

インスリン抵抗性がレチノール結合タンパク質 (RBP4)

およびビタミン A 代謝に与える影響の解析

2016 年

白井 智美

目次

第一章 序論

- 第一節 研究の概要
- 第二節 メタボリックシンドローム
- 第三節 インスリン抵抗性
- 第四節 アディポサイトカイン
- 第五節 ビタミンAの役割と機能
- 第六節 レチノール結合タンパク質 (RBP4)

第二章 食餌性肥満と非肥満型糖尿病が RBP4 発現量と

Retinol 代謝に及ぼす影響解

第一節 食餌性肥満モデルと非肥満型糖尿病モデルラットの作出

- 第一項 目的
- 第二項 動物実験モデルの背景
 - (1) Goto-kakizaki (GK) ラット
 - (2) 肥満モデルラット
- 第三項 実験方法
 - (1) 実験動物および飼育方法
 - (2) 経口糖負荷試験
 - (3) 血中グルコース濃度の定量分析
 - (4) 統計解析
- 第四項 結果
 - (1) 経口糖負荷試験
 - (2) 最終体重・総摂食量・臓器重量・血中グルコース
- 第五項 小括

第二節 血中 RBP4 の解析

- 第一項 目的
- 第二項 実験方法
- 第三項 結果
- 第四項 小括

第三節 肝臓・腎臓・脂肪組織中の RBP4 遺伝子の発現解析

第一項 目的

第二項 実験方法

第三項 結果

第四項 小括

第四節 血中・肝臓・腎臓・脂肪組織における Retinol、Retinyl palmitate 量の解析

第一項 目的

第二項 実験方法

(1) 血清中のレチノール抽出方法

(2) 臓器中のレチノール抽出方法

(3) HPLC 測定条件

第三項 結果

第四項 小括

第五節 肝臓・腎臓・脂肪組織における RALDH、RAR β 遺伝子の発現解析

第一項 目的

第二項 実験方法

第三項 結果

第四項 小括

第六節 腎臓組織における HSP70 遺伝子の発現解析

第一項 目的

第二項 実験方法

(1) 実験動物および飼育方法

(2) 遺伝子発現解析

第三項 結果

第四項 小括

第三章 転写因子 PSMB1 の核内移行による RBP4 遺伝子発現解析

機構の解析

第一節 RBP4 遺伝子発現機構

第二節 PSMB1 のドメイン解析

第一項 目的・実験方法

第二項 結果

第三項 小括

第三節 PSMB1 の Y149 のリン酸化が核移行と RBP4 の転写に及ぼす影響解析

第一項 目的・実験方法

第二項 結果

第三項 小括

第四章 総括

第一節 総括

第二節 英文要旨

第三節 参考文献

第四節 謝辞

第一章

序論

第一節 大要

近年、心筋梗塞や脳梗塞が増加しており、これらの冠動脈疾患の原因として考えられているのが、生活習慣に起因して起こるメタボリックシンドロームである¹⁾。メタボリックシンドロームとは、過栄養や運動不足などにより、肥満を呈することで高血糖や高血圧、脂質代謝異常症などを引き起こし、高頻度に狭心症や心筋梗塞などの冠動脈疾患を招く病態である(Fig.1-1)²⁾。このメタボリックシンドロームの主原因として考えられているのが、アディポサイトカインの異常である³⁾。肥満を呈することで、脂肪細胞の数の増加や脂肪細胞の肥大化が起こり、マクロファージが活性化し、慢性的な炎症反応が生じた結果、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインに異常が起き、全身の代謝障害を引き起こす⁴⁾。アディポサイトカインの中でもレプチンやアディポネクチンは、食欲の調節やインスリン感受性を増強する作用などインスリン抵抗性を抑制する働きが知られている⁵⁾。しかし、TNF- α や炎症性サイトカインとして知られるIL-1やIL-6はインスリンシグナルを阻害し、インスリン抵抗性を発症させることが明らかになっている⁶⁾。そして、近年、新たにインスリン抵抗性を引き起こすアディポサイトカインとして同定されたのが、レチノール結合タンパク質(RBP4)である⁷⁾。

RBP4は、21 kDaの比較的低分子量タンパク質であり、肝臓に貯蔵されているレチノールを標的臓器に運び、体内のレチノール量を厳密に制御するために機能するタンパク質だと考えられてきた⁸⁾。しかし、先行研究により肥満や糖尿病の脂肪細胞から分泌されるRBP4が、アディポサイトカインとして、肝臓の糖新生を亢進させ、筋肉では糖の取り込みを阻害することが報告された。^{7,9)}

しかし、アディポサイトカインとしてのRBP4には不明な点が多いのが現状である。まず、脂肪組織からのRBP4の増加が、肥満とインスリン抵抗性のどちらに起因するのかについて明らかになってはいない。肥満を呈し、インスリン抵抗性を発症し、メタボリックシンドロームになるという一連の流れのどの段階でRBP4が上昇するのかを明らかにすることは、アディポサイトカインとしてのRBP4の役割を明らかにするために必要である。肝臓に貯蔵されているレチノールは、RBP4と複合体を形成し、標的臓器へと運ばれるが、増加したRBP4がレチノールと結合しているのか、RBP4の変動が末梢組織のビタミンA代謝に影響を及ぼすのかについても不明である。さらに、RBP4の発現機構についても不明である。

そこで、上記の 3 つの疑問を明らかにすることを目的に、食事誘導性の単純性肥満モデルと自然発症的にインスリン抵抗性を惹起する 2 つの異なるモデルラットを用いた研究と、脂肪細胞を用いて **RBP4** 遺伝子発現機構の研究を行った。

本研究は、上記の 2 つの実験について報告する。

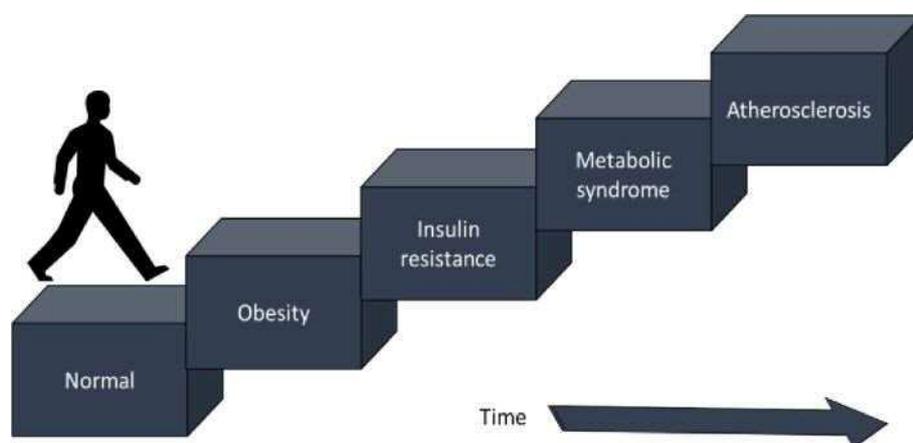


Fig.1-1 冠動脈疾患発症概念図

第二節 メタボリックシンドローム

厚生労働省が発表している人口動態調査によると、平成 27 年度の死因順位の第 1 位が悪性新生物で 28.7%、第 2 位が心疾患で 15.2%、第 3 位が肺炎の 9.4%、第 4 位が脳血管疾患で 8.7%、第 5 位が老衰の 6.6%である¹⁰⁾。第 2 位の心疾患や第 4 位の脳血管疾患などの冠動脈疾患の原因として挙げられているのが、メタボリックシンドロームである。

Gerald Reaven は、肥満、高インスリン血症、耐糖能異常、脂質異常症の間の密接な相互関係を「シンドローム X」とし¹¹⁾、Kaplan は、肥満、高中性脂肪血症、耐糖能低下、高血圧の集積を「死の四重奏(deadly quartet)」とした¹²⁾。さらに、WHO が、インスリン抵抗性と耐糖能異常、脂質異常症、高血圧、肥満、アルブミン尿などの症状の内、少なくとも 2 つ以上あてはまる状態を「メタボリックシンドローム」と提唱した¹³⁾。その後、国際糖尿病連盟により、中心性肥満に加え、高血圧、高中性脂肪、HDL コレステロール低値、空腹時血糖値の異常の内、2 つが当てはまる状態をメタボリックシンドロームであると定義した¹⁴⁾。日本では、平成 17 年にメタボリックシンドローム診断基準検討委員会によって、腹囲が基準値以上（男性 85cm、女性 90cm）、加えて、中性脂肪値 150 mg/dl 以上、HDL コレステロール 40 mg/dl 未満、高血圧、空腹時血糖値 110 mg/dl 以上、これらの項目のうち、2 つ以上が当てはまると「メタボリックシンドローム」として定義された¹⁵⁾。このように、メタボリックシンドロームについての定義は統一されておらず、未だに議論されている。しかし、すべての定義において、肥満、高血圧、高コレステロール、インスリン抵抗性は偶然に発症したのではなく、脂肪細胞から分泌されるサイトカインによる慢性炎症によって引き起こされているのではないかという認識は一致している。

このことから、肥満によって脂肪細胞に炎症が起きることで、アディポサイトカインの異常を引き起こし、インスリン抵抗性を発症し、メタボリックシンドロームや冠動脈疾患に繋がると考えられている。

以下の節では、肥満とメタボリックシンドロームの間の病態であると考えられているインスリン抵抗性と、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインについて述べる。

第三節 インスリン抵抗性

インスリン抵抗性とは、肝臓や骨格筋などのインスリン感受性組織においてインスリン作用の障害や減弱により、グルコースの取り込みが減少している状態である^{16,17}。インスリン抵抗性の概念図を Fig 1-2 に示した。

インスリンは、膵臓の Langerhans 島（膵島）から分泌されている。膵島は、卵形の細胞の集合体である。膵島は膵臓全体に散在しているが、体部や頭部よりも尾部に密である。膵島は、膵臓全体の約 2% を占めている。膵臓全体重の内、外分泌腺が 80% を占め、残りは導管と血管が占めている。ヒトは 100~200 万個の膵島をもっている。膵島のそれぞれに血管が分布しており、膵島を流れた血液は胃腸管を流れた血液と同様に肝門脈中に流入する。膵島の細胞は、その形態と染色性から、A、B、D、F(PP)細胞に分類されており、A 細胞はグルカゴンを分泌し、B 細胞はインスリンを分泌し、D 細胞はソマトスタチンを分泌し、PP 細胞は膵ポリペプチドを分泌する。B 細胞は、膵島細胞のうちで最も多く 60~75% を占め、一般に膵島の中心部に位置する¹⁸。

インスリンはインスリン受容体に結合し、一部は標的細胞内に取り込まれ、エンドサイトーシス過程で生成されたエンドソーム内のプロテアーゼによって分解される。インスリンの生理学的効果は、最もよく知られているのが血糖値低下作用である^{19,20}。他にも、アミノ酸やカリウム輸送、タンパク質合成の促進、タンパク質分解の抑制、グリコーゲン合成と解糖系酵素の促進やホスホリラーゼと糖新生酵素の抑制などその作用は多岐に渡る¹⁹。各組織におけるインスリンの効果として、肝臓では、ケトン生成の低下、タンパク質合成、脂質合成の増加。脂肪組織では、グルコース取り込み増加、脂肪酸合成の上昇、トリグリセリドの沈着の増加、リポタンパク質リパーゼの活性化、ホルモン感受性リパーゼの抑制、カリウム取り込みの上昇が知られている²¹。筋肉では、グルコースの取り込み増加、グリコーゲン合成の増加、アミノ酸の取り込み増加、リボソームタンパク質合成増加、タンパク質異化の低下、糖新生アミノ酸放出の低下、ケトン取り込み低下、カリウム取り込み増加など、各組織特異的に働く作用も持つ、非常に重要なホルモンである¹⁹。

グルコースの細胞内への取り込みは、促進拡散によって行われる。腸や腎臓では、 Na^+ と共に二次性能動輸送によって細胞内に取り込まれる。このグルコースが、細胞膜を通過し流入する促進拡散を担うグルコーストランスポーターは、細胞膜を 12 回貫通する共通する構造を持つタンパク質ファミリーに属し、それらの N 末端と C 末端は細胞内に存在している¹⁷。インスリンは、筋肉や脂肪組織では、細胞膜のグルコーストランスポーターの数を増やすことに

よって細胞内へのグルコース取り込みを促進する。グルコーストランスポーターは、発見順に従って GLUT1 から GLUT7 まで 7 種類存在することが明らかにされている²²⁾。GLUT1 と GLUT3 は、胎盤や脳、赤血球、腎臓、腸にて静止時グルコースの取り込み、GLUT2 は、膵島 B 細胞グルコース感受機構、腸と腎上皮細胞の管内からのグルコース輸送、GLUT4 は、骨格筋や心筋、脂肪組織にてインスリン刺激時のグルコースの取り込み、GLUT5 は空腸や精子にてフルクトースの輸送、GLUT6 は偽遺伝子、GLUT7 は、肝臓にて小胞体のグルコース 6 リン酸のトランスポーターとして働くことがこれまでに明らかにされている¹⁷⁾。

インスリンと関わりが深い GLUT4 は、インスリン感受性細胞の細胞質の小胞に予備的に貯蔵されている。これらの細胞のインスリン受容体が活性化されると、小胞は直ちに細胞膜に向かって移動して融合し、トランスポーターが細胞膜に入る。インスリン作用が止まると、トランスポーターを含む細胞膜の領域はエンドサイトーシスされ、小胞は次のインスリン刺激に対し準備に入る。インスリン受容体活性化による小胞の細胞膜への移動は PI3 キナーゼの活性化による²³⁾。

インスリン受容体は、分子量が約 340,000 kDa で、2 α と 2 β の糖タンパク質サブユニットから構成される四量体である。単一の RNA 上で合成され、タンパク質分解によって分離されてから互いにジスルフィド結合によって結合される。 α サブユニットは細胞膜を貫通している。 β サブユニットの細胞内部位はチロシンキナーゼ活性を有している。 α と β サブユニットは共にグリコシル化されており、それらの糖残基は間質液中に延びている。インスリンが受容体と結合すると、 β サブユニットのチロシンキナーゼが活性化され、 β サブユニットのチロシン残基が自己リン酸化され、インスリンシグナルへと繋がっていく¹⁷⁾。

しかし、これらのインスリン作用がなんらかの原因により障害されることで肝臓や末梢のインスリン抵抗性を発症する。インスリン抵抗性は、インスリン受容体の下流から、細胞の代謝機能に関連するインスリン作用の最終的な基質までのインスリンシグナルが障害を受けることが示唆されている。これは、2 型糖尿病患者において、インスリン受容体の数やチロシンキナーゼ活性が正常であることが報告されているため、インスリン抵抗性とは、インスリンシグナルの障害であるとの認識が高まっている。他にもミトコンドリア機能不全や数の減少による脂肪酸酸化の減少と脂肪酸アシル COA とジアシルグリセロールの蓄積によってインスリン抵抗性が起こるといふ説もある²⁴⁾。

これらのインスリン抵抗性の原因として、肥満による細胞外グルコース過多による耐糖能の低下や、脂肪細胞の炎症によるアディポサイトカイン分泌異常が挙げられる^{25,26}。

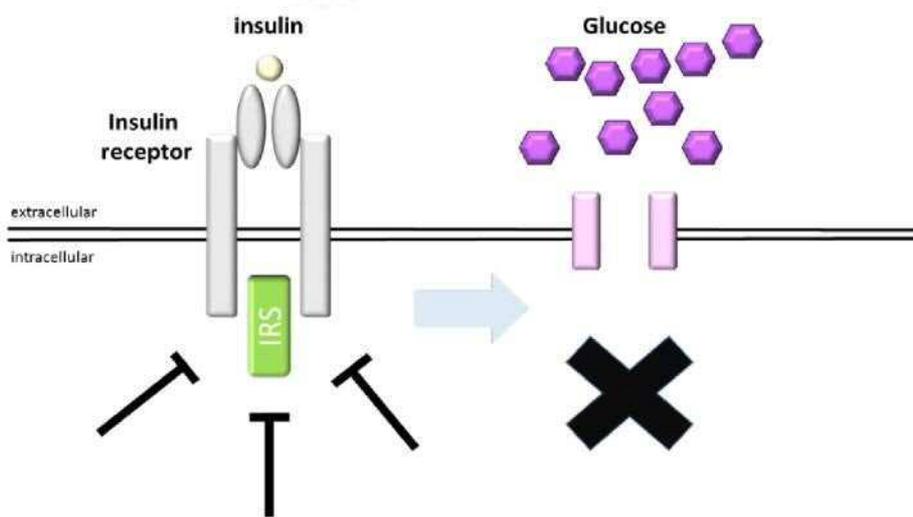


Fig.1-2 インスリン抵抗性の概念図

第四節 アディポサイトカイン

アディポサイトカインとは、脂肪細胞から分泌されるホルモンやサイトカイン、ケモカイン、脂肪酸などの生理活性物質の総称である²⁷⁾。これまでに脂肪細胞に特異的に発現するという定義にあてはまるものだけで、すでに 50 以上のアディポサイトカインが同定されている。

最初のアディポサイトカインとして発見されたのが、レプチンである²⁸⁾。レプチンは、脂肪組織の栄養状態を視床下部のレプチン受容体に伝達することで、食欲やエネルギー代謝調節、下垂体ホルモンの調節や交感神経の活動制御など、多彩な役割を担うホルモンである。これまでエネルギーの貯蔵庫としてのみ捉えられてきた脂肪組織は、実は内分泌臓器であり、アディポサイトカインを介して他の臓器に作用し、様々な生理機能を有しているということがレプチンの発見により明らかになった。他にも、アディポネクチンは、脂肪組織のみで合成・分泌されるタンパク質で APM1 とも呼ばれている²⁵⁾。アディポネクチンは、骨格筋や肝臓においてインスリン感受性を増強し、血管壁においては接着分子群の誘導を抑制し、マクロファージの泡沫化を抑制し、動脈硬化の進行を防ぐ役割をしている²⁵⁾。

しかし、肥満を呈すると TNF- α 、IL-6、CRP、フィブリノゲン値が上昇し、これらのアディポサイトカインがメタボリックシンドロームやインスリン抵抗性、冠動脈疾患の有意な関連因子となることが明らかになった²⁹⁾。

インスリン抵抗性を引き起こすアディポサイトカインとして、最初に同定された TNF- α は、セリン・スレオニンキナーゼである JNK を活性化し、IKK β /NF- κ B 経路を活性化することで IRS-1 のセリン残基をリン酸化し、通常の IRS のシグナルを阻害することや、TNF α により、GKAP42 を分解することで、IRS を直接阻害することなどが明らかになっており、炎症性サイトカインである IL-1 は、ERK を介し IRS の発現を転写レベルで減少させることや、IKK β を介して IRS を阻害することが示されている³⁰⁾。他にも、IL-6 は、SOCS1 と SOCS3 を誘導することで IRS をユビキチンにより分解することが明らかになっている³⁰⁾。このようにアディポサイトカインが、インスリンシグナルを阻害する系がいくつも明らかになっている(Fig 1-3)。

