

Asashima M, Okochi H. (2007) cell surface marker prominin-1/CD133.
Isolation of murine hair-inducing cells using the J Invest Dermatol. 127(5): 1052-60.

ヒト血管内皮細胞を用いた糖尿病性微小血管症の発症機構解明と 治療法開発

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨

糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえ、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）の研究を進める。血管内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞を用いた。測定する細胞内パラメーターは細胞内 reactive oxygen species (ROS)、血管内皮細胞機能としては索状構造形成能を用いた。さらに、網羅的な解析として、各種血管内皮細胞のブドウ糖濃度変化による遺伝子発現変化をマイクロアレイによって検討した。細胞内 ROS は、ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞を用いて測定したところ、何れの内皮細胞においても high glucose で高い値を得ることができた。ROS の産生部位に関しては、ヒト大動脈内皮細胞ではミトコンドリア、その他の内皮細胞では NADPH オキシダーゼと考えられた。さらに、いずれの血管内皮細胞においても high glucose による索状構造形成能の低下が観察された。以上より、ヒト血管内皮細胞を用いて、ブドウ糖濃度の上昇に伴う細胞障害につながる細胞内機構が再現され、糖毒性の in vitro 解析系が確立された。このような系を用いて網羅的な解析を行ったところ、high glucose による Thioredoxin-interacting protein を初めとする遺伝子の高発現が認められた。一方、以上のような初代培養ヒト血管内皮細胞の限界を補うために、霊長類（サルおよびヒト）胚性幹細胞からの無フィーダー培養による血管内皮細胞の分化誘導を試みて、サル、ヒトいずれの系においても従来よりも極めて効率の高い継代可能な血管内皮細胞を得た。

A. 研究目的

糖尿病の予後を決定するもっとも主重要な要素は合併症であると言っても過言ではない。合併症としては網膜症、腎症、神経症が知られており、いずれも進行すると患者の QOL に深刻な影響を及ぼすこととなる。従って、合併症の発生と進展の分子機序を解明して、その分子を標的とした特異性の高い「分子標的療法」が開発されれば、糖尿病を発症したとしても、その予後は格段に改善する。また、合併症発生の初期の変化をとらえるマーカーやパラメーターが明らかになれば、診断的ならびに患者状態のモニターという面での利点も大きい。

以上のような状況の中で、近年、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえることができるという考え方が広まっている。すなわち、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）が中心的な現象であるという可能性も含めた展開である。

本研究においてはこのような観点から、ヒ

トの血管内皮細胞を用いて糖毒性解析のための in vitro の解析システムを構築して高血糖による血管内皮細胞傷害の機序を解明して、治療法開発や診断マーカー開発につなげたい。

B. 研究方法

血管内皮細胞は、これまでの研究において最も幅広く用いられてきたヒト臍帯静脈内皮細胞の他に、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞も用いて、更に今年度は、合併症臓器である腎臓由来のヒト腎微小血管内皮細胞も追加して、できるだけ普遍的な結果を出すように試みた。

細胞内 reactive oxygen species (ROS) の測定に関しては、以下の如くである。5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 培地（10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF）で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し（ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 6、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 6、ヒト腎微小血

管内皮細胞は day 7 で細胞を回収)、細胞内の活性酸素種、ROS は蛍光プローブ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA (Molecular Probes) を用いて FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン) により測定した。FACS buffer (5% FBS, 0.05% NaN₃, PBS) に懸濁した細胞 5 × 10⁵ 個に終濃度 200 μM の DCFH-DA を添加、蛍光 FL-1 (励起波長 480 nm / 蛍光波長 530 nm) を測定し、mean の値を算出した。ROS 阻害剤として用いた 5 mM N-acetyl-Cysteine; NAC (Sigma) は DCFH-DA を添加する 30 分および 1 時間前より添加した。

索状構造形成能は以下の方法にて行った。5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 5、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 7、ヒト腎微小血管内皮細胞は day 7 で細胞を回収)、Cord formation assay を行った。24 穴プレートに 100 μl の Matrigel (BD Biosciences) を 30 分コートし、内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞は 5 × 10⁴ 個、ヒト微小血管内皮細胞は 6 × 10⁴ 個、ヒト大動脈内皮細胞は 2.5 × 10⁴ 個、ヒト腎微小血管内皮細胞は 6 × 10⁴ 個) をまき、5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EGM-2 (Cambrex) 培地 (2% FBS) で培養 24 時間後に倒立顕微鏡 IX-70 (オリンパス) により観察を行った。

従来の初代培養ヒト血管内皮細胞の限界を打破するために、カニクイザル胚性幹細胞ならびにヒト胚性幹細胞から血管内皮細胞を分化誘導することを試みた。サル ES 細胞は、京都大学再生医科学研究所と田辺製薬で樹立された CMK6 株を用いた。ヒト ES 細胞は、京都大学再生医科学研究所で樹立された KhES-1、KhES-2、KhES-3 の 3 株を用いたが、血管内皮細胞の分化誘導は主に KhES-3 を用いた。未分化維持における無血清培養は 20% KSR

(knockout serum replacement) を用いて行った。培養開始当初はマウス胎児線維芽細胞と共培養し、その後にマトリゲルコート培養皿において noggin、FGF2 を添加して無フィーダー培養を行った。最終的には noggin、FGF2 を添加せずに培養した。血管内皮細胞の分化誘導を行う場合は、サル ES 細胞、ヒト ES 細胞いずれにおいても、当研究室において無血清で未分化維持継代した物を用いた。細胞凝集塊形成は、

hanging drop 法で行った。サイトカインは VEGF、BMP-4、SCF、Flt-3 リガンド、IL-3、IL-6 を用いて 3 日間培養した。その後、形成された胚様体をほぐさずにゼラチンコート培養皿にて平面培養を行った。VE-cadherin、PECAM-1 等の血管内皮細胞特異的表面抗原は BD 社の FACSCalibur により解析した。これらの蛋白および eNOS、von Willbrand factor (vWF) の免疫染色も行った。血管内皮細胞の機能測定は、索状構造形成能と Ac-LDL 取り込み能を検討した。in vivo 内皮機能としては、コラーゲンプラクアッセーを行った。分化した血管内皮細胞を、honeycomb コラーゲンスポンジに封入して、SCID マウスの腹腔中に移植した。35 日後に、FITC デキストランを尾錠注射して、マウス腹腔中の移植部分を取り出して固定し、HE 染色、免疫染色を行った。それぞれ、正立顕微鏡と蛍光顕微鏡により観察して評価した。

C. 研究結果

① 初代培養ヒト血管内皮細胞も用いた糖毒性の系の開発

糖毒性の検定のために、血管内皮細胞を normal glucose (NG : 5.5 mM) と high glucose (HG : 30 mM) の条件で培養して、細胞内 reactive oxygen species (ROS) を測定した。本年度はヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞を用いて測定し、培養期間はそれぞれ 6 日間、11 日間、6 日間、7 日間である。その結果、何れの内皮細胞においても high glucose で高い値を得ることができた。このような高ブドウ糖濃度による細胞内 ROS の増加に関しては、その由来に関してミトコンドリアであるという説と細胞膜の NADPH オキシダーゼであるという 2 種類の学説が存在する。そこで、我々の観察した細胞内 ROS がこれらのいずれであるかを明らかにするために、それぞれの阻害剤での検討を行った。ミトコンドリアの阻害剤 (CCCP、TTFA) ヒト大動脈内皮細胞における ROS 産生を阻害したが、ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞における ROS 産生には作用しなかった。一方、NADPH 阻害剤 (Apocynin) は、ヒト大動脈内皮細胞における ROS 産生には作用しなかったが、ヒト微

小血管内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞における ROS 産生を阻害した。

血管内皮細胞の機能に対する high glucose の影響を明らかにするために、high glucose の索状構造形成能に対する作用を検討した。培養期間はヒト臍帯血静脈内皮細胞は5日間、ヒト微小血管内皮細胞は11日間、ヒト大動脈内皮細胞は7日間、ヒト腎微小血管内皮細胞は7日間である。いずれの血管内皮細胞においても high glucose で索状構造の形成が低下しており、糖毒性が血管内皮細胞の重要な機能に影響を与えていることが示された。

最後に、以上のようなヒト血管内皮細胞の糖毒性における発現変化遺伝子を同定して合併症発生進行機序を解析して合併症診断マーカーを開発するために、cDNA マイクロアレーを駆使した網羅的発現解析を行った。ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞の各培養期間において high glucose によって共通して発現誘導される遺伝子を検討したところ、Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) やインテグリンファミリーの分子 (ITGb4)、凝固線溶系の分子 (tPA, TFPI2) 等が発現上昇することが明らかとなった。TXNIP の増加は、蛋白レベルでも確認できた。

