

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 を介した
脂肪組織の機能異常を基盤とする 2 型糖尿病モデル動物の構築
及び病態発症機構の解析

2015 年 3 月

秋山 展輝

目次

緒言	1
第1章 Cortisone pellet-implanted DIO マウス (DIO/CP マウス) の構築	
1.1. 序論	3
1.2. 材料と方法	3
1.3. 結果	5
1.4. 考察	9
第2章 DIO/CP マウスの2型糖尿病発症機構の解析	
2.1. 序論	10
2.2. 材料と方法	10
2.3. 結果	12
2.4. 考察	18
第3章 DIO/CP マウスのヒト外挿性の確認	
3.1. 序論	21
3.2. 材料と方法	21
3.3. 結果	22
3.4. 考察	23
総括と展望	24
引用文献	25
論文目録	31
謝辞	32

略語一覽

ATGL, adipose triglyceride lipase

BMI, body-mass index

CBG, corticosteroid-binding globulin

CP, cortisone pellet

11-DHC, 11-dehydrocorticosterone

DIO, diet-induced obesity

DIO/CP mice, cortisone pellet-implanted DIO mice

FFA, free fatty acids

GC, glucocorticoid

GIR, glucose infusion rate

GR, glucocorticoid receptor

11 β -HSD1, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1

11 β -HSD2, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2

IRS, insulin receptor substrate

Lean/CP mice, cortisone pellet-implanted lean mice

NEFA, non-esterified fatty acid

PCR, polymerase chain reaction

PK/PD, Pharmacokinetics/Pharmacodynamics

PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor

RU486 (Mifepristone), 11 β -[*p*-(dimethylamino)phenyl]-17 β -hydroxy-17-(1-propynyl)estra-4,9-dien-3-one

緒言

グルココルチコイド (GC) は糖・脂質ホメオスタシス維持に重要な制御因子である。ヒトにおいて活性型 GC であるコルチゾールの 90% 以上は、血中において corticosteroid-binding globulin (CBG) とアルブミンに結合しており、細胞膜を通過することができるコルチゾールはフリー体で存在する全体の 10% 未満の割合である。一方、不活性型 GC であるコルチゾン は、ほとんどタンパク結合しておらず、主にフリー体の状態で血中に存在し、ターゲット臓器の細胞膜を通過することができる (Fig. 1; Andrews and Walker, 1999; Stulnig and Waldhäusl, 2004)。

細胞内 GC の主な制御分子は 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) であり、2 種のアイソフォーム (11 β -HSD1, 11 β -HSD2) がクローニングされてきた (Lakshmi and Monder, 1988; Agarwal et al., 1989; Brown et al., 1993; Albiston et al., 1994; Brown et al., 1996)。11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) は主に reductase として働く NADP(H) 依存的な酵素であり、不活性型 GC [コルチゾン, ヒト; 11-dehydrocorticosterone (11-DHC), 齧歯類] を活性型 GC (コルチゾール, ヒト; コルチコステロン, 齧歯類) へと変換する。11 β -HSD1 は、肝臓、脂肪組織、脳といった GC のターゲット臓器に高い発現が見られる。反対に、11 β -HSD2 は主に oxidase として働く NAD(H) 依存的な酵素であり、活性型 GC を不活性型 GC へと変換する。11 β -HSD2 の発現は、ミネラルコルチコイド受容体が発現している腎臓、結腸、胎盤等に限定されている。

クッシング症候群のような過剰の GC の状態は、心血管イベントリスクの上昇に関連する肥満、インスリン抵抗性、高脂血症を引き起こす (Newell-Price et al., 2006)。注目すべきことに、11 β -HSD1 活性に部分的欠損があるクッシング病患者では、こういった表現型が緩徐であり、この事象は細胞内における GC 活性化がメタボリックシンドロームの表現型の悪化に寄与していることを示唆するものである (Tomlinson et al., 2002)。

脂肪組織における 11 β -HSD1 の過剰発現マウスは、脂肪組織で活性型 GC であるコルチコステロン濃度が上昇し、肥満、高血圧、高脂血症、そしてインスリン抵抗性といったメタボリックシンドローム様の表現型を呈した (Masuzaki et al., 2001)。一方、全身性 11 β -HSD1 欠損マウスは、野生型マウスと比較して、高脂肪食負荷による高血糖誘導に対し抵抗性であり (Kotelevtsev et al., 1997)、また脂質パラメータの改善が見られた (Morton et al., 2001)。更に、脂肪組織における 11 β -HSD2 の過剰発現マウスは、高脂肪食による食餌誘導性肥満 (diet-induced obesity, DIO) マウスにおける代謝パラメータの改善が見られた (Kershaw et al., 2005)。肥満のヒトにおいては、肝臓の 11 β -HSD1 活性は減少しているが (Rask et al., 2001, 2002)、一方で脂肪組織の 11 β -HSD1 活性は肥満度の指標である body-mass index (BMI) と正の相関を示す (Rask et al., 2001, 2002; Wake et al., 2003; DeSchoolmeester et al., 2013)。これらの報告は脂肪組織での 11 β -HSD1 による GC 活性化が肥満 2 型糖尿病を含むメタボリックシ

ンドロームの悪化に寄与するという説を支持するものである。

このように脂肪組織における GC 活性化とメタボリックシンドロームの病態との関連はこれまでに示唆されているが、脂肪組織における GC 活性化が、どのように全身性の糖代謝を悪化に傾けるのか、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。したがって、このメカニズムの解明は、肥満 2 型糖尿病治療に重要な手がかりを与えると考えられる。本研究において、我々は GC 活性化による糖尿病発症と肥満の関係に着目し、過剰なエネルギー摂取による肥満（内臓脂肪蓄積）とそれに伴う代謝異常を有する高脂肪食負荷肥満モデルである DIO マウスに、ヒト不活性型 GC であるコルチゾン（Cortisone）を慢性処置することで高血糖を呈する新規糖尿病モデルマウスを構築し、脂肪組織における GC 活性化から 2 型糖尿病発症へと繋がるメカニズムの解明を試みた。

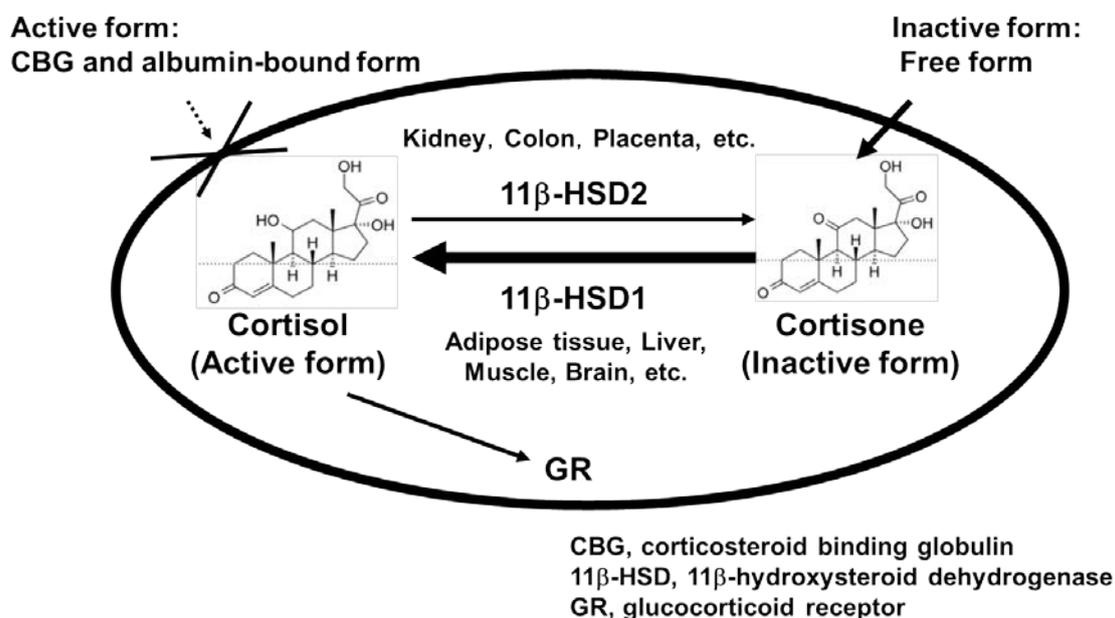


Fig. 1. Regulation of GCs by 11 β -HSDs

[益崎裕章. 肥満とメタボリックシンドローム -動物モデルから- 第 124 回 日本医学会シンポジウム記録集 肥満の科学 27-34 (2003) 図 2 を改変]

第1章 Cortisone pellet-implanted DIO マウス (DIO/CP マウス) の構築

1.1. 序論

コルチゾン (ヒト)、11-DHC (齧歯類) といった不活性型 GC は 11 β -HSD1 の基質であるが、ヒトとマウスでは血中の GC 濃度は大きく異なっている。ヒトの血漿中コルチゾン濃度は 50-100 nM だが (Walker et al., 1992)、一方、マウスの血漿中 11-DHC 濃度は 10 nM 未満と低いことが報告されている (Tagawa et al., 2007)。このようにマウスの血漿中における不活性型 GC 濃度が低い為、マウスを用いた非臨床試験において 11 β -HSD1 によって活性化される GC の生理的な役割を十分に解明するのは、困難であると考えられた。この課題を克服する為、我々は KK マウスにコルチゾンペレットを外科的に処置した二つの報告に着目した (Bhat et al., 2008; Morgan et al., 2009)。KK マウスは、複数の遺伝要因から 2 型糖尿病の病態を発症すると考えられており、肥満とインスリン抵抗性を有する病態モデルである。Bhat らは、KK マウスへのコルチゾン処置により高血糖が誘導されること、一方で、痩せ型マウスにコルチゾン処置を行っても、血糖値にはほぼ変化なく高インスリン血症を呈するのみであることを報告している。また、この報告において、肝臓における 11 β -HSD1 による GC 活性化が糖尿病の病態悪化に関与していることが示された。我々は、Bhat らの報告における痩せ型マウスと肥満モデルである KK マウスでのコルチゾン処置による病態の表現型の違いに着目し、GC 活性化による糖尿病病態惹起において、肝臓のみならず内臓脂肪が重要な役割を果たしている可能性を考えた。

脂肪組織における GC 活性化の糖尿病病態惹起における重要性について解明する為、我々は KK マウスのような複数の遺伝要因から病態を発症するマウスではなく、C57BL/6J マウスに対して通常食給餌を行った痩せ型マウス、もしくは高脂肪食給餌を行った肥満モデルである DIO マウスを用いての解析を行った。本研究において、我々は痩せ型マウスと DIO マウスへのコルチゾン慢性処置による表現型の差異についての解析を行い、GC 活性化による糖尿病病態惹起における脂肪組織の寄与度と、過剰な GC シグナル活性化によって引き起こされる糖尿病病態の表現型についての詳細な解析を行った。

