

糖尿病治療におけるピオグリタゾンの副作用低減に関する基礎的研究

n-3系脂肪酸(EPA・DHA)によるピオグリタゾンの
皮下脂肪蓄積を伴う体重増加の抑制

飯塚 讓

目次

本論文で使用した略語一覧	1
緒言	3
第1章 n-3系 PUFA (EPA・DHA)の併用によるピオグリタゾンの副作用低減 および脂肪細胞の肥大化と炎症に及ぼす影響の検討	7
第1節 摂食量、ピオグリタゾンと n-3系 PUFA の平均1日投与量、体重 および体組成	9
第2節 経口糖負荷試験(OGTT)およびインスリン負荷試験(ITT)	11
第3節 血糖値、HOMA-IR および血漿中パラメータ	12
第4節 肝臓の形態、組織解析および肝臓中脂質値	13
第5節 肝臓中遺伝子発現およびタンパク質発現	14
第6節 脂肪細胞の形態学的解析	16
第7節 白色脂肪組織中遺伝子発現	17
第8節 n-3系 PUFA (EPA・DHA)の併用によるピオグリタゾンの副作用低減 および脂肪細胞の肥大化と炎症に及ぼす影響の検討に関する考察	18
第9節 DHA 濃縮魚油の使用に関する考察	22
第10節 小括	24
第2章 ピオグリタゾンと n-3系 PUFA (EPA・DHA)が膵臓の機能維持に及ぼす 影響の検討	25
第1節 摂食量、ピオグリタゾンと n-3系 PUFA の平均1日投与量、体重 および体組成	27
第2節 血糖値、HOMA-IR および血漿中パラメータ	28
第3節 膵臓の組織学および形態学的解析	28
第4節 膵臓ランゲルハンス島の小胞体ストレスおよびアポトーシスの評価	30
第5節 膵臓中遺伝子発現	31
第6節 ピオグリタゾンと n-3系 PUFA (EPA・DHA)が膵臓の機能維持に及ぼす 影響の検討に関する考察	32
第7節 小括	34
第3章 加齢マウスにおけるピオグリタゾンと n-3系 PUFA (EPA・DHA)の併用 による有効性の検討	35
第1節 加齢 KK マウスにおけるフェノタイプおよび遺伝子発現の検討	36
第1項 酸化ストレス、抗酸化能力、血糖値、血漿インスリン値および HOMA-IR の推移	37
第2項 摂食量推移、成長曲線および体組成	39
第3項 血糖値、HOMA-IR、血漿中パラメータ	40

第4項	肝臓中遺伝子発現.....	40
第5項	加齢KKマウスにおけるフェノタイプおよび遺伝子発現の検討に関する考察.....	41
第2節	ピオグリタゾンの有意なインスリン抵抗性改善効果がみられない用量の検討.....	43
第1項	摂食量、ピオグリタゾンの平均1日投与量、体重および体組成.....	44
第2項	血糖値、HOMA-IR、血漿中パラメータ.....	44
第3項	ピオグリタゾンの有意な有効性がみられない用量の検討に関する考察.....	45
第3節	ピオグリタゾンの投与量減少に対するn-3系PUFA(EPA・DHA)の有効性の検討.....	46
第1項	摂食量、ピオグリタゾンとn-3系PUFAの平均1日投与量、体重および体組成.....	47
第2項	酸化ストレスおよび抗酸化能力の評価.....	49
第3項	血糖値、HOMA-IR、血漿中パラメータおよびインスリン負荷試験(ITT).....	50
第4項	肝臓の形態、組織解析および肝臓中脂質値.....	51
第5項	肝臓中遺伝子発現およびタンパク質発現.....	53
第6項	脂肪細胞の形態学的解析.....	55
第7項	白色脂肪組織中遺伝子発現.....	56
第8項	膵臓の組織学的解析および形態学的解析.....	56
第9項	ピオグリタゾンの投与量減少に対するn-3系PUFA(EPA・DHA)の有効性の検討に関する考察.....	58
第4節	小括.....	62
	総括.....	64
	謝辞.....	67
	実験の部.....	68
	引用文献.....	74

本論文で使用した略語一覧

ABC: ATP-binding cassette transporter
ACC: acetyl-CoA carboxylase
ANOVA: analysis of variance
AOX: acyl-CoA oxidase
AUC: area under the curve
BAP: biological antioxidative potential
BAT: brown adipose tissue
BSA: bovine serum albumin
BW: body weight
CHOP: C/EBP homologous protein
Con: Control
CPT: carnitine palmitoyltransferase
CT: computed tomography
DGAT: diacylglycerol acyltransferase
DHA: docosahexaenoic acid
d-ROMs: diacron of reactive oxygen metabolites
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
en%: energy %
EPA: icosapentaenoic acid
ER: endoplasmic reticulum
FAS: fatty acid synthase
FAT: fatty acid transporter
FFA: free fatty acid
FO: fish oil
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLP: glucagon-like peptide
H&E: hematoxylin-eosin
HOMA-IR: homeostasis model of assessment-insulin resistance
HRP: horseradish peroxidase
IL: interleukin
ITT: insulin tolerance test
Insig: insulin induced gene
JELIS: Japan EPA Lipid Intervention Study
LPL: lipoprotein lipase

LXR: liver-X receptor
MCAD: medium chain acyl-CoA dehydrogenase
MCP: monocyte chemoattractant protein
MUFA: monounsaturated fatty acid
N.D.: not-detected
OGTT: oral glucose tolerance test
P: pioglitazone
PCR: polymerase chain reaction
PDX: pancreatic-duodenal homeobox
P/FO: pioglitazone/fish oil
PH: pioglitazone-high dose
PH/FO: pioglitazone-high dose/fish oil
PL: pioglitazone-low dose
PL/FO: pioglitazone-low dose/fish oil
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor
PRACTICAL: PRospective ACTos practICAL experience
PUFA: polyunsaturated fatty acid
PVL: pioglitazone-very low dose
PVL/FO: pioglitazone-very low dose/fish oil
QOL: quality of life
SCAP: SREBP cleavage-activating protein
SCD: stearyl-CoA desaturase
SE: standard error
SRE: sterol regulatory element
SREBP: sterol regulatory element binding protein
TBARS: thiobarbituric acid reactive substances
TC: total cholesterol
TG: triacylglycerol
TLR: toll-like receptor
TNF: tumor necrosis factor
TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling
UCP: uncoupling protein
UPR: unfolded protein response
VLDL: very low density lipoprotein
WAT: white adipose tissue
wt%: weight %

緒言

生活全般が豊かになった現代では、飽食に伴うエネルギーの過剰摂取、くわえて身体活動の低下によるエネルギー消費量の減少といった、エネルギー収支バランスの乱れによって生じる肥満が問題となっている^{1,2)}。特に、内臓脂肪型肥満では過剰な脂肪蓄積により脂肪細胞が肥大化し、炎症性アディポサイトカインの発現および分泌に異常が引き起こされ、炎症が惹起される³⁾。炎症が生じた脂肪細胞からは多量の遊離脂肪酸(FFA)が放出され、肝臓や骨格筋、膵臓などに流入し、異所性脂肪として蓄積することでインスリン作用を阻害する。これを lipotoxicity(脂肪毒性)といい、肥満によってインスリン抵抗性が生じる原因の1つであると考えられている^{4,5)}。インスリン抵抗性状態は、体内の酸化ストレスを増加させ、血圧、糖代謝、脂質代謝に異常が生じることで、高血圧症、2型糖尿病、脂質異常症などの様々な代謝性疾患に進展し、虚血性心疾患や脳血管疾患の大きなリスク要因となる⁵⁾。これらの大血管障害は、発生リスクが糖尿病発症前の耐糖能異常の時期から進行性に上昇するため、死亡率が高いことが報告されている⁶⁻⁸⁾。したがって、大血管障害を予防するという観点から、糖尿病の重症化と他の代謝性疾患の合併を防ぎ、インスリン抵抗性に対する治療をおこなうことは非常に重要となる。

2型糖尿病の治療を目的とした経口糖尿病薬は多く開発されており、中でもチアゾリジン薬は、リガンド応答性転写因子の peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)のサブタイプの1つである PPAR γ のアゴニストであり、肝臓、骨格筋、白色脂肪組織への作用によりインスリン抵抗性を改善することが明らかになっている⁹⁾。また、血中脂質プロファイル改善作用^{10,11)}、脂肪肝改善作用^{12,13)}、抗炎症作用¹⁴⁾、大血管障害の抑制作用および抗動脈硬化作用^{15,16)}など、多面的な有効性が確認されている。我が国では、チアゾリジン薬の1つであるピオグリタゾンが糖尿病の治療に用いられており、2007年から2015年にわたっておこなわれた大規模臨床試験により、ピオグリタゾンは2型糖尿病患者の心血管イベントの発症と死亡率を低下させることが明らかにされた^{17,18)}。我が国でおこなわれた横断研究によると、ピオグリタゾンは2002年から10年間で使用率が増加し¹⁹⁾、製造販売業者による調査では、2010年度の年間推定使用患者数は2型糖尿病患者の半数を占める約140万人であったと報告されている。一方、服用した患者において皮下脂肪の蓄積を伴う体重増加が確認されており、副作用の1つとして問題になっている^{20,21)}。チアゾリジン薬は、前駆脂肪細胞の分化促進による小型脂肪細胞の増加と、多量の脂肪を蓄積して肥大化した脂肪細胞に対するアポトーシスの誘導による大型脂肪細胞の減少を介し、インスリン抵抗性改善作用を有するアディポネクチンの分泌を増加させる^{9,22,23)}。チアゾリジン薬の服用中に適切な食事療法と運動療法が守られない場合、エネルギー消費量よりエネルギー摂取量が多くなり、増加した小型脂肪細胞に過剰となったエネルギーが脂肪として蓄積し、脂肪組織の肥大が引き起こされやすくなると考えられている。ピオグリタゾン(アクトス®)の市販後の調査である PRACTICAL (PRospective ACTos practICAL experience)では、服用期

間中に体重が維持された症例では治療効果が現れたが、体重増加がみられた症例では治療効果が消失したと報告している¹⁰⁾。したがって、ピオグリタゾンによる薬物治療をおこなう上で、増加した小型脂肪細胞への脂肪蓄積を抑制できれば、体重増加によって日常生活や運動療法に支障が出ることを防ぎ、チアゾリジン薬の処方設計の幅を広げることにも貢献できると考えられる。

Icosapentaenoic acid (EPA)や docosahexaenoic acid (DHA)などの n-3 系多価不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)は、脂肪酸合成系とコレステロール合成系酵素遺伝子の転写因子である sterol regulatory element binding proteins (SREBPs)を介して脂質代謝を制御することが解明されている²⁴⁾。また、PPARs のサブタイプの 1 つである PPAR α を活性化し、その標的遺伝子である脂肪酸 β 酸化関連タンパク質遺伝子の発現を増加させ、脂肪酸 β 酸化とエネルギー消費を亢進することが報告されている²⁵⁻²⁷⁾。このような作用機序から、高純度 EPA 製剤や EPA・DHA 製剤として脂質異常症の治療に用いられている。さらに、EPA および DHA は内臓脂肪蓄積や肥満の抑制作用を有している。これらの作用は、肝臓における脂肪酸合成の抑制と脂肪酸 β 酸化の亢進を介して、超低密度リポタンパク質(VLDL)の合成を減少させることで、末梢組織へのトリアシルグリセロール輸送を減少させ、脂肪細胞への FFA の取り込みを抑制すると考えられている²⁸⁻³⁰⁾。高純度 EPA 製剤に関する大規模臨床試験である JELIS (Japan EPA Lipid Intervention Study) および、そのサブ解析によって、冠動脈性疾患の 1 次・2 次予防^{31, 32)}、脳卒中、糖代謝異常、末梢動脈疾患に対する EPA の有効性が報告されている³³⁻³⁵⁾。また、EPA と DHA の機能性として、抗酸化作用³⁶⁾、抗炎症作用³⁷⁾、脂肪毒性の低減による膵臓保護効果³⁸⁾、インスリン分泌能の維持効果³⁹⁾が報告されており、糖代謝の改善作用に関しても多くの知見が得られている。

これらのことから、チアゾリジン薬による薬物治療において、食事療法と運動療法が完全には徹底できず、エネルギーコントロールが不十分な状態であっても、EPA・DHA を併用することで、肝臓を中心とした脂肪酸合成の抑制作用と脂肪酸 β 酸化の亢進作用によって脂肪組織への脂肪蓄積が低減され、チアゾリジン薬による皮下脂肪の増加を抑制でき、さらに、EPA・DHA による糖・脂質代謝改善作用により、相加的な糖尿病治療効果を現すと考えられる(Fig. 1)。しかしながら、2 型糖尿病の治療を目的として、n-3 系脂肪酸製剤を医薬品として使用すること、または、チアゾリジン薬と n-3 系脂肪酸製剤を併用した場合の有効性については、これまで全く検討されていない。

一方、炎症が生じた脂肪細胞から放出される FFA を起因とする異所性脂肪の蓄積は、糖尿病を悪化させる要因の 1 つであることは冒頭で述べたが、糖代謝障害により高血糖・高インスリン状態が続いた場合、膵臓の疲弊によるインスリン分泌能の低下、酸化ストレスおよび小胞体ストレスの増加による膵 β 細胞の減少などの膵臓の機能不全が生じ、糖尿病が悪化することも大きな問題となっている⁴⁰⁾。

そこで本研究は、チアゾリジン薬としてピオグリタゾンを用い、ピオグリタゾンと n-3 系脂肪酸製剤を併用した糖尿病の新たな薬物治療・処方設計のための基礎データを提供す

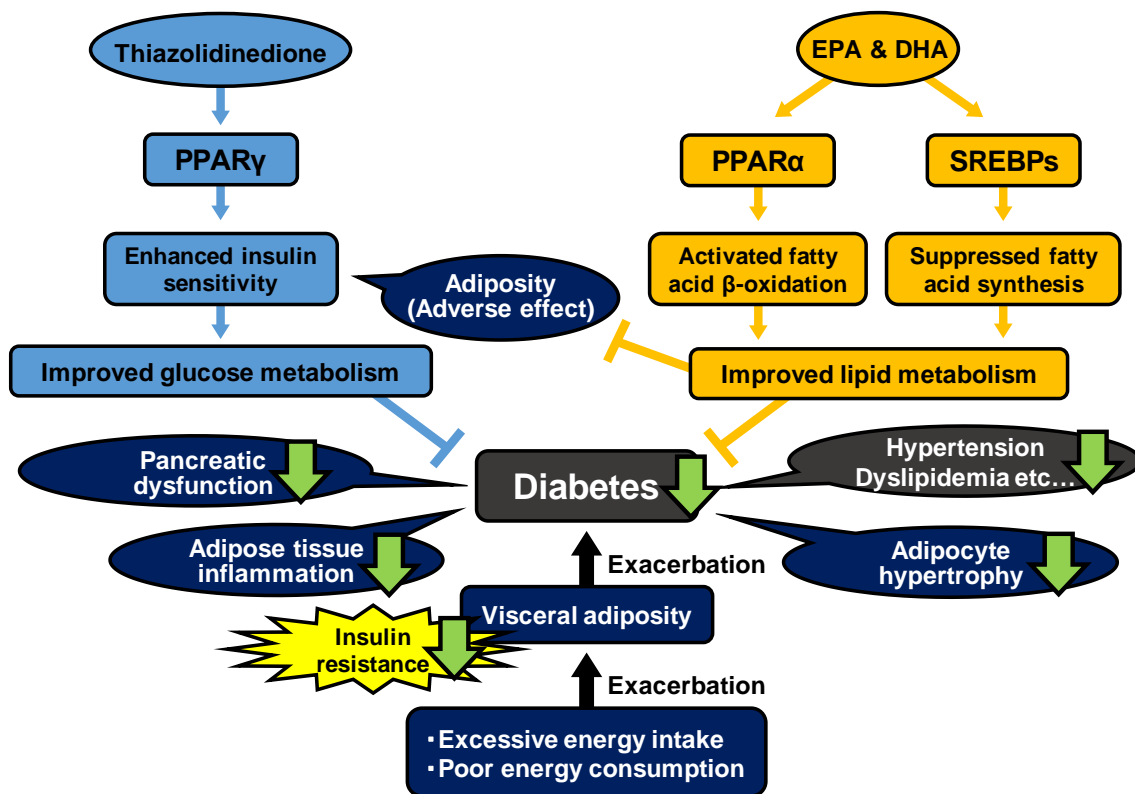


Figure 1. Hypothetical benefits for the combination of thiazolidinedione and n-3 PUFA (EPA-DHA).

ことを目的として、第1章ではピオグリタゾンと EPA・DHA の併用による糖・脂質代謝改善効果、ピオグリタゾンの副作用である体重増加の抑制効果、さらに、脂肪組織における脂肪細胞肥大化と炎症の低減効果を検討し、第2章では糖尿病の治療に対するピオグリタゾン、EPA・DHA、および、これらを併用することによる有用性を、膵臓の機能維持の観点から明らかにすることを目的とした(Fig. 2)。

次に、第3章では、ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用による治療効果が、高齢の2型糖尿病患者に対しても有効であるかを明らかにする。超高齢社会を迎えた我が国では、糖尿病患者に占める高齢者の割合も年々増加しており、2型糖尿病の高齢者に対する治療が今後非常に重要となる⁴¹⁻⁴³⁾。高齢者では、筋肉量の低下と脂肪組織量の比率増加⁴⁴⁾、基礎代謝量の減少⁴⁵⁾がみられると同時に、膵β細胞の機能障害やインスリン標的組織の情報伝達効率の低下^{46, 47)}など、様々な要因によって耐糖能が悪化しやすく、複数の症状を併発している場合も多い。さらに、薬物による副作用の発生リスクが若年者に比べ高齢者で増加することが知られており、その原因の1つとして加齢による薬物の体内動態の変化が考えられている⁴⁸⁾。そのため、新たな治療法を検討する場合には、対象者の年齢や併発する疾患を含めた様々な条件を考慮する必要がある。特に、高齢者は若年者に比べて低血糖を来しやすく、生理機能の低下によって副作用が生じやすいことから、治療効果を維持したままピオグリ

タゾンの投薬量を減少できることは、高齢者に薬物治療をおこなう上で大きな有益性となる。そこで第3章では、加齢させた糖尿病モデルマウスを用いて、EPA・DHAの併用がピオグリタゾンの投薬量を減少できるか検討し、高齢の2型糖尿病患者にピオグリタゾンを併用した薬物治療をおこなう際に、n-3系脂肪酸製剤を併用することでインスリン抵抗性改善効果を維持したままピオグリタゾンの投薬量を減少させるか明らかにすることを目的とした(Fig. 2)。

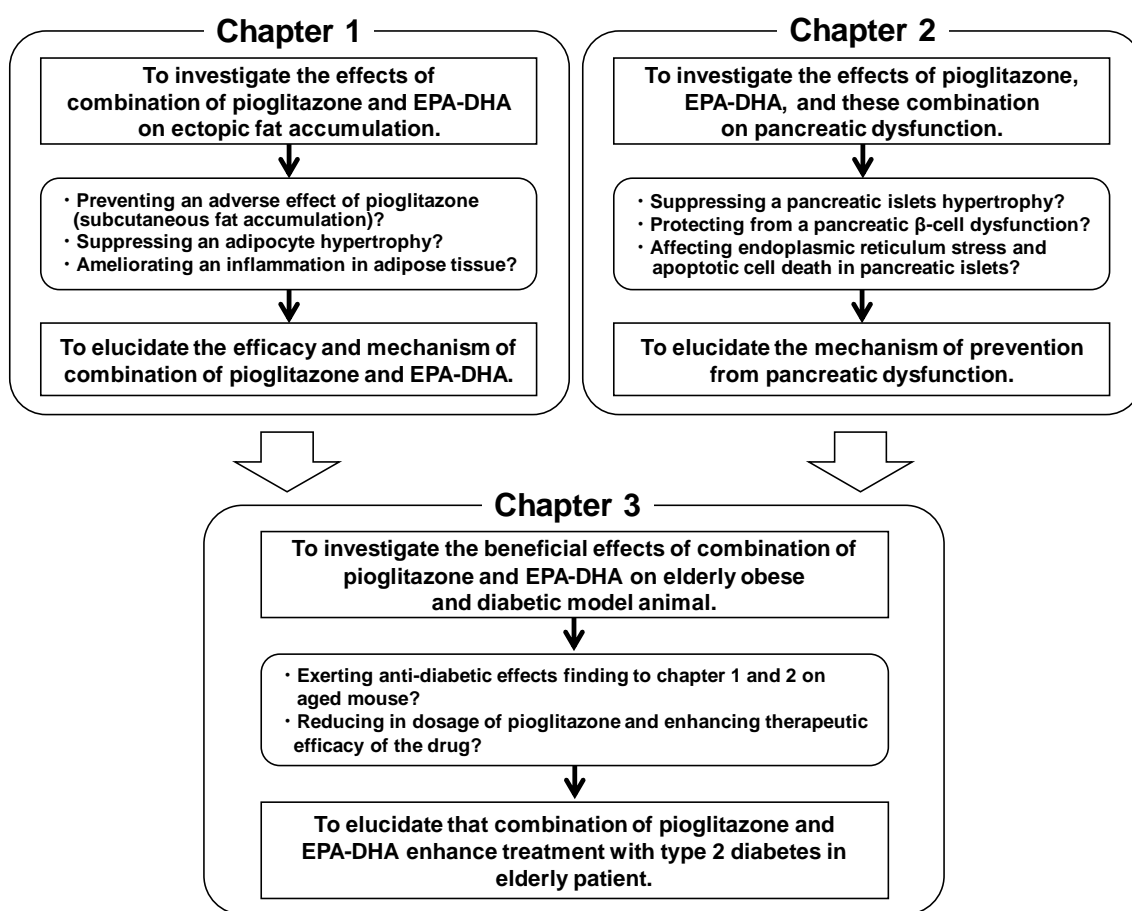


Figure 2. Schematic representation of the purpose in this study.

第1章 n-3系 PUFA (EPA・DHA)の併用によるピオグリタゾンの副作用低減および脂肪細胞の肥大化と炎症に及ぼす影響の検討

ピオグリタゾンは、肥満とインスリン抵抗性を有する2型糖尿病患者に対して有効性が高いとされているが、一方で、肥満または過体重の患者に対する薬物治療は体重増加を来しにくい治療薬の選択が推奨されている⁴⁹⁾。したがって、食事療法と運動療法が維持できない重度の肥満を伴う患者に対するピオグリタゾンの使用は、さらに肥満を助長する可能性があるため適切でないことが考えられた。そこで、本研究が提案するピオグリタゾンとn-3系脂肪酸製剤の併用法は、中程度の肥満および2型糖尿病患者に適用することを想定した。これに伴い、本研究で用いる実験動物は、ob/obマウス、KK-Ayマウスなどの重度に肥満を発現するマウスより、比較的軽度な肥満・2型糖尿病モデルマウスであるKKマウスを選択した。

第1章は、ピオグリタゾンとn-3系PUFA(EPA・DHA)を併用することによる糖・脂質代謝改善効果、ピオグリタゾンによる皮下脂肪蓄積を伴う体重増加の低減効果、くわえて脂肪細胞の肥大化と炎症に対する抑制効果を明らかにすることを目的とした(Fig. 3)。

Bodaryらは、0.012 weight % (wt%)の用量のピオグリタゾンは、KKマウスの血漿インスリン値を有意に低下させたことを報告しており⁵⁰⁾、Araiらは、KKマウスに対する12.5 energy % (en%)の魚油の摂取は、肝臓の脂肪酸合成抑制と脂肪酸 β 酸化亢進を介して、肝臓脂肪蓄積を有意に抑制したことを報告している³⁰⁾。

したがって、これらの文献をもとに、第1章の実験系では実験動物としてKKマウス(雄、7週齢)、チアゾリジン薬として0.006と0.012 wt%のピオグリタゾン、EPAおよびDHAの供給源として10 en%のDHA濃縮魚油を選択した。具体的には、実験飼料の脂肪エネルギー比率は20 en%に設定し、油脂源としてサフラワー油を調合したものをCon (Control)食とした。Con食にピオグリタゾンをそれぞれ0.006、0.012 wt%添加したPL (pioglitazone-low dose)食、PH (pioglitazone-high dose)食、これらの3種類の実験飼料の10 en%をDHA濃縮魚油で置換した、FO (fish oil)食、PL/FO (pioglitazone-low dose/fish oil)食、PH/FO (pioglitazone-high dose/fish oil)食を調製した(Table 1)。これらの飼料をマウスに与え、Con群、PL群、PH群、FO群、PL/FO群、PH/FO群の計6群を設け、Fig. 4に示す実験計画に沿って8週間の飼育をおこなった。

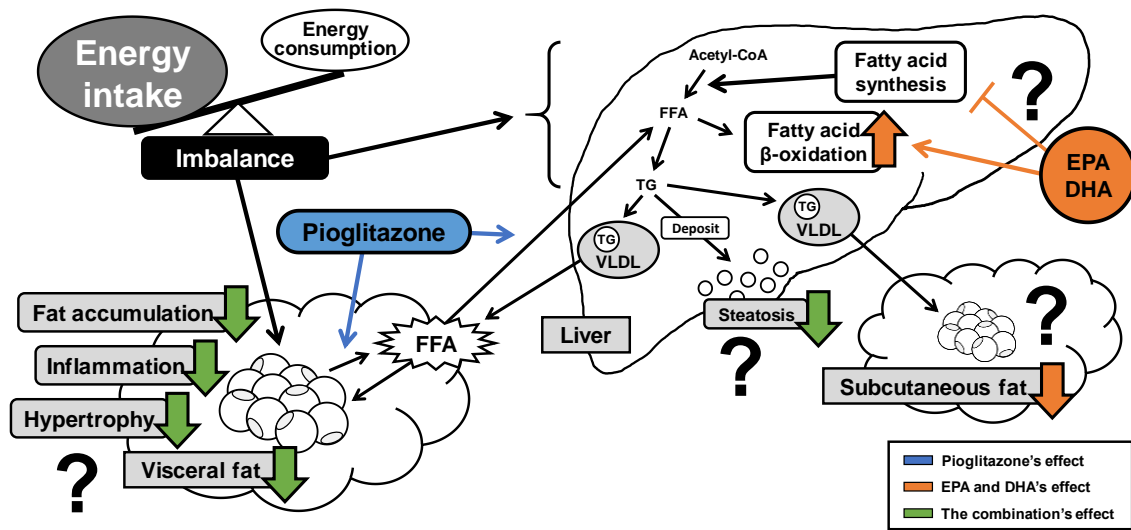


Figure 3. The hypothetical anti-diabetic effects by the combination of pioglitazone and n-3 PUFA (EPA-DHA).

Table 1. Composition of experimental diets.

	Con	PL	PH	FO	PL/FO	PH/FO
Safflower oil (g)	8	8	8	4	4	4
Fish oil (g)	–	–	–	4	4	4
Casein (g)	20	20	20	20	20	20
Sucrose (g)	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37
β -starch (g)	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83
Vitamin mix (g)*	1	1	1	1	1	1
Mineral mix (g)*	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellulose powder (g)	5	5	5	5	5	5
L-cystin (g)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
t-Butylhydroquinone (g)	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016
Pioglitazone (g)	–	0.006	0.012	–	0.006	0.012
Total (g)	100.00	100.01	100.01	100.00	100.01	100.01
Energy (kcal/100g)	374.02	374.00	373.99	374.02	374.00	373.99
Fat energy (%)	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70

*Vitamin and mineral mix were based on the AIN-93G formulation. Vitamin mix substituted 0.25% sucrose for choline bitartrate.

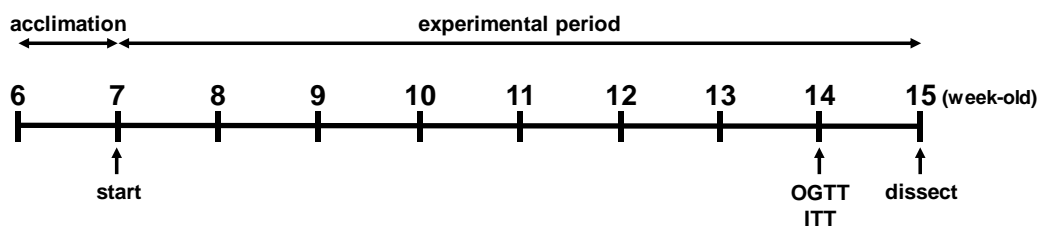


Figure 4. Time schedule of animal treatment in chapter 1.

第1節 摂食量、ピオグリタゾンと n-3 系 PUFA の平均 1 日投与量、体重および体組成

総摂食量、最終体重、体重変化および組織重量を Table 2 に、摂食量と体重から算出したピオグリタゾンと n-3 系 PUFA の平均投与量(1 日あたり)を Table 3 に示す。摂食量はすべての群間で大きな変化はみられなかった。最終体重はすべての群で 10 g 以上の増加がみられ、ピオグリタゾンを単独投与した PL、PH 群の体重増加量は、有意ではないものの Con 群と比較してそれぞれ 24.6、29.1%高値であった。一方、EPA・DHA の併用群である PL/FO、PH/FO 群は、ピオグリタゾンによる体重の増加が Con 群レベルまで抑制された。肝臓重量は、Con 群と比較して PL 群でのみ有意に増加した。副睾丸周囲白色脂肪組織重量は、Con 群と比較して PH 群で減少傾向を示し、他の群で有意に減少した。対照的に、肩甲骨間の褐色脂肪組織重量は、Con 群と比較して PL、PH、PH/FO 群で有意な増加、PL/FO 群で増加傾向($P=0.0903$)がみられた。

X 線 CT スキャンによる腹部脂肪面積の測定結果を Fig. 5 に示す。なお、CT 画像のピンク色の領域は内臓脂肪、黄色の領域は皮下脂肪を示す。内臓脂肪面積は、すべての群間で有意な差はなかったが、Con 群と比較して PL/FO、PH/FO 群はそれぞれ 13.0、17.8%減少した。皮下脂肪面積も、すべての群間で有意な差はなかったが、Con 群と比較して、ピオグリタゾンを単独投与した PL、PH 群でそれぞれ 40.3、57.0%増加した。一方、EPA・DHA との併用群である PL/FO、PH/FO 群は、Con 群レベルまで増加が抑制された。

Table 2. Total food intake, body weight, and tissue weights in 15-week-old male KK mice.

	Con	PL	PH	FO	PL/FO	PH/FO
Total food intake (g/mouse)	267 ± 15	270 ± 10	258 ± 9	277 ± 14	255 ± 3	242 ± 5
Initial body weight (g)	29.8 ± 0.7	29.8 ± 0.7	29.8 ± 0.7	29.8 ± 0.7	29.8 ± 0.5	29.8 ± 0.5
Final body weight (g)	42.3 ± 1.1	45.3 ± 1.8	45.9 ± 1.5	40.8 ± 1.0	42.3 ± 0.8	43.2 ± 0.7
Body weight gain (g)	+12.5 ± 0.6 ^{ab}	+15.6 ± 1.2 ^a	+16.1 ± 1.2 ^a	+11.0 ± 1.4 ^b	+12.5 ± 0.9 ^{ab}	+13.4 ± 0.7 ^{ab}
Liver weight (g)	2.54 ± 0.14 ^b	3.85 ± 0.34 ^a	2.95 ± 0.21 ^{ab}	2.18 ± 0.11 ^b	2.77 ± 0.28 ^b	2.20 ± 0.13 ^b
Epididymal WAT weight (g)	1.52 ± 0.11 ^a	1.14 ± 0.11 ^b	1.21 ± 0.08 ^{ab}	1.11 ± 0.08 ^b	0.94 ± 0.04 ^b	1.02 ± 0.03 ^b
BAT weight (g)	0.32 ± 0.02 ^b	0.83 ± 0.06 ^a	1.09 ± 0.14 ^a	0.30 ± 0.03 ^b	0.68 ± 0.07 ^{ab}	0.96 ± 0.15 ^a

Data are represented as mean ± SE, n = 5. Groups sharing different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test. WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue.

Table 3. The average dose of pioglitazone and n-3 PUFA in 15-week-old male KK mice.

	Con	PL	PH	FO	PL/FO	PH/FO
Pioglitazone (mg/kg/day)		6.63 ± 0.14	12.76 ± 0.26		6.64 ± 0.12	12.56 ± 0.15
n-3 PUFA (g/kg/day)				1.55 ± 0.06	1.39 ± 0.02	1.31 ± 0.02

Data are represented as mean ± SE, n = 5.

