

グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)による膵β細胞保護の分子機構の解明 ～ヒトGLP-1アナログリラグルチドによる糖尿病モデル *db/db* マウスへの介入実験からの検討

下田 将司

川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の膵β細胞保護作用の分子機構を明らかにするため、ヒトGLP-1アナログ製剤リラグルチド (LIRA) による糖尿病モデル動物への介入実験を行った。雄性10週齢の*db/db* マウスに対し、LIRAもしくはリン酸緩衝液を2日間もしくは2週間皮下投与し、膵ラ氏島の形態学的、生化学的解析に加え、膵β細胞が主に存在する膵ラ氏島中心部の遺伝子発現の変化について、laser capture microdissection, real-time RT-PCRを用い検討した。LIRAの2週間投与は、*db/db* マウスの代謝パラメーター、インスリン感受性を改善した。LIRAの2週間投与後に採取した膵ラ氏島のグルコース応答性インスリン分泌反応 (GSIS)、インスリン含量は増加し、中性脂肪含量は減少していた。LIRAの2週間投与は、膵β細胞の分化増殖促進遺伝子、抗アポトーシス遺伝子、抗酸化ストレス遺伝子の発現を増加させ、分化抑制遺伝子、アポトーシス誘導遺伝子、小胞体ストレス遺伝子、脂質合成遺伝子の発現を減じた。LIRAの2日間投与は、僅かに代謝パラメーターを改善したが、膵ラ氏島のGSIS、インスリン含量、中性脂肪含量には影響しなかった。LIRAの2日間投与は、膵β細胞の分化増殖促進遺伝子、抗アポトーシス遺伝子の発現を増加させ、アポトーシス誘導遺伝子の発現を減じたが、酸化ストレス、小胞体ストレス、脂質合成に関する遺伝子の発現には影響しなかった。膵ラ氏島を用いた免疫組織染色 (細胞増殖、アポトーシス、酸化ストレス) の結果は、遺伝子解析結果と一致した。LIRAは直接的な細胞動態調節作用とともに、糖脂肪毒性の改善を介した酸化ストレス、小胞体ストレスの軽減作用により膵β細胞量を増加させる。

(平成22年10月22日受理)

キーワード：グルカゴン様ペプチド-1, 膵β細胞量, 細胞動態, 酸化ストレス, 小胞体ストレス

緒言

2型糖尿病患者におけるグルコース応答性インスリン分泌反応は早期から低下すること¹⁾、膵β細胞の機能は経年的に低下すること²⁾、さらに細胞量は非糖尿病患者と比較し減少していることが報告されている³⁾。糖尿病性血管合併症の阻止には厳格な血糖管理を長期間維持が必須

であるが、そのためには膵β細胞機能を如何に保持するかが重要である。そのため、新たな糖尿病治療の戦略として、膵β細胞量および機能の保持に関する研究に注目が集まり、これまでにインスリン抵抗性改善薬による2型糖尿病患者の膵β細胞機能改善作用が報告されている^{4,5)}。同様に、近年、抗糖尿病薬として新たに

別刷請求先
下田将司
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学

電話：086 (462) 1111
ファックス：086 (462) 1199
Eメール：masashi-s@med.kawasaki-m.ac.jp

登場したグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 関連薬は、膵 β 細胞量⁶⁻⁸⁾ および膵 β 細胞機能⁹⁻¹¹⁾ を保持することにより2型糖尿病の自然史を改善し得るものとして期待されている。

GLP-1は様々な抗糖尿病作用を有している。第一に膵作用として血糖依存性インスリン分泌促進作用^{12, 13)} および血糖依存性グルカゴン分泌抑制作用^{14, 15)} を有する。第二に膵外作用として胃内容排出遅延作用^{16, 17)}、食欲抑制作用¹⁸⁾、インスリン感受性改善作用¹⁹⁾ を持つ。さらに、GLP-1は、膵 β 細胞の複製^{20, 21)}、新生²²⁾、分化²²⁾ を促進し、アポトーシスを抑制する²³⁻²⁷⁾ ことが報告されている。しかしGLP-1を臨床応用する際には、生体内に広範に存在するジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) により速やかに分解され数分で失活する²⁸⁾ という問題点がある。新規ヒトGLP-1アナログ製剤リラグルチド (LIRA) は、活性型GLP-1の34位リジンアルギニンに置換し、 γ グルタミンをスパーサーとしてパルミトール酸を付加することでアルブミンとの結合を容易にし、DPP-4抵抗性を獲得した薬剤である²⁹⁾。

本研究は、GLP-1による膵 β 細胞保護作用の分子機構を明らかにするため、LIRAを用いて肥満糖尿病モデル *db/db* マウスに短期および長期介入を試み、その膵 β 細胞保護作用の詳細を検討した。

材料と方法

実験動物

雄性10週齢 BKS.Cg-*Lepr^{db}/+ Lepr^{db}/Jcl* (*db/db*) マウス (日本クレア株式会社, 東京) を対象とするため、8週齢より搬入した。マウスは、実験期間を通して室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度20~60%、照明時間7~21時のクリーンエリア飼育室で飼育し、固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業, 東京) と水道水を自由摂取させた。本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 06-062)、川崎医科大学動物実験指針に基づき行った。

薬剤投与方法

雄性10週齢 *db/db* マウスは、無作為にLIRA投与群 (LIRA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) もしくはリン酸緩衝液 (PBS : phosphate-buffered saline) 投与群に分けられ、1日2回の皮下投与 (AM9:00およびPM4:00) を受けた。本研究でのLIRA投与量は、既報⁷⁾ に基づき決定した。

体重、摂餌量、生化学データ測定方法

体重および摂餌量は9週齢から12週齢まで毎週測定した。採血は尾静脈から10週齢より1週ごとに12週齢まで行った。血糖値は、フリースタイル[®] (キッセイ薬品工業, 松本) を用い、採血直後に行った。血漿分離した採血試料は -80°C にて保存した。血漿インスリン濃度測定は超高感度マウスインスリン測定キット (森永生科学研究所, 横浜) を用い、血漿中性脂肪濃度測定はトリグリセライドE-テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用い行った。

インスリン負荷試験

LIRA投与2日後および2週後に、空腹条件下 (10時間以上の絶食) においてインスリン (ヒューマリンR[®] 2.0単位/kg, 日本イーライリリー株式会社, 神戸) をマウス腹腔内に投与した。採血は30分ごとに尾静脈から行い、血糖値はフリースタイル[®]を用い、採血直後に行った。

