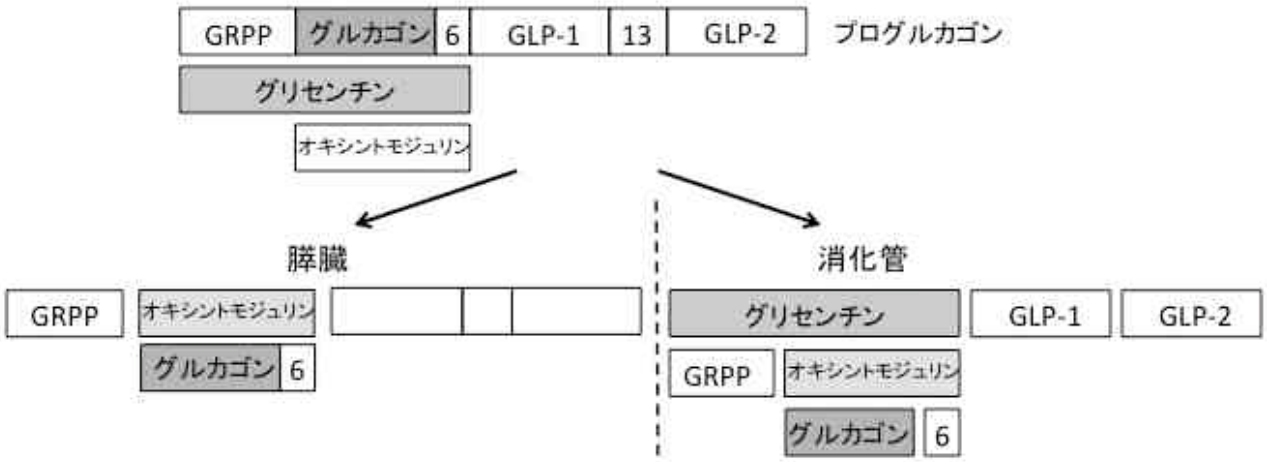
72　消化管グルカゴン関連ペプチドと糖尿病、肥満との関連	北村　忠弘

【目的】糖尿病領域において、DPP4 阻害薬や GLP-1 受容体作動薬などの臨床応用に伴って、GLP-1 とグルカゴンに注目が集まっているが、プログルカゴンからはグルカゴン、GLP-1 以外にも複数のペプチドホルモン（図参照）が産生されており、これらがグルカゴンの正確な測定を困難にさせてきた。そこで、筆者らが開発した質量分析を用いたグルカゴン測定法（LC-MS/MS）及び、サンドイッチ ELISA で種々の病態におけるグルカゴン濃度を再評価した。また、グルカゴン関連ペプチドが消化管のどの細胞から分泌されているかについても未解明であり、組織学的に検討する必要がある。

【方法】まず、LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA の測定値に良好な相関が認められるか評価した。次に、これらの測定系を用いて、健常者や糖尿病患者で食後の血中グルカゴン濃度変化を解析した。また、LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA で測定値に解離が認められる症例も検討した。オキシントモジュリン測定系の開発、並びに種々のグルカゴン関連ペプチド分泌細胞の組織学的解析も行った。

【結果】食後の血中グルカゴン濃度の変化は従来考えられていたものとは異なり、タンパク質成分によって上昇することが明らかとなった。また、糖負荷後はグルカゴン濃度が低下したが、2 型糖尿病の病態ではこの低下が遅れることも判明した。一方、膵臓摘出では現行のサンドイッチ ELISA と LC-MS/MS の測定値に大きな解離が認められ、恐らくグリセンチンによる交叉反応の可能性が考えられたことから、さらに高特異性のグルカゴンサンドイッチ ELISA の開発が必要と考えられた。また、オキシントモジュリンに関しても、引き続き特異的な測定系の開発途中である。一方、グルカゴンに関連するペプチドホルモンが消化管のどの細胞から分泌されているかについても未解明であり、これらのペプチドに対する様々な抗体を用いた組織免疫染色に関しても現在検討中である。今後の本研究の継続によって、糖尿病や肥満に対する新しい治療標的の同定、並びに新しい治療法の開発につながることを期待している。

