

Goto-Kakizaki (GK) ラットは、日本クレア社の Wistar (WI) ラットを起源として得られた、自然発症性の 2 型糖尿病モデルラットである。多因子遺伝により糖尿病を発症しており、継代しても安定して軽度の高血糖を示す。GK ラットの大きな特徴の一つは、WI ラットと比較して肥満でもやせでもない点であり、レプチンレセプターに異常は認められない。近年、アジアで広がりを見せる 2 型糖尿病は、欧米とは異なり body mass index が比較的低値でも発症する。そのため、非肥満である GK ラットの病態モデルとしての有用性には大きな期待が寄せられる。これまで、GK ラットの肝臓における脂質代謝に関しては、非肥満という表現型であるが故に、詳細な検討はなされてこなかった。しかしながら、GK ラットを病態モデルとして利用するためには、肝臓の脂質代謝に関わる基本的な情報が必要不可欠である。そこで本研究では、GK ラットの肝臓における脂肪酸および triacylglycerol (TAG) 代謝の変動とそのメカニズムについて解析し、非肥満 2 型糖尿病病態モデルとして使用する際に必要となる脂質代謝の特徴を示すことを目的とした。以下にそれらの具体的な取り組みを要約する。

### 第 1 章 GK ラットの肝臓における脂肪酸および TAG 代謝の解析

GK ラットの肝臓における脂肪酸および TAG 代謝に変動が生じているか否かを明らかにすることを目的とし、肥満および耐糖能異常を呈する Zucker *fafa* (ZF) ラットと比較して検討した。ZF ラットの肝 TAG レベルは、対照群である Zucker lean (ZL) ラットに比べ顕著に高かった。一方、GK ラットは非肥満であるにも関わらず、肝臓において TAG が軽度ではあるが蓄積していた。そこで、GK ラットの肝臓における脂質代謝変動のメカニズムを解明するために、脂質代謝関連遺伝子の発現に加えて、細胞外脂肪酸からの TAG 合成速度、細胞内での *de novo* TAG 合成速度、脂肪酸  $\beta$  酸化能を *ex vivo* または *in vivo* で調べた。その結果、GK ラット肝では血清中の free fatty acid (FFA) の上昇による脂肪酸の TAG への取り込みおよび TAG の *de novo* 合成が亢進していることが明らかとなった。一方、脂質代謝関連転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、PPAR $\alpha$  の活性化により発現が亢進することが明らかとなっている acyl-CoA thioesterase 1 (Acot1)、TAG 加水分解の初段階を担う adipose triglyceride lipase (ATGL)、ミトコンドリアでの脂肪酸  $\beta$  酸化の律速酵素である carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) とエネルギー代謝に重要なミトコンドリアタンパク質の発現に関与する peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$  の遺伝子発現が有意に高いこと、 $\beta$  酸化が亢進していることから、TAG および脂肪酸の分解が促進していることが明らかとなった。このように、GK ラットの肝臓では、TAG の合成と分解がともに亢進してバランスを維持しているが、このバランスは TAG 蓄積側に少し傾いているものと考えられる。また、GK ラットの肝臓では ATGL の発現が上昇していたことから、TAG が分解され、PPAR $\alpha$  の内因性リガンドである FFA の生成が亢進していると予想される。FFA 濃度が上昇し、PPAR $\alpha$  が持続的に活性化状態になると、PPAR $\alpha$  応答遺伝子である ATGL および CPT1a の遺伝子発現が上昇し、さらなる TAG および脂肪酸分解が促進される。このように、GK ラットの肝臓では ATGL 発現の上昇によって、PPAR $\alpha$ 、ATGL および  $\beta$  酸化系の相互影響によるポジティブフィードバックループが拡大し、TAG 分解および  $\beta$  酸化が促進されるものと考えられた。

### 第 2 章 PPAR $\alpha$ アゴニストによる肝臓 TAG 代謝変動の解析

ATGL は肝臓の TAG 分解に重要な役割を果たすと考えられる。しかしながら、これまで、PPAR $\alpha$  アゴニストによる肝 TAG 減少作用に対する、ATGL の関与については報告がない。そこで、PPAR $\alpha$  アゴニストとして 3 種類のフィブラートを選び、これらをラットに投与した時の肝 TAG 分解における ATGL の役割について解析することを目的とした。フェノフィブラート、ベザフィブラートおよびクロフィブリン酸を濃度を変えて混合した飼料を健常ラットである WI ラットに 14 日間与えると、フィブラートの摂取量に依存して肝臓の TAG 含量は低下したのに対し、ATGL の mRNA 発現量は上昇した。また、こ

のとき、ATGL と Acot1 の mRNA 発現レベルにはきわめて強い正の相関が認められた。次に、肝臓中のフィブリン酸の微量定量法の開発を行い、3 種のフィブラートを投与した時の、肝臓中のフィブリン酸濃度を測定した。飼料中のフィブラート濃度は同じでも、フィブリン酸として肝臓に存在する濃度はフィブラートの種類によって異なることが明らかとなった。肝臓中のフィブリン酸濃度と ATGL mRNA 発現レベルには強い正の相関が認められ、肝臓中のフィブリン酸濃度と肝 TAG 含量については、強い負の相関が確認された。以上の検討により、フェノフィブラート、ベザフィブラートおよびクロフィブリン酸は、肝臓におけるフィブリン酸濃度として評価すると、1 分子当たりほぼ同じ強さで PPAR $\alpha$  を活性化して ATGL の発現を亢進し、TAG 含量を低下させることが明らかになった。

