

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 産生に対する  
小胞体ストレスの影響の研究

東北大学大学院薬学研究科

医療薬学専攻

林 寛人

## 本論文中に用いた略語の一覧

18s rRNA	18s ribosomal RNA
2-BA	2-bromohexadecanoic acid
BiP	binding immunoglobulin protein
CS	calf serum
C/EBP	CCAAT-enhancer binding protein
CHOP	C/EBP homologous protein
cDNA	complementary DNA
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER stress	endoplasmic reticulum stress
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLP-1	glucagon-like peptide 1
GPR120	G-protein coupled receptor 120
GPR40	G-protein coupled receptor 40
HFD	high fat diet
IBMX	isobutylmethylxanthine
LPS	lipopolysaccharide
mRNA	messenger RNA
PC1/3	prohormone convertase 1/3
PERK	double-stranded RNA-like endoplasmic reticulum-regulated kinase
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction

STD	standard diet
TLR4	toll-like receptor 4
XBP1	X-box-binding protein 1

## 目次

1. 序論	…1
2. 実験材料	…4
2-1. 細胞	…4
2-2. 試薬	…4
2-3. 薬物	…7
2-4. プライマー	…7
2-5. 抗体	…8
2-6. キット	…8
3. 試薬の調製	…9
3-1. 細胞培養関連試薬の調製	…9
3-2. Real-time polymerase chain reaction (PCR) 法関連試薬の調製	…12
3-3. PC1/3 活性測定法関連試薬の調製	…13
3-4. Western blot 法関連試薬の調製	…14
4. 実験方法	…19
4-1. マウス実験	…19
4-1-2. グルコース刺激による GLP-1 およびインスリン分泌測定	…19
4-1-3. 腸管の回収	…19
4-2. 細胞の培養および薬物処理	…19
4-2-1. GLUTag 細胞の継代	…19
4-2-2. Plate への細胞の播種	…20

4-2-3.	細胞の薬物処理および刺激	…20
4-2-4.	細胞の脂肪酸処置	…20
4-3.	Real-time PCR 法	…21
4-3-1.	Total RNA の抽出	…21
4-3-2.	Reverse transcription (RT)	…21
4-3-3.	Real-time PCR	…22
4-3-4.	解析	…22
4-4.	PC1/3 活性測定法	…21
4-4-1.	細胞の回収	…22
4-4-2.	Bradford 法によるタンパク濃度の決定	…23
4-4-3.	PC1/3 活性の測定	…23
4-5.	Western blot 法	…23
4-5-1.	Total cell lysate の調製	…23
4-5-2.	Western blot	…24
4-6.	ELISA 法	…24
4-6-1.	細胞の回収	…24
4-6-2.	Bradford 法によるタンパク濃度の測定	…25
4-6-3.	GLP-1 ELISA	…25
4-6-4.	インスリン ELISA	…25
4-7.	RT-PCR 法	…25
4-7-1.	PCR 反応	…25
4-7-2.	アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の検出	…26
4-8.	統計処理	…26
5.	実験結果	…27

5-1.	マウス腸管からの GLP-1 分泌に対する高脂肪食負荷による影響	…27
5-1-1.	高脂肪食負荷による体重・血糖値・インスリン分泌への影響	…27
5-1-2.	高脂肪食負荷における GLP-1 分泌・産生への影響	…29
5-1-3.	高脂肪食負荷による腸管での小胞体ストレスの誘導	…30
5-2.	GLUTag 細胞における脂肪酸の影響	…30
5-2-1.	脂肪酸処置による小胞体ストレスの誘導	…30
5-2-2.	脂肪酸処置による PC1/3 酵素活性への影響	…33
5-2-3.	PC1/3 mRNA 発現量およびタンパクレベルへの脂肪酸処置の影響	…34
5-3.	GLUTag 細胞における LPS 処置による影響	…36
5-3-1.	LPS 処置による PC1/3 活性への影響	…36
5-3-2.	LPS 処置による PC1/3 mRNA 発現量およびタンパクレベルへの影響	…37
5-3-3.	LPS 処置による GLP-1 分泌への影響	…38
5-4.	GLUTag 細胞における活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS)の影響	…39
5-4-1.	パルミチン酸と 2-bromohexadecanoic acid (2-BA) の比較	…39
5-4-2.	抗酸化剤による PC1/3 酵素活性への影響	…40
5-5.	GLUTag 細胞におけるオレイン酸とパルミチン酸同時処置の影響	…41
5-5-1.	パルミチン酸による小体ストレスに対するオレイン酸の効果	…41
5-5-2.	パルミチン酸による PC1/3 タンパク減少及び活性低下に対するオレイン酸の効果	…42
5-5-3.	パルミチン酸による proglucagon タンパクに対する作用へのオレイン酸の効果	…43
5-5-4.	パルミチン酸による GLP-1 分泌に対する作用へのオレイン酸の効果	

	…44
5-6. GLUTag 細胞における小胞体ストレス誘導薬 thapsigargin の影響	…45
5-6-1. Thapsigargin の小胞体ストレスへの効果	…45
5-6-2. Thapsigargin の PC1/3 酵素活性への効果	…48
5-6-3. Thapsigargin の PC1/3 mRNA 発現量およびタンパクレベルへの効果	…49
5-6-4. Thapsigargin の proglucagon タンパクレベルへの効果	…50
5-6-5. Thapsigargin の GLP-1 分泌への効果	…51
6. 考察	…52
7. 謝辞	…59
8. 引用文献	…60

## 1. 序論

近年、世界中で 2 型糖尿病の患者数が増加している。我が国においても例外ではなく食事の欧米化や運動量の減少により肥満とそれに伴う 2 型糖尿病患者数が増加している。厚生労働省の推計によると、2011 年において男性の 33.0%、女性の 23.0% が糖尿病かその予備軍であることが示された<sup>1</sup>。2 型糖尿病は、自覚症状が少なく、糖尿病と診断された人でも、治療を受けていない人は 37.6% と約 4 割は治療を受けていないのが現状である<sup>1</sup>。高血糖な状態が長期間持続すると、三大合併症である糖尿病性の網膜症・腎症・末梢神経障害が引き起こされる。これらの合併症は細小血管障害とも呼ばれ、それぞれ、失明や人工透析導入、壊疽による下肢切断を誘発する。また、細小血管障害のあとも、血糖値が高い状態が続くと大血管障害をも引き起こし、脳梗塞や心筋梗塞などの死に直結する疾病を引き起こす。これらは、患者の quality of life (QOL) を著しく低下させるだけでなく、医療経済学的にも大きな負担となっていることが問題となっている。これまでの臨床研究から、早期からの治療介入が極めて重要で、高血糖が長く続いたあとから治療しても心筋梗塞などのリスクが低下しないこと(グルコースメモリー)が報告されている<sup>2,3</sup>。これは、糖尿病の発症メカニズムを理解し予防することが必要であるということを示している。しかしながら、糖尿病の発症メカニズムは未だ十分に明らかとされていない。

2 型糖尿病は、血糖値を減少させるホルモンであるインスリン産生・分泌細胞の膵 β 細胞の減少やそれに伴うインスリン分泌減少、またインスリンの標的臓器においてインスリンの効果が低下するインスリン抵抗性が引き起こされている病態である。特に、2 型糖尿病の患者の膵 β 細胞において小胞体ストレスが誘導されていることが報告されている<sup>4</sup>。そのため現在、2 型糖尿病の発症メカニズムの一つとして小胞体ストレスが考えられている。小胞体は、タンパクの成熟化や細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシスにかか



わっているオルガネラである。即ち、タンパクの折り畳みや糖鎖付加を担っており、また、細胞のシグナル伝達における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化にも関わっている。細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシスの障害や折り畳み不全のタンパクが蓄積した場合、小胞体は unfolded protein response (UPR) と呼ばれるシステムによって、障害を取り除こうとする。この応答反応は、小胞体ストレス感知センサーである double-stranded RNA-like endoplasmic reticulum-regulated kinase (PERK) や、inositol-requiring protein 1 alpha (IRE1 $\alpha$ ), activating transcription factor 6 (ATF6) により感知されタンパク合成の低下を介した負荷の軽減や、X-box-binding protein 1 (XBP1) と呼ばれる転写因子を介しシャペロンを増加させることで折り畳み不全タンパクをの減少させ、負荷を軽減する。XBP1 は、IRE1 $\alpha$  によって前駆体である unspliced XBP1 の mRNA から 26 塩基が切り出され、spliced XBP1 となりタンパクが産生される<sup>5,6</sup>。産生された spliced XBP1 のタンパクは、ER stress response element と呼ばれる配列に結合しタンパクのフォールディングを補助する binding immunoglobulin protein (BiP) といったシャペロンの転写を促進する<sup>5</sup>。しかし、これらの応答によっても負荷が軽減できない場合、C/EBP homologous protein (CHOP) の発現上昇を介して、細胞にアポトーシスを誘導し周囲の細胞への影響を防いでいる<sup>7,8</sup>。

飽和脂肪酸は、欧米食に多く含まれ、肥満時や糖尿病時において血中濃度が増加している。これは、インスリンの作用が不足しており脂肪分解が抑制されず、脂肪組織から遊離脂肪酸が分泌されているためである<sup>9</sup>。また、血中の飽和脂肪酸の増加は、2型糖尿病の危険因子である<sup>10-12</sup>。飽和脂肪酸の糖尿病誘発機構の一つとして、小胞体ストレスを誘導することが知られている。マウス膵 $\beta$ 細胞株である MIN6 細胞において、飽和脂肪酸であるパルミチン酸により小胞体ストレスが誘導され、アポトーシスの増加やインスリン分泌の低下が生じることが報告されている<sup>13</sup>。また、肝細胞や筋細胞にパルミチン酸を処置するとインスリン抵抗性が誘導されることも明らかにされている<sup>14,15</sup>。一方で、地中海料理や青魚などに多く含まれている不飽和脂肪酸や多価不飽和脂肪酸には飽和脂肪酸のような作用は報告されていない。不飽和脂肪酸は、飽和脂肪酸の小胞体

ストレスを緩和する効果や血中コレステロール低下作用が報告されており、一日摂取量の目標量が決められている<sup>16,17</sup>。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、小腸 L 細胞から分泌されるアミノ酸 31 個からなるペプチドホルモンで、分泌顆粒膜に存在する prohormone convertase 1/3 (PC1/3) によって proglucagon から切り出され、L 細胞において分泌顆粒として蓄えられている<sup>18</sup>。蓄えられた GLP-1 は、食事により摂取されるグルコース<sup>19</sup>、長鎖多価不飽和脂肪酸<sup>20</sup>などの増加を sweet taste receptor や GRP120 を介して認識したときに分泌され、さまざまな生理作用を示す<sup>21</sup>。膵 β 細胞に作用すると、血糖値上昇に応答して分泌されるインスリン分泌量を増加させる。また、膵 α 細胞に作用するとグルカゴン分泌を抑制する。近年、動物レベルにおいて、GLP-1 は膵 β 細胞の小胞体ストレスを緩和し、さらに、膵 β 細胞の量を増やすことが報告されている<sup>22</sup>。近年、新規の糖尿病治療薬として、GLP-1 アナログ製剤や GLP-1 を分解する酵素である dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) の阻害薬が多数上市され非常に優れた治療成果を上げている。また、これらの薬剤は糖尿病の治療だけではなく糖尿病によって機能が大きく低下する腎臓に対する保護作用や心筋梗塞後などの心臓の保護作用も報告されており GLP-1 関連薬の有用性が臨床において期待されている<sup>23,24</sup>。

これまでの研究から、肥満や糖尿病の患者<sup>25,26</sup>および高脂肪食を摂取させたマウス<sup>27</sup>において GLP-1 分泌が減少していることが報告されており、肥満や糖尿病における GLP-1 分泌低下のメカニズムを解明することは、糖尿病の発症メカニズムを理解することにおいて重要な位置を占めると考えられる。しかし、これまで栄養素と直接接触する小腸における過剰な栄養素の影響の詳細な報告は少ない。本研究では、マウスに高脂肪食を負荷し、食餌誘発性の肥満マウスを作製し、過栄養状態による小腸の生化学的変化を検討するとともに、マウス小腸 L 細胞株である GLUTag 細胞を用いた生化学的解析を行うことにより、脂質異常などを原因として誘発される過栄養ストレスが GLP-1 分泌を低下させる可能性について検討した。

## 2. 実験材料

### 2-1. 細胞

北海道大学大学院農学研究院 食品栄養学研究室

助教 比良徹 先生、ならびに

GLUTag 細胞

京都大学大学院薬学研究科 薬理ゲノミクス・ゲノム  
創薬科学

平澤明 准教授より供与

### 2-2. 試薬

Acrylamide

和光純薬工業株式会社

Acetic acid

和光純薬工業株式会社

Agarose S

株式会社ニッポンジーン

2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)

和光純薬工業株式会社

Ammonium persulfate (APS)

和光純薬工業株式会社

Bio-Rad Protein Assay

Bio-Rad Laboratories. Inc.