膵ラ氏島採取と膵ラ氏島インスリン含量測定

膵ラ氏島の単離には Kitamura らの方法³⁰⁾ に準じてコラゲナーゼ消化法を用いた。1.5mg/ml コラゲナーゼ (collagenase P, Roche, Swiss) と10%ウシ胎仔血清を含むHBSS (Hanks' balanced salt solution : 137mM NaCl, 5.36mM KCl, 0.44mM KH_2PO_4 , 5.55mM Glucose, 0.03mM Phenol Red, 0.34mM Na_2HPO_4 , 0.27mM MgSO_4 , 1.26mM CaCl_2 , 5.83mM NaHCO_3) を、ペントバルビタール (0.05mg/g) にて腹腔内麻酔を行ったマウスの胆管に27ゲージの注射針で3ml注入し、膵管へ逆流させた。コラゲナーゼ注入に

よって膨張した膵臓を採取し、50ml コニカルチューブに移し、37℃で19分間継続的に振とうした。HBSS 30mlを加えて遠心(1,100rpm, 2分)を3度繰り返す。最後のペレットに10mlのHBSSを添加して金属製フィルターに通した。さらにHistopaque-1077 (sigma, St. Louis, MO, USA)を用いて遠心(2,500rpm, 22分)し、内分泌組織と外分泌組織を分離した。中間層を採取し、HBSSを30ml入れて遠心(1,100rpm, 2分)する操作を3度繰り返した。最後に残った膵ラ氏島をシャーレに移し実体顕微鏡下で、ピペットを用いて膵ラ氏島を採取した。インスリン含量測定までは、-80℃にて凍結保存し、インスリン含量測定は、膵ラ氏島を酸エタノールで溶解し、前述した超高感度マウスインスリン測定キットにて測定した。

膵ラ氏島中性脂肪含量測定

前述した方法で採取した膵ラ氏島は、50 μ lのHigh-salt buffer (2 M NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM sodium phosphate)を添加したPBSにて2回洗浄した後、1分間超音波処理した。得られた試料を遠心(12,000rpm, 5分)した後、上清10 μ lを10 μ l ϵ -ブタノール、50 μ l Triton X-100-methyl alcohol (1 : 1)と混合した。膵ラ氏島中性脂肪含量測定は前述したトリグリセライドE-テストワコーにて測定した。

グルコース応答性インスリン分泌反応 (GSIS)

前述した方法で採取した膵ラ氏島をKRB-HEPES バッファー (5mg/ml BSA 含有 KRBH, pH 7.4) でプレインキュベートし、遠心(10,000rpm, 1分)後に上清を3.0mMもしくは16.7mM グルコースと置換し、60分間インキュベートした。遠心(10,000rpm, 1分)により得られた上清を用い、前述した超高感度マウスインスリン測定キットにてインスリン濃度を測定した。

膵ラ氏島の組織学的検討

第12週齢に、ペントバルビタール (0.05mg/g)

にてマウスの腹腔内麻酔を行い、膵臓を摘出し、ホルマリン固定・パラフィン包埋した後、4 μ mの薄切スライド標本を作製した。免疫染色は酵素抗体法に従って行った。まず膵パラフィン切片をレモゾール[®] (和光純薬工業株式会社, 大阪), エタノールにて脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするため、3% 過酸化水素加メタノールに15分間浸した。10mM PBS (pH7.0) で洗浄後、1次抗体として抗膵ホルモン2種混合抗体 (ウサギ抗グルカゴン抗体 : ウサギ抗ソマトスタチン = 1 : 1, 25℃, 1時間, 株式会社ニチレイ, 東京), 抗マウス PCNA (proliferative cell nuclear antigen) モノクローナル抗体 (4℃, 14時間, 株式会社ニチレイ, 東京), 抗マウス4-HNE (4-hydroxy-2-noneal modified protein) モノクローナル抗体 (4℃, 14時間, 日本老化制御研究所, 袋井) を使用した。PBSにて洗浄後、シンプルステイン MAX-PO[®] (株式会社ニチレイ, 東京) を添加し、25℃にて10分間反応させた。PBSにて洗浄後、シンプルステイン DAB 溶液 (株式会社ニチレイ, 東京) を添加し、25℃にて7分間反応させ、発色させた。対比染色は Mayer Hematoxylin にて行った。TUNEL アッセイは、DeadEnd[™] Colorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI) を用い、既報³¹⁾に基づき行った。

形態学的解析

全膵切片面積、膵ラ氏島面積、グルカゴン・ソマトスタチン陽性細胞、PCNA 陽性細胞、4-HNE 陽性細胞、TUNEL 陽性細胞の計測は、NIH Image (Ver. 1.61) を用いた。膵β細胞量は、膵重量 (mg) \times %膵ラ氏島面積 \times %膵β細胞数により算出した。PCNA 免疫染色および4-HNE 免疫染色の判定は、既報^{32, 33)}に基づき、免疫反応の強度により半定量した。免疫反応の強度は、0点 (染色なし), 1点 (弱陽性 : 染色程度は弱い, 無染色の背景からは区別可能), 2点 (中等度陽性 : 染色程度が強い細胞が2個以下), 3点 (強陽性 : 染色程度が強い細胞が3個以上) に群別し、50個の膵ラ

氏島を用いて判定し、その平均値を算出した。TUNEL アッセイは、100個の腭ラ氏島を用いて判定し、TUNEL 陽性細胞数の平均値を算出した。

LCM 法

膵β細胞遺伝子発現を検討するため、既に当教室で確立した腭ラ子島のβ細胞特異的遺伝子発現解析を可能にする LCM (laser capture microdissection) 法³⁴⁾を用いた。ペントバルビタール (0.05mg/g) にてマウスの腹腔内麻酔を行い、膵臓を採取後、凍結組織包埋剤に入れ凍結保存し、凍結切片をクリオスタットで8μmにスライスし、スライドガラスに張り付け、染色まで-80℃にて凍結保存した。スライドを70%エタノール、Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水にそれぞれ30秒間浸した後、ヘマトキシリンで30秒間染色した。さらにDEPC処理水、70%、95%、100%エタノールに各30秒間浸した後、キシレンに5分間浸した。組織染色を行った後、PixCell system (Arcturus, Mountain View Ca. USA) を用いて組織切片内の腭ラ氏島にレーザーを照射し、専用転写フィルムに採取した。最初に周辺部を採取した後に膵β細胞が主に存在する中心部を採取した。