②サル及びヒト胚性幹細胞細胞の無血清・無フィーダー・無サイトカイン環境下での未分化維持継代培養とそこからの無フィーダー血管内皮差分化誘導

サル ES 細胞を3日間の胚様体形成に引き続き、平面培養を行うと、フラスコの底に接着した胚様体は次第に平坦となり周囲に広がり、約2週間後には胚様体が存在した中心付近から囊状の構造物が出現した。囊状構造物の壁とその他の接着細胞を継代培養するとヒト臍帯静脈内皮細胞と形態が類似した細胞に均一に分化した。FACS による細胞表面の抗原解析では VE-cadherin と PECAM-1 が両方陽性の細胞が 20-60%程度認められ、血管内皮細胞であることが確認された。これらの細胞は、索状構造形成能陽性、Ac-LDL 取り込み能陽性で、eNOS、von Willbrand factor (vWF) も陽性の成熟内皮細胞であった。また、in vivo でも内皮細胞機能を発揮した。

次に、ヒト ES 細胞を同様の方法で分化誘導した。サル ES 細胞の時とほぼ同様の経過 (胚様体形成、胚様体接着拡散、囊状構造物) を経

て、血管内皮細胞が産生された。これらの細胞は、索状構造形成能陽性、Ac-LDL 取り込み能陽性で、eNOS、von Willbrand factor (vWF) も陽性の成熟内皮細胞であった。また、in vivo でも内皮細胞機能を発揮した。

D. 考察

今回用いた4種類のヒト初代培養血管内皮細胞、すなわち、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞のすべてにおいて、数日間 (同じヒト血管内皮細胞種により異なり6-11日間) の高ブドウ糖濃度負荷によって細胞内の活性酸素が上昇することが明らかにされた。この結果は、ウシ大動脈内皮細胞を用いての Brownlee らの報告やヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた他の研究グループからの報告と一致する成果で、高血糖が酸化ストレスに結びつくことが確認できた。

高血糖の際の細胞内 ROS がどこから発生するかに関しては、ミトコンドリア由来という学説と細胞膜 NADPH オキシダーゼ由来という学説が混在している。両者の機構は全く異なり、機序の解明と分子標的の探索のためにはどちらであるかを解明することが必須である。今年度の解析により、ヒト大動脈内皮細胞においてミトコンドリア由来、その他のヒト内皮細胞では細胞膜 NADPH オキシダーゼ由来であることが強く示唆された。したがって、Brownlee らのウシ大動脈内皮細胞を用いての研究からミトコンドリア説が提唱され、その他の多くの研究らがヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて NADPH オキシダーゼを唱えたことは、動物の種差による現象ではなくて内皮細胞の種類による現象と考えられる。同じ内皮細胞でも異なる分子機序は不明であるが、治療の標的が明らかになった点は、大きな進歩である。

索状構造形成能は、血管内皮細胞機能の測定系の1つとして多くの研究者に用いられており、今回、この機能が高ブドウ糖濃度培養によって、検討した4種類の血管内皮細胞すべてにおいて阻害されたことは注目すべき結果である。高血糖による血管内皮障害の1つの系として意義深いものと考えられる。現在、ROS の阻害や細胞内刺伝達の阻害によって、高ブドウ糖濃度誘導の索状構造形成障害が回

復するか否か検討中である。

網羅的な遺伝子発現解析は、高ブドウ糖濃度によって酸化ストレスが増大して内皮機能が低下している細胞の状態の分子機構を解明する上で極めて有用な手段で、さらには治療の分子標的や血管内皮からみた合併症の診断マーカーの探索にも貢献しうる解析手法である。本年度は、ヒト臍帯静脈内皮細胞とヒト大動脈内皮細胞に関して、その培養期間中の遺伝子発現変化を解析して、幾つかの発現増加遺伝子を明らかにした。中でも、4種類のヒト内皮細胞に共通して高ブドウ糖濃度において著明に発現増大していた分子は

Thioredoxin-interacting protein と呼ばれる分子である。この分子は、**Thioredoxin** の作用を阻害して細胞内の酸化抑制作用を低下させる方向に働き、既に高ブドウ糖濃度との関連も示唆されている。すなわち、高ブドウ糖濃度による酸化ストレスの1つの機序として注目すべき分子である。今後は、特異的阻害実験や低分子阻害剤のスクリーニングを行う予定である。

本研究においては、4類のヒト初代培養血管内皮細胞、すなわち、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞を用いて研究を進めた。複数のヒト初代培養血管内皮細胞を用いている研究は少なく、今回の成果の意義は大きい。今後は合併症が惹起されるもう一つの臓器である網膜のヒト初代培養血管内皮細胞を入手して研究を広げることが必要である。また、ヒト初代培養血管内皮細胞の限界を考慮して、霊長類胚性幹細胞から分化誘導された血管内皮細胞を用いて極めて独自の研究を進めることも重要である。現在、サル胚性幹細胞のみならずヒト胚性幹細胞からも安定して高効率に血管内皮細胞が分化誘導できる段階に至った。今後は、培養液中のブドウ糖濃度を下げて、現在の系に使用できるようにする予定である。

E. 結論

糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえ、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）の研究を行った。血管内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト

腎微小血管内皮細胞を用い、測定する細胞内パラメーターは細胞内 **reactive oxygen species (ROS)**、血管内皮細胞機能としては索状構造形成能を用いた。さらに、網羅的な解析として、各種血管内皮細胞のブドウ糖濃度変化による遺伝子発現変化をマイクロアレイによって検討した。その結果、細胞内 **reactive oxygen species (ROS)** は、ヒト大動脈内皮細胞においてはミトコンドリア阻害剤により、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞においては、**NADPH** オキシダーゼ阻害剤によって阻害され、細胞の種類によって ROS 産生部位が異なることが明らかとなった。以上より、ヒト血管内皮細胞を用いて、ブドウ糖濃度の上昇に伴う細胞障害につながる細胞内機構が再現され、糖毒性の *in vitro* 解析系が確立された。このような系を用いて網羅的な解析を行ったところ、**Thioredoxin-interacting protein** を初めとする遺伝子の高発現が認められ、酸化ストレスの関与が一層明らかとなった。さらに、以上のような初代培養ヒト血管内皮細胞の限界を補うために、霊長類胚性幹細胞からの、従来よりも極めて効率の高い継代可能な血管内皮細胞を得て、我々の系に使用すべく準備を行っている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A: The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *J Electrophoresis* 51:1-8, 2007.

2. 学会発表

1. 中原正子、過足芳子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、佐伯久美子、湯尾明：サル・ヒト ES 細胞からの無フィーダー培養による高効率な血管内皮

細胞分化法の開発。第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会・合同総会、2007年10月、横浜。

2. 中原正子、過足芳子、佐伯久美子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、小柳 真、近藤 靖、末盛博文、中辻憲夫、湯尾 明：霊長類（サル、ヒト）ES細胞からの無フィーダー培養による高効率な血管内皮細胞分化誘導法の開発－各サイトカインの役割の検討及びin vivoでの機能評価－。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会、2007年12月、横浜
3. 中村直子、過足芳子、中原正子、佐伯久美子、小柳 真、松山さと子、小柳明美、八木田秀雄、湯尾 明：霊長類胚性幹（ES）細胞からの高効率な血管内皮細胞分化。第7回日本再生医療学会総会、2008年3月、名古屋。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国際特許

霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺三菱製薬株式会社

PCT/JP2007/71811

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖尿病モデルを用いた個体レベルの病態解析

分担研究者 岡村 匡史 国立国際医療センター研究所・室長

研究要旨：LEA/Sendai ラットは Long-Evans Agouti (LEA)ラットコロニーから分離した非肥満型糖尿病モデルラットであり、このラットでは早期からインスリン分泌不全に起因する耐糖能の著しい低下が観察される。本研究では、このラットのインスリン分泌不全病態に着目し、これらの病態を引き起こす原因遺伝子の同定を目指し、量的形質遺伝子座解析を行った。F2 個体群における量的形質遺伝子座解析により、糖負荷後 30 分血糖値において第 1 染色体上に **significant level** を超える QTL が同定された。交配実験および病態解析により、この領域に存在する疾患遺伝子は膵 B 細胞の質的な機能に関わる遺伝子に変異があると推測され、優性あるいは半優性の遺伝子が関わっている事が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合う多因子疾患である。その病像は多彩でしかもきわめて長い経過を経て発症・進展し、病態が変遷していく。そのため、交配や飼育条件の操作により、遺伝因子と環境因子の効果を経時的に調べることができるモデル動物は、糖尿病研究において非常に有用なツールである。我々は非肥満とインスリン分泌能低下を主徴とし、日本人ヒト 2 型糖尿病に酷似した非常にユニークなモデルラット

