

主論文の要旨

**Endogenous GIP ameliorates impairment of insulin secretion
in proglucagon-deficient mice under moderate beta cell damage
induced by streptozotocin**

プログルカゴン欠損マウスにおいて
ストレプトゾトシン誘発中等度 β 細胞傷害下では
内因性 GIP がインスリン分泌不全を改善する

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：有馬 寛 教授)

飯田 淳史

【緒言】

グルカゴンは主に肝臓に作用し糖新生を促す。糖尿病患者ではグルカゴン分泌が亢進しており、グルカゴン作用遮断が新規の糖尿病治療の標的として研究されている。グルカゴン作用欠損モデル動物においては、ストレプトゾトシン(STZ)誘発β細胞傷害の際にも、正常血糖値を維持することが報告されており、グルカゴンはβ細胞傷害時の高血糖に不可欠と考えられる。

Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)と glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、それぞれ腸管内分泌K細胞、L細胞から分泌され、膵β細胞に作用し血糖依存的にインスリン分泌を促すインクレチンホルモンであるが、膵外作用により血糖値改善効果を示すことも近年報告されている。グルカゴン作用欠損モデル動物では、グルカゴン遺伝子・プログルカゴンに由来するGLP-1の血中濃度が著明に増加することが知られており、STZ誘発β細胞傷害時の正常血糖維持にGIPやGLP-1作用が寄与している可能性があるが、GIPやGLP-1の役割は十分に解明されていない。

我々はプログルカゴン由来ペプチドであるグルカゴン・GLP-1を欠損する*Gcg*KOマウスを作成し、インスリン感受性が良好であることや、GIP依存性に早期のインスリン分泌が上昇することにより、耐糖能が非常に良好であることを報告してきた(Hayashi Y, *Mol Endocrinol* 2009; Fukami A, *Diabetes* 2013)。本研究では、*Gcg*KOマウスを用いて、STZ誘発β細胞傷害下の糖代謝に対するGIP、GLP-1の寄与に関する検討を行った。

【方法】

*Gcg*KOマウスまたは対照マウス(野生型マウス、*Gcg*ヘテロ)マウスに対して、16時間絶食後に200mg/kg(高用量STZ、以下hSTZと表記)もしくは生理食塩水(生食)を投与し、投与前、4、7、9日目に血糖値・血清インスリン値を測定し、9日目の膵インスリン含有量を測定した。

次に、*Gcg*KOマウスまたは対照マウスにSTZ 50mg/kg 5日間(中等量STZ、以下mSTZと表記)もしくは生食を投与し、5週目までの体重・随時血糖値を測定し、5週目の血清インスリン値、血清GIP値を測定した。経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)、腹腔内ブドウ糖負荷試験(IPGTT)を行い、血糖値、血清インスリン値を測定した。

また、*Gcg*KOマウスにおけるGIP作用の寄与を検討する目的でGIP作用を欠損するGIP受容体欠損マウスとの交配マウス(*Gcg-Gipr* DKOマウス、以下DKOマウス)を作成した。*Gipr*KOマウス、*Gcg*KOマウス、DKOマウスにmSTZを投与し、対照として*Gipr*KOマウスに生食を投与した。5週目までの体重・随時血糖値を測定し、3週にOGTT、4週にIPGTTを行い、5週目の血清インスリン値を測定した。

さらに、GIPやGLP-1作用を増強するためにmSTZ実験開始1週間前から給水内にGIP・GLP-1の分解を阻害するDPP-4阻害薬(anagliptin, 0.625mg/ml)を混合して投与し、9週目までの体重・随時血糖値を測定、6週にIPGTT、7週にOGTTを行い、9週目の膵インスリン含有量、β細胞面積、活性型caspase-3面積の解析を行った。

