

学位論文

「GIP 及び GIP 関連ペプチドの生理活性探索研究」

DM 17027 正木 嗣人

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 内分泌代謝内科学
指導教授 七里 眞義

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)はインクレチンの一つであり、上部小腸に存在する腸管内分泌 K 細胞より分泌される 42 アミノ酸からなるポリペプチドである。GIP はその前駆体蛋白である proGIP からプロホルモン変換酵素により活性型 GIP となる。インスリン分泌を促進する膵作用が主な作用であるが、近年様々な組織における膵外作用も明らかとなってきた。しかしこれらの作用についての GIP の有用性に関する報告はもう一つのインクレチンである glucagon-like peptide-1 と比較すると限定的である。今回、ヒト大動脈血管内皮細胞における GIP の膵外作用を評価する目的で、GIP による生理活性蛋白の産生・分泌促進作用について検討を行った。この結果、Endoglin, Angiogenin, SDF-1 α , Angiopoietin-2, DKK-1 などの血管新生制御性蛋白や IL-17A, IL-6, MIF をはじめとする炎症性サイトカインなど、多くの重要な生理活性蛋白の分泌促進作用が確認された。

現時点で proGIP 蛋白から生合成される GIP 以外の生理活性ペプチドの存在は確認されていない。昨今、北里大学理学部プロテオミクスセンターでは血漿中の大分子量タンパクを除去した後、残存蛋白・ペプチド分画をさらに精製して低分子量低存在量ペプチドをきわめて高効率に抽出する手法を開発し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法により、数多くのヒト血漿中ネイティブペプチドの同定に成功し、血漿ネイティブペプチドームデータベースが作成されるに至った。これらの膨大な配列について *in silico* 解析を行ったところ、ペプチド同定偽発見率 (FDR) 1%以下の精度で同定された proGIP 蛋白由来のネイティブペプチドが GIP 以外に同定偽発見率 1%の精度でヒト血漿中に 7つの配列が存在することが明らかになった。これらについて蛍光標識ペプチドを化学合成し、ヒト大動脈血管内皮細胞に添加すると GIP の N 端配列のペプチドの中に細胞への結合が確認された。またこれらの中にはヒト大動脈血管内皮細胞における遺伝子発現誘導に関与するものが見出された。免疫組織化学染色より GIP の N 端配列は、小腸以外の全身組織でも発現している可能性が示唆された。

本研究により、活性型 GIP の血管内皮細胞に対する膵外作用の一部が明らかとなった。さらに、proGIP 由来ペプチドの中に新規生理活性因子が存在する可能性が示された。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. ペプチドの合成と抗ペプチド抗体の精製	2
2-2. 細胞培養	2
2-3. RT-PCR	2
2-4. 細胞内 Ca^{2+} イオン濃度測定	2
2-5. 抗体アレイによる解析	3
2-6. 細胞へのペプチド結合の評価	3
2-7. 免疫組織化学染色	3
2-8. 統計解析	4
3. 結果	
3-1. ヒト大動脈血管内皮細胞における GIP の膜外作用	
3-1-1. RT-PCR による GIP 受容体発現の評価	4
3-1-2. GIP 添加による細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の変化	5
3-1-3. ヒト大動脈血管内皮細胞における GIP による生理活性蛋白分泌促進作用	5
3-2. 新規 proGIP 由来ペプチドの解析	
3-2-1. proGIP 由来ペプチドの in silico 解析	6
3-2-2. proGIP 由来ペプチドの細胞への結合	7
3-2-3. proGIP 由来ペプチド刺激による MMP-8 mRNA の発現誘導	8
3-2-4. proGIP 由来ペプチドの発現解析	8
4. 考察	
4-1. ヒト大動脈血管内皮細胞における GIP の膜外作用について	9
4-2. proGIP 由来ペプチドの生理活性について	10
5. 総括	11

6. 今後の課題	12
7. 謝辞	12
8. 引用文献	12
9. 業績目録	14

1. 序論

Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)はインクレチンの一つであり、1932年に命名された¹⁾。その後、長く臨床的には注目されることはなかったが、本邦においては2009年にインクレチン関連薬であるdipeptidyl peptidase-4阻害薬が使用可能となり、改めてインクレチンが広く認知されることとなった。GIPは上部小腸に存在する腸管内分泌K細胞よりグルコース依存性に分泌される42アミノ酸からなるポリペプチドである。153アミノ酸からなる前駆体proGIPからプロホルモン変換酵素(PC1)により活性型GIPとなる²⁾。現段階でproGIPから生合成されるGIP以外の生理活性ペプチドの存在は確認されていない。インクレチンは膵β細胞膜上の受容体に結合し、インスリン分泌を促進する膵作用が主な作用である³⁾が、近年様々な組織での膵外作用も明らかとなってきた⁴⁾。しかしこれまでのGIPにおける知見は、もう一つのインクレチンであるglucagon-like peptide-1 (GLP-1)の圧倒的な臨床的有用性に関する報告と比べるときわめて限定的である。血管内皮細胞への作用に関して、GLP-1は動脈硬化進展に抑制的に作用することが知られている^{5,6)}。一方でGIPは同様に動脈硬化の進展抑制作用があるとされているが⁷⁾、現在のところ報告はきわめて少数でその見解は一致していない。