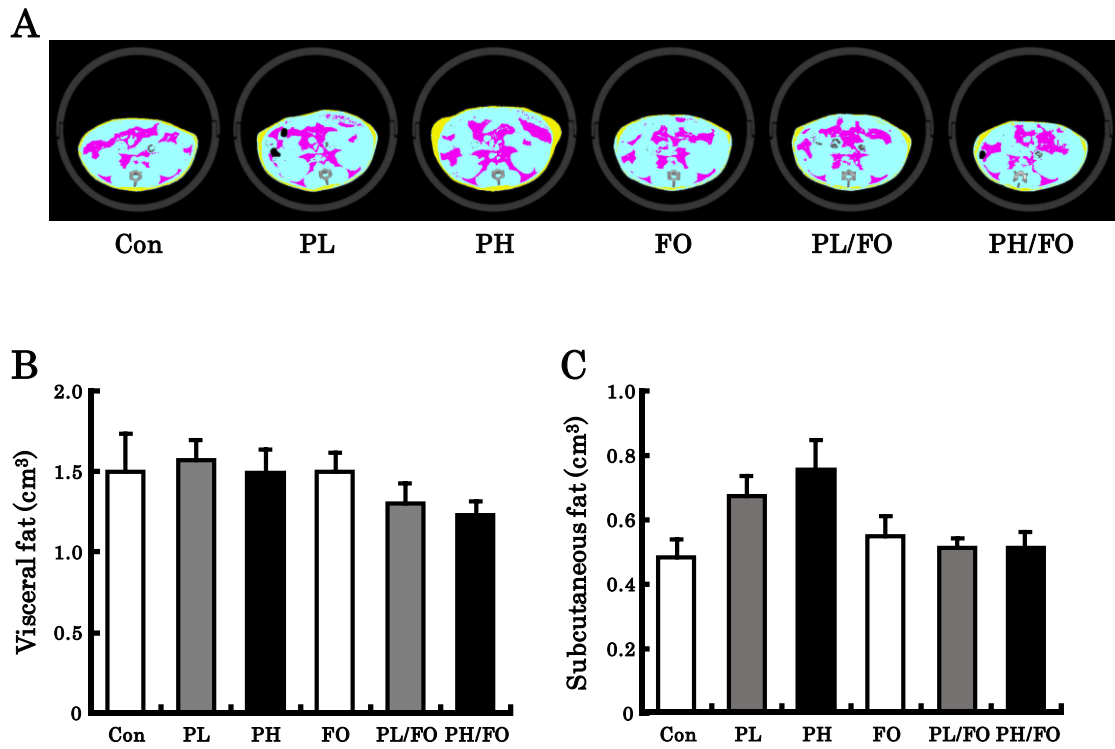


Figure 5. X-ray CT images, visceral fat masses, and subcutaneous fat masses in 15-week-old male KK mice. X-ray CT images (A), visceral fat masses (B) and subcutaneous fat masses (C). Representative images show X-ray CT scanned cross-sections from mice fed Con, PL, PH, FO, PL/FO, and PH/FO diets for 8 weeks. The colored areas show visceral fat (pink) and subcutaneous fat (yellow). Visceral fat and subcutaneous fat are evaluated in abdominal area between second lumbar vertebra and fourth lumbar vertebra. Data are shown as mean \pm SE, $n=4-5$. Significant differences among groups were analyzed by Tukey-Kramer test.

第2節 経口糖負荷試験(OGTT)およびインスリン負荷試験(ITT)

ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用が、耐糖能に及ぼす影響を生理的な条件下で調べるために、飼育開始後7週目に経口糖負荷試験とインスリン負荷試験をおこなった。OGTT では、糖負荷後0、30、60、120分時すべてで実験飼料の違いによる有意な差は認められなかった(Fig. 6A)。また、血糖曲線下面積(AUC)も同様の結果であった。一方、ITT では、ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用群である PL/FO、PH/FO 群は、有意な変化ではなかったが、他の群と比較してインスリン負荷後30分時から血糖値の低下が顕著であり、PH/FO 群の120分時は、PH群と比較して有意に低値であった(Fig. 6B)。

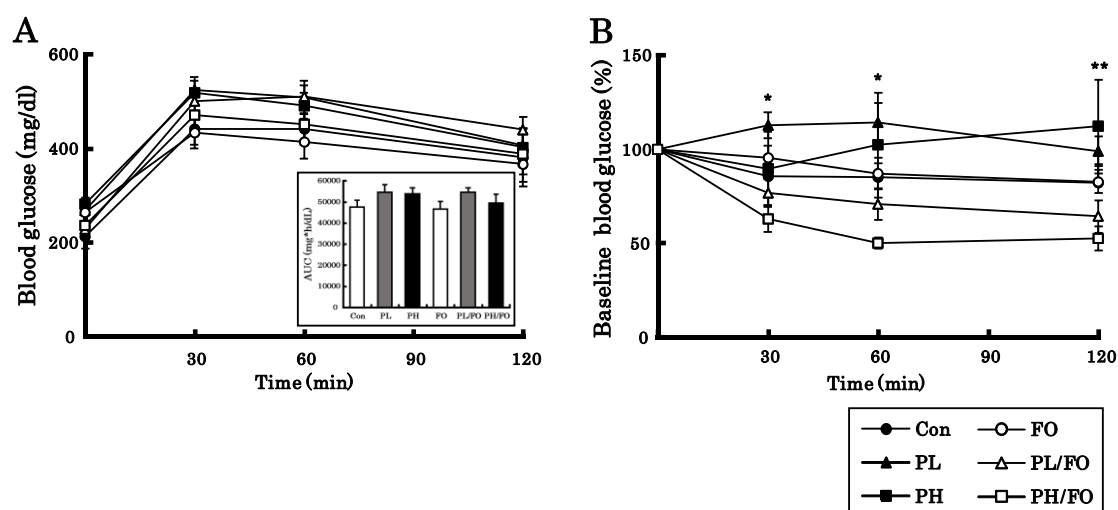


Figure 6. Oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) in 14-week-old male KK mice. Blood glucose levels during OGTT and area under the curve values (A) and blood glucose levels during ITT (B). OGTT was performed by oral administration of a 10% glucose solution (1 g/kg) after 3 h of fasting. ITT was performed by intraperitoneal injection of an insulin solution (0.75 U/kg) after 3 h of fasting. Blood samples were obtained immediately prior to glucose or insulin treatment (0 min) and at 30, 60, and 120 min after glucose loading or insulin injection. Data are represented as mean \pm SE, $n = 5$. The Tukey-Kramer test was used for statistical analyses. *, $P < 0.05$ for comparison between PL and PH/FO groups; **, $P < 0.05$ for comparison between PH and PH/FO group.

第3節 血糖値、HOMA-IR および血漿中パラメータ

血糖値、HOMA-IR および血漿中パラメータの結果を Table 4 に示す。血糖値は、すべての群間で有意な変化はみられなかったが、インスリン値および HOMA-IR は、Con 群と比較して、ピオグリタゾンの投与群である PL、PH、PL/FO、PH/FO 群で有意に低値を示した。アディポネクチン値は、Con 群と比較して PH、PL/FO、PH/FO 群で有意に増加し、さらに PH/FO 群は、PH 群と比較しても有意に高値であった。トリアシルグリセロール値は、Con 群と比較して、併用群である PL/FO、PH/FO 群でのみ有意に減少し、PH/FO 群は PH 群と比較して、有意に低値であった。総コレステロール値は、Con 群と比較して EPA・DHA を投与した FO、PL/FO、PH/FO 群で有意に減少した。また、PL/FO、PH/FO 群は、FO 群と比較しても有意に低値であった。遊離脂肪酸値は、Con 群と比較して PH、FO、PL/FO、PH/FO 群で有意に減少し、PH/FO 群は PH 群と比較してさらに有意に減少した。

Table 4. Blood glucose, HOMA-IR, and plasma parameters in 15-week-old male KK mice.

	Con	PL	PH	FO	PL/FO	PH/FO
Blood glucose (mg/dl)	287 ± 26	255 ± 23	347 ± 34	354 ± 54	290 ± 30	288 ± 14
Plasma insulin (ng/ml)	50.2 ± 11.3 ^a	19.8 ± 3.2 ^b	6.2 ± 1.7 ^b	31.3 ± 7.7 ^{ab}	16.9 ± 3.9 ^b	9.8 ± 2.1 ^b
HOMA-IR	1.00 ± 0.20 ^a	0.36 ± 0.06 ^{bc}	0.15 ± 0.04 ^c	0.68 ± 0.16 ^{ab}	0.36 ± 0.10 ^{bc}	0.20 ± 0.04 ^{bc}
Plasma adiponectin (μg/ml)	10.3 ± 0.3 ^c	19.6 ± 1.3 ^{bc}	30.9 ± 3.9 ^b	12.7 ± 1.0 ^c	28.9 ± 2.4 ^b	68.2 ± 5.8 ^a
Plasma TG (mg/dl)	193 ± 23 ^a	146 ± 13 ^{abc}	168 ± 11 ^{ab}	187 ± 11 ^a	116 ± 10 ^{bc}	93 ± 10 ^c
Plasma TC (mg/dl)	176 ± 9 ^a	167 ± 7 ^a	163 ± 7 ^a	115 ± 5 ^b	86 ± 4 ^c	76 ± 2 ^c
Plasma FFA (mEq/l)	0.74 ± 0.05 ^a	0.56 ± 0.05 ^{ab}	0.50 ± 0.04 ^b	0.48 ± 0.04 ^b	0.41 ± 0.04 ^{bc}	0.28 ± 0.02 ^c

Data are represented as mean ± SE, n = 5. HOMA-IR are shown as the ratio to the Con group (882.6 ± 178.8). Groups sharing different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test. TG, triacylglycerol; TC, total cholesterol; FFA, free fatty acid.

第4節 肝臓の形態、組織解析および肝臓中脂質値

肝臓外見、hematoxylin-eosin (H&E)染色による肝臓の組織解析、肝臓中脂質値を Fig. 7 に示す。形態観察において、Con 群およびピオグリタゾン添加した PL、PH、PL/FO 群の肝臓は、肥大化し白く変色していたが、FO 群および PH/FO 群の肝臓ではそのような変化はなかった。肝臓の組織切片では、ピオグリタゾン単独投与した PL 群および PH 群は、Con 群と比較して脂肪滴の蓄積痕が多く確認されたが、EPA・DHA を投与した FO、PL/FO、PH/FO 群では、脂肪滴の蓄積痕は減少した。肝臓のトリアシルグリセロール含量は、Con 群と比較して PL 群および PH 群では有意に増加したが、FO 群は有意に減少し、PL/FO 群、PH/FO 群は Con 群レベルまで増加が抑制された。さらに、PL 群、PH 群と比較して、それぞれの EPA・DHA 併用群である PL/FO 群、PH/FO 群は有意に低値であった。肝臓の総コレステロール含量は、Con 群と比較して PL 群は有意に増加し、EPA・DHA を投与した FO、PL/FO、PH/FO 群は有意に低下した。

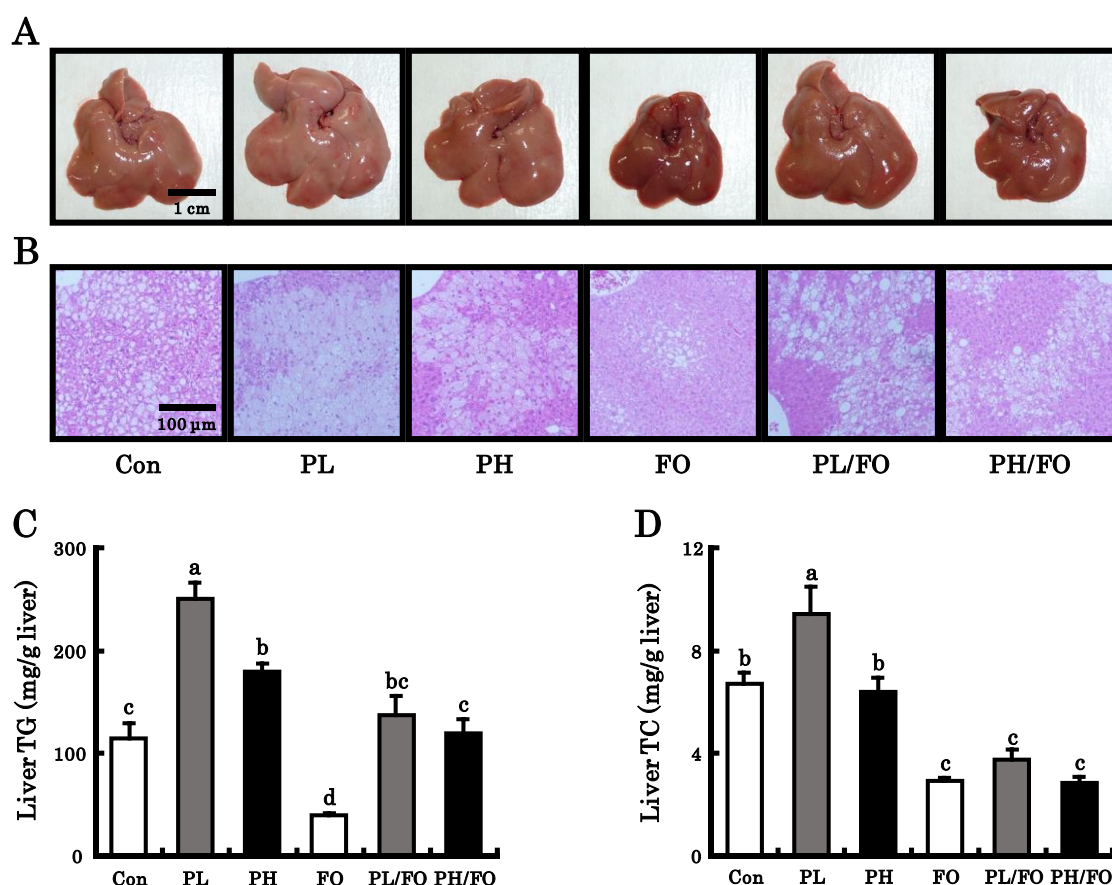


Figure 7. Liver morphology, liver histological sections, and liver lipid parameters in 15-week-old male KK mice. Liver morphology (A), liver histology (B), liver triacylglycerol levels (C), and liver total cholesterol levels (D). Representative macroscopic liver images and tissue sections from mice fed Con, PL, PH, FO, PL/FO, and PH/FO diets for 8 weeks. Sections were stained by H&E and examined under a microscope at 100-fold magnification. Data are represented as mean \pm SE, $n = 4-5$. Groups sharing different letters are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test. TG, triacylglycerol; TC, total cholesterol.

第5節 肝臓中遺伝子発現およびタンパク質発現

脂質代謝に関与する肝臓中の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法、タンパク質発現をウエスタンブロット法で測定し、それぞれの結果を Table 5 と Fig. 8 に示す。脂質合成系酵素遺伝子の転写因子である SREBP-1c の mRNA レベルは、Con 群と比較してピオグリタゾン投与した PL、PH、PL/FO、PH/FO 群で有意に低下した。前駆型 SREBP-1 のタンパク質発現は、Con 群と比較してすべての群で低下し、特に FO 群で顕著であったが、活性型 SREBP-1 のタンパク質発現は、すべての群で大きな変化はなかった。SREBP-1 の標的遺伝子である、脂肪酸合成酵素 fatty acid synthase (FAS) の mRNA レベルは、Con 群と比較して、PL 群および PH 群では有意な差はなかったが、EPA・DHA の投与群である FO、PL/FO、PH/FO 群は有意に低下した。FAS のタンパク質発現も mRNA レベルと同様の傾向を示した。脂肪酸不飽和化酵素である stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 の mRNA レベルは、Con 群と比較して PL 群で有意に増加したが、FO、PL/FO、PH/FO 群は有意に低下した。また、PL 群でみられた増加が、EPA・DHA を併用することで抑制された。SCD-1 のタンパク質発現は、Con 群と比較してピオグリタゾンの投与により著しく増加したが、mRNA レベルと同様に EPA・DHA を併用することで抑制された。脂肪酸合成の律速酵素である acetyl-CoA carboxylase (ACC) の mRNA レベルも、Con 群と比較して PL 群で有意に増加したが、FO、PL/FO、PH/FO 群は有意に低下した。ペルオキシソームの脂肪酸 β 酸化酵素である acyl-CoA oxidase (AOX) の mRNA レベルは、Con 群と比較して PL、PH、PH/FO 群で有意に増加した。一方、AOX のタンパク質発現は、ピオグリタゾン非投与群と比較し、投与群すべてで増加した。ミトコンドリアの脱共役タンパク質であり、エネルギー消費に関与する uncoupling protein (UCP)-2 の mRNA レベルは、Con 群と比較して PL、PH、PL/FO 群でそれぞれ 2.5、2.3、1.9 倍増加したが、すべての群間で有意な差ではなかった。ミトコンドリアの β 酸化に関与する carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1 および medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) の mRNA レベルは、すべての群間で有意な差はみられなかった。核内受容体 Liver-X Receptor (LXR) の標的遺伝子である ABCA1、ABCG5 および ABCG8 の mRNA レベルは、Con 群と比較してすべての群間で有意な差はみられなかった。

Table 5. Liver mRNA levels in 15-week-old male KK mice.

	Con	PL	PH	FO	PL/FO	PH/FO
<i>Lipogenesis</i>						
SREBP-1c	1.00 ± 0.13 ^a	0.55 ± 0.07 ^b	0.51 ± 0.06 ^b	0.73 ± 0.12 ^{ab}	0.52 ± 0.12 ^b	0.43 ± 0.09 ^b
FAS	1.00 ± 0.10 ^a	1.60 ± 0.32 ^a	1.18 ± 0.18 ^a	0.12 ± 0.02 ^b	0.20 ± 0.03 ^b	0.25 ± 0.11 ^b
SCD-1	1.00 ± 0.07 ^b	1.58 ± 0.11 ^a	1.31 ± 0.13 ^{ab}	0.18 ± 0.02 ^c	0.30 ± 0.06 ^c	0.28 ± 0.03 ^c
ACC	1.00 ± 0.09 ^b	1.41 ± 0.23 ^a	1.00 ± 0.16 ^b	0.40 ± 0.05 ^c	0.52 ± 0.10 ^c	0.40 ± 0.05 ^c
<i>Fatty acid β-oxidation and energy consumption</i>						
AOX	1.00 ± 0.06 ^c	1.64 ± 0.06 ^{ab}	1.73 ± 0.17 ^a	0.97 ± 0.04 ^c	1.22 ± 0.11 ^{bc}	1.58 ± 0.08 ^{ab}
UCP-2	1.00 ± 0.04	2.53 ± 0.29	2.29 ± 0.88	0.78 ± 0.08	1.87 ± 0.77	1.09 ± 0.11
CPT1	1.00 ± 0.12	0.93 ± 0.07	1.00 ± 0.13	0.84 ± 0.09	0.64 ± 0.06	0.85 ± 0.09
MCAD	1.00 ± 0.06	1.13 ± 0.07	1.21 ± 0.17	1.13 ± 0.07	1.04 ± 0.13	1.26 ± 0.14
<i>Cholesterol homeostasis</i>						
ABCA1	1.00 ± 0.03	0.87 ± 0.08	0.86 ± 0.08	1.09 ± 0.07	0.94 ± 0.17	0.86 ± 0.11
ABCG5	1.00 ± 0.23	0.75 ± 0.08	0.97 ± 0.12	1.65 ± 0.13	1.19 ± 0.30	1.49 ± 0.32
ABCG8	1.00 ± 0.09 ^{ab}	0.65 ± 0.07 ^b	0.83 ± 0.04 ^{ab}	1.22 ± 0.04 ^a	0.88 ± 0.16 ^{ab}	1.16 ± 0.14 ^a

Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the Con group. Data are represented as mean \pm SE, n = 5. Groups with different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

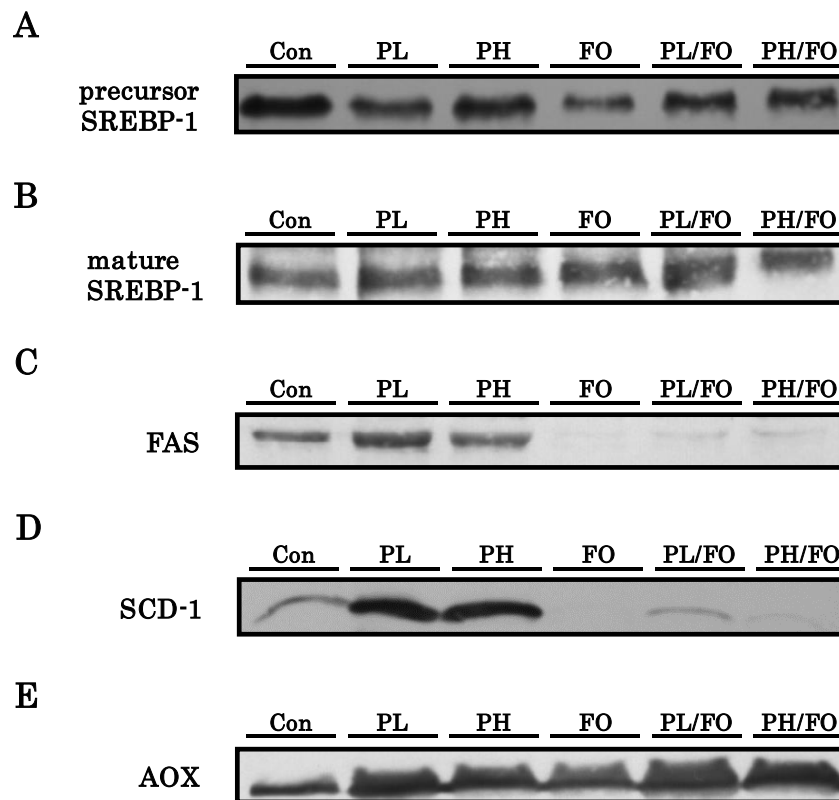


Figure 8. Liver protein expressions in 15-week-old male KK mice.

SREBP-1 expressions in membrane (precursor form) (A), SREBP-1 expressions in nuclear (mature form) (B), FAS expressions (C), SCD-1 expressions (D), and AOX expressions (E). The livers for each group (n = 5) were pooled. All protein expressions were detected by Western blot analysis.

第 6 節 脂肪細胞の形態学的解析

ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用による、脂肪細胞の肥大化に対する抑制効果を調べるため、副睪丸周囲白色脂肪組織切片を H&E 染色して脂肪細胞の形態学的解析をおこなった結果を Fig. 9 に示す。脂肪細胞の平均面積は、Con 群と比較して PL 群および FO 群では有意な差はみられなかったが、PH、PL/FO、PH/FO 群は有意に減少した。また、PH/FO 群は、PH 群と比較してさらに有意に減少した。白色脂肪細胞面積の分布をみると、Con 群は 6400-8100 μm^2 の割合が最も多く、8100-19600 μm^2 の比較的大型の脂肪細胞も確認された。PL 群も Con 群と同様の傾向を示した。PH 群は 4900-6400 μm^2 、FO 群は 3600-4900 μm^2 の割合が最も多かったが、8100-19600 μm^2 の脂肪細胞も確認された。一方、ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用群である PL/FO 群および PH/FO 群は、2500-3600 μm^2 の比較的小型の脂肪細胞の割合が最も多く、他の群と比較して 8100-14400 μm^2 のものの割合は少なかった。また、14400 μm^2 以上の肥大化した脂肪細胞はほとんど確認されなかった。

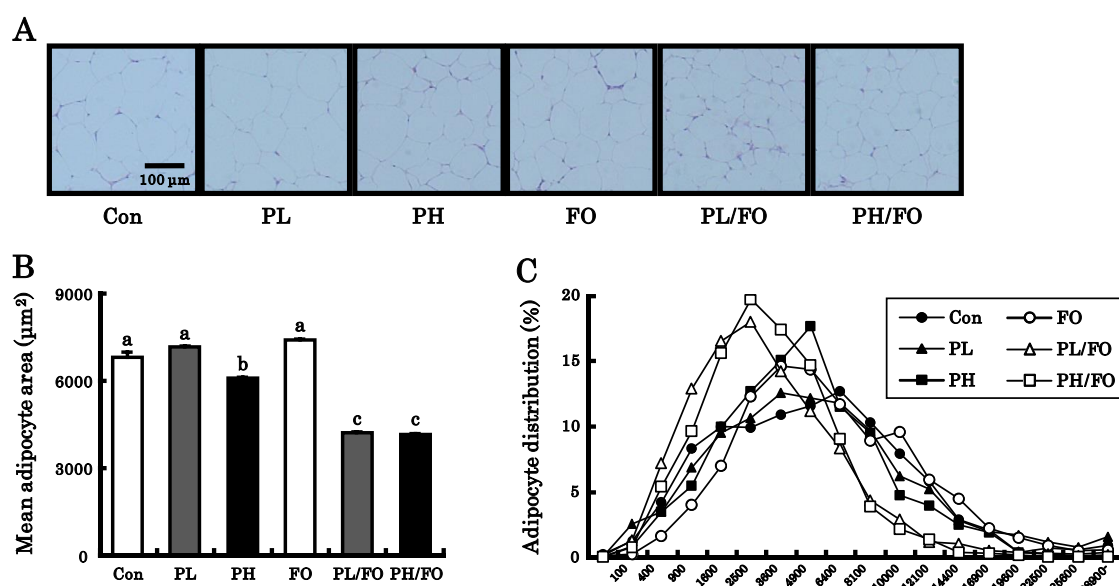


Figure 9. Morphological analysis of epididymal white adipose tissue in 15-week-old male KK mice. Epididymal white adipose tissue histological sections (A), mean adipocyte areas (B), and adipocyte distributions (C). Representative sections from mice fed Con, PL, PH, FO, PL/FO, and PH/FO diets for 8 weeks. Sections were stained by H&E and examined under a microscope at 100-fold magnification. Scale bar, 100 μm . Data are represented as mean \pm SE, n = 5. Groups with different letters are different at $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第7節 白色脂肪組織中遺伝子発現

副睪丸周囲白色脂肪組織中の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で測定し、結果を Table 6 に示す。インスリン抵抗性改善効果を有するアディポサイトカインである adiponectin の mRNA レベルは、すべての群間で有意な差はみられなかった。また、脂肪酸のトランスポーターである CD36/fatty acid transporter (FAT)、リポタンパク質中のトリアシルグリセロール分解に関わる lipoprotein lipase (LPL) の mRNA レベルも、すべての群間で有意な差はみられなかった。一方、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α の mRNA レベルは、Con 群と比較して PL、PH、PH/FO 群で有意に低下し、PL/FO 群は低下傾向 ($P=0.0685$) があつた。同じく炎症性サイトカインである interleukin (IL)-6 の mRNA レベルは、Con 群と比較して、PL、FO、PL/FO、PH/FO 群で有意な低下、PH 群で低下傾向 ($P=0.0898$) を示した。単球走化性タンパク質である monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 の mRNA レベルは、Con 群と比較して、すべての群で有意に低下した。

Table 6. Epididymal white adipose tissue mRNA levels in 15-week-old male KK mice.

	Con	PL	PH	FO	PL/FO	PH/FO
Glucose and lipid metabolism						
Adiponectin	1.00 \pm 0.19	1.13 \pm 0.38	1.68 \pm 0.15	1.17 \pm 0.31	1.39 \pm 0.28	1.68 \pm 0.31
CD36/FAT	1.00 \pm 0.14	0.57 \pm 0.11	0.74 \pm 0.12	0.70 \pm 0.10	0.68 \pm 0.10	0.75 \pm 0.10
LPL	1.00 \pm 0.18	0.62 \pm 0.15	0.92 \pm 0.19	0.65 \pm 0.18	0.63 \pm 0.10	0.77 \pm 0.09
Inflammation						
TNF- α	1.00 \pm 0.17 ^a	0.37 \pm 0.08 ^b	0.29 \pm 0.03 ^b	0.78 \pm 0.21 ^{ab}	0.49 \pm 0.07 ^{ab}	0.38 \pm 0.06 ^b
IL-6	1.00 \pm 0.33 ^a	0.13 \pm 0.02 ^b	0.38 \pm 0.18 ^{ab}	0.30 \pm 0.11 ^b	0.15 \pm 0.03 ^b	0.12 \pm 0.03 ^b
MCP-1	1.00 \pm 0.16 ^a	0.08 \pm 0.02 ^b	0.08 \pm 0.01 ^b	0.20 \pm 0.08 ^b	0.09 \pm 0.01 ^b	0.08 \pm 0.02 ^b

Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the Con group. Data are represented as mean \pm SE, n = 4-5. Groups with different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第 8 節 n-3 系 PUFA (EPA・DHA)の併用によるピオグリタゾンの副作用低減および脂肪細胞の肥大化と炎症に及ぼす影響の検討に関する考察

チアゾリジン薬の副作用として体重増加が起こることは、臨床研究と動物試験の両方で明らかになっており、その要因の 1 つとして皮下脂肪量の増加が報告されている^{20, 21, 51)}。本研究においても、チアゾリジン薬であるピオグリタゾンの単独投与による、皮下脂肪量と体重の増加が確認されたが、これらの増加は EPA・DHA を併用することで抑制された。チアゾリジン薬は脂肪肝に対する改善作用が認められており、これは、脂肪組織の PPAR γ を活性化し、脂肪細胞の分化と脂肪の貯蔵能を亢進させ、肝臓に蓄積した脂肪を皮下脂肪組織に分配するためであると考えられている⁵²⁾。しかし、本研究ではピオグリタゾンを単独投与したマウスの肝臓に多くの脂肪滴の蓄積痕がみられ、肝臓のトリアシルグリセロール値も、Con 群と比較して PL 群と PH 群それぞれで、約 2.2 倍、約 1.6 倍高値であった。また、肝臓中の脂肪酸合成関連酵素の発現を調べたところ、ピオグリタゾンの投与により、SCD-1 のタンパク質および遺伝子発現が増加していることを確認した。これらのことから、ピオグリタゾンはヒトに対する脂肪肝改善効果が報告されているが^{12, 13)}、本研究で用いた KK 雄性マウスの肝臓では SCD-1 発現を増加させ、脂肪肝を悪化させたことが示された。SCD-1 は、ACC および FAS により合成されたパルミチン酸(C16:0)、または、脂肪酸伸長酵素 Elovl6 により産生されたステアリン酸(C18:0)を、それぞれパルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)に変換する不飽和化酵素であり、これらの一価不飽和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)はトリアシルグリセロール合成の主な基質となる⁵³⁾。そして、肝臓で合成されたトリアシルグリセロールは、VLDL に取り込まれて脂肪組織へ輸送される²⁹⁾。このことから、ピオグリタゾンの投与により皮下脂肪蓄積が増加したメカニズムの 1 つとして、肝臓の脂肪合成の亢進が関与している可能性が考えられた。PPAR γ は脂肪組織に高発現していることから、PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンの主な作用部位は脂肪組織であると考えられている。しかし、ob/ob マウス、KK-Ay マウスなどの肥満・2 型糖尿病モデルマウスは、肝臓における PPAR γ の発現が増加しており、PPAR γ アゴニストを投与すると脂肪肝が悪化することが報告されている^{51, 54)}。本研究で用いた KK マウスも肥満・2 型糖尿病のモデルマウスであり、ピオグリタゾンが肝臓の PPAR γ に強く作用し、肝臓の脂肪合成が促進された結果、脂肪肝を発症したと考えられた。これらの所見は、服用したピオグリタゾンが肝臓の PPAR γ に作用することで脂肪肝改善作用を減弱させる可能性を示しており、EPA・DHA の併用により肝臓の脂肪合成が抑制されることは、脂肪肝を予防する上でも望ましいと考えられた。

EPA・DHA の併用は、0.006 および 0.012 wt%の両用量のピオグリタゾン投与による肝臓トリアシルグリセロール含量の増加を有意に抑制し、肝臓への脂肪蓄積を防いだ。さらに、EPA・DHA は、肝臓の ACC 遺伝子の発現を低下させ、FAS と SCD-1 はタンパク質および遺伝子の発現を低下させることで、肝臓の脂肪酸合成を強く抑制した。上述したように、肝

臓の脂肪酸合成の亢進は、脂肪組織へのトリアシルグリセロールの蓄積も促進し、体脂肪の増加を引き起こす。したがって、EPA・DHAの併用がピオグリタゾンによる皮下脂肪の蓄積と体重増加を抑制したメカニズムとして、EPA・DHAが肝臓の脂肪酸合成を抑制し、肝臓への脂肪蓄積を低減するとともに、脂肪組織へのトリアシルグリセロール輸送を低下させたことが考えられた。また、EPA・DHAは、ピオグリタゾンによる肝臓の脂肪酸合成の亢進を抑制し、より直接的に脂肪肝を改善する可能性が示された。一方、EPAとDHAは肝臓のPPAR α を活性化し、その標的遺伝子であるAOX、UCP-2、CPT-1などの遺伝子発現を増加させ、脂肪酸 β 酸化とエネルギー消費を亢進することが知られている^{25, 26, 55}。しかし、本研究ではこれらの遺伝子の発現増加は認められなかった。また、ピオグリタゾンの投与により肝臓におけるAOXの遺伝子およびタンパク質発現とUCP-2の遺伝子発現が増加したものの、EPA・DHAの併用による影響は認められなかった。したがって、肥満・2型糖尿病モデル動物のKKマウスに対してEPA・DHA併用がもたらす肝臓脂肪蓄積の抑制作用に、肝臓の脂肪酸 β 酸化は関与していないことが示唆された。

ピオグリタゾンは、インスリン抵抗性の改善を機序とした経口糖尿病薬であり、本研究でもピオグリタゾンを投与したすべての群で、血漿インスリン値とインスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRが低下した。しかしながら、糖負荷時の血糖値変動には影響が認められず、インスリン負荷による血糖値の低下も、ピオグリタゾンまたはEPA・DHAの単独投与群では認められなかった。これは、本研究で設定した0.006および0.012 wt%のピオグリタゾンは、インスリン抵抗性を改善するのに十分な用量であったが、血漿インスリン値は依然として高く（参考値：一般固形飼料で飼育した15週齢雄性C57BL/6マウス0.69 \pm 0.12 ng/ml）、糖負荷時およびインスリン負荷時に血糖値を低下させるには至らなかったためであると考えられた。また、ヒトを対象とした研究で、肝臓の脂肪蓄積がインスリン抵抗性を悪化させる要因の1つであることが明らかになっていることから⁵⁶、本研究でもピオグリタゾンによる肝臓脂肪蓄積がインスリン負荷時の血糖低下に影響した可能性がある。一方で、ピオグリタゾンにEPA・DHAを併用した群は、他の群と比べてインスリン負荷時の血糖値の低下が早く、本研究で用いた10 en%のDHA濃縮魚油(n-3系PUFA 1.31~1.55 mg/kg/day)は、インスリン感受性に影響を及ぼす用量ではなかったが、肝臓脂肪蓄積を抑制することでピオグリタゾンによるインスリン抵抗性改善作用を増強したことが示唆された。