1.2. 材料と方法

1.2.1. 動物実験

C57BL/6J マウス (雄性、日本クレアより 6 週齢で購入) は、12/12 時間の light/dark サイクルの照明下で飼育し、飲水は自由摂取させた。高脂肪飼料として Test Diet 58Y1 (5.16 kcal/g, 60% of calories from fat; Purina Mills) を、通常飼料として CE-2 (日本クレア) を用い、7 週齢よりいずれかの飼料をマウスに給餌した。動物実験はシオノギ動物実験委員会の管理下で適切に行われた。

C57BL/6J マウスへの高脂肪食給餌開始より約 16 週後、個別ケージでの飼育を開始し、

コルチゾンペレット (35 mg, 21-day release; Innovative Research of America) を皮下移植した。比較対象として、コルチゾンペレットを移植しない偽手術を施した群を作製した。コルチゾンペレットを移植した日を day 0 と定義し、血漿中代謝パラメータの測定には各実験で記載された条件において血液を採取した。

1.2.2. 血漿中パラメータ測定

血液サンプルはヘパリン処理されたヘマトクリット毛細管 (テルモ) を用いて尾静脈より採取し、遠心 (15,000g, 5 minutes, 4°C) 後に血漿を回収した。血漿中グルコース、トリグリセライドおよび遊離脂肪酸 (non-esterified fatty acid, NEFA) は自動分析装置 (日立 7150) を用いて測定した。血漿中インスリンとグリセロールは、それぞれ insulin ELISA kit (シバヤギ) と Free glycerol determination kit (Sigma-Aldrich) により測定した。血漿中の GC 測定は、以下の通りに実施した。採取した血漿を、血漿:蒸留水:酢酸エチルを 1:1:4 の割合にて混合後、内部標準として 200 pmol デキサメタゾン (Sigma-Aldrich) を加えた後、シリカゲルを添加し、遠心 (15,000g, 5 minutes, 4°C) を行った。遠心後、有機層を回収しエバポレーターにて乾燥後、アセトニトリルを添加し、遠心 (15,000g, 5 minutes, 4°C) を行った。上清を回収しエバポレーターにて乾燥後、蒸留水-メタノール混合溶液 (蒸留水:メタノール = 45:55) にて再溶解したものを測定サンプルとし、HPLC (Waters 2690) によりグルココルチコイド量を定量した。

1.2.3. 肝臓中トリグリセライド含量測定

二酸化炭素ガスを用いて安楽死させたマウスより肝臓を摘出し、4-10 倍量のイソプロパノールを用いてホモジナイズした。ホモジネートを遠心 (>10,000g)、上清を回収後、自動分析装置 (日立 7150) により上清中のトリグリセライド量を測定した。

1.2.4. 正常血糖高インスリンクランプ試験

正常血糖高インスリンクランプ試験は、DIO マウスに偽手術もしくはコルチゾンペレット皮下移植の施術後、5 日目に実施した。正常血糖高インスリンクランプ試験に用いた DIO、もしくは DIO/CP マウスは、血漿中パラメータ測定を行ったマウスとは別のマウスを用いた。一晚絶食条件下に置いた後、試験の約 4 時間前にマウスはイソフルランによる麻酔下で、右の頸静脈に生理食塩水を満たした MRE-025 チューブ (内径 0.0305 mm, 外径 0.0635 mm; Braintree Scientific) を留置した。インスリン (Humalin R; Eli Lilly) を 100 mU/kg/min の流速にて持続注入し、血糖値を 10 分毎に測定し、血糖値が 115-135 mg/dl に維持するよう 20% 糖液の注入量を調節した。糖液の注入率 (glucose infusion rate, GIR) はクランプ試験中の血糖値が安定している 20 分間の糖液注入速度から算出を行った。

1.3. 結果

1.3.1. コルチゾン慢性処置による血漿中 GC 濃度変化

Table 1 に示すように、11-DHC (齧歯類内在性不活性型 GC) は痩せ型マウスと DIO マウスにおいて共に検出されなかった。一方、コルチコステロン (齧歯類内在性活性型 GC) は DIO マウスでのみ確認された。我々はコルチゾンペレットの皮下移植を行い、血漿中 GC 濃度をヒトと同程度に合わせたマウスモデルの構築を試みた。コルチゾンペレット移植痩せ型マウス (cortisone pellet-implanted lean マウス, lean/CP マウス) とコルチゾンペレット移植 DIO マウス (cortisone pellet-implanted DIO マウス, DIO/CP マウス) 共にヒトと同様のレベルまで血漿中 GC レベルが上昇し、活性型 GC であるコルチゾールの血漿中濃度は、lean/CP マウス、DIO/CP マウスにおいて同程度であった。

TABLE 1

Effects of cortisone treatment on plasma levels of GCs in lean and DIO mice

	Cortisone (nM)	Cortisol (nM)	11-DHC (nM)	Corticosterone (nM)
Lean	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lean/CP	202 ± 12.9	314 ± 29.2	N.D.	N.D.
DIO	N.D.	N.D.	N.D.	55 ± 13.4
DIO/CP	135 ± 8.4	284 ± 20.7	N.D.	N.D.

Plasma samples were collected 5 days after sham-operation or cortisone pellet implantation into lean and DIO mice. Values are mean ± SEM (lean, n = 5; lean/CP, n = 5; DIO, n = 16; DIO/CP, n = 28). N.D., Not detected.

1.3.2. コルチゾン慢性処置による血中代謝パラメータ変化

コルチゾン慢性処置による痩せ型マウスと DIO マウスの血漿中パラメータ変化を解析する為、コルチゾンペレット皮下移植 5 日後に非絶食条件下における血漿中グルコース、トリグリセライド、遊離脂肪酸 (NEFA) の測定を行った。結果、DIO マウスへのコルチゾン慢性処置により血漿中グルコース値が顕著に上昇した (Fig. 2A, plasma glucose, sham-operated DIO マウス, 183 ± 18.5 mg/dl; DIO/CP マウス, 351 ± 15.7 mg/dl, $P < 0.001$)。一方、痩せ型マウスへのコルチゾン慢性処置では有意な血漿中グルコース値の上昇は見られなかった。更に、偽手術を施した DIO マウスと比較して DIO/CP マウスでは非絶食条件下において血漿中のトリグリセライド値、NEFA 値が有意に上昇した (Fig. 2, B and C)。また、偽手術を施した DIO マウスと比較して DIO/CP マウスでは有意に絶食条件下の血漿中グルコース値、インスリン値が上昇した (Fig. 2, E and F)。DIO/CP マウスのインスリン感受性変化

を正常血糖高インスリンクランプ試験において評価した結果、偽手術を施した DIO マウスと比較して糖液注入率 (glucose infusion rate, GIR) は有意に低下し、顕著なインスリン抵抗性状態であることが明らかとなった (Fig. 2D, 44.2 ± 4.4 mg/kg/min in DIO mice versus 14.0 ± 2.1 mg/kg/min in DIO/CP mice)。

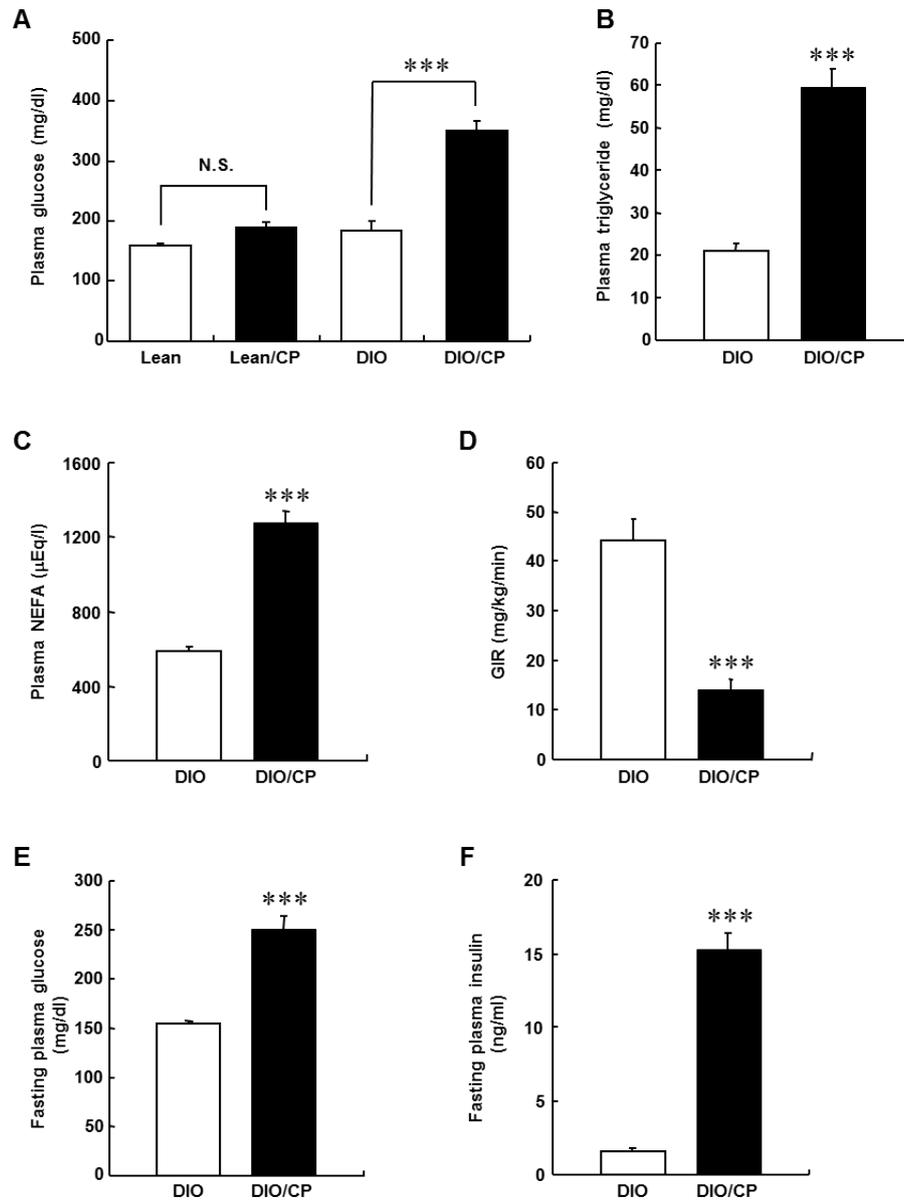


Fig. 2. Effects of cortisone treatment on metabolic parameters in lean and DIO mice. A-C, Plasma levels of glucose (A), triglyceride (B), and non-esterified fatty acid (NEFA) (C) in lean and DIO mice 5 days after treatment with sham-operation or cortisone pellet implantation (lean, n = 19; lean/CP, n = 4; DIO, n = 12; DIO/CP, n = 25). D, GIR during hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies performed in DIO mice 5 days after treatment with sham-operation or cortisone pellet implantation (DIO, n = 5; DIO/CP, n = 6). E and F, Plasma levels of glucose (E) and insulin (F) in overnight-fasted DIO mice 7 days after treatment with sham-operation or cortisone pellet implantation (DIO, n = 21; DIO/CP, n = 20). Values are mean \pm SEM. *** P < 0.001 vs sham-operated DIO mice. N.S., Not significant.

