

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム(2018)第18巻:

&Lg\cf h! Zcf a' ; =D

2) short-form GIP の測定系の確立による分泌機構と生理学的意義の解明

Development of new enzyme-linked immunosorbent assay system for 'short-form GIP'

研究代表者 竹田 安孝

【目的】

GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) と GLP-1 (glucagon-like peptide-1) は、食事摂取に伴い小腸の K 細胞 (GIP) と L 細胞 (GLP-1) から門脈血中に分泌され、G 蛋白共役受容体を介して血糖依存性に膵β細胞におけるインスリンの分泌を促進する腸管ペプチドで、インクレチンとして知られている。食後のインスリン分泌の 50% はインクレチンを介すると考えられており、糖代謝において重要な役割を担っている。さらに動物モデルにおいては、膵β細胞におけるインスリン遺伝子の転写促進やβ細胞死の抑制により、膵保護作用を示すことが明らかにされている。また GLP-1 は中枢性の食欲抑制作用や心保護作用を有するほか、GIP では脂肪細胞における脂肪蓄積、骨量の調節に関与する等、多彩な膵外作用を有することも報告されている¹⁾。

GIP は 42 アミノ酸配列を有するペプチドホルモンで、小腸の K 細胞より分泌される (GIP (1-42))。近年、新たなインクレチンとして、'short-form' GIP

である GIP (1-30) が注目されている。GIP (1-30) は、膵α細胞に発現し、パラクリン機構でβ細胞におけるインスリン分泌調節に関与していることが報告されており²⁾、インクレチンとして糖代謝機構に重要な役割を果たしていることが想定されているが、測定系は確立されておらず、その分泌動態や生理学的意義は明らかではない。本研究では、GIP (1-30) に高い特異性を有する ELISA 法での測定系を新たに確立し、糖代謝における生理的な GIP (1-30) の分泌動態および糖尿病における分泌異常の有無を探求することを目的とし、検討を行った。

【方法】

GIP (1-30) に特異性の高い ELISA 法を構築する上で、既存の GIP (1-42) の N 末端を認識する抗体に加え、新たに GIP (1-30) の C 末端を特異的に認識する抗体を作成し、これら 2 種の抗体でのサンドイッチ法による特異的 ELISA 系を作成する方針とした。

【結果】

GIP (1-30) の C 末端ペプチドとして、GIP (24-30) ペプチド (8mer, CNWLLAQK-NH₂, MW974.2) を合成した。ウシサイログロブリンをキャリア蛋白として、GIP (24-30) を BDF1 マウス、BALB/c マウス、Wister Rat に免疫を施し、いずれにおいても抗原固相 ELISA にて抗体価上昇が確認され、最終免疫、細胞融合に進んだ。しかし、スクリーニングアッセイにおいて、Wister Rat においてのみ、GIP (1-30) amide の C 末端特異的抗体をクローニングした。これを biotin 化し、streptavidin 固相化プレートに対する特異的二次抗体とした。また既存の GIP (1-42) N 末端に対する特異的抗体を HRP (horseradish peroxidase) 標識し、これを HRP 標識二次抗体とした (発色基質には TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) を用いた)。こうして GIP (1-30) に対する新規 ELISA 系を構築した (図 1)。GIP (1-30) amide を用いた検討において、用量依存性の GIP (1-30) を検出した一方、GIP (1-42) に対する交差性は 0.1% 以下であった。

【考察】

'short-form' GIP である GIP (1-30) の ELISA 系を新たに構築した。GIP (1-42) との交差性はなく、

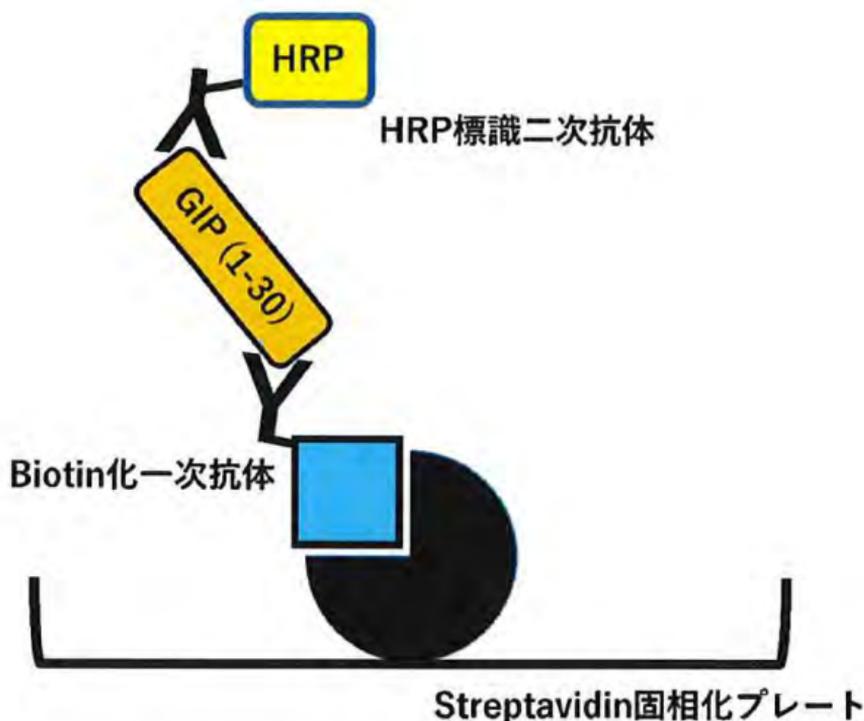


図 1 GIP (1 - 30) の新規 ELISA 系

GIP (1 - 30) に対する特異的測定系が確立されたと考える。ヒトを始めとして、GIP (1 - 30) の分泌動態や生理学的意義は明らかではない。本研究で確立した ELISA 系を用いて、健常者および糖尿病患者における分泌動態を検証・比較し、生理的な GIP (1 - 30) の分泌機構や糖代謝における役割について検討を行う予定である。

【文 献】

- 1) Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007 ; 132 : 2131-2157.
- 2) Fujita Y, Yanagimachi T, Takeda Y et al. Alternative form of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its physiology. *J Diabetes Investig* 2016 ; 7 : 33 - 37.