脂肪酸合成系とコレステロール合成系遺伝子の転写因子であるSREBP-1cは、コレステロールの過剰状態では小胞体膜上でSREBP cleavage-activating protein (SCAP)、insulin induced gene (Insig)と三量体を形成し、前駆型として活性が制御されている。一方、細胞内コレステロールの低下やインスリン作用により、Insigが解離して前駆型SREBP-1cとSCAPの二量体がゴルジ体へ移行すると、site 1 proteaseとsite 2 proteaseの働きにより2段階のプロセッシングを受ける。これらの過程により活性型となったSREBP-1cが核内へ移行し、標的遺伝子のプロモーター領域にあるsterol regulatory element (SRE)に結合することで、応答遺伝子の転写を促進する⁵⁷。これまでの研究により、EPA・DHAまたは

EPA・DHA を多く含む魚油が、肝臓の SREBP-1c 発現を遺伝子または活性型タンパク質レベルで減少させるとともに、標的遺伝子である FAS、SCD-1、ACC など脂肪酸合成系の遺伝子発現を低下させ、脂肪酸合成を抑制することが明らかにされている^{25, 58)}。しかし、本研究では、EPA・DHA の投与群で FAS、SCD-1、ACC の遺伝子発現が明らかに低下していたにもかかわらず、活性型 SREBP-1 および SREBP-1c の遺伝子発現は低下していなかった。FAS、SCD-1 などの脂肪酸合成関連遺伝子の発現は、PPAR γ や SREBP-1c の他に、核内受容体の LXR α によっても制御を受けていることが報告されている⁵⁹⁾。LXR α のリガンドとして、コレステロールの酸化物であるオキシステロールが同定されており⁶⁰⁾、EPA・DHA の投与群である FO、PL/FO、PH/FO 群は肝臓総コレステロール含量が有意に低値であったことから、オキシステロールの減少により脂肪酸合成関連遺伝子の転写が低下したことが推察された。しかし、同じく LXR α の標的遺伝子であり、コレステロール代謝に関与する ATP-binding cassette transporter (ABC) の ABCA1、ABCG5 および ABCG8 の mRNA レベルは、肝臓総コレステロール含量と相関していなかった。DHA は一部の転写因子に対して、標的遺伝子のプロモーター領域への結合を阻害すること、さらに転写後の過程に抑制的に作用して遺伝子発現を制御することが報告されている⁶¹⁾。本研究の、ピオグリタゾンに EPA・DHA を併用することで肝臓の脂肪酸合成酵素の転写および翻訳の過程が抑制されたメカニズムは、これまで報告されていた活性型 SREBP-1c の低下や LXR α を介したのではないことが考えられ、詳細なメカニズムに関しては今後の検討が必要である。

なお、EPA および DHA は、腸内分泌細胞の 1 つである L 細胞に作用し、消化管ホルモンである glucagon-like peptide (GLP)-1 の分泌を増加させることが報告されている^{62, 63)}。GLP-1 は、血糖依存的に膵 β 細胞からのインスリン分泌を促進し、食後の血糖恒常性に働くと考えられているが、膵 α 細胞からのグルカゴン分泌抑制作用、中枢神経系を介した摂食抑制作用、食物の滞胃時間遅延作用などの他の機能も明らかになっている⁶⁴⁾。本研究においても、EPA・DHA の摂取が KK マウスの GLP-1 分泌を増加させ、摂食抑制による摂取エネルギー量の低下をもたらし、ピオグリタゾンによる肝臓脂肪および皮下脂肪の増加を抑制する可能性を検討した。しかし、EPA・DHA の摂取群と非摂取群の摂食量に有意な差はなく、摂食抑制および摂取エネルギーの減少は生じていなかったことから、GLP-1 分泌の影響はないと考えられる。

肥満に伴って肥大化した脂肪細胞では単球走化性因子 MCP-1 の産生が増加し、炎症性マクロファージの浸潤が誘導されると、慢性的な炎症状態が引き起こされる。炎症が生じた脂肪細胞からは、TNF- α 、IL-6 などの炎症性アディポサイトカインおよび FFA の分泌が増加する。同時に、アディポネクチンなどの抗炎症性アディポサイトカインの分泌は減少する⁶⁵⁻⁶⁷⁾。さらに、FFA はマクロファージの toll-like receptor (TLR) 4 のリガンドとなり、TNF- α の分泌を誘導する⁶⁸⁾。このような炎症状態の変化は、各組織のインスリンシグナル伝達を阻害してインスリン抵抗性を惹起するため、糖尿病の治療を考える上で、脂肪細胞の肥大化や炎症を軽減させることは重要となる。チアゾリジン薬は、大型脂肪細胞の減少と小型脂肪

細胞の増加によりアディポネクチンの産生を高め、炎症性アディポサイトカインの産生を低下させる²²⁾。また、脂肪組織の炎症性マクロファージの割合を減少させ、炎症性アディポサイトカインの発現低下を介した抗炎症作用も報告されている⁶⁹⁾。一方、EPA・DHAは後者の機序にくわえて、マクロファージのTLR4の活性化を抑制することによる抗炎症作用がある^{70, 71)}。本研究では、0.006 wt%のピオグリタゾンまたはEPA・DHAの単独投与は、脂肪細胞のサイズに大きな影響を及ぼさないが、これらを併用することで小型脂肪細胞が増加し、0.012 wt%のピオグリタゾンとEPA・DHAを併用した場合は、小型脂肪細胞がさらに増加した。また、ピオグリタゾンとEPA・DHAは、ともに脂肪細胞の炎症性アディポサイトカインの遺伝子発現を低下させ、抗炎症作用を示唆した。これらのことから、ピオグリタゾンとEPA・DHAの併用は、脂肪細胞の肥大化を効果的に抑制するとともに、抗炎症作用により炎症状態を低減できることが明らかになった。

第9節 DHA濃縮魚油の使用に関する考察

本研究においては、EPA・DHAの供給源としてDHA濃縮魚油を選択し、サフラワー油のみを油脂源としたCon食、サフラワー油とDHA濃縮魚油を調合したFO食をベースに、ピオグリタゾンを追加することで各実験飼料を調製した。脂質異常症の治療薬として使用されているn-3系脂肪酸製剤はエチルエステル型のEPA・DHAであることから、同製剤に替えて魚油を使用して基礎研究をおこなう場合、それらの化学構造と脂肪酸組成の違いが及ぼす影響を考慮しなければならない。

まず、化学構造の違いについて、魚油に含まれるEPA・DHAは、グリセロールとエステル結合したトリアシルグリセロールの構造をとっている。魚油を摂取すると、小腸で膵リパーゼにより2分子の遊離脂肪酸と1分子のモノアシルグリセロールに加水分解され、胆汁酸とミセルを形成して小腸上皮細胞へ吸収される⁷²⁾。一方、エチルエステル型のEPA・DHAも、膵リパーゼにより加水分解を受けた後、魚油由来のEPA・DHAと同様の過程により小腸上皮細胞へ吸収されると考えられている⁷³⁾。EPA・DHAの血漿および肝臓中トリアシルグリセロール低下作用は、エチルエステル型⁷⁴⁻⁷⁶⁾、トリアシルグリセロール型⁷⁷⁻⁷⁹⁾の両者において明らかにされている。また、エチルエステル型のEPA・DHA^{74,80)}と魚油^{77,78)}の摂取は、それぞれ肝臓の脂肪酸合成の抑制と脂肪酸 β 酸化の亢進を誘導することが報告されており、脂質代謝改善作用およびそのメカニズムの同等性が証明されている。したがって、本研究をおこなう上で化学構造の違いがEPA・DHAの機能性に影響を与えることはほとんどないと考えられる。

次に、脂肪酸組成の違いについて、魚油には飽和脂肪酸が多く含まれることが挙げられる。代表的な飽和脂肪酸であるパルミチン酸は、膵 β 細胞のインスリン分泌を抑制するだけでなく、膵臓および骨格筋のTLR4を活性化することで慢性的な炎症を誘発し、インスリン抵抗性を惹起することが報告されている^{38,81,82)}。このことから、EPA・DHAの供給源としてDHA濃縮魚油を用いる上で、魚油由来のパルミチン酸によって耐糖能の悪化が誘導される可能性が懸念された。この問題に対し、魚油に含まれるEPA・DHAはパルミチン酸の影響を上回ってインスリン抵抗性改善効果を発揮することがすでに示されている^{83,84)}。実際に、Table 25に示した脂肪酸組成から、DHA濃縮魚油にも比較的多くのパルミチン酸が含まれていることが確認されたが、本研究においても魚油によるインスリン抵抗性の悪化は確認されず、ピオグリタゾンのインスリン抵抗性改善効果が打ち消されることもなかった。したがって、インスリン抵抗性に対するピオグリタゾンとEPA・DHAの併用効果に、実験飼料のパルミチン酸含有量の差が影響した可能性は低いと判断した。

EPA・DHAのエチルエステルを用いて研究をおこなう場合、比較対照となる実験飼料と同じ油脂源を選択すれば、添加するEPA・DHA以外の脂肪酸による影響を取り除くことができる。しかし、EPA・DHAの供給源として魚油を用いることで、油脂源が比較対照の飼料と異なった場合、実験飼料の脂肪酸組成に差異が生じてEPA・DHAの機能性が正しく評

価できない可能性がある。n-9系 MUFA のオレイン酸、n-6系 PUFA のリノール酸を多く含む油脂の摂取は、ともにインスリン抵抗性および肝臓の脂肪蓄積低下作用に抑制的に作用することが報告されている⁸⁵⁻⁸⁷⁾。本研究を例にすると、オレイン酸およびリノール酸が Con 食より FO 食に多く含まれている場合、ピオグリタゾンによる肝臓脂肪蓄積、皮下脂肪および体重増加に対する FO 食の抑制効果はオレイン酸とリノール酸が関与している可能性あり、EPA・DHA によるものであるとはいえないことになる。この問題に対しては、魚油添加飼料に含まれるオレイン酸およびリノール酸が、比較対象の飼料より少なくなるように調整している de Castro らの研究⁸³⁾を参考にした。すなわち、本研究では FO 食のオレイン酸とリノール酸の含有量が Con 食より少なくなるように飼料を調整し、これらの脂肪酸が EPA・DHA の脂質代謝改善作用に影響しないように配慮した。具体的な Con 食と FO 食の脂肪酸組成は、実験の部に記載したサフラワー油と DHA 濃縮魚油の脂肪酸組成から算出し、Table 26 に示している。

また、リノール酸から合成されたアラキドン酸は炎症誘発性のエイコサノイドの前駆体であり、リノール酸の摂取は体内の炎症状態を悪化させることが報告されている⁸⁸⁾。そのため、FO 食に含まれるリノール酸含有量が Con 食より少ない場合、DHA 濃縮魚油を投与したマウスに認められた抗炎症作用は、Con 食と比べてリノール酸の摂取量が少なかったことに起因している可能性が考えられた。ただし、C57BL/6 マウスを用いた研究により、リノール酸が脂肪酸組成の 70%以上を占める高リノール酸食を 4 週間摂取させた場合も、肝臓および脂肪組織の炎症は誘導されないことが明らかになっており⁸⁹⁾、魚油を用いることで生じる実験飼料のリノール酸含有量の差異は、EPA・DHA による抗炎症作用に影響しないことが示唆された。実際に本研究では、ピオグリタゾンと DHA 濃縮魚油を併用投与したマウスにおいて、糖・脂質代謝改善効果、脂肪組織の抗炎症効果が確認され、これらは EPA・DHA が起因していると考察できる。

第 10 節 小括

第 1 章では、7 週齢の雄性 KK マウスにピオグリタゾンと EPA・DHA を 8 週間併用させ、ピオグリタゾンの副作用である体重増加が抑制されるか、そして、脂肪細胞の肥大化と炎症が低減されるか検討した。

その結果、ピオグリタゾンによりインスリン抵抗性が改善され、EPA・DHA を併用することで、肝臓における脂肪酸合成抑制を中心としたメカニズムにより、肝臓の脂肪蓄積が低下するとともに、皮下脂肪の蓄積が抑制された。これは、肝臓の脂肪酸合成が抑制されたことで、VLDL を介して脂肪組織へ輸送される脂肪酸が減少したためであると考えられる。これらの結果から、ピオグリタゾンによる薬物治療をおこなう際に、エネルギーコントロールが不十分であっても、EPA・DHA を併用することでピオグリタゾンによるインスリン抵抗性改善効果を維持し、さらに、副作用の 1 つである皮下脂肪蓄積を伴う体重増加を低減できることが示された。また、脂肪組織の解析結果から、ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用は、内臓脂肪組織に対して脂肪細胞の肥大化と炎症に抑制的に作用することが明らかになった(Fig. 10)。

以上の結果により、ピオグリタゾンによる薬物治療をおこなう上で、n-3 系脂肪酸製剤の併用により、厳格に食事療法と運動療法が徹底できない患者に対してもインスリン抵抗性改善効果が高めることができることが示唆され、今回得られた知見は、糖尿病の新たな薬物治療または処方設計のためのエビデンスとして有用であると考えられる。

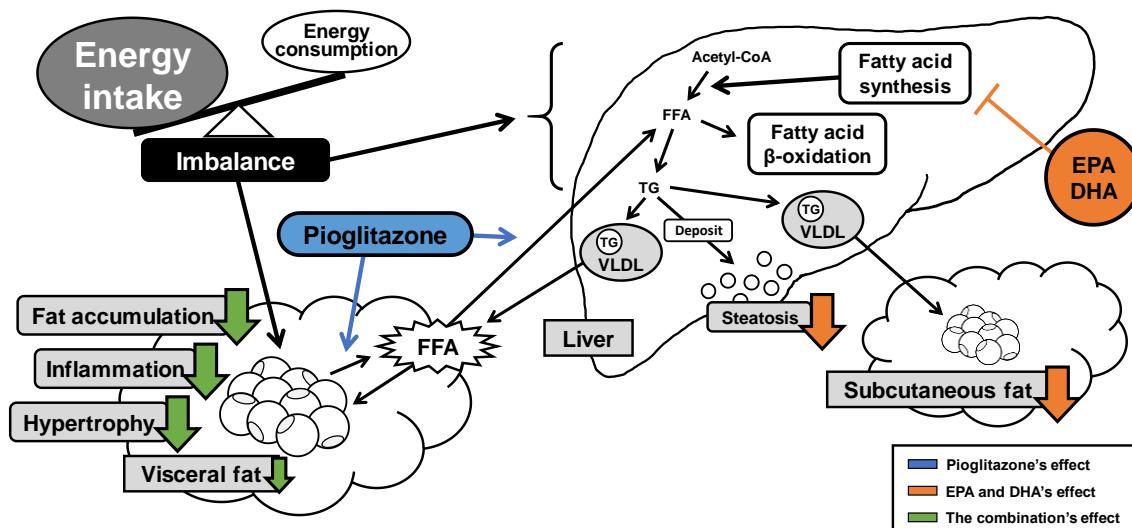


Figure 10. Proposed benefits by the combination of pioglitazone and n-3 PUFA (EPA-DHA) on liver and white adipose tissue.

第2章 ピオグリタゾンと n-3 系 PUFA (EPA・DHA)が膵臓の機能維持に及ぼす影響の検討

第1章では、ピオグリタゾンと n-3 系 PUFA (EPA・DHA)を併用することで、EPA・DHA の肝臓の脂肪酸合成抑制作用により肝臓および脂肪組織への脂肪蓄積が減少し、ピオグリタゾンによる皮下脂肪蓄積と体重増加が抑制できることが示された。くわえて、脂肪組織の解析結果から、EPA・DHA の併用は脂肪細胞の肥大化を効果的に抑制し、炎症状態を低減できることが明らかとなった。一方、糖代謝異常により高血糖・高インスリン状態が続くと、膵β細胞内では酸化ストレスおよび小胞体ストレスが増加し、インスリン生合成の低下、膵β細胞のアポトーシスが引き起こされる⁴⁰⁾。このような膵臓の機能不全と膵β細胞の減少は、糖尿病の発症と悪化を導くことから、膵β細胞の数とその機能を維持させることは糖尿病の治療をおこなう上で重要である(Fig. 11)。

そこで第2章では、ピオグリタゾンと EPA・DHA が膵臓に及ぼす影響を検討することで、第1章で明らかになったピオグリタゾンと EPA・DHA の併用による糖尿病治療効果のメカニズムを、膵臓の機能維持の観点から明らかにすることとした。第2章は、実験飼料および実験群の変更を除き、第1章とすべて同条件の実験系とした。実験飼料は、実験1と同様のコントロール食である Con 食、Con 食に 0.012 wt%のピオグリタゾンを添加した P (pioglitazone)食、これらの食餌の 10 en%を DHA 濃縮魚油で置き換えた FO (fish oil)食、P/FO (pioglitazone/fish oil)食を調製した(Table 7)。これらの飼料をマウスに与え、Con 群、P 群、FO 群、P/FO 群の計4群を設け、Fig. 12 に示す実験計画に沿って8週間の飼育をおこなった。

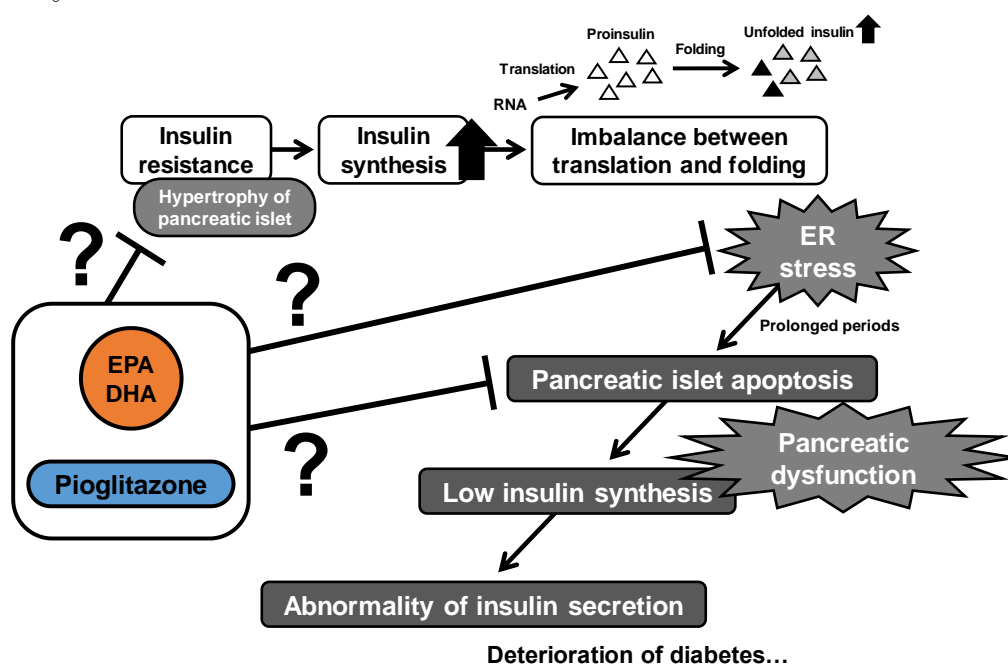


Figure 11. The hypothetical effects by pioglitazone, n-3 PUFA (EPA-DHA), and their combination for prevention on pancreatic dysfunction.

Table 7. Composition of experimental diets.

	Con	P	FO	P/FO
Safflower oil (g)	8	8	4	4
Fish oil (g)	–	–	4	4
Casein (g)	20	20	20	20
Sucrose (g)	10.37	10.37	10.37	10.37
β-starch (g)	51.83	51.83	51.83	51.83
Vitamin mix (g)*	1	1	1	1
Mineral mix (g)*	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellulose powder (g)	5	5	5	5
L-cystin (g)	0.3	0.3	0.3	0.3
t-Butylhydroquinone (g)	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016
Pioglitazone (g)	–	0.012	–	0.012
Total (g)	100.00	100.01	100.00	100.01
Energy (kcal/100g)	374.02	373.99	374.02	373.99
Fat energy (%)	19.70	19.70	19.70	19.70

*Vitamin and mineral mix were based on the AIN-93G formulation. Vitamin mix substituted 0.25% sucrose for choline bitartrate.

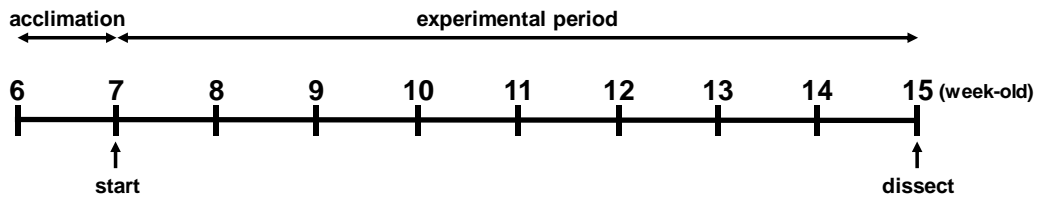


Figure 12. Time schedule of animal treatment in chapter 2.

第1節 摂食量、ピオグリタゾンと n-3 系 PUFA の平均1日投与量、体重および体組成

総摂食量、最終体重、体重変化、組織重量および腹部脂肪面積を Table 8 に、摂食量と体重から算出したピオグリタゾンと n-3 系 PUFA の平均投与量(1日あたり)を Table 9 に示す。摂食量は、Con 群と比較してすべての群間で有意な変化はみられなかった。最終体重および体重増加量は、Con 群と比較してピオグリタゾンを単独投与した P 群で有意に高値であったが、EPA・DHA の投与群である FO、P/FO 群では、有意な高値にはならなかった。また、併用群である P/FO 群のこれらのパラメータは、それぞれ P 群と比較して低下傾向 ($P=0.0896$) および有意な低下を示した。副睾丸周囲白色脂肪組織重量は、Con 群と比較してすべての群で有意に減少した。X線 CT スキャンによる腹部脂肪面積の測定をおこなったところ、内臓脂肪面積は、Con 群と比較して P 群で低下傾向 ($P=0.0508$)、FO、P/FO 群は有意な低下を示した。皮下脂肪面積は、Con 群と比較して P 群でのみ有意に増加したが、P/FO 群はこの増加が有意に抑制された。

Table 8. Total food intake, body weight, tissue weight, and abdominal fat masses in 15-week-old male KK mice.

	Con	P	FO	P/FO
Total food intake (g/mouse)	281 ± 10 ^{ab}	290 ± 7 ^{ab}	299 ± 10 ^a	266 ± 5 ^b
Initial body weight (g)	26.1 ± 0.7	26.1 ± 0.6	26.1 ± 0.6	26.1 ± 0.6
Final body weight (g)	38.0 ± 0.4 ^b	42.2 ± 1.4 ^a	36.6 ± 0.7 ^b	38.8 ± 1.0 ^{ab}
Body weight gain (g)	+11.9 ± 0.6 ^b	+16.1 ± 0.8 ^a	+10.5 ± 0.8 ^b	+12.7 ± 0.5 ^b
Epididymal WAT weight (g)	1.34 ± 0.04 ^a	0.97 ± 0.05 ^b	0.91 ± 0.04 ^b	0.83 ± 0.05 ^b
Visceral fat mass (cm ³)	1.59 ± 0.13 ^a	1.17 ± 0.13 ^{ab}	1.07 ± 0.07 ^b	1.04 ± 0.07 ^b
Subcutaneous fat mass (cm ³)	0.44 ± 0.02 ^c	0.82 ± 0.04 ^a	0.40 ± 0.03 ^c	0.57 ± 0.03 ^b

Data are represented as mean ± SE, n = 4-5. Groups sharing different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

Table 9. The average dose of pioglitazone and n-3 PUFA in 15-week-old male KK mice.

	Con	P	FO	P/FO
Pioglitazone (mg/kg/day)		14.14 ± 0.11		14.01 ± 0.16
n-3 PUFA (g/kg/day)			1.69 ± 0.05	1.46 ± 0.02

Data are represented as mean ± SE, n = 4-5.

第2節 血糖値、HOMA-IR および血漿中パラメータ

血糖値、HOMA-IR および血漿中パラメータを Table 10 に示す。血糖値は、Con 群と比較して P 群のみ有意に増加した。インスリン値および HOMA-IR は、Con 群と比較して FO 群は有意な変化はみられなかったが、P 群で有意な低下、P/FO 群で低下傾向($P = 0.0565$, 0.0569)を示した。アディポネクチン値は、Con 群と比較して P 群および P/FO 群で有意に増加し、P/FO 群は P 群と比較して、さらに有意に増加した。

Table 10. Blood glucose, HOMA-IR, and plasma parameters in 15-week-old male KK mice.

	Con	P	FO	P/FO
Blood glucose (mg/dl)	161 ± 20 ^b	243 ± 32 ^a	144 ± 3 ^b	144 ± 5 ^b
Plasma insulin (ng/ml)	15.0 ± 4.4 ^a	2.7 ± 0.8 ^b	9.0 ± 1.8 ^{ab}	5.1 ± 0.6 ^{ab}
HOMA-IR	1.00 ± 0.30 ^a	0.26 ± 0.09 ^b	0.57 ± 0.11 ^{ab}	0.32 ± 0.04 ^{ab}
Plasma adiponectin (µg/ml)	9.1 ± 1.3 ^c	37.2 ± 4.1 ^b	11.9 ± 0.7 ^c	68.0 ± 8.5 ^a

Data are represented as mean ± SE, n = 4-5. HOMA-IR are shown as the ratio to the Con group (147.1 ± 44.3). Groups sharing different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第3節 膵臓の組織学的および形態学的解析

H&E 染色を施した膵臓ランゲルハンス島の組織解析と平均面積、ランゲルハンス島の面積を 10000 µm² 毎に区分し、各範囲に含まれる割合の分布を Fig. 13 に示す。ランゲルハンス島の平均面積は、Con 群と比較して、有意な変化ではないが P 群、FO 群、P/FO 群で、それぞれ 68%、79%、51% ($P = 0.0948$)まで減少した。また、Con 群と比較して、ピオグリタゾンの投与群である P 群、P/FO 群は、50000 µm² 以上のランゲルハンス島の割合が少なく、FO 群は、50000 µm² 以上の割合は Con 群と同程度だったものの、10000 µm² 未満のランゲルハンス島が増加していた。併用群である P/FO 群のランゲルハンス島面積は、50000 µm² 以上の割合が最も低く、10000 µm² 未満の割合が最も高かった。

次に、グルカゴンとインスリンの免疫染色をおこない、各染色面積を膵 α 細胞あるいは β 細胞の面積がランゲルハンス島の面積に占める割合(%)の平均を算出した(Fig. 13E, F)。膵 α 細胞の面積は、Con 群と比較して P 群および FO 群で有意な増加がみられた。膵 β 細胞の面積は、Con 群と比較してすべての群で増加したが、これらの群間で有意な差はなかった。

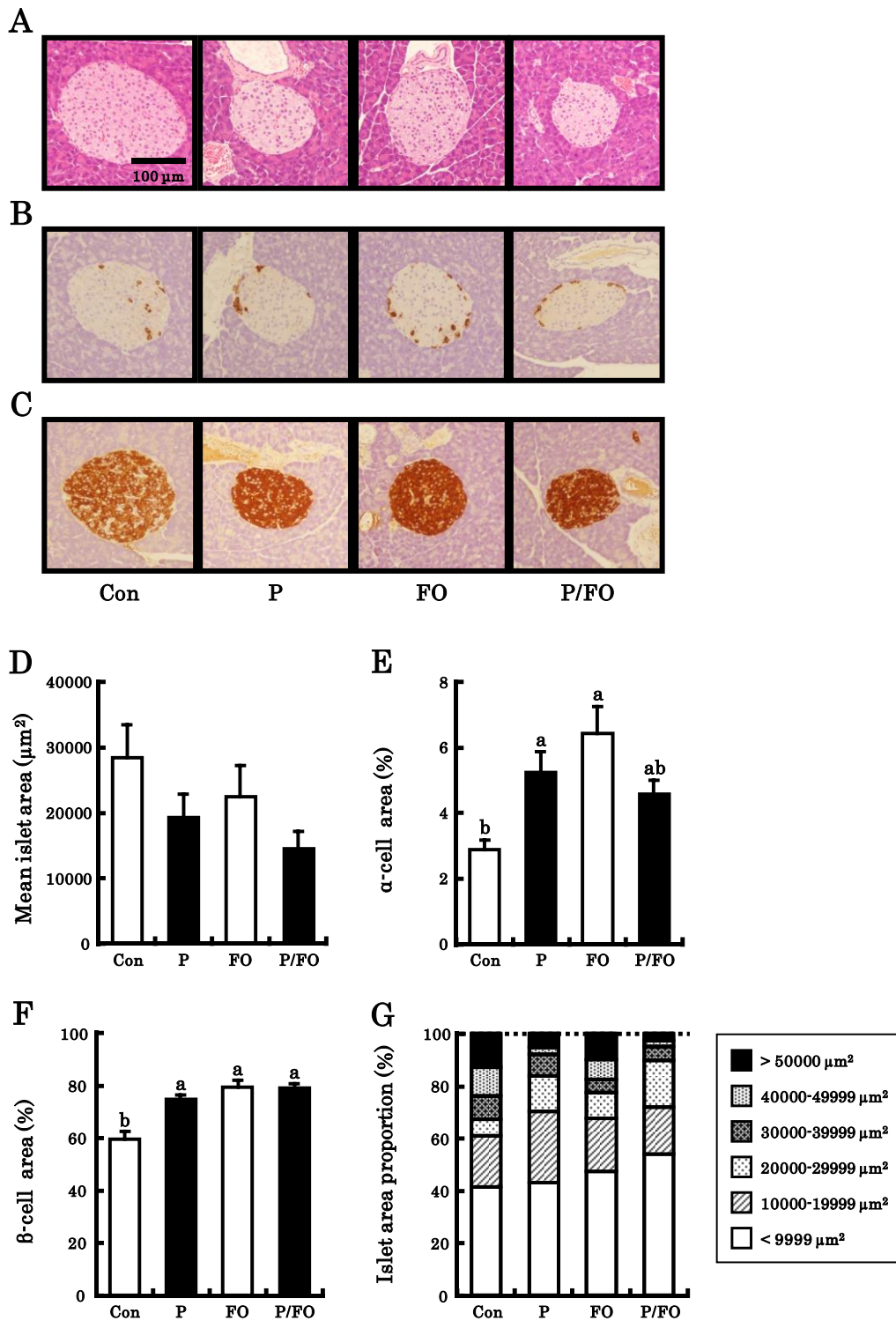


Figure 13. Morphological analysis of pancreatic islets in 15-week-old male KK mice. Islet images of H&E staining (A), glucagon immunostaining (B), insulin immunostaining (C), mean islet areas (D), percentages of α -cell area (E), percentages of β -cell area (F), and islet area proportions (G) in mice fed Con, P, FO, and P/FO diets for 8 weeks. Magnification, $\times 200$. Scale bar, $100\mu\text{m}$. Data except for (G) are represented as mean \pm SE, $n = 4-5$. Groups with different letters are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第4節 膵臓ランゲルハンス島の小胞体ストレスおよびアポトーシスの評価

C/EBP homologous protein (CHOP)の免疫染色と、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)染色を施した膵臓の組織標本を用いて、ランゲルハンス島の小胞体ストレスとアポトーシスの評価をおこない、その結果を Fig. 14 に示す。ランゲルハンス島あたりの CHOP 陽性細胞の占める割合(%)は、Con 群と比較してすべての群で有意に低下したが、これらの群間では有意な差はなかった。TUNEL 陽性細胞の割合は、Con 群と比較して、有意な差ではないが P 群で減少した。EPA・DHA を投与した FO 群および P/FO 群では、TUNEL 陽性細胞が検出されなかった。

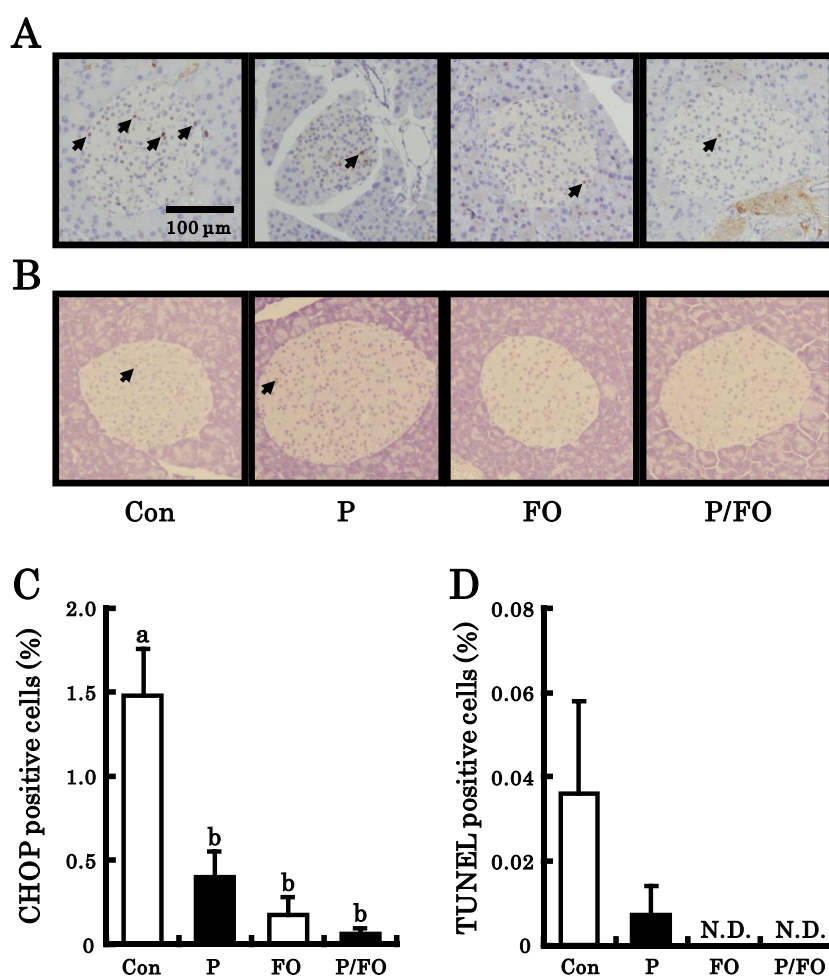


Figure 14. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis assay of pancreatic islets in 15-week-old male KK mice. Islet images of CHOP immunostaining (A), TUNEL staining (B), mean CHOP positive ratio (C), and mean TUNEL positive ratio (D) in mice fed Con, P, FO, and P/FO diets for 8 weeks. Arrows indicate positive nuclei with CHOP or TUNEL staining. Magnification, $\times 200$. Scale bar, 100 μm. Data are represented as mean \pm SE, $n = 4-5$. Undetected apoptotic cell in all islet are expressed as not-detected (N.D.). Groups with different letters are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第 5 節 膵臓中遺伝子発現

炎症に関与する膵臓中の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で測定し、結果を Table 11 に示す。炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β および MCP1 の mRNA レベルは、各群間で有意な変化はみられず、Toll 様受容体の 1 つである TLR4 の mRNA レベルも同様の結果であった。

Table 11. Pancreatic mRNA levels in 15-week-old male KK mice.