1.3.3. DIO マウスへのコルチゾン慢性処置による脂肪組織重量と肝臓中トリグリセライド含量変化

DIO/CP マウスの脂肪組織の分布を明らかにする為、肝臓と脂肪組織重量の測定を行った。DIO/CP マウスにおいて、コルチゾンペレット皮下移植 11 日後の時点において肝重量は偽手術を施した DIO マウスと比較して増大していた (Table 2)。肝重量の増加と一致して、DIO/CP マウスの肝臓中トリグリセライド含量は上昇していた (Table 2)。一方、DIO/CP マウスの腸間膜脂肪、副睾丸脂肪重量は偽手術を施した DIO マウスと比較して減少していた (Table 2)。

TABLE 2

Effects of cortisone treatment on adiposity and hepatic triglyceride contents in DIO mice

	DIO	DIO/CP	
Body weight (g)	43.4 ± 0.51	39.0 ± 0.59	***
Liver (g)	1.67 ± 0.07	2.57 ± 0.13	***
Mesenteric fat (g)	1.15 ± 0.04	0.62 ± 0.03	***
Epididymal fat (g)	1.75 ± 0.06	1.28 ± 0.05	***
Liver triglycerides (mg/g tissue)	129.1 ± 14.6	172.3 ± 9.7	*

Body weight was measured on day 10. Tissue samples were collected on day 11 and analyzed for tissue weight and triglyceride contents in the liver. Values are mean ± SEM, n = 20 or 21 for body weight and tissue weight, n = 14 for liver triglyceride contents. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs sham-operated DIO mice.

1.4. 考察

肥満 2 型糖尿病の進展における 11 β -HSD1 の役割の解明を目的とし、我々は Bhat らの報告と同様に、マウスの内在性 GC と区別する為に慢性処置する不活性型 GC としてヒト型の GC であるコルチゾンをを用い、外科的にコルチゾンペレットを皮下移植することで、ヒトと同様の血漿中 GC 濃度を有するモデルマウスを作製した。Lean/CP マウスと DIO/CP マウスは、共に同程度のコルチゾン (不活性型) とコルチゾール (活性型) の血漿中濃度を示した (Table 1)。また本研究においても、高脂血症、高血糖、そして顕著なインスリン抵抗性といった代謝異常は、DIO/CP マウスにおいてのみ観察され、lean/CP マウスにおいて高血糖は誘導されなかった (Fig. 2)。この lean/CP マウスと DIO/CP マウスの表現型の差は、11 β -HSD1 を介した GC 活性化による糖尿病発症には脂肪組織が重要な役割を果たしているということを示唆するものである。加えて、今回の lean/CP マウスと DIO/CP マウスは、これまで報告されていたような遺伝要因の差異を含んでおらず、これら二つのモデル動物の表現型の差異は、肥満 (脂肪蓄積) という要因に依存していることから、脂肪量が GC 活性化による糖尿病発症に重要であることを裏付ける結果と考えられる。

DIO/CP マウスは、血漿中 NEFA 値が上昇し、顕著な脂肪肝の表現型を呈した。更に、DIO/CP マウスは DIO マウスと比較して、腸間膜脂肪重量の低下が確認された。これらの結果は、DIO/CP マウスの脂肪組織において脂肪分解が亢進し、異所性の脂肪蓄積が誘導されていることを示すものである。これまでの多くの報告から、GC シグナルの亢進はヒトにおいて脂肪分解を亢進することが明らかとなっている (Divertie et al., 1991; Gravholt et al., 2002)。これらの論文報告と、今回明らかにした lean/CP マウスと DIO/CP マウスの表現型を踏まえると、11 β -HSD1 を介した GC 活性化による代謝性疾患の発症に脂肪分解の亢進が重要な役割を果たしていると考えられる

本研究において、我々は DIO マウスにコルチゾンペレットを皮下移植することでヒトと同様の血漿中 GC 濃度を有する新規の糖尿病モデルを構築した。また、DIO/CP マウスの表現型解析から、DIO/CP マウスは脂肪肝といった異所性の脂肪蓄積を伴う、顕著なインスリン抵抗性を有した糖尿病モデルマウスであること、GC による病態発症には脂肪量が極めて重要であることが明らかとなった。また、DIO/CP マウスは、ヒトと同様の血漿中 GC 濃度を有するモデルマウスであり、非臨床試験では解析が困難であった 11 β -HSD1 を介した GC 活性化による代謝性疾患の病態発症機構の解明に非常に有用な動物モデルと考えられる。

第2章 DIO/CP マウスの2型糖尿病発症機構の解析

2.1. 序論

第1章において、 11β -HSD1 を介した GC 活性化による代謝性疾患の発症には、脂肪組織の量が極めて重要な役割を果たしていること、また GC 活性化による脂肪分解の亢進が異所性脂肪蓄積を伴う2型糖尿病の発症に寄与している可能性が示された。これまでに、脂肪分解により血中に放出されるグリセロールや遊離脂肪酸によって、高血糖が誘導されるメカニズムが多く報告されてきているが (Postic et al., 2004; Capurso and Capurso, 2012)、マウスにおける内在性 GC 濃度の低さから脂肪組織における GC 活性化が、どのように全身性の糖代謝を悪化させるのか、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

我々は本研究において、DIO/CP マウスにおける2型糖尿病の発症機構、即ち 11β -HSD1 を介した GC 活性化による2型糖尿病の発症機構の解明を目的とし、脂肪組織における脂肪分解と高血糖発症機構に着目して解析を行った。本研究は、GC による全身性の糖代謝悪化機構の解明の手がかりを示すものであり、肥満2型糖尿病の新たな治療戦略を考える上で、重要なヒントを与えると考えられる。更に、GC 受容体 (GR) アンタゴニスト RU486 (mifepristone, 11β -[*p*-(dimethylamino)phenyl]-17 β -hydroxy-17-(1-propynyl)estra-4,9-dien-3-one) を用い、DIO/CP マウスの病態発症が GR を介していることの確認と、過剰な GC シグナルによって誘導される病態発症における脂肪組織の役割についての解明を試みた。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 動物実験 (RU486 反復投与試験)

コルチゾンペレット移植 DIO マウス (DIO/CP マウス) は、1.2.1.に記載の通りに作製した。DIO/CP マウスに、0.5% w/v ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液 (信越化学工業) を溶媒として RU486 (10 あるいは 30 mg/kg, Sigma-Aldrich) を1日2回、day 0 から day 4 までの5日間、経口投与した。Day 5 の時点で非絶食条件下において血液と腸間膜脂肪組織を採取し、血漿中代謝パラメータ [グルコース、遊離脂肪酸 (NEFA)、グリセロール] と脂肪組織中の 11β -HSD1, adipose triglyceride lipase (ATGL) の mRNA 発現レベルの測定を実施した。

2.2.2. RNA 抽出と real-time PCR

マウスから摘出した各組織 (肝臓、腓腹筋、腸間膜脂肪) を RNAlater (Life Technologies) 中で保管し RNA 抽出用のサンプルとした。保管サンプルを QIAzol (Qiagen) 中でホモジナイズし、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。各組織それぞれ等量の total RNA を、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies) を用いて逆転写し cDNA を調製した。 11β -HSD1, ATGL, ribosomal protein S18 に対する PCR プライマーセットはタカラバ

イオより購入した。11 β -HSD1 ならびに ATGL の mRNA 発現レベルは、7500 リアルタイム PCR システム (Life Technologies) を用いて測定し、ribosomal protein S18 の mRNA 発現レベルにより補正した。データは偽手術を施した DIO マウス群における発現レベルを 1 として示した。

2.2.3. 3T3-L1 細胞培養

3T3-L1 前駆脂肪細胞は、10% ウシ胎仔血清と 1% penicillin-streptomycin を添加した高グルコース Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies) 中で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。細胞はコラーゲンコートされた 6 ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるまで培養後に分化誘導を開始した。分化誘導は、10% ウシ胎仔血清、5 μ g/ml insulin (Sigma-Aldrich)、1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich)、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (Sigma-Aldrich)、1% penicillin-streptomycin を添加した DMEM へ培地を交換することにより実施した。2 日間培養後に、分化誘導に用いた培地を培養培地へ交換し、さらに 6 日間培養し分化脂肪細胞とした。

2.2.4. 3T3-L1 細胞からのグリセロール放出測定

実験前日に 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) と 1% penicillin-streptomycin を添加した DMEM に交換した分化脂肪細胞に、100 nM cortisone (Sigma-Aldrich) を添加あるいは非添加の条件で 24 時間培養した。24 時間培養後の培地を回収し、培地中のグリセロール濃度を Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich) を用いて測定した。データはウェル中のタンパク量で補正した。遺伝子発現の解析には、RNeasy Mini Kit を用いて細胞より total RNA を回収し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用いて逆転写後にリアルタイム PCR により mRNA レベルを解析した。

2.2.5. ラット初代培養肝細胞の調製

初代培養肝細胞は雄性の 10-12 週齢の Wistar ラット (日本クレア) からコラーゲンゼンゼ還元法により単離した。単離した肝細胞は、10% ウシ胎仔血清、100 nM insulin、100 nM dexamethasone、1% penicillin-streptomycin を添加した William's medium E (Life Technologies) 中で、コラーゲンコートされた 24 ウェルプレートに播種し (2.5×10^5 cells/well)、37°C、5% CO₂ 条件下で 4 時間培養し、プレートへ接着させた。接着後に、細胞を PBS (-) で洗浄し、0.5% BSA と 1% penicillin-streptomycin を添加した低グルコース DMEM を添加し、一晩培養後、実験に使用した。

2.2.6. ラット初代培養肝細胞からの糖放出測定

24 ウェルプレートに播種した初代培養肝細胞を、PBS (-) で 3 回洗浄し、記載された濃度のグリセロールと 0.5% BSA 含有 glucose- and phenol red-free DMEM を 250 μ l 添加し 4 時間

培養した。4 時間培養後の培地を回収し、肝細胞より放出されたグルコース量を **Glucose Assay Kit (Wako)** を用いて定量した。ウェル中のタンパク量での補正を行い、糖放出量を算出した。

