HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	２型糖尿病分子メカニズムの解明と核酸医薬への展望
Author(s)	山内, 順
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11851号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11851
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62169
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_Yamauchi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

2 型糖尿病分子メカニズムの解明と核酸医薬への展望

北海道大学大学院　生命科学院

生命科学専攻　生命医薬科学コース

薬剤分子設計学研究室

平成 27 年 3 月

山内　順

目次

略語表 5

序論 8

本論
第一章　FoxO6 過剰発現モデルマウスを用いた MTP 産生亢進を介した
　　肝 VLDL 合成メカニズムの解明
諸言 16
結果
1.1. FoxO6-tg マウスと高トリグリセリド血症の獲得 20
1.2. FoxO6 による肝臓 VLDL-TG 産生亢進の評価 22
1.3. FoxO6 が肝脂質代謝に与える影響評価 24
1.4. FoxO6 が肝 PPAR-γ発現に与える影響評価 26
1.5. 肝培養細胞を用いた FoxO6 による TG 産生促進経路の評価 27
1.6. FoxO6 が MTP プロモーターのトランス活性に与える影響評価 28
1.7. *db/db* マウスの肝臓 FoxO6 発現抑制による高トリグリセリド血症改善効果の検証 30
考察 32

第二章　FoxO6 欠損マウスを用いた２型糖尿病抑制効果の検証
諸言 36
結果
2.1. FoxO6 欠損による糖代謝への影響評価 38
2.2. FoxO6 欠損が肝糖新生に与える影響評価 40
2.3. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損が糖代謝に与える影響評価 42
2.4. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損がエネルギー代謝に与える影響評価 46
2.5. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損が肝クッパー細胞浸潤に与える影響評価 48
2.6. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損が肝臓脂質代謝に与える影響評価 50
2.7. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損が脂肪組織マクロファージ浸潤に与える
　　影響評価 52
考察 54

第三章　核酸医薬への展望
諸言 57
結果

3.1. FoxO6 siRNA 内封 YSK-05 MEND の作製 59
3.2. YSK-05 MEND を用いた肝臓 FoxO6 のノックダウン効果 59
3.3. YSK-05 MEND を用いた肝臓 FoxO6 のノックダウンによる糖新生抑制効果 60
3.4. YSK-13 MEND を用いた肝臓 FoxO6 のノックダウンによる糖尿病治療効果 61
考察 64

結語 66

実験方法
1. 実験材料 69
2. 実験機器 70
3. 試薬調整 71
4. 一般操作 71
5. 第一章の実験 71
6. 第二章の実験 76
7. 第三章の実験 80

参考文献 83

謝辞 91

略語表

本論文では以下の略語を用いた.

ACC:	acetyl- CoA carboxylase
ACOX1:	acyl-coenzyme A oxidase 1
ALT:	alanine aminotransferase
Amp：	ampicillin
ApoB：	apolipoprotein B
AST:	aspartate aminotransferase
BCA:	bicinchoninate
BSA:	bovine serum albumin
bp：	base pair
CCR2:	C-C chemokine receptor 2
CCL2:	chemokine C-C motif ligand 2
CCL3:	chemokine C-C motif ligand 3
CCL7:	chemokine C-C motif ligand 7
CD68:	cluster of differentiation 68
cDNA:	complementary DNA
Chip：	chromatin immunoprecipitation
Chol:	cholesterol
CLSM:	confocal laser scanning microscopy
CPT:	carnitine palmitoy transferase 1
DDW:	deinonized distilled water
DIO:	diet - induced obesity
DNA：	deoxyribonucleic acid
dpm:	disintegration per minute
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
Em：	emission
EtOH:	ethanol
Ex：	excitation
FAS:	fatty acid synthase
FBS:	fetal bovine serum
FoxO6:	forkhead box O6
FoxO1:	forkhead box O1
g：	gravity
G6Pase：	glucose-6- phosphatase

HEPES:	2-｛4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl｝ethanesulfonic acid
HL:	hepatic lipase
HFD:	high fat diet
hr :	hour
ID :	injection dose
IGF-1 :	insulin-like growth factor 1
IL-1β:	interleukin-1beta
IL-6 :	interleukin-6
Luc :	luciferase
LPL :	lipoprotein lipase
MEND :	multifunctional envelope-type nano device
min :	minute
mRNA :	messenger RNA
MW :	molecular weight
MTP :	microsomal triglyceride transfer protein
NEFA :	nonesterified fatty acids
NLS :	nuclear localization signal
NP:	nano particle
PBS :	phosphate-buffered saline
PCR :	polymerase chain reaction
pDNA :	plasmid deoxyribonucleic acid
PdI:	polydispersity index
PEI:	polyethyleneimine
PEG:	polyethylene glycol
PEPCK:	posphoenolpyruvate carboxykinase
PGC-1α:	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PGC-1β:	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta
PKB:	protein kinase B
PPAR-α:	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR-γ:	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
qRT- PCR:	quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
R8:	octaarginine
RLU :	relative light unit
RNA	ribonucleic acid

RNAi:	ribonucleic acid interfering
rpm :	round per minute
r.t.:	room temperature
sec :	second
siRNA:	small interfering RNA
SRB1:	scavenger receptoe classB,member 1
SRBP-1c:	sterol regulatory element-binding protein 1c
STR-R8:	stearyl-R8
TG:	triglycerides
TNFα:	tumor necrosis factor alpha
VLDL:	very low-density lipoprotein