ヒト血中に存在する生理活性ペプチドの中には低濃度で強力な作用を示すものも数多く知られている。しかし血中にはアルブミンやグロブリンなどの高分子量蛋白が圧倒的な高存在量を占めるため、はるかに微量な未知の低存在量・低分子量ペプチドを同定することは非常に困難であると考えられてきた。最近、北里大学理学部プロテオミクスセンターでは血漿中の高分子量タンパクを除去した後、残存タンパクから低分子量ペプチド分画をきわめて高効率に抽出する手法を開発し^{8,9)}、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)により多数の血中ネイティブペプチド配列を網羅的に同定することに成功しつつあり、すでに国際的にも初めての血漿ネイティブペプチドデータベースが構築されるに至った。

今回まず、ヒト大動脈血管内皮細胞においてGIPが各種サイトカイン、増殖因子等の発現・分泌蛋白プロファイルの変化をきたすかどうかサイトカインアレイを用いて幅広く評価し、GIPの血管内皮に対する膵外作用を確認することを目的とした。次に、同センターとの共同研究により、アミノ酸配列が決定されたヒト血中ネイティブペプチドライブラリーの中からGIP前駆体タンパクであるproGIPに由来するネイティブペプチドが存在するか検討し、それらの中に新規生理活性因子が存在する可能性を探索した。

2. 方法

2-1. ペプチドの合成と抗ペプチド抗体の精製

ペプチド化学合成は SCRUM 社で行い、10%アセトニトリル/0.1%TFA で 1 mM の濃度に溶解した。特異的ポリクローナル抗体は家兔に免疫して得た抗血清を Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて IgG 精製した。

2-2. 細胞培養

ヒト大動脈血管内皮細胞は PromoCell 社 (ドイツ) より入手し、SupplementPack Endothelial Cell GM MV2 を添加した Endothelial Cell Basal Medium MV2 (PromoCell) 培地で 37°C、5%CO₂ の環境下で 2-3 日間培養したのち、P4-P6 の継代細胞を用いた。

2-3. RT-PCR

6 穴プレートで培養したヒト大動脈血管内皮細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、TRIzol reagent (Invitrogen, 米国) で溶解した。次いでクロロホルムを加え攪拌し、遠心分離後に水層を回収し、イソプロパノールを加え RNA を沈殿させた。RNA ペレットを 75%エタノールでリンスし Total RNA を抽出した。その後、PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ) を用い、Total RNA を cDNA に逆転写した。KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa Bio Systems Inc., 南アフリカ) を用い、Cyber Green 法により RT-PCR を施行した。PCR 条件として、鋳型 DNA を 94°C・3 分で熱変性した後、94°C・10 秒の熱変性、60°C・30 秒のアニーリング・伸長を計 40 サイクル施行した。PCR 反応後、溶解液を 65°C から 90°C まで 0.5°C 刻みで徐々に上昇させ、蛍光値をモニタリングし、融解曲線分析を行った。C1000 Touch Thermal Cycler and CFX Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, 米国) を使用し、データは Ct 値で表出され、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method を用いて標的遺伝子の相対的発現増加を倍率評価した。

RT-PCR 施行に際し Eurofins Genomics (日本) で合成した下記プライマーを用いた

MMP8 forward primer 5'-tctgcaaggttatcccaagg-3'、
reverse primer 5'-gctccatgaattgtctttggt-3'
GIPR forward primer 5'-acgtctgctgggactatgct-3'、
reverse primer 5'-cgaaacctgcagccacat-3'
Actb forward primer 5'-attggcaatgagcgggttc-3'、
reverse primer 5'-ggatgccacaggactcca-3'

2-4. 細胞内 Ca²⁺イオン濃度測定

ヒト大動脈血管内皮細胞を透明底の 96 穴・黒プレートで 48 時間培養し、Calcium Kit - Fluo 4 (同仁化学研究所) を用い、ハンクス平衡塩液 (HBSS, ナカライテスク) 中に 5% phoronic、250nM probenecid を含む溶液中で、Fluo 4-AM を 37°C、30 分間イン

キュベートした。その後 HBSS で 2 回洗浄し、各濃度の GIP を添加後、プレートリーダーで蛍光強度の変化を経時的に計測した。測定機器は POWERSCAN® HT (DS ファーマバイオメディカル) を用い、励起波長 485 nm で、蛍光波長 528 nm を検出した。

2-5. 抗体アレイによる解析

6 穴プレートで 2 日間培養したヒト大動脈血管内皮細胞に 10^{-7} M の GIP (ペプチド研究所) もしくはコントロールとしてペプチドを含まない同量の培地を添加し、30 時間後にそれぞれの培養上清を回収した。Human XL Cytokine Array Kit (ARY022B, R & D Systems, 米国) を用い、細胞培養上清中の各種サイトカインや増殖因子等の解析を行った。培養上清は各 500 μ l 使用した。シグナルは ImageQuant LAS 4000 (GE ヘルスケア) で検出し、ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) で信号強度を定量した。値は各 2 個のスポットの平均値を、GIP 未添加のコントロールを 100%とした比率として表示した。

2-6. 細胞へのペプチド結合の評価

ヒト大動脈血管内皮細胞を、カバーガラスを敷いた 12 穴に播種し、2-3 日培養した。PBS で 3 回洗浄後、N 末端に Carboxyfluorescein 蛍光標識した proGIP 由来ペプチド 10^{-6} M を添加し、5-60 分インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、4% paraformaldehyde を添加し室温で 15 分静置し細胞固定した。PBS で 3 回洗浄後、DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech, 米国) で核を対比染色した。蛍光シグナルを LSM710 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss, ドイツ) で撮像した。

