を誘因とする母体内の変化は妊孕性に影響を及ぼすと考えられる。また出産後36時間以内に全仔を死亡させた母獣の割合が*Gcgsfp/gfp*では経産マウスにおいても有意に高かった。GLP-1レセプター欠損マウスでは記憶や学習能力の低下が見られることから、*Gcgsfp/gfp*におけるGLP-1欠損が母獣

の育児能力の習得を障害している可能性が示唆された。

【結論】

Glucagon は妊娠に必須の要素ではなく、GLP-1 は妊娠に伴うβ細胞の増殖に関与していない。しかしながら *Gcgs^{fp/fp}* では、低い妊娠率、少ない出産仔数、妊娠後期のインスリン分泌不全といった異常を認め、母体のグルカゴン遺伝子由来ペプチド欠損は妊孕性に大きな影響を与える。