序論

序論

インスリン非依存性の 2 型糖尿病は，複数の要因が絡み合って生じる多因子疾患である．日本における 2014 年現在の糖尿病患者は 720 万人を超えている．また，治療を受けていない糖尿病予備群は 390 万人だと推定される．一方，2013 年，世界の糖尿病人口は 3 億 8200 万人に上ると言われている（Fig.1）．日本を含む西太平洋地区は世界最大の糖尿病人口を抱えていることがわかる．また，糖尿病は先進国だけでなく途上国でも増えており，感染症が長年医療の焦点だったアフリカ地域でも，2030 年までに糖尿病人口は 90%増加すると予想されている．糖尿病患者の爆発的な増加は，感染症に見られた患者数増加と類似している．糖尿病患者は非糖尿病患者に比較して平均寿命が 10 年短く，さらに Quality of life （QOL）を低下させる合併症を伴いやすい．日本では年間 6 万 5 千人，世界中で見ると 490 万人が糖尿病を原因として死亡している．したがって，糖尿病患者の急増が世界へ与える脅威は深刻である．これに対して世界保健機関は糖尿病の世界的脅威を認知するための決議を発表し，糖尿病患者増大抑止に向けた政策を進めている [1]．これらの点から，糖尿病患者の抑止が急務の課題であることは明らかである．

しかしながら，糖尿病の発症要因はまだ特定されておらず，治療は血糖コントロールのための対症療法にとどまっているのが現状である [2]．一方で長年の研究成果により，2 型糖尿病の病態に関しては研究が進み，より深い理解が得られている [3]．具体的には，2 型糖尿病では脂肪組織，筋肉，肝臓といった末梢組織でのインスリン抵抗性と，インスリン分泌を行う膵臓 β 細胞での障害が認められることがわかっている．脂肪組織や筋肉ではインスリン刺激を受けて GLUT4 と呼ばれるグルコーストランスポーターが細胞膜表面にトランスロケーションすることでグルコースの細胞内取り込みが生じ,血糖値の低下が起こる．しかしながら，インスリン抵抗性を生じると，インスリンシグナルの低下によりグルコースの取り込みが弱化することが知られている．一方，肝臓では細胞膜表面に GLUT2 が恒常的に発現しているため，インスリンシグナルはグルコース取り込みよりもむしろ肝臓での糖新生の抑制や糖の原料となる脂質分解を抑制する方向に働く．この働きは，インスリン抵抗性時に亢進すると言われている（Fig. 2）[4,5]． 2 型糖尿病患者では糖新生が亢進する報告があることから，この肝臓でのインスリン抵抗性による糖産生抑制の障害が血糖値上昇の原因ではないかと考えられている．