また、肝臓に軽度の TAG 蓄積が認められる GK ラットにベザフィブラートを投与したところ、ATGL、Acot1 および CPT1a の mRNA 発現が上昇し、肝 TAG 含量を健常ラットと同程度まで低下させることができた。ベザフィブリン酸によって、GK ラットの PPAR $\alpha$ 、ATGL および  $\beta$  酸化系の相互影響によるポジティブフィードバックループがさらに拡大し、TAG 分解および  $\beta$  酸化が促進されたものと考えられた。

### 第 3 章 GK ラットの肝臓における脂肪酸プロファイルおよびその制御メカニズムの解析

GK ラットの肝臓の脂肪酸プロファイルと、その制御を行う脂肪酸の不飽和化と鎖伸長の役割について解析した。GK ラット肝臓の  $\Delta 9$  不飽和化酵素である stearoyl-CoA desaturase (SCD) の活性は、非肥満であるにも関わらず、ZF ラットに匹敵するほど高かった。そこで、SCD 産物であるオレイン酸 (18:1n-9) およびパルミトオレイン酸 (16:1n-7) の肝臓重量あたりの含量を調べたところ、ZF ラットでは対照群に対して顕著に多いのに対し、GK ラットではそれらの差は小さかった。SCD をコードする遺伝子である SCD1 の mRNA 発現レベルは、GK および ZF ラット共に、対照群に比べて有意に高かった。鎖伸長酵素をコードする遺伝子である fatty acid elongase (Elovl) 6 の mRNA 発現レベルは、ZF ラットでは対照群に比べて顕著に高いのに対し、GK ラットでは対照群とほぼ同じであった。以上の検討より、ZF ラットでは SCD1 と Elovl6 の両遺伝子の発現が高いため、18:1n-9 と 16:1n-7 の含量は顕著に多いのに対し、GK ラットでは SCD1 の発現は高いが、Elovl6 の発現は低く、両遺伝子の発現が同調していないことが示された。これが、GK ラットの SCD 活性は高いにも関わらず、18:1n-9 含量が少ないことの原因だと考えられた。SCD1 と Elovl6 の発現が同調していない自然発症性動物はこれまで報告がなく、本研究で示した GK ラットが初めての例である。そこで、SCD1 および Elovl6 の発現調節に関わる転写因子を人為的に変動させた時の、SCD1 および Elovl6 の応答を調べることにより、GK ラットにおける両遺伝子の発現応答を解析した。その結果、GK ラットでは sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) を抑制することが報告されている魚油投与に対する SCD1 の応答性が、WI ラットと異なる可能性が示唆された。原因としては、GK ラットの SCD1 に対する SREBP-1c の抑制過程そのものに異常がある可能性、または他の転写因子、特に GK ラットで活性化していると考えられる PPAR $\alpha$  の SCD1 に対する制御が強いため、SREBP-1c による抑制効果が相殺されている可能性が予想された。

### 総括

本研究では、これまで詳細が不明であった GK ラットの肝臓における脂肪酸と TAG 代謝の変動を解析し、① GK ラットは非肥満にも関わらず肝臓 TAG が微増していること、② TAG の合成が亢進しているが、ATGL 発現の上昇により TAG 分解も亢進していること、③ SCD1 と Elovl6 の発現が同調しておらず、その結果、SCD1 の発現が高いにも関わらず 18:1n-9 含量が増えていないこと、を明らかにした。また、これらの結果を踏まえて、以下の諸点を推測した。(1) ATGL 発現の亢進が FFA を増加させ、この FFA が PPAR $\alpha$  を活性化することにより、ATGL、CPT1a をさらに増産するというポジティブフィードバックループが存在する可能性が示唆された。(2) Elovl6 の発現が非常に高ければ、18:1n-9 が増産され、TAG がさらに蓄積する可能性が示唆された。

これらの脂質代謝に関する基本的な情報は、今後、GK ラットを非肥満 2 型糖尿病の病態モデルとして使用する際に有用なものになると考える。

## 論文審査結果の要旨

世界の肥満人口は増加の一途をたどり、2型糖尿病、心疾患などのリスクが高まり、社会問題へと発展している。日本や東アジアにおいても2型糖尿病が広がりを見せているが、肥満の程度は欧米に比べるとはるかに小さく、肥満（脂肪の蓄積）以外の要因の重要性が指摘されている。Goto-Kakizaki (GK) ラットは、日本クレア社の Wistar ラットを起源として得られた、自然発症性の2型糖尿病モデルラットであり、多因子遺伝により糖尿病を発症する。GK ラットの特徴は非肥満であり、非肥満型の糖尿病のモデルとしての有用性に期待が寄せられるが、非肥満であるがゆえに脂質代謝に関する情報はほとんどない。本論文では、GK ラットを非肥満2型糖尿病病態モデルとして使用する際に必要となる脂質代謝の特徴づけを行うことを目的とした。

