

Goto-Kakizaki ラットの肝臓における  
脂質代謝の解析

唐橋 美奈子

## 論文目録

本学位論文は下記の原著論文を基に作成され、城西大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Karahashi M, Ishii F, Yamazaki T, Imai K, Mitsumoto A, Kawashima Y, Kudo N (2013) Up-regulation of stearyl-CoA desaturase 1 increases liver MUFA content in obese Zucker but not Goto-Kakizaki rats. *Lipids* 48:457-467
2. Karahashi M, Fukuhara H, Hoshina M, Sakamoto T, Yamazaki T, Mitsumoto A, Kawashima Y, Kudo N (2014) A simple and sensitive method for the determination of fibric acids in the liver by liquid chromatography. *Biol Pharm Bull* 37:105-112
3. Karahashi M, Hoshina M, Yamazaki T, Sakamoto T, Mitsumoto A, Kawashima Y, Kudo N (2013) Fibrates reduce triacylglycerol content by upregulating adipose triglyceride lipase in the liver of rats. *J Pharmacol Sci* 123:356-370

# 目次

略語 .....	i
総論の部	
緒言 .....	1
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 .....	5
第1節 GK ラットの基礎的情報 .....	5
第2節 肝臓の脂質組成 .....	6
第3節 肝臓の病理組織像 .....	6
第4節 脂肪酸および TAG 代謝関連遺伝子の発現 .....	9
第5節 肝スライスにおける細胞外脂肪酸の TAG への取り込み活性 .....	12
第6節 <i>In vivo</i> における細胞内の <i>de novo</i> TAG 合成速度 .....	12
第7節 肝スライスにおける脂肪酸 $\beta$ 酸化能 .....	15
第8節 <i>In vivo</i> での肝臓からの VLDL 分泌速度 .....	15
第9節 脂質代謝関連転写因子遺伝子の発現 .....	15
第10節 小括、考察 .....	17
第2章 PPAR $\alpha$ アゴニストによる肝臓 TAG 代謝変動の解析 .....	23
第1節 肝臓における ATGL 発現と TAG 含量に対するフィブラートの影響の解析 .....	23
第2節 肝臓中のフィブリン酸の微量定量法の開発 .....	36

第3節 GK ラットの肝臓における ATGL 発現と TAG 含量に対する ベザフィブラートの効果の解析	45
第4節 考察	49
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	54
第1節 GK ラットの肝臓脂肪酸プロファイルの解析	54
第2節 GK ラットの肝臓脂肪酸プロファイルの制御メカニズムの解析	69
第3節 考察	73
総括	79
謝辞	82
実験の部	83
引用文献	102

本論文で使用した略号を以下に示す。

ACC : acetyl-CoA carboxylase

ACLY : ATP-citrate lyase

Acot : acyl-CoA thioesterase

Acox : acyl-CoA oxidase

ACSL : long-chain acyl-CoA synthetase

apoCIII : apolipoprotein CIII

ATGL : adipose triglyceride lipase

BMI : body mass index

BrMDCM : 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin

C : cholesterol

CE : cholesterol ester

CGI : comparative gene identification

ChREBP : carbohydrate response element-binding protein

CPT : carnitine palmitoyltransferase

DAG : diacylglycerol

DGAT : acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EI-MS : electrospray ionization mass spectrometry

Elovl : fatty acid elongase

ER : endoplasmic reticulum

FAB-MS : fast atom bombardment mass spectroscopy

FABP : fatty acid binding protein

FABPpm : plasma membrane-associated fatty acid binding protein

Fads : fatty acid desaturase

FAS : fatty acid synthase

FAT/CD36 : fatty acid translocase

FATP : fatty acid transport protein

FFA : free fatty acid

G6Pase : glucose-6-phosphatase

GK : glucokinase

GK : Goto—Kakizaki

GLUT : glucose transporter type

GPAT : glycerol-3-phosphate acyltransferase

H&E : hematoxylin and eosin

HPLC : high performance liquid chromatography

HTGL : hepatic triglyceride lipase

IRS : insulin receptor substrate

LCAD : long-chain acyl-CoA dehydrogenase

LPK : L-type pyruvate kinase

LPL : lipoprotein lipase

LXR : liver X receptor

MCAD : medium-chain acyl-CoA dehydrogenase

ME : malic enzyme

MTP : microsomal triglyceride transfer protein

MUFA : monounsaturated fatty acid

NADH : nicotinamide adenine dinucleotide reduced

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced

NEFA : nonesterified fatty acid

NRF : nuclear respiratory factor

ORO : oil red O

PC : phosphatidylcholine

PCE : palmitoyl-CoA chain elongase

PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase

PGC : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator

PI : phosphatidylinositol

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PL : phospholipid

POCE : palmitoleoyl-CoA chain elongase

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

PPRE : PPAR response element

PUFA : polyunsaturated fatty acid

SCD : stearoyl-CoA desaturase

SFA : saturated fatty acid

SHR : spontaneously hypertensive

SHR/ND<sup>+</sup> : SHR/ND<sup>mcr-cp</sup> (+/+)

SHR/ND<sup>cp</sup> : SHR/ND<sup>mcr-cp</sup> (*cp/cp*)

SREBP : sterol regulatory element-binding protein

STZ : streptozotocin

TAG : triacylglycerol

TLC : thin-layer chromatography

UV : ultraviolet

VLCAD : very long-chain acyl-CoA dehydrogenase

VLDL : very low-density lipoprotein

WI : Wistar

ZF : obese Zucker (*fa/fa*)

ZL : lean Zucker (*?/+*)

炭素数の異なる脂肪酸は、以下のように示した。16:0 等のコロン前の数字は脂肪酸の炭素数を表し、コロン後の数字は不飽和結合数を表す。

16:0、 palmitic acid (パルミチン酸)

16:1n-7、 palmitoleic acid (パルミトオレイン酸)

18:0、 stearic acid (ステアリン酸)

18:1n-9、 oleic acid (オレイン酸)

18:1n-7、 *cis*-vaccenic acid (シスバクセン酸)

18:2n-6、 linoleic acid (リノール酸)

18:3n-3、  $\alpha$ -linolenic acid ( $\alpha$ -リノレン酸)

18:3n-6、  $\gamma$ -linolenic acid ( $\gamma$ -リノレン酸)

20:3n-9、 5, 8, 11-eicosatrienoic acid (5, 8, 11-エイコサトリエン酸)

20:3n-6、 8, 11, 14-eicosatrienoic acid (8, 11, 14-エイコサトリエン酸)

20:4n-6、 arachidonic acid (アラキドン酸)

20:5n-3、 eicosapentaenoic acid (エイコサペンタエン酸)

22:5n-3、 docosapentaenoic acid (ドコサペンタエン酸)

22:6n-3、 docosahexaenoic acid (ドコサヘキサエン酸)



## 総論の部

### 緒言

近年、これまで欧米諸国でみられた肥満、糖尿病といった生活習慣病の増加が全世界に広がり、その傾向はますます強まる危険性が指摘されている。

世界の肥満人口は飢餓人口を上回り、世界的な公衆衛生問題へと発展している。2008年の世界保健機構（World Health Organization、WHO）の統計によれば、世界の成人の14億人がbody mass index（BMI）が25以上を示す肥満、5億人がBMIが30以上を示す高度肥満であり、世界成人人口の35%、つまり3人に1人以上が肥満となっている。肥満は糖尿病、高血圧症、心疾患、あるいはある種の癌発症の大きなリスクファクターとなり、少なくとも1年に280万人が肥満に起因して死亡している。

2013年9月、中国の糖尿病人口が1億3980万人にまで増加したことがXuらによって米医学誌「米国医師会雑誌」に発表された[97]。有病率は11.6%で世界全体の8.3%を大きく上回っていること、また、成人の2人に1人が糖尿病予備群で、推定数は4億9340万人に上ることが明らかとなった。中国国民の糖尿病をめぐる現状が警戒水準に達し、国を挙げての予防対策なしには、将来的に糖尿病関連の合併症が蔓延する可能性が高いと示唆されている。

日本の現状については、厚生労働省の「平成23年国民健康・栄養調査報告」によると、肥満者の割合は男性30.3%、女性21.5%と報告されている。また、肥満人口は男性1300万人および女性1000万人と推計されている。先進諸国（OECD加盟国）の中で比較すると日本の肥満人口の割合は最も低く、BMIが30以上の頻度は欧米の約10分の1にとどまる（OECD Health Date 2012）。ところが、BMIが低いにもかかわらず、日本人の2型糖尿病の発症率は欧米と同等である。肥満度が高くなれば、生活習慣病の発症率が高くなることは間違いのない事実であるが、BMIと疾病の発症は必ずしも一致しない。これは、肥満症の発症には脂肪が蓄積する部分が大きく関与し、皮下脂肪蓄積型肥満よりも内臓脂肪蓄積型肥満の方が危険度が高いためだと考えられている。したがって、内臓脂肪蓄積型肥満傾向にある日本人は注意が必要である。「平成23年国民健康・栄養調査報告」によると、糖尿病が強く疑われる人と糖尿病の可能性を否定できない「予備群」を合わせると、20歳以上の国民の27.1%にのぼると推計され、4人に1人以上が糖尿病かその予備群である。日本人の糖尿病患者の90%以上を2型糖尿病が占めており、これはわが国の糖尿病の特徴である。欧米人では肥満が頻繁にみられ、インスリン分泌能は高いが、

末梢組織でのインスリン抵抗性が強い。一方、日本人は欧米人に比べるとインスリン分泌能が低いため、高度な肥満がなくても耐糖能異常を生じ、非肥満者でも内臓脂肪の蓄積があるとインスリン抵抗性を来し、軽度の糖尿病を発症する可能性がある。このように、欧米人と日本人では2型糖尿病のタイプが異なっており、このことは2型糖尿病の予防および治療法も欧米人と日本人で異なる可能性があることを意味している。2型糖尿病は、遺伝因子および環境因子が相互に作用しあって発症する多因子疾患である。遺伝因子については、単一遺伝子の異常の割合は少なく、多数の原因遺伝子の組み合わせによるものの割合が圧倒的に大きい。遺伝的素因に食事、運動、ストレス、肥満といった環境因子が加わることによって発症するため、2型糖尿病の成因は複雑であり、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性とが様々な割合で絡み合っている。

最近、メタボリックシンドロームが生活習慣病の一次予防の観点から重要視されることにともない、脂肪肝への関心が非常に高まっている。肥満、メタボリックシンドロームが脂肪肝の発症および進展に重要な役割を果たし、また脂肪肝そのものがメタボリックシンドロームの肝臓での表現型として注目されている [103]。肥満と同様、脂肪肝は先進国だけではなく発展途上国でもみられ、全世界人口の10~20%に広がっており、世界的な公衆衛生問題として認識されつつある (Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. June 2012.)。日本においても、食生活の欧米化や運動不足にともなう肥満の増加とともに、脂肪肝の保有者が増加している。脂肪肝は健診受診者の中でも20~30%に認められ、BMIが25以上30未満の肥満では34.6%、BMIが30以上の高度肥満においては70%にもおよぶ [103]。このように肥満が脂肪肝の重要な関連因子であることは周知のことであるが、近年、BMI値には変化がないのに脂肪肝が増加していること、また、BMI正常値群でも著しい増加がみられていることから、非肥満においても脂肪肝の存在が注目されている [105]。また、最近、驚くべきことにこの脂肪肝が子供にも広がっており、米国の小児の10人に1人、700万人程度が脂肪肝を罹っていると推定されるという調査結果が示された。脂肪肝疾患は、肥満の小児の約40%が罹っているが標準体重の小児の間でも広がっており、肥満の比率が頭打ちになりはじめているにもかかわらず脂肪肝は広がり続けている。このことから、脂肪肝の増加には過食や運動不足などによる肥満の増加だけでは説明しきれない問題の存在が示唆されている。非肥満者における脂肪肝は肝機能、血清脂質、糖代謝などの生活習慣病関連因子と関係しているという調査結果や、肝内脂肪はBMIや体脂肪からは独立して肝臓、骨格筋および脂肪組織におけるインスリン抵抗性およびメタボリックシ

ンドロームの発症に関与するという報告 [104] からも、肝臓トリアシルグリセロール (triacylglycerol、TAG) 蓄積は、インスリン抵抗性の亢進やメタボリックシンドロームの発症および進行と深く関連していることが考えられる。そのため、肝臓 TAG 蓄積メカニズムの解明は非常に重要な研究課題である。

昨今、めざましい発達をとげている発生工学技術によって糖代謝やインスリン抵抗性にかかわる遺伝子改変動物が開発されているが、単一遺伝子のノックアウトによる糖尿病は予想よりは軽症であり、やはり多遺伝子の関与が重要であることが考えられる。つまり、単一ではなく多数の原因遺伝子が作用しあって発症する例が圧倒的に多いヒトの 2 型糖尿病の発症を、既知の単一の遺伝子の作用だけで説明することは難しい。また、食餌誘発性モデルは、非常に人工的で不自然な操作となり、結果をヒトに当てはめることは妥当とはいえない。一方、多遺伝子支配型の自然発症モデル動物は、ヒトの 2 型糖尿病の病態に類似した症状を示すことから、糖尿病の予防法や治療法を確立する上でも極めて有用である。日本ではこれまで、2 型糖尿病の優れた自然発症モデルマウスおよびラットが数多く作出されてきており、それらの多くのモデル動物は肥満を呈し、インスリン抵抗性を示すことがわかっている。

Goto-Kakizaki (GK) ラットは 1975 年に Goto と Kakizaki らにより、日本クレア社の Wistar (WI) ラットを起源として、経口ブドウ糖負荷試験で耐糖能が低下している個体を選抜し交配するという操作を第 8 世代まで繰り返し行い、第 9 世代からは兄妹交配を行うことで得られた、自然発症型の 2 型糖尿病モデルラットである [27, 28]。多因子遺伝により糖尿病を発症しているが [23, 58]、継代しても安定して、軽度の高血糖を示す。GK ラットでは胎生期から膵臓  $\beta$  細胞の形成不全が認められ、膵臓でのインスリン含量や  $\beta$  細胞数は低値を示している [66]。膵臓でのグルコースに対する  $\beta$  細胞の感受性は著しく低下しており、グルコースに対するインスリン分泌反応は低下している。このように、GK ラットではインスリン分泌が低下している一方で、飽食時の血中インスリン値はむしろ高値を示しており、インスリン抵抗性を示す [7, 8]。血中インスリンが高値でありながら、糖新生が亢進しており、糖輸送の低下などの報告がなされている [42, 69]。また、GK ラットの大きな特徴の一つは、対照群である WI ラットと比較して肥満でもやせでもない、非肥満を呈している点であり、レプチンレセプターに異常は認められない。肥満と糖尿病は密接に関連していると考えられており、これまでも肥満を呈する自然発症モデル動物での解析が多く行われてきた。しかしながら、上述したように、糖尿病は BMI が比較的 low 値を示すアジアでの広がりが高く、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。

肝臓は、糖代謝だけでなく脂質代謝においても、非常に重要な役割を果たす臓器である。肝臓は脂質の取り込み、合成、貯蔵、分解および分泌を行い、全身の脂肪酸および TAG 代謝の中心的な働きを担う。そのため、肥満や糖尿病の病態においては、肝臓でのインスリン感受性の低下や糖代謝異常だけでなく、高い確率で脂肪肝などの脂質代謝異常をともなう。糖代謝異常と脂質代謝異常は相互に影響し合い、密接な関係があるが、その病態としては共通の部分と共通していない部分があり、まだ十分には両者の関係は解明されていない。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、肝臓における脂肪酸および TAG 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 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 型糖尿病の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。

## 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

レプチンレセプターに異常があり肥満を呈する 2 型糖尿病モデル動物である *db/db* マウスや、spontaneously hypertention (SHR) /NDmcr-cp (*cp/cp*) (SHR/NDcp) ラットでは、肝臓に TAG が蓄積している [24, 47]。また、肥満かつ耐糖能異常モデル動物である obese Zucker (*fa/fa*) (ZF) ラットの肝臓の TAG 含量を減少させると、グルコース耐性が改善することが明らかとされている [36]。これらの事実は、肝臓における脂肪酸や TAG 代謝が糖尿病の病態と深く関係していることを示唆している。そこで、本章では、2 型糖尿病であるが非肥満を呈している 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た。

### 第1節 GK ラットの基礎的情報

GK ラット、ZF ラットおよびそれぞれの対照群の体重および各種組織の相対重量を Table 1-1 に示した。GK ラットの体重は対照群 (Wistar (WI) ラット) に比べ約 14% 小さかった。GK ラットの肝臓、精巣周囲脂肪組織および腸間膜脂肪組織の相対重量については、WI ラットとの間に大きな差異は認められなかったが、肩甲骨間褐色脂肪組織の相対重量が WI ラットの 2.0 倍であった。一方、ZF ラットについては、体重は非肥満対照群 (lean Zucker (?/+) (ZL) ラット) の 1.6 倍であった。ZF ラットの肝臓の相対重量は ZL ラットの 1.24 倍であり、白色および褐色脂肪組織の相対重量はいずれも 2 倍以上と有意に高かった。

GK ラットおよび ZF ラットの血清生化学パラメータとして非絶食下における血糖、インスリン、TAG、総コレステロール、非エステル型脂肪酸 (nonesterified fatty acid、NEFA) を測定した (Table 1-2)。GK ラットにおける血糖値およびインスリン値は、WI ラットと比較して、それぞれ 1.92 倍および 1.75 倍であった。総コレステロール値および NEFA 値は両者とも WI ラットの 1.66 倍と有意に高いが、TAG 値は 41% 低かった。一方、ZF ラットについては、血糖値に上昇は認められなかったが、インスリン値は ZL ラットと比較して 18.7 倍と有意な高値を示した。ZF ラットの TAG 値、総コレステロール値および NEFA 値は、ZL ラットに比べて、それぞれ 6.14 倍、1.83 倍および 2.0 倍と有意に高かった。

## 第2節 肝臓の脂質組成

肝臓の TAG、ジアシルグリセロール (diacylglycerol、DAG)、リン脂質 (phospholipid、PL)、コレステロールエステル (cholesterol ester、CE) および遊離脂肪酸 (free fatty acid、FFA) の臓器重量あたりの含量について調べた (Table 1-3)。GK ラットの TAG および DAG 含量は、WI ラットに比べて、それぞれ 1.48 倍および 1.32 倍有意に高く、PL 含量は WI ラットの 91% であった。一方、ZF ラットは、ZL ラットに比べて、TAG および DAG 含量はそれぞれ 5.72 倍および 1.73 倍と顕著に高かったが、PL 含量には差はなかった。CE と FFA については、GK ラットと WI ラットとの間に差異が認められなかった。ZF ラットでは、ZL ラットに比べて、CE は 1.64 倍、FFA は 1.39 倍高かった。

## 第3節 肝臓の病理組織像

GK ラット、ZF ラットおよびそれぞれの対照群の肝臓の切片について、hematoxylin and eosin (H&E) 染色および Oil red O (ORO) 染色を行い、その病理組織像を Fig. 1-1 に示した。WI ラットでは星細胞 (伊東細胞) 等の肝臓の類洞の細胞を除いては、肝細胞の空胞変性や脂肪沈着は認められなかった (Fig. 1-1 A, B)。GK ラットでは肝細胞への脂肪沈着が小葉周辺性に顕著に認められた (Fig. 1-1 C, D)。一方、ZF ラットでは、びまん性に小滴性の脂肪沈着が肝細胞に認められた (Fig. 1-1 G, H)。ZL ラットでは、脂肪変性の所見は認められなかった (Fig. 1-1 E, F)。

**Table 1-1** Body weight and relative organ weights of WI, GK, ZL and ZF rats

	WI	GK	ZL	ZF
Body weight ( g )	310.9 ± 2.8	266.4 ± 19.0 <sup>**</sup>	281.4 ± 8.1	452.0 ± 41.6 <sup>###</sup>
	( % of body weight )			
Liver	4.21 ± 0.23	4.43 ± 0.11	3.80 ± 0.07	4.72 ± 0.30 <sup>###</sup>
Epididymal fat	0.99 ± 0.11	0.95 ± 0.06	0.86 ± 0.10	2.72 ± 0.30 <sup>###</sup>
Mesenteric fat	0.67 ± 0.04	0.75 ± 0.05 <sup>*</sup>	0.62 ± 0.07	1.58 ± 0.10 <sup>###</sup>
Brown adipose tissue	0.10 ± 0.01	0.20 ± 0.02 <sup>***</sup>	0.15 ± 0.01	0.36 ± 0.03 <sup>###</sup>

Values represent means ± SD (n = 6). <sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup> Significantly different from WI rats (<sup>\*</sup>*p* < 0.05; <sup>\*\*</sup>*p* < 0.01; <sup>\*\*\*</sup>*p* < 0.001). <sup>###</sup> Significantly different from ZL rats (<sup>###</sup>*p* < 0.001). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant (*p* > 0.05).

**Table 1-2** Serum biochemical parameters of WI, GK, ZL and ZF rats

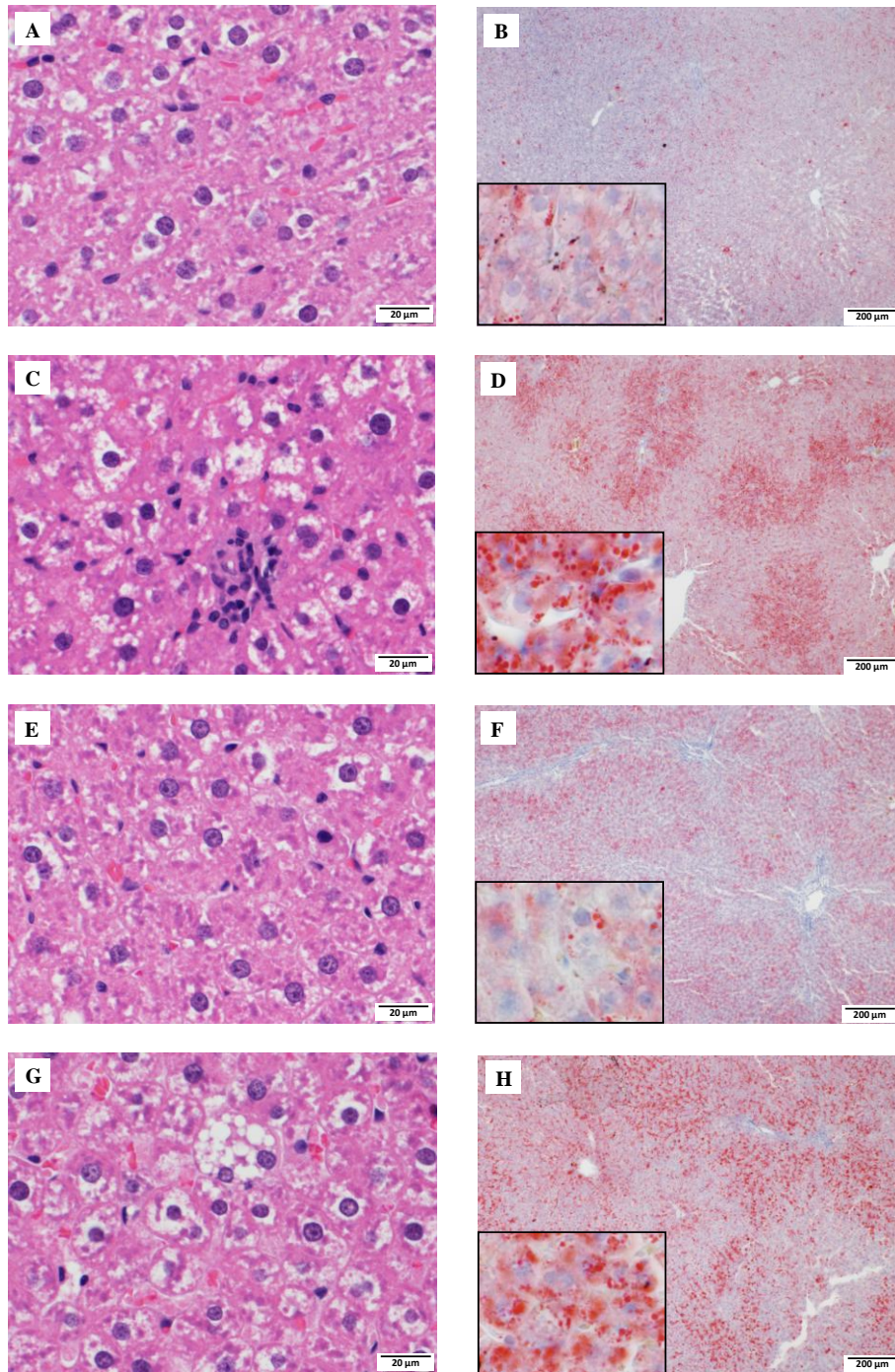
	WI	GK	ZL	ZF
Glucose ( mg / dL )	179.9 ± 21.4	344.7 ± 42.5 <sup>***</sup>	192.1 ± 13.3	219.7 ± 37.9
Insulin ( ng / mL )	2.4 ± 1.0	4.2 ± 0.9 <sup>**</sup>	2.6 ± 0.7	48.6 ± 23.9 <sup>##</sup>
TAG ( mg / dL )	172.0 ± 54.5	101.1 ± 31.7 <sup>*</sup>	128.6 ± 34.1	789.2 ± 121.0 <sup>###</sup>
Total cholesterol ( mg / dL )	63.3 ± 3.4	105.2 ± 5.0 <sup>***</sup>	63.8 ± 3.9	116.9 ± 13.3 <sup>###</sup>
NEFA ( mEq / L )	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1 <sup>***</sup>	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1 <sup>#</sup>

Values represent means ± SD (n = 4–8). <sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup> Significantly different from WI rats (<sup>\*</sup>*p* < 0.05; <sup>\*\*</sup>*p* < 0.01; <sup>\*\*\*</sup>*p* < 0.001). <sup>#</sup>, <sup>##</sup>, <sup>###</sup> Significantly different from ZL rats (<sup>#</sup>*p* < 0.05; <sup>##</sup>*p* < 0.01; <sup>###</sup>*p* < 0.001). In the absence of a superscript, the difference in the means is not significant (*p* > 0.05).

**Table 1-3** The contents of lipids in the liver of WI, GK, ZL and ZF rats

	WI	GK	ZL	ZF
	(μmol/g liver)			
TAG	27.48 ± 3.20	40.59 ± 5.60 <sup>***</sup>	18.02 ± 3.08	103.14 ± 31.81 <sup>##</sup>
DAG	0.83 ± 0.08	1.09 ± 0.17 <sup>*</sup>	0.71 ± 0.12	1.22 ± 0.23 <sup>###</sup>
PL	54.58 ± 2.08	49.41 ± 1.20 <sup>***</sup>	63.02 ± 3.00	60.58 ± 2.20
CE	1.42 ± 0.37	1.18 ± 0.19	1.63 ± 0.30	2.68 ± 0.71 <sup>##</sup>
FFA	2.52 ± 0.57	3.37 ± 0.37	0.92 ± 0.18	1.28 ± 0.12 <sup>##</sup>

Values represent means ± SD (n = 4–8). <sup>\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup> Significantly different from WI rats (<sup>\*</sup>*p* < 0.05; <sup>\*\*\*</sup>*p* < 0.001). <sup>##</sup>, <sup>###</sup> Significantly different from ZL rats (<sup>##</sup>*p* < 0.01; <sup>###</sup>*p* < 0.001). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant (*p* > 0.05).



**Fig. 1-1** Representative H&E and ORO staining in liver of WI (A, B), GK (C, D), ZL (E, F) and ZF rats (G, H). Peripheral accumulation of ORO-positive vacuolation in sections (C) and (D) was observed. Sections (G) and (H) show diffuse lipid accumulation. Scale bars indicate 20 and 200 μm in H&E- and ORO-stained sections, respectively. Insets show a higher magnification of the respective figure (B, D, F, H).



#### 第4節 脂肪酸およびTAG代謝関連遺伝子の発現

本章第2節および第3節の結果より、GKラットは非肥満であるにもかかわらず、肝臓にTAGが蓄積していることが明らかとなり、脂肪酸およびTAG代謝が変異していると考えられた。そこで、GKラットの肝臓における脂肪酸およびTAG代謝変動の鍵となる酵素、タンパク質を見出す目的で、これらの遺伝子の発現について、肥満モデルであるZFラットと比較して調べた (Table 1-4)。

##### 1) 脂肪酸およびTAGの合成

ZFラットは、ZLラットに比べて、脂肪酸の *de novo* 合成に関与する fatty acid synthase (FAS)、acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)、ATP-citrate lyase (ACLY) および malic enzyme 1 (ME1)、グリセロ脂質合成に関与する glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1) および diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) の発現が有意に高かった。GPAT4 と DGAT1 の mRNA レベルについては、ZLラットとの間に差異は認められなかった。一方、GKラットについては、WIラットと比較して、ME1 の発現のみが有意に高くなり、GPAT1 の発現は有意に低かった。それ以外の遺伝子の発現については、GKラットとWIラットの間に差異はなかった。

##### 2) 脂肪酸の輸送、運搬および活性化

脂肪酸の輸送、運搬および活性化に関するタンパク質については、ZFラットの fatty acid translocase (FAT/CD36) および long-chain acyl-CoA synthetase 5 (ACSL5) の mRNA レベルが ZLラットに比べて有意に高かったが、fatty acid transport protein 2 (FATP2)、FATP4、FATP5、plasma membrane-associated fatty acid binding protein (FABPpm)、FABP1、ACSL1 および ACSL3 の発現についてはZFラットとZLラットの間に差異は認められなかった。一方、GKラットでは、FAT/CD36 および FATP5 の発現がWIラットに比較して減少していた。FATP4 の発現については、WIラットに比べてGKラットで高い傾向を示した。それ以外の遺伝子の発現は、GKラットとWIラットの間に差異はなかった。

### 3) TAG および脂肪酸の分解

TAG を加水分解する adipose triglyceride lipase (ATGL)、脂肪酸のミトコンドリアへの移行を担い、 $\beta$  酸化の律速酵素となる carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a)、ミトコンドリアの数や呼吸機能の調節を行うと考えられている peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) の発現は、GK ラットでは WI ラットに比べて有意に高かったのに対し、ZF ラットでは ZL ラットに比べ低くなった。ATGL の活性化因子とされている comparative gene identification-58 (CGI-58) の発現は WI ラットに比べて GK ラットで低下していたが、ZF ラットと ZL ラットでは差異はなかった。ミトコンドリア  $\beta$  酸化に関与する medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)、very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)、ペルオキシソームの  $\beta$  酸化に関与する acyl-CoA oxidase 1 (Acox1) の発現は GK ラット、ZF ラットともにそれぞれの対照群との間に差異が認められなかった。Long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) の発現は GK ラットと WI ラットでは差異がなかったが、ZF ラットでは ZL ラットに比べて、有意に高かった。

### 4) リポタンパク質代謝

Lipoprotein lipase (LPL) と hepatic triglyceride lipase (HTGL) の活性を阻害する apolipoprotein CIII (apoC III) の発現は、GK ラットでは対照群に比べて有意に低下していたが、ZF ラットでは ZL ラットに比べて上昇していた。肝細胞内で very low-density lipoprotein (VLDL) の会合や分泌を促進する microsomal triglyceride transfer protein (MTP) の発現については、GK ラット、ZF ラットともにそれぞれの対照群との間に差異が認められなかった。

### 5) 糖代謝

L-type pyruvate kinase (LPK) と glucokinase (GK) の発現は ZL ラットに比べて ZF ラットで有意に高かったが、両遺伝子の発現には GK ラットと WI ラットでは差異はなかった。Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) と glucose-6-phosphatase (G6Pase) の発現については、GK ラットは WI ラット

**Table 1-4** Gene expressions in the liver

Gene	WI	GK	ZL	ZF
<b>Lipogenesis</b>				
FAS	1.0 ± 0.36	0.72 ± 0.24	1.00 ± 0.42	8.96 ± 2.30 <sup>###</sup>
ACCI	1.0 ± 0.23	0.94 ± 0.10	1.00 ± 0.25	4.34 ± 0.85 <sup>###</sup>
ACLY	1.0 ± 0.28	1.36 ± 0.30	1.00 ± 0.20	3.02 ± 0.61 <sup>###</sup>
ME1	1.0 ± 0.28	1.98 ± 0.55 <sup>**</sup>	1.00 ± 0.36	4.07 ± 0.80 <sup>###</sup>
GPAT1	1.0 ± 0.14	0.73 ± 0.09 <sup>**</sup>	1.00 ± 0.14	3.31 ± 0.29 <sup>###</sup>
GPAT4	1.0 ± 0.20	0.87 ± 0.09	1.00 ± 0.21	0.95 ± 0.24
DGAT1	1.0 ± 0.22	1.08 ± 0.30	1.00 ± 0.34	1.61 ± 0.59
DGAT2	1.0 ± 0.24	0.84 ± 0.11	1.00 ± 0.05	1.78 ± 0.35 <sup>##</sup>
<b>Fatty acid trafficking</b>				
FAT/CD36	1.0 ± 0.40	0.57 ± 0.16 <sup>*</sup>	1.00 ± 0.22	1.90 ± 0.72 <sup>#</sup>
FATP2	1.0 ± 0.19	0.99 ± 0.15	1.00 ± 0.08	0.94 ± 0.19
FATP4	1.0 ± 0.18	1.27 ± 0.32	1.00 ± 0.29	1.07 ± 0.34
FATP5	1.0 ± 0.17	0.78 ± 0.04 <sup>*</sup>	1.00 ± 0.18	1.04 ± 0.39
FABPpm	1.0 ± 0.021	1.02 ± 0.14	1.00 ± 0.18	0.93 ± 0.36
FABP1	1.0 ± 0.21	0.97 ± 0.19	1.00 ± 0.18	0.75 ± 0.22
ACSL1	1.0 ± 0.14	0.96 ± 0.07	1.00 ± 0.16	0.91 ± 0.12
ACSL3	1.0 ± 0.19	0.89 ± 0.16	1.00 ± 0.26	0.95 ± 0.45
ACSL5	1.0 ± 0.26	0.73 ± 0.26	1.00 ± 0.32	1.74 ± 0.30 <sup>##</sup>
Acot1	1.0 ± 0.22	1.46 ± 0.31 <sup>*</sup>	1.00 ± 0.05	0.99 ± 0.06
<b>Lipid degradation</b>				
ATGL	1.0 ± 0.26	1.86 ± 0.70 <sup>*</sup>	1.00 ± 0.35	0.63 ± 0.13 <sup>#</sup>
CGI-58	1.0 ± 0.06	0.66 ± 0.17 <sup>**</sup>	1.00 ± 0.11	0.86 ± 0.29
CPT1a	1.0 ± 0.41	1.58 ± 0.34 <sup>*</sup>	1.00 ± 0.51	0.53 ± 0.29
MCAD	1.0 ± 0.14	1.06 ± 0.09	1.00 ± 0.12	0.94 ± 0.16
LCAD	1.0 ± 0.22	1.02 ± 0.12	1.00 ± 0.07	1.30 ± 0.08 <sup>###</sup>
VLCAD	1.0 ± 0.20	1.06 ± 0.18	1.00 ± 0.10	1.08 ± 0.12
PGC1 $\alpha$	1.0 ± 0.29	2.39 ± 0.43 <sup>***</sup>	1.00 ± 0.31	0.42 ± 0.21 <sup>##</sup>
Acox1	1.0 ± 0.23	1.10 ± 0.11	1.00 ± 0.22	1.01 ± 0.12
<b>Lipoprotein metabolism</b>				
apoCIII	1.0 ± 0.17	0.76 ± 0.11 <sup>*</sup>	1.00 ± 0.15	1.37 ± 0.15 <sup>##</sup>
MTP	1.0 ± 0.09	0.92 ± 0.11	1.00 ± 0.34	1.23 ± 0.16
<b>Glucose metabolism</b>				
LPK	1.0 ± 0.18	1.19 ± 0.20	1.00 ± 0.28	3.52 ± 0.41 <sup>###</sup>
PEPCK	1.0 ± 0.27	1.39 ± 0.12 <sup>**</sup>	1.00 ± 0.11	0.54 ± 0.12 <sup>###</sup>
G6Pase	1.0 ± 0.59	1.74 ± 0.30 <sup>*</sup>	1.00 ± 0.47	0.78 ± 0.26
GK	1.0 ± 0.26	0.77 ± 0.27	1.00 ± 0.28	1.82 ± 0.66 <sup>#</sup>
GLUT2	1.0 ± 0.19	1.18 ± 0.10	1.00 ± 0.34	1.23 ± 0.05
<b>Nuclear transcription factors</b>				
SREBP-1c	1.0 ± 0.35	0.57 ± 0.32	1.00 ± 0.54	2.53 ± 0.55 <sup>###</sup>
ChREBP	1.0 ± 0.21	0.86 ± 0.15	1.00 ± 0.21	1.06 ± 0.24
PPAR $\alpha$	1.0 ± 0.37	1.79 ± 0.45 <sup>***</sup>	1.00 ± 0.31	0.74 ± 0.24
LXR $\alpha$	1.0 ± 0.19	1.15 ± 0.16	1.00 ± 0.17	0.93 ± 0.19

Values represent means  $\pm$  SD (n = 4–8). \*, \*\*, \*\*\* Significantly different from WI rats ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). #, ##, ### Significantly different from ZL rats ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

に比べて有意に高かったが、ZF ラットでは ZL ラットに比べて低かった。Glucose transporter type 2 (GLUT2) の発現は、GK ラットおよび ZF ラットともに対照群との間に差異は認められなかった。

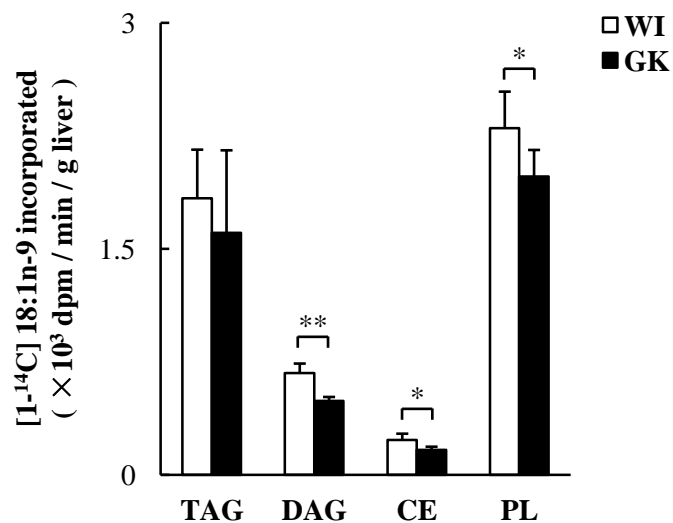
#### 第 5 節 肝スライスにおける細胞外脂肪酸の TAG への取り込み活性

肝臓外から、肝臓の各脂質への脂肪酸取り込み能を測定するために、単離したラットの肝臓からスライスを調製し、*ex vivo* において [1-<sup>14</sup>C] オレイン酸 (18:1n-9) の脂質への取り込みを測定した。その結果、GK ラットの TAG への [1-<sup>14</sup>C] 18:1n-9 の取り込みには、WI ラットとの間で有意な差はみられなかった。また、DAG、CE および PL への取り込みは、WI ラットに比べて、GK ラットで有意に低かった (Fig. 1-2)。この実験法では、[1-<sup>14</sup>C] 18:1n-9 が培養液から肝スライスの肝実質細胞に取り込まれ、細胞内の遊離 18:1n-9 のプールと混合されたのちに、TAG 合成の基質として使われるので、TAG に取り込まれた 18:1n-9 の絶対量を求めることは不可能である。肝臓中の遊離 18:1n-9 の濃度を定量したところ、GK ラットでは  $497 \pm 100$  nmol/g liver、WI ラットでは  $303 \pm 70$  nmol/g liver となり、GK ラットの方が 1.64 倍有意に高かった (Fig. 1-3)。細胞内の遊離 18:1n-9 のプールが一つだと仮定すると、GK ラットでは取り込まれた [1-<sup>14</sup>C] 18:1n-9 放射活性が、細胞内の遊離 18:1n-9 によって、WI ラットの約 1/1.64 倍に希釈されることになる。これを考慮するために、GK ラットの TAG への [1-<sup>14</sup>C] 18:1n-9 取り込み能の測定値に 1.64 を乗じると、GK ラットの TAG へ取り込まれる細胞外 18:1n-9 は、WI ラットに比べて 1.38 倍多くなると推定された。

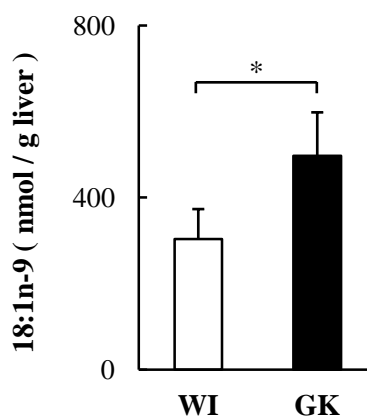
#### 第 6 節 *In vivo* における細胞内の *de novo* TAG 合成速度

肝臓の脂肪酸量の増加をもたらす因子の一つと考えられる脂肪酸 *de novo* 合成速度を *in vivo* で調べた。ラットの腹腔内に [1-<sup>14</sup>C] 酢酸を投与し、5 分間で肝臓中の脂質の脂肪酸に取り込まれた放射活性を測定することにより、*de novo* 脂肪酸合成速度を算出した。まず、肝臓に取り込まれた [1-<sup>14</sup>C] 酢酸から合成された総脂肪酸について調べたところ、GK ラットでは WI ラットと比較して 1.6 倍高かった (Fig. 1-4 A)。各脂質クラスへの取り込みについてみると、TAG については GK ラットが WI ラットに比べて 2.41 倍高かったが、DAG、CE、FFA、PL およびコレステロール (cholesterol、C) では GK ラットと WI ラ

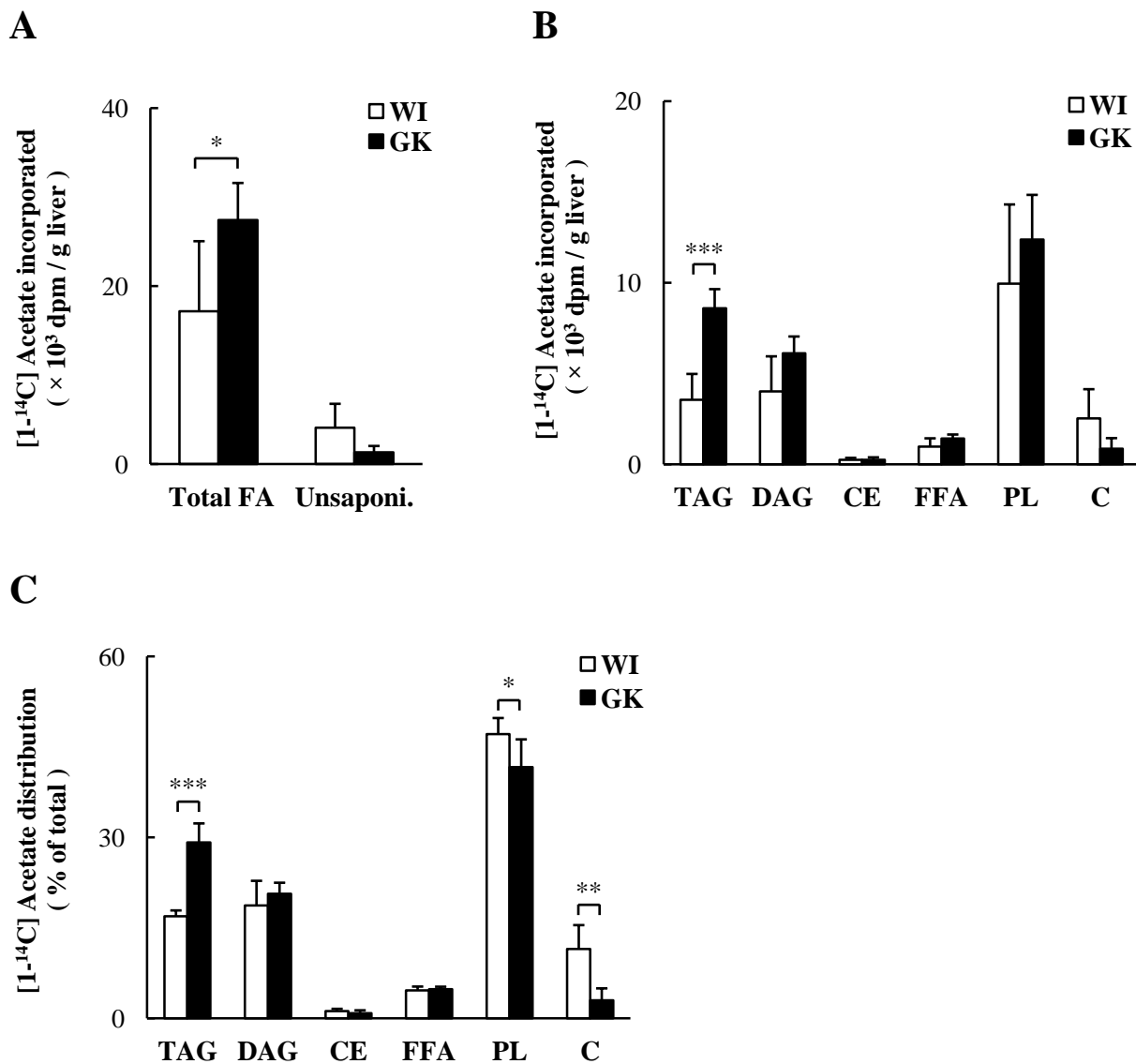
ットの間で有意な差はみられなかった (Fig. 1-4 B)。また、 $[1-^{14}\text{C}]$  酢酸が各脂質へ取り込まれた割合を調べたところ、WI ラットに比べて、GK ラットでは TAG で 1.72 倍高く、PL および C ではそれぞれ 12% および 74%、有意に低いことが判明した (Fig. 1-4 C)。



**Fig. 1-2** Incorporation *ex vivo* of  $[1-^{14}\text{C}]$ 18:1n-9 into lipids in liver slices. Liver slices were incubated with 0.25 mM  $[1-^{14}\text{C}]$ 18:1n-9 for 15 min at 37 °C. The lipids were extracted from liver slices and separated by TLC. Values represent means  $\pm$  SD (n = 4). \*\*, \* Significantly different from WI rats (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). In the absence of a superscript, the difference in the means is not significant ( $p > 0.05$ ).