2-7. 免疫組織化学染色

proGIP 由来ペプチドの産生臓器を検討するため、Antibody cross-reactivity testing tissue array (MNO341, US Bionax, Inc., 米国) を用いて、ペプチド発現の検討を行った。組織アレイをドライサーモユニット上で 60°C で 90 分焼き付け、UI ゴールで脱パラフィンした。10 倍希釈した Histo VT One (ナカライテスク) を用い、PH7 の条件下で、121°C、10 分間オートクレーブ処理し抗原を賦活化した。0.3%過酸化水素含有メタノール溶液に 20 分浸し内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを、内因性アビジン・ビオチンブロッキングキット (ニチレイバイオサイエンス) により内因性ビオチンのブロッキングを、次いで Blocking One (ナカライテスク) で 30 分非特異的反応のブロッキングを行った。各種ブロッキング後に、精製した抗ペプチド IgG 及びコントロールとして非免疫血清の IgG を室温で 90 分インキュベートし一次抗体反応を行った (1:500)。PBS-T で 3 回洗浄後、Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (1:500, ベクター) で 60 分二次抗体反応を行った。その後 avidin-biotin-peroxidase complex を形成し、diaminobenzidine (DAB) により発色した。水道水で流洗後、ヘマトキシリンで

核染色した。脱水・透徹・封入し、光学顕微鏡 (Axioscope5, Axiocam 208 color, Carl Zeiss) で観察・撮影した。

2-8. 統計解析

2 群間の比較は、対応のない Student's t test もしくは Welch's t test で行った。3 群以上の検討は one-way ANOVA で有意差を確認した後、Newman-Keuls の多重比較検定を行った。また対応のある関連多群の検定には、反復測定分散分析で有意差を確認した後、Bonferroni の多重比較を行った。各データは mean \pm SEM で示した。P<0.05 を統計学的有意差ありと判断した。統計解析及びグラフの作成はいずれも GraphPad Prism (La Jolla, 米国) で行った。

3. 結果

3-1. ヒト大動脈血管内皮細胞における GIP の膜外作用

3-1-1. RT-PCR による GIP 受容体発現の評価

まず本実験に用いたヒト大動脈血管内皮細胞において GIP 受容体 (GIPR) の発現を確認するため、培養細胞より Total RNA を抽出、cDNA を作成し、GIPR のプライマーを用い RT-PCR により発現・増幅が見られるか確認した。PCR サイクルの進行に伴い、PCR 産物の増加が確認された (図 1a)。またプライマーダイマーやその他非特異的増幅の可能性を除外するため、PCR の増幅サイクルが完了した後、増幅産物を加熱し解離曲線データを解析したところ、単一の融解曲線が得られ (図 1b)、反応特異性が確認された。以上よりヒト大動脈血管内皮細胞における GIPR の発現が確認された。

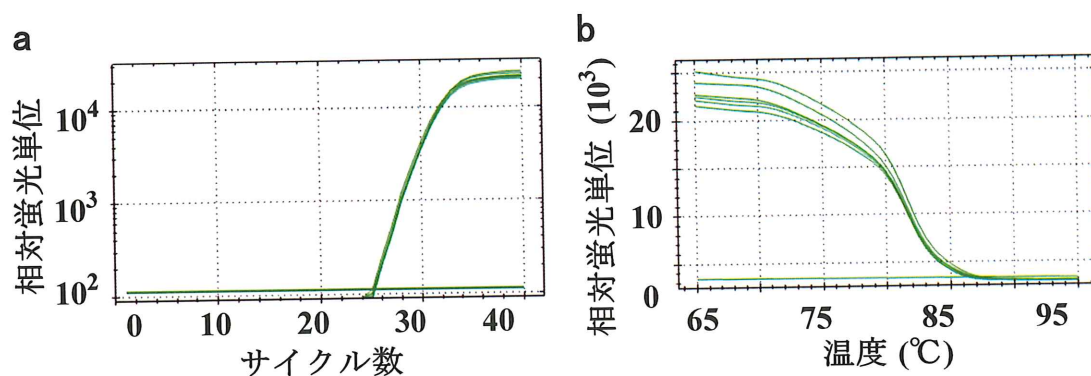


図 1 RT-PCR によるヒト大動脈血管内皮細胞における GIP 受容体発現の評価

a : PCR サイクルに伴う SYBRTM Green による蛍光強度の増加曲線。縦軸は相対蛍光単位 (RFU) を log scale で示す。

b: サーマルサイクリングプロトコルの完了直後に、融解プロファイルを組み施行した解離曲線解析。
温度の上昇に伴う 2 本鎖解離による蛍光強度の低下を示す。
いずれも $n=6$ の個々の曲線を融合した。

3-1-2. GIP 添加による細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の変化

ヒト大動脈血管内皮細胞に対して GIP が細胞内シグナルを惹起するかどうか評価するために、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の変化を確認した。Fluo4-AM 蛍光プローブを用い、GIP 添加後の蛍光強度の変化を記録した。添加後経時的に蛍光強度の変化を追跡したところ、GIP を含まない HBSS (Vehicle) では変化が見られなかった一方で、GIP 10^{-7}M 、 10^{-8}M の添加により濃度依存的に蛍光強度の増加が確認された (図 2)。このことから GIP はヒト大動脈血管内皮細胞において、細胞内 Ca^{2+} イオンの増加を介した応答を引き起こすことが示唆された。