膵臓と消化管におけるプログルカゴンから産生されると予想されるホルモン



72. 消化管グルカゴン関連ペプチドと糖尿病、肥満との関連

北村　忠弘

群馬大学 生体調節研究所 代謝シグナル解析分野

Key words：グルカゴン，膵 α 細胞，糖尿病，LC-MS/MS，サンドイッチ ELISA

緒　言

現在、国内には糖尿病患者はその予備軍（境界型）も含めると約 2000 万人、肥満者も約 2300 万人いると推定されており、これらの病態が心筋梗塞、脳卒中、さらには癌といった致死的疾患のリスクも高めていることを考えると、その早急な対策が必要と考えられる。

糖尿病領域において、DPP4 阻害薬や GLP-1 受容体作動薬などの臨床応用に伴って、数年前から GLP-1 とグルカゴンに注目が集まっているが、プログルカゴンからはグルカゴン、GLP-1 以外にも複数のペプチドホルモン（グルカゴン関連ペプチドと呼ばれている）が産生されている。特に消化管においてはプログルカゴンからグリセンチンやオキシントモジュリンが産生されており、その産生細胞は消化管 L 細胞だと考えられてきた。しかしながら、膵臓でもオキシントモジュリンが、胃を中心とした消化管からもグルカゴンが分泌されていることが確認されており、これらのグルカゴン関連ペプチドを産生、分泌する細胞についてはほとんど未解明である。また、グリセンチンとオキシントモジュリンの生理作用としては、膵液・胃液分泌抑制、食欲抑制があり、これらのホルモンと食事性肥満との関連は興味深い。一方、糖尿病病態では膵 α 細胞から GLP-1 も分泌されることが明らかとなっており［1］、2 型糖尿病や肥満といった糖・エネルギー代謝異常の状態では消化管のグルカゴン関連ペプチド産生細胞の数、機能、並びに、これらのホルモンの血中濃度に変化が生じている可能性がある。さらに、血中プロインスリン濃度が糖尿病の程度と相関することが知られているが、酵素分解され残ったプログルカゴンが血中に存在し、糖尿病の病態と関連しているかどうかは全く不明である。

そこで本研究課題では、種々のグルカゴン関連ペプチドを特異的に測定できるサンドイッチ ELISA 法を確立し、食事や糖負荷後のこれらのホルモンの血中濃度変動を調査することを目的とした。また、同じ抗体の組み合わせで組織免疫 2 重染色を行い、消化管におけるこれらのペプチドホルモン産生細胞を同定し、糖尿病や肥満モデルマウスを解析することで、これらのグルカゴン関連ペプチドと病態との関連を明らかにすることを目指した。本研究課題の成果によっては、糖尿病や肥満に対する新しい治療標的の同定、並びに新しい治療法の開発につながる可能性が期待される。

方　法

筆者らは最近質量分析を用いたグルカゴン測定系を開発し、グルカゴンの N 末と C 末断端認識抗体を用いたグルカゴン・サンドイッチ ELISA 法を用いた測定系との比較検討を行った。さらに、グルカゴン・サンドイッチ ELISA の原理に準じて、グリセンチン、オキシントモジュリン、プログルカゴンといった種々のグルカゴン関連ペプチドに対する特異抗体を作製し、それらを組み合わせて種々のグルカゴン関連ペプチドを特異的に測定できる系を確立することを目指した。本研究で使用予定のグルカゴン関連ペプチドに対する抗体を図 1 に示す。このうち、①〜③のマウスモノクローナル抗体については既に作製済みである。2 重免疫染色に使用することを考えて、その他の抗体はニワトリモノクローナル抗体を作製している。ニワトリ抗体の主要な抗体は IgY であり、哺乳類の IgG とほとんど交叉しない。また、これらの抗体を組み合わせて組織免疫２重染色を行い、消化管におけるグルカゴン関連ペプチド産生細胞を特異的に同定することができるはずである。次に、食事や糖負荷前後での血中濃度の変化や、高脂肪食飼育による発現細胞の変化などを調査した。さらに、遺伝性糖尿病モデル（*db/db*）、肥満モデル（*ob/ob*）、食事誘導性肥満・糖尿病モデル（高脂