RNA 抽出と Reversed transcription

RNA 抽出には PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus PN 12206-01, Applied Biosystems, Life Technologies. Corp., Carlsbad, CA) を使用した。DNase 処理を追加し、ゲノム DNA のコンタミネーションを回避した。Reversed transcription には TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems N808-0234) を使用し、cDNA 合成のためのプライマーには Random Hexamers を用いた。

Real time-PCR 法

SYBR Green によるおよび real-time RT-PCR (reverse transcriptase- polymerase chain reaction) 法を用いた。プライマーは GenBank の

nucleotides からダウンロードした mRNA sequence に基づき Primer Express (Applied Biosystems) で設計し、blast を用いてプライマーの相同性について確認した。膵β細胞分化、細胞増殖、アポトーシス、酸化ストレス、小胞体ストレス、脂質合成に関するプライマーを使用し遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

サンプル量0.5μl、プライマー溶液を1μl、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、希釈水の混液を9μl入れて最終10μlの反応液を作成した。ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) で55サイクルの Real time-PCR を行った。PCR 条件は50℃ 2分、95℃ 10分、95℃ 15秒、60℃ 1分とした。全ての実験において Dissociation curve 分析を行い解離温度、アガロースゲル電気泳動で PCR products の確認を行った。遺伝子発現量の定量化のため、内部コントロールとして18srRNA を用い、 $2^{-\Delta CT}$ を計算した。

統計学的解析

全てのデータは平均値±標準誤差 (mean ± SEM) で記した。多群間の比較は Mann-Whitney U test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計検定には StatView- ver.5 (SAS, NC, USA) を使用した。

結果

代謝に及ぼす影響

LIRA 投与1週間において、コントロール群と比較し、*db/db* マウスの摂餌量は減少し (LIRA 群: 23.7 ± 1.6 vs. コントロール群: 39.8 ± 0.8 g/週, $p < 0.005$, 図1a)、体重増加は抑制された (LIRA 群: 41.3 ± 0.4 vs. コントロール群: 43.3 ± 0.5 g, $p < 0.05$, 図1b)。また、空腹時血糖値および空腹時血漿インスリン値も、コントロール群と比較し減少した (LIRA 群: 126 ± 7.2 vs. コントロール群: 169 ± 10.1 mg/dl, $p < 0.05$, 図1c; LIRA 群: 3.3 ± 0.3 vs. コントロール群: 6.0 ± 0.5 ng/ml, $p < 0.01$, 図1d)。これらの効果は LIRA 投与2週間まで持続し、LIRA は、投

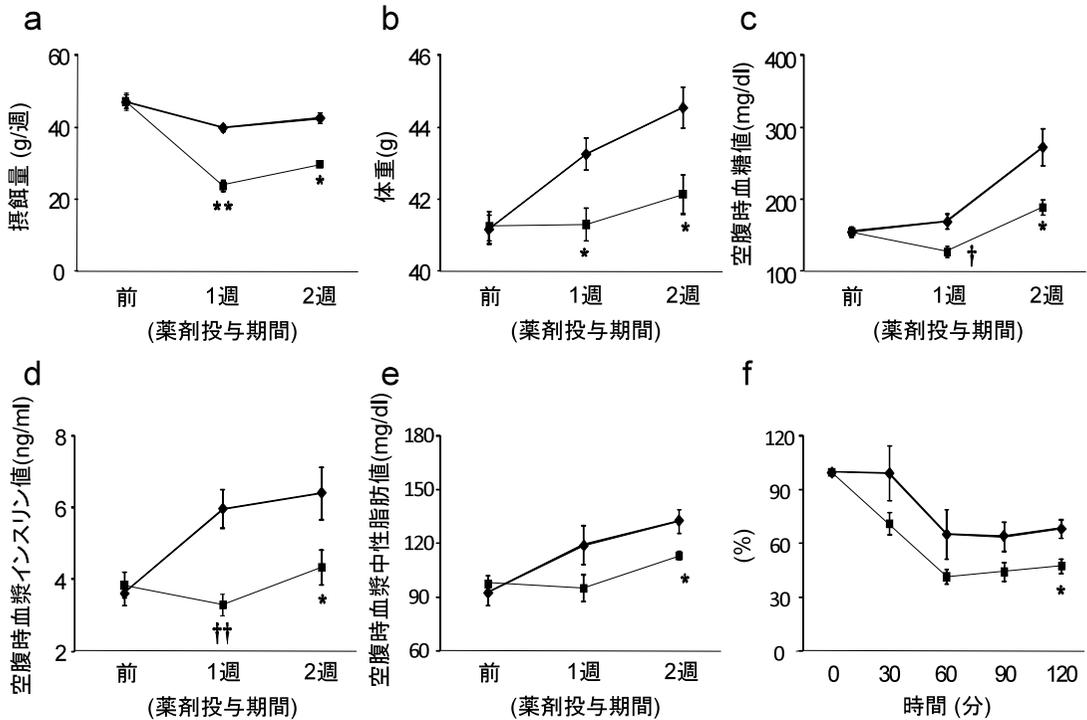


図1 代謝パラメーターの変化およびインスリン負荷試験

◆: コントロール群 (n=7), ■: リラゲルチド群 (n=7).

a. 摂餌量の変化. b. 体重の変化. c. 空腹時血糖値の変化. d. 空腹時血漿インスリン値の変化. e. 空腹時血漿中性脂肪値の変化. f. インスリン負荷試験 (インスリン 2.0単位/kg 腹腔内投与). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, † $p < 0.01$, †† $p < 0.001$.

与2週時点において高中性脂肪血症 (LIRA 群: 113 ± 2.4 vs. コントロール群: 133 ± 6.5 mg/dl, $p < 0.01$, 図1 e) およびインスリン感受性 (図1 f) も改善させた. 2日介入後の代謝パラメーターのデータは示していないが, LIRA は, 2日間介入後においてもコントロール群と比較し, 体重, 空腹時血糖値および空腹時血漿中性脂肪値の増加を抑制した. 2日介入後の空腹時血漿インスリン値は, 2週介入後とは異なり, LIRA 群はコントロール群と比較し増加した. 2日介入後のインスリン感受性は変化しなかった.

膵ラ氏島構築およびβ細胞機能への影響

LIRA による *db/db* マウスの膵ラ氏島への影響を明らかにする目的で, まずグルカゴン・ソマトスタチン二重染色を行い, 膵ラ氏島構築および膵β細胞量への影響について検討した.