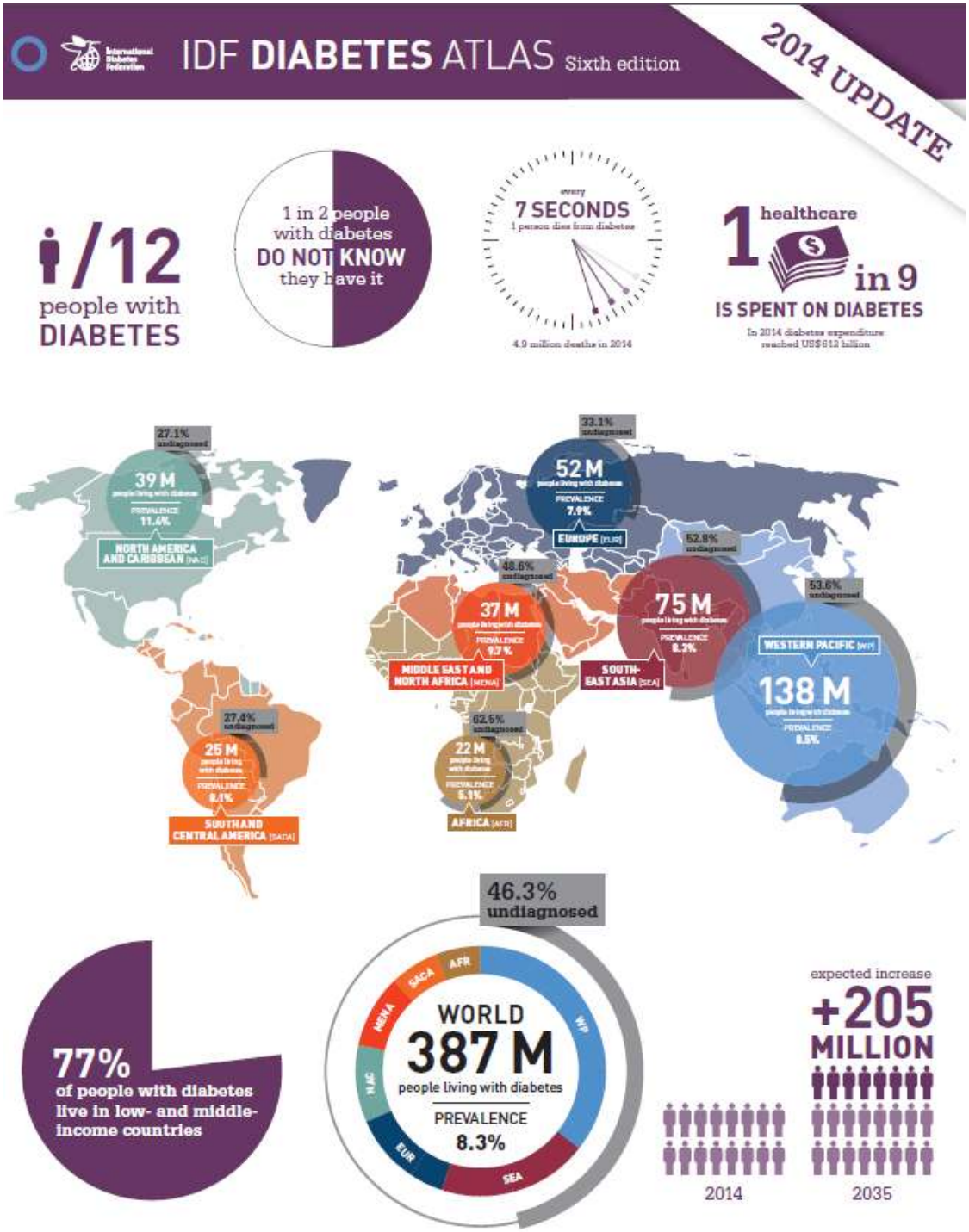


Fig.1 Global diabetes prevalence:

From International Diabetes Federation, Diabetes Atras 6th edition 2014

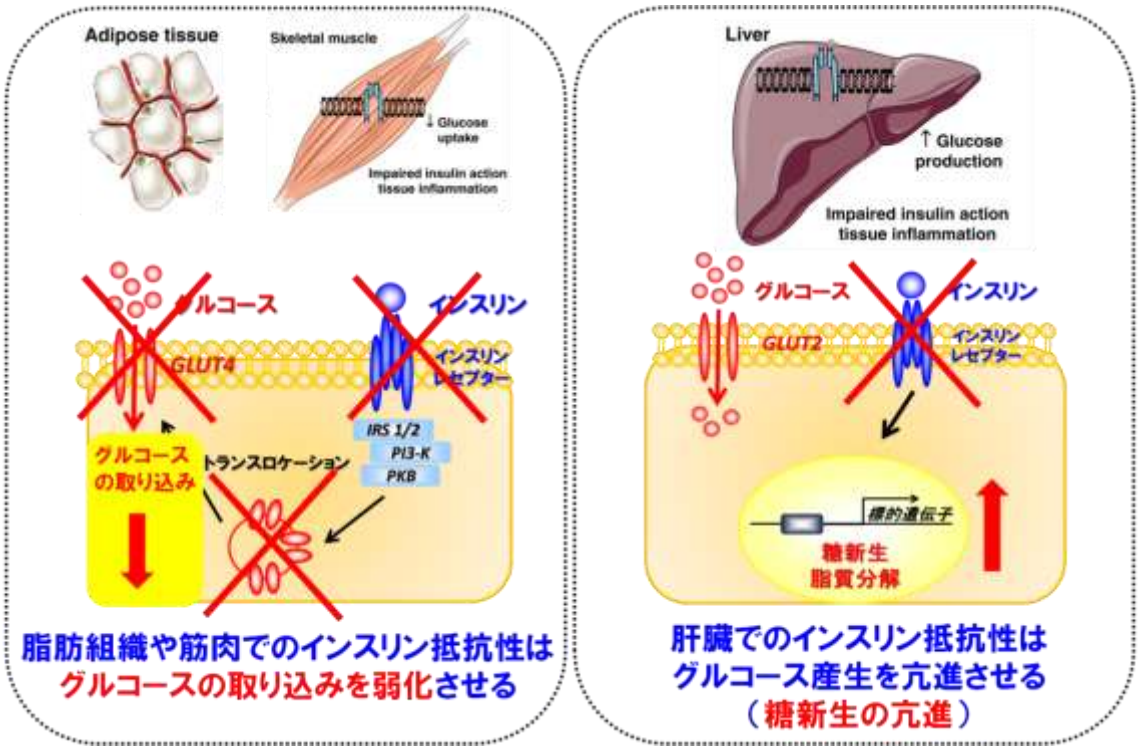


Fig.2 Type 2 diabetes and Insulin resistance in peripheral tissue :

糖尿病患者で認められる空腹時血糖値の上昇に関して, Kim らは 2011 年に Foxo6 と呼ばれる forkhead 転写調節因子が, 糖新生律速酵素の発現上昇を介して, 糖新生活性を亢進させることを報告している[6]. 彼らは以下の点を明らかとしている. 1) もともと肝臓で発現が低い FoxO6 が糖新生の亢進する絶食時に発現が 5 倍上昇する. 2) 高脂肪食負荷による肥満モデルや肥満・糖尿病モデルである *db/db* マウスでは, 正常時に比較してそれぞれ 8 倍, 4 倍 FoxO6 の遺伝子発現が上昇している. さらに同じ論文内で, FoxO6 を肝臓で選択的に過剰発現させたトランスジェニックマウスでは, 血糖値の上昇や血中インスリン濃度の上昇といった糖尿病症状を誘起することを報告している. 次の表は 2 型糖尿病患者の臨床データを表しているが, 高血糖及び高インスリン血症を呈する 2 型糖尿病患者では, 高トリグリセリド血症を頻発することが知られている（Table.1）[7]. Kim らのグループでは FoxO6 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでも同様に血中トリグリセリド濃度が上昇し, 高トリグリセリド血症を誘発することすることを報告した[8]. 上記の点は, FoxO6 の過剰発現は, 糖尿病症状の誘起のみならず, 糖尿病患者で頻発する脂質代謝変動も引き起こしていることを意味する. FoxO6 は 2 型糖尿病患者の病態を強く反映しており, 糖尿病発症の鍵を握る有用な因子であることが示唆される.