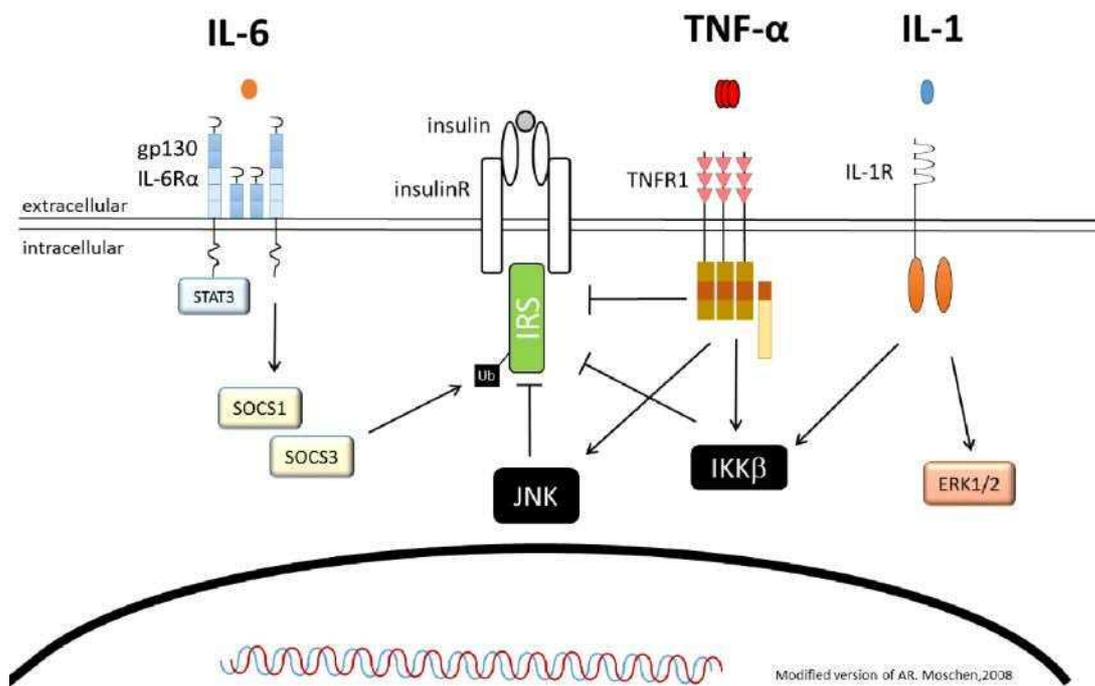


Fig.1-3 アディポサイトカインによるインスリンシグナル阻害

第五節 ビタミン A の役割と機能

ビタミン A とは、全トランス-レチノールの活性を有するレチノイドのひとつである。レチノールは、分子量 286.5 kDa であり、4 個のイソプレンを有し、二重結合を 5 個含んだ構造を持っている (Fig.1-5)。レチノールは可逆的にレチナールに酸化され、さらにレチノイン酸に酸化される。貯蔵型は、レチニルパルミテイトである。βカロテンなどのカロテノイドをプロビタミン A とし、開裂されることでレチノイドの活性が得られる。リコペンは、プロビタミン A 化合物の特性を持たないカロテンである。これまでに 700 種以上のカロテノイドが単離されているが、50 種のみがビタミン A 活性を有している。レチノイドやカロテノイドは、光、酸素、金属、熱により酸化や異性化を起こしやすい。

ビタミン A の生理作用は、視覚、成長、生殖、皮膚、粘膜上皮の正常保持、糖タンパク質・糖脂質生合成能ならびに粘液分泌機能の維持、さらには聴覚・味覚作用ときわめて多彩である³¹⁾。

ビタミン A の欠乏症は、最初にラットで発見され、その後、ヒトを含むすべての哺乳動物が欠乏症になることが示された。ビタミン A が欠乏すると、成長が阻害され、骨と神経系は適切に発達できない。また、上皮細胞の分化、増殖に対する障害が起こる。そのために皮膚は乾燥して肥厚し角質化が起こり、粘膜上皮の乾燥が認められる。また、腎臓などの腺組織は退化し、生殖器は、生殖上皮の変化によって両性とも生殖機能を失う。最も顕著なのが、目の障害であり、乳幼児の場合、眼球乾燥症が起こり、重篤な場合は失明に至る。成人では、夜盲症を発症する³¹⁾。

ビタミン A は、肉や魚油、乳製品といった動物由来食品からはレチノイドの形で、緑黄色野菜や果物などの植物由来食品からはプロビタミン A として摂取される。腸管で植物由来食品のプロビタミン A はレチナールに開裂し CRBP II と結合する。マイクロソームのレチナールレダクターゼが CRBP II と結合しているレチナールを認識し、レチノールに変換する。動物由来食品のレチノイドは、レチノールへの加水分解を受ける。レシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ (LRAT) は、CRBP II・レチノール複合体を認識し、レチノールエステルを合成する⁶⁴⁾。CRBP II はレチナールやレチノールの酸化を防ぎ、レチノールエステル生成を最適化する。カイロミクロンは、レチノールエステルをトリアシルグリセロールの加水分解後に形成されたカイロミクロンレムナントとして肝臓へ運ばれる³²⁾。

肝臓では、体内のビタミン A の約 80%が貯蔵され、その 50~80%がビタミン A の貯蔵細胞である星細胞に局在する^{33,34)}。上皮組織へのビタミン A の輸送は、肝細胞内で、レチノールは RBP4 と複合体を形成し、レチノール輸送が必要になるまで小胞体に蓄積される³³⁾。血液中に分泌された後、TTR と結合する。レチノールに対する RBP4 の結合安定性は、TTR によって高められ、RBP4 のレチノールへの結合親和性が上昇する(Fig.1-6)³⁵⁾。この結合親和性の上昇は、RBP4 が糸球体濾過や尿中排泄によって失われないように TTR が 55kDa のホモテトラマー TTR と変化するからである。

ビタミン A 供給が十分な状態では、RBP4 合成と蓄積は適切に行われ、新たに吸収されたビタミン A が肝臓外に移行することはほとんどない。ビタミン A 欠乏状態では、レチノールと結合していない RBP4 が肝細胞内で増大することも明らかになっている。

ビタミン A の分析方法はとして、レチノイドとカロテノイドの共役ポリエン構造は、特徴的な吸収スペクトルやモル吸光係数、UV もしくは可視吸光スペクトルを示す。エタノール溶液中の最大モル吸光係数は、全トランスレチノールは 325 nm、全トランスレチナールは 381 nm、全トランスレチノイン酸は 350 nm である。レチノールを 325 nm で励起すると、470 nm の蛍光を発する。このことから、吸光度や蛍光を用いたレチノイドやカロテノイドの定量は逆相の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて行われる。血清レチノールを分析するためには、レチノール結合タンパク質を分析前にアルコールかアセトニトリルの有機溶媒抽出により変性させレチノールを遊離させる³¹⁾。

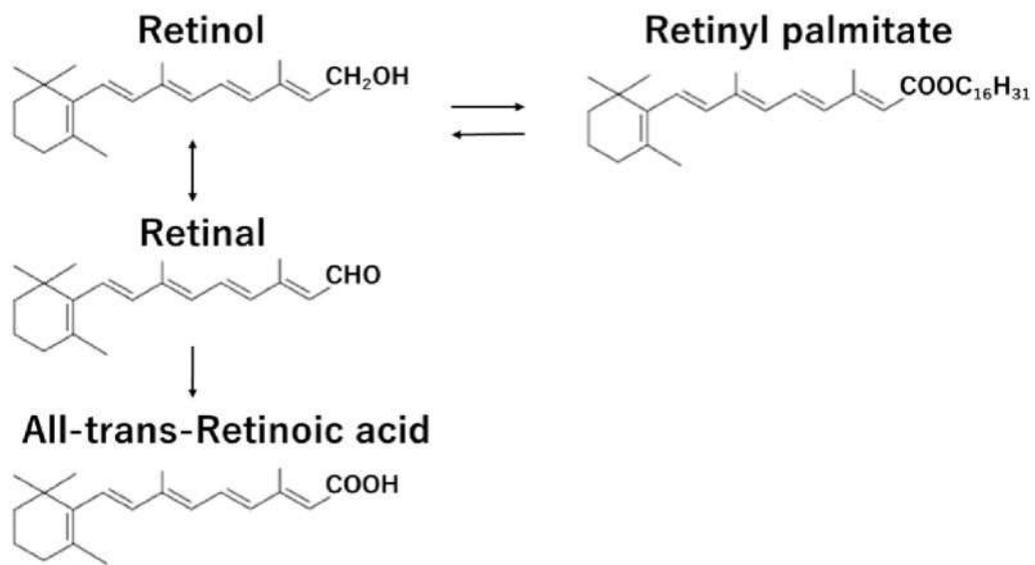


Fig.1-5 レチノール化学式

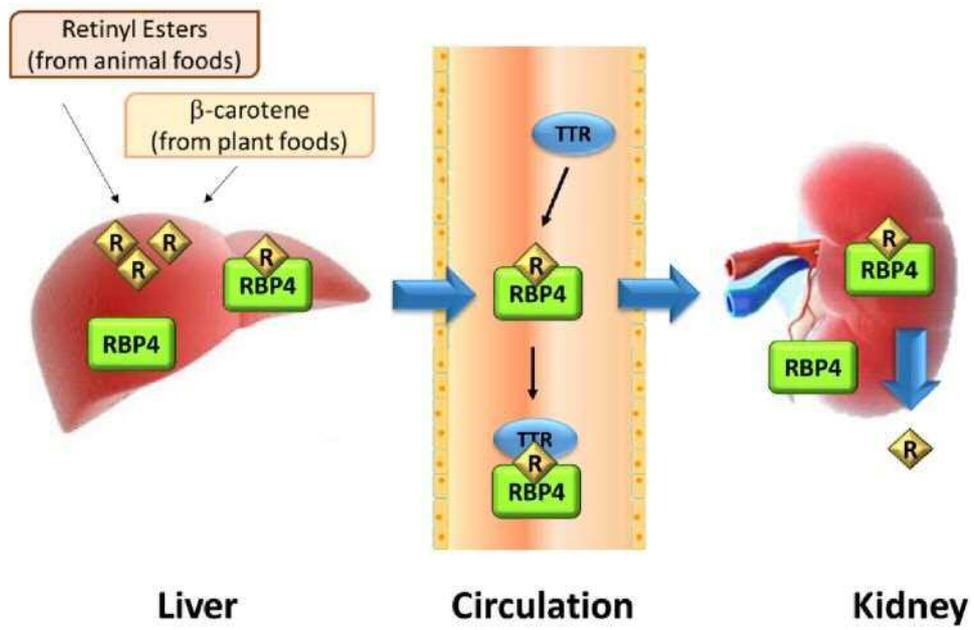
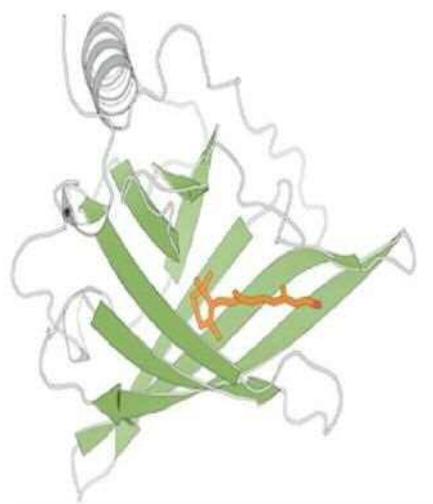


Fig.1-6 レチノール輸送機構

第六節 レチノール結合タンパク質 (RBP4)

レチノール結合タンパク質 (RBP4) は、レチノールを肝臓から抹消組織へと運ぶ輸送タンパク質の機能を持ったタンパク質である。RBP4 は、アミノ酸 183 残基、21kDa の比較的分子量タンパク質である³⁶⁾。RBP4 の発現もそのほとんどが肝臓で合成され、レチノールの動態に応じて、発現が調節されると考えられてきた³⁶⁾。しかし、Kahn らは、RBP4 トランスジェニックマウスがインスリン抵抗性を示し、野生型のマウスにリコンビナント RBP4 を投与するとインスリン抵抗性を惹起することを明らかにした⁷⁾。肥満や他の糖尿病モデルの血中 RBP4 レベルが上昇していることを明らかにした⁷⁾。一方で、RBP4 をノックアウトさせるとインスリン感受性が改善することや、合成レチノイドである Fenretinide の投与により、尿への RBP4 排泄を促進することで、インスリン抵抗性が改善することを示し、RBP4 がインスリン抵抗性に寄与するアディポサイトカインであると証明した⁷⁾。RBP4 がインスリン抵抗性を惹起するメカニズムとして、骨格筋におけるインスリン受容体シグナルの低下や肝臓の糖新生酵素 PEPCK の発現上昇などが示されたが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。また、RBP4 の元来の機能であるレチノール輸送との関わりについても明らかになっていない。



Chem Rev. 2014 Jan 8; 114(1): 194–232.

Fig 7. RBP4

第二章

食餌性肥満と非肥満型糖尿病が RBP4 発現量と Retinol 代謝に及ぼす影響解析

第七節 食餌性肥満モデルと非肥満型糖尿病モデルラットの作出

第一項 目的

血中 **RBP4** は、肥満やインスリン抵抗性状態で上昇することが明らかになっている。しかし、肥満とインスリン抵抗性のどちらに起因して上昇するのか、また増加した血中 **RBP4** が末梢組織の **RBP4** 遺伝子発現に及ぼす影響、そして、レチノール代謝に与える影響については明らかになっていない。そこで、肥満とインスリン抵抗性を明確に区別したモデルを作成し、解析することを目的に動物実験を行った。

一般的に肥満を呈するモデルは、食欲中枢に作用し、過食によって肥満を呈し、インスリン抵抗性を発症するモデルが多く実験に用いられている。そこで、本研究では 40%高脂肪食を与え、遺伝的な影響を受けずに肥満にさせたモデルを食餌性肥満モデルとし、インスリン抵抗性モデルには、肥満を伴わないことを特徴とする 2 型糖尿病モデルラット **Goto-Kakizaki(GK)**ラットを用いて実験を行った。

食餌性肥満モデルと非肥満型インスリン抵抗性モデルの確立までを本節では述べていく。

第二項 動物実験モデルの背景

(1) Goto-Kakizaki(GK)ラット

Goto-Kakizaki (GK ラット) は、糖尿病の発症は糖尿病遺伝子の有無によって決定されるという作業仮説を基に東北大学の後藤、柿崎らによって確立された2型糖尿病モデルラットである³⁶⁾。

正常ラットにブドウ糖負荷試験を行い、その中から相対的に耐糖能の低下しているラットを選択し、交配する。そして、この操作を何代も繰り返し、代を重ねるごとに耐糖能が高度に低下し、糖尿病状態のラットが発現するのではないかと。もしも、何代交配を繰り返しても耐糖能が低下したラットが発現しなければ、糖尿病の発症には糖尿病遺伝子の有無によって決定されるという作業仮説である³⁶⁾。

この仮説を基に後藤、柿崎らは Wistar (Jcl/Wistar) ラットを用いて、ブドウ糖負荷試験による選択交配後、第一世代からブドウ糖負荷試験で 0、30、60、90、120 分の 5 時点の血糖値を足した値 (血糖和) の上昇が認められ、第 8 世代以降は兄弟交配を取り入れ、糖尿病モデルラットである GK ラットが誕生した。この結果から、耐糖能悪化は多因子遺伝が原因であることを示した。その後、種の保存を目的に伝染病除去と SPF 化が行われた³⁷⁾。

GK ラットの特徴として、非肥満型・インスリン分泌不全・網膜症・腎障害・神経障害などが挙げられる³⁸⁾。GK ラットの成長曲線は、Wistar ラットよりも有意差はないが低いまま推移し、肥満を呈さない。耐糖能異常は、生後 2 週齢ですでに認められ、加齢による変動は認められない。インスリン分泌不全の原因は、膵島の変形と線維化による面積減少、インスリンを分泌する B 細胞の減少である。さらに、インスリン分泌不全だけでなく、肝臓のグルコース産生も亢進しており、インスリン値の上昇による肝臓グルコース産生の抑制が認められないことから、インスリン感受性の低下も糖尿病の一因である³⁸⁾。網膜症は、早期から明らかな色素漏出が認められている。腎臓の組織学的解析から、GK ラットの糸球体基底膜の不規則な肥厚、メサンギウム細胞にもマトリクスの増殖性変化が確認されており、8 週齢から尿中アルブミンの有意な排泄量の増加も認められている。神経伝達速度も Wistar ラットよりも有意に低下し、有髄神経線維、平均軸索面積、ミエリン鞘面積が低値であることも確認されている。また、GK ラットは、肝臓での糖新生が増加しているため、肝臓でのインスリン抵抗性が認められている。これは、GK ラットがインスリン分泌不全による糖尿病モデルとして

だけでなく、インスリン抵抗性モデルとしても用いることができることを示している³⁷⁾。

これらのことから、肥満を呈し、糖尿病を発症する糖尿病モデルと異なり、非肥満型でありながら耐糖能異常とインスリン抵抗性を呈する糖尿病モデルであることから、本研究の目的の一つである **RBP4** の変動が肥満とインスリン抵抗性のどちらに起因しているのかを明らかにするモデルとして適していると考え、**GK** ラットを用いて研究を行った。

(2) 肥満モデルラット

肥満モデル動物は、大きく分けて自然発症モデル、食事性モデルと遺伝子改変モデルの3つに分けられる³⁹⁾。

自然発症モデルの中でもよく用いられるラットとして、レプチン受容体遺伝子欠損ラット (**Zucker** ラット) とコレシストキニン A 受容体遺伝子変異ラット (**Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty =OLETF** ラット)⁴¹⁾がある。

Zucker ラットは、1961年に **Zucker** らによって発見された。満腹中枢シグナルを担うレプチン受容体遺伝子欠損ホモ型により、生後3週齢頃より肥満を呈する^{*)}。多食、高脂血症、高インスリン血症、軽度の耐糖能異常を示すことから、インスリン抵抗性モデルや2型糖尿病モデルとしても用いられる。2型糖尿病の合併症である、腎障害や軽度の網膜症は認められるが、神経障害は、発症しない。さらに、肥満により免疫応答と $\text{TNF-}\alpha$ や $\text{IL-1}\beta$ などの炎症性サイトカイン産生の亢進が認められる。