LIRA 投与群の膵ラ氏島は, コントロール群と比較し, 形態がより保持されていた (図2 a). また, LIRA は, コントロール群と比較し膵β細胞量を有意に増加させた (LIRA 群: 7.7 ± 0.7 vs. コントロール群: 4.9 ± 0.5 mg, $p < 0.01$, 図2 a). LIRA による2週介入後の膵ラ氏島インスリン含量は, 2週介入後のコントロール群と比較し有意に増加した (LIRA 群: 33.7 ± 2.3 vs. コントロール群: 17.2 ± 2.1 ng/islet, $p < 0.01$, 図3 a). コントロール群の膵ラ氏島インスリン含量は週齢とともに減少する傾向が認められたが (2日: 27.1 ± 1.7 vs. 2週: 17.2 ± 2.1 ng/islet, $p = 0.1$, 図3 a), LIRA 群の膵ラ氏島インスリン含量は週齢とともに有意に増加した (2週: 33.7 ± 2.3 vs. 2日: 27.0 ± 1.7 ng/islet, $p < 0.05$, 図3 a). LIRA の2日介入では, 膵ラ氏島のGSISに対する影響は認められなかったが,

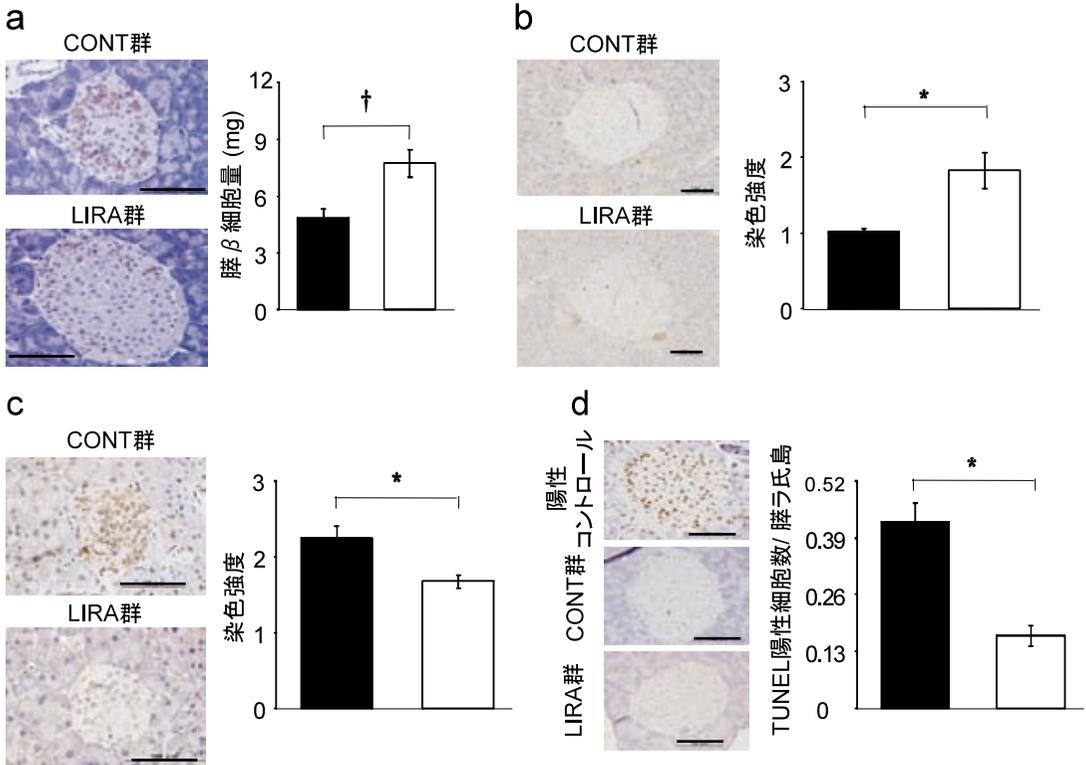


図2 膵ラ氏島組織像の比較

■: コントロール群 (12週齢), □: リラグルチド群 (12週齢).

a. 膵ラ氏島構築および膵β細胞量 (各群 n=5). b. PCNA (proliferative cell nuclear antigen) 免疫染色 (各群 n=5). c. 4-HNE (4-hydroxy-2-noneal modified protein) 免疫染色 (各群 n=5). d. TUNEL アッセイ (各群 n=3). 陽性コントロールは DNase を用いた. Scale bar: 100 μm. *p < 0.05, † p < 0.01.

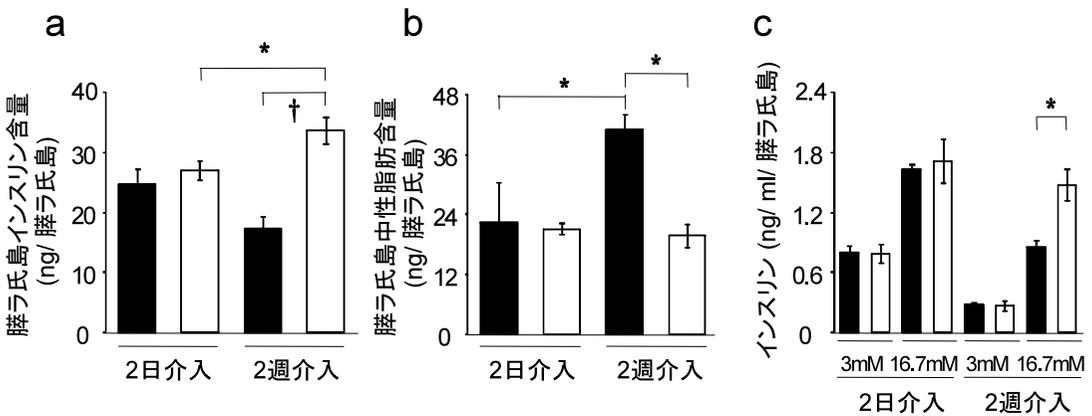


図3 膵ラ氏島における生化学パラメーターの比較

■: コントロール群, □: リラグルチド群

a. 膵ラ氏島インスリン含量 (各群 n=5). b. 膵ラ氏島中性脂肪含量 (各群 n=5).

c. 低濃度グルコース (3mM) および高濃度グルコース (16.7mM) によるグルコース応答性インスリン分泌反応 (各群 n=5). *p < 0.05, † p < 0.01.

2週間介入では、LIRAは16.7mMの高濃度グルコース負荷によるGSISを改善した(LIRA群: 1.5 ± 0.2 vs. コントロール群: 0.9 ± 0.1 ng/ml/islet, $p < 0.05$, 図3c). 膵ラ氏島中性脂肪含量は、コントロール群において週齢とともに増加したが(2日: 22.4 ± 1.1 vs. 2週: 41.0 ± 8.0 ng/islet, $p < 0.05$, 図3b), LIRAは加齢による膵ラ氏島への中性脂肪蓄積を抑制した(2日: 21.2 ± 2.3 vs. 2週: 19.9 ± 3.0 ng/islet, 図3b).

