

犬におけるインスリン抵抗性と糖尿病発症に関する  
メタボローム研究

(Metabolome study on canine insulin resistance and diabetes onset)

野澤 聡司

犬におけるインスリン抵抗性と糖尿病発症に関する  
メタボローム研究

(Metabolome study on canine insulin resistance and diabetes onset)

野澤 聡司

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教員：田崎弘之)

平成 28 年 3 月

## 目次

序論 .....	1
第1章 副腎皮質機能亢進症の犬における末梢血好中球のインスリンシグナリング 遺伝子発現量の解析	
緒言 .....	9
材料および方法 .....	10
結果 .....	13
考察 .....	14
小括 .....	15
表および図 .....	16
第2章 デキサメサゾン添加による単離した犬末梢血単核球の代謝産物解析	
緒言 .....	21
材料および方法 .....	22
結果 .....	25
考察 .....	26
小括 .....	27
表および図 .....	28
第3章 デキサメサゾンおよび TNF- $\alpha$ が犬骨格筋培養細胞の代謝産物とインスリンシ グナリング遺伝子発現に及ぼす影響の解析	
緒言 .....	35
第1節 デキサメサゾン、TNF- $\alpha$ が犬骨格筋培養細胞の代謝産物に及ぼす 影響の解析	
材料および方法 .....	36
結果 .....	44
考察 .....	49
第2節 デキサメサゾン、TNF- $\alpha$ が犬骨格筋培養細胞の糖取り込み量および インスリンシグナリング遺伝子に及ぼす影響の解析	
材料および方法 .....	51
結果 .....	54
考察 .....	56

小括 .....	57
表および図 .....	59
第4章 健常犬の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中代謝産物変動の比較	
緒言 .....	88
材料および方法 .....	88
結果 .....	89
考察 .....	91
小括 .....	92
表および図 .....	93
第5章 副腎皮質機能亢進症の犬と肥満犬の血清中代謝産物の比較検討	
緒言 .....	101
材料および方法 .....	102
結果 .....	105
考察 .....	107
小括 .....	111
表および図 .....	113
総括 .....	124
謝辞 .....	131
参考文献 .....	132

## 序論

犬の糖尿病は、近年の動物を取り巻く生活環境の変化や長寿化、獣医療の発展によって診断精度も向上し、増加の一途を辿っている。犬における糖尿病は2-4ヶ月齢で発見される先天性の遺伝子異常が原因である若齢性と、中高齢になってから発症するものがある。中高齢で発症する糖尿病の原因としては、副腎皮質機能亢進症、ステロイドホルモンの過剰/慢性投与、黄体期を代表とした発情周期などが関連しているものが考えられており、これらの要因で発症する糖尿病はヒトでは2型あるいはその他の糖尿病と分類されている。しかしながら、犬では糖尿病が発見された時には既にインスリン分泌がほとんどない状態が多く、糖尿病の治療にインスリン投与が必須であり、中高齢の犬で一般的に見られる糖尿病は発症機序が異なるものの、ヒトの分類で言うところの1型糖尿病に分類される(Nelson, 2014)。

犬の糖尿病は一般的に治療にインスリンを必要とするか否かで分類されているが、ヒトでは糖尿病の成因から糖尿病タイプを分類することで合併症の予防と治療に役立っている。日本糖尿病学会では、「糖尿病はインスリン作用の不足に基づく慢性の高血糖を主徴とする代謝疾患群である」と定義されており、慢性の高血糖を引き起こす成因は非常に不均一である。これらの成因を明らかにし、超早期診断を主軸とした予防医学が医学領域では主流である。そのため、モデル動物であるげっ歯類を用いた遺伝子改変（先天性肥満、先天性糖尿病など）マウスや人為的肥満、糖尿病の誘導、薬物投与などの *in vivo* 研究、げっ歯類の組織サンプルやマウスおよびヒトの培養細胞を用いた *in vitro* 研究により、発症に関わるタンパク質群の発見やそれらタンパク質群の機能の解明と糖尿病発症における病態解明が進められてきた(Burén et al., 2008; Cho et al., 2001; Del Aguila et al., 1999; Kaneko et al., 2006; Kerouz et al., 1997; Kubota et al., 2000; Matsumoto et al., 2002)。

肥満は、ヒトにおいて2型糖尿病の主な原因となるが、犬においては高インスリン血症を呈し(Verkest et al., 2011b)、インスリン抵抗性を惹起するものの(Rand et al., 2004)、現在のところ糖尿病発症の直接的な原因であるとの報告はない。また、ヒトと犬とでは肥満により生じる種々の変化に相違点が多いことも報告されており(Verkest, 2014)、犬の糖尿病発症機序の解明の研究については、医学領域で確立している糖尿病モデルげっ歯類を用いることは不適切であると考えられる。そこで本研究では、犬特有の糖尿病発症機序を解明するために、インスリン抵抗性が生じ糖尿病の発症に進行したケ

ースのある(Peikes et al., 2001; Peterson et al., 1984)、高グルココルチコイド血症を示す副腎皮質機能亢進症 (hyperadrenocorticism: HAC) の犬を研究対象にするという考えに至った。そして、解析方法としてセントラルドグマの最下流に位置し、ポストゲノム研究の中で最もフェノタイプに近く、ホメオスタシスの破綻をより直接的に反映する代謝産物を測定対象とするメタボローム解析に着目した。メタボロームとは、ある生物の持つ全ての代謝産物を表し、メタボローム解析は、生体内に存在する全代謝産物を網羅的に解析することを指し、アミノ酸、核酸、糖類、脂質およびその他の物質を含む、およそ分子量が 1,000 以下の代謝産物を測定の対象とし(Nicholson, 2006)、代謝産物プロファイルの変化を比較解析する手法である。

本研究のメタボローム解析では、質量分析計により得られた代謝産物のデータを多変量解析である、主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA)、部分最小二乗法判別分析 (Partial Least Squares-Discriminant Analysis: PLS-DA) および直交部分最小二乗法判別分析 (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis: OPLS-DA) を用いて分析した。これらの多変量解析を行って、HAC、肥満、健常間での代謝産物の変動を、細胞レベル、個体レベルで探り出した。

PCA は各サンプルの位置がなるべく離れるように、つまり、分散が最大になるように 2 次元のスコアプロットと呼ばれる図に配置したもので、同じようなスペクトルのプロファイルを持つサンプル同士は近くに配置されるため、代謝産物プロファイルの違いによるサンプルのグループ分けに利用される。液体クロマトグラフ質量分析計 (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer: LC-MS) を分析装置に使用した場合は、質量電荷比 ( $m/z$ ) と保持時間 (Retention Time: RT) を組み合わせた  $m/z$ \_RT が変数となり、ローディングプロットという図に表示される (図 1)。スコアプロットとローディングプロットは相対的な位置でその関係を示し、双方を重ね合わせ、スコアプロット上にあるサンプルとローディングプロット上の変数の位置が近ければ、そのサンプルに固有の変数と解釈できる。PLS-DA はグループを予め指定し、複数のグループを最大限に分離するようにスコアプロット上に射影した手法であり、スコアプロットとローディングプロットの見方は PCA と同様である (図 2)。OPLS-DA は PLS-DA による 2 群分析で得られたスコアプロット上の 2 群の分離軸を垂直にし、グループ分けに寄与した変数を明確にする目的で用いられる (図 3)。OPLS-DA により得られる S 型ローディングプロット (s-plot) については、縦軸に信頼度、横軸に寄与率を示したもの

で（図 4）、*t*-検定、分散分析などの従来の統計処理では有意差のない変数についても候補として抽出できる手法である。s-plot 解析による解釈は *t*-検定の有意水準のような基準はなく、違いを抽出する際の基準は研究者によって異なっているが(Laiakis et al., 2010; Varghese et al., 2010; Yokoi et al., 2015)、新規バイオマーカーの探索を行う場合は、より信頼度が高い変数が着目され、比較する 2 群間での違いを見出すような場合は、より寄与率が高い変数を抽出し代謝パスウェイ解析などと組み合わせて、抽出された違いの意義付けが行われている。なお、図 3、4 に用いたデータは Umetrics 社のホームページ (<http://umetrics.com/downloads/simca>) からデモデータをダウンロードし、SIMCA 13.0.3 (Umetrics AB, Umeå, Sweden) により多変量解析を実施した結果である。

このように、メタボローム解析では、可能な限りの代謝産物を網羅的に分析し、多変量解析により健常体と異なる変動を示す代謝産物を探索する手法が用いられる。

そこで、本研究ではこの考え方にに基づき、HAC 症例の犬を研究対象と位置づけ、コントロール群あるいは肥満犬との違いについて代謝産物レベルで比較をし、犬のインスリン抵抗性とそれに続く糖尿病発症メカニズムを解明することを目的とした。以上の目的を達成するために、本論文では以下の構成で研究を実施した。

第 1 章は、後に続くメタボローム研究の予備実験と位置づけ、研究対象である HAC 症例犬の末梢血好中球がグルココルチコイドの影響評価に利用できるか検討するため、末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子の発現量の変化を調べた。

第 2 章では、培養方法が確立されており、グルココルチコイドから受ける影響が HAC の末梢血好中球と似た傾向を示す末梢血単核球を使用して、*in vitro* の実験系でグルココルチコイドが細胞中の代謝産物に及ぼす影響を検討した。

第 3 章では、末梢血単核球は長期的な維持が困難であるため、犬の正常骨格筋細胞を実験に供試し、犬における糖代謝異常のメカニズム解明に向け、グルココルチコイド製剤であるデキサメサゾンと、ヒトにおいて肥満により高値を示し、インスリン抵抗性を惹起する腫瘍壊死因子 (TNF) - $\alpha$  の影響を *in vitro* で検討した。

第 4 章では、個体レベルでの検討のため、健康な犬に静脈内糖負荷試験を行い、インスリン分泌を促した時の血清中代謝産物の変動について調べた。

最終章の第5章では、HAC症例犬と肥満犬の血清中代謝産物の解析を行い、副腎皮質機能亢進症および肥満が惹起するインスリン抵抗性の違いを、これまでの細胞と健常な個体を対象にして得た結果も踏まえて代謝産物レベルで検討した。



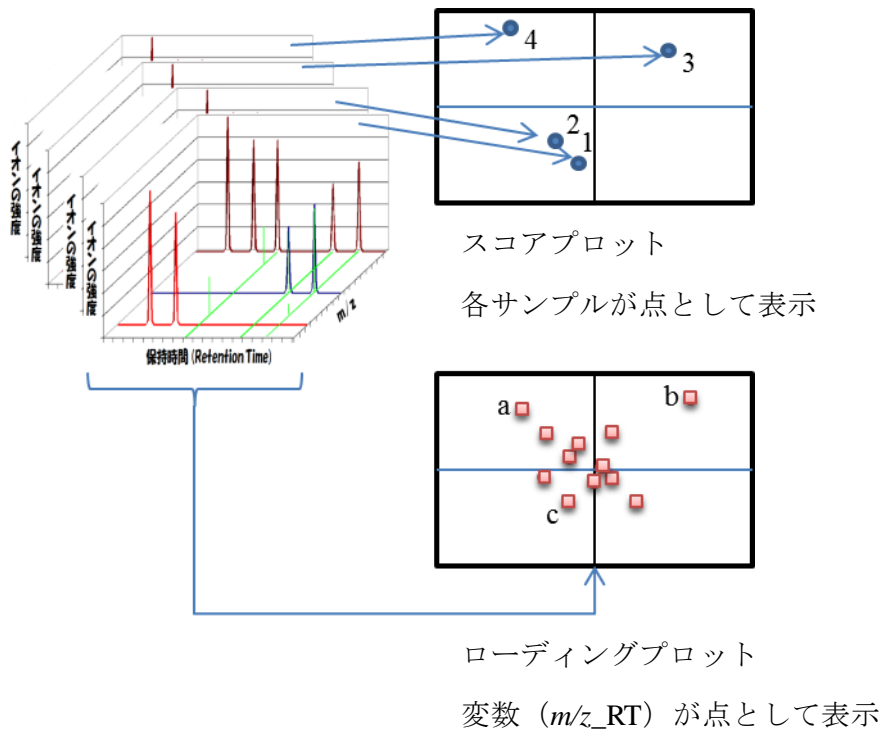


図1 主成分分析 (PCA) の概念図

スコアプロット上の各サンプルの位置がなるべく離れるように配置  
 サンプル 1、2 は変数 c を特徴に持ち、サンプル 3 は変数 b を特徴に持ち、サ  
 ンプル 4 は変数 a を特徴に持っている と解釈できる。

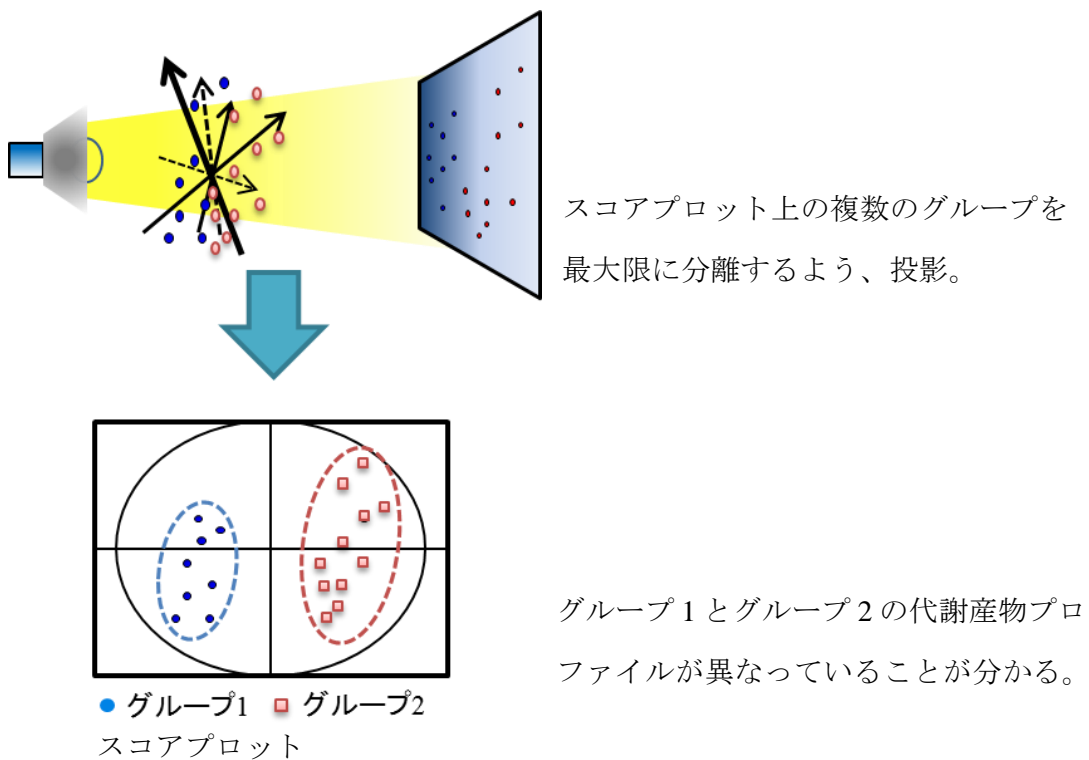


図2 部分最小二乗法判別分析 (PLS-DA) の概念図

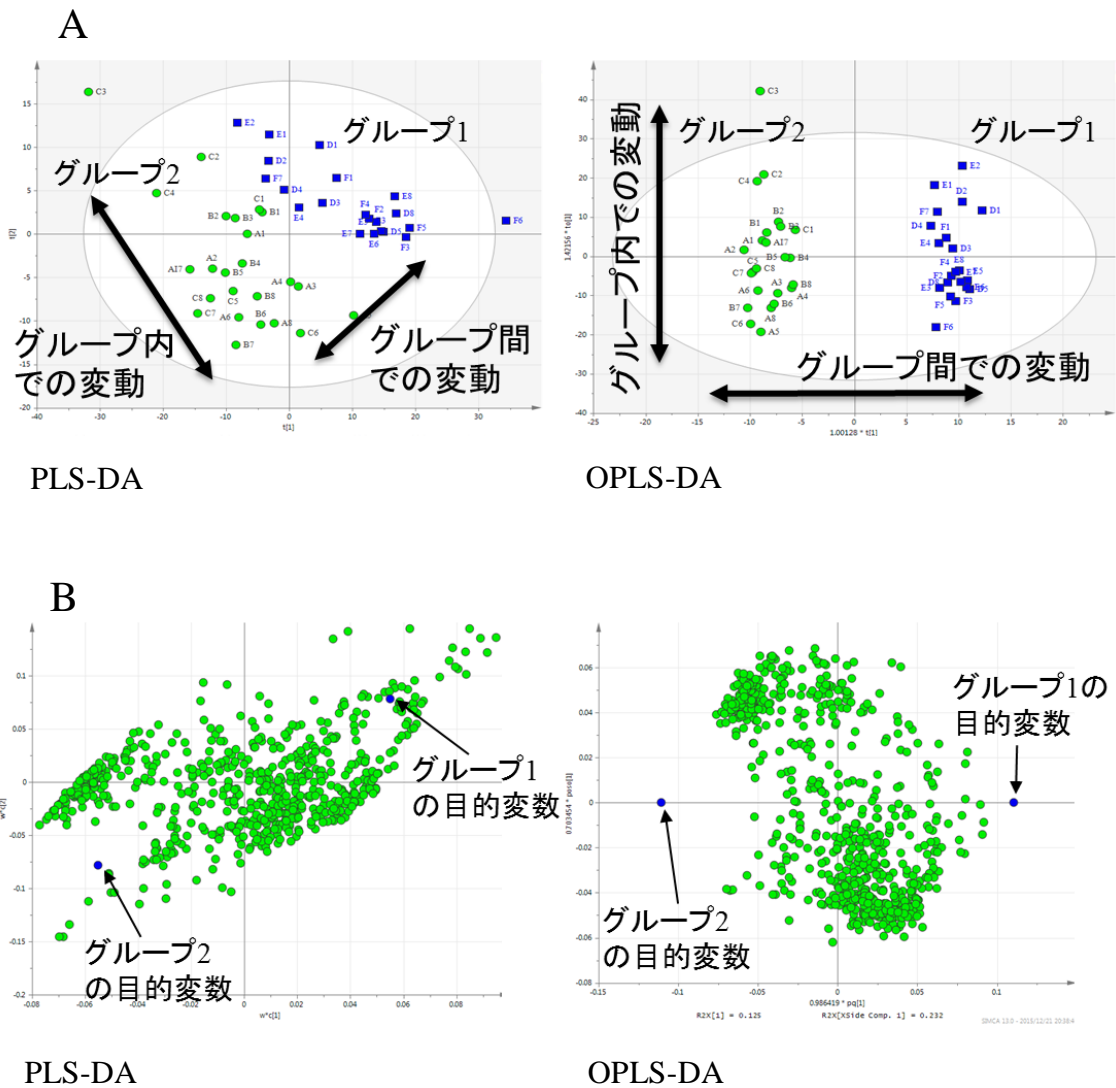


図3 同じデータセットを用いた PLS-DA および OPLS-DA スコアプロット (A) とローディングプロット (B) の違い

ローディングプロット上で目的変数の近くにプロットされる変数は、そのグループに特徴的であると解釈できる。

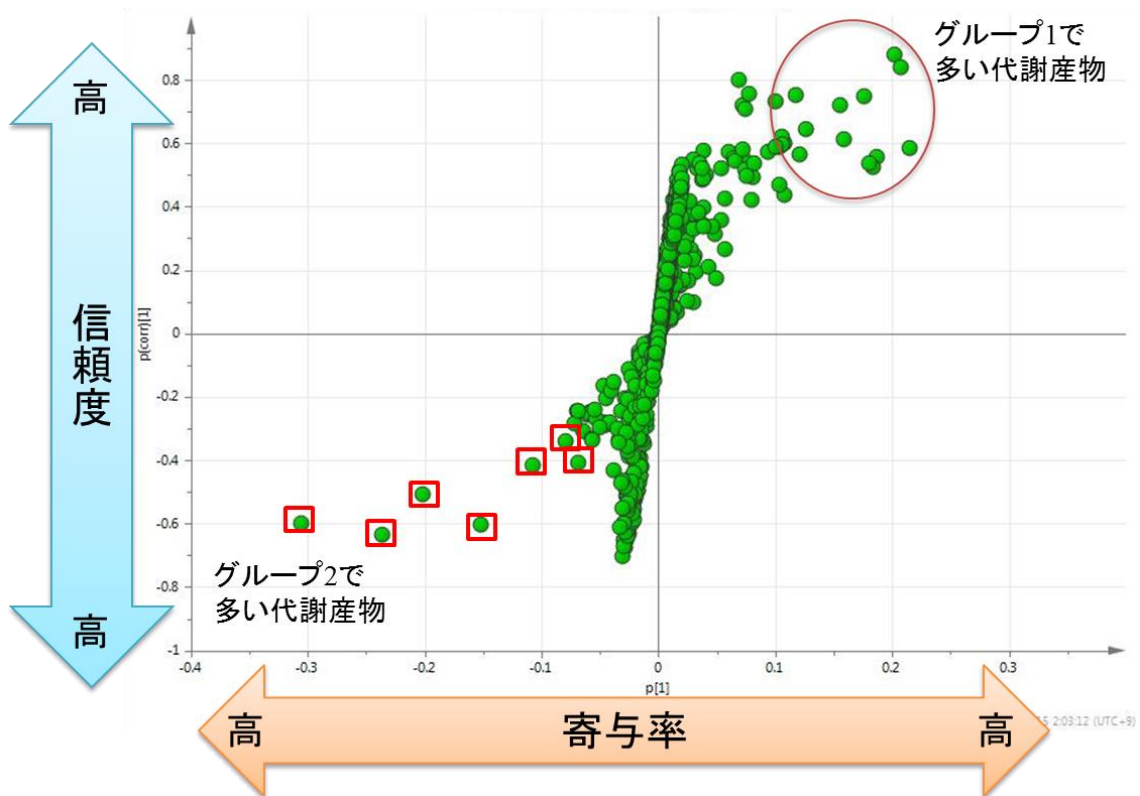


図4 図3と同じデータセットを用いて OPLS-DA により得られた S 型ローディングプロット (s-plot)

グラフの縦軸は信頼度、横軸は寄与率を示す。原点から離れた位置にプロットされたものほど群の分離に寄与、すなわちその群に特徴的であることを表し、2 群間での違いを容易に抽出することが出来る。

## 第 1 章

副腎皮質機能亢進症の犬における末梢血好中球の  
インスリンシグナリング遺伝子発現量の解析

## 緒言

グルココルチコイドは、げっ歯類やヒトのみならず犬においてもインスリン抵抗性を惹起し、糖尿病の危険因子となる事が知られている(Campbell et al., 1966; Marco et al., 1968; Olefsky et al., 1975; Peikes et al., 2001; Perley and Kipnis, 1966; Peterson et al., 1984)。インスリン抵抗性はインスリン受容体の絶対量の低下や細胞内シグナリング分子の減少、チロシン/セリンリン酸化酵素の活性阻害等によって生じると考えられており、多くの研究者によって、げっ歯類におけるグルココルチコイド過剰下でのインスリンシグナリング分子の研究が、遺伝子およびタンパク質レベルで行われている(Andrews and Walker, 1999; Burén et al., 2008; Burén et al., 2002; Matsumoto et al., 2002; Saad et al., 1993; Sakoda et al., 2000)。これらの研究の多くはインスリンの主要な標的組織である骨格筋や脂肪細胞を用いたものであるが、骨格筋や脂肪細胞の採取は外科的侵襲を伴うため、臨床研究において犬に応用することは困難である。一方、近年、犬の白血球におけるインスリンシグナリング遺伝子の発現量の定量が可能であることおよび、糖尿病の犬では、遺伝子の発現量が血糖コントロールの状態を反映していることが報告され(Mori et al., 2009a)、さらに肥満した犬において末梢血白血球のインスリンシグナリング遺伝子やエネルギー代謝に関わる遺伝子の発現量が変動することが報告された(Li et al., 2013)。これらは、白血球のインスリンシグナリング分子の研究における有用性を示唆しており、加えて白血球は骨格筋や脂肪組織と比べ、採取が容易であるという大きな利点を有している研究材料であると考えられる。

細胞におけるインスリンシグナル伝達様式 (Fig. 1-1) は、インスリンがインスリン受容体に結合し、受容体が自己リン酸化することで始まる。自己リン酸化した受容体は、直下に位置するインスリン受容体基質である insulin receptor substrate (IRS) をリン酸化する。チロシンリン酸化された IRS には phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) の調節サブユニットである p85 が結合し、その後、protein kinase B/Akt kinase (Akt) -2 や protein kinase C (PKC) - $\lambda$  などの様々な下流カスケード分子を介して糖輸送体 glucose transporter (GLUT) -4 を細胞膜へ誘導し、末梢組織への糖の取り込みを促進する。IRS には IRS-1 から IRS-4 まで4つのアイソフォームが存在するが、本章では早くからインスリンシグナリングへの関与が報告され(White, 1998)、犬の末梢血白血球中での発現の報告もある(Mori et al., 2009b)、IRS-1 と IRS-2、および IRS 下流カスケード分子である PI3-K、Akt2、PKC- $\lambda$  を対象とした。このように、インスリンシグナル

伝達は、遺伝子の翻訳産物であるタンパク質とそのタンパク質のリン酸化によっても制御されているが、本実験では近年の研究により血糖状態を評価するのに有用であると報告された(Mori et al., 2009a)、遺伝子の発現量に注目した。

そこで、本章では本研究の対象としている HAC 症例犬におけるインスリンシグナリング遺伝子の発現に及ぼすグルココルチコイドの影響を明らかにすることを目的として、その影響評価に末梢血白血球を利用できるか検討した。ただし、前述の Mori ら (2009)、Li ら (2013) の報告では総白血球を検体として利用しているが、グルココルチコイドは、末梢血中の白血球分画のうち好中球と単球を増加させ、リンパ球と好酸球を減少させ細胞集団の構成比を変化させてしまう作用を持つ。従って、総白血球を解析対象とすることは不適であり、特定の種類の白血球を対象を絞って解析を行うことにした。単球や好酸球は絶対量が少なく、リンパ球はグルココルチコイド製剤の投与によって末梢血中で減少するため解析には不向きであり、定量に十分な量を確保できるという利点を有する末梢血中の好中球を用いて検討を行った。

## 材料および方法

### 供試動物

本学付属動物医療センターに来院し、副腎皮質機能亢進症 (HAC) と診断された症例 11 頭および、Control として本学獣医保健看護学科臨床部門で飼育されている健常ビーグル犬 8 頭 (去勢雄 3 頭、避妊雌 5 頭 ; 2-6 歳齢) の計 19 頭を用いた。HAC は ACTH 刺激試験後 1 時間の血清コルチゾール濃度が正常範囲以上 ( $\geq 20 \mu\text{g/dL}$ )、超音波検査で左右副腎の両側過形成 ( $>7 \text{ mm}$ )、および初診時において多飲多尿があったもののうち 2 つ以上が当てはまる症例を対象とした。また、HAC は未治療の症例 (HAC untreated) 群および、トリロスタンによる治療を行っていて状態が安定している症例 (HAC treated) 群の 2 群とした。これらの犬種、年齢、性別、および ACTH 刺激試験後 1 時間の血清コルチゾール濃度は Table 1 に示した。HAC 症例からの血液採取は合成 ACTH 製剤の投与前とした。また、HAC 症例の検体採取の時刻は一定ではないため Control 群の血液採取の時刻はランダムで行い、採取した血液全量を、EDTA-2K により抗凝固処理を行った。

### ACTH 刺激試験

合成 ACTH 製剤（コートロシン注; Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用い、0.25 mg/head を静脈内投与した。血液採取は投与前および投与 1 時間後に行い、血清を分離し、化学発光酵素免疫測定装置（IMMULULYZE1000: LSI Medience Co., Tokyo, Japan）を用いて血清コルチゾール濃度を測定した。

#### 末梢血好中球由来 cDNA の作製

好中球分画は Oh ら（2008）の方法を参考にし(Oh et al., 2008)、Ficoll-Paque PREMIUM（GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan）を用いた比重遠心分離（2,000 rpm、70 分）により単離して total RNA の抽出材料とした。total RNA 抽出は血液からの RNA 抽出用キットである QIAamp RNA Blood Mini Kit（QIAGEN Co., Hamburg, Germany）を用い、プロトコルに従って行った[1]。抽出後の RNA 溶液を、微量検体用の分光光度計（NanoDrop ND-1000 spectrophotometer: LMS Co., Ltd, Tokyo, Japan）を用いて濃度を測定し、OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> で示される純度が 1.8 以上であるもののみを使用した。逆転写反応には QuantiTect Rev. Transcription Kit（QIAGEN）を用いた。gDNA Wipeout Buffer を 4 μL 使用し、テンプレート RNA と dH<sub>2</sub>O を加えて 28 μL のゲノム DNA 除去反応液を作製し、42°C で 2 分間インキュベートし、その後直ちに氷上にて静置した。これとは別の 0.2 mL チューブに逆転写反応マスターミックスとして Quantiscript Reverse Transcriptase を 2 μL、Quantiscript RT Buffer を 8 μL、RT Primer Mix を 2 μL のトータル 12 μL で調製した。このマスターミックスに氷上で静置しておいたゲノム DNA 除去反応液を全量加え、42°C、15 分間のインキュベートで逆転写反応を行い、cDNA を作製した。Quantiscript Reverse Transcriptase を不活性化するために 95°C、3 分のインキュベートを行い、作製した cDNA は定量まで -80°C にて保存した。

#### 定量 PCR 用プライマーの作製のためのパーシャルクローニングおよびシークエンス

犬の IRS-1、IRS-2、PI3-K p85 $\alpha$ 、Akt2、PKC- $\lambda$  および  $\beta$ -actin のシークエンス情報（Ref. Seq.）は GenBank（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>）から入手し、ウェブ上ソフトの Primer3（<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>）を用いてそれぞれに対する特異的プライマー対を設計した。使用したプライマー配列は次の通りである：IRS-1 Forward: 5'-acctgcgttcaaggaggtctg-3'; IRS-1 Reverse: 5'-cggtagatgccaatcaggttc-3' (Ref. Seq. No. XM\_543274); IRS-2 Forward: 5'-tggcaggtgaacctgaagc-3'; IRS-2 Reverse: 5'-

gaagaagaagctgtccgagtgg-3' (Ref. Seq. No. XM\_542667); PI3-K Forward: 5'-gcattaaaccagacctcattcagc-3'; PI3-K Reverse: 5'-gcgagtattggtcttcagtgtctc-3' (Ref. Seq. No. AB\_436616); Akt2 Forward: 5'-ctcgagtatttgcattcgag-3'; Akt2 Reverse: 5'-acctggcaccggaggtgctg-3' (Ref. Seq. No. NM\_001012340); PKC-λ Forward: 5'-gctctgataaccggatcaa-3'; PKC-λ Reverse: 5'-cctttgggtcctgttgaga-3' (Ref. Seq. No. XM\_535855); β-actin Forward: 5'-gccaacctgagaagatgact-3'; β-actin Reverse: 5'-cccagatccatgacaataccag-3' (Ref. Seq. No. AF\_021873)

上記のプライマー対が目的の領域を増幅しているか確認するとともに遺伝子発現量の定量に用いる標準プラスミドを作製するために、PCR 産物のサブクローニングを行った。まず、PCR 反応液の作製には TaKaRa Ex Taq Kit (TaKaRa Bio Company, shiga, Japan) を用い、TaKaRa Ex Taq (5 units/μL) を 0.25 μL、10 × Ex Taq Buffer を 5 μL、dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) を 4 μL、dH<sub>2</sub>O を 37.75 μL、forward/reverse Primer (10 nmol/L) を 1 μL ずつ、およびテンプレート cDNA を 1 μL 使用した。この PCR 反応液をサーマルサイクラー (MyCycler : Bio-Rad Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) を用いて 94°C 2 分の初期反応に続き、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクルにて PCR 反応を行った。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動を行い、予想したサイズに合致する PCR 産物は Ligation Mix (DNA Ligation Kit: TaKaRa) を用いて T-Vector pMD20 (TaKaRa) にサブクローニングした。ライゲーションを行ったプラスミドは Competent Quick DH5α (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) に導入しクローニングした後、LaboPass Mini Kit (Hokkaido System Science Co., Ltd., Sapporo, Japan) にてプラスミド DNA を精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.) を用いてシーケンス反応を行った。

#### 定量 PCR 用標準プラスミドの調製および標的遺伝子発現量の定量

定量 PCR に用いる標準プラスミドの調製を行った。プラスミド DNA は 1 kb, 1 μg 中に  $9.1 \times 10^{11}$  コピーを有するので、プラスミド DNA の溶液量あたりのコピー数 [copies/μL] は  $\{(9.1 \times 10^{11}) [\text{copies}] \times \text{プラスミド濃度} [\mu\text{g}/\mu\text{L}]\} / \text{ベクター鎖長} [\text{kb}]$  で算出することが出来る (Whelan et al., 2003)。この値を元に、 $10^8$  copies/μL のプラスミド DNA を含む溶液を作製し、EASY Dilution (for Real Time PCR) (TaKaRa) を用いて  $10^7$ - $10^1$  copies/μL まで段階希釈を行った。この希釈サンプルを用いて以下のように希



積直線性の検討を行った。SYBR Premix Ex Taq II Perfect Real Time (TaKaRa) を用い、SYBR Premix Ex Taq II を 10  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L の PCR Forward/Reverse Primer を 0.8  $\mu$ L ずつ、ROX Reference Dye を 0.4  $\mu$ L、dH<sub>2</sub>O を 7.0  $\mu$ L、末梢血好中球由来の cDNA 実験サンプルあるいはプラスミド DNA 希釈サンプル ( $10^7$ - $10^1$ ) をそれぞれ 1.0  $\mu$ L 使用し合計 20  $\mu$ L の反応液を作製した。調製した反応液を、リアルタイム PCR 装置 (Applied Biosystems 7300 Real-time PCR system: Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用し、94°C 30 秒の初期変性に続き、95°C 5 秒、60°C 30 秒の PCR 反応を 40 サイクルの条件で行なった。この反応の後に、95°C 15 秒、60°C 60 秒、95°C 15 秒の反応にて融解曲線分析を行い PCR 産物の特異性の確認を行った。その後、ハウスキーピング遺伝子として  $\beta$ -actin 遺伝子の発現量を同じ方法で定量し、目的とする遺伝子の発現量を  $\beta$ -actin 遺伝子の発現量に対する比で表した。即ち、target mRNA [copies]/ $\beta$ -actin mRNA [copies] を Ratio とし、全ての実験サンプルで Ratio を算出した。算出した全ての Ratio は Ratio<sub>control</sub> (Control 群における Ratio) の平均値で割り、Control 群の遺伝子発現量を 1 として HAC 群の値は相対値で表した。

#### 統計処理

全ての結果は Mean  $\pm$  SEM にて表した。Control 群、HAC untreated 群および HAC treated 群間の標的遺伝子の発現量に有意性があるかを評価するために Kruskal-Wallis test、post hoc test として Dunn's Multiple Comparison test を行った。全ての結果は GraphPad Prism analysis software 5.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, U.S.A) を用いて統計解析を行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

#### 結果

HAC には未治療の HAC untreated 群と、トリロスタン製剤による治療を行っている HAC treated 群が含まれている。Table 1 に示すように、ACTH 刺激試験後 1 時間の血清コルチゾール濃度は HAC untreated 群と HAC treated 群とで明らかに異なっていることから、それぞれのインスリンシグナリング遺伝子の発現量を集計し、Control 群と比較した。

Control 群の遺伝子発現量を 1 として各 HAC 群のインスリン受容体基質の遺伝子発現量を比較したところ、IRS-1 および IRS-2 の遺伝子発現量について Fig. 1-2 に示す結

果が得られた。IRS-1 の遺伝子発現量は HAC untreated 群で  $0.63 \pm 0.04$ 、HAC treated 群で  $0.65 \pm 0.14$  であり、ともに低下傾向を示したが有意な差ではなかった。IRS-2 の遺伝子発現量は、HAC untreated 群で  $0.39 \pm 0.06$  と減少傾向を示し、HAC treated 群で  $0.28 \pm 0.05$  ( $P < 0.01$ ) と有意に減少した。次に、IRS 下流カスケードを構成する PI3-K、Akt2 および PKC- $\lambda$  の遺伝子発現量を調べたところ、Fig. 1-2 に示す結果が得られた。PI3-K の遺伝子発現量は、Control 群の遺伝子発現量を 1 とすると HAC untreated 群で  $0.53 \pm 0.07$  と減少傾向を示し、HAC treated 群では  $0.45 \pm 0.25$  ( $P < 0.05$ ) と有意に減少した。Akt2 の遺伝子発現量は HAC untreated 群で  $0.55 \pm 0.14$  と減少傾向を示し、HAC treated 群で  $0.44 \pm 0.07$  ( $P < 0.05$ ) と有意に減少した。PKC- $\lambda$  の遺伝子発現量は、HAC untreated 群で  $1.00 \pm 0.33$  と Control 群と比べてほとんど差が見られず、HAC treated 群で  $0.85 \pm 0.28$  と若干の減少傾向を示した。

#### 考察

インスリン抵抗性の発現は、転写レベル、翻訳レベルおよび翻訳されたタンパク質のリン酸化レベルでの減少といった複数のメカニズムが関与している。本章では転写レベルに着目し、HAC 症例犬のインスリンシグナリング分子として IRS-1、IRS-2、PI3-K、Akt2 および PKC- $\lambda$  の遺伝子発現量を健常犬と比較した。Fig. 1-2 に示すように、HAC 症例において IRS-1 と IRS-2 の遺伝子発現量は両方とも抑制される傾向にあった。Control 群との間に有意差が認められたのは HAC treated 群における IRS-2 のみであるが、値を見る限り実際は HAC untreated 群でも低下しており、HAC treated 群ではそれが回復していないという解釈が妥当だと思われる。

IRS はユビキタスに発現しているタンパク質であり、インスリンシグナルカスケードの上流に位置している(Araki et al., 1994; Patti et al., 1995; White, 1998; Yamauchi et al., 1996)。*In vitro* ではラット正常脂肪細胞(Buren et al., 2002)やマウス 3T3-L1 細胞(Sakoda et al., 2000)においてグルココルチコイドによりリン酸化 IRS-1 の減少とリン酸化 IRS-2 の増加が報告されているが、*in vivo* ではグルココルチコイドを投与されたラットにおいてリン酸化 IRS-2 は減少したと報告されている (Caperuto et al., 2006; Saad et al., 1993)。さらに、IRS-2 ノックアウトマウスでは糖尿病性徴候を示したことも報告されている(Kubota et al., 2000)。

PI3-K と Akt2 の遺伝子発現量は IRS-2 と同様の変動パターンを示しており、HAC treated 群においても発現量は低下したままであった。以上のことから、グルココルチコイド過剰症例である HAC 症例犬においても、げっ歯類や肥満の犬と同様に末梢血白血球のインスリンシグナリング遺伝子発現量が低下していることが明らかになった。従って、末梢血白血球の遺伝子発現の変動がグルココルチコイドの影響を評価する有用な手段であることが示された。

#### 小括

本章では、グルココルチコイドが犬に及ぼす影響を明らかにするために、その影響を評価するのに末梢血白血球を利用できるか検討した。定量 PCR 法により、末梢血白血球を用いて、HAC 症例犬と健常犬のインスリンシグナリング遺伝子として IRS-1、IRS-2、PI3-K、Akt2、PKC- $\lambda$  の mRNA 発現量を測定した。末梢血好中球における IRS-1 の遺伝子発現量は HAC untreated 群、HAC treated 群ともに軽度の低下傾向を示した。IRS-2、PI3-K、Akt-2 の遺伝子発現量は HAC untreated 群、HAC treated 群の両群ともに Control 群の約半分に低下し、HAC treated 群での差は統計学的に有意であった。インスリンシグナリングのダウンレギュレーションは、ヒトやげっ歯類のグルココルチコイドによるインスリン抵抗性の原因と考えられており、副腎皮質機能亢進症の犬においても同様であることが明らかになった。

従って、グルココルチコイドが及ぼす影響を検討するのに末梢血白血球を利用することは妥当であると考えられる。遺伝子発現量の変動から、その代謝も変動していると考えられ、第 2 章では白血球中の代謝産物への影響を検討することにした。

## 表および図

Table 1 供試動物プロフィール

No.	Classification	Breeds	Age (years)	Gender	Cortisol concentration ( $\mu\text{g/dL}$ )		Adrenal glands sizes (mm)		Clinical signs
					pre ACTH stimulation	post ACTH stimulation	Right	Left	
1	Control	Beagle	3	Spayed	<1	14.1	4.6	4.9	no sign
2		Beagle	3	Spayed	<1	N.A.	5.6	4.4	no sign
3		Beagle	3	Castrated	1.26	14.3	N.D.	4.0	no sign
4		Beagle	2	Castrated	<1	11.7	N.D.	4.9	no sign
5		Beagle	2	Castrated	1.11	15.7	N.D.	3.6	no sign
6		Beagle	2	Spayed	1.02	16.7	N.D.	4.0	no sign
7		Beagle	6	Spayed	2.11	10.6	N.D.	N.D.	no sign
8		Beagle	6	Spayed	1.78	9.39	4.8	4.3	no sign
9	HAC (untreated)	Toy Poodle	6	Castrated	13.0	29.2	3.9	3.3	PU/PD, polyphagia, dermatologic problem
10		Portuguese Water Dog	8	Castrated	8.80	30.3	12.8	10.9	PU/PD, polyphagia, dermatologic problem
11		Tiny Poodle	13	Female	5.75	56.2	6.0	7.8	PU/PD, decreased activity, panting
12		Yorkshire Terrier	4	Spayed	16.5	46.4	5.5	7.3	PU/PD, dermatologic problem, decreased activity
13		Yorkshire Terrier	12	Male	9.82	23.7	7.5	7.2	PU/PD, polyphagia, decreased activity
14	HAC (treated)	Miniature Dachshund	14	Castrated	3.22 (8.60)	6.15 (37.1)	(7.6)	(5.4)	dermatologic problem, decreased activity, pendulous abdomen
15		Maltese	10	Female	2.21 (15.6)	5.90 (39.8)	(10.7)	(9.6)	PU/PD, polyphagia, dermatologic problem
16		Miniature Dachshund	12	Female	1.85 (9.07)	2.98 (23.4)	(6.6)	(5.9)	PU/PD, polyphagia, dermatologic problem
17		Miniature Dachshund	11	Castrated	1.95 (2.80)	5.62 (45.5)	(8.5)	(10.2)	polyphagia, dermatologic problem, pendulous abdomen
18		Mix	7	Spayed	3.70 (7.50)	8.60 (31.5)	(9.8)	(8.2)	PU/PD, polyphagia, dermatologic problem
19		Pug	11	Female	3.57 (5.75)	7.81 (53.3)	(7.0)	(7.6)	PU/PD, polyphagia, dermatologic problem

Treated 群での初診時のコルチゾール値および副腎サイズは括弧内に示した。  
HAC, hyperadrenocorticism; PU/PD, polyuria polydipsia; N.D., not detectable.