OLETF ラットは、インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) のモデルとして用いられることが多く、生後18週齢頃から高血糖、高インスリン血症、高脂血症を発症し、高インスリンにより、膵臓 **B** 細胞が疲弊萎縮を起こし、低インスリン血症になることが明らかになっている。**OLETF** ラットも、肥満だけでなくインスリン抵抗性モデルとしても用いられる。

Zucker ラットや **OLETF** ラットは、肥満だけでなく、インスリン抵抗性や糖尿病を発症するため、単純性肥満モデルには、食事によって肥満を誘導するモデルがよく用いられる。

一方、食事誘導性モデルは、通常食に対し、高脂肪食や、高スクロース食、高フルクトース食など、それぞれの目的に応じた食餌を与え、体重や血液マーカーにて肥満を判断し、モデルを確立する。しかし、食事誘導性モデルは、薬剤などを用いて病態を発症させるのではないため、発症を見極めるのが難しく、飼育期間や方法などを確立させるのが難しい。

現在、肥満モデルとしてよく用いられているのが、**40%~60%fat kcal** の高脂肪食を与えて、長期間飼育を行い体重や血中脂質などで肥満を判定するモデルである。

本研究で用いた肥満モデルも、インスリン抵抗性との区別を明確にさせるため、**40%fat kcal** の高脂肪食を与え、遺伝的ではなく食事によって誘導されたモデルを作製した。

第三項 実験方法

(1) 実験動物および飼育方法

動物実験は、東京農業大学動物実験委員会の承認を受け、東京農業大学高次生命機能解析センターにて行った。

4週齢雄性の Wistar ラット 12 匹と 4 週齢雄性の GK ラット 12 匹を日本クレアより購入した。環境に適応させるため個別ケージにて標準飼料である AIN-93G を与え、自由摂食・自由摂水にて一週間予備飼育を行った。明暗サイクルは、12 時間。室温は、23°C、湿度 50%±5%。予備飼育一週間後に体重を測定し、各群で体重のバラつきがないように 4 つの群にグループ分けを行った。与えた飼料は、Wistar ラットに標準飼料である AIN-93G⁴²⁾を与えたコントロール群、Wistar ラットに高脂肪食(40%fat kcal)を与えた肥満群、GK ラットに AIN-93G を与えたインスリン抵抗性群、GK ラットに高脂肪食(40%fat kcal)を与えた群の計 4 群(n=6)で、それぞれの飼料で 10 週間飼育を行った。高脂肪食(40%fat kcal)に用いた油は、ビタミン A の含有量が非常に微量である牛脂⁴³⁾を用い、飼料中のビタミン A 含有量を一定にした。飼料組成を Table.1 に示した。また、摂取するビタミン A の量を揃える目的で、pair-feeding を行った。摂水は、自由摂取とした。毎日同時刻に体重と摂食量の測定を行った。解剖の 3 日前に経口糖負荷試験を実施した。解剖の 12 時間前から飼料を抜き、絶食を行った。解剖は、腹腔内にソムノペンチル(ペントバルビタール 64.8 mg/ml 含有)を麻酔後、心臓採血を行い、臓器を摘出し、素早く液体窒素にて凍結し、-80°C の冷凍庫にて保管した。肝臓は、生理食塩水にて灌流を行った後、液体窒素にて凍結し、-80°C の冷凍庫にて保管した。血液は、3000 rpm で 15 分間遠心分離後、速やかに生化学的解析に用い、残りの血清を 200µl ずつ分注し、-80°C の冷凍庫にて保管した。

Table.1 食餌組成

Ingredient	AIN-93G	High fat
	g/kg diet	
Cornstarch	397.486	257.458
α-Cornstarch	200	200
Casein	132	132
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
Fiber	50	50
Mineral Mixture	35	35
Vitamin Mixture	10	10
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
TBHQ	0.014	0.042
Beef tallow	0	140
Protein kcal (%)	20.10%	17.10%
Carbohydrate kcal (%)	64.10%	42.60%
Fat kcal (%)	15.80%	40.30%

Table.2 AIN-93G ビタミン混合

AIN-93Gビタミン混合	mg/100g
ニコチン酸	300
パントテン酸カルシウム	160
塩酸ピリドキシン	70
塩酸チアミン	60
リボフラビン	60
葉酸	20
D-ビオチン	2
ビタミンB12 (シアノコバラミン) [0.1%]	250
ビタミンE (全-rac- α -トコフェロール酢酸) [50%]	1500
ビタミンA (全-trans-パルチン酸レチノール) [500,000U/g]	80
ビタミンD3 (コルカルシフェロール) [400,000U/g]	25
ビタミンK1 (フィロキノン)	7.5
シュークロース	97465.5
合計	100000

Table.3 AIN-93G ミネラル混合

AIN-93G ミネラル混合	mg/100g
CaCO ₃	35700
KH ₂ PO ₄	19600
K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · H ₂ O	7078
NaCl	7400
K ₂ SO ₄	4660
MgO	2400
FeC ₆ H ₅ O ₇ · xH ₂ O	606
ZnCO ₃	165
MnCO ₃	63
CuCO ₃ · Cu(OH) ₂ · H ₂ O	32.4
KIO ₃	1
Na ₂ SeO ₄	1.025
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.795
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	145
CrK(SO ₄) · 12H ₂ O	27.5
LiCl	1.74
H ₃ BO ₃	8.15
NaF	6.35
NiCO ₃ · 2Ni(OH) ₂ · 4H ₂ O	3.06
NH ₄ VO ₃	0.66
シュークロース	22100.32
合計	100000

(2) 経口糖負荷試験

12時間絶食を行った後に、0分（空腹時血糖値）の血糖値をラットの尾静脈から血液を採取し、メデイセーフチップを用いて血糖値を測定した。その後、ラットに1gのグルコースをH₂Oに溶解し経口投与し、それぞれ30・60・90・120分後に採血し、血糖値を測定した。

(3) 血中グルコース濃度の定量分析

血中グルコース濃度は、グルコース CII テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。

心臓採血より採取した血液を 3000rpm、10min 遠心分離を行い得られた上清を血清とし、サンプルとした。

上記の血清 0.01ml に発色試薬 1.5ml を加え、同様に標準液にも 0.01ml 発色試薬を加え、ボルテックスで攪拌し、37°C で 5min 加温した。

ボルテックスで攪拌後、120min 以内に試薬盲検を対照として、505nm 波長で標準の吸光度を測定し、検量線を作製し、そこから検体の吸光度に相当する血中グルコース濃度を求めた。以上の操作を下記に示した。



(4) 統計解析

データは、平均±標準偏差 (mean±SD) で示した。
統計解析は、まず各群の分散が等しいことを **levene test** にて確認した。
Levene test の結果、有意差が認められた場合には、**Log** 変換を行った。
Levene test にて独立した多群の分散 (母分散) が等しいことを確認した後、
Two-way ANOVA 法にて主効果と交互作用について判定した。
さらに多群間の比較には、**Tukey** の多重比較検定を、2 群間の比較には
Student's ttest を用いた。いずれも $P<0.01$ で有意差と判定した。
検定力分析は、**Power analysis(G*power 3)**にて行った⁴⁴⁾。
G*power <http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/>

第四項 結果

(1) 経口糖負荷試験

Wistar (Cont) 群と Wistar(HFD)群では、どの Time においても有意な差は認められない。同様に GK(Cont)群と GK(HFD)群でも、有意な差は認められない。しかし、Wistar(Cont)群と GK 両群を比較した結果、すべての Time で有意差が認められた。さらに、GK 両群においてインスリン抵抗性の特徴である血糖値が 120 分後にも低下しない、血糖コントロール不良状態であることを確認した。このことは、GK 両群がインスリン抵抗性を呈していることを示唆している。同時に、40%高脂肪食を給餌した群は、インスリン抵抗性ではないことを示唆した。

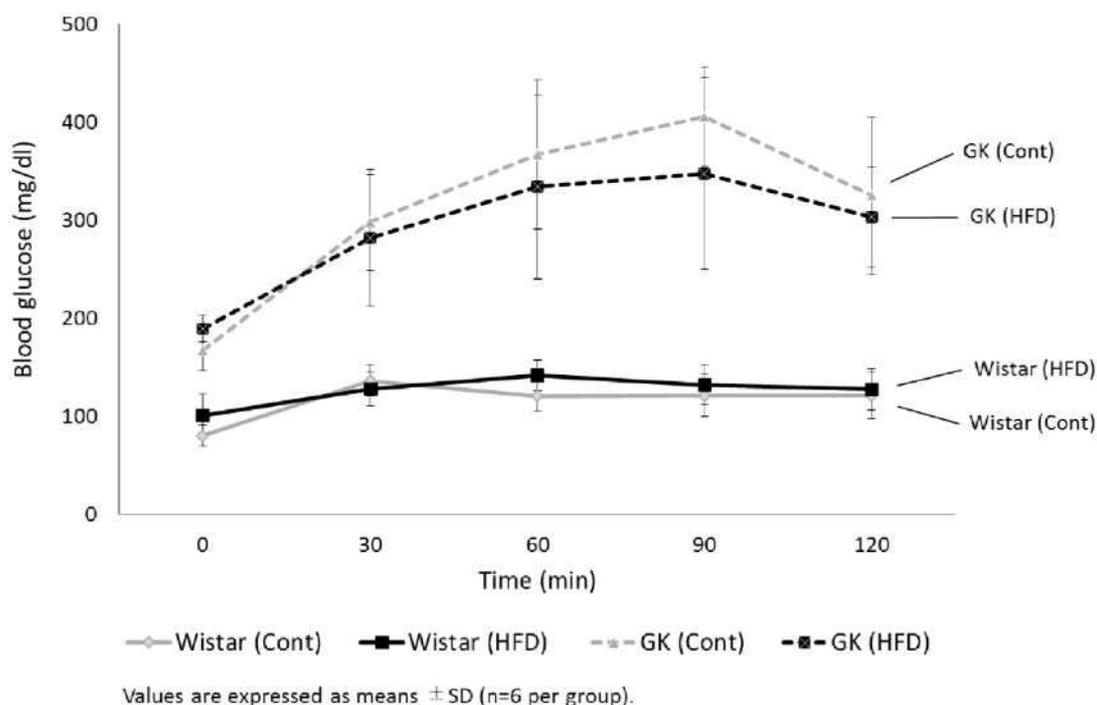


Fig.2-1 OGTT 結果

(2) 最終体重・総摂食量・臓器重量・血中グルコース

最終体重の結果、Wistar(Cont)群と比較して GK(Cont)群に有意な差は認められなかった。しかし、高脂肪食を負荷した群では、Wistar(Cont)群と比較して Wistar(HFD)、GK(Cont)群と比較して GK(HFD)群のどちらの群も有意に最終体重が増加していた。

総摂食量は、pair-feeding を行ったので、どの群間においても差は認められなかった。

内臓脂肪重量の結果、Wistar(Cont)群と比較して、Wistar(HFD)群で上昇傾向がみられた。同様に、GK(Cont)群と比較して、GK(HFD)群で上昇傾向がみられた。Wistar(Cont)と比較して、GK(Cont)では、減少傾向がみられた。

血中グルコースの結果、Wistar 両群と比較して GK 両群で有意な上昇が認められた。Wistar(Cont)群と Wistar(HFD)群、GK(Cont)群と GK(HFD)群には有意な差は認められなかった。

Table 2 Results of the growth parameters, tissue weight, and serum glucose analysis

	Experimental groups				Two-way ANOVA		
	Wistar		GK		Factors		Interactions
	Control	HFD	Control	HFD	Animal	Diet	Animal ×Diet
Final body weight(g)	266.4±9.6 ^a	296.3±9.6 ^b	277.1±8.6 ^{abc}	299.3±10.0 ^b	<i>p</i> =0.051	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> =0.342
Food intake(g/day)	12.7±0.2	12.0±0.3	12.7±0.2	12.1±0.7	<i>p</i> =0.662	<i>p</i> =0.002	<i>p</i> =0.951
Adipose tissue(g) ¹	7.2±1.1 ^a	8.6±1.2 ^{ab}	4.4±0.5 ^a	6.2±0.6 ^{ac}	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> =0.001	<i>p</i> =0.580
Glucose(mg/ dl)	143.2±6.0 ^a	150.6±23.4 ^a	292.8±29.7 ^b	263.7±27.9 ^b	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> =0.964	<i>p</i> =0.093

The control and high fat diet were given for 10 weeks.

Values are expressed as means ±SD (n=6 per group). The data were tested using Two-way ANOVA. The Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons among the means. Within a row, significantly different values are marked with different superscript letters (a-c) when significant interaction was observed (*p*<0.01).

¹ Adipose tissue = Epididymal adipose tissue.

第五項 小括

本節では、食餌誘導性肥満モデルとインスリン抵抗性モデルを作製することを目的に実験を行った。経口糖負荷試験 (OGTT) を実施した結果、**GK-Control**、**GK-HFD** 両群は、**Wistar** 両群に比べて空腹時血糖値が有意に高いこと、また経口負荷 2 時間後でも高血糖状態が維持されていることが示された。これらは糖尿病の特徴であったことから、両 **GK** 群が糖尿病状態であることを判断した。また、**Wistar-HFD** 群は、他の群と比較し、最終体重と脂肪組織重量において有意な増加が認められたが、高血糖状態は認められなかったため、糖尿病を伴わない肥満状態であることを確認した。

以上の結果より、**Wistar-Control** 群をコントロール群、高脂肪食の影響のみによる変化が解析出来る **Wistar-HFD** 群を肥満群とし、また糖尿病モデルとして **GK** ラットを用い、さらに高脂肪食を給餌することで高脂肪食の影響を解析できる計 4 群のモデル系の構築ができたものと考えた。

第八節 血中 RBP4 の解析

第一項 目的

本節では、第一節で作製した 2 つのモデルラット（肥満モデルラットとインスリン抵抗性モデルラット）を用いて、血中 RBP4 の動態を確認する。

先行研究で、肥満やインスリン抵抗性や糖尿病状態で血中の RBP4 が上昇することが示された。しかし、血中 RBP4 の上昇が肥満とインスリン抵抗性のどちらに起因しているのかについては明らかにされてはいない。アディポサイトカインとして、インスリン抵抗性の発症に関与するのか。それとも、インスリン抵抗性を発症してから RBP4 が上昇し、さらなる病態を招くのかを明らかにすることは RBP4 のアディポサイトカインとしての役割を明らかにするために必要であると考えた。

そこで、血中 RBP4 タンパク質レベルを抗 RBP4 抗体を用いた Western blotting 法を用いて解析を行った。

第二項 実験方法

1. プロテインアッセイ

タンパク量の調整は、プロテインアッセイラピッドキットワコー (Wako) を用いた。具体的には、血清を 50 倍希釈し、96well マイクロプレートに希釈した検体と標準液を 10 μ l ずつアプライする。遮光下で 20 分間静置した。マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定した。

2. タンパク質量調整

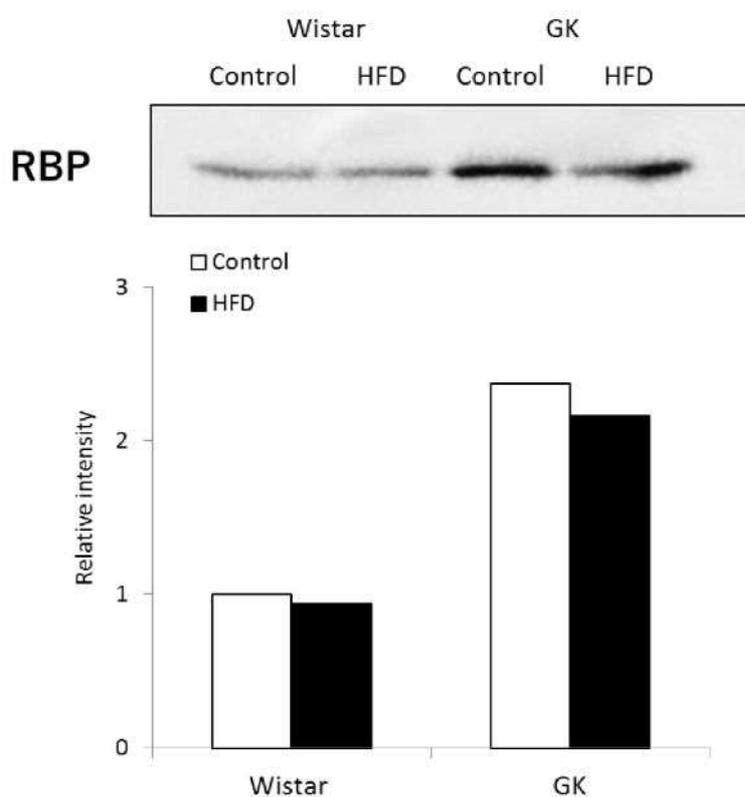
プロテインアッセイの結果を基に全サンプルを同タンパク質量に調整する。今回は、血清中のタンパク質を 10 μ g に調製した
計算式 測定結果(μ g/ μ l) \times 50(希釈倍率) \times X(液量) = 10 μ g
トータル液量を決定し、それに合わせて 4 \times buffer と milli-Q を加える。
上記の方法で調整したサンプルを Western blotting 法のサンプルとして用いた。

3. Western blotting

12%の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲルをメタノール処理した PVDF メンブレンで 500V、20mA、1 時間の条件で転写を行った。転写後のメンブレンを ECL Plus のブロッキング剤を PBST にて希釈したものを室温で 1 時間攪拌を行いながら、ブロッキングを行った。その後 PBST で 3 回洗浄を行い、5000 倍希釈した Anti-RBP4 抗体(MERCK MILLIPORE)を 4 $^{\circ}$ C にて 16 時間反応させ、その後 PBST にて 3 回洗浄を行った。PBST にて、HRP 標識された抗 rabbit IgG 抗体を添加し、室温にて 1 時間反応させる。その後、メンブレンを PBST で 3 回洗浄し、ECL-plus (GE Healthcare)の発光試薬を用いて、Gel-doc(Bio-Rad)にて検出を行った。

第三項 結果

血中 RBP4 レベルは、Wistar(Cont)群と比較して Wistar(HFD)群では変化しなかった。しかし、Wistar 両群と比較して GK 両群では増加していた (Fig.2-2)。



Total protein samples from individual serum in each groups was pooled (n=6 per pool) and equal amount of protein were loaded onto SDS page gel.