膵ラ氏島の免疫組織学的解析

次にLIRAによる膵β細胞量保持作用のメカニズムを明らかにするために、免疫組織学的解析を行った. 細胞増殖マーカーであるPCNA免疫染色の結果、LIRA群はコントロール群と比較しPCNA陽性細胞数が増加し(図2b), 酸化ストレスマーカーである4-HNE免疫染色では、LIRAにより4-HNE陽性細胞数は減少した(図2c). また、アポトーシスマーカーであるTUNELアッセイでは、TUNEL陽性細胞数はLIRAにより減少した(図2d).

膵β細胞遺伝子発現への影響

さらにLIRAによる2日および2週間介入後、膵β細胞遺伝子発現の変化について検討した. LIRAによる2日および2週間介入は、ともに細胞分化促進遺伝子(*Hlxb-9*: Homeobox gene *HB9*, *Neuro D*: Neurogenic differentiation, *PDX-1*: Pancreatic-duodenal homeobox-1)を増加させ、分化抑制遺伝子(*Hes-1*: Hairy enhancer of split-1)の発現を低下させた(図4). 細胞増殖促進遺伝子(*ERK-1*: Extracellular signal-regulated kinase-1, *cyclin D*)についても同様に、LIRAの2日および2週間介入により発現量が増加した(図4). LIRAの2日および2週間介入は、アポトーシス抑制遺伝子(*Bcl-2*: B cell lymphoma protein-2)の発現量を増加させ(図5), アポトーシス誘導遺伝子(*Caspase 8*, *Caspase 3*, *CAD*: Caspase-activated DNase)の発現量を減らした(図5). これらの遺伝子への影響とは異なり、LIRAは2週間介入においてのみ抗酸化ストレス遺伝子(*Catalase*, *GPx*: Glutathione peroxidase)の発現を増加させ、

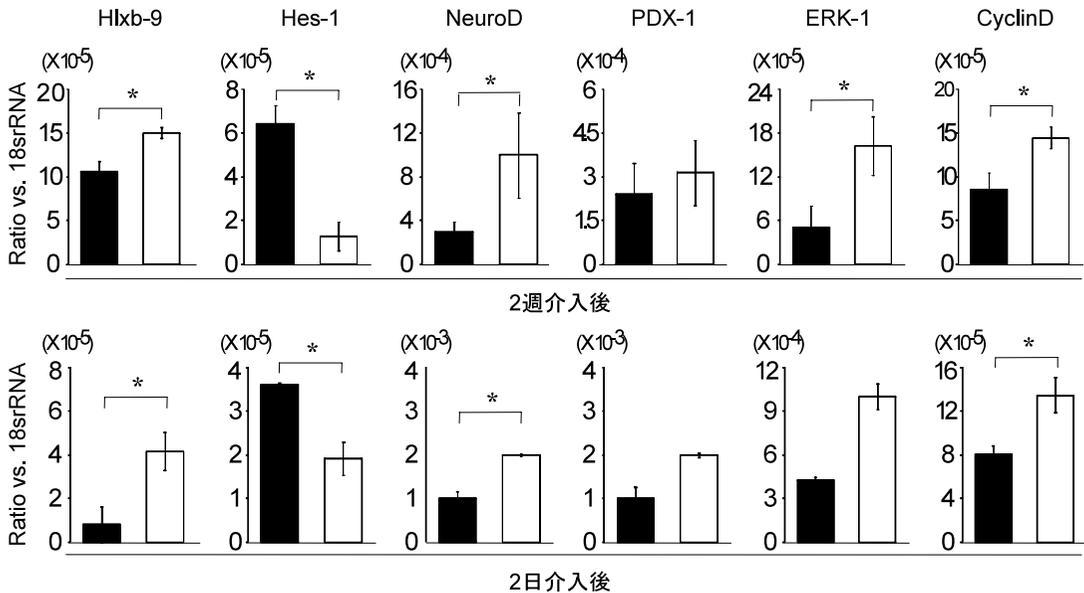


図4 膵β細胞特異的分化増殖関連遺伝子発現プロファイルの比較

■: コントロール群, □: リラグルチド群

上段: 2週間介入後 (各群 n=4), 下段: 2日介入後 (各群 n=4). * $p < 0.05$.