(LEA/Sendai) を新たに開発した。本研究では、LEA/Sendai ラットのインスリン分泌不全病態を規定する遺伝子の同定を目指し、糖負荷後血糖値に関する量的形質遺伝子座

(Quantitative trait locus; QTL) 解析を行った。

B. 研究方法

(1) 動物

LEA/Sendai ラットは、1996 年東北大学医学部（現大学院医学系研究科）附属動物実験施設にて飼育されていた Long-Evans Agouti (LEA)ラットコロニーから多飲多尿個体として発見された。その後、このコロニーのラットに対し糖負荷試験を行い、120 分血糖値が

200mg/dl 以上の雄ラットを選び、兄妹交配により系統化した。2005 年に国立国際医療センター研究所動物実験施設に導入し、以後も同様に兄妹交配により系統維持している。対照群は、Brown Norway (BN) ラット (Japan SLC Inc.) を用いた。すべての動物は Specific Pathogen Free (SPF)で飼育され、照明は 12 時間の明/暗サイクル、飼育室の温度は $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿 $40 \pm 10\%$ であった。飼料 (CE2 standard diet; 346.8kcal/100g; CLEA Japan Inc.) および水は自由摂取させた。

(2) 経口糖負荷試験および血中インスリン濃度の測定

16-17 時間絶食させたラットに、グルコース 2 g/kg 体重になるよう経口投与し、0、30、60、90 および 120 分後にそれぞれ尾静脈から採血した。血糖値はグルテスト R 血糖測定機 (Sanwa kagaku kenkyusho, Co., Ltd) で測定した。血中インスリン濃度は遠心により血漿を分離後、インスリン測定キット (Morinaga Milk Industry Co., Ltd) を用いて、ELISA 法により同定した。

(3) 耐糖能関連量的遺伝形質の QTL 解析

LEA/Sendai ラットと非糖尿病の BN ラットを交配し、F2 世代 207 匹を作成した。生後 8

週齢の個体に対し、16 時間絶食後経口糖負荷試験を行い、血糖値を測定した。F2 個体の遺伝子型は、201 個のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型を決定し (表 1)、糖負荷後の血糖値および血糖曲線下面積を量的形質として Map ManagerQTX を用いて QTL 解析を行った。有意水準は Permutation test (1-cM steps for 5,000 permutations)により求めた。likelihood ratio statistics (LRS) score を 4.61 で割り、LOD score に変換した。

(倫理面への配慮)

動物実験を行う際には、動物実験計画書を国立国際医療センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた後実施した。動物実験の実施に当たっては、「国立国際医療センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、実験動物に無用な苦痛を与えないよう麻酔薬の投与、保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じ適切な処置を講じた。

C. 結果

LEA/Sendai と BN ラットの F1 に経口糖負荷試験を行ったところ、F1 は両系統のほぼ中間の表現型になった (図 1)。親系統の雌雄の組み合わせ (SB, BS) を変えても F1 の特徴は変わらなかった。これらの結果から、LEA/Sendai ラットのインスリン分泌能低下は優性あるいは半優性遺伝子が関与していることが示唆された。これらの遺伝子を同定するため、LEA/Sendai ラットと BN ラットの F2 個体を作成し、糖負荷後血糖値に関する QTL 解析を行った。

8 週齢の F2 個体群 207 匹に OGTT を行ったところ、30 分血糖値は 95~249mg/dl までの切れ目のない連続した形質値を示し、糖負荷後の血糖値は量的形質であることが明らかとなった (図 2)。量的形質は複数の遺伝子が関与した多因子疾患の特徴であるため、LEA/Sendai ラットの耐糖能異常は、単

一ではなく複数の遺伝子が関与していることがわかった。

F2 個体群における、絶食時血糖値、糖負荷 30 分、60 分および血糖曲線下面積 (AUC) を量的形質として、Interval mapping (区間マッピング) を行った結果、30 分値血糖値で第 1 染色体上に significant level を超える QTL が同定された (図 3, Peak LOD score of 4.6)。AUC においても同様に suggestive level を超える QTL が同定された (Peak LOD score of 3.0)。空腹時および 60 分血糖値では、suggestive level を超える QTL は同定されなかった。

QTL が同定された領域は、マウス第 7 番染色体とシンテニーがあり、この領域には糖尿病およびインスリン分泌に関わる Gipr (gastric inhibitory polypeptide receptor)、Ffar1 (Free fatty acid receptor 1, GPR40, G-protein coupled receptor 40)、Kcnj11 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11; Kir6.2) および Abcc8 (ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8; SUR1) 遺伝子が存在していた。これらの遺伝子は有力な候補遺伝子となるため塩基配列を決定したところ、Gipr 遺伝子において、アミノ酸置換を伴う塩基置換を同定した。Ffar1 および Kcnj11 遺伝子の変異は同定されなかった。さらに QTL 近傍に糖尿病モデル OLETF および GK ラットで変異が報告されている G-protein-coupled receptor 10 (GPR10) 遺伝子の塩基配列を調べたところ、これらの糖尿病モデルラットと同様、転写開始コドン ATG が ATA に変異していた。

D. 考察

ヒトの 2 型糖尿病では、グルコース負荷に対する「早期インスリン分泌」が、遺伝的に規定され、かつ将来の糖尿病発症リスクを高める形質として注目されている。さらに、日本人 2 型糖尿病の 70~80% が遺伝的・体質的素因によるインスリン分泌不全から糖尿病を発症するとされている。本研究では、

LEA/Sendai ラットの若齢から観察されるインスリン分泌不全病態に着目し、これらの病態を規定する関連遺伝子の同定を目指し、8週齢においてQTL解析を行った。4および8週齢の病理学的検索では、雌雄とも膵島に顕著な病変は見られず、膵B細胞の割合、膵B細胞の大きさもコントロールと比べ、有意な差はないことが明らかとなっている。膵臓あたりのインスリン含量にも顕著な減少は観察されないことから、LEA/Sendai ラットでは、膵島の量やインスリン含有量を規定する遺伝子ではなく、膵B細胞の質的な機能に関わる遺伝子に変異があると推測された。さらに、F1世代の糖負荷後血糖値を測定すると、興味深いことに8週齢F1ラットでは、LEA/SendaiとBNラットのほぼ中間の血糖値を示した(図1)。このことから若齢に見られるインスリン分泌低下およびこれに起因すると考えられる耐糖能の低下は、劣性遺伝子ではなく、優性あるいは半優性の遺伝子が関わっている事が示唆された。

これまでに行った研究で、12ヶ月齢のF2個体を用いた糖負荷後血糖値に関する量的形質遺伝子座(QTL)解析により、空腹時血糖値と関連するQTLが第1染色体(LOD score = 4.71, significant)上に同定されている。LEA/Sendai ラットのインスリン分泌不全病態に着目し、若齢で行った本研究においても、高齢ラットで行ったときとほぼ同様の位置にsignificant levelを超えるQTLが同定された(図3)。この領域にはGipr, Ffar1(GPR40), Kcnj11, Abcc8など糖尿病との関連性を示す遺伝子が存在している。Gipr(gastric inhibitory polypeptide receptor)は十二指腸および小腸のK細胞から分泌されるインクレチン(gastric inhibitory polypeptide: GIP)の受容体である。GIPは膵β細胞に対してグルコース濃度依存的にインスリン放出を刺激し、また膵外では脂肪細胞に作用し、糖・脂質の取り込みを促進する。インスリン分泌促進作用は膵β細胞におけるGIPの主な生理作用であり、摂食後のインスリン分泌に大きく関与している。