2.3. 結果

2.3.1. 痩せ型マウスと DIO マウスにおけるコルチゾン急性処置の血漿中グルコース値と脂肪分解指標 (グリセロール値、NEFA 値) に対する効果

コルチゾンペレット皮下移植 1 日後の時点において、非絶食条件下における血漿中グルコース値は、lean/CP マウス、DIO/CP マウス共に、偽手術を施した群と比較して変化は認められなかった (Fig. 3A)。コルチゾンペレット皮下移植 4 日後の時点では、DIO/CP マウスのみ、顕著な高血糖を呈した (Fig. 3B)。一方、DIO/CP マウスの脂肪分解の指標である血漿中グリセロール値、NEFA 値は、コルチゾンペレット皮下移植 1 日後の時点から顕著に上昇し (Fig. 3, C and E)、コルチゾンペレット皮下移植 4 日後の時点においても血漿中グリセロール値、NEFA 値の上昇は維持されていた (Fig. 3, D and F)。しかしながら、痩せ型マウスにコルチゾンペレット皮下移植を施しても、非絶食条件下の血漿中グルコース値、グリセロール値、NEFA 値に変化は認められなかった (Fig. 3)。

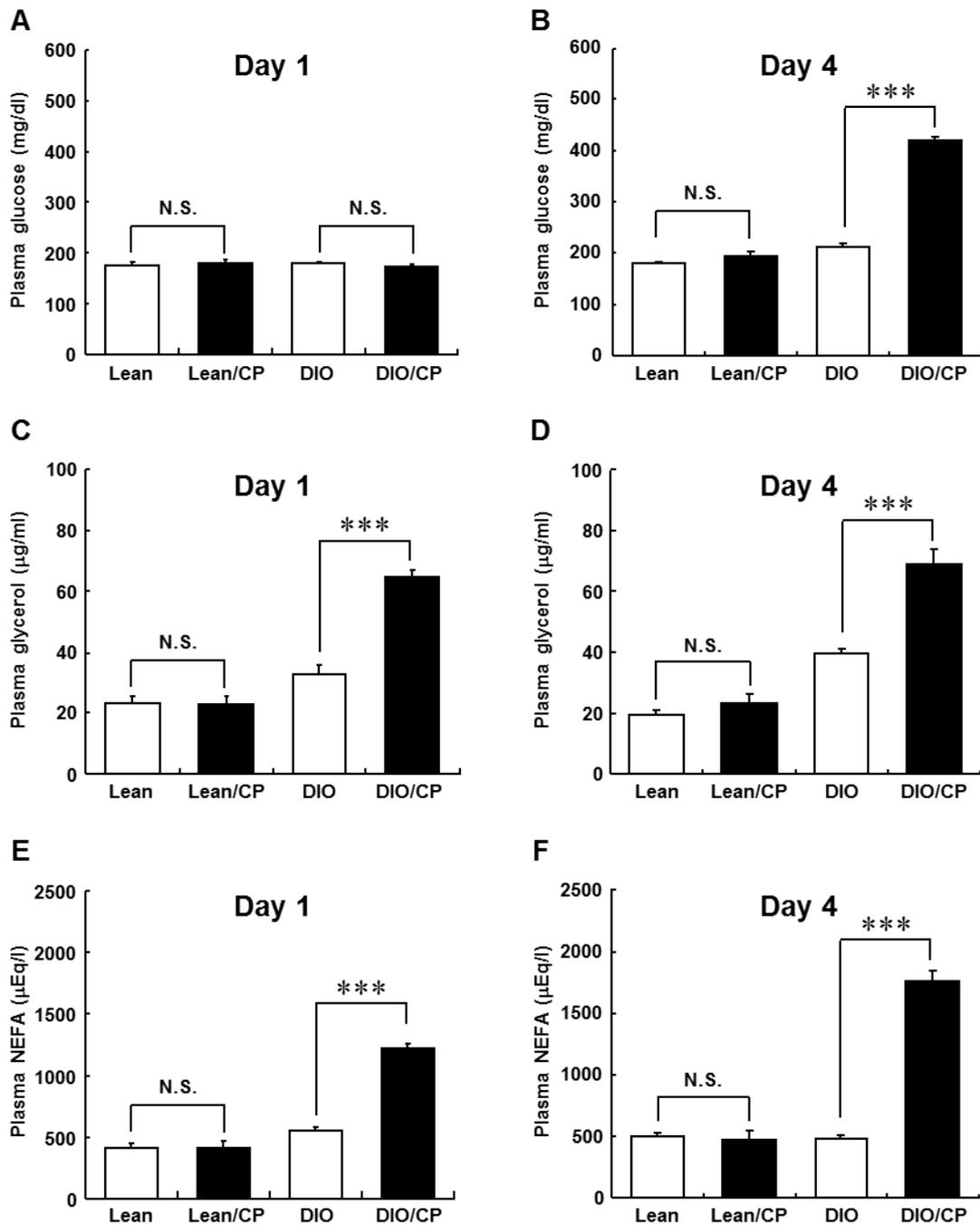


Fig. 3. Plasma parameters in lean/CP and DIO/CP mice on day 1 (A, C, E) and day 4 (B, D, F). A and B, Plasma glucose levels. C and D, Plasma glycerol levels. E and F, Plasma NEFA levels. Values are mean \pm SEM (lean, n = 8; lean/CP, n = 8; DIO, n = 16; DIO/CP, n = 15). *** $P < 0.001$ vs sham-operated DIO mice (two-way ANOVA). N.S., Not significant.

2.3.2. DIO/CP マウスの脂肪組織における 11 β -HSD1 mRNA 発現変化

コルチゾンペレット皮下移植 5 日後の時点において、DIO/CP マウスの腸間膜脂肪の 11 β -HSD1 mRNA 発現レベルは偽手術を施した DIO マウスと比較して 2.9 倍上昇した (Fig. 4)。一方、肝臓と腓腹筋における 11 β -HSD1 mRNA 発現レベルはコルチゾン処置により変化が見られなかった。

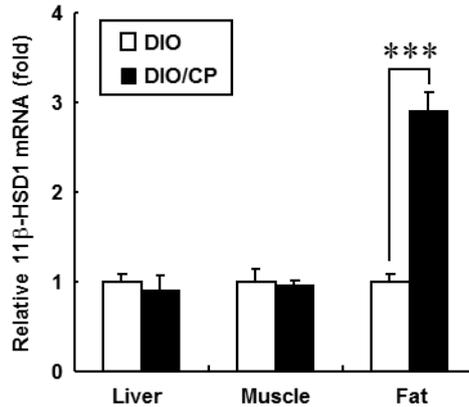


Fig. 4. 11 β -HSD1 mRNA levels in liver, gastrocnemius muscle, and mesenteric fat of DIO and DIO/CP mice. Tissue samples were collected 5 days after treatment with sham-operation or cortisone pellet implantation in DIO mice. Each column represents relative 11 β -HSD1 mRNA levels compared with sham-operated DIO mice. Values are mean \pm SEM; n = 9-11. *** P < 0.001 vs sham-operated DIO mice.

2.3.3. DIO/CP マウスにおける RU486 による脂肪組織遺伝子発現と血漿中代謝関連パラメータ変化

コルチゾンペレット皮下移植 5 日後の時点において、偽手術を施した DIO マウスと比較して DIO/CP マウスの腸間膜脂肪の 11 β -HSD1、ATGL mRNA 発現レベルと、非絶食条件下の血漿中代謝関連パラメータ (グリセロール、NEFA、グルコース) は有意に上昇した (Fig. 5)。コルチゾンペレット移植と同時に RU486 の投与を開始し、5 日後の時点において脂肪組織遺伝子発現変化と血漿中代謝関連パラメータ変化についての解析を行った。結果、GR 受容体アンタゴニストである RU486 の DIO/CP マウスへの反復投与 (5 日間) により、RU486 の用量依存的に腸間膜脂肪の 11 β -HSD1、ATGL mRNA は低下した (Fig. 5, A and B)。更に、RU486 は用量依存的に非絶食条件下の血漿中代謝関連パラメータ (グリセロール、NEFA、グルコース) を改善した (Fig. 5, C-E)。

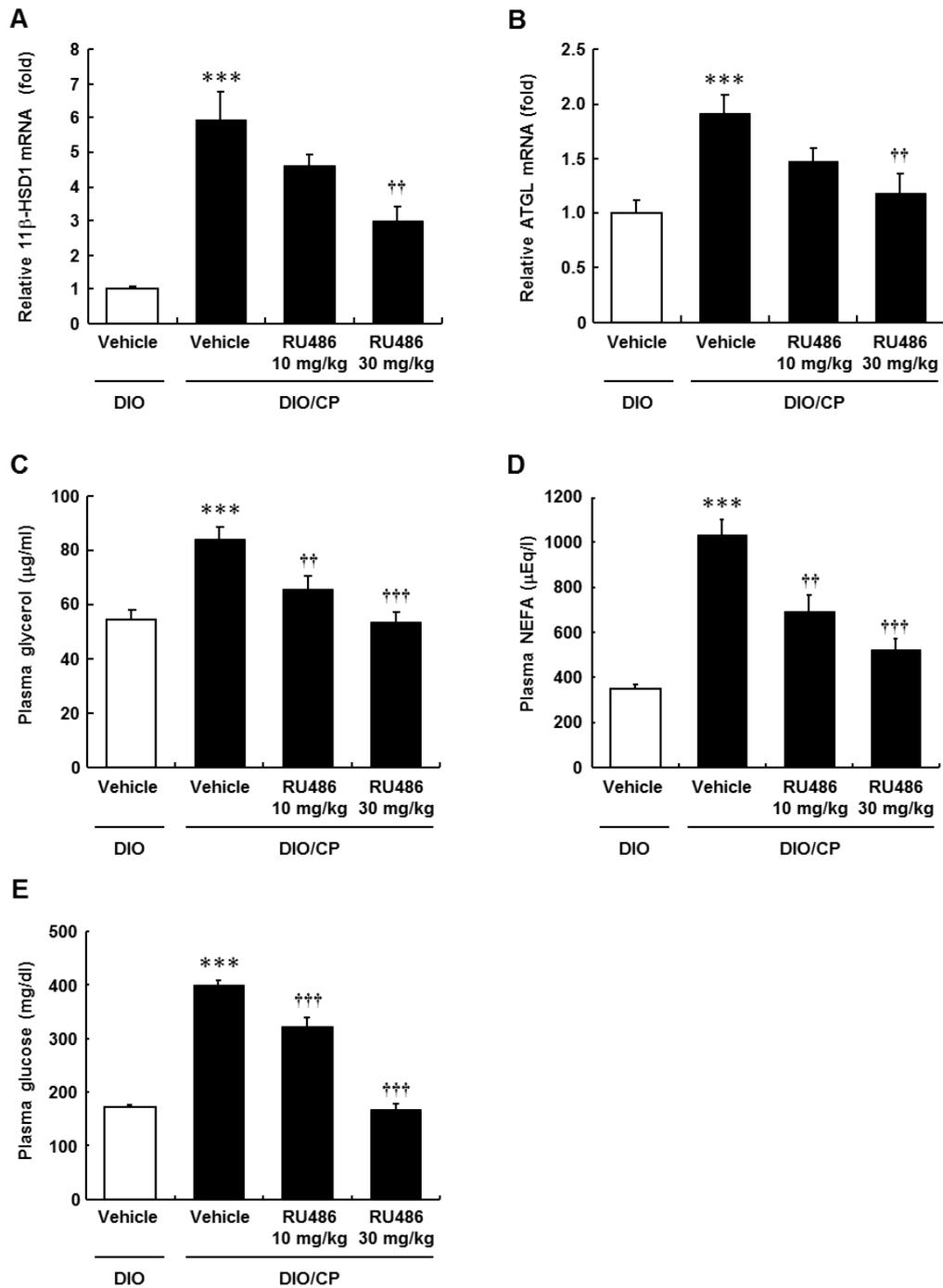


Fig. 5. Effects of 5-day oral dosing with the RU486 (10 and 30 mg/kg) on 11β-HSD1 (A) and ATGL (B) mRNA levels in mesenteric fat, plasma glycerol (C), plasma NEFA (D), and plasma glucose levels (E) in DIO/CP mice. Values are mean ± SEM; n = 8. ****P* < 0.001 vs sham-operated DIO mice (*t* test). ††*P* < 0.01; †††*P* < 0.001 vs vehicle-treated DIO/CP mice (Dunnett's multiple comparison test).