統計学的解析は、GraphPad Prism 6 ソフトウェアを用い、ANOVA もしくは Student の t 検定により行った。

【結果】

対照マウス、*GcgKO* マウスともに、hSTZ 投与により、血清インスリン値の著明な低下とともに高血糖を呈した(Fig. 1a,b)。膵インスリン含量は対照マウス、*GcgKO* マウスともに著明に低下していた(Fig. 1c)。

mSTZ 投与後、対照マウスでは、随時インスリン値の低下とともに高血糖を示したが、*GcgKO* マウスでは、随時インスリン値の低下は認めず、高血糖とならなかった(Fig. 2a)。血糖応答性インスリン分泌は、対照マウスではほとんど消失したが、*GcgKO* マウスでは軽度の減弱のみであった(Fig. 2b)。血清 GIP 濃度は対照マウスと比較し、*GcgKO* マウスで有意な上昇を認めた(Fig. 2c)。

mSTZ 投与によって、*GiprKO* マウスでは随時血清インスリン値が低下し随時血糖値が上昇したが、*GcgKO* マウス、DKO マウスでは随時血糖値の上昇は認められなかった(Fig. 3a,b)。糖負荷試験施行時、*GcgKO* マウスでは mSTZ 投与後も血糖応答性インスリン分泌が残存していたが、DKO マウスでは完全に消失した(Fig. 3c-f)。

対照マウス、*GcgKO* マウスともに、DPP-4 阻害薬投与による mSTZ 処置後の随時血糖値は変化を認めなかった(Fig. 4a)。しかし、*GcgKO* マウスでは GLP-1 を欠損するにもかかわらず、DPP-4 阻害薬投与により、mSTZ 処置後も糖負荷試験時の血糖応答性インスリン分泌が増強し(Fig. 4f, j)、耐糖能(Fig. 4e, i)が改善した。一方で、mSTZ 処置後の対照マウスでは、DPP-4 阻害薬を投与しても血糖応答性のインスリン分泌や耐糖能の改善は認めなかった(Fig. 4c-d, g-h)。膵インスリン含有量は、対照マウス、*GcgKO* マウスともに同程度(約 18~19%)の減少が認められた(Fig. 4b)。mSTZ 投与後の *GcgKO* マウスにおいて、DPP-4 阻害薬投与によっても、アポトーシス細胞を反映する活性型 caspase-3 陽性細胞の有意な減少を認めず(Fig. 5a, b)、 β 細胞面積の有意な増加も認めなかった(Fig. 5c, d)。

【考察】

グルカゴン受容体欠損マウスにおいて、STZ 処置後も高血糖を呈さないことが報告され、高グルカゴン血症が血糖上昇に非常に重要な役割を果たしていると考えられた。しかし、グルカゴンと GLP-1 の両者を欠損する *GcgKO* マウスでは、hSTZ 処置により高血糖を呈した。この差異は GLP-1 作用の有無によると考えられる。また、mSTZ 処置により対照マウスは高血糖を呈したが、*GcgKO* マウスは正常血糖を維持した。*GcgKO* マウスはインスリン感受性が良好で、mSTZ 処置の前後で血清インスリン値は有意差を認めないことから、インスリンが血糖値の維持に最も重要な役割を担っており、グルカゴン作用の欠損は、インスリン需要を減少させることにより膵 β 細胞傷害時の正常血糖値維持に寄与していることが示された。

mSTZ 処置後、*GcgKO* マウスでは糖負荷時のインスリン分泌がある程度残存してい

たが、GIP 作用を欠損すると完全に消失した。DPP-4 阻害薬によるインスリン分泌増強効果は GIP および GLP-1 のみに依存することが報告されている。mSTZ 投与後の *GcgKO* マウスにおいては、DPP-4 阻害薬によるインスリン分泌増強効果を認めた。以上から、膵β細胞傷害時においても正常血糖値を示す *GcgKO* マウスにおいては、GIP がインスリン分泌増強を介して耐糖能改善効果を示すことが明らかとなった。一方、DPP-4 阻害薬投与では、膵島のアポトーシスを起こした細胞数の有意な減少は見られなかったことから、*GcgKO* マウスにおいて GIP はβ細胞保護にはほとんど寄与していないと考えられる。

近年、GIP や GLP-1 は、腸内分泌細胞のみならず、膵島からも分泌されていることが報告されている。mSTZ 処置後の *GcgKO* マウスにおいては、腸管の GIP 分泌が増加する OGTT のみならず、腸管の GIP 分泌には影響を与えない IPGTT においても、対照マウスでは認められなかった耐糖能の改善を認めたことから、膵島および腸管由来の GIP が *GcgKO* マウスにおいては膵β傷害時にも血糖恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

【結語】

STZ 誘発β細胞傷害下においても、GIP は、β細胞保護効果によらずインスリン分泌を促進し、耐糖能を改善する効果がある。