

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	柳町 剛司
学位論文題目			
Pancreatic glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) (1-30) expression is upregulated in diabetes and PEGylated GIP(1-30) can suppress the progression of low-dose-STZ-induced hyperglycaemia in mice			
(糖尿病で膵GIP(1-30)の発現は上昇し、PEG化したGIP(1-30)は 低用量STZ誘発性糖尿病モデルマウスの高血糖の進展を抑制する)			
共著者名			
藤田 征弘, 竹田 安孝, 本庄 潤, Kuralay K. Atageldiyeva, 滝山 由美, 安孫子 亜津子, 牧野 雄一, Timothy J. Kieffer, 羽田 勝計			
Diabetologia <i>in press</i>			
研究目的			
GIPは小腸のK細胞から分泌されるインクレチンであり、血糖依存性に膵β細胞からのインスリン分泌を調節する。GIPは分泌後直ちにdipeptidylpeptidase-4(DPP-4)によって分解され、多くが不活化型になる。GIPは小腸のK細胞からはGIP(1-42)として分泌されるが、膵島にもGIPの遺伝子が発現しており、膵α細胞からC末端を欠失したshort-form GIP(1-30)が分泌されている(引用文献1)。この膵島から分泌されるGIP(1-30)はGIP(1-42)とほぼ同等のインスリン分泌能を有していることが報告されているが、糖尿病状態で発現がどのように変化しているかは不明であり、本検討ではまず膵島でのGIP(1-30)の発現が糖尿病状態でどのように変化しているのかを明らかにする。次に、持効型short-form GIPアナログを作成し、それがlow-dose STZ(LD-STZ)糖尿病マウスにおいて高血糖の進展を抑制し得るか、さらに膵島の形態や機能を改善し得るか検討する。一方GIPは食事誘導性の肥満に寄与する可能性が示唆されているが、外因性に投与したshort-form GIPアナログが肥満を誘発するかは明らかではない。そこで高脂肪食負荷マウスに持効型short-form GIPアナログを投与し、体重や耐糖能に及ぼす影響を検討する。			

(1)

※用紙の大きさは、A4判とし23×17cmの枠内におさめ、パソコン等で印字すること。

※用紙は、各自で作成すること。

材 料 ・ 方 法

正常マウス及び様々な糖尿病モデルマウス(Akita、db/db、NOD、LD-STZ)の膵島でのGIPの発現をインスリン、グルカゴンとの3重蛍光免疫組織染色で検討した。

GIP(1-30)のN末端から2番目のアミノ酸であるAlaをD-Alaに置換したDPP-4抵抗性GIP(1-30)を作製し、更にそのC末端に40kDaのPEGを付加したアナログ ([D-Ala²]GIP(1-30)-PEG) を合成した。

GIP及びグルカゴンの血中濃度はHEK293細胞にヒトGIPもしくはグルカゴンレセプターとCREB-lucをco-transfectした細胞を作製し、cAMP濃度依存性に増加するluciferaseの発光強度から算出した。

C57BL/6マウスで十分な血糖降下作用を示すGIPの至適血中濃度の検討と[D-Ala²]GIP(1-30)-PEG単回皮下注射時のGIPの血中濃度をモニターした。[D-Ala²]GIP(1-30)-PEGを3日毎にDay33までマウスに皮下投与した(初期用量100pmol/animal、維持用量70pmol/animal)。LD-STZマウスはDay1から5日間連続で50mg/kgのSTZを腹腔内に投与し、作製した。non-STZ、non-STZ+GIP、STZ、STZ+GIPの4群に分け、体重、随時血糖、HbA1cを測定し、腹腔内ブドウ糖負荷試験(IPGTT)、IPGTT時のインスリン・グルカゴン測定(0分値及び10分値)、膵のインスリン・グルカゴンの免疫組織学的検討を行い、さらにβ細胞のアポトーシスと増殖をそれぞれTUNEL染色とPCNA染色で評価した。更に高脂肪食(脂肪60%、炭水化物20%、たんぱく質20%)負荷マウスに[D-Ala²]GIP(1-30)-PEGを同様の条件で投与し、体重や耐糖能を検討した。