2.3.4. 3T3-L1 脂肪細胞における ATGL mRNA 発現レベルとグリセロール放出に対するコルチゾン処置の効果

脂肪細胞における脂肪分解活性に対するコルチゾン処置の効果を明らかにする為、分化 3T3-L1 脂肪細胞にコルチゾン (100 nM) 処置を行い、ATGL mRNA 発現レベルと培養上清中グリセロール放出についての解析を行った。分化 3T3-L1 脂肪細胞へのコルチゾンの 24 時間処置により、ATGL mRNA の発現レベルと培養上清中のグリセロール濃度は有意に上昇した (Fig. 6)。

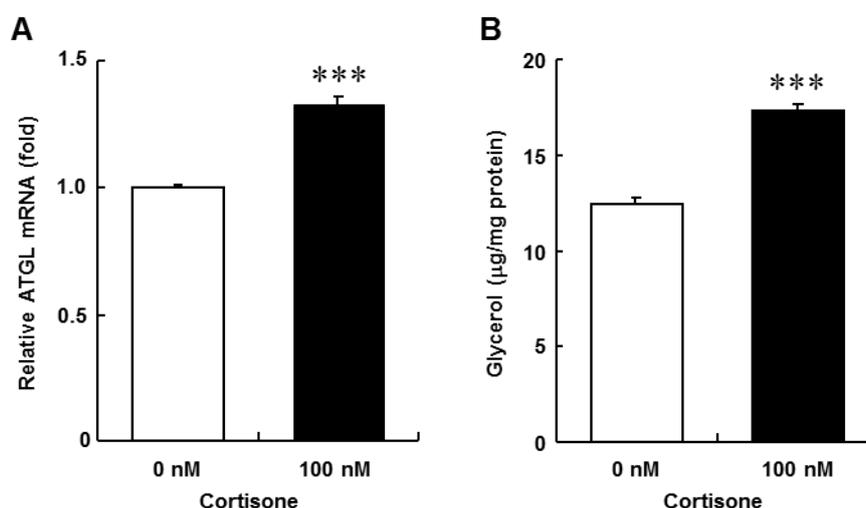


Fig. 6. ATGL mRNA expression (A) and glycerol release (B) in differentiated 3T3-L1 adipocytes treated with cortisone. Differentiated 3T3-L1 adipocytes were starved in serum-free medium for 1 day, followed by incubation with cortisone (100 nM) for 24 hours. Total RNA was isolated from the cells, and the ATGL mRNA level was determined. Glycerol level in the medium was measured and normalized with the total protein content in the well. Values are mean \pm SEM; $n = 3$ for mRNA expression analysis and $n = 5$ for glycerol measurement. *** $P < 0.001$ vs control 3T3-L1 adipocytes.

2.3.5. ラット初代培養肝細胞における糖放出に対するグリセロール処置の効果

グリセロールは糖新生の基質であり (Postic et al., 2004)、DIO/CP マウスの血漿中グリセロール濃度はコルチゾンペレット皮下移植 1 日後の時点から上昇していた (Fig. 3C)。血漿中グリセロール濃度の範囲内で糖放出に影響を与えるのかを明らかにする為 (1 mM グリセロール = 92 $\mu\text{g/ml}$ グリセロール)、ラット初代培養肝細胞に血漿中と同程度の濃度域のグリセロール処置を行い、培養上清中の糖濃度を測定した。結果、血漿中濃度域 (0.25 mM-1.0 mM) のグリセロール濃度依存的に、ラット初代培養肝細胞からの糖放出が亢進した (Fig. 7)。

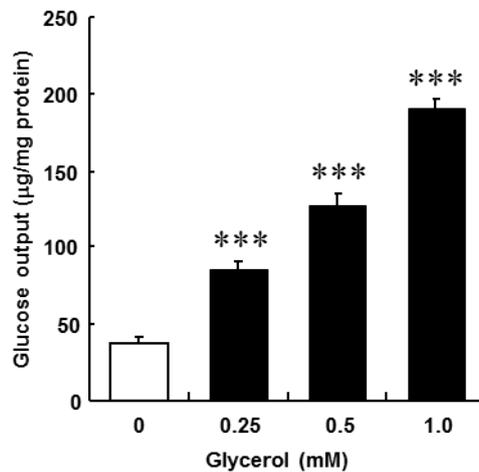


Fig. 7. Effects of glycerol treatment on glucose output in primary hepatocytes. Rat primary hepatocytes were treated with the indicated concentrations of glycerol in glucose-free medium for 4 hours, and the glucose level in the medium was measured. Values are mean \pm SEM; $n = 6$. *** $P < 0.001$ vs control primary hepatocytes (Dunnett's multiple comparison test).

2.4. 考察

第1章において、 11β -HSD1 を介した GC 活性化による代謝性疾患の発症には、脂肪組織の量が重要であることが明らかとなった。また、活性型 GC による脂肪分解の亢進が異所性脂肪蓄積を伴う 2 型糖尿病の発症に寄与している可能性が示唆された。我々は、DIO/CP マウスにおける脂肪分解亢進機構と、亢進した脂肪分解と高血糖発症の関係性に着目し、活性型 GC による病態発症機構の解明を試みた。

我々は、活性型 GC による脂肪分解亢進の鍵となる分子として ATGL に着目した。ATGL は、トリグリセライドを分解し、血中に遊離脂肪酸を放出させる分子である (Jenkins et al., 2004; Zimmermann et al., 2004; Haemmerle et al., 2006)。加えて、脂肪の ATGL 発現と脂肪分解は GC シグナルによって制御されていることが報告されてきた (Villena et al., 2004; Berthiaume et al., 2007; Xu et al., 2009; Campbell et al., 2011; Serr et al., 2011; Sano et al., 2012; Wang et al., 2012)。これらの類似の報告と同様に、我々も 3T3-L1 脂肪細胞へのコルチゾン (100 nM) 処置により ATGL mRNA 発現とグリセロール放出が上昇することを確認した (Fig. 6)。この結果は、ヒトにおける血漿中濃度と同程度のコルチゾン処置により脂肪分解が亢進することを示すものであり、GC が生理作用として脂肪分解を制御していることを示唆している。本研究において、我々は DIO/CP マウスの脂肪組織の ATGL mRNA は偽手術を施した DIO マウスよりも増大していることを示した。これらの結果より、脂肪組織において発現上昇した ATGL が DIO/CP マウスにおいて認められた脂肪分解亢進に寄与していると考えられる。

脂肪組織における脂肪分解亢進により高血糖を発症する機構として、グリセロールが肝臓における糖新生の基質となることが報告されてきた (Postic et al., 2004)。我々は、血漿中濃度域のグリセロール処置により、濃度依存的にラット初代培養肝細胞からの糖放出が亢進することを確認した (Fig. 7)。血中へのグリセロール放出と、肝糖放出は 2 型糖尿病患者において増大している (Nurjhan et al., 1992; Puhakainen et al., 1992)。また、ナイアシン誘導体の脂肪分解阻害剤であるアシピモックスは、ストレプトゾトシン誘導性の糖尿病ラットにおける血漿中グリセロール値とグルコース値を低下させた (Claus et al., 2005)。臨床試験においても、アシピモックスは、2 型糖尿病患者の血漿中遊離脂肪酸を低下させ、空腹時血糖値とインスリン抵抗性を改善した (Bajaj et al., 2005)。脂肪組織の機能不全が肝糖放出に密接に関与していることを示すこれらの知見を基に、我々は、DIO/CP マウスにおける活性型 GC による病態発症機構について、脂肪分解亢進と高血糖との関連性に着目した。

コルチゾンペレット皮下移植 1 日後、DIO/CP マウスにおいて血漿中グルコース値が上昇する以前に血漿中グリセロール値、NEFA 値は顕著に上昇した (Fig. 3, A, C, and E)。この結果は、活性型 GC による脂肪分解誘導が高血糖発症によりも上流に位置していることを示している。一方、lean/CP マウスでは、コルチゾンペレット皮下移植 1 日後、4 日後共に血漿中グリセロール値、NEFA 値に変化なく、血漿中グルコース値の上昇も誘導されなかった。この lean/CP マウスの表現型は、痩せ型マウスの内臓脂肪量が少ない為、グリセロール供給

が不十分であり、肝臓中での糖新生亢進に至らなかったと考えられる。

Lean/CP マウスと DIO/CP マウスの表現型の違いから、我々は脂肪分解によって産生されるグリセロールや遊離脂肪酸が GC 活性化による高血糖発症に重要な役割を果たしていると考えられた。更に、血漿中グリセロールや遊離脂肪酸は脂肪組織における 11β -HSD1 活性の良いバイオマーカーとなる可能性があると考えられる。

正常血糖高インスリンランプ試験の結果から、DIO/CP マウスは顕著なインスリン抵抗性を呈していることが明らかとなった。インスリンは、脂肪分解を負に制御する制御因子として知られている (Giorgino et al., 2005)。一方、GC は脂肪組織におけるインスリン感受性を低下させることが報告されてきた。脂肪組織において、GC は insulin receptor substrate (IRS) 1 と IRS2 の発現を低下させ (Caperuto et al., 2006)、phosphoinositide 3 kinase の活性を低下させる (Corporeau et al., 2006)。したがって、DIO/CP マウスでの脂肪分解の亢進は、脂肪組織におけるインスリン抵抗性惹起による二次的なものである可能性も考えられる。