肪、高ショ糖食飼育)、薬剤誘導性糖尿病モデル（ストレプトゾトシン投与）マウスにおける各種グルカゴン関連ペプチドの血中濃度測定、並びに免疫２重染色による産生細胞の数や分布の解析を現在も引き続き行っている。



図1. サンドイッチ ELISA 法に使用する各種グルカゴン関連ペプチド抗体と、それにより測定可能なペプチドホルモン
種々のグルカゴン関連ペプチドに対する特異抗体を作製し、それらを組み合わせて種々のグルカゴン関連ペプチドを特異的に測定できる系を確立できる。

結果および考察

1. LC-MS/MS を用いた新規グルカゴン測定法と各種イムノアッセイを比較した

著者らはイムノアッセイの欠点である抗体の交叉反応性を克服すべく、質量分析を用いたグルカゴン測定系（LC-MS/MS）を開発した [2]。しかしながら、この方法は測定時間とコストの面で多検体の測定には向いておらず、汎用性に乏しい。そこで、この測定系と市販のイムノアッセイとの相関を解析した所、図２に示すように、従来の競合法 RIA（図２右）に比べ、サンドイッチ ELISA（図２左）で比較的良好な相関を得た。ただし、完全に一致するレベルでないのは、先述したグルカゴン関連ペプチドとの交叉反応が原因と考えている。現在、著者らはサンドイッチ ELISA を用いた測定で、グルカゴンを糖尿病の診断に応用できないかを、まず糖尿病モデルマウスを用いて検討中である。結果については、まとまり次第報告する。

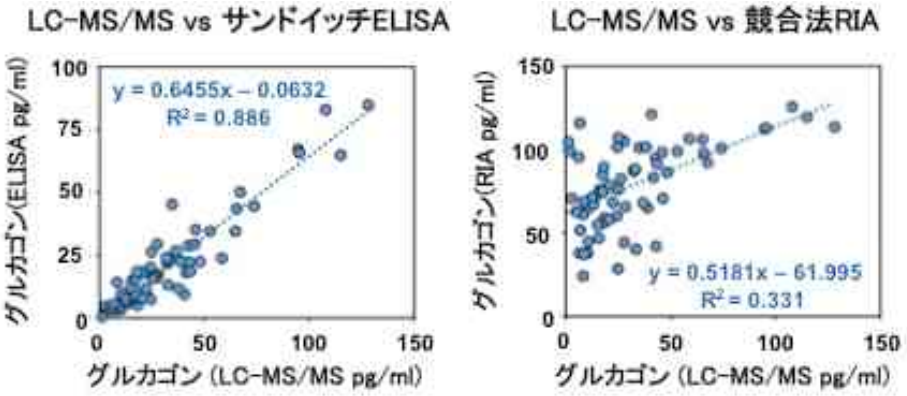


図2. LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA、競合法 RIA とのグルカゴン測定値の比較結果
LC-MS/MS を用いた正確なグルカゴン測定系と新しいイムノアッセイであるサンドイッチ ELISA、及び従来の競合法 RIA との測定結果を比較すると、サンドイッチ ELISA でより良好な相関が認められた。

2. LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA で測定値が大きく解離する症例を見出した

これまでに種々の病態におけるグルカゴン値の変動を LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA の両方で評価してきた所、膵切除患者の検体では LC-MS/MS で測定感度以下のグルカゴン値はサンドイッチ ELISA では糖負荷後に大きく上昇しており、この上昇はサンドイッチ ELISA が交叉反応したグルカゴン関連ペプチドと考えられる。同様の結果は肥満治療目的に胃スリーブ手術を受けた患者の検体においても認められた。これらの結果は、いずれかのグルカゴン関連ペプチドが病態に反応して変動している可能性を示唆した。従って、今後、より抗体の反応特異性を増したサンドイッチ ELISA 系の開発が必要と考えられた。