Block Ace

雪印乳業株式会社

Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA

ペプチド研究所

Bovine serum albumin, low endotoxin, fatty acid free (BSA)

Sigma-Aldrich

2-Bromopalmitic acid (2-BA)

Sigma-Aldrich

Bromophenol blue

和光純薬工業株式会社

Calcium chloride dihydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

和光純薬工業株式会社

Calf serum

ICN Biomedicals

Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ )

和光純薬工業株式会社

DEPC-Treated Water	Ambion
Disodium hydrogenphosphate 12-water ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	和光純薬工業株式会社
Diprotin A	ペプチド研究所
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	日水製薬株式会社
Ethanol	和光純薬工業株式会社
Ethidium bromide solution (10 mg/mL EtBr)	和光純薬工業株式会社
Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid, disodium salt, dehydrate ( $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ )	同仁化学研究所
Fetal bovine serum (FBS)	Biowest
Glucose	和光純薬工業株式会社
<i>L</i> -Glutamine	和光純薬工業株式会社
Glycerol	和光純薬工業株式会社
Glycine	和光純薬工業株式会社
HEPES	同仁化学研究所
KR62436	Sigma-Aldrich
Leupeptin	和光純薬工業株式会社
Lipopolysaccharide (LPS)	和光純薬工業株式会社
Magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	和光純薬工業株式会社
2-Mercaptoethanol (2-ME)	和光純薬工業株式会社
Methanol	和光純薬工業株式会社
<i>N</i> -acetyl- <i>L</i> -cysteine	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate ( <i>p</i> -NPP)	Sigma-Aldrich
Penicillin G potassium	明治製菓株式会社
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich
Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES)	同仁化学研究所

Ponceau S	Sigma-Aldrich
Potassium chloride (KCl)	和光純薬工業株式会社
Potassium dihydrogenphosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	和光純薬工業株式会社
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad Laboratories. Inc.
2-Propanol	和光純薬工業株式会社
RNAiso Plus	タカラバイオ株式会社
Sodium acetate	和光純薬工業株式会社
Sodium chloride (NaCl)	和光純薬工業株式会社
Sodium dihydrogenphosphate dehydrate (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	和光純薬工業株式会社
Sodium dodecylsulfate (SDS)	和光純薬工業株式会社
Sodium fluoride (NaF)	和光純薬工業株式会社
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	和光純薬工業株式会社
Sodium hydroxide (NaOH)	和光純薬工業株式会社
Sodium oleate	Sigma-Aldrich
Sodium orthovanadate (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Sodium palmitate	CHEM SERVICE
Streptomycin sulfate	明治製菓株式会社
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenediamine (TEMED)	和光純薬工業株式会社
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	和光純薬工業株式会社
Triton X-100	和光純薬工業株式会社
Trypsin	Invitrogen
Tween 20	和光純薬工業株式会社

## 2-3. 薬物

Thapsigargin

和光純薬工業株式会社

Forskolin

和光純薬工業株式会社

Isobutylmethylxanthine (IBMX)

和光純薬工業株式会社

## 2-4. プライマー

18S rRNA<sup>28</sup>

Forward : 5'-TTG ACG GAA GGG CAC CAC CAG-3'

Reverse : 5'-GCA CCA CCA CCC ACG GAA TCG-3'

Pcsk1 (PC1/3)<sup>29</sup>

Forward : 5'-ACA TGG GGA GAA TCC TGT AGG C-3'

Reverse : 5'-CAT GGC CTT TGA AGG AGT TCC TTG T-3'

CHOP<sup>30</sup>

Forward : 5'-CCA ACA GAG GTC ACA CGC AC-3'

Reverse : 5'-TGA CTG GAA TCT GGA GAG CGA-3'

BiP<sup>30</sup>

Forward : 5'-GCT TCG TGT CTC CTC CTG AC-3'

Reverse : 5'-TAG GAG TCC AGC AAC AGG CT-3'

XBP1<sup>15</sup>

Forward : 5'-ACC TGA GCC CGG AGG AGA AA-3'

Reverse : 5'-GTC CAG AAT GCC CAA AAG GA-3'

#### GAPDH

Forward : 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'

Reverse : 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

株式会社 ファスマック

#### Gcg (Proglucagon)

Forward : 5'-TTC GCA GCT CAG GCT CAC A-3'

Reverse : 5'-GCT GCC TTG CAC CAG CAT TA-3'

タカラバイオ株式会社

#### 2-5. 抗体

Goat anti-actin (I-19) polyclonal antibody

Santa Cruz Biotechnology

Mouse anti-GLP-1 (HYB 147-12) monoclonal antibody

Santa Cruz Biotechnology

Rabbit anti-PC1/3 polyclonal antibody

Abcam

Phospho-PERK (Thr980) monoclonal antibody

Cell Signaling Biotechnology

#### 2-6. キット

PrimeScript® RT Master Mix

タカラバイオ株式会社

SYBR® Premix EX Taq™ II (Tli RNaseH Plus), Bulk

タカラバイオ株式会社

TaKaRa Ex Taq®

タカラバイオ株式会社

Western Lightning® Plus-ECL

Perkin Elmer

レビス® GLP-1 (Active)

株式会社 シバヤギ

### 3. 試薬の調製

#### 3-1. 細胞培養関連試薬の調製

##### DMEM

DMEM	4.75	g
NaHCO <sub>3</sub>	0.75	g
L-Glutamine	0.292	g
Penicillin G potassium	9	mg
Streptomycin sulfate	25	mg
<hr/>		
MilliQ water	500	mL

DMEM を MilliQ water に溶解した後、高圧蒸気滅菌 (121°C、15 分間) し、他の試薬を加えて、pore size 0.22  $\mu\text{m}$  の membrane filter で濾過滅菌した。

##### FBS および CS

56°C で 30 分間非働化処理を行った後、1,000  $\times g$  で 20 分間遠心し、その上清を用いた。

##### 10 $\times$ Phosphate-buffered saline (10 $\times$ PBS)

NaCl	40	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> $\cdot$ 12H <sub>2</sub> O	14.5	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g
KCl	1	g



---

MilliQ water	500	mL
--------------	-----	----

調製後、121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

#### PBS

10×PBS を MilliQ water で 10 倍希釈し、再度 121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌した後に使用した。

#### 2% EDTA (pH 7.4)

EDTA · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	2	g
--------------------------------	---	---

MilliQ water	100	mL
--------------	-----	----

NaOH で pH 7.4 に調整後、121°C で 15 分間、高圧蒸気滅菌処理した。

#### 0.25% Trypsin、0.02% EDTA 含有 PBS

2.5% Trypsin	5	mL
--------------	---	----

2% EDTA (pH 7.4)	0.5	mL
------------------	-----	----

PBS	44.5	mL
-----	------	----

#### Glucose free Krebs-Ringer buffer

NaCl	7.012	g
------	-------	---

KCl	372.0	mg
-----	-------	----

CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	294.0	mg
---------------------------------------	-------	----

MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	203.0	mg
---------------------------------------	-------	----

NaHCO <sub>3</sub>	1.88	g
--------------------	------	---

---

MilliQ water	1000	mL
--------------	------	----

調製後、pore size 0.22  $\mu\text{m}$  の membrane filter で濾過滅菌した。

10  $\times$  PIPES buffer (pH 7.2)

NaCl	34.81	g
KCl	1.865	g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.405	g
PIPES	37.8	g
NaOH	8	g

---

MilliQ water に溶かし NaOH で pH 7.2 に調整後、500 mL にメスアップし、pore size 0.22  $\mu\text{m}$  の membrane filter で濾過滅菌した。

100 mM Diprotin A

Diprotin A	5	mg
MilliQ water	139	$\mu\text{L}$

---

1.5 mM Thapsigargin

Thapsigargin	1	mg
Ethanol	976	$\mu\text{L}$

50% Ethanol solution (v/v)

Ethanol に MilliQ を加え 50% ethanol solution とした。

100 mM Sodium oleate

Sodium oleate	152	mg
50% Ethanol solution (v/v)	5	mL

100 mM Sodium palmitate

Sodium palmitate	139	mg
50% Ethanol solution (v/v)	5	mL

3-2. Real-time polymerase chain reaction (PCR) 法関連試薬の調製

75% Ethanol

Ethanol	37.5	mL
DEPC-treated water	15	mL

1 M Tris (pH 8.0)

Tris	6.06	g
------	------	---

---

i.e. water に溶かし HCl で pH 8.0 に調整した後、50 mL にメスアップした。

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	9.31	g
--------------------------------	------	---

---

i.e. water に溶かし NaOH で pH 8.0 に調整した後、50 mL にメスアップした。

100 mM Tris、10 mM EDTA (10 × TE、pH 8.0)

1M Tris (pH 8.0)	10	mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2	mL
i.e. water	88	mL

調製後、121°Cで 15 分間、高圧蒸気滅菌した。i.e. water で 10 倍希釈後に使用した。

Real-time PCR 反応溶液

SYBR® <i>Premix EX Taq</i> <sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus), Bulk	10	vol
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8	vol
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8	vol
MilliQ water	6.8	vol

1 サンプルあたり 18.4 μL 使用した。

### 3-3. PC1/3 活性測定法関連試薬の調製

1 M Acetic acid

Acetic acid	30	mL
MilliQ water	470	mL

1 M Sodium acetate

Sodium acetate	41	g
MilliQ water	500	mL

Stop solution (1M acetate buffer, pH 4.8)

1 M の sodium acetate に対して、1 M の acetic acid を加えて pH 4.8 に調整した。

4 mM Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA (PC1/3 蛍光基質)

Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA	5.4	mg
MilliQ water	1.6	mL

3-4. Western blot 法関連試薬の調製

Lysis buffer

HEPES	2.383	g
Triton X-100	5	mL
Glycerol	50	mL
EDTA · 2Na	0.186	g
<hr/>		
MilliQ water	500	mL

使用直前に、lysis buffer 1 mL に対して NaF (1 M in MilliQ water) 50  $\mu$ L、*p*-NPP (250 mM in MilliQ water) 10  $\mu$ L、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (0.1 M in MilliQ water) 10  $\mu$ L、PMSF (1 mg/mL in isopropanol) 10  $\mu$ L、leupeptin (10 mg/mL in MilliQ water) 1  $\mu$ L を加えた。

30% (w/v) acrylamide 保存液

Acrylamide	29.2	g
------------	------	---

BIS	0.8	g
<hr/>		
MilliQ water	100	mL

分離ゲル用 buffer (pH 8.8)

Tris	90.86	g
SDS	2	g
<hr/>		

MilliQ water に溶かし HCl で pH 8.8 に調整後 500 mL にメスアップした。

濃縮ゲル用 buffer (pH 6.8)

Tris	30.3	g
SDS	2	g
<hr/>		

MilliQ water に溶かし HCl で pH 6.8 に調整後 500 mL にメスアップした。

APS (200 mg/mL)

APS	0.2	g
MilliQ water	1	mL

10 × Running buffer

Tris	30	g
Glycine	142.5	g
SDS	10	g
<hr/>		

MilliQ water	1000	mL
--------------	------	----

MilliQ water で 10 倍希釈後に使用した。

#### 5 × Transfer buffer

Tris	15.14	g
------	-------	---

Glycine	72.07	g
---------	-------	---

MilliQ water	1000	mL
--------------	------	----

#### 1 × Transfer buffer

5 × Transfer buffer	500	mL
---------------------	-----	----

i.e. water	1500	mL
------------	------	----

Methanol	500	mL
----------	-----	----

#### 10 × Tris-buffered saline (TBS)

Tris	96.6	g
------	------	---

NaCl	350.6	g
------	-------	---

MilliQ water に溶かし、HCl で pH 7.5 に調整後 2000 mL にメスアップした。

#### TTBS

10 × TBS	80	mL
----------	----	----

MilliQ water	720	mL
--------------	-----	----

Tween 20	0.8	mL
----------	-----	----

#### 10 × Ponceau S 溶液

Ponceau S	2	g
-----------	---	---

Acetic acid	100	mL
-------------	-----	----

MilliQ water で 10 倍希釈して使用した。

#### 5 × Sample buffer

濃縮ゲル用 buffer	7.8	mL
--------------	-----	----

SDS	3.0	mg
-----	-----	----

Glycerol	10	mL
----------	----	----

2-Mercaptoethanol (2-ME)	5	mL
--------------------------	---	----

Bromophenol blue	1.5	mg
------------------	-----	----

#### ABC-HRP 溶液

1% BSA-TTBS	30	mL
-------------	----	----

Vectastain ABC-HRP kit A 液	1	滴
----------------------------	---	---

Vectastain ABC-HRP kit B 液	1	滴
----------------------------	---	---

### 3-5. RT-PCR 法関連試薬の調製

#### 50 × TAE buffer

Tris	121	g
------	-----	---



Acetic acid	29	mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	50	mL
<hr/>		
MilliQ water	500	mL

#### 3.5% Agarose gel

Agarose S	1.05	g
1 × TAE	30	mL

#### 2% Agarose gel

Agarose S	0.6	g
1 × TAE	30	mL

#### 0.5 µg/mL EtBr 溶液

10 mg/mL EtBr solution	12.5	µL
IEW	250	mL

## 4. 実験方法

### 4-1. マウス実験

#### 4-1-1. マウス飼育

5 週齢の雄性 C57BL/6N マウス (SLC 株式会社) を SPF 環境下、12 時間の明暗周期にて飼育した。自由摂食下において、摂取エネルギーが脂質から 4.6% のコントロール食 (STD) または、60% の高脂肪食 (HFD) を与え 8 週間飼育した。1 週間ごとに、4 時間絶食後の血糖値および体重を測定しモニタリングした。

#### 4-1-2. グルコース刺激による GLP-1 およびインスリン分泌測定

4-1-1. に記した方法で飼育したマウスを 12 時間絶食後、20 mg/kg の KR62436 (DPP-4 阻害薬) を経口投与した。その 30 分後、マウスの尻尾から 100  $\mu$ l の血液を haematokrit-kapillaren<sup>®</sup> にて回収し、1 mM の diprotin A (DPP-4 阻害薬) を 10  $\mu$ l 入れておいた 1.5 mL チューブに移し 0 分のサンプルとした。その後、1.5 g/kg のグルコースを経口投与し、その 15 分後、0 分のサンプルと同様にマウスの尻尾から血液を回収した。回収した血液を遠心したのち、ELISA 法によって、active GLP-1 およびインスリン血中濃度を測定した。

#### 4-1-3. 腸管の回収

4-1-1. に記した方法で飼育したマウスを 12 時間絶食後、回腸と盲腸の接合部より 2 cm 前の腸管を摘出した。

### 4-2. 細胞の培養および薬物処理

#### 4-2-1. GLUTag 細胞の継代

GLUTag 細胞を 10% FBS 含有 DMEM に懸濁して、100 mm 培養 dish (Becton, Dickinson) に播種し、37°C、飽湿、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。細胞が dish を約 80-90% 占めるまで増殖したところで培養上清を除き、PBS で細胞を 2 回洗浄した。すぐに、1 mL の 0.25% trypsin、0.02% EDTA 含有 PBS を dish に加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で約 1 分間インキュベートして細胞を浮遊させた。ただちに dish 内の細胞浮遊液を 1 mL の CS を入れた遠沈管に回収した。さらに、8 mL の PBS で dish を洗いこみ、それを同じ遠沈管に回収した。得られた細胞浮遊液を 300 × g で 3 分間遠心した後、その上清を除き、得られた細胞を DMEM に再懸濁した。その適量を新しい 100 mm 培養 dish に播種し、1 mL の FBS および全量が 10 mL になるように DMEM を加えて 37°C、飽湿、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### 4-2-2 Plate への細胞の播種

4-2-1. に記した方法で得られた細胞浮遊液中の細胞数を、血球計算板を用いて算定し、 $2.5 \times 10^5$  もしくは  $5.0 \times 10^5$  cells/mL となるように 10% FBS 含有 DMEM で細胞浮遊液を希釈した。これを、12-well plate (Becton, Dickinson) の各 well に 1 mL、もしくは 24-well plate (Becton, Dickinson) の各 well に 500  $\mu$ L 播種し、37°C、飽湿、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養した。

#### 4-2-3. 細胞の薬物処理および刺激

4-2-2. に記した方法で培養した細胞を、37°C に温めた PBS で 3 回洗浄した後、各種濃度の薬物を含む 10% FBS 含有 DMEM で任意の時間刺激した。この時、全ての群で薬物の vehicle の濃度を 0.1% になるようにした。