Ffar1(Free fatty acid receptor 1, GPR40, G-protein coupled receptor 40)は膵β細胞に高発現する遊離脂肪酸の受容体である。中長鎖脂肪酸により活性化され、脂肪酸が結合することにより細胞内のカルシウム濃度が上昇し、インスリン分泌を促進する。Kcnj11(potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11; Kir6.2)は内在性膜タンパク質で、内向整流性カリウムチャンネルを構成する。Gタンパク質に制御され、スルホニル尿素受容体(SUR)1と機能的に共役して膵β細胞K_{ATP}チャンネルを構成しており、インスリン分泌調節において重要な役割を担っている。さらにAbcc8(ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8; SUR1)は細胞内ループに2カ所の核酸結合領域を有するABCトランスポータースーパーファミリーの一つである。膵β細胞のK_{ATP}チャンネルは4分子のSUR1サブユニットと4分子のKir6.2サブユニットから構成されるヘテロ8量体である。よってKcnj11同様インスリン分泌調節において重要な役割を担っている。上記遺伝子の塩基配列を解読した結果、Gipr遺伝子において、アミノ酸置換を伴う塩基置換を同定した。しかしながら、腹腔内糖負荷試験においても、著しい耐糖能低下および血中インスリン濃度の低下が観察された。このことから、Gipr遺伝子のアミノ酸置換が他の遺伝子と協調して病態を増悪させている可能性はあるものの、直接的にインスリン分泌不全病態に関与している可能性は低いと考えられた。

第1染色体のQTL領域近傍に糖尿病モデルOLETFおよびGKラットで変異が報告されている。G-protein-coupled receptor 10 (GPR10)遺伝子の塩基配列を調べたところ、これらの糖尿病モデルラットと同様、転写開始コドンATGがATAに変異していた。Gpr10は摂食中枢に発現し、主に摂食量をコントロールしている。さらに、クローズドコロニーのWistar, SD, LE系統でも0.14-0.89の頻度でATAアリルを持っている。LEA/Sendai ラットの摂食量はコントロール系統と比べて有意な差はなく、

LEA/Sendai ラットの主要な変異でないと判断したが、この変異は2型糖尿病モデルラットに広く存在するため興味深い。

E. 結論

LEA/Sendai ラットの若齢から観察される耐糖能およびインスリン分泌能低下は、優性あるいは半優性の遺伝子が関わっている事が示唆されており、またこれらの遺伝子は、膵島の量やインスリン含有量を規定する遺伝子ではなく、膵B細胞の質的機能に関わる遺伝子変異であることが明らかとなった。さらに、その病態は複数の遺伝子によって規定される量的形質であり、そのうちの1つは第1染色体上に位置していることがわかった。今後、この領域を組み込んだコンジェニック系統を作成し、候補領域を狭小化するとともに、ポジショナル候補遺伝子アプローチにより、日本人に多いとされるインスリン分泌不全病態を新たな規定する遺伝子の同定を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y., Kawai, J., Matsushima, S., Kawakami, H., Watanabe, T., Akagawa, K. and Nagamatsu, S. : Imaging analysis reveals mechanistic differences between first and second phase insulin exocytosis. *J. Cell. Biol.*, 177, 695-705 (2007).

2. 学会発表

(国内)

1. 岡村匡史、矢延理絵子、清水有紀子、笠井憲雪：インスリン分泌不全型糖尿病モデル LEA/Sendai ラットの病態解析、第17回 LEC ラット研究会、東京、5月、2007
2. 岡村匡史、矢延理絵子、新矢恭子、谷口繁生、清水有紀子、安田和基、笠井憲雪：非

肥満型糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットを用いた耐糖能異常関連遺伝子の探索、第143回日本獣医学会学術集会、つくば、4月、2007

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

Oral Glucose Tolerance Test (2g/Kg glucose) for F1 progeny

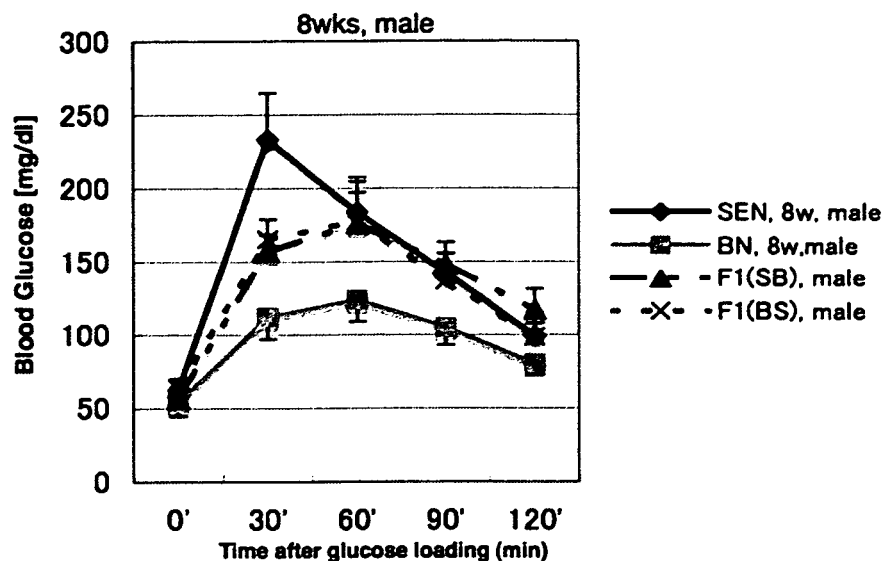


図1 経口糖負荷後の血糖値

LEA/SendaiとBNラットのF1に経口糖負荷試験を行ったところ、F1は両系統のほぼ中間の表現型になった。親の雌雄の組み合わせ (SB, BS) を変えてもF1の特徴は変わらなかった。

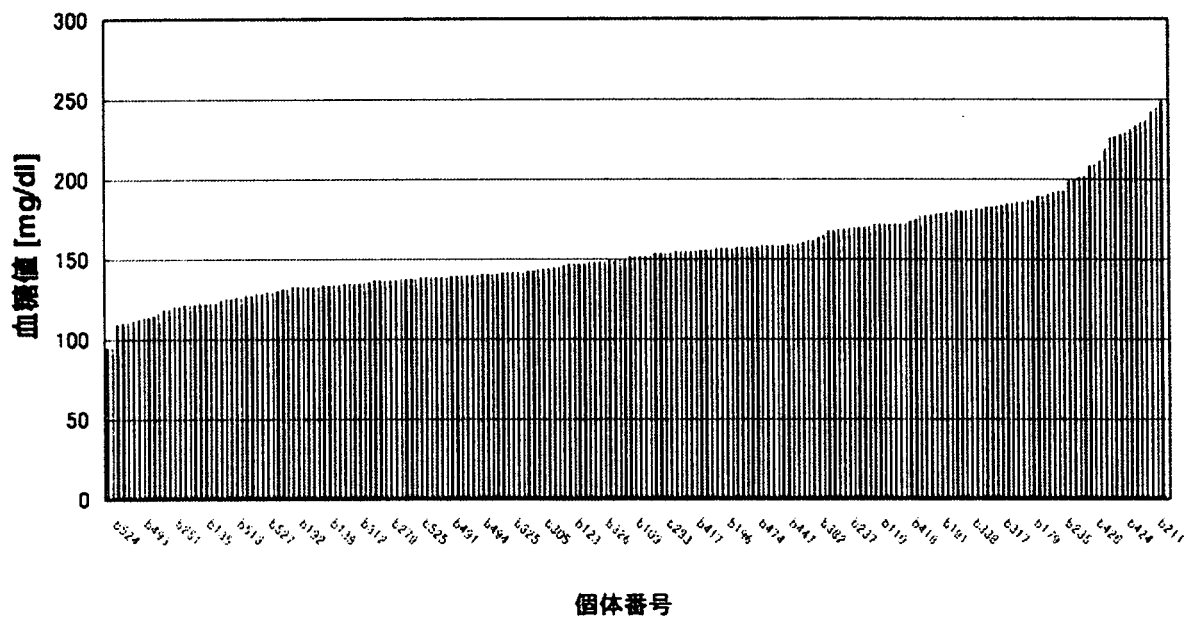


図2 8週齢F2各個体の糖負荷後30分における血糖値

血糖値が低い個体から高い個体に順に並べると、境界が不明瞭な曲線になった。糖負荷30分血糖値の最も低い個体は95mg/dl、高い個体は249mg/dlであった。

LOD Score Plots for Blood Glucose

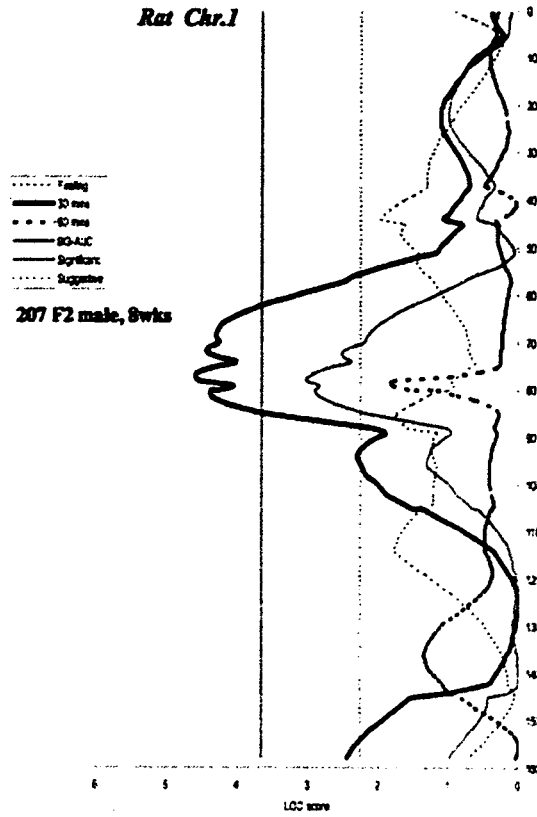


図3 207匹の8週齢F2ラットを用いたQTL解析。糖負荷0、30、60分後血糖値およびAUCを量的形質とした。その結果、糖負荷後30分血糖値でsignificantを超えるQTLがマップされた。