**Fig. 1-3** The concentrations of 18:1n-9 in the liver of WI and GK rats. Values represent means  $\pm$  SD (n = 6). \* Significantly different from WI rats ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1-4** Fatty acid synthesis *de novo* from [1-<sup>14</sup>C] acetate in the liver. Rats were injected intraperitoneally with [1-<sup>14</sup>C] acetate. After 5 minutes, liver was removed rapidly and frozen in liquid nitrogen. The lipids extracted from the liver were separated by TLC and the radioactivity was determined. A, [1-<sup>14</sup>C] Acetate incorporated into the total FA (fatty acid) and unsaponi (unsaponifiable matter); B, [1-<sup>14</sup>C] acetate incorporated into TAG, DAG, CE, FFA, PL and C (cholesterol); C, distribution of [1-<sup>14</sup>C] acetate (% of total). Values represent means ± SD (n = 6). \*, \*\*, \*\*\* Significantly different from WI rats (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

## 第7節 肝スライスにおける脂肪酸β酸化能

肝臓における遺伝子発現の結果から、GK ラットでは、脂肪酸のミトコンドリアへの取り込みと代謝が亢進していることが考えられた。そこで、実際に脂肪酸のβ酸化が亢進しているか否かを調べるために、単離した肝臓からスライスを調製し、*ex vivo* においてパルミチン酸 (16:0) の分解活性を評価した。具体的には肝スライスを [1-<sup>14</sup>C] 16:0 存在下でインキュベートし、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> および <sup>14</sup>C 標識酸可溶性代謝物の生成量を調べ、両者の和を総酸化生成物とした。GK ラットは WI ラットに比べて <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 生成量は 2.2 倍、<sup>14</sup>C 標識酸可溶性代謝物は 2.5 倍、また、総酸化生成物で比較すると 2.5 倍高かった (Fig. 1-5)。肝臓中の遊離 16:0 の濃度は GK ラットで 698 ± 305 nmol/g liver、WI ラットでは 788 ± 103 nmol/g liver であるので、内因性の 16:0 による [1-<sup>14</sup>C] 16:0 の希釈の影響を考慮しても、GK ラットは WI ラットと比べて [1-<sup>14</sup>C] 16:0 のβ酸化が亢進していると考えられた。

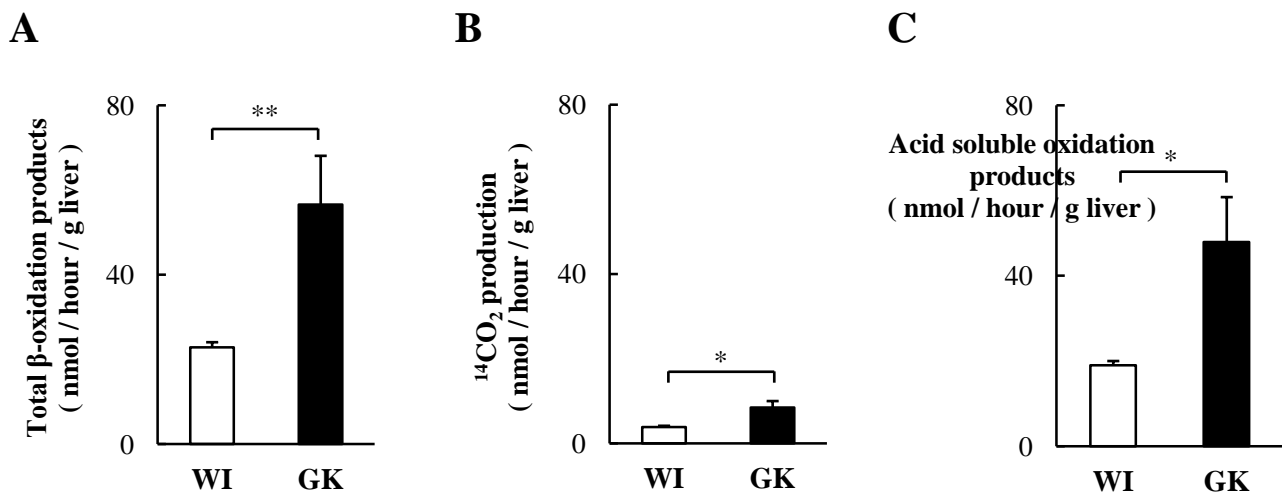
## 第8節 *In vivo* での肝臓からの VLDL 分泌速度

肝臓から末梢への脂質の供給は、肝臓で合成され分泌される VLDL を介して行われている。したがって、肝臓の TAG 蓄積の要因として VLDL の肝臓からの分泌の低下が考えられる。そこで、GK ラットにおける VLDL 分泌速度を WI ラットと比較した。肝臓から分泌された VLDL は血漿中で速やかに代謝され、VLDL 中の TAG は LPL により分解されるので、LPL 阻害剤であるトリトン WR1339 を尾静脈から投与し、この活性を阻害した条件下での TAG の増加を測定することで VLDL 分泌速度の指標とした。なお、キロミクロン由来の TAG の影響を抑えるために、12 時間絶食したラットを実験に用いた。Fig. 1-6 に示した通り、GK ラットと WI ラットの VLDL-TAG 分泌速度に有意な差はみられなかった。

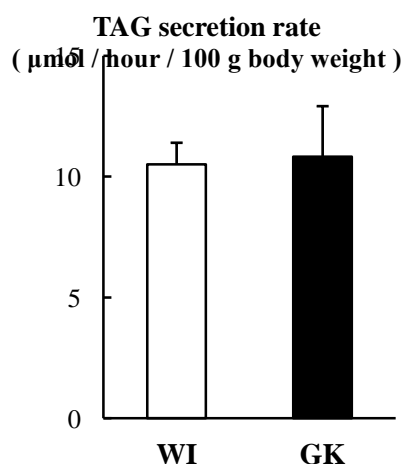
## 第9節 脂質代謝関連転写因子遺伝子の発現

GK ラットの肝臓における peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) の発現および PPAR $\alpha$  による発現調節を受けていると報告がある acyl-CoA thioesterase 1 (Acot1) の発現は、WI ラットに比べて有意に高かった (Table 1-4)。この両者には、ZF ラットと ZL ラットでは差異は認められなかった。Sterol

regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) の発現は、ZF ラットでは ZL ラットに比べ有意に高かったが、GK ラットでは WI ラットに比べて低下傾向にあった。Liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) と carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) の発現については、GK ラットおよび ZF ラットのいずれについても、対照群との間に差異は認められなかった。



**Fig. 1-5** Oxidation *ex vivo* of [1-<sup>14</sup>C]16:0 in liver slices. Liver slices were incubated with 0.25 mM [1-<sup>14</sup>C]16:0 for 60 min at 37°C. The <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced was trapped with benzethonium hydroxide, and acid-soluble oxidation products were extracted. A, Total  $\beta$ -oxidation products; B, CO<sub>2</sub>; C, acid soluble oxidation products. Values represent means  $\pm$  SD (n = 4). \*, \*\* Significantly different from WI rats (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01).



**Fig. 1-6** Rate of TAG secretion. Rats that had been starved for 12 h were injected intravenously with 20% (w/v) Triton WR1339 at a dose of 300 mg/kg body weight. Values represent means  $\pm$  SD (n = 6). The difference in the means is not statistically significant (*p* > 0.05).



## 第 10 節 小括、考察

### 1) GK ラットの特徵

ZF ラットが典型的な肥満モデル動物であるのに対し、GK ラットは非肥満 2 型糖尿病モデル動物である。実際、GK ラットでは、肝臓の重量比は対照群とほぼ同じであり、内臓脂肪の蓄積もみられなかった (Table 1-1)。まず、糖代謝について考察すると、ZF ラットは、血糖値は正常であるが高インスリン血症であることから、インスリン抵抗性であると考えられる (Table 1-2)。一方、GK ラットの血清インスリンはごく軽度上昇しているにすぎないが、血糖値はかなり上昇しており、糖尿病状態であると考えられた (Table 1-2)。さらに、肝臓における糖代謝関連遺伝子の発現について調べたところ、GK ラットの PEPCK および G6Pase は対照群より有意に高いことから、糖新生とグルコースの分泌が亢進しており、これらが高血糖の一因になっていると考えられる (Table 1-4, Fig. 1-9)。これらの結果は、GK ラットの肝臓および末梢組織は、インスリン抵抗性の状態にあるという Bisbis らの報告 [8] と一致するものである。一方、ZF ラットでは対照群に比べこれらの遺伝子発現は低下しており、代わりにグルコキナーゼおよび LPK の発現が高いことから、脂肪酸合成の前駆体の供給が亢進していると考えられた (Table 1-4, Fig. 1-9)。次に脂質含量については、ZF ラットの肝臓では、TAG、DAG、CE および FFA のいずれも増加していた (Table 1-3)。一方、GK ラットでは、興味深いことに、非肥満であるにもかかわらず肝臓において TAG が軽度ではあるが蓄積しており、小葉周辺 (門脈周辺) に強く認められた (Table 1-3, Fig. 1-1)。また、GK ラットの血清中の TAG 値は肝臓とは反対に、対照群に比べて有意に低下していた (Table 1-2)。血清中の TAG は、カイロミクロンが含有する食餌由来の TAG、肝臓で合成され VLDL として分泌される TAG、これらの TAG が末梢組織の LPL や HTGL によって加水分解されることによる減少のバランスで決定される。GK ラットでは、肝臓での apoCIII の発現低下がみられたことから (Table 1-4)、HTGL の活性化により血清 TAG の分解が亢進していることが考えられた。生成した脂肪酸は肝臓に取り込まれ、TAG 蓄積に寄与しているかもしれない。このように、GK ラットでは、血清中の TAG 値は低下しているのに対し、肝臓には TAG を軽度に蓄積していた。そこで、GK ラットの肝臓において脂質代謝が変化しているものと考え、検討を進めた。

## 2) GK ラットの肝臓における TAG 蓄積のメカニズム

肝臓における脂質代謝の概要を Fig. 1-8 に示す。肝臓 TAG の蓄積は、①肝臓への FFA の流入の増加、②脂肪酸の *de novo* 合成および TAG 合成の亢進、③TAG 分解および脂肪酸  $\beta$  酸化の低下、④VLDL 分泌の低下が、一つあるいは複合的に起こり、TAG の供給と消失のバランスが崩れることによって引き起こされる。そこで、GK ラットの肝臓 TAG 蓄積のメカニズムを解明するために、まず脂肪酸と TAG 代謝に関与する酵素およびタンパク質をコードする遺伝子発現について調べ、ZF ラットと比較した (Table 1-4)。ZF ラットでは、*de novo* 脂肪酸合成系 (FAS、ACC、ACLY、ME1)、TAG 合成系 (GPAT1、DGAT2)、脂肪酸の輸送、運搬および活性化 (FAT/CD36、ACSL5) の遺伝子の発現は上昇しているが、TAG 分解系 (ATGL)、脂肪酸分解系 (CPT1a、PGC1 $\alpha$ ) の遺伝子発現は低下していたことから、肝臓での TAG の蓄積が亢進していると考えられる。GK ラットでは ME1 の発現は高いが、脂肪酸 *de novo* 合成の主要な酵素である FAS や ACC、TAG 合成に関与する酵素の遺伝子の発現には変化がみられなかった。一方、TAG および脂肪酸分解系酵素 (ATGL、CPT1a、PGC1 $\alpha$ ) の遺伝子の発現は、予想に反して上昇していた。このように、mRNA レベルの変動からみると、GK ラットの肝臓で観察された TAG の蓄積は十分には説明できない。そこで、遺伝子の発現変動と生理学的変化の一致性を確認するために、遺伝子発現の定量に加えて、細胞外脂肪酸の TAG への取り込み活性、細胞内での *de novo* TAG 合成速度、脂肪酸  $\beta$  酸化能および VLDL 分泌速度について *ex vivo* または *in vivo* で調べた。

合成：肝臓外 [1-<sup>14</sup>C] 18:1n-9 の肝 TAG への取り込みは、GK ラットと対照群との間で差はみられなかった (Fig. 1-2)。しかしながら、肝臓中の遊離 18:1n-9 濃度で補正すると、GK ラットの TAG への 18:1n-9 の取り込みは、対照群に比べて高くなる傾向が認められた。GK ラットでは、脂肪酸の取り込みに中心的に働く FAT/CD36 [25] は対照群よりも低下していたが (Table 1-4)、取り込みの基質となる血清中の NEFA 値は対照群に比べ高いことから (Table 1-2)、肝 TAG への脂肪酸の取り込みが亢進している可能性が高い。また、GK ラットでは [1-<sup>14</sup>C] 酢酸の取り込みを指標とした肝臓での *de novo* 脂肪酸合成速度が有意に上昇しており (Fig. 1-4 A)、TAG への [1-<sup>14</sup>C] 酢酸の取り込みも顕著に増加していた (Fig. 1-4 B, C)。GK ラットでみられた ME1 遺伝子の発現上昇は、*de novo* 脂肪酸合成で必要とされる nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) を供給することにより、脂肪酸合成の亢進に寄与している可能性も考えられる (Table 1-4)。また、後述するように、GK ラットの肝臓では  $\beta$  酸化の亢進によ

り、*de novo* 脂肪酸合成の基質となるアセチル-CoA の供給量は増加していることと推察される。以上のことから、GK ラットの肝臓では、血清由来の脂肪酸および細胞内で *de novo* 合成された脂肪酸からの TAG 合成が亢進していると考えられた。

分解：ミトコンドリアでの脂肪酸の  $\beta$  酸化が不全になると、TAG が蓄積し脂肪肝を誘導することが報告されている [89]。肝臓のスライスを用いて、ミトコンドリアでの  $\beta$  酸化を放射標識された 16:0 を基質に用いて測定したところ、GK ラットでは  $\beta$  酸化が亢進していることが明らかとなった (Fig. 1-5)。また、GK ラットでは、TAG および脂肪酸分解系酵素のうち、ATGL、CPT1a および PGC1 $\alpha$  の遺伝子発現が予想に反して、対照群に比べて上昇していた (Table 1-4)。ATGL は、TAG を分解して DAG と FFA を生成する TAG 加水分解の初期反応を担う酵素であり、TAG 分解の律速酵素と考えられている [100]。このことから、GK ラットでは TAG の分解が亢進していると考えられた。ATGL のノックアウトマウスは、心臓において、PPAR $\alpha$  により調節される遺伝子群および PGC1 $\alpha$  遺伝子の発現の顕著な低下、ミトコンドリアの呼吸機能の低下および TAG の蓄積がおり、心不全により早死することから [30]、ATGL による TAG 分解作用は生理的に必須な働きを持つと考えられる。ATGL は脂肪組織に高発現しているが、肝臓における発現量は少ない。しかしながら、最近、肝臓においても ATGL の生理的重要性が報告されており [101]、GK ラットの肝臓の TAG 含量の制御に ATGL が重要な働きをしていることが考えられる。また、CPT1a はミトコンドリア外膜に局在し、脂肪酸のミトコンドリア内への移行を担う、 $\beta$  酸化の律速酵素である。CPT1a の発現がわずかに亢進している状態でも、肝臓の TAG 含量の増加は抑制されることが報告されていることから、CPT1a は肝臓 TAG 含量の制御に重要な役割を果たしていると考えられる [82]。そのため、GK ラットにおける CPT1a の発現亢進は、ミトコンドリアへの脂肪酸の取り込みとそれに続く燃焼を促進させることにより、TAG 含量の制御にも関与していると考えられた。以上のことから、GK ラットの肝臓では、TAG および脂肪酸の分解が亢進していることが明らかとなった。

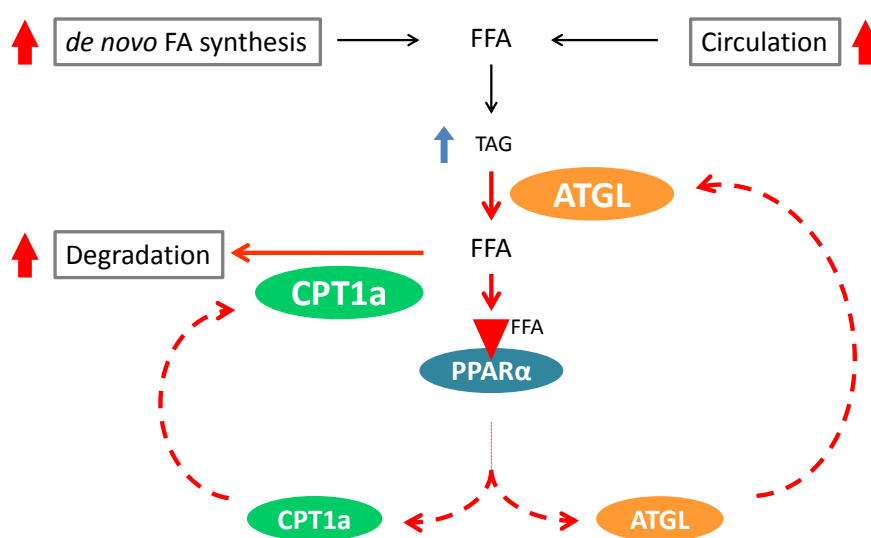
分泌：肝臓からの VLDL-TAG の分泌は GK ラットと対照群の間に差が認められなかったことから、GK ラットの肝臓での TAG 蓄積の原因は、肝細胞で合成された TAG の血流への移行過程にある訳ではないと結論した (Fig. 1-6)。

### 3) GK ラットの肝臓における脂質代謝関連転写因子

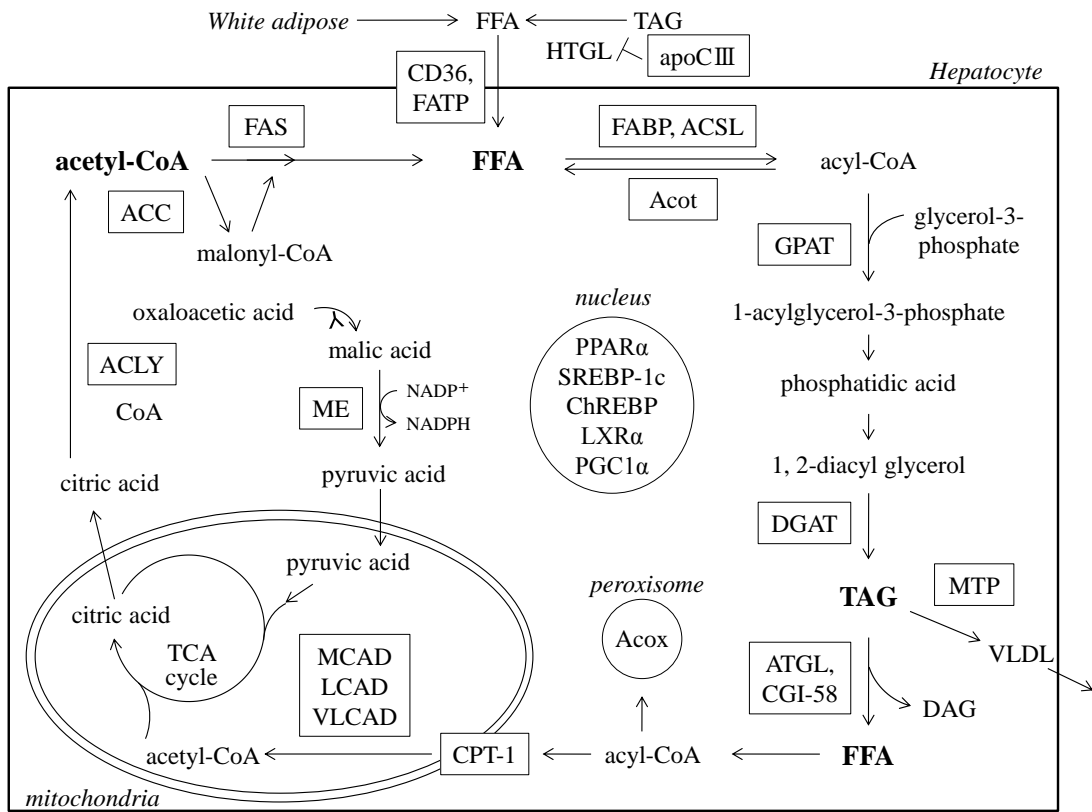
FAS や ACC などの脂肪酸の *de novo* 合成に関与する遺伝子は、SREBP-1c、ChREBP および LXR $\alpha$  などの転写因子の活性化により発現が誘導される [38, 90]。インスリン抵抗性や 2 型糖尿病の動物では、SREBP-1c と ChREBP の両者の発現が増加しており、二次的に脂質合成を亢進させるということが報告されている [6, 79, 80]。本章における検討においても、ZF ラットでは SREBP-1c の発現が有意に高いという結果が得られ (Table 1-4)、脂肪酸合成にかかわる遺伝子の発現を誘導している可能性が考えられた。一方、GK ラットにおいては、PPAR $\alpha$  の発現は有意に高いが、他の転写因子 (SREBP-1c、ChREBP および LXR $\alpha$ ) には変化がなかった (Table 1-4)。PPAR 応答配列 (PPAR response element、PPRE) を有する PPAR $\alpha$  の標的遺伝子には、脂肪酸や TAG の異化に関係した分子が多い。PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスでは、肝臓のミトコンドリア  $\beta$  酸化能が対照群に比べ約 40%低下しており [2]、PPAR $\alpha$  がミトコンドリア  $\beta$  酸化の制御に重要であることが明らかとなっている。GK ラットの肝臓では、PPAR $\alpha$  の遺伝子の発現、および、PPRE を有し、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 Acot1 の遺伝子発現が有意に高くなっていることから (Table 1-4)、実際に PPAR $\alpha$  活性も亢進していると考えられる。また、ミトコンドリアの増殖に関与する因子として発見された PGC1 は、近年、ミトコンドリアの酸化的リン酸化、脂肪酸酸化、肝臓での糖新生などのエネルギー代謝に関与する転写を調節する、転写因子活性化因子であることが明らかとなっている [48]。肝臓特異的に PGC1 $\alpha$  を高発現させると、ミトコンドリアの  $\beta$  酸化活性が上昇し、肝臓の TAG 量が減少すること [65]、また、分子レベルにおいても PGC1 $\alpha$  と PPAR $\alpha$  は相互作用して、 $\beta$  酸化関連遺伝子の発現を上昇させることが報告されており [19, 48]、肝臓において PPAR $\alpha$  の機能発現に PGC1 $\alpha$  の存在が強く影響していることが示唆されている。GK ラットにおいては、PPAR $\alpha$ 、PGC1 $\alpha$  および CPT1a の遺伝子発現がともに高いことが明らかとなり (Table 1-4)、これらの働きによって起こる  $\beta$  酸化能亢進により、TAG 合成が亢進しているにもかかわらず肝臓での TAG の蓄積が軽微に抑えられているのだと考えられる。

また、一部の脂肪酸合成に関与する遺伝子も PPAR $\alpha$  のターゲットとなる。脂肪酸合成に必要な NADPH を生成する ME1 は、プロモーター領域に PPRE 配列をもつことが示されている [12, 53, 61]。GK ラットでみられた ME1 遺伝子発現の上昇は (Table 1-4)、PPAR $\alpha$  の発現上昇によるものだと考えられた。

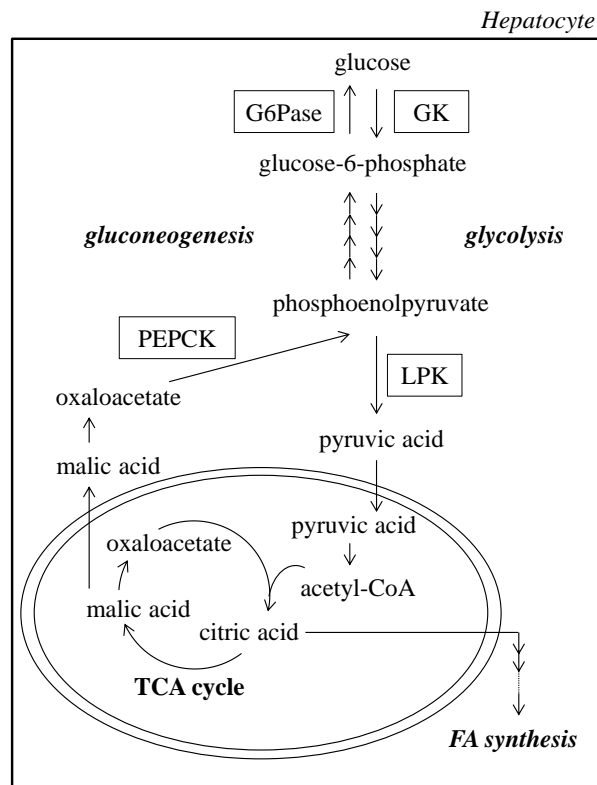
本章において、GK ラットの肝臓では、血清由来の脂肪酸および細胞内で *de novo* 合成された脂肪酸からの TAG 合成が亢進していた。一方、PPAR $\alpha$ 、ATGL、CPT1a および PGC1 $\alpha$  の遺伝子発現が有意に高いこと、 $\beta$  酸化が亢進していることから、TAG および脂肪酸の分解についても促進していることが明らかとなった。また、GK ラットの肝臓では ATGL の発現が上昇していたことから、TAG が分解され、FFA の生成が亢進していると予想される。この FFA は、分解されるか、PPAR $\alpha$  の内因性リガンドとして働く。そのため、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 (Fig. 1-7)。肥満 2 型糖尿病モデルである *ob/ob* マウスの *Acox1* をノックアウトすると、内因性のリガンドである FFA が増加し、肝臓の PPAR $\alpha$  が持続的に活性化状態になる。その結果、肝臓の脂肪酸  $\beta$  酸化が亢進し、肥満が抑制されることが明らかになっている [34]。GK ラットにおける PPAR $\alpha$  の活性化は、ATGL の TAG 分解で生成した FFA によるものだと考えると、この状態に類似する点があり興味深い。以上のことから、GK ラットの肝臓では、TAG の合成とポジティブフィードバックループによる TAG および脂肪酸の分解が、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た。



**Fig. 1-7** The pathway of TAG synthesis and proposed model of a positive feedback loop between PPAR $\alpha$ —ATGL— $\beta$  oxidation signaling pathway in the GK rat hepatocyte.



**Fig. 1-8** Lipid metabolism in the hepatocyte



**Fig. 1-9** Glucose metabolism in the hepatocyte

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

第1章において GK ラットの肝臓では TAG 合成の亢進が認められたが、 $\beta$  酸化が亢進していることで TAG の蓄積が微増にとどまることが明らかとなった。ここで、GK ラット肝臓において、核内転写因子である PPAR $\alpha$  およびそのターゲットである ATGL の遺伝子発現が対照群と比較して高いことに注目した。ATGL は TAG 加水分解の初段階を担い [100]、肝臓の TAG 代謝に重要な役割を果たすと考えられている。また、ATGL は PPAR $\alpha$  のターゲット遺伝子である可能性が示唆されているが [74]、PPAR $\alpha$  アゴニストによる肝臓 TAG レベルの低下作用は、主に脂肪酸  $\beta$  酸化の亢進を介したものと考えられており [14, 70]、ATGL との関係についての詳細な報告はない。そこで本章では、PPAR $\alpha$  アゴニストとして3種類のフィブラートを選び、これらを健常ラットに投与したときに、ATGL が誘導されるか、また肝臓で TAG が蓄積している GK ラットに PPAR $\alpha$  アゴニストであるベザフィブラートを投与したとき、TAG 代謝へどのように影響するかについて調べ、TAG 分解における ATGL の役割について検討することを目的とした。

### 第1節 肝臓における ATGL 発現と TAG 含量に対するフィブラートの影響の解析

PPAR $\alpha$  アゴニストであるフィブラート系薬物は、血管壁表面に存在する LPL の活性の促進、肝臓における  $\beta$  酸化の亢進、VLDL 分泌の抑制などを介して血清 TAG を低下させる高脂血症治療薬として知られている。しかしながら、これらの薬物が肝臓の TAG 分解にどのように関与するかについての詳細はいまだに不明である。そこで本節では、健常ラットに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与えたときの肝臓における TAG 代謝について、特に ATGL の関与に注目して解析した。

#### 1) フィブラート投与の基礎的情報

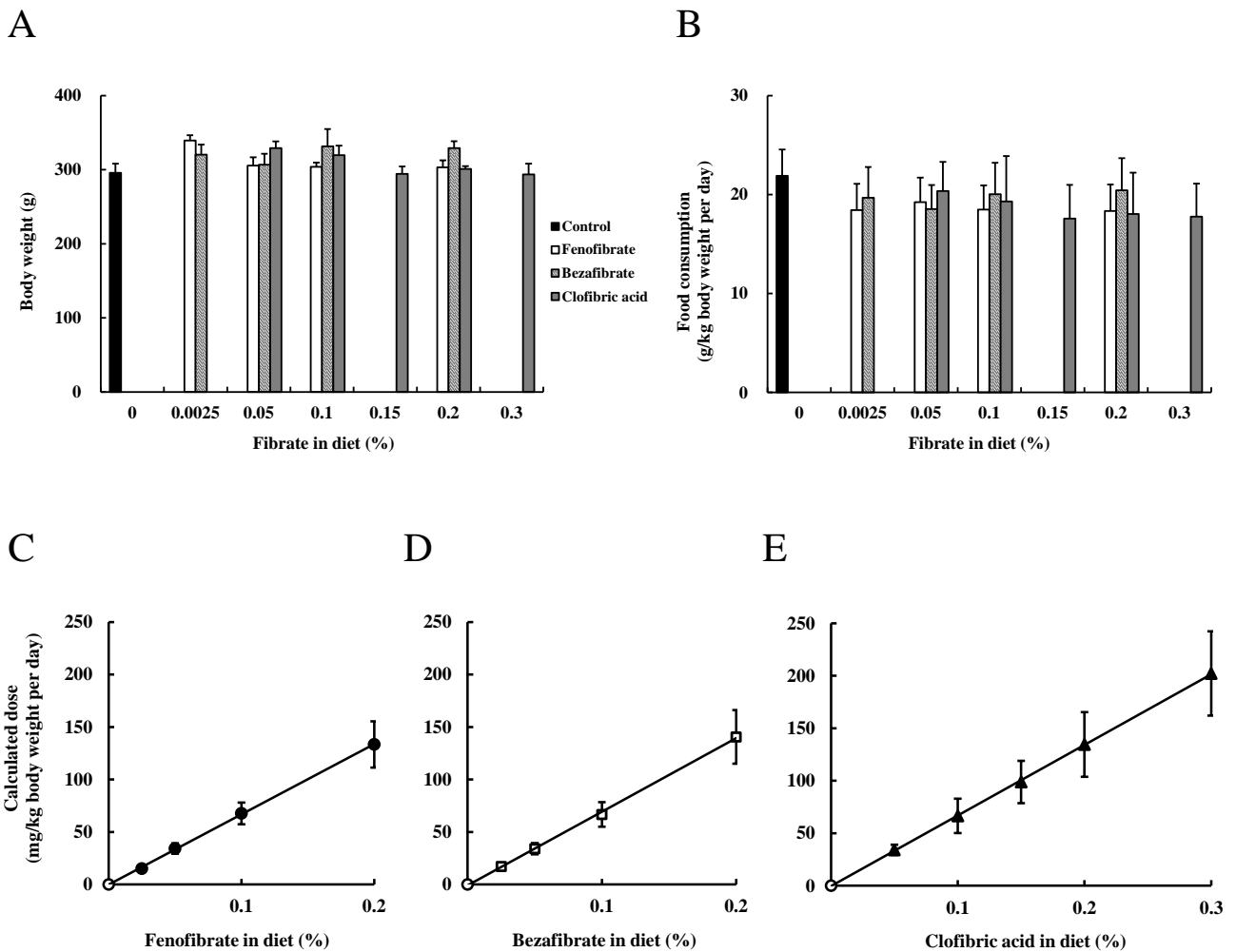
健常ラットである WI ラットにフェノフィブラート、ベザフィブラートおよびクロフィブリン酸を混合した飼料を14日間与え、処置期間中は体重および摂食量を測定した。いずれの薬物で処置した時も、

処置期間の体重および摂食量には対照群との間で差異がみられなかった (Fig. 2-1 A, B)。動物ごとに一日当たりの摂食量を求め、飼料に含まれるフィブラートの割合から、実際に摂取したフィブラート量を調べたところ、フェノフィブラート 0.025%、0.05%、0.1%、0.2% (w/w) はそれぞれ  $15.2 \pm 2.7$ 、 $34.3 \pm 5.0$ 、 $67.7 \pm 10.4$ 、 $133.4 \pm 22.1$  mg/kg 体重/日、ベザフィブラート 0.025%、0.05%、0.1%、0.2% (w/w) はそれぞれ  $17.0 \pm 3.2$ 、 $34.0 \pm 5.3$ 、 $66.6 \pm 11.7$ 、 $140.6 \pm 25.5$  mg/kg 体重/日、そしてクロフィブリン酸に関しては 0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.3% (w/w) はそれぞれ  $34.1 \pm 4.9$ 、 $66.4 \pm 16.4$ 、 $98.8 \pm 20.2$ 、 $134.5 \pm 30.8$ 、 $202.1 \pm 40.2$  mg/kg 体重/日となった。飼料からのフィブラートの摂取量は、飼料中のフィブラート濃度に比例して増加した (Fig. 2-1 C, D, E)。このことから、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の間で、ラットが摂取したフィブラートの量に違いがないことが確認できた。