Fig.2-2 血中 RBP4

第四項 小括

これまで血中 **RBP4** は、レチノール量に応じて変動すると考えられてきた。しかし、**Kahn** らの報告により、肥満やインスリン抵抗性状態で上昇することが確認されたが、肥満とインスリン抵抗性のどちらの起因するのかは明らかになっていなかった。

本結果から、肥満ではなくインスリン抵抗性に起因して血中の **RBP4** が上昇することを初めて明らかにした。しかし、この血中 **RBP4** がレチノールと複合体を形成している **holoRBP4** なのか、それとも単体で存在しているアポ **RBP4** なのかは明らかになっていない。また、上昇した **RBP4** がどの臓器由来なのかを明らかにする必要があると考える。

第九節 肝臓・腎臓・脂肪組織中の RBP4 遺伝子の発現解析

第一項 目的

血中 RBP4 がインスリン抵抗性状態で増加することを示した。しかし、増加した RBP4 がアディポサイトカインとして全身のインスリン抵抗性に寄与しているのか。それとも、レチノールを末梢組織へと運ぶために増加しているのかは明らかにしていない。

そこで、まず血中 RBP4 の増加が、RBP4 の合成器官である肝臓、脂肪組織、腎臓中のいずれに由来するのかについて解析を行った。

第二項 実験方法

Total RNA の抽出は、RNAiso Plus (Takara) のプロトコールに基づいて行った。凍結保存した肝臓、脂肪組織、腎臓を 1g 切り出し、RNAiso Plus を 1ml 加えてホモジナイズした後、室温で 5 分間静置した。12,000×g、4℃で 5 分間遠心を行い、上清を新しい遠心チューブに移した。

クロロホルムを開始容量 (ホモジナイズに用いた RNAiso Plus の液量) の 0.2 倍量加え、混合した。室温で 5 分間静置した。12,000×g、4℃で 15 分間遠心し、上層の水層を新しい遠心チューブに移した。開始容量の 0.5 倍量～等量のイソプロパノールを加えて混合する。室温で 10 分間静置した。12,000×g、4℃で 10 分間遠心し、75%エタノールを開始容量と等量加えて洗浄を行った。7,500×g、4℃で 5 分間遠心し、沈澱を残して上清を捨てた。残渣 (RNA 画分) を乾燥させた後、適量の DEPC 水にて溶解した。

Total RNA は、NanoDrop にて濃度を測定し、500ng に調製した。

その後、PrimeScriptRT Master Mix(Takara)を用いて、cDNA へと変換した

mRNA 発現量の測定器には、Light Cycler real-time PCR (Roche)を用い、酵素は SYBR Premix EX Taq II (Takara)にてインターカレー法に供した。

ハウスキーピング遺伝子として、 β -actin を用い、RBP4 発現量の定量を行った。

Forward および Reverse primer は、下記の通りである。

Forward	Sense primer (5'-3')	Reverse	Antisense primer (5'-3')
RBP4	TTCTGATTAGCTCTCATCCAGTCTT	RBP4	TGGTTTTAATGTCCACCTAGAGAAG
β -actin	CTGACAGACTACCTCATGAAGAT	β -actin	TAGCACAGCTTCTCTTTAATGTCCAC

第三項 結果

RBP4 の主な合成臓器であると考えられている肝臓中の RBP4 遺伝子発現量の結果は、どの群においても有意な差はみられなかった (Fig.2-3)。

脂肪組織の RBP4 遺伝子発現量は、Wistar 両群と比較し、GK 両群で有意に上昇しており、この結果は血中 RBP4 レベルと同様の傾向を示した (Fig.2-4)。

腎臓中の RBP4 遺伝子発現量の結果は、Wistar(Cont)群と比較して Wistar(HFD)群で有意に上昇していた。しかし、大変興味深いことに GK 両群は、Wistar 両群と比較して、劇的に減少していた (Fig.2-5)。

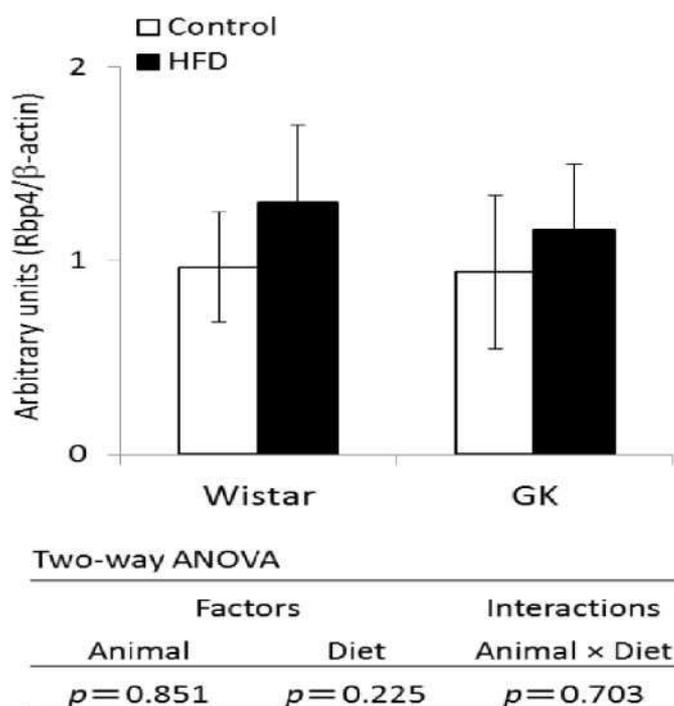
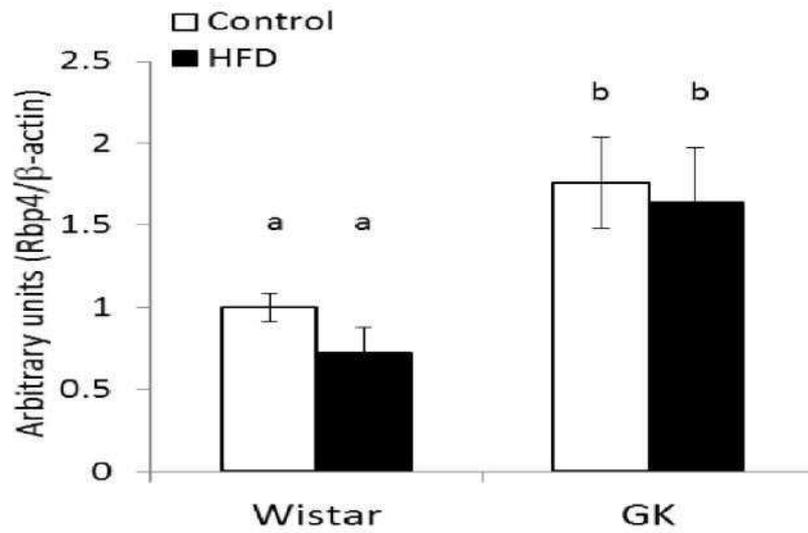


Fig.2-3 肝臓中の RBP4 遺伝子発現量



Two-way ANOVA

Factors		Interactions
Animal	Diet	Animal × Diet
$p < 0.001$	$p = 0.194$	$p = 0.475$

Fig.2-4 脂肪組織中の RBP4 遺伝子発現量

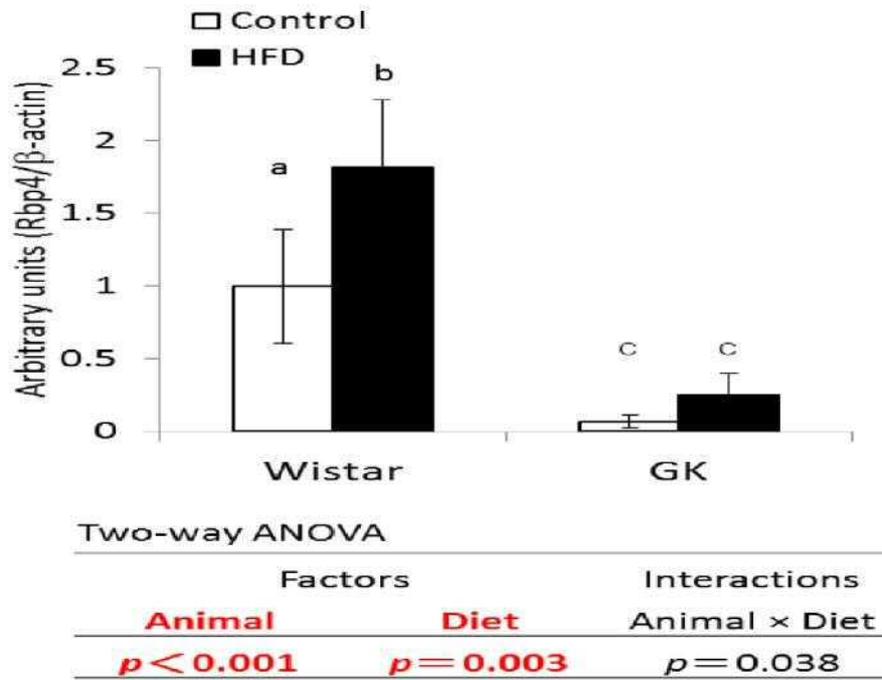


Fig.2-5 腎臓中の RBP4 遺伝子発現量

第四項 小括

血中 RBP4 の増加が、RBP4 の合成器官である肝臓、脂肪組織、腎臓中のいずれに由来するのかについて解析を行った結果、肥満モデルとインスリン抵抗性モデルでは異なる挙動を示すことを明らかにした (Fig.2-6)。

脂肪組織の RBP4 遺伝子発現量が血中と相関する結果が得られた。他の臓器で、GK 両群の上昇が認められなかったことから、血中 RBP4 の増加は脂肪組織由来であることが示唆された。この結果は、先行研究とも一致する。

RBP4 の主な合成臓器である肝臓では、高脂肪食を与えた群で上昇傾向がみられたが有意な差は見られなかった。これは、高脂肪食になると脂溶性ビタミンであるレチノールの吸収が増え、体内を循環するレチノール-RBP4 が増えているのではないかと考えた。

これまで腎臓は、再吸収と排泄器官であるとの認識が強く、ビタミン A 代謝との関連についてはあまり論じられてこなかった。しかし、腎臓中の RBP4 がほとんど合成できていないのであれば、再吸収されたレチノールは腎臓外に出ることはできないのではないか。腎臓にもビタミン A を貯蔵する機構は存在していることはすでに明らかになっている。しかし、インスリン抵抗性で RBP4 合成能が低下している状態でのレチノール代謝についてはこれまで明らかになっていない。

そこで、RBP4 合成器官である肝臓、脂肪組織、腎臓のレチノールとその貯蔵体であるレチニルパルミテイト量について測定することにした。

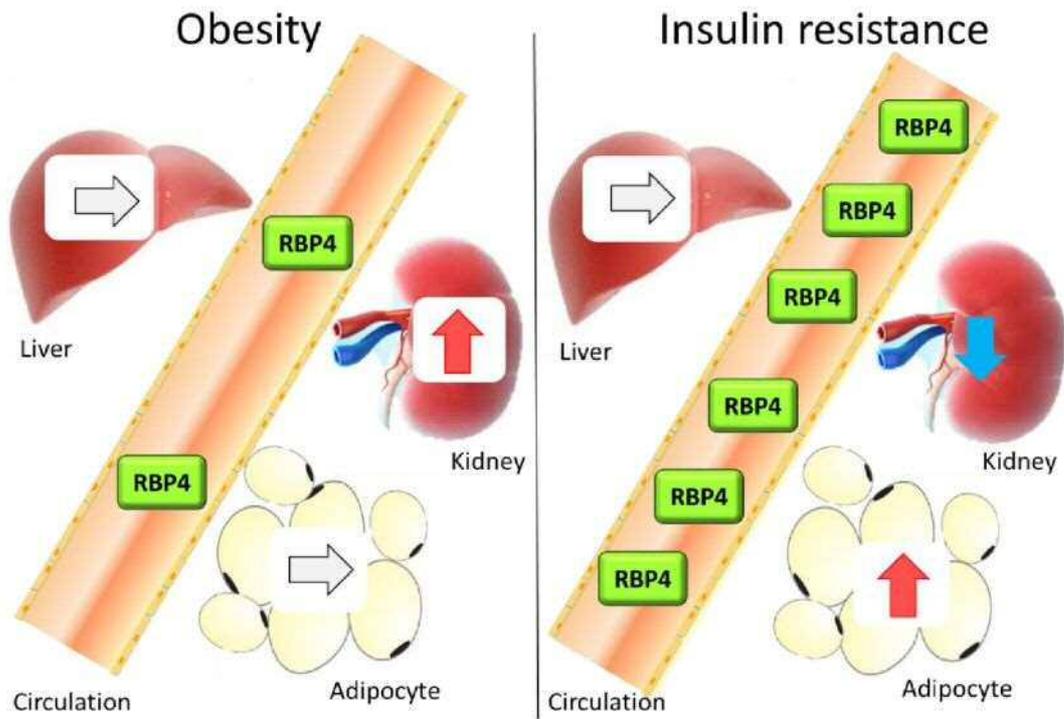
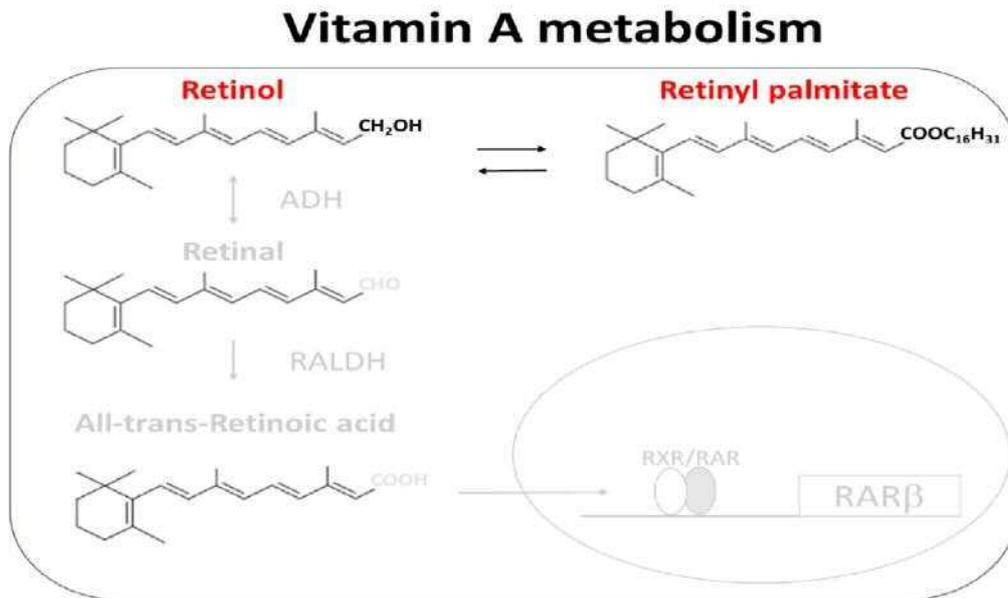


Fig.2-6 肥満モデルとインスリン抵抗性モデルにおける RBP4 動態

第十節 血中・肝臓・腎臓・脂肪組織における Retinol、Retinyl palmitate 量の解析

第一項 目的

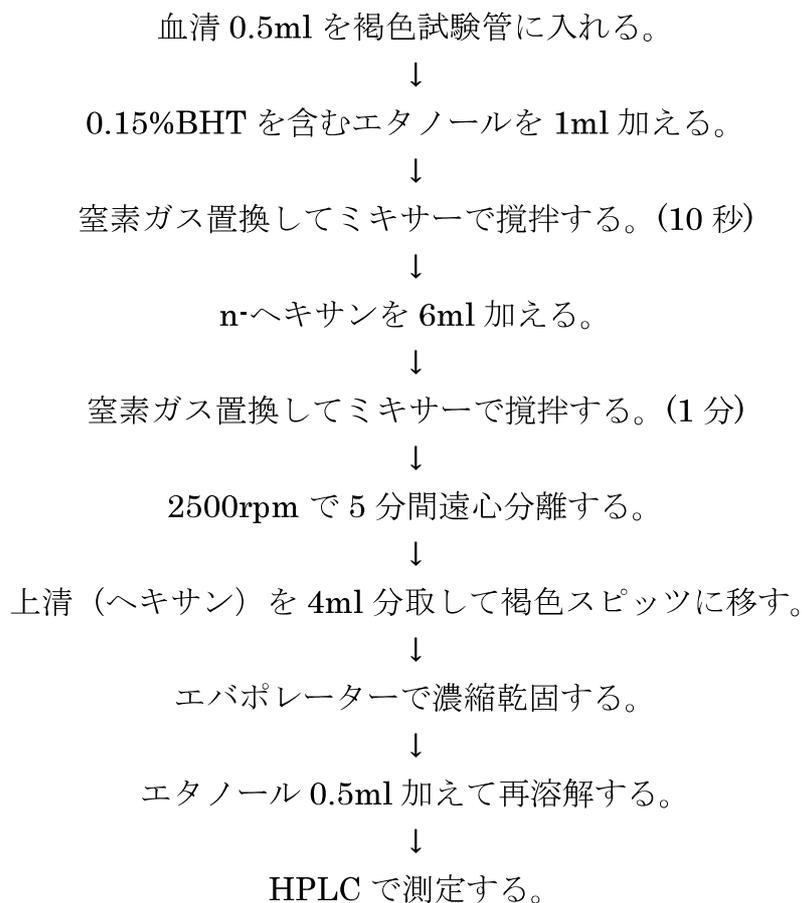
肥満モデルとインスリン抵抗性モデルで、RBP4 が異なる挙動を示すことを明らかにした。しかし、RBP4 の元来の役割であるレチノール輸送との関わりについては、明らかに出来ていない。そこで、血中のレチノール量、肝臓・脂肪組織・腎臓中のレチノール量、貯蔵体のレチニルパルミテイト量を測定し、各臓器のレチノール代謝を明らかにすることを目的に実験を行った。



第二項 実験方法

(1) 血清中のレチノール抽出方法

血清 0.5ml を褐色試験管に採り、0.15%BHT を含むエタノールを 1ml 加える。そこに窒素ガスを置換してボルテックスで 10 秒間攪拌した。そこへ更に n-ヘキサンを 6ml 加え、再び、窒素ガスを置換しボルテックスで 1 分間攪拌した。その後、2500rpm で 5 分間遠心し、上清（ヘキサン）を 4ml 分取して褐色スピッツに移した。それをエバポレーターで約 40 分間濃縮乾固し、エタノール 0.5ml を加えて再溶解した。再溶解したサンプルを 20 μ l HPLC に注入して分析した⁴⁵⁾。



(2) 臓器中のレチノール、レチニルパルミテイト抽出方法

各臓器を 1g 精秤し、生理食塩水を加えながらホモジナイズして 6ml にメスアップした。その懸濁液をボルテックスでよく攪拌し、0.5ml を褐色試験管に採り、そこに 0.15%BHT を含むエタノールを 1ml 加えた。窒素ガスを置換してボルテックスで 10 秒間攪拌し、*n*-ヘキサン：酢酸エチル(9:1)を 6ml 加えた。再び、窒素ガスを置換してボルテックスで 10 秒間攪拌し、2500rpm で 5 分間遠心分離した。上清(ヘキサン)を 4ml 分取して褐色スピッツに移し、それをエバポレーターで 40 分間濃縮乾固する。そこに 0.5ml エタノールを加えて、再溶解した。出来上がったサンプルを HPLC に 20 μ l 注入して分析した⁴⁵⁾。