表1 QTL解析に使用したマイクロサテライトマーカー

染色体	マーカー数	マーカー名
1	24	d1rat246, d1mgh17, d1rat389, d1rat403, d1mit10, d1mit1, d1rat24, d1rat27, d1rat344, d1rat269, d1rat38 d1rat271, d1rat418, d1rat158, d1mgh19, d1mit12, d1rat139, d1rat56, d1rat67, d1rat70, d1rat169 d1rat79, d1rat81, d1rat90
2	13	d2rat189, d2rat6, d2mit5, d2rat163, d2mit17, d2rat136, d2rat115, d2mit8, d2rat40, d2mgh12, d2rat61 d2rat112, d2mit16
3	12	d3rat52, d3rat117, d3rat46, d3rat188, d3rat130, d3mgh6, d3rat35, d3rat160, d3mit3, d3rat145, d3rat142, d3mgh10
4	14	d4rat149, d4rat11, d4rat157, d4rat119, d4rat265, d4rat175, d4rat182, d4rat273, d4rat238, d4rat198, d4arb40 d4rat203, d4rat70, d4rat207
5	11	d5rat126, d5rat2, d5rat3, d5rat4, d5mit10, d5rat113, d5rat154, d5rat30, d5mgh8, d5rat89, d5rat51
6	10	d6mit5, d6rat41, d6rat148, d6rat34, d6rat132, d6rat20, d6rat14, d6rat11, d6rat8, d6rat109
7	8	d7rat113, d7rat31, d7rat92, d7rat73, d7mit5, d7mgh6, d7rat85, d7rat3
8	9	d8rat55, d8mit5, d8rat47, d8rat80, d8mgh7, d8mgh4, d8rat130, d8rat90, d8rat3
9	13	d9rat44, d9rat133, d9rat129, d9rat76, d9mit3, d9rat11, d9rat84, d9rat5, d9rat4, d9rat110 d9rat153, d9rat108, d9rat71
10	9	d10rat95, d10rat121, d10rat181, d10rat42, d10rat34, d10mgh6, d10rat151, d10rat122, d10rat7
11	7	d11mit4, d11rat21, d11rat18, d11rat10, d11mgh4, d11mgh3, d11rat43
12	6	d12rat58, d12rat40, d12rat39, d12rat23, d12rat15, d12rat52
13	6	d13rat2, d13mgh4, d13rat25, d13mit2, d13mit5, d13mit4
14	10	d14rat1, d14mit2, d14rat36, d14rat16, d14mit4, d14rat40, d14rat57, d14rat94, d14rat38, d14rat132
15	10	d15rat69, d15mgh7, d15rat5, d15rat85, d15mgh8, d15mgh4, d15mgh9, d15rat26, d15mgh5, d15rat29
16	6	d16mgh4, d16rat9, d16rat67, d16rat65, d16rat34, d16rat37
17	9	d17rat2, d17rat8, d17rat14, d17rat15, d17mgh5, d17rat34, d17rat37, d17rat130, d17rat47
18	6	d18rat62, d18mit1, d18mit8, d18rat60, d18rat8, d18rat77
19	8	d19rat28, d19rat17, d19rat15, d19rat73, d19mit9, d19rat68, d19rat7, d19rat60
20	6	d20rat32, d20mgh5, d20rat3, d20rat7, d20rat39, d20rat29
X	4	dxrat2, dxrat8, dxrat64, dxrat102
Total	201	

運動トレーニング(定期的な運動)は糖尿病、肥満予防に効果がある。その効果に運動による β アドレナリン受容体の刺激が関与しているかどうか検討した。野生型マウスは高脂肪食を食べていても毎日運動を行うことにより体重増加が抑制されたが、 β 受容体を持たない β レスマウスではその効果は認められなかった。 β レスマウスでは運動時のエネルギー消費量、脂肪組織での脂肪分解能は正常であったが、運動トレーニングによる安静時代謝量の亢進が認められなかった。運動トレーニングの抗肥満効果に β アドレナリン受容体の刺激が重要な役割をもつことが明らかになった。

筋肉GLUT4を増加させる薬剤を検索中、PPAR α 活性化剤(fenofibrate, gemfibrozol, 又は、Wy14643)が筋肉特異的にGLUT4の発現量を増加させることを見いだした。この作用はPPAR α ノックアウトマウスでは認められず、PPAR α 依存性であった。PPAR α 活性化剤のインスリン抵抗性改善効果の一部に筋肉でのGLUT4量増加が寄与することが推定された。

A. 研究目的

高脂肪食摂取や運動不足によって生じる肥満は、糖尿病発症の原因の一つである。運動トレーニングは肥満・糖尿病を予防する有効な手段であり、その機序として運動自体の消費エネルギー増大、運動トレーニングによる生体の質的变化(筋肉での代謝亢進、GLUT4量の増加)が考えられているが、分子機序は明らかでない。一方、交感神経系の興奮は熱産生を刺激し、エネルギー消費量を増加させる。また、白色脂肪組織に蓄えられている中性脂肪が遊離脂肪酸として血中に放出される反応にも関与する。また、骨格筋は脂質を消費する主要な組織であり、筋肉中のミトコンドリアはその反応の場である。前年度の研究で、 β 受容体刺激が骨格筋のミトコンドリア生合成促進因子であるPGC-1 α の発現量を増加させること、運動によるPGC-1 α の発現量増加にも β 受容体が関与していることを明らかにした。従って、交感神経系の興奮は食事由来、あるいは白色脂肪組織に蓄えられた脂肪を、褐色脂肪組織や筋肉で酸化させることによ

り、減少させる作用を有すると考えられる。そこで、本研究では、運動トレーニングによる肥満抑制作用に、交感神経系興奮、特に β アドレナリン受容体刺激が関与するかを、3種類(β 1, β 2, β 3)のアドレナリン受容体すべてを欠損した β レスマウスを用いて検討した。

運動トレーニングはglucose transporter 4 (GLUT4)の発現量を増加させる。又、筋肉でのGLUT4過剰発現マウスでは高脂肪食や遺伝による糖尿病発症が認められないことが報告されていて、運動によるGLUT4発現増加は運動トレーニングによる糖尿病予防効果の主因と考えられている。筋肉でAMPKの減弱したAMPK-DNマウスやPGC-1 α 過剰発現マウスを用いた今までの研究では、AMPK活性化やPGC-1 α 増加だけではglucose transporter 4 (GLUT4)の発現量増加は説明できない。今回偶然、PPAR α 活性化剤に筋肉特異的にGLUT4発現量を増加させる作用があることを見いだした。

B. 研究方法

運動の肥満抑制作用への交感神経系の役割

8週齢の雄性野生型と β レスマウスにそれぞれ、脂肪エネルギー比57%の高脂肪食を与えながら、「運動トレーニングをさせる群（運動群）」と特に運動を強くない「安静群」に分けて、体重変化を調べた。また、対照として高炭水化物(HC)食を与えて運動を強くない群を設けた。試験終了時（第8週）にはDEXAを用いて体組成変化を測定した。また、解剖時に脂肪組織などの組織重量を測定した。又、各群マウスについてエアタイトトレッドミルを用い、1回の運動時の酸素消費量と二酸化炭素排出量を間接カロリーメトリー法により測定し、呼吸商を算出した。一回の運動時の脂肪組織での脂肪分解の程度を調べるため、運動直後の血中FFAとglycerolの濃度を測定した。