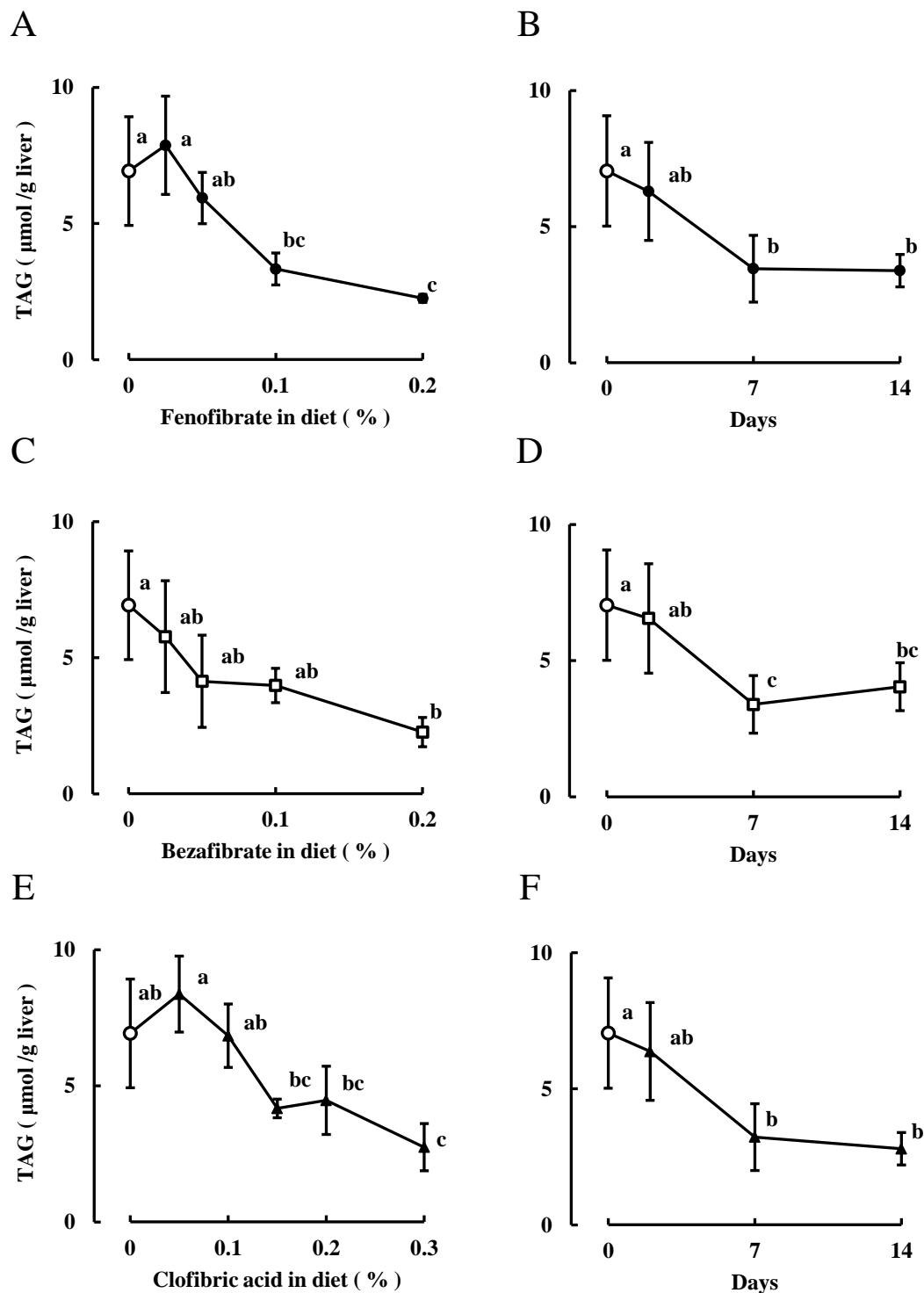
## 2) フィブラートによる TAG 含量の低下

WI ラットに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混合した飼料を与えたときの肝臓の TAG 含量を調べた。本節 1) で記載した濃度の各フィブラートの混餌を 14 日間与えたところ、フィブラートの投与量に依存して肝臓の TAG 含量が低下した。フェノフィブラート 0.1% (w/w) およびベザフィブラート 0.1% (w/w) では、TAG 含量がそれぞれ対照群の 48% および 58% まで低下した。クロフィブリン酸 0.1% (w/w) 群の TAG 含量は対照群と同じであったが、0.3% (w/w) 投与では 40% まで低下した (Fig. 2-2 A, C, E)。Fig. 2-2 B, D, F に示したように、フェノフィブラート 0.1% (w/w)、ベザフィブラート 0.1% (w/w) およびクロフィブリン酸 0.3% (w/w) 投与によって、時間依存的に肝臓 TAG が減少した。また、これらのフィブラートを与えた時の血清中の TAG 濃度を調べたところ、フェノフィブラートとベザフィブラートでは、TAG 濃度が有意に低下した。クロフィブリン酸では低下傾向がみられたが、対照群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 2-3)。

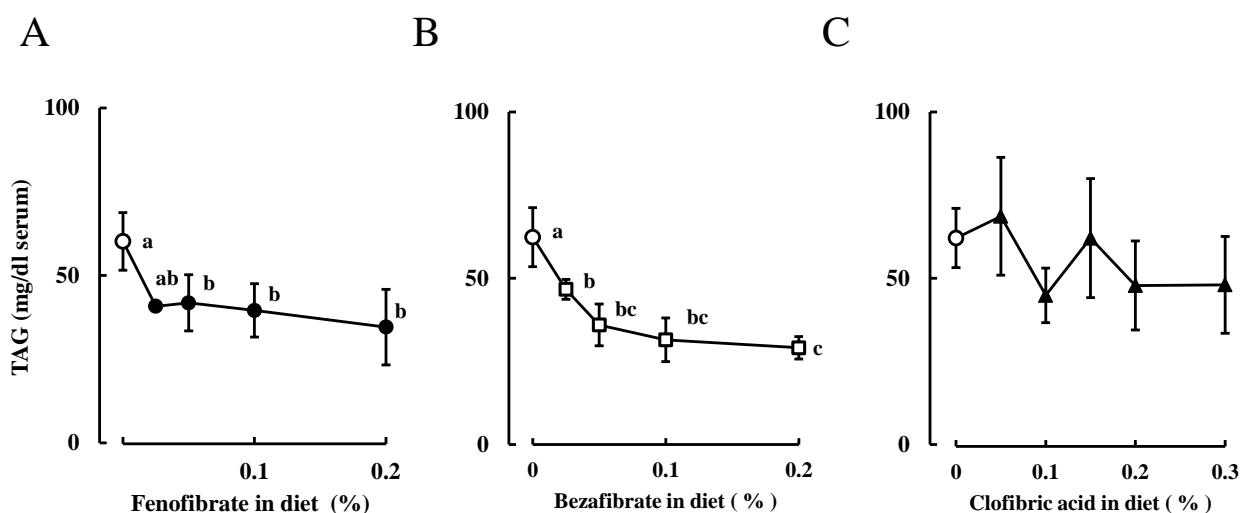




**Fig. 2-1** Effects of fibrates on body weight, food consumption and calculated dose. A: Body weight of rats. B: Food consumption of rats. C, D, E: Calculated dose. Rats were fed on a standard diet or a diet admixed with fenofibrate at a dietary concentration of 0.025, 0.05, 0.1 or 0.2% (w/w), bezafibrate at a dietary concentration of 0.025, 0.05, 0.1 or 0.2% (w/w) or clofibric acid at a dietary concentration of 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 or 0.3% (w/w) for 14 days. Values are means  $\pm$  SD (n = 4). The amounts of fibrate taken in by a rat were calculated using the regression lines. C, The relationship between the dietary dose and the calculated dose of fenofibrate,  $y = 670.0x - 0.1$  ( $r^2 = 0.9997$ ). D, The relationship between the dietary dose and the calculated dose of bezafibrate,  $y = 701.6x - 1.0$  ( $r^2 = 0.9992$ ). E, The relationship between the dietary dose and the calculated dose of clofibric acid,  $y = 672.8x - 0.4$  ( $r^2 = 0.9998$ ).



**Fig. 2-2** Effects of fibrates on TAG concentration in the liver of rats. A, C, E: The dose-dependent reduction of TAG; rats were fed on a standard diet or a diet admixed with fenofibrate (A) at a dietary concentration of 0.025, 0.05, 0.1 or 0.2% (w/w), bezafibrate (C) at a dietary concentration of 0.025, 0.05, 0.1 or 0.2% (w/w) or clofibrac acid (E) at a dietary concentration of 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 or 0.3% (w/w) for 14 days. B, D, F: The time-dependent reduction of TAG; rats were fed on a diet containing (B) 0.1% (w/w) fenofibrate, (D) 0.1% (w/w) bezafibrate or (F) 0.3% (w/w) clofibrac acid for 0, 2, 7 or 14 days. Values are means  $\pm$  SD (n = 4).<sup>a, b, c</sup> Differences in the mean without a common superscript (a, b or c) are statistically significant ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2-3** Effects of fibrates on TAG concentration in serum. Rats were treated with fenofibrate, bezafibrate or clofibric acid at various doses for 14 days. The treatments were the same as those described in the legend to Fig. 2-2 A, C and E. A, Fenofibrate; B, bezafibrate; C, clofibric acid. Values are means  $\pm$  SD (n = 4). <sup>a, b, c</sup> Differences in the mean without a common superscript (a, b or c) are statistically significant ( $p < 0.05$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

### 3) 脂肪酸および TAG 代謝関連遺伝子の発現

フィブレートによる肝臓 TAG 減少の分子メカニズムの手掛かりをつかむために、肝臓の脂肪酸および TAG 代謝に関与する酵素、タンパク質の遺伝子の発現を調べ、その結果を Table 2-1 に示した。フェノフィブレート 0.1% (w/w)、ベザフィブレート 0.1% (w/w) およびクロフィブリン酸 0.3% (w/w) を 14 日間与えたラットの肝臓の mRNA の発現を測定したところ、TAG および脂肪酸の分解に関与する ATGL、CGI-58、CPT1a、MCAD、LCAD および Acox1 の発現がすべてのフィブレートによって増加した。また、脂肪酸の輸送、運搬および活性化に関与する遺伝子にも変動がみられ、フィブレートによって、脂肪酸の取り込みを担う FAT/CD36 と FATP2、脂肪酸運搬に関与する FABP1、脂肪酸の活性化に関する ACSL1 と ACSL3 の mRNA 発現レベルは有意に上昇した。一方、FATP5 の発現はフィブレート投与によって減少し、FATP4、FABPpm および ACSL5 の発現については対照群との間に差が認められなかった。脂肪酸合成については、fatty acid elongase 6 (Elovl6) と stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1) の発現が顕著に上昇した。FAS の発現については、フェノフィブレートのみで有意に上昇し、ベザフィブレートとクロフィブリン酸は影響しなかった。グリセロ脂質合成に関与する酵素に関しては、DGAT2

の遺伝子発現はわずかに減少したが、DGAT1 の発現はフェノフィブラートで上昇し、ベザフィブラートとクロフィブリン酸では上昇傾向にあった。フェノフィブラートとベザフィブラートは GPAT4 の遺伝子発現をわずかに上昇させたが、クロフィブリン酸では低下した。

**Table 2-1** Effects of fibrates on gene expression in the liver

Gene	Control	Fenofibrate	Bezafibrate	Clofibric acid
<b>Lipid degradation</b>				
ATGL	1.0 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.45 ± 0.69 <sup>b</sup>	4.25 ± 0.82 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.12 <sup>b</sup>
CGI-58	1.0 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.95 ± 0.24 <sup>b</sup>	3.13 ± 0.87 <sup>bc</sup>	2.10 ± 0.96 <sup>ab</sup>
CPT1a	1.0 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.44 <sup>b</sup>	3.19 ± 0.37 <sup>b</sup>	2.76 ± 1.24 <sup>b</sup>
MCAD	1.0 ± 0.18 <sup>a</sup>	4.53 ± 0.58 <sup>b</sup>	3.58 ± 0.33 <sup>bc</sup>	2.63 ± 0.64 <sup>c</sup>
LCAD	1.0 ± 0.40 <sup>a</sup>	3.68 ± 0.30 <sup>b</sup>	3.39 ± 0.40 <sup>b</sup>	2.88 ± 0.46 <sup>b</sup>
Acox1	1.0 ± 0.06 <sup>a</sup>	27.56 ± 3.95 <sup>b</sup>	33.08 ± 10.58 <sup>b</sup>	9.42 ± 2.52 <sup>a</sup>
<b>Fatty acid trafficking</b>				
FAT/CD36	1.0 ± 0.32 <sup>a</sup>	17.26 ± 1.17 <sup>b</sup>	9.32 ± 1.77 <sup>c</sup>	23.05 ± 3.67 <sup>d</sup>
FATP2	1.0 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.15 ± 0.65 <sup>b</sup>	4.24 ± 0.36 <sup>b</sup>	4.26 ± 1.11 <sup>b</sup>
FATP4	1.0 ± 0.09	1.34 ± 0.35	1.35 ± 0.25	1.14 ± 0.30
FATP5	1.0 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.41 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.11 <sup>b</sup>
FABPpm	1.0 ± 0.14	1.68 ± 0.30	0.61 ± 0.56	1.46 ± 0.30
FABP1	1.0 ± 0.25 <sup>a</sup>	6.72 ± 0.78 <sup>b</sup>	5.12 ± 0.91 <sup>c</sup>	2.53 ± 0.53 <sup>d</sup>
ACSL1	1.0 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.64 ± 0.34 <sup>b</sup>	3.11 ± 0.19 <sup>c</sup>	2.23 ± 0.22 <sup>d</sup>
ACSL3	1.0 ± 0.05 <sup>a</sup>	10.76 ± 3.39 <sup>b</sup>	7.53 ± 0.76 <sup>bc</sup>	5.05 ± 1.43 <sup>c</sup>
ACSL5	1.0 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.37 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.13 <sup>a</sup>
<b>Lipogenesis</b>				
FAS	1.0 ± 0.49 <sup>a</sup>	2.52 ± 1.07 <sup>b</sup>	1.19 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.84 ± 0.33 <sup>ab</sup>
SCD1	1.0 ± 0.24 <sup>a</sup>	17.56 ± 4.58 <sup>b</sup>	19.84 ± 6.61 <sup>b</sup>	20.73 ± 1.44 <sup>b</sup>
Elovl6	1.0 ± 0.55 <sup>a</sup>	18.35 ± 7.43 <sup>b</sup>	17.60 ± 5.33 <sup>b</sup>	27.81 ± 9.50 <sup>b</sup>
DGAT1	1.0 ± 0.49 <sup>a</sup>	2.62 ± 1.05 <sup>b</sup>	1.73 ± 0.83 <sup>ab</sup>	1.80 ± 0.41 <sup>ab</sup>
DGAT2	1.0 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.07 <sup>b</sup>
GPAT1	1.0 ± 0.03	1.68 ± 0.33	1.19 ± 0.16	1.12 ± 0.37
GPAT4	1.0 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.25 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.16 <sup>c</sup>

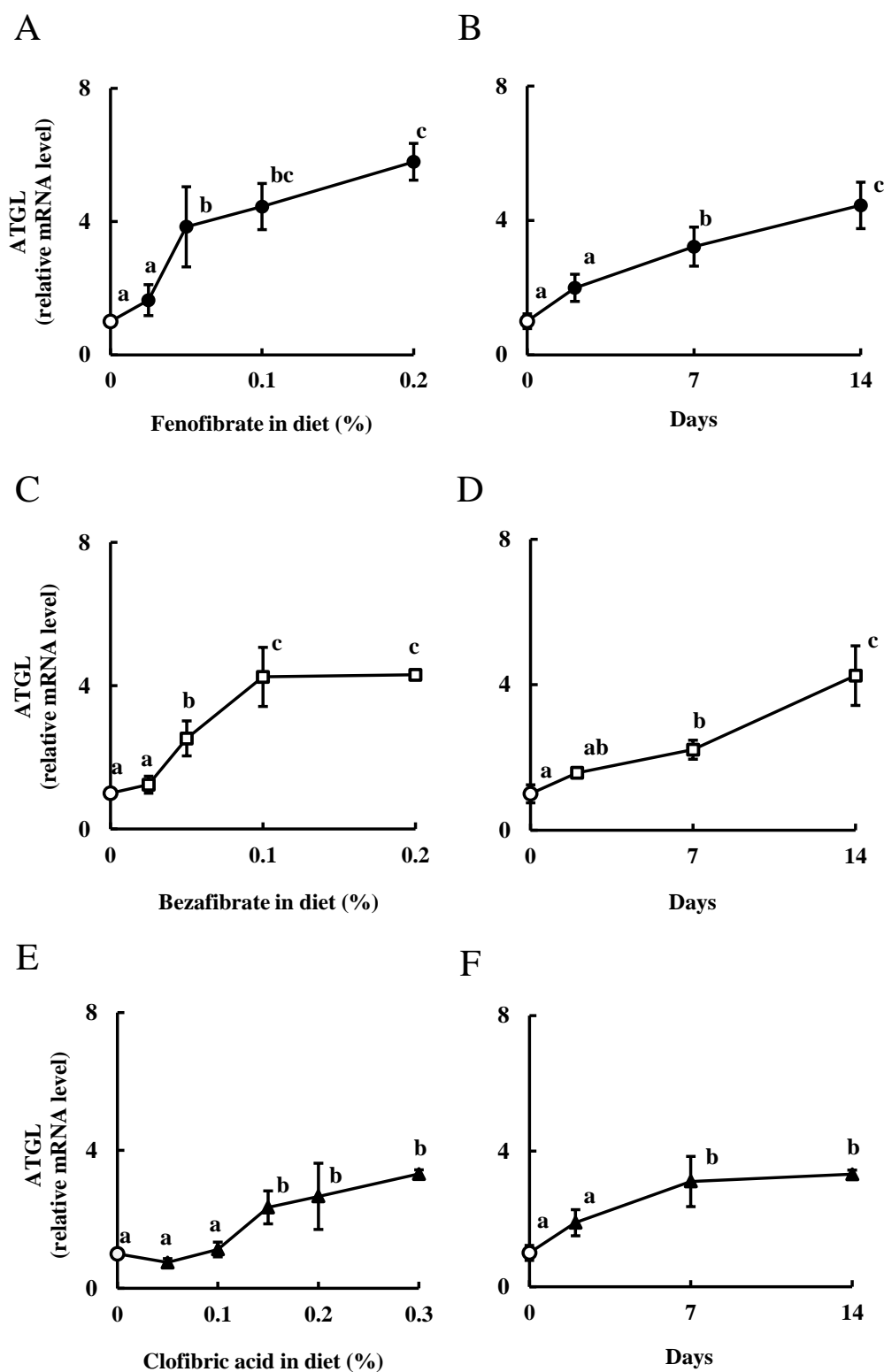
Rats were fed on the standard diet or diet containing 0.1% (w/w) fenofibrate, 0.1% (w/w) bezafibrate or 0.3% (w/w) clofibric acid for 14 days. Values represent means ± SD (n = 4-6). <sup>a, b, c</sup> Differences in the mean without a common superscript (a, b, c or d) are significant ( $p < 0.05$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

#### 4) ATGL および CGI-58 の遺伝子発現

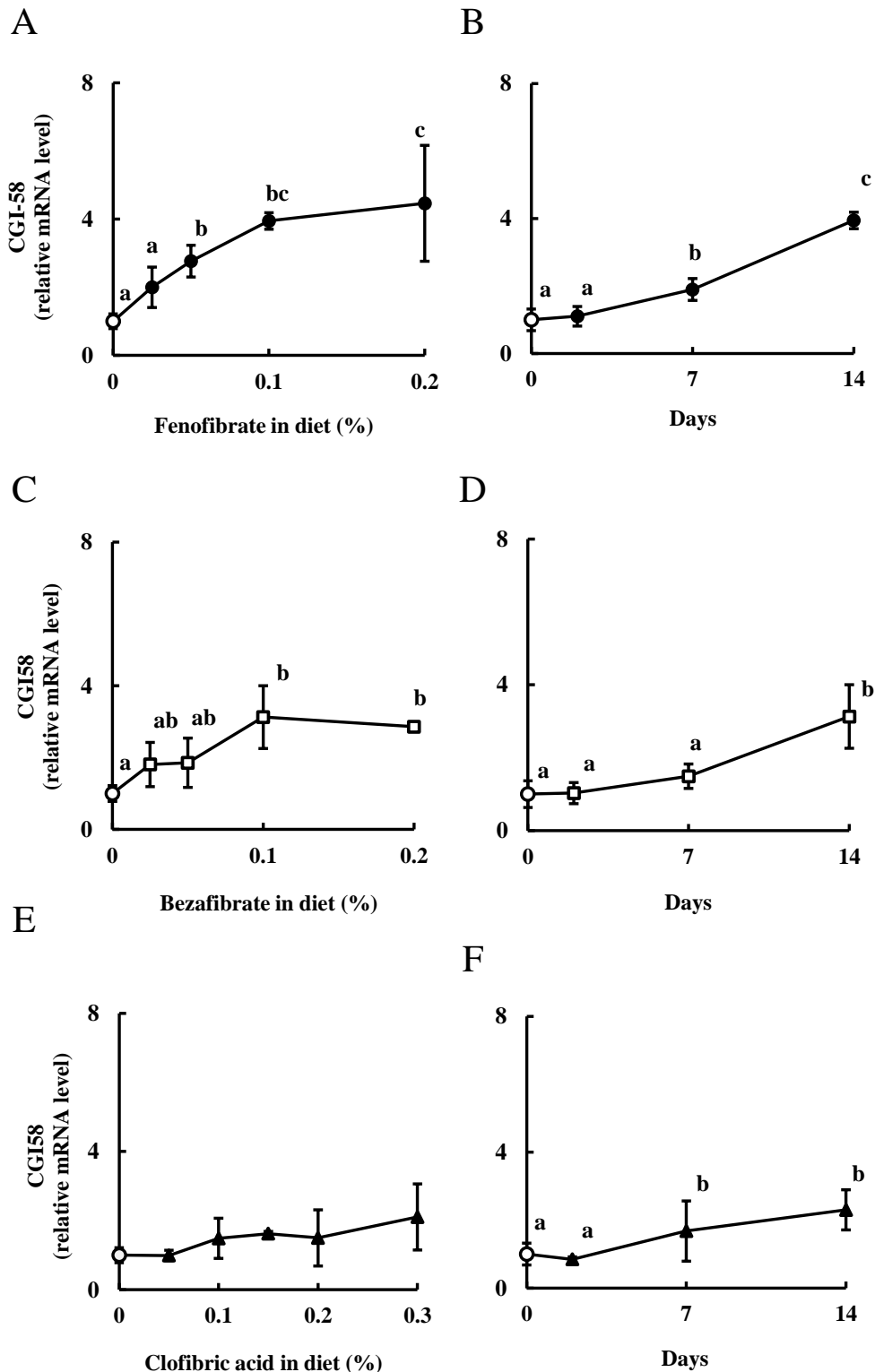
WI ラットにフェノフィブラート、ベザフィブラートおよびクロフィブリン酸を混合した飼料を与えたときの肝臓における ATGL の mRNA 発現誘導について調べた。本節 1) で記載した濃度の各フィブラートの混餌を 14 日間与えたところ、フェノフィブラートとベザフィブラートではともに 0.05% (w/w) から ATGL の発現が誘導され、0.1% (w/w) でプラトーに達した。一方、クロフィブリン酸については、低濃度では ATGL は誘導されず、0.15% (w/w) で有意に誘導され、それ以上の濃度ではプラトーとなった。各フィブラート 0.1% (w/w) で比較すると、ATGL の mRNA の発現は対照群に対して、フェノフィブラートでは 4.5 倍、ベザフィブラートでは 4.3 倍、クロフィブリン酸では 1.1 倍上昇した (Fig. 2-4 A, C, E)。また、Fig. 2-4 B, D, F に示すように、ATGL の mRNA は時間依存的に誘導された。ATGL の活性化因子である CGI-58 の発現について同様に調べたところ、3 種類のフィブラートで、濃度依存的かつ時間依存的に mRNA 発現量が上昇した (Fig. 2-5)。ATGL の mRNA 発現量と肝臓 TAG 含量の回帰分析を行ったところ、Fig. 2-6 に示したように、強い逆相関関係が認められた ( $r^2 = 0.6808$ )。

#### 5) TAG 加水分解活性

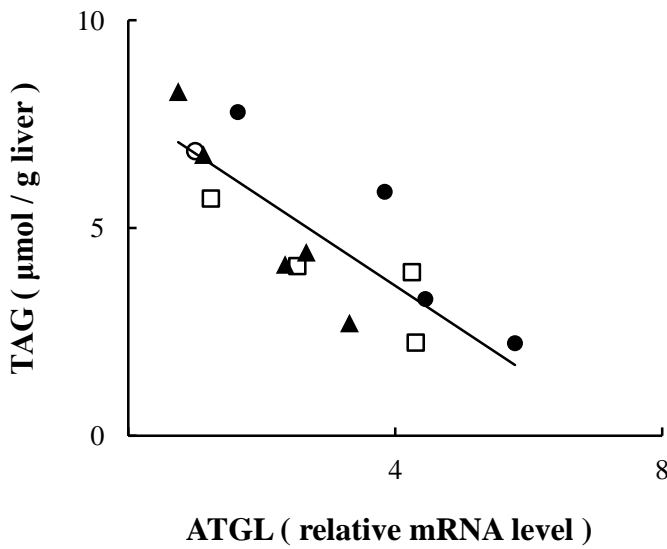
フェノフィブラート 0.1% (w/w)、ベザフィブラート 0.1% (w/w) およびクロフィブリン酸 0.3% (w/w) を 14 日間与えた WI ラットの肝臓における TAG 加水分解活性を [カルボキシル- $^{14}\text{C}$ ] トリオレインを基質として測定した。フェノフィブラートとクロフィブリン酸投与は、TAG 加水分解活性をそれぞれ対照群の 1.8 倍および 1.6 倍に上昇させた。また、ベザフィブラート投与では、活性は有意ではないものの、高い傾向 (1.4 倍) にあった (Fig. 2-7)。



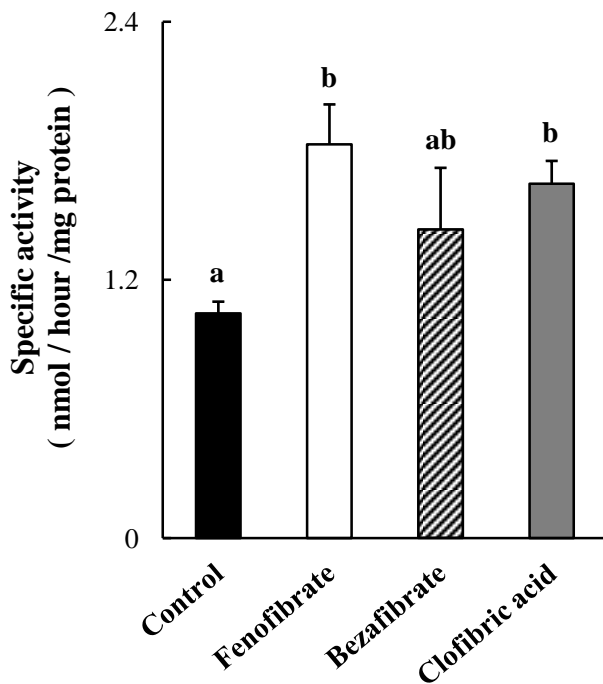
**Fig. 2-4** Effects of fibrates on mRNA encoding ATGL in the liver of rats. The treatments of rats were the same as described in the legend to Fig. 2-2 A, C and E: The dose-dependent increase in ATGL mRNA; A, fenofibrate; C, bezafibrate; E, clofibric acid. B, D, F: The time-dependent increase in ATGL mRNA; B, fenofibrate; D, bezafibrate; F, clofibric acid. Values are means  $\pm$  SD (n = 4). <sup>a, b, c</sup> Differences in the mean without a common superscript (a, b or c) are statistically significant ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2-5** Effects of fibrates on mRNA encoding CGI-58 in the liver of rats. The treatments of rats were the same as described in the legend to Fig. 2-4 A, C and E: The dose-dependent increase in CGI-58 mRNA; A, fenofibrate; C, bezafibrate; E, clofibric acid. B, D, F: The time-dependent increase in CGI-58 mRNA; B, fenofibrate; D, bezafibrate; F, clofibric acid. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). <sup>a, b, c</sup> Differences in the mean without a common superscript (a, b or c) are statistically significant ( $p < 0.05$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).



**Fig. 2-6** Relationship between ATGL mRNA level and TAG concentration in the liver of rats. ○, Control; ●, fenofibrate; □, bezafibrate; ▲, clofibric acid. The relationship between TAG concentration (data from Fig. 2-2 A, C and E) and the ATGL mRNA level (data from Fig. 2-4 A, C and E) was determined as  $Y = -1.0629 X + 7.8595$  ( $r^2 = 0.6808$ ).



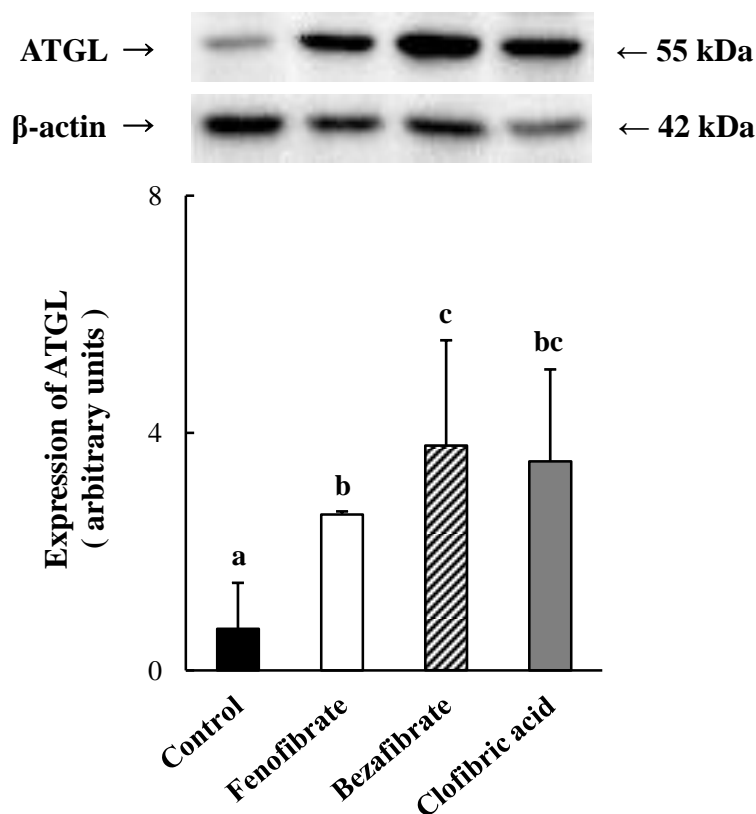
**Fig. 2-7** Effects of fibrates on TAG hydrolase activity in the liver of rats. Rats were fed on a standard diet or a diet containing 0.1% (w/w) fenofibrate ( $67.7 \pm 10.4$  mg/kg body weight per day), 0.1% (w/w) bezafibrate ( $66.6 \pm 11.7$  mg/kg body weight per day) or 0.3% (w/w) clofibric acid ( $202.1 \pm 40.2$  mg/kg body weight per day) for 14 days. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). <sup>a, b</sup> Differences in the mean without a common superscript (a or b) are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

## 6) ATGL タンパク質の発現

WI ラットにフェノフィブラート 0.1% (w/w)、ベザフィブラート 0.1% (w/w) およびクロフィブリン酸 0.3% (w/w) を 14 日間与え、肝臓における ATGL タンパク質の発現量をウエスタンブロット法に



より定量した (Fig. 2-8)。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の投与では、ATGL のタンパク質量は、対照群に対して、それぞれ 2.7 倍、3.8 倍および 3.5 倍高いことが判明した。



**Fig. 2-8** Effects of fibrates on protein expression of ATGL in the liver of rats. Rats were fed on a standard diet or a diet containing 0.1% (w/w) fenofibrate, 0.1% (w/w) bezafibrate or 0.3% (w/w) clofibric acid for 14 days. Immunoblot was carried out on liver extracts. Liver extracts (10  $\mu$ g of protein each) were loaded and separated by electrophoresis. Visible bands represent ATGL and  $\beta$ -actin as indicated. Quantitation of the amount of ATGL was carried out using Multi gauge software (GE Healthcare) and normalized by loaded  $\beta$ -actin. Values represent means  $\pm$  SD (n = 4). <sup>a, b, c</sup> Differences without a common superscript (a, b or c) are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

#### 7) ATGL および Acot1 遺伝子発現の相関関係

3 種類のフィブラートによる ATGL の誘導が PPAR $\alpha$  の活性化を介して起きているのかを検討するために、ATGL と代表的な PPAR $\alpha$  標的遺伝子である Acot1 の mRNA 発現量について相関関係を調べた。ま

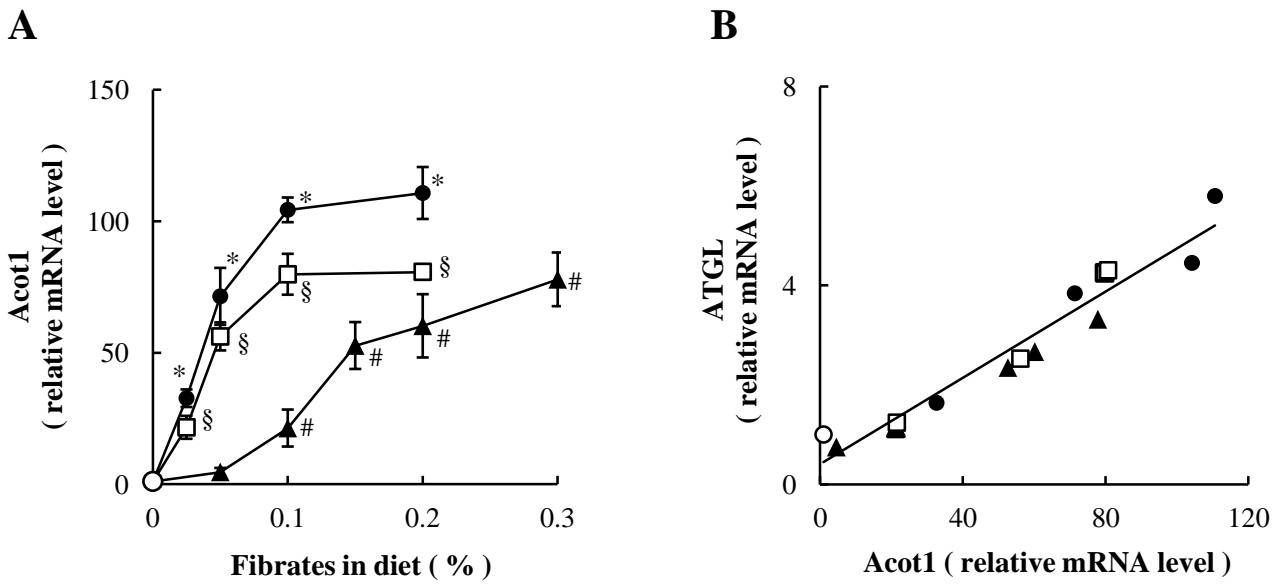
ず、WI ラットへ各フィブラートの混餌を 14 日間与え、肝臓における *Acot1* の mRNA 発現を調べたところ、Fig. 2-9 A に示すように、フィブラートの投与量に依存して発現が上昇した。そこで、ATGL および *Acot1* の mRNA 発現レベルについて回帰分析をおこなったところ、両者にはきわめて強い正の相関が認められた ( $r^2 = 0.9383$ ) (Fig. 2-9 B)。

#### 8) 肝臓中のフィブリン酸量と ATGL および TAG 含量の関係

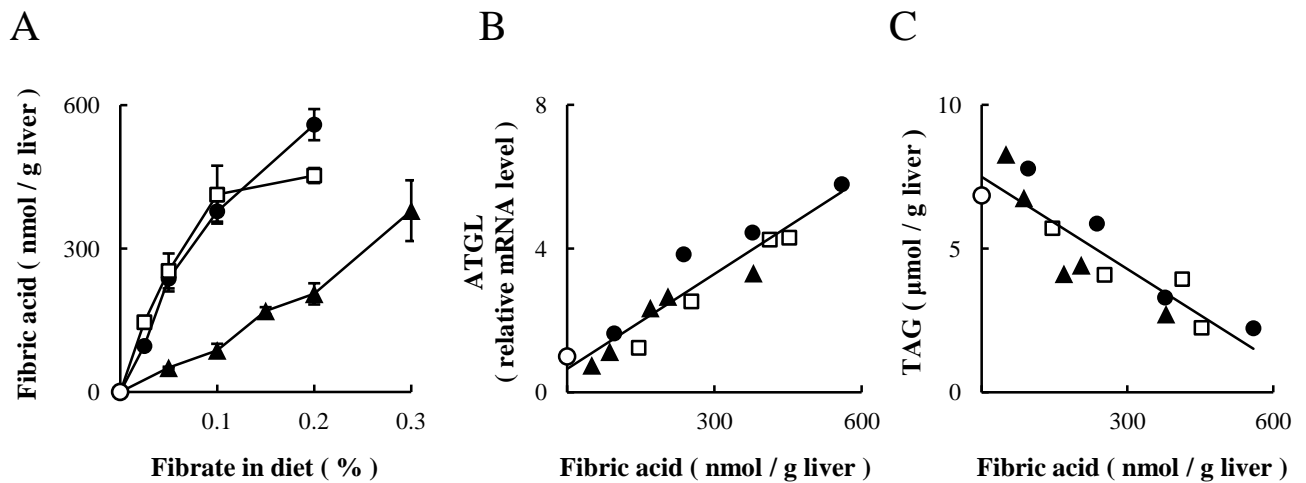
エステル体として存在するフィブラートは吸収後、血中および組織中のエステラーゼにより速やかに加水分解され、活性体であるフィブリン酸となり、PPAR $\alpha$  リガンド結合部位に結合する。活性化された PPAR $\alpha$  は、標的遺伝子のプロモーターに存在する PPRE に結合して、その標的遺伝子の転写を活性化すると考えられている [5, 94]。実際に、肝臓にどれだけのフィブリン酸が存在すると、ATGL の発現を誘導し、TAG 含量を低下させるか調べるために、肝臓からフィブリン酸を抽出後、4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin (BrMDMC) を用いて蛍光誘導体化し、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography、HPLC) を用いて定量した (定量法の詳細は第 2 節に示す)。WI ラットに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 14 日間与えた時の肝臓におけるフィブリン酸含量を調べたところ、Fig. 2-10 A に示すように、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。そこで、肝臓中のフィブリン酸濃度と ATGL 遺伝子発現レベルについて回帰分析をおこなったところ、Fig. 2-10 B に示すように、強い正の相関が認められた ( $r^2 = 0.9025$ )。また、肝臓中のフィブリン酸濃度と肝臓 TAG 含量については、強い負の相関があることがわかった ( $r^2 = 0.8080$ 、Fig. 2-10 C)。

#### 9) 小括

本節での検討によって、3 種類のフィブラートは ATGL を誘導し、この発現誘導は PPAR $\alpha$  の活性化と強く相関していた。また、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は肝臓中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 ATGL の発現を誘導し、TAG 含量の低下を引き起こすことが明らかになった。



**Fig. 2-9** Up-regulation of the expression of ATGL gene and Acot1 gene by fibrates in the liver. Rats were treated with fenofibrate, bezafibrate or clofibric acid at various doses for 14 days. The treatments were the same as those described in the legend to Fig. 2-2 A, C and E. ○, Control; ●, fenofibrate; □, bezafibrate; ▲, clofibric acid. A: Fibrate-induced elevation of Acot1 mRNA level. Values are means  $\pm$  SD (n = 4). \* The means (fenofibrate-treated) are significantly different from the control ( $P < 0.05$ ). § The means (bezafibrate-treated) are significantly different from the control ( $p < 0.05$ ). # The means (clofibric acid-treated) are significantly different from the control ( $p < 0.05$ ). B: The relationship between the ATGL mRNA level (data from Fig. 2-4 A, C and E) and the Acot1 mRNA level (data from panel A) was determined as  $Y = 0.0434 X + 0.4045$  ( $r^2 = 0.9383$ ).



**Fig. 2-10** Hepatic concentrations of fibric acids and their potency with respect to up-regulation of ATGL mRNA expression and reduction of TAG concentration. Rats were treated with fenofibrate, bezafibrate or clofibric acid at various doses for 14 days. The treatments were the same as those described in the legend to Fig. 2-2 A, C and E. ○, Control; ●, fenofibrate; □, bezafibrate; ▲, clofibric acid. A: The concentrations of active metabolites, fibric acids, in the liver. B: The relationship between ATGL mRNA level (data from Fig. 2-4 A, C and E) and fibric acid concentration (data from panel A) was determined as  $Y = 0.0088 X + 0.6454$  ( $r^2 = 0.9025$ ). C: The relationship between hepatic TAG concentration (data from Fig. 2-2 A, C and E) and fibric acid concentration (data from panel A) was determined as  $Y = -0.0107 X + 7.4985$  ( $r^2 = 0.8008$ ).