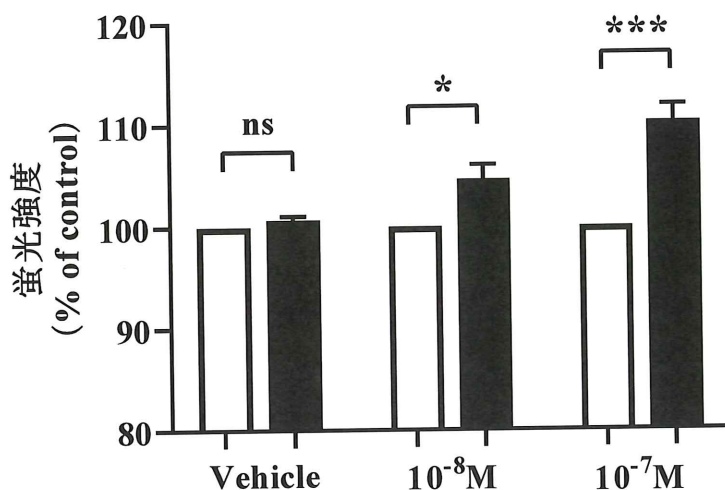


図 2 GIP 添加による細胞内カルシウムイオン濃度の変化

ヒト大動脈血管内皮細胞を GIP を含まない HBSS (Vehicle)、 10^{-7}M および 10^{-8}M の GIP でそれぞれ刺激し、Fluo 4-AM 蛍光プローブの蛍光強度の変化を経時的に追跡した。グラフは添加後 36 秒時点の蛍光強度 (黒) を添加前 (白) との比率で示した。

$n=8$ 、データは $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ で表示、ns : 有意差なし、* $p<0.05$ 、*** $p<0.001$ vs 試薬添加前

3-1-3. ヒト大動脈血管内皮細胞における GIP による生理活性蛋白分泌促進作用

ヒト大動脈血管内皮細胞における GIP 受容体の発現および GIP 添加による細胞内 Ca^{2+} イオンの応答が確認されたため、次いで GIP 添加による同細胞に対する各種生理活性蛋白の分泌制御作用を評価する目的で、GIP を添加し 30 時間後に培養上清を回収

し、上清中に分泌されたサイトカインを含む種々の生理活性蛋白をタンパク質抗体アレイを用いて測定した。GIP を含まないコントロール（図 3a）と比較し、GIP 添加（図 3b）により Endoglin, Angiogenin, SDF-1 α , Angiopoietin-2, DKK-1 など血管新生に関与する蛋白が複数増加し、また IL-17A, IL-6, MIF など炎症性サイトカインの増加が確認された（図 3c）。

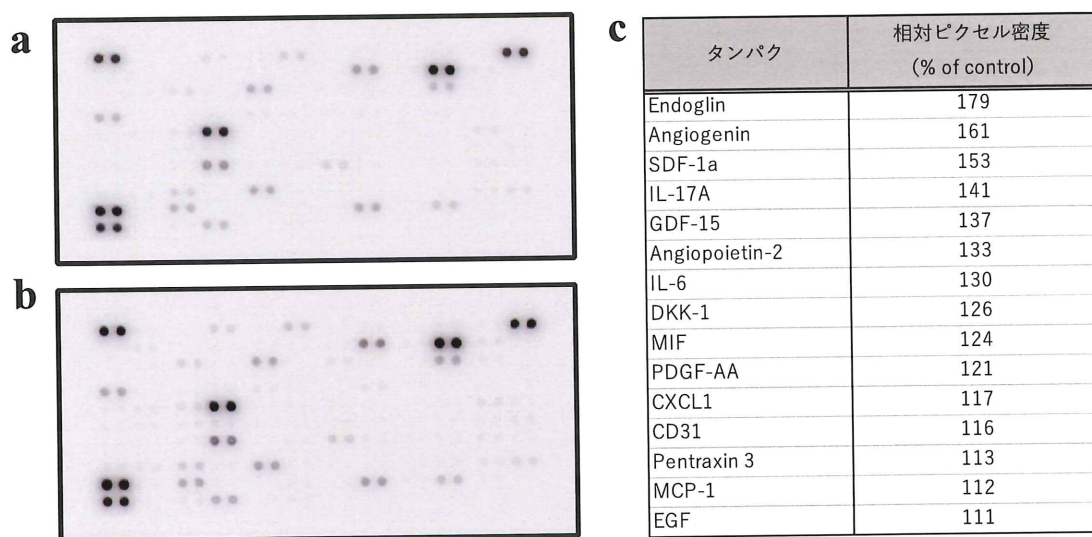


図 3 Human Cytokine Array Kit を用いた GIP 添加によるヒト大動脈血管内皮細胞培養上清のタンパク発現プロファイルの評価

- a、b : GIP 添加 30 時間後に回収したヒト大動脈血管内皮細胞の培養上清をアレイにプローブした後の化学発光検出画像、GIP 添加なし（コントロール）（a）、GIP 添加（b）
- c : GIP 添加後の培養上清中の各タンパクの定量化した信号強度を各 2 spot の平均値として算出し、コントロールとの比率で表示、発現の増加率が高い順に表示した。

3-2. 新規 proGIP 由来ペプチドの解析

3-2-1. proGIP 由来ペプチドの in silico 解析

血漿ネイティブペプチドームにてアミノ酸構造が決定され、ProteomeXchange Consortium via the PRIDE®を介してすでにデータベースに登録されている 1 万を超えるネイティブペプチドの中で、ペプチド同定偽発見率（FDR）1%以下の proGIP 由来ペプチドを in silico 解析したところ以下に示す 7 個の配列が同定された（表 1）。これらのうち、6 つは GIP とその N 端側のシグナル配列までの間に位置し、残りの 1 つは C 端側に存在していた。