3. グルカゴン血中濃度の変動は栄養素によっても異なる

著者らが行ってきた解析では、図 3 に示すように、血中グルカゴン濃度の変動は糖、タンパク、脂質の各種栄養素負荷で全く異なっており、種々の病態とグルカゴン関連ペプチドの関連を検討する際にも、各種の栄養素負荷試験を行う必要性が示唆された。この成果は今後の食事によるグルカゴン変動、並びに糖尿病や肥満といった生活習慣病とグルカゴンの関連を検討する上で、非常に重要な知見と考えている。

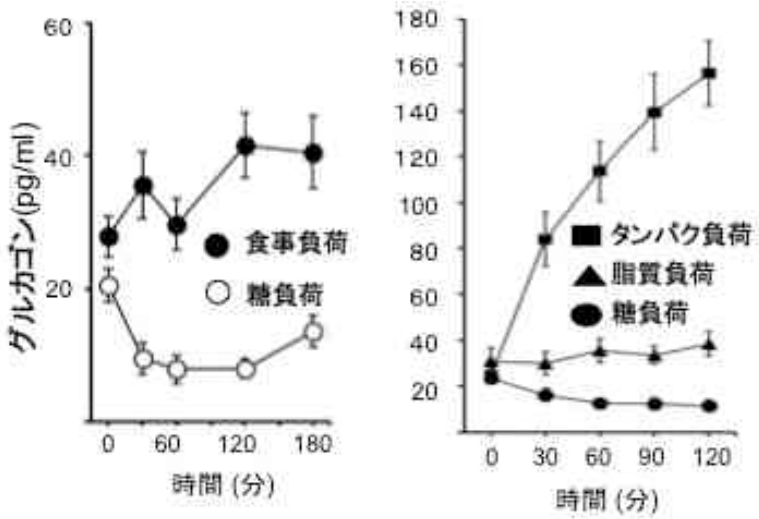


図 3. 各種栄養素負荷による血中グルカゴン濃度の変動

血中グルカゴン濃度の変動は糖、タンパク、脂質の各種栄養素負荷で全く異なっていることが明らかとなった。

4. 今後の継続課題

今回の研究成果はグルカゴンに集中したが、今後はオキシントモジュリンに関しても、引き続き特異的な測定系の開発を行う予定である。一方、グルカゴンに関連するペプチドホルモンに対する様々な抗体を用いた組織免疫染色に関しても現在、抗体を作成の上、順次検討を重ねている。今後の本研究の継続によって、糖尿病や肥満に対する新しい診断法の開発、並びに治療標的の同定につながることを期待している。

共同研究者･謝辞

本研究は群馬大学生体調節研究所、代謝シグナル解析分野の小林雅樹の協力により行いました。最後になりましたが、本研究課題に対して助成をして頂きました上原記念生命科学財団に深謝致します。

文　献

1) Nie Y, Nakashima M, Brubaker PL, Li QL, Perfetti R, Jansen E, Zambre Y, Pipeleers D. Regulation of pancreatic PC1 and PC2 associated with increased glucagon-like peptide 1 in diabetic rats. J Clin Invest 2000 Apr; 105(7): 955-65. PMID: 10749575 DOI: 10.1172/JCI7456.

2) Miyachi A, Kobayashi M, Mieno E, Goto M, Furusawa K, Inagaki T, Kitamura T. Accurate analytical method for human plasma glucagon levels using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry: Comparison with commercially available immunoassays. Anal Bioanal Chem 2017 Oct; 409(25): 5911-5918. Epub 2017 Aug 12. PMID: 28801845　DOI: 10.1007/s00216-017-0534-0.