	Normal	High	
Glucose (mmol/L)	5.37 ±0.78	*5.50 ±1.02	*p<0.05
Insulin (pmol/L)	113 (47-271)	**131 (48-362)	**p<0.001
Triglycerides (mmol /L)	1.34 (0.69-1.67)	2.10 (1.70-855)	

Table.1
TG levels of type2 diabetes patient

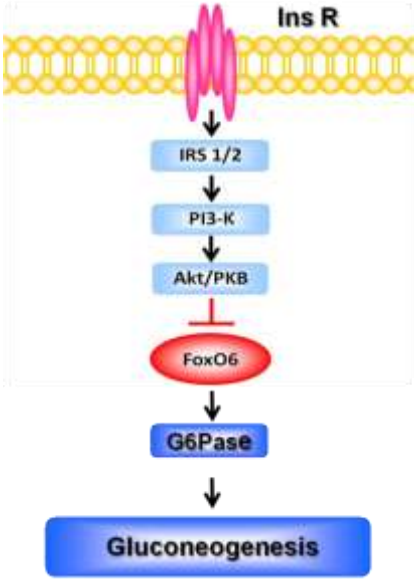


Fig.3
FoxO6 integrates gluconeogenesis through insulin signals

一方，基礎研究で探索された新規治療標的因子を治療薬へと発展させる際には，新たな応用技術が必要となる．この事が糖尿病治療を目的とした医薬品開発の研究進度を遅らせ，糖尿病の根治を困難としている．2007 年に発見された RNA 干渉技術は，従来の方法では治療が困難であった疾患に対しても，標的遺伝子の発現抑制を介することで根治療法となるのではないかと期待されている [9]．この応用のためには安全かつ効率的なデリバリーシステムの開発が不可欠である [10]．当研究室で開発された多機能性エンベロープ型ナノ構造体は，これまでに安全で効率的な核酸報告を多数報告しており，この問題を解決するための手立てになり得ると期待される [11]．

Fig.4 のブルーサークルは糖尿病患者の急激な増加を抑止するべく，世界中の人に糖尿病を知ってもらうためのシンボルとして 2006 年に WHO により作られた．本研究の意義は，この糖尿病患者増大抑止にむけて，糖尿病尿病発症メカニズム解明を行うとともに，これまで進められてきた核酸医薬等の最新創薬研究を連携させる，異分野融合研究を遂行することにある．本研究の達成により，2 型糖尿病発症メカニズムに則した新規治療システムの開発が可能になると期待される．



Fig.4

Goal of this project: *infuse molecular biology and Drug delivery techniques to develop novel type2 cure system*

本論

第一章
FoxO6 過剰発現モデルマウスを用いた MTP 産生亢進を介した 肝 VLDL 合成メカニズムの解明

第一章
FoxO6 過剰発現モデルマウスを用いた
MTP 産生亢進を介した肝 VLDL 合成メカニズムの解明

緒言

高トリグリセリド（TG）血症は, 最もよく知られる脂質異常症のうちの一つであり, 肝臓での血中リポタンパク質の合成亢進または, 分解の減少により生じる[12 13]. 高 TG 血症は, 血中で TG-rich なリポタンパク質レムナントが蓄積するために動脈硬化を引き起こし, 心臓病のリスクを誘発する[7]. 高 TG 血症は肥満症や 2 型糖尿病をはじめとするインスリン抵抗性に密接に関与することが知られている[14]. 一方で, インスリン抵抗性と高 TG 血症の病理学的, 分子生物学的発症機序は完全に明らかとなっていない. TG 代謝の鍵となるのは, 肝臓で合成された Very-Low-Density-Lipoprotein- Triglyceride （VLDL-TG）の血中への流入である. 小腸から脂肪酸が流入すると, 肝臓にて VLDL-TG の構築, 分泌が増大する. VLDL-TG の分泌は, 通常時では肝臓脂質の蓄積を枯渇させないために生じており, インスリン作用や脂肪酸基質の流入により制御されている[15]. 肥満や 2 型糖尿病で見られるインスリン抵抗性時にはこの制御がはずれ, 高 TG 血症を介した動脈硬化を引き起こす[16].