第一章では、脂肪酸およびトリアシルグリセロール (TAG) 代謝に関する評価を行い、肥満、耐糖能異常を呈する Zucker *fa/fa* (ZF) ラットと比較することにより特徴づけを行った。ZF ラットに比べると軽度ではあるが、GK ラットは対照動物である Wistar ラットに比べて、肝臓中 TAG が有意な高値を示すことを見出した。脂肪酸合成に関与する遺伝子の発現量は、ZF ラットにおいて著しい高値を示したが、GK ラットではほとんど変化が認められなかった。一方、ラット肝スライスを用いた [<sup>14</sup>C] オレイン酸 (18:1n-9) からの TAG 合成速度、および *in vivo* での [<sup>14</sup>C] 酢酸からの脂肪酸合成速度評価の結果から、GK ラット肝では細胞内での TAG の *de novo* 合成速度の上昇および血清中脂肪酸濃度上昇に伴う細胞外からの脂肪酸流入の増加により TAG 合成が亢進しているものと考えられた。さらに、ラット肝スライスを用いた *ex vivo* の脂肪酸分解実験より、GK ラット肝では  $\beta$  酸化も亢進していることを見出した。これは、脂肪酸分解の調節をつかさどる転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、TAG 分解の初段階を担う adipose triglyceride lipase (ATGL)、ミトコンドリアの脂肪酸  $\beta$  酸化の律速酵素である carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) の発現量が高いことから裏付けられた。これらの結果より、GK ラット肝では、TAG の合成と分解はともに亢進しているものの、結果として TAG 蓄積量がやや増加していると結論付けている。これらの知見に基づいて、ATGL 発現の上昇に伴う TAG 分解によって供給される遊離脂肪酸が PPAR $\alpha$  を活性化し、 $\beta$  酸化の亢進をもたらす「ポジティブフィードバックループ」が働いていることを提唱した。

第二章では、PPAR $\alpha$  活性化による肝臓の TAG 低下における ATGL の関与について検討した。3種類のフィブラート系薬物クロフィブリン酸、ベザフィブラート、

フェノフィブラートをラットに投与し、PPAR $\alpha$ の活性化に伴って ATGL の遺伝子発現量が増加し、蛋白質量と酵素活性が上昇すること、また、ATGL 遺伝子発現量と肝 TAG レベルに負の相関があることを突き止めた。また、高速液体クロマトグラフィーを用いたフィブラート系薬物の活性代謝物の微量定量法を開発し、フェノフィブリン酸、ベザフィブリン酸およびクロフィブリン酸のいずれも肝臓内の濃度に依存して ATGL mRNA 発現量を増加させ、肝 TAG を低下させることを示した。さらに、GK ラットにベザフィブラートを投与すると ATGL および CPT1a の mRNA 発現量の増加に伴い、肝 TAG が低下することを示した。これらの結果より、PPAR $\alpha$ の活性化による ATGL および CPT1a の誘導によりポジティブフィードバックループが拡大し、肝臓の TAG 低下に強く寄与すると結論付けている。

第三章では、GK ラット肝の脂肪酸プロファイルの特徴を明らかにすることを目的とし、ZF ラットとの比較を行った。ZF ラット肝では、*de novo* 経路で合成されるパルミチン酸 16:0、パルミトレイン酸 16:1n-7 および 18:1n-9 が著しく増加するのに対し、GK ラットでは、16:0 と 16:1n-7 の増加は認められるものの、18:1n-9 がほとんど増加しないという相違点を明らかにした。これらの脂肪酸合成に関与する酵素遺伝子の発現を検討し、GK ラット肝では 2 重結合を導入する酵素をコードする遺伝子 SCD1 の発現量は ZF ラットに匹敵する高レベルであるのに対し、16:0 炭素鎖伸長酵素をコードする Elovl6 の発現がほとんど変化していないことを見出した。従来、SCD1 と Elovl6 の発現調節は同調していると考えられており、異なる発現調節が起こっている初めての例として注目される。また、種々の薬物や、栄養状態の変動に対するこれらの遺伝子の応答を解析し、GK ラット肝では sterol regulatory element binding protein 1c を介する調節が ZF ラットとは異なっている可能性があることを結論付けている。

非肥満 2 型糖尿病の病態の詳細な解明と予防、治療法の開発は喫緊の課題である。本研究において、GK ラットは非肥満であっても肝臓の脂質代謝に広範な変調をきたしていることを明らかにした意義は大きい。本研究の結果は、非肥満 2 型糖尿病の病態解明や治療法の開発においてモデル動物として GK ラットを用いる際に重要な知見を提供するものである。したがって、本論文は独創的な研究であるとともに、新規性と有用性の観点からも意義のあるものであり、城西大学大学院薬学研究科における「課程によらない博士（薬学）」の論文に十分値するものであると判断した。