

7) ヒトにおける新規バイオアッセイを用いた活性型インクレチン (GIP, GLP-1) 血中濃度の測定

研究代表者 藤田 征弘

1. はじめに

インクレチンである GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) と GLP-1 (glucagon-like peptide-1) は消化管ホルモンで、食事由来の刺激により門脈血中に分泌され、膵臓ランゲルハンス島のβ細胞からそれぞれ血糖依存性にインスリンの分泌を促進する。GIP を分泌する細胞は K 細胞と呼ばれ主に十二指腸、空腸を中心とした小腸上部に局在するのに対し、GLP-1 を分泌する細胞は L 細胞とよばれ主に小腸下部に局在する。活性型 GIP と活性型 GLP-1 はそれぞれ膵臓ランゲルハンス島のβ細胞の膜上に存在するそれぞれの7回膜貫通型 G 蛋白質共役受容体に結合する。GIP 受容体および GLP-1 受容体は、3 量体 GTP 結合蛋白 Gs α β γ と共役してアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase (AC)) を活性化させ細胞内 cAMP 濃度を上昇させる。上昇した細胞内 cAMP は、主に PKA (protein kinase A) 依存性の経路と非依存性の経路 (おも epac 2 を介した経路) でインスリン分泌を促進させる。AC を阻害すると、GIP や GLP-1 による cAMP 産生は抑制され、糖によるインスリン分泌促進効果は消失する。DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) は GIP や GLP-1 の N 末端のジペプチドを遊離し、インスリン分泌を誘発しない非活性型にする。現在臨床では、DPP-4 抵抗性 GLP-1 受容体作動薬 (exendin-4, liraglutide) や内因性の活性型インクレチン濃度を上昇させる DPP-4 阻害薬が用いられている。

2. 活性型インクレチン測定の問題点

GIP や GLP-1 はアミノ酸配列の相同性からグルカゴン・セクレチン・VIP スーパーファミリーに分類されている。特に N 末端側ではペプチド間で非常に高い相同性をしめす。実際、多くの抗体がそれぞれのペプチドと交差性を認めている。比較的 C 末端で抗体を作成するとそれぞれのペプチドに対して特異度が高くなる。しかしながら、活性型 GIP (GIP<sub>1-42</sub>) と非活性型 (GIP<sub>3-42</sub>) を識別しようとする N 末端に対する抗体が必要で、ジペプチド (Tyr-Ala) の有無を識別する必要がある。さらに、筆者等は GIP に新しい活性型の short-form GIP (GIP<sub>1-30</sub>) が、消化管と膵α

細胞から分泌されることを報告している<sup>1) 2)</sup>。一方、活性型 GLP-1 には GLP-1<sub>7-36NH2</sub> と GLP-1<sub>7-37</sub> の2つの form が存在し、GIP と同様に、N 末端のジペプチド (His-Ala) の有無を識別する必要があり、抗体の特性にかなり左右される。したがって、抗体を用いた RIA または ELISA 法での活性型インクレチンの測定には、困難が伴うことが知られている。ちなみに、GLP-1 受容体には、消化管ホルモンでグルカゴン関連ペプチドの oxyntomodulin も結合しインスリン分泌に関わると言われている。

3. バイオアッセイ法による測定のしくみ

測定に必要な細胞は、共同研究者である University of British Columbia, Kieffer 教授より供与を受けた。測定の原理を図 1 に示す。本来、GIP 受容体または GLP-1 受容体の発現していない HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) にそれぞれの受容体の cDNA を含んだプラスミドをトランスフェクションし、さらに CRE-Luc を含んだプラスミドをダブルトランスフェクションし、neomycin と hygromycin を含んだ培養液で選択培養して HEK293-GIPR-Luc と HEK293-hGLP1R-Luc を作製している。測定の際、培養液中の活性型 GIP や GLP-1 は受容体を介して、細胞内の cAMP を増加させる。なお、GLP-1 測定には増幅のため cAMP の分解を防ぐため、PDE 阻害剤の IBMX を添加している。細胞内の cAMP は CRE に結合し、Luciferase 酵素を誘導する。最終的に、Bright-Glo キットにて細胞の Luciferase 活性を測定して、標準曲線から GIP または GLP-1 の濃度を測定する。