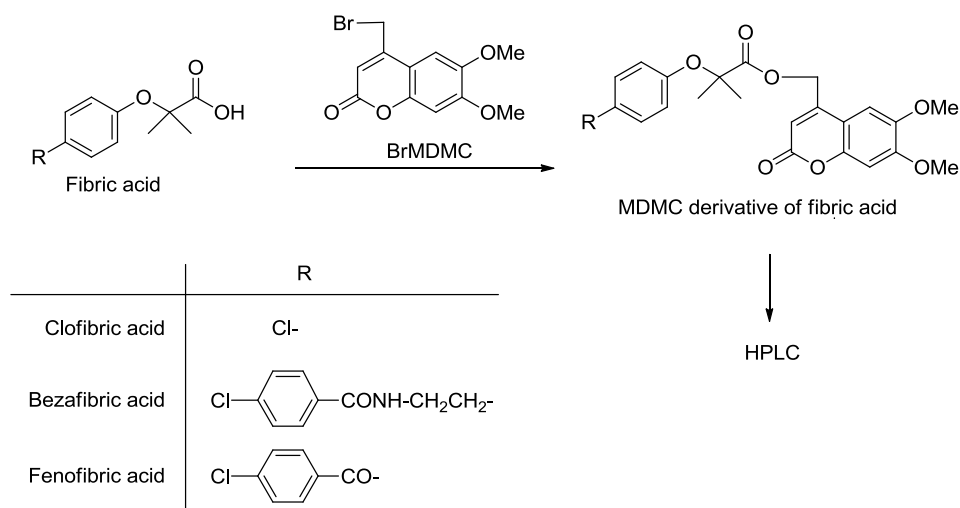
## 第2節 肝臓中のフィブリン酸の微量定量法の開発

フィブラートは、カルボン酸型であるフィブリン酸となり、PPAR $\alpha$ のリガンドとして作用することが知られている [5, 94]。フィブラートもしくはフィブリン酸は非常に有用な生理活性化合物として、生化学や薬理学分野をはじめとする様々な分野の研究で用いられてきた。しかしながら、肝臓中のフィブリン酸の簡便で感度の高い定量法がなかったため、これまでの研究ではフィブラートの投与量についての情報のみで、実際に影響を及ぼす組織中でのフィブリン酸の濃度に関する情報は示されてこなかった。組織内でのフィブリン酸の作用メカニズムについて、より詳細に理解するためには、実際に作用する組織や細胞内でのフィブリン酸の正確な濃度の情報が必要である。そこで本節では、微量の肝臓試料を用いて、組織中の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を定量することを目的とし、BrMDMCを用いてフィブリン酸を誘導体化し、HPLCで分離し蛍光を検出することにより定量する方法の開発を試みた。

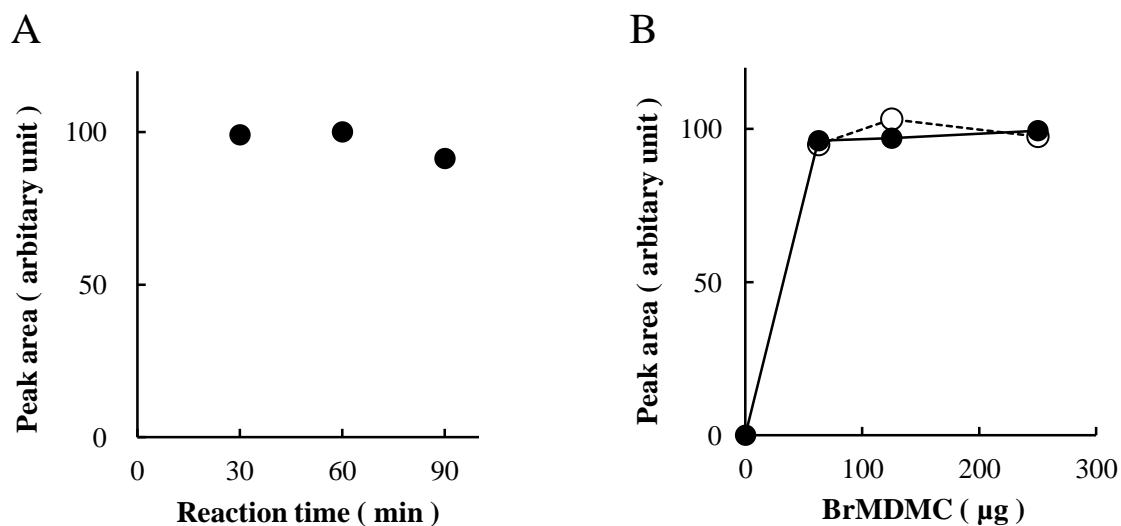
### 1) 抽出および誘導体化

Abeらが報告した方法 [1] を一部改変し、有機溶媒によるフィブリン酸の抽出方法の開発を試みた。抽出溶媒として *n*-ヘキサン-酢酸エチル (85 : 15, v/v) を用いたところ、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について高い抽出効率が確保でき、分析時の妨害物の混入もほとんどみられなかった。本研究で用いた蛍光誘導体化試薬である BrMDMC は、フィブリン酸のカルボキシル基と反応する (Fig. 2-11)。次に、BrMDMCによるフィブリン酸誘導体化の反応条件について検討した。まず、70°Cでの加熱が必要となるため、その反応時間について検討した。Fig. 2-12 A に示したように、蛍光強度は反応 30 分でプラトーに達し、60、90 分と経過してもピーク面積に変化がみられなかった。次に、水またはラット肝ホモジネート (肝臓 10 mg 相当) に 1 nmol のクロフィブリン酸をスパイクした試料を用いて、反応系に加える BrMDMC 量について検討した。BrMDMC/18-クラウン-6-エーテル比を一定とし、BrMDMC 量を 62.5  $\mu$ g から 250  $\mu$ g まで変化させると、蛍光検出によるピーク面積は BrMDMC 125  $\mu$ g および 18-クラウン-6-エーテル 31.5  $\mu$ g でプラトーに達した (Fig. 2-12 B)。これらの結

果から、誘導体化は BrMDMC 250  $\mu\text{g}$  および 18-クラウン-6-エーテル 62.5  $\mu\text{g}$  を用いて 70°C で 60 分間行うこととした。方法の詳細については実験の部 第 9 章に記した。



**Fig. 2-11** Scheme of derivatization reaction



**Fig. 2-12** Effects of reaction time and the amounts of BrMDMC on the derivatization of fibric acids. A: Water (100  $\mu\text{L}$ ) spiked with 1 nmol clofibric acid was treated according to the standard procedure, except for the reaction time. B: Water (100  $\mu\text{L}$ ) (○··○) and rat liver homogenates (10 mg of liver) (●—●) spiked with 1 nmol clofibric acid were treated according to the standard procedure, except for the amounts of BrMDMC and 18-crown-6-ether; the ratio of BrMDMC to 18-crown-6-ether was kept constant.

## 2) 定量方法のバリデーション

本節における検討によって開発した定量法の妥当性を確認するために、選択性 (selectivity)、直線性 (linearity)、正確度 (accuracy)、精密度 (precision)、回収率 (recovery) についてのバリデーションをアメリカ食品医薬品局の “Guide for Industry, Bioanalytical Method Validation” の判定基準[20]に従って調べた。

### (1) 選択性 (selectivity)

選択性とは、各分析対象物質および内標準物質の定量に対して妨害作用がないことである。Fig. 2-13 A に示すように、移動相にアセトニトリル-水 (43 : 57, v/v) を用いた場合、BrMDMC 誘導体化クロフィブリン酸とバザフィブリン酸を完全に分離することができた。同様に、移動相をアセトニトリル-水 (46 : 54, v/v) にした場合、BrMDMC 誘導体化クロフィブリン酸とフェノフィブリン酸は完全に分離された (Fig. 2-13 D)。次に、フィブリン酸をスパイクしていない肝臓ホモジネートに抽出、誘導体化の操作を行ったブランク試料のクロマトグラムを調べたところ、いずれの移動相においても、誘導体化フィブリン酸の保持時間に妨害ピークはみられなかった (Fig. 2-13 B, E)。なお、ラウリン酸 (12:0) やステアリン酸 (18:0) などの脂肪酸が BrMDMC で誘導体化されても、これらはフェノフィブリン酸の保持時間の 2 倍以上後で検出され、分析には影響しないことを確認した (データ未掲載)。また、肝臓ホモジネートにフィブリン酸をスパイクし、抽出、誘導体化した試料のクロマトグラムでは、Fig. 2-13 A, D の場合と同様に、誘導体化フィブリン酸のピークは完全に分離し、妨害ピークも確認されなかった (Fig. 2-13 C, F)。腎臓、筋肉のホモジネートおよび血清についても同様に検討したところ、誘導体化フィブリン酸のピークに対する妨害はみられず、また、2 つのフィブリン酸は完全に分離することが確認できた (Fig. 2-14)。HPLC クロマトグラムでみられた蛍光検出ピークが実際に、BrMDMC 誘導体化フィブリン酸であることを確認するために、それぞれ 3 つのピークのフラクションを分取し、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (electrospray ionization mass spectrometry, EI-MS) および高速原子衝撃質量分析 (fast atom bombardment mass spectroscopy, FAB-MS) を用いて構造解析を行った。EI-MS で検出されたフィブリン酸由来の塩素原子を含む分子イオンピークおよび FAB-MS で検出されたプロトン付加ピークの質

量電荷比から、HPLC の検出ピークは BrMDMC で誘導体化されたそれぞれのフィブリン酸であることが確認できた (Table 2-2)。

## (2) 直線性 (linearity)

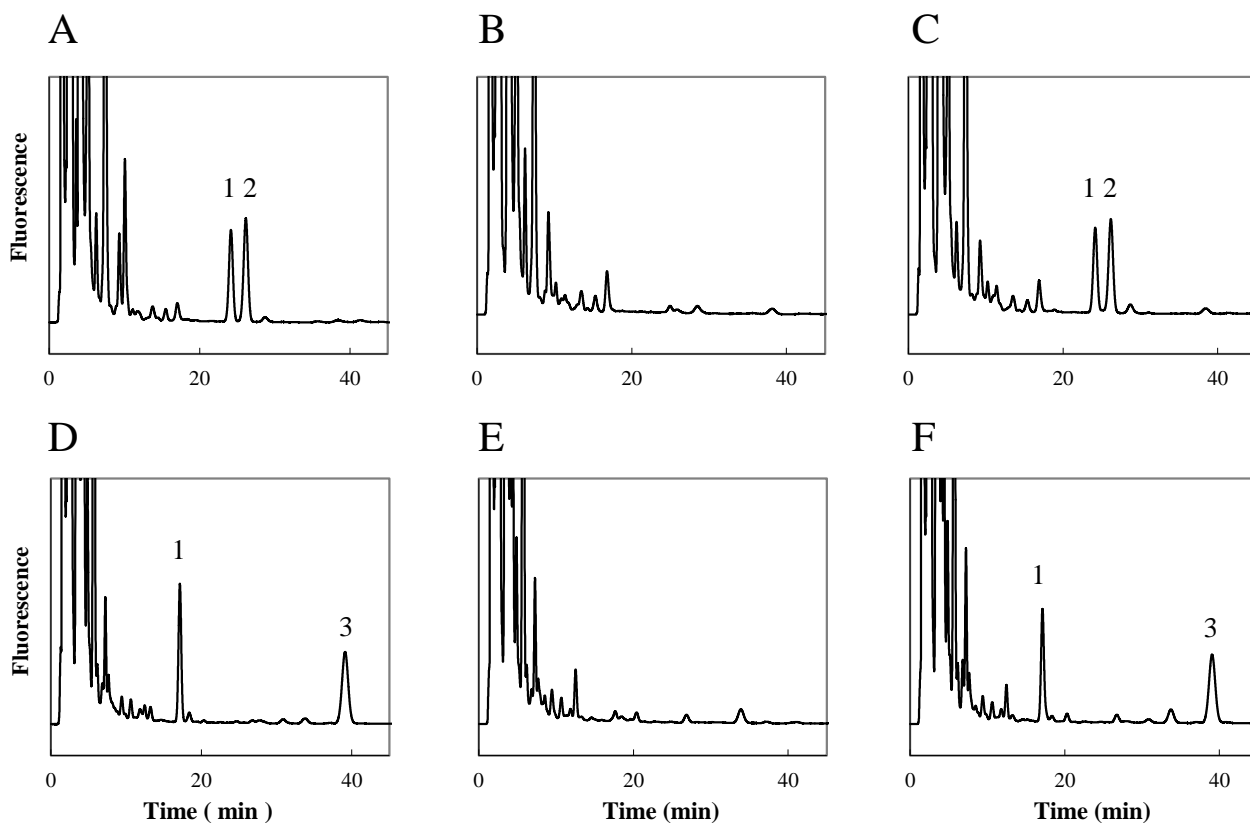
検量線の直線性とは、分析対象物質の濃度と定量値の関係である。10 mg の肝臓ホモジネートのブランク試料に 0.2 から 20 nmol のフィブリン酸をスパイクし、検量線を作成した。クロフィブリン酸の検量線には、内部標準としてベザフィブリン酸 2 nmol を、ベザフィブリン酸およびフェノフィブリン酸の検量線には、内部標準としてクロフィブリン酸 2 nmol を加えた。クロフィブリン酸、ベザフィブリン酸およびフェノフィブリン酸ともに、それぞれの検量線には高い直線性が得られた (Table 2-3)。

## (3) 正確度 (accuracy) および精密度 (precision)

正確度とは、測定対象物質の測定値が真の値に近い値であることを示す尺度であり、精密度とは、繰り返しの分析によって得られる定量値の間のばらつきの小ささの尺度である。10 mg の肝臓ホモジネートにスパイクした 0.5、2.5 および 20 nmol の各フィブリン酸の定量を、日間および日内に 5 回繰り返し行い、正確度と精密度を調べた。すべての定量値の正確度および精密度は許容限界である  $\pm 15\%$  以内であった (Table 2-4)。

## (4) 回収率 (recovery)

回収率とは、生体試料の前処理過程における分析対象物質の回収効率のことである。0.5、2.5 および 20 nmol の各フィブリン酸について、直接誘導体化した (抽出操作を行っていない) 場合と、10 mg の肝臓ホモジネート試料にスパイクし、抽出および誘導体化操作を行った場合の定量値をそれぞれ 5 回繰り返して比較したところ、回収率は、クロフィブリン酸では 99.14–107.57%、ベザフィブリン酸では 93.03–100.89%、フェノフィブリン酸では 103.41–112.29% となった。このように、回収率はほぼ 100% であった。また、変動変数はいずれも小さく、再現性の高さも確認できた (Table 2-5)。



**Fig. 2-13** Chromatograms obtained for MDMC derivatives of standard clofibric, bezafibric and fenofibric acids. (A) 2.5 nmol clofibric and bezafibric acids that were directly derivatized; (B) blank liver sample; (C) liver sample (10 mg of liver) spiked with 2.5 nmol clofibric and bezafibric acids; the mobile phase for (A), (B) and (C) was acetonitrile–water (43:57, v/v). (D) 2.5 nmol clofibric and fenofibric acids that were directly derivatized; (E) blank liver sample; (F) liver sample (10 mg of liver) spiked with 2.5 nmol clofibric and fenofibric acids; the mobile phase for (D), (E) and (F) was acetonitrile–water (46:54, v/v). Peak1, MDMC-clofibric acid; peak 2, MDMC-bezafibric acid; peak 3, MDMC-fenofibric acid.

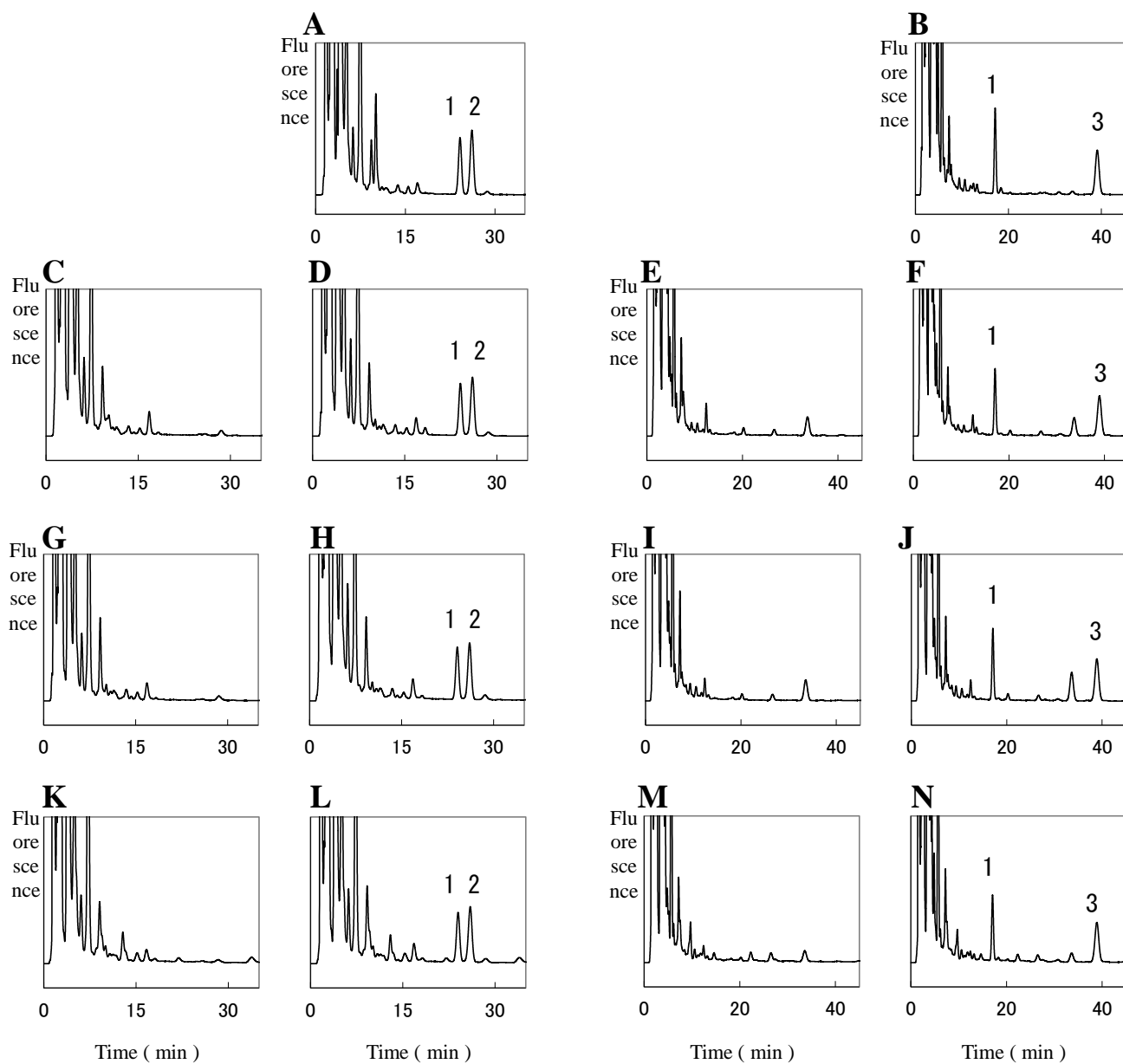
**Table 2-2** EI- and FAB-MS analyses of MDMC derivatives of fibric acids

MDMC-fibric acid	Formula	EI-MS ( relative intensity )		FAB-MS <sup>a</sup>
		M <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> + 2	[M + H] <sup>+</sup>
MDMC-clofibric acid	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> ClO <sub>7</sub>	432 ( 66 )	434 ( 22 )	433
MDMC-bezafibric acid	C <sub>31</sub> H <sub>30</sub> ClNO <sub>8</sub>	579 ( 0.38 )	581 ( 0.18 )	580
MDMC-fenofibric acid	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>8</sub>	536 ( 100 )	538 ( 38 )	537

MDMC derivatives of each fibric acid isolated by using HPLC were subject to EI- and FAB-MS analyses.

*a)* Matrix: 3-nitrobenzyl alcohol.





**Fig. 2-14** Chromatograms obtained for MDMC derivatives of standard clofibric, bezafibric and fenofibric acids with tissue homogenates and serum. (A) 2.5 nmol clofibric and bezafibric acids that were directly derivatized; (C, G, K) blank samples of kidney (C), muscle (G) and serum (K), respectively; (D, H, L) tissue samples (10 mg of kidney (D) and muscle (H), respectively) and 100  $\mu$ L serum (L) spiked with 2.5 nmol clofibric and bezafibric acids; the mobile phase for (A), (C), (D), (G), (H), (K) and (L) was acetonitrile–water (43:57, v/v). (B) 2.5 nmol clofibric and fenofibric acids that were directly derivatized; (E, I, M) blank samples of kidney (E), muscle (I) and serum (M), respectively; (F, J, N) tissue samples (10 mg of kidney (F) and muscle (J), respectively) and 100  $\mu$ L serum (N) spiked with 2.5 nmol clofibric and fenofibric acids; the mobile phase for (B), (E), (F), (I), (J), (M) and (N) was acetonitrile–water (46:54, v/v).

**Table 2-3** Calibration lines for HPLC assay of fibric acids and LOQ

Fibric acid	Linear regression equation ( $y = ax + b$ )			<i>n</i>
	Slope ( <i>a</i> )	Intercept ( <i>b</i> )	Correlation ( <i>r</i> )	
Clofibric acid	0.987	-0.041	1.0000	7
Bezafibric acid	1.167	0.007	0.9999	7
Fenofibric acid	1.234	-0.025	1.0000	7

Fibric acids (0.2–2.0 nmol) and IS were added to liver homogenates (10 mg of liver). The determination was made according to the standard procedure.

**Table 2-4** Precision and accuracy for the determination of clofibric acid, bezafibric acid and fenofibric acid in rat liver homogenates

Fibric acid	Nominal concentration	Measured concentration	Precision (% CV)	Accuracy (%)
Intraday				
Clofibric acid	0.5	0.420 ± 0.001	0.21	-12.33
	2.5	2.180 ± 0.023	1.00	-9.72
	20	18.118 ± 0.066	0.35	-6.82
Bezafibric acid	0.5	0.533 ± 0.001	0.22	6.49
	2.5	2.582 ± 0.003	1.03	3.28
	20	19.984 ± 0.072	1.03	3.28
Fenofibric acid	0.5	0.435 ± 0.003	0.77	-12.91
	2.5	2.800 ± 0.015	0.54	12.01
	20	21.180 ± 0.296	1.40	5.90
Interday				
Clofibric acid	0.5	0.438 ± 0.000	0.06	-12.49
	2.5	2.221 ± 0.007	0.30	-11.16
	20	18.530 ± 0.204	1.10	-7.35
Bezafibric acid	0.5	0.533 ± 0.000	0.06	6.68
	2.5	2.625 ± 0.008	0.31	5.01
	20	20.106 ± 0.232	1.15	0.53
Fenofibric acid	0.5	0.446 ± 0.013	2.86	-10.81
	2.5	2.730 ± 0.029	1.07	9.21
	20	21.996 ± 0.430	1.96	9.98

**Table 2-5** Recovery of fibric acids from liver homogenates at the three concentrations

Fibric acid	Nominal concentration ( nmol / 10 mg liver )	n	Recovery ( % )	
			Mean	CV ( % ) <sup>a</sup>
Clofibrinic acid	0.5	5	107.57	3.17
	2.5	5	103.72	2.82
	20	5	99.14	1.48
Bezafibrinic acid	0.5	5	93.03	3.15
	2.5	5	96.48	2.84
	20	5	100.89	1.47
Fenofibrinic acid	0.5	5	103.41	5.08
	2.5	5	108.40	1.76
	20	5	112.29	1.86

Fibric acid (0.5, 2.5 or 20 nmol) was added to liver homogenates ( 10 mg of liver ).  
The determination was made according to the standard procedure. a) coefficient of variation.

### 3) 生体試料への適応

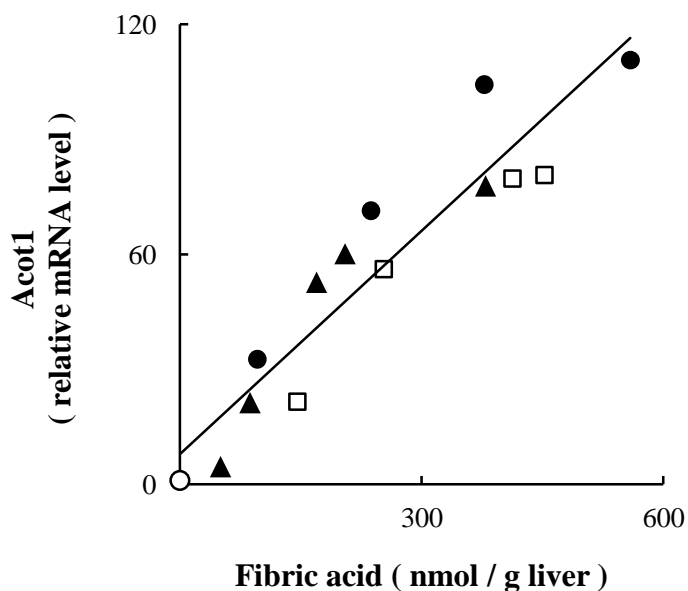
本節で開発した方法が、実際の生体試料の定量に用いることができるか検討した。3種のフィブライターの混餌を14日間与えたWIラットの肝臓からフィブリン酸を抽出、誘導体化して定量を行ったところ、投与量に依存して肝臓中のフィブリン酸濃度が上昇することが確認できた (Fig. 2-10 A)。この肝臓中のフィブリン酸濃度と、*in vivo*におけるPPAR $\alpha$ の代表的な標的遺伝子であるAcot1の肝臓における遺伝子発現レベル (Fig. 2-9 A) の回帰分析を行ったところ、強い相関が認められた ( $r^2 = 0.8764$ , Fig. 2-15)。このことは、3種のフィブリン酸のPPAR $\alpha$ 活性化能がほぼ同じであることを示していると考えられる。

また、BrMDMC誘導体化フェノフィブリン酸の定量の際、HPLCの保持時間21分付近に大きな未知ピークが検出された (Fig. 2-16)。なお、ベザフィブリン酸およびクロフィブリン酸では未知ピークは検出されなかった。Abeらは、フェノフィブリン酸を投与したヒトの血清中にフェノフィブリン酸の還元体である2-{4-[(4-chlorophenyl) (hydroxy)methyl]phenoxy}-2-methylpropanoic acidが検出されたと報告して

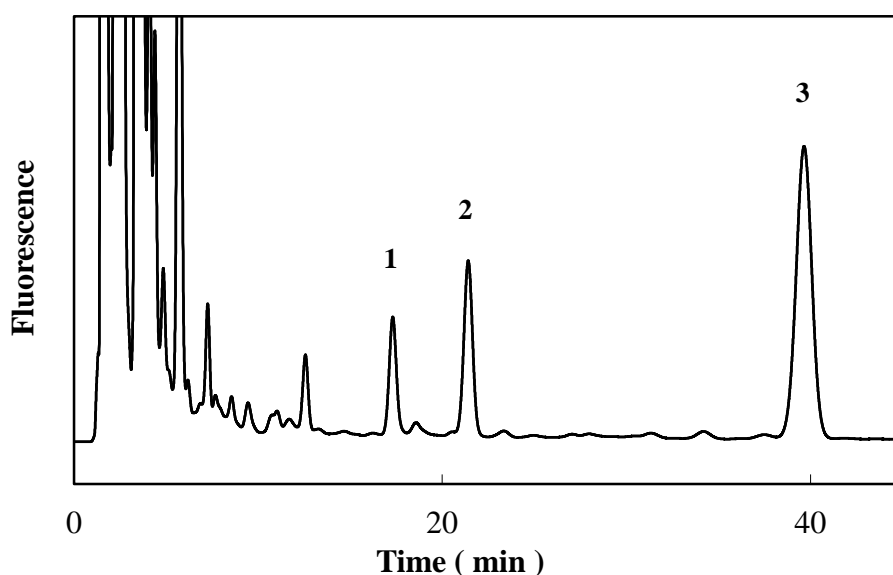
いる [1]。そこで、本研究において検出された未知ピークを示す化合物が、フェノフィブリン酸の還元体であることを確認するために、フェノフィブリン酸の還元体を化学合成し、これを BrMDMC 誘導体化して HPLC にて分析したところ、検出されたピークの保持時間は上述した未知ピークのもものと一致した。このことから、ラットをフェノフィブリン酸処置すると、肝臓中でフェノフィブリン酸の還元体が生じることが明らかとなった。

#### 4) 小括

本節では、10 mg の肝臓を用いて、フィブラートの活性化体であるフィブリン酸の肝臓中の濃度を、感度よく簡便に定量する方法を開発した。この方法を用いて、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 1 分子は、化学構造の違いにもかかわらず、肝臓中において同じ PPAR $\alpha$  活性を有していることを明らかにした。



**Fig. 2-15** Hepatic concentrations of fibric acids (data from Fig. 2-10 A) and their potency with respect to up-regulation of Acot1 mRNA expression (data from Fig. 2-9 A).  $Y = 0.1942 X + 7.8194$  ( $r^2 = 0.8764$ ). ○, Control; ●, fenofic acid; □, bezafibric acid; ▲, clofibric acid.



**Fig. 2-16** Representative chromatogram of MDMC derivatives fenofibric acid and its reduced metabolite. Chromatogram obtained for liver samples of the rats fed a diet containing 0.1% (w/w) fenofibrate for 14 days. Liver homogenates (10 mg of liver), spiked with 2 nmol clofibrac acid as a standard, were assayed according to the standard procedure. Peak1, MDMC-clofibrac acid; peak 2, unknown compound; peak 3, MDMC-fenofibrac acid. The retention time of the unknown compound was confirmed to be completely the same as that of MDMC derivative of 2-[4-[(4-chlorophenyl)(hydroxy)methyl]phenoxy]-2-methylpropanoic acid, the reduced form of fenofibrac acid.

### 第3節 GK ラットの肝臓における ATGL 発現と TAG 含量に対するベザフィブラートの効果の解析

Turpin らは、肥満モデル動物の肝臓で ATGL 発現を低下させると、脂肪酸の酸化が抑制され、脂肪肝が増悪すること、また ATGL 発現を上昇させると脂肪肝を改善し、インスリン感受性を高めることを示している [88]。第1章において非肥満2型糖尿病モデルである GK ラットは、肝臓に TAG が軽度に蓄積していることが明らかとなった。そこで、本章第1節において、健常ラットを用いて確認したフィブラートによる肝臓の TAG 減少作用が、GK ラットでもみられるか検討するために、PPAR $\alpha$  アゴニストであるベザフィブラートを投与した時の GK ラットの肝臓 TAG 代謝について解析した。

#### 1) ベザフィブラート投与の基礎的情報

ベザフィブラート (100 mg/kg 体重) を 1 日 1 回 7 日間経口投与した WI ラット、GK ラットおよびそれぞれの対照群の体重と相対肝重量を Table 2-6 に示した。WI ラット、GK ラットともにベザフィブラート投与による体重の増減はみられなかったが、肝臓の相対重量は増加した。血清脂質パラメータについては、非絶食下における TAG 値および総コレステロール値は両群ともにベザフィブラート投与により有意に低下した。NEFA 値は、GK ラットではベザフィブラートにより 28%低下したが、WI ラットではベザフィブラートを投与しても変化は認められなかった (Table 2-7)。

#### 2) ベザフィブラートによる肝臓 TAG 含量の低下

ベザフィブラートを投与した WI ラットおよび GK ラットの肝臓 TAG 含量を定量した。WI ラットおよび GK ラットではベザフィブラート投与によって、肝臓 TAG 含量がそれぞれ 42%および 47%低下した (Fig. 2-17)。

#### 3) 肝臓中のベザフィブリン酸量

ベザフィブラートを投与した WI ラットおよび GK ラットの肝臓中のベザフィブリン酸濃度を定量した。それぞれ  $113.81 \pm 41.55$  nmol/g liver および  $187.34 \pm 42.42$  nmol/g liver 存在していた (Fig. 2-18)。

#### 4) 脂肪酸および TAG 代謝関連遺伝子の発現

ベザフィブラート投与により、ATGL の mRNA 発現は WI ラットおよび GK ラットではそれぞれ 2.20 倍および 3.66 倍高くなった。CGI-58 の発現については、ベザフィブラート投与によって、WI ラットで有意に高くなったが、GK ラットでは変化がなかった。また、GK ラットでは、PPAR $\alpha$  および SREBP-1c の発現に有意な差はみられなかったが、WI ラットでは SREBP-1c のみが有意に高くなった。Acot1 の発現はベザフィブラート投与により WI ラットでは 21.9 倍、GK ラットでは 31.7 倍顕著に上昇した。CPT1a

および MCAD の遺伝子発現は WI ラット、GK ラットともにベザフィブラートで上昇した。一方、apoC III の発現はベザフィブラートで低下した。MTP の遺伝子発現は GK ラットのベザフィブラート投与群で有意に上昇した。

## 5) 小括

GK ラットにベザフィブラートを投与すると、健常ラットと同様に、ベザフィブリン酸による PPAR $\alpha$  の活性化を介して ATGL の発現が誘導され、肝臓中の TAG を低下させた。

**Table 2-6** Effect of bezafibrate on body weight and relative liver weight of WI and GK rats

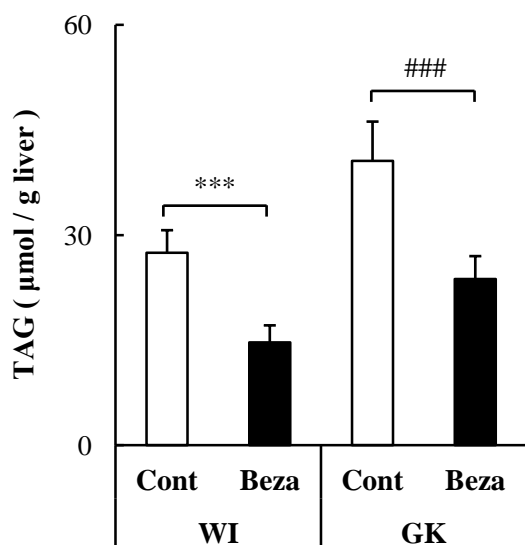
	WI		GK	
	Control	Bezafibrate	Control	Bezafibrate
Body weight ( g )	310.9 $\pm$ 2.8	312.8 $\pm$ 15.0	266.4 $\pm$ 19.0	265.9 $\pm$ 17.1
Liver ( % of body weight )	4.21 $\pm$ 0.23	5.92 $\pm$ 0.36 <sup>***</sup>	4.43 $\pm$ 0.11	6.38 $\pm$ 0.53 <sup>##</sup>

Rats were given an oral administration of bezafibrate at a dose of 100 mg/kg body weight once a day for 7 days. Values represent means  $\pm$  SD (n = 4-6). <sup>\*\*\*</sup> Significantly different from WI control rats ( $p < 0.001$ ). <sup>##</sup> Significantly different from GK control rats ( $p < 0.01$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

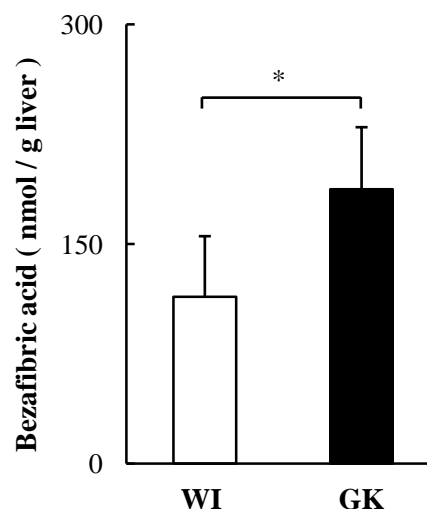
**Table 2-7** Effect of bezafibrate on serum lipid parameters of WI and GK rats

	WI		GK	
	Control	Bezafibrate	Control	Bezafibrate
TAG ( mg / dL )	172.0 $\pm$ 54.5	61.6 $\pm$ 8.6 <sup>**</sup>	101.1 $\pm$ 31.7	41.8 $\pm$ 3.6 <sup>##</sup>
Total cholesterol ( mg / dL )	63.3 $\pm$ 3.4	49.4 $\pm$ 1.4 <sup>***</sup>	105.2 $\pm$ 5.0	45.1 $\pm$ 3.7 <sup>###</sup>
NEFA ( mEq / L )	0.3 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>#</sup>

Rats were given an oral administration of bezafibrate at a dose of 100 mg/kg body weight once a day for 7 days. Values represent means  $\pm$  SD (n = 4-6). <sup>\*\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup> Significantly different from WI control rats ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). <sup>#</sup>, <sup>##</sup>, <sup>###</sup> Significantly different from GK control rats ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).



**Fig. 2-17** Effect of bezafibrate on the content of TAG in the liver of WI and GK rats. Rats were given an oral administration of bezafibrate at a dose of 100 mg/kg body weight once a day for 7 days. Values represent means  $\pm$  SD (n = 4-6). \*\*\* Significantly different from WI control rats ( $p < 0.001$ ). ### Significantly different from GK control rats ( $p < 0.001$ ).



**Fig. 2-18** The concentration of bezafibric acid in the liver of WI and GK rats. Rats were given an oral administration of bezafibrate at a dose of 100 mg/kg body weight once a day for 7 days. Values represent means  $\pm$  SD (n = 6). \* Significantly different from WI rats ( $p < 0.05$ ).

**Table 2-8** Effect of bezafibrate on gene expressions in the liver of WI and GK rats

Gene	WI		GK	
	Control	Bezafibrate	Control	Bezafibrate
ATGL	1.0 $\pm$ 0.22	2.20 $\pm$ 0.52 <sup>***</sup>	1.86 $\pm$ 0.70	6.81 $\pm$ 0.53 <sup>###</sup>
CGI-58	1.0 $\pm$ 0.16	1.54 $\pm$ 0.34 <sup>**</sup>	0.66 $\pm$ 0.17	0.76 $\pm$ 0.20
PPAR $\alpha$	1.0 $\pm$ 0.32	1.07 $\pm$ 0.03	1.79 $\pm$ 0.45	2.89 $\pm$ 0.91
Acot1	1.0 $\pm$ 0.29	21.87 $\pm$ 8.89 <sup>*</sup>	1.46 $\pm$ 0.31	46.32 $\pm$ 13.83 <sup>##</sup>
SREBP-1c	1.0 $\pm$ 0.44	2.49 $\pm$ 0.84 <sup>**</sup>	0.57 $\pm$ 0.32	0.70 $\pm$ 0.28
CPT1a	1.0 $\pm$ 0.33	1.87 $\pm$ 0.03 <sup>***</sup>	1.58 $\pm$ 0.34	3.48 $\pm$ 0.63 <sup>###</sup>
MCAD	1.0 $\pm$ 0.14	2.38 $\pm$ 0.24 <sup>***</sup>	1.06 $\pm$ 0.09	2.48 $\pm$ 0.23 <sup>###</sup>
apoCIII	1.0 $\pm$ 0.15	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>***</sup>	0.76 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.05 <sup>###</sup>
MTP	1.0 $\pm$ 0.10	1.51 $\pm$ 0.36	0.92 $\pm$ 0.11	1.39 $\pm$ 0.12 <sup>###</sup>

Values represent means  $\pm$  SD (n = 4-8). \*, \*\*, \*\*\* Significantly different from WI control rats ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). ##, ### Significantly different from GK control rats ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).



