

5

特集 グルカゴン(膵α細胞)はどこまでわかったか

正確なグルカゴン測定法の開発と、それを用いた2型糖尿病のグルカゴン評価

小林雅樹, 北村忠弘

群馬大学 生体調節研究所 代謝シグナル解析分野

グルカゴン抑制作用を併せ持つ糖尿病薬が最近登場したことにより、グルカゴンが再注目されている。従来のグルカゴン測定法はグルカゴン関連ペプチドとの交差反応により正確な血中濃度の測定が難しく、糖尿病の病態診断には応用できなかった。一方、最近開発された新しい測定法であるサンドイッチELISAで2型糖尿病患者と健常者の血中グルカゴン濃度を比較検討した結果、以下の3点で有意差を認めた。①2型糖尿病患者は健常者より空腹時グルカゴン値が高い。②2型糖尿病患者は糖負荷後30分のグルカゴン値が低下しない。③2型糖尿病患者は食事負荷後30分のグルカゴン値が顕著に上昇する。さらに、食後30分のグルカゴン値の変化は耐糖能とは相関するが、インスリン値やインクレチン値とは相関しない。サンドイッチELISAによるグルカゴン測定が糖尿病の病態を診断するための新たな独立した指標として活用できる可能性がある。

はじめに

グルカゴンはインスリンが発見された2年後の1923年に血糖上昇物質として発見された古いホルモンであるが、これまで糖尿病領域ではインスリンの拮抗ホルモンとして、常に脇役的存在であった。しかしながら、約10年前にDPP-4阻害薬やGLP-1受容体作動薬といったグルカゴン分泌抑制作用を併せ持つ糖尿病治療薬が臨床応用されたことにより、グルカゴンに対する注目度は一気に増した。また、ほぼ同時期にグルカゴンは基礎医学的にも再注目された。2010年以降、膵α細胞欠損マウスやグルカゴン受容体欠損マウスが作製され、これらのマウスにストレプトゾトシンを投与して膵β細胞を破壊し、インスリン分泌を抑制しても、ほとんど血糖値は上

がらなかったからである。これらの結果は、血糖値が上がるための前提としては、インスリンがないことよりもグルカゴンがあることのほうが重要であることを示している。一方、インスリン研究に比べグルカゴン研究は遅れており、その最大の原因はグルカゴンの正確な測定系が存在しなかったからである。糖尿病におけるグルカゴンの異常についても意見が分かれ、実際の糖尿病診療においても血中グルカゴン濃度の測定はほとんど行われなかった。そのことは、現時点でも臨床検査におけるグルカゴン測定の保険適応はグルカゴノーマ疑いだけであり、糖尿病の病態診断目的には測定できないことから明らかである。本稿では従来のグルカゴン測定法の問題と、それを克服した新しいグルカゴン測定法の開発、ならびに、後者を用いた2型糖尿病患者におけるグルカゴン評価の結果につき、筆者らが行った多施設共同研究の結果を中心に概説する。