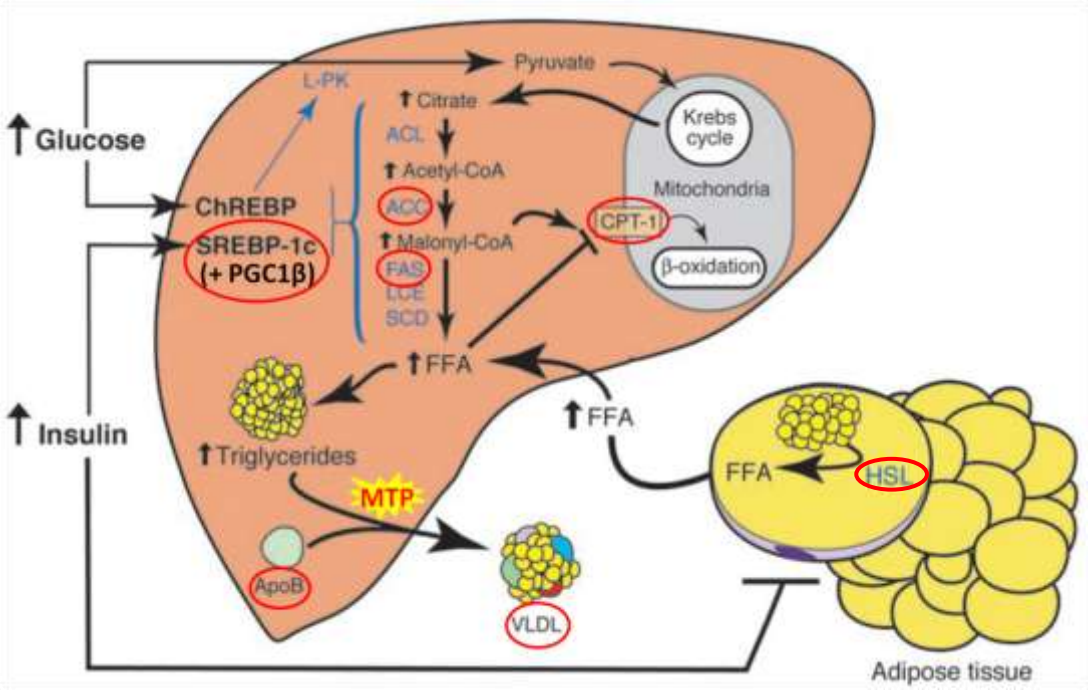
高 TG 血症の分子生物学機序に関して, より深い理解を得るために, Forkhead box O family の転写調節因子として知られる FoxO6 と VLDL-TG 産生に関する関連性を調べた. このサブファミリータンパク質には FoxO1, FoxO3, FoxO4, FoxO6 が知られており, winged- helix DNA binding motif を高度に保存している[17]. これらのタンパク質は Akt /PKB の基質となり, インスリン（または IGF-1） に抑制的に働く[18]. その結果, 哺乳類でインスリンにより制御を受ける細胞死, 分化や抗酸化ストレスや代謝に関連した遺伝子発現を抑制する[19 20 21]. FoxO1 の相同分子種は dFoxO と呼ばれる *Drosophia melanogaster* と *C. elegans* の DAF16 であり, 生命長寿の制御に関与している. 一方で, FoxO6 の肝臓脂質代謝に関しての役割はほとんど知られておらず, 肥満や 2 型糖尿病への寄与は明らかとなっていない.

FoxO6 は, FoxO サブファミリーに分類されているものの, 他の FoxO メンバーとは異なる点が多数認められる. 以下にその違いを列挙する[22]. 1）FoxO6 は他の FoxO サブファミリーで共通して見られるアミノ酸配列において, 最も低い相同性を有する（< 30%）. 2）他の FoxO メンバーでは AKT/PKB リン酸化部位を 3 つ（FoxO1 では T24, S256, S319） 有しているのに対し, FoxO6 は T26 と S184 の 2 つのみを有している[23]. 3） FoxO6 は他の FoxO サブファミリーが有する nuclear export signal （NES）を有さない. 4） FoxO6 はインスリン依存性の核外移行を示さない[6 24]. 一方, FoxO6 は他の FoxO サブファミリーが有する特徴や作用機序を多く共有している[19]. FoxO6 はヒトやげっ歯類の肝臓で発現している[6]. 近年の研究から, 食事誘導性肥満モデルマウスや糖尿病モデルである *db/db* マウスで見られるインスリン抵抗性を獲得した肝臓において, FoxO6 の発現制御がはずれ, mRNA

及びタンパク質の高発現を引き起こし，その結果脂質代謝を変化させることが報告されている[6]．これらの結果は，FoxO6 は肝臓の脂質代謝に関して重要な役割を担っていることを示唆するものである．そこで本研究では，糖尿病時に見られる高 TG 血症に関して，FoxO6 の制御が関与しているのではないかと考えた．本仮説を検証するため，肝臓特異的に FoxO6 を過剰発現させたトランスジェニックマウス及び，肝臓選択的に FoxO6 発現を抑制させた *db/db* マウスを用いて検証を行った．

はじめに

高インスリン血症，肝臓での糖産生の増大および糖利用の減少が認められるインスリ抵抗性時には，肝臓での TG 蓄積増大が認められる [16]．以下に第一章に後述する肝臓 TG 合成経路に関与する分子種についてまとめる．



インスリン抵抗性時における肝臓での TG 蓄積増大経路

(Browning JD et al, Clin. Invest, 2004 より一部改変)

脂肪組織では，インスリン抵抗性時にホルモン感受性リパーゼ（hormone-sensitive lipase: HSL）活性が上昇し，脂肪分解により脂肪組織での TG が分解される．その結果遊離脂肪酸（FFA）とグリセロールが血中に遊離され，遊離してきた FFA が肝臓に流入する．その後 FFA はミトコンドリアで酸化され，TG の貯蔵あるいは VLDL 粒子の合成に寄与する [25]．