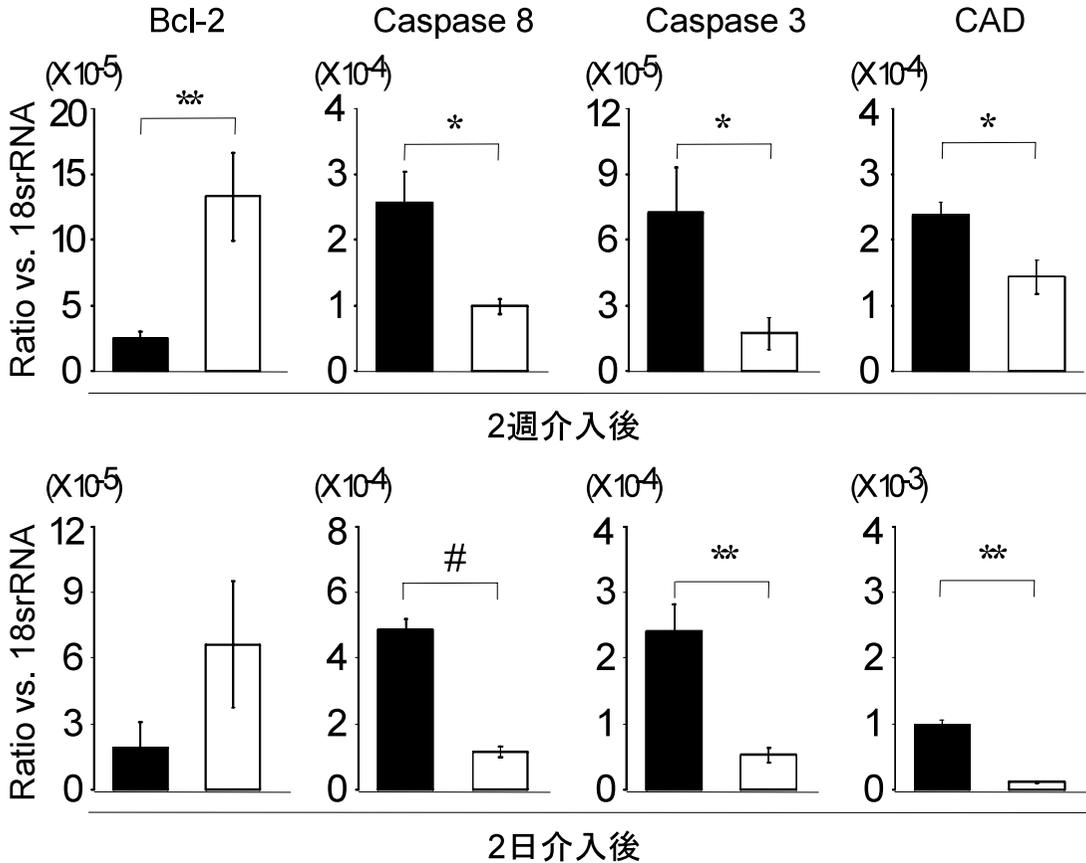


図5 膵β細胞特異的アポトーシス関連遺伝子発現プロファイルの比較

■: コントロール群, □: リラグルチド群

上段: 2週介入後 (各群 n=4), 下段: 2日介入後 (各群 n=4). * p < 0.05, ** p < 0.005, † p < 0.01, # p < 0.001.

小胞体ストレス遺伝子 (XBP-1: *X-box-binding protein 1*) および脂質合成遺伝子 (*SREBP-1c*: *Sterol-regulatory element binding protein-1c*, *FAS*: *Fatty acid synthase*) の発現を減少させた (図6).

考 察

本研究において、肥満糖尿病モデル *db/db* マウスに対しヒト GLP-1アナログ LIRA の投与を行い、その慢性投与が *db/db* マウスの膵β細胞量を増加させることを明らかにした。この結果は、部分膵切除を行った2型糖尿病モデルラットに対し、LIRAと同様にGLP-1受容体作動薬である Exendin-4²⁰⁾ を慢性投与した報告や *db/db* マウスに対し LIRA を慢性投与した報告に一致する⁷⁾。

膵ラ氏島の PCNA 免疫染色の結果は、GLP-1の膵β細胞量維持作用が細胞増殖促進作用を介している可能性を示唆している。さらに LIRA の短期投与および長期投与が、β細胞に富む膵ラ氏島中心部の細胞分化促進遺伝子や細胞増殖促進遺伝子の発現を増加させ、かつ細胞分化抑制遺伝子の発現を減少させたことは、GLP-1が直接的に細胞分化および増殖を促進させることにより膵β細胞量を増加させることを強く示唆するものである。また内胚葉上皮細胞マーカーである *Hlx-9* 遺伝子および内分泌前駆細胞マーカーである *NeuroD* 遺伝子の発現に対し LIRA が直接的に影響するという結果は、GLP-1が膵β細胞より未分化な細胞レベルで作用していることを示唆しており、注目に値する。

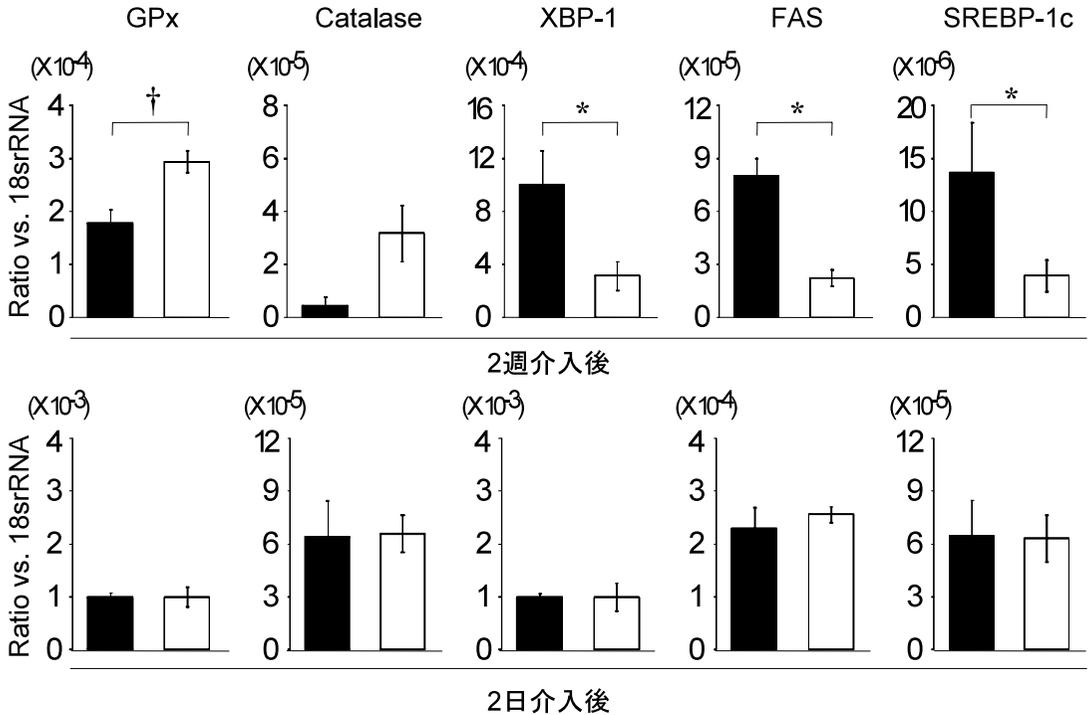


図6 膵β細胞特異的な酸化ストレス、小胞体ストレス、脂質合成関連遺伝子発現プロファイルの比較
 ■: コントロール群, □: リラグルチド群
 上段: 2週介入後 (各群 n=4), 下段: 2日介入後 (各群 n=4). * $p < 0.05$, † $p < 0.01$.