PPAR α 活性化剤による骨格筋でのPGC-1 α 発現増加

臨床でよく使用されているPPAR α 活性化剤、fenofibrateを各種濃度で1週間（濃度依存性）、0.5% (wt/wt)の濃度で投与期間（期間依存性）を変えてマウスに投与し、筋肉でGLUT4発現量を測定した。0.5% (wt/wt)の濃度で1週間投与後、経口糖負荷テスト、インスリン感受性試験を行った。他のPPAR α 活性化剤の効果を調べるとともに、PPAR α ノックアウトマウスでPPAR α 活性化剤投与により、GLUT4の発現が増加するかどうか調べた。

C. 研究結果

運動の肥満抑制作用への交感神経系の役割

高脂肪食負荷した安静群ではいずれのマウスでも同じように体重や体脂肪は増加したが、運動をさせた群では野生型マウスでは体脂肪が減少したのにもかかわらず、 β レスマウスでは体脂肪は減らなかった（図1）。運動食後時の血中脂肪酸、グリセロールの増加は β レスマウスでもwild-type (WT) miceと同程度認められ、lipolysisは障害されていなかった（図2）。

1回の運動による酸素消費量にも差は認められなかったが、 β レスマウスでは安静時の酸素消費量が野生型と比較し減少していた（図3）。運動トレーニングを行うと野生型では安静時代謝量は亢進したが β レスマウスでは安静時代謝量の亢進は認められなかった。その原因を骨格筋や褐色脂肪細胞でのエネルギー代謝に関与する遺伝子発現量を調べることにより推定した。野生型で、運動トレーニング後認められる褐色脂肪細胞の脂肪燃焼関連遺伝子発現の増加が β レスマウスでは認められなかった（図4）。骨格筋においては著明な変化は認められなかった。

PPAR α 活性化剤による骨格筋でのPGC-1 α 発現増加

PPAR α 活性化剤、fenofibrateを各種濃度で1週間投与した所、0.3% (wt/wt)以上の濃度から有意なGLUT4mRNAの発現増加が認められ、濃度依存的に発現量は増加した（図5）。しかし、摂食量の減少が認められたため、pair feedingを行い、同じ摂取カロリーの条件で以下の実験を行った。Fenofibrateを0.5% (wt/wt)で経口投与した場合、GLUT4の増加は投与2日後から認められ、1週間でその値は安定した。投与1週間後の糖負荷テストでは血糖値の上昇が抑制され、インスリントレランステストではインスリン感受性の亢進が認められた。

GLUT4の発現増加作用は他のPPAR α 活性化剤、gemfibrozilやwyl4643でも認められた（図6）。FenofibrateのGLUT4発現増加作用は雌のPPAR α knockout miceでは認められず、雄のPPAR α knockout miceでは50%程度阻害された（図7）。

（倫理面への配慮）

研究所の動物管理規約に従い研究を行っている。また、動物に苦痛を与えないため、ネンブタール麻酔下で解剖を行なった。

D. 考察

運動の肥満抑制作用への交感神経系の役割

運動トレーニングは体重増加を効果的に抑制する。今回、緩い条件で運動トレーニングを行ったのにもかかわらず、野生型マウスでは、高脂肪食によって誘発される体重増加を有意に抑えることができた。一方、 β レスマウスでは運動トレーニングによる体重減少効果が認められず、運動トレーニングによる体重増加抑制作用に β 受容体が必要なことがわかった。さらに、運動トレーニングによる安静時代謝量の増加に β 受容体が必要であることが示唆された。今後、運動トレーニングによってエネルギー消費量が増加するが、その変化にはどの臓器が関与しているのかを明らかにしていく必要がある。遺伝子の発現からは褐色脂肪細胞が運動トレーニングによってエネルギーを消費し易い状態になることが推定された。

PPAR α 活性化剤による骨格筋でのPGC-1 α 発現増加

筋肉でGLUT4量を増加させる薬剤は見いだされていなかったが、臨床でよく使用されているPPAR α 活性化剤に高濃度であるが、GLUT4発現を増加させる作用があることを見いだした。このGLUT4発現増加させる作用はPPAR α 依存性であった。GLUT4の発現調節部位にPPAR α 結合エレメントは見つかっておらず、PPAR α を介した間接的な作用と考えられる。

E. 結論

野生型マウスは高脂肪食を食べていても毎日運動を行うことにより体重増加が抑制されたが、 β 受容体を持たない β レスマウスではその効果は認められなかった。体脂肪量も野生型では運動トレーニングで増加が抑制されたが、 β レスマウスでは抑制されなかった。運動トレーニングの抗肥満効果に β アドレナリン受容体の刺激が重要な役割をもつことが明らかになった。PPAR α 活性化剤に、筋肉組織のGLUT4

発現を増加させる作用があることを見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to exercise is mediated by β -adrenergic receptor activation.** Miura S, Kawanaka K, Kai Y, Tamura M, Goto M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Ezaki O. An Increase in Murine Skeletal Muscle Activation. *Endocrinology*. 2007; 148(7): 3441-3448
- 2) **Fish oil prevents sucrose-induced fatty liver but exacerbates high-safflower oil-induced fatty liver in ddy mice.** Yamazaki T, Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O. *Hepatology* 2007; 46(6): 1779-1790
- 3) **Studies of UCP2-transgenic and -knockout mice reveal that liver UCP2 is not essential for the anti-obesity effects of fish oil.** Tsuboyama-Kasaoka N, Sano K, Shozawa C, Osaka T, Ezaki O. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: (3): E600-E606
- 4) **Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of RXR/LXR and FOXO1.** Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai S, Sugita S, Katsumata A, Aburatani H, Unterman TG, Ezaki O. Ogawa Y. *Endocrinology* 2008; in press

2. 学会発表

- 1) **肥満予防のための骨格筋の役割** 江崎治第61回日本栄養・食糧学会大会/

日本栄養・食糧学会創立60周年記念式典. 2007.05.19, 京都

- 2) **ゾンデ投与によるアルコール性脂肪肝発症モデルマウスの作成** 和田智史, 山崎聖美, 中森明子, 佐々木江梨子, 川野因, 江崎治. 第61回日本栄養・食糧学会大会. 2007.05.20, 京都
- 3) **Increase in Murine Skeletal Muscle PGC-1 alpha mRNA in Response to Exercise Is Mediated by Beta2- Adrenergic Rec eptor Activation.** Miura S, Kawanaka K, Ezaki O, An American Diabetes Association, 67th Scientific Sessions. 2007 .06 .24
- 4) **Effects of FoxO1 on Gene Expression in Skeletal Muscle.** American Diabetes Association, 67th Scientific Sessions. Zapater J, Zhang W, Unterman A, Larsen P, Kamei Y, Miura S, Ezaki O, Unterman T. 2007 .06 .24 Chicago, IL, USA
- 5) **Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake.** Kubota N, Yano W, Kubota T, Ueki K, Yamauchi T, Itoh S, Terauchi Y, Ezaki O, Tobe K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Scientific Sessions 67th American Diabetes Association. 2007. 6. 24 Chicago IL, USA
- 6) **運動による筋肉での PGC-1 α 発現増加は β 2-アドレナリン受容体の活性化を介している** 三浦進司, 江崎治. 第28回日本肥満学会. 2007.10 .20, 東京
- 7) **骨格筋で転写因子FOXO1を過剰発現させ筋萎縮が生じたマウスでは体脂肪量の増加をきたす** 亀井康富, 菅波孝祥, 赤池史子, 金井沙綾香, 岡淳一郎, 三浦進司, 江崎治, 小川佳宏. 第28回日本肥満学会. 2007.10.20,