一方で，肝臓では高インスリン血症時に SRBP-1c（Sterol regulatory element- binding protein 1c）の発現が促進され，余剰のグルコースから脂肪酸を合成する経路が亢進する．具体的には，SRBP1-c はアセチル-CoA カルボキシラーゼ（ACC）や脂肪酸合成酵素（fatty acid synthetase: FAS）遺伝子の転写活性を上昇させる．また，ACC の作用によりアセチル CoA から合成されるマロニル CoA は，カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I 型（carnitine palmitoyl transferase-1: CPT-1）を抑制し，ミトコンドリアへの FFA 流入の低下を引き起こす．その結果細胞内の TG 量が増大する．PGC-1β はこの SRBP-1c に作用することにより，脂肪酸合成や TG 合成を強力に調節することが知られている [26]．

以上よりインスリン抵抗性時に増大した FFA は，肝臓の *de novo* 経路によりグリセロール 3-リン酸とエステル結合し，TG となる．合成された TG を原料に，肝細胞の小胞体では

VLDLが生成され，ゴルジ装置を経てVLDLが血中に分泌される．この新生VLDLはApoBと呼ばれるアポリポタンパク質を含んでおり，MTP（Microsomal triglyceride transfer protein）と呼ばれる酵素の働きにより構築される[26 27].

なお, PPARαは，肝臓で強く発現しており, FFAなどを生理的リガンドとして活性化され，血中TG濃度の低下などを導く．一方PPARγは脂肪分化を促進させ，肝臓でのTG蓄積を促進させることが知られている[28].

