

魚油とフェノフィブラートの  
糖・脂質代謝制御システムに及ぼす影響

荒井 健

魚油とフェノフィブラートの  
糖・脂質代謝制御システムに及ぼす影響

荒井 健

## 目次

緒言	1
第1章 C57BL/6J マウスに対する EPA と DHA の含有比率が異なる 魚油とフェノフィブラートの糖・脂質代謝に及ぼす影響	5
第1節 体組成、血漿および肝臓脂質レベル	6
第2節 肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子発現	9
第3節 小括および考察	13
第2章 KK マウスに対する EPA と DHA の含有比率が異なる魚油 とフェノフィブラートの糖・脂質代謝に及ぼす影響	18
第1節 体組成、血漿および肝臓脂質レベル	19
第2節 肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子発現	25
第3節 小括および考察	27
第3章 高脂肪食により肥満誘導した KK マウスに対する魚油摂取量 の糖・脂質代謝に及ぼす影響	31
第1節 体組成、血漿および肝臓脂質レベル	32
第2節 肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子発現	37
第3節 小括および考察	39
総括	44
謝辞	47

実験の部 48

引用文献 52

本論文で使用した略語一覧

ACC; acetyl-CoA carboxylase  
ACS; acyl-CoA synthetase  
AdipoR; adiponectin receptor  
ALT; alanine aminotransferase  
AMPK; AMP-activated protein kinase  
AOX; acyl-CoA oxidase  
AST; aspartate aminotransferase  
BAT; brown adipose tissue  
CHD; coronary heart disease  
CYP7A1; cholesterol 7  $\alpha$  -hydroxylase  
CYP8B1; sterol 12  $\alpha$  -hydroxylase  
DHA; docosahexaenoic acid  
EPA; eicosapentaenoic acid  
FAS; fatty acid synthase  
FF; fenofibrate  
HDL; high-density lipoprotein  
HMG-CoA; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A  
Insig; insulin inducing gene  
LDL; low-density lipoprotein  
LPL; lipoprotein lipase  
LXR; liver X receptor  
MCAD; medium-chain acyl-CoA dehydrogenase  
OGTT; oral glucose tolerance test  
PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor  
PPRE; PPAR response element  
PUFA; polyunsaturated fatty acid  
RXR; retinoid X receptor  
SCAP; SREBP-cleavage activating protein

SCD; stearyl-CoA desaturase

SREBPs; sterol regulatory element binding proteins

SREs; sterol regulatory elements

SSD; sterol-sensing domain

TNF  $\alpha$  ; tumor necrosis factor  $\alpha$

UCP; uncoupling protein

WAT; white adipose tissue

## 緒言

魚油には、n-3系多価不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid、PUFA)であるエイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid、EPA)やドコサヘキサエン酸(docosahexaenoic acid、DHA)が含まれている。n-3系PUFAは、血中トリグリセリド値の低下、冠動脈心疾患(CHD)や心不全などの心血管疾患の予防効果を示すことが報告されている<sup>1-3)</sup>。n-3系PUFAや魚油によって、脂質合成は低下し、脂肪酸酸化は上昇することが明らかにされている<sup>4-10)</sup>。肝臓をはじめとして、脂肪酸合成系とコレステロール合成系遺伝子は、転写因子である sterol regulatory element binding proteins (SREBPs)によって制御されている<sup>11)</sup>。SREBPsは、小胞体膜上に局在し、sterol-sensing domain (SSD)を有する SREBP-cleavage activating protein (SCAP)と二量体を形成している。細胞内コレステロールプールが十分な時は、SSDにコレステロールが結合してSCAPの構造を変化させ、insulin inducing gene (Insig)と三量体を形成し、小胞体に留まっている。しかし、細胞内のコレステロールが枯渇すると、三量体の形成が解除され、二量体となったSREBPs/SCAPはゴルジ体に輸送される。その後、2種類の特異的なプロテアーゼである Site-1 protease と Site-2 protease によって切断され、SREBPsの活性ドメイン(NH<sub>2</sub>-terminal basic helix-loop-helix leucine zipper domain)が核へ移行する。核内に入ると、標的遺伝子のプロモーターに存在する sterol regulatory elements (SREs)やE-boxに結合することによって転写を制御している<sup>12-14)</sup>。プロモーターにSREsやE-boxを持つ標的遺伝子として、脂肪酸合成経路に関わる acetyl-CoA carboxylase (ACC)、fatty acid synthase (FAS)、stearoyl-CoA desaturase (SCD)の遺伝子とコレステロール合成経路に関わる 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase、HMG-CoA synthase、LDL-receptorの遺伝子がある。さらに、SREBPsには、SREBP-1a、SREBP-1c、SREBP-2の3つのサブタイプがある。*In vivo*では、SREBP-1aとSREBP-1cが1:9の割合で発現しており<sup>15)</sup>、SREBP-1c発現の変化が脂肪酸合成に大きく影響する<sup>6)</sup>。SREBP-1はACC、FAS、SCDなど脂肪酸合成系を主に活性化し、

SREBP-2 は HMG-CoA reductase、HMG-CoA synthase、LDL-receptor などコレステロール合成系を主に活性化する<sup>16-18)</sup>。n-3 系 PUFA や魚油摂取により、SREBP-1c の mRNA 発現や成熟型タンパク質レベルが減少し、脂肪酸合成系およびコレステロール合成系酵素遺伝子の mRNA 発現が減少することで、脂質合成が抑制されることが明らかにされている<sup>4-8)</sup>。

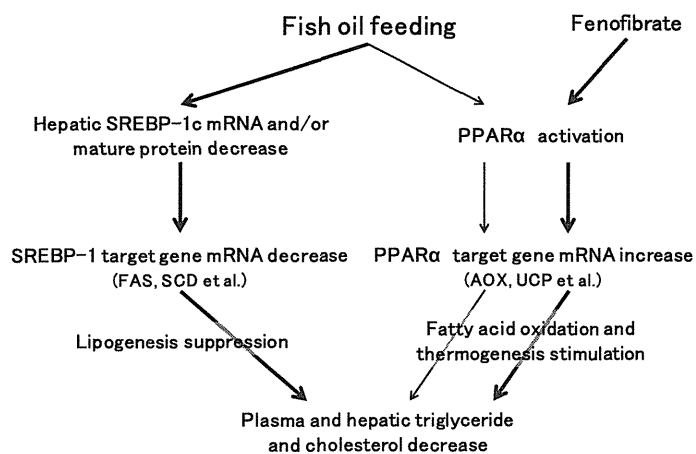
一方、脂肪酸酸化は、核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  によって制御されている。PPAR  $\alpha$  は、retinoid X receptor (RXR) と二量体を形成した後、標的遺伝子のプロモーターに存在する PPAR response element (PPRE) に結合することによって転写を制御している<sup>19,20)</sup>。そして、PPRE をプロモーター内に持つ遺伝子には、脂肪酸酸化や熱産生に関わる acyl-CoA oxidase (AOX)、lipoprotein lipase (LPL)、medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)、acyl-CoA synthetase (ACS)、uncoupling protein (UCP)-2 などが知られている。EPA や DHA、それらの代謝産物は PPAR  $\alpha$  のリガンドであり、魚油摂取により、これら脂肪酸酸化関連遺伝子の mRNA 発現やタンパク質活性の亢進が示されている<sup>4,8-10)</sup>。

魚油の血中脂質低下作用は、主に EPA と DHA によるものと考えられており、EPA と DHA の作用の違いについても多くの研究が行われている。*In vitro* の実験において、EPA、DHA ともに成熟型 SREBP-1 タンパク質を減少させるが、DHA がより強く成熟型 SREBP-1 タンパク質を減少させることが示されている<sup>21)</sup>。また、EPA と DHA はともに PPAR  $\alpha$  を活性化するが、EPA がより強く活性化することが報告されている<sup>22)</sup>。ラットを用いた実験では、EPA、DHA ともに AOX の mRNA とタンパク質を誘導したが、血漿トリグリセリド低下作用は EPA のみで示されたことが報告されている<sup>23)</sup>。このように、EPA と DHA はともに、脂質を低下させる作用を示すが、その強さには差があることが示唆されている。しかしながら、日常生活では、EPA と DHA は、それぞれを単独で摂ることは極めて稀で、魚介由来の魚油として摂取している。このような背景から、第 1 章では EPA と DHA の含有比率が異なる 2 種類の魚油を用い、2 つの成分の比率の違いが糖・脂質代謝に及ぼす影響について検討した。



PPAR $\alpha$  のリガンドとして EPA や DHA も機能するが、より強い PPAR $\alpha$  の合成リガンドとして、脂質、特にトリグリセリドの低下を目的に高脂血症治療薬として用いられているフェノフィブラートがある。フィブラートは、PPAR $\alpha$  の活性化により、リポタンパク質リパーゼ(LPL)の転写レベルでの発現を誘導し、トリグリセリドに富むリポタンパク質の代謝を促進する。また、肝臓における脂肪酸酸化を亢進し、トリグリセリド合成や超低密度リポタンパク質(VLDL)の合成と分泌を抑制する。さらに、アポ A I、A II の発現を誘導し、高密度リポタンパク質(HDL)レベルを増加させる<sup>24-30)</sup>。近年、フェノフィブラートのメタボリックシンドロームや 2 型糖尿病への効果を示すデータが報告され、注目されている<sup>31)</sup>。

魚油の脂肪酸酸化亢進作用はあまり強いものでなく、その脂質低下作用は、主に脂質合成の抑制によるものと考えられる。一方、フェノフィブラートは脂肪酸酸化を強く誘導することで脂質低下作用を示す。このような脂質低下の作用機序が異なる魚油とフェノフィブラートを組み合わせることで併用効果により有効性が得られる可能性は高いと考えられるが、その検討は今までされていなかった。そこで、第 1 章では、魚油とフェノフィブラートの併用における糖・脂質代謝に対する改善効果を明らかにするために、脂質に対する応答性が高い C57BL/6J マウス<sup>32)</sup>を用いて検討した。



**Fig.1 Hypolipidemic mechanism by fish oil and fenofibrate**

肥満者では、高脂血症やインスリン非依存性糖尿病(2型糖尿病)の発症リスクが上昇し、CHDや脳卒中を引き起こす危険性が高まる<sup>33-35)</sup>。平成19年の国民健康・栄養調査では、脂肪の摂取量が総エネルギー比率の30%以上の者が、20歳以上の男性では20.6%、女性では28.1%を占めている<sup>36)</sup>。そして、その割合は年々増加している。脂肪蓄積および脂肪細胞の肥大化により、アディポサイトカインであるアディポネクチンの血中レベルは減少し、レプチンとTNF $\alpha$ は増加して、インスリン抵抗性を呈し、最終的には糖尿病が発症する。アディポネクチンは、AMP-activated protein kinase (AMPK)を活性化して糖新生を抑制し、肝臓への糖の取り込みを亢進させる。また、PPAR $\alpha$ を活性化し、脂肪酸酸化を亢進させることでインスリン感受性を高めると考えられている<sup>37-39)</sup>。肥満者では、このような作用が健常者に比べ低下し、糖・脂質代謝に異常をきたしている。そこで、第2章では、肥満に至る過程における魚油とフェノフィブラートの有効作用を明らかにすることを目的とし、肥満体質を持ちインスリン抵抗性を呈すKKマウスをモデル動物として用い、魚油摂取または魚油とフェノフィブラートの併用摂取の糖・脂質代謝に対する改善効果を検討した。

さらに、肥満に至った後に対する魚油の作用を明らかにすることも極めて重要であると考えた。そこで、KKマウスに一定期間高脂肪食を与え、高度肥満を誘導させた後に、魚油の影響を検討することにした。現在の日本人が魚から摂っている脂質の割合は、約2.5%エネルギーに過ぎない<sup>40)</sup>。しかしながら、我々の研究を含め、これまでの魚油の機能解析を目的とした研究では、食餌中の脂質を全て魚油にしたものが多く、通常魚油摂取量に比べ、かなり多量の魚油を負荷した条件での作用を報告している。そこで、第3章では、KKマウスに一定期間高脂肪食を与えて、高度肥満を誘導させた後に、食餌中の魚油のエネルギーを2.5%、12.5%、25%に設定し、魚油摂取量および脂肪エネルギー比率の違いによる糖・脂質代謝に対する改善効果を検討した。

## 第1章 C57BL/6J マウスに対する EPA と DHA の含有比率が異なる 魚油とフェノフィブラートの糖・脂質代謝に及ぼす影響

魚油摂取による脂質低下作用は、主に EPA と DHA によるものと考えられており、EPA と DHA の作用の違いについても多くの研究が行われている。ラットの初代肝細胞の培養液に EPA または DHA を 100  $\mu$ M 添加した実験において、DHA が EPA より強く成熟型 SREBP-1 タンパク質を減少させることが示されている<sup>21)</sup>。また、初代肝細胞の培養液にさまざまな PUFA を 250  $\mu$ M 添加した実験において、EPA と DHA はともに PPAR $\alpha$  の活性化を誘導するが、EPA がより強く PPAR $\alpha$  を活性化することが報告されている<sup>22)</sup>。ラットを用いた実験では、EPA または DHA を 1000 mg/day/kg BW 摂取させたとき、EPA、DHA はともに AOX の mRNA とタンパク質レベルを増加させたが、血漿トリグリセリド低下作用は EPA のみで認められたことが報告されている<sup>23)</sup>。以上より、EPA と DHA はともに、脂質低下作用を示すが、その強さには差があることが示唆される。

本章では、EPA と DHA の含有比率が異なる魚油を用い、糖・脂質代謝に及ぼす作用の違いについて検討した。さらに、PPAR $\alpha$  の合成リガンドであるフェノフィブラートを用いて、魚油との併用摂取による作用について検討した。実験動物として 8 週齢の C57BL/6J 雌性マウスを用い、サフラワー油 (SO 群)、EPA の含有比率の高いニシン油 (MO 群)、DHA の含有比率の高いマグロ油 (TO 群) を脂質源とした食餌とそれぞれの食餌にフェノフィブラートを 0.1% (w/w) 添加した食餌 (SO+FF 群、MO+FF 群、TO+FF 群) で 8 週間飼育した。その後、糖・脂質代謝に関わるパラメータの解析を行った。実験食の脂肪エネルギー比率は全て 20% とし (Table 1-1)、脂肪酸組成は Table 1-2 に示した。

Table 1-1. Composition of the experimental diets

Experimental group	SO	MO	TO	SO+FF	MO+FF	TO+FF
Safflower oil	8.00			8.00		
Menhaden oil		8.00			8.00	
Tuna oil			8.00			8.00
Casein	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Sucrose	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37
$\beta$ -starch	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83
Vitamin mix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
Cellulose powder	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
L-cystine	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
t-Butylhydroquinone	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016
Fenofibrate				0.10	0.10	0.10
Total (g)	100.00	100.00	100.00	100.10	100.10	100.10

Table 1-2. Composition of the fatty acid

%	SO, SO+FF	MO, MO+FF	TO, TO+FF
14:0		7.5	3.0
16:0	4.4	17.5	18.2
16:1	0.2	11.5	4.2
18:0	2.1	3.5	4.9
18:1	77.5	8.5	18.8
18:2	14.2	<3	1.3
18:3	0.4	<3	0.8
20:4	0.5	<3	2.0
20:5		12.5	7.3
22:6		11.5	24.1
Others	0.7	<18.5	15.4

## 第 1 節 体組成、血漿および肝臓脂質レベル

最終体重は、SO 群と比較して、MO 群、TO 群で有意な差はなかった。フェノフィブラート(FF)を添加した全ての群が、SO 群と比較して有意に低値を示し、MO+FF 群では MO 群と比べても有意に低値であった。肝臓重量

は、MO 群、TO 群で有意に低値を示し、ともに SO 群の 81%であったが、MO+FF 群と TO+FF 群では、それぞれ MO 群と TO 群に比べ、2.0 倍、2.2 倍に増加した。子宮周囲白色脂肪組織(WAT)重量は、脂質源の違いによる有意な差はなかったが、FF 無添加群と比べて FF 添加群で 30-60%まで減少した。また、肩甲骨間褐色脂肪組織(BAT)重量は、WAT 重量と同様、脂質源の違いによる差はなかったが、FF 無添加群と比べて FF 添加群で 35-60%まで減少した(Table 2)。

Table 2. Body weight, liver weight and white adipose tissue and brown adipose tissue in C57BL/6J mice fed safflower oil, menhaden oil and tuna oil with/without 0.1% fenofibrate diet for 8 weeks.

	Body weight (g)	Liver weight (g)	WAT weight (g)	BAT weight (mg)
SO	24.16±3.38 <sup>a</sup>	1.17±0.25 <sup>c</sup>	0.74±0.37 <sup>a</sup>	114.6±35.4 <sup>a</sup>
MO	24.69±2.26 <sup>a</sup>	0.94±0.08 <sup>d</sup>	0.83±0.35 <sup>a</sup>	111.3±39.0 <sup>a</sup>
TO	22.67±1.76 <sup>ab</sup>	0.94±0.14 <sup>d</sup>	0.59±0.21 <sup>ab</sup>	101.6±41.9 <sup>a</sup>
SO+FF	20.07±1.70 <sup>c</sup>	1.74±0.21 <sup>b</sup>	0.29±0.10 <sup>c</sup>	40.7±10.9 <sup>b</sup>
MO+FF	20.61±1.15 <sup>bc</sup>	1.93±0.17 <sup>ab</sup>	0.26±0.04 <sup>c</sup>	49.7±5.9 <sup>b</sup>
TO+FF	21.70±0.92 <sup>bc</sup>	2.08±0.14 <sup>a</sup>	0.35±0.08 <sup>bc</sup>	58.5±14.9 <sup>b</sup>

Values represent the mean ± S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. SO: safflower oil fed group, MO: menhaden oil fed group, TO: tuna oil fed group. FF: fenofibrate. BAT: brown adipose tissue, WAT: white adipose tissue.