これまでに GLP-1誘導性の細胞内シグナル伝達機構については、幾つかの報告がなされている。GLP-1受容体への結合後、アデニルシクラーゼ活性が上昇し、cyclic adenosine monophosphate (AMP)/protein kinase A (PKA) 経路が活性化される。さらに GLP-1誘導性 DNA 合成および複製において、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)³⁵⁾, p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK)³⁶⁾, epidermal growth factor receptor (EGFR)³⁷⁾, Protein kinase C ζ ³⁸⁾も重要な役割を担っている。このように膵β細胞における GLP-1シグナル伝達は、G 蛋白共役型受容体とチロシンキナーゼ受容体の様々な相互作用により行われている。本研究では LIRA の短期投与および長期投与において、ともに *ERK-1* 遺伝子の発現増加を認めており、LIRA は少なくとも PKA-MAPK 経路を介して、膵β細胞量を増加させたと考えられる。一方、既報³⁵⁾と同様に本研究においても、PI3K 経路の下流に位置する膵β細胞分化に重

要な *PDX-1* 遺伝子の発現量が LIRA 投与により増加傾向を示しており、LIRA の膵β細胞量増加作用は PI3K 経路を介している可能性も示唆された。

本研究では TUNEL アッセイにおいて LIRA によるアポトーシス抑制作用が示唆され、遺伝子発現解析においても、*Bcl-2*, *Caspase 8*, *Caspase 3*, *CAD* 等のアポトーシス関連遺伝子発現が、LIRA 投与により調節を受けていた。細胞アポトーシスに関しては *ERK-1/2*が cyclic AMP-responsive element-binding protein を介し、*Bcl-2*遺伝子および蛋白質の発現、*Caspase 3*活性を調節するとの報告³⁹⁾、膵β細胞では、細胞外基質が PI3K 経路ではなく ERK 経路を介して *Caspase 8*活性を抑制するとの報告⁴⁰⁾がある。従って GLP-1は少なくとも一部は ERK を介して膵β細胞アポトーシスを抑制すると考えられる。

本研究で LIRA の長期投与は、膵ラ氏島にお

ける4-HNE 陽性細胞を減少させ、特に膵 β 細胞領域に顕著であったことから、LIRAは膵 β 細胞に対する酸化ストレス軽減作用を有すると考えられた。酸化ストレスに対するGLP-1の影響に関して、Tewらは、INS-1 β 細胞を用い、Exendin-4が直接的に電子伝達系を介し酸化ストレスを抑制すると報告している²⁶⁾。一方、本研究でLIRAは抗酸化ストレス遺伝子*Catalase*および*GPx*の発現量を長期投与により増加させたが、短期投与では影響を示さなかった。また脂質合成関連遺伝子*FAS*および*SREBP-1c*の発現量もLIRAの長期投与でのみ減少した。今回の結果は、Tewらの報告²⁶⁾とは異なり、LIRAによる酸化ストレス改善作用は糖脂肪毒性の改善を介し二次的に発揮されることを示唆するものである。

さらにLIRA長期投与後においてのみ、*XBP-1*遺伝子の発現量が減少しており、LIRAの長期投与による小胞体ストレス改善作用が示唆された。この結果は、Yustaらが*db/db*マウスに対しExndin-4を慢性投与した場合の結果と一致する⁴¹⁾。しかし、Yustaらは、INS-1 β 細胞に対しExendin-4を添加し、Exendin-4はPKA依存性にactivating transcription factor-4の産生を促し、eukaryotic translation initiation factor 2 α の脱リン酸化を惹起し小胞体ストレスを改善すると報告している⁴¹⁾。Yustaらの*in vitro*における報告とは異なり、今回の*in vivo*条件下での実験において、LIRAの短期投与は*XBP-1*遺伝子の発現量に影響しなかった。この相違は、*in vitro*と*in vivo*といった実験条件の違いによるものである可能性は否定できない。

本研究結果は、主に膵ラ氏島中心部の遺伝子解析によって得られたものである。膵ラ氏島を構成している細胞の中でも、膵 β 細胞に対するGLP-1の影響を検討するため、できる限りその他の細胞(α 細胞、 δ 細胞など)の混入を避けなければならない、LCM法を採用した。LIRAによる膵 β 細胞量調節作用の分子機構を総合的に理解するには、今後は蛋白の発現や活性の変化の検討も必要と思われる。LCM法による蛋白

分析は可能であるが、細胞採取の段階でその他の細胞の混入が避けられないため、今回の実験では遺伝子解析にとどめた。また今回の報告は、高血糖や脂質代謝異常といった代謝異常を認める状態における結果であり、正常な代謝状態においてLIRAがどのような影響を示すかについては今後の検討課題である。

本研究から肥満糖尿病モデル*db/db*マウスにおいて、新規ヒトGLP-1アナログ製剤リラグルチドは、直接的な細胞動態調節作用のみならず、糖脂肪毒性の改善を介した酸化ストレスおよび小胞体ストレスの軽減作用により膵 β 細胞量を増加させることが明らかになった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学教室 加来浩平教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を行うにあたり、薬剤の提供のみならず、御助言を賜りましたLotte Bierre Knudsen博士(Novo Nordisk A/S)、さらに研究遂行に多大な御協力頂きました同教室員、研究補助員の皆様に深謝致します。

なお、本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費(18-501, 19-502, 20-505)および日本学術振興会科学研究費補助金(18591008)の援助により行われた。

引用文献

- 1) Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr : The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest* 46 : 1549-1557, 1967
- 2) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group : Overview of 6 years' therapy of type diabetes (UKPDS 16). *Diabetes* 44 : 1249-1258, 1995
- 3) Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC : Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52 : 102-110, 2003
- 4) Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, *et al.* : Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 51 : 2796-2803, 2002
- 5) Ovalle F, Bell DS : Effect of rosiglitazone versus

- insulin on the pancreatic beta-cell function of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27 : 2585-2589, 2004
- 6) Pospisilik JA, Martin J, Doty T, Ehes JA, Pamir N, Lynn FC, Piteau S, Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA : Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52 : 741-750, 2003
- 7) Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB : The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 : E745-752, 2002
- 8) Tourrel C, Bailbe D, Lacombe M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B : Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51 : 1443-1452, 2002
- 9) Fehmann HC, Habener JF : Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I (7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology* 130 : 159-166, 1992
- 10) Wang Y, Perfetti R, Greig NH, Holloway HW, DeOre KA, Montrose-Rafizadeh C, Elahi D, Egan JM : Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J Clin Invest* 99 : 2883-2889, 1997
- 11) D'Alessio DA, Kahn SE, Leusner CR, Ensick JW : Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal. *J Clin Invest* 93 : 2263-2266, 1994
- 12) Mojsos S, Weir GC, Habener JF : Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 79 : 616-619, 1987
- 13) Kreyman B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR : Glucagon-like peptide-1 7-36 : a physiological incretin in man. *Lancet* 2 : 1300-1304, 1987
- 14) Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV : Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon- (78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology* 123 : 2009-2013, 1988
- 15) Nauck MA, Wollschlaeger D, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Willms B : Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* 39 : 1546-1553, 1996
- 16) Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ : Truncated GLP-1 (proglucagon 72-107 amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci* 38 : 665-673, 1993
- 17) Näslund E, Gutniak M, Skogar S, Rössner S, Hellström PM : Glucagon-like peptide-1 increases the period of postprandial satiety and slows gastric emptying in obese men. *Am J Clin Nutr* 68 : 525-530, 1998
- 18) Näslund E, Barkeling B, King N, Gutniak M, Blundell JE, Holst JJ, Rössner S, Hellström PM : Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like-peptide 1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 : 304-311, 1999
- 19) Lee YS, Shin S, Shigihara T, Hahm E, Liu MJ, Han J, Yoon JW, Jun HS : Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 56 : 1671-1679, 2007
- 20) Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S : Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48 : 2270-2276, 1999
- 21) Friedrichsen BN, Neubauer N, Lee YC, Gram VK, Blume N, Petersen JS, Nielsen JH, Møldrup A : Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol* 188 : 481-492, 2006
- 22) Paris M, Tourrel-Cuzin C, Plachot C, Ktorza A : Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited. *Exp Diabetes Res* 5 : 111-121, 2004
- 23) Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ : Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates cell apoptosis. *J Biol Chem* 278 : 471-478, 2003
- 24) Bregenholt S, Møldrup A, Blume N, Karlens AE, Nissen Friedrichsen B, Tornhave D, Knudsen LB, Petersen JS : The long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, liraglutide, inhibits beta-cell apoptosis in vitro. *Biochem*