アミノ酸配列	遺伝子名とアミノ酸位置	FDR (%)
ALPSLPVGSHAKVSSPQPRGPR	GIP_HUMAN [30-51]	0
EKKEGHFSALPSLPVGSHAKVSSPQPR	GIP_HUMAN [22-48]	1
EKKEGHFSALPSLPVGSHAKVSSPQPRGPR	GIP_HUMAN [22-51]	0
S(+87.05)HAKVSSPQPRGPR	GIP_HUMAN [38-51]	1
SLPVGSHAKVSSPQPRGPR	GIP_HUMAN [33-51]	0
S(sub G)SHAKVSSPQPRGPR	GIP_HUMAN [37-51]	0
SSPAKNPSDEDLLR	GIP_HUMAN [117-130]	1

表 1 血漿ペプチドームにてヒト血中に同定された **proGIP** 由来ネイティブペプチド

FDR: False discovery rate、(sub G): アミノ酸置換、(+87.05): 翻訳後修飾を示す

3-2-2. proGIP 由来ペプチドの細胞への結合

蛍光標識 **proGIP** 由来ペプチドを培養細胞に添加し共焦点蛍光顕微鏡にて観察したところ、GIP の N 端側ペプチドのなかにヒト大動脈血管内皮細胞において、コントロールと比べ、明らかに蛍光シグナルの増加が確認されるものが認められた (図 4)。このことから GIP の N 端側にヒト大動脈血管内皮細胞への結合活性がある可能性が示された。

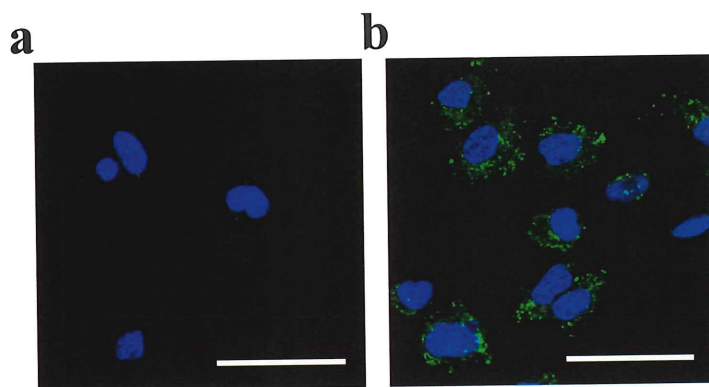


図 4 **proGIP** 由来ペプチドのヒト大動脈血管内皮細胞への結合

a, b: 培養したヒト大動脈血管内皮細胞を 10^{-6} M の蛍光標識ペプチドと 15 分間インキュベートし、細胞を洗浄、固定した。核を DAPI で対比染色し (青)、FAM の緑色信号を共焦点顕微鏡で観察した。蛍光標識ペプチド添加なし (コントロール) (a)、蛍光標識ペプチド添加 (b)、スケールバーは $50 \mu\text{m}$ を示す。

3-2-3. proGIP 由来ペプチド刺激による MMP-8 mRNA の発現誘導

次に RT-PCR により proGIP 由来ペプチド刺激に伴う遺伝子発現量の変化を評価した。ペプチド添加後、MMP-8 mRNA 遺伝子発現の増加が見られた。MMP-8 の増加は時間依存的 (図 5a) かつ濃度依存的 (図 5b) であることが示された。以上より proGIP 由来配列にはヒト大動脈血管内皮細胞において MMP-8 mRNA 誘導活性を有する可能性が示唆された。

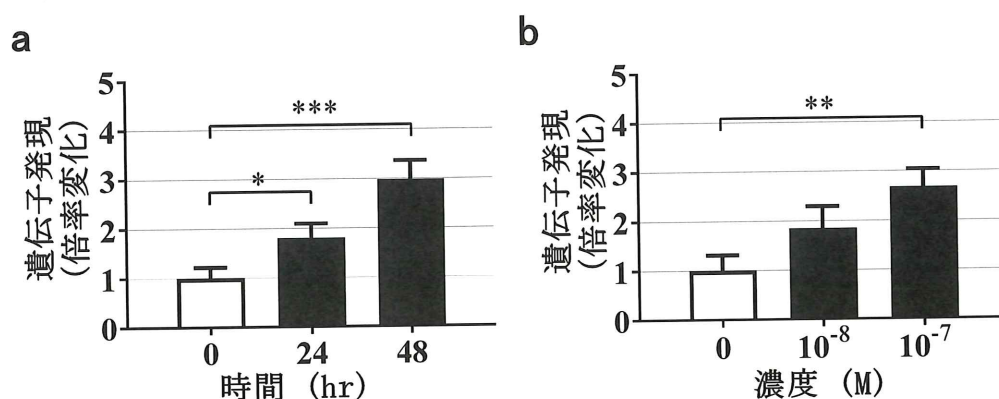


図 5 proGIP 由来ペプチド刺激による MMP-8 mRNA の発現誘導

a: 培養したヒト大動脈血管内皮細胞に 10^{-7} M の proGIP 由来ペプチドを添加し、図示した時間経過での MMP-8 mRNA の発現を解析した。(n=5)

b: 培養したヒト大動脈血管内皮細胞を図示した濃度の proGIP 由来ペプチドで 48 時間刺激し、同様に MMP-8 mRNA の発現を解析した。(n=5)

MMP-8 の mRNA レベルは β -actin と共に RT-PCR で比較定量し、未処理細胞 (0hr もしくは Vehicle) に対する変化の倍率で表示。データは mean \pm S.E.M で示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Vehicle