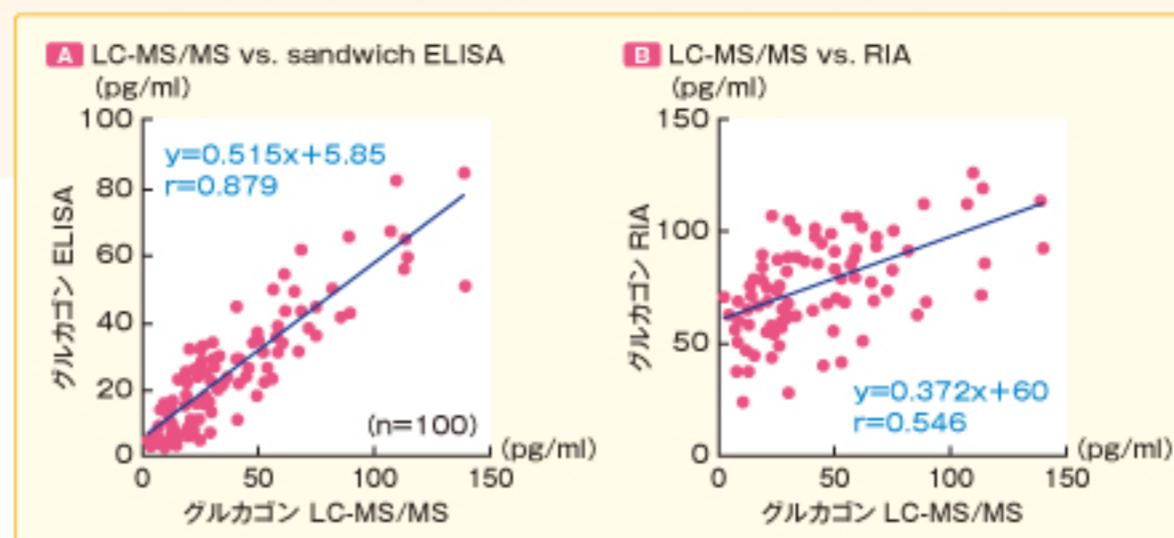


図1 LC-MS/MSとサンドイッチELISA (A), またはRIA (B) とのグルカゴン測定値の相関(文献5改変)

新規グルカゴン測定系の開発

これまでグルカゴン研究を困難にさせてきた理由として、血中濃度測定の難しさがあった。RIAを用いたグルカゴン測定の基礎はインスリンとほぼ同時期の1960年ごろには確立されていたが、この方法を用いると、血中に存在するグルカゴンに構造が類似したペプチドとの交差反応が問題となった。なぜなら、グルカゴンの前駆体であるプログルカゴンからは主に胃や腸でプロセッシングを受けて、グルカゴンと共通のアミノ酸配列を持った複数のペプチドが分泌されるからである。これはプロインスリンからインスリンとC-ペプチドの2つしか産生されないのとは対照的である。そこで、従来のグルカゴン測定法はグルカゴンのC末断端と特異的に反応する断端認識抗体が使用されてきた(グルカゴン類似ペプチドの多くはC末構造がグルカゴンと異なる)。しかしながら、最近の精密分析により、グルカゴンとC末構造が共通であるグリセンチン(1-61)やグルカゴン(3-29)、グルカゴン(19-29)などの血中での存在が明らかとなり、C末断端認識抗体でも交差反応を起こす可能性が強く示唆された。これらの問題を克服すべく、最近開発されたのがN末断端認識抗体とC末断端認識抗体の両方を用いたサンドイッチELISA法である。この測定法を用いると、C末構造が同じペプチドとの交差反応は避けられる。Holst博士らはMerckodia社のサンドイッチELISA (Glucagon ELISA #10-1271-01) が現時点で最も正確にグルカゴンを測定できると報告した^{1,2)}。しかしながら、筆者らを含め、国内で行われたいくつかの交差反応試験では、

Merckodia社のサンドイッチELISAはいくつかのグルカゴン関連ペプチドとの交差反応性が数%程度確認された^{3,4)}。すなわち、サンドイッチELISAといえども測定原理は免疫アッセイのままであり、抗体による非特異的な交差反応を100%除外することはできない。筆者らは抗体を用いる免疫アッセイそのものの問題を克服すべく、原理の異なる新しい測定法として、質量分析装置を用いたグルカゴン測定系(LC-MS/MS)を開発した⁵⁾。誌面の都合上、詳細は別稿⁶⁾を参照いただきたいが、免疫アッセイでは交差反応を起こすグルカゴン関連ペプチドでも分子量はグルカゴンと異なるため、この方法では検出しない。さらに、¹³Cの安定同位体グルカゴンを用いてキャリブレーションすることで、測定前処理における回収率やMSにおけるイオン化抑制などを検体ごとに補正でき、定量性も担保されている。しかしながら、LC-MS/MSによるグルカゴン測定を臨床検査に応用するには、以下の理由から、現時点では困難と考えられた。まず、複数検体を同時に測定することが難しく、測定に時間がかかる。さらに、測定装置が高額であり、人件費もかかることから、検体あたりの測定費用が高額になる。したがって、機器の技術革新により測定時間や費用の問題がクリアできれば、将来的にはグルカゴンはLC-MS/MSでの測定が標準になる可能性はあるが、現時点では少なくともLC-MS/MSの測定値に最も近い値を示す免疫アッセイを臨床検査に採用すべきである。実際に、健常者の血液検体を用いて、LC-MS/MSと2種類の免疫アッセイ間でのグルカゴン測定値の相関関係を解析した結果を^{図1}に示す。Merckodia社のサンドイッチELISAとLC-MS/MSの値に一致はみられないものの、おおむね良好な相関は得られている(^{図1}-A)⁵⁾。