血漿トリグリセリド値は、SO 群と比較して MO 群で低下傾向(P=0.087)を示し、TO 群で有意に低値を示した。FF 添加群では FF 無添加群と比較して有意に低値を示し、SO+FF 群は SO 群の 61%、MO+FF 群は MO 群の 78%、TO+FF 群は TO 群の 83%であった。血漿総コレステロール値は、SO 群と比べて MO 群で 70%、TO 群で 63%であった。また、MO+FF 群、TO+FF 群ではそれぞれ MO 群、TO 群と比べ、2.0 倍、2.2 倍高値を示した。また、血漿 HDL-コレステロール値も、FF 添加群では FF 無添加群と比べ有意に高値を示し、MO+FF 群は MO 群に対して 1.7 倍、TO+FF 群は TO 群の 2.1

倍増加した(Table 3)。

Table 3. Plasma triglyceride, total cholesterol and HDL-cholesterol concentration and liver triglyceride and total cholesterol concentration in C57BL/6J mice fed safflower oil, menhaden oil and tuna oil with/without 0.1% fenofibrate diet for 8 weeks.

	Plasma triglyceride (mg/dL)	Plasma total cholesterol (mg/dL)	Plasma HDL-cholesterol (mg/dL)	Liver triglyceride (mg/total liver)	Liver total cholesterol (mg/total liver)
SO	65 ± 13 <sup>a</sup>	79 ± 18 <sup>b</sup>	47 ± 13 <sup>b</sup>	65.82 ± 39.63 <sup>a</sup>	3.68 ± 2.21 <sup>a</sup>
MO	58 ± 3 <sup>ab</sup>	55 ± 8 <sup>c</sup>	33 ± 7 <sup>c</sup>	8.16 ± 4.95 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.16 <sup>c</sup>
TO	53 ± 7 <sup>b</sup>	49 ± 11 <sup>c</sup>	28 ± 5 <sup>c</sup>	4.47 ± 2.21 <sup>b</sup>	0.95 ± 0.22 <sup>c</sup>
SO+FF	40 ± 3 <sup>c</sup>	66 ± 24 <sup>b,c</sup>	58 ± 7 <sup>a</sup>	20.95 ± 14.09 <sup>b</sup>	2.62 ± 1.02 <sup>a,b</sup>
MO+FF	45 ± 3 <sup>c</sup>	108 ± 12 <sup>a</sup>	57 ± 8 <sup>a</sup>	6.88 ± 4.77 <sup>b</sup>	1.79 ± 0.43 <sup>b,c</sup>
TO+FF	44 ± 6 <sup>c</sup>	109 ± 13 <sup>a</sup>	57 ± 5 <sup>a</sup>	6.72 ± 1.47 <sup>b</sup>	1.98 ± 0.13 <sup>b,c</sup>

Values represent the mean ± S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. SO: safflower oil fed group, MO: menhaden oil fed group, TO: tuna oil fed group. FF: fenofibrate

肝臓トリグリセリド値は、MO 群、TO 群で有意に低値を示し、SO 群と比べて MO 群は 12%、TO 群は 7%であった。また、SO+FF 群は SO 群と比べて 32%であったが、MO+FF 群と TO+FF 群はそれぞれ MO 群、TO 群との間に差はなかった。肝臓総コレステロール値もトリグリセリド値と同様に、SO 群と比較して MO 群、TO 群で有意に低値を示し、MO 群で 31%、TO 群で 26%であった。しかし、FF 添加による差は認められなかった(Table 3)。

血漿アディポネクチン値は、MO 群、TO 群で有意に高値を示し、SO 群と比べて MO 群で 1.8 倍、TO 群で 1.9 倍増加した。FF 添加群の間では、SO+FF 群と MO+FF 群の間に有意な差がなく、TO+FF 群は有意に高値を示したが、約 1.3 倍の増加にとどまった。また、SO 群と SO+FF 群の間で差はなかった。一方、血漿レプチン値は、摂取油脂源の違いによる有意な差はなかったが、SO+FF 群と MO+FF 群は、SO 群、MO 群と比較して有意に低値を示し、TO+FF 群も TO 群と比べて低下傾向を示した。肝障害のマーカーである血漿アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)とアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)値は、脂質源の違いで差はなかったが、

MO+FF 群、TO+FF 群では MO 群、TO 群と比べて有意に高値を示し、AST はそれぞれ 1.6 倍、1.4 倍、ALT は 3.4 倍、3.2 倍であった(Table 4)。

Table 4. Plasma adiponectin, leptin, AST and ALT levels in C57BL/6J mice fed safflower oil, menhaden oil and tuna oil with/without 0.1% fenofibrate diet for 8 weeks.

	Plasma adiponectin ( $\mu$ g/mL)	Plasma leptin (ng/mL)	Plasma AST (IU/L)	Plasma ALT (IU/L)
SO	36.5 $\pm$ 3.7 <sup>b,c</sup>	20.2 $\pm$ 11.0 <sup>a</sup>	41 $\pm$ 11 <sup>b,c</sup>	8 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
MO	67.3 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	16.8 $\pm$ 11.2 <sup>a</sup>	33 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	7 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
TO	70.5 $\pm$ 12.3 <sup>a</sup>	13.4 $\pm$ 11.8 <sup>ab</sup>	38 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	8 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
SO+FF	32.7 $\pm$ 4.0 <sup>c</sup>	2.3 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	32 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	13 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
MO+FF	39.5 $\pm$ 8.4 <sup>b,c</sup>	2.5 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>	52 $\pm$ 15 <sup>ab</sup>	24 $\pm$ 9 <sup>a</sup>
TO+FF	43.5 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	4.6 $\pm$ 3.1 <sup>b,c</sup>	54 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	27 $\pm$ 7 <sup>a</sup>

Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase. SO: safflower oil fed group, MO: menhaden oil fed group, TO: tuna oil fed group. FF: fenofibrate

## 第 2 節 肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子発現

魚油やフェノフィブラートの負荷による血漿や肝臓脂質への影響について、さらにそのプロセスを明らかにするため、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の mRNA レベルを定量 RT-PCR 法を用いて調べた。

Fig. 2 に SREBP-1c、Insig-1、FAS、SCD-1 の mRNA レベルを示した。SREBP-1c の mRNA レベルは、FF 無添加の各群間に有意な差はなかったが、FF 添加群の SO+FF 群と TO+FF 群は、SO 群、TO 群と比べて有意に増加した。しかし、ニシン油(MO)ではフェノフィブラート添加で増加が認められなかった。SREBP-1 の標的遺伝子である Insig-1、FAS、SCD-1 の mRNA レベルは、SO 群と比較して MO 群、TO 群で有意に低下し、Insig-1 は MO 群で 31%、TO 群で 32%、FAS は MO 群で 17%、TO 群で 12%、SCD-1 は MO 群で 18%、TO 群で 8%にまで低下した。次に、FF 添加群との比較では、Insig-1 の mRNA レベルは FF 添加による影響はみられなかった。一

方、FAS の mRNA 発現は、SO+FF 群で SO 群と比べ有意に低下したが、MO+FF 群と TO+FF 群では、MO 群、TO 群との間に差はなかった。SCD-1 の mRNA レベルは SO 群と SO+FF 群間で差がなかったのに対して、MO+FF 群と TO+FF 群では、MO 群、TO 群と比べて有意に増加した。

SREBP-2、HMG-CoA reductase、LDL-receptor の mRNA レベルを Fig. 3 に示した。SREBP-2 の mRNA レベルは、脂質源を魚油とした MO 群、TO 群で有意に低く、SO 群と比べて MO 群で 68%、TO 群で 57%であった。しかし、FF 添加による影響は認められなかった。HMG-CoA reductase の mRNA レベルは、MO 群と TO 群で有意に低く、SO 群と比べて MO 群で 17%、TO 群で 21%であった。また、SO+FF 群は SO 群と比較して有意に低下したが、MO+FF 群と TO+FF 群はそれぞれ MO 群、TO 群との間に差は認められなかった。LDL-receptor の mRNA レベルは、SO 群と比較して TO 群で有意に低がったが、MO 群では有意な差はなかった。また、TO+FF 群では TO 群と比較して有意に増加した。

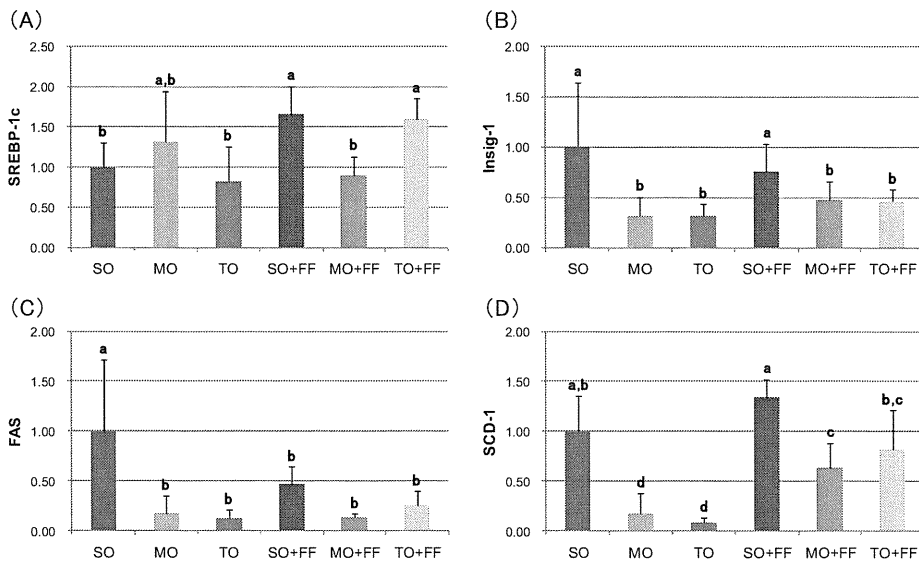


Fig.2. Effects of menhaden oil and tuna oil with/without 0.1% fenofibrate treatment for 8 weeks on expression of genes involved in fatty acid synthesis in liver from C57BL/6J mice.

Panels show mRNA expression levels of SREBP-1c (A), Insig-1 (B), FAS (C) and SCD-1 (D). mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the 20% safflower oil group. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. Insig-1: insulin-induced gene-1, FAS: fatty acid synthase, SCD-1: stearoyl-CoA desaturase. SO: safflower oil fed group, MO: menhaden oil fed group, TO: tuna oil fed group, FF: fenofibrate.



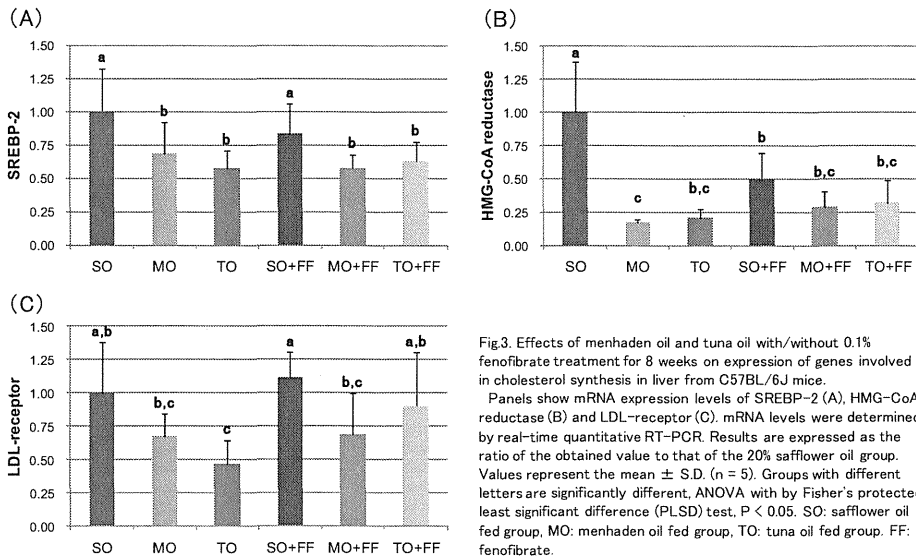


Fig.3. Effects of menhaden oil and tuna oil with/without 0.1% fenofibrate treatment for 8 weeks on expression of genes involved in cholesterol synthesis in liver from C57BL/6J mice. Panels show mRNA expression levels of SREBP-2 (A), HMG-CoA reductase (B) and LDL-receptor (C). mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the 20% safflower oil group. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. SO: safflower oil fed group, MO: menhaden oil fed group, TO: tuna oil fed group. FF: fenofibrate.

Fig. 4 に PPAR $\alpha$ 、AOX、UCP-2 の mRNA レベルを示した。PPAR $\alpha$  の mRNA レベルは、SO 群と比較して MO 群、TO 群で有意に増加した。SO+FF 群は SO 群と比べて有意に増加したが、MO+FF 群と TO+FF 群はそれぞれ MO 群と TO 群の間に差がなかった。AOX の mRNA レベルには、FF 無添加の群間で有意な差は認められなかったが、SO 群と比較して MO 群で 1.6 倍、TO 群で 1.9 倍増加した。さらに、FF 添加群では著しく発現が誘導され、それぞれの FF 無添加群と比べて SO+FF 群で 5.7 倍、MO+FF 群で 4.5 倍、TO+FF 群で 4.3 倍増加した。UCP-2 の mRNA レベルも、SO 群と比較して MO 群、TO 群で差はなかったが、FF 添加群では 3 群とも有意に増加し、それぞれの FF 無添加群と比べて SO+FF 群で 3.4 倍、MO+FF 群で 2.8 倍、TO+FF 群で 2.4 倍増加した。

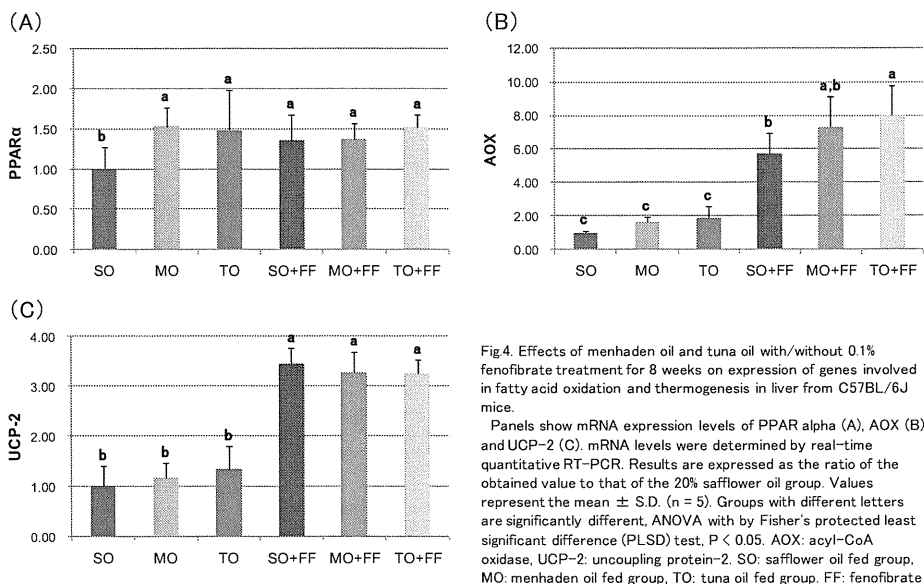


Fig. 4. Effects of menhaden oil and tuna oil with/without 0.1% fenofibrate treatment for 8 weeks on expression of genes involved in fatty acid oxidation and thermogenesis in liver from C57BL/6J mice. Panels show mRNA expression levels of PPAR alpha (A), AOX (B) and UCP-2 (C). mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the 20% safflower oil group. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. AOX: acyl-CoA oxidase, UCP-2: uncoupling protein-2. SO: safflower oil fed group, MO: menhaden oil fed group, TO: tuna oil fed group, FF: fenofibrate

Fig. 5 に示した、コレステロール異化の律速酵素である cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)の mRNA レベルは、SO 群と比べて魚油摂取群の MO 群と TO 群で変動しなかった。また、FF 添加の SO+FF 群は SO 群との間で変化はなかったが、魚油とフェノフィブラートを併用摂取した MO+FF 群、TO+FF 群では、MO 群、TO 群と比べて有意に増加した。sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1)の mRNA レベルは、CYP7A1 と同様に、FF 無添加の群間では差がなかったが、MO+FF 群では MO 群および SO+FF 群と比べて有意に増加した(Fig. 5)。

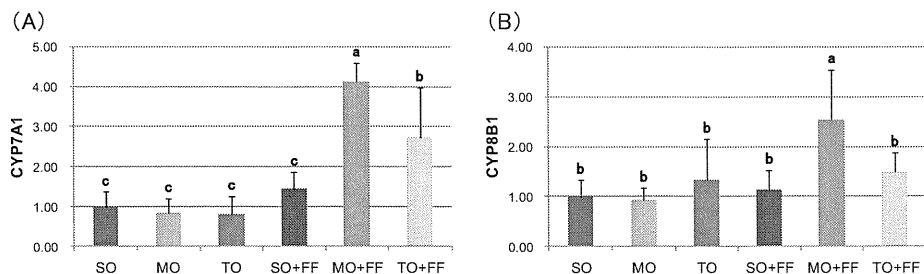


Fig.5. Effects of menhaden oil and tuna oil with/without 0.1% fenofibrate treatment for 8 weeks on expression of genes involved in cholesterol metabolism in liver from C57BL/6J mice. Panels show mRNA expression levels of CYP7A1 (A) and CYP8B1 (B). mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the 20% safflower oil group. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. CYP7A1: cholesterol 7alpha-hydroxylase, CYP8B1: sterol 12alpha-hydroxylase. SO: safflower oil fed group, MO: menhaden oil fed group, TO: tuna oil fed group, FF: fenofibrate