3-2-4. proGIP 由来ペプチドの発現解析

proGIP 配列が生理活性を有する可能性が示されたため、GIP の N 末端側配列が GIP 発現組織に発現しているかどうかを検討するため、免疫組織化学染色を行った。GIP の N 末端側ポリクローナル抗体を用いたところ、小腸の腺上皮の一部および肝細胞内に発現が見られた (図 6c, d) のに対して、コントロールにおいては染色が認められなかった (図 6a, b)。

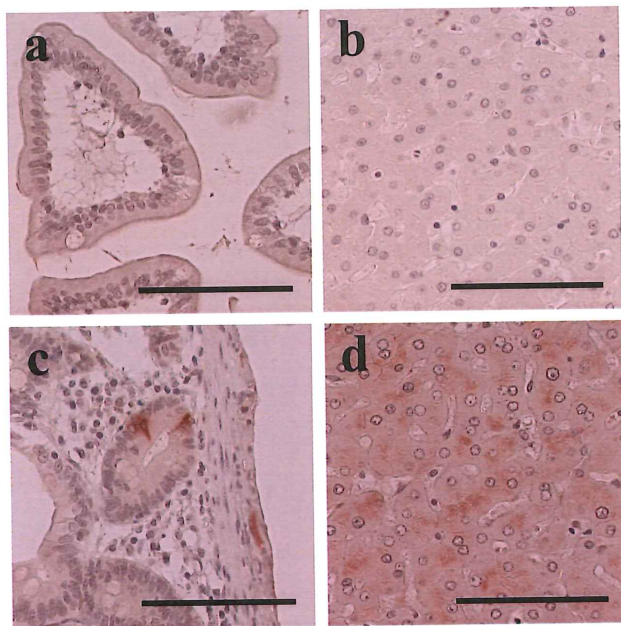


図6 小腸および肝臓における proGIP 由来ペプチドの発現

a-d : proGIP 由来ペプチドで免疫した家兔血清より精製した IgG を一次抗体とし、免疫組織化学染色を施行、二次抗体はビオチン化 goat anti-rabbit IgG を用い、DAB で発色し光学顕微鏡で観察 (c, d)。コントロールとして免疫前の家兔血清より精製した IgG で染色 (a, b)
a, c : 小腸、b, d : 肝臓、スケールバー : 100μm

4. 考察

4-1. ヒト大動脈血管内皮細胞における GIP の腭外作用について

本研究では、まず使用している大動脈血管内皮細胞に GIPR が発現していることを確認するため、培養細胞より Total RNA を抽出し cDNA に逆転写した後、GIPR のプライマーを用い RT-PCR を施行した。この結果 GIPR mRNA の特異的な増幅が確認された。もう一方のインクレチンである GLP-1 においては血管内皮に対する腭外作用が広く知られており、GLP-1 作動薬は特に 2 型糖尿病患者に対する心血管疾患への有益性が示されている^{5,6)}。対照的に GIP に関しては血管内皮に対する腭外作用に関しては一部の限られた報告のみに留まっているが、大動脈血管内皮細胞における GIPR の発現自体に関しては以前より報告がなされている¹⁰⁾。本研究において用いたヒト大動脈血管内皮細胞において GIPR が発現していることをまず確認した。

次いで GIP が大動脈血管内皮細胞における細胞内シグナルを惹起するかどうかを評価するため、細胞内 Ca^{2+} の変化を検討した。腭β細胞においては、GIP 及び GLP-1 は

細胞内 Ca^{2+} 及び cAMP を介してインスリン分泌を促進することが知られている¹¹⁾。本研究の結果、大動脈血管内皮細胞への GIP 添加により直後に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が確認された。このことから膵 β 細胞と同様に GIP は大動脈血管内皮細胞においても細胞内 Ca^{2+} を介する作用が想定された。各種血管内皮細胞において GIP はそのタイプに応じて細胞内 Ca^{2+} や cAMP の異なるシグナル伝達を活性化すると報告されており¹²⁾、本研究からは大動脈血管内皮細胞においては細胞内 Ca^{2+} をシグナルとした経路が存在する可能性が示唆された。

大動脈血管内皮細胞における GIPR の発現及び、GIP 添加による細胞内 Ca^{2+} の増加反応が確認されたため、次いで GIP の膵外作用を広く評価する目的で、細胞培養上清を用い、105 個の可溶性タンパク質の発現レベルを相対的に評価可能な、抗体アレイキットによる検討を行った。GIP 添加により、Endoglin, Angiogenin, SDF-1 α , Angiopoietin-2, DKK-1 など血管新生に関与するタンパクが複数増加し、その他に IL-17A, IL-6, MIF など炎症性サイトカインの増加が見られた。これまでの報告では GLP-1 は eNOS を誘導し、MCP-1, PAI-1, TNF- α , IL-6, VCAM-1 などの産生抑制を介し動脈硬化保護的に作用するとされている^{5, 13, 14)}が、今回の GIP での検討においてはこれらとは異なる分泌蛋白のプロファイルが確認された。また GIP の膵外作用としては、脂肪細胞における栄養素の蓄積作用¹⁵⁾や骨芽細胞における骨形成促進作用¹⁶⁾などは良く知られているが、血管内皮細胞に対する作用に関してはこれまで一定した見解はなかった。本研究において、GIP は血管内皮細胞に対しても前述した血管新生関連タンパクや炎症性サイトカインなど複数の重要な因子の分泌促進作用を有することが確認された。これらの中でサイトカインの増加は動脈硬化促進的に作用する可能性が想定されるが、一方で SDF-1 α は骨髄での内皮前駆細胞の産生を誘導し動脈硬化進展に抑制的に作用することが報告されている¹⁷⁾。本研究の結果からはこれらの相互的な作用により GIP の血管内皮を介する動脈硬化進展への影響が規定されてくるものと考察される。