臓器 1g を試験管に入れ、生理食塩水を加えながらホモジナイズして 6ml にメスアップする。

↓

懸濁液をよく攪拌し、0.5ml を褐色試験管に採る。

↓

0.15%BHT を含むエタノールを 1ml 加える。

↓

窒素ガス置換してミキサーで攪拌する。(10 秒)

↓

n-ヘキサン：酢酸エチル (9:1) を 6ml 加える。

↓

窒素ガス置換してミキサーで攪拌する。(1 分)

↓

2500rpm で 5 分間遠心分離する。

↓

上清 (ヘキサン) を 4ml 分取して褐色スピッツに移す。

↓

エバポレーターで濃縮乾固する。

↓

エタノール 0.5ml 加えて再溶解する。

↓

HPLC で測定する。

(3) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、LC-2000Plus (Jasco) のシステムを用いて測定した。

それぞれ抽出したサンプルを20 μ l測定に供した。カラムは、Wakosil II 5C18AR; 4.6 mm \times 250 mmを用い、流速は、1.0ml/min。325nmと470nm波長でレチノールとレチニルパルミテイト量を測定した。

移動相は、メタノール：アセトニトリル (60:40) を用いて、測定したレチノール量とレチニルパルミテイト量は、臓器重量で除した値で示した。

第三項 結果

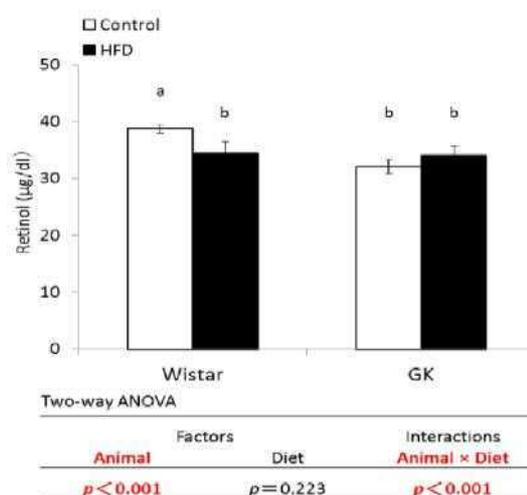
血清中のレチノール量は、Wistar(Cont)群と比較して Wistar(HFD)群、GK両群共に有意に減少していた (Fig.2-7)。

肝臓中のレチノール量は、遺伝的要因に関係なく高脂肪食負荷により有意に低下していた。レチニルパルミテイト量は、有意差は認められなかったが、レチノール量の結果と同様に高脂肪食負荷により低下する結果を得た(Fig.2-8)。

脂肪組織では、肝臓と挙動が異なり、レチノール、レチニルパルミテイト量ともに遺伝と食餌の両方の影響を受け、GK(HFD)群においてのみ有意に上昇していることを明らかにした(Fig.2-9)。

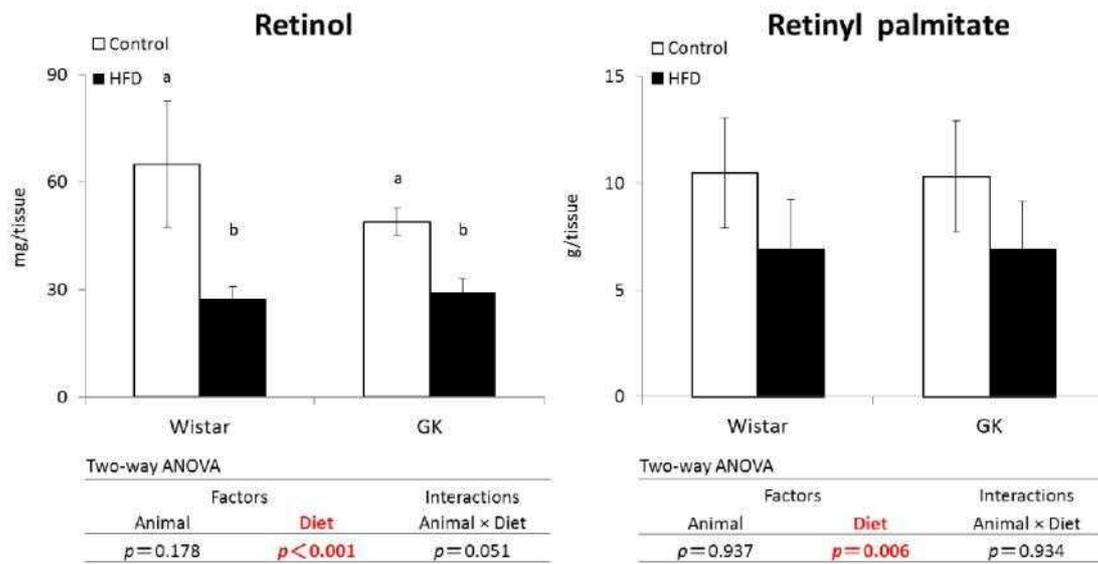
腎臓では、RBP4の発現量はインスリン抵抗性で有意に減少していたが、レチノール量は、反対にインスリン抵抗性で上昇する結果を得た。

腎臓中のレチニルパルミテイトの結果は、食餌と系統の両方の影響を受け、GK(HFD)群で上昇した(Fig.2-10)。



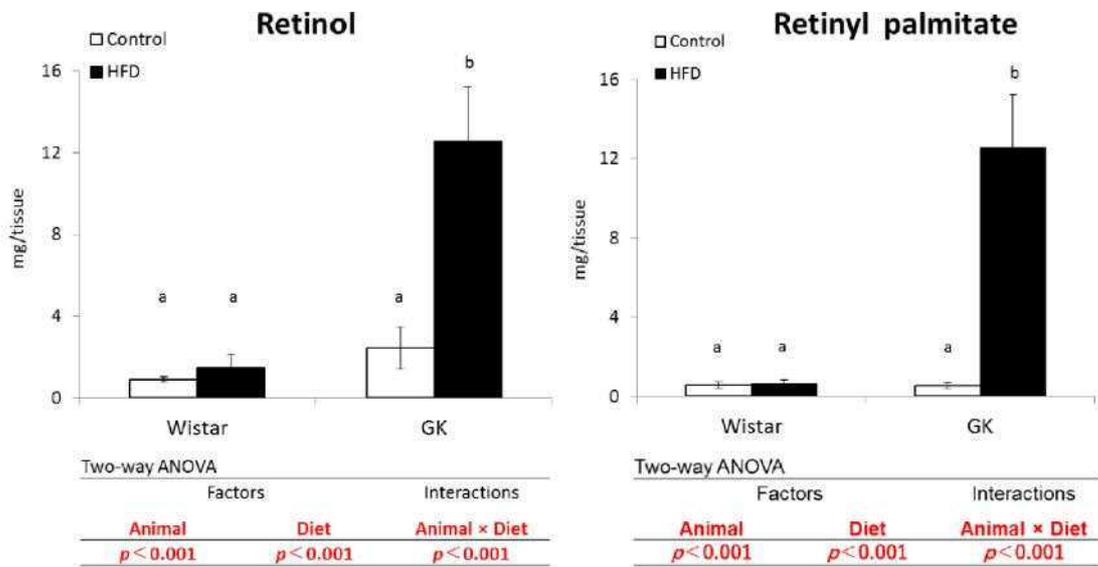
Values are expressed as means \pm SD (n=6 per group). The data were tested using Two-way ANOVA. The Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons among the means. Within a row, significantly different values are marked with different superscript letters (a-c) when significant interaction was observed ($p < 0.01$).

Fig.2-7 血中レチノール量



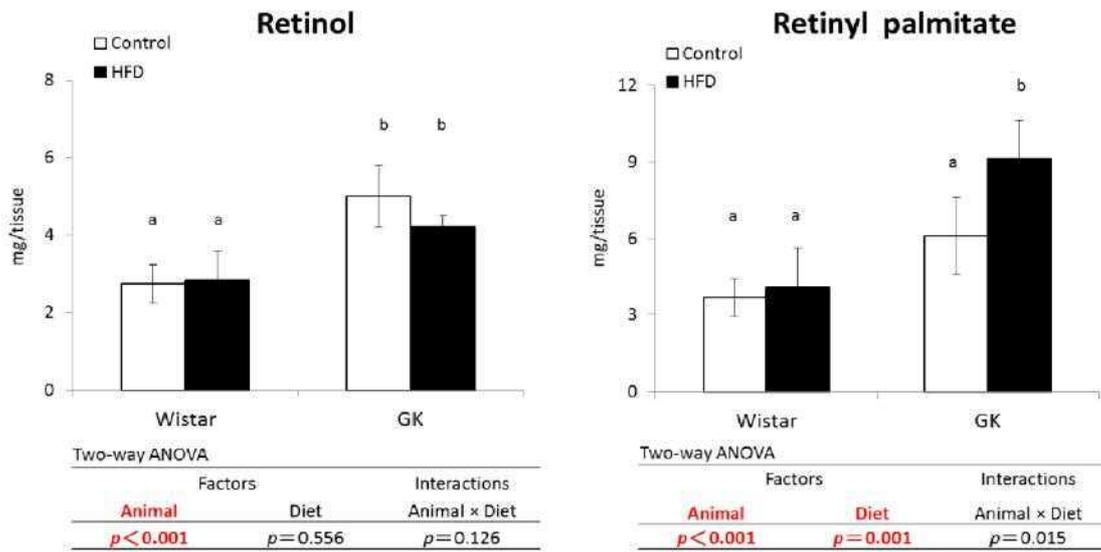
Values are expressed as means \pm SD (n=6 per group). The data were tested using Two-way ANOVA. The Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons among the means. Within a row, significantly different values are marked with different superscript letters (a-c) when significant interaction was observed ($p < 0.01$).

Fig.2-8 肝臓中のレチノール、レチニルパルミテイト量



Values are expressed as means \pm SD (n=6 per group). The data were tested using Two-way ANOVA. The Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons among the means. Within a row, significantly different values are marked with different superscript letters (a-c) when significant interaction was observed ($p < 0.01$).

Fig.2-9 脂肪組織中のレチノール、レチニルパルミテイト量



Values are expressed as means \pm SD (n=6 per group). The data were tested using Two-way ANOVA. The Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons among the means. Within a row, significantly different values are marked with different superscript letters (a-c) when significant interaction was observed ($p < 0.01$).

Fig.2-10 腎臓中のレチノール、レチニルパルミテイト量

第四項 小括

肥満モデルとインスリン抵抗性モデルで、各臓器の **RBP4** の動態が異なることを第三節で明らかにした。そこで、次に肥満モデルとインスリン抵抗性モデルがレチノール代謝へどのような影響を及ぼしているのか、またインスリン抵抗性状態で、脂肪組織から過剰に分泌された **RBP4** が血中でレチノールと複合体を形成しているのか、腎臓中で **RBP4** の発現が低下している影響を受け、レチノール量が増加しているのかについて明らかにする目的でレチノール量とレチニルパルミテイト量について測定を行った。

その結果、肝臓では遺伝的要因ではなく高脂肪食負荷により、レチノール量、レチニルパルミテイト量ともに低下していることを明らかにした。腸管でのレチノール吸収は、脂肪量が多いとレチノールの吸収率も上昇することが知られており、高脂肪食により肝臓中のレチノール量は上昇するのではないかと考えた。しかし、本結果より高脂肪食負荷によってレチノール量はコントロール群と比較して約半分量近くまで減少してしまった。

この原因として、^(a) 腸管でのレチノールトランスポーターのひとつが高脂肪食や高コレステロール負荷により吸収率が落ちることが報告されており、吸収量落ちたのが原因したのではないか。^(b) 脂肪肝になると、レチノールを貯蔵している伊東細胞が線維化し、レチノールを貯蔵出来なくなることが報告されている。しかし、本研究では、脂肪肝であったか否かについては確認していないが、今後、高脂肪食負荷により、脂肪肝やレチノール貯蔵への影響については調べる必要があると考える。

次に、脂肪組織は肝臓組織と挙動が異なり、レチノール量、レチニルパルミテイト量ともに遺伝的要因と環境要因だけでは影響を受けず、両方の影響を受けて有意に上昇することを明らかにした。

さらに、腎臓組織では、遺伝的要因によりレチノール量が有意に上昇しており、反対に **RBP4** 遺伝子発現は遺伝的要因により有意に減少していた。インスリン抵抗性の腎臓組織において、**RBP4** が発現できなくなることで、レチノールが腎臓外に出ることが出来ず、腎臓中にレチニルパルミテイトとして貯蔵されるが、一定量しか貯蔵出来ないため、レチノールの形のまま腎臓中で増加しているのではないかと推察した。

そこで、次にインスリン抵抗性の腎臓組織中でレチノール代謝に変動が起きているのかを明らかにしようと考えた。

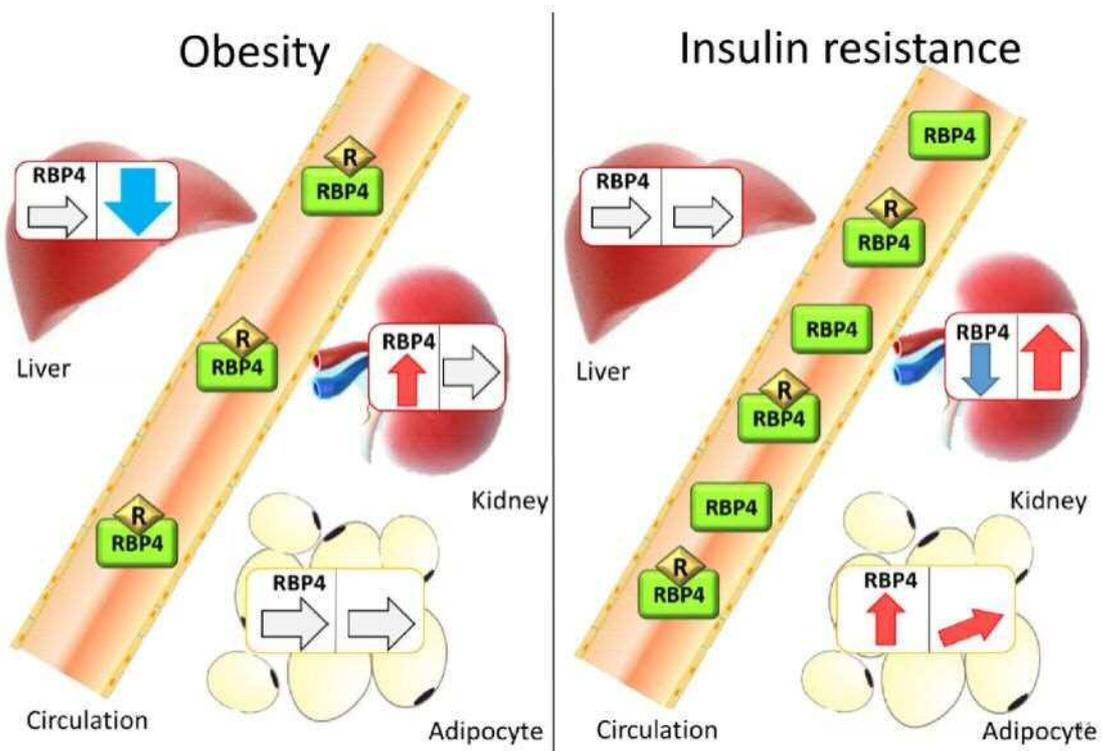


Fig.2-11 RBP4 とレチノール量における臓器特異性

第十一節 肝臓・腎臓・脂肪組織における RALDH、RARβ

遺伝子発現の解析

第一項 目的

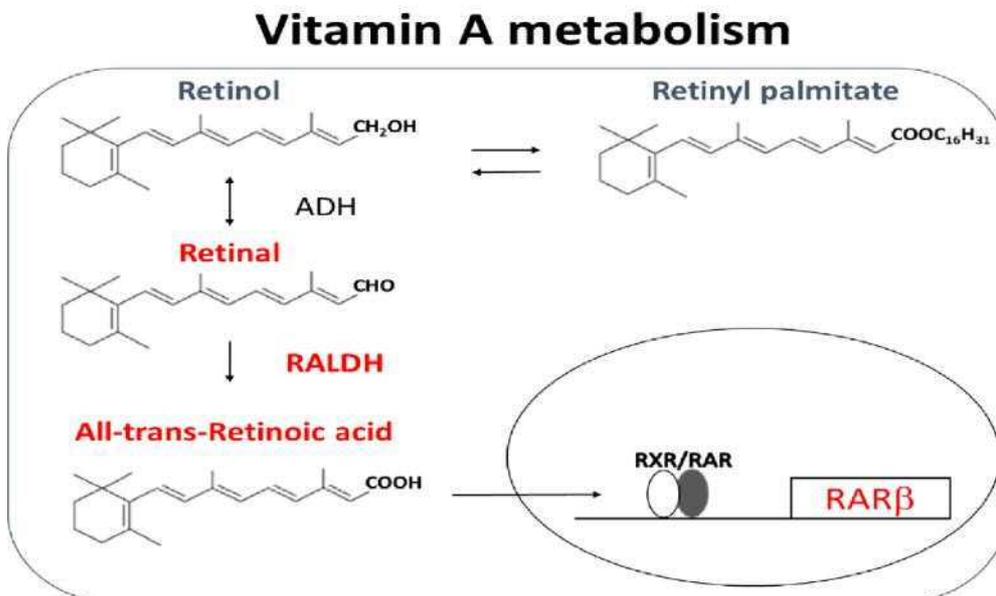
これまでの結果から、インスリン抵抗性状態での脂肪組織や腎臓でのレチノール代謝に変動が起きていることを示唆してきた。

そこで、さらに臓器中のレチノール代謝を詳細に解析したいと考えた。

しかし、レチノールの活性本体であるレチノイン酸はその存在量が微量であり、HPLCでその濃度を調べることは困難である。

そこで、レチノールをレチノイン酸へと変換する酵素である RALDH の遺伝子発現量を測定することにした。

さらに、RALDH が正に制御されているにもかかわらず、実際にレチノイン酸標的の遺伝子を制御しているのかについては定かではない。そこで、レチノイン酸量依存的に存在することが知られている RARβ の遺伝子発現についても測定した。



第二項 実験方法

Total RNA の抽出は、RNAiso Plus (Takara) のプロトコールに基づいて行った。凍結保存した肝臓、脂肪組織、腎臓を 1g 切り出し、RNAiso Plus を 1ml 加えてホモジナイズした後、室温で 5 分間静置した。12,000×g、4℃で 5 分間遠心を行い、上清を新しい遠心チューブに移した。