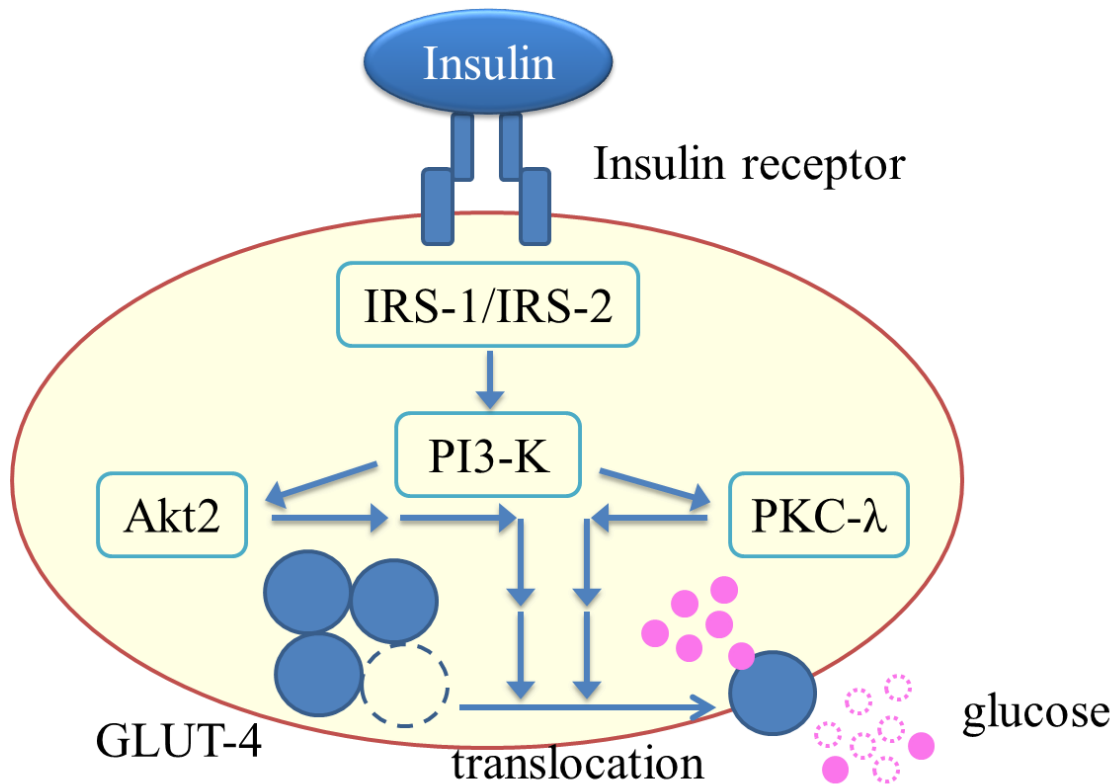


Fig. 1-1 インスリンシグナリング伝達様式

インスリンがインスリン受容体に結合することで自己リン酸化したインスリン受容体は、直下に位置するインスリン受容体基質である insulin receptor substrate (IRS) をリン酸化する。チロシンリン酸化された IRS には phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) の調節サブユニットである p85 が結合し、その後、様々な下流カスケード分子を介して糖輸送体 glucose transporter (GLUT) -4 を細胞膜へ誘導し、末梢組織への糖の取り込みを促進する。

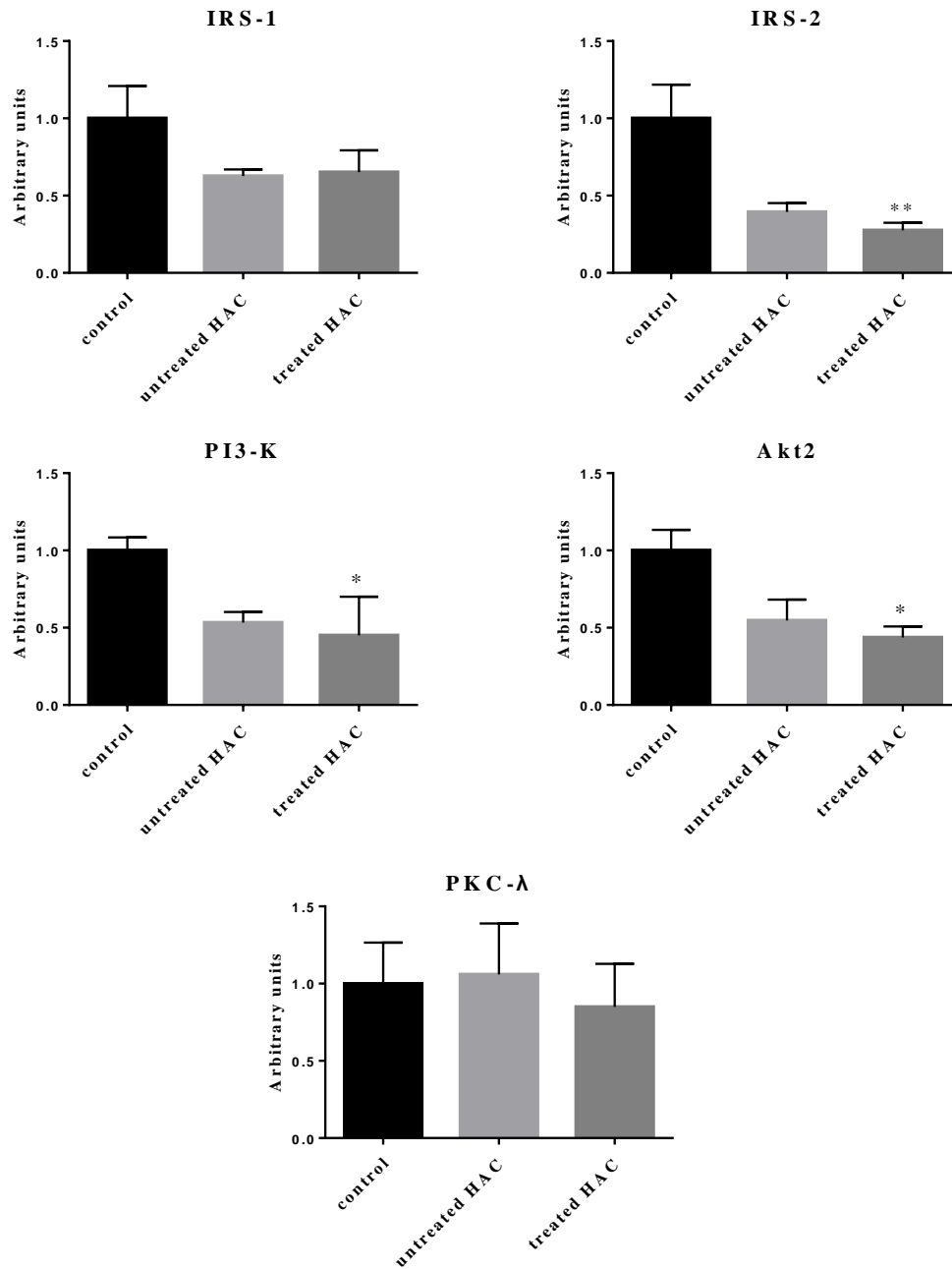


Fig. 1-2 末梢血好中球におけるインスリンシグナリング遺伝子発現量

HAC 症例犬を治療経過に基づいて未治療 (HAC untreated) 群と治療 (HAC treated) 群の 2 群に分類し、末梢血好中球における IRS-1、IRS-2、PI3-K、Akt2、PKC-λ の mRNA 発現量を定量した。それぞれの発現量を  $\beta$ -actin で除して、Control 群を 1 とした相対値で表した。全ての値は Mean  $\pm$  SEM で示した。

Kruskal-Wallis test; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control; (Dunn's test)

## 第 2 章

# デキサメサゾン添加による単離した犬末梢血単核球 の代謝産物解析



## 緒言

グルココルチコイドは全身性にインスリン抵抗性を惹起し、これは様々な組織、特に骨格筋、肝臓と脂肪組織での代謝に影響を及ぼす(Qi and Rodrigues, 2007)。犬においては肥満や副腎皮質機能亢進症 (HAC) がインスリン抵抗性を引き起こすが、血清中グルコースおよびインスリン濃度は、より HAC 症例犬で高値であったことが報告されている(Miceli et al., 2014)。また、ヒトにおいて 2 型糖尿病の主な原因となる肥満は、犬においてはインスリン抵抗性を惹起するものの糖尿病を発症することは稀であり (Peikes et al., 2001; Rand et al., 2004)、インスリン抵抗性のヒトで変動が確認されているアディポネクチン、グルカゴン様ペプチド-1 については、肥満した犬と健常な犬とで変化は認められなかったと報告されている (Verkest, 2014; Verkest et al., 2011a)。

本章では、肥満と HAC のうち、より犬において糖尿病発症リスクにつながると示唆されているグルココルチコイドが犬の代謝に及ぼす影響を検討した。Stentz ら

(2007) は、活性化培養した末梢血リンパ球の遺伝子とタンパク質の発現量が糖尿病の患者と健常者とで異なることを報告しており (Stentz and Kitabchi, 2007)、また本論文の第 1 章で述べたように、グルココルチコイドが白血球中の遺伝子発現量を変動させることが明らかとなり、代謝にも影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで、本章ではグルココルチコイドが末梢血白血球に及ぼす影響の基礎的検討として、予備実験によりデキサメサゾンの濃度に依存してインスリンシグナリング遺伝子発現量が第 1 章で対象とした末梢血好中球と同様の傾向で変動することが明らかで (筆者本学修士論文、2012 年)、かつ培養方法が確立している末梢血単核球を使用して、グルココルチコイド製剤であるデキサメサゾンの添加による、細胞内へのグルコース取り込み能と取り込み後の細胞内代謝産物の影響について検討した。グルコース取り込み能は、2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) の細胞内への取り込み量で評価した。2-DG はグルコースの 2-ヒドロキシル基が水素原子に置換した構造を持ち、グルコーストランスポーターによって取り込まれリン酸化により 2-デオキシグルコース-6-リン酸 (2DG6P) までは代謝が進むが、その次の酵素反応には進まず細胞内に留まるため、細胞内の 2DG6P を定量することによりグルコース取り込み能を評価することができる。また、細胞内代謝産物の測定については、代謝産物を網羅的に定性、定量できるキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置 (Capillary Electrophoresis - Time of Flight-Mass Spectrometer : CE-TOF-MS) を使用した。

## 材料および方法

### 末梢血単核球の分離

予め無菌的にヘパリン処理をした採血シリンジを用いて健常ビーグル犬から血液を採取した。採取した血液は直ちに等量の滅菌 PBS と混和し、無菌的に遠心チューブに分注しておいた Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) に重層した後、 $2,000\times g$ 、70 分間の比重遠心分離により犬の末梢血単核球 (CnPBMCs) を分離した。分離した CnPBMCs は糖取り込み試験のために、5 mL のラウンドチューブ 1 本あたり  $7.2\times 10^5$  個となるように 3 mL の 10% FBS 加 RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.) に播種し、細胞内代謝産物測定のために、10 cm 浮遊細胞用培養ディッシュ 1 枚あたり  $6.5\times 10^6$  個となるように 10 mL の 10% FBS 加 RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) に播種した。培地には最終濃度で、培養刺激剤として 5  $\mu\text{g/mL}$  のコンカナバリン A (ConA; Thermo Fisher Scientific Inc.) および抗生物質として 100 U/mL のペニシリンと 100  $\mu\text{g/mL}$  のストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific Inc.) を添加した。さらにデキサメサゾンを経最終濃度 0 (デキサメサゾン非添加群)、1  $\mu\text{mol/L}$  で添加 (デキサメサゾン添加群) し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の湿潤条件下で 48 時間培養した。

### CnPBMCs におけるグルコース取り込み能の評価

48 時間培養後、血清由来成分による影響を除くために無血清 RPMI1640 にて  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の湿潤条件下にて 6 時間培養した。次いで、培地を除去、2% BSA 含有 Krebs ringer phosphate HEPES (KRPH; 1.2 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 1.3 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 118 mmol/L  $\text{NaCl}$ , 5 mmol/L  $\text{KCl}$ , 30 mmol/L HEPES, pH7.5) buffer で 2 回洗浄した。その後、デキサメサゾン非添加群は、インスリン無添加 2% BSA 含有 KRPH buffer と 100  $\mu\text{U/mL}$  インスリン (Novolin-R; Novo Nordisk Pharma Ltd., Tokyo, Japan) 添加 2% BSA 含有 KRPH buffer の 2 群に分け、デキサメサゾン添加群は 100  $\mu\text{U/mL}$  インスリン添加 2% BSA 含有 KRPH buffer の 1 群のみとし、それぞれ  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で 30 分間インキュベートした。次いで、2% BSA 含有 KRPH buffer に溶解した 2-DG (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan) を最終濃度 1 mmol/L で添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で 30 分間インキュベートした。ただし、ネガティブコントロール群として、デキサメサ

ゾン非添加インスリン非添加群には 2-DG を添加せず、培地容量が 2-DG 添加群と同じになるよう 2% BSA 含有 KRPH buffer のみを添加後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 30 分間インキュベートした。これらの作業により、デキサメサゾン非添加インスリン非添加 2-DG 非添加群（ネガティブコントロール群）、デキサメサゾン非添加インスリン非添加 2-DG 添加群（コントロール群）、デキサメサゾン非添加インスリン添加 2-DG 添加群、デキサメサゾン添加インスリン添加 2-DG 添加群の 4 群となり、各群ともに、5 mL のラウンドチューブ 3 本で培養した。30 分間のインキュベート後ただちに、残存 2-DG を除去するために 2% BSA 含有 PBS にて 1 回洗浄し、細胞溶解のために 10 mmol/L のトリス塩酸 buffer を 1.2 mL 加え、ソニケーター（AU-180C; AIWA Medical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan）にて 10 分間の超音波処理を行った。細胞抽出液を 80°C、15 分間の熱処理で内在性の酵素を失活させた後、4°C、15,000×g、20 分間の遠心分離により上清を回収した。2-DG 取り込み量の測定には 2-Deoxyglucose Uptake Measurement Kit（Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan）を使用し、上清サンプルを検体希釈液で 5 倍希釈した後、ユーザーマニュアルに従って行った[2]。

#### CnPBMCs の細胞内代謝産物の解析

CnPBMCs について上述した方法でデキサメサゾン非添加群と添加群をそれぞれディッシュ 4 枚ずつ培養し 48 時間後、培地中に最終濃度 100 μU/mL でインスリンを添加し、さらに 1 時間培養した。細胞を遠心回収して 5% マンニトール水溶液にて 2 回洗浄し、酵素活性のクエンチング処理のためにメタノールを 1 mL 加えて 30 秒間よく攪拌した。次いで、内部標準試料（Internal Standard: I.S.）含有 Milli-Q 水（H3304-1002, 10 μmol/L メチオニンスルホンおよび 10 μmol/L 10-カンファースルホン酸; Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Japan）を 400 μL 加えて攪拌し、4°C、2,300×g、5 分間の遠心分離を行った。遠心分離後、水層を限外濾過チューブ（UltrafreeMC-PLHCC 遠心式フィルターユニット 5 kDa; Merck Millipore, Darmstadt, Germany）に 400 μL ずつ 2 本に分注し、4°C、9,100×g、120 分間遠心して限外濾過処理を行った。ろ液を乾固させた後、それぞれを 25 μL の Milli-Q 水で再溶解してカチオン性代謝産物の測定とアニオン性代謝産物の測定に供した。

分析には CE-TOF-MS（Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, U.S.A.）を使用した。内径 50 μm、長さ 80 cm のフューズドシリカキャピラリーを使用し、電気泳動バッフ

アーには市販されている溶液を使用した（カチオン測定 p/n: H3301-1001、アニオン測定 p/n: H3302-1021; Human Metabolome Technologies, Inc.）。カチオン測定時は 10 秒間 50 mbar の圧力で注入し（およそ 10 nL に相当）、アニオン測定時は 25 秒間 50 mbar の圧力で注入し（およそ 25 nL に相当）、 $m/z$  50-1,000 を測定した。その他の条件は Soga らの方法に従い実施した(Soga and Neiger, 2000; Soga et al., 2003; Soga et al., 2002)。

CE-TOF-MS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェア MasterHands ver. 2.9.0.9 (Keio University, Tsuruoka, Japan) を用いて自動抽出し、ピーク情報として  $m/z$ 、泳動時間 (Migration Time: MT) とピーク面積値を得た。これらのデータから同位体異性体、アダクトイオンおよびプロダクトイオンなどの分子量関連イオンに関するデータを削除し選択されたデータに対して  $m/z$  と MT の値をもとにヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社の代謝産物データベースに登録されている全物質と許容誤差  $MT \pm 0.5$  min、 $m/z \pm 10$  ppm で照合し、代謝産物を定性した。また、同定された各物質のピーク面積値は I.S. の面積値と細胞数により補正をし、相対面積値を求め、100  $\mu\text{mol/L}$  の一点検量により濃度を算出した。

#### Pathway Enrichment Analysis およびパスウェイマッピング

CE-TOF-MS により同定され、かつ定量されたデータは代謝産物データベース (CAS: <https://www.cas.org/>、KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>) より代謝産物識別番号を取得し、MetaCore ソフトウェア (GeneGo Inc., St. Joseph, MI, U.S.A.) によりパスウェイ解析を行った。また、KEGG データベースに収録されているカノニカルパスウェイを用いて、パスウェイ上に代謝産物定量結果のマッピングを行った。

#### 統計処理

全ての結果は Mean  $\pm$  SEM にて表した。デキサメサゾンの添加 (Dexa 群) とデキサメサゾンの非添加 (Cont 群) の CnPBMCs 細胞内各代謝産物量の有意差を評価するために Paired  $t$  test (Microsoft Excel 2013) を行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。パスウェイ解析では、代謝経路内において変動した代謝産物数から有意性の検定を行い、false discovery rate (FDR) にて評価し、有意水準は Dutta ら (2012) の報告を参考に  $P < 0.15$  とした(Dutta et al., 2012)。

## 結果

CnPBMCs における 2-DG 取り込み量を調べたところ、Fig. 2-1 に示す結果が得られた。2-DG を添加した群では 2-DG 非添加群と比較し、約 30 倍の取り込み量が認められた。インスリンおよびデキサメサゾンの添加による 2-DG 取り込み量に違いは見られなかった。

CE-TOF-MS による CnPBMCs のメタボローム解析の結果、 $m/z$  および MT の値から Table 2-1 に示す 96 種が同定され定量することができた。グルコース-1-リン酸は Cont 群で  $48 \pm 8$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $62 \pm 8$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な増加が認められた。グルコース-6-リン酸は、Cont 群で  $82 \pm 9$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $167 \pm 28$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な増加が認められた。フルクトース-6-リン酸は、Cont 群で  $22 \pm 3$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $48 \pm 8$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な増加が認められた。セドヘプツロース-7-リン酸は、Cont 群で  $12 \pm 0$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $17 \pm 2$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な増加が認められた。アセチル-CoA は、Cont 群で  $4.2 \pm 1.2$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $5.3 \pm 1.0$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な増加が認められた。その一方で、ピルビン酸は、Cont 群で  $48 \pm 6$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $32 \pm 5$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.01$ ) と有意な減少が認められた。ATP は、Cont 群で  $1149 \pm 100$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $923 \pm 53$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な減少が認められた。CTP は、Cont 群で  $49 \pm 5$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $34 \pm 2$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な減少が認められた。dATP は、Cont 群で  $2.4 \pm 0.3$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $1.8 \pm 0.2$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な減少が認められた。NADP<sup>+</sup> は、Cont 群で  $7.5 \pm 0.9$  pmol/ $10^6$  cell であったのに対して、Dexa 群で  $6.2 \pm 0.6$  pmol/ $10^6$  cell ( $P < 0.05$ ) と有意な減少が認められた。

Table 2-1 に示した 96 種の代謝産物定量結果を用いて、MetaCore ソフトウェアによるパスウェイ解析を行った結果、デキサメサゾン添加により変動量の多かったパスウェイのうち上位 11 経路を Table 2-2 に示した。11 種の代謝経路のうち 8 種がアミノ酸代謝に関わる経路であり、3 種がグルコース代謝に関わる経路であった。また、これらの代謝経路のうち直接的につながる、解糖系／糖新生経路、TCA サイクル、ペントースリン酸経路について KEGG データベースに収録されているカノニカルパスウェイを

取得し、代謝経路への代謝産物量のマッピングを行った (Fig. 2-2)。解糖系／糖新生経路においては Dexa 群で代謝産物量が多く、一方 TCA サイクルでは Dexa 群で代謝産物量が少なくなる傾向にあった。

### 考察

グルココルチコイドは、*in vivo* および *in vitro* でインスリン抵抗性を引き起こすことが知られている (Grunfeld et al., 1981; Guillaume-Gentil et al., 1993)。本研究において、CnPBMCs の ATP 量はデキサメサゾンの添加により 0.8 倍と有意に減少した。2-DG 取り込み量試験では、デキサメサゾンを添加しても 2-DG 取り込み量に違いが見られなかったことから TCA サイクルと解糖系による ATP 産生が抑制されたと考えられる。MetaCore ソフトウェアによりデキサメサゾンの添加で変化の生じた代謝経路を調べたところ、他の代謝経路と比較し TCA サイクルと解糖系／糖新生経路に変動量が多いことが認められた。さらに、解糖系中間体であるグルコース-6-リン酸は 2.04 倍、フルクトース-6-リン酸は 2.16 倍とデキサメサゾン添加により有意な増加が示された一方で、ピルビン酸は 0.67 倍と有意な減少であり、TCA サイクル中間体の減少傾向が示された。これらの結果から、解糖系と TCA サイクルによるグルコースの異化作用が減少していることが示唆された。デキサメサゾンはインスリンシグナリングのダウンレギュレーションとグルコース輸送体である glucose transporter (GLUT) -4 の膜上へのトランスロケーション低下により細胞におけるグルコース取り込みを低下させる報告されているが (Sakoda et al., 2000; Yoon et al., 2011)、本研究ではデキサメサゾンにより細胞内でのグルコース異化作用が減少し、細胞内のグルコース濃度が維持され、糖の取り込みが不要な状態であるということが示唆された。

犬の HAC 症例では euglycemic hyperinsulinemic glucose clamp (グルコースクランプ法) により末梢組織でのグルコース取り込みが有意に低下していることが報告されている (Fukuta et al., 2012)。しかしながら、グルコースクランプ法を実施するための人工膝臓装置は獣医領域への普及は少なく、また、グルコースクランプ法は 1 回の実施に約 2 時間の拘束を要するためストレスに弱い HAC 症例の犬への臨床的な実施は困難であると考えられる。本章で述べた末梢血白血球を用いたメタボローム解析は、*in vitro* での検証ではあるが、犬の糖代謝状態を評価するのに有用な手段となるだろう。

本研究は、デキサメサゾンの添加は 48 時間の短期的な影響であること、筋細胞、肝

細胞や脂肪細胞ではなく末梢血単核球であるという制限がある。しかしヒトの筋組織と末梢血白血球において、トランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析の結果、類似した共通の変化が認められたこと(Stentz and Kitabchi, 2007)、さらに、白血球内酵素は動物組織内のエネルギー代謝レベルを反映することも報告されている(Arai et al., 2002; Washizu et al., 1998)。したがって、第1章および本章の結果から末梢血単核球が糖代謝研究において筋細胞の代替組織として利用できることが示された。

#### 小括

本章では、グルココルチコイドが犬の末梢血単核球の細胞内代謝物質にどのような影響を及ぼすかについて検討した。健常な犬から単離した、末梢血単核球の培養液中にデキサメサゾンを追加し、48時間培養後の細胞内代謝産物をCE-TOF-MSにより分析し、解析した。デキサメサゾンを追加することでCnPBMCsにおけるATP産生の減少が示された。デキサメサゾンを追加するとCnPBMCsのグルコース-1-リン酸は1.29倍、グルコース-6-リン酸は2.04倍、フルクトース-6-リン酸は2.16倍、セドヘプツロース-7-リン酸は1.41倍、アセチル-CoAは1.25倍有意に高値を示し、ピルビン酸は0.67倍有意に低値を示し、パスウェイ解析の結果からも、主にTCAサイクルおよび解糖系／糖新生経路に変化を認めた。

糖新生経路上流の代謝産物の増加傾向と、TCAサイクル中間体、ピルビン酸の減少傾向から、デキサメサゾンの追加によって培養犬末梢血単核球におけるグルコースの異化作用が減少したということが考えられる。さらに、デキサメサゾンによる糖取り込み能の変化は培養犬末梢血単核球で認められず、また細胞内での糖異化作用が減少していることから、細胞内のグルコース濃度が維持され、細胞への糖取り込みが不要であり、高血糖を招きやすい状態にあることが考えられる。

犬の末梢血単核球での代謝産物の解析は、生体におけるグルコース代謝障害を反映し、グルココルチコイドによって誘発される糖尿病発症に関する評価法として有用となる可能性が考えられた。

## 表および図



Table 2-1 デキサメサゾンの添加を添加した時の犬末梢血単核球の代謝産物量

Metabolite	P value	Ratio (Dexa/Cont)	Concentration (pmol/10 <sup>6</sup> cell)				KEGG ID
			Control (n = 4)		Dexamethasone-treated (n = 4)		
			Mean	SEM	Mean	SEM	
Amino acid							
Gly	0.298	0.810	968	165	784	93	C00037
Ala	0.130	0.824	1375	118	1133	87	C00041
Ser	0.419	0.915	824	66	754	85	C00065
Pro	0.438	0.930	1030	80	957	79	C00148
Val	0.714	0.982	224	21	220	16	C00183
Thr	0.433	0.932	591	60	550	48	C00188
Cys	0.561	0.940	25	10	23	14	C00097
Ile	0.540	0.930	293	44	273	30	C00407
Leu	0.503	0.938	310	44	291	32	C00123
Asn	0.171	0.807	1543	224	1244	166	C00152
Asp	0.355	0.906	2422	164	2195	151	C00049
Gln	0.583	0.933	718	96	669	17	C00064
Lys	0.212	1.177	277	20	326	17	C00047
Glu	0.190	0.783	8796	1443	6886	1189	C00025
Met	0.946	0.993	64	8	63	7	C00073
His	0.652	0.958	124	13	119	13	C00135
Phe	0.813	0.979	103	14	101	11	C00079
Arg	0.320	1.101	812	47	894	38	C00062
Tyr	0.919	0.991	106	15	105	11	C00082
Trp	0.394	0.846	9.2	1.6	7.8	0.3	C00078
β-Ala	0.100	0.735	88	12	64	8	C00099
Hydroxyproline	0.118	0.800	528	65	422	48	C01015
S-Adenosylmethionine	0.547	1.071	92	6	99	12	C00019
GABA	0.798	0.954	57	8	55	10	C00334
Amino acid metabolism							
Ornithine	0.358	1.158	215	15	250	21	C00077
Citrulline	0.253	0.861	14	2	12	1	C00327
Glyoxylic acid	0.538	1.017	18	3	18	4	C00048
Lipid metabolism							
Choline	0.253	1.204	225	19	271	31	C00114
Betaine	0.604	0.963	410	44	394	26	C00719
Sarcosine	0.444	0.883	36	5	32	5	C00213
Glycerol 3-phosphate	0.204	1.121	74	23	83	29	C00093
Lactic acid	0.554	0.877	8485	2263	7445	2345	C00186
Central carbon metabolism							
Glucose 1-phosphate	0.020*	1.291	48	8	62	8	C00103
Glucose 6-phosphate	0.035*	2.035	82	9	167	28	C00668
Fructose 6-phosphate	0.036*	2.157	22	3	48	8	C05345
Fructose 1,6-diphosphate	0.861	1.024	83	12	85	17	C05378
Glyceraldehyde 3-phosphate	0.534	0.929	13	3	12	2	C00118
Dihydroxyacetone phosphate	0.289	1.280	127	31	163	38	C00111
3-Phosphoglyceric acid	0.452	1.197	13	3	16	1	C00197
2-Phosphoglyceric acid	0.122	1.235	6.9	0.4	8.5	0.4	C00631
Phosphoenolpyruvic acid	0.158	1.420	13	1	18	3	C00074
Pyruvic acid	0.009**	0.669	48	6	32	5	C00022
6-Phosphogluconic acid	0.218	1.122	3.5	0.4	3.9	0.1	C00345
Gluconic acid	0.483	0.925	8.0	1.0	7.4	1.0	C00257
Sedoheptulose 7-phosphate	0.045*	1.413	12	0	17	2	C05382
Ribose 5-phosphate	0.073	1.214	8.7	1.7	11	2	C00117
Ribulose 5-phosphate	0.159	1.190	29	2	35	4	C00199
Acetyl CoA_divalent	0.028*	1.249	4.2	1.2	5.3	1.0	C00024
Citric acid	0.104	0.561	1051	218	590	66	C00158
Isocitric acid	0.327	0.591	33	12	19	3	C00311
cis-Aconitic acid	0.304	0.646	36	12	23	4	C00417
2-Oxoglutaric acid	0.312	0.716	28	8	20	2	C00026
Succinic acid	0.202	0.779	200	38	156	33	C00042
Fumaric acid	0.225	0.778	131	25	102	19	C00122
Malic acid	0.246	0.783	493	88	386	68	C00149
PRPP	0.236	0.478	4.7	1.3	2.2	0.5	C00119

(次のページに続く)

Table 2-1 (continued)

Metabolite	P value	Ratio (Dexa/Cont)	Concentration (pmol/10 <sup>6</sup> cell)				KEGG ID
			Control (n = 4)		Dexamethasone-treated (n = 4)		
			Mean	SEM	Mean	SEM	
<b>Nucleotide metabolism</b>							
Adenine	0.146	0.476	3.5	0.4	1.7	0.2	C00147
Adenosine	0.309	0.557	4.9	2.3	2.8	0.5	C00212
AMP	0.796	1.040	467	129	486	123	C00020
ADP	0.925	0.989	681	27	674	87	C00008
ATP	0.046*	0.803	1149	100	923	53	C00002
cAMP	0.807	1.041	16	3	16	3	C00575
Guanine	0.768	1.049	18	4	19	6	C00242
Guanosine	0.350	1.221	16	2	19	4	C00387
GMP	0.774	0.942	124	37	117	36	C00144
GDP	0.145	0.906	130	11	118	13	C00035
GTP	0.050	0.696	201	27	140	10	C00044
Hypoxanthine	0.622	0.955	225	51	215	51	C00262
Inosine	0.602	1.197	69	12	82	18	C00294
IMP	0.834	0.992	235	41	233	46	C00130
Cytidine	0.426	0.823	48	14	40	12	C00475
CMP	0.928	0.988	32	7	32	6	C00055
CDP	0.700	0.945	21	2	20	1	C00112
CTP	0.018*	0.693	49	5	34	2	C00063
Uridine	N.A.	1.112	23	NA	26	NA	C00299
UMP	0.198	1.039	169	52	175	52	C00105
UDP	0.490	1.089	134	4	146	16	C00015
UTP	0.084	0.778	210	34	164	16	C00075
dATP	0.022*	0.735	2.4	0.3	1.8	0.2	C00131
dTMP	0.529	0.887	4.7	1.2	4.1	1.3	C00364
dTDP	0.927	0.995	5.0	0.3	5.0	0.6	C00363
dTTP	0.231	0.858	7.3	0.6	6.3	0.4	C00459
<b>Coenzyme</b>							
NAD <sup>+</sup>	0.697	0.929	105	29	97	15	C00003
NADP <sup>+</sup>	0.033*	0.824	7.5	0.9	6.2	0.6	C00006
CoA_divalent	0.121	0.619	9.0	1.3	5.6	1.8	C00010
<b>Peptide</b>							
Glutathione	0.476	0.711	1119	409	795	212	C00051
Glutathione disulfide	0.623	0.860	584	242	502	159	C00127
Carnosine	0.901	0.990	44	3	44	5	C00386
<b>Other</b>							
Creatine	0.627	0.940	236	26	222	23	C00300
Creatinine	0.372	0.878	12	1	11	2	C00791
Putrescine	0.350	1.669	100	42	167	32	C00134
Spermidine	0.673	1.176	14	2	17	5	C00315
Spermine	N.A.	0.359	11	5	4.1	NA	C00750
<b>Uncategorised</b>							
Glycolic acid	0.396	1.652	62	12	103	33	C00160
2-Hydroxybutyric acid	0.222	0.716	3.3	0.7	2.3	0.1	C05984
3-Hydroxybutyric acid	0.619	0.928	23	5	22	3	C01089

Dexa/Cont, dexamethasone-treated/control; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; PRPP, 5-phosphoribosyl diphosphate; AMP, adenosine 5'-monophosphate; ADP, adenosine 5'-diphosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; cAMP, cyclic adenylic acid; GMP, guanosine 5'-monophosphate; GDP, guanosine 5'-diphosphate; GTP, guanosine 5'-triphosphate; IMP, inosine 5'-monophosphate; CMP, cytidine 5'-monophosphate; CDP, cytidine 5'-diphosphate; CTP, cytidine 5'-triphosphate; UMP, uridine 5'-monophosphate; UDP, uridine 5'-diphosphate; UTP, uridine 5'-triphosphate; dATP, deoxyadenosine 5'-triphosphate; dTMP, deoxythymidine 5'-phosphate; dTDP, deoxythymidine 5'-diphosphate; dTTP, deoxythymidine 5'-triphosphate; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide; NADP<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NA, not available. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control (Paired  $t$  test)

Table 2-2 デキサメサゾンの添加により変動量の多かった上位 11 種の代謝経路

Rank	Pathway	FDR <i>P</i> value	Differentially expressed metabolites ( <i>n</i> )	Gene or proteins or metabolites in pathway ( <i>n</i> )
1	Aminoacyl-tRNA biosynthesis in mitochondrion	$5.9 \times 10^{-19}$	20	81
2	Urea cycle	$1.2 \times 10^{-10}$	13	70
3	L-Arginine metabolism	$2.4 \times 10^{-10}$	13	75
4	Histidine-glutamate-glutamine metabolism	$2.9 \times 10^{-10}$	14	95
5	Aspartate and asparagine metabolism	$2.4 \times 10^{-9}$	12	73
6	Glycine, serine, cysteine and threonine metabolism	$5.5 \times 10^{-9}$	14	121
7	L-Alanine, L-cysteine, and L-methionine metabolism	$2.6 \times 10^{-8}$	10	56
8	Tricarmonic acid cycle	$1.8 \times 10^{-7}$	9	51
9	Methionine-cysteine-glutamate metabolism	$7.6 \times 10^{-7}$	8	43
10	Pentose phosphate pathway	$8.6 \times 10^{-7}$	8	44
11	Glycolysis and gluconeogenesis	$1.5 \times 10^{-6}$	9	66

FDR, false discovery rate

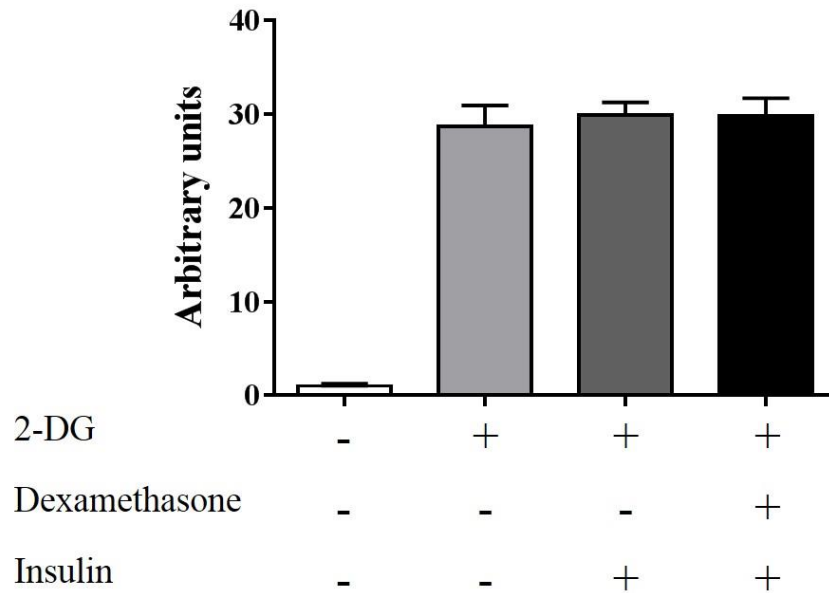


Fig. 2-1 犬末梢血単核球培養中の異なる条件における 2-DG 取り込み量 (Mean ± SEM,  $n = 3$ )

デキサメサゾンは最終濃度  $1 \mu\text{mol/L}$  で 48 時間添加した。48 時間後に  $100 \mu\text{U/mL}$  でインスリンを添加し 30 分間インキュベートした後、2-DG を  $1 \text{mmol/L}$  で添加して 30 分間の 2-DG 取り込み量を測定した。

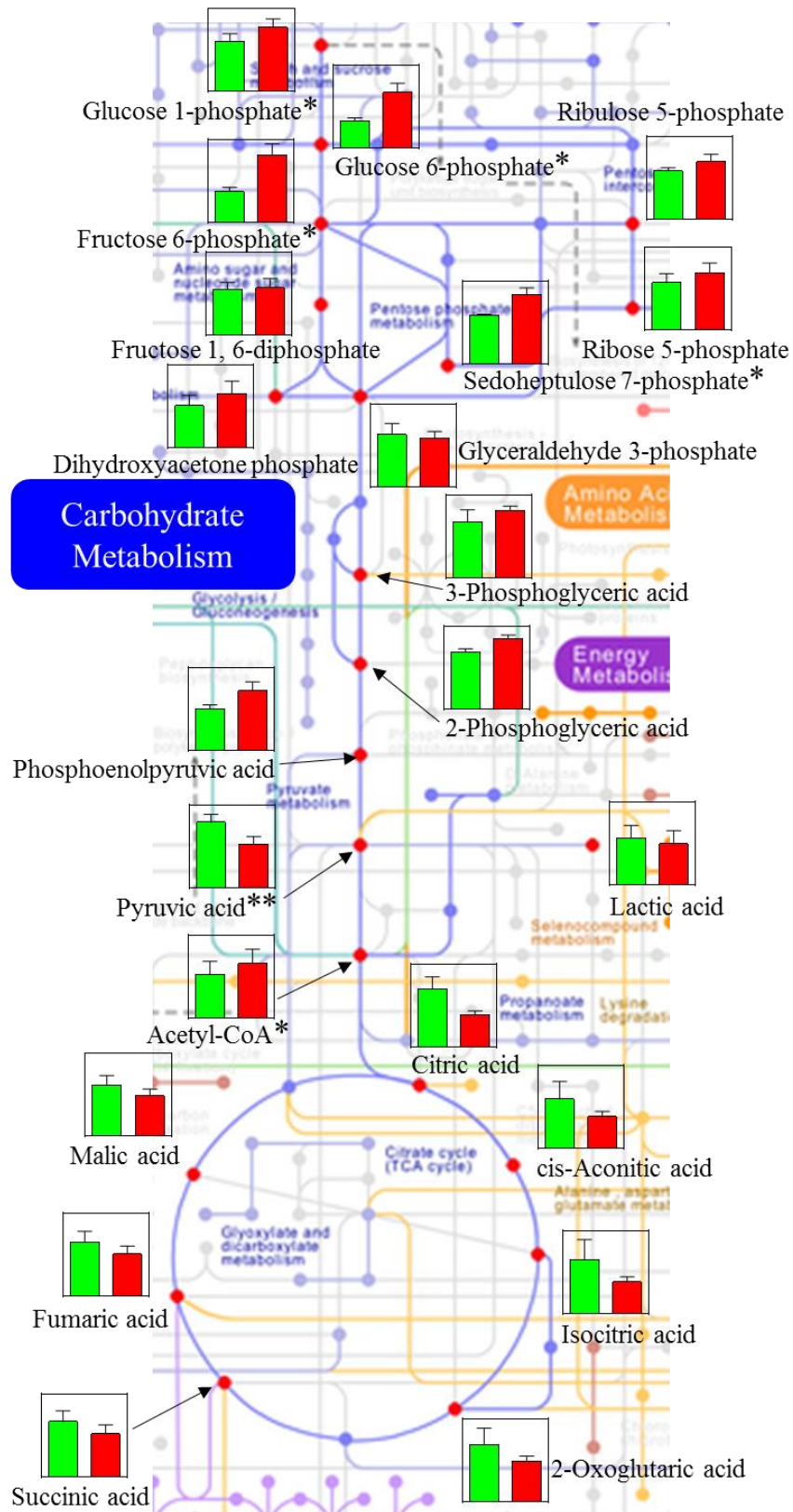


Fig. 2-2 KEGG パスウェイ (解糖系/糖新生、TCA サイクル、ペントースリン酸経路) を用いた代謝産物マッピング

緑; Control 群、赤; Dexa 群の代謝産物量

Paired *t* test; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs Cont

## 第3章

デキサメサゾンおよび TNF- $\alpha$  が犬骨格筋培養細胞の  
代謝産物とインスリンシグナル遺伝子発現に及ぼす

影響の解析

## 緒言

ヒトにおいて 2 型糖尿病の主な原因となる肥満は、犬においては高インスリン血症を呈し(Verkest et al., 2011b)、インスリン抵抗性を惹起するものの(Rand et al., 2004)、現在のところ糖尿病発症の直接的な原因であるとの報告はない。また、ヒトや猫の 2 型糖尿病では膵島に沈着するアミリンが膵  $\beta$  細胞の炎症につながるとされているが、犬ではアミリンと糖尿病発症の関連は見出されていない(Haataja et al., 2008; Scheuner and Kaufman, 2008)。

このように犬はヒトと糖尿病発症機序が異なると考えられ、犬の糖尿病発症機序の解明の研究については、医学領域で確立している糖尿病モデルげっ歯類を用いることはできず、犬固有の研究材料が必要になると考えられる。しかしながら、第 1 章では臨床症例の犬の末梢血白血球を実験に供したため、主要なインスリン感受性組織における影響についての検討は実施できなかった。特に、骨格筋はインスリン依存性の糖取り込みを行っており、かつ生体の約 70%をしめる最大の糖取り込み器官であることから、骨格筋における糖代謝異常のメカニズム解明は犬の糖尿病発症機序の解明につながるものであると考えられる。

第 2 章では、組織内のエネルギー代謝レベルを反映し、採取が容易であるという特徴を有する犬の末梢血単核球を用いたが、長期的な維持は出来ずその都度の採取が必要である。そこで本章では、市販されている犬の正常骨格筋細胞を実験に供試し、犬における糖代謝異常のメカニズム解明に向け、グルココルチコイド製剤であるデキサメサゾンと、ヒトにおいて肥満により高値を示し、インスリン抵抗性を惹起する腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の影響を *in vitro* で検討した。

まず、第 1 節ではデキサメサゾン、TNF- $\alpha$  を犬骨格筋培養細胞の培地に添加し、代謝産物を分析し、影響を解析した。代謝産物のアミノ酸 20 種、脂肪酸 14 種、有機酸 11 種についてそれぞれ異なる誘導体化後にガスクロマトグラフ質量分析計 (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer: GC-MS) で定量を行った。また、糖と糖リン酸 9 種については液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (Liquid Chromatograph tandem Mass Spectrometer: LC-MS/MS) を用いて定量を行った。

次に第 2 節では第 1 節と同様にデキサメサゾン、TNF- $\alpha$  を犬骨格筋培養細胞の培地に添加し、糖取り込み能の評価とインスリンシグナリング遺伝子に及ぼす影響を解析した。第 2 章では糖取り込み能の評価に 2-Deoxyglucose Uptake Measurement Kit を使用

したが、本章では 2-Deoxyglucose Uptake Measurement Kit よりも測定レンジが広くサンプルの希釈を必要としない方法として、2-DG の細胞取り込み後の代謝産物である 2-デオキシグルコース-6-リン酸 (2DG6P) について、LC-MS/MS により定量を行うことで、糖取り込み能が評価できるか検討した。さらに糖取り込み能の評価に最適なインスリン濃度を求めたのち、デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  の影響を検討した。また、インスリンシグナリング遺伝子である IRS-1、PI3-K、Akt2 の mRNA 量を定量 PCR 法によって測定した。

## 第1節 デキサメサゾン、TNF- $\alpha$ が犬骨格筋培養細胞の代謝産物に及ぼす影響の解析

### 材料および方法

#### 犬骨格筋培養細胞

Cell Applications Inc. (San Diego, CA, U.S.A.) から購入したイヌ骨格筋細胞 (Canine Skeletal Muscle Cells; CnSkMC) の分化誘導により得られた筋管様細胞を用いた。分化誘導は次の手順により行った。まず、10 cm 接着細胞用培養ディッシュ 1 枚あたり未分化状態の筋芽細胞  $5.0 \times 10^5$  個を播種し、増殖培地 (10% Canine Skeletal Muscle Cell Growth Supplements 加 Canine Skeletal Muscle Cell Basal Medium (Cell Applications Inc.)) にて約 4 日間 37°C、5% CO<sub>2</sub> の湿潤条件下にて培養した。およそ 80% コンフルエントに達しているのを確認した後、分化培地 (Canine Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium (Cell Applications Inc.)) に交換し、さらに 96 時間培養し、分化誘導を行った。

増殖培養 4 日後の培養細胞鏡検像を Fig. 3-1A に、96 時間の分化誘導後の培養細胞鏡検像を Fig. 3-1B に示した。また、筋芽細胞と筋管様細胞を上述の方法で培養した後、細胞をエタノール固定処理したのち、ギムザ染色により、核の染色を行った (Fig. 3-1C、D)。

#### 犬筋管様細胞のインスリン抵抗性状態の誘導

デキサメサゾンおよび TNF- $\alpha$  による犬筋管様細胞に対するインスリン抵抗性状態の誘導は Yoon ら (2011) の報告を参考にして行った (Yoon et al., 2011)。デキサメサゾン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) は最終濃度 1  $\mu\text{mol/L}$ 、イヌ TNF- $\alpha$  (Recombinant Canine TNF- $\alpha$ /TNFSF1A; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.) は最終濃度 2 ng/mL



となるように2%非働化牛胎児血清 (FBS; Biowest Inc., Nuaille, France)、25 units/mL ペニシリンおよび25 µg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; PAA Laboratories GmbH, Austria) にて調製した。

分化誘導により得られた筋管様細胞を1 µmol/L のデキサメサゾン含有 DMEM、2 ng/mL の TNF-α 含有 DMEM、無添加の DMEM の3種類の条件で4日間37°C、5% CO<sub>2</sub> の湿潤条件下にて培養した。培養中は、24時間毎に新鮮なデキサメサゾン含有培地、TNF-α 含有培地あるいは無添加 DMEM に交換し、無添加 DMEM で培養した細胞を Control 群とした。また、分析対象とした代謝産物のアミノ酸、有機酸、脂肪酸、糖と糖リン酸の4種類については、それぞれ別個の分析方法で測定したため、培養も種類毎に行った。ただし、脂肪酸については、アミノ酸と同時に細胞から抽出したため、全部で3回に分けて培養を行った。また、アミノ酸および脂肪酸の抽出には、3種類の条件で各3ディッシュずつ培養し、有機酸、糖と糖リン酸の抽出にはそれぞれ3種類の条件で各9ディッシュずつ培養した。

#### 犬筋管様細胞からの代謝産物の抽出

培養細胞からの代謝産物の抽出は Sana ら(Sana et al., 2008)、Sheikh ら(Sheikh et al., 2011)の方法を参考に一部改変して行った。96時間のインスリン抵抗性誘導の後、培養上清を除去し、トリプシン (TrypLE Express Enzyme (1×), phenol red; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.) にて細胞を剥離した。2% FBS 加 DMEM を加えて細胞を遠心チューブに回収し、25°C、360×g、5分間の遠心分離の後上清を除去し、冷却 PBS にて2回細胞を洗浄した。その後、1 mL の冷却 PBS にて再懸濁し全量を1.5 mL マイクロチューブ (Eppendorf Co., Ltd., Tokyo, Japan) に移した後4°C、1,000×g、3分間の遠心分離により細胞ペレットを得た。この際、細胞懸濁液の1部を別の1.5 mL マイクロチューブに分注し、おおよそ  $1.0 \times 10^3$ - $5.0 \times 10^4$  個/100 µL になるように PBS にて希釈し、Scepter 2.0 セルカウンター (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) にてサンプル中の細胞数の計測を行った。

1.5 mL マイクロチューブに形成された細胞ペレットの上清を取り除き、代謝産物抽出過程における誤差補正のための内部標準物質 (Internal Standard; I.S.) 含有冷却超純水を150 µL 加えて再度懸濁した。I.S. 溶液は L-Phenylalanine ring-d5 (≥98%, Cambridge

Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA, U.S.A.) をアミノ酸分析用には 1 サンプルあたり 30 nmol、有機酸分析用には 1 サンプルあたり 5 nmol になるよう調製し、糖と糖リン酸分析用には U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-D-グルコース (≥99%; Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を 1 サンプルあたり 2.5 nmol になるよう調製した。懸濁した細胞液は -80°C のアイスバスにて凍結させた後、37°C のヒートブロックで融解させた。細胞を十分に破壊させるために、この過程は 2 度繰り返して行った。その後、酵素活性のクエンチング処理のために -30°C のメタノールを 600 μL 加えてよく攪拌した。次いで、高分子タンパク質を変性させるためにクロロホルムを 450 μL 加えて激しく攪拌した。さらに、細胞の破壊をより十分なものにするために、ソニケーター (AU-180C; AIWA Medical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて 10 分間の超音波処理を行った。次いで、-80°C のアイスバスにて 30 分間冷却し、5 分毎にミキサーにて攪拌を行った後、冷却超純水を 150 μL 加えて 4°C、1,000×g、3 分間遠心分離した。代謝産物の水層あるいは有機溶媒層への分離および分画の形成を促すために -80°C フリーザーにて 20 時間静置した。20 時間後にチューブを取り出し 4°C、10,000×g、10 分間の遠心分離により形成された 3 分画 (上から水層、タンパク質層、有機溶媒層) を壊さずに上層は 1.5 mL マイクロチューブに分注、下層は 15 mm ねじロガラス試験管に分注した。1.5 mL マイクロチューブに分注した上層の溶液は、60 分間遠心エバポレータにて残存有機溶媒を揮発させた後、-80°C で 2 時間凍結し、凍結乾燥機 (PDU-1200; Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて一晩凍結乾燥した。この凍結乾燥サンプルはアミノ酸、有機酸、糖と糖リン酸のそれぞれの分析に供した。また、15 mm ねじロガラス試験管に分注した下層の溶液は、減圧デシケータにてただちに乾燥し、脂肪酸分析に供した。

#### 培養細胞中のアミノ酸分析

細胞サンプルの前処理およびアミノ酸の誘導体化はアミノ酸分析キット EZ:faast (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, U.S.A.) を使用した。凍結乾燥サンプルを水 100 μL で再溶解したのち、内部標準試料含有溶液 (Reagent 1; Internal Standard; I.S. ノルバリン: 200 nmol/mL、*n*-プロパノール:10%、塩酸:20 μmol/L) を 100 μL 加えて混和し、この混合液全量を固相抽出チップに通して吸着させたのち 200 μL の洗浄液 (Reagent 2; *n*-プロパノール:30%) で洗浄し、200 μL の溶出液 (Reagent 3A (NaOH:0.33 N) : Reagent 3B (*n*-プロパノール:80%、3-ピコリン:20%))=3 : 2 で調製) にてチップから吸着剤粒子を排

出させた。次いで、誘導体化のために 50  $\mu\text{L}$  の有機溶剤 I (Reagent 4; 2,2,4-トリメチルペンタン:11.0%、クロロホルム:71.6%、クロロギ酸プロピル:17.4%) を加え、10 秒間攪拌した。最後に、誘導体化されたアミノ酸を水層から有機層に抽出させるために 50  $\mu\text{L}$  の有機溶剤 II (Reagent 5; 2,2,4-トリメチルペンタン:81%、クロロホルム:19%) を加えて 10 秒間攪拌し、再度この操作を行った後、1 分間静置し、上層を GC-MS 用バイアルに移して分析サンプルとした。

培養細胞中のアミノ酸の定性のために、EZ:faast に含まれるアミノ酸スタンダード溶液 (アミノ酸 32 種: アラニン、サルコシン、グリシン、 $\alpha$ -アミノ酪酸、バリン、 $\beta$ -アミノイソ酪酸、ロイシン、アロイソロイシン、イソロイシン、スレオニン、セリン、プロリン、アスパラギン、チオプロリン、アスパラギン酸、メチオニン、4-ヒドロキシプロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、 $\alpha$ -アミノアジピン酸、 $\alpha$ -アミノピメリック酸、グルタミン、オルニチン、グリシン-プロリン、リシン、ヒスチジン、ヒドロキシリシン、チロシン、プロリン-ヒドロキシプロリン、トリプトファン、シスタチオニン、シスチン; 各 200 nmol/mL) 100  $\mu\text{L}$  を凍結乾燥再溶解サンプルと同様に前処理および誘導体化を行った。また、保持時間のずれを補正するために  $\text{C}_7$ - $\text{C}_{33}$  を含む *n*-アルカン (RESTEK Co., Bellefonte, U.S.A.) をサンプルの分析と同じ条件で測定した。

Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS) による分析は GCMS-QP2010 Plus (SHIMADZU Co., Kyoto, Japan) を使用し、Table 3-1 に示した条件に従って行った。得られた分析サンプルデータの保持時間は、*n*-アルカンの保持時間をもとに GCMSsolution Ver. 2.72 (SHIMADZU Co.) の自動保持時間調整機能により補正し、GC/MS 代謝成分データベース (SHIMADZU Co.) に登録されている 33 種を対象に同定し、抽出過程の誤差補正のために使用した I.S. L-Phenylalanine ring-d5 のデータ解析条件は、Retention time; 5.831 min、Quantified ion;  $m/z$  153、Confirmed ion;  $m/z$  96, 195 とした。それぞれのアミノ酸について I.S. であるノルバリンと L-Phenylalanine ring-d5 に対する相対面積値を求め、Control 群のクロマトグラム面積値を 1 として TNF- $\alpha$  群と Dexa 群の相対値を算出した。

#### 培養細胞中の脂肪酸分析

細胞サンプルの前処理および脂肪酸の誘導体化は脂肪酸メチル化キット (Nacal Tesque, Inc., Tokyo, Japan) を使用し、メチル化脂肪酸の精製には、メチル化脂肪酸精製

キット (Nacalai tesque, Inc.) を使用した。まず、乾燥させた細胞抽出物が入っている 15 mm ねじ口試験管に、一次メチル化 (エステル交換反応) のために 500  $\mu$ L の試薬 A (抽出有機溶媒) および 500  $\mu$ L の試薬 B (メトキシドナトリウムメタノール溶液) を加え、37°C で 60 分間反応させた。次いで、二次メチル化 (メチルエステル化反応) のために 500  $\mu$ L の試薬 C (三フッ化ホウ素メタノール溶液) を加えて 37°C で 20 分間反応させた。その後、1 mL の抽出試薬 (ヘキサン; 96%) および内部標準物質 (I.S.) としてヘキサンで 50  $\mu$ g/mL に調製したアラキジン酸エチルエステル (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) を 100  $\mu$ L 加えてボルテックスミキサーで十分に攪拌し、二層に分離した有機層 700  $\mu$ L を別の試験管に回収した。水溶性の不純物を水層に溶出させるために、回収した有機層に 1 mL の超純水を加えて攪拌した。再度分離した有機層から 400  $\mu$ L をとり、3 mL の前洗浄液 (ヘキサン; 96%) で洗浄したシリカゲルカートリッジカラムに注入し、脂肪酸メチルを吸着させた。3 mL の洗浄液 (ヘキサン; 96%) でカートリッジカラムを洗浄した後、3 mL の溶出液 (ヘキサン; 96%、酢酸メチル; 2%) にてカートリッジカラムから溶出する脂肪酸メチルを新しい試験管に回収した。回収した脂肪酸メチル溶液は減圧デシケータにて乾燥させ、1 mL の抽出試薬 (ヘキサン; 96%) にて再溶解したのち、GC-MS 用バイアルに移して分析サンプルとした。

培養細胞中の脂肪酸の定性のために標準物質として、ラウリン酸 ( $\geq 99\%$ , Sigma)、ミリスチン酸 ( $\geq 98\%$ , Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan)、パルミトレイン酸 ( $\geq 98.5\%$ , Sigma)、パルミチン酸 ( $\geq 99\%$ , Sigma)、マルガリ酸 ( $\geq 98\%$ , Sigma)、リノール酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan)、オレイン酸 ( $\geq 99\%$ , Sigma)、*cis*-バクセン酸 ( $\geq 97\%$ , Sigma)、ステアリン酸 ( $\geq 99\%$ , Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)、アラキドン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi)、エイコサペンタエン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi)、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi)、ドコサヘキサエン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi)、ドコサペンタエン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi) を使用した。各化合物をエタノールあるいはヘキサンで溶解し、同様に前処理および誘導体化を行った。

GC-MS による分析は GCMS-QP2010 Plus (SHIMADZU Co.) を使用し、Table 3-2 に示す条件に従い実施した。また、Table 3-3 に示したデータ解析条件にて分析サンプルに含まれる脂肪酸を同定した。それぞれの脂肪酸について I.S. であるエチルアラキジン酸に対する相対面積値を求め、Control 群のクロマトグラム面積値を 1 として TNF- $\alpha$  群と Dexa 群の相対値を算出した。

### 培養細胞中の有機酸分析

培養細胞中の有機酸についてはトリメチルシリル (TMS) 化による誘導体化を行った。まず、20 mg/mL になるよう脱水ピリジン ( $\geq 99.5\%$ , wako) で溶解したメトキシアミン塩酸塩 ( $\geq 98\%$ , Sigma) を凍結乾燥後の 1.5 mL マイクロチューブに 100  $\mu$ L 加えた後、残滓が分散するまでソニケーター (AU-180C) で処理し、30°C の恒温振とう器にて 1,200 rpm、90 分間反応させた。その後、マイクロチューブに 50  $\mu$ L の N-トリメチルシリル-N-メチルトリフルオロアセトアミド (MSTFA; Sigma) を加えて 37°C の恒温振とう器にて 1,200 rpm、30 分間反応させたのち 6,000 $\times$ g、5 分間の遠心分離を行い、上清を GC-MS 用バイアルに移し分析サンプルとした。

また、有機酸の定性のための標準物質として、ピルビン酸 ( $\geq 98\%$ , Sigma)、ジヒドロキシアセトンリン酸二リチウム塩 ( $\geq 93\%$ , Sigma)、フマル酸 ( $\geq 99\%$ , Sigma)、L-リンゴ酸 ( $\geq 97\%$ , Wako)、2-オキソグルタル酸 ( $\geq 98\%$ , Sigma)、ホスホエノールピルビン酸一カリウム塩 ( $\geq 99\%$ , Sigma)、オキサロ酢酸 ( $\geq 95\%$ , Wako)、*cis*-アコニット酸 ( $\geq 98\%$ , Sigma)、*sn*-グリセリン 3 リン酸二シクロヘキシルアンモニウム塩 ( $\geq 93\%$ , Sigma)、D-3-ホスホグリセリン酸二ナトリウム塩 ( $\geq 93\%$ , Sigma)、DL-イソクエン酸三ナトリウム塩水和物 ( $\geq 93\%$ , Sigma)、クエン酸一水和物 (99.5%, Wako) をそれぞれ 1 mmol/L と 10  $\mu$ mol/L になるよう超純水で調製した。これらの標準溶液から 50  $\mu$ L を 1.5 mL マイクロチューブに分注し、Nishiumi ら (2010) の方法を参考に前処理と誘導体化を行った (Nishiumi et al., 2010)。まず、50  $\mu$ L の標準試料溶液に 250  $\mu$ L の抽出溶媒 (メタノール:水:クロロホルム=2.5:1:1) を添加して、ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。I.S. として抽出溶媒で調製した 0.01 mg/mL の L-Phenylalanine ring-d5 を 90  $\mu$ L 加えて攪拌し、37°C の恒温振とう器にて 1,200 rpm、30 分間振とうさせた。その後、4°C、15,000 rpm、3 分間の遠心分離を行い、上清 315  $\mu$ L を新しい 1.5 mL マイクロチューブに分注し、280  $\mu$ L の超純水を加えて混和した。その後再度 4°C、15,000 rpm、3 分間の遠心分離を行い、上清 420  $\mu$ L を新しい 1.5 mL マイクロチューブに回収した。60 分間遠心エバポレータにて残存有機溶媒を揮発させた後、-80°C で 2 時間凍結し、凍結乾燥機 (PDU-1200) にて一晩凍結乾燥した。その後の誘導体化 (TMS 化) 処理は培養細胞サンプルと同様にして行った。

GC-MS による分析は GCMS-QP2010 Plus (SHIMADZU Co.) を使用し、Table 3-4 に

示す条件に従い実施した。また、Table 3-5 に示したデータ解析条件をもとに分析サンプルに含まれる解糖系、TCA サイクル中間体を同定した。それぞれの有機酸について I.S.である L-Phenylalanine ring-d5 に対する相対面積値を算出し、Control 群を 1 とした時の TNF- $\alpha$  群と Dexa 群の相対値を算出した。

#### 培養細胞中の糖、糖リン酸分析

培養細胞中の糖、糖リン酸の前処理および誘導体化は Han ら (2013) の方法を参考に行った(Han et al., 2013)。まず、凍結乾燥後の 1.5 mL マイクロチューブに 75%メタノールを 100  $\mu$ L 加えた後、メタノールで 25 mmol/L に調製した冷却 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC,  $\geq 95\%$ ; Sigma) を 100  $\mu$ L、超純水で 50 mmol/L に調製した NaCNBH<sub>3</sub> ( $\geq 95\%$ ; Sigma) を 50  $\mu$ L、酢酸を 20  $\mu$ L の順に加え、70°Cの恒温振とう器にて 600 rpm、70 分間反応させた。反応後、溶液を氷冷し、300  $\mu$ L の超純水と 300  $\mu$ L のジクロロメタン：ヘキサン (2:1, v/v) を加えよく攪拌した後、10,000 rpm、5 分間遠心分離して、上清 450  $\mu$ L を新しいマイクロチューブに移した。60 分間遠心エバポレータにて残存有機溶媒を揮発させた後、- 80°Cで 2 時間凍結し、凍結乾燥機 (PDU-1200) にて一晚凍結乾燥した。凍結乾燥後の 1.5 mL マイクロチューブに、メタノール：水：酢酸溶液 (175: 375: 20, v/v/v) を 60  $\mu$ L 加えよく溶解させたのち、さらに超純水を 340  $\mu$ L 加え、残滓が分散するまでソニケーター (AU-180C) で処理をした後、6,000 rpm、5 分間遠心分離して回収した上清を Millex シリンジフィルターユニット (0.2  $\mu$ m; Merck Millipore) にて濾過し、得られた濾液を LC-MS 用バイアル瓶に移して分析用サンプルとした。また、糖、糖リン酸の定性のための標準物質として、D-グルコース-6-リン酸一ナトリウム塩 ( $\geq 98\%$ , Wako)、D-マンノース-6-リン酸ナトリウム塩 ( $\geq 98\%$ , Sigma)、D-リボース-5-リン酸二ナトリウム塩水和物 ( $\geq 98\%$ , Sigma)、D-エリトース-4-リン酸塩ナトリウム塩 (no less than 60%, Sigma)、DL-グリセルアルデヒド-3-リン酸溶液 (50 mg/mL in water, Sigma)、D-グルコース ( $\geq 98\%$ , Wako)、D-リボース ( $\geq 99\%$ , Wako)、L-フコース ( $\geq 99\%$ , Sigma)、D-グリセルアルデヒド ( $\geq 98\%$ , Funakoshi) をそれぞれ 20  $\mu$ g/mL と 2  $\mu$ g/mL になるように 75%メタノールで調製し、50  $\mu$ L を 1.5 mL マイクロチューブに分注した。さらに、75%メタノールで 10  $\mu$ g/mL に調製した U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-D-グルコース ( $\geq 99\%$ ; Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を 50  $\mu$ L 加えた。以降の操作は、培養細胞サンプルと同様に前処理および誘導体化を行った。

LC-MS/MSによる分析にはHPLCはProminence (SHIMADZU Co.)を使用し、MSは質量分離部に四重極型 (Quadrupole) と飛行時間型 (Time of flight) のタンデム型であるQ-ToF Premier (Waters Co., Milford, MA, U.S.A.)を使用した。HPLC分析には逆相カラムであるPhenomenex Kinex core-shell pentafluorophenyl (PFP) column (2.1 × 150 mm, 2.6 μm; Phenomenex, Inc.)を使用した。その他の分析条件の詳細はTable 3-6 および Table 3-7 に示した。なお、AEC誘導体化された糖および糖リン酸の精密質量の算出はChemBioDraw Ultra 13.0 (PerkinElmer Inc., Massachusetts, U.S.A.)を用いて行い、グルコース-6-リン酸を一例とし、Fig. 3-2 に示した。質量数のキャリブレーションにはギ酸ナトリウム溶液 (90% 2-プロパノールに最終濃度 0.5%のギ酸と最終濃度 5 mmol/L のNaOH)を使用し、さらに分析の間中、適切なキャリブレーションをかけ、精密質量データを得るために500 pg/μLのロイシンエンケファリン (≥95%, Sigma)をロックマスに用いた。得られたデータは、Table 3-7 に示した条件をもとに分析サンプルに含まれる糖、糖リン酸を同定した。MarkerLynx (Waters Co.)を用いてそれぞれの代謝産物についてI.S.であるU-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-D-グルコース (≥99%; Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)に対する相対面積値を算出し、Control群を1とした時のTNF-α群とDexa群の相対値を算出した。

#### 統計解析

全ての結果はMean ± SEMで表した。Control群、TNF-α群およびDexa群の3群間の培養細胞中代謝産物量に有意性があるかを評価するためにOne-way ANOVA、post hoc testとしてBonferroni's multiple comparisons testを行った。2群間での有意性の評価のためにはPaired *t* testを行った。全ての検定はGraphPad Prism analysis software 6.05

(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, U.S.A)を用いて統計解析を行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。なお、LC-MS/MSにより分析した9種類の糖および糖リン酸は得られた培養細胞数の関係から同一条件下における反復数が2つとなったため、統計処理は行わなかった。

また、犬筋管様細胞を分析し得られた代謝産物情報を活用し、SIMCA 13.0.3 (Umetrics AB, Umeå, Sweden)を用いた多変量解析により、デキサメサゾンとTNF-αのそれぞれの添加が培養細胞中の代謝産物に及ぼす影響を調べるために主成分分析 (principal component analysis: PCA)、部分最小二乗法判別分析 (Partial Least Square-

Discriminant Analysis: PLS-DA)、直交部分最小二乗法判別分析 (Orthogonal PLS-DA: OPLS-DA) を行った。

#### KEGG データベースを利用したパスウェイマッピング

KEGG データベース (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) から取得した各代謝産物の KEGG ID を用いて KEGG データベースに収録されている Metabolic pathways 上にデータのマッピングを行った。

#### 結果

##### 培養細胞中のアミノ酸の分析

20 種類のアミノ酸中、8 種類のアミノ酸 (バリン、 $\beta$ -アミノイソ酪酸、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、プロリン、アスパラギン、メチオニン) において Control 群、TNF- $\alpha$  群および Dexa 群の 3 群間で有意な差が認められた (Table 3-8)。バリンは Control 群で  $1.00 \pm 0.11$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $0.92 \pm 0.03$  と減少傾向が見られ、Dexa 群で  $0.68 \pm 0.02$  と有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。 $\beta$ -アミノイソ酪酸は Control 群で  $1.00 \pm 0.02$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $2.25 \pm 0.13$  と有意に高値を示し ( $P < 0.0001$ )、Dexa 群で  $1.04 \pm 0.05$  と変化は見られなかった。また、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間において TNF- $\alpha$  群で有意に高値であった ( $P < 0.0001$ )。ロイシンは Control 群で  $1.00 \pm 0.09$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $0.90 \pm 0.05$  と減少傾向が見られ、Dexa 群で  $0.71 \pm 0.03$  と有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。イソロイシンは Control 群で  $1.00 \pm 0.10$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $0.87 \pm 0.04$  と減少傾向が見られ、Dexa 群で  $0.69 \pm 0.03$  と有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。スレオニンは Control 群で  $1.00 \pm 0.06$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $0.83 \pm 0.03$ 、Dexa 群で  $0.78 \pm 0.05$  であり、ともに低下傾向を示したが有意な差ではなかった。プロリンは Control 群で  $1.00 \pm 0.04$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $0.71 \pm 0.01$  と有意に低値を示し ( $P < 0.001$ )、Dexa 群で  $1.07 \pm 0.00$  と変化は見られなかった。また、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間において TNF- $\alpha$  群で有意に低値であった ( $P < 0.001$ )。アスパラギンは Control 群で  $1.00 \pm 0.05$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $0.94 \pm 0.03$  と減少傾向が見られ、Dexa 群で  $0.81 \pm 0.03$  と有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。メチオニンは Control 群で  $1.00 \pm 0.05$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $1.09 \pm 0.06$  と増加傾向を示し、Dexa 群で  $0.85 \pm 0.01$  と減少傾向を示したもののともに有意な差ではなかったが、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間においては Dexa 群で有意に低値であった ( $P < 0.05$ )。



#### 培養細胞中の脂肪酸の分析

14 種類の脂肪酸中、7 種類の脂肪酸（ミリスチン酸、パルミトレイン酸、パルミチン酸、マルガリ酸、オレイン酸、*cis*-バクセン酸、ステアリン酸）において Control 群、TNF- $\alpha$  添加群および Dexamethasone (Dexa) 添加群の 3 群間で有意な差が認められた (Table 3-9)。ミリスチン酸は Control 群で  $1.00 \pm 0.05$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $1.08 \pm 0.04$  と変化は見られなかった一方で、Dexa 群で  $0.68 \pm 0.02$  と有意に低値を示し ( $P < 0.05$ ) また、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間において Dexa 群で有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。パルミトレイン酸は Control 群で  $1.00 \pm 0.05$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $1.09 \pm 0.02$  と変化は見られなかった一方で、Dexa 群で  $0.76 \pm 0.04$  と有意に低値を示し ( $P < 0.05$ ) また、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間において Dexa 群で有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。パルミチン酸は Control 群で  $1.00 \pm 0.01$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $1.11 \pm 0.04$  と増加傾向を示し、Dexa 群で  $0.87 \pm 0.07$  と減少傾向を示したもののともに有意な差ではなかったが、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間においては Dexa 群で有意に低値であった ( $P < 0.05$ )。マルガリ酸は Control 群で  $1.00 \pm 0.01$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $1.16 \pm 0.08$  と増加傾向を示し、Dexa 群で  $0.84 \pm 0.05$  と減少傾向を示したもののともに有意な差ではなかったが、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間においては Dexa 群で有意に低値であった ( $P < 0.05$ )。オレイン酸は Control 群で  $1.00 \pm 0.00$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $1.09 \pm 0.04$  と変化は見られず、Dexa 群では  $0.86 \pm 0.06$  と減少傾向を示したもののともに有意な差ではなかったが、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間において Dexa 群で有意に低値であった ( $P < 0.05$ )。*cis*-バクセン酸は Control 群で  $1.00 \pm 0.01$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $1.14 \pm 0.04$  と増加傾向を示し、Dexa 群で  $0.90 \pm 0.06$  と減少傾向を示したもののともに有意な差ではなかったが、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間においては Dexa 群で有意に低値であった ( $P < 0.05$ )。ステアリン酸は Control 群で  $1.00 \pm 0.00$  に対して、TNF- $\alpha$  群で  $1.17 \pm 0.05$  と増加傾向を示し、Dexa 群で  $0.89 \pm 0.07$  と減少傾向を示したもののともに有意な差ではなかったが、TNF- $\alpha$  群と Dexa 群間においては Dexa 群で有意に低値であった ( $P < 0.05$ )。

#### 解糖系、TCA サイクル中間体の分析

解糖系、TCA サイクル中間体は GC-MS により分析したところ Table 3-10 に示す結果が得られた。GC-MS では解糖系／糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物の

標準物質 11 種類を分析に供したが、イソクエン酸とクエン酸についてはクロマトグラム、マススペクトルのどちらによっても分離することが出来なかったため、サンプルの分析ではイソクエン酸とクエン酸の合計値とした。11 種類の代謝産物において Control 群、TNF- $\alpha$  群および Dexa 群の 3 群間で有意な差は認められなかった。

#### 培養細胞中の糖、糖リン酸物質の分析

まず、2  $\mu\text{g/mL}$  および 20  $\mu\text{g/mL}$  のグルコース-6-リン酸 (G6P) 標準液を分析したときのトータルイオンクロマトグラムおよび  $m/z$  455.16 のマスキロマトグラム (MC) の結果を Fig. 3-3 に示した。 $m/z$  455.16 の MC を描写することで Retention time 3.62 分付近にシングルピークを認め、かつ得られたピーク強度は G6P 標準液の濃度に依存していることが明らかとなった。次に、 $m/z$  455.16 が AEC 誘導体化された G6P に由来するものか否かを確認するために、G6P 標準液を直接 Q-ToF Premier (Waters Co.) に導入し、異なるコリジョンエネルギーを与えた時に得られたマススペクトルを Fig. 3-4 に示した。コリジョンエネルギーが 25 eV の時は、 $m/z$  223.13 と 210.12 が強く検出され、35 eV の時は  $m/z$  195.10 が新たに検出された。さらに 50 eV の時には、 $m/z$  223.12 と 210.12 の強度は弱くなり、 $m/z$  195.10 が最も強く検出された。以上のことから、G6P のフラグメンテーションは Fig. 3-5 であることが推測され、これは Han らの報告(Han et al., 2013) と一致することから、本研究に用いた質量分析計においても AEC 誘導体化された糖リン酸の分析が可能であることが分かった。その他の糖、糖リン酸においても同様にして、分析が可能であり、グルコース-6-リン酸、マンノース-6-リン酸、リボース-5-リン酸、エリトロース-4-リン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、グルコース、リボース、フコース、グリセルアルデヒドの 9 種類について分析した結果を Table 3-11 に示した。 $n$  数が 2 ずつの分析となったため統計処理は行わなかったが、Control 群の代謝産物量を 1 としたところ、Dexa 群においてグルコース-6-リン酸は  $3.01 \pm 0.25$ 、マンノース-6-リン酸は  $3.37 \pm 1.48$ 、リボース-5-リン酸は  $3.65 \pm 0.08$ 、エリトロース-4-リン酸は  $2.00 \pm 0.43$ 、グリセルアルデヒド-3-リン酸は  $2.45 \pm 0.64$ 、グルコースは  $2.68 \pm 0.14$ 、リボースは  $4.35 \pm 1.20$ 、フコースは  $2.13 \pm 0.15$  となりデキサメサゾンの添加により増加する傾向が見られた。

#### TNF- $\alpha$ 、Dexa の添加による細胞中代謝産物の多変量解析

犬筋管様細胞の分析により得られた、サンプル数 9 (Control 群  $n = 3$ 、TNF- $\alpha$  群  $n = 3$ 、Dexa 群  $n = 3$ ) と変数 54 種 (アミノ酸 20 種、脂肪酸 14 種、解糖系/糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物 20 種) からなるデータセットを用いて多変量解析を行った。まず、PCA により得られた第 1 主成分 (横軸) と第 2 主成分 (縦軸) に基づく、スコアプロットの結果を Fig. 3-6 に示した。その結果、Control 群、TNF- $\alpha$  群、Dexa 群の 3 群を 3 つの区分に分類できた。次に、同じデータセットを用いて PLS-DA を行いグループ間での分離を最大にした上で、各群における代謝産物の変動の傾向を確認した。3 群は Fig. 3-7A に示したように良好に分類され、その時のローディングプロットの結果を Fig. 3-7B に示した。PLS-DA による第 1 主成分の寄与率は 38.1% であり、第 2 主成分の寄与率は 20.6% であった。第 1 主成分に寄与した上位 10 種の代謝産物はリボース-5-リン酸、パルミトレイン酸、フコース、ミリスチン酸、グルコース-6-リン酸、メチオニン、オレイン酸、リボース、グルコース、マルガリ酸であり、第 2 主成分に寄与した上位 10 種の代謝産物は  $\beta$ -アミノイソ酪酸、アスパラギン酸、グリシン、プロリン、スレオニン、ピルビン酸、ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸、ホスホエノールピルビン酸、アラニン、リシンであった。

さらに、インスリン抵抗性誘導のために添加した TNF- $\alpha$  とデキサメサゾンのそれぞれが培養細胞中の代謝産物に及ぼす影響を明らかにするために、TNF- $\alpha$  群、Dexa 群それぞれを Control 群との 2 群比較を行った。

サンプル数 6 (Control 群  $n = 3$ 、TNF- $\alpha$  群  $n = 3$ ) と変数 54 種 (アミノ酸 20 種、脂肪酸 14 種、解糖系/糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物 20 種) からなるデータセットを用いた OPLS-DA スコアプロットの結果を Fig. 3-8A に示した。TNF- $\alpha$  群と Control 群は 2 群に分離され、この時の s-plot を Fig. 3-8B に示した。序論で述べたように s-plot 解析による解釈は Paired  $t$  test の有意水準のような基準はなく、違いを抽出する際の基準は研究者によって異なっており (Laiakis et al., 2010; Varghese et al., 2010; Yokoi et al., 2015)、ここでは TNF- $\alpha$  を添加した時に生じる変化をより明確に抽出することを目的に、分離の寄与率の絶対値 0.15 以上を基準として 2 群を分類するのに寄与した代謝産物を抽出した。この基準を満たしたものは、 $\beta$ -アミノイソ酪酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、リシン、フコース、リボース、グルコース、イソクエン酸/クエン酸、グルコース-6-リン酸、リボース-5-リン酸、マンノース-6-リン酸、ステアリン酸、アスパラギン酸、グリシン、ホスホエノールピルビン酸およびプロリンの 15 種類であ

った。このうち LC-MS/MS で分析した  $n$  数が 2 である糖と糖リン酸を除く、8 種類について Paired  $t$  test により 2 群間での差の検定を行った (Fig. 3-9)。その結果、TNF- $\alpha$  群で  $\beta$ -アミノイソ酪酸が 2.25 倍 ( $P < 0.01$ ) 有意に高値を示した一方で、アスパラギン酸は 0.82 倍 ( $P < 0.05$ )、プロリンは 0.71 倍 ( $P < 0.05$ ) 有意に低値を示すことが分かった。

次いで、サンプル数 6 (Control 群  $n = 3$ 、Dexa 群  $n = 3$ ) と変数 54 種 (アミノ酸 20 種、脂肪酸 14 種、解糖系/糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物 20 種) からなるデータセットを用いた OPLS-DA スコアプロットの結果を Fig. 3-10A に示した。Dexa 群と Control 群は 2 群に分離され、この時の s-plot を Fig. 3-10B に示した。上述の Control 群と TNF- $\alpha$  群の比較と同様に、分離の寄与率の絶対値 0.15 以上を基準として 2 群に分類するのに寄与した代謝産物を抽出した。この基準を満たしたものは、マンノース-6-リン酸、リボース-5-リン酸、グルコース-6-リン酸、リボース、グルコース、フコース、2-オキソグルタル酸、アスパラギン、アラニン、ミリスチン酸、スレオニン、ピルビン酸、*cis*-アコニット酸、パルミトレイン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、アロイソロイシン、イソロイシン、バリンの 20 種類であった。このうち LC-MS/MS で分析した  $n$  数が 2 である糖と糖リン酸を除く、14 種類について Paired  $t$  test により 2 群間での差の検定を行った (Fig. 3-11)。その結果、Dexa 群でロイシンは 0.71 倍 ( $P < 0.05$ )、パルミトレイン酸は 0.76 倍 ( $P < 0.01$ )、フェニルアラニンは 0.74 倍 ( $P < 0.05$ )、*cis*-アコニット酸は 0.71 倍 ( $P < 0.05$ )、ミリスチン酸は 0.79 倍 ( $P < 0.01$ )、アラニンは 0.78 倍 ( $P < 0.05$ ) 有意に低値を示すことが分かった。

#### KEGG データベースを利用したパスウェイマッピング

本実験で分析対象とした 54 種の代謝産物のうち 7 種の脂肪酸を除く、47 種類が KEGG データベースに収録されている Metabolic pathways にマッピングされた (Fig. 3-12)。パスウェイマップが広域であるため Fig. 3-12 に示した A、B、C の 3 つの領域について拡大し、実験データのマッピングを行った (Fig. 3-12A、B、C)。Fig. 3-12A に示すように解糖系/糖新生経路の上流代謝産物が Dexa 群で増加している傾向が見られた一方、TCA サイクル中間体は減少している傾向が見られた。Fig. 3-12B には主にアミノ酸代謝を、Fig. 3-12C には分析された一部の脂肪酸を示したが、本実験データのみではマッピングされない代謝産物が多く全容の把握には至らなかった。

## 考察

本章では犬の正常細胞として、犬筋管様細胞を使用しデキサメサゾンあるいは TNF- $\alpha$  が細胞に及ぼす影響を代謝産物レベルで検討した。PLS-DA スコアプロットの結果から第 1 主成分（横軸）は添加したインスリン抵抗性惹起物質の違い、第 2 主成分（縦軸）はインスリン抵抗性惹起物質添加の有無であると考えられた。まず、インスリン抵抗性惹起物質による細胞内代謝産物の変動について考えると、インスリン抵抗性惹起物質を培地中に加えることで  $\beta$ -アミノイソ酪酸、ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸、リシンが増加し、アスパラギン酸、グリシン、プロリン、スレオニン、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸、アラニンが減少するという特徴が見られた。デキサメサゾン、TNF- $\alpha$  のどちらも細胞に対してインスリン依存性グルコース取り込みを抑制する作用を有しており、これらの代謝産物の増減は細胞におけるインスリン抵抗性発現の指標となる可能性が考えられた。次に、デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  のそれぞれが細胞に及ぼす影響を明確にするために Control 群と TNF- $\alpha$  群、Control 群と Dexa 群の 2 つに分けて OPLS-DA を行った。

TNF- $\alpha$  の添加により、 $\beta$ -アミノイソ酪酸の顕著な増加が認められた。 $\beta$ -アミノイソ酪酸は、近年注目され始めている骨格筋から分泌される生理活性物質マイオカインの一つである (Pedersen et al., 2007)。 $\beta$ -アミノイソ酪酸は、マウスにおいて骨格筋中の proliferator- activated receptor- gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) の増加に伴い血液中に増加することが知られている (Roberts et al., 2014)。ヒトやマウスにおいて持続的な運動によって骨格筋中で PGC-1 $\alpha$  の遺伝子発現量が増加し、また骨格筋特異的に PGC-1 $\alpha$  を過剰発現させたマウスではミトコンドリア量や GLUT-4 量が増加しインスリン感受性が增强される (Finck and Kelly, 2006; Roberts et al., 2014)。また、 $\beta$ -アミノイソ酪酸は、白色脂肪細胞に作用して  $\beta$  酸化を促進させる遺伝子 (UCP-1, PPAR- $\delta$ ) の発現を亢進させ白色脂肪細胞を褐色化することが報告されている (Roberts et al., 2014)。また、マウス C2C12 筋管細胞の IRS-1、Akt2 のリン酸化を抑制し糖取り込み量を低下させた条件下で、培地に添加した  $\beta$ -アミノイソ酪酸の濃度に依存して糖取り込み量が回復したことも報告されている (Jung et al., 2015)。本研究では TNF- $\alpha$  を培地中に加えたことで犬筋管様細胞内の  $\beta$ -アミノイソ酪酸の増加が認められた。前述したように、細胞外性  $\beta$ -アミノイソ酪酸の増加は糖代謝の改善に関わっていると考えられる。すなわち、本研究

で見られた TNF- $\alpha$  添加による細胞内性  $\beta$ -アミノイソ酪酸の増加は、犬が肥満しても耐糖能異常を引き起こしにくい要因の一つとなると考えられる。

デキサメサゾンを追加すると、多くのアミノ酸と脂肪酸の減少が観察された。また、統計処理は行っていないものの糖新生経路上流の代謝産物であるグルコース-6-リン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸の増加傾向が見られた。犬末梢血単核球におけるデキサメサゾンの影響を検討した研究では、グルコースの異化作用が減少し(Nozawa et al., 2015)、骨格筋細胞を用いた本研究においても同様の傾向が示された。ヒトの 2 型糖尿病患者と健常者の筋組織とリンパ球をもちいたトランスクリプトーム、プロテオーム研究では、筋組織での変化とリンパ球での変化はパラレルであったと報告されており(Giesbertz et al., 2015)、第 2 章および本章の結果から犬においても少なくともデキサメサゾンの糖代謝に及ぼす影響は末梢血白血球と骨格筋細胞とで共通である可能性が示された。また、KEGG データベースパスウェイへのマッピング結果からも、第 2 章および本章ともに糖新生経路上流の代謝産物の増加という共通の結果が見られた。

また、デキサメサゾンの添加により細胞内バリン、イソロイシンの有意な減少を認めた。デキサメサゾンは筋細胞において、kruppel-like factor 15 (KLF15) -branched chain aminotransferase 2 (BCAT2) を介して分岐鎖アミノ酸 (BCAA; ロイシン、イソロイシンおよびバリン) の分解を促進することがラット L6 細胞やマウス C2C12 細胞を用いた研究により証明されている(Shimizu et al., 2011)。BCAA は骨格筋におけるアミノ酸トランスポーターである system A amino acid transporter によって細胞内へ取り込まれる。この system A amino acid transporter はデキサメサゾンにより抑制される PI3-K-Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) - p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) を介する経路である(Kuo et al., 2013; Peyrollier et al., 2000)。すなわち、細胞培養液中へのデキサメサゾンの添加により KLF15-BCAT2 による細胞内 BCAA の分解促進、と PI3-K-Akt-mTOR-p70S6K の抑制による細胞内への BCAA 輸送の減少の 2 つの作用で細胞内 BCAA 濃度が低下すると考えられる。さらに、Shimizu ら (2011) は PI3-K-Akt-mTOR によるタンパク質翻訳系は BCAA により促進されることも報告しており(Shimizu et al., 2011)、細胞内 BCAA 量の低下はタンパク質翻訳系も抑制されることから、筋の萎縮が起こることが知られている(Kuo et al., 2013)。骨格筋は生体において最大の糖取り込み器官であることから、デキサメサゾンにより生じる筋萎縮は糖取り込み量の減少に繋がり、HAC において高血糖を引き起こす要因の一つとなると考えられる。

本研究は、細胞内代謝産物の変動に焦点を当てており培地中成分の変動や、遺伝子発現量についての検討は行っていない。今回の結果からデキサメサゾンあるいは TNF- $\alpha$  により変動が示された代謝経路にかかわる酵素活性、タンパク質および遺伝子発現量についてさらに詳細に検討し、犬の骨格筋における代謝変動について明らかにする必要がある。また、今回はインスリン抵抗性物質としてデキサメサゾンと TNF- $\alpha$  を使用したが、特に肥満により変動するサイトカインは一種類に限定されとは限らないため複数のサイトカインをあわせて用いることでより生体における変化を反映させた *in vitro* 実験も必要であると考えられる。

## 第2節 デキサメサゾン、TNF- $\alpha$ が犬骨格筋培養細胞の糖取り込み量およびインスリンシグナリング遺伝子に及ぼす影響の解析

### 材料および方法

#### LC-MS/MS による糖取り込み能の評価方法の確立と最適インスリン濃度の検討

犬筋管様細胞は第1節と同様にして得た。糖取り込み能の評価には2-デオキシグルコース (2-DG) を用い、第1節に示した糖リン酸誘導体化法により細胞に取り込まれ、ヘキソキナーゼにより変換されて生じる2-デオキシグルコース-6-リン酸 (2DG6P) の測定には LC-MS/MS を使用し、以下の方法で行った。

増殖培地で懸濁した CnSkMC の筋芽細胞を 6 ウェルプレート上に  $0.85 \times 10^5$  個/ウェルで播種し、第1節と同様の方法にて得られた筋管様細胞を使用した。まず、培地由来成分の影響を除くために無血清 DMEM にて  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の湿潤条件下で 6 時間培養した。次いで、培地を除去、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 Krebs ringer phosphate HEPES (KRPH; 1.2 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 1.3 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 118 mmol/L  $\text{NaCl}$ , 5 mmol/L  $\text{KCl}$ , 30 mmol/L Hepes, pH7.5) buffer で 2 回洗浄した。0.1% BSA 含有 KRPH buffer にて  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で 20 分間インキュベートした後、最終濃度で 0, 1, 10, 100, 1000 nmol/L インスリン (Insulin, Human, recombinant; Wako) を含む 0.1% BSA 含有 KRPH buffer に交換し、さらに  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で 40 分間インキュベートした。その後、2-DG (Wako) を 0 あるいは 1 mmol/L の最終濃度で添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で 20 分間インキュベートした。20 分後ただちに培養上清を除去し、残存 2-DG を除去するために、0.1% BSA 含有冷却 PBS で 1 回洗浄し、

I.S.として 80%冷却メタノールで調製した 3.6 nmol/mL の U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-D-グルコース (≥99%; Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を 750 μL 加えてクエンチング処理をした。セルスクレーパーで細胞を搔爬して細胞浮遊液を回収し、サンプルを氷冷しながら超音波発生機 (UD-200) にて細胞を破碎した後、450 μL のクロロホルムを加えた。以降の操作は第 1 節に示した培養細胞からの代謝産物抽出方法ならびに、糖リン酸の前処理と誘導体化および分析方法と同様にして行った。ただし、サンプル中の細胞数をタンパク質濃度で補正するために、-80°Cフリーザーに静置し 20 時間後の遠心分離により形成された 3 分画 (上から水層、タンパク質層、有機溶媒層) のうちタンパク質層は細胞由来タンパク質濃度測定に使用した。タンパク質層に 0.1 mol/L の水酸化ナトリウムを加え 37°Cで一晩処理した後、プロテインアッセイラピッドキットワコー (Wako) を用いたピロガロールレッド - モリブデン錯体発色法により、吸光度計にて測定した。

また、2DG6P の定量のために、第 2 章で使用した 2-デオキシグルコース代謝速度測定キットに含まれる 2DG6P 標準液を使用し、100 μmol/L から 6.25 μmol/L の異なる複数の濃度になるようにサンプルを調製し、第 1 節と同様の方法にて前処理および誘導体化を行った。LC-MS/MS による 2DG6P の分析は、第 1 節と同様にして行った。ただし、2DG6P の Calculated exact mass は  $m/z$  439.1629 であり、分析および解析条件は Retention time; 4.31 min、Scan time range; 3.81-4.81 min、Targeted mass;  $m/z$  439.16、Scan mass range;  $m/z$  414-464 とした。

#### インスリン抵抗性誘導を行った犬筋管様細胞における糖取り込み能の評価

犬骨格筋培養細胞を材料とし、筋管様細胞のインスリン抵抗性状態の誘導は第 1 節と同様にして行った。デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  のそれぞれによる 4 日間のインスリン抵抗性誘導の後、血清由来成分による影響を除くために無血清 DMEM にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の湿潤条件下にて 6 時間培養した。次いで、培地を除去、0.1% BSA 含有 KRPH buffer で 2 回洗浄し、0.1% BSA 含有 KRPH buffer にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 20 分間インキュベートした。その後、前項で検討した結果、適当であった 1 あるいは 10 nmol/L のインスリン (Wako) を含む 0.1% BSA 含有 KRPH buffer に交換し、さらに 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 40 分間インキュベートした。その後、2-デオキシ-D-グルコース (Wako) を 1 mmol/L の最終濃度で添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 20 分間インキュベ



ートした。以降、細胞からの代謝産物抽出、細胞由来タンパク質濃度測定および糖リン酸の誘導体化法は、前述の方法と同様にして行った。

### インスリン抵抗性誘導を行った犬筋管様細胞のインスリンシグナリング遺伝子発現量解析

増殖培地で懸濁した CnSkMC の筋芽細胞を 10 cm ディッシュに  $5.0 \times 10^5$  個で播種し、第 1 節と同様の方法にて得られた筋管様細胞を使用し、デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  のそれぞれによるインスリン抵抗性誘導についても第 1 節と同様の方法で行った。その後、培地由来成分の影響を除くために無血清 DMEM にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の湿潤条件下で 6 時間培養した。次いで、培地を除去、0.1% BSA 含有 DMEM で 2 回洗浄し、0.1% BSA 含有 DMEM にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 90 分間インキュベートした後、インスリンを最終濃度 1  $\mu\text{mol/L}$  で添加し、さらに 20 分間インキュベートした。その後、PBS で洗浄し、市販の RNA およびタンパク質抽出キットの NucleoSpin RNA/Protein (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) の Lysis Buffer RP1 を 700  $\mu\text{L}$  (1/100 量の  $\beta$ -メルカプトエタノールを添加) 培養ディッシュに添加して、得られた細胞溶解液を用いて、ユーザーマニュアルに従って total RNA の調製を行った[3]。抽出後の RNA 溶液を、微量検体用の分光光度計 BioSpec-nano (SHIMADZU Co.) を用いて濃度を測定し、OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> で示される純度が 1.8 以上であることを確認した。逆転写反応には QuantiTect Rev. Transcription Kit (QIAGEN Co., Hamburg, Germany) を用いた。gDNA Wipeout Buffer を 4  $\mu\text{L}$  使用し、テンプレート RNA と dH<sub>2</sub>O を加えて 28  $\mu\text{L}$  のゲノム DNA 除去反応液を作製し、42°C で 2 分間インキュベートし、その後直ちに氷上にて静置した。これとは別の 0.2 mL チューブに逆転写反応マスターミックスとして Quantiscript Reverse Transcriptase を 2  $\mu\text{L}$ 、Quantiscript RT Buffer を 8  $\mu\text{L}$ 、RT Primer Mix を 2  $\mu\text{L}$  のトータル 12  $\mu\text{L}$  で調製した。このマスターミックスに氷上で静置しておいたゲノム DNA 除去反応液を全量加え、42°C、15 分のインキュベートで逆転写反応を行い、cDNA を作製した。Quantiscript Reverse Transcriptase を不活性化するために 95°C、3 分のインキュベートを行い、作製した cDNA は定量まで -80°C にて保存した。定量 PCR は第 1 章と同様の方法で行い、インスリンシグナリング遺伝子である IRS-1、PI3-K、Akt2 の遺伝子発現量を定量した。

## 統計処理

全ての結果は Mean  $\pm$  SEM にて表した。インスリンの添加濃度により、犬筋管様細胞において 2DG6P の量に違いが生じるかを評価するため、また、デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  のそれぞれの添加により犬筋管様細胞において 2DG6P の量に違いが生じるかを評価するため、さらに、デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  のそれぞれの添加によりインスリンシグナリング遺伝子発現量に違いが生じるかを評価するために One-way ANOVA、post hoc test として Bonferroni's multiple comparisons test を行った。