### 第3節 小括および考察

魚油を用いた食餌において、n-3系 PUFA の EPA と DHA の摂取量は、MO 群で、EPA が 1374 mg/kg BW/day、DHA が 1264 mg/kg BW/day であり、TO 群では、EPA 806 mg/kg BW/day、DHA 2661 mg/kg BW/day であった。また、MO+FF 群は、EPA 1144 mg/kg BW/day、DHA 1053 mg/kg BW/day、TO+FF 群は、EPA 731mg/kg BW/day、DHA 2414 mg/kg BW/day の摂取に値した。さらに、フェノフィブラートの負荷量は 125-140 mg/kg BW/day であった。最終体重および脂肪組織重量の増加は、脂肪エネルギー比率 20%の EPA 含有比率の高いニシン油、あるいは DHA 含有比率の高いマグロ油の摂取によって抑制されなかったが、フェノフィブラート 0.1%(w/w)添加により体重および脂肪組織重量の増加が著しく抑制された。肝臓において、脂肪酸合成に関わる FAS、SCD-1 やコレステロール合成に関わる HMG-CoA reductase、LDL-receptor の mRNA レベルは魚油摂取によって著しく減少したが、フェノフィブラート添加による影響はみられなかった。一方、脂肪酸酸化や熱産生に働く AOX や UCP-2 の mRNA レベルは、魚油摂取では有意に増加が示されなかったが、フェノフィブラート添加によって著しく発現が誘導された。コレステロール異化の律速酵素である CYP7A1 の mRNA レベルは、魚油とフェノフィブラートを併用摂取することで著しく増加し、さらにニシン油(MO)とフェノフィブラートを併用することによってその発現が強く誘導されることが明らかになった。

本章の検討では、体重および脂肪組織重量には、サフラワー油と比較して魚油摂取による影響がみられなかったが、フェノフィブラート添加により大きく低下した(Table 2)。C57BL/6J 雌性マウスに 60%エネルギーの魚油食を 1 週間与えた研究では、明らかな体重減少がみられている<sup>8)</sup>。このような結果の違いは、本研究では、魚油を 20%エネルギーに設定したことから、脂肪エネルギー比率の差が体重や脂肪組織重量の変化に影響したと考えられる。一方、フェノフィブラート添加群では、肝臓における脂肪酸合成に関与する FAS、SCD-1 の mRNA レベルは変化しなかったが、AOX と UCP-2 の mRNA

レベルはFF無添加群に比べ、著しく増加した(Fig. 4)。このことは、フェノフィブラートは、脂質の異化過程における脂肪酸酸化や熱産生を誘導し、体重および脂肪組織重量の増加を抑制することを示唆する。魚油は、AOX、UCP-2のmRNA発現とタンパク質量、活性をともに増加させることが報告されている<sup>8,41,42)</sup>。これらの中には、血中および肝臓中トリグリセリド量も低下したことを示すものもある<sup>41)</sup>。また、フェノフィブラートは、PPAR $\alpha$ を転写レベルでは誘導せず、PPAR $\alpha$ タンパク質の活性化を誘導し、標的遺伝子であるAOX、UCP-2などのmRNAレベルを著しく増加させることが報告されている<sup>43,44)</sup>。本研究において、PPAR $\alpha$ のmRNAレベルは魚油およびフェノフィブラート添加によって有意に増加した。しかし、AOX、UCP-2のmRNAレベルは、魚油摂取では誘導されず、フェノフィブラート摂取によって著しく誘導された(Fig. 4)。Nakataniらの研究では、脂肪エネルギー比率60%と高濃度の魚油投与で、AOXやUCP-2のmRNA発現が亢進することを示している<sup>8)</sup>。今回の検討において、魚油の摂取量が脂肪エネルギー比率20%では、脂肪酸酸化と熱産生に関わるAOX、UCP-2のmRNA発現は誘導されないことが示され、血漿トリグリセリドは低下しなかった。

レプチンは脂肪組織の肥大化に伴い分泌量が増加し、血中レベルが上昇する。フェノフィブラート添加群では、脂肪組織の増加が有意に抑制され、血中レプチン値も著しく低下することが示された。一方、アディポネクチンの分泌は、体重および内臓脂肪量と逆相関を示すことが報告されている<sup>45,46)</sup>。本研究では、魚油摂取によって体重と白色脂肪組織重量に変化はなかったが、血中アディポネクチン値はSO群と比べ、約2倍増加した(Table 2)。しかし、魚油とフェノフィブラートの併用摂取群では、魚油単独摂取群でみられた血中アディポネクチン値の増加が認められなくなった。アディポネクチンは、アディポネクチンレセプターに結合することで作用を発揮する。Tsuchidaらは、PPAR $\alpha$ アゴニストであるWy-14,643投与により血清アディポネクチン値は増加しないが、白色脂肪組織におけるアディポネクチンレセプターの発現が増加し、インスリン感受性が亢進すると報告している<sup>47)</sup>。また、インスリン分泌とインスリン感受性の亢進は血中アディポネクチン値やアディポネクチンとアディポネクチンレセプターのmRNA発現と負の相関を

示すことが報告されている<sup>48-51)</sup>。本研究では、フェノフィブラート添加群の肝臓において、AOX、UCP-2 の mRNA レベルが著しく上昇したことから、 $\beta$ 酸化が著しく誘導され、脂肪組織の増加を強く抑制したと考えられる。そして、脂肪組織の肥大化の抑制により、インスリン抵抗性の発現が抑えられたことで、血中アディポネクチン値は増加しなかったと考えられる。

脂肪エネルギー比率 25%の魚油でラットを 1 週間飼育した研究や魚油 60%エネルギーで C57BL/6J マウスを 4 か月飼育した研究では、SREBP-1c の mRNA 発現と成熟型タンパク質レベルが減少したと報告されている<sup>46)</sup>。また、脂肪エネルギー比率 40%の魚油で 1 週間飼育した C57BL/6J マウスでは、SREBP-1c mRNA 発現は減少しなかったが、成熟型タンパク質レベルが減少したという報告と SREBP-1c mRNA 発現と成熟型タンパク質レベルの両方が減少したという報告がある<sup>7,52)</sup>。また、C57BL/6J マウスを用いて、総脂肪エネルギー比率 60%のうち、1/6(10%エネルギー)を魚油に置換した時は、成熟型タンパク質量のみが減少し、1/2(30%エネルギー)以上を魚油に置換した場合は mRNA とタンパク質レベルがともに減少したという報告もある<sup>8)</sup>。本研究では、8 週間飼育を行ったが、脂肪エネルギー比率が 20%であったため魚油摂取量が少なく、SREBP-1c の mRNA レベルを減少させる用量には至らなかったと考えられる。しかし、SREBP-1 の応答遺伝子である Insig-1 の mRNA レベルは魚油摂取によって有意に減少した。Insig-1 の mRNA とタンパク質レベルは、成熟型 SREBP-1 タンパク質によって制御されている<sup>53)</sup>。本研究で Insig-1 の mRNA レベルが減少していることから、SREBP-1 タンパク質の成熟型へのプロセスが抑制され、成熟型 SREBP-1 タンパク質レベルが減少していることが考えられる。また、魚油または n-3PUFA によって、SREBP-1 の標的遺伝子である FAS や SCD-1 の mRNA とタンパク質活性は連動して低下することが報告されている<sup>54,55)</sup>。MO 群と TO 群の魚油摂取群では、FAS、SCD-1 の mRNA レベルが著しく減少し、脂肪酸合成が抑制されたことが示唆されたが、体重や脂肪組織重量には影響を与えなかった。SREBP-2 mRNA 発現や成熟型タンパク質、その標的遺伝子に対する不飽和脂肪酸や魚油による影響は一様なものではない<sup>4,7,52)</sup>。魚油摂取によって、SREBP-2 成熟型タンパク質は減少しないが、

HMG-CoA reductase や LDL-receptor の mRNA 発現は減少するという報告があり、肝臓中コレステロール値は低下し、2.9 mg/g liver であった<sup>6)</sup>。また、魚油摂取によって、HMG-CoA reductase や LDL-receptor の mRNA レベルとタンパク質活性がともに減少した報告がある<sup>56,57)</sup>。本研究では、SREBP-2 の mRNA レベルは魚油摂取によって抑制され、その標的遺伝子である HMG-CoA reductase と LDL-receptor の mRNA レベルも減少した。また、魚油摂取群では、血中および肝臓中総コレステロール値も有意に低値を示し、コレステロール合成に対する制御は、今回用いた魚油摂取量でも有効であることが示唆された。肝臓中総コレステロール値は著しく低下(約 1 mg/g liver)したが、解剖時の観察では、肝臓からの出血は認められなかった。また、同様の条件で検討した別の実験では、肝臓中総コレステロール値が 0.6 mg/g liver であっても、肝臓組織切片の観察において肝細胞の形態に異常は認められなかったことから(data not shown)、コレステロール低下による障害は起きていないものと考えられた。以上の結果から、C57BL/6J 雌性マウスにおいて、脂肪エネルギー比率 20%の魚油は、同レベルのサフラワー油に比べ、体重と脂肪組織重量を低下させることはできないが、分子レベルでの制御を介して、脂肪酸合成およびコレステロール合成を抑制することで肝臓における脂質低下作用を現すことが示唆された。

CYP7A1 の mRNA 発現は、魚油またはフェノフィブラートによって誘導され<sup>58-60)</sup>、魚油により、胆汁酸とコレステロールの排泄が 2 倍増加することが報告されている<sup>58)</sup>。また、CYP7A1 や CYP8B1 のタンパク質量とその活性は mRNA レベルで制御されていることが報告されている<sup>61-63)</sup>。本研究において、CYP7A1 の mRNA 発現は、魚油またはフェノフィブラートの単独摂取では誘導されず、魚油とフェノフィブラート併用摂取でのみ著しく誘導された(Fig. 5)。CYP7A1 発現は、核内受容体のヘテロダイマーである PPAR/RXR や LXR/RXR によって誘導され、PPAR/LXR によって抑制される<sup>64)</sup>。魚油は RXR $\alpha$  の発現を増加させることが報告されている<sup>58)</sup>。MO+FF 群と TO+FF 群では、魚油による RXR 発現誘導とフェノフィブラートによる PPAR $\alpha$  の活性化が互いに作用し合って、PPAR/RXR の形成が亢進され、CYP7A1 の mRNA 発現が誘導されたと考えられる。また、MO+FF 群では、

TO+FF群と比較して有意にCYP7A1のmRNAレベルが増加したことから、EPAを多く含む魚油はDHAを多く含む魚油より、RXRの発現誘導を介したPPAR/RXRの形成をより強く誘導する可能性が示された。しかし、魚油単独群と魚油とフェノフィブラートの併用群の間で肝臓中のコレステロール値の差はなかったことから、このことに関しては、EPAとDHAの含有量をより高めた油脂等を用いて、さらなる検討が必要である。

以上述べてきたように、魚油は、脂肪酸およびコレステロール合成を抑制し、肝臓中トリグリセリドと血中および肝臓中総コレステロールを低下させることを示した。一方、フェノフィブラートは、脂肪酸酸化を亢進し、血中のトリグリセリドを低下させ、体重および脂肪組織の増加を抑制することを示した。これらのことから、魚油とフェノフィブラートの併用では、それぞれの作用が相加的に働き、脂質合成は抑制されて、脂肪酸酸化が亢進されることで、血中および肝臓中のトリグリセリドと総コレステロールの低下、体重および脂肪組織の増加を抑制できると考えられる。

## 第2章 KK マウスに対する EPA と DHA の含有比率が異なる魚油とフェノフィブラートの糖・脂質代謝に及ぼす影響

KK マウスは、体重や脂肪組織重量が著しく多く、重度の高インスリン血症、高血糖および高脂血症を呈する 2 型糖尿病モデルである KK-A<sup>y</sup> マウスに比べると、体重増加が緩やかであり、体重増加に伴って、雄では高インスリン血症と高血糖を呈するが、雌では高インスリン血症を呈するものの、高血糖は誘発されにくい特徴を持っている<sup>65)</sup>。第 2 章では、中程度の肥満および糖尿病予備群のモデルとして KK マウスを用い、EPA と DHA の含有比率が異なる魚油とフェノフィブラートの糖・脂質代謝への作用を調べた。6 週齢の KK 雌性マウスを用い、日本人が日常生活で摂取している脂肪酸の種類および割合に近づけ、動物性のラード、植物性のサフラワー油を 4:6 で調合した油(コントロール群)、EPA が豊富な魚油(EPA 群)、DHA が豊富な魚油(DHA 群)を脂質源とした食餌、さらに DHA が豊富な魚油にフェノフィブラートを 0.2%(w/w)添加した食餌(DHA+FF 群)で 8 週間飼育した。その後、糖・脂質代謝に関わるパラメータの解析を行った。実験食の脂肪エネルギー比率は全て 25%とし(Table 5-1)、脂肪酸組成は Table 5-2 に示した。



Table 5-1. Composition of the experimental diets

Experimental group	Lard/SO	EPA	DHA	DHA+FF
Lard	4.20			
Safflower oil	6.30			
EPA-rich fish oil		10.50		
DHA-rich fish oil			10.50	10.50
Casein	21.00	21.00	21.00	21.00
Sucrose	10.50	10.50	10.50	10.50
$\beta$ -starch	47.45	47.45	47.45	47.45
Vitamin mix	1.31	1.31	1.31	1.31
Mineral mix	3.68	3.68	3.68	3.68
Cellulose powder	5.25	5.25	5.25	5.25
L-cystine	0.32	0.32	0.32	0.32
t-Butylhydroquinone	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021
Fenofibrate				0.2000
Total (g)	100.00	100.00	100.00	100.20

Table 5-2. Composition of the fatty acid

%	Lard/SO	EPA	DHA, DHA+FF
14:0	0.7	6.3	3.0
16:0	12.2	14.4	18.2
16:1	1.2	9.1	4.2
18:0	7.0	4.8	4.9
18:1	64.1	15.6	18.8
18:2	12.2	1.8	1.3
18:3	0.5	0.2	0.8
20:4	0.3	0.7	2.0
20:5		20.3	7.3
22:6		13.0	24.1
Others	1.8	13.8	15.4

## 第 1 節 体組成、血漿および肝臓脂質レベル

飼育期間中のマウスの成長曲線を Fig. 6 に示した。飼育開始 1 週間の時点で、DHA+FF 群の体重増加量は他の群と比べ 1/2 に抑えられ、体重はコントロール群と比較して有意に少なかった。EPA 群、DHA 群の両魚油摂取群

の体重が有意に低値を示し始めたのは、飼育開始から 5 週間後であった。

Table 6 に示したように、8 週間後の最終体重は、魚油摂取の 3 群で有意に低値を示し、コントロール群と比べて EPA 群で 85%、DHA 群で 89%であり、DHA+FF 群は、DHA 群に比べて 73%であった。肝臓重量は EPA 群と DHA 群の両魚油摂取群で有意に少なく、コントロール群と比べて EPA 群で 42%、DHA 群で 52%であった。しかし、DHA+FF 群は、コントロール群と同レベルだった。子宮周囲 WAT 重量は、魚油摂取の 3 群で有意に低値を示し、コントロール群と比べて EPA 群で 62%、DHA 群で 77%であり、DHA+FF 群では DHA 群よりさらに 63%低下した。肩甲骨間 BAT 重量は、コントロール群と比較して EPA、DHA 群で差はなかったが、DHA+FF 群は、DHA 群と比べて有意に低値を示した。小型実験動物用の X 線 CT 装置の解析結果を Fig. 7 に示した。内臓脂肪量は、魚油摂取の 3 群で有意に低値を示し、コントロール群と比べて EPA 群で 68%、DHA 群で 72%あり、DHA+FF 群は DHA 群よりさらに 75%少なかった。皮下脂肪量は、DHA 群で有意に低値を示し、DHA+FF 群は DHA 群と比べて 75%少なかった。

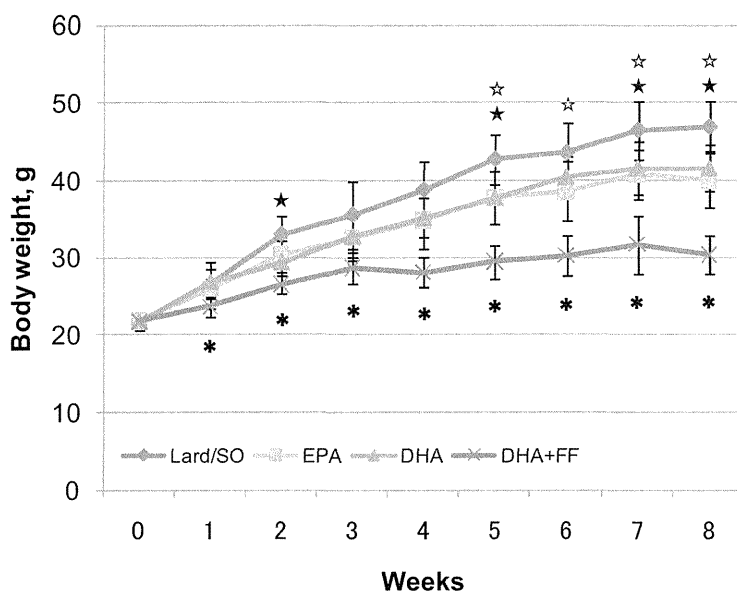


Fig.6. Body weight curves for female KK mice fed lard/safflower oil, EPA-rich fish oil, and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate for 8 weeks.

Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Statistical significance is indicated for the ☆-EPA-rich fish oil group, ★-DHA-rich fish oil group, \*-DHA-rich fish oil with fenofibrate group compared to the Lard/SO group. ANOVA by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05.

Table 6. Feeding energy, body weight, liver weight and white adipose tissue and brown adipose tissue weight in KK mice fed lard/safflower oil, EPA-rich fish oil and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate diet for 8 weeks.

	Lard/SO	EPA	DHA	DHA+FF
Feeding energy <sup>※</sup> (kcal/mouse/day)	17.4	15.3	16.5	13.9
Initial body weight (g)	21.7±1.0	21.8±1.0	21.6±1.1	21.7±1.1
Final body weight (g)	46.9±3.2 <sup>a</sup>	40.0±3.6 <sup>b</sup>	41.6±3.0 <sup>b</sup>	30.3±2.4 <sup>c</sup>
Liver weight (g)	3.27±0.50 <sup>a</sup>	1.36±0.14 <sup>b</sup>	1.70±0.29 <sup>b</sup>	3.24±0.13 <sup>a</sup>
WAT weight (g)	4.20±0.31 <sup>a</sup>	3.02±0.16 <sup>c</sup>	3.64±0.33 <sup>b</sup>	1.34±0.42 <sup>d</sup>
BAT weight (mg)	207.3±53.4 <sup>a</sup>	243.2±60.3 <sup>a</sup>	256.1±24.6 <sup>a</sup>	78.0±21.8 <sup>b</sup>

Values represent the mean ± S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. <sup>※</sup>Mean daily feeding energy calculated from total feeding energy in feeding period for 8 weeks.

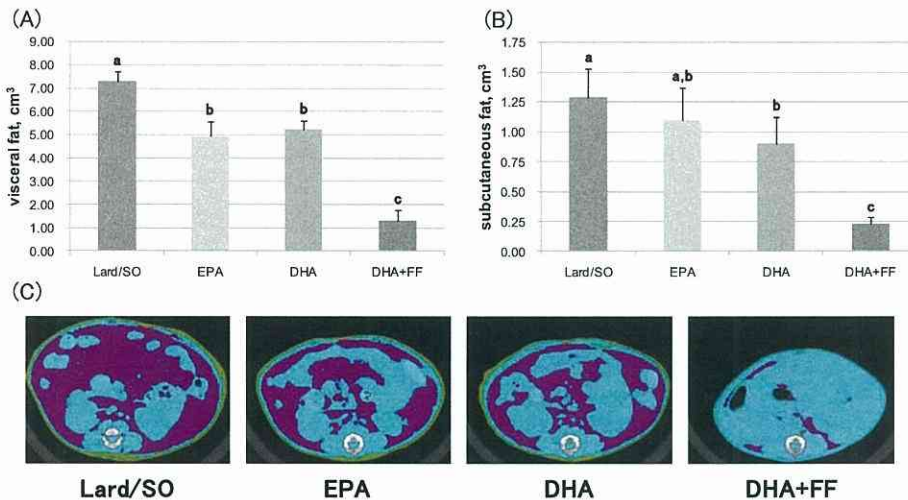


Fig.7. CT-based body fat composition analysis of female KK mice fed lard/safflower oil, EPA-rich fish oil, and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate diet for 8 weeks.

CT-estimated amounts of visceral fat (A) and subcutaneous fat (B). Representative CT images (C). The purple and yellow areas represent the visceral and subcutaneous fat, respectively. Values represent the mean ± S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different. ANOVA by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05.

血糖値は、群間で有意な差は認められなかった(Table 7)。血漿インスリン値は、魚油摂取の 3 群で有意に低値を示し、コントロール群と比べて EPA 群で 19%、DHA 群で 28%であり、DHA+FF 群は DHA 群より 82%低値を示した。血漿レプチン値は、コントロール群と比較して EPA 群、DHA 群の両魚油群ともに差はなかったが、DHA 群と比べて DHA+FF 群で有意に低値を示し 5%であった。血漿アディポネクチン値は、EPA 群、DHA 群で有意に高値を示し、コントロール群と比べて EPA 群で 2.2 倍、DHA 群で 2.5 倍であったが、DHA+FF 群ではこのような高値は示さなかった(Table 7)。

血漿トリグリセリド値は、コントロール群と比較して EPA 群、DHA 群の両群ともに有意な差はなかったが、DHA 群と比べて DHA+FF 群は有意に低値を示し、59%であった。血漿総コレステロール値は、EPA 群と DHA 群の魚油群で有意に低値を示し、コントロール群と比べて、それぞれ 44%、61%であったが、フェノフィブラートを添加した DHA+FF 群では、逆に有意な上昇がみられた(Table 7)。血漿 HDL-コレステロール値も血漿総コレステロールと同様の傾向がみられた。Fig. 8 に示したように、肝臓トリグリセリド値は、魚油摂取の 3 群で有意に低値を示し、コントロール群と比べて EPA 群で 9%、DHA 群で 27%であり、DHA+FF 群は DHA 群と比べて 89%低値を示した。肝臓総コレステロール値も、魚油摂取の 3 群で有意に低値(2-3 mg/g liver)を示し、前章のサフラワー油食を与えた C57BL/6J マウスと同じか低い値であった。また、DHA 群と DHA+FF 群間で差はなかった。肝臓組織を HE 染色した結果、コントロール群の肝臓では、脂肪滴の蓄積が観察されたが、魚油摂取の 3 群ではこのような脂肪滴の蓄積が顕著に抑えられた(Fig. 8A)。

Table 7. Blood glucose and plasma insulin, leptin and adiponectin level and plasma triglyceride, total cholesterol and HDL-cholesterol concentration in KK mice fed lard/safflower oil, EPA-rich fish oil and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate diet for 8 weeks.

	Lard/SO	EPA	DHA	DHA+FF
Blood glucose (mg/dL)	180±18	190±77	234±36	181±34
Plasma insulin (ng/mL)	15.83±5.76 <sup>a</sup>	2.94±1.45 <sup>b</sup>	4.37±2.50 <sup>b</sup>	0.77±0.24 <sup>b</sup>
Plasma leptin (ng/mL)	89.7±3.4 <sup>a</sup>	70.1±10.7 <sup>b</sup>	83.7±8.6 <sup>a</sup>	4.4±1.9 <sup>c</sup>
Plasma adiponectin (μg/mL)	16.6±2.1 <sup>b</sup>	36.6±5.6 <sup>a</sup>	41.0±7.6 <sup>a</sup>	20.8±1.6 <sup>b</sup>
Plasma triglyceride (mg/dL)	110±22 <sup>a</sup>	93±15 <sup>a</sup>	97±17 <sup>a</sup>	57±9 <sup>b</sup>
Plasma cholesterol (mg/dL)	121±25 <sup>b</sup>	53±4 <sup>c</sup>	73±12 <sup>c</sup>	154±24 <sup>a</sup>
Plasma HDL-cholesterol (mg/dL)	45±21 <sup>b</sup>	17±4 <sup>c</sup>	29±8 <sup>b,c</sup>	66±13 <sup>a</sup>

Values represent the mean ± S.D. (n = 4-5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. .

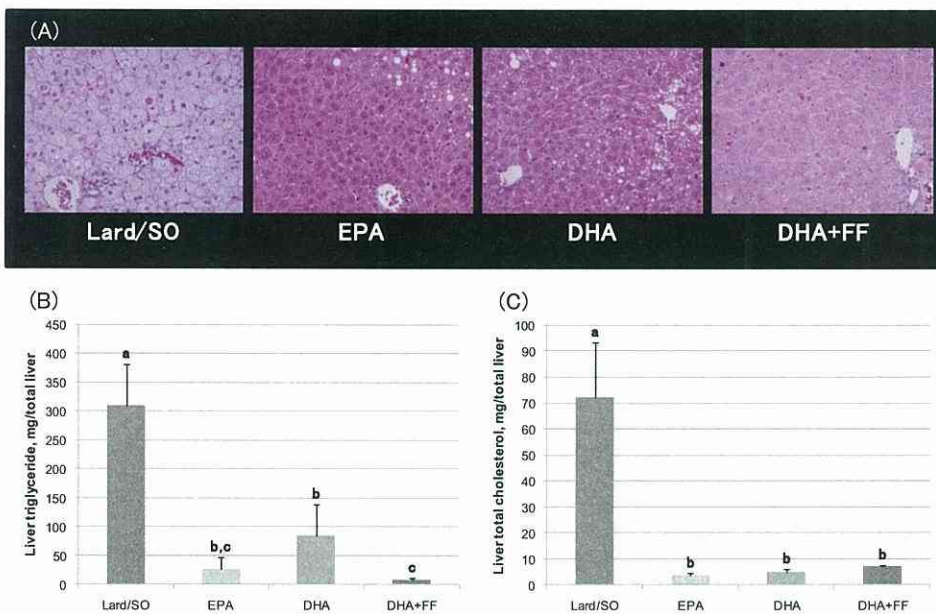


Fig.8. Liver histopathology, liver triglyceride, and total cholesterol concentrations of lard/safflower oil, EPA-rich fish oil, and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate diet.

Liver tissue isolated from female KK mice fed lard/safflower oil, EPA-rich fish oil, and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate diet for 8 weeks. Histopathology of isolated liver tissues from each group embedded in paraffin and then stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under a microscope at 400-fold magnification (A). Liver triglyceride (B) and total cholesterol (C) concentrations. Values represents the mean ± S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different. ANOVA by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05.

## 第2節 肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子発現

魚油およびフェノフィブラートによる糖・脂質代謝への影響を分子レベルで解析するため、肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子の mRNA レベルを定量 RT-PCR 法を用いて分析した。

Fig. 9 に SREBP-1c、Insig-1、FAS、SCD-1 の mRNA レベルを示した。SREBP-1c の mRNA レベルは、魚油摂取群で有意に低く、コントロール群と比べて EPA 群で 31%、DHA 群で 71%であった。SREBP-1 の標的遺伝子である Insig-1、FAS、SCD-1 の mRNA レベルも魚油摂取群で有意に低く、コントロール群と比べて Insig-1 は EPA 群で 22%、DHA 群で 39%、FAS は EPA 群で 3%、DHA 群で 6%、SCD-1 は EPA 群で 5%、DHA 群で 4%であった。これらの遺伝子発現は、DHA 群と DHA+FF 群の間で差はなかった。

SREBP-2、HMG-CoA reductase、LDL-receptor の mRNA レベルを Fig. 10 に示した。SREBP-2 の mRNA レベルは、コントロール群と比べて、EPA 群で有意に低かったが、DHA 群や DHA+FF 群では差がなかった。しかし、SREBP-2 の標的遺伝子である HMG-CoA reductase や LDL-receptor の mRNA レベルは、魚油摂取で有意に低下し、コントロール群と比べて HMG-CoA reductase は、EPA 群で 29%、DHA 群で 47%であり、LDL-receptor は、EPA 群で 33%、DHA 群で 52%であった。これらの遺伝子発現は、DHA 群と DHA+FF 群の間で差はなかった。

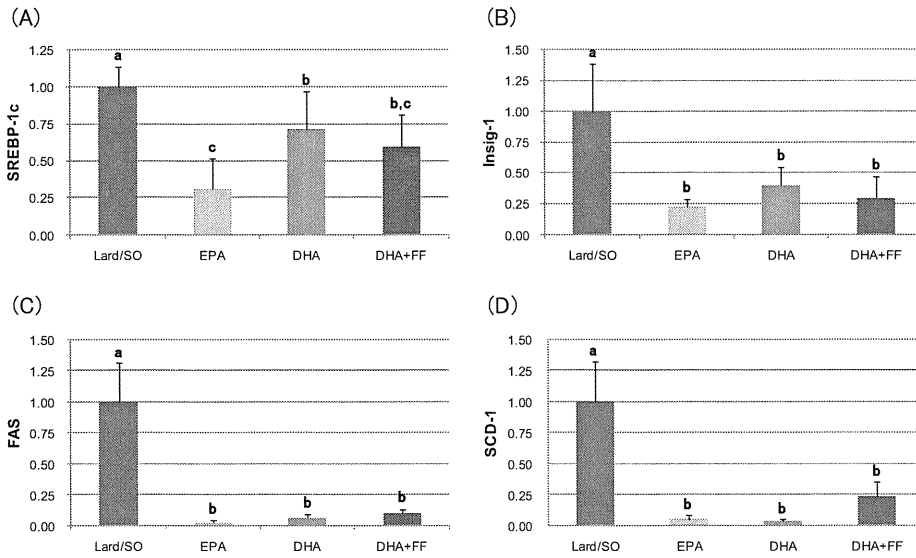


Fig.9. Effects of EPA-rich fish oil and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate diet for 8 weeks on mRNA expression of genes involved in fatty acid synthesis in liver.  
 Panels show mRNA expression levels of SREBP-1c (A), Insig-1(B), FAS (C) and SCD-1 (D). mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the lard/safflower oil group. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-5). Groups with different letters are significantly different. ANOVA by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. Insig-1: insulin-induced gene-1, FAS: fatty acid synthase, SCD-1: stearoyl-CoA desaturase.

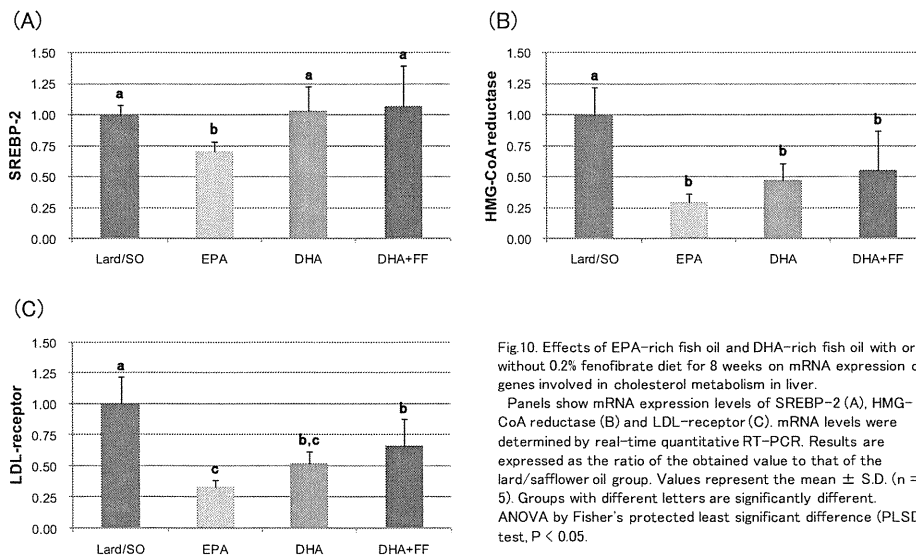


Fig.10. Effects of EPA-rich fish oil and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate diet for 8 weeks on mRNA expression of genes involved in cholesterol metabolism in liver.  
 Panels show mRNA expression levels of SREBP-2 (A), HMG-CoA reductase (B) and LDL-receptor (C). mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the lard/safflower oil group. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different. ANOVA by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05.

Fig. 11 に AOX、UCP-2、PPAR $\alpha$ 、AdipoR2 の mRNA レベルを示した。  
 AOX と UCP-2 の mRNA レベルは、コントロール群と比較して EPA 群および DHA 群で有意な差はなかったが、DHA+FF 群では有意に高く、DHA



群と比べて AOX は約 4 倍、UCP-2 は約 8 倍であった。これらの遺伝子の制御因子である PPAR $\alpha$  の mRNA レベルは、全ての群間で差は認められなかった。また、主に肝臓に発現しているアディポネクチンレセプターである、AdipoR2 の mRNA レベルは、魚油摂取群で有意に低かった。

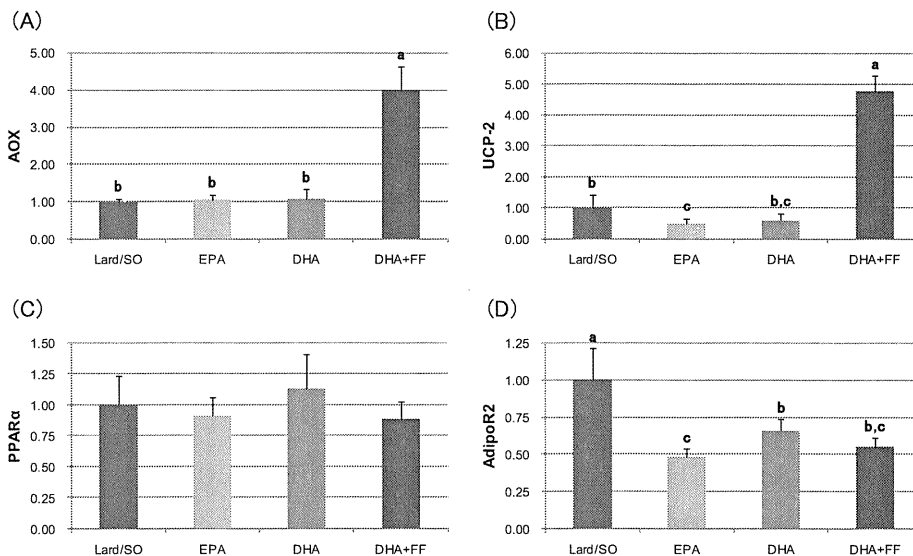


Fig.11. Effects of EPA-rich fish oil and DHA-rich fish oil with or without 0.2% fenofibrate diet for 8 weeks on mRNA expression of genes involved in fatty acid oxidation and thermogenesis in liver. Panels show mRNA expression levels of AOX (A), UCP-2 (B), PPAR $\alpha$  (C) and AdipoR2 (D). mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the lard/safflower oil group. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different. ANOVA by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. AOX: acyl-CoA oxidase, UCP-2: uncoupling protein-2, AdipoR2: adiponectin receptor 2.