#### 4-2-4. 細胞の脂肪酸処置

4-2-2. に記した方法で培養した細胞を、37°C に温めた PBS で 3 回洗浄した後、脂

脂肪酸を含む 10% FBS 含有 DMEM で任意の時間刺激した。脂肪酸は、fatty acid free BSA を 10% FBS 含有 DMEM に 2% になるように溶解したのち、パルミチン酸またはオレイン酸を任意の濃度になるように加えた。その後、45°C で 5 分間インキュベーションし BSA と脂肪酸を結合させたのち、37°C に戻した後に処置した。

#### 4-3. Real-time PCR 法

##### 4-3-1. Total RNA の抽出

24-well plate に播種し任意の時間処置した細胞を 氷冷した PBS で 3 回洗浄した後、500  $\mu$ L の RNAiso Plus を well に加えなじませ、細胞溶解液を 1.5 mL チューブに回収し、室温で 5 分間静置した。CHCl<sub>3</sub> を 50  $\mu$ L 加えよく攪拌した後、12,000  $\times$  g で 4°C、15 分間遠心し、上層を新たな 1.5 mL チューブに回収した。2-Propanol を 500  $\mu$ L 加え、室温で 10 分間静置した後、12,000  $\times$  g で 4°C、10 分間遠心し上清を除いた。75% Ethanol を 500  $\mu$ L 加え、7,500  $\times$  g で 4°C、10 分間遠心し、沈殿を残して上清を除いた。約 10 分間乾燥させ、1  $\times$  DEPC treated water を 50  $\mu$ L 加え沈殿を溶解させた。得られた total RNA は -80°C で保存した。

##### 4-3-2. Reverse transcription (RT)

本操作は PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix (Perfect Real Time) を用いて付属のプロトコールに準じて行った。4-3-1. で抽出した total RNA 溶液の濃度を NanoDrop<sup>®</sup> spectrophotometer ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。500 ng に相当する total RNA 溶液を PCR tube (ワトソン株式会社) にとり、RNase Free dH<sub>2</sub>O を加えて全量を 8  $\mu$ L にした後、5  $\times$  PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix (Perfect Real Time) を 2  $\mu$ L 加えて全量を 10  $\mu$ L とした。スピンドウン後、PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient (タカラバイオ株式会社) を用いて RT 反応を行った。得られた cDNA 溶液は DEPC-treated water で 20 倍希釈した後 -20°C で保存した。RT 反応条件は以下の通りである。

37°C	85°C	4°C
15 min	5 sec	∞

#### 4-3-3. Real-time PCR

本操作は SYBR® Premix EX Taq™ II (Tli RNaseH Plus), Bulk を用いて付属のプロトコールに準じて行った。はじめに PCR 反応溶液を調製し、PCR tube (日本ジェネティクス株式会社) に 18 µL ずつ分注した。そこに、4-3-2. で得られた cDNA 溶液を 2 µL 加え、スピンドウン後、Thermal Cycler Dice™ Real Time System (タカラバイオ株式会社) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応条件は以下の通りである。

Hold	2 Step PCR			Dissociation	
95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
3 min	5 sec	60 sec	15 sec	30 sec	15 sec
<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> 40 cycles					

#### 4-3-4. 解析

各サンプルの threshold cycle (Ct) 値は 2nd derivative maximum 法により算出し、相対的検量線を作成して各遺伝子の PCR 増幅効率が 100% に近いことを確認した後、 $\Delta\Delta Ct$  法により RNA 相対量に換算した。

### 4-4. PC1/3 活性測定法

#### 4-4-1. 細胞の回収

以下の操作は氷上で行った。24-well plate に播種し任意の時間処置した細胞を 4°C の PBS で 3 回洗浄した後、1 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 1 × PIPES buffer 200 μL を各 well に加え、セルスクレーパーで剥し、1.5 mL チューブ (株式会社イナ・オプティカ) に回収した。ソニケーション(Handy Sonic Tomy) を行い、15,000 × g で 10 分間遠心し新たな 1.5 mL チューブに上清を回収した。

#### 4-4-2. Bradford 法によるタンパク濃度の決定

Bradford reagent を必要量とり i.e. water で 5 倍希釈し、濾紙 (GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社) で濾過した。また、4-3-1 で得られた細胞サンプルも i.e. water で任意の倍率で希釈した。10 μL の各種濃度 standard BSA 溶液および希釈した細胞サンプルを 96-well plate (住友ベークライト株式会社) に加えた後、さらに各 well に 200 μL の 5 倍希釈 Bradford reagent を加えた。595 nm における吸光度を microplate reader iMark™ (Bio-Rad) により測定し、細胞サンプルのタンパク濃度を決定した。

#### 4-4-3. PC1/3 活性の測定

4-4-2. で得られたサンプルから、一定量のタンパクを含む細胞サンプルを 1.5 mL チューブにとった。さらに、細胞サンプルと合わせて 180 μL となるように 0.1% BSA-1 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 1 × PIPES buffer を加えた。そこに 20 μL の 4 mM 蛍光基質 (Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA) を加え、37°C で反応させた。30 分後に 800 μL の反応停止液 (1M acetate buffer pH 4.8) を加え、サンプルを 10 mm 角の石英セルに取り、emission 460 nm/excitation 380 nm の波長で fluorescence spectrophotometer F-2000 (株式会社日立製作所) を用いて蛍光強度を測定した。

#### 4-5. Western blot 法

##### 4-5-1. Total cell lysate の調製

以下の操作は氷上で行った。12-well plate に播種し任意の時間処置した細胞を 4°C の PBS で 3 回洗浄した後 lysis buffer を 75  $\mu$ L 加え、セルスクレーパーで細胞を剥し、1.5 mL チューブに回収した。ソニケーションを行い、15,000  $\times$  g で 10 分間遠心し 60  $\mu$ L の上清を新たな 1.5 mL チューブに回収した。そこに 5  $\times$  sample buffer を 15  $\mu$ L 加え、95°C で 5 分間熱処理したサンプルを -20°C で保存した。

#### 4-5-2. Western blot

4-5-1. で得られたサンプルを任意の濃度の polyacrylamide gel に 15  $\mu$ L ずつアプライし、125 V の定電圧で約 90 分間電気泳動を行った。泳動終了後、gel を transfer buffer に浸して洗浄し、セミドライ型 blotting 装置 (Bio-Rad) を用いてゲル一枚当たり 150 mA の定電流で 1 時間 PVDF 膜、またはニトロセルロース膜に blotting した。PVDF 膜の場合、methanol に約 10 分間浸し、さらに transfer buffer に浸してから blotting に用いた。Blotting 終了後に膜を Block Ace に 1 時間以上浸して blocking を行った後、TTBS で洗浄し、1 次抗体に浸して 4°C、over night で反応させた。反応終了後、TTBS で 10 分間ずつ 4 回洗浄し、2 次抗体としてビオチン化抗体あるいは HRP 標識抗体を用いて、4°C で 3~6 時間浸し反応させた。反応終了後、TTBS で 10 分間ずつ 4 回洗浄した。2 次抗体としてビオチン化抗体を用いた場合、ABC-HRP 溶液に浸して常温で 30 分間振とうし、TTBS で 10 分間ずつ 4 回洗浄した後、Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL を基質として化学発光させ、ライトキャプチャー AE-6960 型 (アトー株式会社) で検出した。2 次抗体として HRP 標識抗体を用いた場合は、TTBS 洗浄後に Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL で発光させ検出した。

#### 4-6. ELISA 法

##### 4-6-1. 細胞の回収

以下の操作は氷上で行った。24-well plate に播種し任意の時間処置した細胞を 4°C の

PBS で 3 回洗浄した後、0.5% BSA-0.1 mM diprotin A 含有 glucose free Krebs-Ringer buffer を 250  $\mu$ L 各 well に加えセルスクレーパーで剥し、1.5 mL チューブに回収した。ソニケーションを行い、15,000  $\times$  g で 10 分間遠心し、上清を新たな 1.5 mL チューブに回収した。得られたサンプルは  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 4-6-2. Bradford 法によるタンパク濃度の測定

4-4-2. に準ずる。4-6-1. で得られたサンプルを用いて Bradford 法を行い、得られたサンプルのタンパク濃度を決定した。

#### 4-6-3. GLP-1 ELISA

本操作はレビス<sup>®</sup> GLP-1 (Active) を用いて付属のプロトコールに準じて行った。4-5-1. で得られたサンプルは、キット付属の緩衝液を用いて 100 倍に希釈して測定した。

#### 4-6-4. インスリン ELISA

本操作はマウスインスリン測定キットを用いて付属のプロトコールに準じて行った。サンプルは、適宜キット付属の緩衝液を用いて希釈した。

#### 4-7. RT-PCR 法

##### 4-7-1. PCR 反応

本操作は、*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> を用いて付属のプロトコールに準じて行った。反応溶液、18  $\mu$ L に対して、4-3-2. で得られた cDNA 溶液を 2  $\mu$ L ずつ加え、PCR を行った。PCR の反応条件は、以下の通りである。

##### GAPDH

94 $^{\circ}\text{C}$

94 $^{\circ}\text{C}$

57 $^{\circ}\text{C}$

72 $^{\circ}\text{C}$

72 $^{\circ}\text{C}$

4 $^{\circ}\text{C}$



3 min	0.5 min	0.5 min	1 min	7 min	$\infty$
<hr style="width: 50%; margin: auto;"/>					
24 cycles					
XBP-1					
94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
3 min	0.5 min	0.5 min	1 min	7 min	$\infty$
<hr style="width: 50%; margin: auto;"/>					
30 cycles					

#### 4-7-2. アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の検出

4-7-1. で得られた PCR 産物と 6 × loading buffer を 5:1 の割合で混合し、全量を XBP-1 サンプルは 3.5% (w/v) agarose gel、GAPDH サンプルは 2% (w/v) agarose gel にアプライしマーカー (1kb plus DNA Ladder) とともに 100 V の定電流で一定時間電気泳動した。泳動後、agarose gel を 50 µg/mL EtBr 溶液に浸し、紫外線照射下で cDNA の splicing を確認した。

#### 4-8. 統計処理

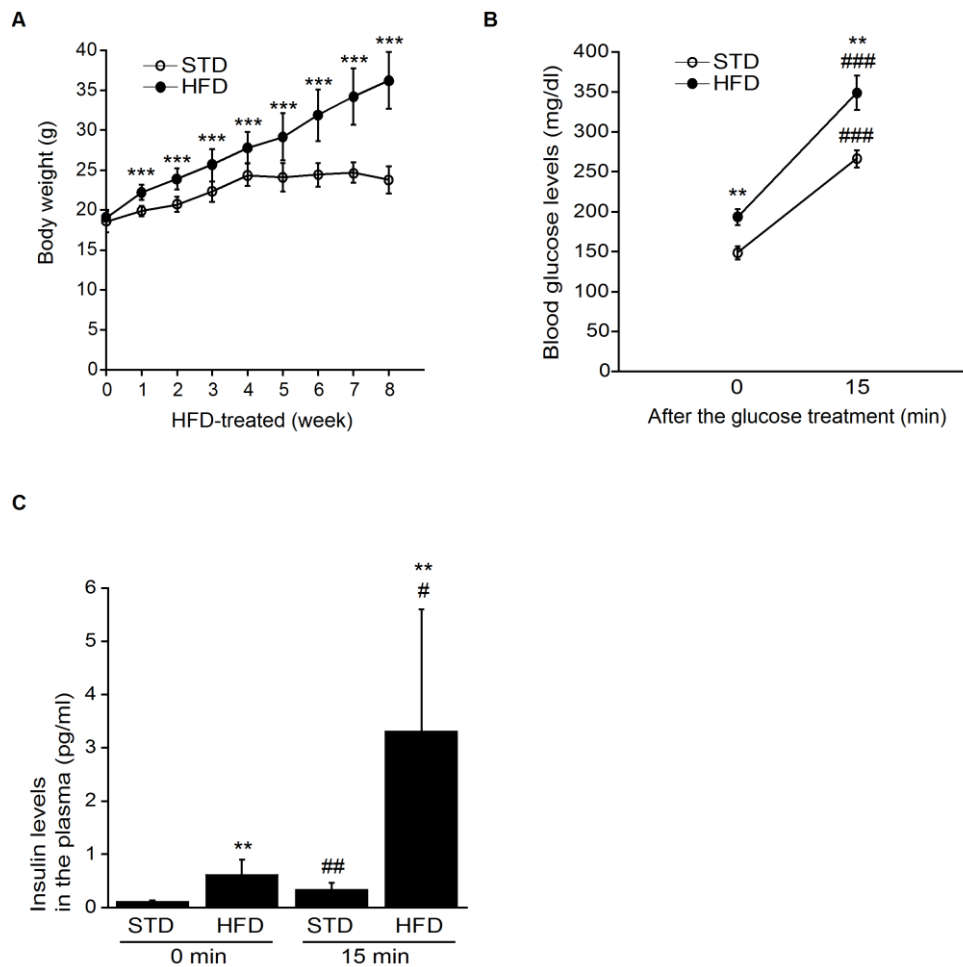
2 群間の有意差検定は Student's t-test で行い、3 群間以上は Bonferroni/Dunnnett post hoc test で行った。

## 5. 実験結果

### 5-1. マウス腸管からの GLP-1 分泌に対する高脂肪食負荷による影響

#### 5-1-1. 高脂肪食負荷による体重・血糖値・インスリン分泌への影響

5 週齢の雄性マウスにおいて、8 週間コントロール食または高脂肪食を負荷させ、体重および血糖値の変化、ならびに糖負荷によるインスリン分泌について解析した。その結果、8 週間の高脂肪食負荷は、マウス体重を増加させた (Fig. 1A)。また、12 時間絶食後および 1.5 g/kg のグルコース処置後 15 分において高脂肪食負荷マウスにおいて血糖値 (Fig. 1B) およびインスリン血中濃度 (Fig. 1C) が高値を示した。

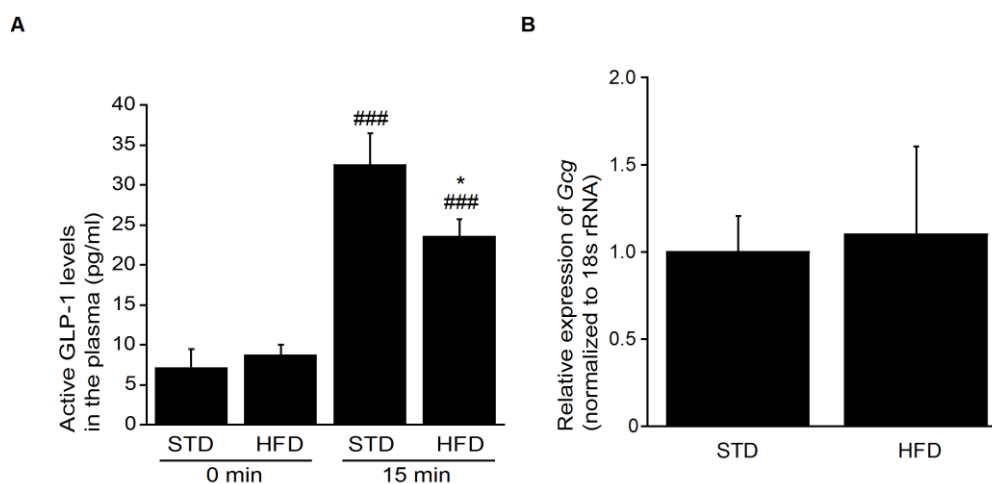


**Figure 1. Mice were increased body weight and impaired glucose homeostasis by HFD treatment.**

A, changes in the body weights of mice fed a high fat diet (HFD) or normal diet (STD) were monitored for 8 weeks. Blood glucose levels (B) and insulin levels in the plasma (C) were determined before (0 min) and 15 min after the 1.5 g/kg glucose treatment in mice fed HFD ( $n = 8$ ) or STD ( $n = 7$ ) for 8 weeks by oral gavage. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. and statistical significance; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. STD mice at the corresponding times. ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  vs. the corresponding 0 min group.