	Con	P	FO	P/FO
<i>Inflammation</i>				
TNF- α	1.00 \pm 0.19	1.63 \pm 0.32	1.44 \pm 0.20	1.28 \pm 0.13
IL-1 β	1.00 \pm 0.03	1.07 \pm 0.03	1.11 \pm 0.02	1.08 \pm 0.05
MCP1	1.00 \pm 0.37	0.79 \pm 0.17	0.76 \pm 0.24	0.82 \pm 0.11
TLR4	1.00 \pm 0.22	1.25 \pm 0.13	1.14 \pm 0.15	1.26 \pm 0.15

Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the Con group. Data are represented as mean \pm SE, n = 4-5. Significant differences among groups were analyzed by Tukey-Kramer test.

第6節 ピオグリタゾンと n-3 系 PUFA (EPA・DHA) が膵臓の機能維持に及ぼす影響の検討に関する考察

内臓脂肪型肥満などでみられる耐糖能異常は、放置すると糖尿病へと進展する。インスリン抵抗性の初期段階では、体内のインスリン需要の高まりに対し、ランゲルハンス島で代償的に膵β細胞の容積が増加し、インスリン分泌を亢進させて血糖値を維持する⁹⁰⁾。しかし、この状態が慢性的に持続すると、膵β細胞が徐々に疲弊することでインスリン分泌能が低下し、糖尿病の悪化が導かれる⁹¹⁾。このように、膵臓の機能障害に焦点を当てると、インスリン分泌促進薬を用いる治療よりも、膵β細胞の量と機能を維持することを重視した治療の方がより理想的であると考えられる。実際にチアゾリジン薬は、インスリン抵抗性の改善という作用機序から膵β細胞の保護作用が期待されており⁹²⁾、本章でもピオグリタゾンの投与によるインスリン抵抗性の改善と、ランゲルハンス島の肥大化および膵β細胞面積のランゲルハンス島に占める割合の低下に対する抑制効果が確認された。一方で、10 en% DHA 濃縮魚油として投与した EPA・DHA のみではインスリン抵抗性を改善することはできず、ランゲルハンス島の肥大化抑制効果も弱かったが、膵β細胞の割合はピオグリタゾンと同等に維持されていた。したがって、EPA・DHA はピオグリタゾンとは異なるメカニズムで膵β細胞の保護作用に働くことが示された。ピオグリタゾンの投与群では、血漿インスリン値および HOMA-IR が低下し、インスリン抵抗性改善効果が確認された。一方、各群の血糖値と血漿インスリン値は、第1章で認められた値よりも 30~59%程低値であった。これは、第1章では解剖前の絶食時間が3時間であったことに対して、今回の検討では絶食を12時間に変更したためであり、解剖時の血糖値の低下が顕著に表れ、これに伴ってインスリン値も低下したと推察された。

これまでの研究により、糖尿病における膵臓の機能障害には、小胞体ストレスによる膵β細胞の減少が関与していることが明らかとなった。インスリンは、膵β細胞の小胞体で前駆型として合成された後、ジスルフィド結合などの修飾を受けてフォールディングされ、立体構造をとるようになる。この状態のインスリンはプロインスリンと呼ばれ、さらに一部が切断されて成熟型となるが、この過程でフォールディングが不十分であると、異常構造をもつインスリンが合成され、小胞体に蓄積することで小胞体ストレスを引き起こすと考えられている。膵β細胞ではインスリン合成が盛んであることから、一定の割合でフォールディングが不十分なインスリンが存在し、これらは **unfolded protein response (UPR)** と呼ばれる異常タンパク質の処理機構により正常な状態へ修正される⁹³⁾。しかし、インスリン抵抗性状態では異常タンパク質の処理能力を超えて異常構造のインスリンが合成され、膵β細胞は過剰な小胞体ストレス状態になる⁹⁰⁾。このとき、転写因子の **CHOP** は、過剰な小胞体ストレスに対してアポトーシス促進性遺伝子の転写を増加する一方で、アポトーシス抑制遺伝子の転写を低下させ、傷害を受けた細胞のアポトーシスを促進することが報告されている^{94, 95)}。

これらのことから、ピオグリタゾンと EPA・DHA の膵β細胞保護作用のメカニズムについて、小胞体ストレスの低減と、これによるアポトーシスの抑制効果に焦点を当て、免疫染色および TUNEL 染色によりランゲルハンス島の CHOP 発現とアポトーシス陽性細胞の評価をおこなった。チアゾリジン薬による小胞体ストレスおよびアポトーシスの抑制作用については、インスリン抵抗性の改善と、内臓脂肪組織および非脂肪組織に蓄積したトリアシルグリセロールを加水分解し、生成した FFA を皮下脂肪組織に輸送することによる脂肪毒性の低減といった間接的な作用にくわえ、インスリンの転写因子である pancreatic-duodenal homeobox (PDX)-1 の発現増加を介した直接的な作用によるメカニズムが報告されている^{92, 96)}。本研究では、ピオグリタゾンの投与によりインスリン抵抗性の改善、内臓脂肪量の減少と皮下脂肪量の増加、ランゲルハンス島の CHOP 発現低下が確認できた。このことから、本研究のピオグリタゾンによる小胞体ストレス低減作用は、上述した間接的な作用が関与していることが考えられた。一方、EPA・DHA またはこれらの脂肪酸を多く含む魚油の摂取は、体脂肪量の低下および糖・脂質代謝を改善するとともに、膵臓ランゲルハンス島の肥大化を抑制することが報告されているが^{84, 97)}、小胞体ストレスの軽減による膵β細胞の保護作用は完全に明らかになっていない。本研究では、EPA・DHA の投与による有意な HOMA-IR の低下は認められなかったが、副腎丸周囲白色脂肪組織および内臓脂肪面積、膵臓ランゲルハンス島の CHOP 発現が低下し、アポトーシス陽性細胞も検出されなかった。EPA・DHA による小胞体ストレス低下とアポトーシスの抑制効果は、インスリン抵抗性の改善を介さない直接的な作用であることが示唆された。

次に、ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用による膵臓の保護効果について検討したところ、ピオグリタゾン単独投与時より膵臓ランゲルハンス島の肥大化が強く抑制された。膵β細胞の割合はそれぞれの単独投与時と同等に維持されており、小胞体ストレスおよび膵臓ランゲルハンス島のアポトーシスに対する抑制作用も確認された。したがって、ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用は、膵臓の機能保護に対して相加・相乗的な効果を示すことはなかったが、それぞれによる小胞体ストレスの低減効果と、EPA・DHA のアポトーシスの抑制効果による膵臓の機能維持効果が示され、併用時ではランゲルハンス島の肥大化を効率よく抑制できることが明らかとなった。

膵臓の機能障害を引き起こす要因の 1 つとして、膵臓および膵臓ランゲルハンス島の炎症が挙げられる⁹⁸⁾。これまでにチアゾリジン薬および EPA・DHA による抗炎症作用は報告されており^{99, 100)}、本研究でも膵臓保護効果と炎症の関わりに着目し、膵臓の炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べたが、すべての群間で大きな変化は認められなかった。したがって、ピオグリタゾン、EPA・DHA、およびこれらの併用における膵臓保護効果に対して、膵臓の炎症の改善は関与していないと考えた。

第7節 小括

第2章では、第1章と同様に7週齢の雄性KKマウスにピオグリタゾンとEPA・DHAを、それぞれの単独と併用で8週間投与し、膵臓保護効果を検討した。

その結果、ピオグリタゾンの単独投与は、インスリン抵抗性を改善することで膵臓ランゲルハンス島の肥大化を抑制したことに加え、インスリン抵抗性に伴う膵β細胞の減少と小胞体ストレスの増加を低減し、膵臓機能維持効果を示した。一方、EPA・DHAの投与はインスリン抵抗性と膵臓ランゲルハンス島の肥大化を改善することはできなかったが、膵β細胞の減少および小胞体ストレスの低減作用と、アポトーシスの抑制作用を示した。そして、これらの併用では、単独投与と比較してランゲルハンス島のサイズがさらに減少した。以上の結果から、膵臓の保護作用は、ピオグリタゾンとEPA・DHAによる小胞体ストレスの低減効果と、EPA・DHAのアポトーシスの抑制効果が関与していることが示唆された(Fig. 15)。

本章により、ピオグリタゾンとn-3系PUFA、およびこれらの併用は、膵臓の機能維持という視点でも有用であることが示された。そこで第3章では、第1章、第2章で得られた結果をもとに、加齢させた2型糖尿病モデルマウスを用いて検討をおこない、ピオグリタゾンとEPA・DHAの併用が、高齢糖尿病患者に対して有効であるか調べることにした。

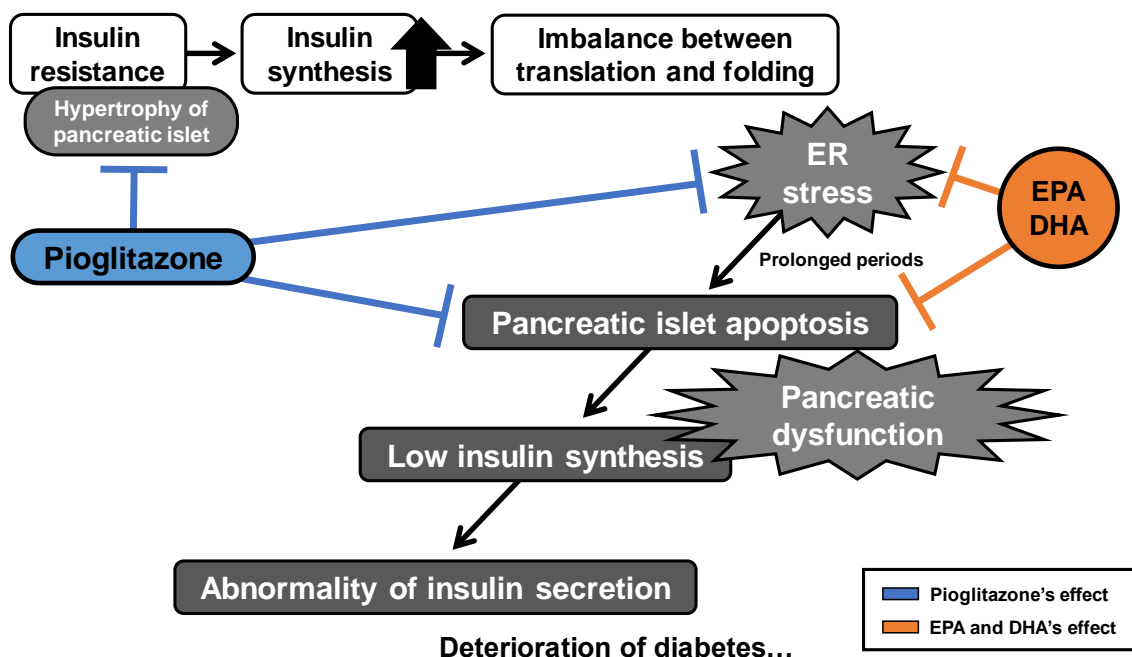


Figure 15. Proposed benefits by pioglitazone, n-3 PUFA (EPA-DHA), and their combination for prevention on pancreatic dysfunction.

第3章 加齢マウスにおけるピオグリタゾンと n-3 系 PUFA (EPA・DHA)の併用による有効性の検討

第1章および第2章では、若齢成獣期の KK マウスを用いて、ピオグリタゾンと n-3 系 PUFA (EPA・DHA)を併用することによる糖・脂質代謝改善作用、ピオグリタゾンによる皮下脂肪蓄積を伴う体重増加の低減作用、脂肪細胞の肥大化抑制作用、脂肪組織における抗炎症作用および膵臓の保護作用を明らかにした。このことから、若年成人に対してピオグリタゾンによる薬物治療をおこなう場合、n-3 系脂肪酸製剤を併用することでインスリン抵抗性改善効果を向上できる可能性が示された。しかし、現在は超高齢化に伴って高齢糖尿病患者が増加していることをふまえると、糖尿病の新たな治療法を提案するためには、高齢者に対しても有効性を証明しなければならない。高齢者は加齢に伴って耐糖能が悪化しやすいことにくわえ、薬物動態の変化によって服用した薬の副作用が発現しやすいことが示されている¹⁰⁾。したがって、n-3 系脂肪酸製剤との併用で糖尿病に対する治療効果を維持した状態で、ピオグリタゾンの投薬量を減少させることができれば、これによる副作用の低減も期待され、高齢者に対する薬物治療として大きな有益性となる。

そこで第3章では、第1章および第2章で確認されたピオグリタゾンと EPA・DHA の併用効果が、高齢2型糖尿病患者の病態モデル動物とする加齢させた KK マウス(以下、「加齢 KK マウス」と略す)に対しても得られるかについて調べるとともに、単独投与では有意なインスリン抵抗性改善効果が得られない低用量のピオグリタゾンと EPA・DHA を併用することで、インスリン抵抗性改善効果を維持したままピオグリタゾンによる皮下脂肪蓄積を抑制できるかについて明らかにすることを目的とした(Fig. 16)。

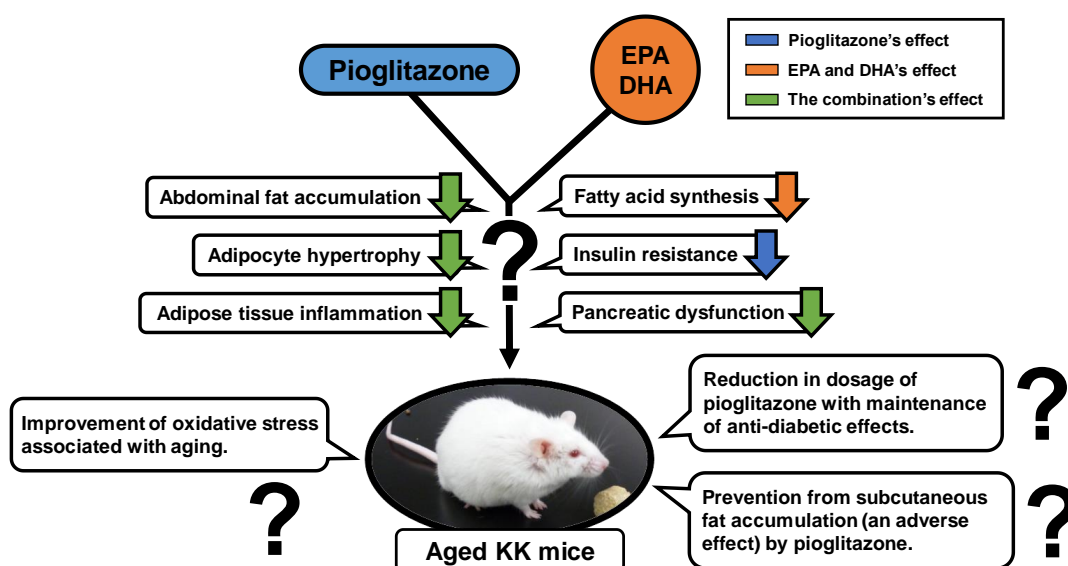


Figure 16. The hypothetical benefits by the combination of pioglitazone and n-3 PUFA (EPA-DHA) on aged KK mice.

第 1 節 加齢 KK マウスにおけるフェノタイプおよび遺伝子発現の検討

KK マウスは肥満・2 型糖尿病モデル動物として研究に用いられているが、このマウスを加齢させた場合に高齢者の 2 型糖尿病と類似した病態を示すかはほとんど明らかにはなっておらず、加齢条件でおこなわれた研究も少ないのが現状である。このことから、加齢 KK マウスを高齢 2 型糖尿病患者の病態モデル動物として用いることの妥当性について検討をおこなった。

まず初めに、本研究を進めるにあたって生後何週齢のマウスに対して評価をおこなうべきかを決める必要がある。その目安とすべく文献検索をおこなったが、KK マウスを用いて老化研究をおこなっている文献は少なく、実験条件が一致している論文は見受けられなかった。そこで、本研究で用いるマウスの週齢設定に関しては、32 週齢の雌性 KK マウスに対して加齢の影響を検討している LePard らの研究¹⁰²⁾を参考にすることとした。飼育期間中は、KK マウスにおけるフェノタイプの加齢変化を評価するために、酸化ストレスと抗酸化能力のマーカーとして diacron of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) 値と biological antioxidative potential (BAP) 値、耐糖能の指標として血糖値、血漿インスリン値および HOMA-IR を経時的にモニタリングし、32 週齢以降におけるインスリン抵抗性と酸化ストレス、抗酸化能力の加齢変化に着目し、HOMA-IR が実験開始時より高値であること、d-ROMs 値の増加が横ばいであること、BAP 値の低下が見受けられることを、週齢を決定するための判断基準とした。具体的な実験条件は以下の通りである。

慢性的な肥満・2 型糖尿病と加齢によって複合的に生じる生理的变化が、マウスの糖・脂質代謝にどのような影響を及ぼすかを確認するために、固形飼料 CE-2[(株)日本クレア]を用いて雄性 KK マウスを飼育し、加齢群(Aged group)としてフェノタイプおよび遺伝子発現に対する加齢変化を検討した。また、コントロールとして、第 1 章および第 2 章で用いた生後 15 週齢まで飼育する若齢成獣群(Young adult group)を設定した。なお、KK マウスのみの検討では、各種パラメータの変化が加齢によるものであるのか、KK マウスに特異的なものであるのかが判断しにくいと考え、正常対照として C57BL/6 マウスを用いて Fig. 17 に示す実験計画に沿って飼育をおこなった。

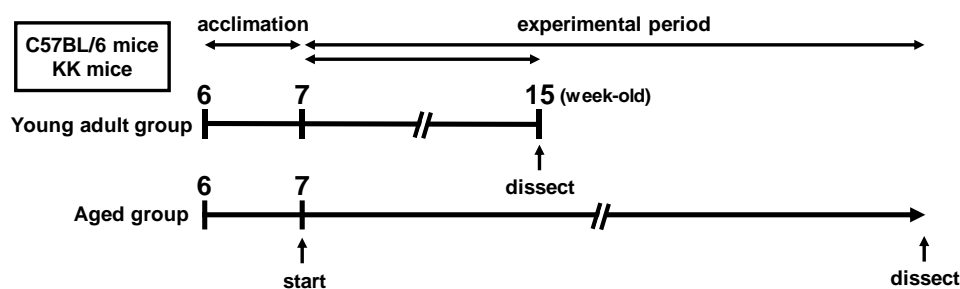


Figure 17. Time schedule of animal treatment in chapter 3-1.

第1項 酸化ストレス、抗酸化能力、血糖値、血漿インスリン値および HOMA-IR の推移

高齢 2 型糖尿病モデル動物として加齢 KK マウスを用いる際の週齢を決定するために、d-ROMs 値、BAP 値、血糖値、血漿インスリン値および HOMA-IR の変化をモニタリングし、結果を Fig. 18 に示す。d-ROMs 値は、C57BL/6 マウス、KK マウスともに加齢による増加が確認され、飼育開始時と比較して 15 週齢以降は有意に高値であった。また、32 週齢付近の変化をみるために 31~39 週齢の間で Tukey-kramer 検定による統計解析をおこなったところ、すべての週齢の間で有意な差は認められなかったことから、31 週齢以降の酸化ストレスの変化は一定であったと判断した。BAP 値は、両マウスともに飼育開始から 35 週齢までほぼ横ばいであったが、39 週齢の KK マウスの値は飼育開始時と比較して有意に低値であった。C57BL/6 マウスの血糖値は、27 週齢までは 100 mg/dl 付近を推移していたが、それ以降はおおよそ 120 mg/dl に増加した。KK マウスは 15 週齢で最も高値を示し、それ以降は 121.2~138.4 mg/dl 付近を推移した。一方、C57BL/6 マウスの血漿インスリン値および HOMA-IR は、飼育開始から 27 週齢までは横ばいであったが、31 週齢において最も高値を示した。KK マウスは 15 週齢までは横ばいであったが、19 週齢で最も高値を示し、それ以降は 35 週齢を除いて飼育開始時より高い状態が続いた。

以上の結果から、あらかじめ設定した高齢 2 型糖尿病モデル動物としての判断基準を満たしたため、39 週齢の時点でモニタリングを終了し、各測定のための絶食および採血のストレス負荷に対する 1 週間の回復期間を設け、40 週齢になった時点で解剖をおこなった。

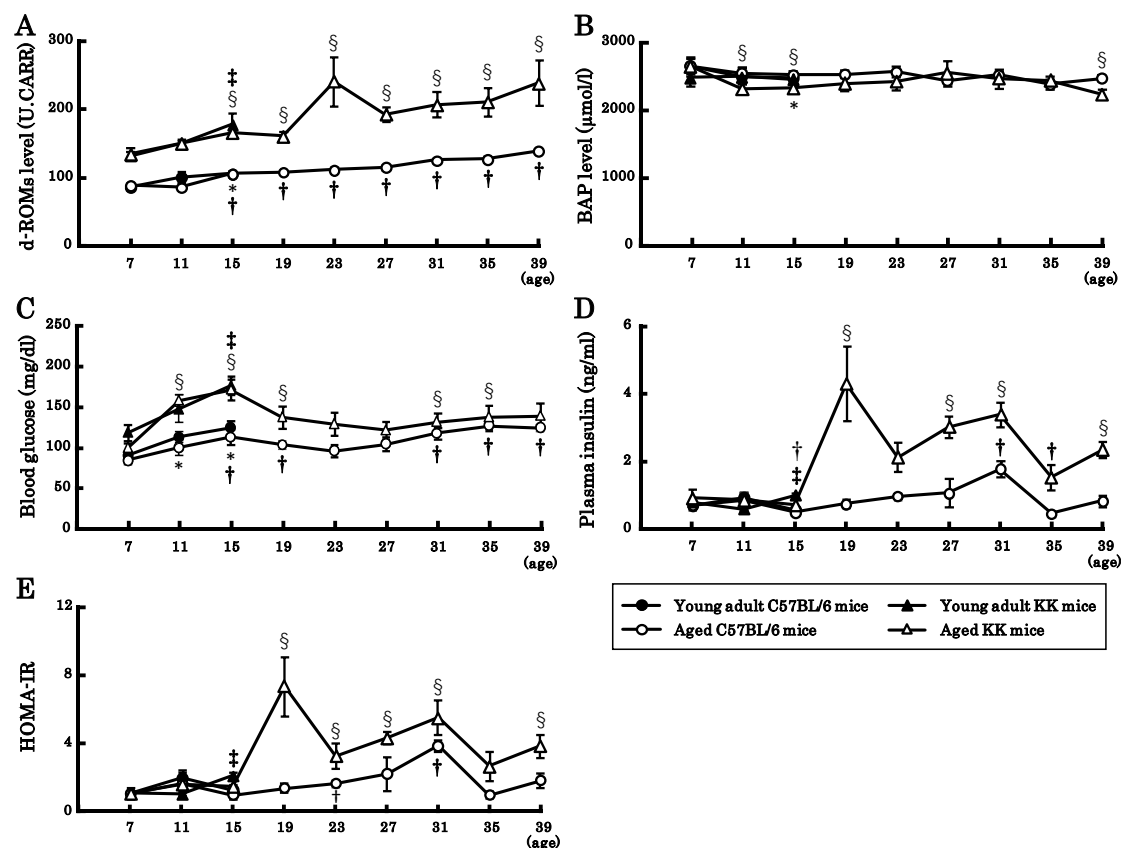


Figure 18. d-ROMs and BAP levels, blood glucose, plasma insulin, and HOMA-IR in male C57BL/6 and KK mice. d-ROMs levels for oxidative marker (A), BAP levels for anti-oxidative potential marker (B), blood glucose (C), plasma insulin (D), and HOMA-IR (E) in experimental period. Data are represented as mean \pm SE, $n = 3-5$. HOMA-IRs are expressed as the ratio of the obtained value to that of the initial value in each mouse. *: $P < 0.05$, Young adult C57BL/6 mice in comparison with initial value, †: $P < 0.05$, Young adult KK mice in comparison with initial value, ‡: $P < 0.05$, Aged C57BL/6 mice in comparison with initial value, §: $P < 0.05$, Aged KK mice in comparison with initial value, by t-test.

第2項 摂食量推移、成長曲線および体組成

摂食量の推移と成長曲線を Fig. 19 に、15 週齢と 40 週齢における最終体重、体重変化および組織重量を Table 12 に示す。摂食量の推移は、C57BL/6 マウスはほぼ横ばいであったが、KK マウスは飼育開始後 15 週間目から徐々に減少する傾向がみられた。成長曲線を見ると、両マウスともに飼育開始から徐々に増加し、C57BL/6 マウスは 36 週齢、KK マウスは 28 週齢で最も高値を示した。最終体重は、40 週齢の C57BL/6 マウスは 15 週齢と比較して有意に高値であったが、KK マウスは加齢による影響は認められなかった。一方、体重増加量は、両マウスともに 15 週齢と比較して 40 週齢で有意に高値であった。肝臓重量は、C57BL/6 マウスは加齢による有意な増加が認められたが、KK マウスでは有意な変化はみられなかった。副睾丸周囲白色脂肪組織重量は、C57BL/6 マウスは加齢に伴い有意に増加したが、KK マウスは有意に減少した。腓腹筋重量は、両マウスともに 15 週齢と比較して 40 週齢で有意に増加した。一方、体重 100g あたりの重量に換算した場合は、両マウスともに加齢による有意な差はみられなかった。

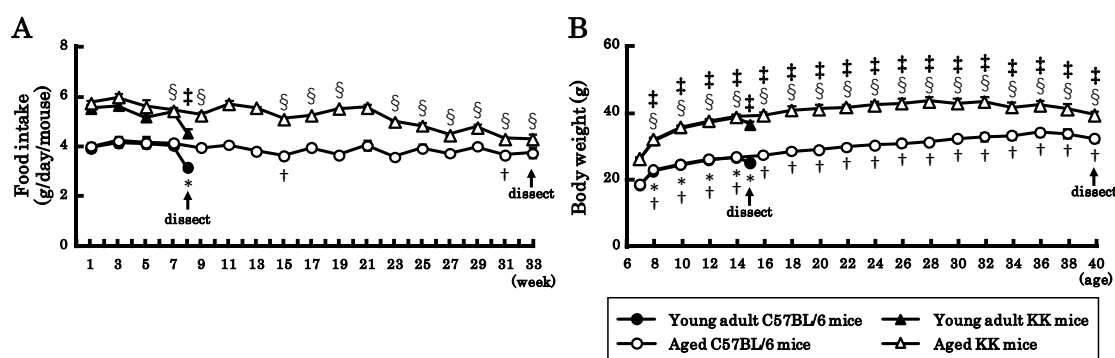


Figure 19. Food intake and growth curves in male C57BL/6 and KK mice.

Mean weekly food intake (A) and growth curves (B) in experimental period. Data are represented as mean \pm SE, n = 5. *: $P < 0.05$, Young adult C57BL/6 mice in comparison with initial value, †: $P < 0.05$, Aged C57BL/6 mice in comparison with initial value, ‡: $P < 0.05$, Young adult KK mice in comparison with initial value, §: $P < 0.05$, Aged KK mice in comparison with initial value, by t-test.

Table 12. Body weight and tissue weights in male C57BL/6 and KK mice.

	C57BL/6		KK	
	15-week-old	40-week-old	15-week-old	40-week-old
Initial body weight (g)	19.0 \pm 0.2	19.0 \pm 0.1	26.7 \pm 0.5	26.7 \pm 0.4
Final body weight (g)	24.8 \pm 0.6	32.6 \pm 1.0*	36.2 \pm 1.1	39.7 \pm 1.2
Body weight gain (g)	+5.8 \pm 0.6	+13.6 \pm 1.0*	+9.6 \pm 0.8	+12.9 \pm 1.1†
Liver weight (g)	1.05 \pm 0.03	1.29 \pm 0.04*	1.50 \pm 0.07	1.41 \pm 0.03
Epididymal WAT weight (g)	0.35 \pm 0.06	1.23 \pm 0.19*	1.25 \pm 0.05	0.90 \pm 0.06†
Gastro weight (g)	0.22 \pm 0.01	0.31 \pm 0.03*	0.19 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01†
Gastro weight (g/100g BW)	0.88 \pm 0.05	0.95 \pm 0.08	0.52 \pm 0.03	0.60 \pm 0.02

Data are represented as mean \pm SE, n = 5. * $P < 0.05$ versus 15-week-old in C57BL/6 mice, † $P < 0.05$ versus 15-week-old in KK mice by t-test.

第3項 血糖値、HOMA-IR、血漿中パラメータ

15週齢と40週齢の雄性C57BL/6マウスとKKマウスにおける血糖値、血漿インスリン値、HOMA-IRおよび血漿アディポネクチン値の結果をTable 13に示す。40週齢時の血糖値は、C57BL/6マウスとKKマウスともに、15週齢の値と比較しておよそ30%低値であり、C57BL/6マウスにおいては有意な低下が認められた。血漿インスリン値は、両マウスともに15週齢の値と比較して、40週齢の値は有意に高かった。一方、HOMA-IRは、KKマウスのみ加齢による有意な上昇が認められた。40週齢時の血漿アディポネクチン値は、C57BL/6マウスは15週齢時の値と比較して有意に増加したが、KKマウスは有意に減少した。

Table 13. Blood glucose, HOMA-IR, and plasma parameters in male C57BL/6 and KK mice.

	C57BL/6		KK	
	15-week-old	40-week-old	15-week-old	40-week-old
Blood glucose (mg/dl)	202 ± 22	140 ± 10*	217 ± 34	146 ± 15
Plasma insulin (ng/ml)	0.28 ± 0.05	0.55 ± 0.04*	0.69 ± 0.12	3.51 ± 0.76†
HOMA-IR	1.00 ± 0.20	1.31 ± 0.14	1.00 ± 0.27	3.28 ± 0.86†
Plasma adiponectin (µg/ml)	12.34 ± 0.20	14.66 ± 0.79*	9.24 ± 0.34	7.75 ± 0.30†

Data are represented as mean ± SE, n = 5. HOMA-IR are shown as the ratio to the 15-week-old group in each mouse (C57BL/6, 3.8 ± 0.8; KK, 10.0 ± 2.7). *P < 0.05 versus 15-week-old in C57BL/6 mice, †P < 0.05 versus 15-week-old in KK mice by t-test.

第4項 肝臓中遺伝子発現

15週齢と40週齢の雄性C57BL/6マウスとKKマウスにおける肝臓の脂肪酸β酸化およびエネルギー消費に關与する遺伝子発現を測定し、結果をTable 14に示す。40週齢のPPARαおよびMCADのmRNAレベルは、C57BL/6マウスのみ15週齢の値と比較して有意に増加した。AOXのmRNAレベルは、KKマウスのみ加齢による有意な低下が認められた。UCP-2のmRNAレベルは、両マウスともに15週齢と40週齢の間で有意な変化は認められなかった。

Table 14. Liver mRNA levels in male C57BL/6 and KK mice.