#### 第4節 考察

フィブラートによる肝臓 TAG 減少は、これまで主にミトコンドリアもしくはペルオキシソームでの脂肪酸  $\beta$  酸化活性の上昇を介して起こると考えられてきた[14, 70]。ところが、 $\beta$  酸化系が基質とする脂肪酸がどのように供給されるのかについては、詳細に検討されて来なかった。最近、ラットの肝実質細胞では肝臓外から取り込んだ脂肪酸よりも、TAG の加水分解によって生成した脂肪酸が優先的に酸化されること[44]、また ATGL により TAG から切り出された脂肪酸は、他の脂肪酸代謝経路からの脂肪酸よりも優先的に  $\beta$  酸化経路に運ばれることが報告され[75]、脂肪酸  $\beta$  酸化への基質の供給を担う酵素として、TAG の加水分解の律速酵素である ATGL が注目されるようになった。肝臓の TAG 加水分解活性には、ATGL とホルモン感受性リパーゼがそれぞれ、33~65%および 20%寄与していることが、それぞれの欠損マウスを用いた解析からわかってきている[101]。実際、ATGL の寄与は大きく、肝臓で ATGL の発現を抑制すると TAG が蓄積し[14]、逆に、ATGL を肝臓で過剰発現させると TAG の蓄積が抑えられる[75]。ヒトの ATGL 欠損症（筋炎を伴う中性脂質蓄積病）や CGI-58 の欠損症（魚鱗癬を伴う中性脂質蓄積病）でも肝肥大や脂肪肝を高頻度に合併することが明らかとなっている[78]。以上のことから、ATGL による TAG 加水分解で生じた脂肪酸が、ミトコンドリアやペルオキシソームでの脂肪酸酸化に利用されることで、ATGL は肝臓 TAG の異化を強力に支配していると考えられる。本章の検討においても、ATGL 遺伝子発現レベルと肝臓 TAG 含量は強い逆相関関係を示したことから (Fig. 2-6)、フィブラート投与による肝 TAG 減少作用にも ATGL の発現誘導が重要な役割を果たしていると考えられる。

本章での検討において、フィブラートにより脂肪酸の酸化に関与する遺伝子発現が上昇することが確認できたが、ペルオキシソーム  $\beta$  酸化に関与する *Acox1* の mRNA の発現の増加は、ミトコンドリア  $\beta$  酸化に関与する *CPT1a* の発現の増加に比べ、明らかに大きかった (Table 2-1)。しかしながら、Mannaerts らは、クロフィブラートを投与したラットの肝実質細胞において、ミトコンドリアの  $\beta$  酸化活性が上昇すること、また、クロフィブラート投与によって肝臓ホモジネート中のペルオキシソームの  $\beta$  酸化活性が顕著に増加したにもかかわらず、単離した肝細胞の全  $\beta$  酸化に対するペルオキシソーム  $\beta$  酸化の寄与率は 10%以下であることを報告している [54]。また、*CPT1a* は、その発現がわずかな上昇でもミトコンドリア  $\beta$  酸化を促進する [82] ことから総括すると、フィブラートによる TAG 分解亢進には、ミトコンドリア  $\beta$  酸化、特に *CPT1a* の発現上昇が大きく寄与しているものと考えられる。

一方、フィブラートによる TAG 合成への影響についてみると、脂肪酸 *de novo* 合成には変化がなかったが、FAT/CD36 と FATP2 の発現は大きく上昇しており (Table 2-1)、フィブラートによって肝臓外からの脂肪酸の取り込みが増加したと考えられる。また、フィブラート投与群で ACSL3 の発現の上昇が確認された (Table 2-1)。最近、ACSL3 は、細胞外から脂肪酸を供給すると endoplasmic reticulum (ER) から脂肪滴に移行すること、また、ACSL3 を高発現すると、細胞外からの脂肪酸の取り込みが亢進することが報告された [73]。ACSL3 が脂肪滴で脂肪酸を CoA エステル化し、細胞内に留めることは、細胞外からの脂肪酸の取り込みの駆動力となる可能性が示唆されている。このことから、フィブラートによって活性化した ACSL3 は、脂肪酸の細胞外から取り込みと、TAG 合成経路への振り分けに寄与しているかもしれない。

以前の報告と同様に [40, 99]、フィブラート投与により Elov16 と SCD1 の遺伝子発現が顕著に上昇した (Table 2-1)。Elov16 と SCD1 は、16:0 および 18:0 から 18:1n-9 の合成に関与する。そのため、*de novo* 合成で生成した 16:0 だけでなく、血中から取り込まれた 16:0 および 18:0 から多くの 18:1n-9 が生成していることが示唆された。後者については、Kawashima らが、ラット肝臓内において [<sup>14</sup>C] 18:0 から [<sup>14</sup>C] 18:1n-9 への変換が、クロフィブリン酸投与によって亢進することを明らかにしている [32, 39]。以上のことから、フィブラートにより、DGAT2 の発現が上昇していなくても (Table 2-1)、大量に産生されている 18:1n-9 が基質として供給されるため、TAG 合成が亢進していると考えられた [49, 52, 62]。肝臓外から取り込まれた脂肪酸よりも、TAG の加水分解によって生成した脂肪酸が優先的に酸化されるという以前の報告から判断すると [44]、フィブラートによって産生が亢進した TAG に、活性化した ATGL が加水分解を行うことにより生成した脂肪酸が、優先的に β 酸化で燃焼することが考えられる。また、本章における検討で、フェノフィブラートとベザフィブラート投与によって血清中の TAG が有意に低下したが、クロフィブリン酸に関しては低下傾向にとどまることが明らかとなった (Fig. 2-3)。この事実は、VLDL-TAG 分泌の変動は、フィブラートによる肝臓 TAG 減少の主要な原因とはならないことを示唆している。

ATGL は PPAR $\alpha$  の標的遺伝子であると考えられていること [74]、またフィブラートは PPAR $\alpha$  のアゴニストであることから [94]、フィブラートは PPAR $\alpha$  の活性化を介して肝臓の ATGL の発現を誘導している可能性が強い。しかしながら、PPAR $\alpha$  アゴニストとしての強さ (活性) は、一般的に培養細胞を用いたレポーターアッセイによって評価されるため [94]、*in vivo* でのフィブラートによる PPAR $\alpha$  活性化

能についてはいまだに不明な点が多い。そこで、*in vivo*におけるフィブラートの PPAR $\alpha$  活性化能を、*in vivo*において PPAR $\alpha$  による制御をうけていることが証明されている [18] *Acot1* 遺伝子の発現を指標として調べたところ、ATGL と *Acot1* の mRNA 発現レベルには強い相関関係が認められた (Fig. 2-9 B)。これは、直接的な証拠とはならないが、フィブラートによる ATGL の発現誘導には、PPAR $\alpha$  の活性化が関与している可能性を強く示唆するものである。

ATGL の過剰発現により、TAG の分解が亢進し、生成した FFA がリガンドとして PPAR $\alpha$  を活性化すること [22, 70, 75]、ATGL 欠損によって PPAR $\alpha$  標的遺伝子の発現が低下することから [70]、ATGL は PPAR $\alpha$  を介した脂肪酸シグナリングと、それに続く脂肪酸の動態に関わる遺伝子の調節に深く関与していることが考えられる [77]。細胞質の脂肪滴の表面、あるいはオルガネラ膜に局在している ATGL によって切り出された脂肪酸の細胞内の運搬については [81]、FABP の関与が示唆されている [67]。本章での検討において、フィブラートにより FABP1 の発現が上昇することが確認された (Table 2-1)。この結果は、Kawashima らが示した、クロフィブリン酸投与によりラット肝臓での FABP タンパク質の発現が上昇するという結果と一致するものである [67]。したがって、ATGL によって細胞質の脂肪滴から放出された脂肪酸は、FABP によってミトコンドリアへ運搬されて  $\beta$  酸化を受けるか、同じく FABP によって核へ運搬されるかという 2 つの経路に振り分けられると考えられる。核内に入った脂肪酸は、リガンドとして PPAR $\alpha$  を活性化し、脂肪酸取り込み (FAT/CD36)、脂肪酸運搬 (FABP1)、脂肪酸活性化 (ACSL1、3)、ミトコンドリア  $\beta$  酸化 (CPT1a、MCAD、LCAD)、ペルオキシソーム  $\beta$  酸化 (*Acox1*)、そして、ATGL の発現を誘導する。誘導されたこれらのタンパク質はさらに、脂肪酸の  $\beta$  酸化を亢進させる。このように、ATGL 発現の亢進が FFA を増加させ、この FFA がリガンドとして PPAR $\alpha$  を持続的に活性化することにより、肝実質細胞における 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を拡大し、その結果として肝臓 TAG が減少すると考えられる (Fig. 2-19)。

本章では微量の組織を用いたフィブリン酸の定量法を初めて開発した。本章で用いた抽出方法は非常に簡便であり、肝臓ホモジネートからのフィブリン酸の抽出効率是非常に高かった (Table 2-5)。また、BrMDMC はカルボン酸を修飾する試薬であるため (Fig. 2-11)、これと反応して誘導体化される生体内化合物は多数あると予想されるが、HPLC において適切な分離条件を設定することによりフィブリン酸を選択的に定量することができた (Fig. 2-13、2-14)。この方法での、肝臓における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定量限界は 0.2 nmol/10 mg liver であった (Table 2-3)。これ

まで、肝臓を用いたフィブリン酸定量の定量限界についての報告はない。血清を用いた定量法では、HPLCのUV検出を用いた定量限界値は0.31から22.8 nmol/mL [1, 4, 50, 57, 83, 84]、タンデムMSのHPLCを用いた定量では0.16 nmol/mLであると報告されている [57]。以上のことから、本章で開発した定量法は非常に感度が高く、肝臓および他の組織中で機能するフィブリン酸の定量にはきわめて有用であることが示された。

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ラート（クロフィブリン酸のエステル体）は同じフィブラート系薬物であるが、作用様式に幾分異なる点のあることが知られている [22, 26, 31]。本章における検討においても、TAG低下作用およびATGLとその活性化因子であるCGI-58の発現誘導作用において強さに違いがみられ、フェノフィブラート $\geq$ ベザフィブラート $>$ クロフィブリン酸の順序となったが (Fig. 2-2、2-4、2-5)、これは、以前報告されたレポーターアッセイによるPPAR $\alpha$ 活性化能の順序とは異なるものであった [94]。しかしながら、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肝臓におけるフィブリン酸濃度として評価すると、それぞれの化学構造の違いには関係なく、Acot1遺伝子発現レベル、ATGL遺伝子発現レベルまたはTAG含量との間に強い相関関係が認められた (Fig. 2-10、2-15)。つまり、フィブリン酸1分子としては、ほぼ同じ強さで肝臓におけるPPAR $\alpha$ を活性化し、ATGLの発現を誘導することによって、TAG含量を減少させたと考えられる。一方、フェノフィブラート0.1% (w/w)、ベザフィブラート0.1% (w/w) およびクロフィブリン酸0.3% (w/w) を混合した飼料を摂食させた際には、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肝濃度はほぼ同じであるにもかかわらず (Fig. 2-10 A)、脂質代謝関連遺伝子の発現誘導については、その効果に違いがあるものもいくつかあったことから (Table 2-1)、これらの遺伝子発現に対する各フィブリン酸の作用様式は全く同じということではないのであろう。

非肥満2型糖尿病モデルであるGKラットにベザフィブラートを投与したところ、健常ラットと同じようにATGLおよびAcot1のmRNA発現が上昇し (Table 2-8)、肝臓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 (Fig. 2-17)。CPT1aおよびMCAD遺伝子の発現も上昇したことから (Table 2-8)、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る。また、GKラットのベザフィブラート投与群では、MTP遺伝子発現の上昇がみられたが、血清TAG値は有意に低下していた (Table 2-7)。一方、apoCIIIの発現は顕著に低下していたことから、LPLおよび

HTGL による血中 TAG の分解が亢進し、肝臓へ取り込まれた脂肪酸がさらにポジティブフィードバックループを促進させる可能性も考えられる。以上のことから、ATGL は非アルコール性脂肪肝を改善するための薬物療法のターゲットとなる可能性があり、フィブリン酸はインスリン抵抗性を伴う脂肪肝の治療または予防薬となりうることを、GK ラットを用いて示唆することができた。

### 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

脂肪酸種の生成には、脂肪酸不飽和化酵素と脂肪酸鎖伸長酵素が重要な役割をはたす。モノ不飽和脂肪酸 (monounsaturated fatty acid、MUFA) である 18:1n-9 は Elovl6 にコードされる脂肪酸鎖伸長酵素と主に SCD1 にコードされる  $\Delta 9$  不飽和化酵素である SCD によって合成される。また、SCD は 16:0 からパルミトオレイン酸 (16:1n-7) を合成する [68]。SCD やその生成物である 18:1n-9 および 16:1n-7 は TAG 合成 [64, 68]、ER ストレス [3, 92, 93]、VLDL 分泌 [17, 46]、インスリン感受性 [11, 29] といった生理的プロセスと深く関与することが知られている。特に最近、肝臓の脂肪酸組成は、細胞内のエネルギーバランスやストレスとは無関係にインスリン感受性を制御しているという報告からも [60]、糖尿病モデル動物の肝臓における脂肪酸組成の解明が必要とされている。第1章において、GK ラットでは非肥満であるにもかかわらず、肝臓の脂質代謝が広範に変化していることを明らかにした。この事実から、脂肪酸種の代謝も変化し、結果として脂肪酸の組成が変化していることが予想された。そこで、本章ではレプチンレセプターに変異をもたない非肥満2型糖尿病モデルである GK ラットの、肝臓における脂肪酸プロファイルの特性を明らかにすることを目的とした。

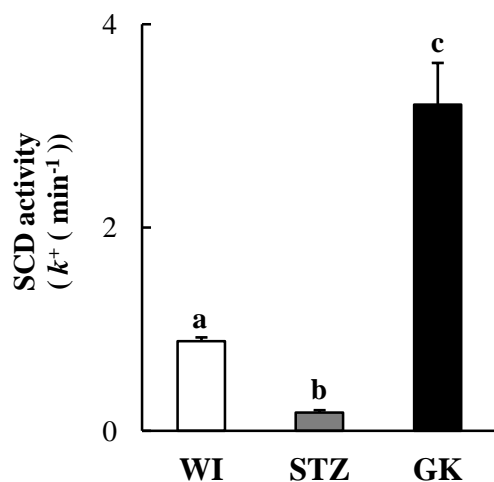
#### 第1節 GK ラットの肝臓脂肪酸プロファイルの解析

第1章において、GK ラットは非肥満であるにもかかわらず、肝臓の脂質代謝に変動がみられることが示された。このことから GK ラットの肝臓では脂肪酸種の代謝も変化している可能性が高い。そこで、本節では GK ラットの肝臓の脂肪酸のプロファイル、およびそのプロファイルを制御している脂肪酸の不飽和化および鎖伸長の役割を、ZF ラットと比較し、解析した。

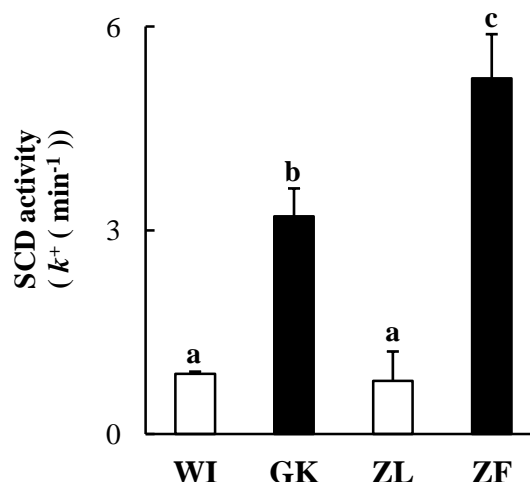
##### 1) GK ラット肝臓の SCD

MUFA 生成に重要な役割を担う SCD 活性について、GK ラットの肝臓で調べた。その際、1型糖尿病モデルである streptozotocin (STZ) 投与ラットにおける活性も比較した。Fig. 3-1 に示すように、GK ラ

ット、WI ラット、および WI ラットに STZ を静注投与したラットの肝臓ミクロソームにおける SCD 活性を測定したところ、STZ ラットの SCD 活性は対照群の 21% まで低下した。一方、GK ラットでは非肥満であるにもかかわらず対照群に比べて 3.6 倍高いことが明らかとなった。次に、GK ラットと、耐糖能異常かつ肥満である ZF ラットの SCD 活性を比較した。Fig. 3-2 に示すように、ZF ラットの SCD 活性は ZL ラットの 6.7 倍であった。また、GK ラットの SCD 活性は ZF ラットの 61% であったが、GK ラットおよび ZF ラットでは、両者とも SCD 活性が対照群に比べて高いことが示された。



**Fig. 3-1** Activities of SCD in hepatic microsomes of STZ, WI and GK rats. Values represent mean  $\pm$  SD (n = 4). <sup>a, b, c</sup> Differences without a common superscript are statistically significant ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3-2** Activities of SCD in hepatic microsomes of GK and ZF rats. Values represent mean  $\pm$  SD (n = 4). <sup>a, b, c</sup> Differences without a common superscript are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

## 2) GK ラットの肝臓における SCD の生理的役割

MUFA の合成経路図を Fig. 3-3 に示す。SCD は 16:0 から 16:1n-7、18:0 から 18:1n-9 への変換を触媒する酵素である。SCD の活性が上昇すると 16:1n-7 および 18:1n-9 が増加することが予想される。そこで、本節 1) で調べた WI、GK、10 週齢 ZL および ZF ラットに加え、異なる条件下にあるラットについても、

肝臓の SCD 活性と SCD によって生成される 18:1n-9 の総脂質中の割合を測定し、GK ラットと比較した (Table 3-1)。耐糖能異常かつ肥満である 16 週齢 ZF ラットは 16 週齢 ZL ラットに比べて、SCD 活性が 5.3 倍高く、肥満 2 型糖尿病である SHR/NDcp ラットでは、対照群である SHR/ND+ ラットに比べ 5.5 倍高かった。また、脂肪酸組成を変化させた食餌を与えた WI ラットのうち、7%魚油摂取群の SCD 活性は、7%サフラワー油および7%シソ油摂取群の、それぞれ 46%および 42%であった。総脂質中の 18:1n-9 の割合については、GK ラットは WI ラットに比べて 1.2 倍高かった。10 週齢 ZF ラットおよび 16 週齢 ZF ラットは、それぞれの対照群に比べて 2.9 倍および 2.5 倍高かった。SHR/NDcp ラットは SHR/ND+ ラットに比べ 2.9 倍高かった。また、7%魚油摂取群は、7%サフラワー油および 7%シソ油摂取群の、それぞれ 61%および 50%であった。次に、これらの 11 群の SCD 活性と 18:1n-9 の割合についての相関関係を調べた。Fig. 3-4 に示すように、GK ラットのみが回帰直線から大きく外れていることが明らかになった。GK ラットを除いた群で作成した回帰直線に、GK ラットの SCD 活性値をあてはめて求めた 18:1n-9 の割合は 17.6%であるのに対し、実際に測定した GK ラットの 18:1n-9 の割合は 8.97 %であった。これは、推定値の 51%の値であった。

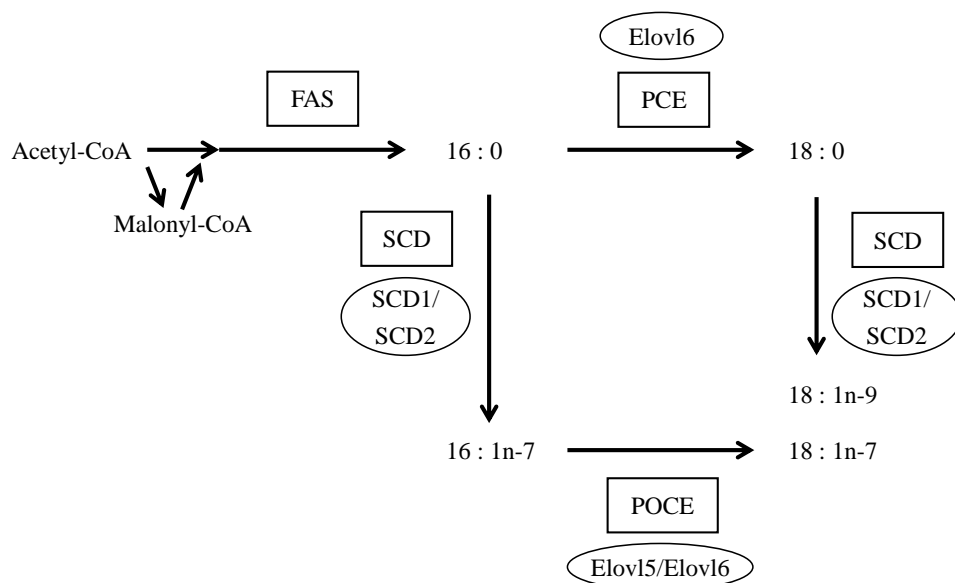
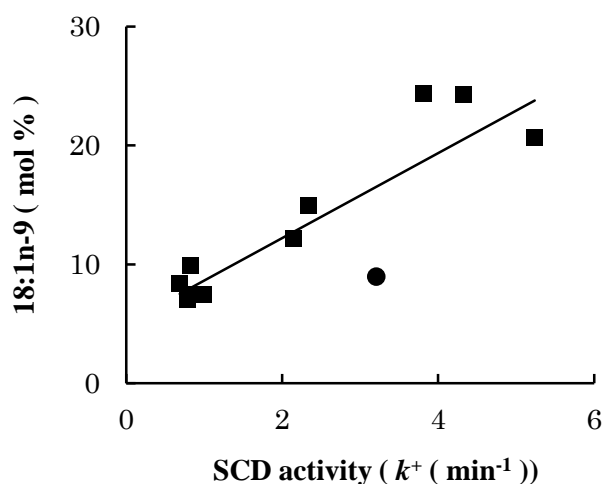


Fig. 3-3 Diagram of enzymes regulating synthesis of 16:1n-7, 18:1n-7 and 18:1n-9



**Table 3-1** Activities of SCD in hepatic microsomes and proportion of 18:1n-9 in the liver

	SCD activity ( $k^+$ ( $\text{min}^{-1}$ ))	18:1n-9 (mol %)
WI	$0.88 \pm 0.03$	$7.47 \pm 0.52$
GK	$3.21 \pm 0.41$	$8.97 \pm 0.68$
ZL aged 10 weeks	$0.78 \pm 0.43$	$7.05 \pm 0.87$
ZF aged 10 weeks	$5.24 \pm 0.65$	$20.71 \pm 2.19$
ZL aged 16 weeks	$0.82 \pm 0.34$	$9.88 \pm 1.54$
ZF aged 16 weeks	$4.33 \pm 1.46$	$24.33 \pm 1.40$
SHR/ND+	$0.69 \pm 0.73$	$8.44 \pm 2.68$
SHR/NDcp	$3.81 \pm 0.27$	$24.37 \pm 0.63$
7 % Safflower oil	$2.14 \pm 0.44$	$12.22 \pm 0.86$
7 % Perilla oil	$2.33 \pm 0.57$	$14.95 \pm 1.22$
7 % Fish oil	$0.98 \pm 0.77$	$7.44 \pm 1.27$



**Fig. 3-4** The relationship between the activities of SCD in hepatic microsomes and proportion of 18:1n-9 in the liver. The proportion of 18:1n-9 in the liver vs. SCD activity,  $Y = 3.8712 X + 5.1632$ ,  $r^2 = 0.8702$ . Regression analysis was performed on ten sets of results, except for the group of GK rats, in Table 3-1. ●, GK rats; ■, other rats.

### 3) モノ不飽和脂肪酸のプロファイリング

GK ラット、ZF ラットおよびそれぞれの対照群の肝臓総脂質中の脂肪酸プロファイルを示す (Table 3-2)。MUFA の割合に注目してみると、対照群である WI ラットと ZL ラットの総脂質における MUFA 組成には、大きな違いはみられなかった。GK ラットのシスバクセン酸 (18:1n-7) は WI ラットに比べて 1.32 倍高かったのに対し、18:1n-9 に大きな違いはみられなかった。GK ラットの 16:1n-7 は、WI ラットに比べて 1.66 倍高かった。ZL ラットに比べて ZF ラットでは、18:1n-9、16:1n-7 および 18:1n-7 がそれぞれ 2.94 倍、4.69 倍および 1.51 倍高かった。次に、肝臓重量あたりの脂肪酸量についてそれぞれ

の対照群との差をみると、18:1n-9についてはZFラットとZLラットの差およびGKラットとWIラットの差は、それぞれ30.82および1.69  $\mu\text{mol/g liver}$ であった。また16:1n-7についてのZFラットとZLラットの差およびGKラットとWIラットの差は、それぞれ10.91および1.03  $\mu\text{mol/g liver}$ 、18:1n-7についてはZFラットとZLラットの差、およびGKラットとWIラットの差は、それぞれ5.30および1.31  $\mu\text{mol/g liver}$ であった (Table 3-2、Fig. 3-5 A)。これらの結果から、総脂質のMUFA組成については、ZFラットでは18:1n-9および16:1n-7が対照群に対して顕著に高いのに対し、GKラットではそれらの差は小さいものであった。一方、18:1n-7に関してはGKラット、ZFラットの間に大きな違いはみられなかった。

肝臓中の脂肪酸のほとんどは、TAG、DAG、PL、CE等にエステル化して存在しており、各脂質クラスの脂肪酸組成には偏りがある。そこで次に、総脂質で認められた差がいずれの脂質クラスの変化によるものであるかを検討するために、GKラットとZFラットの肝臓から抽出した脂質を、TAG、DAG、PL、CEに分離後、脂肪酸の定量をし、脂質プロファイルと比較した。TAGおよびDAGにおけるMUFA組成は、総脂質とほぼ同じ傾向の変化を示した。すなわち、脂肪酸の割合については、GKラットの18:1n-7はWIラットに比べてTAG、DAGでそれぞれ1.33倍および1.65倍高かったのに対し、18:1n-9には大きな違いはみられなかった。GKラットの16:1n-7は、WIラットに比べて、TAGで1.50倍、DAGで1.67倍高かった。ZFラットでは、ZLラットに比べて、TAGで18:1n-9、16:1n-7および18:1n-7がそれぞれ1.67倍、4.10倍および1.80倍、DAGでは18:1n-9、16:1n-7および18:1n-7がそれぞれ1.81倍、3.83倍および1.11倍高かった (Table 3-3、3-4)。TAGおよびDAGの肝臓重量あたりの脂肪酸量についても総脂質の結果を反映しており、ZFラットでは18:1n-9および16:1n-7が対照群に対して顕著に高いのに対し、GKラットと対照群との比較においてはそれらの差は小さかった。18:1n-7に関しては、GKラットとZFラットの間に大きな違いはみられなかった (Fig. 3-5 B, C)。PLにおけるMUFA組成については、GKラットの16:1n-7および18:1n-7の割合はそれぞれWIラットに比べて1.35倍および1.22倍高かったのに対し、18:1n-9は15%減少していた。ZFラットでは、ZLラットに比べて、18:1n-9、16:1n-7および18:1n-7がそれぞれ1.47倍、3.43倍および1.03倍高かった (Table 3-5)。肝臓重量あたりの脂肪酸量についてはGKラット、ZFラットともに対照群と大きな差はみられなかった (Fig. 3-5 D)。CEにおけるMUFA組成については、GKラットおよびZFラットはそれぞれの対照群と比べて大きな差はみられず、また、肝臓重量あたりの脂肪酸量も少ないため、CEのMUFAによる総脂質の脂肪酸プロファイルへの影響は小さいと考えられた (Table 3-6)。

**Table 3-2** Fatty acid profile of hepatic lipid of GK and ZF rats

	WI	GK	ZL	ZF
	( mol % )			
16:0	25.47 ± 1.26	26.30 ± 2.09	28.87 ± 5.92	32.07 ± 2.67
16:1n-7	1.63 ± 0.23 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.61 <sup>a</sup>	6.70 ± 1.12 <sup>b</sup>
18:0	16.70 ± 0.59 <sup>a</sup>	16.25 ± 1.57 <sup>a</sup>	17.52 ± 1.93 <sup>a</sup>	10.96 ± 2.56 <sup>b</sup>
18:1n-9	7.47 ± 0.52 <sup>a</sup>	8.97 ± 0.68 <sup>a</sup>	7.05 ± 0.87 <sup>a</sup>	20.71 ± 2.19 <sup>b</sup>
18:1n-7	4.01 ± 0.30 <sup>ac</sup>	5.28 ± 0.20 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.66 ± 0.92 <sup>bc</sup>
18:2n-6	21.62 ± 0.74 <sup>a</sup>	17.29 ± 1.67 <sup>b</sup>	23.22 ± 0.68 <sup>a</sup>	14.05 ± 1.68 <sup>c</sup>
18:3n-3	0.46 ± 0.03	0.42 ± 0.08	0.36 ± 0.05	0.35 ± 0.07
20:3n-9	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.05	0.12 ± 0.11
20:3n-6	1.24 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.11 <sup>ac</sup>	0.75 ± 0.17 <sup>bc</sup>	1.34 ± 0.30 <sup>a</sup>
20:4n-6	14.47 ± 0.72 <sup>a</sup>	15.61 ± 1.02 <sup>a</sup>	12.87 ± 2.84 <sup>a</sup>	5.11 ± 1.24 <sup>b</sup>
20:5n-3	1.13 ± 0.10	0.97 ± 0.12	0.96 ± 0.33	0.81 ± 0.18
22:5n-3	1.62 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.27 <sup>ac</sup>	1.13 ± 0.53 <sup>ac</sup>	0.83 ± 0.18 <sup>bc</sup>
22:6n-3	4.14 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.75 ± 0.32 <sup>ac</sup>	2.68 ± 1.25 <sup>ac</sup>	2.30 ± 0.77 <sup>bc</sup>
Total	99.99 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01
	( μmol / g liver )			
16:0	22.34 ± 2.20 <sup>a</sup>	23.87 ± 1.82 <sup>a</sup>	29.58 ± 11.00 <sup>a</sup>	58.46 ± 19.47 <sup>b</sup>
16:1n-7	1.43 ± 0.23 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.25 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.88 <sup>a</sup>	12.41 ± 5.11 <sup>b</sup>
18:0	14.64 ± 1.14 <sup>a</sup>	14.71 ± 0.41 <sup>a</sup>	17.24 ± 1.49 <sup>ab</sup>	18.93 ± 1.52 <sup>b</sup>
18:1n-9	6.54 ± 0.39 <sup>a</sup>	8.23 ± 1.50 <sup>a</sup>	7.13 ± 2.03 <sup>a</sup>	37.95 ± 13.48 <sup>b</sup>
18:1n-7	3.50 ± 0.23 <sup>a</sup>	4.81 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.12 ± 0.86 <sup>a</sup>	8.42 ± 2.50 <sup>b</sup>
18:2n-6	18.91 ± 0.42 <sup>ab</sup>	15.91 ± 3.32 <sup>a</sup>	23.12 ± 3.87 <sup>ab</sup>	24.99 ± 5.24 <sup>b</sup>
18:3n-3	0.40 ± 0.04	0.39 ± 0.11	0.35 ± 0.07	0.64 ± 0.22
20:3n-9	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.11 ± 0.07	0.19 ± 0.13
20:3n-6	1.09 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.73 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.31 ± 0.13 <sup>c</sup>
20:4n-6	12.66 ± 0.69 <sup>a</sup>	14.29 ± 2.22 <sup>a</sup>	12.47 ± 0.56 <sup>a</sup>	8.77 ± 0.36 <sup>b</sup>
20:5n-3	0.99 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.89 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.23 <sup>b</sup>
22:5n-3	1.42 ± 0.16	1.35 ± 0.40	1.06 ± 0.34	1.43 ± 0.16
22:6n-3	3.63 ± 0.24 <sup>ab</sup>	3.45 ± 0.66 <sup>ab</sup>	2.51 ± 0.78 <sup>a</sup>	3.88 ± 0.53 <sup>b</sup>
Total	87.58 ± 4.58 <sup>a</sup>	91.27 ± 10.84 <sup>a</sup>	99.82 ± 18.07 <sup>a</sup>	179.78 ± 44.97 <sup>b</sup>

Values represent mean ± SD (n=4). Differences in horizontal means without a common superscript (a, b, c) are significant ( $p < 0.05$ ). If no superscript appears, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

**Table 3-3** Fatty acid profile of hepatic TAG of GK and ZF rats

	WI	GK	ZL	ZF
	( mol % )			
16:0	29.27 ± 1.86 <sup>ab</sup>	30.62 ± 0.76 <sup>a</sup>	27.78 ± 1.08 <sup>b</sup>	37.89 ± 1.90 <sup>c</sup>
16:1n-7	2.87 ± 0.48 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.46 <sup>b</sup>	2.25 ± 0.43 <sup>a</sup>	9.22 ± 0.69 <sup>c</sup>
18:0	9.25 ± 1.44 <sup>a</sup>	7.81 ± 1.10 <sup>a</sup>	4.91 ± 0.77 <sup>b</sup>	2.67 ± 0.63 <sup>c</sup>
18:1n-9	15.44 ± 1.40 <sup>a</sup>	16.06 ± 0.64 <sup>a</sup>	18.44 ± 1.00 <sup>b</sup>	30.85 ± 1.20 <sup>c</sup>
18:1n-7	3.90 ± 0.33 <sup>a</sup>	5.18 ± 0.43 <sup>b</sup>	3.08 ± 0.36 <sup>a</sup>	5.55 ± 0.93 <sup>b</sup>
18:2n-6	26.13 ± 2.02 <sup>a</sup>	21.96 ± 1.71 <sup>b</sup>	30.03 ± 1.62 <sup>c</sup>	10.49 ± 1.54 <sup>d</sup>
18:3n-3	1.03 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.05 <sup>ac</sup>	1.34 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.15 <sup>c</sup>
20:3n-9	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.09 <sup>a</sup>
20:3n-6	0.52 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>c</sup>
20:4n-6	4.60 ± 0.69 <sup>a</sup>	5.56 ± 0.44 <sup>b</sup>	2.20 ± 0.32 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.05 <sup>d</sup>
20:5n-3	1.35 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.19 <sup>ab</sup>	1.70 ± 0.26 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.07 <sup>c</sup>
22:5n-3	1.99 ± 0.35 <sup>a</sup>	2.07 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.77 ± 0.28 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.14 <sup>c</sup>
22:6n-3	3.40 ± 0.66 <sup>a</sup>	3.41 ± 0.28 <sup>a</sup>	4.74 ± 0.32 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.26 <sup>c</sup>
Total	99.99 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01
	( μmol / g liver )			
16:0	8.05 ± 1.08 <sup>a</sup>	12.41 ± 1.65 <sup>a</sup>	5.02 ± 0.97 <sup>a</sup>	39.25 ± 13.45 <sup>b</sup>
16:1n-7	0.79 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.14 <sup>a</sup>	9.61 ± 3.47 <sup>b</sup>
18:0	2.58 ± 0.67 <sup>a</sup>	3.14 ± 0.36 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.08 <sup>b</sup>	2.71 ± 0.93 <sup>a</sup>
18:1n-9	4.22 ± 0.39 <sup>a</sup>	6.51 ± 0.83 <sup>a</sup>	3.35 ± 0.72 <sup>a</sup>	31.76 ± 9.83 <sup>b</sup>
18:1n-7	1.07 ± 0.14 <sup>ab</sup>	2.09 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.15 <sup>b</sup>	5.70 ± 1.66 <sup>c</sup>
18:2n-6	7.16 ± 0.83 <sup>ab</sup>	8.97 ± 1.76 <sup>ac</sup>	5.40 ± 0.84 <sup>b</sup>	10.72 ± 2.99 <sup>c</sup>
18:3n-3	0.28 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.22 <sup>b</sup>
20:3n-9	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.10 <sup>b</sup>
20:3n-6	0.14 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>a</sup>
20:4n-6	1.28 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.34 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.35 ± 0.08 <sup>c</sup>
20:5n-3	0.37 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.13 <sup>a</sup>
22:5n-3	0.54 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.18 <sup>ab</sup>
22:6n-3	0.93 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.29 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.34 <sup>ab</sup>
Total	27.48 ± 3.20 <sup>a</sup>	40.59 ± 5.60 <sup>a</sup>	18.02 ± 3.08 <sup>a</sup>	103.14 ± 31.81 <sup>b</sup>

Values represent mean ± SD (n=4). Differences in horizontal means without a common superscript (a, b, c) are significant ( $p < 0.05$ ). If no superscript appears, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

**Table 3-4** Fatty acid profile of hepatic DAG of GK and ZF rats

	WI	GK	ZL	ZF
	( mol % )			
16:0	25.83 ± 1.67 <sup>a</sup>	25.30 ± 2.26 <sup>a</sup>	19.98 ± 2.77 <sup>b</sup>	27.42 ± 2.60 <sup>a</sup>
16:1n-7	2.25 ± 0.87 <sup>a</sup>	3.75 ± 0.60 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.35 <sup>a</sup>	5.90 ± 0.50 <sup>c</sup>
18:0	18.67 ± 1.51 <sup>a</sup>	14.82 ± 1.09 <sup>b</sup>	12.37 ± 1.31 <sup>c</sup>	11.91 ± 0.75 <sup>c</sup>
18:1n-9	12.01 ± 1.13 <sup>ab</sup>	13.88 ± 1.10 <sup>a</sup>	10.19 ± 0.86 <sup>b</sup>	18.44 ± 1.47 <sup>c</sup>
18:1n-7	3.58 ± 0.22 <sup>a</sup>	5.90 ± 0.50 <sup>b</sup>	5.03 ± 0.41 <sup>b</sup>	5.60 ± 0.69 <sup>b</sup>
18:2n-6	26.28 ± 1.09 <sup>a</sup>	24.45 ± 1.55 <sup>ac</sup>	37.32 ± 2.31 <sup>b</sup>	21.21 ± 2.14 <sup>c</sup>
18:3n-3	0.65 ± 0.53	0.56 ± 0.43	1.15 ± 0.60	1.07 ± 1.18
20:3n-9	3.54 ± 1.72	2.43 ± 2.12	3.43 ± 0.59	2.54 ± 1.62
20:3n-6	0.60 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.26 <sup>b</sup>
20:4n-6	4.05 ± 0.73 <sup>a</sup>	6.58 ± 0.79 <sup>b</sup>	5.83 ± 0.97 <sup>b</sup>	2.65 ± 0.57 <sup>a</sup>
20:5n-3	0.76 ± 0.11	0.34 ± 0.17	0.53 ± 0.26	0.80 ± 0.63
22:5n-3	0.73 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.18 <sup>b</sup>
22:6n-3	1.06 ± 0.34	1.38 ± 0.20	1.03 ± 0.63	0.93 ± 0.49
Total	100.01 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.01 ± 0.01
	( nmol / g liver )			
16:0	213.43 ± 12.12 <sup>ab</sup>	273.05 ± 32.22 <sup>ac</sup>	141.33 ± 31.30 <sup>b</sup>	335.11 ± 75.89 <sup>c</sup>
16:1n-7	18.45 ± 7.04 <sup>ab</sup>	40.63 ± 8.80 <sup>a</sup>	11.06 ± 4.07 <sup>b</sup>	72.14 ± 15.83 <sup>c</sup>
18:0	154.18 ± 9.33 <sup>a</sup>	159.78 ± 13.10 <sup>a</sup>	86.68 ± 11.93 <sup>b</sup>	146.14 ± 32.55 <sup>a</sup>
18:1n-9	100.09 ± 17.70 <sup>ab</sup>	151.96 ± 34.00 <sup>a</sup>	72.57 ± 17.10 <sup>b</sup>	227.18 ± 56.91 <sup>c</sup>
18:1n-7	29.74 ± 3.47 <sup>a</sup>	64.62 ± 15.12 <sup>b</sup>	35.65 ± 7.29 <sup>a</sup>	67.36 ± 8.93 <sup>b</sup>
18:2n-6	218.47 ± 28.70	267.40 ± 57.72	262.67 ± 41.50	255.46 ± 29.22
18:3n-3	5.39 ± 4.40	6.06 ± 4.39	8.65 ± 5.73	14.32 ± 16.00
20:3n-9	30.17 ± 16.52	24.97 ± 19.20	23.86 ± 3.10	31.76 ± 23.03
20:3n-6	4.97 ± 0.37 <sup>a</sup>	7.00 ± 5.09 <sup>a</sup>	5.52 ± 1.70 <sup>a</sup>	16.63 ± 2.22 <sup>b</sup>
20:4n-6	33.32 ± 4.14 <sup>a</sup>	71.25 ± 11.48 <sup>b</sup>	41.62 ± 12.10 <sup>a</sup>	31.76 ± 6.12 <sup>a</sup>
20:5n-3	6.32 ± 1.32	3.87 ± 2.53	3.59 ± 1.68	10.06 ± 9.02
22:5n-3	5.98 ± 1.79 <sup>ab</sup>	7.51 ± 3.86 <sup>a</sup>	5.03 ± 2.38 <sup>ab</sup>	2.12 ± 1.99 <sup>b</sup>
22:6n-3	6.86 ± 5.09	14.75 ± 0.87	7.12 ± 4.81	11.15 ± 5.92
Total	827.36 ± 76.73 <sup>ab</sup>	1086.37 ± 167.42 <sup>ac</sup>	706.56 ± 121.58 <sup>b</sup>	1220.88 ± 226.68 <sup>c</sup>

Values represent mean ± SD (n=4). Differences in horizontal means without a common superscript (a, b, c) are significant ( $p < 0.05$ ). If no superscript appears, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