### 第 3 節 小括および考察

魚油を用いた食餌において、EPA と DHA の摂取量は、EPA 群で、EPA 2508 mg/kg BW/day、DHA 1606 mg/kg BW/day となり、DHA 群では、EPA 958 mg/kg BW/day、DHA 3163 mg/kg BW/day であった。また、DHA+FF 群は、EPA 990 mg/kg BW/day、DHA 3267 mg/kg BW/day、フェノフィブラートの負荷量は、258 mg/kg BW/day に値した。KK マウスにおいても、脂肪エネルギー比率 25%の魚油摂取により肝臓の脂質合成系遺伝子の mRNA 発現が低下し、体重および体脂肪量の増加が有意に抑えられた。さらに、魚油とフェノフィブラート併用摂取により、肝臓の脂肪酸酸化と熱産

生系遺伝子の mRNA レベルも増加し、実験開始 1 週間から著しく体重増加が抑えられた。また、魚油単独摂取によって、血漿アディポネクチン値は著しく増加したが、魚油とフェノフィブラート併用摂取では、増加が示されなかった。

KK マウスは C57BL/6J マウスに比べて成長に伴う体重の増加が著しく、6-8 週齢時の一般的な体重は、C57BL/6J 雌性マウスが 16-18 g であるの対し、KK 雌性マウスは 24-30 g で約 1.5 倍になる。本章の検討においても、開始時 6 週齢の体重が約 22 g の平均的な KK 雌性マウスを用いた (Table 6)。魚油摂取の EPA 群と DHA 群は、ともに実験開始 5 週間後から体重の有意な低下が認められた。また、第 1 章でフェノフィブラートによって、体重が有意に低下したが、本研究においても、魚油とともにフェノフィブラートを添加した DHA+FF 群では 1 週間と早い時期から有意に低下した (Fig. 6)。このような体重増加抑制パターンは、最終体重にも反映され、コントロール群 > EPA・DHA 群 > DHA+FF 群の結果となった。肝臓の SREBP-1c の mRNA レベルは、魚油摂取の 3 群でともに減少した (Fig. 9)。これは、第 1 章の魚油 (20% エネルギー) を摂取した C57BL/6J マウスでは SREBP-1c mRNA 発現が抑制されなかった結果とは異なるものだった。しかし、SREBP-1 の標的遺伝子である Insig-1 や FAS の mRNA レベルは、第 1 章の C57BL/6J マウスでの結果と同様に、魚油摂取によって著しく低下した。KK-A<sup>y</sup> や ob/ob の肥満モデルマウスでは、C57BL/6J マウスよりも SREBP-1c mRNA 発現がそれぞれ約 2.5 倍、2.4 倍亢進していることが報告されている<sup>66-68</sup>)。今回用いた KK 雌性マウスも、SREBP-1c mRNA 発現が誘導されている状態であり、脂肪酸合成が著しく亢進し、肥満を呈したと考えられる。これらのことから、体重増加が著しい KK マウスでは、魚油摂取による FAS、SCD-1 の mRNA レベル低下率は、第 1 章の C57BL/6J マウスより強く、脂肪酸合成抑制作用が顕著となり、抗肥満作用が認められたと考えられる。

魚油とフェノフィブラート併用摂取群では、魚油単独摂取群より早期から体重増加が抑制された。フェノフィブラートは、PPAR $\alpha$  の活性化によって脂肪酸酸化系と熱産生系の AOX、UCP-2 などの発現を著しく誘導することが知られており<sup>43,44</sup>)、今回の検討でも、フェノフィブラート併用摂取によっ

て肝臓における AOX、UCP-2 の mRNA 発現が著しく誘導された(Fig. 11)。このことは、魚油とフェノフィブラートとの併用が、脂肪酸合成の抑制に加え、脂肪酸酸化と熱産生が著しく誘導され、体重および体脂肪量の増加を強く抑えることを示唆するものである。

コントロール群では、血漿インスリンが著しく高値を示し、第 1 章で用いた C57BL/6J マウスのコントロール群のインスリン値( $4.11 \pm 4.99$  ng/mL)と比べて約 4 倍の値であった(Table 7)。しかし、魚油摂取の 3 群の血漿インスリン値は、コントロール群と比べて有意に低値を示した。血糖値は全ての群間で差がなく、魚油またはフェノフィブラート併用による変化も示されなかった。これらの結果から、KK 雌性マウスでは、通常強いインスリン抵抗性を呈示するが、魚油摂取によりインスリン感受性が維持されることが示唆された。EPA 群と DHA 群の両魚油摂取群では血漿アディポネクチン値が有意に上昇した。アディポネクチンは AMPK の活性化により糖新生を抑制し、PPAR $\alpha$  を活性化して $\beta$ 酸化を亢進することで、インスリン感受性を亢進する<sup>37-39)</sup>。また、血中アディポネクチン値は BMI と逆相関する<sup>44)</sup>。これらのことから、KK マウスにおいて、魚油が体重および体脂肪の増加を抑え、血漿アディポネクチン値の増加を介してインスリン感受性を高めることが示唆された。しかし、魚油とフェノフィブラートを併用摂取した DHA+FF 群では、体重および体脂肪の増加抑制が、魚油単独摂取群より強かったにもかかわらず、血漿アディポネクチン値は上昇しなかった。インスリン分泌とインスリン感受性の亢進は血中アディポネクチン値やアディポネクチンとアディポネクチンレセプターの mRNA 発現と負の相関を示すことが報告されている<sup>48-51)</sup>。フェノフィブラート添加により、DHA+FF 群では、肝臓の AOX mRNA レベルが大きく増加し、 $\beta$ 酸化が著しく亢進し、体重と脂肪組織重量の増加が強く抑制された。また、血漿インスリン値は、EPA 群や DHA 群よりも低く、インスリン感受性が良好であることが示唆された。アディポネクチンは、主に筋肉に存在する AdipoR1 と肝臓に局在する AdipoR2 の 2 つのタイプのアディポネクチンレセプターに結合することで作用を発揮する<sup>38)</sup>。今回の検討において、肝臓に発現しているアディポネクチンレセプター AdipoR2 の mRNA レベルは、魚油摂取の 3 群で有意に低下した(Fig. 11)。

魚油とフェノフィブラート併用摂取群の血漿インスリン値( $0.77 \pm 0.24$  ng/mL)は、5週齢のKK雌性マウス( $2.66 \pm 1.16$  ng/mL)よりも低レベルであることから、魚油とフェノフィブラートの併用摂取により、飼育の初期から肥満の誘導が強く抑えられ、インスリン抵抗性の発現が抑制されたと考えられる。また、このことがアディポネクチンによるインスリン感受性亢進作用を必要としなかったため血中のアディポネクチン値が増加しなかったと推察した。

以上述べてきたように、中程度の肥満および糖尿病予備群のモデルにおいて、魚油は、脂肪酸およびコレステロール合成を抑制し、肝臓中トリグリセリドと血中および肝臓中総コレステロールの減少、体重と脂肪組織の低下を示した。さらに、血中アディポネクチンを増加させ、インスリン感受性を維持するように働くことを示した。また、魚油とフェノフィブラートを併用することで、それぞれの作用が相加的に働き、脂肪酸酸化が著しく誘導され、血中トリグリセリドの低下、体重および脂肪組織の増加をさらに抑制することを示した。このように、フェノフィブラート併用では、魚油単独摂取に比べ強い抗肥満効果がみられ、インスリン感受性が亢進し、アディポネクチンによる作用を必要としなかったと考えられる。

本章の検討において、KKマウスに対する魚油の摂取は、肥満、インスリン抵抗性の誘発を防ぐことが明らかになった。さらに、インスリン感受性の改善には、血中アディポネクチン値の増加が重要な働きをしていることが示唆された。血中アディポネクチン値は、体重の増加とともに減少することから、KKマウスがさらに肥満を呈した状態において、魚油がどのような影響を及ぼすか検討することは重要な課題であると考えられる。

### 第3章 高脂肪食により肥満誘導した KK マウスに対する魚油摂取量の糖・脂質代謝に及ぼす影響

前章までは、食餌に占める脂質の全量(脂肪エネルギー比率 20-25%)を魚油にして、C57BL/6J または KK マウスに対する魚油の糖・脂質代謝への影響を検討してきた。しかし、平成 14 年の国民健康・栄養調査によると、現在の日本人が魚から摂っている脂質の割合は、約 2.5%エネルギーであることが報告されている<sup>40)</sup>。そこで、第3章では、高脂肪食により、著しい肥満を呈した KK マウスに対して、2.5、12.5、25%エネルギーの魚油を含む食餌を与え、魚油の摂取量の違いが糖・脂質代謝に及ぼす影響について検討した。はじめに、KK 雌性マウスに対し、高脂肪食による肥満の誘導期間を検討した。脂肪エネルギー比率 50%の高脂肪食を与え体重変動を観察した結果、開始 10 週目から体重の増加(率)が安定した。その後、20 週目まで変動は緩やかであったことから、高脂肪食による肥満誘導の期間を 12 週間と設定した(data not shown)。

本章の検討では、6 週齢の KK 雌性マウスを用い、2 章のコントロール食で用いたラードとサフラワー油 4:6 で調合した油(以下、Lard/SO 調合油)を脂質源とした高脂肪食(50%エネルギー、50Lard/SO 食)を 12 週間与え肥満を誘導した。その後、脂肪エネルギー比率を 25%とし、Lard/SO 調合油を脂質源とした食餌(25Lard/SO 群)、2.5、12.5、25%エネルギーの魚油を含む食餌(2.5FO 群、12.5FO 群、25FO 群)で 9 週間飼育した。その後、糖代謝および脂質代謝に関わるパラメータの解析を行った。また、脂肪エネルギー比率の違いによる影響も検討するため、50Lard/SO 食を与え続ける群(50Lard/SO 群)を設けた(Table 8-1)。実験食の脂肪酸組成は Table 8-2 に示した。

Table 8-1. Composition of the experimental diets

Experimental group	50Lard/SO	25Lard/SO	2.5FO	12.5FO	25FO
Lard	10.00	4.20	3.78	2.10	
Safflower oil	15.00	6.30	5.67	3.15	
Fish oil			1.05	5.25	10.50
Casein	25.00	21.00	21.00	21.00	21.00
Sucrose	12.50	10.50	10.50	10.50	10.50
$\beta$ -starch	24.93	47.45	47.45	47.45	47.45
Vitamin mix	1.56	1.31	1.31	1.31	1.31
Mineral mix	4.38	3.68	3.68	3.68	3.68
Cellulose powder	6.25	5.25	5.25	5.25	5.25
L-cystine	0.38	0.32	0.32	0.32	0.32
t-Butylhydroquinone	0.0050	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021
Total (g)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Table 8-2. Composition of the fatty acid

%	50Lard/SO, 25Lard/SO	2.5FO	12.5FO	25FO
14:0	0.7	0.9	1.8	3.0
16:0	12.2	12.8	15.2	18.2
16:1	1.2	1.5	2.7	4.2
18:0	7.0	6.8	6.0	4.9
18:1	64.1	59.5	41.4	18.8
18:2	12.2	11.1	6.7	1.3
18:3	0.5	0.5	0.7	0.8
20:4	0.3	0.5	1.2	2.0
20:5		0.7	3.7	7.3
22:6		2.4	12.1	24.1
Others	1.8	3.2	8.6	15.4

## 第1節 体組成、血漿および肝臓脂質レベル

高脂肪食の 50Lard/SO 食を継続して摂取させた群では、摂食開始 13 週以後も飼育終了まで体重が増加し続けた(Fig. 12)。一方、脂肪エネルギー比率 25%の食餌に移行した 25Lard/SO 群、魚油摂取群では体重が減少した。9 週間の飼育終了時の最終体重は、25Lard/SO 群では、50Lard/SO 群の 91%に減少し、25Lard/SO 群と 3つの魚油摂取群の間で有意な差はなかった(Fig. 12, Table 9)。肝臓重量は、50Lard/SO 群と 25Lard/SO 群の間で有意な変動はなく、25Lard/SO と比べて 12.5FO 群と 25FO 群では有意に低値を示し、

12.5FO 群で 67%、25FO 群で 62%であった。子宮周囲 WAT 重量は、50Lard/SO 群と 25Lard/SO 群、また、25Lard/SO 群と魚油摂取の 3 群の間で有意な差は認められなかった。肩甲骨間 BAT 重量は、50Lard/SO 群と比べて 25Lard/SO 群で 21%低下した。また、25Lard/SO 群と比較して、2.5FO 群では有意に低下したが、それよりも魚油摂取量の多い 12.5FO 群や 25FO 群では差がなかった(Table 9)。X 線 CT 装置の解析により定量化した内臓脂肪量は、50Lard/SO 群と比べて 25Lard/SO 群で 23%減少した。しかし、25Lard/SO 群と 3 つの魚油摂取群の間で有意な差はなかった。皮下脂肪量も同様に、50Lard/SO 群と比べて 25Lard/SO 群で減少したが、魚油を摂取した 3 群と 25Lard/SO 群との間に差はなかった(Fig. 13)。

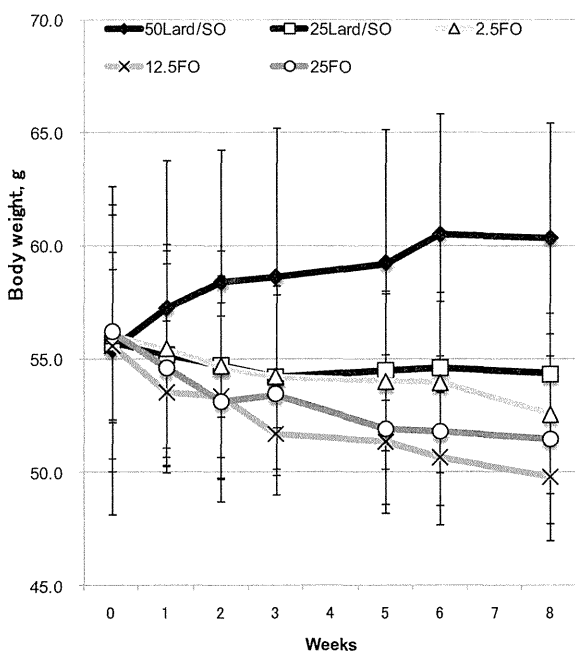


Fig.12. Growth curve for 8 weeks of experimental diets fed. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5).

Table 9. Energy intake, final body weight, body weight gain volume, liver weight and white adipose tissue and brown adipose tissue weight in KK mice fed 0, 2.5, 12.5, 25% fish oil diet for 9 weeks.

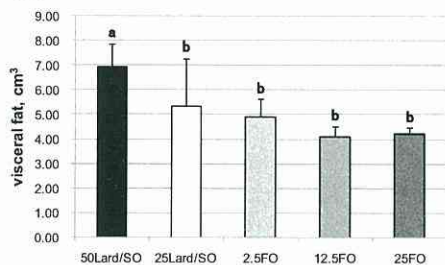
Groups	Feeding energy <sup>※</sup> (kcal/mouse/day)	Final body weight (g)	Body weight gain volume (g)	Liver weight (g)	WAT weight (g)	BAT weight (mg)
50Lard/SO	17.90	58.61 ± 5.31 <sup>a</sup>	3.22 ± 2.74 <sup>a</sup>	3.20 ± 0.81 <sup>ab</sup>	3.30 ± 0.79 <sup>a</sup>	462.6 ± 92.6 <sup>a</sup>
25Lard/SO	15.87	53.15 ± 3.54 <sup>b</sup>	-2.57 ± 5.08 <sup>b</sup>	3.85 ± 1.41 <sup>a</sup>	2.63 ± 1.48 <sup>ab</sup>	365.7 ± 41.2 <sup>b</sup>
2.5FO	16.44	51.98 ± 3.68 <sup>b</sup>	-4.06 ± 2.17 <sup>b</sup>	2.80 ± 0.87 <sup>ac</sup>	2.70 ± 0.34 <sup>ab</sup>	278.6 ± 21.3 <sup>c</sup>
12.5FO	15.42	49.07 ± 3.18 <sup>b</sup>	-7.13 ± 3.89 <sup>b</sup>	2.14 ± 0.44 <sup>bc</sup>	2.24 ± 0.38 <sup>b</sup>	320.6 ± 31.1 <sup>bc</sup>
25FO	14.74	50.45 ± 3.36 <sup>b</sup>	-5.77 ± 2.72 <sup>b</sup>	1.99 ± 0.16 <sup>c</sup>	2.48 ± 0.22 <sup>ab</sup>	352.5 ± 58.3 <sup>b</sup>

Values represent the mean ± S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. <sup>※</sup>Mean daily feeding energy calculated from total feeding energy in feeding period for 9 weeks.