4-2. proGIP 由来ペプチドの生理活性について

GIP は上部小腸に存在する腸管内分泌 K 細胞よりグルコース依存性に分泌される 42 アミノ酸からなるポリペプチドである。シグナルペプチドが切断され、153 アミノ酸からなる前駆体 proGIP からプロホルモン変換酵素 (PC1) により活性型 GIP へと変換される²⁾。現段階で proGIP には、GIP 以外の生理活性ペプチドの存在はないとされている。昨今北里大学理学部プロテオミクスセンターでは、血漿中の大分子量タンパクを除去した後、残存タンパクより低分子量ペプチド分画をきわめて高効率に抽出する Differential Solubilization 法を開発し、この抽出物を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) により分析することで、これまで同定困難であった多数の生理活性ペプチドの候補がヒト血中より同定された^{8, 9)}。この中で GIP プロタンパク

由来のペプチド配列が決定されており、FDR が 1% で同定された 14000 を越えるペプチド配列について *in silico* 解析を行ったところ表 1 に示したように 7 つのネイティブペプチドの構造が決定されており、そのうちの 6 つは GIP の N 端側に位置していることが明らかになった。

そこでこれらの proGIP 由来ペプチドが生理活性を有する可能性があるかどうかを探索するため、まず各種培養細胞に N 末端に蛍光標識したペプチドを添加し、細胞への結合の有無を確認した結果、大動脈血管内皮細胞へのペプチド結合が確認された。これら大動脈血管内皮細胞に添加すると MMP-8 mRNA が増加したことから proGIP 配列に GIP 以外の未知の生理活性ペプチドが存在する可能性が示唆された。

大動脈血管内皮細胞に対する proGIP 由来ペプチドの作用の一部が確認されたため、GIP が proGIP のプロセッシングによって生合成される際に N 端側配列も同時に生成されるかどうかを検討すべく、GIP 産生臓器における GIP N 端側配列の発現を解析した。GIP N 端配列に対するポリクローナル抗体を一次抗体として免疫組織化学染色により検討を行ったところ、小腸、肝臓での染色が確認された。小腸の発現に関しては、GIP の産生臓器として知られている小腸の K 細胞に一致する可能性もあるが、詳細は不明であり、今後 GIP N 端側に存在する生理活性ペプチドホルモンを正確に同定したのち、高次構造を特異的に認識する抗体を生成したのち、抗 GIP 抗体との二重染色を行って共在するかどうかを確認する必要がある。仮に GIP N 端側配列に新規生理活性ペプチドホルモンの配列が含まれていると仮定するとシグナル配列の除去の後、PC1 の作用により同じ proGIP から活性型 GIP が産生されるのと同時に精製される可能性が想定される。これと類似の産生メカニズムを有する有名なホルモンとして、GLP-1 とグルカゴンの関係が挙げられる。両者はともに同じプログルカゴンの翻訳後プロセッシングにより生成されるが、主にグルカゴンは膵 α 細胞、GLP-1 は小腸遠位の L 細胞より産生され、同一の前駆タンパクに由来するにも関わらず、その産生臓器はそれぞれ異なる¹⁸⁾。GIP 及び GIP 関連ペプチドの産生メカニズムもこれと同様に、それぞれ異なる組織特異的翻訳後プロセッシングに由来するものと推察される。

5. 総括

現段階で詳細な報告がなされていない、GIP による血管内皮への膵外作用の評価を目的としてヒト大動脈血管内皮細胞を用い、サイトカインアレイにより GIP によるタンパク発現プロファイルの変化を評価した。またヒト血漿ペプチドームにより同定されたペプチドライブラリーを探索することにより生理活性を有する新規因子が存在する可能性が示された。

6. 今後の課題

血漿から低分子量ペプチドをきわめて効率よく濃縮し抽出可能な手法が理学部で開発され、LC/MS-MS を組み合わせて、ヒト血漿ペプチドームが完成されるに至り、北里大学発の新規生理活性ペプチドが同定できる可能性が高くなった。その成果を活用して、今回の研究では proGIP 由来の生理活性因子が存在する可能性を示唆することができた。今後、これらの中から新規生理活性ペプチドを正確に同定し、その正確な生理作用、作用機序、発現調節機序の解明が必要である。

7. 謝辞

本論文は筆者が北里大学大学院 医療系研究科医学専攻博士課程臨床医科学群 内分泌代謝内科学に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻教授 七里眞義先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、またその遂行にあたり終始ご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。北里大学理学部物理学科物性物理学講座教授・疾患プロテオミクスセンター センター長 小寺義男先生には研究遂行にあたり日頃よりご指導戴きました。ここに深謝の意を表します。また内分泌代謝内科学教室技術員 加藤由起子様には多くの技術支援を戴き、厚く御礼申し上げます。医療系研究科 内分泌代謝内科学研究室および理学部物理学科 物性物理学教室の各位には研究遂行にあたり日頃より有益な討論・御助言を戴き感謝の意を表します。

