

第92回 日本内分泌学会学術総会 モーニングセミナー1

グルカゴン測定の意味と 新しいグルカゴン・バイオロジー

■ 2019年5月11日

■ 仙台国際センター



演者

林 良敬先生

名古屋大学環境医学研究所
内分泌代謝分野 教授

座長

赤水 尚史先生

和歌山県立医科大学
内科学第一講座 教授
内分泌学会 代表理事

座長からのメッセージ

従来、グルカゴンの作用は血糖上昇に大きく関与しているとされてきました。これは、グルカゴンの作用や産生の障害モデルでは血糖値が低下するからでした。さらにこのコンセプトに基づいて、Unger博士らはグルカゴン分泌亢進が血糖上昇の主な原因であり、グルカゴン分泌抑制が糖尿病治療で重要であるという説を提唱されました。一方、林良敬先生のグループは、グルカゴンとGLP-1がプログルカゴンを共通の前駆体として産生されるという点に着目し、グルカゴンとGLP-1を両方も欠損するグルカゴン遺伝子欠損マウスを作製されました。すると、血糖値は下がらず正常であり、グルカゴン欠損単独では血糖値が下がらず、そこにGLP-1産生が加わってはじめて血糖値が下がることを示されました。さらに、グルカゴンには血糖コントロール以外に重要な生理作用があるのではないかという仮説を立てられ、前述のグルカゴン遺伝子欠損マウスを用いてグルカゴンがアミノ酸代謝の恒常性維持に不可欠であることを見事に示されました。本講演では、グルカゴンの歴史に始まり、グルカゴンの生理作用や糖尿病における病態的意義に関する林先生の一連のご研究、さらにはグルカゴン測定の臨床的意義の提言と、包括的かつ斬新なお話を聞くことができ、大変有意義なものでした。

Summary

- 1960年代に確立された古典的なグルカゴン測定法は、グルカゴン以外のペプチドも併せて測定している可能性がある。
- グルカゴンとGLP-1という血糖コントロールにおいて相反する2つのペプチドは、グルカゴン前駆体であるプログルカゴンによって作られる。
- グルカゴンの主要かつ特異的な生理作用は血糖上昇ではなく、アミノ酸代謝の恒常性維持であると考えられる。

共催：第92回 日本内分泌学会学術総会
株式会社エスアールエル
株式会社コスミックコーポレーション

グルカゴン測定の意義と 新しいグルカゴン・バイオロジー

林 良敬 先生

名古屋大学環境医学研究所 内分泌代謝分野 教授

Keywords : グルカゴン関連物質 プログルカゴン GLP-1 サンドイッチELISA アミノ酸代謝

グルカゴン測定の歴史

インスリンは1921年、Frederick Banting 医師らが行った犬を用いた実験によって発見されました。インスリンの精製は生化学者Bertram Collip博士により進められ、発見の翌年の1922年には精製インスリンは糖尿病を患う少年に投与され、彼の命を救いました。このようにインスリンの発見が華々しく報じられた1920年代初期に、グルカゴンもまた膵臓抽出物に含まれる血糖上昇物質として発見されました。グルカゴンという名前はグルコースとアゴニストを合わせたもので、このような歴史的経緯から「グルカゴンは血糖上昇ホルモンである」ことは常識と考えられ、高校の生物の教科書にも記載されています。

インスリンの測定は1959年にYalow博士とBerson博士がラジオイムノアッセイ（以下、RIA）を確立したことにより可能になりました。その2年後の1961年にはUnger博士らによりグルカゴンのRIAが確立されています。グルカゴンの測定が可能となってから、早い時期に、腸管にもグルカゴン様物質（Glucagon-like Immunoreactivityあるいは、enteroglucagon）が存在することは明らかとなりましたが、その実体は不明でした。その実体、つまりさまざまなグルカゴン関連物質が存在することが明らかになったのは、分子生物学のテクニックを用いてグルカゴン遺伝子やcDNAの構造が解明された、1980年代以降のことです。