- Biophys Res Commun 330 : 577-584, 2005
- 25) Hui H, Nourparvar A, Zhao X, Perfetti R : Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144: 1444-1455, 2003
- 26) Tews D, Lehr S, Hartwig S, Osmers A, Paslack W, Eckel J : Anti-apoptotic action of exendin-4 in INS-1 beta cells: comparative protein pattern analysis of isolated mitochondria. *Horm Metab Res* 41 : 294-301, 2009
- 27) Liu LB, Wang YP, Pan XD, Jiang SY, Chen Z : Exendin-4 protected murine MIN6 pancreatic beta-cells from oxidative stress-induced apoptosis via down-regulation of NF-kappaB-iNOS-NO pathway. *Yao Xue Xue Bao* 43 : 690-694, 2008
- 28) Richter B, Bandeira-Echtler E, Bergerhoff K, Lerch C : Emerging role of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in the management of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 4 : 753-768, 2008
- 29) Drucker DJ, Nauck MA : The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368 : 1696-1705, 2006
- 30) Kitamura T, Kido Y, Nef S, Merenmies J, Parada LF, Accili D : Preserved pancreatic beta-cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor. *Mol Cell Biol* 21 : 5624-5630, 2001
- 31) Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R : Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 143 : 4397-4408, 2002
- 32) Shao J, Iwashita N, Ikeda F, Ogihara T, Uchida T, Shimizu T, Uchino H, Hirose T, Kawamori R, Watada H : Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in *db/db* mice. *Biochem Biophys Res Commun* 344 : 1224-1233, 2006
- 33) Shao JQ, Iwashita N, Du H, Wang YT, Wang YY, Zhao M, Wang J, Watada H, Kawamori R : Angiotensin II receptor blocker provides pancreatic beta-cell protection independent of blood pressure lowering in diabetic *db/db* mice. *Acta Pharmacol Sin* 28 : 246-257, 2007
- 34) Kanda Y, Shimoda M, Hamamoto S, Tawaramoto K, Kawasaki F, Hashiramoto M, Nakashima K, Matsuki M, Kaku K : Molecular mechanism by which pioglitazone preserves pancreatic beta-cells in obese diabetic mice: evidence for acute and chronic actions as a PPAR gamma agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298 : E278-286, 2010
- 35) Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M : Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1) -cells. *Diabetologia* 42 : 856-864, 1999
- 36) Frödin M, Sekine N, Roche E, Filloux C, Prentki M, Wollheim CB, Van obberghen E : Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem* 270 : 7882-7889, 1995
- 37) Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M : Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* 52 : 124-132, 2003
- 38) Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M : Protein kinase C ζ activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 50 : 2237-2243, 2001
- 39) Costes S, Broca C, Bertrand G, Lajoix AD, Bataille D, Bockaert J, Dalle S : ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 55 : 2220-2230, 2006
- 40) Hammar E, Parnaud G, Bosco D, Perriraz N, Maedler K, Donath M, Rouiller DG, Halban PA : Extracellular matrix protects pancreatic beta-cells against apoptosis: role of short- and long-term signaling pathways. *Diabetes* 53 : 2034-2041, 2004
- 41) Yusta B, Baggio LL, Estall JL, Koehler JA, Holland DP, Li H, Pipeleers D, Ling Z, Drucker DJ : GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 4 : 391-406, 2006

The molecular mechanism of human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide on pancreatic beta-cell preservation in obese diabetic model *db/db* mice

Masashi SHIMODA

*Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolism, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

ABSTRACT We investigated the molecular mechanism by which the human GLP-1 analogue liraglutide (LIRA) preserves the pancreatic β -cells. Ten-week-old male diabetic *db/db* mice received LIRA or vehicle for either a period of 2 days or 2 weeks. In addition to morphological and biochemical analysis of the pancreatic islets, gene expression profiles in the islet core area were investigated by laser capture microdissection and real-time RT-PCR. LIRA treatment for 2 weeks improved metabolic parameters and insulin sensitivity in *db/db* mice. Two-week LIRA treatment increased glucose-stimulated insulin secretion and islet insulin content, and reduced islet triglyceride content. LIRA treatment for 2 weeks up-regulated the expression of genes involved in cellular differentiation, proliferation, anti-apoptosis and anti-oxidative stress, and down-regulated genes related to anti-differentiation, pro-apoptosis, endoplasmic reticulum stress and lipid synthesis. In the 2-day experiment, LIRA slightly improved metabolic parameters, but glucose-stimulated insulin secretion, islet insulin and triglyceride contents were not affected. LIRA increased gene expressions associated with cellular differentiation, proliferation and anti-apoptosis, and suppressed gene expressions involved in pro-apoptosis. However, it had no effect on genes related to oxidative stress or endoplasmic reticulum stress. Morphometric results for cellular proliferation, apoptosis and oxidative stress in the pancreatic islets were consistent with the results of the gene expression analysis. LIRA increases the pancreatic β -cell mass not only by directly regulating cell kinetics, but also by suppressing oxidative/ER stress, secondary to amelioration of glucolipototoxicity.

(Accepted on October 22, 2010)

Key words : **Glucagon-like peptide-1, Pancreatic β -cell mass, Cellular kinetics, Oxidative stress, Endoplasmic reticulum stress**

Corresponding author
Masashi Shimoda
Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolism,
Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki,
701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111
Fax : 81 86 462 1199
E-mail : masashi-s@med.kawasaki-m.ac.jp