8. 引用文献

- 1) Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. J Clin Endocrinol Metab 1973; 37: 826.
- 2) Takeda J, Seino Y, Tanaka K, Fukumoto H, Kayano T, Takahashi H, et al. Sequence of an intestinal cDNA encoding human gastric inhibitory polypeptide precursor. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 7005-8.
- 3) Fehmann HC, Göke R, Göke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. Endocr Rev 1995; 16(3): 390-410.
- 4) Seino Y, Yabe D. Glucose-dependent insulinitropic polypeptide and

- glucagon-like peptide-1: Incretin actions beyond the pancreas. *J Diabet Invest* 2013; 4(2): 108-30.
- 5) Erdogdu Ö, Nathanson D, Sjöholm Å, Nyström T, Zhang Q. Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 325: 26-35.
 - 6) Nyström T, Gutniak MK, Zhang Q, Zhang F, Holst JJ, Ahrén B, Sjöholm Å. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E1209-15.
 - 7) Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, Tomoyasu M, Nohtomi K, Kim-Kaneyama J, et al. Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia* 2011; 54: 2649–59.
 - 8) Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T, Takahashi H, Nomura F, Maeda T et al. High-Yield Peptide-Extraction Method for the Discovery of Subnanomolar Biomarkers from Small Serum Samples. *J Proteome Res* 2010; 9: 1694-705.
 - 9) Saito T, Kawashima Y, Minamida S, Matsumoto K, Araki K, Matsui T, et al. Establishment and application of a high-quality comparative analysis strategy for the discovery and small-scale validation of low abundance biomarker peptides in serum based on an optimized novel peptide extraction method. *J Electrophoresis* 2013; 57: 1-9.
 - 10) Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 1993; 133(6): 2861-70.
 - 11) MacDonald PE, El-kholy W, Riedel MJ, Salapatek AMF, Light PE, Wheeler MB. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51(Suppl 3): S434-42.
 - 12) Zhong Q, Bollag RJ, Dransfield DT, Gasalla-Herraiz J, Ding KH, Min L, et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide signaling pathways in endothelial cells. *Peptides* 2000; 21 1427-32.
 - 13) Gallego-Colon E, Wojakowski W, Francuz T. Incretin drugs as modulators of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2018; 278: 29-38.
 - 14) Almutairi M, Al Batran R, Ussher JR. Glucagon-like peptide-1 receptor

- action in the vasculature. *Peptides* 2019; 111: 26-32.
- 15) Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 2002; 8(7): 738-42.
 - 16) Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, et al. Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. *Mol Endocrinol* 2006; 20(7): 1644-51.
 - 17) Fadini GP, Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: Beyond GLP-1. *Vascul Pharmacol* 2011; 55: 10-16.
 - 18) Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 1986; 261: 11880-9.

9. 業績目録

9-1. 原著

1. Masaki T, Shichiri M. Glucose-dependent insulintropic polypeptide stimulates the release of a spectrum of biologically active proteins in human endothelial cells. *Kitasato Med J*, 51(1): (in press).
2. Takada T, Masaki T, Hoshiyama A, Toki T, Kamata Y, Shichiri M. Tolvaptan alleviates excessive fluid retention of nephrotic diabetic renal failure unresponsive to furosemide. *Nephrology* 2018; 23: 883-886.
3. Hayashi A, Takano K, Masaki T, Yoshino S, Ogawa A, Shichiri M: Distinct biomarker roles for HbA1c and glycated albumin in patients with type 2 diabetes on hemodialysis. *J Diabet Complications* 2016; 30(8): 1494-1499.
4. Ogawa A, Fujimoto K, Hayashi A, Chida S, Sato K, Takai K, Masaki T, Suzuki A, Kamata Y, Takano K, Koyama T, Shichiri M: Physiological fluctuations of human plasma total salusin- β , an endogenous parasympathomimetic / proatherosclerotic peptide. *Peptides* 2014; 59: 83-88.

9-2. 著書

1. 正木嗣人、七里眞義: 内分泌臨床検査マニュアル. 第1版、東京、日本医事新報社、223-229 頁、2017.

2. 正木嗣人、七里眞義：内分泌代謝専門医ガイドブック．第4版、東京、診断と治療社、442-444 頁、2016.

9-3. 総説・講座

なし

9-4. 症例・臨床治験・その他

1. 正木嗣人、市川雷師、小川顕史、鎌田裕二、高野幸路、七里眞義：1型糖尿病と診断されていたが、反復する有痛性筋痙攣を契機にミトコンドリア糖尿病と確定診断された1例．糖尿病 2017; 60(2): 91-97.
2. 桃園明、市川雷師、河合沙友希、星山綾子、井上光子、鈴木陽彦、正木嗣人、高井久仁庸、山岸貴洋、小川惇郎、林哲範、鎌田裕二、高野幸路、七里眞義：授乳による血糖低下をCGMで確認し得たCSII使用中1型糖尿病の2症例．糖尿病と妊娠 2016; 16(1): 66-71.
3. Nihonyanagi S, Sunakawa K, Cui L, Masaki T, Wada T, Hoshiyama T, Nakamura M, Takayama Y, Kanoh Y, Ogawa Y, Shichiri M, Hanaki H. A very rare case of primary meningococcal arthritis in an adult male. Clin Case Rep 2015; 3(2): 76-80.
4. 鎌田裕二、大村和規、鈴木陽彦、正木嗣人、林哲範、高野幸路、七里眞義：アルコール性慢性膵炎による膵性糖尿病の治療経過中に著明な低カリウム血症をきたした1例．糖尿病 2014; 57(7): 520-526.
5. 畑石隆治、正木嗣人、高村元子、柳澤信之：肺間質陰影の原因検索中に肺腺癌が見出された一症例．北里医学 2009; 39: 151-154.