グルカゴン遺伝子はグルカゴンの前駆体であるプレプログルカゴンをコードしており、シグナル配列が除去されたプログルカゴンがさらにプロセッシングを受けて、膵島 α 細胞においてはグルカゴンが産生されます。また腸管のL細胞ではプログルカゴンからGLP-1、GLP-2が作られます。さらに、これら以外にもグルカゴンのN末端およびC末端にペプチドが連結したグリセンチンやオキシントモジュリンなどのグルカゴン関連物質が産生されることが明らかとなっています。1960年代にUnger博士らによって確立された**古典的なグルカゴン測定法はグルカゴン遺伝子やプログルカゴンの構造が解明される前に開発されたため、グルカゴン以外のペプチドも併せて測定している可能性がある**と考えられます。しかしながら、Unger博士らによる膨大な測定データは教科書的記載の多くの根拠となっていて、現在でも一定の整合性はあると考えられているようです。

Unger博士らによるRIAはポリクローナル抗体を用いていたため、近年ではグルカゴンに対して高い特異性を持つ抗体が枯渇し、また品質管理をクリアするものを新たに作るものが困難となりました。その結果、最近では信頼性の高いグルカゴン測定が非常に困難になっていました。こうした問題を克服したのがサンドイッチELISAです。グルカゴンのC末端、N末端それぞれに特異的なモノクローナル抗体を作り、

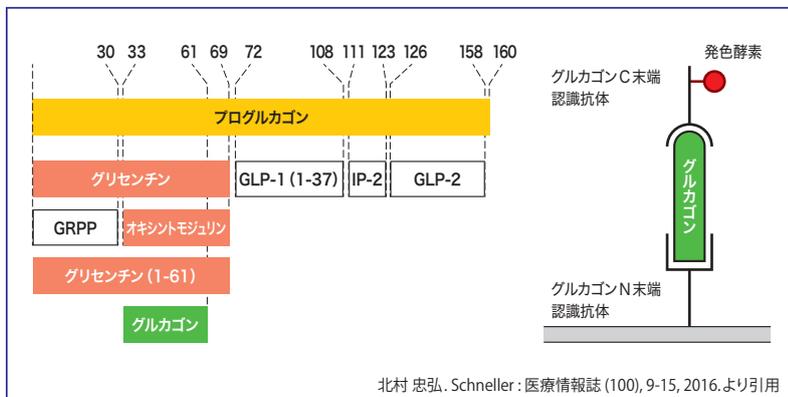


図1

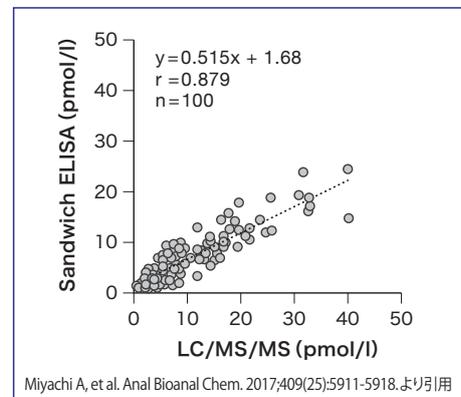


図2

両側から挟んでグルカゴンを測定することにより、非常に特異性の高い、正確な結果を得ることが期待できます(図1)。実際、現在微量な物質を最も正確に測定する方法と考えられているLC-MS/MS法による測定値とサンドイッチELISAを比較すると、高い相関を示すことが確認されています¹⁾(図2)。

グルカゴンと糖尿病

グルカゴンの分泌亢進が血糖上昇の主な原因であり、グルカゴンの分泌抑制こそが糖尿病治療で重要であるという「糖尿病グルカゴン主因論」は2012年、Unger博士らにより提唱されました。彼らは、グルカゴン受容体を欠損するマウスはβ細胞を破壊しても糖尿病にならないというデータ²⁾に基づいて「グルカゴンこそ糖尿病の原因である」と考えたわけです。彼らの考えをもう少し詳細に紹介すると、1) 膵島内でα細胞はβ細胞に隣接していて、α細胞からのグルカゴン分泌は体内で最も高い濃度のインスリンにより抑制されている。2) β細胞からのインスリン分泌が無くなるとグルカゴン分泌が上昇し、その結果、血糖値が上昇する。3) 糖尿病状態ではインスリンの補充と同等あるいはそれ以上にグルカゴン分泌の抑制が重要であるとなります。