これまでの報告より、*in vitro* 試験において活性型 GC は 11β -HSD1 mRNA 発現を亢進させることが示されてきた (Whorwood et al., 2001; Sun et al., 2002; Yang et al., 2007)。更に *in vivo* 試験において、齧歯類の脂肪組織における 11β -HSD1 mRNA は、活性型 GC の慢性処置により発現上昇することが報告されている (Michailidou et al., 2007; Balachandran et al., 2008; Sai et al., 2008)。肥満 2 型糖尿病患者において、腸間膜脂肪における定常的な脂肪分解と 11β -HSD1 mRNA 発現レベルは、肥満患者と比較して亢進している (Yang et al., 2008)。したがって、肥満 2 型糖尿病患者の脂肪組織において、 11β -HSD1 発現上昇を伴う GC シグナルの悪循環が存在していると考えられる。我々は、DIO/CP マウスの腸間膜脂肪組織において 11β -HSD1 mRNA 発現上昇を確認した。この結果は、DIO/CP マウスの脂肪組織においても、肥満 2 型糖尿病患者と同様の GC シグナル活性化の悪循環が成立していることを示唆している。

DIO/CP マウスの病態進展における GC シグナルの寄与を確認する為、我々は、GR 受容体アンタゴニストである RU486 の DIO/CP マウスへの反復投与による薬効評価を行った。齧歯類モデルにおいて GR の薬理的な阻害により高血糖やインスリン抵抗性が改善することが報告されてきている (Kusunoki et al., 1995; Gettys et al., 1997; Liu et al., 2005)。RU486 反復投与の結果、コルチゾン処置により発現上昇した DIO/CP マウス脂肪組織の 11β -HSD1 と ATGL mRNA 発現は、RU486 の用量依存的に低下した。更に、DIO/CP マウスにおいて、RU486 の用量依存的に血漿中 NEFA 値、グリセロール値、そしてグルコース値が低下した。これらの結果は、GC シグナル活性化による脂肪分解亢進と高血糖が密接な関係にあることを示すものである。更に、DIO/CP マウスは、過剰な GC シグナル活性化に依存して病態発症を示す動物モデルであり、GC シグナル阻害剤の作用を感度良く捉えられることが示された。したがって、本モデルは、GR アンタゴニストや 11β -HSD1 阻害剤といった GC シグナル阻害剤の詳細な Pharmacokinetics (PK)/Pharmacodynamics (PD) 解析と薬効評価に非常に有用な動物モデルとなることが推測される。

本研究において、脂肪組織 GC シグナル活性化による病態形成には、脂肪組織における

脂肪分解が高血糖発症の引き金となる重要な役割を果たしていることが明らかとなった。脂肪組織における GC シグナル活性の結果、脂肪分解によって上昇する血中グリセロールは肝臓において糖新生の基質となり、また血中遊離脂肪酸が筋肉、肝臓といったインスリン感受性臓器において脂肪毒性を發揮し、これらの臓器においてインスリン抵抗性を形成することで、全身性に糖代謝が悪化すると考えられる (Fig. 8)。また、GC 活性化により糖尿病の病態を発症する過程で、脂肪組織における 11 β -HSD1 mRNA 発現上昇を伴う GC シグナルの悪循環が成立していることが示唆された (Fig. 8)。したがって、脂肪組織における過剰な GC シグナルの是正は脂肪分解の亢進を抑制するだけでなく、脂肪組織における GC シグナル活性化の悪循環を断ち、脂肪組織の機能を正常化することで、2 型糖尿治療の魅力的なアプローチとなり得るであろう。

実際に、Incyte 社の 11 β -HSD1 阻害剤 INCB-13739 の phase II 試験において、INCB-13739 投与群において空腹時血糖値と HbA1c が改善した (Rosenstock et al., 2010)。この時、INCB-13739 投与群においてチアゾリジン系薬剤において懸念となっている体重増加作用は認められなかった。INCB-13739 の phase I 試験において、肝臓に加えて脂肪組織における INCB-13739 の 11 β -HSD1 阻害作用も証明しており (Tiwari, 2010)、脂肪組織における 11 β -HSD1 阻害が薬効發揮に重要であることが臨床試験の結果からも示唆されている。これらの結果から、特に脂肪組織における阻害作用を有する 11 β -HSD1 阻害剤は、新規のインスリン抵抗性改善薬となると期待される。

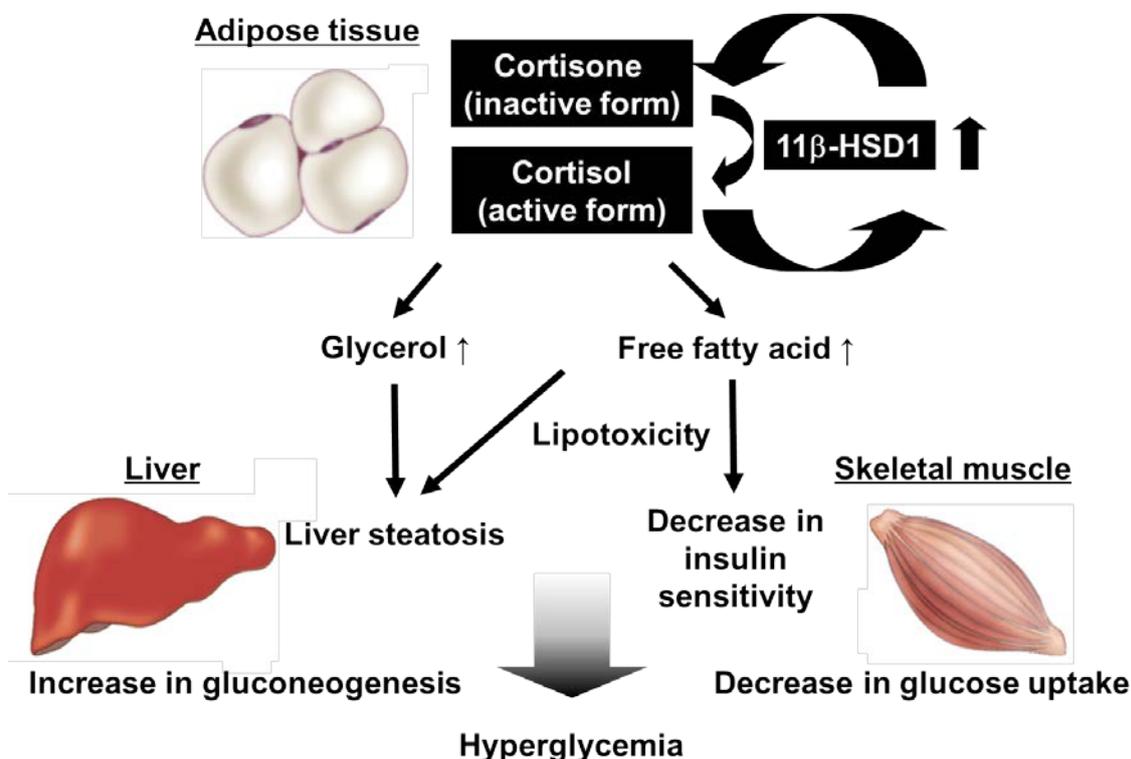


Fig. 8. The mechanism of disease onset caused by 11 β -HSD1

第3章 DIO/CP マウスのヒト外挿性の確認

3.1. 序論

これまでに、DIO/CP マウスにおける GC シグナル依存的な病態発症には、脂肪組織からの脂肪分解の亢進、脂肪組織における GC 活性化悪循環の成立が重要な役割を担うことを明らかにした。

我々は、DIO/CP マウスのヒト外挿性の確認を目的とし、本モデルにおける既存の糖尿病治療薬の応答性の確認を試みた。DIO/CP マウスが脂肪組織の機能不全を伴う顕著なインスリン抵抗性を呈するモデルであることから、脂肪組織を標的臓器とするインスリン抵抗性改善であるピオグリタゾンを使用する薬剤として選択した。ピオグリタゾンは peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ のリガンドであるチアゾリジン系薬剤の代表的な化合物であり、2 型糖尿病治療にこれまで広く用いられてきている薬剤である。チアゾリジン系薬剤は、主に前駆脂肪細胞に作用しインスリン感受性の高い小型の脂肪細胞への分化を誘導する (Okuno et al., 1998)。また、チアゾリジン系薬剤は、インスリン抵抗性惹起分子である tumor necrosis factor- α 、遊離脂肪酸等の因子を分泌する肥大化した脂肪細胞を減少させる (Okuno et al., 1998)。これらのメカニズムに基づいて、ピオグリタゾンをはじめとするチアゾリジン系薬剤は、脂肪細胞の機能を是正することで、肝臓、骨格筋といったインスリン感受性臓器における脂肪毒性を解除し、全身性のインスリン感受性を亢進させると考えられている。

今回新たに構築した DIO/CP マウスのピオグリタゾンの応答性を確認することは、DIO/CP マウスが GC シグナル阻害剤以外の薬剤の評価に使用可能であることを示すものであり、本モデルの糖尿病治療薬評価におけるヒト外挿性と汎用性の高さを示す上で重要な意味を持つと考えられる。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 動物実験 (ピオグリタゾン反復投与試験)

コルチゾンペレット移植 DIO マウス (DIO/CP マウス) は、1.2.1.に記載の通りに作製した。DIO/CP マウスに、0.5% w/v メチルセルロース溶液 (Wako) を溶媒としてピオグリタゾン (3 あるいは 10 mg/kg) を 1 日 1 回、day 0 から day 6 までの 7 日間、経口投与した。

Day 5 の時点で非絶食条件下にて、day 7 の時点で一晩絶食条件下にて血液の採取を行い、血漿中代謝パラメータ [グルコース、遊離脂肪酸 (NEFA)、インスリン] の測定を実施した。

3.3. 結果

コルチゾンペレット移植と同時にピオグリタゾンの投与を開始し、5日後（非絶食条件）、7日後（絶食条件）の時点において血漿中代謝関連パラメータ変化についての解析を行った。結果、ピオグリタゾンのDIO/CPマウスへの反復投与によりピオグリタゾンは用量依存的にDIO/CPマウスの非絶食条件下における血漿中NEFA値とグルコース値を改善した（Fig. 9, A and B）。一方、空腹時条件下においては、ピオグリタゾン投与によって有意な血漿中グルコース値の改善は認められなかったが、インスリン値の低下が確認された（Fig. 9, C and D）。