### 5-1-2. 高脂肪食負荷における GLP-1 分泌・産生への影響

8 週間の高脂肪食負荷後に、12 時間絶食後グルコース処置し、血中の GLP-1 濃度を測定し、GLP-1 分泌能の変化を検討した。その結果、12 時間絶食後の定常状態では、血中の GLP-1 濃度は両群において変化がなかったが、グルコース経口投与 15 分後においてみられる GLP-1 濃度の上昇は、高脂肪食負荷マウスにおいて抑制された (Fig. 2A)。そこで、腸管を回収し、GLP-1 の前駆体である proglucagon の遺伝子発現を確認したところ、両群において、proglucagon mRNA の発現に差は認められなかった (Fig. 2B)。

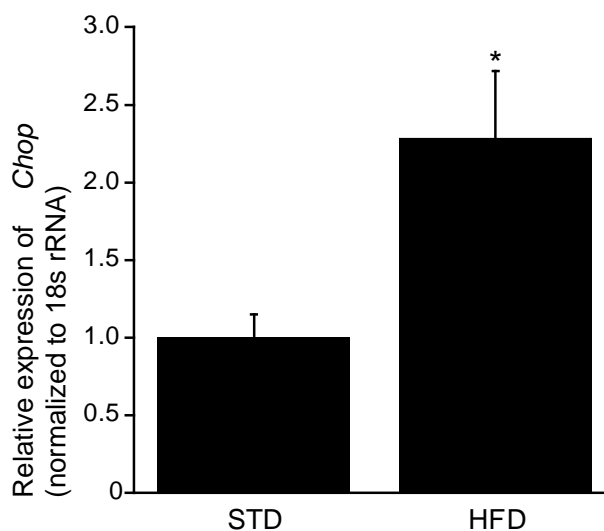


**Figure 2. GLP-1 secretion was impaired in HFD-fed mice.**

A, active GLP-1 levels in the plasma was determined before (0 min) and 15 min after the 1.5 g/kg glucose treatment in mice fed HFD ( $n = 8$ ) or STD ( $n = 7$ ) for 8 weeks by oral gavage. B, the expression of mRNA for proglucagon in the intestines of mice fed HFD and STD for 8 weeks was detected with real-time PCR. The ratio of each mRNA level to 18s rRNA was calculated and the values of STD mice were set to 1.0. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. and statistical significance; \*  $p < 0.05$  vs. STD mice at the corresponding times. ###  $p < 0.001$  vs. the corresponding 0 min group.

### 5-1-3. 高脂肪食負荷による腸管での小胞体ストレスの誘導

高脂肪食負荷は、臓器に小胞体ストレスを誘導することが知られている。そこで、次に GLP-1 分泌減少は小胞体ストレスが誘導された結果ではないかと考え、腸管において、小胞体ストレスマーカーである CHOP の遺伝子発現を確認した。その結果、腸管において、高脂肪食負荷によって、CHOP の遺伝子発現が誘導されていることが確認された (Fig. 3)。



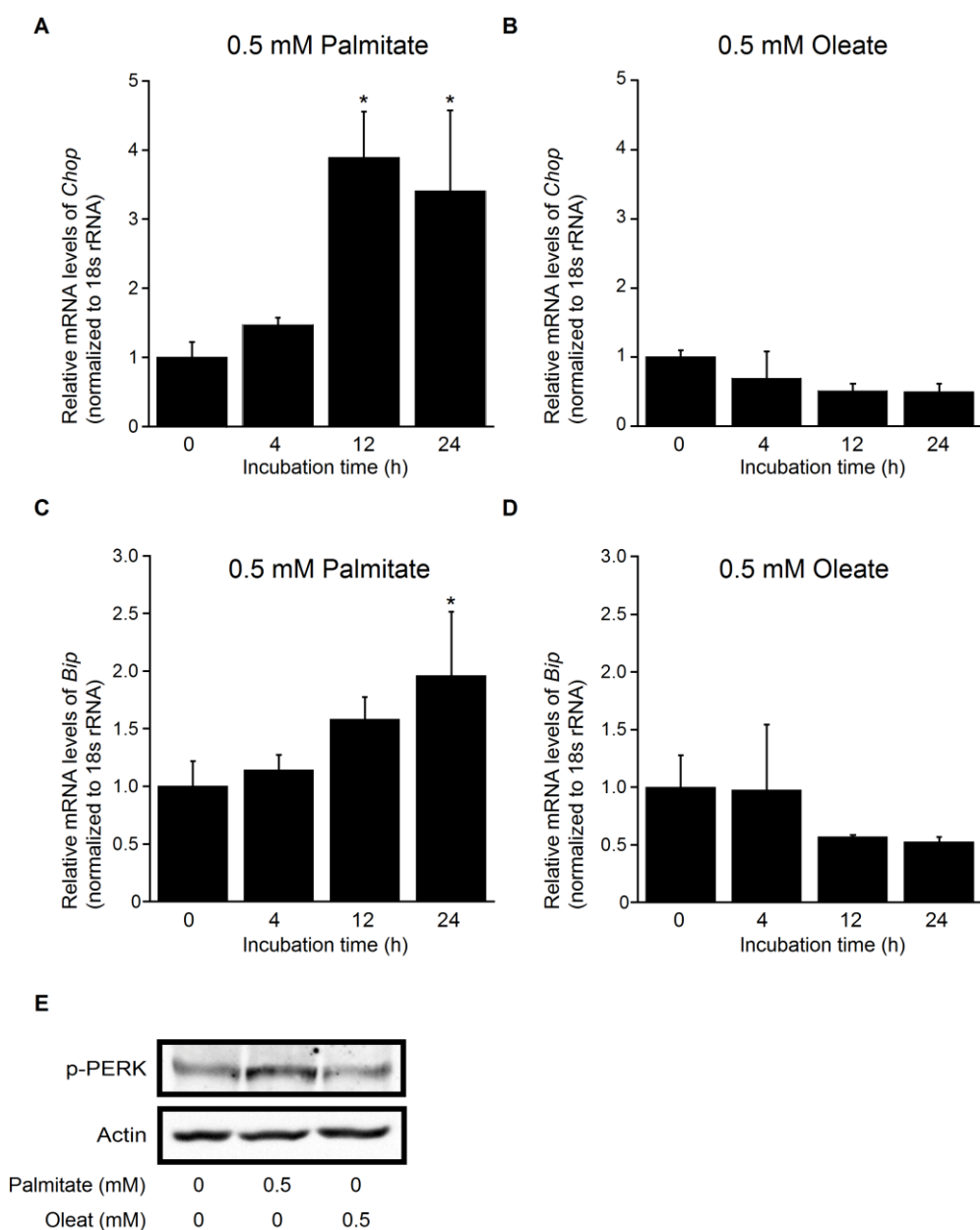
**Figure 3. HFD induced ER stress in the intestine.**

The expression of mRNA for CHOP in the intestines of mice fed HFD and STD for 8 weeks was detected with real-time PCR. The ratio of each mRNA level to 18s rRNA was calculated and the values of STD mice were set to 1.0. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 7 - 8) and significance; \* p < 0.05 vs. the STD-fed group.

## 5-2. GLUTag 細胞における脂肪酸の影響

### 5-2-1. 脂肪酸処置による小胞体ストレスの誘導

次に、小腸 L 細胞株である GLUTag 細胞に飽和脂肪酸であるパルミチン酸または、不飽和脂肪酸であるオレイン酸を処置し小胞体ストレスが誘導されるか確認した。その結果、パルミチン酸は、GLUTag 細胞において 12 および 24 時間において CHOP の遺伝子発現を誘導した (Fig. 4A)。また、24 時間において BiP の遺伝子発現も誘導した (Fig. 4C)。また、24 時間において、パルミチン酸処置は、PERK のリン酸化を亢進させた (Fig. 4E)。しかし、オレイン酸ではこれらの効果は誘導されなかった (Fig. 4B, 4D, 4E)。

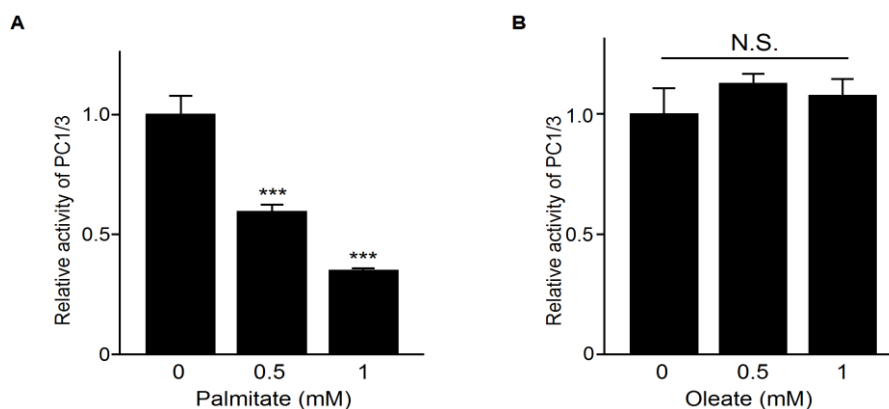


**Figure 4. Palmitate induced ER stress in GLUTag cells.**

GLUTag cells were treated for the indicated periods with 0.5 mM palmitate (A and C) or oleate (B and D). The expression of mRNA for CHOP and BiP were detected with real-time PCR. The ratio of CHOP and BiP mRNA levels to 18s rRNA was calculated and the value of time 0 was set to 1.0. E, GLUTag cells were treated with 0.5 mM palmitate or oleate for 24 h. PERK phosphorylation and actin were detected with western blot. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3) and significance; \*  $p < 0.05$  vs. time 0.

### 5-2-2. 脂肪酸処置による PC1/3 酵素活性への影響

マウスの検討から、高脂肪食負荷により GLP-1 分泌の減少が確認されたが、GLP-1 の遺伝子発現には影響がなかったことから、GLP-1 産生が変化を受けていると考え、GLP-1 産生酵素である PC1/3 に着目して実験を行った。0.5 mM のパルミチン酸またはオレイン酸を 24 時間刺激し PC1/3 の酵素活性を測定した。パルミチン酸処置によって PC1/3 の酵素活性が減少した。一方で、オレイン酸ではその効果は認められなかった (Fig. 5)。



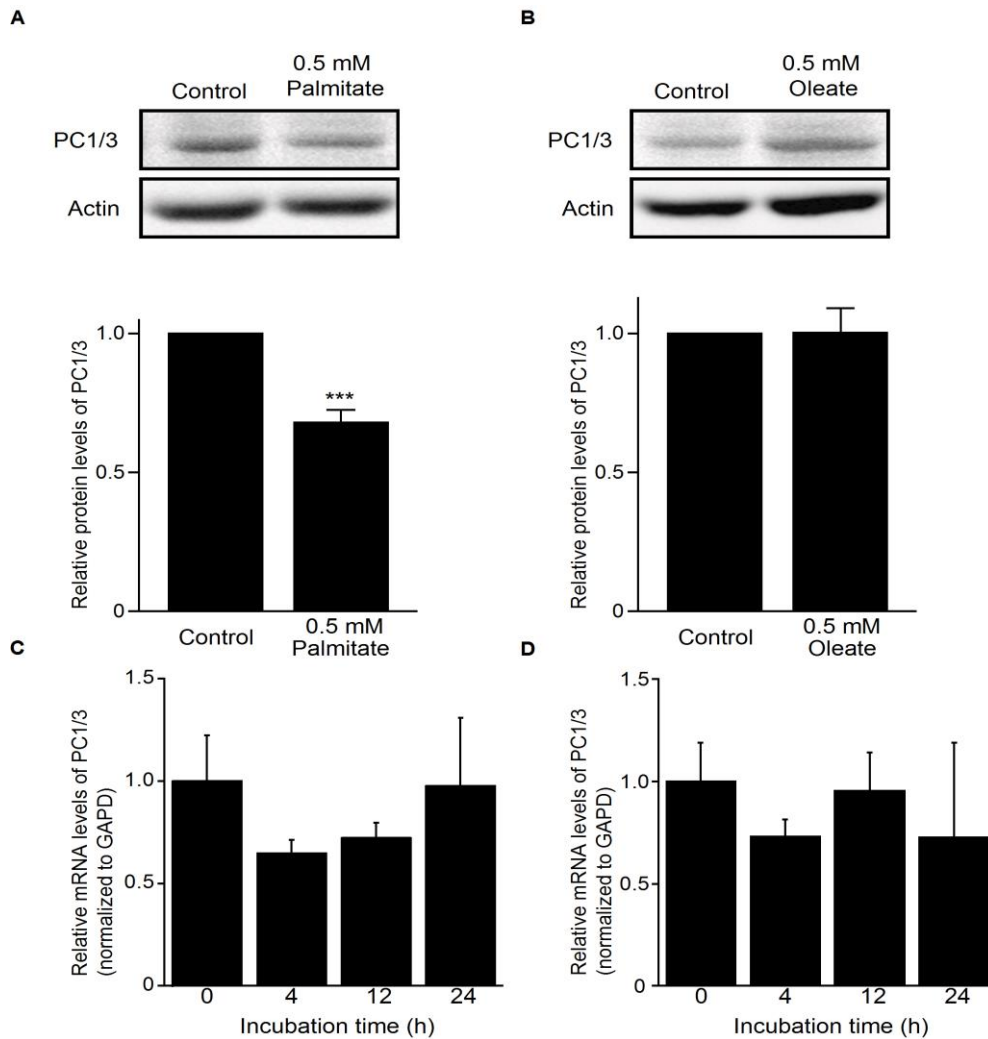
**Figure 5. PC1/3 activity was impaired by palmitate, but not oleate.**

GLUTag cells were treated with 0.5 and 1 mM of palmitate (A) or oleate (B) for 24 h. PC1/3 activity was determined in the cells as described in the Methods. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3) and significance; \*\*\*  $p < 0.001$  vs control.