さて、グルカゴン受容体欠損マウスのほかには、グルカゴンの産生に必要なPcsk2を欠損するマウスにおいても血糖値が低下することが知られています。この2種類の動物モデルのデータは、グルカゴンを欠損すれば血糖

値が低下することを示唆しますが、1つ注意しなければならないことがあります。それはグルカゴンの前駆体であるプログルカゴンからはGLP-1も産生されるという点です。グルカゴンがグリコーゲン分解や糖新生の促進を介して血糖値を上げる方向に働くのに対して、GLP-1は主要なインクレチンとしてインスリン分泌刺激作用、β細胞増殖刺激・保護作用といった血糖値を下げる方向に働きます。すなわち**血糖コントロールにおいて一見相反する生理作用を示す2つのペプチドが共通の前駆体から作られている**わけです。グルカゴンとGLP-1は不可分のセットであるために、グルカゴンの産生や作用がブロックされたグルカゴン受容体欠損マウスやPcsk2欠損マウスではGLP-1の産生が上昇しています。このGLP-1の上昇が血糖値の低下に関与しているか否かは、グルカゴンとGLP-1の両方を欠損するマウスを解析すればわかります。我々はグルカゴン遺伝子欠損マウス(以下、GCGKO)を作成して研究を進めてきました。このマウスはグルカゴンとGLP-1の両者を欠損します。GCGKOに腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った結果(図3)をお示しします。インスリン感受性は若干亢進していますが、0分、120分の時点で差はなく、血糖値は概ね正常です³⁾。この結果からグルカゴン欠損単独では血糖値は下がらず、そこにGLP-1産生の亢進が加わって初めて血糖値が下がることがわかります(図4)。

グルカゴン受容体欠損マウスはストレプトゾトシン投与による糖尿病誘発に対して抵抗性を示しますが、グルカゴン

ミノ酸のほぼすべてが有意に上昇していました(図6)。これらの結果を総合するとGCGKOの肝臓では**アミノ酸の異化能力、つまりアミノ酸を糖新生基質へ転換する能力が低下し、そのために高アミノ酸血症を示す**ことがわかりました(図7: オレンジ色のバックに太字で示した酵素遺伝子の発現が低下、青地に白抜ききの代謝産物の濃度が上昇していた)。我々はGCGKOを用いて遺伝子発現の日内変動なども調べていますが、そのような解析においてもSDSやGOT1といったアミノ酸代謝酵素の発

現にははっきりとした差が見られるのに対して、PEPCKやG6PCといった糖新生律速酵素の発現の差はそこまでクリアではありませんでした。

自由摂食のもとではGCGKOの血中インスリン濃度は低く、肝臓におけるインスリン作用の下流にあるAKT活性も低下していることから、インスリンシグナルが減弱していることがわかりました。これは、グルカゴン欠損により血糖が上がりにくいために、要求されるインスリン量が減少しているためと考えています。この結果を踏まえて、イン