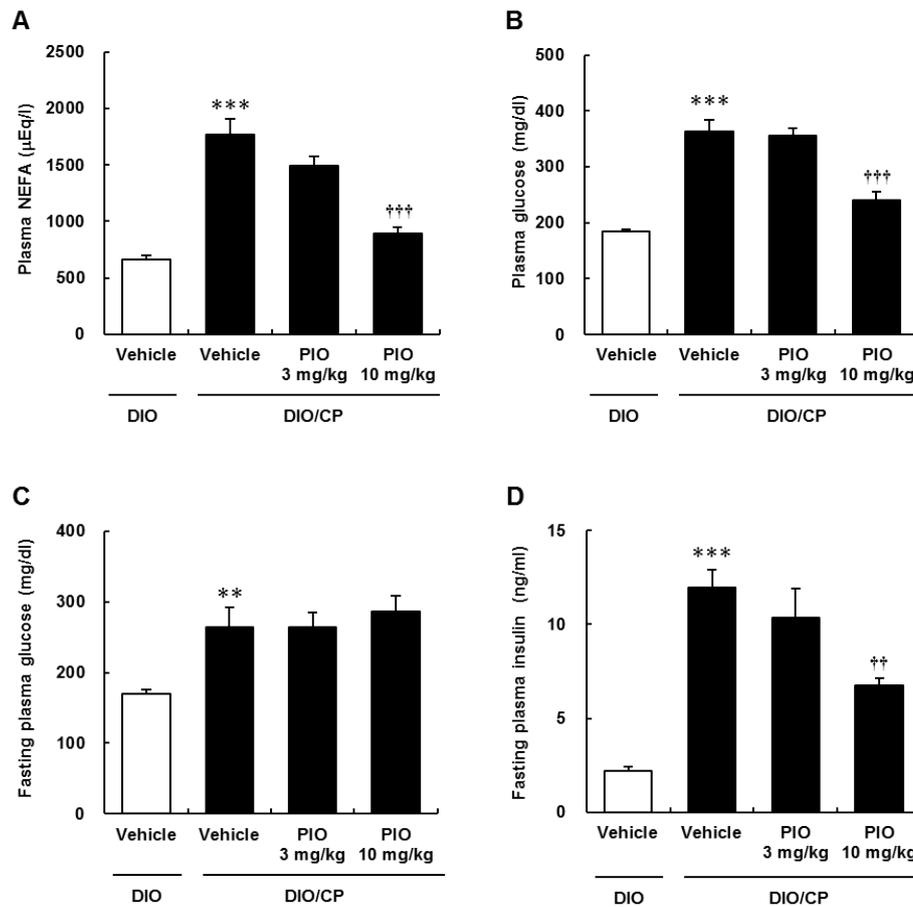


Fig. 9. Effects of oral dosing with pioglitazone (PIO, 3 and 10 mg/kg) on metabolic parameters in DIO/CP mice. A and B, Plasma levels of NEFA (A) and glucose (B) in DIO/CP mice 5 days after administration of pioglitazone. C and D, Plasma levels of glucose (C) and insulin (D) in overnight-fasted DIO/CP mice 7 days after administration of pioglitazone. Values are mean \pm SEM; $n = 14$. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs sham-operated DIO mice (t test). †† $P < 0.01$; ††† $P < 0.001$ vs vehicle-treated DIO/CP mice (Dunnett's multiple comparison test).

3.4. 考察

インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンの薬効発揮メカニズムとして、脂肪細胞の小型化、脂肪細胞での脂肪酸の取り込み亢進と脂肪分解の抑制による、他のインスリン感受性臓器における脂肪毒性の解除が考えられている。今回、我々はピオグリタゾンが DIO/CP マウスにおいても、血漿中グルコース値、インスリン値を低下させインスリン抵抗性改善作用に基づく糖代謝改善作用を発揮することを確認した。

チアゾリジン系薬剤は、脂肪細胞においてリポ蛋白リパーゼ (Schoonjans et al., 1996)、脂肪酸輸送蛋白質 (Martin et al., 1997)、CD36 などの発現を上昇させ (Teboul et al., 2001)、脂肪酸の取り込みを増大させる。また、脂肪細胞におけるグリセロールキナーゼの発現を亢進することでグリセロール-3-リン酸を増大させ、遊離脂肪酸及びグリセロールがトリグリセライドの形で脂肪組織内に蓄積するのを亢進し (Guan et al., 2002)、脂肪分解を抑制する。また、実際にピオグリタゾンは 2 型糖尿病患者の全身の脂肪分解を低下させることが報告されている (Gastaldelli et al., 2009)。我々が期待していた通り、DIO/CP マウスへのピオグリタゾン投与により非絶食条件下の血漿中 NEFA 値の低下と相関して血漿中グルコース値が改善した (Fig. 9, A and B)。この結果は、ピオグリタゾンによる脂肪分解抑制作用によって、DIO/CP マウスの糖尿病状態が改善したことを示唆するものであり、これまで我々が明らかにした DIO/CP マウスの病態発症機構を裏付ける結果である。しかし、ピオグリタゾン投与によって絶食条件下における血漿中グルコース値は改善せず、血漿中インスリン値のみ有意に改善した (Fig. 9, C and D)。空腹時血糖値の維持には肝臓からの糖放出が大部分を占めることが報告されている (Landau et al., 1996)。ピオグリタゾンは、脂肪を直接の標的臓器とする為、この時点においてはまだ肝臓における病態改善作用が十分ではなく、病態改善作用が空腹時の血漿中グルコース値にまで反映していない可能性が考えられる。

ピオグリタゾンは、*in vitro*、*in vivo* 試験において共に、脂肪の 11 β -HSD1 mRNA 発現を低下させることが報告されている (Berger et al., 2001; Nakano et al., 2007)。しかしながら、ピオグリタゾン投与 DIO/CP マウスの腸間膜脂肪組織における 11 β -HSD1 mRNA 発現変化を確認したところ、vehicle 投与群と比較して有意な 11 β -HSD1 mRNA 発現変化は認められなかった (data not shown)。この結果より、DIO/CP マウスにおけるピオグリタゾンによる病態改善作用は、脂肪組織における直接的な GC 状態の正常化に基づいた作用ではなく、ピオグリタゾンによる脂肪分解抑制作用に基づくものだと考えられる。

今回我々は、既存のインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンが、DIO/CP マウスにおいてもインスリン抵抗性を改善して糖代謝を改善することを見出した。この結果より、DIO/CP マウスが GC シグナル阻害剤以外の薬剤の評価に使用可能であることが示され、DIO/CP マウスが脂肪組織の機能不全を病態発症の基盤とする 2 型糖尿病患者を外挿する動物モデルであることが示唆された。

総括と展望

本研究において、我々は、 11β -HSD1 を介した GC シグナル活性化を基盤とした新規の肥満 2 型糖尿病モデル DIO/CP マウスを構築した。また、DIO/CP マウスにおいて、インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンの応答性を確認したことから、本モデルが脂肪組織の機能不全を病態発症の基盤とする 2 型糖尿病患者を外挿する動物モデルであることが示唆された。今後、DIO/CP マウスにおいてビグアナイド系、インクレチン関連薬剤といった他の糖尿病治療薬の応答性を確認することで、本モデルが 2 型糖尿病患者のどのセグメントを反映した動物モデルであるのか、より詳細に解析を行う必要がある。DIO/CP マウスの特徴を理解した上で、将来的には本モデルを活用した糖尿病治療薬の候補化合物スクリーニングや、候補化合物の特徴付けへと繋げていきたい。

更に、DIO/CP マウスを用いて、GC による糖尿病発症には、内臓脂肪における脂肪分解亢進が重要であることを示した。また、GC により糖尿病の病態を発症する過程において、 11β -HSD1 発現上昇を伴う脂肪組織の GC シグナル活性化の悪循環の存在が、糖尿病の病態発症に寄与している可能性を提示した。これらの現象と同様の脂肪組織の機能不全は、2 型糖尿病患者においても認められることが報告されている。したがって、脂肪組織における GC シグナルの正常化は、肥満 2 型糖尿病患者において、糖尿病治療の魅力的な治療アプローチとなり得ると考えられる。今後、脂肪組織の GC シグナル正常化を目指した 11β -HSD1 阻害剤や GR アンタゴニストといった薬剤の新規糖尿病治療薬としての開発と臨床応用が期待される。

引用文献

- Agarwal, A.K., Monder, C., Eckstein, B., and White, P.C. Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 β -dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 264:18939-18943 (1989)
- Albiston, A.L., Obeyesekere, V.R., Smith, R.E., and Krozowski, Z.S. Cloning and tissue distribution of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.* 105:R11-R17 (1994)
- Andrews, R.C. and Walker, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *ClinSci. (Lond.)* 96:513-523 (1999)
- Bajaj, M., Suraamornkul, S., Romanelli, A., Cline, G.W., Mandarino, L.J., Shulman, G.I., and DeFronzo, R.A. Effect of a sustained reduction in plasma free fatty acid concentration on intramuscular long-chain fatty Acyl-CoAs and insulin action in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 54:3148-3153 (2005)
- Balachandran, A., Guan, H., Sellan, M., Van, Uum, S., and Yang, K. Insulin and dexamethasone dynamically regulate adipocyte 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology* 149:4069-4079 (2008)
- Berger, J., Tanen, M., Elbrecht, A., Hermanowski-Vosatka, A., Moller, D.E., Wright, S.D., and Thieringer, R. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands inhibit adipocyte 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *J. Biol. Chem.* 276:12629-12635 (2001)
- Berthiaume, M., Laplante, M., Festuccia, W., G elinas, Y., Poulin, S., Lalonde, J., Joannise, D.R., Thieringer, R., and Deshaies, Y. Depot-specific modulation of rat intra-abdominal adipose tissue lipid metabolism by pharmacological inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology* 148:2391-2397 (2007)
- Bhat, B.G., Younis, H., Herrera, J., Palacio, K., Pascual, B., Hur, G., Jessen, B., Ogilvie, K.M., and Rejto, P.A. Antisense inhibition of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves diabetes in a novel cortisone-induced diabetic KK mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365:740-745 (2008)
- Brown, R.W., Chapman, K.E., Edwards, C.R., and Seckl, J.R. Human placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* 132:2614-2621 (1993)
- Brown, R.W., Chapman, K.E., Kotelevtsev, Y., Yau, J.L., Lindsay, R.S., Brett, L., Leckie, C., Murad, P., Lyons, V., Mullins, J.J., Edwards, C.R., and Seckl, J.R. Cloning and production of antisera to human placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Biochem. J.* 313:1007-1017 (1996)
- Campbell, J.E., Peckett, A.J., D'souza, A.M., Hawke, T.J., and Riddell, M.C. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*

