

Title	Suppression of synthesis and release of glucagon by glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) without affect on mRNA level in isolated rat islets
Author(s)	倭, 英司
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37629
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	倭	英	司
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	9 4 3 4	号
学位授与の日付	平成 2 年 12 月 19 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
学位論文題目	Suppression of synthesis and release of glucagon by glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) without affect on mRNA level in isolated rat islets (Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) のグルカゴン分泌、グルカゴン合成抑制機序の解明)		
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男 (副査) 教授 垂井清一郎 教授 矢内原千鶴子		

論文内容の要旨

【目 的】

GLP-1 はプレプログルカゴン mRNA にコードされるグルカゴン様ペプチドの 1 つで、インスリン分泌刺激作用とともに、グルカゴン分泌抑制作用を有することが報告されている。GLP-1 のグルカゴン分泌抑制作用は、ヒトへの投与実験や、各種の動物を用いた豚灌流実験にて報告されているが、その作用機構についての詳細な検討はない。本研究は、単離ラ氏島を用い、グルカゴン分泌量、グルカゴン含有量、グルカゴン mRNA 量に及ぼす GLP-1 (7-36 amide) の影響を検討することにより、GLP-1 のグルカゴン生合成、及びグルカゴン分泌に対する作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

ラ氏島は、ラットの膵臓をコラゲナーゼを用い消化後、Ficoll gradient にて単離した。単離したラ氏島を 10% FCS を含む RPMI-1640 にて 24 時間の前培養後、Gey & Gey buffer (glucose 5.5 mM) にて 1 時間培養し、続いて、① Gey & Gey buffer、② 10 mM Arginine を含む Gey & Gey buffer ③ 10 mM Arginine を含む Gey & Gey buffer に 10, 100, 1000 pM の GLP-1 (7-36 amide) を添加した培養液中で 1 時間あるいは 18 時間培養した。

ラ氏島内のグルカゴンは、ラ氏島を酢酸中で煮沸し抽出した。培養上清および抽出したグルカゴン量は C 端抗体 OAL-123 を用いた RIA 法で測定した。

ラ氏島の RNA は、キャリアーとしてイースト tRNA を加え、塩酸リチウムを用い抽出し、ナイロンフィルターに blotting した。その後、フィルターをウシグルカゴン cDNA と hybridization を行った。また、同一フィルターを β アクチン DNA にて、再 hybridization した。プレプログルカゴン mRNA 量は、

得られたオートラジオグラムのスポットをデンストメーターにて測定し、 β アクトチン mRNA 量にて補正後、コントロールのプレプログルカゴン mRNA 量とのパーセンテージにて表示した。

【結 果】

① グルカゴン分泌に対する影響

培養1時間では、グルカゴン分泌はコントロールでは 30.8 ± 3.6 pg/10 islets であったが、アルギニン刺激により、 45.5 ± 4.5 pg/10 islets と有意に増加した ($p < 0.01$)。GLP-1 を 10 pM, 100 pM, 1000 pM 添加すると、グルカゴン分泌は、それぞれ 50.0 ± 6.8 , 25.6 ± 8.6 , 22.5 ± 4.5 pg/10 islets となり、GLP-1 100 pM, 1000 pM でアルギニン刺激によるグルカゴン分泌は有意に抑制された ($p < 0.01$)。培養18時間では、グルカゴン分泌はコントロールでは 36.2 ± 2.3 pg/10 islets であったがアルギニン刺激により 251 ± 43 pg/10 islets と有意に増加した ($p < 0.01$)。GLP-1 を添加すると、グルカゴン分泌は 132 ± 28 pg/10 islets (10 pM, $p < 0.05$), 84.5 ± 13 pg/10 islets (100 pM, $p < 0.01$), 91.1 ± 15 pg/10 islets (1000 pM, $p < 0.01$) となり、有意にグルカゴン分泌が抑制された。

② ラ氏島内グルカゴン含有量に対する影響

培養1時間後のラ氏島内グルカゴン含有量はコントロールでは 609 ± 293 pg/30 islets であったが、アルギニン刺激により $1,940 \pm 337$ pg/30 islets と有意に増加した ($p < 0.05$)。GLP-1 1000 pM を添加するとグルカゴン含有量は 409 ± 289 pg/30 islets に有意に抑制された ($p < 0.01$)。培養18時間後のラ氏島内グルカゴン含有量はコントロールでは 17.4 ± 4.5 pg/30 islets であったがアルギニン刺激により 123 ± 22.5 pg/30 islets に有意に増加した。GLP-1 1000 pM を添加するとグルカゴン含有量は 29.8 ± 4.5 pg/30 islets に有意に抑制された。

③ グルカゴン mRNA 量に対する影響

培養1時間後のラ氏島内プレプログルカゴン mRNA 量はアルギニン刺激にて、コントロールの 103 ± 29 %、GLP-1 1000 pM を添加しても 104 ± 17 % で、有意な変化はみられなかった。培養18時間では、アルギニン刺激により、コントロールの 186 ± 40 % に有意に増加した ($p < 0.01$)。GLP-1 1000 pM を添加しても 201 ± 40 % でアルギニン刺激によるグルカゴン mRNA 量の増加は抑制されなかった。

【総 括】

- ① アルギニン単独刺激では、培養1時間、18時間ともにラ氏島内グルカゴン含有量とグルカゴン分泌量が増加した。プレプログルカゴン mRNA 量は培養1時間では増加しなかったが、培養18時間では増加した。
- ② GLP-1 (7-36 amide) を添加すると、培養1時間、18時間ともにラ氏島内グルカゴン量とグルカゴン分泌の増加が抑制された。しかし、培養18時間でみられたプレプログルカゴン mRNA 量の増加は GLP-1 (7-36 amide) により抑制されなかった。
- ③ 以上より、GLP-1 (7-36 amide) はグルカゴン mRNA 量には影響せず、グルカゴン mRNA からグルカゴン合成、グルカゴン分泌の段階を抑制していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

GLP-1 (7-36 amide) は、腸管L細胞から分泌され、膵からのインスリン分泌を刺激し、腸管由来のインスリン分泌刺激因子であるとして注目されている。

本研究は、GLP-1 (7-36 amide) のグルカゴン合成、分泌に対する効果とその作用機構を検討する目的で、単離ラ氏島を用い、GLP-1 (7-36 amide) のグルカゴン分泌量、グルカゴン含有量、グルカゴンmRNA量に対する影響を検討したものである。その結果、GLP-1 (7-36 amide) はグルカゴンmRNA量には影響せず、アルギニンによるグルカゴン含有量及びグルカゴン分泌が抑制されることが明らかとなった。

これらの結果より、GLP-1 (7-36 amide) はグルカゴン合成、分泌を抑制し、その抑制機構は、グルカゴンmRNAからプログルカゴンへの翻訳の段階以降であることが判明した。

以上より、本研究は、GLP-1 の生理的役割に新知見を加え、学位論文に値するものである。