(A)



(B)



(C)

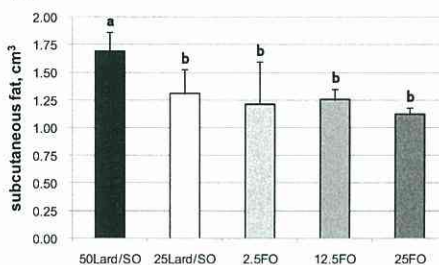


Fig.13. The difference of CT-based body fat composition by experimental diets fed for 9 weeks.

Representative CT images (A), CT-estimated amounts of visceral fat (B) and subcutaneous fat (C). The purple and yellow areas represent the visceral and subcutaneous fat, respectively. Values represent the mean ± S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different. ANOVA by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05.

血糖値は、50Lard/SO 群と 25Lard/SO 群の間では差がなかったが、25Lard/SO 群と比較して 25FO 群で有意に低下した。血漿インスリン値は、全ての群で高値を示し、群間における差が認められなかった。血漿レプチン値は、50Lard/SO 群と 25Lard/SO 群の間では有意な差がなかったが、25Lard/SO 群と比較して 2.5FO 群と 12.5FO 群で有意に低値を示した。血漿アディポネクチン値の結果も、レプチン値と同様の傾向を示した (Table 10)。



Table 10. Blood glucose and plasma insulin, leptin and adiponectin level in KK mice fed 0, 2.5, 12.5, 25% fish oil diet for 9 weeks.

Groups	Blood glucose (mg/dL)	Plasma insulin (ng/mL)	Plasma leptin (ng/mL)	Plasma adiponectin ( $\mu$ g/mL)
<b>50Lard/SO</b>	150 $\pm$ 56 <sup>ab</sup>	38 $\pm$ 25	179 $\pm$ 25 <sup>a</sup>	16.3 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>
<b>25Lard/SO</b>	180 $\pm$ 60 <sup>a</sup>	53 $\pm$ 66	142 $\pm$ 45 <sup>ab</sup>	13.5 $\pm$ 2.5 <sup>ab</sup>
<b>2.5FO</b>	156 $\pm$ 38 <sup>ab</sup>	29 $\pm$ 33	94 $\pm$ 27 <sup>c</sup>	9.5 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>
<b>12.5FO</b>	148 $\pm$ 25 <sup>ab</sup>	83 $\pm$ 64	77 $\pm$ 25 <sup>c</sup>	11.4 $\pm$ 2.4 <sup>bc</sup>
<b>25FO</b>	117 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	52 $\pm$ 40	105 $\pm$ 39 <sup>bc</sup>	12.1 $\pm$ 2.3 <sup>bc</sup>

Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05.

血漿トリグリセリド値は、25Lard/SO 群と比較して 2.5FO 群のみ有意に高値を示した。それに対して、血漿総コレステロール値と non HDL-コレステロール値は、25Lard/SO 群と比較して魚油摂取の 3 群で有意に低値を示した。一方、血漿 HDL-コレステロール値は、全ての群間で差がなかった。肝臓トリグリセリド値は、50Lard/SO 群と 25Lard/SO 群の間で有意な変動はなく、25Lard/SO 群と比較して 12.5FO 群と 25FO 群で有意に低値を示し、それぞれで 42%、17%にまで低下した。肝臓総コレステロール値も 50Lard/SO 群と 25Lard/SO 群の間に有意差はなく、25Lard/SO 群と比較して 2.5FO 群で低下傾向(P=0.058)を示し、12.5FO 群と 25FO 群では有意に低下し、12.5FO 群で 15%、25FO 群で 9%であった(Table 11, Fig. 14)。25FO 群の 2.2 mg/g liver の値は、第 1 章の魚油食を与えた C57BL/6J マウスの肝臓総コレステロール値と同レベルのものである。また、他研究において、C57BL/6J マウスにスタンダード chow 食を与えた時、肝臓総コレステロール値が 2-3 mg/g liver であることを報告している<sup>69,70)</sup>。

Table 11. Plasma triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol concentration and liver triglyceride and total cholesterol concentration in KK mice fed 0, 2.5, 12.5 25% fish oil diet for 9 weeks.

	Plasma triglyceride (mg/dL)	Plasma total cholesterol (mg/dL)	Plasma HDL-Cholesterol (mg/dL)	Plasma nonHDL-Cholesterol (mg/dL)	Liver triglyceride (mg/total weight)	Liver total cholesterol (mg/total weight)
<b>50Lard/SO</b>	129 ± 12 <sup>b</sup>	143 ± 23 <sup>a</sup>	74 ± 41	70 ± 31 <sup>a,b</sup>	299.3 ± 98.0 <sup>a</sup>	35.5 ± 34.0 <sup>a</sup>
<b>25Lard/SO</b>	148 ± 12 <sup>b</sup>	145 ± 25 <sup>a</sup>	52 ± 30	95 ± 34 <sup>a</sup>	348.7 ± 71.6 <sup>a</sup>	45.7 ± 21.0 <sup>a</sup>
<b>2.5FO</b>	221 ± 59 <sup>a</sup>	110 ± 26 <sup>b</sup>	58 ± 33	54 ± 24 <sup>b</sup>	298.9 ± 98.0 <sup>a</sup>	19.4 ± 6.5 <sup>a,b</sup>
<b>12.5FO</b>	148 ± 20 <sup>b</sup>	115 ± 22 <sup>a,b</sup>	70 ± 29	48 ± 22 <sup>b</sup>	145.0 ± 64.3 <sup>b</sup>	7.0 ± 1.9 <sup>b</sup>
<b>25FO</b>	134 ± 37 <sup>b</sup>	92 ± 19 <sup>b</sup>	57 ± 27	38 ± 18 <sup>b</sup>	59.9 ± 21.7 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.5 <sup>b</sup>

Values represent the mean ± S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05.

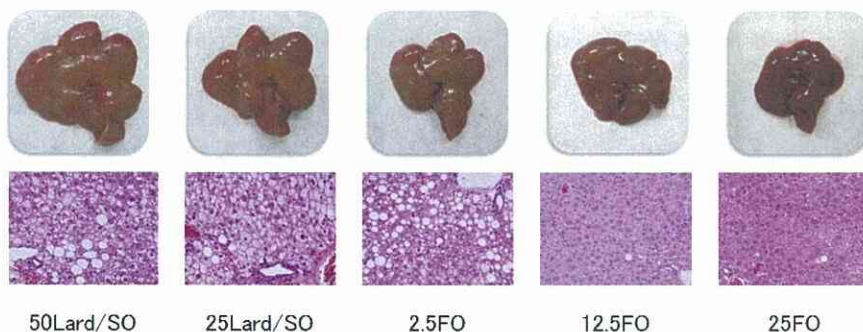


Fig.14. The alteration of hepatic condition and histopathology by experimental diets fed for 9 weeks. Macroscopic state (A). Histopathology of isolated liver tissues from each group embedded in paraffin and then stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under a microscope at 400-fold magnification (B).

インスリン抵抗性の改善効果を検討するため、実験食に移行して7週目で経口糖負荷試験(OGTT)を実施した。糖負荷2時間の血糖値曲線下面積は、25Lard/SO群と比較して、12.5FO群と25FO群で有意に低値を示し、12.5FO群88%、25FO群で72%減少した(Fig. 15)。

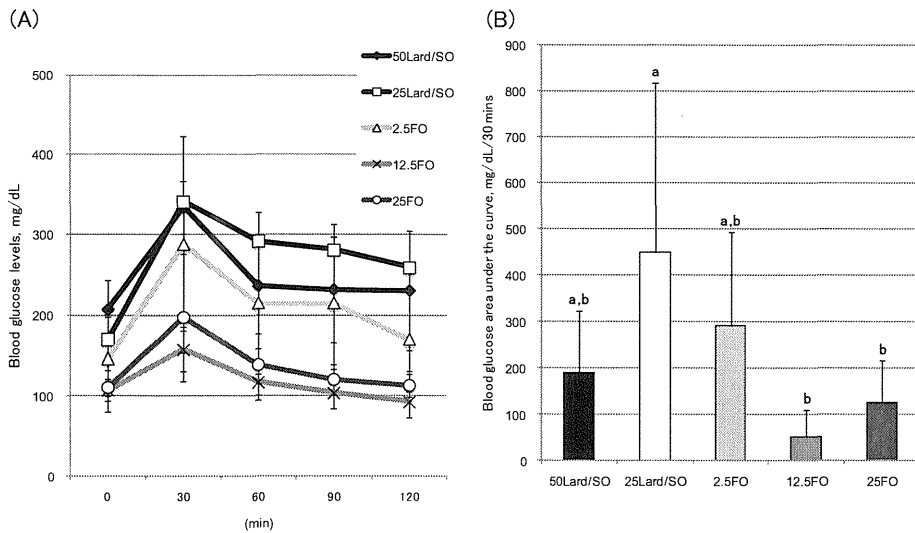


Fig.15. Oral glucose tolerance test on 7 weeks of experimental diets fed. Mice in several groups were subjected to oral glucose tolerance test (OGTT) after a 4-hour fasting period. The mice were orally administered a 10% glucose solution at a dose 1g/kg, and blood sample were obtained immediately before and 30, 60, 90 and 120 minutes after glucose loading. (A) Curve of blood glucose levels, (B) Blood glucose area under the curve. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different, ANOVA with by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test,  $P < 0.05$ .

## 第2節 肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子発現

魚油摂取量の違いが肝臓中の糖・脂質代謝調節遺伝子の mRNA レベルに及ぼす影響を調べた。

Fig. 16 に SREBP-1c、Insig-1、Insig-2a、FAS、SCD-1 の mRNA レベルを示した。SREBP-1c の mRNA レベルは、脂肪エネルギー比率 25% の実験食群の間で有意な差が認められなかったが、25FO 群で低下傾向 ( $P=0.061$ ) を示した。SREBP-1c の標的遺伝子である Insig-1、Insig-2a、FAS の mRNA レベルは、25Lard/SO 群と比較して 25FO 群で有意に低下した。SCD-1 の mRNA レベルは、25Lard/SO 群と比較して、12.5FO 群と 25FO 群で有意に低下し、それぞれ 28%、5% であった。また、50Lard/SO 群の SREBP-1c、Insig-1、FAS の mRNA レベルは、25Lard/SO 群と比較して有意に減少したが、Insig-2a と SCD-1 の mRNA レベルには差がなかった。

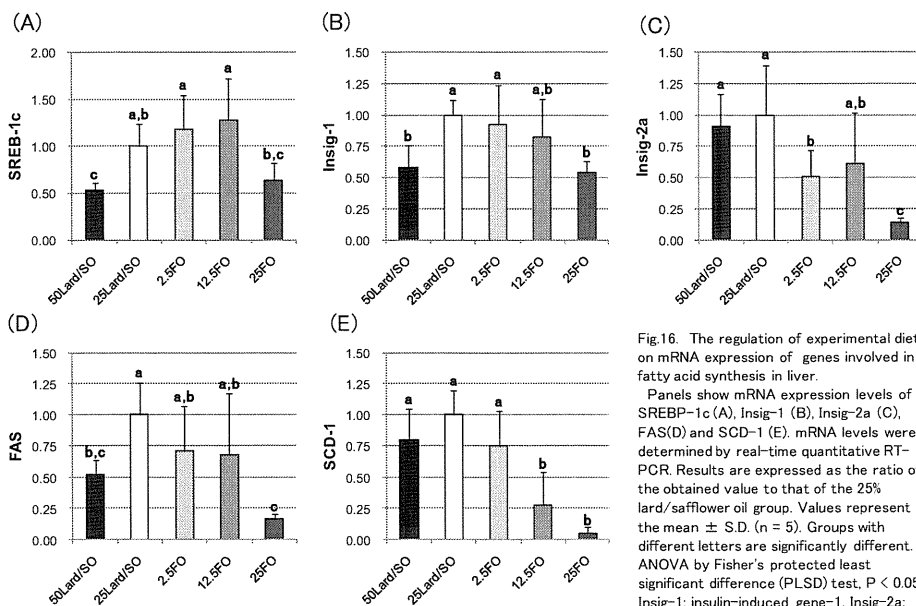
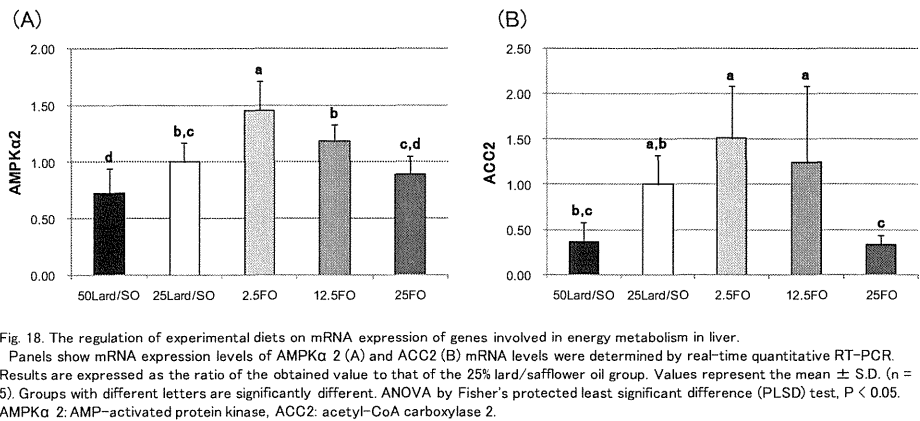
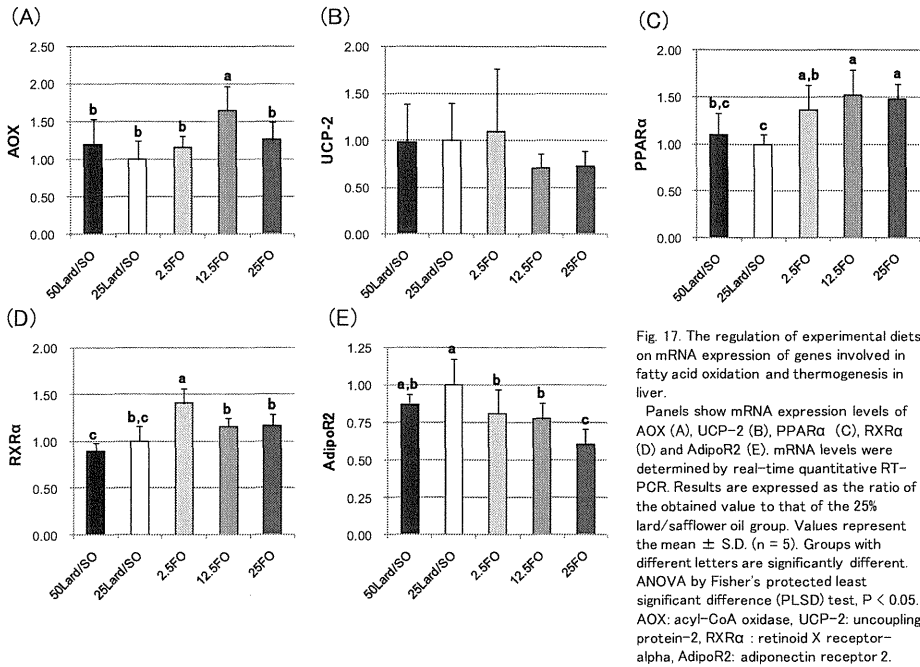


Fig.16. The regulation of experimental diets on mRNA expression of genes involved in fatty acid synthesis in liver. Panels show mRNA expression levels of SREBP-1c (A), Insig-1 (B), Insig-2a (C), FAS(D) and SCD-1 (E). mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the 25% lard/safflower oil group. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). Groups with different letters are significantly different. ANOVA by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test, P < 0.05. Insig-1: insulin-induced gene-1, Insig-2a: insulin-induced gene-2a, FAS: fatty acid synthase, SCD-1: stearoyl-CoA desaturase.