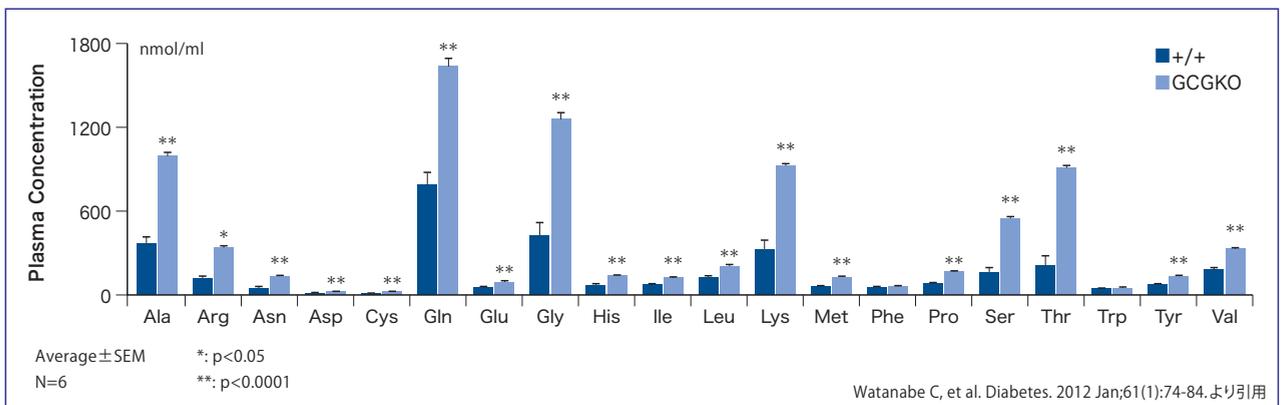


図6 血中アミノ酸濃度：GCGKOは高アミノ酸血症を示す

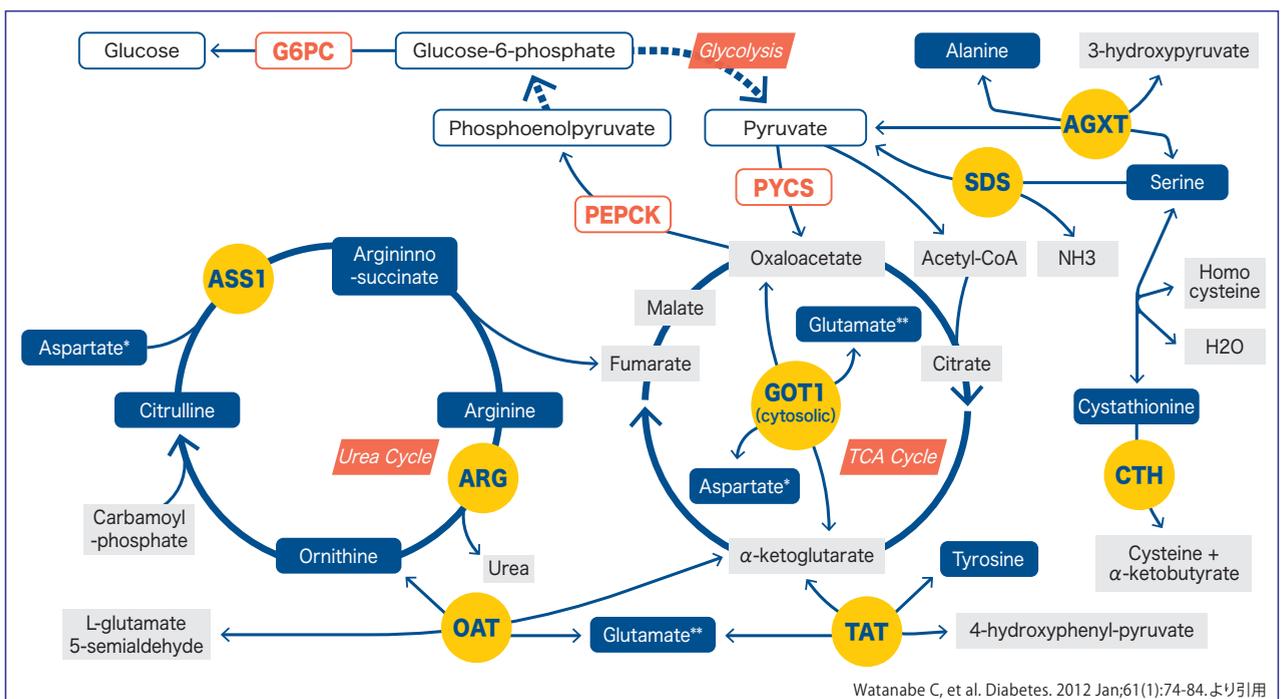


図7

スリンとグルカゴンの関係、血糖値と血中アミノ酸濃度の制御を(図8)で示しました。左にはインスリンが血糖を低下させグルカゴンが血糖を上昇させることを示しています。ここに血中アミノ酸濃度を横軸として書き加えます。すると、インスリンは血糖値を下げると同時にアミノ酸を原料として蛋白質合成を促進することにより血中アミノ酸濃度を下げます。一方、グルカゴンは糖新生基質としてアミノ酸を消費し血中アミノ酸濃度を下げつつ、血糖値を上昇させます。GCGKOではグルカゴンがないために、インスリン需要量も減少し、中央の図における二つのベクトルがともに弱まります。その結果、血糖は正常で血中アミノ酸濃度が上昇すると考えると理解しやすいでしょう。グルカゴン受容体欠損マウスも高アミノ酸血症を示すことが報告されていますから、先に述べた血糖の場合と異なり、GLP-1の有無にかかわらず、アミノ酸濃度は上昇するわけです。ですから、我々は**グルカゴンの主要かつ特異的な生理作用は、血糖上昇ではなくアミノ酸代謝の恒常性維持**であることを提唱しています。我々は、グルカゴンとアミノ酸代謝の関係をより明確に捉えるために、高蛋白食を与える実験や、アミノ酸の中で最も血中濃度が高いグルタミンを投与する実験などを進めています。GCGKOに蛋白質を60%含む高蛋白食を食べさせると、血中のグルタミン濃度は6mMに達することもあります。空腹時血糖100mg/dlは