**Table 3-5** Fatty acid profile of hepatic PL of GK and ZF rats

	WI	GK	ZL	ZF
	( mol % )			
16:0	21.24 ± 0.75 <sup>a</sup>	19.49 ± 0.70 <sup>b</sup>	20.71 ± 0.95 <sup>ab</sup>	20.32 ± 0.89 <sup>ab</sup>
16:1n-7	0.85 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.30 ± 0.21 <sup>c</sup>
18:0	21.17 ± 0.58 <sup>a</sup>	21.89 ± 0.26 <sup>a</sup>	22.14 ± 0.73 <sup>a</sup>	24.59 ± 1.47 <sup>b</sup>
18:1n-9	3.47 ± 0.22 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.20 <sup>b</sup>	3.62 ± 0.17 <sup>a</sup>	5.31 ± 0.32 <sup>c</sup>
18:1n-7	4.10 ± 0.36 <sup>a</sup>	5.00 ± 0.19 <sup>b</sup>	3.17 ± 0.44 <sup>c</sup>	3.26 ± 0.68 <sup>c</sup>
18:2n-6	18.34 ± 0.82 <sup>a</sup>	11.96 ± 0.52 <sup>b</sup>	20.24 ± 0.98 <sup>c</sup>	19.43 ± 1.18 <sup>ac</sup>
18:3n-3	0.21 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>b</sup>
20:3n-9	0.15 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.06 <sup>b</sup>
20:3n-6	1.34 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.29 ± 0.21 <sup>b</sup>
20:4n-6	21.40 ± 1.03 <sup>a</sup>	27.47 ± 1.30 <sup>b</sup>	21.21 ± 0.99 <sup>a</sup>	13.51 ± 0.40 <sup>c</sup>
20:5n-3	1.16 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.01 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.48 ± 0.25 <sup>c</sup>
22:5n-3	1.30 ± 0.14 <sup>ab</sup>	1.53 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.18 <sup>b</sup>
22:6n-3	5.29 ± 0.43 <sup>a</sup>	6.43 ± 0.32 <sup>b</sup>	4.40 ± 0.49 <sup>a</sup>	4.97 ± 0.84 <sup>a</sup>
Total	100.01 ± 0.01	100.01 ± 0.02	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01
	( μmol / g liver )			
16:0	11.60 ± 0.69 <sup>a</sup>	9.63 ± 0.29 <sup>b</sup>	13.04 ± 0.59 <sup>c</sup>	12.30 ± 0.60 <sup>ac</sup>
16:1n-7	0.46 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.10 <sup>b</sup>
18:0	11.55 ± 0.33 <sup>a</sup>	10.82 ± 0.37 <sup>a</sup>	13.95 ± 0.79 <sup>bc</sup>	14.91 ± 1.20 <sup>c</sup>
18:1n-9	1.89 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.12 <sup>b</sup>	2.28 ± 0.14 <sup>c</sup>	3.22 ± 0.22 <sup>d</sup>
18:1n-7	2.24 ± 0.26	2.47 ± 0.07	2.01 ± 0.35	1.97 ± 0.39
18:2n-6	10.02 ± 0.79 <sup>a</sup>	5.91 ± 0.29 <sup>b</sup>	12.74 ± 0.51 <sup>c</sup>	11.76 ± 0.67 <sup>c</sup>
18:3n-3	0.12 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>ab</sup>
20:3n-9	0.08 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.04 <sup>b</sup>
20:3n-6	0.73 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.16 <sup>b</sup>
20:4n-6	11.66 ± 0.30 <sup>a</sup>	13.57 ± 0.77 <sup>b</sup>	13.39 ± 1.20 <sup>b</sup>	8.19 ± 0.46 <sup>c</sup>
20:5n-3	0.64 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.15 <sup>c</sup>
22:5n-3	0.71 ± 0.09	0.76 ± 0.05	0.75 ± 0.07	0.67 ± 0.12
22:6n-3	2.88 ± 0.25	3.18 ± 0.19	2.78 ± 0.39	3.02 ± 0.57
Total	54.58 ± 2.08 <sup>a</sup>	49.41 ± 1.20 <sup>b</sup>	63.02 ± 3.00 <sup>c</sup>	60.58 ± 2.20 <sup>c</sup>

Values represent mean ± SD (n=4). Differences in horizontal means without a common superscript (a, b, c) are significant ( $p < 0.05$ ). If no superscript appears, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

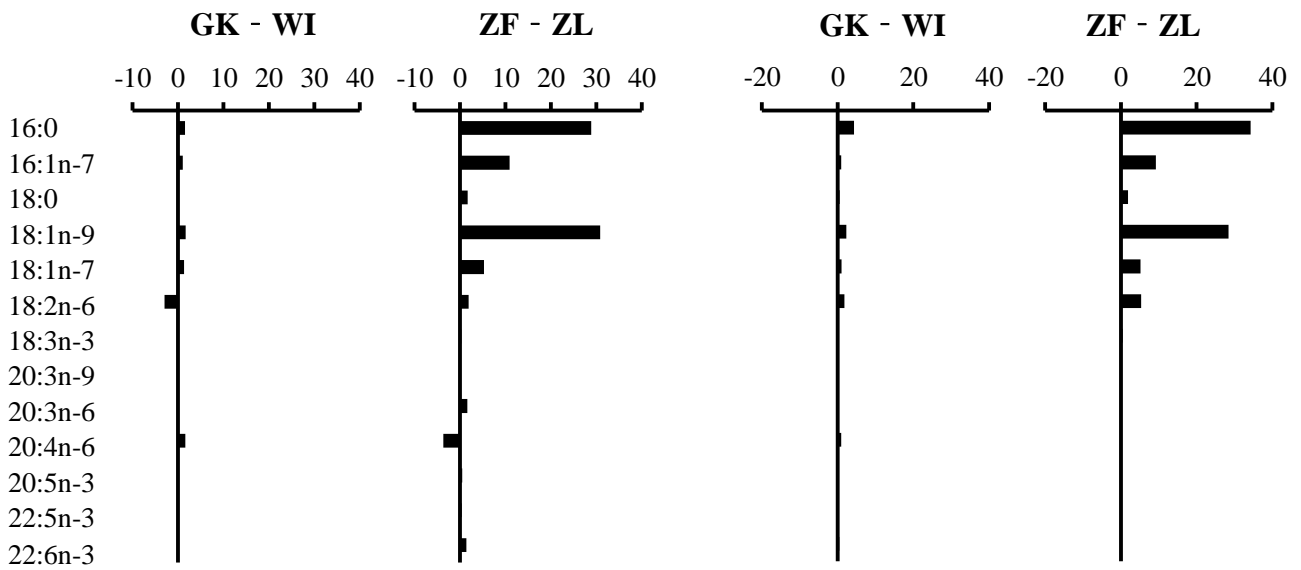
**Table 3-6** Fatty acid profile of hepatic CE of GK and ZF rats

	WI	GK	ZL	ZF
	( mol % )			
16:0	26.04 ± 3.21 <sup>a</sup>	25.02 ± 2.48 <sup>a</sup>	43.16 ± 5.30 <sup>b</sup>	37.55 ± 7.16 <sup>b</sup>
16:1n-7	4.82 ± 0.76 <sup>a</sup>	6.23 ± 0.48 <sup>ac</sup>	2.42 ± 0.63 <sup>b</sup>	7.13 ± 2.14 <sup>c</sup>
18:0	11.76 ± 2.79	12.63 ± 2.62	11.34 ± 2.03	10.28 ± 1.75
18:1n-9	20.28 ± 5.16	16.42 ± 3.36	14.84 ± 3.15	15.63 ± 2.84
18:1n-7	2.80 ± 0.56	2.77 ± 0.35	2.11 ± 0.28	2.55 ± 0.80
18:2n-6	17.08 ± 1.97 <sup>a</sup>	13.04 ± 1.02 <sup>b</sup>	14.76 ± 2.25 <sup>ab</sup>	8.99 ± 0.93 <sup>c</sup>
18:3n-3	2.46 ± 0.66 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.43 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.47 <sup>b</sup>
20:3n-9	8.41 ± 2.33 <sup>ac</sup>	8.71 ± 2.44 <sup>a</sup>	2.91 ± 0.51 <sup>b</sup>	4.86 ± 2.62 <sup>bc</sup>
20:3n-6	0.04 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.06 <sup>c</sup>
20:4n-6	5.10 ± 0.85 <sup>a</sup>	9.37 ± 1.78 <sup>b</sup>	5.76 ± 1.11 <sup>a</sup>	6.28 ± 2.94 <sup>ab</sup>
20:5n-3	0.97 ± 0.27	2.86 ± 3.72	1.77 ± 0.35	2.12 ± 0.81
22:5n-3	0.05 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.22 <sup>c</sup>
22:6n-3	0.20 ± 0.28	0.40 ± 0.12	0.65 ± 0.35	4.14 ± 4.55
Total	99.99 ± 0.01	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.01
	( nmol / g liver )			
16:0	364.40 ± 81.30 <sup>a</sup>	293.38 ± 33.77 <sup>a</sup>	695.74 ± 117.60 <sup>b</sup>	997.19 ± 314.15 <sup>b</sup>
16:1n-7	67.67 ± 17.84 <sup>a</sup>	73.30 ± 10.32 <sup>a</sup>	40.70 ± 17.09 <sup>a</sup>	200.91 ± 105.17 <sup>b</sup>
18:0	165.82 ± 57.99 <sup>a</sup>	147.94 ± 29.02 <sup>a</sup>	180.11 ± 17.70 <sup>a</sup>	266.52 ± 47.50 <sup>b</sup>
18:1n-9	297.75 ± 141.13 <sup>ab</sup>	192.79 ± 39.32 <sup>a</sup>	245.90 ± 82.17 <sup>ab</sup>	427.61 ± 175.29 <sup>b</sup>
18:1n-7	39.68 ± 12.72 <sup>ab</sup>	32.55 ± 4.64 <sup>a</sup>	34.67 ± 9.61 <sup>a</sup>	72.32 ± 38.91 <sup>b</sup>
18:2n-6	242.91 ± 68.54	154.28 ± 26.12	243.70 ± 71.11	243.72 ± 77.62
18:3n-3	36.05 ± 15.20 <sup>a</sup>	30.62 ± 10.06 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	8.70 ± 12.17 <sup>b</sup>
20:3n-9	119.73 ± 47.50 <sup>a</sup>	105.25 ± 42.03 <sup>ab</sup>	47.30 ± 11.95 <sup>b</sup>	117.70 ± 41.16 <sup>a</sup>
20:3n-6	0.58 ± 0.67 <sup>ab</sup>	0.24 ± 0.38 <sup>a</sup>	2.68 ± 0.74 <sup>b</sup>	9.11 ± 2.53 <sup>c</sup>
20:4n-6	71.66 ± 19.52 <sup>a</sup>	110.98 ± 25.94 <sup>ab</sup>	94.24 ± 27.60 <sup>ab</sup>	166.52 ± 73.72 <sup>b</sup>
20:5n-3	13.93 ± 6.32	38.07 ± 56.64	28.91 ± 7.95	59.28 ± 36.71
22:5n-3	0.45 ± 1.10 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	12.04 ± 2.95 <sup>b</sup>	11.43 ± 5.08 <sup>b</sup>
22:6n-3	3.18 ± 5.14 <sup>a</sup>	4.54 ± 1.27 <sup>a</sup>	10.87 ± 6.67 <sup>a</sup>	109.50 ± 107.67 <sup>b</sup>
Total	1423.80 ± 374.98 <sup>a</sup>	1183.94 ± 191.73 <sup>a</sup>	1627.63 ± 304.32 <sup>a</sup>	2675.01 ± 712.29 <sup>b</sup>

Values represent mean ± SD (n=4). Differences in horizontal means without a common superscript (a, b, c) are significant ( $p < 0.05$ ). If no superscript appears, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

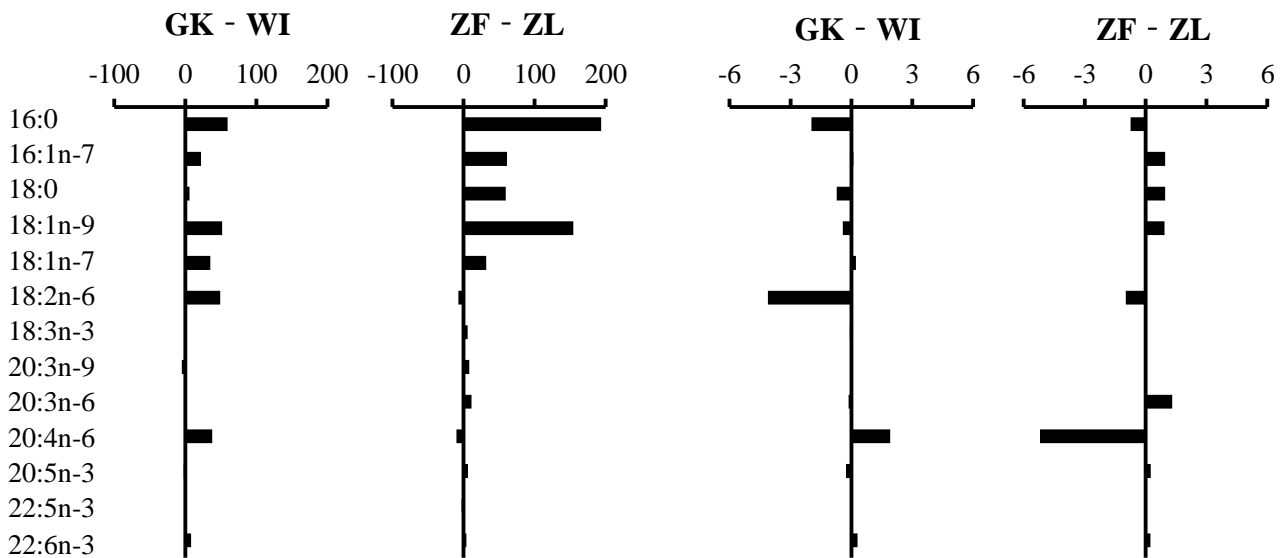
(A) Total lipid ( $\mu\text{mol} / \text{g liver}$ )

(B) TAG ( $\mu\text{mol} / \text{g liver}$ )



(C) DAG (nmol / g liver)

(D) PL ( $\mu\text{mol} / \text{g liver}$ )

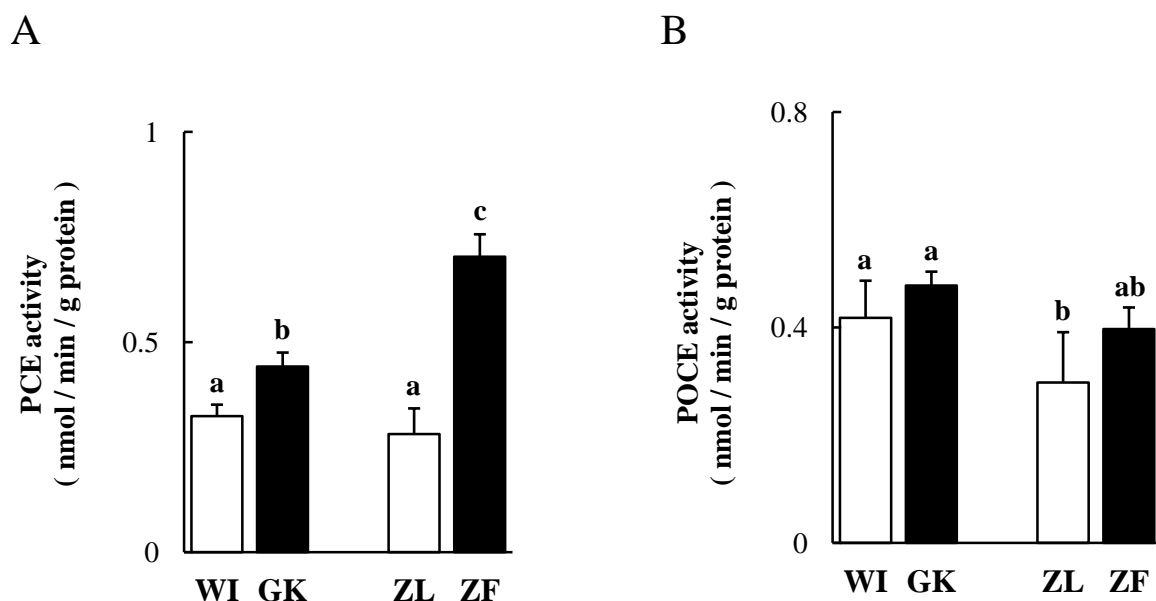


**Fig. 3-5** Differences in content of fatty acids in hepatic lipids between GK and WI rats and between ZF and ZL rats. A: Total lipid ( $\mu\text{mol} / \text{g liver}$ ), B: TAG ( $\mu\text{mol} / \text{g liver}$ ), C: DAG (nmol/g liver), D: PL ( $\mu\text{mol} / \text{g liver}$ ). With regard to each fatty acid, differences in content between the means of WI and GK rats and between the means of ZL and ZF rats were calculated from the data in Table 3-3 (A), 3-4 (B), 3-5 (C), 3-6 (D).



#### 4) 脂肪酸鎖伸長反応

Fig. 3-3 に示すように、MUFA の中でも 18:1n-9 と 18:1n-7 の合成には、SCD に加えて脂肪酸鎖伸長酵素である palmitoyl-CoA chain elongase (PCE) または palmitoleoyl-CoA chain elongase (POCE) が必要である。そこで、PCE および POCE の活性を、肝臓ミクロソームを用いて測定した。パルミトイル-CoA を基質に用いて PCE 活性を測定したところ、Fig. 3-6 A に示すように、GK ラットは WI ラットに比べて 1.36 倍有意に高かった。一方、ZF ラットの PCE 活性は ZL ラットに比べ、2.50 倍と顕著に高かった。WI ラットと ZL ラットの活性には差異は認められなかったが、GK ラットは ZF ラットに比べ 37% 活性が低かった。また、パルミトオレオイル-CoA を基質に用いて POCE 活性を測定したところ、4 群間に大きな違いはみられなかった (Fig. 3-6 B)。



**Fig. 3-6** Activities of PCE (A) and POCE (B) in hepatic microsomes of GK and ZF rats. Values represent mean  $\pm$  SD (n = 4). <sup>a, b, c</sup> Differences without a common superscript are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

## 5) MUFA 代謝にかかわる酵素の遺伝子の発現

GK ラット、ZF ラットおよびそれぞれの対照群の、MUFA 組成を制御する酵素の遺伝子の発現についてリアルタイム PCR を用いて測定した (Fig. 3-7)。まず、SCD をコードする遺伝子である SCD1 の mRNA レベルは、GK ラットおよび ZF ラットでそれぞれの対照群の 1.92 倍および 8.89 倍と有意に高かった。ZF ラットは GK ラットの 1.69 倍高かった。SCD をコードするもう一つの遺伝子である SCD2 の mRNA レベルについては、4 群間で大きな差異はみられなかった。脂肪酸鎖伸長酵素をコードする遺伝子は fatty acid elongase (Elovl) と命名され、ラットの PCE と POCE には Elovl6 および Elovl5 遺伝子の発現が関与している (Fig. 3-3)。ZF ラットにおける Elovl6 の mRNA 発現が ZL ラットに比べて 29.3 倍と顕著に高いのに対し、GK ラットでは WI ラットとほぼ同じであった。GK ラットの Elovl6 は ZF ラットのわずか 5.6% しか発現していなかった。Elovl5 の発現については、GK ラットは WI ラットに比べ 1.58 倍有意に高いが、ZF ラットでは対照群との間に差はみられなかった。GK ラットの Elovl5 は ZF ラットの 2.1 倍高く発現していた。

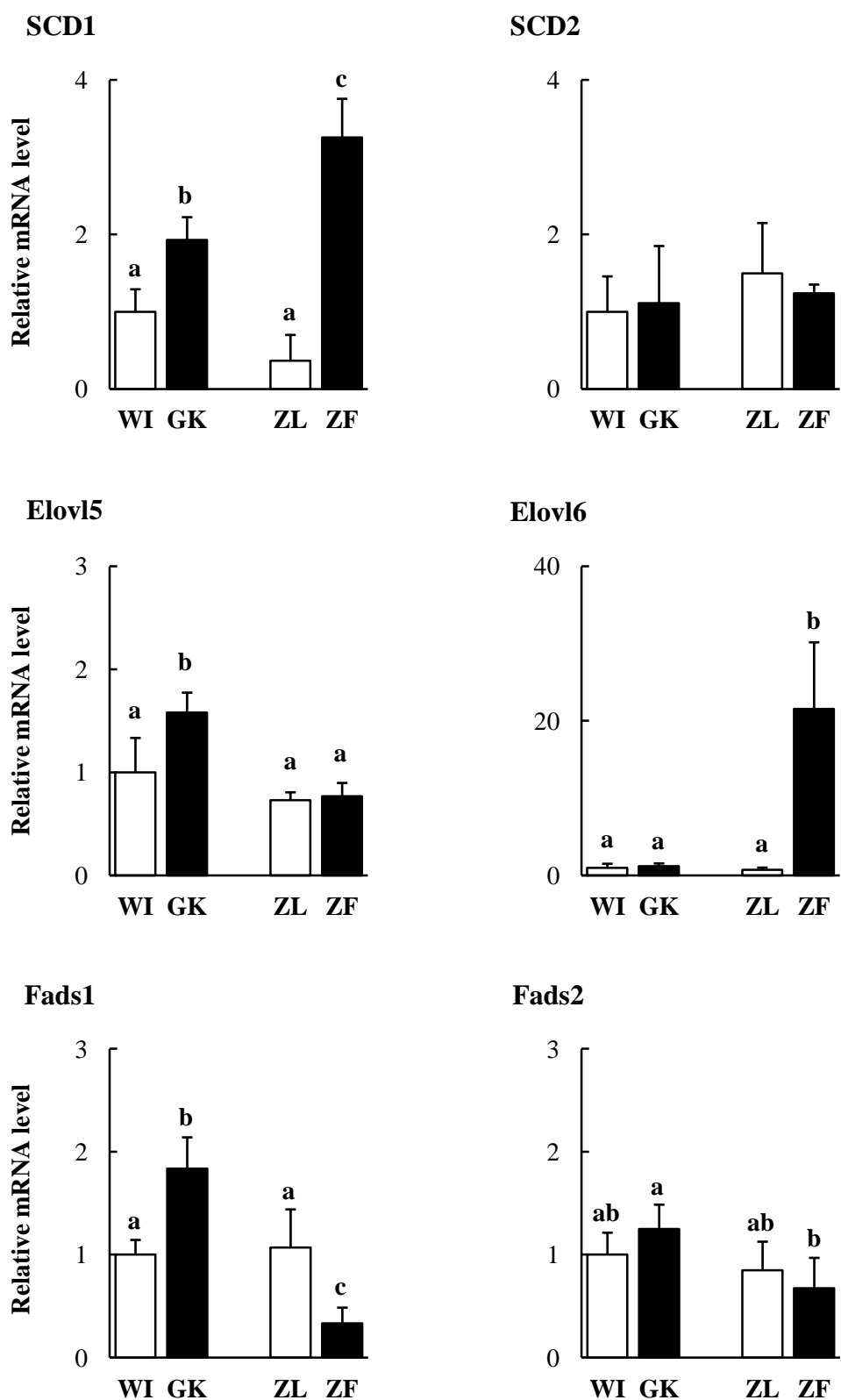
## 6) 多価不飽和脂肪酸のプロファイリング

Table 3-2 に示した脂肪酸組成において、多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid、PUFA) についてみると、ZF ラットでは対照群と比較して PUFA 組成が大きく異なっていた。ZF ラットのアラキドン酸 (20:4n-6) およびリノール酸 (18:2n-6) は、ZL ラットのそれぞれ 40% および 61% に減少していたが、8, 11, 14-エイコサトリエン酸 (20:3n-6) は 1.79 倍高かった。肝臓重量あたりの脂肪酸量で示すと、ZF ラットと ZL ラットの 18:2n-6 には違いはみられなかった (23.1 および 25.0  $\mu\text{mol/g liver}$ ) が、ZF ラットの 20:4n-6 は ZL ラットに比べて 30% 減少し、20:3n-6 は 3.16 倍高かった (Table 3-2、Fig. 3-5 A)。一方、GK ラットと WI ラットについては、GK ラットの 18:2n-6 の割合は WI ラットの 80% であったが、20:4n-6 と 20:3n-6 については大きな違いはみられなかった (Table 3-2)。PL の PUFA 組成については、ZF ラットの 20:4n-6 は ZL ラットに比べて、割合および肝臓重量あたりの含量ともに、ZL ラットの 60% 程度まで低下していた。GK ラットの 20:4n-6 は、割合および肝臓重量あたりの含量ともに WI ラットに比べて有意に高かった。一方、18:2n-6 については、ZF ラットと ZL ラットの間には差がみられなかったが、

GK ラットと WI ラットの間に変動がみられた。GK ラットでは、18:2n-6 の割合および肝臓重量あたりの含量ともに、WI ラットの 60%程度まで低下していた (Table 3-5、Fig. 3-5 D)。TAG、DAG および CE 中の PUFA 含量は著しく低いことを考えると、総脂質でみられた PUFA の組成の変化は、主に PL における変化によるものだと考えられた (Fig. 3-5)。そこで、PUFA 合成に関連する脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子発現について調べたところ、fatty acid desaturase 1 (Fads1) の mRNA レベルは、GK ラットで WI ラットの 1.84 倍高いのに対し、ZF ラットでは ZL ラットの 31%しかなく、GK ラットの 18%と著しく低いレベルであった。Fads2 については、ZF ラットの mRNA レベルは ZL ラットの 79%および GK ラットの 54%であったが、Fads1 に比べ、4 群間で大きな違いはみられなかった (Fig. 3-7)。

## 7) 小括

本節における検討によって、GK ラットは非肥満であるにもかかわらず肝臓の SCD 活性が高いこと、SCD の生成物である 18:1n-9 の肝臓の総脂質に占める割合は、SCD 活性から推定される値に比して著しく少ないことが判明した。また、GK ラットの肝臓では、SCD1 の mRNA 発現レベルは高いが Elovl6 の mRNA 発現レベルは低く、SCD と PCE の両遺伝子の発現が同調していないことが明らかとなった。ZF ラットでは PUFA 生合成経路に異常が生じ、その結果 PUFA プロファイルに変化がみられたが、GK ラットでは PUFA 生合成と PUFA プロファイルには ZF ラットに比べ、大きな変化はみられなかった。



**Fig. 3-7** Levels of mRNA encoding SCD1, SCD2, Elovl5, Elovl6, Fads1 and Fads2 in the liver of GK and ZF rats. Values represent mean  $\pm$  SD (n = 4). <sup>a, b, c</sup> Differences without a common superscript are statistically significant ( $p < 0.05$ ). If no superscript appears, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

## 第2節 GK ラットの肝臓脂肪酸プロファイルの制御メカニズムの解析

肝臓における SCD および PCE タンパク質の発現には、SCD1 と Elovl6 の寄与が大きく、両者とも転写因子である PPAR $\alpha$ 、ChREBP、SREBP-1c および LXR $\alpha$  による発現調節を介して制御されていると考えられている [38]。SCD と PCE 活性は摂食制限、炭水化物摂取、脂肪の摂取などの種々の生理状態において大きく変動するが、両者の変動は連動している。このため、SCD1 と Elovl6 は上述した転写因子のいずれか、またはそれらの組み合わせによって、同調的に制御されると信じられてきた。しかしながら、本章第1節において、GK ラットの肝臓では、両遺伝子の発現は同調していないことが明らかになり、GK ラットの肝臓では、SCD1 または Elovl6、もしくは両者に関して、通常とは異なる発現調節が働いていると推察された。そこで、本節では、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 の遺伝子の発現変動を調べ、GK ラットにおける両遺伝子の発現調節について解析することを試みた。

### 1) SCD1 および Elovl6 の発現調節に関わる転写因子の人為的操作に対する両遺伝子の発現応答

SCD1 および Elovl6 の発現調節に関わる転写因子には、PPAR $\alpha$ 、ChREBP、SREBP-1c および LXR $\alpha$  があり、これらの活性化または抑制を起こす条件が知られている。そこで、PPAR $\alpha$  のアゴニストであるベザフィブラート、ChREBP を介した転写活性化を促す高フルクトース食 [37, 41]、SREBP-1c の活性を抑制することが報告されている魚油 [98]、魚油の対照群であるトリオレインおよび LXR のアゴニストである T0901317 [15] をラットに与え、SCD1 および Elovl6 の発現の応答性を解析した。WI ラットの非投与群を 1 として比較した遺伝子発現量を Table 3-7 A に、WI ラットおよび GK ラットのそれぞれの非投与群を 1 として比較した遺伝子発現量を Table 3-7 B に示した。

#### (1) PPAR $\alpha$ の人為的操作

第2章第3節で用いた、ベザフィブラート (100 mg/kg 体重) を 1 日 1 回 7 日間経口投与した WI ラットおよび GK ラットについて、肝臓における遺伝子発現を調べた。ベザフィブラート投与により、WI ラットおよび GK ラットの Acot1 の発現が、それぞれの非投与群に比べて 21.9 倍および 31.6 倍に上昇し

た。SCD1 の遺伝子発現は、それぞれの非投与群に対して WI ラットで 3.04 倍および GK ラットで 1.92 倍高くなった。Elov16 遺伝子の発現については、WI ラットおよび GK ラットは非投与群に対してそれぞれ 2.94 倍および 4.19 倍高くなった (Table 3-7 B)。

#### (2) ChREBP の人為的操作

WI ラットおよび GK ラットにフルクトース 62.55% (w/w) の混餌を 14 日間与えたときの、肝臓における遺伝子発現を調べた。WI ラット、GK ラットともに、それぞれの非投与群に比べて ChREBP の遺伝子発現が約 1.3 倍に上昇した。SCD1 遺伝子の発現は、WI ラットおよび GK ラットではそれぞれ非投与群に比べ、2.78 倍および 3.74 倍、Elov16 遺伝子の発現は 8.04 倍および 27.5 倍高くなった (Table 3-7 B)。

#### (3) SREBP-1c の人為的操作

WI ラットおよび GK ラットに魚油 20% (w/w) またはトリオレイン 20% (w/w) の混餌を 28 日間与えたときの、肝臓における遺伝子発現を調べた。WI ラットおよび GK ラットの SCD1 遺伝子の発現はそれぞれの非投与群に比べ、魚油投与では 0.33 倍および 0.94 倍、トリオレイン投与では 2.08 倍および 2.98 倍であった。WI ラットおよび GK ラットの Elov16 遺伝子の発現はそれぞれの非投与群に比べ、魚油投与では 1.14 倍および 2.19 倍、トリオレイン投与では 7.97 倍および 15.9 倍であった。魚油投与群では WI ラットおよび GK ラットの Acot1 の発現が非投与群に比べてそれぞれ、16.2 倍および 11.1 倍に上昇したが、SREBP-1c の発現に変化はみられなかった。一方、トリオレイン投与群では Acot1 遺伝子発現の目立った上昇はみられなかったが、WI ラットおよび GK ラットの SREBP-1c の発現が非投与群に比べて、それぞれ 2.33 倍および 3.65 倍に上昇した (Table 3-7 B)。

#### (4) LXR $\alpha$ の人為的操作

WI ラットおよび GK ラットに T0901317 の 0.005% (w/w) 混餌を 7 日間与えたときの、肝臓における遺伝子発現を調べた。それぞれ非投与群に比べ、SCD1 遺伝子の発現は、WI ラットで 6.31 倍および GK ラットで 5.68 倍、Elov16 遺伝子の発現は WI ラットで 31.7 倍および GK ラットで 60.1 倍高くなった。また、WI ラット、GK ラットともに、SREBP-1c、ChREBP および Acot1 の遺伝子発現が上昇した。Acot1 遺伝子の発現は、WI ラットで 10.6 倍および GK ラットで 8.87 倍であった (Table 3-7 B)。

**Table 3-7** Effect of artificial manipulations on mRNA expression in the liver of WI and GK rats

## A Comparison with non-treated WI rats

	SCD1	Elovl6	Acot1	SREBP-1c	ChREBP
WI					
Non-treated	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.50	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.35	1.00 ± 0.21
Bezafibrate	3.04 ± 0.62 <sup>***</sup>	2.94 ± 1.13 <sup>*</sup>	21.87 ± 8.89 <sup>*</sup>	2.49 ± 0.84 <sup>***</sup>	1.05 ± 0.10
Fructose	2.78 ± 1.11 <sup>**</sup>	8.04 ± 5.75 <sup>*</sup>	1.18 ± 0.61	1.04 ± 0.58	1.29 ± 0.21 <sup>*</sup>
Fish oil	0.33 ± 0.16 <sup>**</sup>	1.14 ± 0.39	16.21 ± 1.60 <sup>***</sup>	0.92 ± 0.21	0.87 ± 0.14
Triolein	2.08 ± 0.95 <sup>*</sup>	7.97 ± 3.32 <sup>**</sup>	2.21 ± 0.31 <sup>***</sup>	2.33 ± 0.20 <sup>***</sup>	1.19 ± 0.22
T0901317	6.31 ± 0.27 <sup>***</sup>	31.73 ± 14.70 <sup>**</sup>	10.60 ± 2.43 <sup>***</sup>	5.42 ± 1.43 <sup>**</sup>	1.51 ± 0.19 <sup>***</sup>
GK					
Non-treated	1.93 ± 0.29	1.21 ± 0.34	1.46 ± 0.31	0.57 ± 0.32	0.86 ± 0.15
Bezafibrate	3.71 ± 0.68 <sup>###</sup>	5.05 ± 1.47 <sup>#</sup>	46.32 ± 13.83 <sup>###</sup>	0.70 ± 0.28	1.15 ± 0.02 <sup>***</sup>
Fructose	7.21 ± 1.80 <sup>##</sup>	33.14 ± 11.42 <sup>##</sup>	1.64 ± 0.73	1.09 ± 0.10 <sup>#</sup>	1.09 ± 0.19 <sup>#</sup>
Fish oil	1.82 ± 0.38	2.64 ± 1.47	16.31 ± 2.13 <sup>###</sup>	0.89 ± 0.18	0.71 ± 0.11
Triolein	5.74 ± 1.57 <sup>##</sup>	19.20 ± 7.02 <sup>##</sup>	2.28 ± 0.35 <sup>#</sup>	2.09 ± 0.61 <sup>###</sup>	0.91 ± 0.17
T0901317	10.96 ± 1.87 <sup>###</sup>	72.39 ± 12.91 <sup>###</sup>	12.98 ± 1.56 <sup>###</sup>	5.50 ± 1.10 <sup>###</sup>	1.18 ± 0.07 <sup>##</sup>

## B Comparison with respective non-treated rats

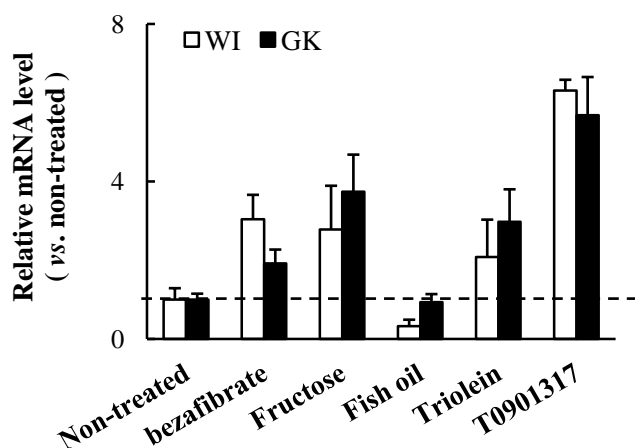
	SCD1	Elovl6	Acot1	SREBP-1c	ChREBP
WI					
Non-treated	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.50	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.35	1.00 ± 0.21
Bezafibrate	3.04 ± 0.62 <sup>***</sup>	2.94 ± 1.13 <sup>*</sup>	21.87 ± 8.89 <sup>*</sup>	2.49 ± 0.84 <sup>***</sup>	1.05 ± 0.10
Fructose	2.78 ± 1.11 <sup>**</sup>	8.04 ± 5.75 <sup>*</sup>	1.18 ± 0.61	1.04 ± 0.58	1.29 ± 0.21 <sup>*</sup>
Fish oil	0.33 ± 0.16 <sup>**</sup>	1.14 ± 0.39	16.21 ± 1.60 <sup>***</sup>	0.92 ± 0.21	0.87 ± 0.14
Triolein	2.08 ± 0.95 <sup>*</sup>	7.97 ± 3.32 <sup>**</sup>	2.21 ± 0.31 <sup>***</sup>	2.33 ± 0.20 <sup>***</sup>	1.19 ± 0.22
T0901317	6.31 ± 0.27 <sup>***</sup>	31.73 ± 14.70 <sup>**</sup>	10.60 ± 2.43 <sup>***</sup>	5.42 ± 1.43 <sup>**</sup>	1.51 ± 0.19 <sup>***</sup>
GK					
Non-treated	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.28	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.56	1.00 ± 0.18
Bezafibrate	1.92 ± 0.35 <sup>###</sup>	4.19 ± 1.22 <sup>#</sup>	31.66 ± 9.45 <sup>##</sup>	1.22 ± 0.49	1.33 ± 0.02 <sup>***</sup>
Fructose	3.74 ± 0.94 <sup>##</sup>	27.50 ± 9.48 <sup>##</sup>	1.12 ± 0.50	1.90 ± 0.17 <sup>#</sup>	1.26 ± 0.22 <sup>#</sup>
Fish oil	0.94 ± 0.20	2.19 ± 1.22	11.14 ± 1.45 <sup>###</sup>	1.55 ± 0.31	0.82 ± 0.13
Triolein	2.98 ± 0.82 <sup>##</sup>	15.93 ± 5.82 <sup>#</sup>	1.56 ± 0.24 <sup>#</sup>	3.65 ± 1.07 <sup>###</sup>	1.05 ± 0.20
T0901317	5.68 ± 0.97 <sup>###</sup>	60.06 ± 10.71 <sup>###</sup>	8.87 ± 1.06 <sup>###</sup>	9.61 ± 1.92 <sup>###</sup>	1.36 ± 0.09 <sup>##</sup>

Values represent means ± SD (n = 4–8). \*, \*\*, \*\*\* Significantly different from WI non-treated rats ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). #, ##, ### Significantly different from GK non-treated rats ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). In the absence of a superscript, the differences in the means are not significant ( $p > 0.05$ ).

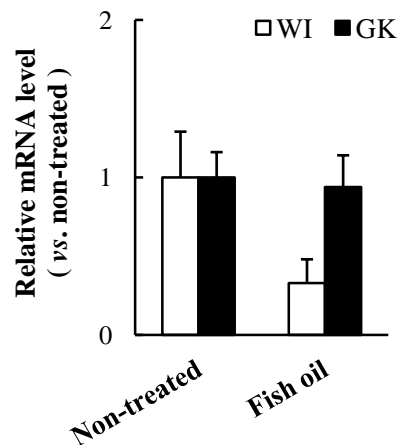
2) 人為的操作に対する応答の比較

人為的操作による SCD1 および Elovl6 の遺伝子発現レベルの変動を評価するために、Table 3-7 B に示した、WI ラットおよび GK ラットそれぞれの非投与群を 1 としたときの人為的操作群の遺伝子発現レベルをグラフに示した (Fig. 3-8)。ベザフィブラート、フルクトース、トリオレインおよび T0901317 投与では、程度の差はあるものの、すべて SCD1 および Elovl6 の発現を上昇させた。一方、魚油投与については、SCD1 の発現が WI ラットでは抑制したのに対し、GK ラットではその抑制がみられなかった。Elovl6 の発現については、魚油投与群と非投与群との間で差は認められなかった。

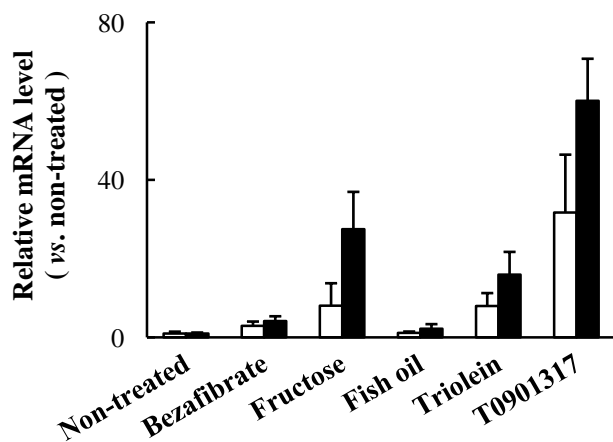
(A) SCD1



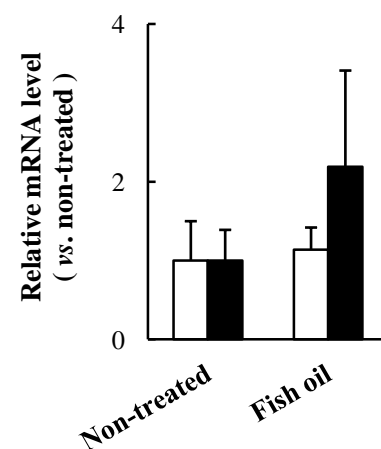
(B) SCD1



(C) Elovl6



(D) Elovl6



**Fig. 3-8** Response of mRNA expression of SCD1 (A and B) and Elovl6 (C and D) to artificial manipulations in the liver of WI and GK rats. Non-treated and fish oil groups in panel A and C are emphasized in panel B and D.