AOX、UCP-2、PPAR $\alpha$ 、RXR $\alpha$ 、AdipoR2 の mRNA レベルを Fig. 17 に示した。脂肪酸酸化に関わる AOX の mRNA レベルは、25Lard/SO 群と比較して 12.5FO 群で有意に増加したが、2.5FO 群と 25FO 群では有意な増加が示されなかった。UCP-2 の mRNA レベルは、全ての群間で有意な変化がなかった。PPAR $\alpha$  の mRNA レベルは、25Lard/SO 群と比較して魚油摂取の 3 群で有意に増加した。RXR $\alpha$  の mRNA レベルは、2.5FO 群で有意に増加し、12.5FO 群と 25FO 群では、有意ではないが増加傾向が示された。AdipoR2 の mRNA レベルは、魚油摂取の 3 群で有意に低下し、2.5FO 群で 81%、12.5FO 群で 77%、25FO 群で 60%であった。また、50Lard/SO 群と 25Lard/SO 群の間で AOX、UCP-2、PPAR $\alpha$ 、RXR $\alpha$ 、AdipoR2 の mRNA レベルは、有意な差がなかった。

細胞内のエネルギー代謝を多岐にわたり制御する AMPK $\alpha$ 2 の mRNA レベルは、50Lard/SO 群と比較して 25Lard/SO 群で有意に増加し、さらに 25Lard/SO 群と比較して 2.5FO 群で有意に増加したが、魚油摂取量の多い 12.5FO 群と 25FO 群では有意差が認められなくなった。AMPK により活性制御を受ける ACC2 の mRNA レベルは、50Lard/SO 群と比較して 25Lard/SO 群で増加傾向(P=0.052)を示した。25Lard/SO 群の ACC2 の

mRNA レベルと比較して 2.5FO 群と 12.5FO 群で有意差は認められないが、25FO 群では有意に減少した(Fig. 18)。



### 第 3 節 小括および考察

魚油を用いた食餌において、EPA と DHA の摂取量は、2.5FO 群で、261 mg/kg BW/day、12.5FO 群では、1284 mg/kg BW/day、25FO 群では、2401

mg/kg BW/day であった。本章では、KK 雌性マウスに 6 週齢から 18 週齢までの 12 週間、脂肪エネルギー比率 50% の高脂肪食を与え、高度の体重増加(肥満)を誘導した後、段階的に設定した魚油の摂取量による影響を検討した。高脂肪食から脂肪エネルギー比率 25% の食餌に移行した全ての群では、体重や脂肪組織重量が減少した。総脂肪エネルギー比 25% のうち、12.5% または 25% を魚油に置き換えた 12.5FO 群と 25FO 群では、肝臓の脂肪酸合成系遺伝子の mRNA レベルが有意に低下し、肝臓脂質値も減少した。OGTT においても、12.5FO 群と 25FO 群では、25Lard/SO 群と比較して糖負荷後の血糖値の上昇が抑えられた。

高脂肪食による肥満誘導期間中、体重は経時的に増加し 12 週間後には初期体重の約 2.5 倍にまで増加し、この値は、通常の KK-A<sup>y</sup> マウスの 18 週齢以降の体重と同レベルであった。そして、KK-A<sup>y</sup> マウスほど重度の高血糖は示さない、高度の肥満モデルとして用いることにした。なお、n=4 での参考値ではあるが、この時点での血糖値は 340±137 mg/dL、インスリン値は 73±46 ng/dL(ともに mean±SD)であった。

肥満誘導後、脂肪エネルギー比率を 25% に下げた食餌に移行したことで、魚油摂取量に関係なく体重、内臓脂肪および皮下脂肪、肩甲骨間 BAT 重量が有意に減少した。脂肪エネルギー比率 25% の群では、食餌からの脂質摂取量が著しく減少し、50Lard/SO 群に比べて 1/2 まで減少した。脂質の異化作用に関与する AOX や UCP-2 の発現は、脂肪組織への過剰な脂肪蓄積によって亢進することが報告されている<sup>71,72)</sup>。本研究で、肝臓の AOX と UCP-2 の mRNA レベルは高脂肪食を継続した 50Lard/SO 群を含め全ての群で大きな変化は認められなかった(Fig. 17)。脂肪エネルギー比率 25% の食餌に移行した群では、脂質摂取の減少とともに、体重と脂肪組織重量が減少したが、依然として過剰な脂肪蓄積の状態であり、脂肪酸酸化と熱産生が亢進している状態で、魚油による作用が現れにくかった可能性が考えられる。また、50Lard/SO 群では、脂肪酸合成関連遺伝子の転写因子である SREBP-1c やその標的遺伝子である FAS および Insig-1 の mRNA レベルが、25Lard/SO 群と比較して有意に低下した。脂肪エネルギー比率 36% の高脂肪食を 12 週間摂取させると体重と内臓脂肪の増加に伴い、ACS や FAS など脂肪酸合成

に関連する遺伝子の mRNA 発現が抑制されることが報告されている<sup>73)</sup>。本研究においても、50Lard/SO 群では、体重および脂肪組織重量の著しい増加により、脂質合成系の遺伝子発現が抑制されたと考えられる。高度肥満の KK マウスでは、過剰な体脂肪の蓄積に対し、脂質代謝の恒常性を保つため、脂肪酸酸化の亢進と脂肪酸合成の抑制が起きていることが示唆された。25Lard/SO 群または 2.5FO 群では、50Lard/SO 群と比較して体重および脂肪組織重量は減少したが、血漿および肝臓の脂質レベルは減少しなかった。AMPK は、糖新生を抑制するとともに脂肪組織に蓄積した脂肪の分解を促進する。血中へ放出された遊離脂肪酸は、血流を介して肝臓へ輸送され、ACC2 の発現を抑制することにより脂肪合成を抑え、同時に脂肪酸酸化を促進する<sup>74,75)</sup>。肝臓の AMPK $\alpha$ 2 mRNA レベルは、50Lard/SO 群と比較して 25Lard/SO 群で有意に増加し、25Lard/SO 群と比べて 2.5FO 群で有意に増加した。一方、ACC2 の mRNA レベルは、50Lard/SO 群と比較して 25Lard/SO 群で増加傾向を示し、25Lard/SO 群と比べて 2.5FO 群、12.5FO 群は同レベルであった。25Lard/SO 群と 2.5FO 群では、AMPK $\alpha$ 2 mRNA が増加し、脂肪組織の分解が誘導されたが、ACC2 の mRNA は減少せず、脂肪酸酸化が誘導されなかったと考えられる。高度肥満の KK マウスでは、脂質摂取量を制限することで、脂肪組織に蓄積された脂肪の分解と遊離脂肪酸の血中への放出によって、脂肪組織重量が減少した。しかし、肝臓トリグリセリドレベルは、25Lard/SO 群と 2.5FO 群で 50Lard/SO 群との有意差がないことから、肝臓での脂肪酸酸化は誘導されず、取り込んだ遊離脂肪酸がトリグリセリドとして留まっていることが示唆された。

脂質源を全て魚油に置き換えた 25FO 群では、SREBP-1c の mRNA レベルは低下傾向を示し、その応答遺伝子である Insig-1 の mRNA レベルも 25Lard/SO 群と比較して有意に低下した(Fig. 16)。この結果から、高度肥満の KK マウスにおいても高用量の魚油摂取により、SREBP-1 タンパク質の前駆型から成熟型へのプロセスが抑制され、標的遺伝子の FAS や SCD-1 の mRNA レベルを低下させ、脂質合成を抑制することが示唆された。また、SCD-1 の mRNA レベルは、12.5FO 群においても有意に低下し、FAS とは異なる結果を示した。肝臓における SCD-1 の欠損は、炭水化物誘導による

肥満症および脂肪肝の発生を防ぐことが報告されており、SCD-1 の発現が減少することで脂質合成が抑制されることが明らかにされている<sup>76)</sup>。本検討においても、12.5FO 群では、SCD-1 mRNA レベルが低下したことによって、肝臓でのトリグリセリド合成が抑制されたことが考えられる。12.5FO 群、25FO 群ともに、両 Lard/SO 群と 2.5FO 群で顕著であった肝肥大および脂肪肝を改善することも確認できた(Fig. 14)。

肥満は、血中アディポネクチンの低下、レプチンや TNF $\alpha$  の増加により、インスリン抵抗性を誘発し、糖の取り込みを低下させる原因になる。OGTT において、50Lard/SO 群と 25Lard/SO 群では、糖負荷直後の血糖値が 300 mg/dL 以上に上昇した。2 時間後の血糖値も初期レベルに戻らず、血糖値曲線下面積は高値を示した。一方、12.5FO 群と 25FO 群では、血糖値曲線下面積は、25Lard/SO 群と比較して、12.5FO 群と 25FO 群で有意に減少し、2 時間後、初期の値まで戻った。このようなことから、高度肥満の KK マウスにおいても、高用量の魚油摂取によりインスリン感受性が改善することが確認された。12.5FO と 25FO の魚油摂取群では、体重や脂肪組織重量が減少し、肝臓トリグリセリド含量も有意に減少したが、血中のアディポネクチン値の増加はみられなかった。第 1、2 章の C57BL/6J や KK マウスの魚油摂取群では、魚油を摂取していないコントロール群と比べ、血中アディポネクチン値が著しく増加する結果とは異なるものとなった。また、血中インスリン値も、魚油摂取による影響は認められず高値を示した。これは、前章での KK マウスへの魚油摂取で、血中インスリン値の増加が抑制され、コントロール群の約 30%のレベルであった結果と比べると大きく相違する結果である。本章で用いた食餌性の高度肥満 KK マウスの両 Lard/SO 群の血中インスリン値は、C57BL/6J マウスに比べて約 10 倍で、第 2 章のコントロール群の KK マウスの Lard/SO 群と比べても 2 倍以上と高インスリン状態であった。また、本章の 25FO 群の最終体重は  $50.45 \pm 3.36$  g であり、前章の DHA 魚油摂取群の約  $41.59 \pm 2.99$  g に比べて、依然として高いレベルである。血中アディポネクチン値は BMI と逆相関することが知られているが<sup>44)</sup>、体重減少に伴う血中アディポネクチン値の増加には、さらなる体重減少を必要とするかもしれない。インスリン分泌とインスリン感受性の亢進は血中ア



ディポネクチン値やアディポネクチンとアディポネクチンレセプターの mRNA 発現と負の相関を示すことが報告されている<sup>48-51)</sup>。KK-A<sup>y</sup> マウスでは、C57BL/6J マウスに比べて、アディポネクチンレセプターが、白色脂肪組織(AdipoR1)では減少し、肝臓(AdipoR2)において増加することにより恒常性を保っている。一方、運動によってインスリン感受性が向上した時、その発現は逆転し、肝臓での AdipoR2 の発現は低下する<sup>77)</sup>。本章の高度肥満 KK マウスにおいて、肝臓におけるアディポネクチンレセプター AdipoR2 の mRNA レベルは、魚油摂取群で有意に低下した。高用量の魚油摂取により脂肪酸合成が低下し、肝臓トリグリセリド含量が減少したことで、インスリン感受性も改善されたと考えられる。しかしながら、依然として高インスリン状態であることから、長期的に魚油を摂取することで、体重および体脂肪をさらに減少させることが期待でき、血中アディポネクチンが増加し、インスリン感受性を亢進させることが期待できるものと考えられる。

## 総括

本研究では、魚油摂取ならびにフェノフィブラートの併用摂取による糖・脂質代謝制御システムに及ぼす影響について検討した。第1章では、脂質に対する応答性の高い C57BL/6J マウスを用いて、1)魚油に含まれる EPA と DHA の含有比率の違いによる影響、2)魚油とフェノフィブラートの併用摂取による影響について検討した。第2章では、3)肥満体質を持ち、肥満に伴いインスリン抵抗性を呈する KK マウスに及ぼす魚油摂取および魚油とフェノフィブラートの併用摂取の影響を調べた。第3章では、4)高脂肪食により高度の肥満を誘導した KK マウスを用いて、魚油摂取量の違いによる影響について調べ、さらに、5)糖・脂質代謝におけるアディポネクチンの変動とインスリン感受性に及ぼす魚油摂取の影響を検討した。

本研究の結果に基づき、以下のことを明らかにすることができた。

1. C57BL/6J マウスの魚油摂取(脂肪エネルギー比率 20%、8 週間)では、EPA と DHA の含有比率の違いに関係なく、肝臓における脂肪酸合成関連遺伝子の mRNA レベルは、転写因子 SREBP-1c の減少を伴わず、標的遺伝子の FAS と SCD-1 は減少した。一方、肝臓のコレステロール合成関連遺伝子の mRNA レベルは、SREBP-2 の減少とともに、HMG-CoA reductase、LDL-receptor も低下した。また、肝臓中トリグリセリドと血中および肝臓中総コレステロールは低下した。これらの結果から判断して、魚油は、脂肪酸およびコレステロール合成を抑制すると考えられる。
2. フェノフィブラート 0.1%(w/w)の投与は、肝臓において AOX や UCP-2 の mRNA レベルを増加させた。その結果として、脂肪酸酸化と熱産生が亢進し、体重および脂肪組織重量の増加を著しく抑制したと考えられる。さらに、魚油とフェノフィブラートの併用では、それぞれの作用が相加的に働き、脂質合成は抑制され、脂肪酸酸化も亢進されることで、

血中および肝臓中のトリグリセリドと総コレステロールの低下、体重および脂肪組織の増加を抑制できると考えられる。

3. 肥満体質を持ち、肥満に伴いインスリン抵抗性を発現する **KK** マウスの 6 週齢からの魚油摂取(脂肪エネルギー比率 25%、8 週間)では、**EPA** と **DHA** の含有比率の違いに関係なく、**SREBP-1c** の mRNA レベルが減少するとともに、脂肪酸合成に関与する **FAS**、**SCD-1** の mRNA 発現が低下した。また、肝臓中トリグリセリドと血中および肝臓中総コレステロールが減少し、体重および体脂肪の増加が抑えられた。この結果から、肥満と高インスリン血症の形質を保有する場合でも、魚油摂取は肥満への移行を抑制することを示唆した。また、魚油とフェノフィブラートを併用することで、それぞれの作用が相加的に働き、魚油による作用に加え、フェノフィブラートによる脂肪酸酸化が誘導され、血中トリグリセリドの低下、体重および脂肪組織の増加をさらに抑制することを示した。
4. インスリン抵抗性を呈する高度肥満の **KK** マウスに対して、日本人が日常生活で摂取している量を反映した 2.5%エネルギーの魚油摂取(9 週間)では、脂質合成関連遺伝子の mRNA 発現に有意な変動は与えないが、**AMPK $\alpha$ 2** の mRNA 発現は上昇した。一方、高用量の 12.5%または 25%エネルギーの魚油摂取では、脂質合成関連遺伝子の mRNA 発現が低下し、肝臓脂質レベルも減少した。このことから、低用量の魚油摂取では脂質合成の抑制は期待できないが、脂肪組織に蓄積した脂肪の分解による脂肪量の減少が期待できることを示唆した。また、高用量の魚油摂取により、高度肥満の **KK** マウスにおいても脂質合成を抑制し、脂質レベルが改善できることを示唆した。
5. **C57BL/6J** や **KK** マウスにおいて、フェノフィブラートを添加しない魚油単独摂取群で血中アディポネクチン値は増加した。魚油の摂取は、血漿アディポネクチン値の増加により、インスリン感受性を維持することが示唆された。しかし、魚油とフェノフィブラート併用摂取では、血中アディポネクチンが増加しなかった。魚油とフェノフィブラートの併用では、体重および脂肪組織の増加が強く抑えられた結果、インスリン抵抗性の発現が抑えられ、アディポネクチンによるインスリン感受性維持

作用を必要としない状態であることが示唆された。一方、高度肥満の KK マウスでは、魚油摂取によっても血中アディポネクチンは増加しなかった。しかし、経口糖負荷試験において、高用量の魚油摂取群では、血糖値の上昇が抑えられた。また、脂肪組織重量の減少に加え、肝臓トリグリセリド含量が低下していた。このことから、高度肥満の KK マウスでも、魚油摂取により肝臓脂質レベルが低下することで、インスリン抵抗性が改善されると考えられる。しかし、高用量の魚油摂取群でも高インスリン血症状態であることから、より長期的に積極的な魚油の摂取が、体重と体脂肪をさらに減少させ、さらなる改善をもたらすと考えられる。

本研究の結果から、フェノフィブラートとともに魚油を積極的に摂取することは、肥満およびインスリン抵抗性の予防、改善に有効であることを示した。今後、肥満や糖尿病が主要因である高トリグリセリド血症の治療において、フェノフィブラートを用いた薬物治療と魚介摂取量を増加させる食事療法との併用、あるいは魚介の摂取が苦手な患者に対しては、EPA 製剤との併用療法を施行する新たな治療法の開発に役立つものになると考える。

## 謝辞

本研究に際し、ご懇篤なご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部分子栄養学講座 松本明世教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご指導とご助言を賜りました城西大学薬学部分子栄養学講座 金賢珠講師に深謝いたします。

本研究に際し、適切なお助言を賜りました城西大学薬学部分子栄養学講座 千葉大成助教に心より感謝申し上げます。

本学位論文の作成にあたり、ご校閲とご教示を賜りました城西大学薬学部生体防御学講座 日比野康英教授ならびに城西大学薬学部病態解析学講座 小林順教授に謹んで感謝申し上げます。

最後に、ともに研究生活を過ごした城西大学薬学部分子栄養学講座諸氏に御礼申し上げます。

## 実験の部

### 実験動物および飼育条件

C57BL/6J および KK 雌性マウスは(株)東京実験動物から購入した。それぞれマウスは実験開始 1 週間前から標準実験飼料である CE2((株)日本クレア)を与え、代謝状態を安定させた。飼育環境は、室温  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$  の 12 時間明暗周期(明期：7:00-19:00)とした。また、食餌、飲料水は自由摂取とした。

飼育終了後の解剖は、3 時間絶食させた後(10:00)に以下の手順で行った。はじめに、ペントバルビタールナトリウム注射液((株)大日本製薬)を腹腔内注射し麻酔を施し、小実験動物用 X 線 CT 装置(La Theta LCT100、(株)アロカ)を用い、横隔膜から腹底部までを 2 mm 間隔で測定し内臓脂肪および皮下脂肪量を算出した。体重測定後、尾先からの採血により血糖値を測定(アセンシア ブリーズ、(株)バイエル メディカル)した。次に、開腹し下大静脈から、EDTA-2Na 処理を施した注射器を用いて採血した。血液をサンプル管へ移し、遠心分離( $4^{\circ}\text{C}$ 、10,000 rpm、10 分)により血漿を回収した。次に、肝臓、子宮周囲白色脂肪組織および肩甲骨間褐色脂肪組織を摘出して重量を測定し、解析に用いるまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。また、肝臓の一部は 10% 中性緩衝ホルマリン液((株)和光純薬工業)で固定し、Hematoxylin eosin 染色を(株)江東微生物研究所に依頼し、病理組織学的観察を行った。