## 結果

### LC-MS/MS による糖取り込み能の評価方法の確立と最適インスリン濃度の検討

まず、第 1 節と同様の糖リン酸を定性する方法にて 2DG6P が分析可能であることを確認した。100  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、25  $\mu\text{mol/L}$ 、12.5  $\mu\text{mol/L}$  および 6.25  $\mu\text{mol/L}$  で調製した 2DG6P 溶液を分析し、得られた  $m/z$  439.16 のマスクロマトグラムの結果を Fig. 3-13 に示した。それぞれのマスクロマトグラム面積値は 2094、1088、528、248、118 であり、明らかに 2DG6P 濃度に依存していた。さらに、Fig. 3-13 に示すように、I.S.である U- $^{13}\text{C}_6$ -D-グルコースのクロマトグラム面積値で補正した相対面積値と 2DG6P 濃度の関係は正の相関にあり、かつその時の相関係数 ( $r$ ) は 0.9996 と良好であり、精度の高い分析方法を確立できた。

異なる濃度のインスリンを添加した時の犬筋管様細胞における 2-DG 取り込みにより生じる 2DG6P を測定した結果を Fig. 3-14 に示した。値は最終濃度 1 nmol/L のインスリン添加した時の 2DG6P 相対面積値を 1 とした時の相対値を算出した。2-DG 非添加群では 2DG6P は検出されなかった。2-DG 添加、インスリン非添加群では 3 サンプル中 1 サンプルでのみ検出され、その時の  $m/z$  439.16 のマスクロマトグラム面積値は 4 とわずかであった。添加インスリン濃度 1 nmol/L に対して、インスリン濃度 10 nmol/L では  $1.00 \pm 0.10$  倍と変化がなく、インスリン濃度 100 nmol/L では  $1.10 \pm 0.04$  倍、インスリン濃度 1,000 nmol/L では  $1.25 \pm 0.01$  倍と増加する傾向が見られたが添加濃度による有意な変化は認められなかった。予備実験としてデキサメサゾンを添加後最終濃度 1,000 nmol/L のインスリンを添加し、2-DG 取り込みを行ったところデキサメサゾンによる 2-DG 取り込み量に変化が現れなかった。このため、2-DG 取り込み

を認めたインスリン最終濃度 1 nmol/L と 10 nmol/L の低濃度側の 2 種類を次項の取り込み能の評価に用いた。

#### インスリン抵抗性誘導を行った犬筋管様細胞における糖取り込み能の評価

デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  のそれぞれによりインスリン抵抗性誘導を行った時の犬筋管様細胞における糖の取り込み能を評価するために 2DG6P を測定した (Fig. 3-15)。値は最終濃度 1 nmol/L のインスリン添加した時の 2DG6P 相対面積値を 1 とした時の相対値を算出した。コントロールでは添加インスリン濃度 1 nmol/L に対して、インスリン濃度 10 nmol/L では  $1.16 \pm 0.09$  倍と若干の増加傾向が見られたが、有意な変動ではなかった。TNF- $\alpha$  によるインスリン抵抗性誘導時の 2DG6P 相対値は、インスリン 1 nmol/L 群では  $1.14 \pm 0.05$ 、インスリン 10 nmol/L 群では  $1.07 \pm 0.14$  であり、TNF- $\alpha$  による 2DG6P 量に変化は見られなかった。一方、Dexa によるインスリン抵抗性誘導時の 2DG6P 相対値は、インスリン 1 nmol/L 群では  $0.84 \pm 0.08$ 、インスリン 10 nmol/L 群では  $0.81 \pm 0.03$  であり、コントロール群と比較するとデキサメサゾン添加群では 2DG6P 量は約 20% 低下した。

#### インスリン抵抗性誘導を行った犬筋管様細胞のインスリンシグナリング遺伝子発現量解析

デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  のそれぞれによるインスリン抵抗性誘導を行った時の犬筋管様細胞におけるインスリンシグナリング遺伝子である IRS-1, PI3-K, Akt2 の発現量の変動を調べたところ、Fig. 3-16 に示す結果が得られた。インスリン非添加群を 1 として相対比で見た場合、IRS-1 の遺伝子発現量はインスリン添加群で  $1.37 \pm 0.52$  と増加傾向が見られた一方で、TNF- $\alpha$  添加インスリン添加群で  $0.45 \pm 0.21$ 、デキサメサゾン添加インスリン添加群で  $0.45 \pm 0.15$  とそれぞれ減少傾向が見られた。PI3-K の遺伝子発現量はインスリン非添加群で  $1.00 \pm 0.05$  であったのに対して、インスリン添加群で  $1.15 \pm 0.09$  と若干の増加傾向が見られた一方で、TNF- $\alpha$  添加インスリン添加群で  $0.90 \pm 0.06$  と若干の減少傾向が見られた。また、デキサメサゾン添加インスリン添加群では  $1.46 \pm 0.14$  と有意に増加した ( $P < 0.05$ )。さらに、デキサメサゾン添加インスリン添加群は TNF- $\alpha$  添加インスリン添加群と比較し 1.6 倍有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。Akt2 の遺伝子発現量はインスリン非添加群で  $1.00 \pm 0.09$  であったのに対し

て、インスリン添加群で  $1.01 \pm 0.22$ 、TNF- $\alpha$  添加インスリン添加群で  $1.02 \pm 0.03$ 、デキサメサゾン添加インスリン添加群で  $1.02 \pm 0.03$  でありインスリンの添加、TNF- $\alpha$  あるいはデキサメサゾンによるインスリン抵抗性誘導による Akt2 発現量に違いは見られなかった。

## 考察

糖代謝研究では実際に細胞の糖取り込み量を測定することは重要な評価指標である。しかし、一般的には放射性ラベルされたグルコースを用いる方法により測定されており、放射性同位体を使用するため管理区域での作業が必要となり限られた施設でしか実施できない。近年、非放射性物質である 2-デオキシグルコースを用いた方法が報告され(Saito et al., 2011)、多くの研究者に利用されている。第 2 章では市販されているキットを用いて 2DG6P による酵素サイクリング法にて培養犬末梢血単核球における糖取り込み量の測定を行ったが、本章では LC-MS/MS を用いた 2DG6P の直接検出を試みた。その結果、測定のダイナミックレンジは 0-100  $\mu\text{mol/L}$  と広範囲であり、かつ細胞抽出液サンプルを希釈することなく測定することが出来た。この方法を用いて CnSkMC の筋管様細胞における 2-DG 取り込みにより生じる 2DG6P を測定したところ、インスリンの添加により筋管様細胞中の 2DG6P は明らかに増加し、添加するインスリン濃度に依存して若干の 2DG6P の増加があった。

インスリンを最終濃度 1、10 nmol/L とし、最終濃度 2 ng/mL の TNF- $\alpha$  によるインスリン抵抗性誘導を行ったところ、TNF- $\alpha$  による 2-DG 取り込み量に変化は認められなかった。Yoon ら (2011) はラットの L6 筋管細胞を用いた実験で、2 ng/mL の TNF- $\alpha$  により細胞膜上の GLUT-4 発現量が有意に減少し、リン酸化 IRS-1 およびリン酸化 Akt 量が減少したと報告している(Yoon et al., 2011)。本研究で、最終濃度 1  $\mu\text{mol/L}$  のデキサメサゾンによるインスリン抵抗性誘導を行ったところ、インスリンの最終濃度 1、10 nmol/L の時の犬筋管様細胞の糖取り込みは、有意ではないが約 20%の減少が見られた。マウス C2C12 筋管細胞を用いた研究では、1  $\mu\text{mol/L}$  のデキサメサゾンの添加により細胞膜上の GLUT-4 が明らかに増加したにも関わらず、グルコース取り込み量はデキサメサゾン非添加群と変化がなかったことが報告されている(Tortorella and Pilch, 2002)。このようにげっ歯類の L6 細胞、C2C12 細胞では 2 ng/mL の TNF- $\alpha$  あるいは 1  $\mu\text{mol/L}$  のデキサメサゾンは細胞の糖取り込みを抑制することが報告されてい

るが、本研究で用いた犬筋管様細胞では、同じ濃度で添加したにも関わらず TNF- $\alpha$  では 2-DG 取り込み量に変化は認められなかった。犬においても血中の TNF- $\alpha$  は肥満で増加するが(Gayet et al., 2004)、TNF- $\alpha$  の添加により 2-DG 取り込み量に変化が認められなかった本研究の結果は、犬ではげっ歯類に較べて糖取り込み抑制が起こりにくいことを示し、糖尿病発症に至らない要因の一つであるかもしれない。

2-DG 取り込み量測定と同一の条件下でインスリンシグナリング遺伝子として IRS-1、PI3-K、Akt2 の遺伝子発現量を測定したところ、IRS-1 はコントロールと比較して TNF- $\alpha$  添加、デキサメサゾン添加の双方で有意ではないものの発現量の低下が見られた。PI3-K はデキサメサゾンの添加で、コントロールおよび TNF- $\alpha$  添加と比較して有意に発現量の増加が認められた。デキサメサゾンの添加により 2-DG 取り込み量の減少傾向が見られていることから PI3-K 遺伝子発現量の増加は糖取り込み量の減少に代償的に働くと考えられる。一方、HAC 症例犬の末梢血好中球では PI3-K の遺伝子発現量は健常犬と比較して有意に減少している(Nozawa et al., 2014)ことから、この代償機構が働かず HAC において高血糖を引き起こす要因の一つと考えられる。短期的なグルココルチコイドの影響は PI3-K 遺伝子の発現量を増加させ、インスリンシグナリング抑制に対して代償的に働くが、慢性的なグルココルチコイドの過剰ではこの代償機構が働かなくなると考えられた。

#### 小括

犬骨格筋細胞の分化誘導により得られた筋管様細胞を用いてデキサメサゾンと TNF- $\alpha$  が細胞内代謝産物、糖取り込み能およびインスリンシグナリング遺伝子発現量に及ぼす影響を検討した。1  $\mu\text{mol/L}$  のデキサメサゾン含有 DMEM と 2 ng/mL の TNF- $\alpha$  含有 DMEM をそれぞれ 4 日間 37°C、5% CO<sub>2</sub> の湿潤条件下にて培養し、培養中は 24 時間毎に新鮮なデキサメサゾン含有培地あるいは TNF- $\alpha$  含有培地に交換することで細胞におけるインスリン抵抗性誘導を行った。代謝産物の測定には、GC-MS、LC-MS/MS を使用し、20 種のアミノ酸と 14 種の脂肪酸、20 種の解糖系／糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物を測定した。糖取り込み能の評価は取り込まれた 2-DG が細胞内へキソキナーゼにより変換され生じる 2DG6P 量を LC-MS/MS にて測定し、インスリンシグナリング遺伝子である IRS-1、PI3-K、Akt2 の発現量は定量 PCR 法にて測定した。

デキサメサゾンの添加では多くの代謝産物の減少が観察され、糖の取り込み能は減少傾向を示した。糖の取り込み能が減少し、かつ細胞内代謝産物量が減少するということは、細胞におけるグルコースの異化作用が減少していることを示唆する。また、特に分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の減少は著しく、これはグルココルチコイドによる細胞内 BCAA の分解促進と、細胞内への BCAA 輸送の減少の 2 つの作用により細胞内 BCAA の低下が生じたと考えられた。細胞内 BCAA 量の低下はタンパク質翻訳系も抑制することから、細胞内の代謝産物は減少し、筋の萎縮が起こることが知られている。骨格筋は生体において最大の糖取り込み器官であることから、デキサメサゾンにより生じる筋萎縮は糖取り込み量の減少に繋がり、HAC において高血糖を引き起こす要因の一つとなると考えられる。

TNF- $\alpha$  の添加では、細胞中の  $\beta$ -アミノイソ酪酸の顕著な増加を認め、IRS-1 遺伝子発現量に減少傾向は見られたものの、糖の取り込み能に変化は認められなかった。 $\beta$ -アミノイソ酪酸は、ヒトやマウスにおいて持続的な運動によって骨格筋中での PGC-1 $\alpha$  の増加に伴い、血液中で増加し、ミトコンドリア量や GLUT-4 量を増加させインスリン感受性を増強させる。また、げっ歯類の筋管細胞の培養液中に  $\beta$ -アミノイソ酪酸を添加することで糖取り込み等の糖代謝異常が改善することが知られている。今回の TNF- $\alpha$  添加による細胞内性  $\beta$ -アミノイソ酪酸の増加は、犬が肥満しても糖代謝異常を引き起こしにくい要因の一つとなると考えられる。

本章では、犬骨格筋細胞を用いて異なるインスリン抵抗性惹起物質が細胞に及ぼす影響を明らかにした。培地中成分の変動や、代謝経路にかかわる酵素活性についてさらに詳細に検討は必要であるが、犬骨格筋培養細胞を対象としたメタボローム研究は犬特有の糖尿病発症機序を解明する有用な手段であると考えられる。

## 表および図

Table 3-1 GC-MS によるアミノ酸分析条件

[GC condition]	
Column	ZB-AAA (Phenomenex, Inc.) (10 m × 0.25 mm i.d.)
Inlet temperature	280°C
Column temperature program	110°C (0 min) → (15°C/min) → 320°C (0 min)
Carrier gas	helium/constant flow rate (15 kPa)
Injection volume	1 µL
Injected mode	Split ratio 1: 15
[MS conditon]	
Ion source temperature	200°C
Interface temperature	280°C
Ionization voltage	70 eV
Analytical mode	SCAN
<i>m/z</i> range	45- 450

Table 3-2 GC-MS による脂肪酸分析条件

[GC condition]	
Column	DB-5MS (Agilent Technologies, Inc.) (30 m × 0.25 mm i.d.; film thickness 0.25 µm)
Inlet temperature	280°C
Column temperature program	40°C (2 min) → (6°C/min) → 320°C (1 min)
Carrier gas	helium/constant flow rate (43.0 cm/sec)
Injection volume	1 µL
Injected mode	Splitless
[MS conditon]	
Ion source temperature	200°C
Interface temperature	280°C
Ionization voltage	70 eV
Analytical mode	SCAN, SIM
<i>m/z</i> range	35- 500



Table 3-3 脂肪酸解析条件

Targeted fatty acid	Retention time (min)	Quantified ion <sup>a</sup> ( <i>m/z</i> )	Confirmed ion <sup>b</sup> ( <i>m/z</i> )
laurate; 12:0	22.202	74.05	74.05
myristate; 14:0	26.104	74.05	199
palmitoleate; 16:1n-7	29.266	TIC <sup>c</sup>	236
palmitate; 16:0	29.613	TIC <sup>c</sup>	227
margarate; 17:0	31.264	TIC <sup>c</sup>	241
linoleate; 18:2n-6	32.325	TIC <sup>c</sup>	262
oleate; 18:1n-9	32.436	TIC <sup>c</sup>	264
<i>cis</i> -vaccenate; 18:1n-7	32.481	TIC <sup>c</sup>	264
stearate; 18:0	32.845	TIC <sup>c</sup>	255
arachidonate; 20:4n-6	34.765	TIC <sup>c</sup>	175
EPA; 20:5n-3	34.838	TIC <sup>c</sup>	175
DGLA; 20:3n-6	35.041	TIC <sup>c</sup>	222
Ethyl arachidate (I.S.)	36.718	TIC <sup>c</sup>	340.3
DHA; 22:6n-3	37.434	TIC <sup>c</sup>	159
DPA; 22:5n-3	37.622	TIC <sup>c</sup>	175

a; 各脂肪酸の定量に使用した *m/z*。

b; 各脂肪酸の特徴的なフラグメントイオンであり、定性のために使用した。

c; トータルイオンクロマトグラム。各時間軸で検出された全ての *m/z* の合算を指す。

EPA; エイコサペンタエン酸、DGLA; ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸、DHA; ドコサヘキサエン酸、DPA; ドコサペンタエン酸

Table 3-4 GC-MS による有機酸（解糖系および TCA サイクル中間体）の分析条件

[GC condition]	
Column	DB-5 (Agilent Technologies, Inc.) (30 m × 0.25 mm i.d.; film thickness 1.00 μm)
Inlet temperature	280°C
Column temperature program	100°C (4 min) → (4°C/min) → 320°C (0 min)
Carrier gas	helium/constant flow rate (39.0 cm/sec)
Injection volume	1 μL
Injected mode	Splitless
[MS condition]	
Ion source temperature	200°C
Interface temperature	280°C
Ionization voltage	70 eV
Analytical mode	SCAN, SIM
<i>m/z</i> range	35- 600

Table 3-5 解糖系および TCA サイクル中間体の解析条件

Targeted metabolite	Retention time (min)	Quantified ion <sup>a</sup> ( <i>m/z</i> )	Confirmed ion <sup>b</sup> ( <i>m/z</i> )
Pyruvic acid	9.745	174.1	73.0
Dihydroxyacetone-phosphate	12.990	133.1	73.0
Fumaric acid	19.970	245.1	73.0
Malic acid	24.840	233.1	73.0
Oxoglutaric acid	27.460	198.1	73.0
Phosphoenolpyruvic acid	28.365	369.0	299.1, 73.0
L-Phenylalanine ring-d5 (I.S.)	29.225	197.1	271.2
Oxaloacetic acid	31.810	304.0	214.0
<i>cis</i> -Anonic acid	32.415	229.1	375.1
Glycerol 3-phosphate	33.105	357.1	299.1
3-Phosphoglyceric acid	34.360	299.1	357.1
Isocitric acid /Citric acid	34.680	273.1	211.1

a; 各有機酸の定量に使用した *m/z*。

b; 各有機酸の特徴的なフラグメントイオンであり、定性のために使用した。

Table 3-6 LC-MS/MS による糖、糖リン酸の分析条件

[LC condition]		
First mobile phase (A)	1 mmol/L methylphosphonic acid in water	
Second mobile phase (B)	0.1% formic acid in acetonitrile	
Injection volume	10 $\mu$ L	
Column flow rate	0.3 mL/min	
Column temperature	40°C	
Gradinet program	Time (min)	B pump conc (%)
	0.01	20
	10.00	42
	12.50	100
	12.51	20
	27.50	20
[MS/MS condition]		
Measurement mode	positive	
Capillary voltage	2.8 kV	
Ionization method	ESI	
Source temperature	100°C	
Sampling cone voltage	40 V	
Desolvation temperature	350°C	
Detector voltage	1900 V	
Collision energy (MS/MS)	5 V	

Table 3-7 LC-MS/MS による糖、糖リン酸の解析条件

Metabolite	calculated exact mass <sup>a</sup> ( $m/z$ )	Retention time (min)	Scan time range <sup>b</sup> (min)	Targeted mass <sup>c</sup> ( $m/z$ )	Scan mass range ( $m/z$ )
Glucose 6-phosphate	455.1578	3.72	3.22-4.46	455.16	430-480
Mannose 6-phosphate	455.1578	3.96	3.22-4.46	455.16	430-480
Ribose 5-phosphate	425.1472	4.10	3.60-4.60	425.15	400-450
Erythrose 4-phosphate	395.1367	4.38	3.88-4.88	395.14	370-420
Glyceraldehyde 3-phosphate	365.1261	4.45	3.95-4.95	365.13	340-390
U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> glucose (I.S.)	381.2116	6.94	6.44-7.44	381.21	356-406
Glucose	375.1915	6.94	6.44-7.44	375.19	350-400
Ribose	345.1809	7.36	6.86-7.86	345.18	320-370
Fucose	359.1965	7.73	7.23-8.23	359.20	334-384
Glyceraldehyde	285.1598	8.08	7.58-8.58	285.16	260-310

a; 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) により誘導体化した時の各糖、糖リン酸の LC-MS/MS で検出される理論精密質量。

b; プリカーサーイオンを四重極型アナライザーで選択しコリジョンセルに通過させる時間

c; LC-MS/MS のシングル MS モードにて予め測定し、実際に得られた  $m/z$

Table 3-8 デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  をそれぞれ添加した時の犬筋管様細胞中のアミノ酸

Metabolite	Ratio for Control Mean $\pm$ SEM		One way ANOVA	posthoc Bonferroni's multiple comparisons test <i>P</i> value		
	TNF- $\alpha$ treated ( <i>n</i> = 3)	Dexamethasone treated ( <i>n</i> = 3)	<i>P</i> value	Control vs TNF- $\alpha$	Control vs Dexamethasone	TNF- $\alpha$ vs Dexamethasone
Alanine	0.84 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.04	0.0721			
Glycine	0.75 $\pm$ 0.04	0.86 $\pm$ 0.05	0.1009			
Valine	0.92 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.02	0.0326	> 0.9999	0.0420	0.1239
beta-Aminoisobutyric acid	2.25 $\pm$ 0.13	1.04 $\pm$ 0.05	<0.0001	< 0.0001	> 0.9999	0.0001
Leucine	0.90 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.03	0.0401	0.9073	0.0470	0.2076
allo-Isoleucine	0.86 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.03	0.0703			
Isoleucine	0.87 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.03	0.0383	0.5812	0.0423	0.2933
Threonine	0.83 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.05	0.0419	0.1469	0.0552	> 0.9999
Serine	0.95 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.15	0.9323			
Proline	0.71 $\pm$ 0.01	1.07 $\pm$ 0.00	0.0002	0.0008	0.3570	0.0002
Asparagine	0.94 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.03	0.0384	> 0.9999	0.0466	0.1733
Aspartic acid	0.82 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.06	0.0516			
Methionine	1.09 $\pm$ 0.06	0.85 $\pm$ 0.01	0.0214	0.5923	0.1473	0.0237
4-Hydroxyproline	1.03 $\pm$ 0.20	0.90 $\pm$ 0.15	0.8391			
Glutamic acid	0.81 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.17	0.4892			
Phenylalanine	0.91 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.04	0.0524			
Glutamine	0.84 $\pm$ 0.11	0.92 $\pm$ 0.19	0.8981			
Lysine	1.47 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.24	0.1364			
Tyrosine	0.96 $\pm$ 0.10	0.78 $\pm$ 0.07	0.3404			
Tryptophan	0.88 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.08	0.0687			

Table 3-9 デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  をそれぞれ添加した時の犬筋管様細胞中の脂肪酸

Metabolite	Ratio for Control Mean $\pm$ SEM		One way ANOVA	posthoc Bonferroni's multiple comparisons test <i>P</i> value		
	TNF- $\alpha$ treated ( <i>n</i> = 3)	Dexamethasone treated ( <i>n</i> = 3)	<i>P</i> value	Control vs TNF- $\alpha$	Control vs Dexamethasone	TNF- $\alpha$ vs Dexamethasone
laurate;12:0	1.18 $\pm$ 0.15	0.94 $\pm$ 0.13	0.5338			
myristate;14:0	1.08 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.04	0.0066	0.6816	0.0348	0.0079
palmitoleate;16:1n-7	1.09 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.04	0.0035	0.5723	0.0190	0.0042
palmitate;16:0	1.11 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.07	0.0341	0.4775	0.3081	0.0371
margarate;17:0	1.16 $\pm$ 0.08	0.84 $\pm$ 0.05	0.0164	0.2368	0.2466	0.0171
linoleate;18:2n-6	1.09 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.06	0.1047			
oleate;18:1n-9	1.09 $\pm$ 0.04	0.86 $\pm$ 0.06	0.0211	0.5284	0.1602	0.0231
cis-vaccenate;18:1n-7	1.14 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.06	0.0192	0.1580	0.4713	0.0208
stearate;18:0	1.17 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.07	0.0147	0.1266	0.4206	0.0158
arachidonate;20:4n-6	1.04 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.06	0.4568			
EPA;20:5n-3	1.11 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.05	0.0892			
DGLA;20:3n-6	1.14 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.06	0.0724			
DHA;22:6n-3	1.13 $\pm$ 0.05	1.04 $\pm$ 0.03	0.3225			
DPA;22:5n-3	1.15 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.03	0.1217			

EPA; エイコサペンタエン酸、DGLA; ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸、DHA; ドコサヘキサエン酸、DPA; ドコサペンタエン酸

Table 3-10 デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  をそれぞれ添加した時の犬筋管様細胞中の解糖系／糖新生、TCA サイクル中間体

Metabolite	Ratio for Control Mean $\pm$ SEM		One way ANOVA	posthoc Bonferroni's multiple comparisons test <i>P</i> value		
	TNF- $\alpha$ treated ( <i>n</i> = 3)	Dexamethasone treated ( <i>n</i> = 3)	<i>P</i> value	Control vs TNF- $\alpha$	Control vs Dexamethasone	TNF- $\alpha$ vs Dexamethasone
Dihydroxyacetone-phosphate	1.06 $\pm$ 0.55	0.91 $\pm$ 0.17	0.9623			
3-Phosphoglyceric acid	0.86 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.02	0.5101			
Phosphoenolpyruvic acid	0.70 $\pm$ 0.16	0.92 $\pm$ 0.11	0.2159			
Pyruvic acid	0.82 $\pm$ 0.07	0.79 $\pm$ 0.02	0.0706			
Oxaloacetic acid	1.05 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.09	0.8344			
Isocitric acid/Citric acid	1.37 $\pm$ 0.28	0.95 $\pm$ 0.16	0.3162			
cis-Aconitic acid	0.94 $\pm$ 0.20	0.71 $\pm$ 0.15	0.4266			
Oxoglutaric acid	0.93 $\pm$ 0.12	0.80 $\pm$ 0.06	0.2898			
Fumaric acid	0.94 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.05	0.3033			
Malic acid	0.94 $\pm$ 0.05	0.94 $\pm$ 0.08	0.7158			
Glycerol 3-phosphate	0.99 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.04	0.2417			

Table 3-11 デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  をそれぞれ添加した時の犬筋管様細胞中の糖と糖リン酸

Metabolite	Ratio for Control Mean $\pm$ SEM		One way ANOVA
	TNF- $\alpha$ treated ( $n = 2$ )	Dexamethasone treated ( $n = 2$ )	<i>P</i> value
Glucose 6-phosphate	1.13 $\pm$ 0.21	3.01 $\pm$ 0.25	N.A.
Glyceraldehyde 3-phosphate	1.57 $\pm$ 0.02	2.45 $\pm$ 0.64	N.A.
Mannose 6-phosphate	0.69 $\pm$ 0.39	3.37 $\pm$ 1.48	N.A.
Ribose 5-phosphate	0.91 $\pm$ 0.19	3.65 $\pm$ 0.08	N.A.
Erythrose 4-phosphate	0.90 $\pm$ 0.19	2.00 $\pm$ 0.43	N.A.
Glucose	1.52 $\pm$ 0.31	2.68 $\pm$ 0.14	N.A.
Ribose	1.80 $\pm$ 0.39	4.35 $\pm$ 1.20	N.A.
Fucose	1.08 $\pm$ 0.13	2.13 $\pm$ 0.15	N.A.
Glyceraldehyde	1.35 $\pm$ 0.19	1.23 $\pm$ 0.28	N.A.

糖と糖リン酸は  $n = 2$  で分析を行ったため統計処理は行わなかった。N.A., not applicable.

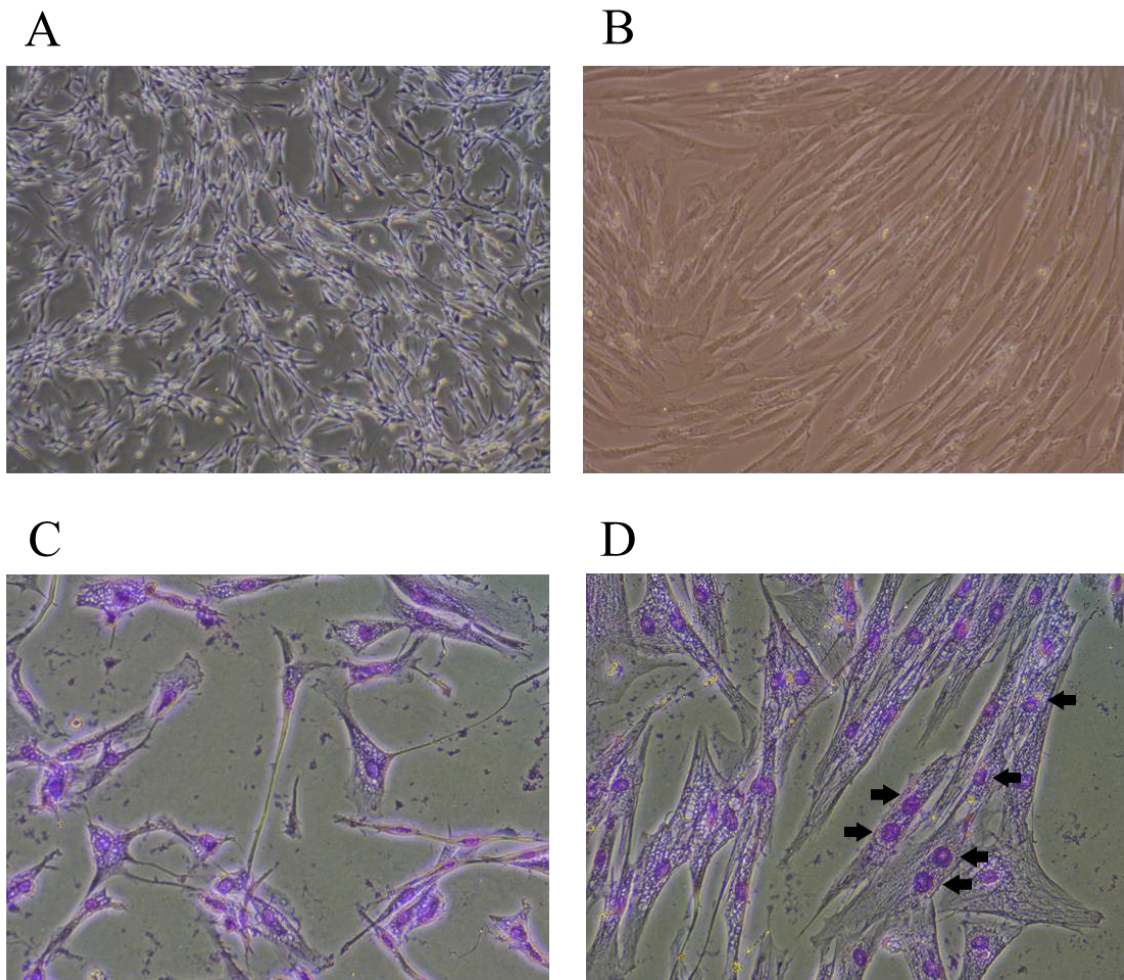


Fig. 3-1 犬培養細胞の倒立位相差顕微鏡像

犬骨格筋細胞を約4日間培養した犬筋芽細胞 (A)、筋芽細胞を分化培地にて96時間培養した犬筋管様細胞 (B)。また、それぞれをギムザ染色による核染色を行った鏡検像 (C、D)。黒矢印は一つの細胞質に多核を有することを示す。



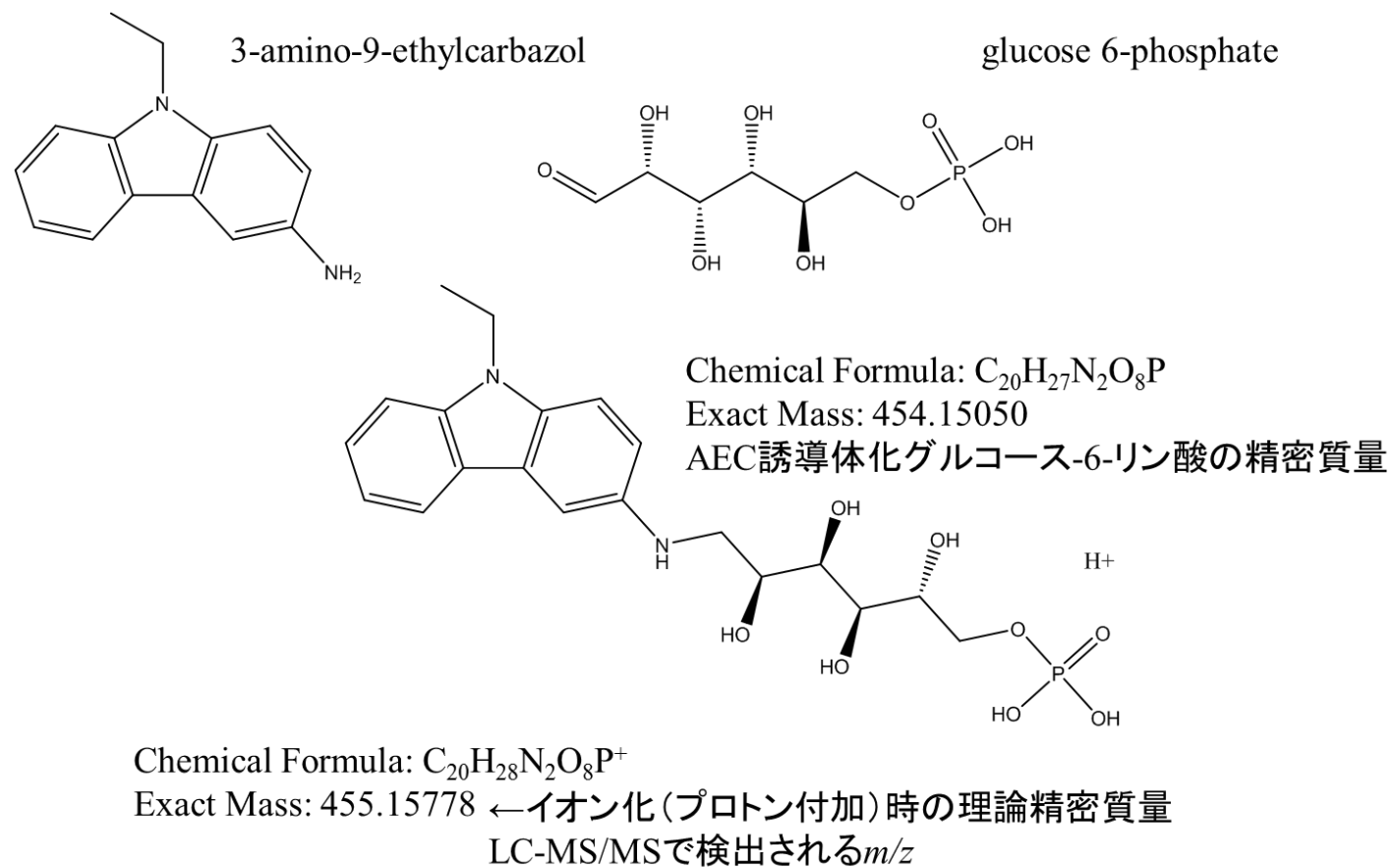


Fig. 3-2 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) 誘導体グルコース-6 リン酸

AEC 誘導体化後にプロトンが負荷した状態の  $m/z$  が LC-MS/MS で検出される。

グルコース-6-リン酸標準液濃度

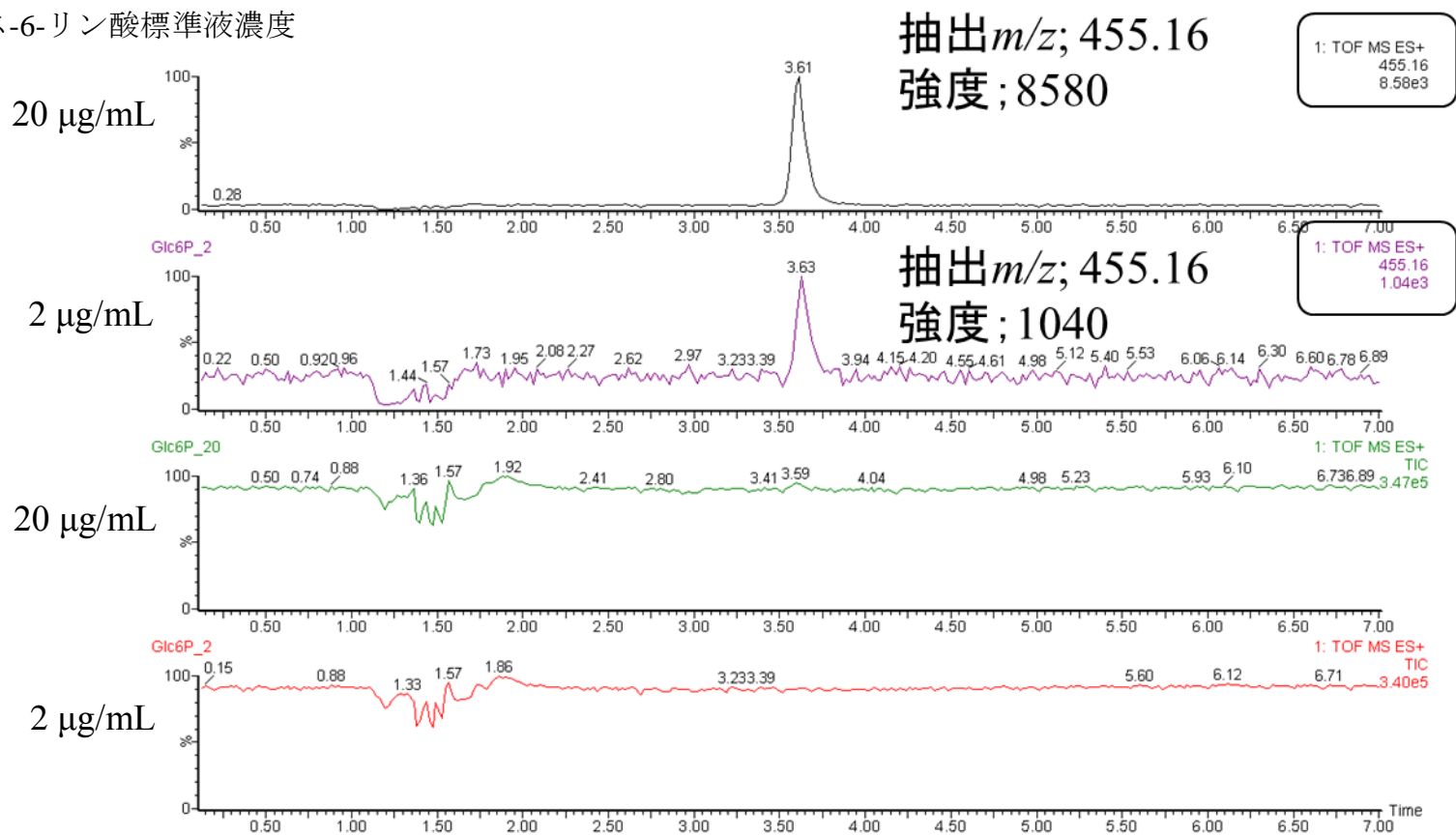


Fig. 3-3 グルコース-6-リン酸標準液を分析し得られたクロマトグラム

下から順に、2 µg/mL のトータルイオンクロマトグラム (TIC)、20 µg/mL の TIC、2 µg/mL の  $m/z$  455.16 マスクロマトグラム (MC)、20 µg/mL の  $m/z$  455.16 MC

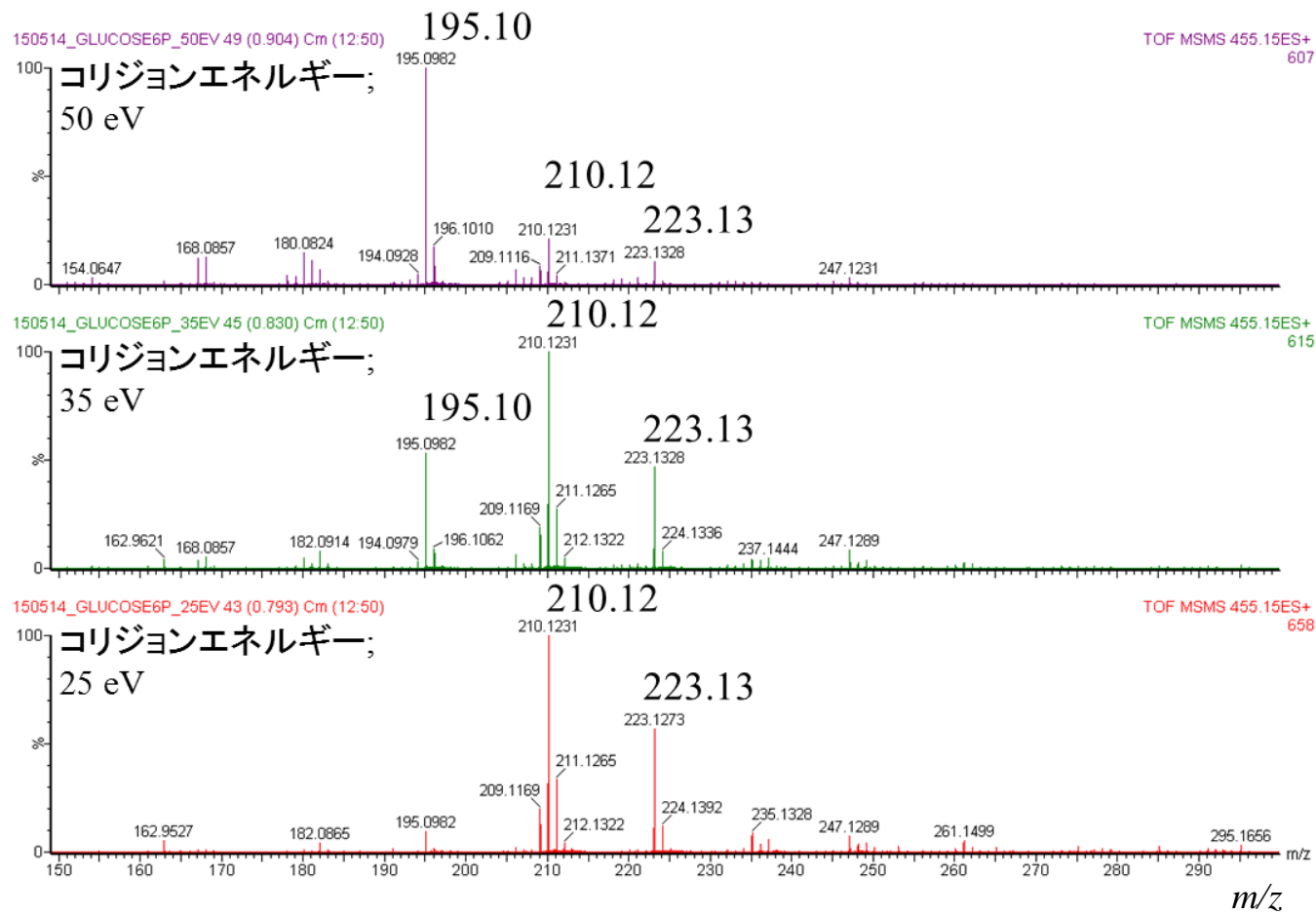


Fig. 3-4 AEC誘導体化グルコース-6-リン酸のフラグメントイオン

50 eV、35 eV、25 eV のコリジョンエネルギーを与えた時に得られた AEC 誘導体化グルコース-6-リン酸のフラグメントイオン

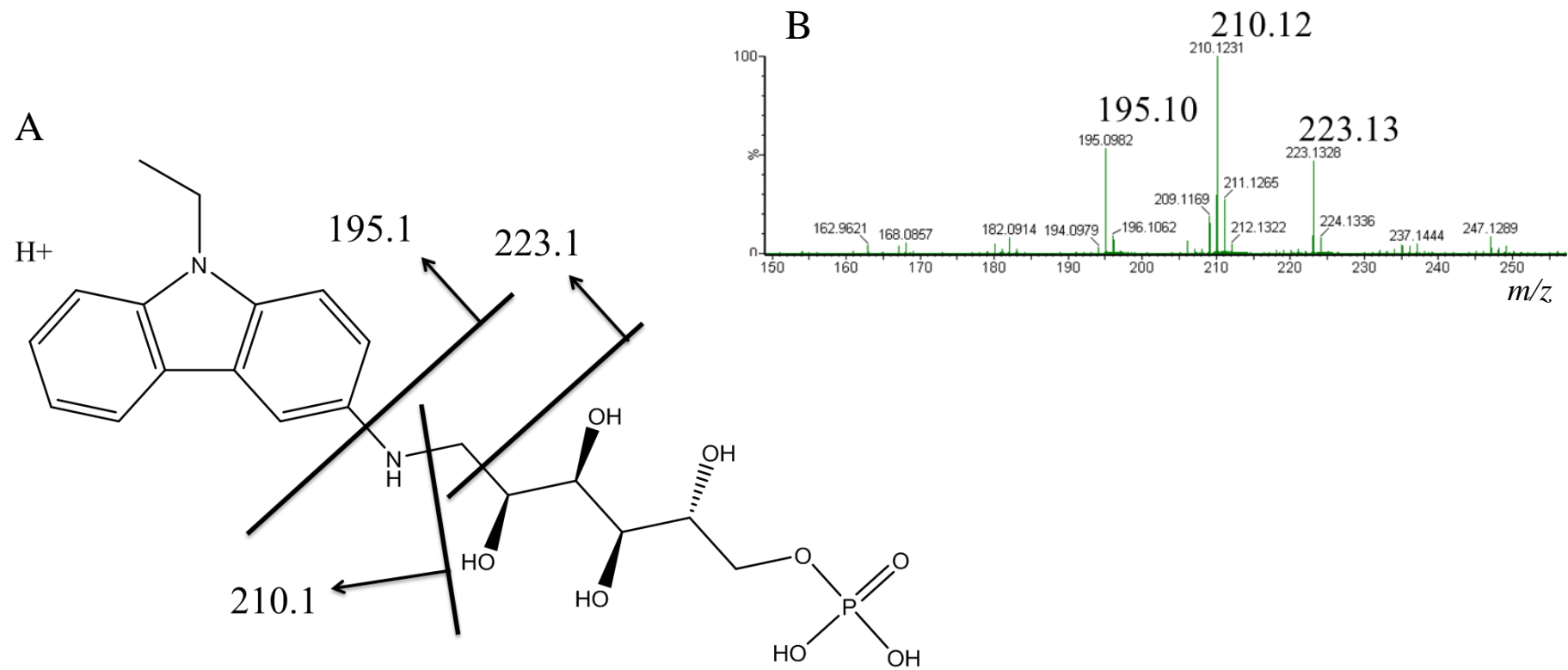


Fig. 3-5 AEC 誘導体化グルコース-6-リン酸の MS/MS フラグメンテーション

AEC 誘導体化グルコース-6-リン酸の開裂パターン (A) とそのフラグメンテーションイオンの各スペクトル (B)