### 3) 小括

PPAR $\alpha$ 、ChREBP、SREBP-1c および LXR $\alpha$  を人為的に操作すると、GK ラットの SCD1 および Elovl6 遺伝子の発現は著しく変化したことから、GK ラットは両遺伝子の発現を変動させる能力はもちあわせていることがわかった。また、GK ラットでは魚油投与に対する SCD1 発現の応答性が、WI ラットと異なる可能性が示唆された。

### 第3節 考察

SCD は  $\Delta 9$  不飽和化酵素に分類され、16:0 および 18:0 に対して  $\Delta 9$  位に不飽和結合を導入し、MUFA である 16:1n-7 および 18:1n-9 を合成する酵素である (Fig. 3-3)。1 型糖尿病ラット (STZ ラット) の SCD 活性は対照群に比べて低く (Fig. 3-1)、肥満かつ耐糖能異常である ZF ラットでは非常に高い値を示した (Fig. 3-2)。興味深いことに、非肥満 2 型糖尿病モデルである GK ラットの SCD 活性値 ( $k^+$  = 3.2) は、対照群よりも 3.6 倍高く、STZ ラットに比べても非常に高かった (Fig. 3-1、3-2)。また、GK ラットの SCD 活性値は、MUFA が顕著に増加している肥満 2 型糖尿病モデルラットである SHR/NDcp ラット ( $k^+$  = 3.8) とほぼ同程度であった (Table 3-1)。肝臓の 18:1n-9 および 16:1n-7 の総脂質における割合は ZF ラットでは対照群に比べ著しく高かったが、GK ラットでは予想に反して、これらの割合については対照群との間に大きな差異は認められなかった (Table 3-2)。そこで、SCD 活性と 18:1n-9 の割合が相関するかを明らかにするために、ZF ラット、SHR/NDcp ラットおよび食餌の脂肪酸組成を変化させたラットの肝臓における SCD 活性と総脂質中の 18:1n-9 の割合を調べたところ、GK ラットを除く全ての群で良好な相関が認められた。一方、GK ラットでは、SCD 活性が高いにもかかわらず、18:1n-9 の割合が SCD 活性から期待される値の約 50% しかないことが判明した (Fig. 3-4)。肝臓における TAG の蓄積は、ヒトのメタボリックシンドロームに特徴的な症状であるが [56]、メタボリックシンドローム患者の肝臓における SCD 活性 (血清中の 18:0 に対する 18:1n-9 および 16:0 に対する 16:1n-7 の比率として評価) は健康人に比べ高いことが報告されている [9, 91]。これまで、ヒトや様々な実験モデルを用いた研究において、SCD は TAG 蓄積に重要な役割をはたすことが示されており、肥満に関連する因子の一つとして考えられてきた。しかしながら、本章における検討により、GK ラットは非肥満にもかかわらず、肥満

動物に匹敵するほどの高い SCD 活性をもつこと、また、SCD 活性と 18:1n-9 量が相関していないモデル動物であることが、初めて明らかとなった。

食事由来で肝臓に取り込まれた脂肪酸およびアセチル CoA から *de novo* 合成で生成する脂肪酸は、鎖伸長や不飽和化による修飾を受ける。SCD は肝臓の脂肪酸組成を調節する因子として、これまでよく調べられてきたが、最近になって脂肪酸鎖伸長酵素の生理的役割も注目されるようになってきた [90]。本章での検討において、ZF ラットの PCE 活性は対照群に比して著しく高いが、GK ラットの PCE 活性は対照群に比べてわずかに上昇しているにすぎなかった (Fig. 3-6 A)。POCE 活性に関しては、GK ラット、ZF ラットおよびそれぞれの対照群との間に、大きな差異はみられなかった (Fig. 3-6 B)。

ラットの肝臓では、2 つの遺伝子 (SCD1、SCD2) が SCD をコードしており [99]、SCD1 は ZF ラットや SHR/NDcp ラットのような肥満モデル動物の肝臓で高く発現している [29, 68, 85, 87]。本章での検討においても、ZF ラットでは以前報告された知見と一致して [87]、SCD1 発現は、対照群に比べて著しく高く、GK ラットにおいても対照群に比べて約 2 倍高いことが分かった (Fig. 3-7)。Elovl1 に関しては、ZF ラットにおいて Elovl6 の発現が非常に高いのに対し、GK ラットでの発現は対照群と変わらず、ZF ラットの 5.6% という低いレベルであった。Elovl5 については、GK ラットでは対照群に比べて発現が有意に高く、この値は ZF ラットの約 2 倍であった (Fig. 3-7)。Elovl6 の遺伝子産物は 16:0 に対して選択性が高く、一方、Elovl5 の遺伝子産物は 16:1n-7 を基質として 18:1n-7 を合成する傾向にあることが報告されている [13, 90]。Tanaka らは、この結果をふまえた検討により、PCE は Elovl6 産物で構成され、POCE は大部分が Elovl5 産物であるが、一部は Elovl6 産物によっても構成されている可能性を示唆している [85]。この仮説に基づくと、ZF ラットにおいては、SCD1 と Elovl6 遺伝子の発現上昇によって SCD と PCE 活性は高く、その結果、18:1n-9 と 16:1n-7 の割合および含量は顕著に高くなるが、Elovl5 遺伝子の発現は対照群と変わらないため、POCE 活性には変化はみられず、18:1n-7 の割合と含量はやや高くなる程度にとどまっていると考えられた (Fig. 3-9 B)。一方、GK ラットでは SCD1 遺伝子の発現上昇により SCD 活性が高くなっていたが、Elovl1 に関しては Elovl6 の遺伝子発現が亢進していないため、PCE 活性も対照群と大きな差はみられなかった。その結果、18:1n-9 の割合と含量は対照群とほとんど変わらないのだと考えられる (Fig. 3-9 A)。また、GK ラットでは SCD 活性が高いにもかかわらず、16:1n-7 の割合および含量は対照群と変わらないレベルであった (Table 3-2)。そこで、16:1n-7 および 18:1n-9 の基質となる 16:0 含量に注目すると、GK ラットおよび ZF ラットではそれぞれ 23.87 および

58.46  $\mu\text{mol/g liver}$  であり、それぞれの対照群との差も ZF ラットでは GK ラットに比べ著しく大きかった (Table 3-2)。GK ラットと ZF ラットの SCD 活性値はほぼ同程度であるのに対し、MUFA の組成が大きく異なるのは、この SCD 活性の基質である 16:0 の含量の違いに起因する可能性が考えられる。

本章の検討で用いた ZF ラットの肝臓では、SCD および PCE 活性がともに上昇していた (Fig. 3-2, 3-6)。また、SHR/NDcp ラットについても同様の結果が報告されている [85]。興味深いことに、Elov16 ノックアウトマウスの肝臓では SCD1 遺伝子の発現が低下しており [60]、一方、肝臓特異的 SCD1 ノックアウトマウスでは Elov16 の発現が低下していることが明らかとなっている [63]。これら 2 つの酵素タンパク質が共に ER 画分に局在すること、遺伝子の構造や機能が似ていることから考えると、Matsuzaka と Shimano が報告したように、SCD1 と Elov16 の遺伝子の祖先は同じである可能性も考えられ、SCD1 と Elov16 は密接に関係していることが推察できる [59]。このような背景を考えると、GK ラットの肝臓における SCD1 と Elov16 の発現パターンは例外的かつ意外性のあるケースであり、SCD1 と Elov16、もしくはそのどちらかに関して、通常とは異なる方法で発現調節されていると考えられる。そこで、その調節のメカニズムを解析する目的で、SCD1 と Elov16 の発現調節に関わる転写因子を人為的に変動させて、SCD1 と Elov16 の応答を調べたところ、GK ラットでは魚油投与に対する SCD1 の応答性が WI ラットと異なる可能性が示唆された (Fig. 3-8)。魚油に多く含まれる n-3 系列の PUFA は、SREBP-1c の前駆体タンパク質の分解を抑制し、成熟型タンパク質を減少させることで脂肪酸合成酵素の遺伝子発現を抑制することが明らかとなっている [16]。魚油の投与により、WI ラットでは SCD1 遺伝子の発現が大きく低下したのに対し、GK ラットでは変化がみられなかった。一方、WI ラットと GK ラットのトリオレイン投与群では、SREBP-1c の発現上昇がみられ、SCD1 の遺伝子発現応答は他の操作と同じように上昇傾向にあった (Table 3-7)。このことから、GK ラットの肝臓では、SCD1 が SREBP-1c の抑制機構に応答していない可能性が考えられる。その原因としては、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 ラットで発現の上昇がみられた PPAR $\alpha$  の発現亢進方向の制御が強いため、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る。SREBP-1c は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 経路を介した protein kinase C  $\lambda$ 、protein kinase C  $\zeta$  および protein kinase B の活性化をはじめとする、いくつかのインスリンシグナル経路により誘導または活性化され、脂質代謝関連遺伝子のプロモーター領域にある sterol regulatory sequence または E-Box に結合し、発現を誘導する [95]。Sajan らは、GK ラットの肝臓ではインスリンまたは摂食による insulin receptor substrate-1 (IRS-1)

/PI3K の活性化が誘導されないため protein kinase B の活性化が起こらないが、IRS-2/PI3K の活性化能は保持されており、protein kinase C の活性化を介して SREBP-1c の遺伝子発現および核移行を上昇させること、また絶食時においても GK ラットの SREBP-1c の遺伝子発現および核移行は抑制されないことを報告しており [76]、実際、GK ラットのインスリンシグナル経路を介した SREBP-1c の発現および活性化の誘導の調節過程に異常があることが示されている。しかしながら、SRRBP-1c の転写活性化に対する SCD1 と Elovl6 の発現調節の違いに関する詳細な解析については、今後の検討課題である。

ZF ラットの肝臓では PUFA 組成に変動がみられ、総脂質に占める 20:4n-6 の割合が対照群に比べて 60%低下していた (Table 3-2)。18:2n-6 から  $\gamma$ -リノレン酸 (18:3n-6) への変換は Fads2 遺伝子にコードされている  $\Delta 6$  不飽和化酵素によって行われる。その後、18:3n-6 は Elovl5 にコードされている脂肪酸鎖伸長酵素によって 20:3n-6 に伸長され、さらに Fads1 にコードされている  $\Delta 5$  不飽和化酵素によって 20:4n-6 が合成される。このように、n-6 系 PUFA の合成には  $\Delta 5$  および  $\Delta 6$  不飽和化酵素が大きく関与している [55]。ZF ラットおよび ZL ラットの 18:2n-6 含量は同程度であり、n-6 系 PUFA 合成に使われる基質の量については両者に差はないが (Table 3-2)、ZF ラットの Fads1 遺伝子の発現は ZL ラットに比べて顕著に低下していたことから (Fig. 3-7)、ZF ラットの肝臓では 20:3n-6 は増加し、20:4n-6 の含量が減少したと考えられた (Table 3-2、Fig. 3-10 B)。GK ラットの Fads1、Fads2 および Elovl5 の mRNA 発現は ZF ラットよりも有意に高く (Fig. 3-7)、GK ラットの PUFA の代謝では、20:4n-6 の合成が充進している傾向がみられた (Fig. 3-10 A)。

本章における検討の結果より、ZF ラットの肝臓では SCD (SCD1) と PCE (Elovl6) の上昇によって 18:1n-9、16:1n-7 および 18:1n-7 が非常に多く存在していることが明らかとなった (Fig. 3-5 A)。16:0 をはじめとする飽和脂肪酸 (saturated fatty acid、SFA) は ER ストレスを惹起することが知られており [3, 92, 93]、これは肝臓のインスリン抵抗性を引き起こす原因となる [72]。生体内では SFA による脂肪毒性を回避するために、SFA を TAG という不活性の状態に蓄積させる必要がある。16:0 は単独では TAG には取り込まれず、SCD1 の発現を上昇させるか、18:1n-9 と共に処理することにより、TAG に取り込まれることが報告されている [49]。ZF ラットでは、TAG が 18:1n-9 を多く含有することによって、16:0 から 18:1n-9 への合成、TAG としての蓄積および VLDL の肝外への分泌を促進し、その結果 16:0 による ER ストレスやインスリン抵抗性の惹起を減弱しようとしていると考えられる。一方、PUFA の中でも特に 20:4n-6 は SREBP-1c の発現を強く抑制することが明らかにされている [45]。また、18:1n-9 につい

でも PUFA と同様、SREBP-1c を ER 膜に留めておく Insig-1 の発現を上昇させ、SREBP-1c の核型への成熟を抑制することが見出されている [45]。ZF ラットでは対照群に比べて 20:4n-6 量は 30% 低く、18:1n-9 量は 5.3 倍高いことから (Table 3-2)、ZF ラットの肝臓では脂肪酸合成の過度な上昇を改善しようとする方向に脂肪酸プロファイルが変更されているのかもしれない。

本章での検討により、GK ラットの肝臓では SCD1 遺伝子の発現は高いが、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。Elovl6 の発現が亢進していないため、GK ラットでは 18:1n-9 の割合と含量が対照群とほとんど変わらないものと考えられる。これまで、SCD1 または Elovl6 の遺伝子改変動物や細胞がつくられ、これらを用いて解析が行われてきたが、SCD1 と Elovl6 の制御が同調していない自然発症性動物についての報告はない。本研究で示した GK ラットが初めての例である。これまでは、SCD1 と同調している Elovl6 の発現が肝臓における 18:1n-9 合成に必要とされているかについては、検討されたことがなかったが、本章での検討によって、肝臓での 18:1n-9 の増産には、Elovl6 の発現上昇を伴う SCD1 の発現亢進が必須である可能性が示された。GK ラットにおいても、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考えられる。

また、特に非肥満である GK ラットで SCD の活性が上昇したことは非常に興味深い。この現象が 2 型糖尿病の病態とどのような関係があるのかは現段階では不明であり、病態モデルとしての今後の研究での検討が期待される。

(A) GK rat

(B) ZF rat

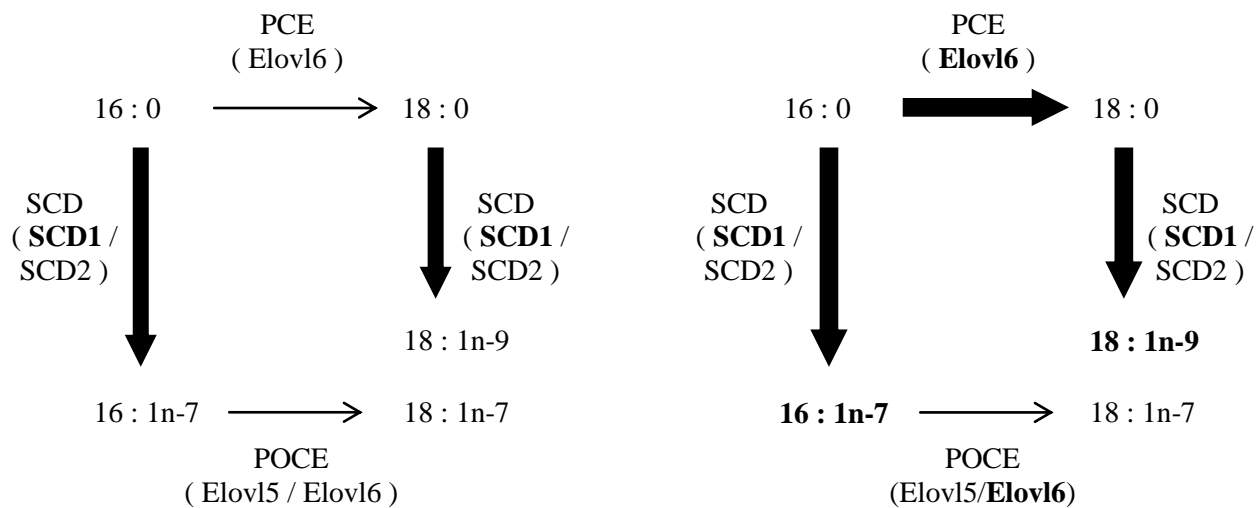


Fig. 3-9 Diagram of enzymes regulating synthesis of 16:1n-7, 18:1n-7 and 18:1n-9 in GK and ZF hepatocyte

(A) GK rat

(B) ZF rat

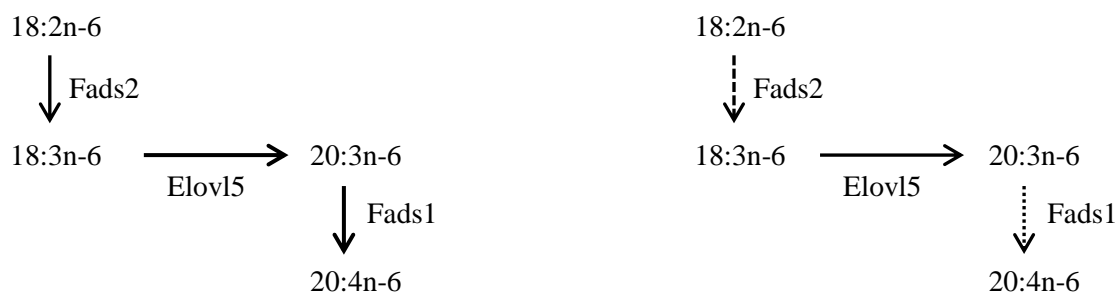


Fig. 3-10 Diagram of enzymes regulating synthesis of 20:3n-6 and 20:4n-6 in GK and ZF hepatocyte

## 総 括

本研究での検討により、各章で以下の諸点が明らかとなった。

### 第 1 章

- GK ラットの肝臓では、血清中の 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を明らかにした。
- GK ラットの肝臓では、PPAR $\alpha$  遺伝子の発現の上昇により、ATGL、CPT1a および PGC1 $\alpha$  の発現が亢進し、さらに脂肪酸の  $\beta$  酸化能が上昇していることを明らかにした。
- これらの結果に基づき、GK ラットの肝臓では、TAG の合成と分解がともに亢進しているが、TAG 蓄積側に少し傾いてバランスを維持していると考えられた。
- GK ラットの肝臓では、ATGL 発現の上昇による TAG 分解の亢進により生成した FFA が、PPAR $\alpha$  を持続的に活性化状態にすることによって、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  $\beta$  酸化が促進されていることを示唆する結果を得た。

### 第 2 章

- 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、肝臓において、ATGL の発現を誘導することによって TAG 含量の低下を引き起こすことを明らかにした。
- 微量の肝臓を用いて、フィブラートの活性化体であるフィブリン酸の肝臓中の濃度を感度よく簡便に定量する方法を開発した。
- 肝臓中の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は、PPAR $\alpha$  を活性化して ATGL を誘導すること、これら 3 種類のフィブリン酸の 1 分子当たりの PPAR $\alpha$  活性化能はほぼ同一であることを明らかにした。
- ベザフィブリン酸は GK ラットの肝臓において、PPAR $\alpha$  の活性化を介して ATGL の発現を誘導し、肝臓中の TAG を低下させることを明らかにした。
- GK ラットの肝臓において、ベザフィブリン酸による ATGL 発現の誘導が、FFA を増加させ、この

FFA が PPAR $\alpha$  を持続的に活性化状態にすることにより、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 ラットは非肥満であるにもかかわらず肝臓の SCD 活性が高いこと、それにもかかわらず生成物である 18:1n-9 の肝臓の総脂質に占める割合は、SCD 活性から推定される値に比して著しく少ないことを明らかにした。
- GK ラットの肝臓では、SCD1 の mRNA 発現レベルは高いが Elovl6 の mRNA 発現レベルは低く、両遺伝子の発現が同調していないこと、これが SCD 活性は高いにもかかわらず、18:1n-9 が少ないことの原因であることを明らかにした。
- GK ラットの肝臓では、PPAR $\alpha$  と SREBP-1c による SCD1 遺伝子の発現調節が WI ラットとは異なる可能性が示唆され、これが SCD1 と Elovl6 が同調的に調節されない原因ではないかと推定した。

以上を総括すると、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、

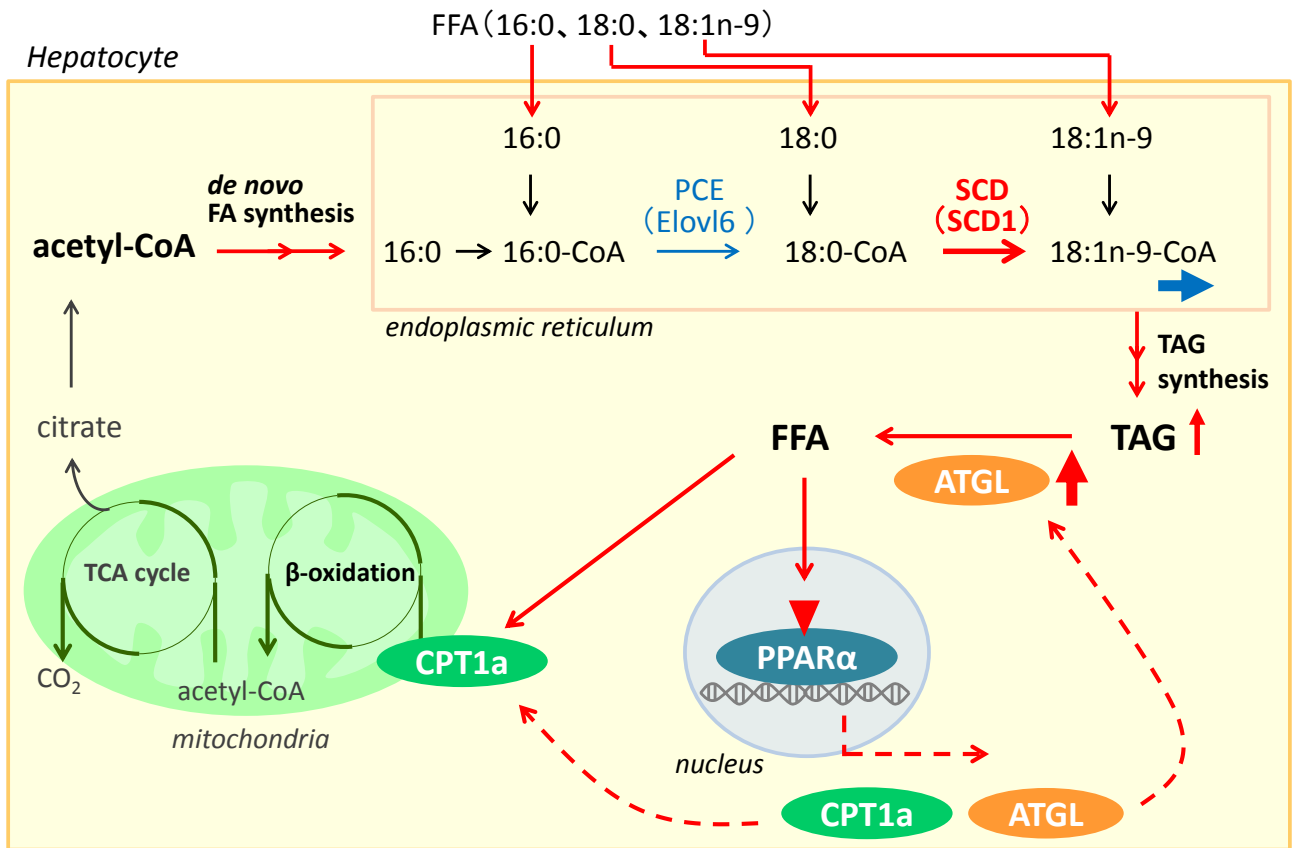
- GK ラットは非肥満にもかかわらず肝臓 TAG が微増している。
- TAG の合成が亢進しているが、ATGL 発現の上昇により TAG 分解が亢進している。
- SCD1 と Elovl6 の発現が同調しておらず、その結果、SCD1 の発現が高いにもかかわらず 18:1n-9 含量が増えていない。

という諸点を明らかにした。また、これらの結果を踏まえて、以下の点を推測した。

- 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。
- 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。





**Fig.** Proposed mechanism for TAG and fatty acid metabolism in hepatocytes of GK rats

## 謝 辞

本研究に際し、研究テーマの設定から結論に至るまで終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科衛生化学講座 工藤なをみ教授に衷心より感謝致します。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科毒性学講座 川嶋洋一教授に深謝の意を表します。

本研究の遂行に多大なるご尽力をいただきました城西大学大学院薬学研究科毒性学講座 山崎研助教に深謝の意を表します。

本学位論文の作成にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学大学院薬学研究科生理学講座 加園恵三教授ならびに城西大学大学院薬学研究科生体防御学講座 日比野康英教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、終始ご指導並びにご助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科 医薬品化学講座 坂本武史教授ならびに城西国際大学薬学部 光本篤史教授に感謝の意を表します。

実験遂行に際してご助言並びにご協力をいただきました城西大学薬学部衛生化学研究室および毒性学研究室の皆様へ感謝致します。

最後に、これまでの研究生生活を終始支えてくださいました家族に、心より感謝致します。

## 実験の部

### 第1章 試薬

#### 第1節 試薬

[1-<sup>14</sup>C] パルミトイル CoA (60 Ci/mol) は Moravek Biochemicals (米国) から入手した。[2-<sup>14</sup>C] マロニル CoA (55 Ci/mol)、[1-<sup>14</sup>C] 16:0 (56 Ci/mol)、[1-<sup>14</sup>C] 18:1n-9 (55 Ci/mol) および [1-<sup>14</sup>C] 酢酸 (55 Ci/mol) は American Radiolabeled Chemicals Inc. (米国) から入手した。[カルボキシル-<sup>14</sup>C] トリオレイン (108.8 mCi/mmol) は Perkin Elmer (米国) から入手後、TLC にて精製したものを使用した。ステアロイル CoA、パルミトイル CoA、パルミトオレオイル CoA、マロニル CoA、STZ、牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, essentially fatty acid free)、ハイアミンヒドロキシド、ベザフィブラート、クロフィブリン酸、フェノフィブラート、アプロチニン、ベスタチン、アンチパイン、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine, PC (卵黄由来))、ホスファチジリンイノシトール (phosphatidylinositol, PI (大豆由来))、トリオレイン、BrMDMC は Sigma-Aldrich Japan から購入した。抗 ATGL (F-7) マウスモノクローナル IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology (米国)、抗マウス IgG HRP 結合抗体は Cell signaling Technology (米国) から購入した。Nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) および nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) はオリエンタル酵母から購入した。トリトン X-100、トリトン WR1339、ロイペプチンおよびペプスタチンはナカライテスクより購入した。ノナデカノイン酸、コレステリルヘプタデカノアートおよびトリヘプタデカノインは Nu-Chek-Prep Inc. (米国)、ヘプタデカン酸メチルは東京化成工業から購入した。ベザフィブリン酸およびクロフィブリン酸は再結晶して使用した。また、フェノフィブリン酸はフェノフィブラートを加水分解後、再結晶したものを使用した。その他の試薬は和光純薬工業の特級を使用した。

#### 第2節 還元型フィブリン酸の合成法

メタノール 10 mL に溶解したフェノフィブリン酸 (300 mg、0.94 mmol) に、水素化ホウ素ナトリウ

ム (231 mg、6.12mmol) を氷冷下で数回に分けて加えた後、室温で 2 時間攪拌して反応させた。この反応液を減圧下で濃縮し、氷冷下で 10% (w/v) 塩酸を加えて酸性にした後、酢酸エチル 20 mL で 2 回抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ濃縮した。この残渣を酢酸エチル-*n*-ヘキサン溶液で再結晶した。得られた無色の結晶 (153 mg、50.7%) は、NMR および EI-MS で測定した結果からフィブリン酸の還元体 (2-{4-[(4-chlorophenyl)(hydroxy)methyl]phenoxy}-2-methylpropanoic acid) であることが同定された。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 1.59 (s, 6 H), 5.79 (s, 1 H), 6.89 (d, *J* = 5.6 Hz, 2 H), 7.25 (d, *J* = 5.6 Hz, 2 H), 7.31 (s, 4 H); EI-MS *m/z* (relative intensity) 320 (M<sup>+</sup>, 10), 322 (M<sup>+</sup> + 2, 3.4), 216 (74), 153 (100).)

## 第 2 章 実験動物と飼料

日本クレア社から購入した雄性 WI ラットおよび GK ラット、日本エスエルシー社から購入した雄性 Wistar ST ラット、SHR/ND+ラットおよび SHR/NDcp ラット、日本チャールズリバー社から購入した雄性 ZL ラットおよび ZF ラットを馴化飼育後、正常な個体を使用した。すべての動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に従うとともに、本研究計画の動物実験委員会による審査結果に基づいた学長承認を得て「城西大学動物実験規定」に従って実施した。

## 第 3 章 動物の処理

### 第 1 節 動物の飼育

#### (1) WI ラット、GK ラット、ZL ラット、ZF ラット、SHR/ND+、SHR/NDcp ラットの飼育

WI ラットおよび GK ラットは 10 週齢、ZL ラットおよび ZF ラットは 10 週齢または 16 週齢、SHR/ND+ ラットおよび SHR/NDcp ラットは 22 週齢で実験に供した。ラットには固形飼料 (CE-2、日本クレア社) および水を自由摂取させた。

## (2) フィブラート混餌投与

フェノフィブラートおよびベザフィブラートは 0.025%、0.05%、0.1%および 0.2% (w/w)、クロフィブリン酸は 0.05%、0.1%、0.15%、0.2%および 0.3% (w/w) の割合で CE2 粉末飼料に混合し、Wistar ST ラットに 14 日間水と共に自由摂取させた。また、フェノフィブラート 0.1% (w/w)、ベザフィブラート 0.1% (w/w) およびクロフィブリン酸 0.3% (w/w) を含む飼料については、2 日、7 日および 14 日間自由摂取させタイムコースとした。すべてのラットは 10 週齢で実験に供した。

## (3) ベザフィブラート経口投与

WI ラットおよび GK ラットにベザフィブラート (100 mg/kg 体重) を 1 日 1 回 7 日間、ゾンデを用いて胃内に投与した。ラットには CE-2 および水を自由摂取させ、10 週齢で実験に供した。

## (4) STZ 投与

5 週齢の WI ラットに STZ (50–60 mg/kg 体重) を 1 回静脈内投与した [39, 43]。STZ は 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解して用いた。ラットには CE-2 および水を自由摂取させ、血糖値 500 mg/100 mL 以上の個体を 1 型糖尿病モデルラットとして、10 週齢で実験に供した。

## (5) サフラワー油、シソ油、魚油混餌投与

サフラワー油 (サミット製油)、シソ油 (太田油脂) および魚油 (EPA-28MN、マルハニチロ食品) を 7% (w/w) の割合で OYC 改変 AIN-93G 粉末飼料 (オリエンタル酵母) に混合し、28 日間、Wistar ST ラットに水と共に自由摂取させた。すべてのラットは 9 週齢で実験に供した。

## (6) 魚油、トリオレイン、フルクトース混餌投与

魚油 (EPA-28MN) およびトリオレイン (和光純薬工業) は 20% (w/w)、フルクトース (オリエンタル酵母) は 62.55% (w/w) の割合で OYC 改変 AIN-93G 粉末飼料に混合し、魚油およびトリオレインは 28 日間、フルクトースは 14 日間、WI ラットおよび GK ラットに水と共に自由摂取させた。すべてのラットは 10 週齢で実験に供した。

(7) T0901317 混餌投与

T0901317 (Cayman Chemical Company、米国) を 0.005% (w/w) の割合で CE2 粉末飼料に混合し、WI ラットおよび GK ラットに 7 日間、水と共に自由摂取させ、10 週齢で実験に供した。

**Table** Nutrient composition of CE-2 diet

	%
Moisture	8.9
Crude protein	24.9
Crude fat	4.6
Crude fiber	4.1
Crude ash	6.6
Nitrogen-free extract <sup>*1</sup>	51.0
Total	100.0

<sup>\*1</sup>, consisting of carbohydrates, sugars, starches, and a major portion of materials classed as hemicellulose in feeds. Values of nutrients are provided in the catalog of CLEA Japan Inc. (2009).

**Table** Fatty acid composition of CE2 diet

	mol %
16:0	23.23
16:1n-7	1.95
17:0	0.22
18:0	2.41
18:1n-9	19.70
18:1n-7	2.17
18:2n-6	42.07
18:3n-3	3.59
20:3n-9	0.04
20:3n-6	0.00
20:4n-6	0.16
20:5n-3	2.86
22:5n-3	0.26
22:6n-3	1.34
Total	100.00

**Table** Composition of experimental diets

	7% (w/w) Safflower oil Perilla oil Fish oil	20% (w/w) Fish oil Triolein	62.55% (w/w) Fructose
	% (w/w)	% (w/w)	% (w/w)
Cornstarch	37.7486	26.35	0.00
Casein	20.0000	20.00	20.00
$\alpha$ - cornstarch	13.2000	13.20	0.00
Sucrose	10.0000	10.00	0.00
Fructose	0.0000	0.00	62.55
Oil	7.0000 ( safflower / fish / perilla )	20.00 ( fish / triolein )	7.00 ( soybean )
Cellulose	5.0000	5.00	5.00
Mineral mixture ( AIN-93G )	3.5000	3.50	3.50
Vitamin mixture ( AIN-93G-VX )	1.0000	1.00	1.00
l-cystine	0.3000	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.2500	0.25	0.25
Butylated hydroxytoluene	0.0014	0.40	0.40
Total	100.00	100.00	100.00

## 第2節 血液の採取と臓器の摘出

エーテル麻酔下、ラットの下大静脈から血液を採取し、速やかに肝臓、精巣周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織、褐色脂肪組織、腎臓および筋肉を摘出した。血液は4°Cで凝固させたあと、900 x gで15分間遠心分離して血清を得た。肝臓は生理食塩水で洗浄後、重量を測定し、小片に切り分け液体窒素下で凍結させ、-80°Cで保存した。組織分析のために、肝臓の小片を10%中性ホルマリン溶液に浸けた。また、一部を使用して肝臓スライスを作製した（後述）。残りの肝臓は生理食塩水で還流し脱血した後、ミクロソーム調製に用いた（後述）。

## 第3節 肝スライスの作製

解剖で得られた肝臓の一部をKrumdieck Tissue Slicer（Alabama Research and Development、米国）を用いて、直系1 cm、厚さ約140 μmのスライスを作製した。

## 第4節 肝ミクロソームの調製

残りの肝臓は重量に対して4倍量の10 mM Tris-塩酸緩衝液（pH 7.4）、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA）を含む0.25 M ショ糖溶液を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートを調製した。ホモジネートの一部は脂肪酸組成の分析のために-30°Cで保存した。残りのホモジネートを4°C、18,000 x gで20分間遠心し（KUBOTA 7780 II ローター：RA40）、得られた上清を再び同様の条件で遠心した。この上清を0°C、105,000 x gで1時間遠心した（Hitachi CP80WX ローター：RP50T）。得られた沈殿を10 mM Tris-塩酸緩衝液（pH 7.4）、0.1 mM EDTAを含む0.25 M ショ糖溶液に懸濁し、再び同様の条件で遠心した。得られた沈殿を10 mM Tris-塩酸緩衝液（pH 7.4）、0.1 mM EDTAを含む0.25 M ショ糖溶液に再懸濁し（約50 mg protein/mL）、液体窒素にて凍結後、-80°Cで保存した。ミクロソーム中のタンパク質量はLowryらの方法に従い測定した [51]。標準物質としてBSAを用いた。

## 第5節 組織ホモジネートの調製

肝臓、腎臓、筋肉の小片に重量に対して9倍量の10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、1 mM EDTA を含む0.25 M ショ糖溶液を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートを調製し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 第6節 サイトゾルの調製

Wu および Soni らの方法に従って、肝臓からのサイトゾルの調製を行った [81, 96]。 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した凍結肝臓を $0^{\circ}\text{C}$ で解凍し、4倍量のホモジナイズ緩衝液 (0.5 M ショ糖、1 mM EDTA、20 mM Tris-塩酸 (pH 7.4)、1 mM ジチオエリトリトール、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ロイペプチン、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンチパイン、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ペプスタチン) を加え Dounce ホモジナイザーを用いてホモジナイズ後、 $4^{\circ}\text{C}$ 、1,000 x g で10分間遠心した。0.25 M、1.5 M ショ糖およびホモジネートの上清 (0.5 M ショ糖) を用いて不連続密度勾配をつくり、 $4^{\circ}\text{C}$ 、100,000 x g で3時間遠心した (CS100GXL スウィングローター : S55S-1106、Hitachi)。分取した0.5 M ショ糖溶液をサイトゾル画分とした。タンパク質量は標準物質としてBSAを用いてBCA法に従い測定した。

## 第4章 血清の生化学的分析

凍結保存した血清から、それぞれのキット、血糖値 : グルコース CII-テストワコー、トリグリセリド : トリグリセライド E-テストワコー、総コレステロール : コレステロール E-テストワコー、NEFA : NEFA C-テストワコーおよびインスリン : Rat insulin RIA Kit (Merck Millipore、ドイツ) を用いて分析した。

## 第5章 組織分析

10% 中性ホルマリン溶液で固定した肝臓をパラフィンで包埋した後、3–4  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作製し、



H&E 染色を行った。また、クライオスタット内で 10–12  $\mu\text{m}$  の厚さの凍結切片を作製し、ORO および H&E 染色を行った。切片の観察には DP72 カメラ (オリンパス) を搭載した光学顕微鏡 (Olympus BX53、オリンパス) を用いた。

## 第 6 章 脂質の分析

### 第 1 節 肝ホモジネートからの脂質の抽出

肝臓ホモジネートから、Bligh-Dyer 法で脂質を抽出した [10]。解凍した 20% 肝ホモジネート 0.8 mL に冷水を加えて 1.6 mL とし、抗酸化剤として 0.02% ブチルヒドロキシトルエン/エタノール溶液を 50  $\mu\text{L}$  加えた。この際、ガスクロマトグラフィー分析に用いる試料には内部標準物質としてノナデカノイン酸、コレステリルヘプタデカノアート、トリヘプタデカノインを加えた。メタノール 4 mL、クロロホルム 2 mL を加えて振とうした。その後、0.1 M 塩酸とクロロホルムを各 2 mL ずつ加えて、2 層に分離し、600 x g で 5 分間遠心後、クロロホルム層を分取した。水層を 2.4 mL のクロロホルムで再抽出して先のクロロホルム層を合わせ、得られたクロロホルム層にクロロホルム/メタノール/0.1 M 塩酸 (3 : 48 : 47, v/v) を 3.2 mL 加えて 3 分間振とうした後、遠心した。上層を取り除いた下層に窒素気流を吹き付け、溶媒を留去した後、クロロホルム/メタノール (1 : 1, v/v) 1 mL に溶かして総脂質とし、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 第 2 節 脂質の分離

総脂質から一部を分取し、シリカゲル G プレート (No.5721、Merck、ドイツ) 上にスポットし、*n*-ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (80 : 30 : 1, v/v) で展開することにより TAG、DAG、PL、CE および FFA に分離した。プレートを乾燥させた後、0.001% プリムリン溶液 (アセトン/水 (4 : 1, v/v)) を噴霧し、UV (265 nm) 照射により各スポットを検出した。シリカゲルプレートから各スポットをかきとり、0.02% ブチルヒドロキシトルエン/エタノール溶液 50  $\mu\text{L}$  およびクロロホルム/メタノール/0.1 M 塩酸 (4 : 4 : 1, v/v) を加えた。 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩放置後、遠心によりシリカゲルを分離し、0.1 M 塩酸 3 mL を加え、3 分間振とう後遠心し、上清を取り除いた。シリカゲルからの抽出の際、DAG、FFA、PL には

内部標準物質としてヘプタデカン酸メチルを加えた。

### 第3節 けん化

肝臓の総脂質、DAG および CE の脂質溶液の溶媒を留去し、10% 水酸化カリウム/90% メタノール溶液を 1 mL 加えて、80°C で 1 時間反応させた。反応液を室温に戻し、水 4 mL およびヘキサン 4 mL を加え、3 分間振とう後遠心し、上層を取り除いた。6 M 塩酸を 1 mL 加えて溶液を酸性にし、ヘキサンを 4 mL 加え、3 分間振とう後遠心し、上層を分取した。下層を 4 mL のヘキサンで再度抽出して、これらのヘキサン抽出液を合わせ、窒素気流を吹き付けて溶媒を留去した。

### 第4節 脂肪酸のメチル化

#### (1) 三フッ化ホウ素メタノール溶液を用いた脂肪酸のメチル化

総脂質および CE をけん化して得た脂肪酸に 14% (w/v) 三フッ化ホウ素メタノール溶液を 1 mL 加えて 100°C で 10 分間加熱した。空冷後、水 4 mL およびヘキサン 4 mL を加えて 3 分間振とう後、遠心してヘキサン層を分取した。水層をヘキサンで再度抽出してこれらを合わせた。

#### (2) ナトリウムメトキシドを用いた脂肪酸のメチル化

TAG および PL に 0.5 N ナトリウムメトキシド 1 mL を加えて 50°C で 10 分間反応させた。空冷後、酢酸 100  $\mu$ L を加えて、酸性溶液とした後、水 4 mL およびヘキサン 4 mL を加えて 3 分間振とう後、遠心してヘキサン層を分取した。水層をヘキサンで再度抽出してこれらを合わせた。

#### (3) 塩化水素メタノールを用いた脂肪酸のメチル化

FFA および DAG をけん化して得た脂肪酸に 5% 塩化水素メタノール溶液 0.5 mL を加えて 100°C で 45 分間反応させた。空冷後、水 2 mL およびヘキサン 3 mL を加えて 3 分間振とう後、遠心してヘキサン層を分取した。水層をヘキサンで再度抽出してこれらを合わせた。