4. 実際の測定

正常健康人に 75g 経口ブドウ糖負荷試験を行い、血

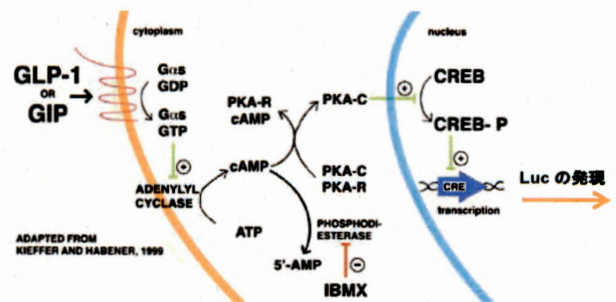
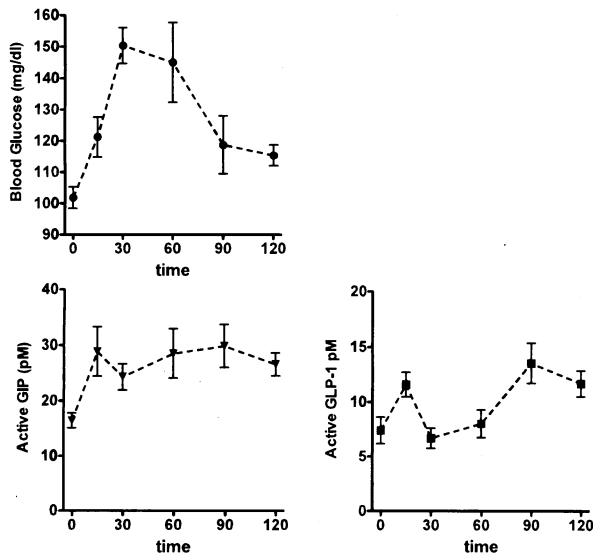


図 1 活性型 GIP と活性型 GLP-1 のバイオアッセイのしくみ



Gastroenterology. 2010 May; 138 (5) : 1966-75.

3) Lee S, Yabe D, Nohtomi K, et al. Endocr J. 2010; 57(2) : 119-26.

図2 健常者における75g経口ブドウ糖（トラーランG）負荷時の血糖値（上段）、活性型GIP（下段左）、活性型GLP-1（C）

糖値と活性型GIPとGLP-1を測定した（図2）。対象は、男性6名、年齢 $35.5 \pm 2.6$ 歳、BMI $23.4 \pm 2.6$ 、HbA1c（IFCC値） $5.08 \pm 0.14\%$ であった。

興味深いことに、GIP、GLP-1ともに負荷後15分にピークを認め、一度低下した後になだらかな上昇を認めた。これは、血糖値がピークに至る前であり、小腸でブドウ糖が感知されインクレチンが分泌されていることを反映していると考えられた。活性型GIPはあまり他で測定されていないため比較することはできないが、我々の活性型GLP-1の値はHolstらがRIAで測定している測定値より低く、一方でLeeら<sup>3)</sup>が日本人健常者で測定したELISAのデータに近かった。

今後、総GIP、総GLP-1、インスリン、グルカゴンを測定しさらなる検討を行う予定である。

## 5. 謝辞

本研究には、University of British Columbia、Kieffer教授より細胞の供与を受けた。また、大学院生の竹田安孝先生、柳町剛司先生に測定およびヒトでの検討に貢献して頂いた。ここに感謝します。

## 文献

- 1) Fujita Y, Asadi A, Yang GK, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010 May; 298(5) : G608-14.
- 2) Fujita Y, Wideman RD, Asadi A, et al.