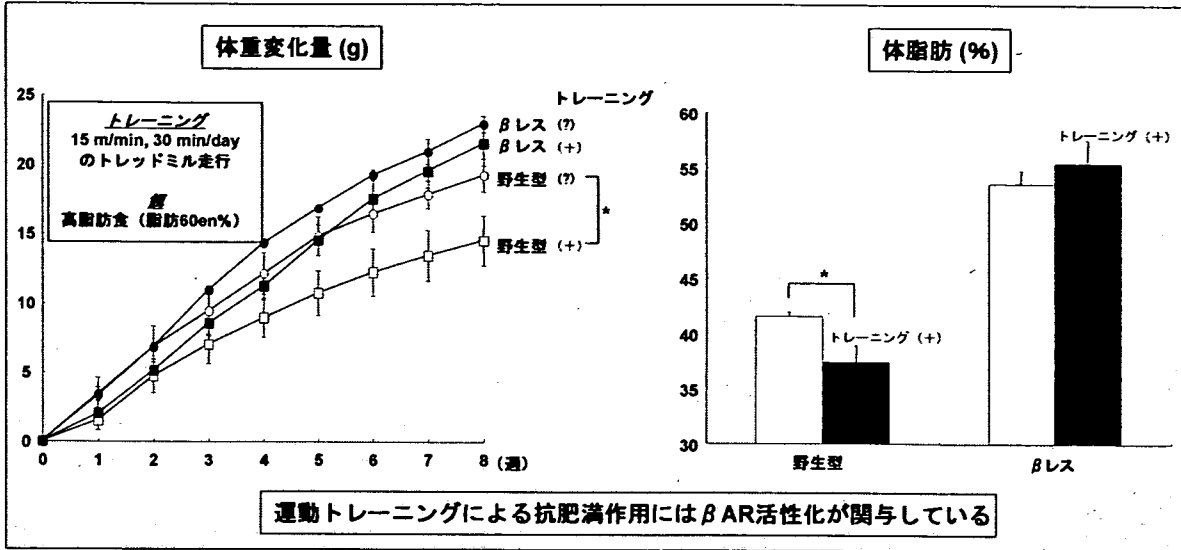
東京「生活習慣病予防のための食事・運動療法の作用機序に関する研究」学会賞受賞講演

- 8) **栄養素 (マクロニュートリエント) 摂取制限と運動による体脂肪減少効果: 理論と実際** 江崎治. 第11回日本病態栄養学会年次学術集会: 2008.1.12: 国立京都国際会館 (京都)

G. 知的所有権の取得状況

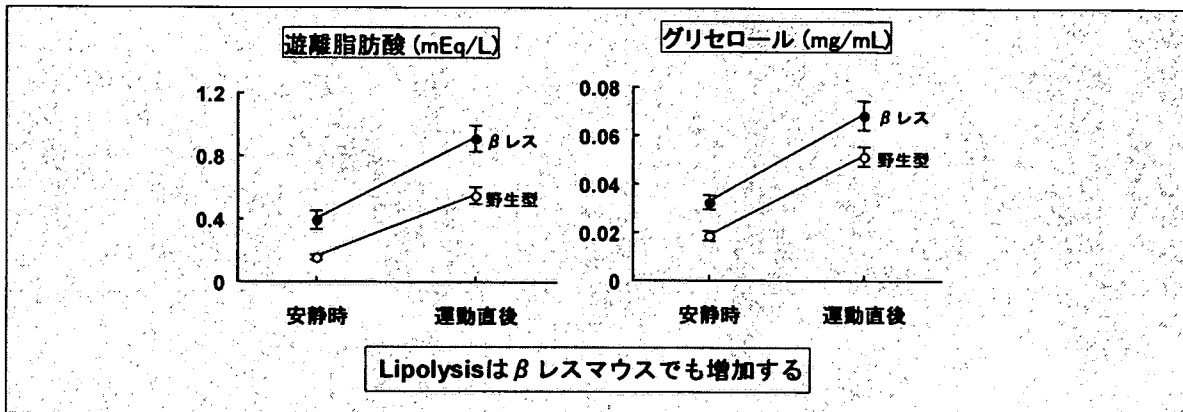
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1



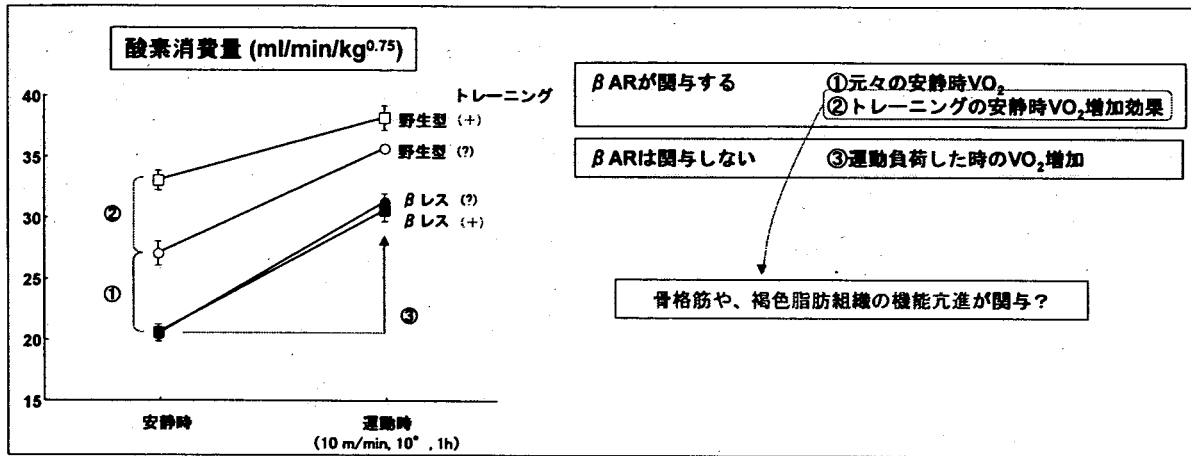
高脂肪食負荷した安静群ではいずれのマウスでも同じように体重や体脂肪は増加したが、運動をさせた群では野生型マウスでは体脂肪が減少したにもかかわらず、βレスマウスでは体脂肪は減らなかった。

図 2



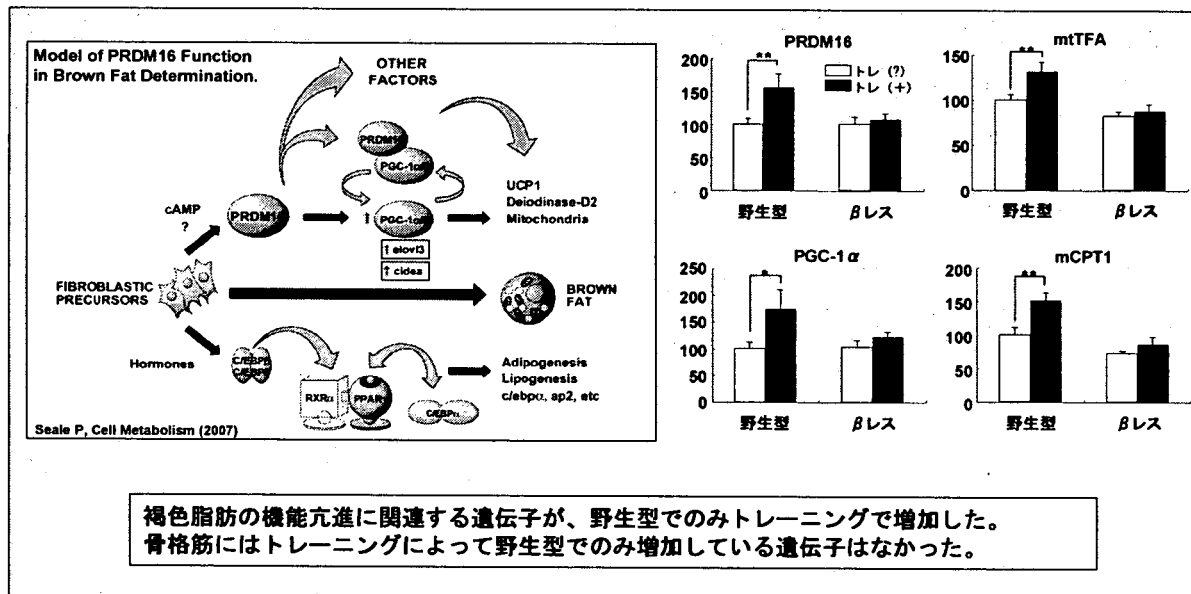
運動食後時の血中脂肪酸、グリセロールの増加はβレスマウスでも野生型マウスと同程度認められ、lipolysisは障害されなかった。

図 3



1回の運動による酸素消費量にも差は認められなかったが、βレスマウスでは安静時の酸素消費量が野生型マウスと比較し減少していた。運動トレーニングを行うと野生型マウスでは安静時代謝量は亢進したがβレスマウスでは安静時代謝量の亢進は認められなかった。