### 5-2-3. PC1/3 mRNA 発現量およびタンパクレベルへの脂肪酸処置の影響

次に、PC1/3 の酵素活性の減少の原因を明らかにするため、0.5 mM のパルミチン酸またはオレイン酸を 24 時間刺激し、PC1/3 タンパクレベルを検討した。その結果、パルミチン酸処置において、PC1/3 のタンパク発現量が減少した (Fig. 6A)。一方、PC1/3 mRNA レベルを経時的に解析したところ、パルミチン酸は影響を与えなかった (Fig. 6C)。オレイン酸は、PC1/3 のタンパク質量、および遺伝子発現には影響しなかった (Fig. 6B, 6D)。



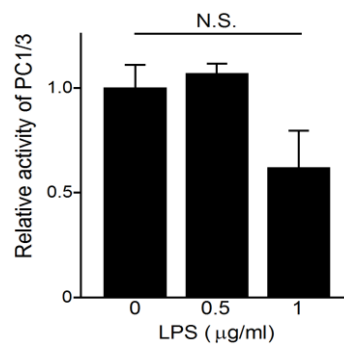
**Figure 6. PC1/3 protein level was decreased by palmitate, but not oleate, without affecting the mRNA expression.**

GLUTag cells were treated with 0.5 mM palmitate (A and C) or oleate (B and D) for 24 h (A and B) or the indicated periods (C and D). PC1/3 and actin protein levels (A and B), and the expression of mRNA for PC1/3 (C and D) were detected. The ratios of PC1/3 levels to actin, and of each mRNA level to 18s rRNA were calculated and the values of the control were set to 1.0. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3) and significance; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

### 5-3. GLUTag 細胞における LPS 処置による影響

#### 5-3-1. LPS 処置による PC1/3 活性への影響

パルミチン酸は、toll-like receptor 4 (TLR4) も刺激することが知られている。そこで次に、TLR4 の刺激薬である LPS で処置し PC1/3 酵素活性の変化を確認した。その結果、0.5 および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の LPS で 24 時間刺激しても PC1/3 酵素活性は有意には低下しなかった (Fig. 7)。

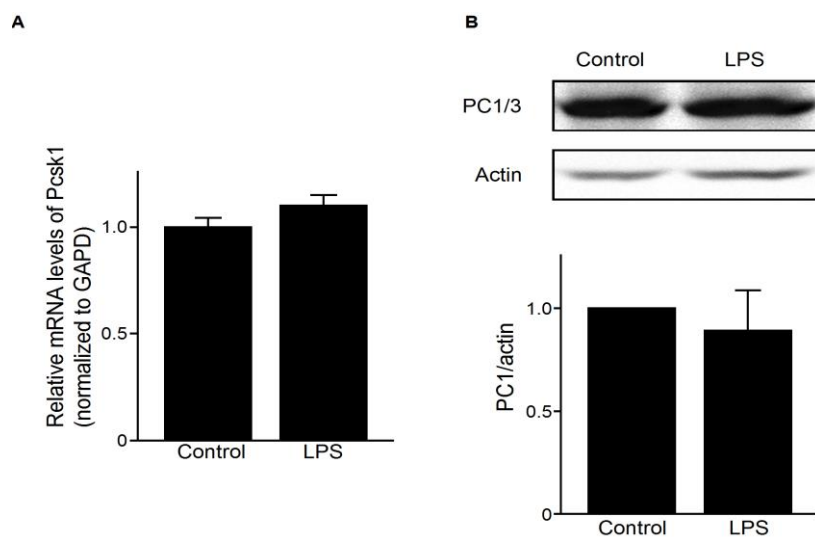


**Figure 7. LPS did not influence PC1/3 activity.**

GLUTag cells were treated with LPS at the indicated concentrations for 24 h. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

### 5-3-2. LPS 処置による PC1/3 mRNA 発現量およびタンパクレベルへの影響

次に、LPS 刺激による PC1/3 の mRNA 発現量およびタンパクレベルの変化を確認した。1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の LPS で 24 時間刺激した場合でも、PC1/3 mRNA 発現量およびタンパクレベルはどちらも変化しなかった (Fig. 8)。

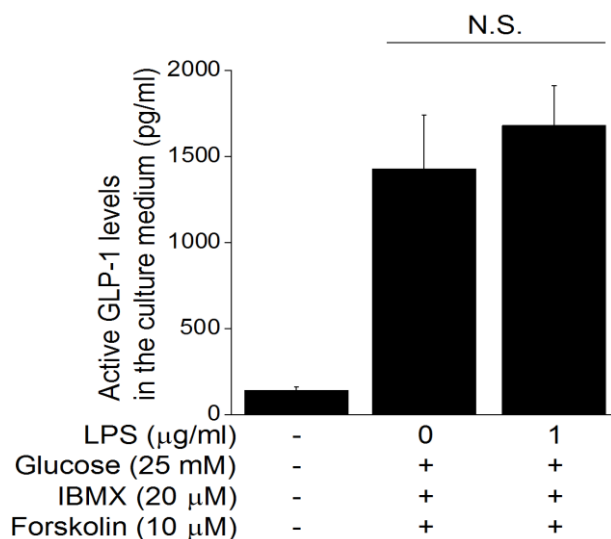


**Figure 8. LPS did not influence PC1/3 mRNA and protein levels.**

GLUTag cells were treated with LPS at the 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 h. The expression of mRNA for proglucagon or PC1/3 (A) and the protein levels of PC1/3 and actin (B) were determined. The ratio of each mRNA level to GAPDH was calculated and the value of the control was set to 1.0. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

### 5-3-3. LPS 処置による GLP-1 分泌への影響

次に、LPS 処置による GLP-1 分泌の変化を解析した。GLUTag 細胞を forskolin、IBMX、および glucose で 2 時間刺激すると GLP-1 分泌が確認されたが、この分泌は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の LPS で 24 時間刺激したのちでも影響を受けなかった (Fig. 9)。



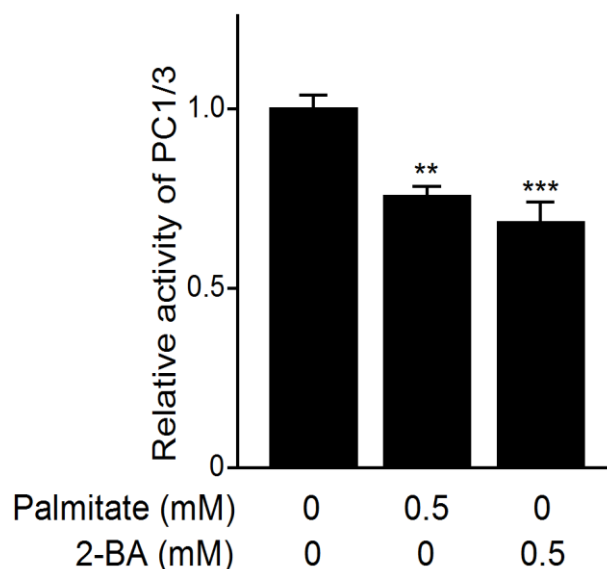
**Figure 9. LPS did not affect GLP-1 secretion.**

GLUTag cells were treated with LPS at 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 h. Glucose, IBMX, and forskolin-induced secretion of active GLP-1 during 2 h was determined. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

#### 5-4. GLUTag 細胞における活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS)の影響

##### 5-4-1. パルミチン酸と 2-bromohexadecanoic acid (2-BA) の比較

パルミチン酸は、ミトコンドリアでの代謝を介して ROS を上昇させ酸化ストレスを誘導することが知られている。そこで、ROS の GLP-1 産生と分泌に対する影響を解析した。まず、ミトコンドリアにおいて代謝されないパルミチン酸の誘導體 2-BA を用いて検討した。0.5 mM のパルミチン酸または 2-BA を 24 時間処置し、PC1/3 の酵素活性を測定した。その結果、パルミチン酸および 2-BA とともに酵素活性を低下させたが両者の間に差は生じなかった (Fig. 10)。

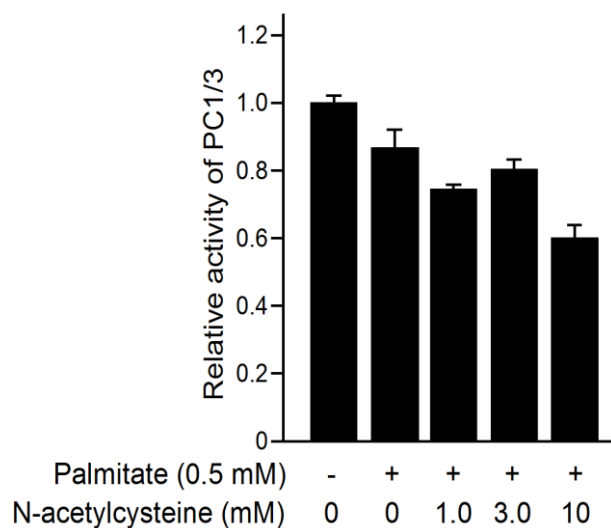


**Figure 10. PC1/3 activity was decreased by 2-BA as well as palmitate.**

GLUTag cells were treated with 0.5 mM of palmitate or 2-bromohexadecanoic acid (2-BA) for 24 h. PC1/3 activity was determined. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ) and significance; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the control.

#### 5-4-2. 抗酸化剤による PC1/3 酵素活性への影響

次に、抗酸化剤である n-acetylcysteine を用いて、パルミチン酸による PC1/3 酵素活性低下における ROS の寄与を検討した。各濃度の n-acetylcysteine を 24 時間前処置しその後 0.5 mM のパルミチン酸と 24 時間同時処置した。その結果、n-acetylcysteine を投与しても PC1/3 の酵素活性低下は回復しなかった (Fig. 11)。



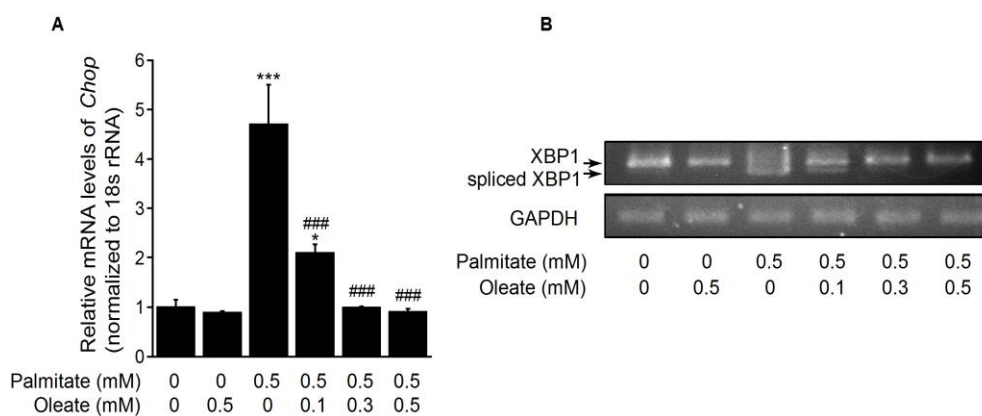
**Figure 11. N-acetylcysteine did not cancel palmitate-induced decreasing of PC1/3 activity.**

GLUTag cells were pre-incubated for 24 h with n-acetylcysteine indicated concentrations and then treated for 24 h with 0.5 mM palmitate. PC1/3 activity was determined. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

## 5-5. GLUTag 細胞におけるオレイン酸とパルミチン酸同時処置の影響

### 5-5-1. パルミチン酸による小胞体ストレスに対するオレイン酸の効果

パルミチン酸による小胞体ストレスは、オレイン酸との同時処置によって減少することが知られている。そこで、本実験系においても、パルミチン酸による小胞体ストレスがオレイン酸で減弱するかどうかを検討した。パルミチン酸とオレイン酸を同時処置し、12 時間後の CHOP の遺伝子発現を解析したところ、パルミチン酸による CHOP mRNA の発現増大がオレイン酸の同時刺激によりコントロールレベルまで低下した (Fig. 12A)。また、添加 24 時間後にはパルミチン酸により XBP-1 のスプライシングが見られるが、これもオレイン酸の濃度に依存して回復し、小胞体ストレスが緩和していることが確認された (Fig. 12B)。



**Figure 12. Oleate blocked palmitate-induced ER stress.**

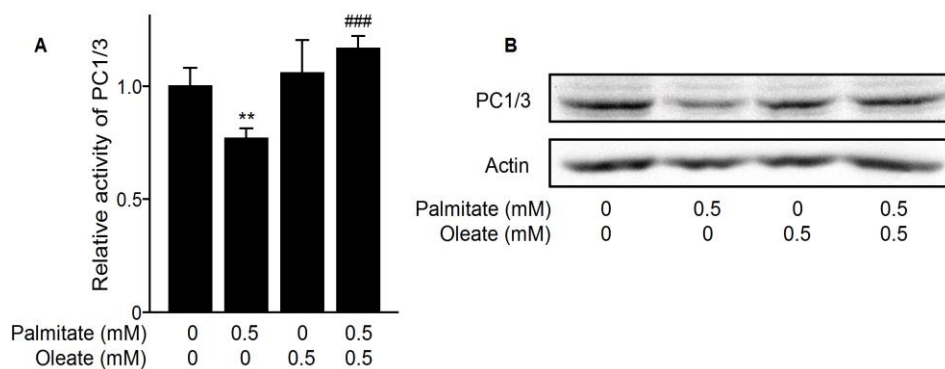
GLUTag cells were treated with 0.5 mM palmitate in the presence or absence of the indicated concentration oleate for 12 h (A) or 24 h (B). The levels of mRNA for CHOP (A) and splicing of XBP1 mRNA (B) were determined. The ratio of each mRNA level to 18s rRNA was calculated and the values of the control were set to 1.0. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). Significance; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated group, and ###  $p < 0.001$  vs. 0.5 mM



palmitate alone.