クロロホルムを開始容量 (ホモジナイズに用いた RNAiso Plus の液量) の 0.2 倍量加え、混合した。室温で 5 分間静置した。12,000×g、4℃で 15 分間遠心し、上層の水層を新しい遠心チューブに移した。開始容量の 0.5 倍量～等量のイソプロパノールを加えて混合する。室温で 10 分間静置した。12,000×g、4℃で 10 分間遠心し、75%エタノールを開始容量と等量加えて洗浄を行った。7,500×g、4℃で 5 分間遠心し、沈澱を残して上清を捨てた。残渣 (RNA 画分) を乾燥させた後、適量の DEPC 水にて溶解した。

Total RNA は、NanoDrop にて濃度を測定し、500ng に調製した。その後、PrimeScriptRT Master Mix(Takara)を用いて、cDNA へと変換した mRNA 発現量の測定器には、Light Cycler real-time PCR (Roche)を用い、酵素は SYBR Premix EX Taq II (Takara)にてインターカレー法に供した。

ハウスキーピング遺伝子として、 β -actin を用い、RBP4 発現量の定量を行った。

Forward および Reverse primer は、下記の通りである。

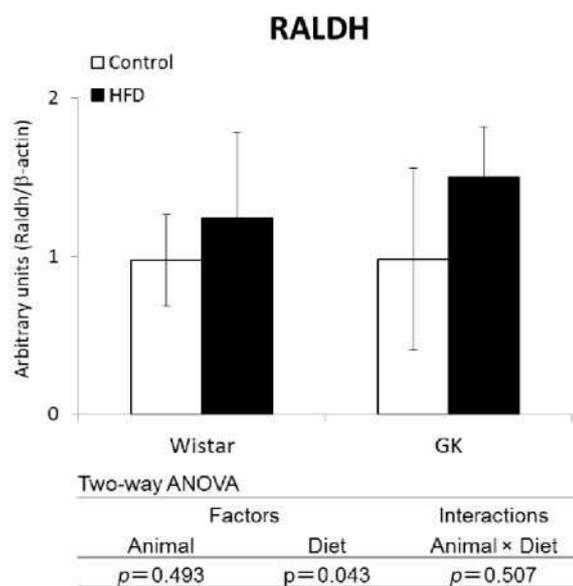
Forward	Sense primer (5'-3')	Reverse	Antisense primer (5'-3')
Raldh	ATGGTCTAGCAGCAGGAGT	Raldh	CCAGACATCTTGAATCCACCGAA
RAR β	ATACCCCAGAGCAAGACACC	RAR β	AGCAGATGGCACTGAGAAGA
β -actin	CTGACAGACTACCTCATGAAGAT	β -actin	TAGCACAGCTTCTCTTTAATGTCAC

第二項 結果

肝臓中の RALDH 遺伝子発現は、遺伝的影響、環境的影響のどちらの影響も受けないことを明らかにした(Fig.2-12)。RAR β は、レチノイン酸量依存的に発現するため肝臓では変動していないと考えた。

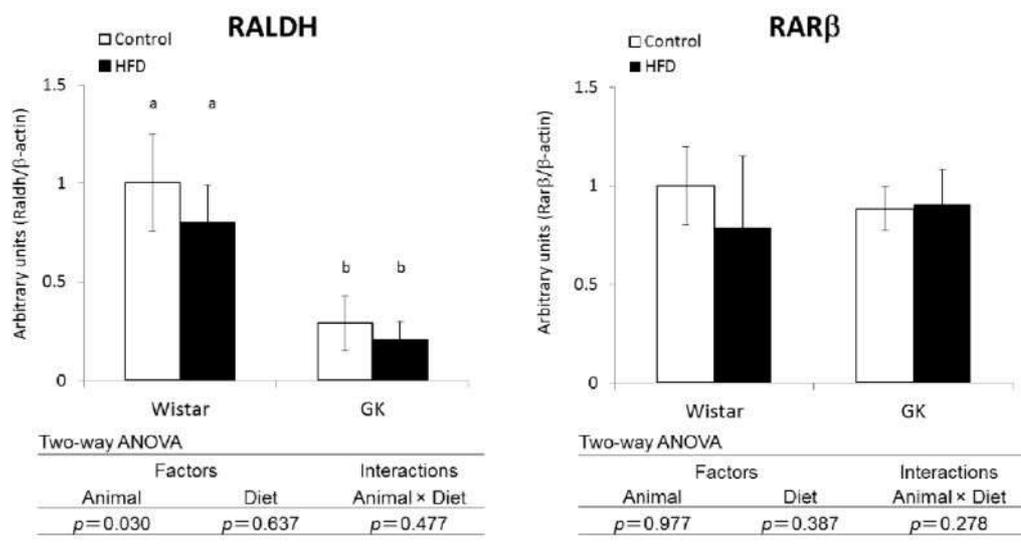
次に、脂肪組織の RALDH 遺伝子発現は遺伝的要因により有意に低下していた(Fig.2-13)。そのため、RAR β の遺伝子発現を確認したところ、RAR β の有意な差は認められなかった。

腎臓組織では、RALDH 遺伝子発現量は Wistar(Cont)群と比較して、GK(Cont)群で有意な低下が認められた(Fig.2-14)。そこで、RAR β の遺伝子発現量を確認したところ、遺伝的要因により有意な低下が認められた。



Values are expressed as means \pm SD (n=6 per group). The data were tested using Two-way ANOVA. The Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons among the means. Within a row, significantly different values are marked with different superscript letters (a-c) when significant interaction was observed ($p < 0.01$).

Fig.2-12 肝臓中の RALDH 遺伝子発現量



Values are expressed as means \pm SD (n=6 per group). The data were tested using Two-way ANOVA. The Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons among the means. Within a row, significantly different values are marked with different superscript letters (a-c) when significant interaction was observed ($p < 0.01$).

Fig.2-13 脂肪組織中の RALDH,RAR β の遺伝子発現量

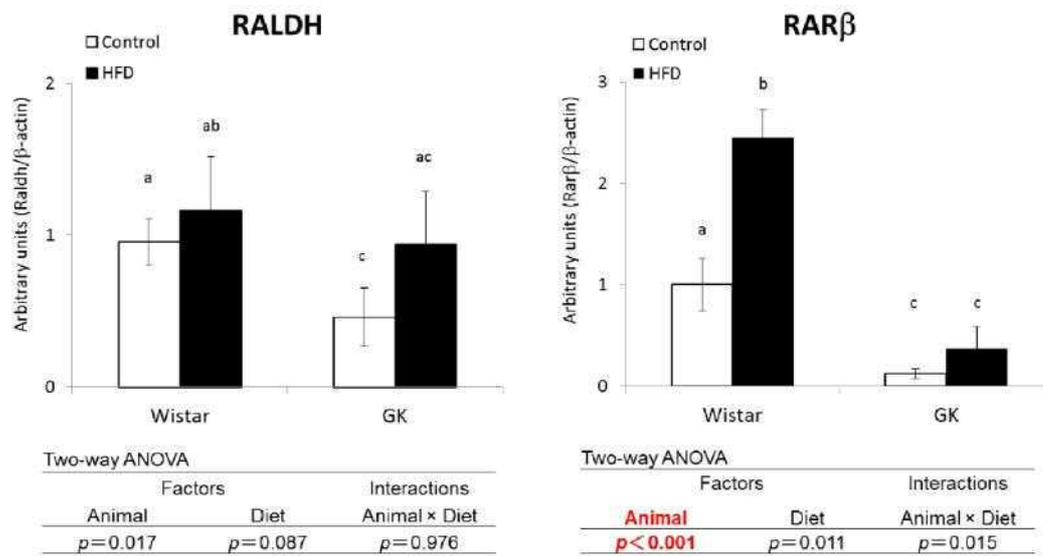


Fig.2-14 腎臓中の RALDH, RAR β の遺伝子発現量

第四項 小括

これまでに、肥満状態とインスリン抵抗性状態において臓器特異的に **RBP4** 遺伝子発現量やレチノール量、レチニルパルミテイト量の変動することを明らかにした。臓器特異的な変動の中でも、インスリン抵抗性時の腎臓組織において顕著な変動が認められた。

この変動の原因が、レチノール代謝に異常が起きているためではないかと考え、腎臓組織中のレチノール代謝関連遺伝子の遺伝子発現を確認したところ、レチノイン酸依存的に発現することが知られている **RAR β** の遺伝子発現量が顕著に減少していた。

この結果から、インスリン抵抗性状態の腎臓組織では、**RBP4** が発現できないだけでなく、レチノールの活性本体であるレチノイン酸の活性が何らかの理由により活性が落ちていることを示した。

レチノイン酸によって制御されている遺伝子は **300** 以上確認されており、糖尿病の合併症の一つとして知られている糖尿病性腎症などの原因のひとつになっているのではないかと推察した。

そこで、まずこの **RAR β** の遺伝子発現量の減少が、レチノール代謝に変動が起きているのか、**RAR β** 特異的な変動なのかを確認するため、別のレチノール標的遺伝子発現量を測定することにした。

第十二節 腎臓組織における HSP70 遺伝子の発現解析

第一項 目的

インスリン抵抗性状態の腎臓組織におけるレチノール代謝変動を確認する目的で、レチノイン酸標的遺伝子であり、さらに、腎障害のマーカーとしても用いることが出来る HSP70 遺伝子発現量を解析することにした。

HSP70 とは、Heat shock protein 70 の略である⁴⁶⁻⁵⁰。名前の通り、熱ストレスを始め、様々なストレス応答するタンパク質であり、糖尿病の合併症である腎障害はストレス応答が低下することが知られています。

第二項 実験方法

(1) 実験動物および飼育方法

動物実験は、東京農業大学動物実験委員会の承認を受けて行った。

4週齢雄性の Wistar ラット 10 匹と 4週齢雄性の GK ラット 10 匹を日本クレアより購入した。環境に適応させるため個別ケージにて標準飼料である AIN-93G を与え、自由摂食・自由摂水にて 10 週間飼育を行った。明暗サイクルは、12 時間。室温は、23°C、湿度 50%±5%。解剖の 12 時間前から飼料を抜き、絶食を行った。

解剖は、腹腔内にソムノペンチル(ペントバルビタール 64.8 mg/ml 含有)を麻酔後、心臓採血を行い、臓器を摘出し、素早く液体窒素にて凍結し、-80°C の冷凍庫にて保管。肝臓は、生理食塩水にて灌流を行った後、液体窒素にて凍結し、-80°C の冷凍庫にて保管。血液は、3000 rpm で 15 分間遠心分離後、速やかに生化学的解析に用い、残りの血清を 200 µl ずつ分注し、-80°C の冷凍庫にて保管した。

(2) 遺伝子発現解析

Total RNA の抽出は、RNAiso Plus (Takara) のプロトコールに基づいて行った。凍結保存した肝臓、脂肪組織、腎臓を 1g 切り出し、RNAiso Plus を 1ml 加えてホモジナイズした後、室温で 5 分間静置した。12,000×g、4℃で 5 分間遠心を行い、上清を新しい遠心チューブに移した。

クロロホルムを開始容量 (ホモジナイズに用いた RNAiso Plus の液量) の 0.2 倍量加え、混合した。室温で 5 分間静置した。12,000×g、4℃で 15 分間遠心し、上層の水層を新しい遠心チューブに移した。開始容量の 0.5 倍量～等量のイソプロパノールを加えて混合する。室温で 10 分間静置した。12,000×g、4℃で 10 分間遠心し、75%エタノールを開始容量と等量加えて洗浄を行った。7,500×g、4℃で 5 分間遠心し、沈澱を残して上清を捨てた。残渣 (RNA 画分) を乾燥させた後、適量の DEPC 水にて溶解した。

Total RNA は、NanoDrop にて濃度を測定し、500ng に調製した。

その後、PrimeScriptRT Master Mix(Takara)を用いて、cDNA へと変換した

mRNA 発現量の測定器には、Light Cycler real-time PCR (Roche)を用い、酵素は SYBR Premix EX Taq II (Takara)にてインターカレー法に供した。

ハウスキーピング遺伝子として、 β -actin を用い、RBP4 発現量の定量を行った。

Forward および Reverse primer は、下記の通りである。

Forward	Sense primer (5'-3')	Reverse	Antisense primer (5'-3')
HSP70	CACTTGTCAGCACCTTCTTCT	HSP70	CGAGTCCTACGCCTTCAATATG
β -actin	CTGACAGACTACCTCATGAAGAT	β -actin	TAGCACAGCTTCTCTTTAATGTCAC

第三項 結果

Wistar ラットと比較して、RBP4、RALDH、RAR β の遺伝子発現量は、GK ラットで有意に低下していることを示した。この結果は、これまでのインスリン抵抗性モデルの結果と同様の傾向性を示した。

そこで、このインスリン抵抗性モデルの腎臓で、レチノイン酸応答遺伝子の発現が低下しているか、また、ストレス応答が低下しているかを明らかにする目的で HSP70 の遺伝子発現量を測定した。

その結果、Wistar ラットと比較して GK ラットで HSP70 遺伝子発現量が有意に低下していることを明らかにした。

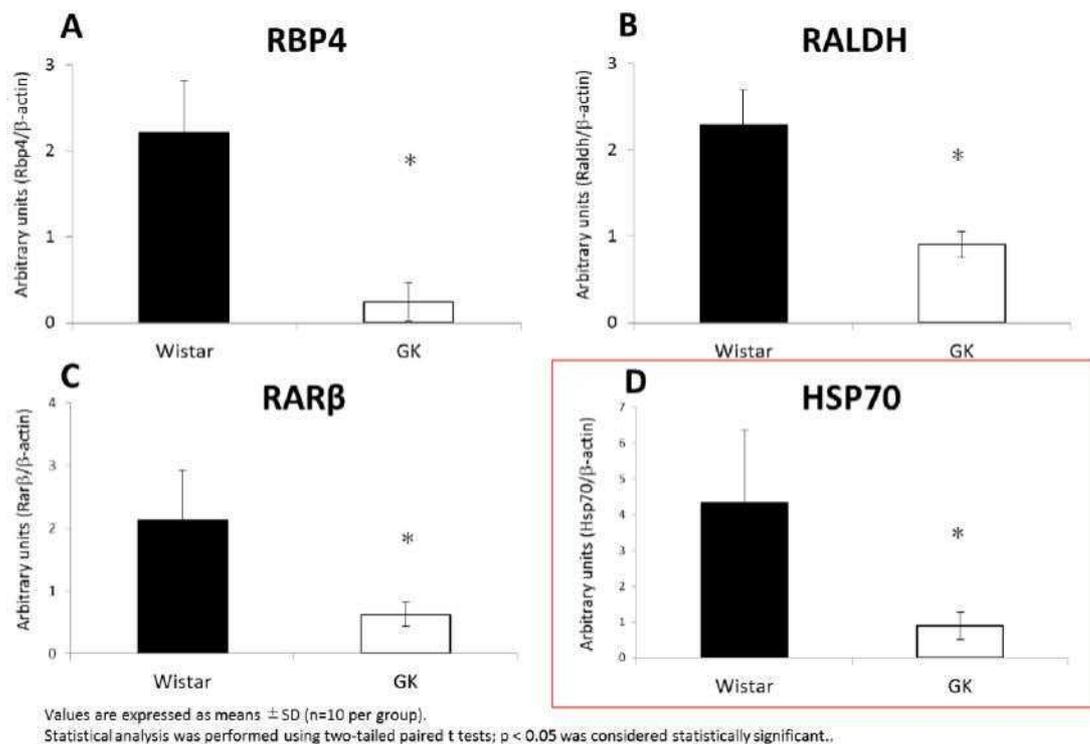


Fig.2-15 HSP70 遺伝子発現解析

第四項 小括

これまで、体内のレチノールのほとんどが肝臓に貯蔵されていることから、レチノールの代謝研究は肝臓を中心に解析されてきた。しかし、本研究により、インスリン抵抗性状態の腎臓でレチノール代謝が変動していることを明らかにしてきた。さらに、本節の結果から、レチノイン酸標的遺伝子発現が低下することにより、ストレス応答が下がることを示唆した。

このことから、肝臓だけでなく腎臓中のレチノール代謝を解析する必要があると考える。その理由として、糖尿病の合併症として、血管に糖負荷がかかることで血管障害おき、網膜症や腎症、神経障害を起こすことが知られているが、腎症の原因が血管障害だけでなく、レチノールの代謝障害がひとつの原因であるとの可能性を示すことができた。

しかし、今回はインスリン抵抗性モデルとして **GK** ラットのみを用いており、腎臓の変動が **GK** ラット特異的であるのか、インスリン抵抗性で共通にみられる変動なのかを明らかにする必要があると考える。

第三章

転写因子 PSMB1 の核内移行による RBP4 遺伝子発現解析 機構の解析

第一節 RBP4 遺伝子発現機構

先行研究で、脂肪組織の RBP4 が肥満やインスリン抵抗性状態で上昇することが明らかになった⁷⁾。また、本研究により脂肪組織の RBP4 遺伝子発現上昇は、肥満ではなく、インスリン抵抗性に起因することを明らかにした。しかし、インスリン抵抗性でなぜ RBP4 発現が上昇するのかについては明らかに出来ていない。

そこで、インスリン抵抗性状態でなぜ RBP4 が上昇するのかを明らかにすることを目的に実験を行うことにした。

これまでに、井上らは、脂肪細胞の GLUT4 を特異的にノックアウトした細胞 (G4KD-L1) で RBP4 遺伝子発現が上昇し、インスリン抵抗性状態になっていることを確認した (Fig.3-1)⁴⁹⁾。またこの細胞を用いて、RBP4 遺伝子のプロモーター領域を確定するとともに、このプロモーター領域に結合する新規転写因子 20 S proteasome subunit beta type 1 (PSMB1) を同定した (Fig.3-2)。この PSMB1 は、20S プロテアソームを構成するサブユニットのひとつとして知られている⁵⁰⁾。さらに、この PSMB1 は、すでに転写因子として機能することが知られていた。井上らは、G4KD-L1 では PSMB1 が核内に多く局在していることを示した (Fig.3-3)。しかし、この PSMB1 がどのように核内移行するのかについては明らかになっていない。

そこで、本章ではこの核内移行に焦点をあて解析を行った。

第一節 PSMB1 のドメイン解析

第一項 目的・実験方法

RBP4 の新規転写因子である PSMB1 が、インスリン抵抗性状態の脂肪細胞で核内に多く局在することが明らかになっている。

そこで、なぜインスリン抵抗性状態で核内に移行するのかは、PSMB1 のリン酸化修飾が核内移行に影響するのではないかと仮説をたて、まずはリン酸化サイトを検索することにした。

リン酸化サイトは、様々な翻訳後修飾を検索することが出来る *In silico* analysis(PhosphoSitePlus: <http://www.phosphosite.org/homeAction.do>) を用いて行った。

第二項 結果

In silico analysis にて、**PSMB1** のリン酸化サイトを **reference** 数が 5 報以上に限り解析したところ、**PSMB1** の 149 番目のチロシンが推定上のリン酸化サイトであると同定した。