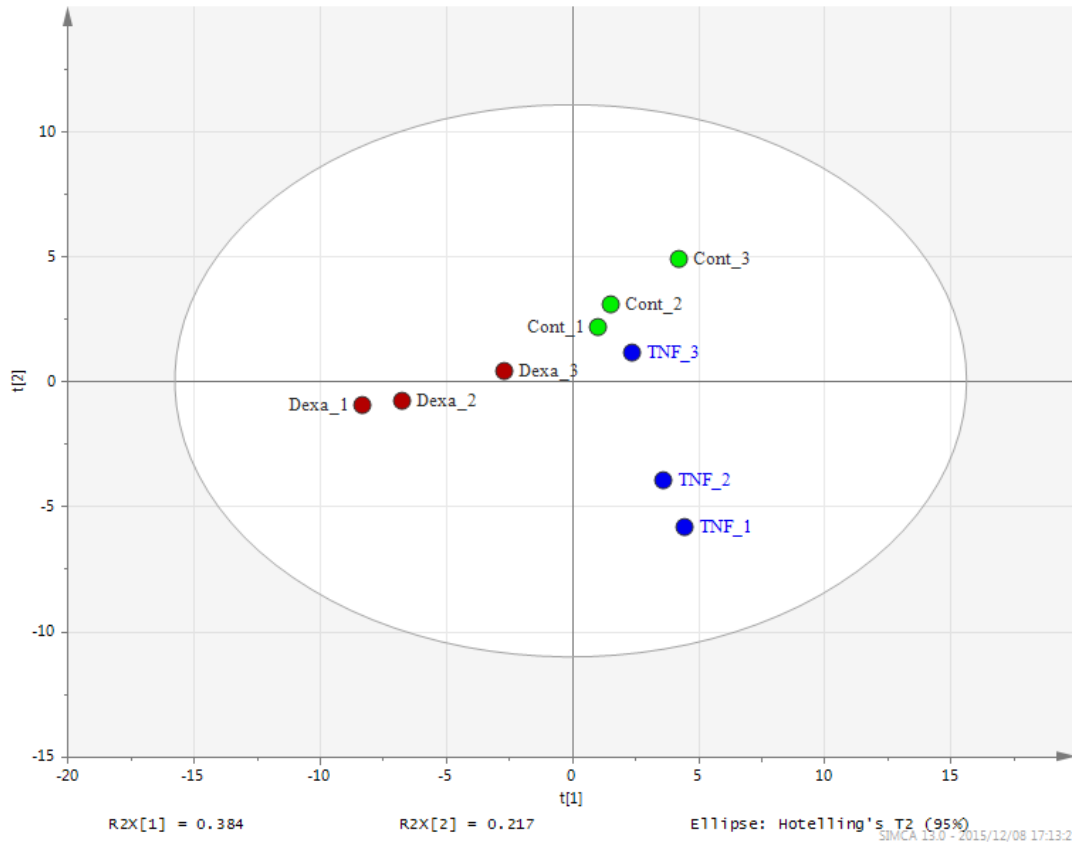


Fig. 3-6 3群の筋管様細胞中アミノ酸、脂肪酸、解糖系／糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物による PCA スコアプロット

データセットはサンプル数 9、変数 54 種からなり、第 1 主成分を横軸に、第 2 主成分を縦軸に表した。

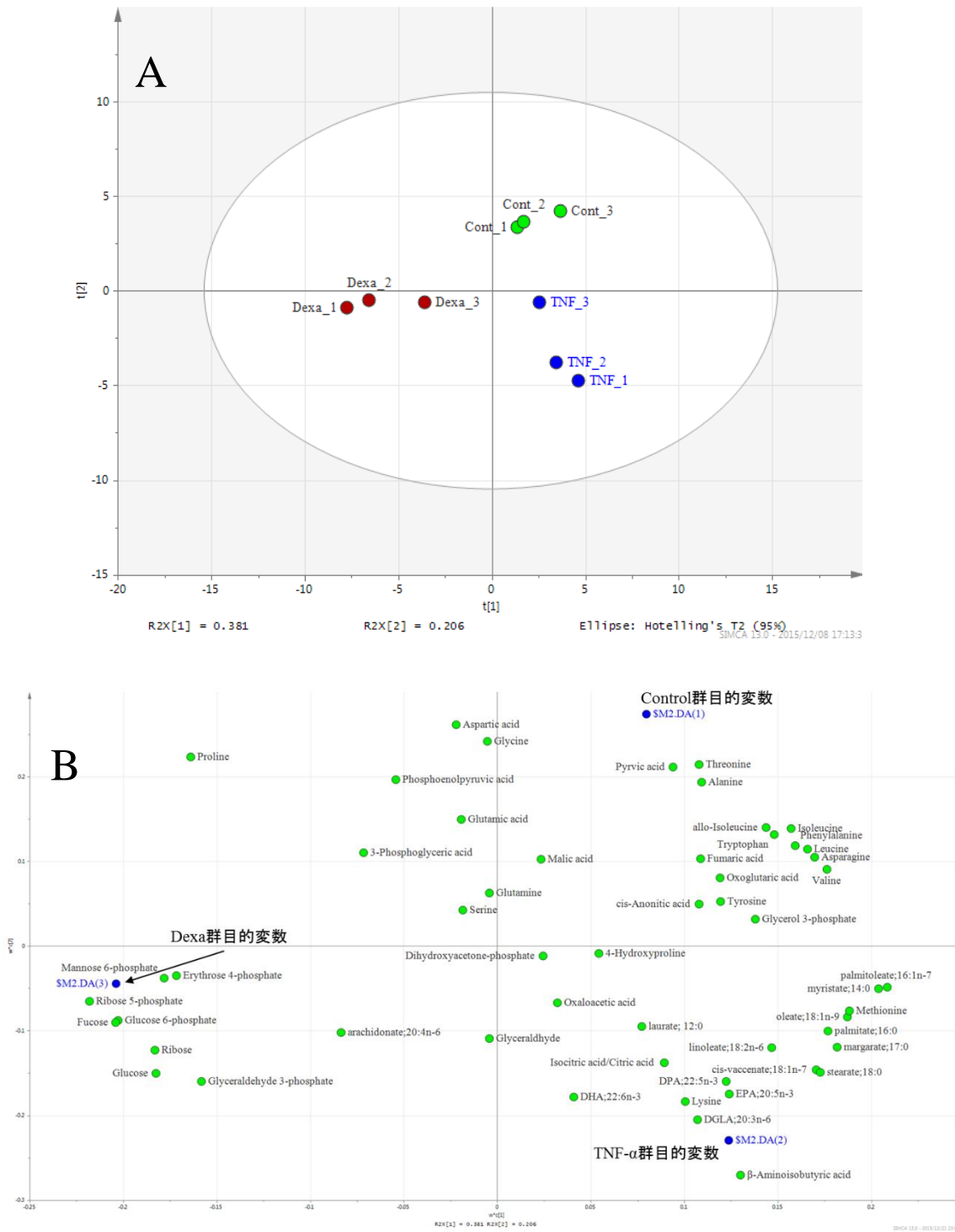


Fig. 3-7 3群の筋管様細胞中アミノ酸、脂肪酸、解糖系／糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物による PLS-DA スコアプロット (A)、ローディングプロット (B)

データセットはサンプル数9、変数54種からなり、第1主成分を横軸に、第2主成分を縦軸に表した。

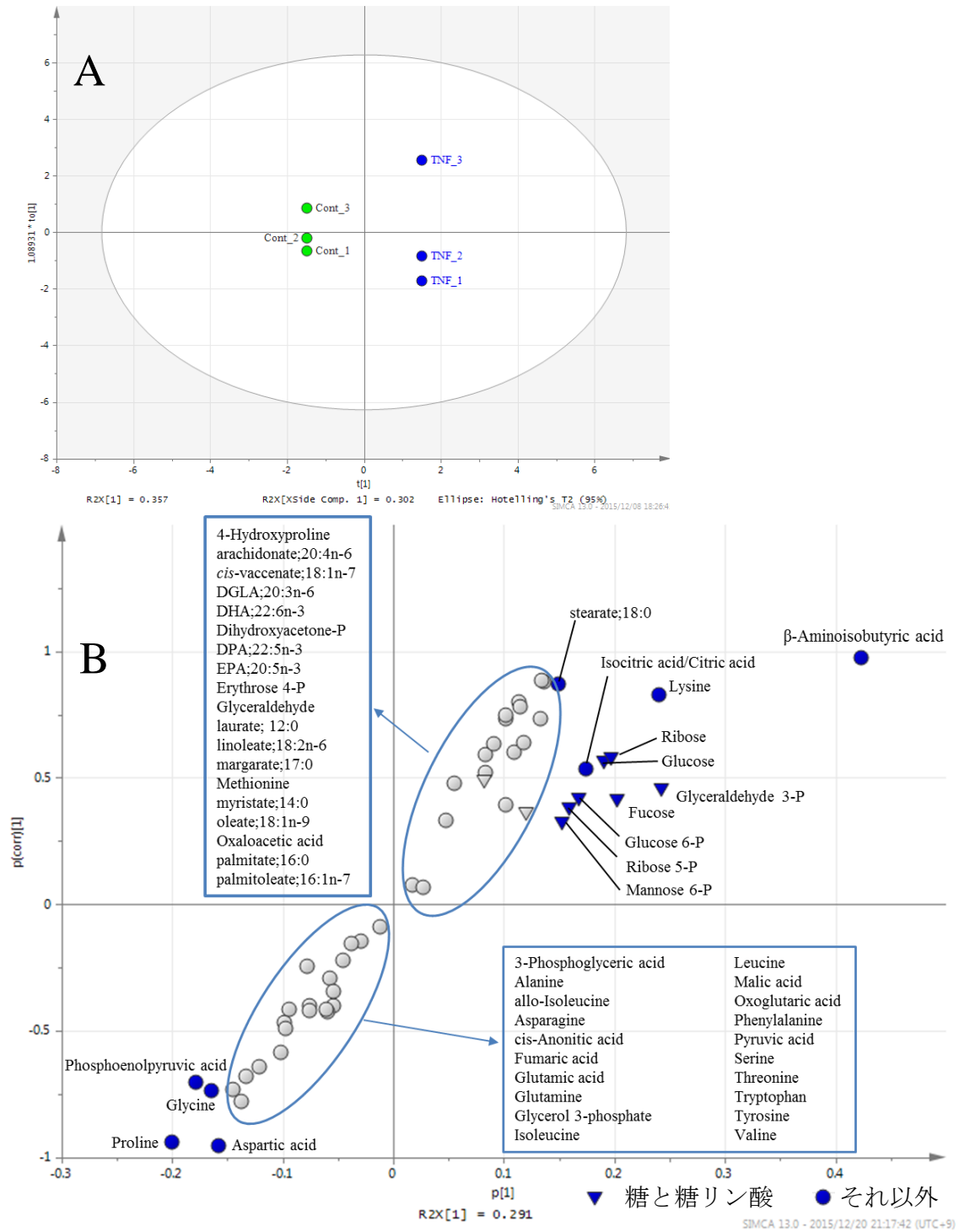


Fig. 3-8 Control 群と TNF- $\alpha$  群の筋管様細胞中アミノ酸、脂肪酸、解糖系／糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物による OPLS-DA スコアプロット (A) と s-plot (B) (データセット ; サンプル数 6、変数 54 種)

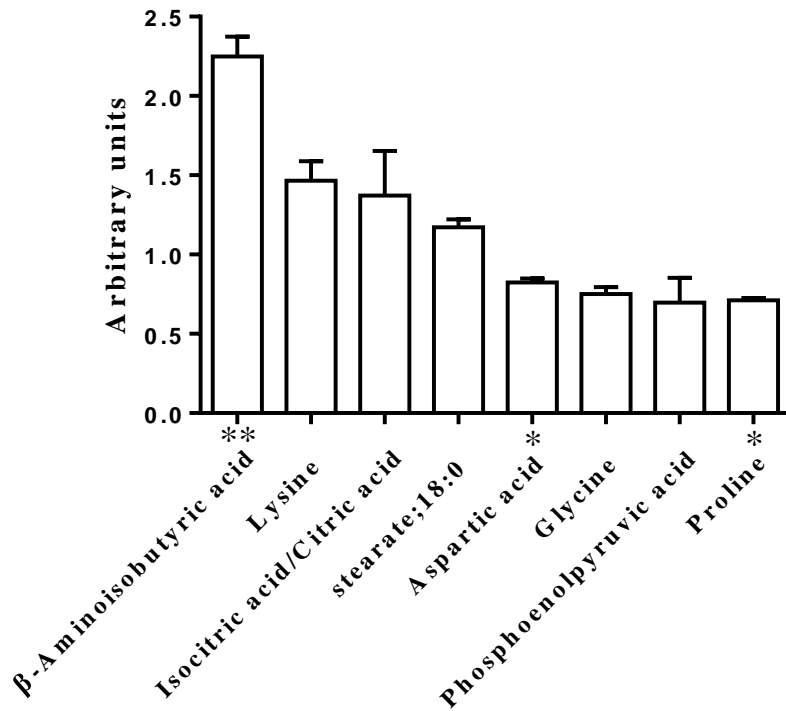


Fig. 3-9 Fig. 3-8 に示した Control 群と TNF- $\alpha$  群における s-plot において分離の寄与率の絶対値 0.15 以上で寄与した代謝産物

値は Control 群を 1 とした時の相対値を表し、Mean  $\pm$  SEM で示した。

Paired *t* test; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs Control



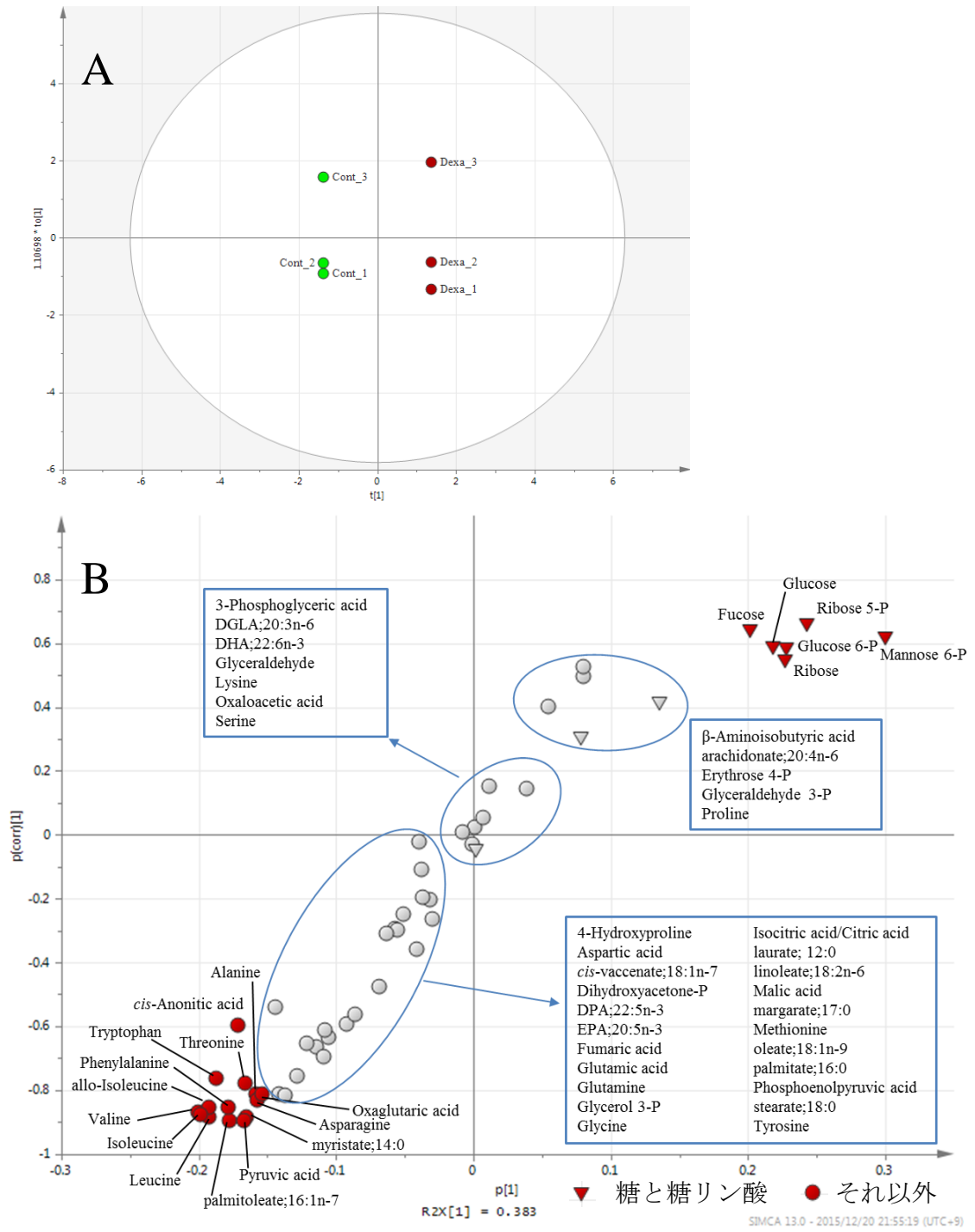


Fig. 3-10 Control 群と Dexa 群の筋管様細胞中アミノ酸、脂肪酸、解糖系／糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物による OPLS-DA スコアプロット (A) と s-plot (B) (データセット ; サンプル数 6、変数 54 種)

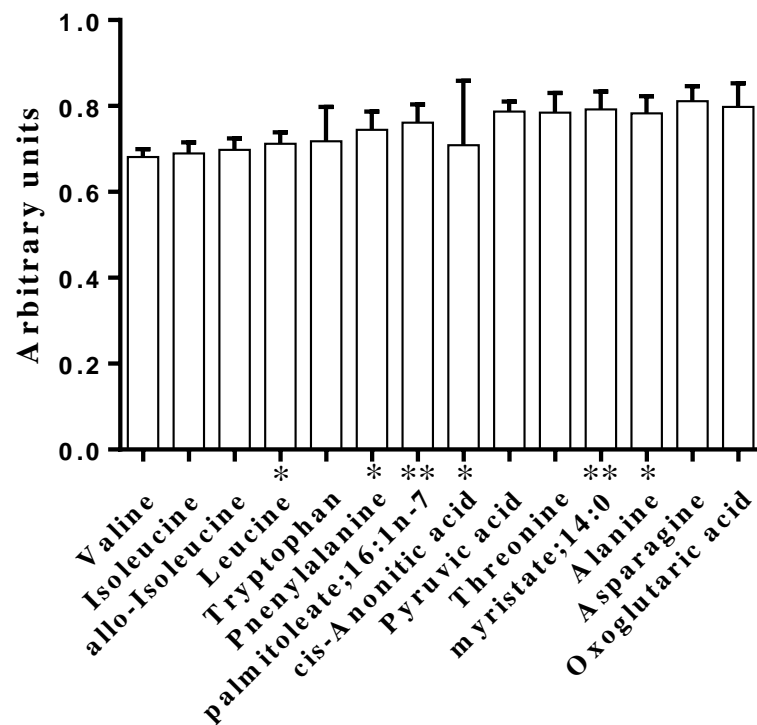


Fig. 3-11 Fig. 3-10 に示した Control 群と Dexa 群における s-plot において分離の寄与率の絶対値 0.15 以上で寄与した代謝産物

値は Control 群を 1 とした時の相対値を表し、Mean ± SEM で示した。

Paired *t* test; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs Control

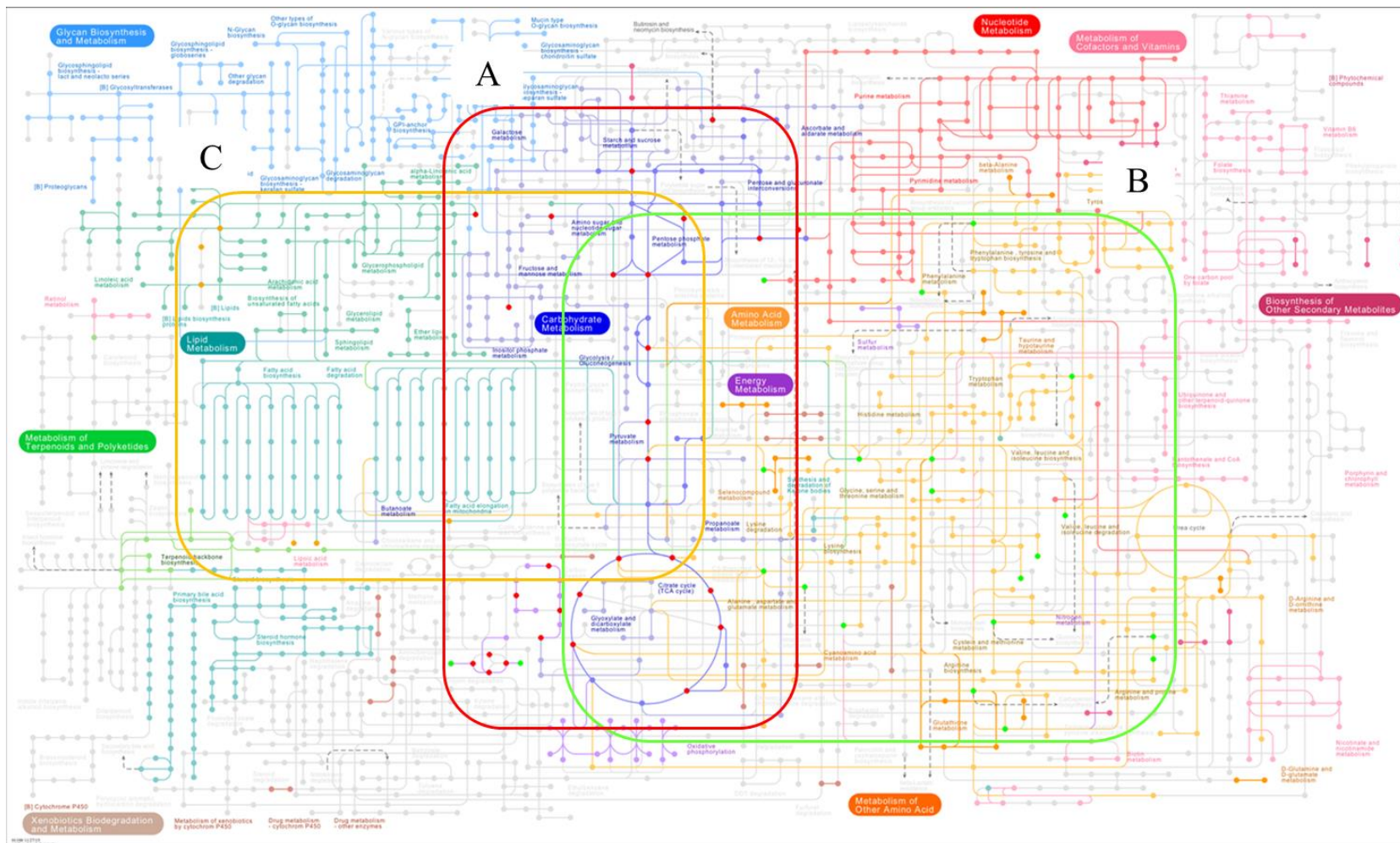


Fig. 3-12 犬の代謝パスウェイ (KEGG データベース) への代謝産物マッピング

パスウェイ上の薄い灰色で示された部分は犬では存在しないことを示す。赤; 解糖系/糖新生経路、TCA サイクルの代謝産物  
 緑; アミノ酸、橙; 脂肪酸を示す。A、B、C で囲んだ部分については次のページ以降に詳細を示した。

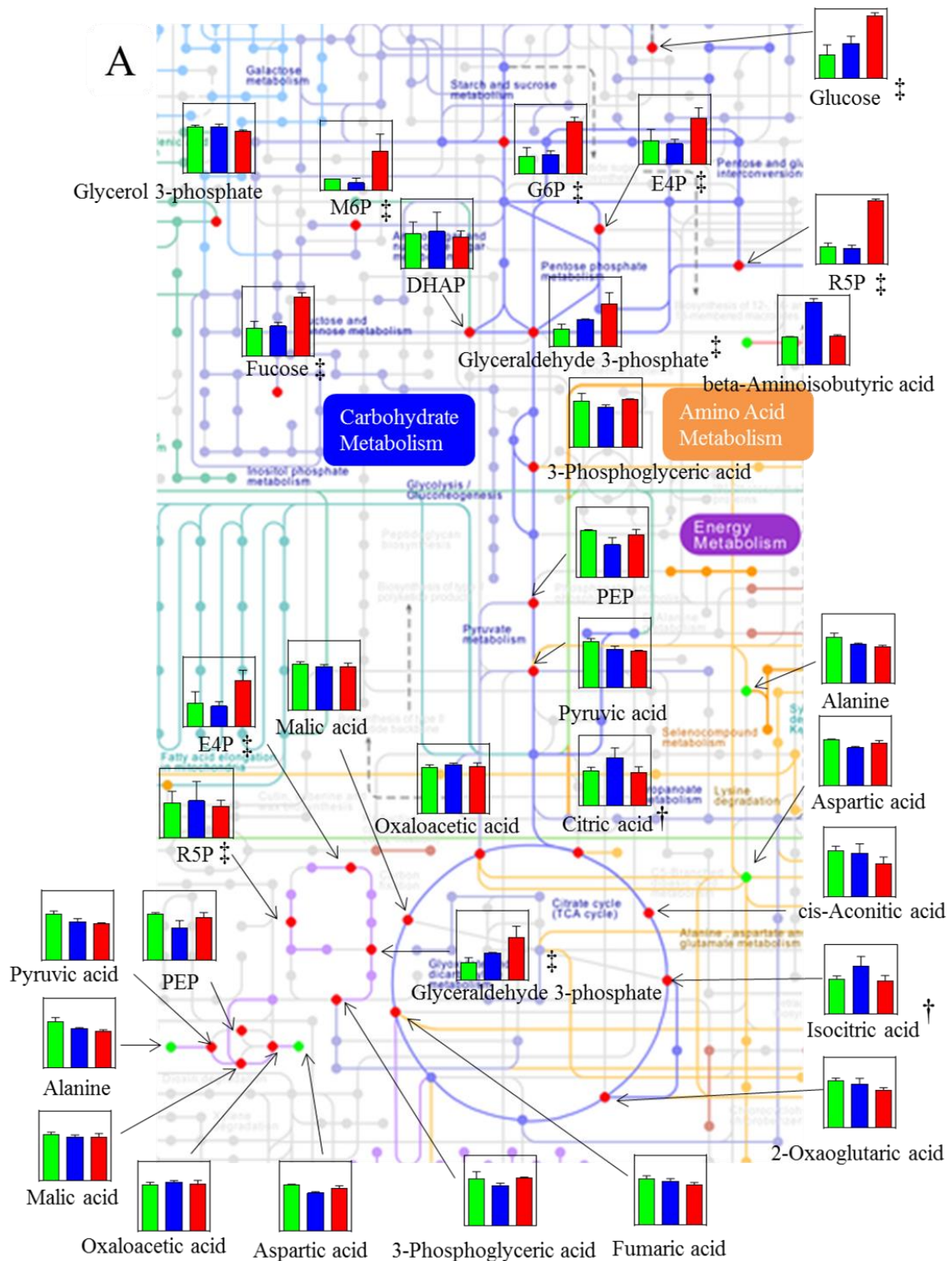


Fig. 3-12A 解糖系／糖新生、TCA サイクル、ペントースリン酸経路

緑; Control 群、青; TNF- $\alpha$  群、赤; Dexa 群

‡; n = 2, †; イソクエン酸とクエン酸の合計値

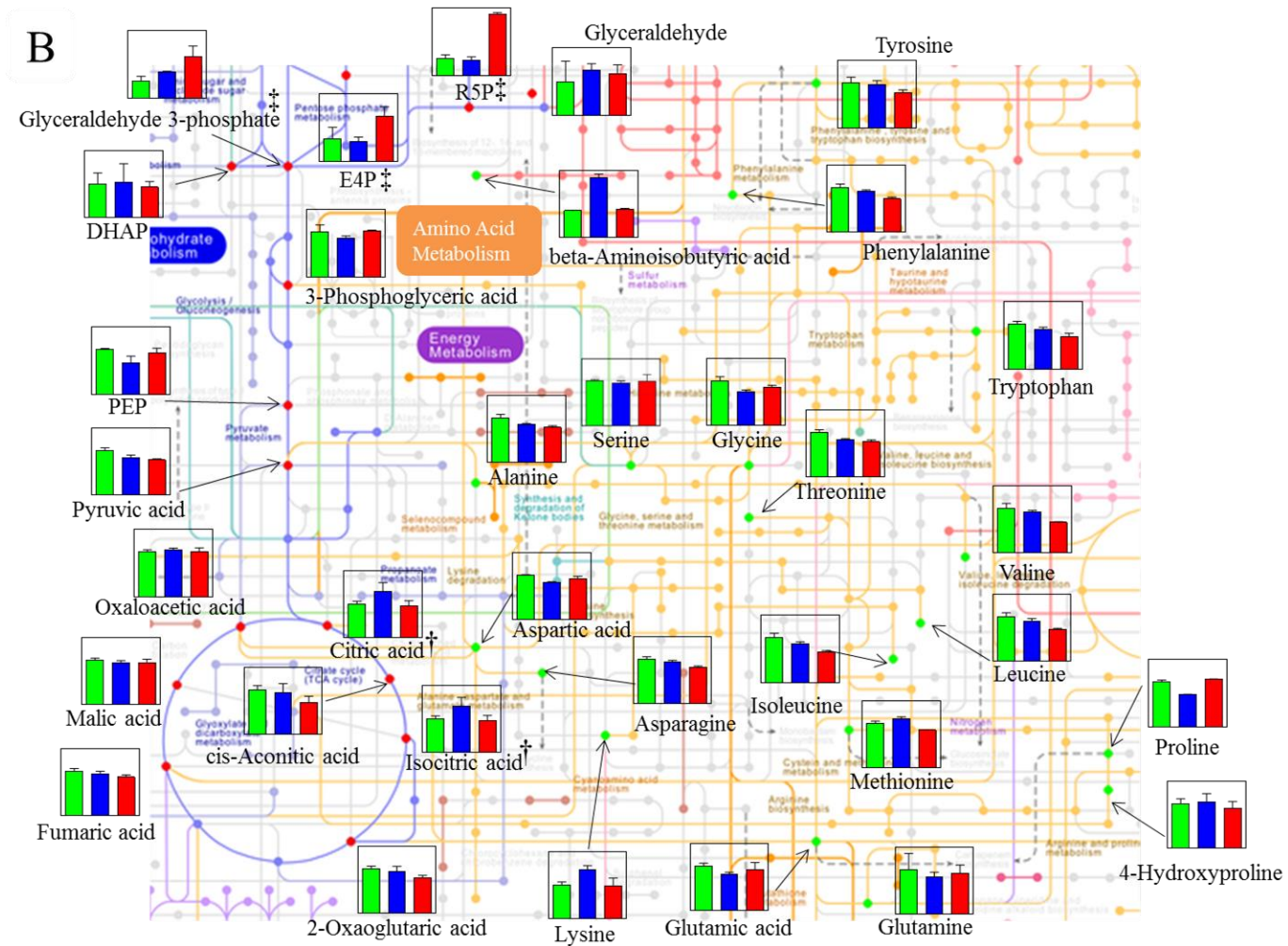


Fig. 3-12B 解糖系／糖新生、TCA サイクル、アミノ酸代謝

緑; Control 群、青; TNF- $\alpha$  群、赤; Dexa 群 ‡; n = 2, †; イソクエン酸とクエン酸の合計値

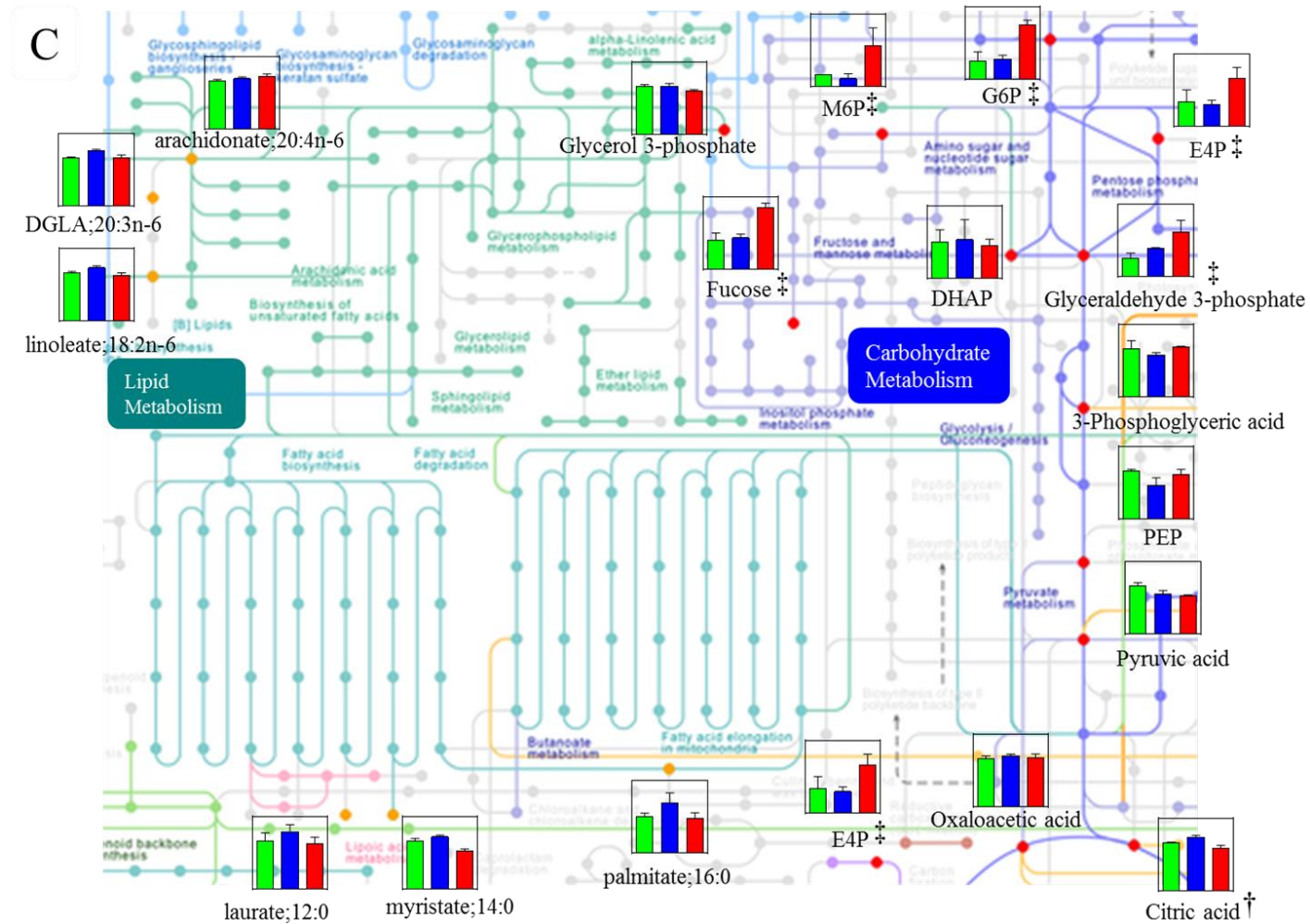
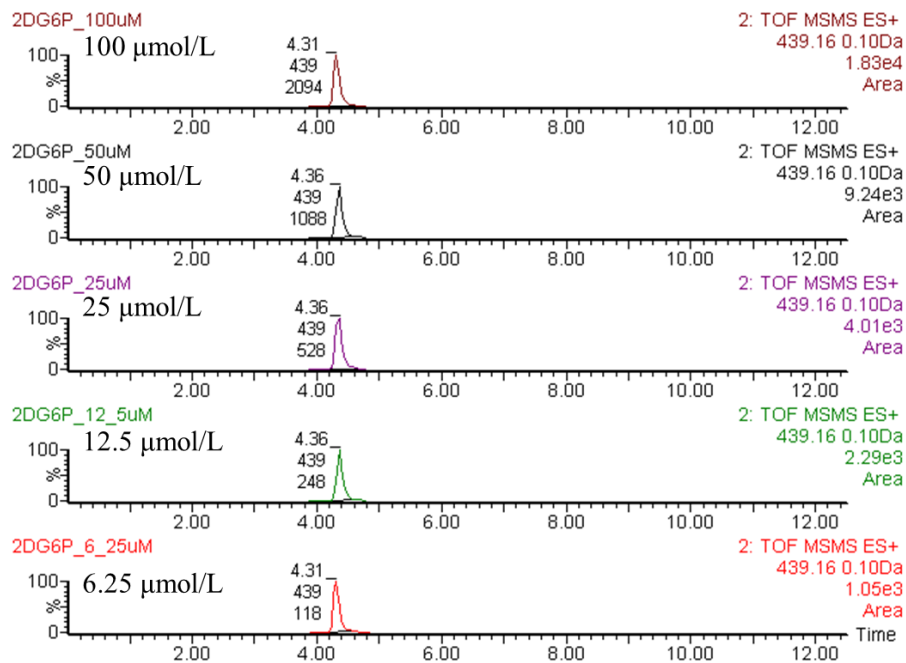


Fig. 3-12C 解糖系／糖新生、脂質代謝

緑; Control 群、青; TNF- $\alpha$  群、赤; Dexa 群 ‡; n = 2, †; イソクエン酸とクエン酸の合計値

A



B

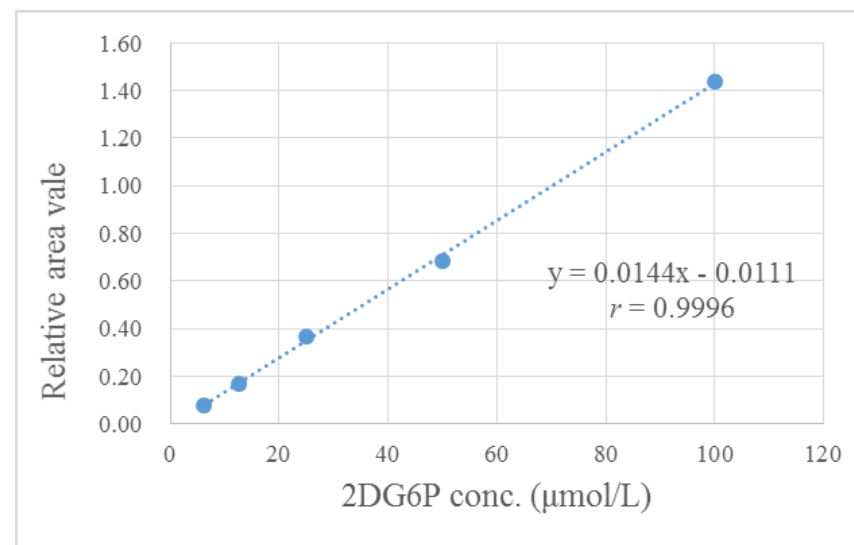


Fig. 3-13 2-デオキシグルコース-6-リン酸 (2DG6P) を分析し、得られた  $m/z$  439.16 のマスクロマトグラム (A)、2DG6P 濃度と相対面積値の関係 (B)

ピークの左に表記された数字は上から、保持時間、整数  $m/z$ 、クロマトグラム面積値を表している (A)。2DG6P の相対面積値は  $m/z$  439.16 のマスクロマトグラム面積値を I.S. ( $U-^{13}C_6$ -D-グルコース) のマスクロマトグラム面積値で補正して算出した。

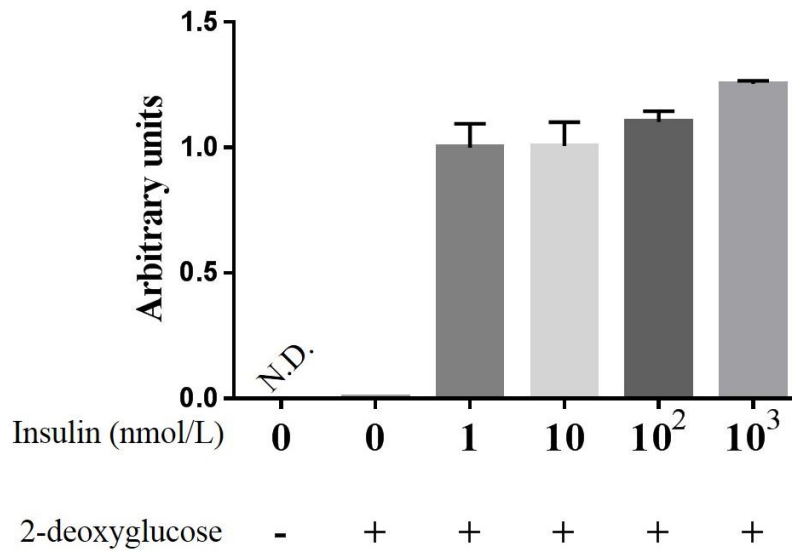


Fig. 3-14 犬筋管様細胞におけるインスリン添加濃度による2-デオキシグルコース取り込み量 (Mean ± SEM,  $n = 3$ )

インスリンは最終濃度 0-1,000 nmol/L で添加し、40 分間インキュベートした。その後、2-デオキシグルコースを最終濃度 1 mmol/L で添加し 20 分間インキュベートした後、LC-MS/MS にて細胞内の 2DG6P 量を測定した。

N.D.; not detected. インスリン非添加 2-デオキシグルコース添加群については 3 反復のサンプル中 1 サンプルでのみ検出された。



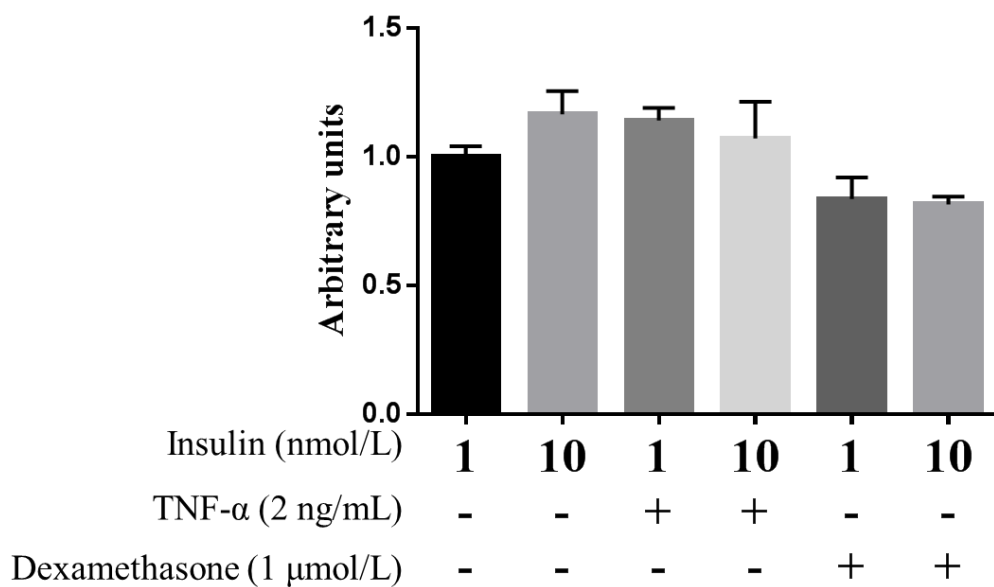


Fig. 3-15 犬筋管様細胞における 2-デオキシグルコース取り込み量 (Mean ± SEM, n = 3)

最終濃度 2 ng/mL の TNF-α と 1 μmol/L のデキサメサゾンのそれぞれによりインスリン抵抗性誘導を行い、2-デオキシグルコースにより細胞における糖取り込み能を評価した。インスリン抵抗性誘導後、インスリンは最終濃度 1 または 10 nmol/L で添加し、40 分間インキュベートした。その後、2-デオキシグルコースを最終濃度 1 mmol/L で添加し 20 分間インキュベートした後、LC-MS/MS にて細胞内の 2DG6P 量を測定した。

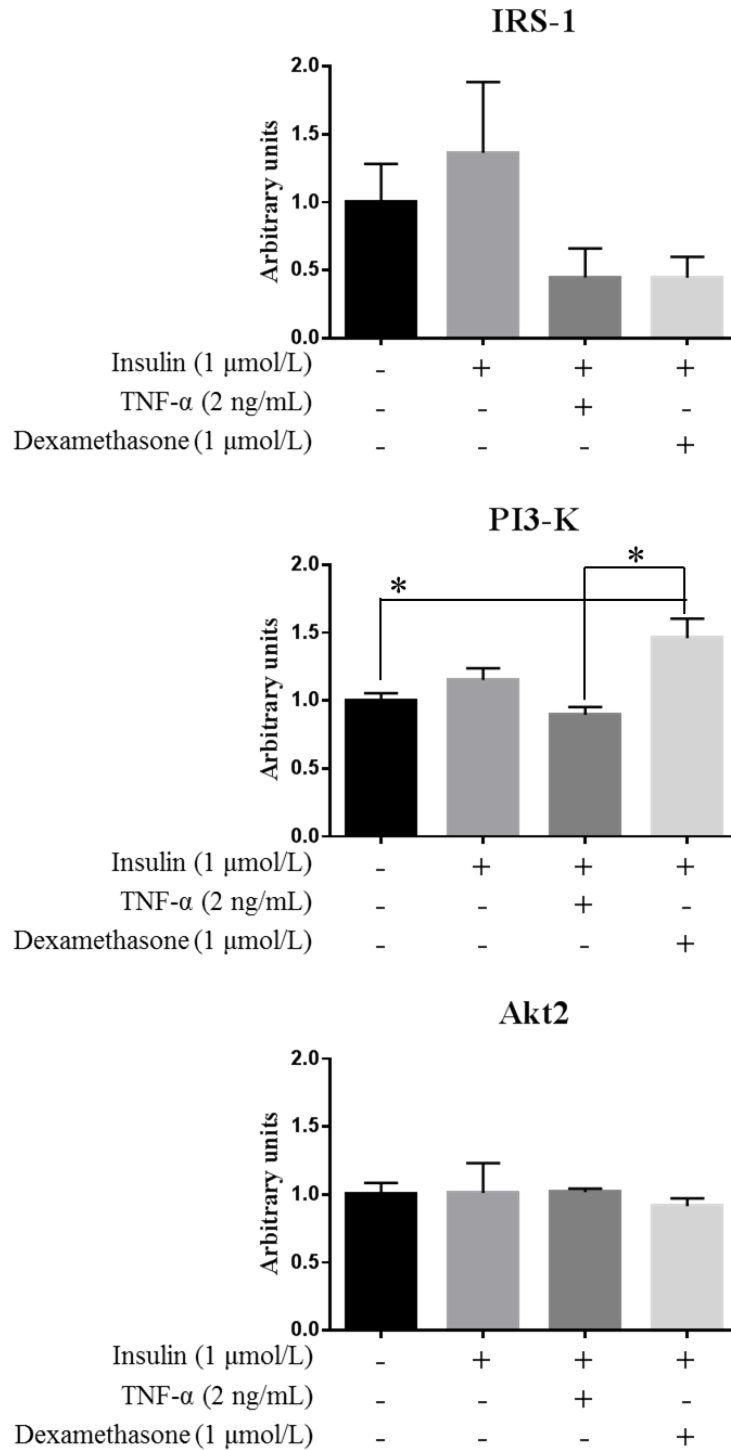


Fig. 3-16 犬筋管様細胞におけるインスリンシグナリング遺伝子発現量 (Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ )

最終濃度 2 ng/mL の TNF- $\alpha$  と 1  $\mu\text{mol/L}$  のデキサメサゾンのそれぞれによりインスリン抵抗性誘導を行った後、インスリンを最終濃度 1  $\mu\text{mol/L}$  で添加し、20 分間インキュベートして細胞から total RNA を抽出、遺伝子発現量の定量を行った。

One-way ANOVA; \* $P < 0.05$  (Bonferroni's multiple comparison)

## 第4章

### 健常犬の血清中グルコースおよびインスリン 濃度変動と血清中代謝産物変動の比較

## 緒言

ヒトの1型糖尿病患者にインスリンを投与すると、いくつかのアミノ酸が有意に減少することが知られており(Nair et al., 1995)、また2,422名の非糖尿病患者を対象にした12年間の追跡研究では、2型糖尿病を発症した201名と2型糖尿病を発症しなかったヒトの血液中代謝産物の網羅的分析により、アミノ酸が糖尿病リスク評価のバイオマーカーとして有用であることが報告されている(Wang et al., 2011)。本論文では、これまでに末梢血白血球と犬骨格筋培養細胞を用いて、HACおよび肥満の影響を調べるために、グルココルチコイドおよびTNF- $\alpha$ によるインスリン作用抑制時のアミノ酸を含む代謝産物の変化について、細胞レベルで明らかにした。しかし、今までに犬ではインスリンが作用している時の血清中アミノ酸変動についての報告はない。

そこで本章では、アミノ酸の変動がインスリン作用低下の指標、すなわちインスリン抵抗性の指標になると考え、健常犬にインスリンを投与したときの血液中アミノ酸を分析対象とした。しかし、膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌が正常に保たれている犬に外部からインスリンを投与することは低血糖を是正するための生体反応を調べることになり、不適切である。そこで、膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌の有無を調べるために獣医療臨床でも実施されている静脈内糖負荷試験により間接的にインスリンの一過性上昇を生じさせ、この時の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中アミノ酸の変動を比較することにした。

## 材料および方法

### 供試動物

本研究には本学獣医保健看護学科臨床部門で飼育している健常ビーグル犬5頭を使用した(避妊雌5頭、6-8歳齢、体重6.1-14.8 kg)。供試犬はケージ内にて単独飼育されており室温、湿度、日照条件は共同施設により適切に管理されていた。なお、食事による影響を除外するために静脈内糖負荷試験前に12時間の絶食期間を設けた。

### 静脈内糖負荷試験

試験は12時間の絶食下で開始し、グルコース投与量は、50%ブドウ糖注射液(Nissin Pharmaceutical Co., Ltd., Yamagata, Japna)を体重1 kgあたり1 gで、1分間かけて橈側皮静脈より投与した。グルコース投与開始から30秒後を糖負荷開始時間とした。血液

サンプルの採取は、静脈内糖負荷試験前（0分）、糖負荷後15、60、120、180分の計5ポイントとし、すべて頸静脈より全血1.5 mLを採取した。採取した血液はただちにベノジェクトII真空採血管（VP-AS054K50; Terumo Co., Tokyo, Japan）に分注し、30分間静置した後、3,000 rpm、20分間遠心分離して血清を分離し、分析まで-80℃にて保存した。

#### 血清グルコースおよびインスリン濃度測定

血清グルコース濃度はグルコース CII テストワコー（Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan）を用いたグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法により、分光光度計（Ultrospec 2100 pro; GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England）にて測定した。血清インスリン濃度は市販のキットを用い ELISA 法により測定した（Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Kanagawa, Japan）。静脈内糖負荷試験前（0分）を1とし15-180分の相対値を算出した。

#### 血清中のアミノ酸分析

第3章と同様の方法で行い、I.S.であるノルバリンに対する相対クロマトグラム面積値を用いて、静脈内糖負荷試験前（0分）を1とし15-180分の相対値を算出した。

#### 統計解析

全ての結果は Mean ± SEM で表した。静脈内グルコース投与による、血清中グルコース、インスリン、アミノ酸の差について評価するために Repeated Measure one-way ANOVA、Post hoc test として Bonferroni's multiple comparisons test を行い、投与前と比較した。全ての検定は GraphPad Prism analysis software 6.05（GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, U.S.A）を用いて統計解析を行い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

SIMCA 13.0.3（Umetrics AB, Umeå, Sweden）を用いた多変量解析 PLS バッチモデリング解析により、犬血清中のアミノ酸情報の時間依存データの解析を行った。

### 結果

#### 血清グルコースおよびインスリン濃度測定

血清中グルコースおよびインスリン値の変動を Fig. 4-1 に示した。血清中グルコー

ス値は静脈内糖負荷前を 1 として変動比率で見た場合、15 分後に  $2.10 \pm 0.12$  と有意に増加した後 ( $P < 0.01$ )、60 分後に  $0.87 \pm 0.03$  ( $P < 0.05$ ) と減少に転じ、120 分後に  $0.86 \pm 0.05$  と減少傾向を示し、180 分後に  $0.93 \pm 0.02$  ( $P < 0.05$ ) と 15 分後に一過性のピークを示したのち、180 分にかけておおよそ投与前のレベルに復した。血清中インスリン値は 15 分後に  $3.15 \pm 0.21$  と有意に増加した後 ( $P < 0.01$ )、60 分後に  $0.79 \pm 0.25$  と減少傾向に転じ、120 分後に  $0.99 \pm 0.25$  と投与前のレベルに復し、180 分後に  $0.86 \pm 0.25$  となり、グルコース値と同様に 15 分後に一過性のピークを示したのち、180 分にかけておおよそ投与前のレベルに復した。

### PLS バッチモデリングによる血清中のアミノ酸の時間依存データ解析

第 3 章では、PLS-DA、OPLS-DA によりグループの分類・判別を行いそのグループを分けるのに寄与する代謝産物成分を抽出したが、本章では、静脈内糖負荷試験により時間依存的に血中アミノ酸が変動することが予測された。そこで、SIMCA13.0.3 の多変量解析手法のうち時間の進展情報を Y 変数として適用できる PLS Batch Evolution Models により血清中のアミノ酸と経過時間の関連付けを行い、血中インスリン濃度やグルコース代謝に関連するアミノ酸の特定を試みた。血清アミノ酸分析により得られた、サンプル数 25 ( $n = 5 \times 5$  タイムポイント)、変数 23 種および Y 変数として 0-180 min の時間により得られた第 1 主成分 (横軸) と第 2 主成分 (縦軸) に基づくスコアプロットの結果を Fig. 4-2A に示し、ローディングプロットの結果を Fig. 4-2B に示した。スコアプロットの結果は個体によるばらつきはあるものの、120 分を除き時間ごとの区分に分類され、静脈内グルコース投与により明らかに犬血清中のアミノ酸が変動したことが分かり、ローディングプロットの形状からアミノ酸が 4 つのクラスターに分類されることが分かった。それぞれのアミノ酸の経時的変動の結果は Fig. 4-3 に示した。

クラスター1に分類されたアミノ酸は、アラニン、アスパラギン酸、トリプトファンであり、60 分以降 180 分まで減少を続けるという特徴を示した。クラスター2に分類されたアミノ酸は、プロリン、メチオニンであり、0-60 分まで減少し、60 分で最低値を示しその後グルコース投与前のレベルに復するという特徴を示した。クラスター3に分類されたアミノ酸は、バリン、ロイシン、アロイソロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンであり、0-60 分はクラスター2と同様に 60 分まで減少し、60 分で最低値

を示したが、その後 180 分にかけて投与前のレベルを超えるという特徴を示した。その他、特徴的な変動は示さなかったアミノ酸はクラスター4とした。なお、チロシンはクラスター4に分類されたものの、クラスター2と3に分類されたアミノ酸のおよそ中間に位置する経時の変動を示していた。

### 考察

本章では、健康な犬に静脈内糖負荷試験を行い、犬にインスリンが作用した時の血中アミノ酸の変動について検討した。

静脈内グルコース投与によるインスリンの分泌は 15 分をピークとし、60 分後では投与前 (0 分) の値に復していた。この時の PLS バッチモデリングによるスコアプロットを見ると、0、15、60 分のサンプルによる左側に位置するクラスターと 120、180 分のサンプルによる右側に位置するクラスターの 2 つのクラスが形成されており、血清中のグルコースおよびインスリンの変動により、血清中アミノ酸濃度が変動を受けると考えられた。特に、PLS バッチモデリングによるローディングプロットより、クラスター3に分類されたバリン、ロイシン、アロイソロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンは血清中インスリン値がピークを示す 0-60 分で有意に減少しており、インスリン動態に鋭敏に反応するアミノ酸であると考えられた。このうち、バリン、ロイシン、イソロイシンはインスリン依存的に system A amino acid transporter によって骨格筋への取り込みが促進されること (Peyrollier et al., 2000) から、犬においてもインスリン作用の低下を評価するのに有用なマーカーとなる可能性が考えられた。

ただし、本研究はインスリンの直接投与ではなく、グルコース投与によりインスリン分泌を促した時の影響でありグルコース代謝による影響を考慮しなければならない。この点に関しては、既に治療に外部からのインスリン投与が必要である 1 型糖尿病犬を実験に供し、インスリンの投与の有無やインスリン投与量に依存したこれらのアミノ酸変動を確認する必要がある。さらに現在、犬の糖尿病の診断および治療効果のモニタリングにも使用されているグルコアルブミン値 (Sako et al., 2009; Sako et al., 2008) との相関を確認することで、治療効果のモニタリング項目としても期待できるかもしれない。

## 小括

第3章までは細胞レベルでのインスリン作用が抑制された時の代謝産物変動を明らかにした。そこで本章では、健康な犬に静脈内糖負荷試験を行い、インスリン分泌を促した時の血清中代謝産物としてアミノ酸の変動について評価することで、犬にインスリンが作用した時の血中アミノ酸の変動について検討した。代謝産物の測定には、ガスクロマトグラフ質量分析計を使用し、23種のアミノ酸を測定した。

23種のアミノ酸データは多変量解析ソフトウェア SIMCA を用いた PLS バッチモデリングを行い、時間の進展をモデリングすることにより経時的変化に伴うアミノ酸の変動をローディングプロットにより可視化することができ、アミノ酸は4つのクラスターに分類された。このうちバリン、ロイシン、アロイソロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンにより形成されたクラスターはインスリンがピークを示す0-60分で有意に減少しており、とくに BCAA はインスリンに反応して速やかに骨格筋に取り込まれたと考えられた。今後さらなる検討は必要ではあるが、データを蓄積することで犬におけるインスリンによる治療効果のモニタリング項目としても期待できるかもしれない。



## 表および図

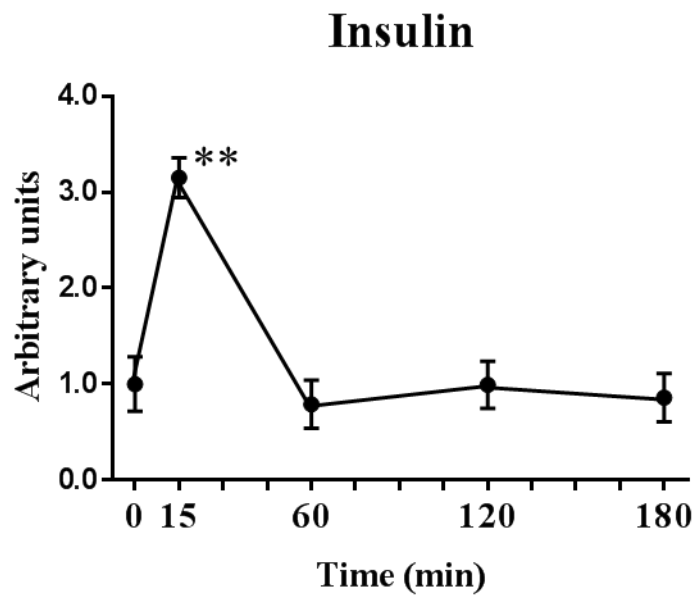
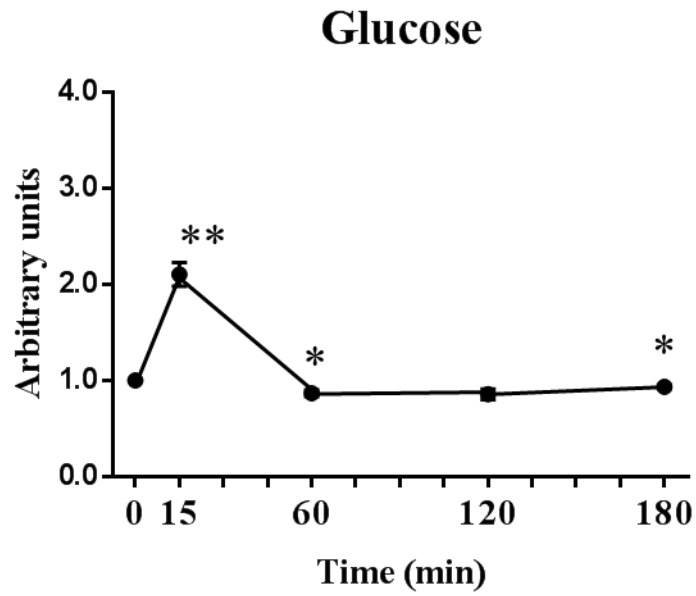


Fig. 4-1 静脈内糖負荷試験による 0-180 min の犬血清中グルコースおよびインスリン値の変動 (Mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$ )

Repeated measures one-way ANOVA

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0 min (Dunnett's multiple comparison test)



Fig. 4-2 犬静脈内糖負荷試験による 0-180 min のアミノ酸による PLS バッチモデリングスコアプロット (A) とローディングプロット (B)

サンプル数 25 ( $n = 5 \times 5$  タイムポイント)、変数 23 種および Y 変数として 0-180 min の時間を用い、第 1 主成分を横軸に、第 2 主成分を縦軸に表した。緑；0 min、青；15 min；赤；60 min、水色；120 min、橙；180 min (A)。1-4 の赤枠で囲まれたアミノ酸は共通の挙動であったことを示す (B)。

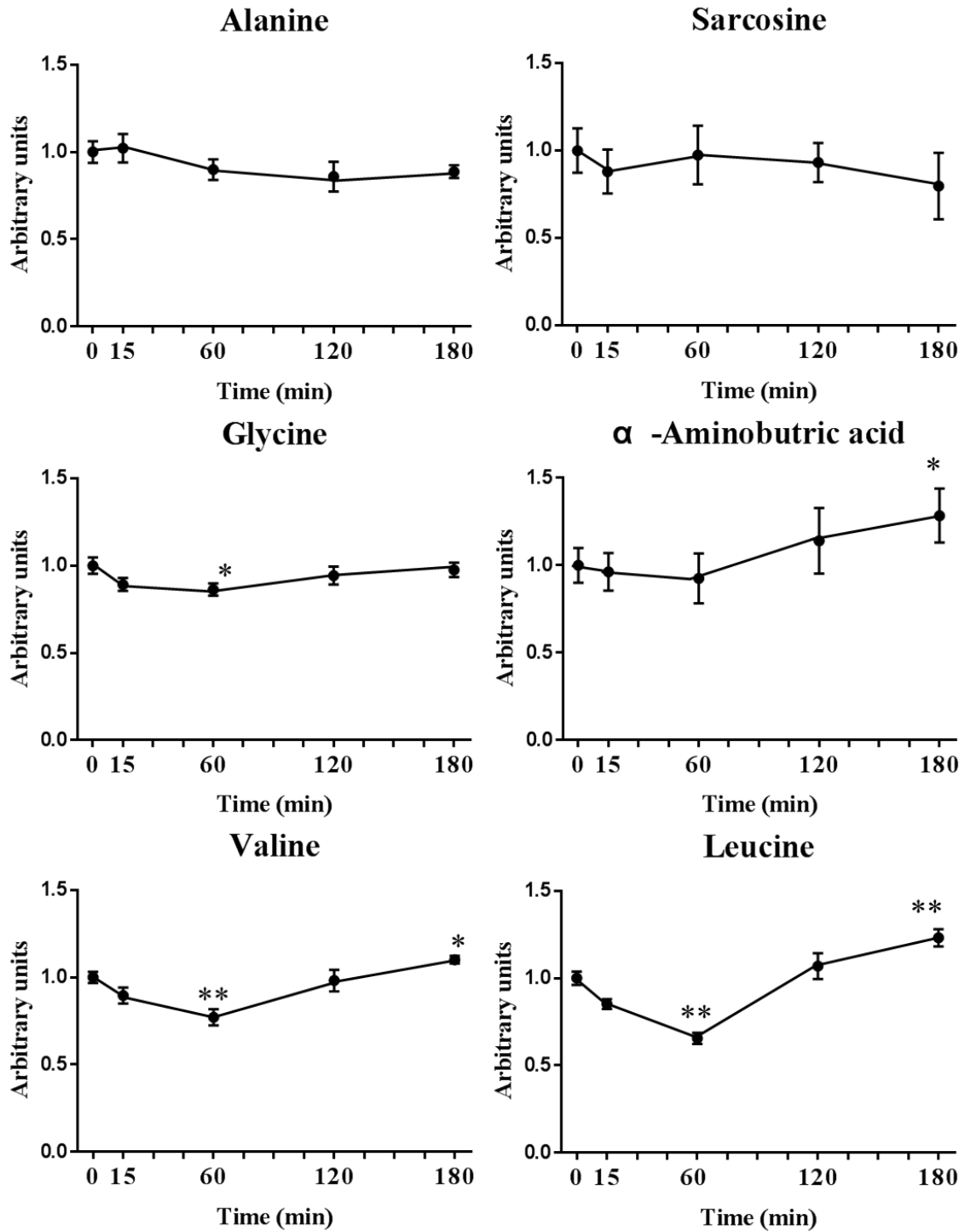


Fig. 4-3 静脈内糖負荷試験による 0-180 min の犬血清中アミノ酸値の変動 (Mean ± SEM,  $n = 5$ )

Repeated measures one-way ANOVA

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0 min (Dunnett's multiple comparison test)

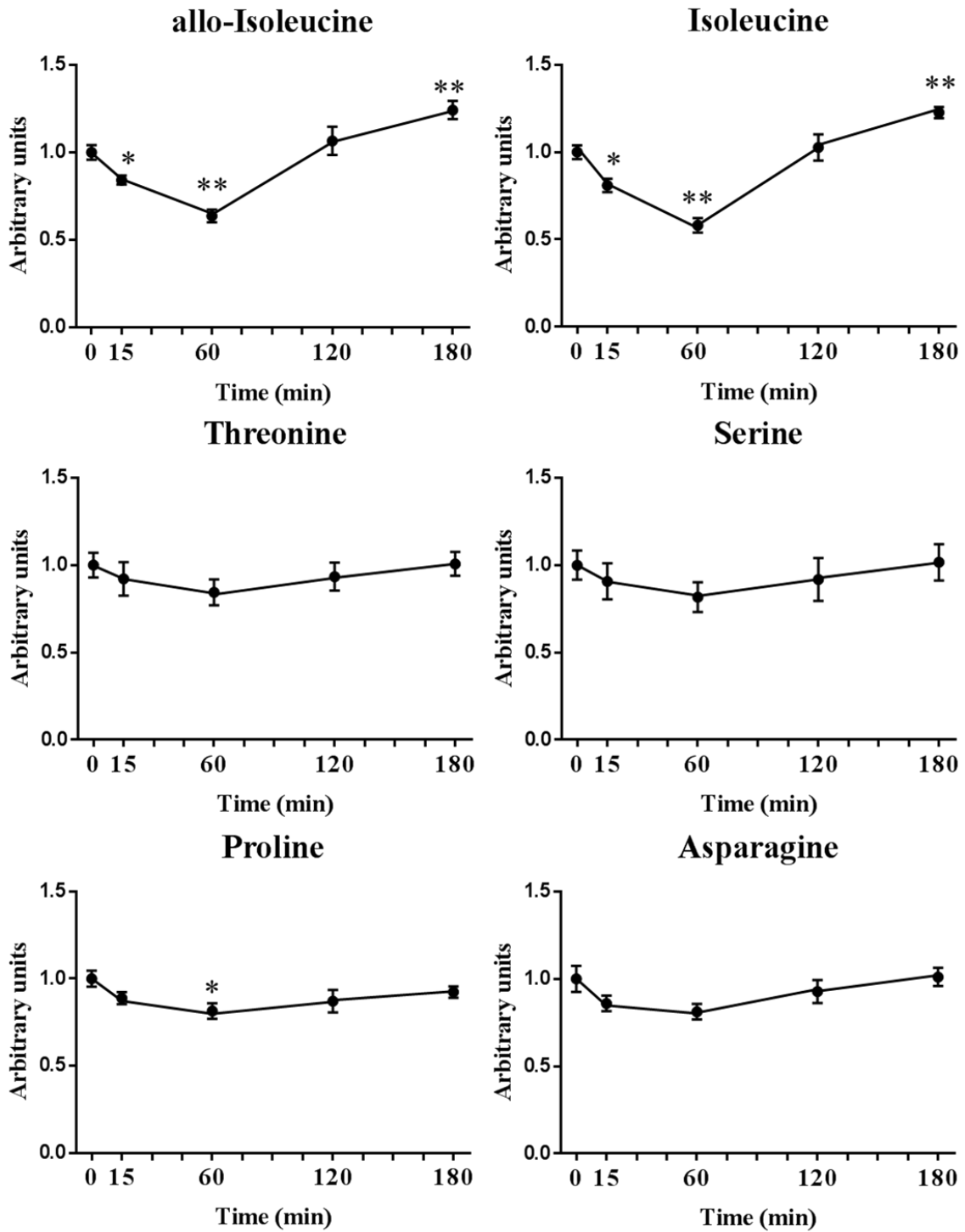


Fig. 4-3 Continued.

Repeated measures one-way ANOVA

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0 min (Dunnett's multiple comparison test)

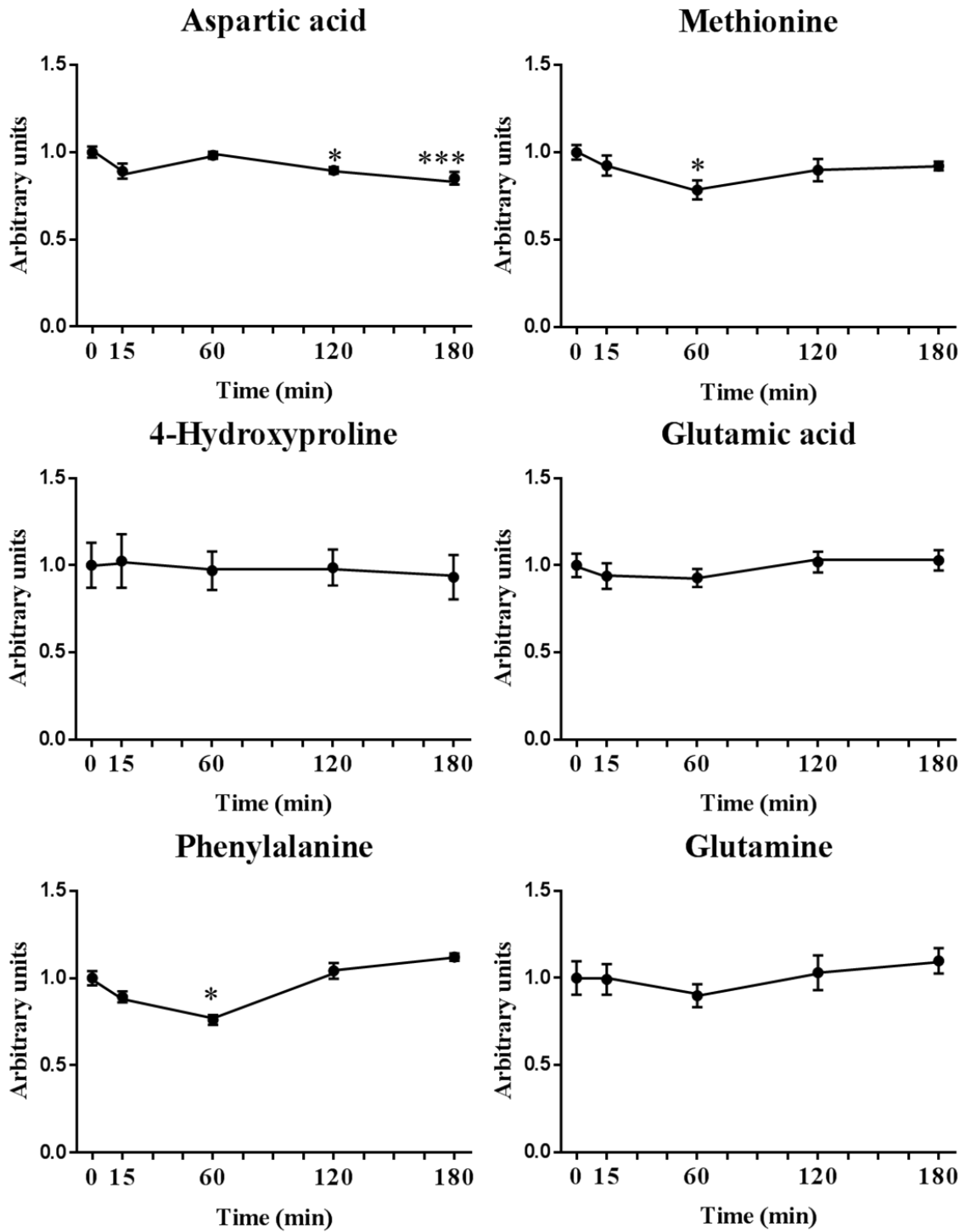


Fig. 4-3 Continued.

Repeated measures one-way ANOVA

\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 0 min (Dunnett's multiple comparison test)

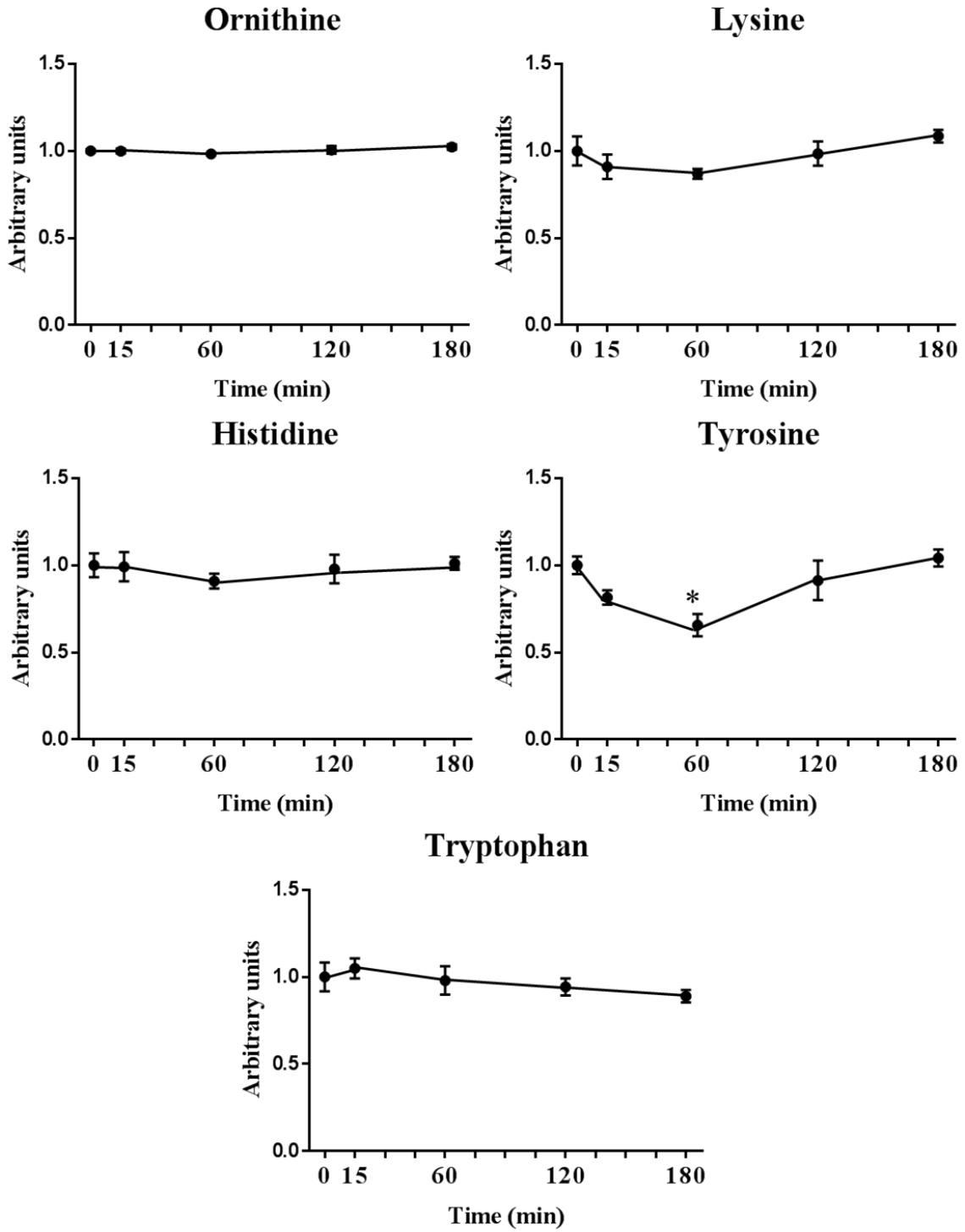


Fig. 4-3 Continued.

Repeated measures one-way ANOVA

\* $P < 0.05$  vs 0 min (Dunnett's multiple comparison test)

## 第 5 章

# 副腎皮質機能亢進症の犬と肥満犬の血清中代謝産物 の比較検討



## 緒言

本研究において、グルココルチコイドが犬の代謝に及ぼす影響として、第 1 章ではグルココルチコイドが犬の末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現量を低下させること、第 2 章では、培養した犬末梢血単核球中の代謝産物の解析から、デキサメサゾンによりグルコースの異化作用が減少していることを明らかにした。第 3 章では、デキサメサゾンにより犬筋管様細胞中の分岐鎖アミノ酸が著明に減少したことおよび、培養犬末梢血単核球と同様にグルコースの異化作用が減少していること、また TNF- $\alpha$  により増加した細胞内性  $\beta$ -アミノイソ酪酸は犬の肥満が糖尿病発症に至らない要因の一つである可能性を示した。第 4 章では、犬の個体レベルでの血中アミノ酸の変動はインスリン動態を反映していることを明らかにした。

ヒトでは肥満が原因となり発症に至る 2 型糖尿病が主体であり、近年医学領域で注目されているメタボロミクスは肥満や 2 型糖尿病の患者を対象に、新しいバイオマーカー探索や病態解明のために、数多くの研究がなされている(Badoud et al., 2014; Chen et al., 2008; Giesbertz et al., 2015; Godzien et al., 2011; Huo et al., 2015; Wallace et al., 2013; Wang et al., 2011; Xu et al., 2013; Yokoi et al., 2015; Zhang et al., 2009)。事実、NCBI が運営する PubMed データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) で「metabolomics, diabetes」をキーワードに論文を検索すると、2010 年までは 94 報であるのに対して、2015 年 12 月現在までには 659 報と、この 5 年間で約 7 倍に増加しており、肥満と糖尿病についての新しい知見が得られてきている。

一方で、犬の糖尿病はヒトの 1 型糖尿病が一般的であり、Verkest ら (2014) も報告しているように、ヒトと犬とでは肥満により生じる種々の変化に相違点も多い(Verkest, 2014)。そのため、犬の糖尿病発症機序の解明の研究については、医学領域で確立している糖尿病モデルげっ歯類を用いることはできず、犬固有の研究材料が必要になると考えられる。しかしながら、近年の動物福祉の観点から学術研究の目的であっても健康な犬を意図的に糖尿病状態にすることや、臓器組織サンプルを利用することは避けるべきである

そこで、本章では本研究でこれまでに得られてきた知見をもとに、糖尿病への進行が報告されている副腎皮質機能亢進症 (HAC) の犬と、糖尿病の発症と関連が示されていない肥満の犬を比較することで、HAC の慢性的なグルココルチコイドの過剰環境によるインスリン抵抗性から糖尿病に進行するメカニズムについての新たな知見を

得ることを目的とした。本章では、臨床症例を対象とする必要があり、検体採取から実際に分析するまでにある程度の日数を要することが考えられたため、採取が容易かつ、長期間の保存に適している血清検体を実験材料として用いることにした。血清検体を用いて第3-4章で個体レベルおよび細胞レベルで変動の認められた代謝産物のアミノ酸と脂肪酸をガスクロマトグラフ質量分析計 (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer: GC-MS) で定量した。また、獣医療臨床でも行われている血液生化学パラメータについても測定した。

## 材料および方法

### 供試動物

本学付属動物医療センターに来院し、副腎皮質機能亢進症 (hyperadrenocorticism: HAC) と診断された症例 17 頭 (雄 2 頭、去勢雄 7 頭、避妊雌 8 頭; 7-17 歳齢)、一般動物病院に健康診断を目的に来院した犬 28 頭および本学獣医内科学研究室で飼育されていた健常ビーグル犬 5 頭の計 50 頭を用いた。50 頭のうち HAC 症例犬を除く 33 頭は、5 段階ボディーコンディションスコア (body condition score: BCS) に基づき 3 および 3.5 を Control 群 ( $n=11$ ; 去勢雄 4 頭、雌 1 頭、避妊雌 6 頭; 1-12 歳齢)、4, 4.5, 5 を Obesity 群 ( $n=22$ ; 雄 3 頭、去勢雄 12、雌 1 頭、避妊雌 6 頭; 1-13 歳齢) とした。HAC 群の条件設定および ACTH 刺激試験は、第 1 章と同様に行った。これらの犬種、年齢、性別等の詳細は Table 5-1、5-2 に示した。HAC 群の血液採取は ACTH 刺激試験前に行い、血清分離を行った後、分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。Control 群および Obesity 群の血清サンプルは凍結状態で譲渡され、分析までは同様に  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保管した。

### 血清中のアミノ酸分析

血清サンプルの前処理およびアミノ酸の誘導體化は血清 100  $\mu\text{L}$  を使用し、第 3 章と同様の方法で行った。血清中アミノ酸濃度の定量に用いる検量線作成のために、EZ:faast に含まれるアミノ酸スタンダード溶液 (アミノ酸 32 種: アラニン、サルコシン、グリシン、 $\alpha$ -アミノ酪酸、バリン、 $\beta$ -アミノイソ酪酸、ロイシン、アロイソロイシン、イソロイシン、スレオニン、セリン、プロリン、アスパラギン、チオプロリン、アスパラギン酸、メチオニン、4-ヒドロキシプロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、 $\alpha$ -アミノアジピン酸、 $\alpha$ -アミノピメリック酸、グルタミン、オルニチン、グリシン

ープロリン、リシン、ヒスチジン、ヒドロキシリシン、チロシン、プロリンーヒドロキシプロリン、トリプトファン、シスタチオニン、シスチン; 各 200 nmol/mL) を 400  $\mu\text{mol/L}$  から 0.78  $\mu\text{mol/L}$  になるように調製した。ただし、L-アラニンと L-グルタミンは予備実験の結果から犬の血清中濃度が 400  $\mu\text{mol/L}$  以上を示すことが予想されたため、L-アラニン ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) および L-グルタミン ( $\geq 99\%$ , Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan) を使用して、800  $\mu\text{mol/L}$ 、1,200  $\mu\text{mol/L}$  になるように調製し、血清サンプルと同様に前処理および誘導体化を行った。

GC-MS による分析は GCMS-QP2010 Plus (SHIMADZU Co., Kyoto, Japan) を使用し、第 3 章と同様の方法で行い、それぞれのアミノ酸について I.S. であるノルバリンに対する相対面積値を算出した。同様にして分析した既知濃度のアミノ酸測定データから検量線を作成し、血清中のアミノ酸濃度の定量を行った。

#### 血清中の脂肪酸分析

血清サンプルの前処理および脂肪酸の誘導体化は血清 40  $\mu\text{L}$  を使用し、第 3 章と同様の方法で行った。

血清中脂肪酸濃度の定量のために標準物質として、ラウリン酸 ( $\geq 99\%$ , Sigma)、ミリスチン酸 ( $\geq 98\%$ , Wako)、パルミトレイン酸 ( $\geq 98.5\%$ , Sigma)、パルミチン酸 ( $\geq 99\%$ , Sigma)、マルガリ酸 ( $\geq 98\%$ , Sigma)、リノール酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan)、オレイン酸 ( $\geq 99\%$ , Sigma)、*cis*-バクセン酸 ( $\geq 97\%$ , Sigma)、ステアリン酸 ( $\geq 99\%$ , Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)、アラキドン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan)、エイコサペンタエン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi)、ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi)、ドコサヘキサエン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi)、ドコサペンタエン酸 ( $\geq 98\%$ , Funakoshi) を使用した。各化合物をエタノールあるいはヘキサンで 3,000  $\mu\text{g/mL}$  から 0.98  $\mu\text{g/mL}$  になるように調製し、血清サンプルと同様に前処理および誘導体化を行った。

GC-MS による分析は GCMS-QP2010 Plus (SHIMADZU Co.) を使用し、第 3 章と同様の方法で行い、それぞれの脂肪酸について I.S. であるエチルアラキジン酸に対する相対面積値を算出、脂肪酸標準物質の測定データから作成した検量線を用いて、血清中の脂肪酸濃度の定量を行った。

## 血清生化学パラメータ測定

乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase; AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase; ALT)、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP)、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen; BUN)、クレアチニン (creatinine; CRE)、トリグリセライド (triglyceride; TG)、総コレステロール (total cholesterol; Tcho)、血清グルコース (serum glucose; Glc)、総タンパク質 (total protein; TP) の 10 項目は全てオートアナライザーを用いて測定した (JCA-BM2250; JEOL Ltd, Tokyo, Japan)。血清インスリン濃度は市販のキットを用いて測定した (Dog Insulin ELISA KIT; Shibayagi, Gunma, Japan)。

## 脂肪酸 *de novo* 酵素活性

脂肪酸の *de novo* 酵素活性の指標となる不飽和化酵素活性、伸長酵素活性は生成物質と前駆物質の比率により評価することが出来る (Kotronen et al., 2009)。本章では得られた脂肪酸濃度を用いて、不飽和化酵素として stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 活性をオレイン酸/ステアリン酸 (18:1n-9/18:0) により、 $\Delta 5$  desaturase 活性をアラキドン酸/ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸 (20:4n-6/20:3n-6) により求めた (Nakamura and Nara, 2004)。伸長酵素としては、パルミチン酸を前駆物質とする elongase ( $C_{16} \rightarrow C_{18}$ ) 活性をステアリン酸/パルミチン酸 (18:0/16:0) により (Nakamura and Nara, 2004)、エイコサペンタエン酸を前駆物質とする elongase ( $C_{20} \rightarrow C_{22}$ ) 活性をドコサペンタエン酸/エイコサペンタエン酸 (22:5n-3/20:5n-3) により求めた (Van Woudenberg et al., 2012)。

## 統計処理

Control群、Obesity群およびHAC群の各群に特徴的な代謝産物を探索するために、SIMCA 13.0.3 (Umetrics AB, Umeå, Sweden) を用いて、主成分分析 (principal component analysis: PCA) を行った。3群間の比較は部分最小二乗法判別分析 (Partial Least Square-Discriminant Analysis: PLS-DA) で行い、2群間の比較には直交部分最小二乗判別分析 (Orthogonal PLS-DA: OPLS-DA) を用いた。

全ての結果はMean  $\pm$  SEMで表した。Control群、Obesity群およびHAC群の3群間の血清中代謝産物量および脂肪酸*de novo*酵素活性の有意性の評価はKruskal-Wallis test、post hoc testとしてDunn's multiple comparisons testを用いた。2群間の有意性の評価は

Mann-Whitney *U* testを用いた。全ての検定にはGraphPad Prism analysis software 6.05 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, U.S.A) を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

## 結果

### 血清中アミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータの3群間比較

GC-MS 分析および生化学パラメータ測定により得られた、サンプル数 50 (Control 群  $n = 11$ , Obesity 群  $n = 22$ , HAC 群  $n = 17$ ) と変数 50 種 (アミノ酸 25 種、脂肪酸 14 種、生化学パラメータ 11 種) からなるデータセットを用いて多変量解析を行った。まず、PCA により得られた第 1 主成分 (横軸) と第 2 主成分 (縦軸) に基づく、スコアプロットの結果を Fig. 5-1 に示した。その結果 PCA では、Control 群、Obesity 群と HAC 群の 3 群を 3 つの区分に明確に分類されなかった。続いて、PCA と同じ測定データを用いて、PLS-DA を行ったところ Control 群と Obesity 群で一部重なりがあるものの、おおむね 3 つの区分に分類された (Fig. 5-2A)。PLS-DA でのローディングプロット (Fig. 5-2B) を見ると、Control 群に対応する右下の領域にプロットされた代謝産物が少ないことから、Control 群に比べて、Obesity 群および HAC 群で増加している代謝産物が多いことが分かり、かつ Obesity 群に対応する右上の領域と HAC 群に対応する左下の領域を見ると、Obesity 群では LDH、チロシン、グルタミン、セリンおよびヒスチジンが多く、一方で HAC 群では ALT、ALP、リノール酸、マルガリ酸および TG が多いことが分かった。また、HAC 群と Obesity 群の両群の特徴を反映する左上の領域には、イソロイシン、バリン、リシンおよびフェニルアラニンがプロットされており、両群に共通して増加していることが分かった。しかしながら、PLS-DA においても Control 群と Obesity 群に重なりが見られたように、今回のデータセットでは 3 群の分離に必要な情報が十分ではないと考えられた。

そこで、血清中の個々のアミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータの結果について、Control 群、Obesity 群および HAC 群の 3 群間での有意性の評価をするために多重比較検定を行った (Table 5-3)。Control 群と比較して Obesity 群でのみ有意な増加が認められたのは LDH のみであり、PLS-DA ローディングプロット上でも Obesity 群の目的変数の点に近くプロットされていたが、チロシン、グルタミン、セリンおよびヒスチジンについては多重比較検定では有意差は認められなかった。Control 群と比較して HAC 群でのみ有意な増加が認められたのは、アラニン、アスパラギン酸、グ

ルタミン酸、オルニチン、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、マルガリ酸、リノール酸、オレイン酸、ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸、ALT、ALP、TG および Tcho であった。PLS-DA ローディングプロット上で HAC 群の目的変数の点に近くプロットされた ALT、ALP、リノール酸、マルガリ酸および TG は多重比較検定においても HAC 群での有意な増加を認めた。一方、グリシンは Control 群と比較して有意に減少しており、HAC 群の目的変数の点からも原点と対称的な位置にプロットされていた。

Control 群と比較して Obesity 群と HAC 群の両群で有意な増加が認められたのは、BCAA であるバリン、イソロイシンとフェニルアラニン、リシン、パルミトレイン酸、*cis*-バクセン酸、ステアリン酸およびインスリンであり、PLS-DA ローディングプロット Control 群の目的変数の点と原点と対称的な位置にプロットされていた。

また、多重比較検定において Obesity 群と HAC 群の間に有意差が認められたのは、シスチン、ALT および ALP であり、特にシスチンは Obesity 群で Control 群よりも減少傾向であり、HAC 群で増加傾向を示しており、Obesity 群と HAC 群の違いを特徴付けている。

#### Obesity 群と HAC 群の血清中アミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータの比較

インスリン抵抗性を惹起する異なる要因である肥満と副腎皮質機能亢進症による影響を明らかとするために、Obesity 群と HAC 群の 2 群を OPLS-DA により比較した。Fig. 5-3A に示すようにスコアプロットは、比較的良好に 2 群を 2 つの区分に分離した。また、Fig. 5-3B に示した s-plot により Obesity 群と HAC 群を 2 群に分類するのに、細胞を用いた第 3 章では寄与率の絶対値 0.15 以上を基準としたが、ここでは生体における変化をより多く抽出することを目的に、分離の寄与率の絶対値 0.1 以上を基準として代謝産物を抽出した。この基準を満たしたものは、グルタミン、LDH、ALP、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、TG、ALT、アラニン、ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸および *cis*-バクセン酸の 12 種類であった。これら 12 種類の代謝産物について 2 群間の比較を Mann-Whitney *U* test によって行った (Fig. 5-4)。その結果、Obesity 群に対して HAC 群では、グルタミンが 0.83 倍 ( $P < 0.05$ )、LDH が 0.52 倍 ( $P < 0.05$ ) 有意に低値を示した一方で、パルミチン酸は 1.41 倍 ( $P < 0.05$ )、リノール酸は 1.45 倍 ( $P < 0.05$ )、オレイン酸は 1.53 倍 ( $P < 0.05$ )、ALT は 2.26 倍

( $P < 0.01$ )、ALP は 3.52 倍 ( $P < 0.001$ ) および TG は 2.34 倍 ( $P < 0.05$ ) 有意に高値を示していた。