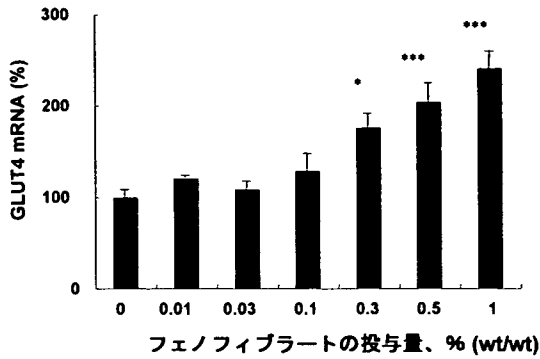
図 4



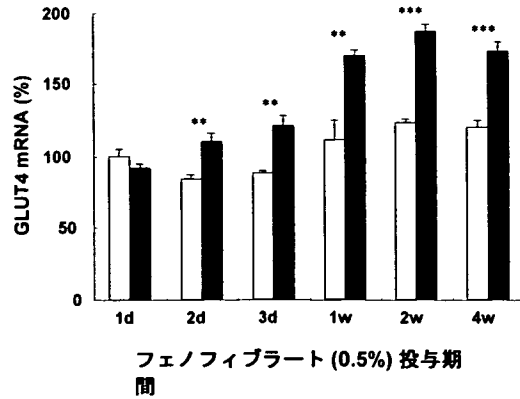
野生型マウスで、運動トレーニング後認められる褐色脂肪細胞の脂肪燃焼関連遺伝子発現の増加はβレスマウスでは認められなかった。

図 5

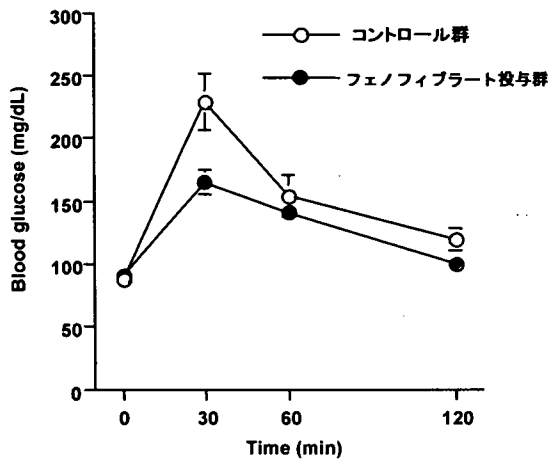
A 筋肉中の GLUT4 mRNA 発現量



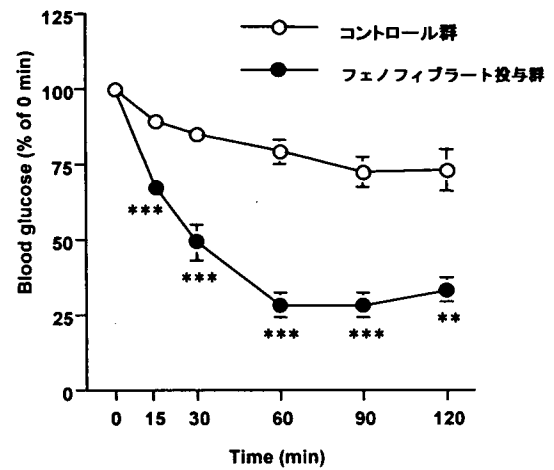
B 筋肉中の GLUT4 mRNA 発現量



C 経口糖負荷テスト

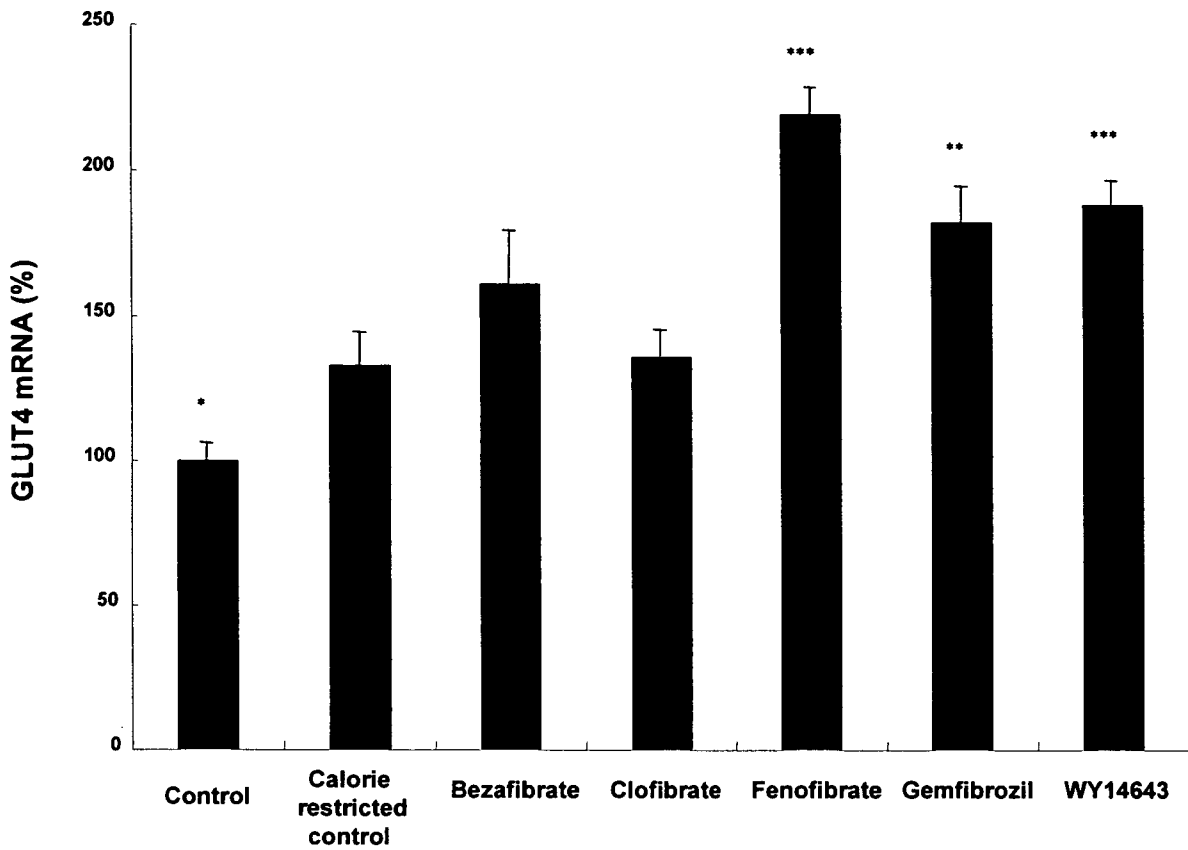


D インスリントレランステスト



(A) 濃度依存性: fenofibrate を各種濃度で1週間投与し、骨格筋の GLUT4mRNA を測定。(B) 期間依存性: 0.5% (wt/wt) の濃度でそれぞれの投与期間投与し、骨格筋の GLUT4mRNA を測定。コントロールは pair-fed mice (白い box)。0.5% (wt/wt) の濃度で1週間投与後、経口糖負荷テスト (C)、インスリン感受性試験 (D) を行う。

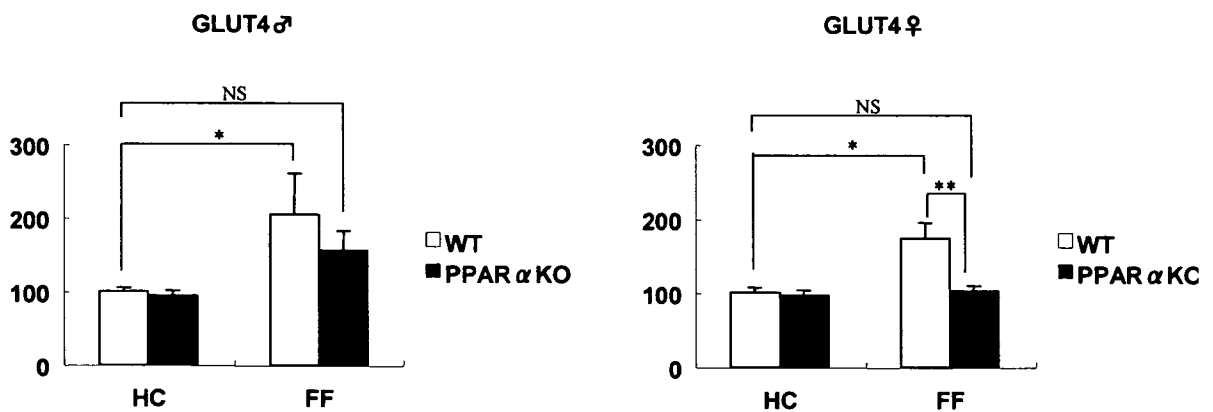
図 6



各種PPAR α 活性化剤、0.5% (wt/wt)

各種 PPAR α 活性化剤の GLUT4mRNA 増加作用。

図 7



PPAR α knockout mice でのフェノフィブラート(LL) による GLUT4 発現増加作用。HC はフェノフィブラートの入っていない高炭水化物食。