成 績

各糖尿病モデルマウス(Akita、db/db、NOD、LD-STZ)の膵島でインスリン陽性細胞面積は正常マウスに比較して減少し、GIPはグルカゴンと共に陽性細胞の発現面積が著明に増加していた。経口糖尿病薬であるDPP-4阻害薬投与はLD-STZマウスのGIP/グルカゴン陽性細胞面積を有意に減少させた。

単回皮下注射による[D-Ala²]GIP(1-30)-PEGの半減期は約60時間であった。7000pmol/animalで投与した際には7日目の時点でも非投与群よりGIPの血中濃度は高値であり、これらより作製したアナログの活性が長時間持続することが確認できた。

[D-Ala²]GIP(1-30)-PEGの長期投与は、STZ、non-STZ共に体重に影響を与えず、摂餌量においても有意差は認めなかった。一方、[D-Ala²]GIP(1-30)-PEGの長期投与はSTZ群の随時血糖、HbA1cを有意に改善し(HbA1c: STZ+GIP: 4.9±0.2 vs STZ: 5.7±0.4 %, p<0.05)、IPGTTにおいても耐糖能の改善を認めた。更に空腹時のインスリン分泌を有意に改善し、空腹時及び糖負荷後のグルカゴン分泌を有意に抑制した。無治療STZ群の膵島組織像ではβ細胞面積の減少とα細胞面積の増加を認めたが、[D-Ala²]GIP(1-30)-PEG投与によってその形態異常は有意に改善した。更にGIP投与群でβ細胞の増殖に関しては有意差を認めなかったが、β細胞のアポトーシスは軽減していた。

GIPによるグルカゴン分泌刺激作用が報告されているため、ラットの単離膵島を用いて[D-Ala²]GIP(1-30)-PEG がグルカゴン分泌に及ぼす影響を評価したが、low glucose (3mM) 条件下ではグルカゴン分泌刺激作用が認められたが、high glucose (20mM)条件下では対照群と同様にグルカゴン分泌が刺激されなかった。

高脂肪食負荷マウスにおいて[D-Ala²]GIP(1-30)-PEG投与は体重増加を誘導せず、逆に非投与群に比べ投与群で体重増加(Δ BW Day 0-30)は有意に抑制された。一方、摂餌量及び耐糖能に有意差は認められなかった。

考 案

膵島のGIPの発現は各糖尿病モデルマウスで上昇していたが、糖尿病では膵 β 細胞でのGIP受容体の発現が減少し、その結果GIPのインスリン分泌能が減弱していると報告されており、糖尿病では代償的に膵島のGIP(1-30)の発現が増加していると考えられた。

今回作成した[D-Ala²]GIP(1-30)-PEGは長時間活性を有しており、少ない投与回数で有効な血中濃度を維持できることが示された。[D-Ala²]GIP(1-30)の連日投与やGIPを過剰発現させたヘテロTgマウスにおいても耐糖能は改善を示したが、それらよりGIPの血中濃度が高いホモTgマウスにおいては耐糖能の改善は認められず、慢性的に高濃度のGIPに暴露されることでGIPに対する抵抗性が生じることが報告されている。よって[D-Ala²]GIP(1-30)-PEGの至適投与量に関してより詳細な検討が必要と考えられる。

short-form GIP投与は β 細胞のアポトーシスを抑制することで β 細胞量を維持し基礎インスリン分泌を担保することで、間接的に α 細胞の増殖及びグルカゴン分泌を抑制することが考えられた。それらが、LD-STZマウスの耐糖能改善に寄与したと推測される。

short-form GIPの脂肪細胞に対する作用はGIP(1-42)と異なり、体重増加に寄与せず、耐糖能を悪化させないことが示唆された。

結 論

PEG化したshort-form GIPアナログは体重増加を誘導せず、low-dose STZ糖尿病マウスにおいて糖尿病の進行を抑制し得ることが示唆された。

引 用 文 献

(重要な引用文献3編以内を掲載すること。)




1. Fujita Y, Wideman RD, Asadi A et al. (2010) Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Is Expressed in Pancreatic Islet α -Cells and Promotes Insulin Secretion. *Gastroenterology* 138:1966-1975.

