

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名            正木 嗣人



論 文 題 目

「GIP 及び GIP 関連ペプチドの生理活性探索研究」

指 導 教 授 承 認 印

七里 真 義



# GIP 及び GIP 関連ペプチドの生理活性探索研究

氏 名 正木 嗣人

---

( 以 下 要 旨 本 文 )

## 背景

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。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。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ことが主な作用であるが、近年様々な組織での膵外作用も明らかとなってきた。しかしこれらの作用に関して、GIP における報告はもう一つのインクレチンである glucagon-like peptide-1 (GLP-1)と比べ限定的である。GIP は 153 アミノ酸からなる前駆体プロタンパク質から生合成されるが、GIP と同時に生成され得る N 末端ペプチドの生理活性は現段階では確認されていない。

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、はるかに微量な存在量である未知の低存在量・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 (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る。その中から GIP プロタンパク由来のペプチドが false discovery rate (FDR) =0%でその配列が決定された。本ペプチド配列を化学合成したところ高純度に精製され、さらに十分な溶解性を示すことが確認され、更に安定同位体標識ペプチドを合成して LC-MS/MS によりヒト血中濃度を測定したところ、約 0.6nM の存在量であることが判明した。

## 目的

報告が限定的である GIP の血管内皮細胞への膵外作用を評価するため、サイトカインアレイを用い、培養細胞において GIP 添加による各種サイトカイン、増殖因子等のタンパクプロファイルの変化を評価した。

また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 プロタンパク由来のペプチド断片を化学合成し、培養細胞を用いてその生理活性を探索し機能解析を行うことで、新規生理活性因子を同定することを目的とした。

## 方法

まずヒト大動脈血管内皮細胞 (HAoEC) における GIP 受容体 (GIPR) の存在を確認するため、RT-PCR により GIPR mRNA の特異的増幅を確認した。また GIP に対する細胞内応答を確認する目的でペプチド添加による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度の変化を確認した。次いで HAoEC への GIP 添加の効果を確認するため、サイトカインをはじめ 105 個のタンパクを同時に検出可能なサイトカインアレイキットを用い、細胞培養上清におけるタンパクプロファイルを幅広く評価した。

また新規 proGIP 由来ペプチドの生理活性を探索するため、HAoEC を用いて、N 末端を 5-carboxyfluorescein 標識したペプチドを化学合成して培養細胞表面への結合を確認した。さらに、RT-PCR によりペプチド添加後の培養細胞の遺伝子発現の誘導を確認した。次いで本ペプチドの産生臓器を明らかにするため、特異的抗ペプチドポリクローナル抗体を作成し、ヒト組織アレイ標本を用いて免疫組織化学染色を行うことで主要臓器におけるペプチド発現の評価を行った。抗体はペプチドを家兎に複数回感作することで免疫反応により作成し、血清より Melon<sup>TM</sup> Gel Reagent を用い IgG を negative selection することで精製した。

## 結果

HAoEC より抽出した cDNA を用い RT-PCR を施行したところ、GIPR mRNA の特異的な増幅が確認された。また HAoEC における GIP への細胞内応答として、GIP 添加直後に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度の上昇が見られた。HAoEC における GIPR の存在及び GIP 添加による細胞内応答が確認されたため、次いでサイトカインアレイキットを用い、GIP 添加による HAoEC 培養上清中のタンパクプロファイルを広く評価した結果、Endoglin, Angiogenin, SDF-1 $\alpha$ , 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。

蛍光標識した新規 proGIP 由来ペプチドを、HAoEC に添加すると共焦点蛍光顕微鏡による観察で細胞表面へのペプチド結合が確認された。また同ペプチドは HAoEC において、RT-PCR により MMP-8 mRNA 量を濃度依存性かつ時間依存性に増加させた。proGIP 由来ペプチドの HAoEC への結合及び生理活性を有する可能性が示されたため、次いで組織アレイを用い免疫組織化学染色を施行し同ペプチドの発現臓器を解析した。その結果小腸以外にもその他全身臓器での発現が示唆された。

## 考察

HAoEC での GIPR の発現を RT-PCR において確認し、また同細胞への GIP 添加により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度の上昇が確認された。HAoEC における GIPR の存在及び、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  をシグナルとした経路の存在はすでに報告されている通りであり、本研究においてもこれらと同様の結果が改めて確認された。GIP の血管内皮に対する膜外作用に関しては一部の限られた報告がなされ

ているのみであり、大動脈血管内皮への GIP の腭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サイトカインアレイキットによる検討を行った。GIP 添加により、血管新生に関与するタンパクが複数増加し、また炎症性サイトカインなど多く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。これらの中で炎症性サイトカインの増加に関しては動脈硬化促進的に作用する可能性が高いが、SDF-1 $\alpha$ は動脈硬化進展に抑制的に作用する因子であることが報告されている。これらの相互的な作用により血管内皮への有益性の有無が規定されてくる可能性が考えられる。

また GIP は小腸に存在する 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。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。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。北里大学理学部プロテオミクスセンターで開発された手法を用い、ヒト血中より GIP プロタンパク由来のペプチド配列が決定され、この生理活性を探索した。HAoEC に N 末端に蛍光標識した proGIP 由来ペプチドを添加することで、細胞表面へのペプチドの結合が確認され、HAoEC への同ペプチドの添加により、MMP-8 mRNA の増加が確認された。以上から proGIP 配列の中に 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。次いで proGIP 由来ペプチドの発現臓器を検討すべく、同ペプチド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、小腸やその他主要臓器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、その他 GIP の発現プロファイルとは異なる主要臓器での発現も確認された。本ペプチドは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。同一の前駆タンパクに由来するにも関わらず、その産生臓器がそれぞれ異なる要因として、各ペプチドが異なる組織特異的翻訳後プロセッシングに由来する可能性が考えられる。

## 結論

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 によるタンパクレベ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より生理活性を有する新規 proGIP 由来ペプチドを同定した。その作用の一部として MMP-8 遺伝子を誘導する可能性が示唆された。