	C57BL/6		KK	
	15-week-old	40-week-old	15-week-old	40-week-old
<i>Fatty acid β-oxidation and energy consumption</i>				
PPARα	1.00 ± 0.14	1.59 ± 0.11*	1.00 ± 0.07	0.87 ± 0.02
AOX	1.00 ± 0.06	1.15 ± 0.06	1.00 ± 0.04	0.84 ± 0.06†
UCP-2	1.00 ± 0.14	0.86 ± 0.04	1.00 ± 0.12	0.94 ± 0.18
MCAD	1.00 ± 0.17	1.54 ± 0.05*	1.00 ± 0.04	1.10 ± 0.09

Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the 15-week-old in each mouse. Data are represented as mean ± SE, n = 5. *P < 0.05 versus 15-week-old in C57BL/6 mice, †P < 0.05 versus 15-week-old in KK mice by t-test.

第5項 加齢 KK マウスにおけるフェノタイプおよび遺伝子発現の検討に関する考察

加齢 KK マウスに対するピオグリタゾンと EPA・DHA の併用効果を検討するにあたって、まず初めに、加齢させた KK マウスの病態が高齢者の 2 型糖尿病を反映するものであるか検討をおこなった。

本研究では LePard らの研究¹⁰²⁾を週齢決定の参考にして、32 週齢以降で、実験開始時よりインスリン抵抗性が悪化していること、酸化ストレスの増加が横ばいであること、抗酸化能力の低下がみられることを基準として、KK マウスを高年齢 2 型糖尿病モデル動物として用いる際の週齢を決定することとした。飼育開始時から d-ROMs 値、BAP 値、血糖値、血漿インスリン値および HOMA-IR の変化をモニタリングしたところ、KK マウスの d-ROMs 値は加齢により徐々に増加し、31 週齢を越えると 200 U.CARR 以上に達した。また、32 週齢付近の変化をみるために 31~39 週齢の間で Tukey-kramer 検定による統計解析をおこなったところ、すべての週齢の間で有意な差は認められなかったことから、31 週齢以降の酸化ストレスの変化は一定であったと判断した。一方、BAP 値は実験開始時と比べて 35 週齢まではほぼ横ばいであったが、39 週齢まで加齢が進むと有意な低下が認められた。HOMA-IR 値は 19 週齢の時点で最も高値を示し、それ以降は 35 週齢を除いて実験開始時より高い状態が続いた。以上の結果から、あらかじめ設定した高齢 2 型糖尿病モデル動物としての判断基準を満たした 39 週齢の時点でモニタリングを終了し、各測定のための絶食および採血のストレス負荷に対する 1 週間の回復期間を設け、40 週齢になった時点で解剖をおこなった。

加齢は摂食行動に影響を及ぼすことが報告されており¹⁰³⁾、消化機能の衰えやエネルギー要求量の減少による摂食量(摂取エネルギー)の低下が、高齢者の栄養障害のリスクとなっている。また、加齢による抗酸化酵素の減少と抗酸化機構の活性低下は、体内の酸化ストレスの増加、過酸化脂質の蓄積を促進し、糖尿病を悪化させると考えられている^{104, 105)}。本研究でも、KK マウスは加齢による摂食量の減少、酸化ストレスの増加と抗酸化能力の低下が認められ、さらに、40 週齢の KK マウスは加齢によりインスリン抵抗性が悪化していることが示された。2 型糖尿病患者の血中アディポネクチン濃度は、健常者と比べて低いことが知られており、中年期の糖尿病患者と比べて、罹患期間が長い高齢の 2 型糖尿病患者ほど低いことが報告されている^{106, 107)}。インスリン抵抗性の悪化がみられた 40 週齢の KK マウスは、15 週齢時と比べ血漿アディポネクチン値が有意に低下しており、アディポネクチンの動態に関してもヒトとの類似性が確認された。一方、高齢者の血中アディポネクチン濃度の低下は、年齢そのものよりも体組成および耐糖能の変化が強く影響し、健常な高齢者は若年者よりも濃度が高いという報告があることから^{108, 109)}、C57BL/6 マウスが加齢により血漿アディポネクチン値が増加した要因は、インスリン抵抗性の感受性が維持されていたためであると考えられた。ヒトを対象とした研究では、加齢に伴う筋肉量の低下と脂肪組織比率の増加、基礎代謝量や脂肪酸 β 酸化の減少といった生理機能の低下も糖尿病の原因となる

ことが明らかになっている^{39,44,110}。筋重量は体重と強い相関があり、筋肥大あるいは萎縮を調べる場合には、実際の重量よりも相対的筋重量を用いるべきであると考えられていることから¹¹¹、本研究でも体重 100g あたりの腓腹筋重量を算出したところ、15 週齢と 40 週齢の間に有意な変化はみられなかった。したがって、加齢 KK マウスのインスリン抵抗性の悪化に骨格筋重量の減少は大きく関与していないことが考えられた。一方、KK マウスの副睾丸周囲白色脂肪組織重量は 40 週齢において有意な低下がみられ、これは加齢による摂食量の減少によって、摂取エネルギー量が必要量を下回った結果、脂肪組織の分解が促進されたためであると推察された。次に、加齢による脂肪酸 β 酸化能の変化を調べるために肝臓の遺伝子発現を測定したところ、40 週齢の KK マウスはペルオキシソームの脂肪酸 β 酸化能が低下していることが示唆された。また、Table 14 に示す遺伝子発現の結果では、各マウスの mRNA レベルを 15 週齢時の値を 1 として比で表しているが、15 週齢時および 40 週齢時の実測値についてマウス間の比較も行っている。これにより、15 週齢の KK マウスは、C57BL/6 マウスと比べて AOX の mRNA レベルのみが有意に低値であったが、40 週齢時は PPARα と MCAD の mRNA レベルも有意に低下していたことが確認された。

以上の結果により、加齢 KK マウスにおける摂食量の減少、酸化ストレスの増加とインスリン抵抗性の悪化、血漿アディポネクチン値および肝臓の脂肪酸 β 酸化能の低下が確認され、これらはヒトにおける加齢変化と類似していた。したがって、本章で 40 週齢の KK マウスを高齢 2 型糖尿病のモデル動物として用いることは妥当であると判断した。

なお、本研究では 40 週齢の KK マウスに対して、老齢 KK マウスではなく加齢 KK マウスという略称を用いている。これは、老齢マウスの週齢に関する定義が必ずしも明確にされているわけではないことにくわえ、de Picciotto らによる研究¹¹²では、老齢マウスとして 112 週齢の C57BL/6 マウスが用いられていることを考慮したためである。KK マウスは肥満・2 型糖尿病モデル動物であるため、特定の疾患モデル動物ではない C57BL/6 マウスと寿命が異なることが推測されるが、40 週齢の KK マウスを 112 週齢のマウスと同様に老齢マウスと称することについて、少なくとも週齢という観点では適切であるかを判断できなかった。そこで本研究では、加齢させた KK マウス、すなわち加齢 KK マウスという表現を用いることにした。

第2節 ピオグリタゾンの有意なインスリン抵抗性改善効果がみられない用量の検討

EPA・DHA の併用がピオグリタゾンの投薬量を減少できるかを明らかにするためには、ピオグリタゾン単独では有意なインスリン抵抗性改善効果がみられない用量に対して EPA・DHA を併用した結果、その効果が得られるようになることが重要となる。そこで、第1章で有意なインスリン抵抗性改善効果が確認された 0.006 wt% のピオグリタゾンをポジティブコントロールとして、有意なインスリン抵抗性改善効果がみられない用量を明らかにするための検討をおこなった。

実験動物は7週齢の雄性 KK マウスを用い、実験飼料として、これまでと同様の Con 食と、これにピオグリタゾンを段階的に半分量(0.006、0.003、0.0015 wt%)にして添加した 0.0015P、0.003P、0.006P 食を調製した(Table 15)。これらの飼料を7週齢の雄性 KK マウスに与える Con 群、0.0015P、0.003P、0.006P 群の計4群を設け、Fig. 20 に示す実験計画に沿って8週間の飼育をおこなった。なお、実験飼料および群の名称について、各数字は添加したピオグリタゾンの用量を示しており、ピオグリタゾンの糖尿病治療効果は、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR により判断した。

Table 15. Composition of experimental diets.

	Con	0.0015P	0.003P	0.006P
Safflower oil (g)	8	8	8	8
Casein (g)	20	20	20	20
Sucrose (g)	10.37	10.37	10.37	10.37
β -starch (g)	51.83	51.83	51.83	51.83
Vitamin mix (g)*	1	1	1	1
Mineral mix (g)*	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellulose powder (g)	5	5	5	5
L-cystin (g)	0.3	0.3	0.3	0.3
t-Butylhydroquinone (g)	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016
Pioglitazone (g)	—	0.0015	0.003	0.006
Total (g)	100.00	100.00	100.00	100.01
Energy (kcal/100g)	374.02	374.01	374.01	374.00
Fat energy (%)	19.70	19.70	19.70	19.70

*Vitamin and mineral mix were based on the AIN-93G formulation. Vitamin mix substituted 0.25% sucrose for choline bitartrate.

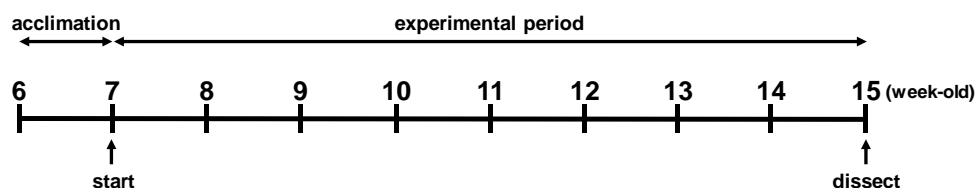


Figure 20. Time schedule of animal treatment in chapter 3-2.

第1項 摂食量、ピオグリタゾンの平均1日投与量、体重および体組成

総摂食量、最終体重、体重変化、組織重量および腹部脂肪面積を Table 16、摂食量と体重から算出したピオグリタゾンの平均1日投与量を Table 17 に示す。摂食量は、すべての群間で有意な変化はみられなかった。最終体重は、Con 群と比較して 0.006P 群でのみ有意に増加した。0.003P 群と 0.006P 群の体重増加量は、Con 群と比較して有意に高値であった。副睪丸周囲白色脂肪組織重量は、Con 群と比較してすべての群で有意に減少した。X線 CT スキャンによる腹部脂肪面積の測定をおこなったところ、内臓脂肪面積にピオグリタゾンの投与による影響は認められなかったが、0.006P 群の皮下脂肪面積は、Con 群と比較して有意に増加した。また、0.003P 群は有意な変化ではなかったが、Con 群より 25.6%高値であった。

Table 16. Total food intake, body weight, tissue weight, and abdominal fats in 15-week-old male KK mice.

	Con	0.0015P	0.003P	0.006P
Total food intake (g/mouse)	268 ± 10	259 ± 8	253 ± 6	262 ± 10
Initial body weight (g)	26.7 ± 0.7	26.7 ± 0.6	26.7 ± 0.6	26.7 ± 0.6
Final body weight (g)	38.3 ± 0.7 ^b	40.4 ± 0.8 ^b	41.0 ± 0.8 ^b	43.0 ± 0.8 ^a
Body weight gain (g)	+11.6 ± 0.8 ^c	+13.7 ± 0.6 ^{bc}	+14.3 ± 0.6 ^{ab}	+16.3 ± 0.6 ^a
Epididymal WAT weight (g)	1.34 ± 0.03 ^a	1.18 ± 0.02 ^b	1.09 ± 0.05 ^b	1.15 ± 0.04 ^b
Visceral fat mass (cm ³)	1.46 ± 0.07	1.34 ± 0.07	1.27 ± 0.07	1.38 ± 0.06
Subcutaneous fat mass (cm ³)	0.43 ± 0.03 ^b	0.42 ± 0.04 ^b	0.54 ± 0.03 ^b	0.68 ± 0.02 ^a

Data are represented as mean ± SE, n = 5-7. Groups sharing different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

Table 17. The average dose of pioglitazone in 15-week-old male KK mice.

	Con	0.0015P	0.003P	0.006P
Pioglitazone (mg/kg/day)		1.76 ± 0.08	3.45 ± 0.05	6.95 ± 0.15

Data are represented as mean ± SE, n = 7.

第2項 血糖値、HOMA-IR、血漿中パラメータ

血糖値、血漿インスリン値、HOMA-IR および血漿アディポネクチン値の結果を Table 18 に示す。血糖値はすべての群間で有意な変化はみられなかった。血漿インスリン値および HOMA-IR もピオグリタゾンによる有意な影響はみられなかったが、0.006 wt%のピオグリタゾンの投与は、それぞれのパラメータを Con 群の 53.0%、59.4%まで低下させた。血漿アディポネクチン値は、Con 群と比較して 0.006P 群は有意に増加した。

Table 18. Blood glucose, HOMA-IR, and plasma parameters in 15-week-old male KK mice.

	Con	0.0015P	0.003P	0.006P
Blood glucose (mg/dl)	193 ± 29	200 ± 16	174 ± 14	215 ± 16
Plasma insulin (ng/ml)	7.07 ± 0.98	7.60 ± 3.00	6.53 ± 1.07	3.74 ± 0.72
HOMA-IR	1.00 ± 0.18	1.13 ± 0.41	0.88 ± 0.20	0.59 ± 0.11
Plasma adiponectin (µg/ml)	5.58 ± 0.47 ^b	6.91 ± 0.78 ^b	7.18 ± 0.37 ^b	8.86 ± 0.68 ^a

Data are represented as mean ± SE, n = 6-7. HOMA-IR are shown as the ratio to the Con group (85.2 ± 15.1). Groups sharing different letters are significantly different in a row: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第3項 ピオグリタゾンの有意な有効性がみられない用量の検討に関する考察

EPA・DHAの併用がピオグリタゾンの投薬量を減少できるか明らかにするためには、あらかじめ有意なインスリン抵抗性改善効果がみられないピオグリタゾンの用量を調べた上で、その用量に対してEPA・DHAを併用した結果、改善効果が得られるようになることが重要となる。そこで、ピオグリタゾンの用量を0.0015、0.003、0.006 wt%に設定し、HOMA-IRを指標としてインスリン抵抗性改善効果の評価をおこなった。第1章では、7週齢の雄性KKマウスに0.006 wt%のピオグリタゾンを8週間投与することで、有意なインスリン抵抗性改善効果が認められたが、本検討は実験動物と投与期間が同様であったにも関わらず、0.006P群の血漿インスリン値およびHOMA-IRはすべての群間で有意な差はみられなかった。しかし、これらのパラメータはCon群と比べておよそ40%減少しており、皮下脂肪蓄積や血漿アディポネクチン値の上昇はみられたことから、雄性KKマウスにおける0.006 wt%のピオグリタゾンの投与は、インスリン抵抗性改善効果に対する有効量の下限に近いことが示唆された。一方、0.0015 wt%および0.003 wt%のピオグリタゾンの投与による血漿インスリン値およびHOMA-IRの変化は確認できなかった。

今回の検討では、0.006 wt%のピオグリタゾンの投与が有意なインスリン抵抗性改善効果を示すことはなかったが、第1章の結果をふまえると、この用量を投与した場合、確実に血漿インスリン値およびHOMA-IRに有意な影響を与えないとはいえない。そこで本章では、ピオグリタゾンの有意なインスリン抵抗性改善効果がみられない投与量を0.003 wt%と設定し、この用量にEPA・DHAを併用することで改善効果が得られるようになるか検討をおこなうこととした。

第3節 ピオグリタゾンの投与量減少に対する n-3 系 PUFA (EPA・DHA)の有効性の検討

第1節および第2節の検討により、40週齢のKKマウスにおける高齢2型糖尿病モデルマウスとしての妥当性が得られ、くわえて0.003 wt%の用量のピオグリタゾンは有意なインスリン抵抗性改善効果がみられないことが示された。これらをふまえて、第1章および第2章で確認されたピオグリタゾンとEPA・DHAの併用効果が、加齢させた条件でも得られるか調べるとともに、EPA・DHAを、単独投与では有意なインスリン抵抗性改善効果が得られない用量のピオグリタゾンと併用し、改善効果を維持したままピオグリタゾンの投与量を減少できるか検討した。

具体的には、実験動物として固形飼料MF[(株)オリエンタル酵母工業]で生後40週齢まで加齢させた雄性KKマウスを用い、実験飼料は、実験1および実験2と同様の20 en%のサフラワー油を調合したCon食をコントロール食として、Con食に0.003、0.006、0.012 wt%のピオグリタゾンを添加したPVL (pioglitazone-very low dose)食、PL (pioglitazone-low dose) 食、PH (pioglitazone-high dose) 食、また、これらの実験飼料の10 en%をDHA濃縮魚油で置き換えた、FO (fish oil)食、PVL/FO (pioglitazone-very low dose/fish oil)食、PL/FO (pioglitazone-low dose/fish oil)食、PH/FO (pioglitazone-high dose/fish oil)食を調製した(Table 19)。これらの飼料をマウスに与え、Con群、PVL群、PL群、PH群、FO群、PVL/FO群、PL/FO群、PH/FO群の計8群を設け、Fig. 21に示す実験計画に沿って8週間の飼育をおこなった。

Table 19. Composition of experimental diets.

	Con	PVL	PL	PH	FO	PVL/FO	PL/FO	PH/FO
Safflower oil (g)	8	8	8	8	4	4	4	4
Fish oil (g)	–	–	–	–	4	4	4	4
Casein (g)	20	20	20	20	20	20	20	20
Sucrose (g)	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37
β-starch (g)	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83
Vitamin mix (g)*	1	1	1	1	1	1	1	1
Mineral mix (g)*	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellulose powder (g)	5	5	5	5	5	5	5	5
L-cystin (g)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
t-Butylhydroquinone (g)	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016
Pioglitazone (g)	–	0.003	0.006	0.012	–	0.003	0.006	0.012
Total (g)	100.00	100.00	100.01	100.01	100.00	100.00	100.01	100.01
Energy (kcal/100g)	374.02	374.01	374.00	373.99	374.02	374.01	374.00	373.99
Fat energy (%)	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70

*Vitamin and mineral mix were based on the AIN-93G formulation. Vitamin mix substituted 0.25% sucrose for choline bitartrate.

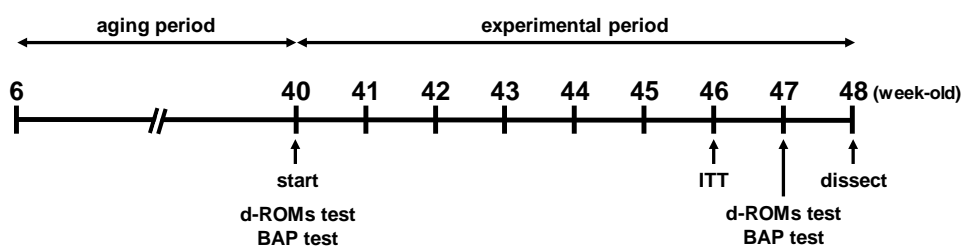


Figure 21. Time schedule of animal treatment in chapter 3-3.

第1項 摂食量、ピオグリタゾンと n-3 系 PUFA の平均 1 日投与量、体重および体組成

総摂食量、最終体重、体重変化および組織重量を Table 20、摂食量と体重から算出したピオグリタゾンと n-3 系 PUFA の平均 1 日投与量を Table 21 に示す。摂食量はすべての群間で有意な変化はみられなかった。ピオグリタゾンを単独投与した PVL、PL、PH 群の体重増加量は、Con 群と比較して、有意な差ではなかったがそれぞれ 20.5、38.3、54.4%高値であり、PH 群は増加傾向($P=0.0865$)があった。これらの体重増加量は、EPA・DHA の併用により有意ではなかったが低減されており、特に PVL/FO 群の体重増加量は平均値で Con 群より 18%低値であった。肝臓重量は、Con 群と比較してすべての群間で有意な変化はみられなかったが、PVL/FO 群は PVL 群と比較して有意に減少した。副睾丸周囲白色脂肪組織重量は、すべての群間で有意な差はなかった。肩甲骨間の褐色脂肪組織重量は、Con 群と比較して PL、PH、PL/FO、PH/FO 群で有意な増加がみられた。

X 線 CT スキャンによる腹部脂肪面積の測定結果を Fig. 22 に示す。内臓脂肪面積は、すべての群間で有意な変化はみられなかった。皮下脂肪面積は、Con 群と比較して、ピオグリタゾンを単独投与した PL、PH 群は 40%以上の有意な増加がみられたが、EPA・DHA を併用することで抑制される傾向($P=0.0632$ 、 0.0519)があった。PVL 群も、Con 群と比較して有意ではないものの 18.6%増加したが、EPA・DHA を併用することで Con 群以下まで減少し、ピオグリタゾンによる増加が抑制される傾向($P=0.0571$)があった。

Table 20. Total food intake, body weight, and tissue weights in 48-week-old male KK mice.

	Con	PVL	PL	PH	FO	PVL/FO	PL/FO	PH/FO
Total food intake (g/mouse)	240 ± 4	243 ± 5	238 ± 4	242 ± 7	237 ± 7	228 ± 3	226 ± 3	230 ± 3
Initial body weight (g)	36.5 ± 0.9	36.5 ± 1.0	36.5 ± 1.0	36.5 ± 0.9	36.5 ± 0.8	36.5 ± 0.8	36.5 ± 0.8	36.5 ± 0.8
Final body weight (g)	42.3 ± 0.3 ^{abc}	43.6 ± 0.5 ^{abc}	44.6 ± 1.3 ^{ab}	45.5 ± 1.4 ^a	40.2 ± 0.3 ^c	41.3 ± 0.4 ^{bc}	43.3 ± 0.7 ^{abc}	44.0 ± 0.6 ^{ab}
Body weight gain (g)	+5.9 ± 1.0 ^{abc}	+7.1 ± 0.7 ^{abc}	+8.2 ± 0.7 ^{ab}	+9.1 ± 1.1 ^a	+3.7 ± 0.9 ^c	+4.8 ± 0.4 ^{bc}	+6.8 ± 0.5 ^{abc}	+7.5 ± 0.2 ^{ab}
Liver weight (g)	1.55 ± 0.09 ^{abc}	1.87 ± 0.11 ^a	1.71 ± 0.12 ^{ab}	1.45 ± 0.06 ^{bc}	1.40 ± 0.04 ^{bc}	1.40 ± 0.08 ^{bc}	1.41 ± 0.05 ^{bc}	1.30 ± 0.04 ^c
Epididymal WAT weight (g)	1.37 ± 0.20	1.03 ± 0.07	1.15 ± 0.07	1.13 ± 0.10	0.96 ± 0.11	1.01 ± 0.04	0.97 ± 0.06	1.04 ± 0.08
BAT weight (g)	0.24 ± 0.02 ^d	0.40 ± 0.02 ^{cd}	0.63 ± 0.10 ^{bc}	0.96 ± 0.14 ^a	0.26 ± 0.02 ^d	0.49 ± 0.04 ^{bcd}	0.74 ± 0.05 ^{ab}	0.69 ± 0.07 ^{abc}

Data are represented as mean ± SE, n = 5-6. Groups sharing different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

Table 21. The average dose of pioglitazone and n-3 PUFA in 48-week-old male KK mice.

	Con	PVL	PL	PH	FO	PVL/FO	PL/FO	PH/FO
Pioglitazone (mg/kg/day)		2.88 ± 0.07	5.68 ± 0.11	11.24 ± 0.10		2.87 ± 0.05	5.49 ± 0.06	10.92 ± 0.22
n-3 PUFA (g/kg/day)					1.28 ± 0.03	1.20 ± 0.02	1.15 ± 0.01	1.14 ± 0.02

Data are represented as mean ± SE, n = 6.

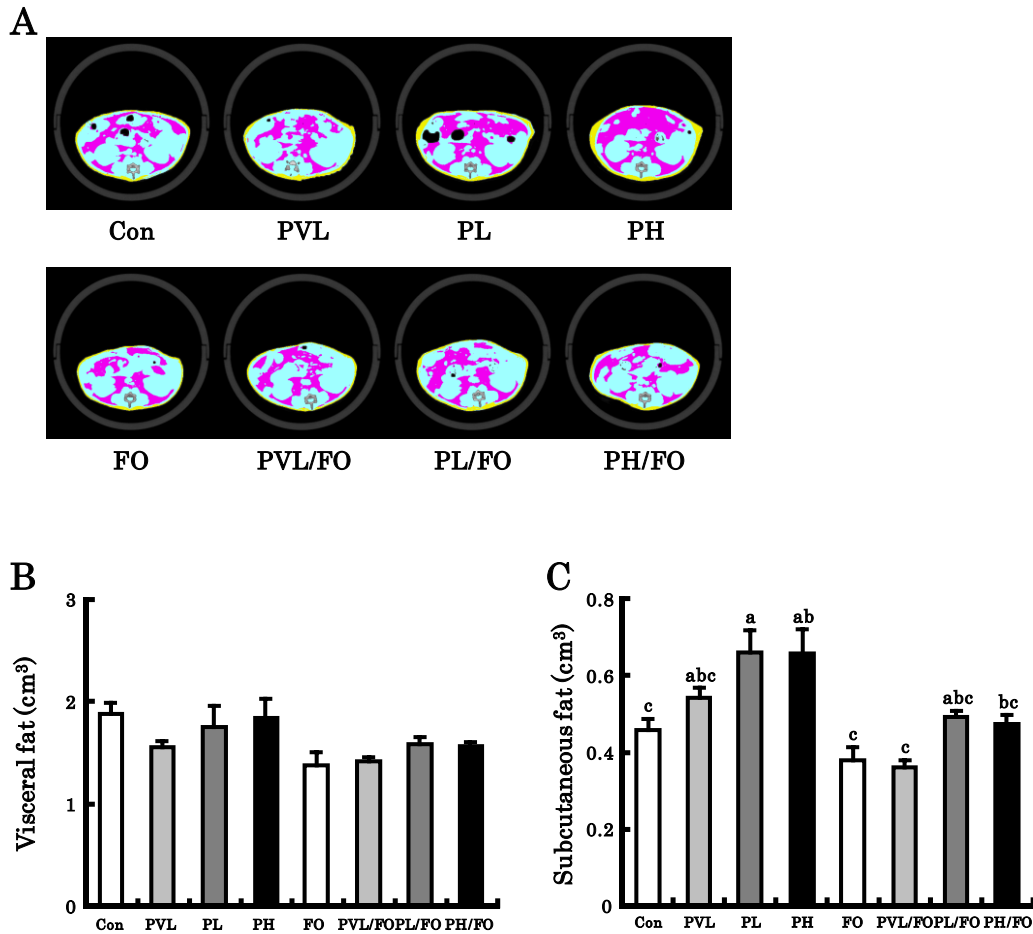


Figure 22. X-ray CT images, visceral fat masses, and subcutaneous fat masses in 48-week-old male KK mice.

X-ray CT images (A), visceral fat masses (B) and subcutaneous fat masses (C). Representative images show X-ray CT scanned cross-sections from mice fed Con, PVL, PL, PH, FO, PVL/FO, PL/FO, and PH/FO diets for 8 weeks. The colored areas show visceral fat (pink) and subcutaneous (yellow). Visceral fat and subcutaneous fat masses are evaluated in abdominal area between second lumbar vertebra and fourth lumbar vertebra. Data are shown as mean ± SE, n = 4-5. Groups sharing different letters are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第2項 酸化ストレスおよび抗酸化能力の評価

加齢による酸化ストレスへの影響、およびピオグリタゾンと EPA・DHA の併用による抗酸化作用を検討するために、飼育開始時と飼育開始後 7 週目に d-ROMs テストと BAP テストをおこない、結果を Fig. 23 に示す。本章の第 1 項において、7 週齢の KK マウスにおける d-ROMs 値は 133.4 ± 4.8 U.CARR であり、今回の飼育開始時における d-ROMs 値は 216.8 ± 16.0 U.CARR であったことから、若齢成獣期と比較して加齢による酸化ストレスの増加したことが示された。しかし、すべての群で、7 週間のピオグリタゾンまたは EPA・DHA の投与による影響は認められなかった。BAP 値は、FO 群のみ有意に増加したが、その他の群は有意な変化はなかった。

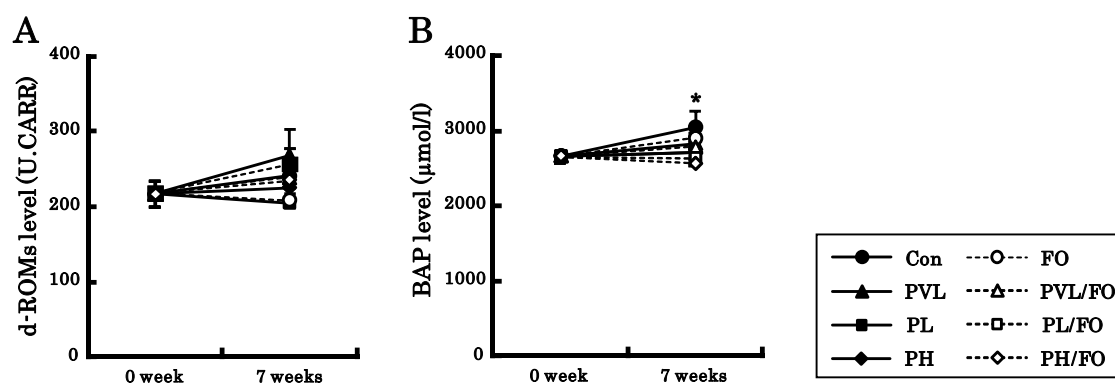


Figure 23. Plasma oxidative stress and anti-oxidative potential markers in 40 and 47-week-old male KK mice.

Plasma d-ROMs levels for oxidative marker (A) and BAP levels for anti-oxidative potential marker (B) at 0 and 7 weeks after the beginning of experimental period. Data are represented as mean \pm SE, $n = 5-6$. *: $P < 0.05$, FO group in comparison with 0 week by Tukey-Kramer test.

第3項 血糖値、HOMA-IR、血漿中パラメータおよびインスリン負荷試験(ITT)

血糖値、HOMA-IR および血漿中パラメータの結果を Table 22 に示す。血糖値は、Con 群と比較してすべての群間で有意な変化はなかったが、FO 群は減少傾向があった($P = 0.0567$)。インスリン値は、Con 群と比較して PL、PH、PL/FO 群で有意な減少、PH/FO 群は減少傾向($P = 0.0520$)がみられた。HOMA-IR は、Con 群と比較して PL、PH、PVL/FO 群で有意な減少、PL/FO、PH/FO 群は減少傾向($P = 0.0552$ 、 0.0505)がみられた。特に、PVL/FO 群の HOMA-IR は Con 群の 15%まで低下した。アディポネクチン値は、Con 群と比較して PL 群は増加傾向($P = 0.0597$)、PH、PL/FO、PH/FO 群では有意な増加がみられ、さらに、PL/FO、PH/FO 群は、それぞれ PL、PH 群と比較して有意に高値であった。トリアシルグリセロール値は、Con 群と比較してすべての群で有意な変化はなかったが、PH/FO 群でのみ減少傾向($P = 0.0662$)があった。総コレステロール値は、Con 群と比較して EPA・DHA を投与した FO、PVL/FO、PL/FO、PH/FO 群で有意に減少した。遊離脂肪酸値は、Con 群と比較してピオグリタゾンの単独投与群すべてでおよそ 30%減少したが、有意な変化ではなかった。一方で、EPA・DHA を投与したすべての群では、Con 群と比較して有意な減少がみられた。thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)値は、すべての群間で有意な変化は認められなかったが、PH/FO 群は Con 群と比較して減少傾向($P = 0.0737$)がみられた。飼育開始後 6 週目におこなった ITT の結果では、インスリン負荷後 30 分時と 60 分時においては、Con 群と比較してすべての群で有意な差はなかったが、120 分時には、PH/FO 群のみで有意な低下がみられた(Fig. 24)。

Table 22. Blood glucose, HOMA-IR, and plasma parameters in 48-week-old male KK mice.

	Con	PVL	PL	PH	FO	PVL/FO	PL/FO	PH/FO
Blood glucose (mg/dl)	159 ± 16 ^{ab}	157 ± 29 ^{ab}	170 ± 20 ^a	161 ± 14 ^a	82 ± 9 ^b	151 ± 21 ^{ab}	151 ± 13 ^{ab}	114 ± 5 ^{ab}
Plasma insulin (ng/ml)	28.0 ± 7.2 ^a	15.1 ± 6.1 ^{ab}	3.8 ± 1.4 ^b	3.5 ± 1.2 ^b	19.3 ± 6.0 ^{ab}	4.5 ± 1.3 ^b	6.0 ± 3.3 ^b	8.3 ± 2.9 ^{ab}
HOMA-IR	1.00 ± 0.30 ^a	0.62 ± 0.30 ^{ab}	0.14 ± 0.04 ^b	0.12 ± 0.04 ^b	0.38 ± 0.12 ^{ab}	0.15 ± 0.03 ^b	0.24 ± 0.15 ^{ab}	0.23 ± 0.09 ^{ab}
Plasma adiponectin (µg/ml)	8.3 ± 0.6 ^d	11.4 ± 0.8 ^d	21.2 ± 4.0 ^{cd}	32.3 ± 5.2 ^{bc}	8.7 ± 0.9 ^d	19.5 ± 1.8 ^{cd}	43.9 ± 3.3 ^b	60.0 ± 4.1 ^a
Plasma TG (mg/dl)	78 ± 7 ^{ab}	83 ± 6 ^a	82 ± 12 ^a	75 ± 5 ^{ab}	71 ± 7 ^{ab}	69 ± 3 ^{ab}	62 ± 3 ^{ab}	51 ± 2 ^b
Plasma TC (mg/dl)	127 ± 7 ^{ab}	114 ± 7 ^{bc}	132 ± 3 ^{ab}	157 ± 18 ^a	93 ± 4 ^{cd}	79 ± 2 ^d	70 ± 3 ^d	64 ± 3 ^d
Plasma FFA (mEq/l)	1.01 ± 0.18 ^a	0.73 ± 0.03 ^{ab}	0.74 ± 0.08 ^{ab}	0.72 ± 0.06 ^{ab}	0.56 ± 0.07 ^b	0.50 ± 0.03 ^b	0.47 ± 0.03 ^b	0.45 ± 0.05 ^b
Plasma TBARS (µM)	13.9 ± 1.4	12.1 ± 1.5	11.8 ± 1.3	10.9 ± 1.1	9.9 ± 0.7	13.4 ± 1.4	10.2 ± 1.3	8.8 ± 0.3

Data are represented as mean ± SE, n = 5-6. Groups sharing different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test. HOMA-IR are shown as the ratio to the Con group (273.7 ± 81.8).