第三項 小括

In silico analysis の結果から、推定上のリン酸化サイトである Y149 のリン酸化サイトに着目した。

Y149 のリン酸化サイトに注目した理由として、Y149 に隣接したアミノ酸のシーケンスが様々な動物種でよく保存されている (Fig.3-1) ため、このモチーフが機能的に重要であることを示唆していると考えた。

Human	¹³⁸ GGLDEEGKGV Y SFD ¹⁵²
Mouse	¹³⁸ GGLDEEGKGV Y SFD ¹⁵²
Rat	¹³⁹ EGLDEEGKGV Y SFD ¹⁵³

Fig.3-1 PSMB1 アミノ酸シーケンス

第三節 PSMB1 の Y149 のリン酸化が核移行と RBP4 の転写に 及ぼす影響解析

第一項 目的・実験方法

PSMB1 が、インスリン抵抗性状態でどのように核内移行するのかについて明らかにする目的で、PSMB1 のリン酸化サイトの同定を試みた。そこで、このリン酸化サイトをチロシン (Y) からフェニルアラニン (F) に人工的にリン酸化できない変異体を作製し (Fig.3-2)、PSMB1 の核内移行が変化するのかについて、脂肪細胞を用いて解析することにした。

3T3-L1 細胞に変異 149Y を pEGFP-N2 発現ベクターに GFP と共に強制発現させ、細胞内局在を調べた。

さらに、実際に RBP4 の転写が上昇しているのかについて、ルシフェラーゼアッセイ法により解析した

。

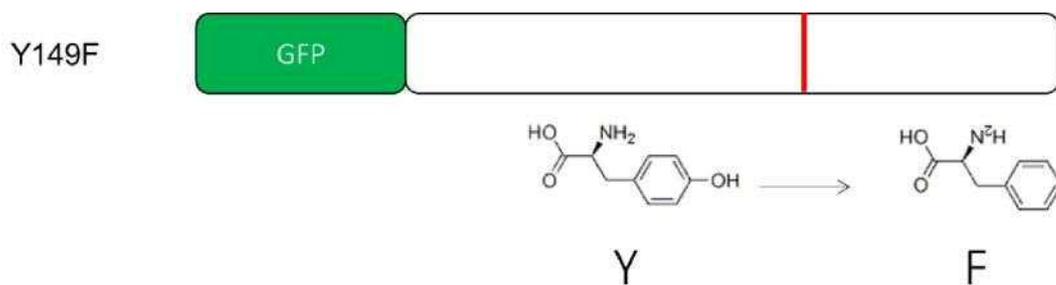


Fig.3-2 Y149F 変異体

第二項 結果

3T3-L1 細胞を用いて、PSMB1 の細胞局在を調べたところ、WT では PSMB1 が核と細胞質の両方に発現しているのに対し、Y149F 変異体では主に核に局在していることを確認した (Fig.3-3)。さらに、ルシフェラーゼアッセイ法を用いて、Y149F 変異体で濃度依存的に RBP4 の発現が上昇していることを確認した (Fig.3-4)。

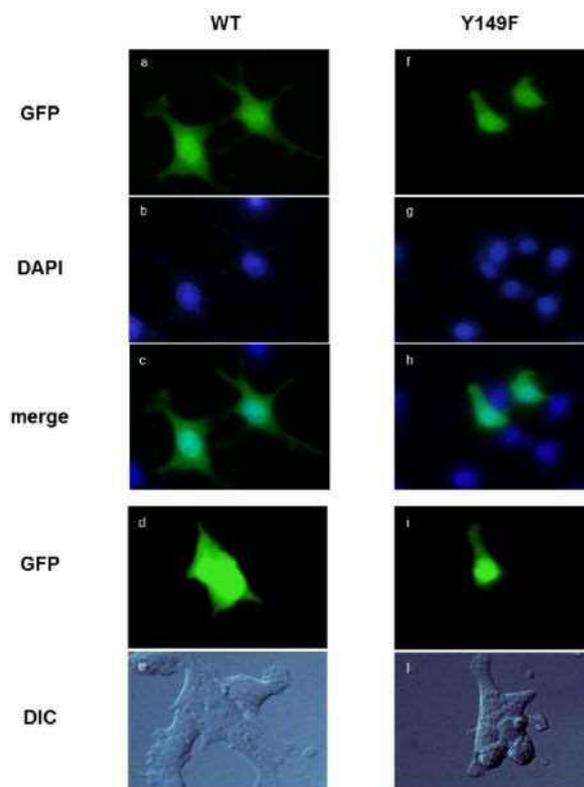


Fig.3-4 PSMB1 細胞内局在

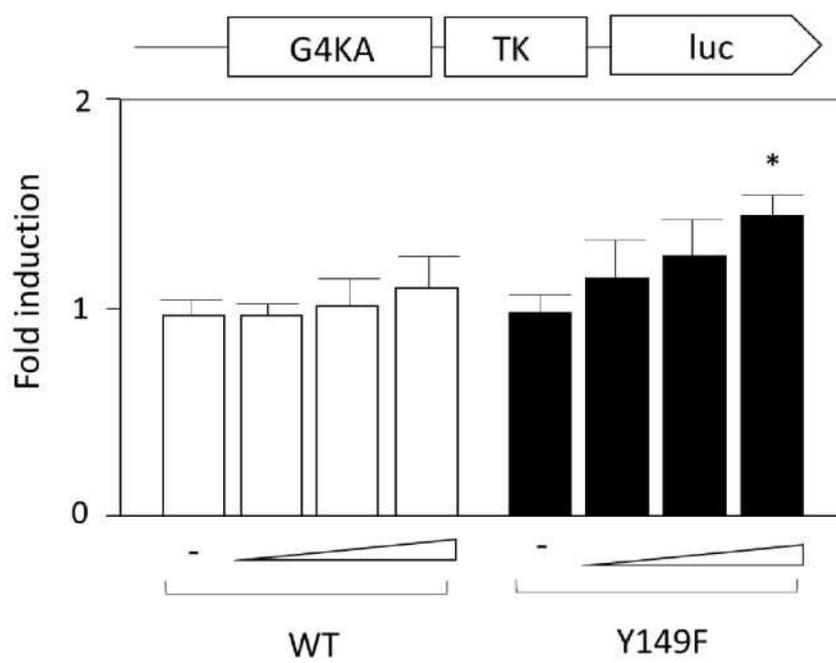


Fig.3-4 ルシフェラーゼアッセイ

第三項 小括

井上らにより、インスリン抵抗性状態での **RBP4** 遺伝子発現機構には **PSMB1** が転写因子として機能していることを明らかにした。

本章の結果と井上らの先行研究から、リン酸化された状態では **PSMB1** は核内に移行されないが、リン酸化できない状態では、**PSMB1** が核内に移行し、**RBP4** の遺伝子発現を上昇させていることを明らかにした (Fig.3-5)。

Hyperphosphorylation of PSMB1

Hypophosphorylation of PSMB1

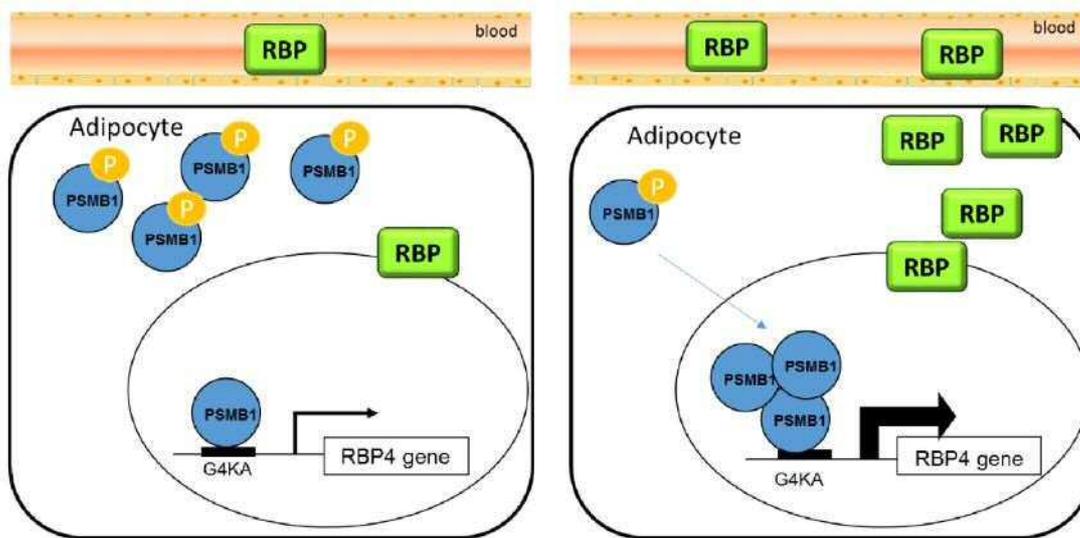


Fig.3-5 PSMB1 の核内移行

第四章

総括

第一節 総括

レチノール結合タンパク質 (Retinol Binding Protein 4) は主に肝臓から合成され、ビタミン A (Retinol) と結合してビタミン A を末梢組織へ輸送するのに重要な役割をしているタンパク質である。近年、Kahn らが RBP4 は肝臓のみならず、脂肪組織でも発現・分泌されることや、肥満に起因したインスリン抵抗性を伴う糖尿病 (2 型糖尿病) 状態では脂肪組織由来の RBP4 発現量が増加していることを報告した (引用文献)。しかし、Kahn らは、RBP4 の変動がいつ起こるのかについては明確にしておらず、2 型糖尿病の主原因である肥満の関与については不明であった。また、RBP4 の変動が末梢組織におけるビタミン A 代謝に及ぼす影響については、いまだ報告例がない。加えて、インスリン抵抗性における脂肪組織の RBP4 の遺伝子発現調節機構についても不明である。

そこで、本研究では RBP4 の変動メカニズムおよびビタミン A 代謝への影響を明らかにする目的で、食餌による単純性肥満モデルと自然発症的にインスリン抵抗性を惹起する 2 つの異なるモデルラットを用い、解析を行った。さらに脂肪組織における RBP4 遺伝子発現制御メカニズムをインスリン抵抗性モデル細胞を用いて解析した。

実験 1 食餌性肥満と非肥満型糖尿病が RBP4 発現量と Retinol 代謝に及ぼす影響解析

(1) 食餌性肥満モデルと非肥満型 2 型糖尿病モデルの作製

今回の実験では、肥満モデルと明確に区別出来るインスリン抵抗性を惹起するモデルとして非肥満型 2 型糖尿病モデルの作製を検討した。一般に糖尿病モ

デルラットとして、OLETF ラットや Zucker ラットが多く実験に用いられているが、これらのモデルは食欲中枢に作用し、過食によって肥満を呈し、インスリン抵抗性から糖尿病を発症するモデルである。一方、GK ラットは、後藤・柿崎らによって作出された 2 型糖尿病モデルラットであり、肥満を伴わないことを特徴とすることから、非肥満型 2 型糖尿病モデルとして用いることとした。

具体的な飼育条件としては、以下のように設定した。Wistar 系 4 週齢の雄性ラットに、コントロール食 (AIN-93G) を給餌した群をコントロール群(Wistar-Control)、また高脂肪食 (40%脂肪) を給餌した群を肥満群 (Wistar-HFD) とし、高脂肪食による影響の解析群とした。一方、非肥満型 2 型糖尿病モデルラットである GK ラットに AIN-93G を給餌した群を糖尿病群 (GK-Control)、GK ラットに高脂肪食を給餌した群 (GK-HFD) とし、Wistar-Control 群に対しての糖尿病発症群を設定するとともに、GK ラットに対する高脂肪食の影響を解析した。摂取するビタミン A の量を揃えるためにコントロール群を基準とし Pair-feeding を行い、それぞれの群のラットを 10 週間飼育した。解剖 3 日前に経口糖負荷試験 (OGTT) を実施した結果、GK-Control、GK-HFD 両群は、Wistar 両群に比べて空腹時血糖値が有意に高いこと、また経口負荷 2 時間後でも高血糖状態が維持されていることが示された。これらは糖尿病の特徴であったことから、両 GK 群が糖尿病状態であることを判断した。また、Wistar-HFD 群は、他の群と比較し、最終体重と脂肪組織重量において有意な増加が認められたが、高血糖状態は認められなかったため、糖尿病を伴わない肥満状態であることを確認した。

以上の結果より、Wistar-Control 群をコントロール群、高脂肪食の影響のみによる変化が解析出来る Wistar-HFD 群を肥満群とし、また糖尿病モデルとして GK ラットを用い、さらに高脂肪食を給餌することで高脂肪食の影響を解析

できる計 4 群のモデル系を構築できたものと考えた。

(2) 血中 RBP4 の解析

はじめに血中 RBP4 の変動が肥満に起因するのか、インスリン抵抗性に起因するのかを明らかにする目的で、ウエスタンブロッティング法を用いて RBP4 の発現量の解析を行った。その結果、血中 RBP4 は非肥満型 2 型糖尿病モデル (GK 両群) では増加していたが、肥満モデル (Wistar-HFD) では変化しなかった。血中 RBP4 の増加は、これまで肥満やインスリン抵抗性で起こるとされてきたが、今回の実験で肥満ではなくインスリン抵抗性によって惹起されることを初めて明らかにした。

(3) 肝臓・腎臓・脂肪組織中の RBP4 遺伝子の発現解析

血中 RBP4 の増加が、RBP4 合成の器官である肝臓・腎臓・脂肪組織のいずれに由来するのかについて解析を行った。各組織より、RNA を抽出し特異的プライマーにより、qRT-PCR 法にて解析を行った。その結果、RBP4 の発現量は、肝臓ではコントロール群と比較して肥満・糖尿病による影響はなかったのに対し、脂肪組織では、RBP4 の遺伝子発現量はコントロール群と比較して糖尿病群で有意に上昇していた。また、腎臓の RBP4 遺伝子発現量はコントロール群と比較して糖尿病群で有意に低下していた。

以上の結果より、RBP4 の発現量は、脂肪組織において従来 of 報告通り糖尿病によって上昇することを確認した。それに対して肝臓では、糖尿病でも肥満でも発現量は影響を受けないこと、腎臓では糖尿病によってのみ著しく低下することを新たに見出した。

(4) 血中、肝、腎、および脂肪組織における Retinol、Retinyl palmitate 量の測

定

血中 RBP4 レベルが、肥満モデルとインスリン抵抗性モデルで異なることから、血中 retinol の輸送にも影響が出ている可能性があると考えた。そこで、血中 retinol 量および、主要なビタミン A 代謝臓器である肝臓、腎臓、脂肪組織の retinol 量とその貯蔵型である retinyl palmitate 量を測定した。

常法に従い、retinol、および、retinyl palmitate を試料より抽出し HPLC 法により定量解析を行った。その結果、血中 retinol 量は、肥満・糖尿病のどちらもコントロール群と比較して有意に減少していた。従って、retinol と結合しない RBP4 (アポ型 RBP4) が増加していることが示唆された。さらに、肝臓中の retinol 量はコントロール・糖尿病群共に高脂肪食により有意に減少した。また、肝臓中の retinyl palmitate 量については、retinol と同様の挙動を示した。一方、脂肪組織では、コントロール群では高脂肪食の影響を受けなかったものの、糖尿病群では高脂肪食により retinol 量は有意に増加し、retinyl palmitate 量については、retinol と同様の挙動を示した。さらに、腎臓では、高脂肪食による影響は見られなかったものの retinol 量は糖尿病群で有意に上昇しており、retinyl palmitate 量は、糖尿病群に高脂肪食を給餌することで増加していた。

以上の結果から、肥満と糖尿病におけるビタミン A 代謝が各臓器で異なることを明らかにした。

(5) 各臓器中の RALDH、RAR β の遺伝子発現解析

Retinol は retinal を経て retinoic acid へと代謝され核内受容体を介して細胞の分化・増殖などの遺伝子発現を制御することが知られている。そこで、活性本体である retinoic acid について解析した。はじめに retinoic acid へ変換させる酵素 RALDH の遺伝子発現と retinoic acid 量によって遺伝子発現量が制御されて

いる RAR β の遺伝子発現を解析した。

その結果、RALDH は肝臓では変化が見られなかったが、脂肪組織において、糖尿病群で有意な減少がみられた。脂肪組織の retinoic acid 量は糖尿病群によって影響を受けていることが推察された。また、腎臓の RALDH も糖尿病で有意に低下した。RAR α の解析から、脂肪組織では各群で変化が見られなかったものの、腎臓においてはコントロール群と比較して高脂肪食群で有意に増加し、糖尿病群において有意に減少していた。

このことから、腎臓では糖尿病によって RALDH の発現量の低下に伴って retinoic acid の生産量が低下し、ビタミン A の活性本体である retinoic acid の産生量が脂肪組織と腎臓において大きくことなることを初めて明らかにした。

実験 2 転写因子 PSMB1 の核内移行による RBP4 遺伝子発現調節機構の解析

実験 1 の結果から、インスリン抵抗性によって脂肪組織の RBP4 の遺伝子発現が変動することが明らかになった。しかし、インスリン抵抗性時の脂肪組織における RBP4 遺伝子発現の調節機構については転写因子も含めて不明な点多かった。そこで、井上らはインスリン抵抗性をミミックした脂肪細胞 (GLUT4 knockdown 3T3-L1 adipocytes) を用いて、RBP4 の転写機構を解析した結果、これまでプロテアソーム構成因子として知られていた 20 S proteasome subunit beta type 1 (PSMB1) が RBP4 の転写調節因子として機能することを明らかにした。しかし、PSMB1 が RBP4 の遺伝子発現にどの様に作用するかについては明確ではなかった。そこで、アミノ酸配列から PSMB1 の機能ドメインの同定を試みた。

(1) PSMB1 のドメイン解析

PSMB1 の機能ドメインを **Silico** 分析により解析した結果、149 番目のチロシン残基 (**Y149**) が推定上のリン酸化サイトであることが示された。**Y149** と隣接したアミノ酸のシーケンスは、ヒトやマウス、ラットでよく保存されていることから、このモチーフが機能的に重要であることが示唆された。

(2) PSMB1 の **Y149** のリン酸化が核移行と **RBP4** の転写に及ぼす影響の解析

次に、このリン酸化が **PSMB1** の機能性へ及ぼす影響を解析する目的で、**Y149** のチロシンをフェニルアラニンに置き換えた変異体 (**Y149F**) を **GFP** 発現ベクターに組み込み **3T3-L1** 細胞に強制発現させて、細胞内局在性に及ぼす影響を解析した。その結果、**Y149 (WT)** は細胞全体に存在しているのに対し、**Y149F** は核内に局在していることを明らかにした。従って、**Y149** のリン酸化が核移行に重要であることが示された。次に、**PSMB1** の核移行が **RBP4** の転写に及ぼす影響について、**RBP4** プロモーターアッセイを用いて測定した結果、**Y149F** では濃度依存的に転写活性が増加した。これらのことから、**PSMB1** の **Y149** のリン酸化が **PSMB1** の細胞内局在と **RBP4** の転写活性化の両方に重要であることが明らかとなった。

今回、食餌性肥満モデルラット、および非肥満 2 型糖尿病モデルラットを用い、肥満から糖尿病に至る経過の 2 つのモデルを用いて RBP4 およびビタミン A 代謝に及ぼす変動を解析した。

その結果、RBP4 は肥満ではなくインスリン抵抗性の影響を受けて脂肪組織より分泌され、血中 RBP4 が上昇することを明らかにした。また、肝臓ではビタミン A 代謝が肥満により強く制御されるのに対して、脂肪組織および腎臓では、糖尿病により強く影響を受けることを明らかにした。さらに、脂肪組織での RBP4 遺伝子発現がインスリン抵抗性によるリン酸化を介したシグナル伝達の変化に起因することを示した。

本結果によって、ビタミン A の従来の視覚や成長・生殖などの機能のみならず、メタボリックシンドロームの発症メカニズムにも深く関与していることを明らかにすることができた。今後のビタミン A 代謝をターゲットとした新たな病態の予防や、健康改善の方向性を示す結果であると考えられる。

第二節 英文要旨

Obesity is caused mainly by consumption of a diet with excessive calories and is a common risk factor for multiple disorders, including insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases. Recent studies have shown that adipose tissue is an active participant in the regulation of endocrine function as it secretes adipokines, such as leptin, TNF- α , adiponectin, resistin, angiotensinogen, and PAI-1. In obesity, an excess amount of lipid accumulates in adipose tissue leading to an increase of the fat mass and subsequently to its dysfunction.