- 300:C198-C209 (2011)
- Caperuto, L.C., Anhô, G.F., Amanso, A.M., Ribeiro, L.M., Medina, M.C., Souza, L.C., Carvalho, O.M., Bordin, S., Saad, M.J., and Carvalho, C.R. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. *Endocrine* 29:391-398 (2006)
- Capurso, C. and Capurso, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul. Pharmacol.* 57:91-97 (2012)
- Claus, T.H., Lowe, D.B., Liang, Y., Salhanick, A.I., Lubeski, C.K., Yang, L., Lemoine, L., Zhu, J., and Clairmont, K.B. Specific inhibition of hormone-sensitive lipase improves lipid profile while reducing plasma glucose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315:1396-1402 (2005)
- Corporeau, C., Foll, C.L., Taouis, M., Gouygou, J.P., Bergé, J.P., and Delarue, J. Adipose tissue compensates for defect of phosphatidylinositol 3'-kinase induced in liver and muscle by dietary fish oil in fed rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290:E78-E86 (2006)
- DeSchoolmeester, J., Palming, J., Persson, T., Pereira, M.J., Wallerstedt, E., Brown, H., Gill, D., Renström, F., Lundgren, M., Svensson, M.K., Rees, A., and Eriksson, J.W. Differences between men and women in the regulation of adipose 11 β -HSD1 and in its association with adiposity and insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.* 15:1056-1060 (2013)
- Divertie, G.D., Jensen, M.D., and Miles, J.M. Stimulation of lipolysis in humans by physiological hypercortisolemia. *Diabetes* 40:1228-1232 (1991)
- Gastaldelli, A., Casolaro, A., Ciociaro, D., Frascerra, S., Nannipieri, M., Buzzigoli, E., and Ferrannini, E. Decreased whole body lipolysis as a mechanism of the lipid-lowering effect of pioglitazone in type 2 diabetic patients. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:E225-E230 (2009)
- Gettys, T.W., Watson, P.M., Taylor, I.L., and Collins, S. RU-486 (Mifepristone) ameliorates diabetes but does not correct deficient β -adrenergic signalling in adipocytes from mature C57BL/6J-ob/ob mice. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21:865-873 (1997)
- Giorgino, F., Laviola, L., and Eriksson, J.W. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta. Physiol. Scand.* 183:13-30 (2005)
- Gravholt, C.H., Dall, R., Christiansen, J.S., Møller, N., and Schmitz, O. Preferential stimulation of abdominal subcutaneous lipolysis after prednisolone exposure in humans. *Obes. Res.* 10:774-781 (2002)
- Guan, H.P., Li, Y., Jensen, M.V., Newgard, C.B., Steppan, C.M., and Lazar, M.A. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat. Med.* 8:1122-1128 (2002)
- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E.F., Klingenspor, M., Hoefler, G., and Zechner, R. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312:734-737 (2006)

- Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., and Gross, R.W. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglyceroltransacylase activities. *J. Biol. Chem.* 279:48968-48975 (2004)
- Kershaw, E.E., Morton, N.M., Dhillon, H., Ramage, L., Seckl, J.R., and Flier, J.S. Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes* 54:1023-1031 (2005)
- Kotelevtsev, Y., Holmes, M.C., Burchell, A., Houston, P.M., Schmoll, D., Jamieson, P., Best, R., Brown, R., Edwards, C.R., Seckl, J.R., and Mullins, J.J. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14924-14929 (1997)
- Kusunoki, M., Cooney, G.J., Hara, T., and Storlien, L.H. Amelioration of high-fat feeding-induced insulin resistance in skeletal muscle with the antiglucocorticoid RU486. *Diabetes* 44:718-720 (1995)
- Lakshmi, V. and Monder, C. Purification and characterization of the corticosteroid 11 β -dehydrogenase component of the rat liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology* 123:2390-2398 (1988)
- Landau, B.R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W.C., Ekberg, K., and Kalhan, S.C. Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J. Clin. Invest.* 98:378-385 (1996)
- Liu, Y., Nakagawa, Y., Wang, Y., Sakurai, R., Tripathi, P.V., Lutfy, K., and Friedman, T.C. Increased glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type 2 diabetes in db/db mice. *Diabetes* 54:32-40 (2005)
- Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B., and Auwerx, J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPAR α and PPAR γ activators. *J. Biol. Chem.* 272: 28210-28217 (1997)
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R., and Flier, J.S. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166-2170 (2001)
- Michailidou, Z., Coll, A.P., Kenyon, C.J., Morton, N.M., O'Rahilly, S., Seckl, J.R., and Chapman, K.E. Peripheral mechanisms contributing to the glucocorticoid hypersensitivity in proopiomelanocortin null mice treated with corticosterone. *J. Endocrinol.* 194:161-170 (2007)
- Morgan, S.A., Sherlock, M., Gathercole, L.L., Lavery, G.G., Lenaghan, C., Bujalska, I.J., Laber, D., Yu, A., Convey, G., Mayers, R., Hegyi, K., Sethi, J.K., Stewart, P.M., Smith, D.M., and Tomlinson, J.W. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes* 58:2506-2515 (2009)

- Morton, N.M., Holmes, M.C., Fiévet, C., Staels, B., Tailleux, A., Mullins, J.J., and Seckl, J.R. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J. Biol. Chem.* 276:41293-41300 (2001)
- Nakano, S., Inada, Y., Masuzaki, H., Tanaka, T., Yasue, S., Ishii, T., Arai, N., Ebihara, K., Hosoda, K., Maruyama, K., Yamazaki, Y., Shibata, N., and Nakao, K. Bezafibrate regulates the expression and enzyme activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in murine adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292:E1213-E1222 (2007)
- Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A.B., and Nieman, L.K. Cushing's syndrome. *Lancet* 367:1605-1617 (2006)
- Nurjhan, N., Consoli, A., and Gerich, J. Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 89:169-175 (1992)
- Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y., and Kadowaki, T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.* 101:1354-1361 (1998)
- Postic, C., Dentin, R., and Girard, J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.* 30:398-408 (2004)
- Puhakainen, I., Koivisto, V.A., and Yki-Järvinen, H. Lipolysis and gluconeogenesis from glycerol are increased in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75:789-794 (1992)
- Rask, E., Olsson, T., Söderberg, S., Andrew, R., Livingstone, D.E., Johnson, O., and Walker, B.R. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:1418-1421 (2001)
- Rask, E., Walker, B.R., Söderberg, S., Livingstone, D.E., Eliasson, M., Johnson, O., Andrew, R., and Olsson, T. Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:3330-3336 (2002)
- Rosenstock, J., Banarar, S., Fonseca, V.A., Inzucchi, S.E., Sun, W., Yao, W., Hollis, G., Flores, R., Levy, R., Williams, W.V., Seckl, J.R., and Huber, R. The 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor INCB13739 improves hyperglycemia in patients with type 2 diabetes inadequately controlled by metformin monotherapy. *Diabetes Care* 33:1516-1522 (2010)
- Sai, S., Esteves, C.L., Kelly, V., Michailidou, Z., Anderson, K., Coll, A.P., Nakagawa, Y., Ohzeki, T., Seckl, J.R., and Chapman, K.E. Glucocorticoid regulation of the promoter of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires CCAAT/enhancer-binding protein- β . *Mol. Endocrinol.* 22:2049-2060 (2008)
- Sano, S., Nakagawa, Y., Yamaguchi, R., Fujisawa, Y., Satake, E., Nagata, E., Nakanishi, T., Liu, Y.J.,

- and Ohzeki, T. Carbenoxolone alters the morphology of adipose tissues and downregulates genes involved in adipogenesis, glucose transport and lipid metabolism in high-fat diet-fed mice. *Horm. Metab. Res.* 44:15-20 (2012)
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., and Auwerx, J. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15:5336-5348 (1996)
- Serr, J., Suh, Y., Oh, S.A., Shin, S., Kim, M., Latshaw, J.D., and Lee, K. Acute up-regulation of adipose triglyceride lipase and release of non-esterified fatty acids by dexamethasone in chicken adipose tissue. *Lipids* 46:813-820 (2011)
- Stulnig, T.M. and Waldhäusl, W. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 in obesity and Type 2 diabetes. *Diabetologia* 47:1-11 (2004)
- Sun, K., He, P., and Yang, K. Intracrine induction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by glucocorticoid potentiates prostaglandin production in the human chorionic trophoblast. *Biol. Reprod.* 67:1450-1455 (2002)
- Tagawa, N., Ikariko, N., Fukumura, K., and Kobayashi, Y. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serum 11-dehydrocorticosterone in rat and mouse. *Biol. Pharm. Bull.* 30:403-409 (2007)
- Teboul, L., Febbraio, M., Gaillard, D., Amri, E.Z., Silverstein, R., and Grimaldi, P.A. Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem. J.* 360: 305-312 (2001)
- Tiwari, A. INCB-13739, an 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *IDrugs* 13:266-275 (2010)
- Tomlinson, J.W., Draper, N., Mackie, J., Johnson, A.P., Holder, G., Wood, P., and Stewart, P.M. Absence of Cushingoid phenotype in a patient with Cushing's disease due to defective cortisone to cortisol conversion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:57-62 (2002)
- Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.H., and Sul, H.S. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 279:47066-47075 (2004)
- Wake, D.J., Rask, E., Livingstone, D.E., Söderberg, S., Olsson, T., and Walker, B.R. Local and systemic impact of transcriptional up-regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:3983-3988 (2003)
- Walker, B.R., Campbell, J.C., Fraser, R., Stewart, P.M., and Edwards, C.R. Mineralocorticoid excess and inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in patients with ectopic ACTH syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 37:483-492 (1992)
- Wang, Y.J., Huang, S.L., Feng, Y., Ning, M.M., and Leng, Y. Emodin, an 11 β -hydroxysteroid

- dehydrogenase type 1 inhibitor, regulates adipocyte function in vitro and exerts anti-diabetic effect in ob/obmice. *Acta. Pharmacol. Sin.* 33:1195-1203 (2012)
- Whorwood, C.B., Donovan, S.J., Wood, P.J., and Phillips, D.I. Regulation of glucocorticoid receptor α and β isoforms and type I 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:2296-2308 (2001)
- Xu, C., He, J., Jiang, H., Zu, L., Zhai, W., Pu, S., and Xu, G. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 23:1161-1170 (2009)
- Yang, Y.K., Chen, M., Clements, R.H., Abrams, G.A., Aprahamian, C.J., and Harmon, C.M. Human mesenteric adipose tissue plays unique role versus subcutaneous and omental fat in obesity related diabetes. *Cell. Physiol. Biochem.* 22:531-538 (2008)
- Yang, Z., Guo, C., Zhu, P., Li, W., Myatt, L., and Sun, K. Role of glucocorticoid receptor and CCAAT/enhancer-binding protein α in the feed-forward induction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by cortisol in human amnion fibroblasts. *J. Endocrinol.* 195:241-253 (2007)
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386 (2004)
- 益崎裕章. 肥満とメタボリックシンドローム -動物モデルから- 第124回 日本医学会シンポジウム記録集 肥満の科学 27-34 (2003)

論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Akiyama, N., Akiyama, Y., Kato, H., Kuroda, T., Ono, T., Imagawa, K., Asakura, K., Shinosaki, T., Murayama, T., and Hanasaki, K. Pharmacological evaluation of adipose dysfunction via 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the development of diabetes in diet-induced obese mice with cortisone pellet implantation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349:66-74 (2014)

謝辞

本研究の遂行に際し、終始適切な御指導御鞭撻を受け賜りました千葉大学大学院薬学
研究院 薬効薬理学研究室 村山俊彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、多大なる御協力、御助言を頂きました塩野義製薬株式会社 花崎浩二博
士、篠崎俊宏博士、朝倉賢治博士に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を通じ御協力を頂きました塩野義製薬株式会社 フロンティア医薬研究所
肥満・代謝性疾患部門のメンバー一同に深く感謝致します。

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された
下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 山口直人
副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 千葉寛
副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 医学博士 高野博之