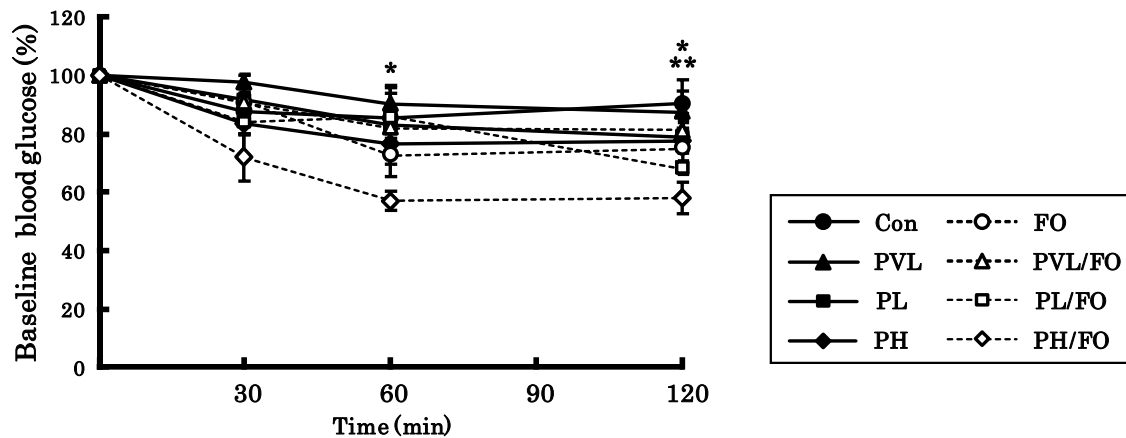


Figure 24. Insulin tolerance test (ITT) in 46-week-old male KK mice.

Blood glucose levels during ITT that was performed by intraperitoneal injection of an insulin solution (0.75 U/kg) after 3 h of fasting. Data are represented as mean \pm SE, $n = 6$. The Tukey-Kramer test was used for statistical analyses. *, $P < 0.05$ for comparison between PVL and PH/FO groups; **, $P < 0.05$ for comparison between Con and PH/FO groups.

第4項 肝臓の形態、組織解析および肝臓中脂質値

肝臓外見、H&E 染色による肝臓の組織解析、肝臓中脂質値の結果を Fig. 25 に示す。形態観察において、Con、PVL、PL 群の肝臓は白く変色し、さらに、PVL 群の肝臓は最も肥大化していたが、その他の群でこのような変化は認められなかった。肝臓の組織切片では、PVL 群および PL 群は、Con 群と比較して脂肪滴の蓄積痕が多く確認されたが、PH 群および EPA・DHA の投与群は Con 群と同程度であった。肝臓のトリアシルグリセロール含量は、Con 群と比較して PVL 群で 170.8% の有意な増加、PL 群で 130.5% の増加傾向 ($P = 0.0760$) がみられたが、このような増加は EPA・DHA を併用することで有意に抑制された。一方、PH、FO、PVL/FO 群は、Con 群と比較して有意な変化はみられなかった。肝臓の総コレステロール含量は、Con 群と比較して、PH 群および EPA・DHA の投与群で有意に低下した。

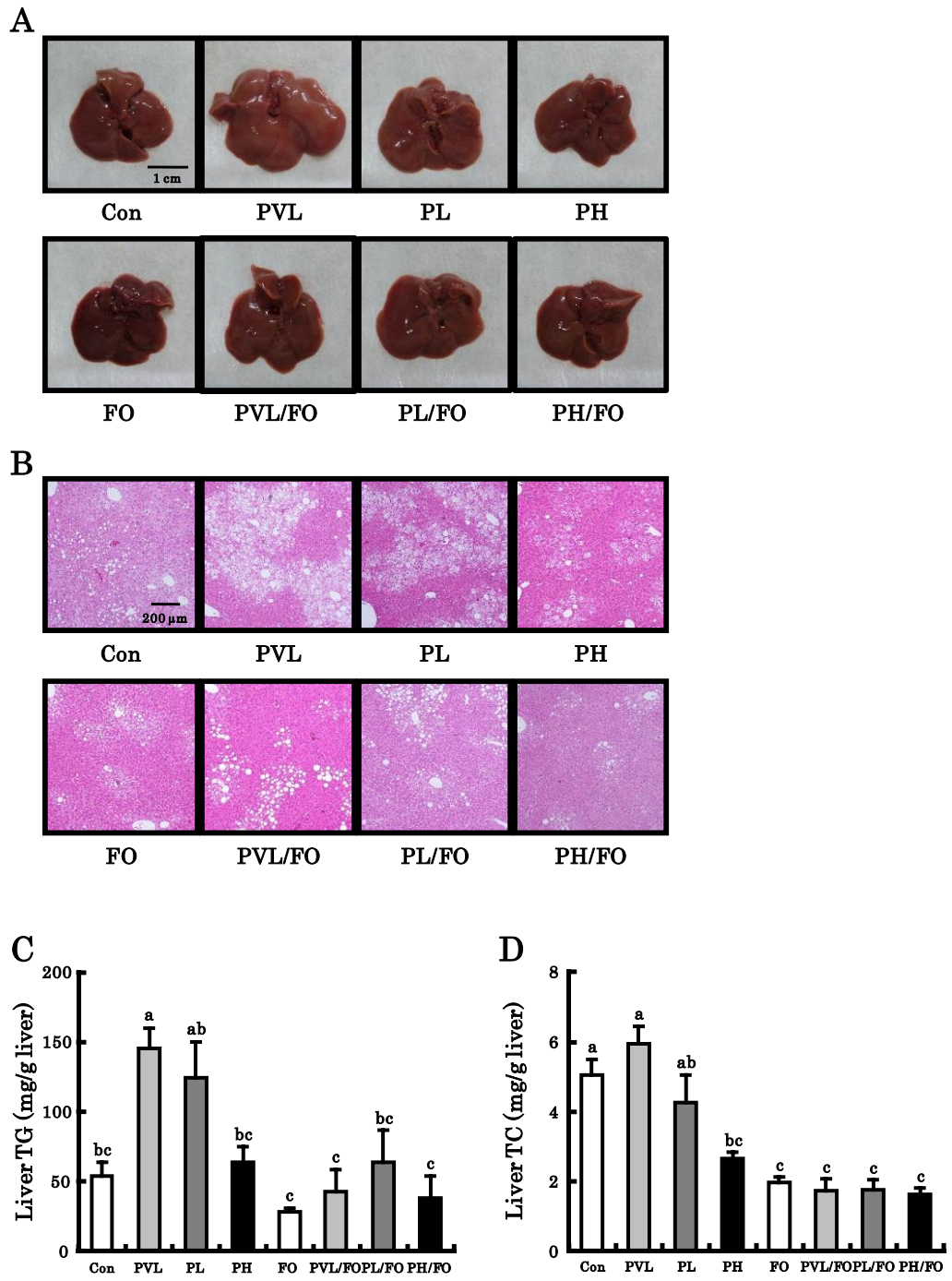


Figure 25. Liver morphology, liver histological sections, and liver lipid parameters in 48-week-old male KK mice. Liver morphology (A), liver histology (B), liver triacylglycerol levels (C), and liver total cholesterol levels (D). Representative macroscopic liver images and tissue sections from mice fed Con, PVL, PL, PH, FO, PVL/FO, PL/FO, and PH/FO diets for 8 weeks. Sections were stained by H&E and examined under a microscope at 100-fold magnification. Data are represented as mean \pm SE, $n = 5-6$. Groups sharing different letters are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第5項 肝臓中遺伝子発現およびタンパク質発現

脂質代謝に関与する肝臓中の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法、タンパク質発現をウェスタンブロット法で測定し、結果を Table 23 と Fig. 26 に示す。FAS の mRNA レベルは、Con 群と比較して、PVL 群および PL 群では有意な差はなかったが、PH 群は有意に増加した。また、EPA・DHA の併用群である PL/FO、PH/FO 群は、PL、PH 群と比較して有意に低下したが、PVL/FO 群と PVL 群の間に有意な差はなかった。FAS のタンパク質発現は、Con 群と比較してピオグリタゾンの投与による影響はみられなかったが、EPA・DHA を投与したすべての群では顕著な低下が認められた。SCD-1 の mRNA レベルは、Con 群と比較して、有意な変化ではないが PVL 群および PL 群でおよそ 1.6 倍に増加し、PH 群においては 1.9 倍に有意に増加した。一方、EPA・DHA の投与群は、Con 群の mRNA レベルに対しておよそ 0.2 倍程度であり、さらに、すべての非投与群と比較しても有意に低下した。SCD-1 のタンパク質発現は、Con 群と比較してピオグリタゾンの投与により増加し、特に PVL 群はその増加が顕著であったが、mRNA レベルと同様に EPA・DHA を併用することで強く抑制された。ACC の mRNA レベルはピオグリタゾンの投与による影響はみられなかったが、EPA・DHA の投与により、Con 群と比較して有意な低下または低下傾向($P = 0.0930$)を示した。AOX の mRNA レベルは、Con 群と比較して、PVL 群は有意な変化ではなかったがおよそ 1.5 倍の増加、PL、PH 群はおよそ 1.7 倍の増加傾向($P = 0.0772$ 、 0.0818)、FO 群はおよそ 2 倍の有意な増加が認められた。さらに、EPA・DHA の併用群は、ピオグリタゾンの単独投与群と比較して有意に高値であった。AOX のタンパク質発現も mRNA レベルと同様の傾向を示し、特にピオグリタゾンと EPA・DHA の併用群では著しい増加が認められた。UCP-2 の mRNA レベルは、すべての群間で有意な変化はなかった。MCAD の mRNA レベルは、Con 群と比較して、有意な変化ではなかったが PL、PH、FO 群で 1.7~1.9 倍に増加し、併用群である PVL/FO、PL/FO、PH/FO 群は、2.6~2.9 倍の有意な増加がみられた。MCAD のタンパク質発現は、Con 群と比較して PL、PH、PVL/FO、PL/FO、PH/FO 群で増加し、PL/FO、PH/FO 群は、それぞれ単独投与群と比較して明らかに増加した。

Table 23. Liver mRNA levels in 48-week-old male KK mice.

	Con	PVL	PL	PH	FO	PVL/FO	PL/FO	PH/FO
Lipogenesis								
FAS	1.00 ± 0.07 ^{bc}	0.87 ± 0.12 ^{bcd}	1.32 ± 0.20 ^{ab}	1.50 ± 0.10 ^a	0.47 ± 0.05 ^d	0.55 ± 0.06 ^{cd}	0.67 ± 0.12 ^{cd}	0.46 ± 0.02 ^d
SCD-1	1.00 ± 0.21 ^b	1.56 ± 0.24 ^{ab}	1.60 ± 0.20 ^{ab}	1.91 ± 0.20 ^a	0.23 ± 0.06 ^c	0.21 ± 0.03 ^c	0.23 ± 0.04 ^c	0.24 ± 0.04 ^c
ACC	1.00 ± 0.09 ^{ab}	0.94 ± 0.09 ^{abc}	1.07 ± 0.10 ^a	1.08 ± 0.06 ^a	0.59 ± 0.06 ^d	0.67 ± 0.02 ^{bcd}	0.66 ± 0.02 ^{cd}	0.61 ± 0.10 ^{cd}
Fatty acid β-oxidation and energy consumption								
AOX	1.00 ± 0.10 ^d	1.45 ± 0.10 ^{cd}	1.68 ± 0.17 ^{cd}	1.71 ± 0.14 ^{cd}	1.95 ± 0.17 ^c	2.87 ± 0.20 ^b	2.97 ± 0.13 ^{ab}	3.60 ± 0.23 ^a
UCP-2	1.00 ± 0.26	1.55 ± 0.16	1.45 ± 0.25	1.25 ± 0.14	0.94 ± 0.14	1.03 ± 0.16	1.34 ± 0.23	1.38 ± 0.19
MCAD	1.00 ± 0.23 ^c	1.18 ± 0.26 ^c	1.68 ± 0.19 ^{bc}	1.83 ± 0.24 ^{abc}	1.88 ± 0.16 ^{abc}	2.63 ± 0.14 ^{ab}	2.91 ± 0.32 ^a	2.62 ± 0.35 ^{ab}

Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the Con group. Data are represented as mean \pm SE, n = 5-6. Groups with different letters in a row are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

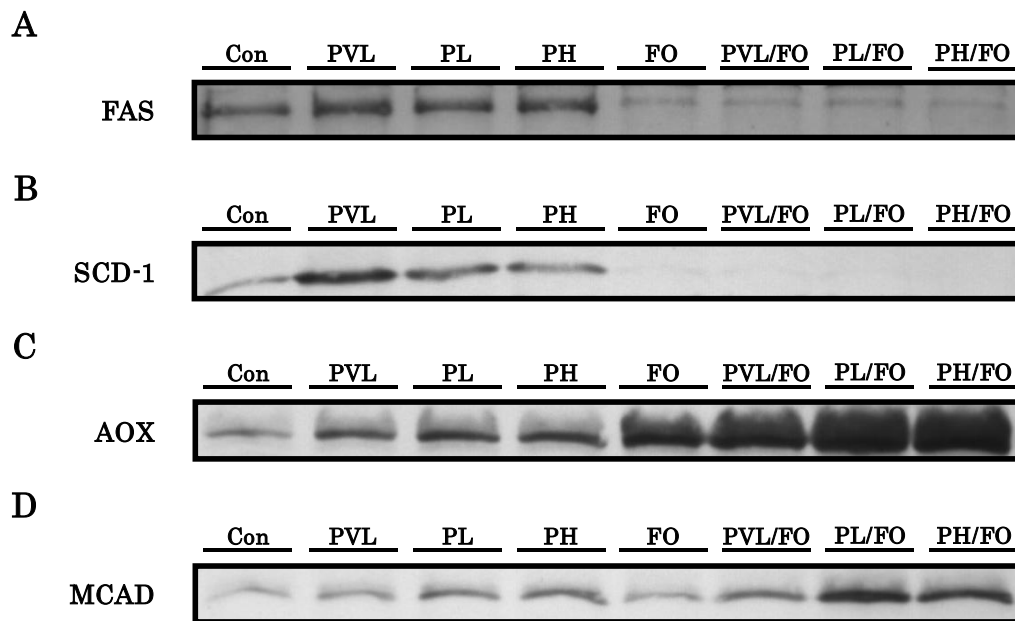


Figure 26. Liver protein expressions in 48-week-old male KK mice.

FAS expressions (A), SCD-1 expressions (B), AOX expressions (C), and MCAD expressions (D). The livers for each group (n = 5-6) were pooled. All protein expressions were detected by Western blot analysis.

第6項 脂肪細胞の形態学的解析

H&E染色を施した副睾丸周囲白色脂肪組織切片を用いた脂肪細胞の形態学的解析の結果を Fig. 27 に示す。脂肪細胞の平均面積は、Con 群と比較してピオグリタゾンまたは EPA・DHA の投与により有意に減少した。また、併用群である PVL/FO、PL/FO、PH/FO 群は、それぞれ PVL、PL、PH 群と比較して、有意に低値であった(Fig. 27B)。白色脂肪細胞面積の分布において、Con 群は 6400-8100 μm^2 の割合が最も多く、他の群と比べ 6400 μm^2 以上の比較的大型の脂肪細胞が多数確認された。ピオグリタゾンを単独投与した群の脂肪細胞は、3600-4900 μm^2 の割合が最も多く、6400 μm^2 以上の脂肪細胞の割合は Con 群と比較して減少した。一方、EPA・DHA を投与した群は 2500-3600 μm^2 の割合が最も多く、特に PL/FO 群および PH/FO 群は、6400 μm^2 以上の脂肪細胞の割合が最も少なかった(Fig. 27C)。

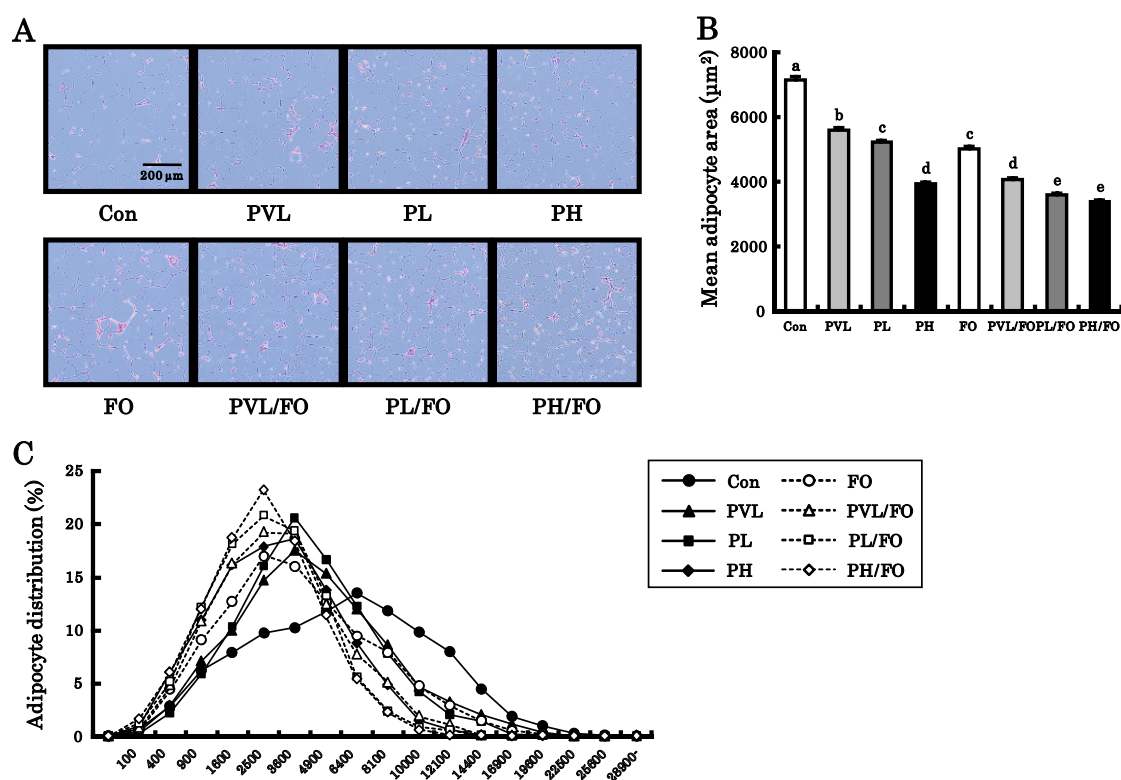


Figure 27. Morphological analysis of epididymal white adipose tissue in 48-week-old male KK mice. Epididymal white adipose tissue histological sections (A), mean adipocyte areas (B), and adipocyte distributions (C). Representative sections from mice fed Con, PVL, PL, PH, FO, PVL/FO, PL/FO, and PH/FO diets for 8 weeks. Sections were stained by H&E and examined under a microscope at 100-fold magnification. Scale bar, 200 μm . Data are represented as mean \pm SE, $n = 5-6$. Groups with different letters are different at $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第 7 項 白色脂肪組織中遺伝子発現

副睪丸周囲白色脂肪組織中の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で測定し、結果を Table 24 に示す。TNF- α の mRNA レベルは、PVL/FO 群のみ高値を示し、すべての群間で有意な変化はみられなかった。一方、IL-6 および MCP-1 の mRNA レベルは、Con 群と比較してすべての群で低下したが、これらは有意な変化ではなかった。

Table 24. Epididymal white adipose tissue mRNA levels in 48-week-old male KK mice.

	Con	PVL	PL	PH	FO	PVL/FO	PL/FO	PH/FO
Inflammation								
TNF- α	1.00 \pm 0.25	1.17 \pm 0.50	1.36 \pm 0.45	1.22 \pm 0.38	1.27 \pm 0.52	2.47 \pm 0.89	0.90 \pm 0.24	0.84 \pm 0.17
IL-6	1.00 \pm 0.55	0.31 \pm 0.13	0.51 \pm 0.28	0.34 \pm 0.13	0.32 \pm 0.14	0.47 \pm 0.17	0.48 \pm 0.19	0.67 \pm 0.28
MCP-1	1.00 \pm 0.48	0.48 \pm 0.13	0.44 \pm 0.15	0.45 \pm 0.13	0.45 \pm 0.16	0.39 \pm 0.10	0.29 \pm 0.09	0.52 \pm 0.16

Results are expressed as the ratio of the obtained value to that of the Con group. Data are represented as mean \pm SE, n = 5-6. Significant differences among groups were analyzed by Tukey-Kramer test.

第 8 項 膵臓の組織学的解析および形態学的解析

膵臓ランゲルハンス島の組織切片に H&E 染色およびインスリンの免疫染色を施し、第 2 章と同様の方法で組織解析および形態学的解析をおこない、結果を Fig. 28 に示す。ランゲルハンス島の平均面積は、すべての群間で有意な変化はみられなかった。ランゲルハンス島面積の分布において、ピオグリタゾンの投与群における 50000 μm^2 以上のランゲルハンス島の割合は Con 群と同程度であった。一方、10000 μm^2 未満の割合は、Con 群と比較して PL 群および PH 群で、それぞれ 8.5%、12.6%増加した。これに対し、EPA・DHA の併用時は、ピオグリタゾンの単独投与時と比較して PL/FO 群および PH/FO 群の割合に大きな変化はみられなかったが、PVL/FO 群では 14.5%の増加が認められた。膵 β 細胞の面積は、Con 群と比較してすべての群で増加したが、これらの群間で有意な差はなかった。

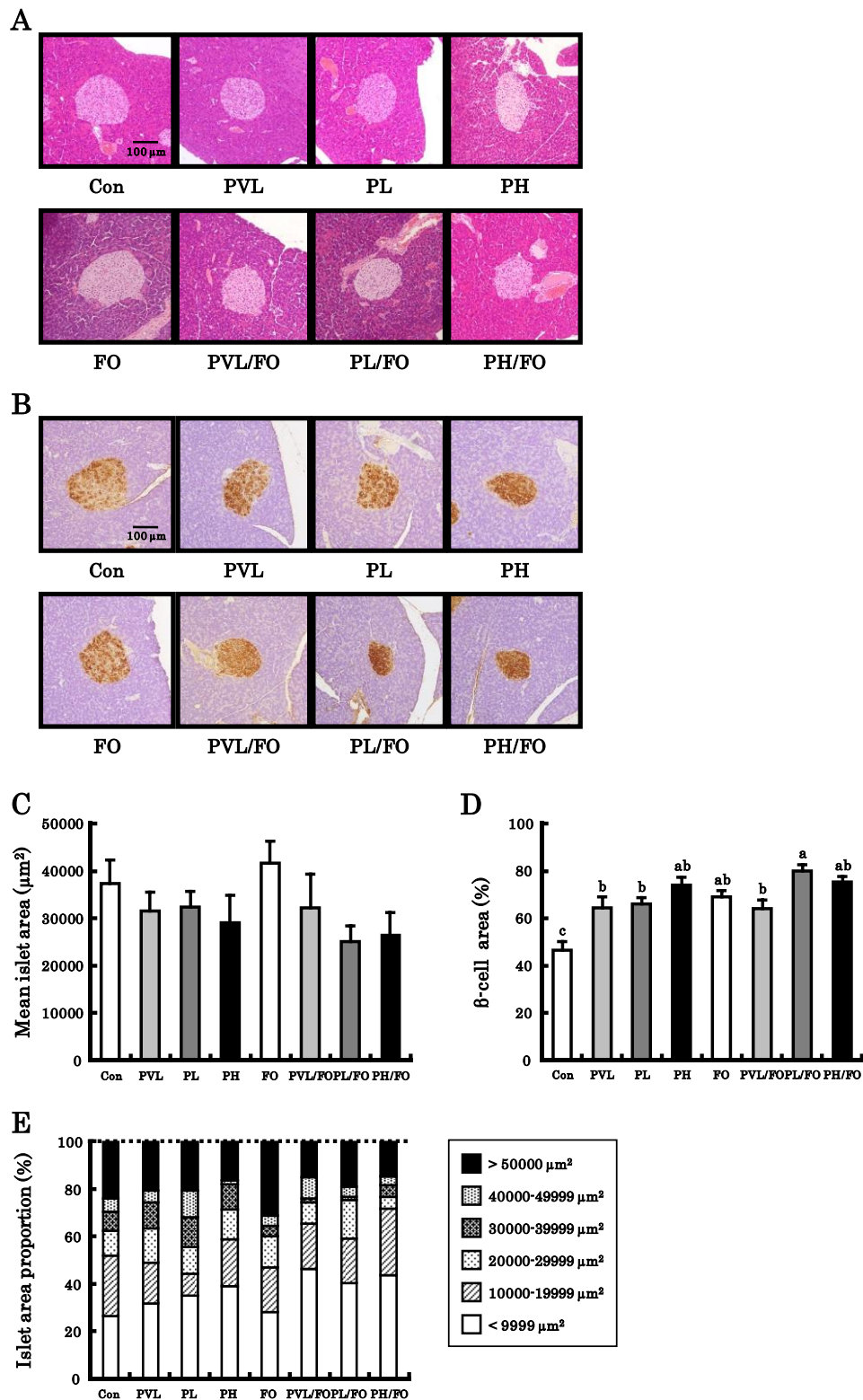


Figure 28. Morphological analysis of pancreatic islets in 48-week-old male KK mice. Islet images of H&E staining (A), insulin immunostaining (B), mean islet areas (C), percentages of β -cell area (D), and islet area proportions (E) in mice fed Con, PVL, PL, PH, FO, PVL/FO, PL/FO, and PH/FO diets for 8 weeks. Magnification, $\times 200$. Scale bar, $100\mu\text{m}$. Data except for (E) are represented as mean \pm SE, $n = 5-6$. Groups with different letters are significantly different: $P < 0.05$ by Tukey-Kramer test.

第9項 ピオグリタゾンの投与量減少に対する n-3 系 PUFA (EPA・DHA)の有効性の検討に関する考察

本研究は、加齢による生理機能の低下および薬物動態の変化が、薬物治療をおこなう上で副作用の発生リスクを高めるという問題に対して、高齢者の糖尿病に特徴的である膵β細胞の機能低下ならびに低血糖の発生頻度の上昇に着目し、これらへの影響が少ないチアゾリジン薬と n-3 系脂肪酸製剤を併用することで、従来の糖尿病治療薬の効果を維持しながら投薬量を減少させ、副作用の発現を抑制する新たな治療戦略を提案することを目的とした。

インスリンの分泌促進を作用機序とするスルホニル尿素薬やグリニド薬は、他の経口糖尿病薬より低血糖のリスクが高く、膵β細胞の疲弊により機能障害を発生させることが報告されている¹¹³⁾。このことから、高齢糖尿病患者の薬物治療には、インスリン抵抗性の改善を作用機序とし、膵β細胞の機能維持効果が期待されるチアゾリジン薬を用いることが望ましいと考えられる。今回の検討では、脂肪エネルギー比率 20 en%の実験飼料によりエネルギー摂取が過剰である条件においても、Con 群と比べピオグリタゾンの投与によりランゲルハンス島の膵β細胞の割合が増加し、0.006 wt%および 0.012 wt%の用量によるインスリン抵抗性改善作用が確認できた。ただし、これらの用量では皮下脂肪蓄積と体重増加が確認されたことから、ピオグリタゾンの投与量はインスリン抵抗性改善作用を発現する用量であったが、エネルギー消費量よりエネルギー摂取量が多かったことで、それらの副作用が生じたと考えられた。一方、0.003 wt%のピオグリタゾンの投与は、0.006 wt%または 0.012 wt%の投与時と比べて皮下脂肪面積や体重の変化が少なかったが、インスリン抵抗性改善効果が認められなかった。しかし、0.003 wt%のピオグリタゾンと EPA・DHA を併用することにより、血漿インスリン値および HOMA-IR の有意な低下がみられ、膵β細胞の肥大化も抑制された。これらのことから、ピオグリタゾン単独で薬物治療をおこなう場合、エネルギーコントロールが不十分である時には、治療効果を維持しつつ、副作用を抑えるためには厳密な用量設定と管理が必要であると考えられた。さらに、ピオグリタゾンに EPA・DHA を併用することは、皮下脂肪蓄積や体重増加がみられる用量に対しては抑制的に作用するだけでなく、ピオグリタゾンの投与量がインスリン抵抗性改善効果を発現しない用量であっても、インスリン抵抗性改善効果を増強しうることを示唆された。

緒言で述べたように、チアゾリジン薬のインスリン抵抗性改善作用は、脂肪細胞の小型化を介したアディポネクチン分泌の増加に起因している²²⁾。本研究でも、PL、PH、PVL/FO、PL/FO、PH/FO 群は、ピオグリタゾンの投与により血漿アディポネクチン値が増加したことによって、血漿インスリン値および HOMA-IR が低下したと考えられた。くわえて、PVL/FO 群の血漿アディポネクチン値は PVL 群のおよそ 2 倍に増加しており、0.003 wt%のピオグリタゾンと EPA・DHA の併用時に認められたインスリン抵抗性の改善に、アディポネクチン値の増加が関与していることが示唆された。一方、0.006 wt%および 0.012 wt%

のピオグリタゾンに EPA・DHA を併用した場合、血漿アディポネクチン値が 2 倍近く増加したにもかかわらず、血漿インスリン値および HOMA-IR はインスリン抵抗性改善効果がみられた非併用群と同等であり、この傾向は第 1 章における若齢成獣期の KK マウスを用いた検討においても観察された。したがって、雄性 KK マウスにおけるインスリン抵抗性改善作用に対して、ピオグリタゾンまたは EPA・DHA の併用による血漿アディポネクチン値の増加は必要であるが、その血漿レベルに正相関していないことが示唆された。しかし、ヒトを対象とした研究では、血漿アディポネクチン値が高く、インスリン感受性が維持されている高齢者は健康かつ長寿であることが報告されており、これはアディポネクチンのインスリン抵抗性改善作用、抗炎症作用と抗動脈効果作用が関与していることが示唆されている¹¹⁴⁻¹¹⁶)。このことから、ピオグリタゾンと EPA・DHA を併用することで血漿アディポネクチン値が増加することは、高齢糖尿病患者に対する動脈硬化進展の抑制、大血管障害の予防という観点で有益であると考えられる。

本研究では、第 1 章においてピオグリタゾンの単独投与が、若齢成獣期の KK マウスの肝臓脂肪蓄積を誘導することを確認した。このような所見は、加齢 KK マウスを用いた本章の試験でも観察され、PVL 群と PL 群の肝臓中トリアシルグリセロール含量は Con 群の 2 倍以上であった。しかし、これらの群は肝臓における SCD-1 のタンパク質発現と皮下脂肪量に差がみられ、SCD-1 発現は PL 群より PVL 群の方が顕著であったことに対して、皮下脂肪蓄積は PL 群のみ認められた。トリアシルグリセロール合成の律速酵素である diacylglycerol acyltransferase (DGAT) は、SCD-1 によってパルミチン酸(C16:0)から合成される、オレイン酸(C18:1)などの一価不飽和脂肪酸を主な基質としていることから¹¹⁷)、PVL 群でみられた肝臓脂肪蓄積は SCD-1 の発現増加による脂肪合成の亢進が原因であると考えられた。しかし、オレイン酸の前駆体であるパルミチン酸(C16:0)も、トリアシルグリセロール合成の基質となることにくわえ、DGAT の活性化を介したトリアシルグリセロール合成の促進作用があることが報告されている¹¹⁸)。したがって、0.006 wt% のピオグリタゾンを投与した場合は、0.003 wt% の投与時と比較して SCD-1 誘導性の脂肪合成は減弱したが、これだけでは最終的なトリアシルグリセロール含量に大きな影響を与えなかったことが推察された。興味深いことに、PH 群の皮下脂肪面積と SCD-1 のタンパク質発現は、ともに PL 群と同程度であったが、ピオグリタゾンによる肝臓脂肪蓄積は認められなかった。PPAR γ アゴニストは、皮下脂肪組織のみならず褐色脂肪組織への FFA 取り込みを亢進し、その重量を増加させることが報告されている¹¹⁹)。本研究でも、PVL 群および PL 群と比較して、PH 群の褐色脂肪組織重量が有意に増加していたことから、0.012 wt% のピオグリタゾンの投与時は、肝臓由来の FFA が皮下脂肪組織と褐色脂肪組織の両方に輸送された結果、肝臓中のトリアシルグリセロール含量が低下したと考えられた。

以上のように、肝臓、皮下脂肪組織および褐色脂肪組織に対するピオグリタゾンの作用は、投与量によって異なることが推察されるが、いずれの場合にも EPA・DHA を併用することで、肝臓または皮下脂肪組織の脂肪蓄積を抑制することができた。この抑制作用のメカニズム