Retinol-binding protein (RBP4) is a 21 kDa protein that is synthesized primarily in the liver and white adipose tissue, where it binds to vitamin A (retinol) and is then secreted into the circulation. In addition to its role as a retinol carrier protein, studies have revealed that the level of RBP4 expression is increased in adipose tissue specific glucose transporter 4 (GLUT4) knockout mice. The increase in serum RBP4 level correlates with insulin resistance, with the inverse effect being observed following administration of an insulin-sensitizing drug. Therefore, RBP4 is now

recognized as an adipokine that may influence insulin resistance.

Previous studies have shown that both genetically diabetic and high-fat diet (HFD) animal models have high levels of serum RBP4. However, in these models, animals fed a high-fat diet also had diabetic symptoms. As a consequence, it remains uncertain whether RBP4 concentration is influenced by a high-fat diet or by the diabetic state.

Several animal models have been developed to study type 2 diabetes. One of the most common models, the ob/ob mouse, is leptin-deficient and shows an association between hyperglycemia and obesity with insulin resistance. In contrast, Goto-Kakizaki (GK) rats are a non-obese diabetic model, established originally by repeated inbreeding from Wistar rats selected at the upper limit of the normal distribution for glucose tolerance. The GK rat is characterized by progressive loss of β -cells in the pancreatic islets associated with fibrosis. The main symptom of the GK rat is impaired insulin secretion and insulin resistance, with nephropathy and peripheral neuropathy occurring as complications. Therefore, accumulation of lipid (obesity) in adipose tissue is not the main cause of the effect of obesity on RBP4 levels or vitamin A metabolism in type 2 diabetes.

The impact of increasing RBP4 levels on whole body vitamin A metabolism is also uncertain. The purpose of this study was to evaluate the effect of a HFD and type 2 diabetes on RBP4 expression and vitamin A metabolism in GK rats and rats fed a HFD. We report that GK rats have increased serum RBP4 levels. However, a HFD had no effect on serum RBP4 levels. Most interestingly, liver retinol metabolism was affected by a HFD, whereas kidney retinol metabolism was influenced markedly by diabetes. This is the first time that kidney retinol metabolism has been shown to be affected by type 2 diabetes.

Obesity is caused mainly by a high intake of fat and is known as a strong nutritional factor for causing diabetes. On the other hand, diabetes is a multifactorial disease and is affected by various environmental factors in addition to genetic factors. The two diseases are often considered to be related through the development of insulin resistance. It is also well documented in animal models that a HFD induces insulin resistance. The combination of accumulation of fat in the pancreas, reduced locomotor activity, and impaired vasorelaxation induces insulin resistance. On the other hand, Kahn et al.

identified that the adipocytokine, RBP4, induces insulin resistance. However, whether obesity or diabetes is the main reason for the increase in RBP4 remains unknown.

Serum RBP4 is the sole specific transporter protein for retinol (vitamin A) in the circulation, and its single known function is to deliver retinol to tissues. However, the dynamics of retinol in obesity and diabetes remain unclear. We therefore performed an analysis of RBP4 and vitamin A metabolites using a diet-induced obesity model and a non-obese type 2 diabetes model. In this study, the GK rat was used as a non-obese type 2 diabetes spontaneous model, while Wistar rats, a counterpart of GK rats, were given 40% fat for 10 weeks to establish a diet-induced obesity model. To avoid differences in vitamin A intake in the HFD and control diets we chose beef tallow because it contains very small amounts of vitamin A. Our results confirmed that two types of models, a non-obese diabetes rat (GK-Cont) and non-diabetic obese rat (Wistar-HFD) had been established. These animal models could be used in further analysis of vitamin A metabolism.

Using these two models, we first analyzed serum RBP4 and retinol, and showed that serum RBP4 was increased significantly in GK rats (Fig. 1A). We

therefore concluded that an elevation in serum RBP4 was more related to diabetes than obesity. Similar results have been reported by Kahn et al. who showed that increased serum RBP4 levels were associated with insulin resistance independent of obesity.

Because it is known that retinol is mobilized from the liver to extrahepatic tissues *via* RBP4 secreted into the circulation (holo-form), based on our results we hypothesized that the RBP4 we measured in our experiments was the apo-form. However, a similar decrease in serum retinol level was observed in diabetes and obesity. Hyperglycemia and loss of β -cell mass are observed in association with decreases in serum retinol and therefore we suggest that impaired β -cell partially may lead to a low serum retinol in GK rats.

Because adipose tissue, liver, and kidney are the major sites of RBP4 expression, we investigated these organs to explain the decrease in retinol levels. Organ-specific responses of retinol metabolism and expression of RBP4 and retinol-related gene expression were observed in adipose tissue, liver, and kidney. It has been reported previously that elevated serum RBP4 derived from adipose tissue induces an inflammatory cytokine. These findings indicate RBP4 is a diabetic marker. Our results showed there was a

significant increase in RBP4 gene expression in the adipose tissue of GK rats (Fig. 3B), leading us to conclude that elevations in serum RBP4 level were produced by adipose tissue.

We also observed that retinol in adipose tissue was increased by both obesity and diabetes. Moreover, gene expression levels of Raldh were decreased significantly by diabetes, indicating that production of retinoic acid was suppressed. However, we did not observe a significant difference in RAR β expression. Retinoic acid is known to improve insulin sensitivity and we hypothesize that retinoic acid production may be inhibited in diabetic adipose tissue. Further analysis needs to be conducted to confirm this possibility.

In contrast to adipose tissue, the retinol content in liver was decreased significantly in obese rats compared to diabetic rats without affecting RBP4 or Raldh gene expression. In theory, dietary retinol is absorbed in the small intestine, with up to 90% of total body retinol being stored in the liver. We therefore concluded that liver retinol uptake could be inhibited in obesity rats.

Finally, the retinol content in the kidney was increased significantly in diabetes. Expression of RBP4 and Raldh was also decreased markedly by

diabetes. Therefore, vitamin A metabolism, especially retinoic acid production, is limited in the kidney during diabetes. The GK rat is known to develop nephropathy, with disorders of excretion and resorption in the kidney having been reported. It is well known that retinoic acid improves glomerular disease. In our experiments we observed a decrease in RAR β in GK rats, indicating a low production of retinoic acid. Interestingly HSP70 is the target gene of retinoic acid and accordingly we analyzed HSP70 expression in another group of GK rats and observed a significant decrease in these levels. HSP70 is known to act as a molecular chaperone and in protein folding, with decreased expression occurring during cancer formation. On the basis of these findings we suggest that a decrease in kidney HSP70 expression may lead to diabetic nephropathy.

In conclusion, our results demonstrate that vitamin A metabolism is affected differently in obesity and diabetes. In particular, retinol metabolism in the kidney is affected greatly by diabetes. From these results, we suggest that retinoic acid treatment may improve diabetes and its associated nephropathy.

Inoue et al, have reported the identification of a transcriptional activation core DNA element (GLUT4 knock-down-dependent transcriptional activation) in the RBP4 promoter of lentiviral shRNA-mediated GLUT4 knockdown 3T3-L1 adipocytes, and the identification of 20 S proteasome subunit beta type 1 (PSMB1), which binds to the G4KA element. RNA interference knockdown of PSMB1 inhibited the expression of a RBP4 promoter-reporter construct. PSMB1 is a transcription factor for RBP4.

In the present study, we investigated the regulation of the subcellular localization of PSMB1 and observed a translocation of Y149F PSMB1 to the post-nuclear. Luciferase activity was not influenced by the exogenous WT. In contrast, luciferase activity was enhanced by the expression of Y149F PSMB1 in a dose-dependent manner.

These results suggest that the phosphorylation on Y149 site in PSMB1 contributes to both its cellular localization and its transcriptional activity.

Here we suggest a novel regulation model of RBP4 expression via PSMB1.

These finding may contribute to understand the insulin resistance and RBP4 expression mechanism.

第二節 参考文献

- 1: Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-1607.
- 2: Golay A, Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19:649-663.
- 3: Abel ED, Peroni O, Kim JK, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001;409:729-733.
- 4: Wiecek A, Kokot F, Chudek J, Adamczak M. The adipose tissue—a novel endocrine organ of interest to the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:191-195.
- 5: Aneja A, El-Atat F, McFarlane SI, Sowers JR. Hypertension and obesity. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:169-205.
- 6: Herbert Tilg and Alexander R Moschen. Inflammatory Mechanisms in the Regulation of Insulin Resistance. *Mol Med*. 2008;14(3-4):222-231.
- 7: Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005;436:356-62. doi:10.1038/nature03711.
- 8: Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, et al. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1992;267:1805-10.
- 9: Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 2006;354:2552-63.
- 10: 厚生労働省 人口動態調査
- 11: Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-1607.
- 12: Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*. 1989;149:1514-1520.
- 13: Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO

- consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539-553.
- 14: Alberti KG, Zimmet P, Shaw. J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome-a new world wide definition. *Lancet.* 2005;366:1059-1062.
- 15: メタボリックシンドローム診断基準検討委員会 メタボリックシンドロームの定義と診断基準 日本内科学会雑誌 第94巻 第4号
- 16: Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004;23:447-56.
- 17: Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106:171-6.
- 18: William F. Ganong, MD, REVIEW OF MEDICAL PHYSIOLOGY 22nd Edition
- 19: Siddle, K. Soos, MA, O' ,Brien, RM, et al.: Monoclonal antibodies as probes of the structure and function of insulin receptors. *Biochem. Soc. Transactions* 15:47-51, 1987
- 20: Hawley, DM, Maddux, BA, Patel, RG et al: Insulin receptor monoclonal antibodies that mimic insulin action without activating tyrosine kinase. *J Biol Chem* 164:2438-2444,1989.
- 21: Trischitta, V., Wong, K.Y., Brunetti, A., et al.: Endocytosis, recycling, and degradation of the insulin receptor. Studies with monoclonal antireceptor antibodies that do not activate receptorkinase. *J Biol Chem*,264:5041-5046,1989.
- 22: Jie Huang, Takeshi Imamura, Jennie L. Babendure, Juu-Chin Lu and Jerrold M. Olefsky : Disruption of Microtubules Ablates the Specificity of Insulin Signaling to GLUT4 Translocation in 3T3-L1 Adipocytes, *J Biol Chem.* 2005 Dec 23;280(51):42300-6.
- 23: Takeshi Imamura, Jie Huang, Isao Usui, Hiroaki Satoh, Jennie Bever, and Jerrold M. Olefsky: Insulin-Induced GLUT4 Translocation Involves Protein Kinase C- λ -Mediated Functional Coupling between Rab4 and the Motor Protein Kinesin, *Mol Cell Biol.* 2003 Jul; 23(14): 4892-4900.
- 24: 葛谷英嗣, インスリン抵抗症, 日本内分泌学会誌.(Folia endocrinol.)63.1515~1526. 1987.
- 25: Tanaka T, Hidaka S, Masuzaki H, Yasue S, Minokoshi Y, Ebihara K, Chusho H, Ogawa Y, Toyoda T, Sato K, Miyanaga F, Fujimoto M, Tomota T, Kusakabe T, Kobayashi N, Tanioka H, Hayashi T, Hosoda K, Yoshimatsu H, Sakata T, Nakao K (2005) Skeletal muscle AMPK phosphorylation parallels

metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification.
Diabetes 54 : 2365-2374

- 26: Grundy SM (2006) Drug therapy of the metabolic syndrome : minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nature Rev : Drug Discovery* 5 : 295-309
- 27: Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM, Shinyama H, Sharp M, Fleming S, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS (2003) Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest* 112 : 83-90
- 28: Ebihara K, Masuzaki H, Nakao K (2004) Efficacy of long-term leptin replacement therapy for lipoatrophic diabetes in Japan. *N Engl J Med* 351 : 615-616
- 29: Haiming Cao, Adipocytokines in Obesity and Metabolic Disease, *J Endocrinol.* 2014 February ; 220(2): T47–T59.
- 30: Herbert Tilg and Alexander R Moschen, Inflammatory Mechanisms in the Regulation of Insulin Resistance, *Mol Med.* 2008 Mar-Apr;14(3-4):222-31.
- 31: 木村修一, 古野純典, 最新栄養学 第10版, 建帛社
- 32: 日本ビタミン学会、ビタミンの辞典、朝倉書店、1996.
- 33: Alapatt P, Guo F, Komanetsky SM, Wang S, Cai J, Sargsyan A, et al. Liver retinol transporter and receptor for serum retinol-binding protein (RBP4). *J Biol Chem* 2013;288: 1250–65.
- 34: Dawson HD, Yamamoto Y, Zolfaghari R, Rosales FJ, Dietz J, Shimada T, et al. Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. *J Nutr* 2000;130:1280–6.
- 35: Naylor HM, Newcomer ME. The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP. *Biochemistry.* 1999 Mar 2;38(9):2647-53.
- 36: 鈴木 研一, 豊田 隆謙, 後藤 由夫, 自然発症糖尿病 GK ラット・成因と合併症-, 日本疾患モデル動物研究会記録, Vol. 5 (1989)
- 37: Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med* 1976;119:85–90.
- 38: Portha B, Serradas P, Bailbé D, Suzuki K, Goto Y, Giroix MH. Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. *Diabetes* 1991;40:486–91.

- 39: Giesbertz P, Padberg I, Rein D, Ecker J, Höfle AS, Spanier B, et al. Metabolite profiling in plasma and tissues of ob/ob and db/db mice identifies novel markers of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2015;58:2133–43.
- 40: Johnson PR, Zucker LM, Cruce JA, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res.* 1971 Nov;12(6):706–14.
- 41: Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes.* 1992 Nov;41(11):1422–8.
- 42: Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 1993;123:1939–51.
- 43: Lowe JS, Morton RA. Studies in vitamin A. 26. The vitamin A-replacing effect of lard. *Biochem J* 1953;55:681–6.
- 44: Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175–91.
- 45: Furusho, Kataoka, Yasuhara, Wada, Masushige. Retinol equivalence of carotenoids can be evaluated by hepatic vitamin A content. *Int J Vitam Nutr Res* 2000;70:43–7.
- 46: Macejak D, Rayfield M, Luftig R. *Arch. Biochem. Biophys.* 280 (1990):53–60.
- 47: Parsell D, Lindquist S. Heat shock proteins and stress tolerance. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 1994.*
- 48: Zhu WM, Roma P, Pellegatta F, Catapano AL. *FEBS Lett.* 372(1995):1–5.
- 49: Inoue E, Yamashita A, Inoue H, Sekiguchi M, Shiratori A, Yamamoto Y, Tadokoro T, Ishimi Y, Yamauchi J. Identification of glucose transporter 4 knockdown-dependent transcriptional activation element on the retinol binding protein 4 gene promoter and requirement of the 20 S proteasome subunit for transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2010 Aug 13;285(33):25545–53.
- 50: Tanaka K, Yoshimura T, Tamura T, Fujiwara T, Kumatori A, Ichihara A. Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Lett.* 1990 Oct 1;271(1–2):41–6.

謝辞

本研究は、平成 21 年 4 月 1 日から平成 23 年 3 月 20 日まで東京農業大学大学院 農学研究科 農芸化学専攻 博士前期課程 栄養生化学研究室において行った研究と、平成 23 年 4 月 1 日から平成 28 年 3 月 30 日まで独立行政法人国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 食品・栄養表示研究室にて行ったものである。

本研究をまとめるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました栄養生化学研究室の田所忠弘 名誉教授、山本祐司 教授、小林謙一 准教授、鈴木司 助教、国立健康栄養研究所の山内淳 博士に心から御礼申し上げます。

また、国立健康栄養研究所の食品保健機能研究部、石見佳子 部長をはじめとする皆さまには多大なるご支援を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。ご教示賜りました東京農業大学 応用生物科学部長 上原万里子 教授、生物応用化学科 内野昌孝 教授に厚く御礼申し上げます。

HPLC を用いたレチノール測定をご教示いただきました東京農業大学古庄律教授、谷岡由梨 助教、共同研究者であります盛岡大学 太田徹 教授に厚く御礼申し上げます。東京農業大学 醸造学科 安藤達彦 教授、石浜峻 助手、辻聡 嘱託助教には多大なるご配慮いただき感謝申し上げます。

本研究を一緒に遂行してくれた志知雄太 さん、佐藤美幸 さんに厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、いつも応援してくれた井上博文 助教（現：東京農業大学）、風見真千子 助手（現：東京農業大学）、鈴木正孝 さん、阿部祐輝 さん、高田恭輔さん、白鳥明日香 さん、原伴栄 さん、池頭智代 さん、本間大輔 さん、廣田弥里 さん、松本雄宇 さん、中村信裕 さん、柳楽大気 さん、佐藤拓也 さん、相澤有美 さん、影山洋平 さん、志賀孝宏 さん、および、これまでともに勉学に励んだ栄養生化学研究室のみなさまに厚く感謝申し上げます。

そして、いつも最大限の応援をしてくれた両親、兄妹、親族に心から感謝いたします。

最後に、恩師であります東京農業大学名誉教授 舛重正一先生へ、道を示してくださったことへの感謝とこれからの頑張りを誓います。

2016 年 12 月 20 日 白井 智美