5.5mMに相当しますから、6mMとなるとグルタミン濃度がグルコース濃度を超えるくらいになるわけです。

最近、**肝臓と α 細胞の間にグルカゴンとアミノ酸を介した相互フィードバック機構がある**ことが解明されつつあり、グルタミンが α 細胞の増殖促進作用を示すことも報告されています⁹⁻¹²⁾。

グルカゴン測定の意義

最後にグルカゴンがアミノ酸代謝制御ホルモンであるということを前提にしてグルカゴン測定の意義を考えてみると、「蛋白質摂取量とグルカゴンの関係」あるいは「筋肉量とグルカゴンの関係」、「アスリートにおけるグルカゴン」、「サルコペニアにおけるグルカゴン」などを明らかにするために、グルカゴン測定は非常に重要であるとともに、興味深いと考えられます。**血中アミノ酸濃度とグルカゴンの関係、グルタミンとグルカゴンの関係、またBUNとグルカゴンの関係**に注目したデータも今後集積されていくことでしょう。このような解析から「糖尿病患者に高蛋白食は推奨され得るのか」、「糖尿病患者に対して低糖質食は推奨されるのか」といったクリニカルクエストに何らかの手がかりが得られるのではないかと考えています。

References

- 1) Miyachi A, Kobayashi M, Mieno E, et al. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(25):5911-5918.
- 2) Unger RH, Cherrington AD. *J Clin Invest.* 2012;122(1):4-12.
- 3) Hayashi Y, Yamamoto M, Mizoguchi H, et al. *Mol Endocrinol.* 2009;23(12):1990-9.
- 4) Jun LS, Millican RL, Hawkins ED, et al. *Diabetes.* 2015;64(3):819-827.
- 5) N Diamond, F Thorel, JS Moyers, et al. *eLife.* 2016;5:e13828.
- 6) Eaton SB, Konner M. *New England J Medicine.* 1985.
- 7) Kuwata H, Iwasaki M, Shimizu S, et al. *Diabetologia.* 2016;59(3):453-461.
- 8) Watanabe C, Seino Y, Miyahira H, et al. *Diabetes.* 2012;61(1):74-84.
- 9) Solloway MJ, Madjidi A, Gu C, et al. *Cell Rep.* 2015;12(3):495-510.
- 10) Dean ED, Li M, Prasad N, et al. *Cell Metab.* 2017;25(6):1362-1373.e5.
- 11) Hayashi Y, Seino Y. *J Diabetes Investif.* 2018;9(3):464-472.
- 12) Hayashi Y. *J Diabetes Investif.* 2019 (in press) doi: 10.1111/jdi.13110.

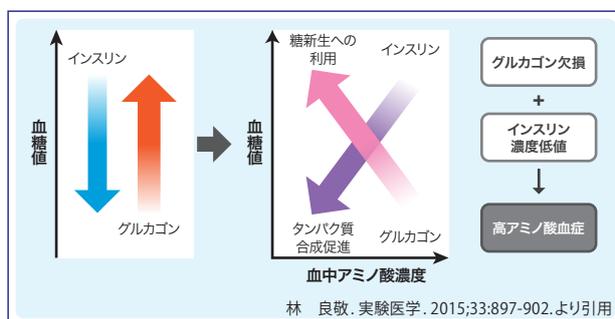


図8 グルカゴン・インスリンと血糖値・血中アミノ酸濃度の制御

発行元

 コスミック コーポレーション



 株式会社 エスアールエル
Communication for Health