ムの1つとして、第1章で述べたように脂肪酸合成系遺伝子およびタンパク質発現の低下が関与していることが考えられる。しかし、若齢成獣期のKKマウスを用いた第1章では、脂肪酸 β 酸化に関与する遺伝子およびタンパク質発現においてEPA・DHAの併用による影響は認められなかったことに対し、加齢KKマウスを用いた本章では、ピオグリタゾンまたはEPA・DHAの単独投与により肝臓のAOXとMCADのタンパク質発現が亢進し、併用時は相加的な増加が確認された。このことから、加齢KKマウスにピオグリタゾンとEPA・DHAを併用した場合は、肝臓の脂肪酸合成抑制にくわえ、脂肪酸 β 酸化の亢進によりピオグリタゾンによる皮下脂肪蓄積を低減したと考えられる。ヒトを対象とした研究では、高齢者がEPA・DHAを摂取する場合、成人と比べて血中TGおよび脂肪組織におけるEPA・DHAの含有量が高くなることが報告されている¹²⁰⁾。また、EPA・DHAによる肝臓中の脂肪酸 β 酸化亢進作用を発現させるためには、脂肪酸合成抑制作用と比べて高用量のEPA・DHAが必要となることが明らかになっている²⁵⁾。そのため、第1章と本章でEPA・DHAの肝臓脂肪蓄積抑制メカニズムに差が生じた要因として、加齢により摂取したEPA・DHAが体内に蓄積しやすくなった結果、脂肪酸 β 酸化亢進作用がより強く発現したことが推察された。AOXとMCADを含む β 酸化関連酵素の遺伝子発現は、核内転写因子であるPPAR α によって制御されているが、加齢に伴いPPAR α の発現は減少し、これによる脂肪酸 β 酸化能の低下はインスリン抵抗性や脂質代謝異常の原因となる^{110, 121, 122)}。したがって、高齢糖尿病患者に対するピオグリタゾンとEPA・DHAの併用は、肝臓の脂肪酸 β 酸化能を維持することで、糖尿病の悪化や他の生活習慣病の合併を予防することにもつながる可能性がある。

高齢者における耐糖能悪化の原因として、上述した脂肪酸 β 酸化能の低下にくわえ、骨格筋の減少や脂肪組織の比率増加といった体組成の変化⁴⁴⁾、 β 細胞の疲弊によるインスリン分泌異常¹²³⁾、酸化ストレス障害¹⁰⁴⁾、脂肪組織の慢性的な炎症などが挙げられる¹²⁴⁾。チアゾリジン薬とEPA・DHAを多く含む魚油は、それぞれアディポネクチンまたは抗酸化酵素の増加を介した、活性酸素種と過酸化脂質の低下作用が報告されている^{125, 126)}。また、第1章の若齢成獣KKマウスを用いた検討により、ピオグリタゾンとEPA・DHAの併用は脂肪細胞の炎症を低減できることが明らかとなった。これらのことから、ピオグリタゾンとEPA・DHAを併用することで、加齢に伴って増加する酸化ストレスと脂肪組織の炎症が低減できれば、高齢者における糖尿病の治療に有益であると考えた。しかし、加齢KKマウスを用いた今回の検討では、d-ROMs、BAP、TBARS値および副睾丸周囲白色脂肪組織の炎症性サイトカインの遺伝子発現において、ピオグリタゾンとEPA・DHAの投与による有意な変化は認められなかった。本章の第1項において、7週齢のKKマウスにおけるd-ROMs値は 133.4 ± 4.8 U.CARRであったが、40週齢まで飼育すると 239.4 ± 33.1 U.CARRまで上昇することが示された。今回の検討では7週齢におけるd-ROMs値の測定をおこなっていないが、実験開始時の値が 216.8 ± 16.0 U.CARRであったことから、加齢に伴う酸化ストレスの増加が十分に誘導されていたと考えた。このような酸化ストレスの増加にくわえ

て、脂肪組織の炎症も加齢とともに増加することから、実験開始時の 40 週齢の時点において酸化ストレスはすでに高く、また、副睪丸周囲白色脂肪組織の炎症も慢性化していたと考えられ、8 週間の投与では酸化ストレスと炎症への有益な改善効果が十分でなかった可能性がある。また、本章で確認されたインスリン抵抗性改善効果に対して、酸化ストレスと脂肪細胞の炎症は大きく関与していないことが示唆された。

第4節 小括

第3章では、40週齢の雄性KKマウスにピオグリタゾンとEPA・DHAを8週間併用させ、第1章および第2章で明らかにした、糖・脂質代謝改善作用、脂肪細胞の肥大化抑制作用、脂肪組織における抗炎症作用および膵臓の保護作用を確認し、インスリン抵抗性の改善に対して有効量未満のピオグリタゾンにEPA・DHAを併用することでインスリン抵抗性改善効果が得られるか、ピオグリタゾンによる皮下脂肪蓄積を伴う体重増加を低減できるか検討した。

その結果、顕著な皮下脂肪蓄積は認められないが十分なインスリン抵抗性改善作用が得られない0.003 wt%のピオグリタゾンに対し、 1.28 ± 0.03 g/kg/dayのEPA・DHAを併用することにより0.006 wt%および0.012 wt%と同等のインスリン抵抗性改善効果が得られることが明らかになった。これは、EPA・DHAの投与により血漿アディポネクチン値が増加することにくわえ、肝臓の脂肪酸合成抑制と脂肪酸の β 酸化亢進をもたらし、ピオグリタゾンによる肝臓脂肪蓄積が抑制されたことによると考えられた。また、これらの肝臓に対する作用は、加齢KKマウスに対しても、0.006 wt%および0.012 wt%のピオグリタゾンによる皮下脂肪蓄積を伴う体重増加を、EPA・DHAが低減することが推察された。以上のことから、EPA・DHAの併用は、皮下脂肪蓄積や体重増加がみられる用量に対しては抑制的に作用するだけでなく、ピオグリタゾンの投与量がインスリン抵抗性を改善しない用量であっても、副作用を発現せずにインスリン抵抗性改善効果を増強できる可能性が示された。また、本研究ではピオグリタゾンおよびEPA・DHAによる脂肪細胞の肥大化抑制作用と膵 β 細胞の保護作用も確認された。しかし、加齢による体内の酸化ストレスおよび脂肪細胞の炎症の増加に対しては、ピオグリタゾンとEPA・DHAの投与による抑制・減少効果はみられなかった(Fig. 29)。

以上の結果により、ピオグリタゾンとn-3系脂肪酸製剤を併用することで、インスリン抵抗性改善効果を維持しつつピオグリタゾンの投薬量を減量できることが示唆された。これは、ピオグリタゾンによる薬物治療の効果を高めるだけでなく、体重増加によって日常生活や運動療法に支障が生じることを防ぎ、高齢者のQOLの維持・向上に役立つと考えられる。第3章で得られた知見は、高齢糖尿病患者に対する新しい糖尿病治療法の開発のための基礎データとして、その意義は大きいと考えられる。

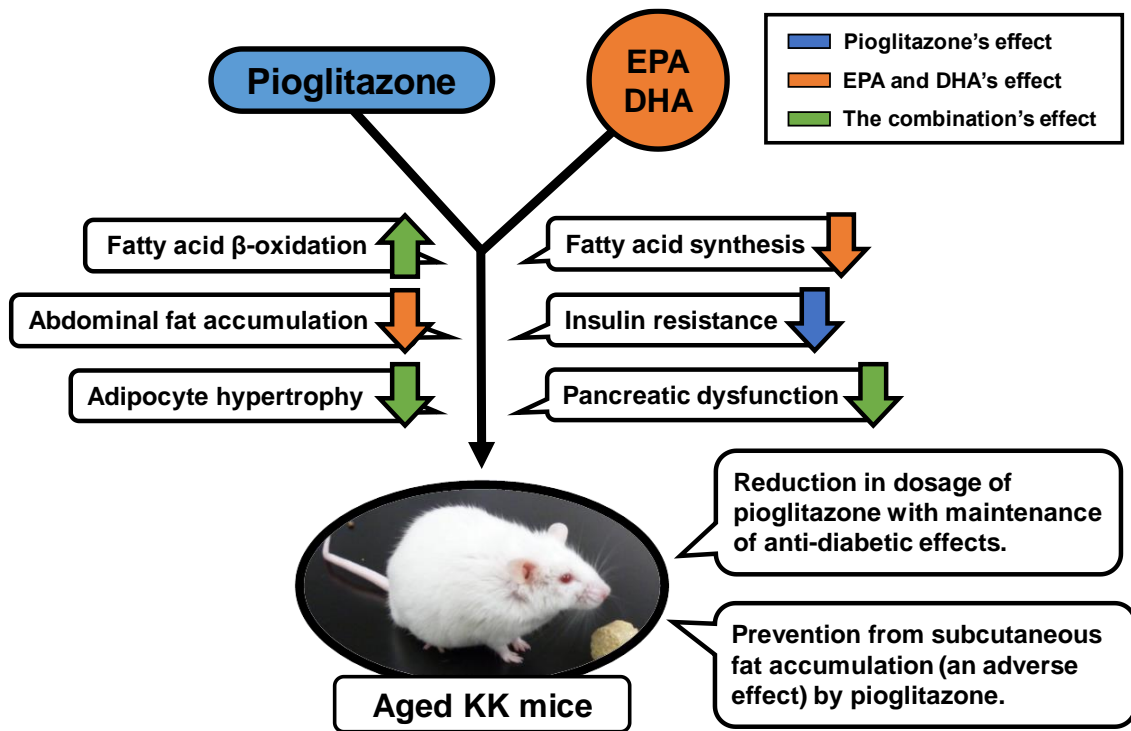


Figure 29. The Proposed benefits by the combination of pioglitazone and n-3 PUFA (EPA-DHA) on aged KK mice.

総括

PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン薬は、インスリン抵抗性の改善を目的とした糖尿病の薬物治療に用いられている。その作用メカニズムは、多量の脂肪を蓄積して肥大化した脂肪細胞に対するアポトーシスの誘導による大型脂肪細胞の減少と、前駆脂肪細胞の分化促進による小型脂肪細胞の増加を介して、インスリン抵抗性改善作用を有するアディポネクチンの分泌を増加させるというものである。しかし、食事療法および運動療法が十分に維持できず、エネルギーコントロールが不十分な患者が服用する場合、チアゾリジン薬により増加した小型脂肪細胞に脂肪が蓄積することで、副作用の 1 つである皮下脂肪蓄積を伴う体重増加が起こりやすくなる。これは、チアゾリジン薬の治療効果を減弱させるだけでなく、体重増加によって日常生活や運動療法に障害を来し、糖尿病の治療に悪影響を及ぼす。チアゾリジン薬による副作用の発生リスクは、総使用量が多いほど高まることが報告されており、加齢によって薬の副作用が発現しやすくなる高齢者に使用する場合は、特に投薬量を留意しなければならない。一方で、膵臓の疲弊によるインスリン分泌能の低下、酸化ストレスおよび小胞体ストレスの増加といった、膵 β 細胞の障害に起因する糖尿病の悪化も問題となっており、これらのリスクは加齢に伴って増加することが知られている。本研究は、このような問題に対して、副作用の低減および膵臓の機能維持という観点で、チアゾリジン薬と n-3 系脂肪酸製剤を併用した新たな薬物治療のための基礎データを提供することを目的とし、チアゾリジン薬であるピオグリタゾン、EPA・DHA の供給源として DHA 濃縮魚油を用いて *in vivo* の検討をおこなった。

第 1 章では、若齢成獣期の雄性 KK マウスにピオグリタゾンと EPA・DHA を併用することで、インスリン抵抗性が改善し、肝臓における EPA・DHA の脂肪酸合成抑制を中心としたメカニズムにより肝臓の脂肪蓄積が低下するとともに、ピオグリタゾンによる皮下脂肪の蓄積が抑制された。さらに、脂肪組織の解析結果から、ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用は、内臓脂肪組織に対して脂肪細胞の肥大化と炎症に抑制的に作用することが明らかになった。これらの結果から、ピオグリタゾンによる薬物治療をおこなう際に、厳格なエネルギーコントロールが維持できない場合であっても、n-3 系脂肪酸製剤を併用することでピオグリタゾンによるインスリン抵抗性改善効果を維持したまま、副作用の 1 つである皮下脂肪蓄積を伴う体重増加を低減できることが示唆された。

第 2 章では、第 1 章と同様の若齢成獣期の KK マウスを用いて、ピオグリタゾン、EPA・DHA およびこれらを併用することによる膵臓保護効果を検討した。その結果、ピオグリタゾンによる膵臓ランゲルハンス島の肥大化の抑制作用、ピオグリタゾンと EPA・DHA による膵 β 細胞の減少と小胞体ストレスの増加に対する低減作用、EPA・DHA のランゲルハンス島のアポトーシス抑制作用を確認した。また、これらを併用した場合は、それぞれの改善効果によりランゲルハンス島の肥大化を効果的に抑制できることが明らかになった。

第 3 章では、加齢させた KK マウスに対して、第 1 章および第 2 章で確認されたピオグ

リタゾンと EPA・DHA の併用効果が得られるか確認するとともに、低用量のピオグリタゾンと EPA・DHA を併用し、従来のインスリン抵抗性改善効果を維持したままピオグリタゾンの投薬量を減少させることができるか検討した。その結果、ピオグリタゾンと EPA・DHA の併用は、加齢させた条件においても脂肪細胞の肥大化抑制作用と膵 β 細胞の保護作用を示すことを確認した。くわえて、体重増加がみられる用量のピオグリタゾンに対しては、肝臓の脂肪酸合成抑制と脂肪酸の β 酸化亢進をもたらす皮下脂肪蓄積に抑制的に作用することが示された。また、インスリン抵抗性改善効果がみられない用量のピオグリタゾンに対しては、副作用を発現せずにインスリン抵抗性改善効果を増強することが明らかになった。

以上の結果から、ピオグリタゾンによる薬物治療をおこなう際に、 $n-3$ 系脂肪酸製剤を併用することで、食事療法と運動療法が十分に徹底できていない患者に対してもインスリン抵抗性改善効果を高めることができること、さらに、高齢糖尿病患者に対しては、インスリン抵抗性改善効果を維持しつつピオグリタゾンの投薬量を減少させ、副作用の発生リスクを低減できることが示唆された。

2 型糖尿病の治療は、食事療法・運動療法、すなわちライフスタイルへの介入が基本となるが、すべての糖尿病患者にこれらを適用することは難しく、その場合はインスリン療法や経口糖尿病薬による薬物治療の追加が有力な選択肢となる。チアゾリジン薬であるピオグリタゾンは、他の経口糖尿病薬との併用による有効性が確認されており、配合剤も開発されている。しかし、2 型糖尿病の治療を目的として $n-3$ 系脂肪酸製剤を医薬品として使用すること、さらにピオグリタゾンと併用した場合の有効性については、これまでに全く検討されていなかった。本研究によって得られた知見は、ピオグリタゾンと $n-3$ 系脂肪酸製剤の併用が、若齢成人のみならず、現在急増している高齢の糖尿病患者に対しても有効であることを示唆しており、幅広い年齢層に対する糖尿病の治療法または重症化の予防法の開発のための基礎データとなりうるものである。また、本研究が提案する併用法は、インスリン抵抗性の改善効果を向上させるだけでなく、ピオグリタゾンの副作用の低減を目的としている点が先進的であり、幅広い年齢層の糖尿病患者の QOL 向上にも貢献できる、新たな治療法・処方設計のための基礎データとして有用であると考えられる (Fig. 30)。しかし、ピオグリタゾンと EPA・DHA を KK マウスに併用させた今回の検討では、インスリン抵抗性の改善に対する有効性は証明されたが、有意な血糖値の降下は確認できなかった。ピオグリタゾンの投与量が本研究で設定した用量と比較的近い動物試験では、2 型糖尿病モデル動物である db/db マウス¹²⁷⁾および Sprague Dawley ラット¹²⁸⁾、肥満モデル動物である Zucker ラット¹²⁹⁾における血糖値降下作用が報告されている。したがって、2 型糖尿病患者に対してピオグリタゾンと $n-3$ 系脂肪酸製剤による薬物治療を実施していくためには、上述したような他の実験動物を選択するなど、血糖値低下作用が確認できる条件下でさらに検討をおこない、多くのエビデンスを蓄積していくことが必要であると考えられる。

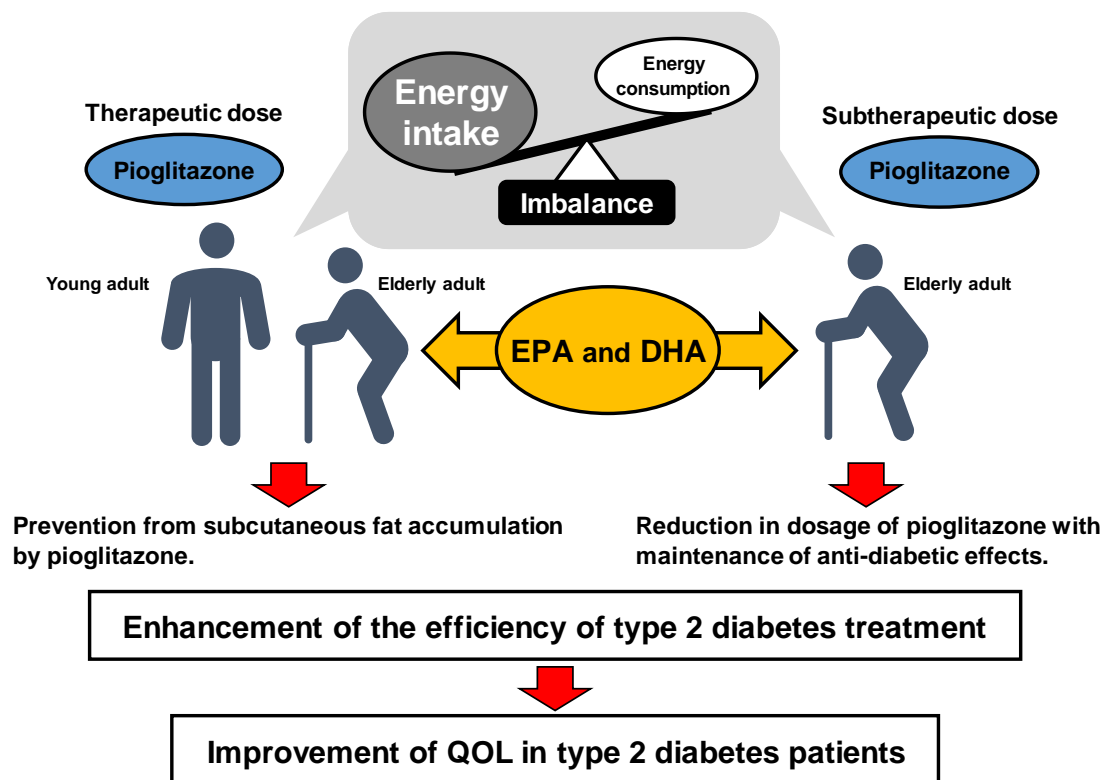


Figure 30. The summary of proposed benefits in the treatment of type 2 diabetes by the combination of pioglitazone and n-3 PUFA (EPA-DHA).

謝辞

本学位論文は、著者が城西大学大学院 薬学研究科 博士後期課程 薬科学専攻に在学中に、城西大学薬学部 分子栄養学講座でおこなわれた研究を取りまとめたものである。

本論文を作成するにあたり、貴重な御指導、御助言、御協力を賜りました城西大学薬学部 医療栄養学科 食毒性学講座 和田 政裕教授、終始御指導と御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 医療栄養学科 松本 明世教授、金 賢珠助教に厚くお礼申し上げます。

本論文の審査過程において、御閲覧と御教示を賜りました城西大学薬学部 薬学科 生理学講座 加園 恵三教授ならびに薬品物理化学講座 関 俊暢教授に心より感謝致します。

また、学位論文審査において、貴重な御指導と御助言を賜りました城西大学薬学部 医療栄養学科 食品機能学講座 真野 博教授ならびに生体防御学講座 日比野 康英教授、城西大学薬学部薬学科 医薬品安全性学講座 金本 郁男教授に心より感謝致します。

常日頃、有益な御助言、御協力を頂きました当講座の卒業生である人間総合科学大学 人間科学部 健康栄養学科 平子 哲史助教に深く感謝いたします。

最後となりましたが、分子栄養学講座でともに研究し、本論文の作成に御協力下さった城西大学薬学部 薬学科 薬学実習教育推進室 井澤 拓也助手、そして、櫻井 晃司氏をはじめとする大学院生の皆様に深く感謝の意を表しますとともに、本学位論文は分子栄養学講座の諸氏による御協力、御助言、御心遣いに支えられたものであることを記し、厚く御礼申し上げます。

実験の部

実験動物および飼育環境

雄性、6週齢の C57BL/6 マウスと KK マウス [(株)東京実験動物]は、温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、明暗周期 12 時間(7~19 時)の条件下で個別飼育し、食餌、飲料水は自由摂取とした。各マウスは、固形飼料 MF または CE-2 で 1 週間の予備飼育をおこなった後、各群の体重の平均値が等しくなるように群分けした。なお、実験飼料、実験群および飼育期間の詳細は各章に記述した。本研究は、科学的観点、動物愛護の観点および環境保全の観点並びに動物実験などをおこなう教職員・学生等の安全保全の観点から、実験動物等の実施方法を定めた「城西大学動物実験規定」に従い、城西大学動物実験委員会による研究計画の審査に基づく学長の承認(第 H25055、H26078、H27073 号)を得て実施した。

実験飼料

サフラワー油は(株)紅花食品から購入し、魚油は(株)日油から提供されたマグロ由来の DHA 濃縮魚油(n-3 系 PUFA 30 wt%)を用いた。なお、各油脂の脂肪酸組成は Table 25 に示した。カゼイン、スクロース、 β -スターチ、AIN-93G ビタミンミックス(コリン添加)、AIN-93G ミネラルミックス、セルロースパウダーは、(株)オリエンタル酵母工業から、L-シスチン、*t*-ブチルヒドロキノン、ピオグリタゾン は、(株)和光純薬工業から購入した。実験飼料は、油脂源をサフラワー油のみとした Con 食、サフラワー油と DHA 濃縮魚油を調合した FO 食をベースに、各章に示した飼料組成に基づきピオグリタゾンを添加して調製した。これらの実験飼料の脂肪酸組成は Table 26 に示した。

Table 25. Fatty acid compositions.

	Safflower oil	Fish oil
	%	
14:0 Myristic acid	—	2.8
16:0 Palmitic acid	4.4	18.0
16:1 Palmitoleic acid	0.2	4.0
18:0 Stearic acid	2.1	5.0
18:1 Oleic acid	77.5	19.5
18:2 Linoleic acid	14.2	1.3
18:3 α -linolenic acid	0.4	0.5
20:4 Arachidonic acid	0.5	1.8
20:5 Icosapentaenoic acid	—	6.6
22:6 Docosahexaenoic acid	—	24.7
other	0.7	15.8

Table 26. Fatty acid compositions in experimental diets.

	Con diet	FO diet
	%	
14:0 Myristic acid	–	1.4
16:0 Palmitic acid	4.4	11.2
16:1 Palmitoleic acid	0.2	2.1
18:0 Stearic acid	2.1	3.6
18:1 Oleic acid	77.5	48.5
18:2 Linoleic acid	14.2	7.8
18:3 α -linolenic acid	0.4	0.5
20:4 Arachidonic acid	0.5	1.2
20:5 Icosapentaenoic acid	–	3.3
22:6 Docosahexaenoic acid	–	12.4
other	0.7	8.3

経口糖負荷試験(OGTT)

実験飼料開始から7週間後にOGTTをおこなった。3時間の絶食下で体重を測定した後、尾静脈から血液を採取し、ONE TOUCH ULTRA (Johnson & Johnson Inc.)を用いて血糖値の0分値を測定した。その後、日本薬局方ブドウ糖注射液第一糖液20% [(株)第一三共]を超純水で希釈して10%グルコース溶液を調製し、1 g/kg 体重の用量でフィーディングニードルにより経胃投与した。投与後、30分、60分、120分において、血糖値を測定した。

インスリン負荷試験(ITT)

第1章では実験飼料開始から7週間後、第3章では6週間後にITTをおこなった。3時間の絶食下で体重を測定した後、OGTTと同様の方法で血糖値の0分値を測定した。その後、ヒューマリン®注100単位/ml [(株)日本イーライリリー]を生理食塩水で1:1000の割合で希釈したインスリン溶液を、0.75U/kg 体重の用量で腹腔内投与した。投与後、30分、60分、120分において、血糖値を測定した。

酸化ストレスおよび抗酸化能力の評価

第3章において、第1項は飼育開始時および4週間ごとに生後29週齢まで、第3章は実験飼料開始時および7週間後に、酸化ストレスの評価としてd-ROMsテスト、抗酸化能力の評価としてBAPテストをおこなった。12時間の絶食下で尾静脈から採血し、採取した血液を遠心分離(800×g、15分間、4℃)して血漿サンプルを得た。その後、d-ROMsまたはBAPテストキット、ならびにフリーラジカル解析装置FREE carpe diem [(株)ウイスマー]を用いて測定をおこなった。

解剖

飼育終了後、第1章では3時間、第2章および第3章では12時間の絶食下で、ペントバルビタールナトリウム [ソムノペンチル、(株)共立製薬]を腹腔内注射し、実験動物に麻酔を施した。第3章の第1項を除き、小実験動物用X線CT装置 [La Theta LCT 100, (株)アロカ]を用いて、第二腰椎から第四腰椎までを2mm間隔でスキャンし、腹部脂肪面積を測定した。その後、体重を測定し、尾静脈より採血をおこない血糖値を測定した。開腹後は、ヘパリン処理を施したシリンジを用いて下大静脈より採血をおこない、肝臓、副睾丸周囲の白色脂肪組織、肩甲骨間の褐色脂肪組織、膵臓、腓腹筋を摘出した。肝臓は、形態を肉眼で観察するために、摘出後すぐにデジタルカメラで撮影した。肝臓、白色脂肪組織、膵臓の一部は、組織学的検討をおこなうために10%中性緩衝ホルマリン液 [(株)和光純薬工業]で固定した。その他の採取した組織は、液体窒素で凍結後、分析に供するまで-80℃で凍結保存した。血液サンプルは、遠心分離(800×g、15分間、4℃)後に、新しいチューブに血漿を採取し、解析するまで-80℃で凍結保存した。

血中パラメータ測定

血漿トリアシルグリセロール、総コレステロール、FFAの測定は、トリグリセライドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコー、NEFA C-テストワコー [(株)和光純薬工業]を用いた。血漿インスリンおよびアディポネクチンの測定は、マウスインスリン測定キット [(株)森永生化学研究所]、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。血漿TBARSの測定は、TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Co.)を用いた。HOMA-IRは、[空腹時血糖値(mg/dl)×空腹時インスリン値(μU/ml)÷405]により算出し、各群の値は、Con群の値を1として比で示した。

組織学的検討

ホルマリン固定を施した肝臓、白色脂肪組織、膵臓は、パラフィン包埋後に H&E 染色をおこなった。膵臓のグルカゴン、インスリンおよび CHOP の免疫染色は、モルモット抗グルカゴン抗体 [(株)タカラバイオ]、モルモット抗インスリン抗体 [(株)タカラバイオ]、ウサギ抗 CHOP 抗体 (Proteintech Group Inc.) を使用した。膵臓ランゲルハンス島のアポトーシスの評価には、TUNEL 染色をおこなった。なお、これらの組織標本作成および染色は、すべて(株)江東微生物研究所に依頼した。

形態学的解析

脂肪細胞面積、膵臓ランゲルハンス島面積、グルカゴンとインスリンの染色面積の計測は、画像解析ソフト (Image J, Wayne Rasband, NIH) を用いた。グルカゴンおよびインスリン陽性細胞面積の割合(%)は、 $[\text{陽性細胞面積}(\mu\text{m}^2) \div \text{ランゲルハンス島面積}(\mu\text{m}^2)] \times 100$ により算出した。CHOP および TUNEL 染色は、核が染色されているものを陽性とし、陽性細胞率(%)は、 $[\text{陽性核数}(\text{個}) \div \text{ランゲルハンス島の全核数}(\text{個})] \times 100$ により算出した。

肝臓脂質の抽出および測定

肝臓脂質の抽出は、Folch らの方法¹³⁰⁾に従って以下の通りおこなった。個体毎に肝臓を、0.1 M 塩化カリウム水溶液：メタノール=1：2.5 の割合で調製した混合液 1.75 ml とともに 13 ml チューブに入れ、Polytron 3100 (Kinematica AG) を用いてホモジナイズした。次に、クロロホルムを 1.375 ml、0.1 M 塩化カリウム水溶液を 0.75 ml 加えて攪拌し、室温で 3 時間静置した。その後、遠心分離 (800×g、15 分間、4℃) をおこない、下層をスピッツ管に回収した。下層を回収した後の 13 ml チューブは、再び 0.1 M 塩化カリウム水溶液：メタノール=1：2.5 の割合で調製した混合液を 0.875 ml、クロロホルム 1.425 ml を加えて攪拌し、10 分間静置した。その後、遠心分離(800×g、15 分間、4℃)をおこない、下層を上記のスピッツ管に回収した。このように 2 回にわたって回収した下層に、超純水を 0.25 ml 加えて攪拌することでエマルジョン状態にした後、10 分間静置して遠心分離(800×g、15 分間、4℃)し、褐色瓶に下層を回収して-30℃遮光下で保存した。肝臓中トリアシルグリセロールおよび総コレステロール含量の測定は、肝臓脂質抽出液 0.05 ml をマイクロチューブ内で蒸発乾固させ、t-ブチルアルコール：トライトン X-100：メタノール=3：1：1 の割合で調製した混合液に溶解させたものをサンプルとし、トリグリセライド E-テストワコーとコレステロール E-テストワコー [(株)和光純薬工業] を用いておこなった。

Western blotting

肝臓中のタンパク質抽出は、Sheng らの方法¹³¹⁾に従っておこない、Bio-Rad protein assay 試薬 (Bio-Rad Laboratories Inc.)を用いて吸光度を測定し、タンパク量を算出した。各抽出液のタンパク量が 30 μg になるように調整して SDS-PAGE をおこない、電気泳動後、ゲルを Hybond-ECL (GE Healthcare)に転写し、3%BSA 溶液を用いてブロッキング処理(4°C、一晚)を施した。一次抗体反応は、マウス抗 SREBP-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、ウサギ抗 FAS 抗体 (Novus Biologicals)、ヤギ抗 SCD-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、ウサギ抗 AOX 抗体 (Proteintech Group Inc.)およびウサギ抗 MCAD 抗体 (Proteintech Group Inc.)を用いておこなった。二次抗体反応は、それぞれ HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare)、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)から適切なものを用いておこなった。反応後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)で発光させ、暗室にて X 線フィルムへ露光した。画像は、蛍光・可視光イメージング装置 WSE-5200 Printgraph 2M [(株)アトー]を用いて撮影した。

RNA 抽出

肝臓および白色脂肪組織からの RNA 抽出は、Chomczynski と Sacchi の方法¹³²⁾の変法で、TRIzol®Reagent (Life Technologies, Co)を用いて製造者マニュアルに従っておこなった。各個体の肝臓または白色脂肪組織を、TRIzol®Reagent 1 ml とともに試験管に入れ、Polytron 3100 でホモジナイズした。このホモジネート液はマイクロチューブに移し、クロロホルムを 0.2 ml 加え攪拌した後、遠心分離(20000 \times g、15 分間、4°C)をおこなった。上清を新たなマイクロチューブに採取し、イソプロパノールを 0.65 mL 加えて攪拌した後、再び遠心分離(20000 \times g、15 分間、4°C)をおこなった。遠心後、イソプロパノール層を除去し、70%エタノールを 1 ml 加えてマイクロチューブの底に沈殿した RNA ペレットを洗浄した。遠心分離(20000 \times g、5 分間、4°C)後に 70%エタノールを除去し、RNA ペレットを室温にてドライアップした。最後に、RNA ペレットに diethylpyrocarbonate 処理水を適量加え、測定に用いるまで-80°Cで保存した。膵臓からの RNA 抽出は、RNA 安定化試薬により組織の RNase を不活性化した後、TRIzol®Reagent と PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用い、製造者マニュアルに従っておこなった。

Real-time PCR

各組織の mRNA 発現の解析は、**QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN, Co)**を用いて **Real-time PCR** をおこなった。プライマーは **Table 27** に示したものを使用し、PCR は、逆転写を **50°C**、**30 秒**、**1 サイクル**、初期活性化を **95°C**、**15 分**、**1 サイクル**おこなった後、増幅反応として、変性を **94°C**、**15 秒**、アニーリングを **55°C**、**30 秒**、エクステンションを **72°C**、**1 分**、**40 サイクル**おこなった。RNA サンプルは、アガロースゲル電気泳動により純度を確認したものを使用し、内部標準はハウスキーピング遺伝子の **glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)**を用いた。

Table 27. Primers used for real time PCR.