結果

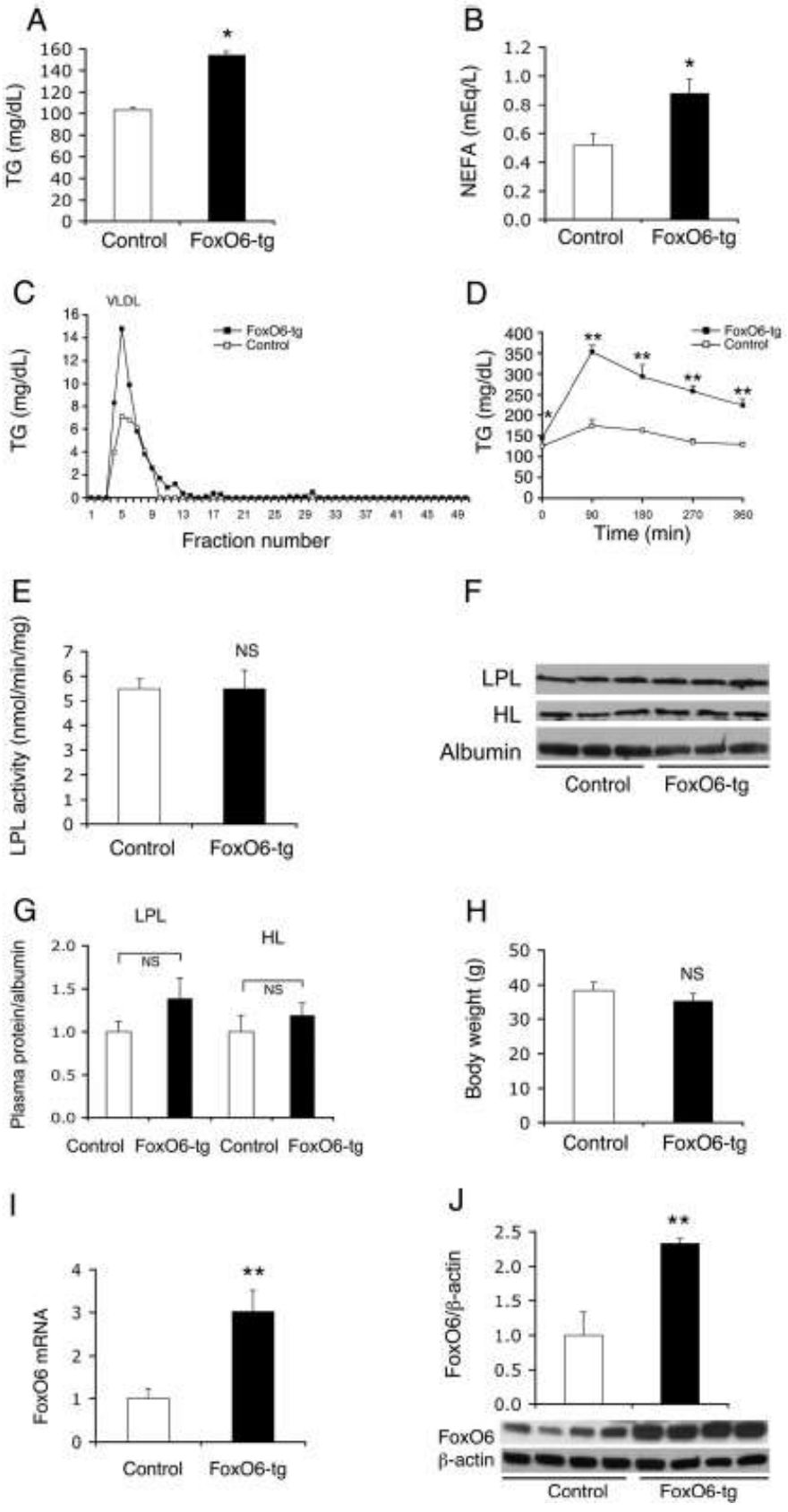
1.1. FoxO6-tg マウスと高トリグリセリド血症の獲得

FoxO6 と肝脂質代謝の関連を明らかとするために, FoxO6 が恒常的に活性であるような FoxO6-CA アレルを肝特異的 transthyretin プロモーターを用いて導入し, FoxO6 トランスジェニックマウスを作製した. このトランスジェニックマウスは, 脳, 筋肉, 脂肪組織や β 細胞等といった他の末梢組織に影響を与えることなく, 肝臓特異的に FoxO6-CA を発現している. オスの FoxO6-CA トランスジェニックマウス（以下 FoxO6-tg）と共に, 年齢と性別の一致したコントロールマウスを用いた. FoxO6-tg は, 高 TG 血症を獲得した. 血清 TG 量（Fig.1-1 A）. 遊離脂肪酸（Fig.1-1 B）, VLDL 由来 TG（Fig.1-1 C）の有意な上昇を示し, 脂質負荷試験を悪化させた(Fig.1-1 D). 経口の脂質投与の結果, 血清中の TG 値は 144 ± 5 mg/dL から 90 分後の 353 ± 16 mg/dL まで急激に上昇した. 6 時間後においても 223 ± 14 mg/dL と高値を維持していた. 一方, コントロールマウスの血中 TG 値は経口脂質投与前では 124 ± 4 mg/dL であったが, 90 分後には 174 ± 15 mg/dL と中程度の上昇を示した. 6 時間後には 129 mg/dL とベースライン程度まで低下した. メスの FoxO6-tg マウスに関しては, VLDL-TG 産生を介した血中 TG 濃度の増加を示した.

生理学的な理解を深めるために, 食後血中 VLDL-TG の主な分解経路として知られる血中 Lipoprotein lipase（以下 LPL）活性を測定した. その結果, 血中 LPL 活性の値に違いは認められなかった（Fig.1-1 E）. コントロールとして,血中 LPL と HL タンパク質を検出した（Fig.1-1 F, G）. いずれにおいてもオス FoxO6-tg マウスとコントロールマウスの間で違いは認められなかった. また, 両群では体重変化の値においても有意な差は見られなかった（Fig.1-1 H）. メスのマウス間も同様に体重変化はなかった. そこで以降の実験ではオスのマウスを用いて FoxO6 と肝脂質代謝への影響を調べることとした. まずコントロールとしてマウス肝臓における FoxO6 の発現量を調べた. その結果, FoxO6-tg マウスはコントロール群と比較して mRNA で 3 倍（Fig.1-1 I）, タンパク質で約 2 倍の発現量の増加を認めた（Fig.1-1 J）.

Fig.1-1 FoxO6-tg mice develop hypertriglycemia:

*(A) Plasma TG levels. (B) Plasma NEFA levels. (C) Plasma VLDL-TG Levels. Aliquots (400 µl) of plasma pooled from FoxO6-tg (with FoxO6-CA transgenic production in the liver) and control wild-type littemates were fractionated by gel filtration in a FPLC system. Fractions (500 µl) were eluted for the determination of TG levels. (D) Plasma TG profiles in response to fat tolerance. (E) Plasma LPL activity. (F) Western blots of plasma LPL, HL and albumin. (G) LPL and HL protein levels relative to albumin. (H) Body weight. (I) Hepatic FoxO6 mRNA levels relative β-actin mRNA. (J) Hepatic FoxO6 protein levels relative to β-actin. Data were obtained from male FoxO6-tg (n=6) and control wild-type littermates (n=4) at 30-32 weeks of age under fasting conditions.*p< 0.05 and ** p<0.01 vs. control. NS means not significant.*



Endocrinology 155 (4), 2011 に掲載済み

1.2. FoxO6 による肝臓 VLDL-TG 産生亢進の評価

FoxO6 に由来する TG 代謝機能障害に関する詳細を探るため, 次に FoxO6-tg マウスの VLDL-TG 産生を調べた. 本実験では tyloxapol という TG 代謝を抑制する薬剤を用いた. FoxO6-tg マウスはコントロール群と比較して, tyloxapol の経口投与により, 有意に高い血中 TG 値を示した（Fig.1-2 A）. この結果は血中 ApoB48 タンパク質の増大及び, 肝 ApoB mRNA 発現量の上昇と相関が認められた（Fig.1-2 B, C）. FoxO6 による肝 VLDL-TG 産生を説明するために, 次に肝臓での VLDL-TG 産生の最終段階を制御する分子シャペロンである MTP 発現量に着目した. FoxO6-tg マウスではコントロール群と比較して, 有意に高い肝 MTP mRNA 及びタンパク発現を示した（Fig.1-2 D, E）. この際, 24 時間をピリオドとして, FoxO6-tg とコントロールマウス間で糞便中の TG 量には違いが認められないことを確認している.