参 考 論 文

(参考論文5編以内を掲載すること。)

1. Takeda Y, Fujita Y, Honjo J, Yanagimachi T, Sakagami H, Takiyama Y, Makino Y, Abiko A, Kieffer TJ, Haneda M (2012) Reduction of both beta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice. *Diabetologia* 55:404-412
2. Fujita Y, Yanagimachi T, Takeda Y, Honjo J, Takiyama Y, Abiko A, Makino Y, Haneda M (2015) An alternative form of GIP and its physiology. *Journal of Diabetes Investigation* *in press*
3. Fujita Y, Asadi A, Yang GK, Kwok YN, Kieffer TJ (2010) Differential processing of pro-glucose-dependent insulinotropic polypeptide in gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298:G608-G614
4. Kim SJ, Nian C, Karunakaran S, Clee SM, Isales CM, McIntosh CH (2012) GIP-Overexpressing Mice Demonstrate Reduced Diet-Induced Obesity and Steatosis, and Improved Glucose Homeostasis. *PLoS ONE* 7:e40156
5. Widenmaier SB, Kim SJ, Yang GK et al. (2010) A GIP Receptor Agonist Exhibits β -Cell Anti-Apoptotic Actions in Rat Models of Diabetes Resulting in Improved β -Cell Function and Glycemic Control. *PLoS ONE* 5:e9590

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	柳町 剛司
<p>審査委員長 奥村利勝 </p> <p>審査委員 長谷部直幸 </p> <p>審査委員 谷口隆信 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Pancreatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) (1-30) expression is upregulated in diabetes and PEGylated GIP(1-30) can suppress the progression of low-dose-STZ-induced hyperglycaemia in mice</p> <p>(糖尿病で膵 GIP(1-30)の発現は上昇し、PEG 化した GIP(1-30)は低用量 STZ 誘発性糖尿病モデルマウスの高血糖の進展を抑制する)</p>			

GIPは小腸のK細胞からはGIP(1-42)として分泌されるが、膵α細胞からC末端を欠失したshort-form GIP(1-30)が分泌されている。この膵島から分泌されるGIP(1-30)はGIP(1-42)とほぼ同等のインスリン分泌能を有しているが、糖尿病の病態への関与は不明であり、申請者はこの点を明らかにするために持効型short-form GIPアナログ([D-Ala²]GIP(1-30)-PEG)を作成し、2型糖尿病モデルマウスなどへの効果を検討した。2型糖尿病モデルマウスに対してGIP(1-30)持効性アナログを投与し、随時血糖、HbA1cの改善、IPGTTにおいても耐糖能の改善、空腹時のインスリン分泌改善、空腹時及び糖負荷後のグルカゴン分泌抑制が観察された。すなわち、GIPアナログの投与は糖尿病の進行を抑制することを示した。GIPアナログ投与はβ細胞のアポトーシスを抑制することでβ細胞量を維持し基礎インスリン分泌を担保することで、間接的にα細胞の増殖及びグルカゴン分泌を抑制し耐糖能改善に関与することも示唆された。同時に摂食量や体重には影響しないこと、さらに高脂肪食を負荷したマウスにおいてGIPアナログは体重の増加を抑制し、GIP(1-42)で報告されている脂肪蓄積作用が少ないものであることを実験的に証明している。これらの結果から、申請者が作成した持効性GIPアナログは、肥満をもたらすことのない糖尿病治療薬としての可能性を示すものであり、臨床的な意義も極めて高い。本論文は既にDiabetologia誌に掲載されており、当該分野の専門家からも高い評価がなされている。各委員による査問にも的確な解答が得られ、関連領域の知識も十分で、学位論文にふさわしいと判断した。