### 5-5-2. パルミチン酸による PC1/3 タンパク減少及び活性低下に対するオレイン酸の効果

次に、パルミチン酸による PC1/3 タンパク減少及び活性低下に対する効果を検討した。その結果、パルミチン酸による PC1/3 の酵素活性およびタンパクレベルの低下はオレイン酸の添加により回復した (Fig. 13)。

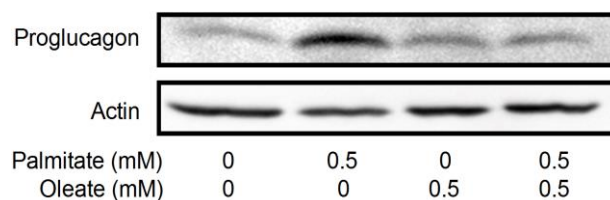


**Figure 13. Oleate blocked palmitate-induced the impairment in PC1/3 activity.**

GLUTag cells were treated with 0.5 mM palmitate in the presence or absence of 0.5 mM oleate for 24 h. The PC1/3 activity (A), and protein levels of PC1/3 and actin (B) were determined. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). Significance; \*\*  $p < 0.01$  vs. the untreated group, and ###  $p < 0.001$  vs. 0.5 mM palmitate alone.

### 5-5-3. パルミチン酸による proglucagon タンパクに対する作用へのオレイン酸の効果

GLP-1 合成酵素である PC1/3 のタンパクおよび活性が減少していたことから、GLP-1 のプロ体である proglucagon のタンパクレベルを確認した。0.5 mM のパルミチン酸刺激 48 時間後では、proglucagon のタンパクレベルが上昇した。また、オレイン酸との同時刺激によりこの proglucagon のタンパクレベルの上昇はコントロールレベルまで減少した (Fig. 14)。

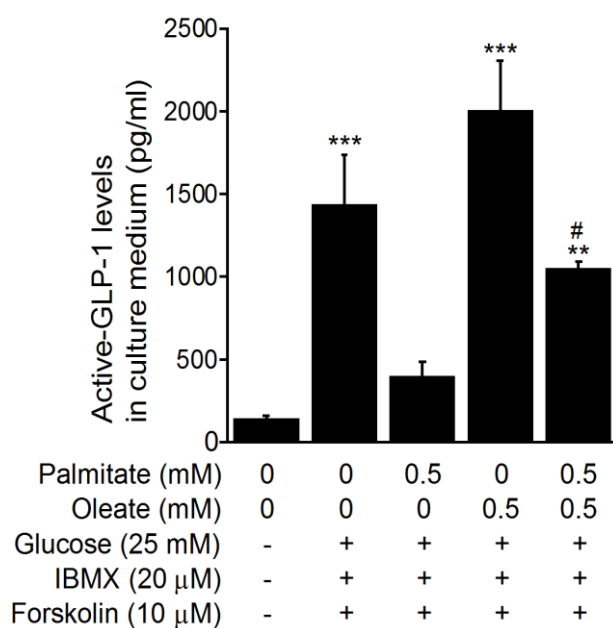


**Figure 14. Oleate cancelled palmitate-induced increasing of proglucagon protein.**

GLUTag cells were treated with 0.5 mM palmitate in the presence or absence of 0.5 mM oleate for 48 h. The levels of proglucagon and actin were determined. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

#### 5-5-4. パルミチン酸による GLP-1 分泌に対する作用へのオレイン酸の効果

次に、パルミチン酸による GLP-1 分泌に対する作用へのオレイン酸の効果を検討した。Forskolin および IBMX, glucose で刺激した際の GLP-1 分泌は、0.5 mM のパルミチン酸を 24 時間前処置すると低下したが、0.5 mM のオレイン酸単独で 24 時間処置しても見られなかった。さらに、オレイン酸とパルミチン酸の同時処置を行ったところ、パルミチン酸による GLP-1 分泌の減少は有意に回復した (Fig. 15)。



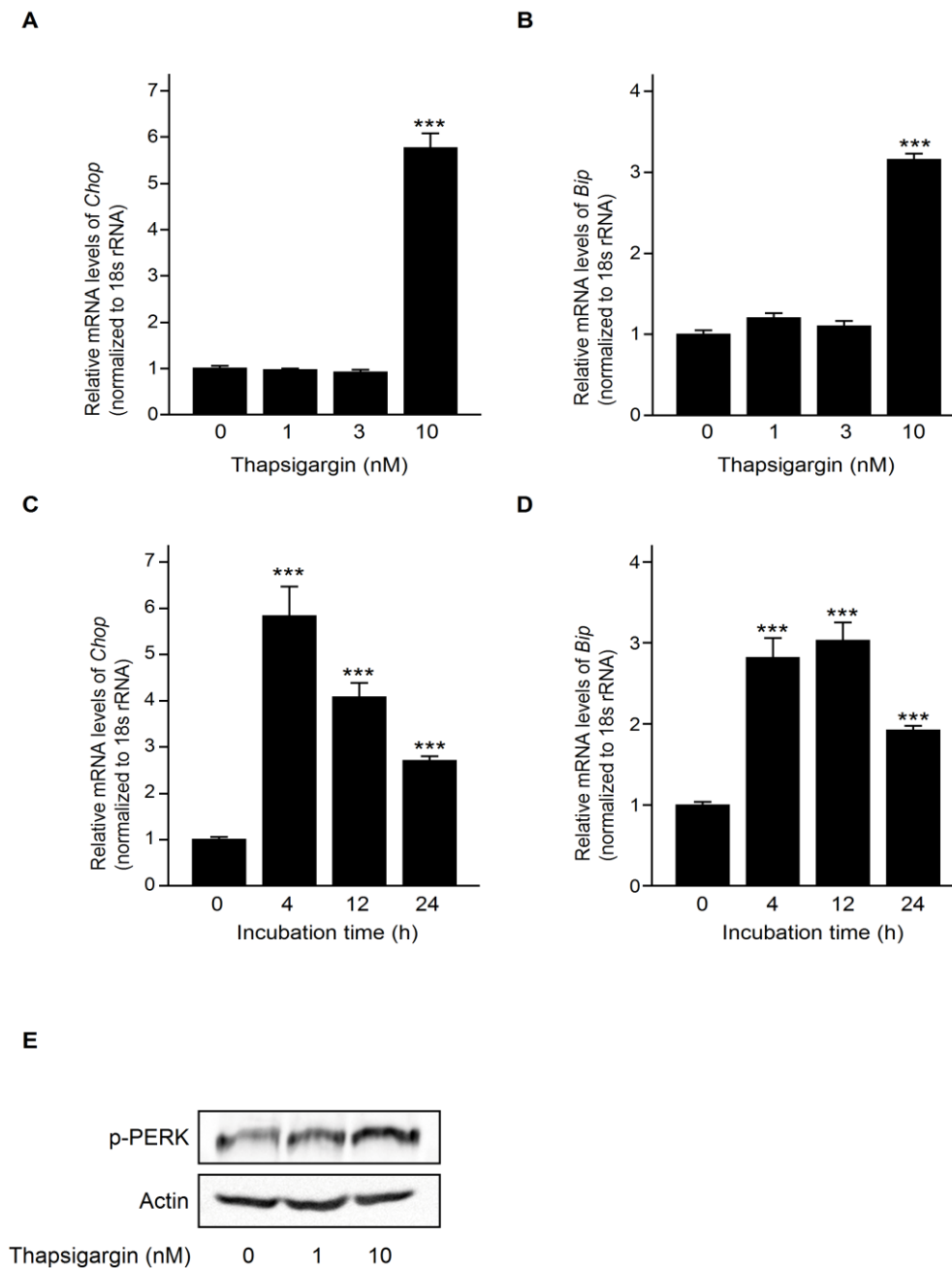
**Figure 15. Oleate cancelled palmitate-induced reduction of GLP-1 secretion.**

GLUTag cells were treated with 0.5 mM palmitate in the presence or absence of 0.5 mM oleate for 24 h. After incubation, cells were stimulated with glucose, IBMX and forskolin for 2 h and active GLP-1 released were determined (n = 3). Significance; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated group, and #  $p < 0.05$  vs. 0.5 mM palmitate alone.

## 5-6. GLUTag 細胞における小胞体ストレス誘導薬 thapsigargin の影響

### 5-6-1. Thapsigargin の小胞体ストレスへの効果

パルミチン酸の効果が小胞体ストレスに基づくことをさらに確認するために、小胞体ストレス誘導薬である thapsigargin を用いて検討した。Thapsigargin を 1, 3, および 10 nM で GLUTag 細胞を 12 時間刺激し、CHOP および BiP の遺伝子発現を確認した。その結果、1 および 3 nM の thapsigargin では、CHOP と BiP の発現に変化はなかったが、10 nM の thapsigargin によって両遺伝子の発現が上昇した (Fig. 16A and B)。さらに、10 nM の thapsigargin で 4, 12, および 24 時間刺激し時間依存性を検討した。その結果、CHOP および BiP の遺伝子発現は刺激後 4 時間から上昇していることが確認された (Fig. 16C and D)。また、thapsigargin 刺激 24 時間における PERK のリン酸化を検討したところ、10 nM の thapsigargin において PERK のリン酸化がコントロールに比べて上昇していた (Fig.16E)。



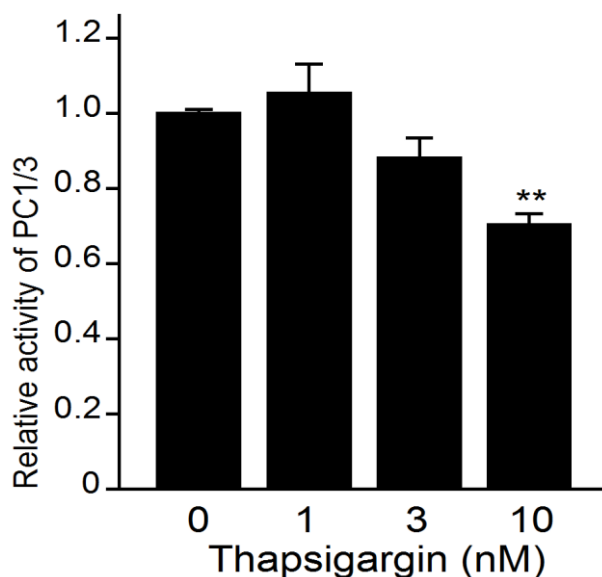
**Figure 16. Thapsigargin induced ER stress in GLUTag cells.**

GLUTag cells were treated for 12 h with the indicated concentrations of thapsigargin (A and B) or the indicated period with 10 nM thapsigargin (C and D). The mRNA levels of CHOP (A and C) and BiP (B and D) were determined with quantitative real-time PCR. The ratio of each mRNA level to 18s rRNA was calculated and the value of the control was set to 1.0. E, GLUTag cells were treated with 1 or 10 nM thapsigargin for 24 h. PERK phosphorylation and actin were

detected by western blot. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). Significance; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the control.

### 5-6-2. Thapsigargin の PC1/3 酵素活性への効果

次に、1, 3, および 10 nM の thapsigargin で 24 時間刺激し PC1/3 の酵素活性を確認した。その結果、小胞体ストレスを誘導しなかった濃度である 1 並びに 3 nM の thapsigargin では、PC1/3 の酵素活性は低下しなかった。しかし、小胞体ストレスを誘導した 10 nM において PC1/3 の酵素活性が低下した (Fig. 17)。



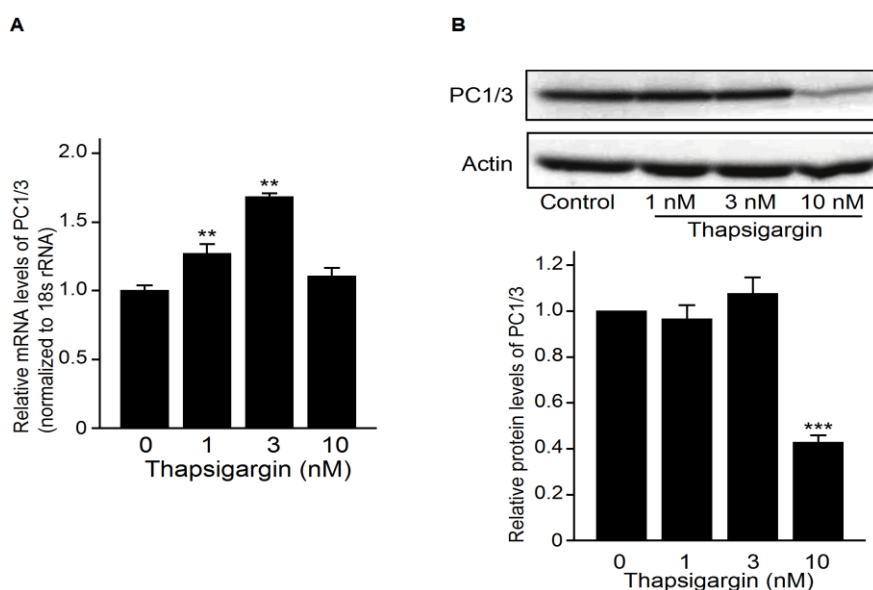
**Figure 17. Thapsigargin reduced the activity of PC1/3.**

GLUTag cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of thapsigargin. PC1/3 activity was determined. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ) and significance; \*\*  $p < 0.01$  vs. the control.



### 5-6-3. Thapsigargin の PC1/3 mRNA 発現量およびタンパクレベルへの効果

Thapsigargin は 10 nM でのみ PC1/3 活性を低下させたことから、次に、1, 3, および 10 nM の thapsigargin で 24 時間刺激し PC1/3 の遺伝子発現およびタンパクレベルを確認した。その結果、小胞体ストレスを誘導しなかった濃度である 1 並びに 3 nM の thapsigargin では、PC1/3 mRNA レベルが上昇したが、一方で、タンパクレベルには変化がなかった。しかし、小胞体ストレスを誘導した 10 nM においては PC1/3 mRNA レベルは変化せず、タンパクレベルが減少した (Fig. 18)。

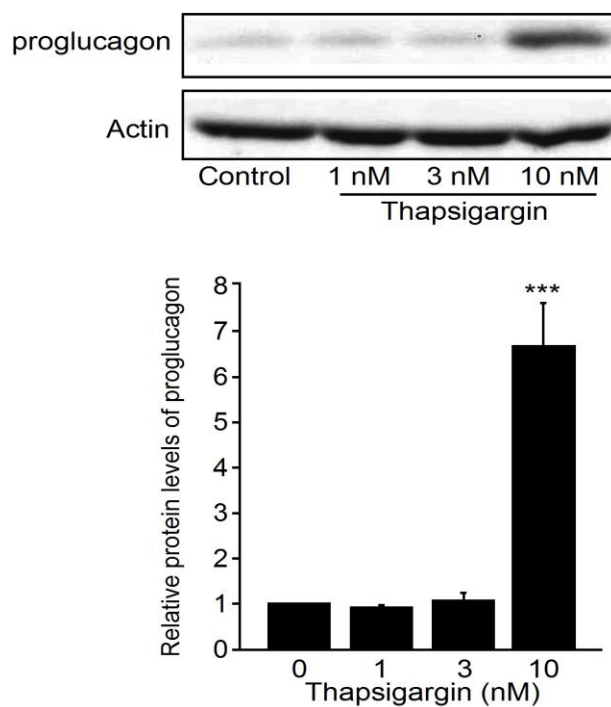


**Figure 18. Thapsigargin reduced PC1/3 protein levels.**

GLUTag cells were treated for 12 h (A) or 24 h (B) with the indicated concentrations of thapsigargin. The protein levels of PC1/3 proglucagon and actin (B) and the expression levels of mRNA for PC1/3 (A) were determined. The ratios of PC1/3 levels to actin and of each mRNA level to 18s rRNA of the control (A) were calculated, and the values of the control were set to 1.0. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3) and significance; \*\*  $p < 0.01$  vs. the control.