	Sense (5'→3')	Antisense (3'→5')
SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGGAAGTCACTGT
FAS	TCACCACTGTGGGCTCTGCAGAGAAGCGAG	TGTCATTGGCCTCCTCAAAAAGGGCGTCCA
SCD-1	CCGGAGACCCCTTAGATCGA	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC
ACC	TGACAGACTGATCGCAGAGAAAAG	TGGAGAGCCCCACACACA
AOX	TCAACAGCCCAACTGTGACTTCCATTA	TCAGGTAGCCATTATCCATCTCTTCA
UCP-2	GTTCTCTGTCTCGTCTTGC	GGCCTTGAAACCAACCA
CPT-1	CCAGGCTACAGTGGGACATT	GAACCTTGCCCATGTCTTGT
MCAD	AGGGTTTAGTTTTGAGTTGACGG	CCCCGCTTTTGTTCATATTCCG
ABCA1	ACCAGCTTCCATCCTCCTTG	GGCCACATCCACAAGTGTCT
ABCG5	TCTCCGCGTCCAGAACAAC	CATTGAGCATGCCGGTGTAT
ABCG8	CCCTCCGATTGCTTCTTTTCCAG	CTGAGAAAATGCCCCAGATAAA
Adiponectin	GCAGAGATGGCACTCCTGGA	CCCTTCAGTCTCTGTCAATCC
CD36/FAT	GCAAAAACGACTGCAGGTCAAC	TGGTCCCAGTCTCATTAGCCA
LPL	CAGAGTTTGACCGCCTTCC	AATTTGCTTTCGATGTCTGAGAA
TNF-α	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC
IL-6	TTCACAGAGGATACCACTCC	GTTTGGTAGCATCCATCATT
MCP-1	GGCTCAGCCAGATGCAGT	GAGCTTGGTGACAAAACTACAG
IL-1β	CTCGGCCAAGACAGGTCGCTC	CCCCACACGTTGACAGCTAGG
TLR4	CTTCATTCAAGACCAAGCCTTTC	AACCGATGGACGTGTAAACCAG
PPARα	GTGGCTGCTATAATTTGCTGTG	GAAGGTGTCATCTGGATGGTT
GAPDH	TGTGTCGTCGTGGATCTGA	CCTGCTCACCACTTCTTGAT

統計解析

すべてのデータは、平均値(mean)±標準誤差(SE)で示した。統計解析は、第 3 章の第 1 節における 2 群間の比較には **t**-検定をおこない、**P < 0.05** で有意差ありとした。それ以外の実験においては、統計解析ソフトとしてエクセル統計 [(株)社会情報サービス]を使用し、一元配置分散分析(ANOVA)をおこなった。**Tukey-kramer** 検定で各群間の比較検定をおこない、**P < 0.05** で有意差ありとした。

引用文献

- 1) Nathan D. M., Clinical practice. Initial management of glycemia in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, **347**, 1342-1349 (2002).
- 2) Alberti K. G., Eckel R. H., Grundy S. M., Zimmet P. Z., Cleeman J. I., Donato K. A., Fruchart J. C., James W. P., Loria C. M., Smith S. C., Prevention I. D. F. T. F. o. E. a., National Heart L. n., and Blood Institute, Association A. H., Federation W. H., Society I. A., Obesity I. A. f. t. S. o., Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, **120**, 1640-1645 (2009).
- 3) Suganami T., Ogawa Y., Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*, **88**, 33-39 (2010).
- 4) Matsuzawa Y., Funahashi T., Nakamura T., Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci*, **892**, 146-154 (1999).
- 5) Cusi K., The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*, **10**, 306-315 (2010).
- 6) Nakagami T., Group D. S., Hyperglycaemia and mortality from all causes and from cardiovascular disease in five populations of Asian origin. *Diabetologia*, **47**, 385-394 (2004).
- 7) Sone H., Mizuno S., Fujii H., Yoshimura Y., Yamasaki Y., Ishibashi S., Katayama S., Saito Y., Ito H., Ohashi Y., Akanuma Y., Yamada N., Study J. D. C., Is the diagnosis of metabolic syndrome useful for predicting cardiovascular disease in asian diabetic patients? Analysis from the Japan Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*, **28**, 1463-1471 (2005).
- 8) Kimura K., Minematsu K., Kazui S., Yamaguchi T., Japan Multicenter Stroke Investigators C., Mortality and cause of death after hospital discharge in 10,981 patients with ischemic stroke and transient ischemic attack. *Cerebrovasc Dis*, **19**, 171-178 (2005).
- 9) Okuno A., Tamemoto H., Tobe K., Ueki K., Mori Y., Iwamoto K., Umesono K., Akanuma Y., Fujiwara T., Horikoshi H., Yazaki Y., Kadowaki T., Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*, **101**, 1354-1361 (1998).
- 10) Kawamori R., Kadowaki T., Onji M., Seino Y., Akanuma Y., Group P. S., Hepatic safety profile and glycemic control of pioglitazone in more than 20,000 patients with type 2 diabetes mellitus: postmarketing surveillance study in Japan. *Diabetes Res Clin Pract*, **76**, 229-235 (2007).
- 11) Aronoff S., Rosenblatt S., Braithwaite S., Egan J. W., Mathisen A. L., Schneider R. L., Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care*, **23**, 1605-1611 (2000).

- 12) Vuppalanchi R.,Chalasan N., Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*, **49**, 306-317 (2009).
- 13) Belfort R., Harrison S. A., Brown K., Darland C., Finch J., Hardies J., Balas B., Gastaldelli A., Tio F., Pulcini J., Berria R., Ma J. Z., Dwivedi S., Havranek R., Fincke C., DeFronzo R., Bannayan G. A., Schenker S.,Cusi K., A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, **355**, 2297-2307 (2006).
- 14) Martens F. M., Rabelink T. J., op 't Roodt J., de Koning E. J.,Visseren F. L., TNF-alpha induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR-gamma agonist pioglitazone. *Eur Heart J*, **27**, 1605-1609 (2006).
- 15) Nissen S. E., Nicholls S. J., Wolski K., Nesto R., Kupfer S., Perez A., Jure H., De Larochelière R., Staniloae C. S., Mavromatis K., Saw J., Hu B., Lincoff A. M., Tuzcu E. M.,Investigators P., Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. *JAMA*, **299**, 1561-1573 (2008).
- 16) Yki-Järvinen H., Thiazolidinediones. *N Engl J Med*, **351**, 1106-1118 (2004).
- 17) Hippisley-Cox J.,Coupland C., Diabetes treatments and risk of heart failure, cardiovascular disease, and all cause mortality: cohort study in primary care. *BMJ*, **354**, i3477 (2016).
- 18) Dormandy J. A., Charbonnel B., Eckland D. J., Erdmann E., Massi-Benedetti M., Moules I. K., Skene A. M., Tan M. H., Lefebvre P. J., Murray G. D., Standl E., Wilcox R. G., Wilhelmssen L., Betteridge J., Birkeland K., Golay A., Heine R. J., Koranyi L., Laakso M., Moka M., Norkus A., Pirags V., Podar T., Scheen A., Scherbaum W., Scherthaner G., Schmitz O., Skrha J., Smith U., Taton J.,Investigators P. R., Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*, **366**, 1279-1289 (2005).
- 19) Oishi M., Yamazaki K., Okuguchi F., Sugimoto H., Kanatsuka A., Kashiwagi A.,Japan Diabetes Clinical Data Management Study G., Changes in oral antidiabetic prescriptions and improved glycemic control during the years 2002-2011 in Japan (JDDM32). *J Diabetes Investig*, **5**, 581-587 (2014).
- 20) Miyazaki Y., Mahankali A., Matsuda M., Glass L., Mahankali S., Ferrannini E., Cusi K., Mandarino L. J.,DeFronzo R. A., Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care*, **24**, 710-719 (2001).
- 21) Miyazaki Y., Mahankali A., Matsuda M., Mahankali S., Hardies J., Cusi K., Mandarino L. J.,DeFronzo R. A., Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 2784-2791 (2002).
- 22) Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Murakami K., Motojima K., Komeda K., Ide T., Kubota N., Terauchi Y., Tobe K., Miki H., Tsuchida A., Akanuma Y., Nagai R., Kimura S.,Kadowaki T., The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem*, **276**, 41245-41254 (2001).

- 23) Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Terauchi Y., Kubota N., Hara K., Mori Y., Ide T., Murakami K., Tsuboyama-Kasaoka N., Ezaki O., Akanuma Y., Gavrilova O., Vinson C., Reitman M. L., Kagechika H., Shudo K., Yoda M., Nakano Y., Tobe K., Nagai R., Kimura S., Tomita M., Froguel P., Kadowaki T., The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, **7**, 941-946 (2001).
- 24) Rustan A. C., Nossen J. O., Christiansen E. N., Drevon C. A., Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol acyltransferase. *J Lipid Res*, **29**, 1417-1426 (1988).
- 25) Nakatani T., Kim H. J., 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*, **44**, 369-379 (2003).
- 26) Neschen S., Moore I., Regittnig W., Yu C. L., Wang Y., Pypaert M., Petersen K. F., Shulman G. I., Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E395-401 (2002).
- 27) Sampath H., Ntambi J. M., Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*, **25**, 317-340 (2005).
- 28) Arai T., Kim H. J., Chiba H., Matsumoto A., Interaction of fenofibrate and fish oil in relation to lipid metabolism in mice. *J Atheroscler Thromb*, **16**, 283-291 (2009).
- 29) Bremer J., The biochemistry of hypo- and hyperlipidemic fatty acid derivatives: metabolism and metabolic effects. *Prog Lipid Res*, **40**, 231-268 (2001).
- 30) Arai T., Kim H. J., Hirako S., Nakasatomi M., Chiba H., Matsumoto A., Effects of dietary fat energy restriction and fish oil feeding on hepatic metabolic abnormalities and insulin resistance in KK mice with high-fat diet-induced obesity. *J Nutr Biochem*, **24**, 267-273 (2013).
- 31) Yokoyama M., Origasa H., Matsuzaki M., Matsuzawa Y., Saito Y., Ishikawa Y., Oikawa S., Sasaki J., Hishida H., Itakura H., Kita T., Kitabatake A., Nakaya N., Sakata T., Shimada K., Shirato K., Investigators J. E. I. I. S. J., Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*, **369**, 1090-1098 (2007).
- 32) Matsuzaki M., Yokoyama M., Saito Y., Origasa H., Ishikawa Y., Oikawa S., Sasaki J., Hishida H., Itakura H., Kita T., Kitabatake A., Nakaya N., Sakata T., Shimada K., Shirato K., Matsuzawa Y., Investigators J., Incremental effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in statin-treated patients with coronary artery disease. *Circ J*, **73**, 1283-1290 (2009).
- 33) Tanaka K., Ishikawa Y., Yokoyama M., Origasa H., Matsuzaki M., Saito Y., Matsuzawa Y., Sasaki J., Oikawa S., Hishida H., Itakura H., Kita T., Kitabatake A., Nakaya N., Sakata T., Shimada K., Shirato K., JELIS Investigators J. p., Reduction in the recurrence of stroke by eicosapentaenoic acid for hypercholesterolemic patients: subanalysis of the JELIS trial. *Stroke*, **39**, 2052-2058 (2008).

- 34) Oikawa S., Yokoyama M., Origasa H., Matsuzaki M., Matsuzawa Y., Saito Y., Ishikawa Y., Sasaki J., Hishida H., Itakura H., Kita T., Kitabatake A., Nakaya N., Sakata T., Shimada K., Shirato K., JELIS Investigators J. p., Suppressive effect of EPA on the incidence of coronary events in hypercholesterolemia with impaired glucose metabolism: Sub-analysis of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis*, **206**, 535-539 (2009).
- 35) Ishikawa Y., Yokoyama M., Saito Y., Matsuzaki M., Origasa H., Oikawa S., Sasaki J., Hishida H., Itakura H., Kita T., Kitabatake A., Nakaya N., Sakata T., Shimada K., Shirato K., Matsuzawa Y., Investigators J., Preventive effects of eicosapentaenoic acid on coronary artery disease in patients with peripheral artery disease. *Circ J*, **74**, 1451-1457 (2010).
- 36) Wang H. H., Hung T. M., Wei J., Chiang A. N., Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. *Cardiovasc Res*, **61**, 169-176 (2004).
- 37) Calder P. C., n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, **83**, 1505S-1519S (2006).
- 38) Kato T., Shimano H., Yamamoto T., Ishikawa M., Kumadaki S., Matsuzaka T., Nakagawa Y., Yahagi N., Nakakuki M., Hastay A. H., 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*, **57**, 2382-2392 (2008).
- 39) Ferreira M. R., Chicco A., Lombardo Y. B., Dietary fish oil normalized glucose-stimulated insulin secretion in isolated pancreatic islets of dyslipemic rats through mechanisms involving glucose phosphorylation, peroxisome proliferator-activated receptor γ and uncoupling protein 2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **89**, 31-38 (2013).
- 40) Weir G. C., Marselli L., Marchetti P., Katsuta H., Jung M. H., Bonner-Weir S., Towards better understanding of the contributions of overwork and glucotoxicity to the beta-cell inadequacy of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, **11 Suppl 4**, 82-90 (2009).
- 41) 平成 26 年国民健康・栄養調査結果の概要. 厚生労働省.
- 42) 平成 27 年度版高齢社会白書. 内閣府.
- 43) IDF Diabetes Atlas 7th ed., International Diabetes Federation.
- 44) Moon S. S., Low skeletal muscle mass is associated with insulin resistance, diabetes, and metabolic syndrome in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Endocr J*, **61**, 61-70 (2014).
- 45) Pannemans D. L., Westerterp K. R., Energy expenditure, physical activity and basal metabolic rate of elderly subjects. *Br J Nutr*, **73**, 571-581 (1995).
- 46) Chang A. M., Halter J. B., Aging and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **284**, E7-12 (2003).
- 47) Serrano R., Villar M., Gallardo N., Carrascosa J. M., Martinez C., Andrés A., The effect of aging on insulin signalling pathway is tissue dependent: central role of adipose tissue in the insulin resistance of aging. *Mech Ageing Dev*, **130**, 189-197 (2009).
- 48) 秋下雅弘. 高齢者に対する薬物療法の考え方. *診断と治療*, **102**, 185-191 (2014).

- 49) 糖尿病診療ガイドライン 2016. 日本糖尿病学会.
- 50) Bodary P. F., Vargas F. B., King S. A., Jongeward K. L., Wickenheiser K. J., Eitzman D. T., Pioglitazone protects against thrombosis in a mouse model of obesity and insulin resistance. *J Thromb Haemost*, **3**, 2149-2153 (2005).
- 51) Oribe J., Kakuma T., Haranaka M., Okamoto K., Seike M., Yoshimatsu H., Intraperitoneal administration attenuates thiazolidinedione-induced hepatic steatosis in KKAY mice with increased hepatic peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma mRNA expression. *Obes Res Clin Pract*, **6**, e175-262 (2012).
- 52) Kovacs P., Stumvoll M., Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **19**, 625-635 (2005).
- 53) Ntambi J. M., Miyazaki M., Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. *Curr Opin Lipidol*, **14**, 255-261 (2003).
- 54) Memon R. A., Tecott L. H., Nonogaki K., Beigneux A., Moser A. H., Grunfeld C., Feingold K. R., Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology*, **141**, 4021-4031 (2000).
- 55) Tsuboyama-Kasaoka N., Takahashi M., Kim H., Ezaki O., Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 879-885 (1999).
- 56) Marchesini G., Forlani G., NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology*, **35**, 497-499 (2002).
- 57) Eberlé D., Hegarty B., Bossard P., Ferré P., Foufelle F., SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, **86**, 839-848 (2004).
- 58) Takeuchi Y., Yahagi N., Izumida Y., Nishi M., Kubota M., Teraoka Y., Yamamoto T., Matsuzaka T., Nakagawa Y., Sekiya M., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Gotoda T., Ishibashi S., Itaka K., Kataoka K., Nagai R., Yamada N., Kadowaki T., Shimano H., Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J Biol Chem*, **285**, 11681-11691 (2010).
- 59) Jakobsson T., Treuter E., Gustafsson J. A., Steffensen K. R., Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci*, **33**, 394-404 (2012).
- 60) Lehmann J. M., Kliewer S. A., Moore L. B., Smith-Oliver T. A., Oliver B. B., Su J. L., Sundseth S. S., Winegar D. A., Blanchard D. E., Spencer T. A., Willson T. M., Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem*, **272**, 3137-3140 (1997).
- 61) Jia Q., Zhou H. R., Shi Y., Pestka J. J., Docosahexaenoic acid consumption inhibits deoxynivalenol-induced CREB/ATF1 activation and IL-6 gene transcription in mouse macrophages. *J Nutr*, **136**, 366-372 (2006).
- 62) Shida T., Kamei N., Takeda-Morishita M., Isowa K., Takayama K., Colonic delivery of docosahexaenoic acid improves impaired glucose tolerance via GLP-1 secretion and suppresses pancreatic islet hyperplasia in diabetic KK-A(y) mice. *Int J Pharm*, **450**, 63-69 (2013).
- 63) Morishita M., Tanaka T., Shida T., Takayama K., Usefulness of colon targeted DHA and EPA as novel diabetes medications that promote intrinsic GLP-1 secretion. *J Control Release*, **132**, 99-104 (2008).

- 64) Drucker D. J., Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology*, **142**, 521-527 (2001).
- 65) Weisberg S. P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R. L., Ferrante A. W., Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, **112**, 1796-1808 (2003).
- 66) Xu H., Barnes G. T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C. J., Sole J., Nichols A., Ross J. S., Tartaglia L. A., Chen H., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, **112**, 1821-1830 (2003).
- 67) Ito A., Suganami T., Miyamoto Y., Yoshimasa Y., Takeya M., Kamei Y., Ogawa Y., Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, **282**, 25445-25452 (2007).
- 68) Kim F., Pham M., Luttrell I., Bannerman D. D., Tupper J., Thaler J., Hawn T. R., Raines E. W., Schwartz M. W., Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res*, **100**, 1589-1596 (2007).
- 69) Fujisaka S., Usui I., Bukhari A., Ikutani M., Oya T., Kanatani Y., Tsuneyama K., Nagai Y., Takatsu K., Urakaze M., Kobayashi M., Tobe K., Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, **58**, 2574-2582 (2009).
- 70) Lee J. Y., Plakidas A., Lee W. H., Heikkinen A., Chanmugam P., Bray G., Hwang D. H., Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, **44**, 479-486 (2003).
- 71) Itoh M., Suganami T., Satoh N., Tanimoto-Koyama K., Yuan X., Tanaka M., Kawano H., Yano T., Aoe S., Takeya M., Shimatsu A., Kuzuya H., Kamei Y., Ogawa Y., Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 1918-1925 (2007).
- 72) Carlier H., Bernard A., Caselli C., Digestion and absorption of polyunsaturated fatty acids. *Reprod Nutr Dev*, **31**, 475-500 (1991).
- 73) Backes J., Anzalone D., Hilleman D., Catini J., The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis*, **15**, 118 (2016).
- 74) Kajikawa S., Harada T., Kawashima A., Imada K., Mizuguchi K., Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **80**, 229-238 (2009).
- 75) Hung P., Gu J. Y., Kaku S., Yunoki S., Ohkura K., Ikeda I., Tachibana H., Sugano M., Yazawa K., Yamada K., Dietary effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid esters on lipid metabolism and immune parameters in Sprague-Dawley rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 2588-2593 (2000).
- 76) Ide T., Takahashi Y., Kushiro M., Tachibana M., Matsushima Y., Effect of n-3 fatty acids on serum lipid levels and hepatic fatty acid metabolism in BALB/c.KOR-Apoeshl mice deficient in apolipoprotein E expression. *J Nutr Biochem*, **15**, 169-178 (2004).

- 77) Hirako S., Kim H. J., Shimizu S., Chiba H., Matsumoto A., Low-dose fish oil consumption prevents hepatic lipid accumulation in high cholesterol diet fed mice. *J Agric Food Chem*, **59**, 13353-13359 (2011).
- 78) Forrest L. M., Lough C. M., Chung S., Boudyguina E. Y., Gebre A. K., Smith T. L., Colvin P. L., Parks J. S., Echium oil reduces plasma triglycerides by increasing intravascular lipolysis in apoB100-only low density lipoprotein (LDL) receptor knockout mice. *Nutrients*, **5**, 2629-2645 (2013).
- 79) Yamazaki R. K., Brito G. A., Coelho I., Pequitto D. C., Yamaguchi A. A., Borghetti G., Schiessel D. L., Kryczyk M., Machado J., Rocha R. E., Aikawa J., Iagher F., Naliwaiko K., Tanhoffer R. A., Nunes E. A., Fernandes L. C., Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. *Lipids Health Dis*, **10**, 66 (2011).
- 80) Willumsen N., Hexeberg S., Skorve J., Lundquist M., Berge R. K., Docosahexaenoic acid shows no triglyceride-lowering effects but increases the peroxisomal fatty acid oxidation in liver of rats. *J Lipid Res*, **34**, 13-22 (1993).
- 81) Eguchi K., Manabe I., Oishi-Tanaka Y., Ohsugi M., Kono N., Ogata F., Yagi N., Ohto U., Kimoto M., Miyake K., Tobe K., Arai H., Kadowaki T., Nagai R., Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab*, **15**, 518-533 (2012).
- 82) Dai F., Jiang T., Bao Y. Y., Chen G. J., Chen L., Zhang Q., Lu Y. X., Fenofibrate improves high-fat diet-induced and palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and inflammation in skeletal muscle. *Life Sci*, **157**, 158-167 (2016).
- 83) de Castro G. S., Deminice R., Simoes-Ambrosio L. M., Calder P. C., Jordao A. A., Vannucchi H., Dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid influence liver triacylglycerol and insulin resistance in rats fed a high-fructose diet. *Mar Drugs*, **13**, 1864-1881 (2015).
- 84) Nakasatomi M., Kim H., Arai T., Hirako S., Shioda S., Iizuka Y., Sakurai K., Matsumoto A., Fish oil and fenofibrate inhibit pancreatic islet hypertrophy, and improve glucose and lipid metabolic dysfunctions with different ways in diabetic KK mice. *Obes Res Clin Pract*, (2016).
- 85) Oliveira V., Marinho R., Vitorino D., Santos G. A., Moraes J. C., Dragano N., Sartori-Cintra A., Pereira L., Catharino R. R., da Silva A. S., Ropelle E. R., Pauli J. R., De Souza C. T., Velloso L. A., Cintra D. E., Diets Containing alpha-Linolenic (omega3) or Oleic (omega9) Fatty Acids Rescues Obese Mice From Insulin Resistance. *Endocrinology*, **156**, 4033-4046 (2015).
- 86) Hsu S. C., Huang C. J., Reduced fat mass in rats fed a high oleic acid-rich safflower oil diet is associated with changes in expression of hepatic PPARalpha and adipose SREBP-1c-regulated genes. *J Nutr*, **136**, 1779-1785 (2006).
- 87) Zhang J., Wang O., Guo Y., Wang T., Wang S., Li G., Ji B., Deng Q., Effect of Increasing Doses of Linoleic and alpha-Linolenic Acids on High-Fructose and High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome in Rats. *J Agric Food Chem*, **64**, 762-772 (2016).
- 88) Adam O., Tesche A., Wolfram G., Impact of linoleic acid intake on arachidonic acid formation and eicosanoid biosynthesis in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **79**, 177-181 (2008).
- 89) Vaughan R. A., Garrison R. L., Stamatikos A. D., Kang M., Cooper J. A., Paton C. M., A High Linoleic Acid Diet does not Induce Inflammation in Mouse Liver or Adipose Tissue. *Lipids*, **50**, 1115-1122 (2015).

- 90) Rossmeisl M., Medrikova D., van Schothorst E. M., Pavlisova J., Kuda O., Hensler M., Bardova K., Flachs P., Stankova B., Vecka M., Tvrzicka E., Zak A., Keijer J., Kopecky J., Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. *Biochim Biophys Acta*, **1841**, 267-278 (2014).
- 91) Bensellam M., Laybutt D. R., Jonas J. C., The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol*, **364**, 1-27 (2012).
- 92) Kawasaki F., Matsuda M., Kanda Y., Inoue H., Kaku K., Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in db/db mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **288**, E510-518 (2005).
- 93) Fonseca S. G., Urano F., Burcin M., Gromada J., Stress hyperactivation in the beta-cell. *Islets*, **2**, 1-9 (2010).
- 94) Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Jungreis R., Harding H. P., Ron D., Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J*, **22**, 1180-1187 (2003).
- 95) Novoa I., Zeng H., Harding H. P., Ron D., Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol*, **153**, 1011-1022 (2001).
- 96) Evans-Molina C., Robbins R. D., Kono T., Tersey S. A., Vestermark G. L., Nunemaker C. S., Garmey J. C., Deering T. G., Keller S. R., Maier B., Mirmira R. G., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation restores islet function in diabetic mice through reduction of endoplasmic reticulum stress and maintenance of euchromatin structure. *Mol Cell Biol*, **29**, 2053-2067 (2009).
- 97) Nascimento F. A., Barbosa-da-Silva S., Fernandes-Santos C., Mandarim-de-Lacerda C. A., Aguilera M. B., Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). *Exp Toxicol Pathol*, **62**, 17-25 (2010).
- 98) Montane J., Cadavez L., Novials A., Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*, **7**, 25-34 (2014).
- 99) Wei D., Li J., Shen M., Jia W., Chen N., Chen T., Su D., Tian H., Zheng S., Dai Y., Zhao A., Cellular production of n-3 PUFAs and reduction of n-6-to-n-3 ratios in the pancreatic beta-cells and islets enhance insulin secretion and confer protection against cytokine-induced cell death. *Diabetes*, **59**, 471-478 (2010).
- 100) Diani A. R., Sawada G., Wyse B., Murray F. T., Khan M., Pioglitazone preserves pancreatic islet structure and insulin secretory function in three murine models of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286**, E116-122 (2004).
- 101) Pretorius R. W., Gataric G., Swedlund S. K., Miller J. R., Reducing the risk of adverse drug events in older adults. *Am Fam Physician*, **87**, 331-336 (2013).
- 102) LePard K. J., Cellini J., Age-dependent slowing of enteric axonal transport in insulin-resistant mice. *World J Gastroenterol*, **19**, 482-491 (2013).
- 103) Ceriello A., Motz E., Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 816-823 (2004).
- 104) Conti V., Izzo V., Corbi G., Russomanno G., Manzo V., De Lise F., Di Donato A., Filippelli A., Antioxidant Supplementation in the Treatment of Aging-Associated Diseases. *Front Pharmacol*, **7**, 24 (2016).

- 105) Bonomini F., Rodella L. F., Rezzani R., Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis*, **6**, 109-120 (2015).
- 106) Hotta K., Funahashi T., Arita Y., Takahashi M., Matsuda M., Okamoto Y., Iwahashi H., Kuriyama H., Ouchi N., Maeda K., Nishida M., Kihara S., Sakai N., Nakajima T., Hasegawa K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Nakamura T., Yamashita S., Hanafusa T., Matsuzawa Y., Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1595-1599 (2000).
- 107) Coimbra S., Brandao Proenca J., Santos-Silva A., Neuparth M. J., Adiponectin, leptin, and chemerin in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: a close linkage with obesity and length of the disease. *Biomed Res Int*, **2014**, 701915 (2014).
- 108) Ryan A. S., Berman D. M., Nicklas B. J., Sinha M., Gingerich R. L., Meneilly G. S., Egan J. M., Elahi D., Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity. *Diabetes Care*, **26**, 2383-2388 (2003).
- 109) Bucci L., Yani S. L., Fabbri C., Bijlsma A. Y., Maier A. B., Meskers C. G., Narici M. V., Jones D. A., McPhee J. S., Seppet E., Gapeyeva H., Paasuke M., Sipila S., Kovanen V., Stenroth L., Musaro A., Hogrel J. Y., Barnouin Y., Butler-Browne G., Capri M., Franceschi C., Salvioli S., Circulating levels of adipokines and IGF-1 are associated with skeletal muscle strength of young and old healthy subjects. *Biogerontology*, **14**, 261-272 (2013).
- 110) Park S. Y., Kim Y. W., Kim J. E., Kim J. Y., Age-associated changes in fat metabolism in the rat and its relation to sympathetic activity. *Life Sci*, **79**, 2228-2233 (2006).
- 111) 藤田慎一. 老化促進モデルマウス(SAMP6)における骨格筋重量の加齢変化. 久留米大学保健体育センター研究紀要, **5**, 1-5 (1997).
- 112) de Picciotto N. E., Gano L. B., Johnson L. C., Martens C. R., Sindler A. L., Mills K. F., Imai S., Seals D. R., Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses vascular dysfunction and oxidative stress with aging in mice. *Aging cell*, **15**, 522-530 (2016).
- 113) Inzucchi S. E., Bergenstal R. M., Buse J. B., Diamant M., Ferrannini E., Nauck M., Peters A. L., Tsapas A., Wender R., Matthews D. R., Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, **35**, 1364-1379 (2012).
- 114) Arai Y., Takayama M., Gondo Y., Inagaki H., Yamamura K., Nakazawa S., Kojima T., Ebihara Y., Shimizu K., Masui Y., Kitagawa K., Takebayashi T., Hirose N., Adipose endocrine function, insulin-like growth factor-1 axis, and exceptional survival beyond 100 years of age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **63**, 1209-1218 (2008).
- 115) Bik W., Baranowska-Bik A., Wolinska-Witort E., Martynska L., Chmielowska M., Szybinska A., Broczek K., Baranowska B., The relationship between adiponectin levels and metabolic status in centenarian, early elderly, young and obese women. *Neuro Endocrinol Lett*, **27**, 493-500 (2006).
- 116) Arai Y., Nakazawa S., Kojima T., Takayama M., Ebihara Y., Shimizu K.-i., Yamamura K., Homma S., Osono Y., Gondo Y., Masui Y., Inagaki H., Kitagawa K., Hirose N., High adiponectin concentration and its role for longevity in female centenarians. *Geriatr Gerontol Int*, **6**, 32-39 (2006).

- 117) Man W. C., Miyazaki M., Chu K., Ntambi J., Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. *J Lipid Res*, **47**, 1928-1939 (2006).
- 118) Pan Z., Wang J., Tang H., Li L., Lv J., Xia L., Han C., Xu F., He H., Xu H., Kang B., Effects of palmitic acid on lipid metabolism homeostasis and apoptosis in goose primary hepatocytes. *Mol Cell Biochem*, **350**, 39-46 (2011).
- 119) Laplante M., Festuccia W. T., Soucy G., Blanchard P. G., Renaud A., Berger J. P., Olivecrona G., Deshaies Y., Tissue-specific postprandial clearance is the major determinant of PPARgamma-induced triglyceride lowering in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **296**, R57-66 (2009).
- 120) Walker C. G., Browning L. M., Mander A. P., Madden J., West A. L., Calder P. C., Jebb S. A., Age and sex differences in the incorporation of EPA and DHA into plasma fractions, cells and adipose tissue in humans. *Br J Nutr*, **111**, 679-689 (2014).
- 121) Yang L., Zhang Y., Wang S., Zhang W., Shi R., Decreased liver peroxisomal beta-oxidation accompanied by changes in brain fatty acid composition in aged rats. *Neurol Sci*, **35**, 289-293 (2014).
- 122) Liu H. H., Li J. J., Aging and dyslipidemia: a review of potential mechanisms. *Ageing Res Rev*, **19**, 43-52 (2015).
- 123) Geloneze B., de Oliveira Mda S., Vasques A. C., Novaes F. S., Pareja J. C., Tambascia M. A., Impaired incretin secretion and pancreatic dysfunction with older age and diabetes. *Metabolism*, **63**, 922-929 (2014).
- 124) Minamino T., Orimo M., Shimizu I., Kunieda T., Yokoyama M., Ito T., Nojima A., Nabetani A., Oike Y., Matsubara H., Ishikawa F., Komuro I., A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*, **15**, 1082-1087 (2009).
- 125) Nakatsuji H., Kishida K., Funahashi T., Shimomura I., Three-month treatment with pioglitazone reduces circulating levels of thiobarbituric acid-reacting substances, a marker of reactive oxidative stress, without change in body mass index, in Japanese patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, **212**, 243-245 (2010).
- 126) Erdogan H., Fadillioglu E., Ozgocmen S., Sogut S., Ozyurt B., Akyol O., Ardicoglu O., Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **71**, 149-152 (2004).
- 127) Ishida H., Takizawa M., Ozawa S., Nakamichi Y., Yamaguchi S., Katsuta H., Tanaka T., Maruyama M., Katahira H., Yoshimoto K., Itagaki E., Nagamatsu S., Pioglitazone improves insulin secretory capacity and prevents the loss of beta-cell mass in obese diabetic db/db mice: Possible protection of beta cells from oxidative stress. *Metabolism*, **53**, 488-494 (2004).
- 128) Zang S. S., Song A., Liu Y. X., Wang C., Song G. Y., Li X. L., Zhu Y. J., Yu X., Li L., Liu C. X., Kang J. C., Ren L. P., Chinese medicine Jinlida (JLD) ameliorates high-fat-diet induced insulin resistance in rats by reducing lipid accumulation in skeletal muscle. *Int J Clin Exp Med*, **8**, 4620-4634 (2015).
- 129) Hallakou S., Doaré L., Foufelle F., Kergoat M., Guerre-Millo M., Berthault M. F., Dugail I., Morin J., Auwerx J., Ferré P., Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes*, **46**, 1393-1399 (1997).
- 130) Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509 (1957).

- 131) Sheng Z., Otani H., Brown M. S., Goldstein J. L., Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 935-938 (1995).
- 132) Chomczynski P., Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159 (1987).