なお、本研究は、科学的観点、動物愛護及び環境保全の観点並びに動物実験等を行う教職員・学生等の安全確保の観点から、動物実験等の実施方法等を定めた「城西大学動物実験規定」に従い、動物実験委員会による研究計画の審査に基づく学長承認を得て実施した。

## 実験飼料

実験飼料の原材料のカゼイン、シュクロース、 $\beta$  スターチ、AIN-93G ミネラル混合、AIN-93G ビタミン混合(コリン添加)、セルロースパウダーは、(株)オリエンタル酵母工業から購入し、L-シスチン、t-ブチルヒドロキノンは、(株)和光純薬工業から購入した。サフラワー油は(株)紅花食品から、ラードは(株)オリエンタル酵母工業から購入した。ニシン油は Sigma-Aldrich Co. から購入し、マグロ油および第 2 章、第 3 章で用いた魚油は、NOF Co. から提供されたものを用いた。油脂の脂肪酸組成を Table12 示した。フェノフィブラートは、Sigma-Aldrich Co. から購入した。これらの材料を用いて、各章に示した飼料組成に基づき実験に用いる食餌を調製した。なお、実験食による飼育期間中は、毎日決まった時刻に食餌を交換し、残食量を測定した。

## 血中パラメータ測定

血漿トリグリセリド値の測定にはトリグリセライド E-テストを用いた。血漿総コレステロール値の測定には、コレステロール E-テストを用いた。血漿 HDL-コレステロール値の測定には、HDL-コレステロール E-テストを用いた。血漿 AST および ALT 値の測定には、トランスアミラーゼ CII-テストワコーを用いた。以上 4 つの測定キットは(株)和光純薬工業から購入した。血漿インスリン値とレプチン値の測定には、モリナガインスリン測定 ELISA キットとマウスレプチン測定 ELISA キット((株)森永生科学研究所)を用いた。血漿アディポネクチン値の測定には、マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット((株)大塚製薬)を用いた。

## 肝臓中脂質抽出・濃度測定

15 mL チューブ(①)に 0.1M KCl : メタノール混液(1 : 2.5)1.75 mL を分注し、肝臓組織(約 0.15 g/匹)を入れ、ホモジナイズした。そこに、クロロホルム 0.625 mL を加え攪拌し、0.1M KCl を 1.12 mL 加え再び攪拌して、3 時

間静置させた。その後、4°C、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、下層をスピッツ管②)に回収した。①のチューブに再び 0.1M KCl : メタノール混液を 0.875 mL、クロロホルム 1.425 mL を加えよく攪拌した。10 分間静置後、4°C、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、下層を②のスピッツ管に回収した。そのスピッツ管に超純水を 0.25 mL 加え、よく攪拌し、エマルジョン状態にした。10 分間静置後、4°C、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、下層を回収し褐色ビンで冷暗下保存した。これを肝臓脂質抽出液として用いた。肝臓トリグリセリド値と総コレステロール値は、肝臓脂質抽出液を 50  $\mu$ l 分注し蒸発乾固させ、t-ブチルアルコール : トライトン X-100 : メタノール混液(3:1:1)を 0.05 mL 加え、よく攪拌したものを試料とし、血中脂質測定と同様に、トリグリセライド E-テストとコレステロール E-テストを用いて測定した。

#### 肝臓 total RNA の抽出および mRNA 量の測定

肝臓の total RNA は、Trizol (Invitrogen、CA)を用い、Chirgwin らの操作手順に従って抽出した<sup>78)</sup>。mRNA レベル測定には、QuantiTect SYBR Green Real-time PCR kit (QIAGEN、Germany)を用い、操作手順に従って温度サイクルをセットし ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems、CA)で分析した。分析対象とした遺伝子に対するプライマーの塩基配列は Table 13 に示した。

#### 経口糖負荷試験(oral glucose tolerance test : OGTT)

第 3 章の実験食開始 7 週経過時点にて、試験当日 4 時間絶食後、糖負荷前に体重と血糖値を測定した。次に、10%グルコース溶液を 1 g/kg 体重で経口投与し、投与 30 分、60 分、90 分、120 分後の血糖値を測定した。

#### 統計処理

数値は全て平均値(mean) $\pm$ 標準偏差(S.D.)にて表した。統計解析には、



SYSTAT 11 (Systat ソフトウェア)を用い、一元配置分散分析による多重解析を行った。Fisher's protected least significant difference (PLSD) test で比較検定し、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

Table 12. Composition of the fatty acid

%	Lard	Safflower oil	Menhaden oil	Tuna oil, DHA rich fish oil	EPA rich fish oil
14:0	1.7		7.5	3.0	6.3
16:0	24.0	4.4	17.5	18.2	14.4
16:1	2.6	0.2	11.5	4.2	9.1
18:0	14.4	2.1	3.5	4.9	4.8
18:1	43.9	77.5	8.5	18.8	15.6
18:2	9.1	14.2	<3	1.3	1.8
18:3	0.7	0.4	<3	0.8	0.2
20:4	0.1	0.5	<3	2.0	0.7
20:5			12.5	7.3	20.3
22:6			11.5	24.1	13.0
Others	3.5	0.7	<18.5	15.4	13.8

Table 13. PCR primers

Genes	Sense (5'→3')	Antisense (3'→5')
SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGAAGTCACTGT
FAS	TCACCACTGTGGGCTCTGCAGAGAAGCGAG	TGTCATTGGCCTCCTCAAAAAGGCGTCCA
SCD-1	CCGGAGACCCCTTAGATCGA	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAAC
SREBP-2	GCGTCTGGAGACCATGGA	ACAAAAGTTGCTCTGAAAACAATCA
HMG-CoA reductase	CTTGTTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
LDL-receptor	AGGCTGTGGGCTCCATAGG	TGCGGTCCAGGGTCATCT
PPAR $\alpha$	GTGGCTGCTATAATTTGCTGTG	GAAGGTGCATCTGGATGGTT
AOX	TCAACAGCCCAACTGTGACTTCCATTA	TCAGGTAGCCATTATCCATCTCTTCA
UCP-2	GTTCTCTGTCTCGTCTTGC	GGCCTTGAACCAACCA
CYP7A1	CTGTGTTCACTTTCTGAAGCCATG	CCCAGGCATTGCTCTTTGAT
CYP8B1	TTGGACTTCAAGCTGGTCCA	CAAAGCCCAGCGCCT
Insig-1	TCACAGTGACTGAGCTTCAGCA	TCATCTTCATCACACCCAGGAC
Insig-2a	CCCTCAATGAATGTAAGGATT	TGTGAAGTGAAGCAGACCAATGT
RXR $\alpha$	GGCTTCTTCAAGAGGACAGTACG	TCGGCTTCCAGAATCTTCTCTAC
AdipoR2	ACCCACAACCTTGCTTCATCTAC	CCATAAGCATTAGCCAGCCTATC
AMPK $\alpha$ 2	GGCAAAGTGAAGATTGGAGAACA	AACTGCCACTTTATGGCCTGTC
ACC2	CACCATGCCACCTCGTTAC	CATACACAGAGCTGGTGTGGACT

## 引用文献

- 1) Iso H, Kobayashi M, Ishihara J, Sasaki S, Okada K, Kita Y, Kokubo Y, Tsugane S; JPHC Study Group: Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese: the Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation*, 2006; 113: 195-202.
- 2) Mozaffarian D, Rimm EB: Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA*, 2006; 296: 1885-1899.
- 3) Yamagishi K, Iso H, Date C, Fukui M, Wakai K, Kikuchi S, Inaba Y, Tanabe N, Tamakoshi A; Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk Study Group: Fish, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and mortality from cardiovascular diseases in a nationwide community-based cohort of Japanese men and women the JACC (Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk) Study. *J Am Coll Cardiol*, 2008; 52: 988-996.
- 4) Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD: Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem*, 1999; 274: 23577-23583.
- 5) Mater MK, Thelen AP, Pan DA, Jump DB: Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J Biol Chem*, 1999; 274: 32725-32732.
- 6) Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O: Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible

- mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J Biol Chem*, 1999; 274: 25892-25898.
- 7) Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N: A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 1999; 274: 35840-35844.
  - 8) Nakatani T, Kim HJ, Kaburagi Y, Yasuda K, Ezaki O: A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity. *J Lipid Res*, 2003; 44: 369-379.
  - 9) Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W: Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, 1997; 11: 779-791.
  - 10) Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O: Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem*, 2002; 277: 9562-9569.
  - 11) Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL: Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell*, 1996; 85: 1037-1046.
  - 12) Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL: Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem*, 1993; 268: 14490-14496.

- 13) Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS: Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 1993; 268: 14497-14504.
- 14) Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, Shih HM, Ellenberger T, Towle HC, Spiegelman BM: Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol*, 1995; 15: 2582-2588.
- 15) Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest*, 1997; 99: 838-845.
- 16) Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL: Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest*, 1996; 98: 1575-1584.
- 17) Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL: Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest*, 1997; 99: 846-854.
- 18) Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H: Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest*, 1998; 101: 2331-2339.
- 19) Reddy JK, Mannaerts GP: Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 1994; 14: 343-370.
- 20) Schoonjans K, Staels B, Auwerx J: The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1996; 1302:

93-109.

- 21) Botolin D, Wang Y, Christian B, Jump DB: Docosaheptaenoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. *J Lipid Res*, 2006; 47: 181-192.
- 22) Pawar A, Jump DB: Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem*, 2003; 278: 35931-35939.
- 23) Frøyland L, Madsen L, Vaagenes H, Totland GK, Auwerx J, Kryvi H, Staels B, Berge RK: Mitochondrion is the principal target for nutritional and pharmacological control of triglyceride metabolism. *J Lipid Res*, 1997; 38: 1851-1858.
- 24) Issemann I, Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990; 347: 645-650.
- 25) Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W: Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell*, 1993; 77: 67-76.
- 26) Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J: Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem*, 1997; 272: 28210-28217.
- 27) Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J: Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem*, 1995; 270: 19269-19276.
- 28) Packard CJ: Overview of fenofibrate. *Eur Heart J*, 1998; Suppl: A62-65.

- 29) Tokuno A, Hirano T, Hayashi T, Mori Y, Yamamoto T, Nagashima M, Shiraishi Y, Ito Y, Adachi M: The effects of statin and fibrate on lowering small dense LDL- cholesterol in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb*, 2007; 14: 128-132.
- 30) Ikewaki K, Tohyama J, Nakata Y, Wakikawa T, Kido T, Mochizuki S: Fenofibrate effectively reduces remnants, and small dense LDL, and increases HDL particle number in hypertriglyceridemic men - a nuclear magnetic resonance study. *J Atheroscler Thromb*, 2004; 11: 278-285.
- 31) Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, Forder P, Pillai A, Davis T, Glasziou P, Drury P, Kesäniemi YA, Sullivan D, Hunt D, Colman P, d'Emden M, Whiting M, Ehnholm C, Laakso M; FIELD study investigators: Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*, 2005; 366: 1849-1861.
- 32) Kaku K, Fiedorek FT Jr, Province M, Permutt MA: Genetic analysis of glucose tolerance in inbred mouse strains. Evidence for polygenic control. *Diabetes*, 1988; 37: 707-713.
- 33) Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB: Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med*, 2002; 162: 1867-1872.
- 34) Gotto AM Jr: Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1998; 82: 22Q-25Q.
- 35) Meshkani R, Adeli K: Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem*, 2009; 42: 1331-1346.
- 36) 平成 19 年度国民健康・栄養調査報告 厚生労働省
- 37) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P,

- Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 2002; 8: 1288-1295.
- 38) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 2003; 423: 762-769.
- 39) Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T: Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*, 2007; 13: 332-339.
- 40) 平成 14 年度国民健康・栄養調査報告 厚生労働省
- 41) Tsuboyama-Kasaoka N, Sano K, Shozawa C, Osaka T, Ezaki O: Studies of UCP2 transgenic and knockout mice reveal that liver UCP2 is not essential for the antiobesity effects of fish oil. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 294: E600-606.
- 42) Hong DD, Takahashi Y, Kushiro M, Ide T: Divergent effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid ethyl esters, and fish oil on hepatic fatty acid oxidation in the rat. *Biochim Biophys Acta*, 2003; 1635: 29-36.
- 43) Zhang X, Tanaka N, Nakajima T, Kamijo Y, Gonzalez FJ, Aoyama T: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent peroxisome proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 346: 1307-1311.

- 44) Morimura K, Cheung C, Ward JM, Reddy JK, Gonzalez FJ: Differential susceptibility of mice humanized for peroxisome proliferator-activated receptor alpha to Wy-14,643-induced liver tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 1074-1080.
- 45) Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T: Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J*, 2004; 68: 975-981.
- 46) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 257: 79-83.
- 47) Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes*, 2005; 54: 3358-3370.
- 48) Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T: Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem*, 2004; 279: 30817-30822.
- 49) Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE: Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*, 2003; 278: 9073-9085.



- 50) Möhlig M, Wegewitz U, Osterhoff M, Isken F, Ristow M, Pfeiffer AF, Spranger J: Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Horm Metab Res*, 2002; 34: 655-658.
- 51) Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R: Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002; 290: 1084-1089.
- 52) Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N, Shimano H: Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*, 2003; 38: 1529-1539.
- 53) Engelking LJ, Kuriyama H, Hammer RE, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL, Liang G: Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J Clin Invest*, 2004; 113: 1168-1175.
- 54) Bené H, Lasky D, Ntambi JM: Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 284: 1194-1198.
- 55) Kim HK, Choi S, Choi H: Suppression of hepatic fatty acid synthase by feeding alpha-linolenic acid rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats. *J Nutr Biochem*, 2004; 15: 485-492.
- 56) Lindsey S, Pronczuk A, Hayes KC: Low density lipoprotein from humans supplemented with n-3 fatty acids depresses both LDL receptor activity and LDLr mRNA abundance in HepG2 cells. *J Lipid Res*, 1992; 33: 647-658.
- 57) Benhizia F, Hainault I, Serougne C, Lagrange D, Hajduch E, Guichard C, Malewiak MI, Quignard-Boulangé A, Lavau M, Griglio S: Effects of a fish oil-lard diet on rat plasma lipoproteins, liver FAS, and lipolytic enzymes. *Am J Physiol*, 1994; 267: E975-982.

- 58) Bérard AM, Dumon MF, Darmon M: Dietary fish oil up-regulates cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA in mouse liver leading to an increase in bile acid and cholesterol excretion. *FEBS Lett*, 2004; 559: 125-128.
- 59) Cheema SK, Agellon LB: The murine and human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated via peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*, 2000; 275: 12530-12536.
- 60) Seedorf U, Raabe M, Ellinghaus P, Kannenberg F, Fobker M, Engel T, Denis S, Wouters F, Wirtz KW, Wanders RJ, Maeda N, Assmann G: Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. *Genes Dev*, 1998; 12: 1189-1201.
- 61) Lavery DJ, Schibler U: Circadian transcription of the cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes Dev*, 1993; 7: 1871-1884.
- 62) Stravitz RT, Hylemon PB, Heuman DM, Hagey LR, Schteingart CD, Ton-Nu HT, Hofmann AF, Vlahcevic ZR: Transcriptional regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA by conjugated bile acids in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1993; 268: 13987-13993.
- 63) Vlahcevic ZR, Eggertsen G, Björkhem I, Hylemon PB, Redford K, Pandak WM: Regulation of sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase and cholic acid biosynthesis in the rat. *Gastroenterology*, 2000; 118: 599-607.
- 64) Gbaguidi GF, Agellon LB: The atypical interaction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha with liver X receptor alpha antagonizes the stimulatory effect of their respective ligands on the murine cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene promoter. *Biochim Biophys Acta*, 2002; 1583: 229-236.
- 65) Nakamura M: A diabetic strain of the mouse. *Proc Jp Acad*, 1962; 38:

348-352.

- 66) Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD: Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem*, 1999; 274: 30028-30032.
- 67) Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL: Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*, 2000; 6: 77-86.
- 68) Kato T, Shimano H, Yamamoto T, Ishikawa M, Kumadaki S, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yahagi N, Nakakuki M, Hastay AH, Takeuchi Y, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Yamada N: Palmitate impairs and eicosapentaenoate restores insulin secretion through regulation of SREBP-1c in pancreatic islets. *Diabetes*, 2008; 57: 2382-2392.
- 69) Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ: Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, 1998; 93: 693-704.
- 70) Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Björkhem I, Pettersson S, Gustafsson JA: Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest*, 2001; 107: 565-573.
- 71) Hsu SC, Huang CJ: Changes in liver PPARalpha mRNA expression in response to two levels of high-safflower-oil diets correlate with changes in adiposity and serum leptin in rats and mice. *J Nutr Biochem*, 2007; 18: 86-96.
- 72) Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajtys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM: Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem*, 1999;

274: 5692-5700.

- 73) Kim S, Sohn I, Ahn JI, Lee KH, Lee YS, Lee YS: Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model. *Gene*, 2004; 340: 99-109.
- 74) Hardie DG: The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci*, 2004; 117: 5479-5487.
- 75) Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B: Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes*, 2005; 54: 1331-1339.
- 76) Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Oztelberger C, Liu X, Ntambi JM: Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab*, 2007; 6: 484-496.
- 77) Huang H, Iida KT, Sone H, Yokoo T, Yamada N, Ajisaka R: The effect of exercise training on adiponectin receptor expression in KKAY obese/diabetic mice. *J Endocrinol*, 2006; 189: 643-653.
- 78) Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 1979; 18: 5294-5299.