#### 5-6-4. Thapsigargin の proglucagon タンパクレベルへの効果

Thapsigargin 10 nM による PC1/3 の活性の低下が proglucagon の分解抑制を誘導しているかどうかを明らかにするために、1, 3, および 10 nM の thapsigargin で 24 時間刺激した後、proglucagon のタンパクレベルを確認した。その結果、小胞体ストレスを誘導した、PC1/3 のタンパクレベルを低下させた 10 nM において proglucagon のタンパクレベルが上昇した (Fig.19)。

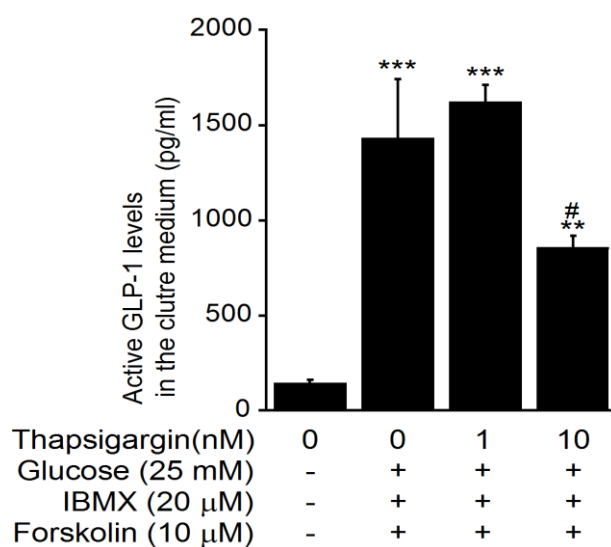


**Figure 19. Thapsigargin increased proglucagon protein levels.**

GLUTag cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of thapsigargin. The protein levels of proglucagon and actin were determined. The ratio of proglucagon levels to actin was calculated, and the values of the control were set to 1.0. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3) and significance; \*\*\*  $p < 0.01$  vs. the control.

#### 5-6-5. Thapsigargin の GLP-1 分泌への効果

GLP-1 産生の低下が分泌量の低下につながるかどうかを確認するために、1 および 10 nM の thapsigargin で 24 時間刺激した後、GLP-1 の分泌を検討した。その結果 forskolin, IBMX, glucose によって分泌される GLP-1 は、小胞体ストレスを誘導しなかった濃度である 1 nM の thapsigargin での前処置では低下しなかった。しかし、小胞体ストレスを誘導した 10 nM の前処理では GLP-1 の分泌が低下した (Fig.20)。



**Figure 20. Thapsigargin reduced secretion of active GLP-1.**

GLUTag cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of thapsigargin. Cells were stimulated with glucose, IBMX, and forskolin for 2 h and active GLP-1 released was determined. All data shows the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ) and significance; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the control and #  $p < 0.05$  vs. the non-treated group.

## 6. 考察

本研究では、マウスにおいて高脂肪食負荷により GLP-1 分泌が低下することを見いだした。その機序として高濃度の飽和脂肪酸は小腸 L 細胞に小胞体ストレスを誘導し、PC1/3 のタンパクレベルならびに酵素活性を低下させ GLP-1 産生を減少させること、その結果として GLP-1 分泌量を減少させることが示唆された。

マウスに高脂肪食を負荷すると、高インスリン血症となり肥満が誘導されその後、膵  $\beta$  細胞の疲弊を介して 2 型糖尿病となると考えられている<sup>31</sup>。今回の検討においても、8 週間の高脂肪食負荷によりマウスの体重が増加するとともに、12 時間絶食時と glucose 経口投与後 15 分後の血糖値 (Fig. 1A, 1B)、および血中のインスリン値が上昇しており (Fig. 1C)、インスリン抵抗が誘導され、高インスリン血症に至っていることが示唆された。その時の、GLP-1 分泌は、12 時間絶食後の血中濃度に差はなかったが、glucose 投与時の GLP-1 分泌が有意に低下することを見いだした (Fig. 2A)。インスリン分泌が亢進しているにもかかわらず GLP-1 の分泌が低下したことから、高脂肪食負荷は、膵  $\beta$  細胞よりも先行して小腸 L 細胞において機能不全を誘導していると考えられる。一方、GLP-1 の遺伝子である *Gcg* の発現を確認したところ高脂肪食負荷によって変化していなかった (Fig. 2B)。この結果から、GLP-1 分泌量の低下は、GLP-1 の前駆体である proglucagon の遺伝子発現が低下したためではなく、GLP-1 の合成または分泌が抑制されていることが示唆された。高脂肪食負荷は、食餌誘導性の肥満モデルとして汎用されており、脂質異常をきたすことが知られている<sup>32,33</sup>。さらに、高脂肪食負荷は、肝臓や骨格筋などに小胞体ストレスを誘導することも知られている<sup>14,15</sup>。本研究でも、高脂肪食負荷マウスにおいて小腸において小胞体ストレスマーカーである CHOP の遺伝子発現が上昇していることが確認された (Fig. 3)。このことから、高脂肪食負荷による脂質異常が小腸において小胞体ストレスを誘導している可能性が強く示唆され

た。

高脂肪食負荷による GLP-1 分泌低下機序をさらに詳細に解析するために、マウス小腸 L 細胞株である GLUTag 細胞を用いて解析した。GLUTag 細胞は、glucose 刺激による GLP-1 分泌能を維持している細胞株であり GLP-1 分泌研究に汎用されている細胞株である。他のマウス細胞株である STC-1 細胞に比べて、高度に分化した細胞であり、生理学および薬理的分泌促進物質により刺激されたラット初代培養腸管細胞の応答性を再現することが可能である<sup>34,35</sup>。さらに、GLP-1 分泌にかかわる、glucose のセンサーやイオンチャネル、制御分子の遺伝子発現パターンがマウス腸管初代培養 L 細胞と非常に類似している<sup>36</sup>。これらのことは、GLUTag 細胞における反応はマウス腸管においても同様の反応が確認されることが示唆されており、実際にこれまでの研究において GLUTag 細胞と腸管 L 細胞において同様の反応が確認されている。

パルミチン酸は、炭素数 16 の飽和脂肪酸であり小胞体ストレスを誘導することが報告されている。本細胞でも、CHOP および BiP の遺伝子発現、および PERK のリン酸化が誘導され、小胞体ストレスが誘導されていることが示唆された (Fig. 4A, 4C, 4E)。一方で、一価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸ではこの反応が生じなかった。この結果は、他の細胞株での報告と合致する。小胞体ストレスを誘導する一つのメカニズムとして、パルミチン酸は、小胞体膜のリン脂質の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の比率を変化させることが知られている<sup>37</sup>。さらに、この膜上の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の比率は、不飽和脂肪酸を同時処置することにより改善されることも知られている。小胞体膜上のリン脂質の飽和脂肪酸ならびに不飽和脂肪酸の構成比を検討することにより GLUTag 細胞における小胞体ストレス誘導メカニズムの解析に有用であると考えられ今後検討すべき課題である。

パルミチン酸は、小胞体の  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスに影響を与えることが報告されている。Proglucagon から GLP-1 を切り出す酵素である PC1/3 は  $Ca^{2+}$  依存性の酵素であり<sup>38</sup> PC1/3 の酵素活性に影響すると考えられた。本細胞では、パルミチン酸は PC1/3 の

遺伝子発現には影響を与えなかったが (Fig. 6C)、PC1/3 のタンパクレベルおよび酵素活性の低下を誘導した (Fig. 5A, 6A)。膵  $\beta$  細胞においては、PC3 によって proinsulin から insulin へと合成される過程を  $\text{Ca}^{2+}$  をキレーターにより阻害すると proinsulin タンパク発現が増加し insulin 量が減少すると報告されている<sup>38,39</sup>。本研究でも、パルミチン酸処置により PC1/3 活性が低下した条件下で、GLP-1 の前駆体である proglucagon タンパク量が増加することが確認され、GLP-1 の産生が低下していることが示唆された。これらの結果は、GLP-1 分泌量が減少したこと (Fig. 15) からも確認された。以上のように、パルミチン酸は GLUTag 細胞において小胞体ストレスを誘導すること、PC1/3 のタンパク量を低下させ GLP-1 の産生を抑制することにより GLP-1 の分泌量を低下させることが示唆された。

次に、パルミチン酸による GLP-1 産生低下が小胞体ストレスを誘導した結果であるかどうかを、多角的に検討した。パルミチン酸は、小胞体ストレス以外に TLR4 に結合し炎症反応を誘導することが知られている<sup>40,41</sup>。またマウスにおいて、ethyl palmitate を血中濃度が 0.5 mM になるように持続注入した研究において、膵  $\beta$  細胞において TLR4 を介した炎症反応が確認されており、今回の検討に用いているパルミチン酸においても同様に TLR4 を介した作用がある可能性が考えられた<sup>42</sup>。しかし、GLUTag 細胞を LPS で刺激した場合でも、PC1/3 のタンパクレベルおよび酵素活性の低下 (Fig. 7, 8)、および GLP-1 分泌の低下は認められなかった (Fig. 9)。これらの結果から、パルミチン酸による GLP-1 産生抑制には TLR4 の刺激の寄与は小さいことが示唆された。腸管上皮の細胞は、共生菌である大腸菌による LPS に常時さらされている。そのため、TLR4 のシグナルに重要である interleukin-1 receptor-associated kinase 1 の発現が減少しており、LPS に対して感受性が低下している<sup>43</sup>。GLUTag 細胞も腸管上皮の細胞であり、LPS に対して応答が低下しており、パルミチン酸による効果が低い可能性が考えられる。

パルミチン酸は、ミトコンドリアにおいて  $\beta$  酸化によって ROS を産生する。過剰

な脂肪酸によって産生される ROS は、糖尿病において、インスリン抵抗性や心臓の肥大を誘導することが報告されている<sup>44,45</sup>。さらに、過剰な脂質による ROS によって GLUTag 細胞においてアポトーシスが増加し、GLP-1 分泌が低下することも示唆されている<sup>46</sup>。しかし、パルミチン酸による GLP-1 産生抑制効果がミトコンドリアを介した  $\beta$  酸化による ROS による可能性は 2-BA および n-acetylcysteine を用いた検討から寄与が低いと考えられる。2-BA はパルミチン酸誘導体であり、 $\beta$  酸化をうけず、パルミチン酸のような ROS 産生が誘導されない<sup>47,48</sup>。また n-acetylcysteine は抗酸化剤として ROS の作用を抑制する。2-BA も パルミチン酸同様に PC1/3 の酵素活性を低下させたこと、また、n-acetylcysteine はパルミチン酸による PC1/3 の酵素活性低下を回復させなかったことから、パルミチン酸による GLP-1 産生の低下は、ROS によるものではないことが示唆された。

GLUTag 細胞は、GPR40 や GPR120 を発現しており<sup>49</sup>、パルミチン酸の作用が、これらの脂肪酸受容体による可能性も考えられる。今回の検討において、パルミチン酸を処置する時に、2% の BSA 存在下で実験を行っている。これらの、脂肪酸受容体へのシグナル誘導には、遊離型の脂肪酸が必須となっている。2% の BSA 存在下では、脂肪酸は BSA と結合していると考えられ GPR シグナルの関与は少ないと予想される。

オレイン酸は、パルミチン酸と同時投与によりパルミチン酸による小胞体ストレスを緩和することが知られている。本研究においても、オレイン酸はパルミチン酸による小胞体ストレスの誘導を抑制した (Fig. 12)。このとき、パルミチン酸による PC1/3 のタンパクレベルおよび酵素活性の低下も回復すること (Fig. 13)、前駆体である proglucagon のタンパク量の上昇も打ち消されること (Fig. 14, 15) が確認された。これらの結果から、パルミチン酸による小胞体ストレスならびに GLP-1 産生抑制作用はいずれもオレイン酸で抑制されることが明らかになった。

最後に、他の小胞体ストレス誘導薬によっても GLP-1 の産生が低下することを確認した。Thapsigargin は、sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) を阻害する強

力な小胞体ストレス誘導薬である<sup>50</sup>。GLUTag 細胞においても、10 nM の thapsigargin は、CHOP および BiP の遺伝子発現 (Fig. 16) ならびに PERK のリン酸化の上昇を誘導し、小胞体ストレスが誘導されていることが確認された。この条件下では、パルミチン酸と同様に、PC1/3 の酵素活性とタンパクレベルの低下 (Fig. 18)、proglucagon のタンパクレベルの上昇 (Fig. 19)、GLP-1 の分泌量の低下が認められた (Fig. 20)。したがって、パルミチン酸による GLP-1 の産生抑制作用は、小胞体ストレスを誘導する thapsigargin によっても再現されたことから、小胞体ストレスが PC1/3 のタンパク量低下に寄与しているものと考えられた。パルミチン酸による proglucagon タンパク量上昇作用は、48 時間という処理時間が必要だったのに対し、thapsigargin では 24 時間であった (Fig. 13, 19)。このパルミチン酸との時間的な差は小胞体ストレスを誘導する強さにおいて説明できると考えられる。すなわち、CHOP や BiP の遺伝子発現がパルミチン酸では 24 時間ほど必要なのに対し、thapsigargin は 4 時間という早期においてすでに小胞体ストレスを誘導している (Fig. 16C and D)。これまでの報告においても、パルミチン酸による小胞体ストレスは慢性的な作用によるものであると示されている<sup>51</sup>。これらのことから、小胞体ストレスの誘導の強さ、速度の差が proglucagon のタンパクレベルを上昇させる時間の差であると考えられる。

以上の結果をまとめると、(1) GLUTag 細胞において、パルミチン酸は小胞体ストレスを誘導し、PC1/3 のタンパクレベルを低下させ、GLP-1 の産生を低下させること、(2) 不飽和脂肪酸であるオレイン酸は小胞体ストレスも GLP-1 産生低下作用も示さないこと、(3) パルミチン酸による効果は、TLR4 や ROS 産生を介した反応ではないこと、(4) 小胞体ストレス誘導薬である thapsigargin によってもパルミチン酸と同じ反応が確認されたこと、さらに (5) オレイン酸と同時処置することによって小胞体ストレスを緩和するとパルミチン酸による効果は減少することが明らかになった。これらの結果から、過剰な飽和脂肪酸は小胞体ストレスを介して PC1/3 のタンパクレベルを低下させ、酵素活性を下げることで GLP-1 産生を減少させることが強く示唆された。小胞体スト