#### 脂肪酸 *de novo* 酵素活性

得られた脂肪酸濃度を用いて脂肪酸 *de novo* 酵素活性の予測した (Table 5-4)。オレイン酸とステアリン酸の比により予測された stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 活性は、Obesity 群では Control 群と比較して増加傾向を示し、HAC 群では Control 群と比べて有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。アラキドン酸とジホモ  $\gamma$ -リノレン酸の比により予測された  $\Delta 5$  desaturase 活性は、HAC 群では Control 群と比較して低下傾向を示し、さらに Obesity 群と比較すると有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。ステアリン酸とパルミチン酸の比により予測された elongase ( $C_{16} \rightarrow C_{18}$ ) 活性、ドコサペンタエン酸とエイコサペンタエン酸の比により予測された elongase ( $C_{20} \rightarrow C_{22}$ ) 活性には有意な差は認められなかった。

#### 考察

本章ではインスリン抵抗性を惹起すると考えられている副腎皮質機能亢進症と肥満に着目し、Obesity 群と HAC 群の血清中アミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータを比較することによって、犬でのインスリン抵抗性と糖尿病発症メカニズムについて推察した。まず、3 群の血清中アミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータを用いて PCA を行ったが、3 群は明確な 3 つの区分に分類されず、特に Control 群と Obesity 群のプロットの多くが重なる結果となった。また、Obesity 群は Table 5-1 に示したように BCS4、4.5 および 5 の肥満犬を含む群であるが、スコアプロット上では BCS に依存したプロットの分離は見られなかった。次に、目的変数 (試料群) を適切に説明できるように説明変数を選択して重み付けをする手法である PLS-DA による 3 群の分離を試みたところ、PCA と比べて良好な 3 つの区分を得ることが出来た。この時のローディングプロットから、Obesity 群でチロシンと LDH、HAC 群でリノール酸と ALP が高値を示すことが分かり、Control 群では特に高値を示す変数が見られないということが分かった。しかしながら、各主成分での情報の吸収量の指標となる第 1 主成分 (横軸) の寄与率は 22.9%、第 2 主成分 (縦軸) の寄与率は 14.4%、累積寄与率は 37.3% であり、計算されたモデルが十分に各群の違いを説明しているとは言えない。そこで、個々の血清中

のアミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータの結果について、Control 群、Obesity 群および HAC 群の 3 群間の有意性の評価をするために多重比較検定を行った。Dunn's multiple comparisons test の結果から Obesity 群と HAC 群間においてシスチン、ALT および ALP が HAC 群で有意に高値を示し、TP が Obesity 群で有意に高値を示すことが分かった。副腎皮質機能亢進症の犬の 80-95% で ALP が、50-80% で ALT が高値を示すことが知られており (Behrend, 2014; Stephen and Edward, 2010)、今回の結果も既報と一致していた。また、TP は Control 群と比べて、Obesity 群でやや高値、HAC 群でやや低値を示すものの Control 群との比較では有意な変動は認められなかった。BCAA であるバリンとイソロイシンは Control 群と比較し、HAC 群、Obesity 群ともに有意に高値で、またロイシンも有意差はないもののどちらの群も Control 群に対して高値であった。BCAA はヒトの 2 型糖尿病では血中で上昇することが知られている (Badoud et al., 2014; Newgard et al., 2009; Wang et al., 2011)。インスリン抵抗性が生じると細胞内への BCAA 取り込みが抑制されるからであり (Peyrollier et al., 2000)、したがって本研究での HAC 群、Obesity 群ともにインスリン抵抗性が生じていたと考えられる。

シスチンは、生体内（組織細胞内）では容易に酸化還元によりシステインと相互変換されるが、血清中ではシステインは容易に酸化されて大部分がシスチンとして存在している。ヒトにおいて総システイン（シスチン、システインの総称）は中性脂肪と同様に体脂肪率と非常に強い正の相関があることが報告されている (Elshorbagy et al., 2012b)。また Elshorbagy ら (2012) は、げっ歯類にシスチン過剰食を 12 週間給与したところ腹腔内糖負荷試験による耐糖能異常が生じたこと、および白色脂肪組織、肝臓、骨格筋において protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1 (PTP-1B) 遺伝子発現量が増加したことを報告している (Elshorbagy et al., 2012a)。PTP-1B はインスリン受容体とインスリン受容体基質のリン酸化を抑制する酵素であり、Lam ら (2006) によりげっ歯類に高脂肪食給与をすることでインスリン抵抗性が生じかつ、白色脂肪組織、肝臓、骨格筋における PTP-1B 発現量が増加したことが報告されている (Lam et al., 2006)。また、高濃度のシステインおよびシステインから生じる硫化水素は、膵  $\beta$  細胞におけるインスリン分泌を抑制することも報告されている (Kaneko et al., 2006)。このように、ヒトでは、総システインの増加は肥満と密接な関係があり、2 型糖尿病の発症に至る要因の一つと考えられ、多くの研究報告がなされている (Bjorck et al., 2006; Buysschaert et al., 2000; Masuda et al., 2008; Seghieri et al., 2003)。さて、本研究における犬の血清中



シスチン濃度は Control 群で  $26.1 \pm 2.3 \mu\text{mol/L}$ 、Obesity 群で  $20.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$ 、HAC 群で  $32.3 \pm 2.8 \mu\text{mol/L}$  であり、ヒトと異なり肥満での増加が認められず、かつ Obesity 群と比較して HAC 群で有意に高値を示している。ヒトやげっ歯類でのシスチンの増加は PTP-1B 遺伝子発現量の増加につながり、インスリンシグナリング抑制やインスリン分泌抑制に寄与しているが、本実験の結果は肥満した犬でシスチンが増加しなかったことから、犬が肥満しても糖尿病発症に至らない一因である可能性がある。一方、グルココルチコイドの過剰は含硫アミノ酸パスウェイにおいて、メチオニンから生じるホモシステインの再メチル化の抑制、ホモシステインのシスタチオン化の促進、システインからタウリン合成経路の抑制により、ホモシステイン由来のシスチンを増加させることが報告されており、ヒトのクッシング症候群では血清中ホモシステインの増加とタウリンの減少が確認されている(Faggiano et al., 2005)。本研究における HAC 群でのシスチン増加も同様のスキームによるものであると推測され、過剰なシスチンはインスリン分泌抑制とインスリンシグナリング抑制に繋がることから、犬の副腎皮質機能亢進症から糖尿病発症に至る機序の一因であるかもしれない。

次に、副腎皮質機能亢進症と肥満による影響の違いについてさらに詳しく検討するために、Obesity 群と HAC 群の 2 群を OPLS-DA により比較した。s-plot と Mann-Whitney *U* test の結果から Obesity 群と HAC 群間において ALP、ALT に加えて、グルタミンと LDH が HAC 群で有意に低値を示し、リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸および TG が HAC 群で有意に高値を示すことが分かった。犬の ALP アイソザイムには肝性 ALP、骨性 ALP に加えて肝細胞中にコルチコステロイド誘導性 ALP がある(Sanecki et al., 1987)。そのため、HAC 症例犬では血清 ALP 値が高値を示すことが知られており(Jensen and Poulsen, 1992; Teske et al., 1989)、本研究においても同様の結果を示した。また、グルココルチコイドによる血清 ALT 値の増加は ALT をコードする遺伝子の発現量増加ではなく(Hadley et al., 1990)、肝細胞におけるグルコーゲン蓄積や血流量増加、肝細胞壊死によるものである(Stephen and Edward, 2010)。さらに慢性的なグルココルチコイド過剰により脂肪組織への脂質蓄積が生じ、また生体での脂肪分解が亢進されることで、血清 TG および Tcho 値は高値を示し、肥満では過剰な脂肪の摂取に伴い血清 TG は高値となる。ステアリン酸からオレイン酸を生成する不飽和化酵素の stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 活性を算出したところ、HAC 群では Control 群と比較して有意に高値を示した。一方、ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸の不飽和酵素でありアラキドン酸の生成

に関わる  $\Delta 5$  desaturase 活性については HAC 群では Obesity 群よりも有意に低値を示していた。種々の炎症性メディエーターはアラキドン酸から産生されるが、グルココルチコイドは強力な抗炎症作用を有しており、今回の結果はその作用の一つとしてアラキドン酸合成に関与する  $\Delta 5$  desaturase 活性の抑制が生じたものと考えられた。生体において脂肪酸 *de novo* 合成は肝臓で行われており、HAC 群では stearyl-Coenzyme A desaturase 1 活性、 $\Delta 5$  desaturase 活性が有意に変動していたことおよび、血清 ALP、ALT の有意な増加から肝臓での代謝が副腎皮質機能亢進症による慢性的なグルココルチコイド過剰により影響を受けたと考えられる。また、ヒトにおいて stearyl-Coenzyme A desaturase 1 活性は肝臓の脂質量と正の相関があると報告されており (Kotronen et al., 2009; Peter et al., 2010)、肝臓での脂質増加は、脂質を材料とした糖新生が亢進し、高血糖をもたらす要因となる。このことから、HAC 群では Obesity 群よりも肝臓での糖新生が亢進していることが示唆され、副腎皮質機能亢進症の犬では血中グルコース濃度が上昇しやすいと考えられた。

さらに、ヒトの 2 型糖尿病では健常者や境界型糖尿病患者に比べて血中グルタミン濃度が有意に低く、グルタミン濃度は、空腹時の血糖値、インスリン濃度、インスリン抵抗性指数である HOMA-IR と有意に負の相関が認められたことが報告されている (Mansour et al., 2015)。また、2 型糖尿病患者にグルタミンサプリメントを 6 週間投与したところ、プラセボ群と比べて有意に HbA<sub>1c</sub> が低値を示したこと (Menge et al., 2010)、高脂肪食給与により糖代謝異常を誘導したマウスにグルタミンを増量し高脂肪食給与を続けたところおよそ 2 ヶ月後に空腹時の血糖値、インスリン濃度が有意に減少したことが報告されている (Opara et al., 1996)。本研究では供試動物のインスリン抵抗性指数は測定していないものの、HAC 症例犬では人工膵臓装置を用いた正常血糖高インスリングルコースクランプ法により測定された glucose infusion rate (GIR) が有意に低値を示し、インスリン抵抗性があることを確認している (Fukuta et al., 2012)。さらに、Miceli ら (2014) は空腹時の血糖値とインスリン濃度によりインスリン感受性指数として HOMA<sub>insulin sensitivity</sub> を算出しており、健常犬と比べて肥満犬群、下垂体性副腎皮質機能亢進症 (PDH) の症例犬群では有意に低く、かつ PDH 群では肥満犬群よりも有意に低値であったことが報告されている (Miceli et al., 2014)。すなわち、本研究における HAC 群での血清中グルタミン濃度の低下は、生体におけるインスリン抵抗性の増加 (インスリン感受性の低下) につながり、糖尿病発症の要因になると考えられた。

ただし、本研究に供試した HAC 症例犬の平均 ALT 値が犬の基準値 20-99 U/L (株式会社モノリスから引用 ; <http://www.monolis.com/publics/index/43/>) を上回っており、肝細胞の膜透過性が昂進していることが示唆された。膜透過性の昂進により ALT のみならず、肝細胞内の微細成分も血中に流出していると考えられ、HAC 群で認められた変化はグルココルチコイドだけでなく、肝細胞から逸脱した物質による影響も考慮しなければならない。少なくとも、HAC 群で認められた血中 BCAA の増加とグルタミンの減少は、グルココルチコイドの影響によるものだと結論付けられたが、グルココルチコイド以外の影響を除外して検討するためには、ステロイドホルモンであるプロゲステロンが高値を示す黄体期の犬の血液を分析に供試し、比較することが必要であると考える。

今回の実験から、犬の肥満あるいは副腎皮質機能亢進症により変動する血清中代謝産物が明らかとなり、これらの変化はインスリン抵抗性発現を示唆するものであった。さらに、肥満群と副腎皮質機能亢進症群間で異なる血清中代謝産物についても明らかになり、このことは、副腎皮質機能亢進症が糖尿病発症に至るメカニズムの解明につながると考えた。

#### 小括

本章では、インスリン抵抗性から糖尿病へ進行するケースが知られている HAC 症例犬を対象とし、インスリン抵抗性は生じるものの糖尿病の直接的な原因とはされていない肥満犬を比較対象に、副腎皮質機能亢進症および肥満が惹起するインスリン抵抗性の違いを代謝産物レベルで比較した。代謝産物の測定には、GC-MS を使用し、25 種のアミノ酸と 14 種の脂肪酸の定量を行い、また 11 項目の生化学パラメータの測定を行った。

解析の結果、HAC 群では Obesity 群と比較し、ALP と ALT が有意に高値を示した。犬の ALP アイソザイムにはコルチコステロイド誘導性 ALP があることが知られている。また ALT についても過剰のグルココルチコイドにより肝細胞壊死を起し高値を示すことが報告されており、これらの変化は既報と一致する結果であった。

血液中のシスチンは、ヒトでは肥満と強い正の相関があるとされているが、本研究において Control 群と比較して、HAC 群では有意な増加を認め、Obesity 群では減少傾向であるという、ヒトとは異なる動態が示された。ヒトでは、過剰なシスチンはイン

スリン分泌抑制とインスリンシグナリング抑制に繋がることが報告されている。また、HAC 群で、Obesity 群に対して有意に血清中グルタミンが低下しており、グルタミンの低下はインスリン感受性の低下に繋がるとされている。さらに、stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 活性が HAC 群は Obesity 群より上昇していた。これはヒトにおいて肝臓での糖新生が亢進していることを示す指標である。BCAA であるバリンとイソロイシンは Control 群と比較し、HAC 群、Obesity 群ともに有意に高値であった。BCAA はヒトの 2 型糖尿病では血中で上昇するが、これはインスリン抵抗性が生じると細胞内への BCAA 取り込みが抑制されるからであると説明されている。したがって、本研究でも HAC 群、Obesity 群ともにインスリン抵抗性が生じていたと考えられる。

これらのことから、HAC 群、Obesity 群のどちらでも Control 群に比べてインスリン抵抗性が生じていたが、HAC 群は、Obesity 群と比較してインスリン感受性が低下し、糖新生も亢進しており、より糖尿病を発症しやすい状態であると考えられる。

以上のように、HAC 群で認められるが Obesity 群では認められない、これらの代謝産物の違いは、犬の副腎皮質機能亢進症が糖尿病発症に至る一方、犬の肥満が糖尿病に至らない一因を示しており、犬におけるインスリン抵抗性の増大と糖尿病の発症機序を解明していく上で有用な知見になると考えられる。

## 表および図

Table 5-1 供試動物（Control 群、Obesity 群）プロフィール

Classification	No.	Breeds	Age (years)	Gender	BW (kg)	BCS
Control	C1	Beagle	2	Castrated	11.20	3.0
	C2	Beagle	2	Castrated	11.20	3.0
	C3	Beagle	2	Castrated	11.00	3.0
	C4	Beagle	12	Spayed	10.00	3.0
	C5	Beagle	12	Spayed	9.80	3.0
	C6	Miniature Schnauzer	4	Castrated	8.60	3.0
	C7	Miniature Schnauzer	8	Spayed	5.00	3.0
	C8	Mix	1	Spayed	17.78	3.0
	C9	Miniature Dachshund	11	Spayed	3.55	3.5
	C10	Toy Poodle	10	Female	4.24	3.5
	C11	Golden Retriever	3	Spayed	27.90	3.5
Obesity	OB1	American Cocker Spaniel	4	Spayed	11.66	4.0
	OB2	Chihuahua	9	Castrated	3.55	4.0
	OB3	Miniature Schnauzer	5	Spayed	7.66	4.0
	OB4	Miniature Schnauzer	8	Spayed	6.20	4.0
	OB5	Beagle	8	Castrated	10.20	4.0
	OB6	Papillon	12	Male	7.20	4.0
	OB7	Toy Poodle	2	Castrated	3.50	4.0
	OB8	Miniature Dachshund	1	Spayed	6.86	4.0
	OB9	Labrador Retriever	4	Castrated	32.80	4.0
	OB10	Mix	4	Castrated	12.18	4.0
	OB11	Toy Poodle	4	Castrated	4.15	4.5
	OB12	Schipperke	4	Castrated	8.28	4.5
	OB13	Golden Retriever	4	Spayed	36.50	5.0
	OB14	Miniature Dachshund	7	Spayed	8.17	5.0
	OB15	Miniature Dachshund	13	Castrated	10.80	5.0
	OB16	Miniature Dachshund	10	Castrated	10.80	5.0
	OB17	Pomeranian	3	Castrated	10.80	5.0
	OB18	Shih Tzu	12	Male	10.82	5.0
	OB19	Golden Retriever	3	Female	30.00	5.0
	OB20	Miniature Dachshund	5	Castrated	9.46	5.0
	OB21	Schipperke	2	Castrated	9.80	5.0
	OB22	Miniature Dachshund	8	Male	9.80	5.0

Table 5-2 供試動物 (HAC 群) プロフィール

Classification	No.	Breeds	Age (years)	Gender	Cortisol concentration ( $\mu\text{g/dL}$ )		Adrenal glands sizes (mm)		Clinical signs
					pre ACTH stimulation	post ACTH stimulation	Right	Left	
Hyperadrenocorticism	HAC1	Miniature Dachshund	17	Castrated	4.61 (8.60)	9.24 (37.1)	(5.4)	(7.6)	PU/PD, decreased activity, polyphagia
	HAC2	Miniature Schnauzer	17	Castrated	4.13 (3.77)	7.46 (41.9)	4.5 (N.D.)	6.0 (6.7)	PU/PD, polyphagia
	HAC3	Miniature Dachshund	9	Castrated	3.88 (6.57)	16.8 (21.0)	6.2 (3.0)	5.6 (4.0)	PU/PD, pendulous abdomen, polyphagia
	HAC4	Miniature Dachshund	13	Male	1.53 (2.80)	10.3 (48.5)	5.9 (8.5)	7.7 (10.2)	dermatologic problem
	HAC5	Maltese	14	Spayed	(N.A.)	(23.8)	(5.3)	(5.6)	PU/PD, dermatologic problem
	HAC6	Miniature Dachshund	8	Male	(9.98)	(>50.0)	(5.6)	(10)	PU/PD, dermatologic problem, polyphagia
	HAC7 <sup>a</sup>	Yorkshire Terrier	10	Castrated	5.09	9.24	8.9	6.6	PU/PD, dermatologic problem
	HAC8	Shih Tzu	10	Spayed	6.44 (7.54)	34.9 (38.2)	7.3 (N.A.)	6.2 (N.A.)	PU/PD, dermatologic problem, decreased activity
	HAC9	Miniature Dachshund	12	Spayed	2.17 (4.50)	7.77 (39.3)	28.7 (13.4)	12.5 (7.2)	PU/PD, polyphagia
	HAC10	Portuguese Water Dog	10	Castrated	3.27 (8.80)	4.91 (30.3)	12.8 (1.15)	10.9 (0.56)	PU/PD, polyphagia
	HAC11	Beagle	7	Spayed	7.67 (7.70)	7.22 (44.8)	9.0 (10)	11 (8.4)	PU/PD, dermatologic problem, panting
	HAC12 <sup>a</sup>	Toy Poodle	8	Spayed	1.52	1.22	8.2	8.7	no sign
	HAC13	Mix	9	Spayed	1.54 (7.50)	9.72 (31.5)	(9.8)	(8.2)	PU/PD, dermatologic problem, polyphagia
	HAC14	Toy Poodle	10	Castrated	4.38 (5.00)	11.1 (59.7)	4.1 (7.3)	4.9 (7.3)	PU/PD, dermatologic problem, polyphagia
	HAC15	Maltese	8	Spayed	6.28 (3.20)	10.1 (>50.0)	(6.4)	(6.1)	PU/PD, pendulous abdomen, polyphagia
	HAC16	Miniature Dachshund	10	Spayed	1.87 (11.1)	7.51 (36.6)	8.3 (7.4)	8.2 (7.3)	PU/PD, dermatologic problem, polyphagia
	HAC17	Mix	14	Castrated	3.77 (6.10)	10.2 (25.6)	6.5 (10.1)	7.9 (10.2)	PU/PD, polyphagia, panting

a; HAC 症例犬のうち No. 7 と No. 12 は本学付属動物医療センター初診時に既にホームドクターにてトリロスタン治療を受けていた。

初診時のコルチゾール値および副腎サイズは括弧内に示した。

HAC, hyperadrenocorticism; PU/PD, polyuria polydipsia; N.A., not applicable.

Table 5-3 Control 群、Obesity 群、HAC 群の血清中アミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータ

Metabolite	Mean $\pm$ SEM			Kruskal-Wallis test <i>P</i> value	posthoc Dunn's multiple comparisons test <i>P</i> value		
	Control ( <i>n</i> = 11)	Obesity ( <i>n</i> = 22)	HAC ( <i>n</i> = 17)		Control vs Obesity	Control vs HAC	Obesity vs HAC
Amino acid ( $\mu\text{mol/L}$ )							
Alanine	352 $\pm$ 35	434 $\pm$ 29	513 $\pm$ 35	0.0276	0.4830	0.0239	0.3445
Sarcosine	3.72 $\pm$ 0.56	2.70 $\pm$ 0.35	3.57 $\pm$ 0.42	0.0684			
Glycine	227 $\pm$ 14	216 $\pm$ 20	177 $\pm$ 13	0.0385	0.4392	0.0329	0.4963
alpha-Aminobutyric acid	35.2 $\pm$ 5.8	52.6 $\pm$ 5.9	45.1 $\pm$ 4.6	0.0516			
Valine	196 $\pm$ 13	268 $\pm$ 19	272 $\pm$ 29	0.0160	0.0191	0.0443	> 0.9999
Leucine	96.5 $\pm$ 9.0	128 $\pm$ 8	136 $\pm$ 14	0.0513			
allo-Isoleucine	1.20 $\pm$ 0.10	1.17 $\pm$ 0.11	1.08 $\pm$ 0.14	0.5573			
Isoleucine	46.6 $\pm$ 3.9	70.3 $\pm$ 5.6	71.4 $\pm$ 9.5	0.0056	0.0058	0.0246	> 0.9999
Threonine	152 $\pm$ 12	182 $\pm$ 14	184 $\pm$ 15	0.2547			
Serine	241 $\pm$ 14	250 $\pm$ 21	205 $\pm$ 16	0.2075			
Proline	208 $\pm$ 23	217 $\pm$ 16	209 $\pm$ 22	0.5895			
Asparagine	42.0 $\pm$ 2.8	46.6 $\pm$ 2.3	50.2 $\pm$ 3.3	0.1857			
Aspartic acid	5.85 $\pm$ 0.31	9.99 $\pm$ 1.81	8.07 $\pm$ 0.60	0.0269	0.1474	0.0230	> 0.9999
Methionine	68.5 $\pm$ 10.3	68.8 $\pm$ 6.0	71.4 $\pm$ 4.2	0.4148			
4-Hydroxyproline	320 $\pm$ 23	328 $\pm$ 17	301 $\pm$ 20	0.7032			
Glutamic acid	48.5 $\pm$ 5.1	72.6 $\pm$ 9.5	84.9 $\pm$ 7.7	0.0020	0.1970	0.0015	0.1148
Phenylalanine	52.5 $\pm$ 2.1	65.2 $\pm$ 2.4	64.7 $\pm$ 3.4	0.0022	0.0038	0.0057	> 0.9999
alpha-Aminoadipic acid	4.40 $\pm$ 0.33	7.13 $\pm$ 1.54	6.85 $\pm$ 0.88	0.1478			
Glutamine	1356 $\pm$ 107	1459 $\pm$ 84	1210 $\pm$ 71	0.1331			
Ornithine	66.1 $\pm$ 1.8	74.4 $\pm$ 3.8	84.5 $\pm$ 5.1	0.0089	0.5220	0.0084	0.1276
Lysine	277 $\pm$ 34	480 $\pm$ 49	488 $\pm$ 55	0.0038	0.0075	0.0075	> 0.9999
Histidine	174 $\pm$ 10	223 $\pm$ 13	198 $\pm$ 17	0.0701			
Tyrosine	84.1 $\pm$ 10.8	97.9 $\pm$ 6.3	79.2 $\pm$ 5.3	0.1423			
Tryptophan	207 $\pm$ 6	260 $\pm$ 15	243 $\pm$ 13	0.0861			
Cystine	26.1 $\pm$ 2.3	20.1 $\pm$ 0.4	32.3 $\pm$ 2.8	<0.0001	0.1169	0.2974	< 0.0001

(次のページに続く)



Table 5-3 (continued)

Metabolite	Mean $\pm$ SEM			Kruskal-Wallis test <i>P</i> value	posthoc Dunn's multiple comparisons test <i>P</i> value		
	Control ( <i>n</i> = 11)	Obesity ( <i>n</i> = 22)	HAC ( <i>n</i> = 17)		Control vs Obesity	Control vs HAC	Obesity vs HAC
Fatty acid ( $\mu\text{g/mL}$ )							
laurate;12:0	2.23 $\pm$ 0.23	16.7 $\pm$ 10.3	3.96 $\pm$ 0.87	0.0202	0.0519	0.0246	> 0.9999
myristate;14:0	11.8 $\pm$ 1.2	43.3 $\pm$ 16.7	32.5 $\pm$ 7.6	0.0075	0.1144	0.0053	0.5047
palmitoleate;16:1n-7	41.7 $\pm$ 2.5	71.7 $\pm$ 7.6	96.1 $\pm$ 16.8	0.0017	0.0249	0.0012	0.6576
palmitate;16:0	396 $\pm$ 28	568 $\pm$ 58	802 $\pm$ 137	0.0024	0.1690	0.0017	0.1529
margarate;17:0	8.63 $\pm$ 0.60	10.4 $\pm$ 0.6	14.3 $\pm$ 1.6	0.0046	0.2909	0.0036	0.1428
linoleate;18:2n-6	894 $\pm$ 71	1077 $\pm$ 78	1562 $\pm$ 179	0.0037	0.3856	0.0033	0.0888
oleate;18:1n-9	509 $\pm$ 47	852 $\pm$ 105	1301 $\pm$ 276	0.0007	0.0567	0.0004	0.1807
cis-vaccenate;18:1n-7	123 $\pm$ 9	184 $\pm$ 13	237 $\pm$ 37	0.0013	0.0160	0.0010	0.7819
stearate;18:0	681 $\pm$ 50	931 $\pm$ 59	1160 $\pm$ 138	0.0020	0.0410	0.0013	0.4860
arachidonate;20:4n-6	703 $\pm$ 94	977 $\pm$ 74	932 $\pm$ 80	0.0930			
EPA;20:5n-3	150 $\pm$ 26	168 $\pm$ 18	204 $\pm$ 49	0.9221			
DGLA;20:3n-6	43.0 $\pm$ 3.3	59.6 $\pm$ 4.9	83.9 $\pm$ 10.6	0.0026	0.0978	0.0017	0.2704
DHA;22:6n-3	168 $\pm$ 21	201 $\pm$ 19	224 $\pm$ 40	0.6240			
DPA;22:5n-3	115 $\pm$ 11	132 $\pm$ 7	143 $\pm$ 12	0.1273			
Biochemistry parameter							
LDH (IU/L)	66.8 $\pm$ 7.1	144 $\pm$ 21	75.4 $\pm$ 6.5	0.0197	0.0296	> 0.9999	0.1376
AST (U/L)	37.8 $\pm$ 3.2	31.1 $\pm$ 2.2	35.1 $\pm$ 8.8	0.0574			
ALT (U/L)	45.6 $\pm$ 7.1	51.1 $\pm$ 6.8	116 $\pm$ 35	0.0148	> 0.9999	0.0420	0.0353
ALP (U/L)	143 $\pm$ 19	355 $\pm$ 103	1249 $\pm$ 304	0.0003	0.8114	0.0007	0.0052
BUN (mg/dL)	13.5 $\pm$ 1.3	18.9 $\pm$ 1.6	20.0 $\pm$ 3.0	0.1601			
CRE (mg/dL)	0.76 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 0.04	0.72 $\pm$ 0.12	0.0619			
TG (mg/dL)	50.1 $\pm$ 11.8	147 $\pm$ 33	344 $\pm$ 87	0.0005	0.0890	0.0003	0.0853
Tcho (mg/dL)	184 $\pm$ 17	226 $\pm$ 14	245 $\pm$ 14	0.0425	0.4606	0.0368	0.5135
Glc (mg/dL)	96.6 $\pm$ 3.9	84.7 $\pm$ 5.5	103 $\pm$ 2	0.0773			
TP (g/dL)	6.48 $\pm$ 0.18	7.05 $\pm$ 0.17	6.36 $\pm$ 0.12	0.0067	0.1192	> 0.9999	0.0080
Insulin (ng/mL)	0.70 $\pm$ 0.08	1.53 $\pm$ 0.30	1.14 $\pm$ 0.11	0.0072	0.0092	0.0210	> 0.9999

Table 5-4 脂肪酸定量結果による算出した脂肪酸 *de novo* 酵素活性

	Mean $\pm$ SEM			Kruskal-Wallis test <i>P</i> value	posthoc Dunn's multiple comparisons test <i>P</i> value		
	Control ( <i>n</i> = 11)	Obesity ( <i>n</i> =22)	HAC ( <i>n</i> =17)		Control vs Obesity	Control vs HAC	Obesity vs HAC
stearoyl-Coenzyme A desaturase 1活性 (oleate;18:1n-9/stearate;18:0)	0.77 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.06	1.03 $\pm$ 0.07	0.0449	0.9572	0.0498	0.2502
$\Delta$ 5 desaturase活性 (arachidonate;20:4n-6/DGLA;20:3n-6)	16.5 $\pm$ 2.0	17.0 $\pm$ 1.0	13.0 $\pm$ 1.6	0.0469	>0.9999	0.3519	0.0457
elongase (C <sub>16</sub> →C <sub>18</sub> )活性 (stearate;18:0/palmitate;16:0)	1.72 $\pm$ 0.06	1.75 $\pm$ 0.08	1.57 $\pm$ 0.09	0.0843			
elongase (C <sub>20</sub> →C <sub>22</sub> ) (DPA;22:5n-3/EPA;20:5n-3)	1.25 $\pm$ 0.31	0.94 $\pm$ 0.11	1.09 $\pm$ 0.20	0.9687			

DGLA; ジホモ  $\gamma$ -リノレン酸、DPA; ドコサペンタエン酸、EPA; エイコサペンタエン酸

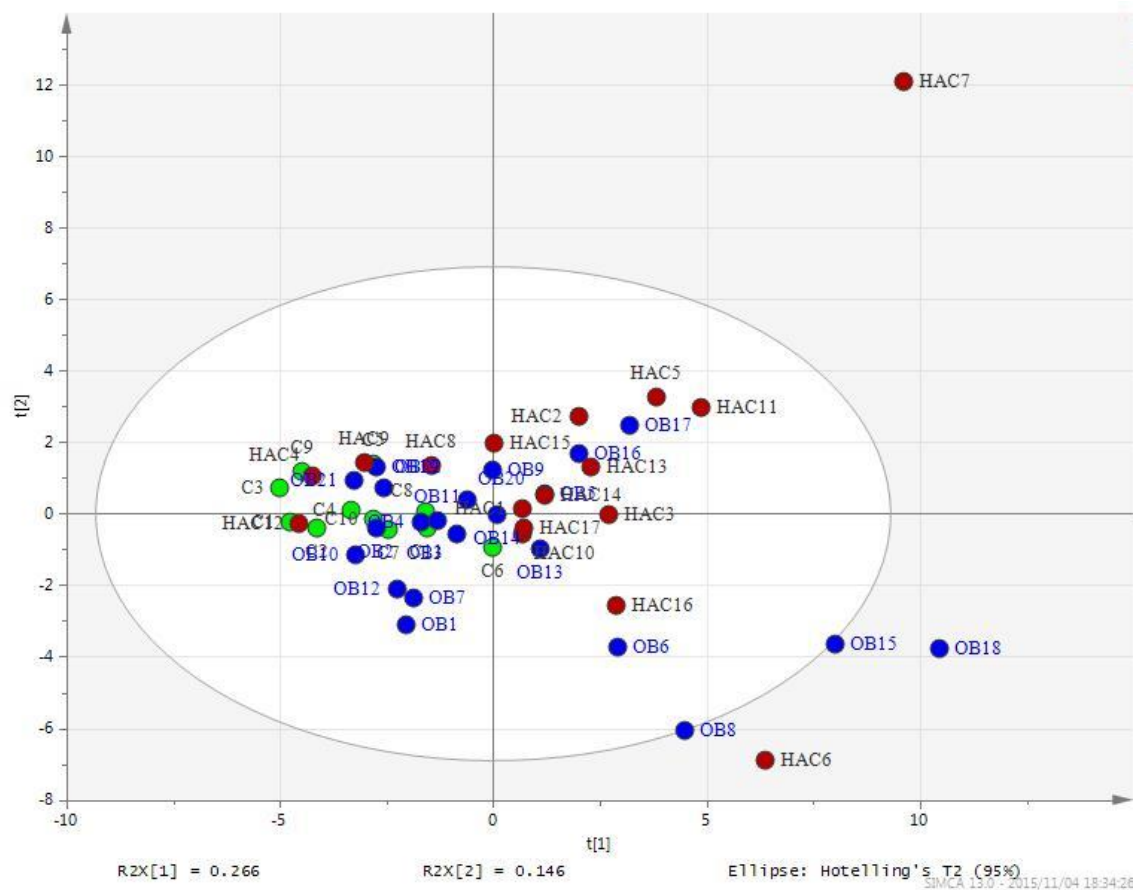


Fig. 5-1 3群の血清中アミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータによる PCA スコアプロット

データセットはサンプル数 50、変数 50 種からなり、第 1 主成分を横軸に、第 2 主成分を縦軸に表した。

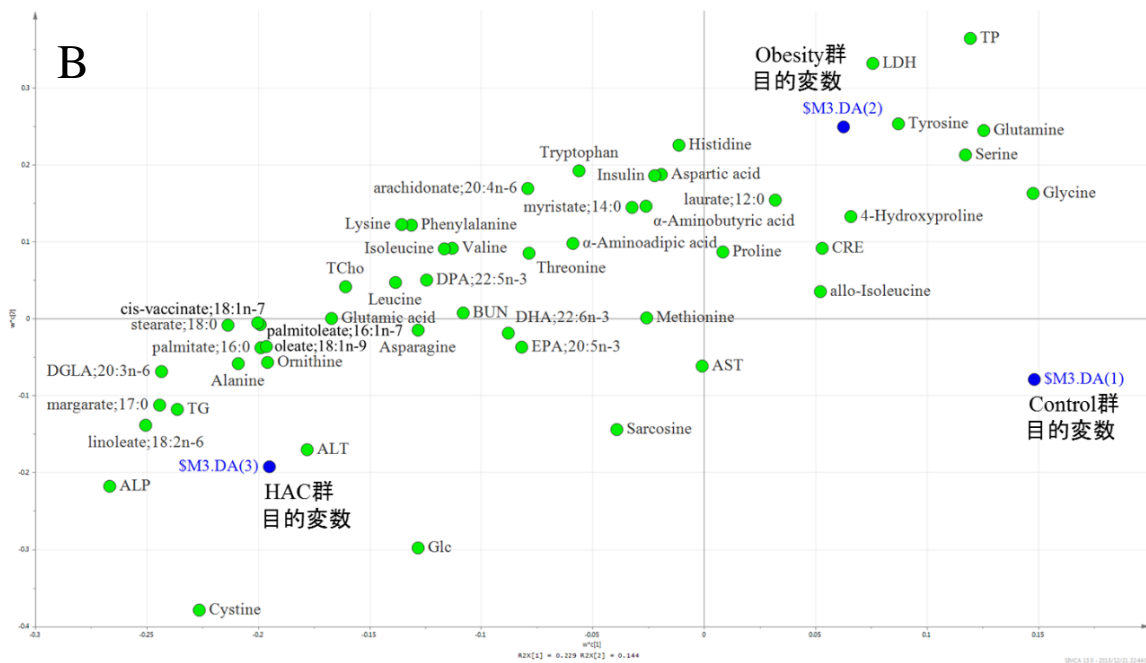
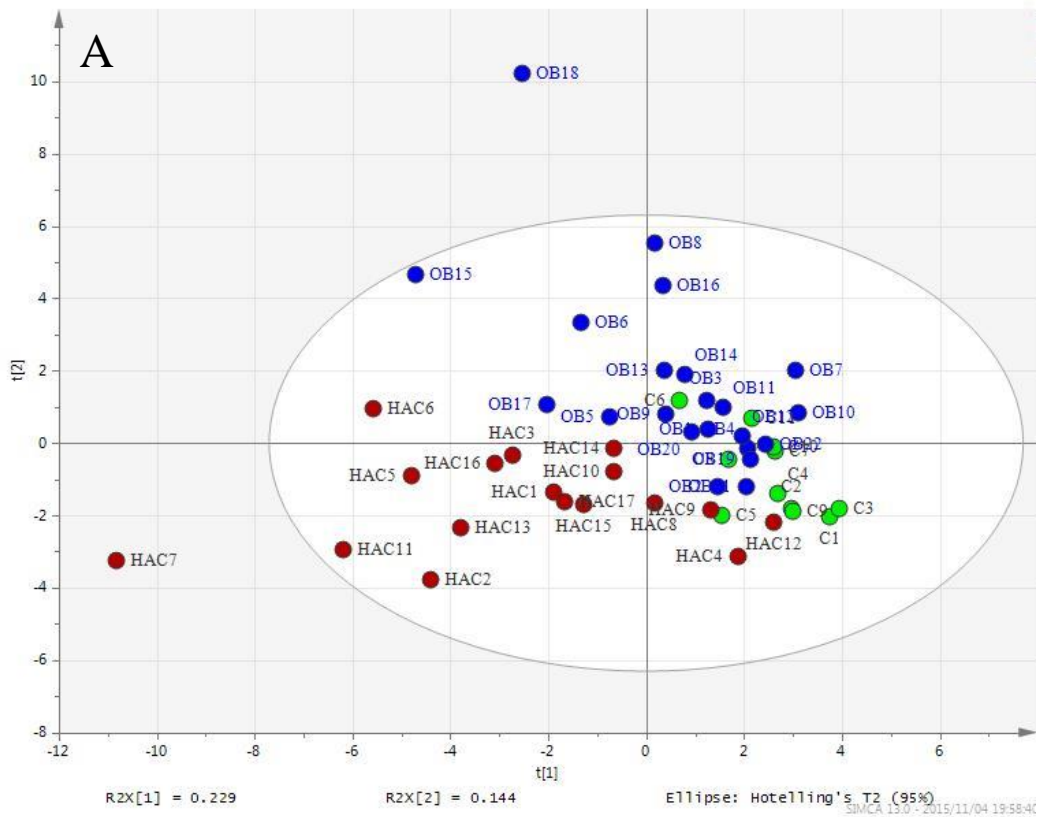


Fig. 5-2 3群の血清中アミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータによる PLS-DA スコアプロット (A) とローディングプロット (B)

データセットはサンプル数 50、変数 50 種からなり、第 1 主成分を横軸に、第 2 主成分を縦軸に表した。

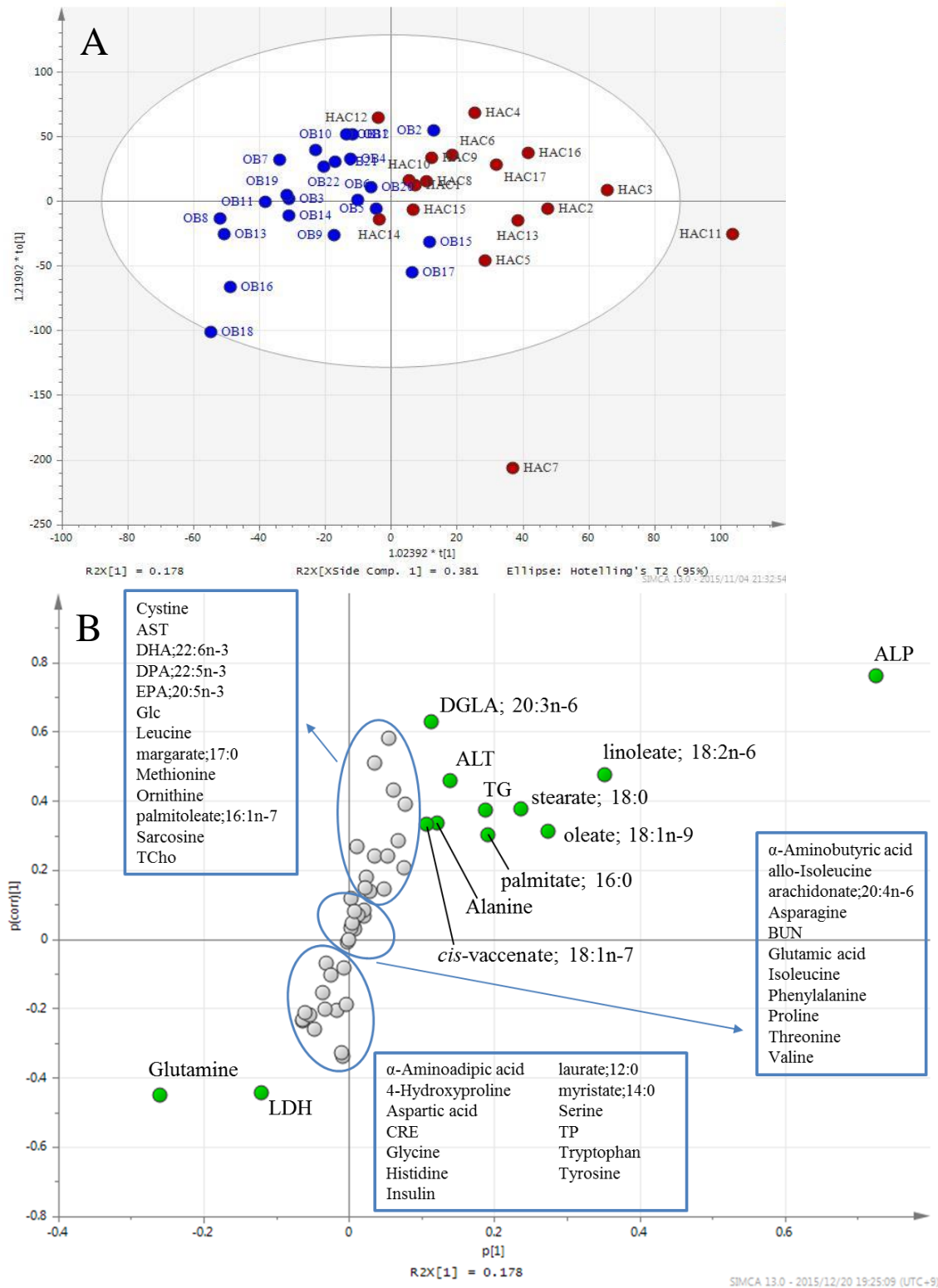


Fig. 5-3 Obesity 群と HAC 群の血清中アミノ酸、脂肪酸および生化学パラメータによる OPLS-DA スコアプロット (A) と s-plot (B) (データセット ; サンプル数 39、変数 50 種)

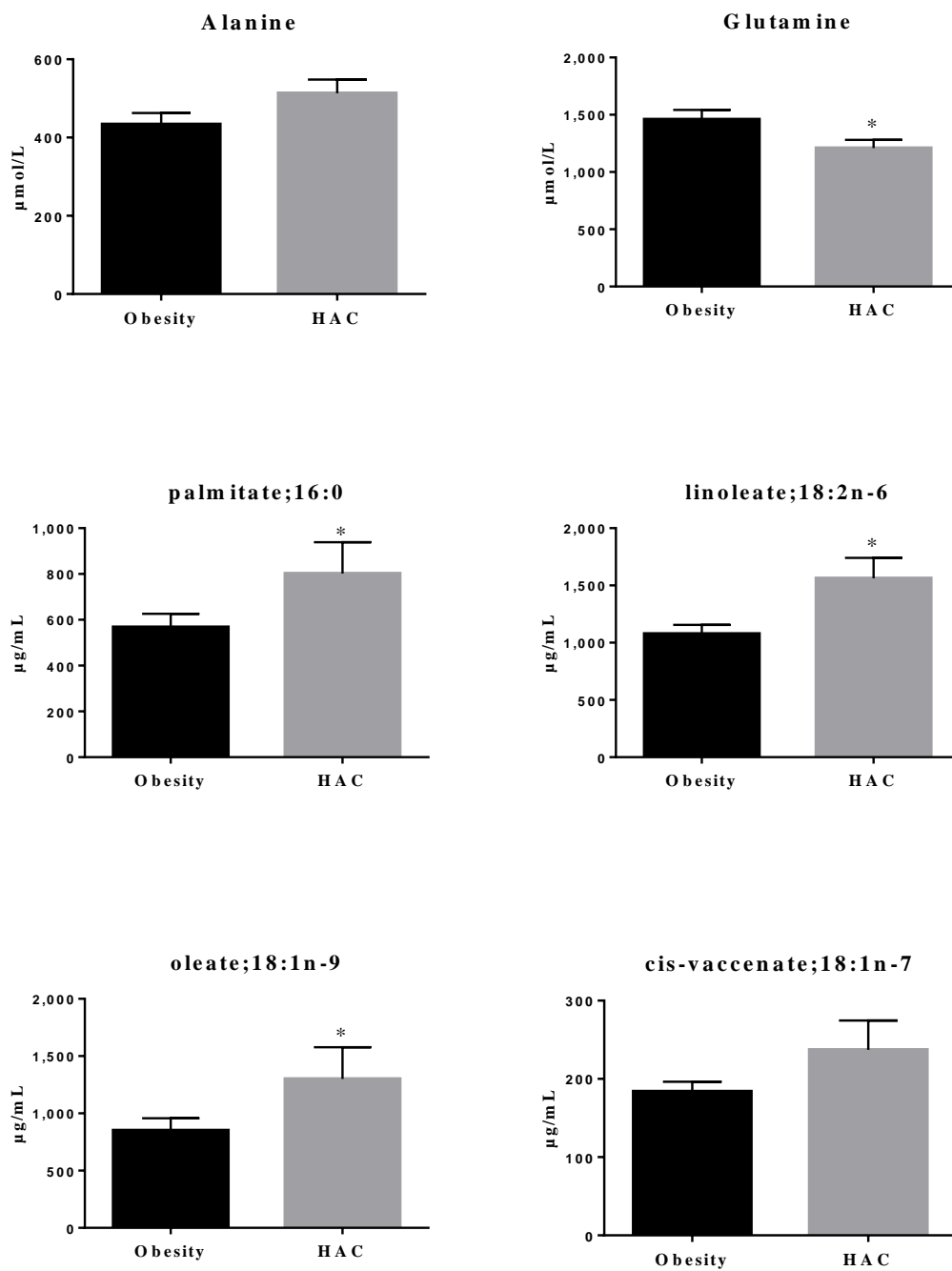


Fig. 5-4 Fig. 5-3 に示した Obesity 群 ( $n = 22$ ) と HAC 群 ( $n = 17$ ) における s-plot において分離の寄与率絶対値 0.1 以上で寄与した代謝産物の比較

全ての値は Mean ± SEM で示した。

Mann-Whitney  $U$  test; \* $P < 0.05$

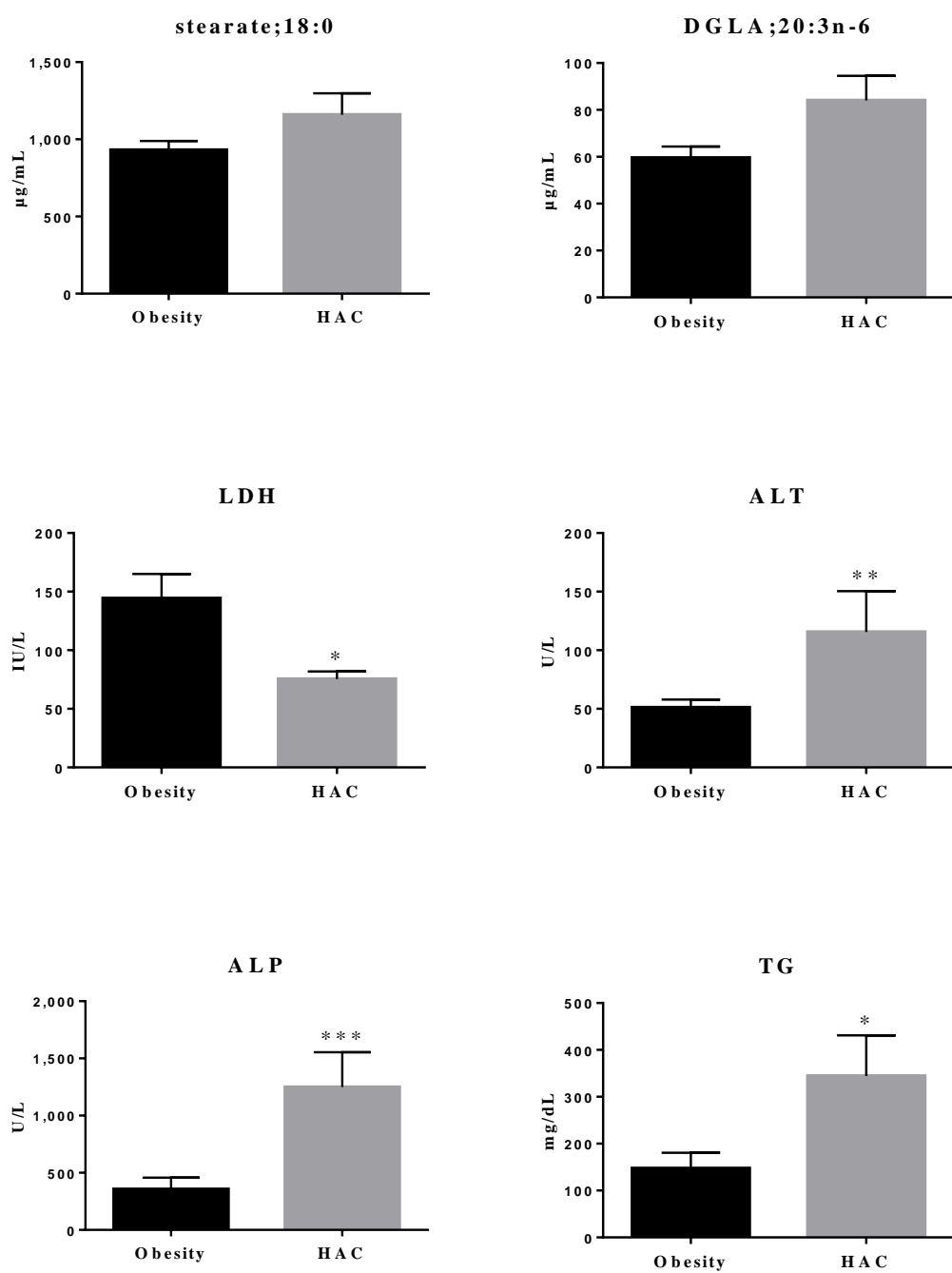


Fig. 5-4 Continued.