## 第5節 ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の分析

ガスクロマトグラフィーには、GC-2014（島津製作所）を用いた。分離にはキャピラリーカラム SUPELCOWAX10（内径 0.53 mm x 30 m、膜厚 1.0  $\mu\text{m}$ 、SUPELCO、米国）を、検出器には水素炎イオン化検出器を使用した。キャリアーガスとしてヘリウムを用いた。試料注入部および検出器の温度は 255 $^{\circ}\text{C}$ 、カラム温度は 230 $^{\circ}\text{C}$ とした。また、18:1n-9 と 18:1n-7 の分離には、キャピラリーカラム SLB-IL100（内径 0.32 mm x 30 m、膜厚 0.26  $\mu\text{m}$ 、Sigma-Aldrich Japan）を用い、試料注入部および検出器の温度は 220 $^{\circ}\text{C}$ 、カラム温度は 120 $^{\circ}\text{C}$ とした。標準物質の保持時間との比較によって各ピークを同定し、内部標準物質であるノナデカノイン酸またはヘプタデカン酸のメチルエステルと試料中の脂肪酸メチルエステルのピーク面積比から各脂肪酸を定量した [35]。

## 第6節 TAG の定量

TLC により分離後、抽出した TAG の一部の溶媒を、窒素气流を吹き付け留去した。クロロホルム 10  $\mu\text{L}$  および 10% トリトン X-100 / イソプロパノール溶液 90  $\mu\text{L}$  を添加し、攪拌後トリグリセライド E-テストワコーを用いて定量した。検量線はトリオレインで作製した。

## 第7章 脂質代謝の測定

### 第1節 脂質への脂肪酸取り込み速度の測定

[1- $^{14}\text{C}$ ] オレイン酸エタノール溶液およびオレイン酸エタノール溶液を試験管に測りとり、溶媒を留去した。1 assay あたりエタノールを 16  $\mu\text{L}$  加えて溶解させた後、6% BSA 水溶液 0.16 mL と、水 24  $\mu\text{L}$  を加えて基質溶液とした。[1- $^{14}\text{C}$ ] オレイン酸 0.25 mM (0.48 mCi)、0.6% (w/v) BSA、1% エタノールを含む Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液 (KRB 緩衝液) (113 mM 塩化ナトリウム、4.7 mM 塩化カリウム、2.5 mM 塩化カルシウム、1.2 mM リン酸二水素カリウム、1.2 mM 硫酸マグネシウム 7水和物、25 mM 炭酸水素ナトリウム、5 mM グルコース、pH 7.4 ) 1.6 mL をガラスバイアルに入れ、秤量した肝

スライスを加え、気相を 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>に置換し、密閉した。37°Cで 15 分間振とうしてインキュベートした後に、0°Cで冷却した BSA 溶液 0.2 mL と KRB 緩衝液 1.4 mL の入ったガラスバイアル中で組織をすばやく洗い、反応停止液（クロロホルム/メタノール/水（1 : 2 : 0.8、v/v））を入れて反応を停止した。肝スライスは、反応停止液とともにテフロンホモジナイザーを用いてホモジネートとした後、総脂質を抽出した。得られた総脂質の一部を分取し、液体シンチレーター（1 L 中に POPOP 0.33 g および DPO 4 g を含むトルエン）8 mL を加えて液体シンチレーションカウンター（LSC6100、Hitachi Aloka Medical）にて放射活性を測定した。また、残りの総脂質から一部を分取し、TLC で分離した TAG、DAG、PL、CE および FFA についても、液体シンチレーター（1 L 中に POPOP 0.33 g および DPO 4 g を含むトルエン/トリトン（2 : 1、v/v））8 mL を加えて同様に放射活性を測定した。

## 第 2 節 脂肪酸合成速度の測定

10 週齢の WI ラットおよび GK ラットの腹腔内へ [1-<sup>14</sup>C] 酢酸（160 μCi/kg 体重）を投与し、投与 5 分後に肝臓を摘出し液体窒素で凍結させ、-80°Cで保存した。この肝臓を用いて 10%ホモジネートを調製後、総脂質を抽出した。この総脂質の一部から、けん化物および不けん化物を抽出し、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。また、残りの総脂質から TLC で分離した TAG、DAG、PL、CE、コレステロールおよび FFA についても同様に放射活性を測定した。

## 第 3 節 脂肪酸分解速度の測定

Friedman らおよび中川の方法を参考にして測定した [21, 102]。[1-<sup>14</sup>C] パルミチン酸エタノール溶液およびパルミチン酸エタノール溶液を試験管に測りとり、溶媒を留去した。1 assay あたりエタノールを 20 μL 加えて溶解させた後、6% BSA 水溶液 0.2 mL を加えて基質溶液とした。[1-<sup>14</sup>C] パルミチン酸 0.25 mM（0.30 mCi）、0.6% BSA および 1% エタノールを含む KRB 緩衝液 2 mL をガラスバイアルに入れ、秤量した肝スライスを加え、気相を 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>に置換し、密閉した。37°Cで振とうさせインキュベートし、30 分後および 90 分後に 0.6 M 過塩素酸溶液 1 mL を注入して反応を停止させた。バイアル内にセットしたカップにハイアミンヒドロキシド 0.2 mL を注入し、室温で 45 分間振とうさせ、生成し

た  $^{14}\text{CO}_2$  をハイアミンヒドロキシドに吸着させた。このハイアミンヒドロキシドを回収し、液体シンチレーター (Eco Lite、MP biomedical、米国) を 8 mL 加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。反応終了後、反応液と肝スライスを回収し、テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートを調製した。ホモジネートを 800 x g で 10 分間遠心して上清を分取した。上清に 5 M KOH を添加して中和し、さらに 3 M 酢酸緩衝液 (pH 7.4) 0.7 mL を加えて pH を 4 とした。これに石油エーテル 5 mL を加えて 5 回抽出し、未代謝の  $[1-^{14}\text{C}]$  パルミチン酸を除いた。得られた水層の一部を分取し、液体シンチレーター (1 L 中に POPOP 0.33 g および DPO 4 g を含むトルエン/トリトン (2:1, v/v)) 8 mL を加えて液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。反応 90 分間から 30 分間での  $\text{CO}_2$  および酸可溶性代謝物の生成量の差を求め、脂質分解速度として算出した。

#### 第 4 節 VLDL 分泌速度の測定

リポタンパク質リパーゼ阻害作用をもつトリトン WR1339 を絶食させたラットに投与し、一定時間内に増加する血中 TAG 量を測定することにより、肝臓からの VLDL 分泌速度の測定を行った [86]。12 時間絶食させたラットに、20% (w/v) トリトン WR1339 生理食塩水溶液を体重 1 kg あたり 300 mg となるように尾静脈より投与した。対照群には生理食塩水のみを投与した。投与 1、2、3、4 および 6 時間後に眼窩静脈叢より採血し、ヘパリンを加え転倒混和後、4°C、2,400 x g で 5 分間遠心し、血漿を得た。この血漿中の TAG をトリグリセライド E-テストワコーを用いて定量し、VLDL 分泌速度を求めた。なお、全血漿量は体重の 3.1% とした。

### 第 8 章 酵素活性の測定

#### 第 1 節 SCD 活性の測定

Oshino らの方法に従って測定した [71]。SCD 活性は NADH により還元されたミクロソーム中のシトクロム  $b_5$  がステアロイル CoA 存在下で再酸化される速度を測定することにより求めた。シトクロム  $b_5$  の酸化速度は 424 nm と 409 nm の差の吸光度変化を記録することにより求めた。反応系は酵素源とし

てミクロソームタンパク質 1.2 mg および 0.1 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を石英セルにとり、最終容量 3 mL とした。30°C で 2 分間プレインキュベートした後、NADH 2 nmol を加え、島津分光光度計 UV-300 で記録を開始した。ミクロソームに含まれるシトクロム  $b_5$  の還元反応が完全に終了した後、20 nmol のステアロイル CoA を加え、2 nmol NADH を添加して再びシトクロム  $b_5$  の吸光度変化を記録した。還元型シトクロム  $b_5$  の酸化の速度定数をステアロイル CoA 存在下 ( $\kappa$ ) と非存在下 ( $\kappa^-$ ) においてそれぞれ求め、SCD の反応速度定数 ( $\kappa^+$ ) は、 $\kappa^+ = \kappa - \kappa^-$  により算出した。

## 第 2 節 Elongase 活性の測定

Kawashima と Kozuka の方法に従って測定した [40]。反応溶液は終濃度で 200  $\mu$ M [2- $^{14}$ C] マロニル CoA (20 nCi)、2 mM NADH、2 mM NADPH、1 mM シアン化カリウム、0.1 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、ミクロソーム 200 または 250  $\mu$ g タンパク質を含み、最終容量を 0.5 mL とした。PCE 活性には 30  $\mu$ M パルミトイル-CoA を、POCE 活性には 30  $\mu$ M パルミトオレオイル CoA を基質として用いた。反応液を 37°C で 4 分間インキュベートした後、10% 水酸化カリウム / 90% メタノール溶液 1 mL の添加により反応を停止させた。80°C で 30 分間加温後、反応液を室温に戻し、6 M 塩酸を 1 mL 加えて溶液を酸性にした。水 1 mL およびヘキサン 2 mL を加え、3 分間振とう後遠心し、上層を分取した。この操作を 3 回繰り返す。得られたヘキサン抽出液に水 4 mL を加え、3 分間振とう後遠心し、上層を分取した。溶媒を留去し、液体シンチレーター (1 L 中に POPOP 0.33 g および DPO 4 g を含むトルエン/トリトン (2:1, v/v)) 8 mL を加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

## 第 3 節 TAG 加水分解活性

Wu らの方法を一部改変して、TAG 加水分解活性を測定した [96]。基質は、[カルボキシル- $^{14}$ C] トリオレイイン 2.96 mg (3  $\mu$ Ci) (終放射活性 0.9  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol)、および PC/PI (3:1, w/w) 300  $\mu$ g を混合し、窒素気流を吹き付けた後、減圧下で溶媒を留去した。0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 1.5 mL を加え、超音波発生装置 (Astrason ultrasonic processor XL2020; Misonix Inc., 米国) で超音波処理を行った。0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解した 20% (w/v) defatted BSA 0.5 mL を加え、弱く攪拌し

た[33]。反応は、基質溶液 100  $\mu\text{L}$ 、サイトゾル画分 50  $\mu\text{L}$ 、緩衝液 (20 mM リン酸カリウム、1 mM EDTA、1 mM ジチオエリトリトールおよび 0.02% (w/v) defatted BSA、pH 7.0) 50  $\mu\text{L}$  を混合し、37°C で 60 分間行った。コントロールとしてサイトゾル画分を加えない反応も同時に行った。クロロホルム/メタノール (1 : 2、v/v) を 6 mL 加え、反応を停止した。キャリアとして、18:1n-9 (56.4  $\mu\text{g}$ /エタノール溶液) および DAG (124.2  $\mu\text{g}$ /エタノール溶液) を加え、総脂質の抽出を行った。総脂質の一部を分取し、液体シンチレーターにて放射活性を測定した。また、残りの総脂質から一部を分取し、TLC で分離した DAG、CE および FFA についても同様に放射活性を測定した。

## 第9章 フィブリン酸の定量

### 第1節 フィブリン酸の抽出

Abe らが報告した方法を一部改変して、フィブリン酸の抽出を行った [1]。試験管にメタノール-水溶液 (90 : 10、v/v) に溶解した内部標準物質 (ベザフィブリン酸およびフェノフィブリン酸にはクロフィブリン酸 2 nmol、クロフィブリン酸にはベザフィブリン酸 2 nmol) を加え、窒素気流下で溶媒を留去した。肝臓、腎臓、筋肉のホモジネート (10 mg 相当) または血清 0.1 mL に水を加えて 0.5 mL とし、さらに 0.5 M 塩酸 1 mL を加えて攪拌した。*n*-ヘキサン/酢酸エチル (85 : 15、v/v) 3 mL を加え、よく振とうした。3,000 rpm、10 分間遠心後、有機層を分取し、水層を再度抽出した。得られた有機層を合わせ 0.1 M リン酸水素二ナトリウム 2 mL を加え振とうし、遠心後、有機層を除去した。残りの水層に 0.5 M 塩酸 2 mL を加えて酸性にし、攪拌した後、*n*-ヘキサン/酢酸エチル (85 : 15、v/v) 3 mL を加え、振とうした。遠心後、有機層を分取し、水層を再度抽出した。合わせた有機層に窒素気流を吹き付け、溶媒を留去した。

### 第2節 フィブリン酸の BrMDMC による誘導体化

抽出したフィブリン酸に、真空乾燥した炭酸カリウム 1 mg、アセトニトリルに溶解した 18-crown-6-エーテル 62.5  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{L}$ 、アセトンに溶解した BrMDMC 250  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌後遮光し、70°C で

60 分間加温した。反応終了後、アセトニトリル/アセトン (1 : 1, v/v) を 200  $\mu$ L 加えて攪拌し、綿栓ろ過後、Millex®-LH フィルター (Merck Millipore、ドイツ) でろ過し、HPLC による分析に用いた。

### 第 3 節 HPLC による BrMDMC 誘導体化フィブリン酸の定量

HPLC による分析には、ポンプ : LC-20AT、デカッサー : DGU-20A<sub>3</sub>、システムコントローラー : SCL 10Avp、蛍光検出器 : RF-10A<sub>XL</sub>、クロマトパック積分機 : RF-10A (すべて島津製作所) を用いた。分離カラムは YMC-Pack Pro C18 (100 x 4.6 mm、粒子径 : S-3  $\mu$ m、細孔径 : 12 nm、YMC CO.) を使用し、カラム温度を 40°C とした。移動相はクロフィブリン酸およびベザフィブリン酸分離の場合はアセトニトリル/水 (43 : 57, v/v)、クロフィブリン酸およびフェノフィブリン酸分離の場合はアセトニトリル/水 (46 : 54, v/v) を用い、流速は 1 mL/分とした。検出は励起波長 340 nm、蛍光波長 425 nm で行った。BrMDMC 誘導体化フィブリン酸が溶出された後、カラムをメタノール (1.5 mL/分) で 30 分間洗浄した。

### 第 4 節 マススペクトルによる BrMDMC 誘導体化フィブリン酸の分析

HPLC で分離した BrMDMC 誘導体化フィブリン酸ピーク画分を分取し、遠心エバポレータで溶媒を留去した後、JEOL JMS-700 mass spectrometer (日本電子) を用いて EI および FAB-MS 法にて構造分析を行った。

## 第 10 章 mRNA の定量

-80°C で凍結保存してあった肝臓の小片に Quiazol (Quiagen、ドイツ) を加え、ポリトロンで粉碎後、RNeasy Mini kit (Quiagen、ドイツ) を用いて総 RNA を抽出した。総 RNA の定量は、抽出液の吸光度を波長 260 nm で測定することにより行なった。逆転写反応は RNA PCR kit (AMV) ver2.1 (タカラバイオ) を用いた。RNA PCR 緩衝液、5 mM 塩化マグネシウム、1 mM dNTP mix、2 U/ $\mu$ L RNase inhibitor、2.5 ng/ $\mu$ L random 9mer、0.05 U/ $\mu$ L AMV 逆転写酵素および 0.5  $\mu$ g の総 RNA を入れ、最終容量が 10  $\mu$ L になるように RNase-free 水を加えた。30°C で 10 分、42°C で 30 分、99°C で 5 分、6°C で 99 分間反応させた。精製し



た complementary DNA (cDNA) は使用するまで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。 mRNA の定量にはリアルタイム PCR 法を用いた。反応は SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ) を用い、Table に示した各プライマーセットの最終濃度が 200 nM になるように調製した。PCR と溶解曲線の作成は、Step one plus Real-Time PCR System (Applied biosystems、米国) を用いて行なった。反応は  $95^{\circ}\text{C}$ 、10 秒で変性させた後、1 サイクルが  $95^{\circ}\text{C}$  で 5 秒、 $60^{\circ}\text{C}$  で 34 秒を 50 サイクル反応させた。増殖後は、融解曲線を作成し、単一生成物であることを確認した。各遺伝子の発現量は comparative Ct 法を用いて解析した。

## 第 11 章 Western blotting

Ried らの方法に従って行った [75]。RIPA lysis 緩衝液 (25 mM Tris-塩酸、150 mM 塩化ナトリウム、1% NP40、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、pH 7.6) にタンパク質分解酵素阻害剤 (アプロチニン 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ベスタチン 13.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ロイペプチン 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ペプスタチン 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AEBSF 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を加え、ホモジナイズ緩衝液とした。 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存していた凍結肝臓にホモジナイズ緩衝液を加え、ポリトロン RT 2100 ホモジナイザー (Kinematica、スイス) を用いてホモジナイズ後、氷上で 30 分静置させた。10,000 x g、 $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心後、得られた上清を再度遠心し、上清を分取した。この上清中のタンパク質量は、標準物質として BSA を用いて、BCA 法に従い測定した。10  $\mu\text{g}$  タンパク質を含む上清を、5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、2% SDS、6% (v/v) グリセロール、0.02% ブロモフェノシルブルーを含む 0.063 M Tris-塩酸 (pH 6.8) に溶解し、 $98^{\circ}\text{C}$  のヒーティングブロックで 5 分間加熱し、泳動サンプルとした。8% または 12% のポリアクリルアミドゲルにサンプルを適用し、濃縮ゲル中は 80 V 定電圧、分離ゲル中は 90 mA 定電流で泳動した。セミドライプロットング装置 (Bio Rad Inc、米国) を使用し、PVDF 膜 (GE Healthcare、英国) に転写した。PVDF 膜はブロッキング緩衝液 (5% スキムミルクおよび 1% BSA を含む TBS-T (0.1% Tween 20、25 mM Tris-塩酸、150 mM 塩化ナトリウム、2.6 mM 塩化カリウム、pH 7.6)) に浸してブロッキングを行った後、抗 ATGL (F-7) マウスモノクローナル IgG 抗体を 12 時間、 $4^{\circ}\text{C}$  で反応させた。TBS-T で 3 回洗浄した後、抗マウス IgG HRP 結合抗体を 2 時間室温で反応させた。再び TBS-T で 3 回洗浄後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare、英国) と反応させ、LAS-1000 (GE Healthcare、英国) を用いて検出した。

## 第 12 章 統計処理

2 群間の比較は、F 検定による分散分析の後、Student の t 検定を用いて行った。3 群以上の比較は、分散分析 (ANOVA) によって、有意性が認められた場合、Sheffé の多重比較検定を用いて行なった。危険率 5% 未満を有意とした。

**Table** Sequences of primers used for real-time PCR

Gene	Primer ( 5'—3' )	Accession No.
FAS	F: CGCCGACCAGTATAAACCCA R: GTTGTAATCGGCACCCAAGTC	M76767
ACC1	F: AACGCCTTCACACCACCTTG R: AGTCGCAGAAGCAGCCCAT	J03808
ACLY	F: AAAGTGTATCGCCCAGGCAGT R: GTAACGCAGCACGTGATCCAT	J05210
ME1	F: ACAATACAGTTTGGCATTCCG R: AGGATTCGCTCTCCATCAGTCA	NM_012600
SCD1	F: TCACCTTGAGAGAAGAATTAGCA R: TTCCCATTCCTTCACTCTGA	J02585
Elovl6	F: AGAACACGTAGCGACTCCGAA R: CAAACGCGTAAGCCCAGAAT	AB071986
Elovl5	F: ACCACCATGCCACTATGCTCA R: GGACGTGGATGAAGCTGTTG	AB071985
Fads1	F: TACAGGCAACCTGCAACGTTT R: GGTGCCACCTTGTGGTAGTTGT	NM_053445
Fads2	F: GCCACTTAAAGGGTGCCTCC R: TGCAGGCTCTTTATGTCCGG	BC081776
DGAT1	F: CCGTGGTATCCTGAATTGGT R: GGCGCTTCTCAATCTGAAAT	NM_053437
DGAT2	F: ATCTTCTCTGTACCTGGCT R: ACCTTTCTTGGGCGTGTTC	NM_001012345
GPAT1	F: AGACACAGGCAGGGAATCCAC R: AATTCCCGGAGAAGCCCAG	AF021348
GPAT4	F: TTGGAGTCCTGGAATTTGCTGA R: GGCTAATCCCTGTGAATGCCA	NM_001047849
FAT/CD36	F: CGAAGGCTTGAATCCTACCG R: TGTTGACCTGCAGTCGTTT	NM_031561
FATP2	F: TTCAACAGTGGCGATCTCCTG R: ACCGGAAGGTGTCTCCAAT	NM_031736
FATP4	F: CCTGGTGTACTATGGATTCCGC R: GCTGAAAACCTTCTCCGGATCA	NM_001100706
FATP5	F: TTGCGAACGTACGGCAAGTAG R: AAGGCGGTCTCGGAAGTAGAAG	NM_024143
FABPpm	F: TCTGCCAATCCTATGCCAA R: CACCCTTTTGGCTTCTTC	NM_013177

FABP1	F: CGGCAAGTACCAAGTGCAGAG R: CTGACACCCCCTTGATGTCCT	BC086947
ACSL1	F: TCAGAGCAGTTCATCGGCATC R: GTCGGTCCAAGCGTGCATA	NM_012820
ACSL3	F: GGTGGCCAAAATGTGACAATG R: AAACCTCTCCAATATCGCCAGT	NM_057107
ACSL5	F: CAAACATGGCTGCTTTCCTCA R: ACCCTGGACAAGCCTCTCAAA	NM_053607
Acot1	F: ACTACGACGACCTCCCCAAGA R: TGGCCACGCAGGTAGTTCA	NM_031315.1
CPT1a	F: AAGGCAGCGTTCCTTCGTGA R: GTCAAAGCATCTTCCATGC	NM_031559
MCAD	F: CTTTGCCTCTATTGCGAAGGC R: TCCGAAAATCTGCACAGCATC	J02791
LCAD	F: TGTATTGGTGCCATAGCCATGA R: CCCAGACCTTTTGGCATTGT	L11276
VLCAD	F: ACAGCTTTCGTAGTGGAACGGA R: CTGGCACCTTGACTCCATCAA	D30647
ATGL	F: TCACCAACACCAGCATCCAA R: TCCATCTCGGTAGCCCTGTTT	NM_001108509
CGI-58	F: TGCATAGATGGCAACTCTGGC R: ATACACATAATGCCCTGCCCC	NM_212524
PGC1 $\alpha$	F: CGATGACCCTCCTCACAC R: TTGGCTTGAGCATGTTGCG	NM_031347
Acox1	F: ACTACGACGACCTCCCCAAGA R: TGGCCACGCAGGTAGTTCA	NM_031315
apoCIII	F: GACAATCGCTTCAAATCCCT R: CGGCTCAAGAGTTGGTGTTG	NM_012501
MTP	F: ACGTGGTATTCCCGCCTCA R: CGTCAAAGCATTTCGTTCTCG	BC012686
LPK	F: TGTGTACCACCGCCAGTTGTT R: AGCACTTGAAGGAAGCCTCCA	M17685
PEPCK	F: TGCCTGGATGAAGTTTGATG R: GCCCGGAGCAACTCCAAAAA	NM_198780
G6Pase	F: CAGCCTCTTCAAAAACCTGG R: GAGCGACTTGCGGAGTTCTC	L37333
GK	F: TGTCACCGACTGCGACATTG R: GCATGCGATTTATGACCCCA	M25807

GLUT2	F: CACACCAGCACATACGACACC R: ACTGCAAAGCTGGACACAGA	NM_012879
SREBP-1c	F: GGAGCCATGGATTGCACATT R: AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA	AF286469
ChREBP	F: AATAGAGGAGCTCAATGCT R: CCCAGAACTTCCAGTTGTGC	AB074517
PPAR $\alpha$	F: AATGCCCTCGAACTGGATGAC R: CACAATCCCCTCCTGCAACTT	NM_013196
LXR $\alpha$	F: CCACAGCTCAGCCCAGAA R: GCGGTGACTCGAAGTCGGT	NM_031627
$\beta$ -Actin	F: TGCAGAAGGAGATTACTGCC R: CGCAGCTCAGTAACAGTCC	V01217

---

## 引用文献

1. Abe S, Ono K, Mogi M, Hayashi T (1998) High-performance liquid chromatographic method for the determination of fenofibric acid and reduced fenofibric acid in human blood, plasma and urine. *Yakugaku Zasshi* 118:447-455
2. Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ (1998) Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 273:5678-5684
3. Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H (2010) Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem* 285:22027-22035
4. Barra J, Taburet AM, Jardel A, Fessi H, Puisieux F (1994) High-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of ethyl clofibrate and clofibric acid in plasma: Evaluation of plasma stability of ethyl clofibrate poly(lactic) nanocapsules in human and rat plasmas. *J Chromatogr B* 661:178-182
5. Barter PJ (2005) Antiatherogenic properties of fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1095-1096
6. Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, Ratziu V, Serfaty L, Housset C, Capeau J, Girard J, Guillou H, Postic C (2012) The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 122:2176-2194
7. Berthelie C, Kergoat M, Portha B (1997) Lack of deterioration of insulin action with aging in the GK rat: a contrasted adaptation as compared with nondiabetic rats. *Metabolism* 46:890-896
8. Bisbis S, Bailbe D, Tormo M-A, Picarel-Blanchot F, Derouet M, Simon J, Portha B (1993) Insulin resistance in the GK rat: decreased receptor number but normal kinase activity in liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265:E807-E813
9. Bjermo H, Risérus U (2010) Role of hepatic desaturases in obesity-related metabolic disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:703-708
10. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
11. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS (2008) Identification of a lipokine,

a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134:933-944

12. Castelein H, Gulick T, Declercq PE, Mannaerts GP, Moore DD, Baes MI (1994) The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J Biol Chem* 269:26754-26758
13. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, More KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* 84:491-495
14. Chen W-L, Chen Y-L, Chiang Y-M, Wang S-G, Lee H-M (2012) Fenofibrate lowers lipid accumulation in myotubes by modulating the PPAR $\alpha$ /AMPK/FoxO1/ATGL pathway. *Biochem Pharmacol* 84:522-531
15. Davies JS, Kotokorpi P, Lindahl U, Oscarsson J, Wells T, Mode A (2008) Effects of the synthetic liver X receptor agonist T0901317 on the growth hormone and thyroid hormone axes in male rats. *Endocrine* 33:196-204
16. Dentin R, Benhamed F, Pégrier JP, Fougère F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, Postic C (2005) Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 115:2843-2854
17. Dixon JL, Furukawa S, Ginsberg HN (1991) Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 266:5080-5086
18. Dongol B, Shah Y, Kim I, Gonzalez FJ, Hunt MC (2007) The acyl-CoA thioesterase I is regulated by PPAR $\alpha$  and HNF4 $\alpha$  via a distal response element in the promoter. *J Lipid Res* 48:1781-1791
19. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, Lawrence JC Jr, Kelly DP (2006) Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  regulatory pathway. *Cell Metab* 4:199-210
20. Food and Drug Administration (2001) Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation.   
<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>>
21. Friedman MI, Harris RB, Ji H, Ramirez I, Tordoff MG (1999) Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *Am J Physiol* 276:R1046-R1053
22. Fruchart JC, Duriez P (2006) Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism. *Drugs Today* 42:39-64

23. Gauguier D, Froguel P, Parent V, Bernard C, Bihoreau MT, Portha B, James MR, Penicaud L, Lathrop M, Ktorza A (1996) Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat Genet* 12:38-43
24. Ge F, Zhou S, Hu C, Lobdell 4th H, Berk PD (2010) Insulin- and leptin-regulated fatty acid uptake plays a key causal role in hepatic steatosis in mice with intact leptin signaling but not in *ob/ob* or *db/db* mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299:G855-G866
25. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A (2010) Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 90:367-417
26. Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U (2008) Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vasc Health Risk Manag* 4:131–141
27. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N (1975) Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Jpn Acad* 51:80-85
28. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N (1976) Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med* 119:85-90
29. Gutiérrez-Juárez R, Pocai A, Mulas C, Ono H, Bhanot S, Monia BP, Rossetti L (2006) Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1686-1695
30. Haemmerle G, Moustafa T, Woelkart G, Büttner S, Schmidt A, van de Weijer T, Hesselink M, Jaeger D, Kienesberger PC, Zierler K, Schreiber R, Eichmann T, Kolb D, Kotzbeck P, Schweiger M, Kumari M, Eder S, Schoiswohl G, Wongsiriroj N, Pollak NM, Radner FP, Preiss-Landl K, Kolbe T, Rüllicke T, Pieske B, Trauner M, Lass A, Zimmermann R, Hoefler G, Cinti S, Kershaw EE, Schrauwen P, Madeo F, Mayer B, Zechner R (2011) ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- $\alpha$  and PGC-1. *Nat Med* 17:1076-1085
31. Heald M, Cawthorne MA (2011) Dual acting and pan-PPAR activators as potential anti-diabetic therapies. *Handb Exp Pharmacol* 203:35-51
32. Hirose A, Yamazaki T, Sakamoto T, Sunaga K, Tsuda T, Mitsumoto A, Kudo N, Kawashima Y (2011) Clofibric acid increases the formation of oleic acid in endoplasmic reticulum of the liver of rats. *J Pharmacol*



Sci 116:362-372

33. Holm C, Østerlund T (1999) Hormone-sensitive lipase and neutral cholesteryl ester lipase. *Methods Mol Biol* 109:109-121
34. Huang J, Jia Y, Fu T, Viswakarma N, Bai L, Rao MS, Zhu Y, Borensztajn J, Reddy JK (2012) Sustained activation of PPAR $\alpha$  by endogenous ligands increases hepatic fatty acid oxidation and prevents obesity in *ob/ob* mice. *FASEB J* 26:628-638
35. Imai K, Koyama M, Kudo N, Shirahata A, Kawashima Y (1999) Increase in hepatic content of oleic acid induced by dehydroepiandrosterone in the rat. *Biochem Pharmacol* 58:925-933
36. Issandou M, Bouillot A, Brusq JM, Forest MC, Grillot D, Guillard R, Martin S, Michiels C, Sulpice T, Daugan A (2009) Pharmacological inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 improves insulin sensitivity in insulin-resistant rat models. *Eur J Pharmacol* 618:28-36
37. Janevski M, Ratnayake S, Siljanovski S, McGlynn MA, Cameron-Smith D, Lewandowski P (2012) Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. *Food Funct* 3:141-149
38. Jump DB (2011) Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14:115-120
39. Kawashima Y, Kozuka H (1982) Increased activity of stearoyl-CoA desaturation in liver from rat fed clofibrilic acid. *Biochim Biophys Acta* 713:622-628
40. Kawashima Y, Kozuka H (1985) Regulation of palmitoyl-CoA chain elongation and linoleoyl-CoA elongation in rat liver microsomes and the differential effects of peroxisome proliferators, insulin and thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* 834:118-123
41. Koo HY, Wallig MA, Chung BH, Nara TY, Cho BH, Nakamura MT (2008) Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1782:341-348
42. Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendić S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR (1997) Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes* 46:2110-2114

43. Kudo N, Toyama T, Mitsumoto A, Kawashima Y (2003) Regulation by carbohydrate and clofibric acid of palmitoyl-CoA chain elongation in the liver of rats. *Lipids* 38:531-537
44. Lankester DL, Brown AM, Zammit VA (1998) Use of cytosolic triacylglycerol hydrolysis products and of exogenous fatty acid for the synthesis of triacylglycerol secreted by cultured rat hepatocytes. *J Lipid Res* 39:1889-1895
45. Lee JN, Zhang X, Feramisco JD, Gong Y, Ye J (2008) Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig-1 at a postubiquitination step. *J Biol Chem* 283:33772-33783
46. Legrand P, Catheline D, Fichot M-C, Lemarchal P (1997) Inhibiting  $\Delta 9$ -desaturase activity impairs triacylglycerol secretion in cultured chicken hepatocytes. *J Nutr* 127:249-256
47. Li M, Fu W, Li X-A (2010) Differential fatty acid profile in adipose and non-adipose tissues in obese mice. *Int J Clin Exp Med* 3:303-307
48. Li S, Liu C, Li N, Hao T, Han T, Hill DE, Vidal M, Lin JD (2008) Genome-wide coactivation analysis of PGC-1 $\alpha$  identifies BAF60a as a regulator of hepatic lipid metabolism. *Cell Metab* 8:105-117
49. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3077-3082
50. Lössner A, Banditt P, Tröger U (2001) Rapid and simple method for detection of fenofibric acid in human serum by high-performance liquid chromatography. *Pharmazie* 56:50-51
51. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
52. Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi J (2006) Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. *J Lipid Res* 47:1928-1939
53. Mandard S, Müller M, Kersten S (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci* 61:393-416
54. Mannaerts GP, Debeer LJ, Thomas J, De Schepper PJ (1979) Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. *J Biol Chem* 254:4585-4595
55. Marcel YL, Christiansen K, Holman RT (1968) The preferred metabolic pathway from linoleic acid to

arachidonic acid *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 164:25-34

56. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N (2001) Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50:1844-1850
57. Masnatta LD, Cuniberti LA, Rey RH, Werba JP (1996) Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed* 687:437-442
58. Matsuoka T, Kajimoto Y, Watada H, Umayahara Y, Kubota M, Kawamori R, Yamasaki Y, Kamada T (1995) Expression of CD38 gene, but not of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, is impaired in pancreatic islets of GK rats. *Biochem Biophys Res Commun* 214:239-246
59. Matsuzaka T, Shimano H (2009) Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *J Mol Med* 87:379-384
60. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, Inoue N, Ishikawa M, Okada S, Ishigaki N, Iwasaki H, Iwasaki Y, Karasawa T, Kumadaki S, Matsui T, Sekiya M, Ohashi K, Hastay AH, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Yatoh S, Sone H, Toyoshima H, Osuga J, Yamada N (2007) Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 13:1193-1202
61. Miller CW, Ntambi JM (1996) Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9443-9448
62. Miyazaki M, Kim Y-C, Ntambi JM (2001) A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J Lipid Res* 42:1018-1024
63. Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Otselberger C, Liu X, Ntambi JM (2007) Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab* 6:484-496
64. Miyazaki M, Kim Y-C, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM (2000) The Biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* 275:30132-30138

65. Morris EM, Meers GM, Booth FW, Fritsche KL, Hardin CD, Thyfault JP, Ibdah JA (2012) PGC-1 $\alpha$  overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced triacylglycerol accumulation and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303:G979-G992
66. Movassat J, Saulnier C, Portha B (1995) Beta-cell mass depletion precedes the onset of hyperglycaemia in the GK rat, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabete Metab* 21:365-370
67. Nakagawa S, Kawashima Y, Hirose A, Kozuka H (1994) Regulation of hepatic level of fatty-acid-binding protein by hormones and clofibric acid in the rat. *Biochem J* 297:581-584
68. Ntambi JM, Miyazaki M (2004) Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 43:91-104
69. Ohneda M, Johnson JH, Inman LR, Unger RH (1993) GLUT-2 function in glucose-unresponsive beta cells of dexamethasone-induced diabetes in rats. *J Clin Invest* 92:1950-1956
70. Ong KT, Mashek MT, Bu SY, Greenberg AS, Mashek DG (2011) Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. *Hepatology* 53:116-126
71. Oshino N, Imai Y, Sato R (1971) A function of cytochrome *b*<sub>5</sub> in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J Biochem* 69:155-167
72. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Özdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-446
73. Poppelreuther M, Rudolph B, Du C, Großmann R, Becker M, Thiele C, Eehalt R, Füllekrug J (2012) The N-terminal region of acyl-CoA synthetase 3 is essential for both the localization on lipid droplets and the function in fatty acid uptake. *J Lipid Res* 53:888-900
74. Rakhshandehroo M, Sanderson LM, Matilainen M, Stienstra R, Carlberg C, de Groot PJ, Müller M, Kersten S (2007) Comprehensive analysis of PPAR $\alpha$ -dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling. *PPAR Res* 2007:26839
75. Reid NB, Ables GP, Otlivanchik OA, Schoiswohl G, Zechner R, Blaner WS, Goldberg IJ, Schwabe RF, Chua SC Jr, Huang LS (2008) Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride

lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J Biol Chem* 283:13087-13099

76. Sajan MP, Standaert ML, Rivas J, Miura A, Kanoh Y, Soto J, Taniguchi CM, Kahn CR, Farese RV (2009) Role of atypical protein kinase C in activation of sterol regulatory element binding protein-1c and nuclear factor kappa B (NFkappaB) in liver of rodents used as a model of diabetes, and relationships to hyperlipidaemia and insulin resistance. *Diabetologia* 52:1197-1207
77. Sapiro JM, Mashek MT, Greenberg AS, Mashek DG (2009) Hepatic triacylglycerol hydrolysis regulates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activity. *J Lipid Res* 50:1621-1629
78. Schweiger M, Lass A, Zimmermann R, Eichmann TO, Zechner R (2009) Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E289-E296
79. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD (1999) Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274:30028-30032
80. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and *ob/ob* mice. *Mol Cell* 6:77-86
81. Soni KG, Mardones GA, Sougrat R, Smirnova E, Jackson CL, Bonifacino JS (2009) Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci* 122:1834-1841
82. Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM (2008) A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E969-E977
83. Straka RJ, Burkhardt RT, Fisher JE (2007) Determination of fenofibric acid concentrations by HPLC after anion exchange solid-phase extraction from human serum. *Ther Drug Monit* 29:197-202
84. Streel B, Hubert, Ph, Ceccato A (2000) Determination of fenofibric acid in human plasma using automated solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *J Chromatogr B* 742:391-400
85. Tanaka S, Yagi Y, Yamazaki T, Mitsumoto A, Kobayashi D, Kudo N, Kawashima Y (2012) Characterization of fatty acid profile in the liver of SHR/NDmcr-cp (*cp/cp*) rats, a model of the metabolic syndrome. *Biol*

Pharm Bull 35:184-191

86. Tietge UJ, Bakillah A, Maugeais C, Tsukamoto K, Hussain M, Rader DJ (1999) Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 40:2134-2139
87. Toyama T, Kudo N, Hibino Y, Mitsumoto A, Nishikawa M, Kawashima Y (2007) Effects of pioglitazone on stearyl-CoA desaturase in obese Zucker fa/fa rats. *J Pharmacol Sci* 104:137-145
88. Turpin SM, Hoy AJ, Brown RD, Rudaz CG, Honeyman J, Matzaris M, Watt MJ (2011) Adipose triacylglycerol lipase is a major regulator of hepatic lipid metabolism but not insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 54:146–156
89. Vial G, Dubouchaud H, Leverve XM (2010) Liver mitochondria and insulin resistance. *Acta Biochim Pol* 57:389-392
90. Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, Nair M, Peters JM, Busik J, Olson LK, Jump DB (2006) Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res* 47:2028-2041
91. Warensjö E, Risérus U, Vessby B (2005) Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia* 48:1999-2005
92. Wei Y, Wang D, Gentile CL, Pagliassotti MJ (2009) Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells. *Mol Cell Biochem* 331:31-40
93. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ (2006) Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E275-E281
94. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR (2000) The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 43:527–550
95. Wong RH, Sul HS (2010) Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol* 10:684-691
96. Wu JW, Wang SP, Alvarez F, Casavant S, Gauthier N, Abed L, Soni KG, Yang G, Mitchell GA (2011)

Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. *Hepatology* 54:122-132

97. Xu Y, Wang L, He J, Bi Y, Li M, Wang T, Wang L, Jiang Y, Dai M, Lu J, Xu M, Li Y, Hu N, Li J, Mi S, Chen CS, Li G, Mu Y, Zhao J, Kong L, Chen J, Lai S, Wang W, Zhao W, Ning G; 2010 China Noncommunicable Disease Surveillance Group (2013) Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *JAMA* 310:948-959
98. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N (1999) A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 274:35840-35844
99. Yamazaki T, Okada H, Sakamoto T, Sunaga K, Tsuda T, Mitsumoto A, Kudo N, Kawashima Y (2012) Differential induction of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2 genes by fibrates in the liver of rats. *Biol Pharm Bull* 35:116-120
100. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386
101. 岡崎啓明 (2013) 細胞内のリパーゼ (HSL・ATGL・NCEH など) *The Lipid* 24:363-403
102. 中川和也 平成 11 年度城西大学修士論文
103. 野村元積 (2013) 生活習慣病と NAFLD/NASH *日本臨床内科医会会誌* 28:37-45
104. 船津和夫、山下毅、本間優、栗原浩次、斗米馨、横山雅子、細合浩司、近藤修二、中村治雄 (2011) 非肥満者と肥満者における脂肪肝とインスリン抵抗性の検討 *人間ドック* 26:37-43
105. 松崎松平 (2007) 生活習慣病としての肝臓病 *日消誌* 104:492-500