レスにより GLP-1 の分泌量低下が見られたが、これは GLP-1 産生の低下の結果であると考えられるが、分泌反応そのものも抑制されている可能性も否定できず、今後の検討課題である。これらの *in vitro* の研究結果から、高脂肪食負荷マウスにおける GLP-1 分泌低下に脂肪酸による小胞体ストレスが関与していると考えられる。

ヒトにおいても、PC1/3 の活性が欠損する遺伝変異により肥満や糖代謝が障害されることが報告されている<sup>52,53</sup>。さらに、*PC1/3 gene* のバリエントは、肥満のリスクと正の相関があることも報告されている<sup>54</sup>。また、肥満は GLP-1 血中濃度と負の相関が報告されている<sup>25,26</sup>。これらのことから、今回の結果は肥満症のヒトにおける GLP-1 分泌低下の一つの理由を示唆する結果であり、また、動物性脂質を多く含む食事によって、小腸 L 細胞において小胞体ストレスが生じ、PC1/3 タンパク減少を介して GLP-1 産生・分泌が減少し、糖尿病のリスクが増大する可能性を示唆した (Fig. 21A)。また、今回マウスの検討から、8 週間の高脂肪食負荷により GLP-1 分泌が減少していた。しかし、血中のインスリン濃度は、空腹時および glucose 経口投与時において、コントロール食群に比べて増加しており膵 β 細胞の減少が始まる前から小腸において負荷がかかっている可能性が示唆された。この結果は、糖尿病の発症メカニズムにおいて GLP-1 分泌減少が早期に起こり、その結果、膵 β 細胞の小胞体ストレス緩和作用が減少している可能性が考えられる (Fig. 21B)。

本研究から、これまでの糖尿病の発症メカニズムに加えて新たに、GLP-1 産生の低下を介する糖尿病の発症メカニズムの可能性が示唆された。本研究により糖尿病発症メカニズムの解明が進み、より有効な治療法の確立および予防法の発展に期待する。

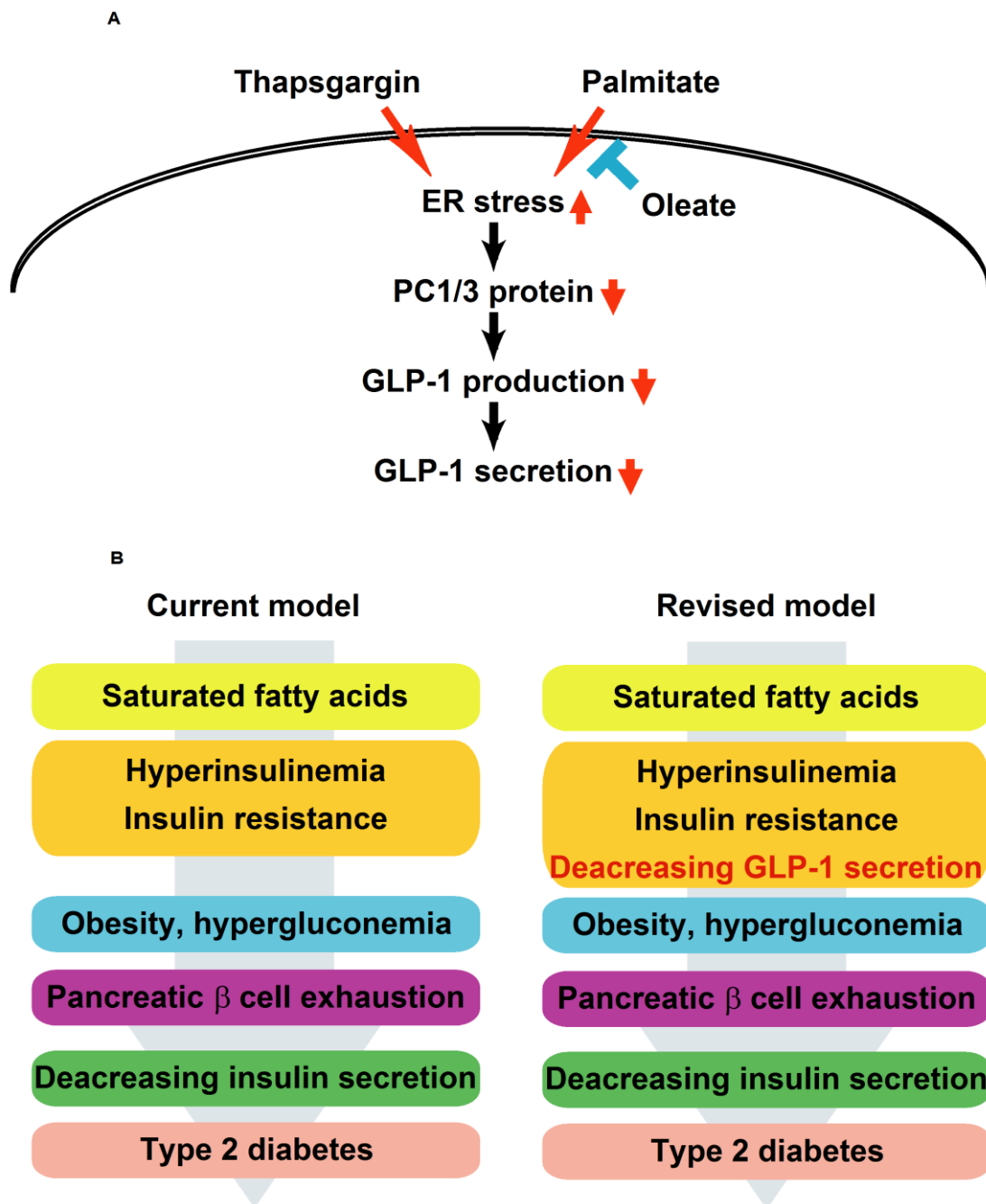


Figure 21. Effects of ER stress on GLP-1 production.

A, scheme illustrating the effects of ER stress on GLP-1 secretion. B, scheme illustrating of the model pathogenic mechanism of type 2 diabetes.

## 7. 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 平澤 典保 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始多大なる御指導、御助言を下さいました東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 平塚 真弘 准教授、ならびに、東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 瀬川 良佑 助手、東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 高橋 亜紀 元助手に心より御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、副査としてご助言くださいました東北大学大学院薬学研究科 佐藤 博 教授ならびに、吉成 浩一 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、快く実験機器を使用させて下さいました東北大学大学院薬学研究科 分子細胞生化学分野 青木 淳賢 教授に深く御礼申し上げます。

また、快く GLUTag 細胞を供与して下さいました北海道大学大学院農学研究院 食品栄養学研究室 比良 徹 助教、京都大学大学院薬学研究科 薬理ゲノミクス・ゲノム創薬科学 平澤 明 准教授に深く御礼申し上げます。

最後に、研究室生活を共に過ごし互いに切磋琢磨し合った水野 夏実氏、Siddhartha Shankar Das 氏をはじめとする東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野の皆様、今までの学生生活を全面的に支えてくれた家族に心から感謝します。

## 8. 引用文献

1. 平成 23 年国民健康・栄養調査報告.
2. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993;329(14):977–86. doi:10.1056/NEJM199309303291401.
3. Nathan DM, Cleary PA, Backlund J-YC, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;353(25):2643–53. doi:10.1056/NEJMoa052187.
4. Marchetti P, Bugliani M, Lupi R, et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia.* 2007;50(12):2486–94. doi:10.1007/s00125-007-0816-8.
5. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107(7):881–91.
6. Calton M, Zeng H, Urano F, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* 2002;415(6867):92–6. doi:10.1038/415092a.
7. Cnop M, Foufelle F, Velloso L a. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med.* 2011:1–10. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.010.

8. Jeschke M. Endoplasmic reticulum stress and insulin resistance post-trauma: similarities to type 2 diabetes. *J Cell Mol.* 2011. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01405.x.
9. Paolisso G, Tataranni P a, Foley JE, Bogardus C, Howard B V, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia.* 1995;38(10):1213–7.
10. Boden G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):1–12. doi:10.1016/j.ecl.2008.06.007.Obesity.
11. Charles M a, Eschwège E, Thibault N, et al. The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia.* 1997;40(9):1101–6.
12. Risérus U, Willett WC HF. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog lipid Res.* 2009;48(1):44–51. doi:10.1016/j.plipres.2008.10.002.Dietary.
13. Lai E, Bikopoulos G, Wheeler MB, Rozakis-Adcock M, Volchuk A. Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(3):E540–50. doi:00478.2007 [pii] 10.1152/ajpendo.00478.2007.
14. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306(5695):457–61. doi:10.1126/science.1103160.

15. Peng G, Li L, Liu Y, et al. Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology*. 2011;152(6):2206–18. doi:10.1210/en.2010-1369.
16. 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」2010年版.pdf.
17. Mensink RP, Katan MB. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *N Engl J Med*. 1989;321(7):436–41. doi:10.1056/NEJM198908173210705.
18. Ugleholdt R, Poulsen M-LH, Holst PJ, et al. Prohormone convertase 1/3 is essential for processing of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide precursor. *J Biol Chem*. 2006;281(16):11050–7. doi:10.1074/jbc.M601203200.
19. Jang H-J, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(38):15069–74. doi:10.1073/pnas.0706890104.
20. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012;483(7389):350–4. doi:10.1038/nature10798.
21. Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(12):728–42. doi:10.1038/nrendo.2012.140.

22. Cunha DA, Ladrière L, Ortis F, et al. Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB. *Diabetes*. 2009;58(12):2851–62. doi:10.2337/db09-0685.
23. Mima A, Hiraoka-Yamamoto J, Li Q, et al. Protective effects of GLP-1 on glomerular endothelium and its inhibition by PKC $\beta$  activation in diabetes. *Diabetes*. 2012;61(11):2967–79. doi:10.2337/db11-1824.
24. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*. 2004;109(8):962–5. doi:10.1161/01.CIR.0000120505.91348.58.
25. Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, Wright JW, Howland R, Marks V. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut*. 1996;38(6):916–9.
26. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3717–23.
27. Klopp P, Serino M, Vachoux C, Dao TA, Barra Y. Resveratrol Increases Glucose Induced GLP-1 Secretion in Mice : A Mechanism which Contributes to the Glycemic Control. *Control*. 2011;6(6). doi:10.1371/journal.pone.0020700.
28. Rhinn H, Marchand-Leroux C, Croci N, Plotkine M, Scherman D, Escriou V. Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury. *BMC Mol Biol*. 2008;9:62. doi:10.1186/1471-2199-9-62.

29. Cai K, Qi D, Wang O, et al. TNF- $\alpha$  acutely upregulates amylin expression in murine pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2011;54(3):617–26.  
doi:10.1007/s00125-010-1972-9.
30. Xu X, Gupta S, Hu W, McGrath BC, Cavener DR. Hyperthermia induces the ER stress pathway. *PLoS One*. 2011;6(8):e23740. doi:10.1371/journal.pone.0023740.
31. Mehran AE, Templeman NM, Brigidi GS, et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab*. 2012;16(6):723–37.  
doi:10.1016/j.cmet.2012.10.019.
32. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:351982. doi:10.1155/2011/351982.
33. Peyot M-L, Pepin E, Lamontagne J, et al. Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes*. 2010;59(9):2178–87.  
doi:10.2337/db09-1452.
34. Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL. Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol Endocrinol*. 1994;8(12):1646–55. doi:10.1210/mend.8.12.7535893.
35. Brubaker PL, Schloos J, Drucker DJ. Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology*. 1998;139(10):4108–14. doi:10.1210/endo.139.10.6228.



36. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab.* 2008;8(6):532–9. doi:10.1016/j.cmet.2008.11.002.
37. Peter A, Weigert C, Staiger H, et al. Individual Stearoyl-CoA Desaturase 1 Expression Modulates Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Human Myotubes and Is Associated Sensitivity In Vivo. 2009;58(August):1757–1765. doi:10.2337/db09-0188.
38. Liu T, Zhao Y, Tang N, et al. Pax6 directly down-regulates Pcsk1n expression thereby regulating PC1/3 dependent proinsulin processing. *PLoS One.* 2012;7(10):e46934. doi:10.1371/journal.pone.0046934.
39. Zhou Y, Lindberg I. Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J Biol Chem.* 1993;268(8):5615–23.
40. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3015–3025. doi:10.1172/JCI28898.
41. Nguyen MTA, Favelyukis S, Nguyen A-K, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2007;282(48):35279–92. doi:10.1074/jbc.M706762200.
42. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link  $\beta$  cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* 2012;15(4):518–33. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.023.

43. Lotz M, Gütle D, Walther S, Ménard S, Bogdan C, Hornef MW. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2006;203(4):973–84. doi:10.1084/jem.20050625.
44. Berdichevsky A, Guarente L, Bose A. Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *J Biol Chem*. 2010;285(28):21581–21589. doi:M109.093633 [pii] 10.1074/jbc.M109.093633.
45. Takimoto E, Kass D a. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. 2007;49(2):241–8. doi:10.1161/01.HYP.0000254415.31362.a7.
46. Kappe C, Holst JJ, Zhang Q, Sjöholm K. Molecular mechanisms of lipoapoptosis and metformin protection in GLP-1secreting cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;(September). doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.010.
47. Mohammed AM, Syeda K, Hadden T, Kowluru A. Upregulation of phagocyte-like NADPH oxidase by cytokines in pancreatic beta-cells: attenuation of oxidative and nitrosative stress by 2-bromopalmitate. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(1):109–14. doi:10.1016/j.bcp.2012.09.024.
48. Chase JF, Tubbs PK. Specific inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation by 2-bromopalmitate and its coenzyme A and carnitine esters. *Biochem J*. 1972;129(1):55–65.
49. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005;11(1):90–4. doi:10.1038/nm1168.

50. Kijima Y, Ogunbunmi E, Fleischer S. Drug action of thapsigargin on the Ca<sup>2+</sup> pump protein of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1991;266(34):22912–22918.
51. Preston a M, Gurisik E, Bartley C, Laybutt DR, Biden TJ. Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia*. 2009;52(11):2369–73. doi:10.1007/s00125-009-1506-5.
52. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC OS. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*. 1997.
53. Jackson RS, Creemers JWM, Farooqi IS, et al. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1550–1560. doi:10.1172/JCI200318784.
54. Benzinou M, Creemers JWM, Choquet H, et al. Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet*. 2008;40(8):943–5. doi:10.1038/ng.177.

## 発表論文リスト

1. Glucagon-like peptide-1 production in the GLUTag cell line is impaired by free fatty acid via endoplasmic reticulum stress