Mann-Whitney *U* test; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

## 総括

本研究は、副腎皮質機能亢進症および肥満が惹起するインスリン抵抗性の違いを代謝産物レベルで比較し、犬のインスリン抵抗性とそれに続く糖尿病発症メカニズムを解明することを目的とした。本論文は5章で構成され、第1章では副腎皮質機能亢進症の犬における末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現に関する研究、第2章ではデキサメサゾン添加による単離した犬末梢血単核球の代謝産物解析に関する研究、第3章ではデキサメサゾンおよびTNF- $\alpha$ が犬骨格筋培養細胞の代謝産物とインスリンシグナリング遺伝子発現に及ぼす影響についての研究、第4章では健常犬の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中代謝産物の変動についての研究を行い、第5章では副腎皮質機能亢進症の犬と肥満犬の血清中代謝産物の比較についての研究を行った。

犬の糖尿病は治療に一生のインスリン投与を必要とするヒトでは1型に分類されている糖尿病である。しかし、ヒトでは肥満が原因となり、相対的にインスリン作用が不足する2型糖尿病が主体であり、犬とヒトとでは糖尿病発症メカニズムが大きく異なっていると考えられている。これまでも、犬の肥満により生じる変化と糖尿病発症に関する研究はなされているものの、現在のところ肥満が糖尿病発症の直接の原因になるといった報告はない。その一方で、副腎皮質機能亢進症の犬ではインスリン抵抗性の増大から、糖尿病の発症に進行したケースが報告されている。そこで、本研究ではインスリン抵抗性に続き糖尿病を発症する犬の副腎皮質機能亢進症と、インスリン抵抗性が生じるものの糖尿病の発症が報告されていない犬の肥満の違いを比較することで、犬に特有な糖尿病発症メカニズムを推察することを考えた。

そこで本研究では、副腎皮質機能亢進症と肥満の違いを *in vivo* および *in vitro* の条件で比較してインスリン抵抗性を惹起する代謝産物を探索し、犬における糖尿病発症に至る知見を得ることを目的とし、代謝産物を対象とするメタボローム解析を主に用いることにした。メタボローム解析は、ポストゲノム研究の中で最もフェノタイプに近くホメオスタシスの破綻をより直接的に評価できる手法である。



## 1. 副腎皮質機能亢進症の犬における末梢血好中球のインスリンシグナリング遺伝子発現量の解析 (第1章)

本章は後に続くメタボローム研究の予備実験と位置づけ、研究対象である副腎皮質機能亢進症 (HAC) 症例犬の末梢血白血球を、グルココルチコイドの影響評価に利用できるか検討するため、末梢血白血球のインスリンシグナリング遺伝子 (IRS-1、IRS-2、PI3-K、Akt2、PKC- $\lambda$ ) の発現量の変化を調べた。インスリン受容体の直下に位置する IRS-1 および IRS-2 に関しては、HAC 症例犬の末梢血白血球において IRS-1 の発現量は軽度の低下傾向を示し、IRS-2 では Control 群の約半分に低下し、HAC による慢性的なグルココルチコイドの過剰環境は、IRS-2 に対して抑制的な影響をもたらすものと考えられた。インスリンシグナルの下流カスケードを構成する PI3-K、Akt2 および PKC- $\lambda$  に関しては、PI3-K の遺伝子発現量が HAC の未治療 (HAC untreated) 群で有意に低下し、治療 (HAC treated) 群ではやや回復傾向が見られた。Akt2 の遺伝子発現量は両群とも有意に抑制され、PKC- $\lambda$  の遺伝子発現量は両群とも変動は認められなかった。

以上の結果から、Control 群と比較して、慢性的なグルココルチコイドの過剰環境である HAC 群の末梢血白血球のインスリンシグナリング遺伝子発現量に変化していることが明らかであり、グルココルチコイドの影響を評価するために末梢血白血球を利用することは妥当であると考えられた。遺伝子発現量の変動から、その代謝も変動していると考えられ、第2章において単離した末梢血白血球を用いて、グルココルチコイド添加時の細胞中代謝産物の解析を行うことにした。

## 2. デキサメサゾン添加による単離した犬末梢血単核球の代謝産物解析 (第2章)

第2章では、培養方法が確立されており、グルココルチコイドの影響が HAC 症例犬の末梢血好中球と似た傾向にある末梢血単核球を使用して、*in vitro* の実験系でグルココルチコイドが細胞中の代謝産物に及ぼす影響を検討した。単核球にグルココルチコイド製剤であるデキサメサゾンを添加、48時間の培養後に代謝産物を抽出し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計を用いて代謝産物を分析した。

分析の結果、96個の代謝産物が同定され、デキサメサゾン添加群においてグルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、セドヘプツロース-7-リン酸およびアセチル-CoA は有意に高値を示し、ATP、CTP、dATP、ピルビン酸および

NADP<sup>+</sup>は有意に低値を示した。パスイエイ解析の結果、主に TCA サイクルおよび解糖系／糖新生経路に変化が認められた。糖新生経路上流の代謝産物の増加傾向と、TCA サイクル中間体、ピルビン酸の減少傾向から、デキサメサゾンの添加は、培養犬末梢血単核球におけるグルコースの異化作用を減少させることが示唆された。デキサメサゾンによる糖取り込み能の変化は単離した培養犬末梢血単核球で認められず、また細胞内での糖異化作用が減少していることから、細胞内のグルコース濃度が維持され、細胞への糖取り込みが不要であり、高血糖を招きやすい状態にあることが考えられる。

### 3. デキサメサゾンおよび TNF- $\alpha$ が犬骨格筋培養細胞の代謝産物とインスリンシグナル遺伝子発現に及ぼす影響の解析 (第3章)

第3章では、正常骨格筋細胞に対する HAC と肥満が骨格筋に及ぼす影響を検討する目的で、デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  の添加試験を行った。インスリン抵抗性惹起物質の影響を検討するために、犬正常骨格筋細胞の分化誘導により得られた筋管様細胞中の 20 種のアミノ酸と 14 種の脂肪酸、20 種の解糖系／糖新生および TCA サイクルに関わる代謝産物を測定した。代謝産物の測定には、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した。糖取り込み能の評価は取り込まれた 2-デオキシグルコースが細胞内へキソキナーゼにより変換され生じる 2-デオキシグルコース-6-リン酸量を LC-MS/MS にて測定し、インスリンシグナリング遺伝子である IRS-1、PI3-K、Akt2 の発現量は定量 PCR 法にて測定した。

デキサメサゾンの添加では多くの代謝産物の減少が観察され、糖の取り込み能は減少傾向を示した。糖の取り込み量が減少し、かつ細胞内代謝産物量が減少するということは、第2章で述べた犬末梢血単核球を用いた実験と同様に、細胞におけるグルコースの異化作用が減少していることを示唆する。また、特に分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の減少は著しく、これはグルココルチコイドによる細胞内 BCAA の分解促進と、細胞内への BCAA 輸送の減少の2つの作用により細胞内 BCAA の著しい低下が生じたと考えられた。細胞内 BCAA 量の低下はタンパク質翻訳系も抑制されることから、細胞内の代謝産物は減少し、筋の萎縮が起こることが知られている。骨格筋は生体において最大の糖取り込み器官であることから、デキサメサゾンにより生じる筋萎縮は糖取り込み量の減少に繋がり、HAC において高血糖を引き起こす要因の一つとなると考え

られる。

TNF- $\alpha$  の添加は、IRS-1 遺伝子発現量に減少傾向を示したものの、糖の取り込み能に変化は認められなかった。げっ歯類の培養細胞に TNF- $\alpha$  を添加すると糖取り込みが抑制されるが、本研究で用いた犬筋管様細胞では、肥満で血液中に増加する TNF- $\alpha$  を添加しても糖取り込みが抑制されなかった。このことから、犬ではげっ歯類より糖取り込み抑制が起こりにくいことが示された。さらに、筋管様細胞中の  $\beta$ -アミノイソ酪酸の顕著な増加を TNF- $\alpha$  の添加で認めた。 $\beta$ -アミノイソ酪酸は、ヒトやマウスにおいて持続的な運動によって骨格筋中での proliferator- activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) の増加に伴い、血液中で増加し、白色脂肪細胞を褐色化することで、ミトコンドリア量や GLUT-4 量を増加させてインスリン感受性を増強させる。また、げっ歯類の筋管細胞の培養液中に  $\beta$ -アミノイソ酪酸を添加することで糖取り込み等の糖代謝異常が改善することが知られている。今回の TNF- $\alpha$  添加による細胞内性  $\beta$ -アミノイソ酪酸の増加は、犬が肥満しても糖代謝異常を引きおこしにくい要因の一つなると考えられる。

#### 4. 健常犬の血清中グルコースおよびインスリン濃度変動と血清中代謝産物変動の比較 (第4章)

本研究では、これまでに末梢血白血球と犬骨格筋培養細胞を用いて、グルココルチコイドや TNF- $\alpha$  のインスリン作用の抑制時の細胞レベルでのアミノ酸を含む代謝産物の変化について明らかにした。しかし、今までに犬ではインスリンが作用している時の血液中アミノ酸変動についての報告はない。そこで本章では、健康な犬に静脈内糖負荷試験を行い、インスリン分泌を促した時の血清中代謝産物の変動を明らかにした。代謝産物の測定には、GC-MS を使用し、23 種のアミノ酸を測定した。

血清中グルコースおよびインスリン濃度はグルコース投与後 15 分でピークを示し、60 分後には投与前 (0 分) の値に復した。23 種のアミノ酸データはバッチデータ解析を行い、時間の進展をモデリングすることにより経時的変化に伴うアミノ酸の変動をローディングプロット上に可視化した。その結果、アミノ酸は、経過時間に対応した 4 つのクラスターに分類された。BCAA であるロイシン、イソロイシンおよびバリンとフェニルアラニンがインスリンがピークを示す 0-60 分で有意に減少しており、インスリン動態に鋭敏に反応するアミノ酸であると考えられた。これらのアミノ酸は、ヒ

トでも糖尿病リスク評価に有用であるとされていること、また BCAA はインスリン依存的に system A amino acid transporter によって骨格筋への取り込みが促進されることから、犬においてもインスリン作用の低下を評価するのに有用なマーカーとなる可能性が考えられる。

#### 5. 副腎皮質機能亢進症の犬と肥満犬の血清中代謝産物の比較検討（第 5 章）

第 5 章では、インスリン抵抗性から糖尿病へ進行するケースが知られる HAC 症例犬（HAC 群）と、糖尿病の発症に至らない肥満犬（Obesity 群）の血清中代謝産物の解析を行い、副腎皮質機能亢進症および肥満が惹起するインスリン抵抗性の違いを代謝産物レベルで比較した。代謝産物の測定には、GC-MS を使用し、25 種のアミノ酸と 14 種の脂肪酸の定量を行い、また 11 項目の生化学パラメータの測定を行った。

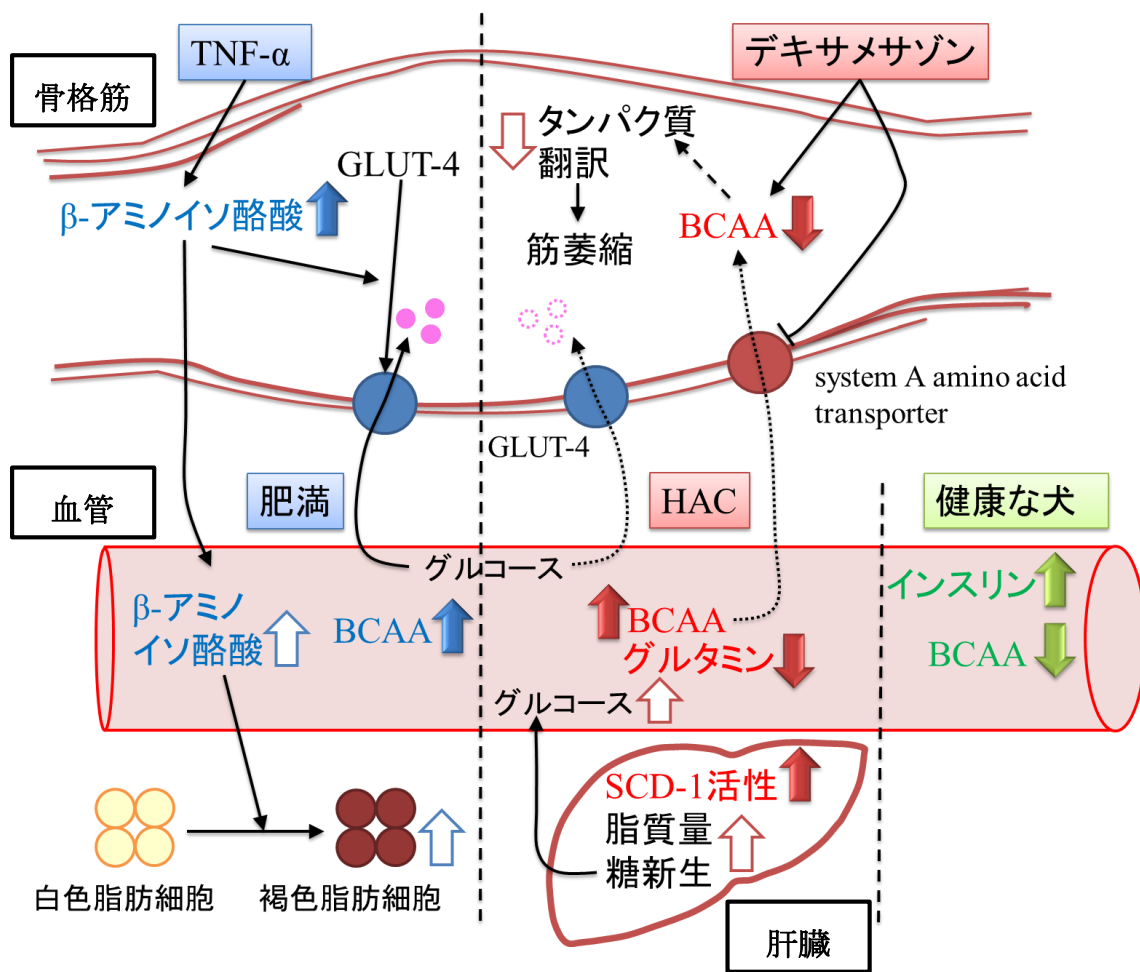
解析の結果、HAC 群では Obesity 群と比較し、ALP と ALT が有意に高値を示した。犬の ALP アイソザイムにはコルチコステロイド誘導性 ALP があることが知られている。また ALT についても過剰のグルココルチコイドにより高値を示すことが報告されており、これらの変化は既報と一致する結果であった。

血液中のシスチンは、ヒトでは肥満と強い正の相関があるとされているが、本研究において Control 群と比較して、HAC 群では有意な増加を認め、Obesity 群では減少傾向であるという、ヒトとは異なる動態が示された。ヒトでは、過剰なシスチンはインスリン分泌抑制とインスリンシグナリング抑制に繋がるということが報告されている。また、HAC 群で、Obesity 群に対して有意に血清中グルタミンが低下しており、グルタミンの低下はインスリン感受性の低下に繋がるとされている。さらに、stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 活性が HAC 群は Obesity 群より上昇していた。これはヒトにおいて肝臓での糖新生が亢進していることを示す指標である。BCAA であるバリンとイソロイシンは Control 群と比較し、HAC 群、Obesity 群ともに有意に高値であった。BCAA はヒトの 2 型糖尿病では血中で上昇するが、これはインスリン抵抗性が生じると細胞内への BCAA 取り込みが抑制されるからであると説明されている。したがって、本研究でも HAC 群、Obesity 群ともにインスリン抵抗性が生じていたと考えられる。

これらのことから、HAC 群、Obesity 群のどちらでも Control 群に比べてインスリン抵抗性が生じていたが、HAC 群は、Obesity 群と比較してインスリン感受性が低下し、糖新生も亢進しており、より糖尿病を発症しやすい状態であると考えられる。

以上のように、健常な犬では血清中インスリン増加に伴い血清中 BCAA が低下したが、これはインスリン依存的に BCAA が細胞に取り込まれたことを示している。デキサメサゾンを追加した犬筋管様細胞では、細胞内の BCAA がコントロールに対して有意に低値であったことから、インスリン抵抗性が高まっていたと示唆される。さらに、デキサメサゾンを追加した犬筋管様細胞では、糖取り込み能が抑制され、糖の異化作用が減少する傾向にあった。糖異化作用の減少は、健常な犬から単離した末梢血単核球にデキサメサゾンを追加した時の代謝産物の解析結果でも示されていた。一方、TNF- $\alpha$  を追加した犬筋管様細胞では、逆にインスリン感受性を増強する  $\beta$ -アミノイソ酪酸が有意に高値を示し、生じたインスリン抵抗性を代償する作用が働いたと考えられる。また、HAC 群と Obesity 群の血清中代謝産物を Control 群と比較したところ、血清中 BCAA が高値であった。これはどちらもインスリン抵抗性が生じていることを示唆しているが、HAC 群では、Obesity 群と比較してインスリン感受性低下の指標である血清中グルタミンの低下と、糖新生が亢進している傾向が見られた。

副腎皮質機能亢進症で認められるが肥満では認められない、これらの代謝産物の違いは、犬の副腎皮質機能亢進症が糖尿病発症に至る一方、犬の肥満が糖尿病に至らない一因を示しており、犬における糖尿病の発症機序を解明していく上で有用な知見になると考えられる。また、犬骨格筋培養細胞を対象としたメタボローム研究は、犬特有の糖尿病発症機序を解明する有用な手段であると考えられる。



デキサメサゾンと TNF- $\alpha$  が各組織に及ぼす影響

塗潰しの矢印は本研究で得られた結果を表し、白抜きの矢印は参考文献から考えられた結果を表す。

## 謝辞

稿を終わるに臨み、本研究に際し終始御指導御助言賜りました日本獣医生命科学大学生体分子化学研究室 田崎弘之教授に心から感謝の意を表します。

また、終始御指導、御教授を頂いた日本獣医生命科学大学生体分子化学研究室 片山欣哉准教授、佐藤稲子助教に深謝致します。

さらに、研究の遂行に際してご協力頂いた日本獣医生命科学大学獣医化学研究室 新井敏郎教授、川角浩准教授ならびにご協力頂いた日本獣医生命科学大学獣医保健看護学科臨床部門 左向敏紀教授、石岡克己准教授、森昭博講師、小田民美助教をはじめとする日本獣医生命科学大学獣医保健看護学科臨床部門代謝・栄養学分野各位に深謝いたします。

最後に、本研究の実施に際して多大なるご協力をいただきました日本獣医生命科学大学生体分子化学研究室在籍室員のみなさまに深く感謝いたします。

結びに、これまでの長きに亘る御支援と暖かい励ましにより支えて頂いた両親に心より感謝いたします。

## 参考文献

Andrews, R.C., Walker, B.R., 1999. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clinical science (London, England : 1979)* 96, 513-523.

Arai, T., Nakamura, M., Magori, E., Fukuda, H., Mizutani, H., Kawakami, E., Sako, T., 2002. Changes in activities of enzymes related to energy metabolism in peripheral leukocytes of diabetic dogs with glycemic control by intensive insulin treatment. *Research in Veterinary Science* 73, 183-186.

Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.E., Bruning, J.C., Haag, B., 3rd, Johnson, R.S., Kahn, C.R., 1994. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372, 186-190.

Badoud, F., Lam, K.P., DiBattista, A., Perreault, M., Zulyniak, M.A., Cattrysse, B., Stephenson, S., Britz-McKibbin, P., Mutch, D.M., 2014. Serum and adipose tissue amino acid homeostasis in the metabolically healthy obese. *Journal of proteome research* 13, 3455-3466.

Behrend, E.N., 2014. Canine Hyperadrenocorticism. In, *Canine and Feline Endocrinology: Fourth Edition*. Elsevier Inc., 377-451.

Bjorck, J., Hellgren, M., Rastam, L., Lindblad, U., 2006. Associations between serum insulin and homocysteine in a Swedish population-a potential link between the metabolic syndrome and hyperhomocysteinemia: the Skaraborg project. *Metabolism* 55, 1007-1013.

Burén, J., Lai, Y.C., Lundgren, M., Eriksson, J.W., Jensen, J., 2008. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474, 91-101.

Burén, J., Liu, H.X., Jensen, J., Eriksson, J.W., 2002. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *European Journal of Endocrinology* 146, 419-429.



Buysschaert, M., Dramais, A.S., Wallemacq, P.E., Hermans, M.P., 2000. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes: relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance. *Diabetes Care* 23, 1816-1822.

Campbell, J., Rastogi, K.S., Hausler, H.R., 1966. Hyperinsulinemia with diabetes induced by cortisone, and the influence of growth hormone in the Chinese hamster. *Endocrinology* 79, 749-756.

Caperuto, L.C., Anhe, G.F., Amanso, A.M., Ribeiro, L.M., Medina, M.C., Souza, L.C., Carvalho, O.M., Bordin, S., Saad, M.J., Carvalho, C.R., 2006. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. *Endocrine* 29, 391-398.

Chen, J., Zhao, X., Fritsche, J., Yin, P., Schmitt-Kopplin, P., Wang, W., Lu, X., Haring, H.U., Schleicher, E.D., Lehmann, R., Xu, G., 2008. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabonomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information. *Analytical chemistry* 80, 1280-1289.

Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., Birnbaum, M.J., 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728-1731.

Del Aguila, L.F., Claffey, K.P., Kirwan, J.P., 1999. TNF- $\alpha$  impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 276, E849-E855.

Dutta, T., Chai, H.S., Ward, L.E., Ghosh, A., Persson, X.M., Ford, G.C., Kudva, Y.C., Sun, Z., Asmann, Y.W., Kocher, J.P., Nair, K.S., 2012. Concordance of changes in metabolic pathways based on plasma metabolomics and skeletal muscle transcriptomics in type 1 diabetes. *Diabetes* 61, 1004-1016.

Elshorbagy, A.K., Church, C., Valdivia-Garcia, M., Smith, A.D., Refsum, H., Cox, R., 2012a. Dietary

cystine level affects metabolic rate and glycaemic control in adult mice. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 332-340.

Elshorbagy, A.K., Smith, A.D., Kozich, V., Refsum, H., 2012b. Cysteine and obesity. *Obesity (Silver Spring)* 20, 473-481.

Faggiano, A., Melis, D., Alfieri, R., De Martino, M., Filippella, M., Milone, F., Lombardi, G., Colao, A., Pivonello, R., 2005. Sulfur amino acids in Cushing's disease: insight in homocysteine and taurine levels in patients with active and cured disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90, 6616-6622.

Finck, B.N., Kelly, D.P., 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 116, 615-622.

Fukuta, H., Mori, A., Urumuhan, N., Lee, P., Oda, H., Saeki, K., Kurishima, M., Nozawa, S., Mizutani, H., Mishina, S., Arai, T., Sako, T., 2012. Characterization and comparison of insulin resistance induced by Cushing Syndrome or diestrus against healthy control dogs as determined by euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamp profile glucose infusion rate using an artificial pancreas apparatus. *The Journal of veterinary medical science* 74, 1527-1530.

Gayet, C., Bailhache, E., Dumon, H., Martin, L., Siliart, B., Nguyen, P., 2004. Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNF $\alpha$ , IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 88, 157-165.

Giesbertz, P., Padberg, I., Rein, D., Ecker, J., Hofle, A.S., Spanier, B., Daniel, H., 2015. Metabolite profiling in plasma and tissues of ob/ob and db/db mice identifies novel markers of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 58, 2133-2143.

Godzien, J., García-Martínez, D., Martínez-Alcazar, P., Ruperez, F.J., Barbas, C., 2011. Effect of a nutraceutical treatment on diabetic rats with targeted and CE-MS non-targeted approaches. *Metabolomics*,

1-15.

Grunfeld, C., Baird, K., Van Obberghen, E., Kahn, C.R., 1981. Glucocorticoid-induced insulin resistance in vitro: Evidence for both receptor and postreceptor defects. *Endocrinology* 109, 1723-1730.

Guillaume-Gentil, C., Assimacopoulos-Jeannet, F., Jeanrenaud, B., 1993. Involvement of non-esterified fatty acid oxidation in glucocorticoid-induced peripheral insulin resistance in vivo in rats. *Diabetologia* 36, 899-906.

Haataja, L., Gurlo, T., Huang, C.J., Butler, P.C., 2008. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocrine reviews* 29, 303-316.

Hadley, S.P., Hoffmann, W.E., Kuhlenschmidt, M.S., Sanecki, R.K., Dorner, J.L., 1990. Effect of glucocorticoids on alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, and gamma-glutamyltransferase in cultured dog hepatocytes. *Enzyme* 43, 89-98.

Han, J., Tschernutter, V., Yang, J., Eckle, T., Borchers, C.H., 2013. Analysis of selected sugars and sugar phosphates in mouse heart tissue by reductive amination and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry* 85, 5965-5973.

Huo, T., Xiong, Z., Lu, X., Cai, S., 2015. Metabonomic study of biochemical changes in urinary of type 2 diabetes mellitus patients after the treatment of sulfonylurea antidiabetic drugs based on ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomedical chromatography* 29, 115-122.

Jensen, A.L., Poulsen, J.S.D., 1992. Preliminary experience with the diagnostic value of the canine corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme in hypercorticism and diabetes mellitus. *Journal of Veterinary Medicine - Series A* 39, 342-348.

Jung, T.W., Hwang, H.J., Hong, H.C., Yoo, H.J., Baik, S.H., Choi, K.M., 2015. BAIBA attenuates insulin resistance and inflammation induced by palmitate or a high fat diet via an AMPK-PPAR $\delta$ -dependent

pathway in mice. *Diabetologia* 58, 2096-2105.

Kaneko, Y., Kimura, Y., Kimura, H., Niki, I., 2006. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes* 55, 1391-1397.

Kerouz, N.J., Horsch, D., Pons, S., Kahn, C.R., 1997. Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *The Journal of clinical investigation* 100, 3164-3172.

Kotronen, A., Seppänen-Laakso, T., Westerbacka, J., Kiviluoto, T., Arola, J., Ruskeepää, A.L., Orešič, M., Yki-Järvinen, H., 2009. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* 58, 203-208.

Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., Satoh, S., Sekihara, H., Sciacchitano, S., Lesniak, M., Aizawa, S., Nagai, R., Kimura, S., Akanuma, Y., Taylor, S.I., Kadowaki, T., 2000. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880-1889.

Kuo, T., Harris, C.A., Wang, J.C., 2013. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Molecular and cellular endocrinology* 380, 79-88.

Laiakis, E.C., Morris, G.A., Fornace, A.J., Howie, S.R., 2010. Metabolomic analysis in severe childhood pneumonia in the Gambia, West Africa: findings from a pilot study. *PLoS ONE* 5, 1-9.

Lam, N.T., Covey, S.D., Lewis, J.T., Oosman, S., Webber, T., Hsu, E.C., Cheung, A.T., Kieffer, T.J., 2006. Leptin resistance following over-expression of protein tyrosine phosphatase 1B in liver. *Journal of Molecular Endocrinology* 36, 163-174.

- Li, G., Lee, P., Yamamoto, I., Mori, N., Arai, T., 2013. Pilot study to determine peripheral blood leukocyte mRNA expression profile of energy homeostasis genes to identify potential predictive biomarkers of obesity in dogs. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 12, 69-75.
- Mansour, A., Mohajeri-Tehrani, M.R., Qorbani, M., Heshmat, R., Larijani, B., Hosseini, S., 2015. Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Nutrition* 31, 119-126.
- Marco, J., Melani, F., Goberna, R., Rott, W.H., Pfeiffer, E.F., 1968. Effect of treatment with prednisolone on the secretion of insulin in rats. *Diabetologia* 4, 365-369.
- Masuda, Y., Kubo, A., Kokaze, A., Yoshida, M., Fukuhara, N., Takashima, Y., 2008. Factors associated with serum total homocysteine level in type 2 diabetes. *Environmental health and preventive medicine* 13, 148-155.
- Matsumoto, M., Ogawa, W., Teshigawara, K., Inoue, H., Miyake, K., Sakaue, H., Kasuga, M., 2002. Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes. *Diabetes* 51, 1672-1680.
- Menge, B.A., Schrader, H., Ritter, P.R., Ellrichmann, M., Uhl, W., Schmidt, W.E., Meier, J.J., 2010. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Regulatory peptides* 160, 75-80.
- Miceli, D.D., Cabrera Blatter, M.F., Gallelli, M.F., Pignataro, O.P., Castillo, V.A., 2014. Involvement of glucagon-like peptide 1 in the glucose homeostasis regulation in obese and pituitary-dependent hyperadrenocorticism affected dogs. *Research in veterinary science* 97, 211-217.
- Mori, A., Lee, P., Sako, T., Mizutani, H., Arai, T., 2009a. Successful intensive insulin treatment of type 1 diabetic dogs leads to restoration of peripheral leukocyte insulin signaling gene expression and enzyme

activities. *Journal of Veterinary Medical Science* 71, 1017-1026.

Mori, A., Lee, P., Takemitsu, H., Sako, T., Arai, T., 2009b. Comparison of insulin signaling gene expression in insulin sensitive tissues between cats and dogs. *Veterinary research communications* 33, 211-226.

Nair, K.S., Ford, G.C., Ekberg, K., Fernqvist-Forbes, E., Wahren, J., 1995. Protein dynamics in whole body and in splanchnic and leg tissues in type I diabetic patients. *The Journal of clinical investigation* 95, 2926-2937.

Nakamura, M.T., Nara, T.Y., 2004. Structure, function, and dietary regulation of  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$ , and  $\Delta 9$  desaturases. *Annual Review of Nutrition* 24, 345-376.

Nelson, R.W., 2014. Canine Diabetes Mellitus. In, *Canine and Feline Endocrinology: Fourth Edition*. Elsevier Inc., 213-257.

Newgard, C.B., An, J., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Stevens, R.D., Lien, L.F., Haqq, A.M., Shah, S.H., Arlotto, M., Slentz, C.A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B.R., Yancy, W.S., Jr., Eisenson, H., Musante, G., Surwit, R.S., Millington, D.S., Butler, M.D., Svetkey, L.P., 2009. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell metabolism* 9, 311-326.

Nicholson, J.K., 2006. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Molecular systems biology* 2, 52.

Nishiumi, S., Shinohara, M., Ikeda, A., Yoshie, T., Hatano, N., Kakuyama, S., Mizuno, S., Sanuki, T., Kutsumi, H., Fukusaki, E., Azuma, T., Takenawa, T., Yoshida, M., 2010. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics* 6, 518-528.

Nozawa, S., Oda, H., Akiyama, R., Ueda, K., Saeki, K., Shono, S., Maruyama, N., Murata, A., Tazaki,

- H., Mori, A., Momota, Y., Azakami, D., Sako, T., Ishioka, K., 2014. Decreased gene expressions of insulin signal molecules in canine hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Medical Science* 76, 1177-1182.
- Nozawa, S., Sato, T., Katayama, K., Ishioka, K., Sako, T., Arai, T., Tazaki, H., 2016. Metabolic analysis of canine peripheral blood mononuclear cells treated ex vivo with dexamethasone. *The Veterinary Journal* 207, 184-187.
- Oh, H., Siano, B., Diamond, S., 2008. Neutrophil isolation protocol. *Journal of visualized experiments* 17, 745.
- Olefsky, J.M., Johnson, J., Liu, F., Jen, P., Reaven, G.M., 1975. The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. *Metabolism* 24, 517-527.
- Opara, E.C., Petro, A., Tevrizian, A., Feinglos, M.N., Surwit, R.S., 1996. L-glutamine supplementation of a high fat diet reduces body weight and attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia in C57BL/6J mice. *The Journal of nutrition* 126, 273-279.
- Patti, M.E., Sun, X.J., Bruening, J.C., Araki, E., Lipes, M.A., White, M.F., Kahn, C.R., 1995. 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 270, 24670-24673.
- Pedersen, B.K., Åkerström, T.C.A., Nielsen, A.R., Fischer, C.P., 2007. Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology* 103, 1093-1098.
- Peikes, H., Morris, D.O., Hess, R.S., 2001. Dermatologic disorders in dogs with diabetes mellitus: 45 cases (1986-2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219, 203-208.
- Perley, M., Kipnis, D.M., 1966. Effect of glucocorticoids on plasma insulin. *The New England journal of medicine* 274, 1237-1241.

Peter, A., Cegan, A., Wagner, S., Elcnerova, M., Konigsrainer, A., Konigsrainer, I., Haring, H.U., Schleicher, E.D., Stefan, N., 2010. Relationships between hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 activity and mRNA expression with liver fat content in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 300, E321-E326.

Peterson, M.E., Altszuler, N., Nichols, C.E., 1984. Decreased insulin sensitivity and glucose tolerance in spontaneous canine hyperadrenocorticism. *Research in veterinary science* 36, 177-182.

Peyrollier, K., Hajduch, E., Blair, A.S., Hyde, R., Hundal, H.S., 2000. L-leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of system A amino acid transport. *The Biochemical journal* 350, 361-368.

Qi, D., Rodrigues, B., 2007. Glucocorticoids produce whole body insulin resistance with changes in cardiac metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 292, E654-E667.

Rand, J.S., Fleeman, L.M., Farrow, H.A., Appleton, D.J., Lederer, R., 2004. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? *The Journal of nutrition* 134, 2072S-2080S.

Roberts, L.D., Boström, P., O'Sullivan, J.F., Schinzel, R.T., Lewis, G.D., Dejam, A., Lee, Y.K., Palma, M.J., Calhoun, S., Georgiadi, A., Chen, M.H., Ramachandran, V.S., Larson, M.G., Bouchard, C., Rankinen, T., Souza, A.L., Clish, C.B., Wang, T.J., Estall, J.L., Soukas, A.A., Cowan, C.A., Spiegelman, B.M., Gerszten, R.E., 2014.  $\beta$ -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic  $\beta$ -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell metabolism* 19, 96-108.

Saad, M.J., Folli, F., Kahn, J.A., Kahn, C.R., 1993. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *The Journal of clinical investigation* 92, 2065-2072.



Saito, K., Lee, S., Shiuchi, T., Toda, C., Kamijo, M., Inagaki-Ohara, K., Okamoto, S., Minokoshi, Y., 2011. An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. *Analytical biochemistry* 412, 9-17.

Sako, T., Mori, A., Lee, P., Takahashi, T., Izawa, T., Karasawa, S., Furuuchi, M., Azakami, D., Mizukoshi, M., Mizutani, H., Kiyosawa, Y., Arai, T., 2008. Diagnostic significance of serum glycated albumin in diabetic dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 634-638.

Sako, T., Mori, A., Lee, P., Sato, T., Mizutani, H., Takahashi, T., Kiyosawa, Y., Tazaki, H., Arai, T., 2009. Serum glycated albumin: Potential use as an index of glycemic control in diabetic dogs. *Veterinary Research Communications* 33, 473-479.

Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Funaki, M., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Kikuchi, M., Oka, Y., Asano, T., 2000. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes* 49, 1700-1708.

Sana, T.R., Waddell, K., Fischer, S.M., 2008. A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 871, 314-321.

Sanecki, R.K., Hoffmann, W.E., Gelberg, H.B., Dorner, J.L., 1987. Subcellular location of corticosteroid-induced alkaline phosphatase in canine hepatocytes. *Veterinary Pathology* 24, 296-301.

Scheuner, D., Kaufman, R.J., 2008. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocrine reviews* 29, 317-333.

Seghieri, G., Breschi, M.C., Anichini, R., De Bellis, A., Alviggi, L., Maida, I., Franconi, F., 2003. Serum homocysteine levels are increased in women with gestational diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental* 52, 720-723.

Sheikh, K.D., Khanna, S., Byers, S.W., Fornace, A., Jr., Cheema, A.K., 2011. Small molecule metabolite extraction strategy for improving LC/MS detection of cancer cell metabolome. *Journal of biomolecular techniques* 22, 1-4.

Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ito, N., Maruyama, T., Suzuki, Y., Takeda, S., Nakae, J., Tagata, Y., Nishitani, S., Takehana, K., Sano, M., Fukuda, K., Suematsu, M., Morimoto, C., Tanaka, H., 2011. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell metabolism* 13, 170-182.

Soga, T., Neiger, D.N., 2000. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry* 72, 1236-1241.

Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., Nishioka, T., 2002. Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry* 74, 2233-2239.

Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., Nishioka, T., 2003. Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research* 2, 488-494.

Stentz, F.B., Kitabchi, A.E., 2007. Transcriptome and proteome expressions involved in insulin resistance in muscle and activated T-lymphocytes of patients with type 2 diabetes. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 5, 216-235.

Stephen, J.E., Edward, C.F., 2010. Hyperadrenocorticism in Dogs. In, *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult*, 7th Edition. Elsevier Inc., 1816-1840.

Teske, E., Rothuizen, J., de Bruijne, J.J., Rijnberk, A., 1989. Corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme in the diagnosis of canine hypercorticism. *Veterinary Record* 125, 12-14.

Tortorella, L.L., Pilch, P.F., 2002. C2C12 myocytes lack an insulin-responsive vesicular compartment despite dexamethasone-induced GLUT4 expression. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283, E514-524.

Van Woudenberg, G.J., Kuijsten, A., Van der Kallen, C.J., Van Greevenbroek, M.M., Stehouwer, C.D., Blaak, E.E., Feskens, E.J.M., 2012. Comparison of fatty acid proportions in serum cholesteryl esters among people with different glucose tolerance status: The CoDAM study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 22, 133-140.

Varghese, R.S., Cheema, A., Cheema, P., Bourbeau, M., Tuli, L., Zhou, B., Jung, M., Dritschilo, A., Resson, H.W., 2010. Analysis of LC-MS data for characterizing the metabolic changes in response to radiation. *Journal of proteome research* 9, 2786-2793.

Verkest, K.R., Fleeman, L.M., Morton, J.M., Ishioka, K., Rand, J.S., 2011a. Compensation for obesity-induced insulin resistance in dogs: Assessment of the effects of leptin, adiponectin, and glucagon-like peptide-1 using path analysis. *Domestic Animal Endocrinology* 41, 24-34.

Verkest, K.R., Fleeman, L.M., Rand, J.S., Morton, J.M., 2011b. Evaluation of beta-cell sensitivity to glucose and first-phase insulin secretion in obese dogs. *American journal of veterinary research* 72, 357-366.

Verkest, K.R., 2014. Is the metabolic syndrome a useful clinical concept in dogs? A review of the evidence. *The Veterinary journal* 199, 24-30.

Wallace, M., Whelan, H., Brennan, L., 2013. Metabolomic analysis of pancreatic beta cells following exposure to high glucose. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830, 2583-2590.

Wang, T.J., Larson, M.G., Vasan, R.S., Cheng, S., Rhee, E.P., McCabe, E., Lewis, G.D., Fox, C.S., Jacques, P.F., Fernandez, C., O'Donnell, C.J., Carr, S.A., Mootha, V.K., Florez, J.C., Souza, A., Melander, O., Clish, C.B., Gerszten, R.E., 2011. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature*

Medicine 17, 448-453.

Washizu, T., Kuramoto, E., Abe, M., Sako, T., Arai, T., 1998. A comparison of the activities of certain enzymes related to energy metabolism in leukocytes in dogs and cats. *Veterinary research communications* 22, 187-192.

Whelan, J.A., Russell, N.B., Whelan, M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods* 278, 261-269.

White, M.F., 1998. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Molecular and cellular biochemistry* 182, 3-11.

Xu, F., Tavintharan, S., Sum, C.F., Woon, K., Lim, S.C., Ong, C.N., 2013. Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98, E1060-E1065.

Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., Sonenberg, N., Yazaki, Y., Kadowaki, T., 1996. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Molecular and cellular biology* 16, 3074-3084.

Yokoi, N., Beppu, M., Yoshida, E., Hoshikawa, R., Hidaka, S., Matsubara, T., Shinohara, M., Irino, Y., Hatano, N., Seino, S., 2015. Identification of putative biomarkers for prediabetes by metabolome analysis of rat models of type 2 diabetes. *Metabolomics* 11, 1277-1286.

Yoon, J.H., Song, P., Jang, J.H., Kim, D.K., Choi, S., Kim, J., Ghim, J., Kim, D., Park, S., Lee, H., Kwak, D., Yea, K., Hwang, D., Suh, P.G., Ryu, S.H., 2011. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced L6 myotube secretome reveals novel TNF- $\alpha$ -dependent myokines in diabetic skeletal muscle. *Journal of Proteome Research* 10, 5315-5325.

Zhang, X., Wang, Y., Hao, F., Zhou, X., Han, X., Tang, H., Ji, L., 2009. Human serum metabonomic analysis reveals progression axes for glucose intolerance and insulin resistance statuses. *Journal of Proteome Research* 8, 5188-5195.

野澤聡司（2012）グルコシルコイドがイヌの末梢血白血球においてインスリンシグナリング遺伝子の発現に及ぼす影響 日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科修士論文（未公開）

## 参考資料

- [1] <http://mace.ihes.fr/data/protocol/1/RNeasy%20Plus%20Mini.pdf>
  
- [2] [http://search.cosmobio.co.jp/cosmo\\_search\\_p/search\\_gate2/docs/CSR\\_/OKPPMGK01E.20120131.pdf](http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/CSR_/OKPPMGK01E.20120131.pdf)
  
- [3] [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM\\_TotalRNAProtein.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNAProtein.pdf)