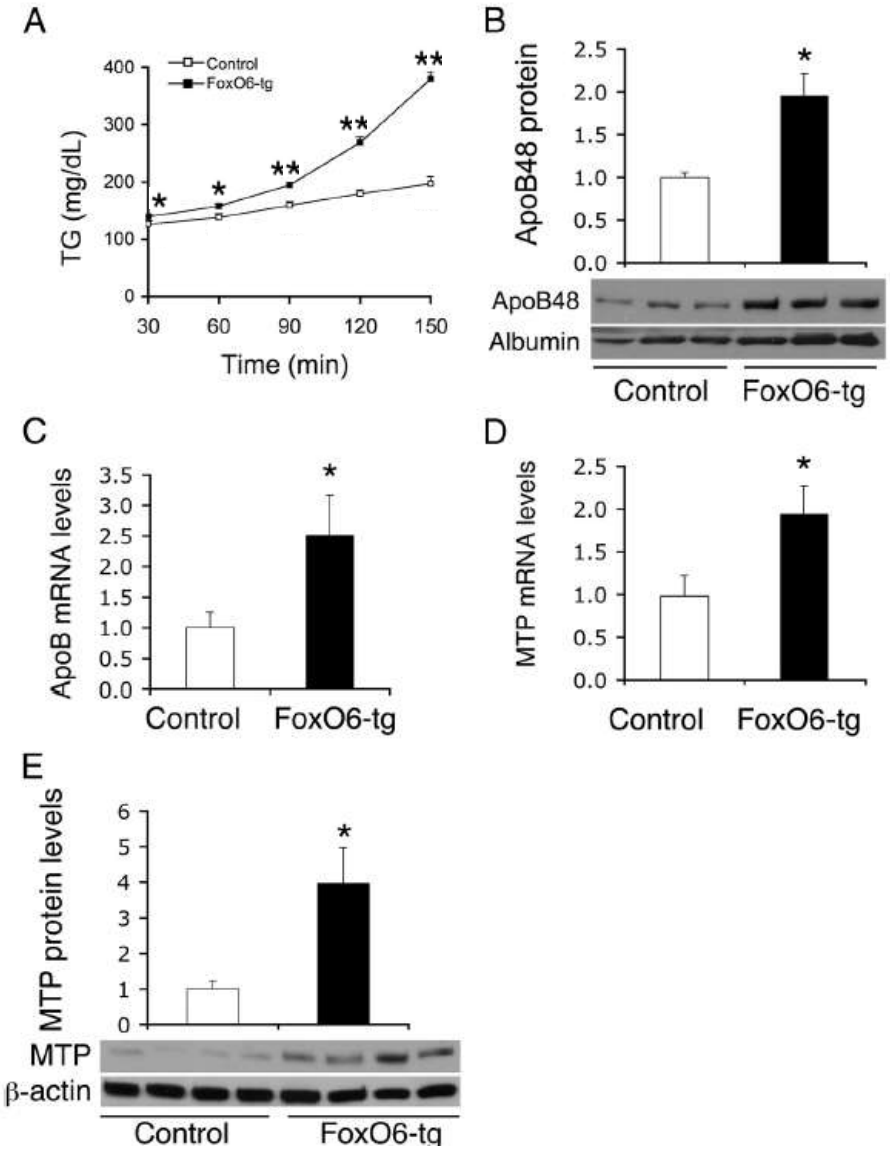


Fig.1-2 FoxO6-tg mice exhibit enhanced VLDL-TG production:

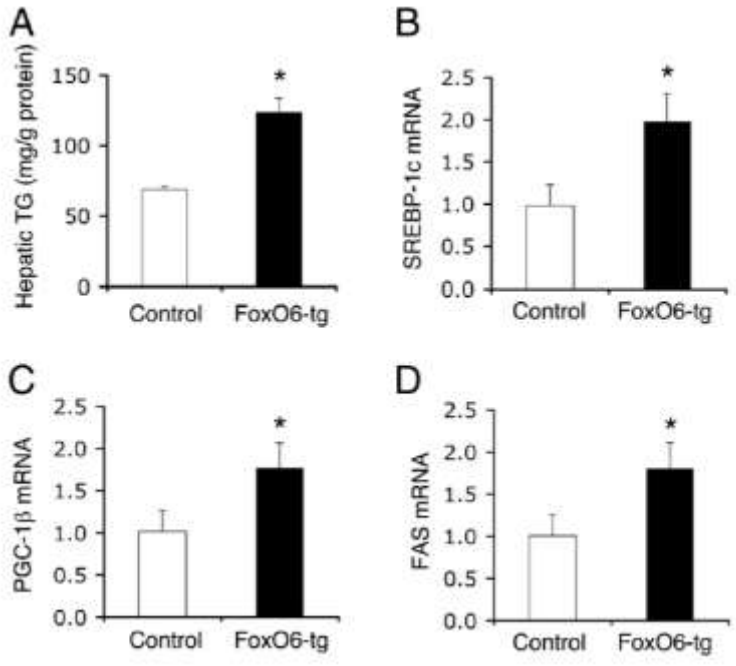
*(A) Plasma TG levels post tyloxapol administration. (B) Plasma ApoB levels relative to albumin. Aliquotsof plasma (5 µl) obtained at 2 hours post tyloxapol administration were subjected to immunoblot analysis using anti-ApoB and control anti-albumin antibodies. (C) Hepatic ApoB mRNA levels. (D) Hepatic MTP mRNA levels relative to β-actin mRNA. (E) Hepatic MTP protein levels relative to β-actin. Data in panels C-D were obtained from FoxO6-tg (male, 30-32 weeks, n=6) and age/sex- matched control littermates (n=4) under fasting conditions. *p< 0.05 and ** p<0.01 vs. control. NS means not significant.*

Endocrinology 155 (4), 2011 に掲載済み

1.3. FoxO6 が肝脂質代謝に与える影響評価

FoxO6 が肝脂質代謝に与える影響を評価するため, 肝臓の TG 量を測定した. FoxO6-tg マウスはコントロール群と比較して, 肝臓中 TG 値の増大を示した（Fig.1-3 A）. FoxO6 が肝臓での脂質成合成を促進し,VLDL-TG 分泌を促しているという予想と一致する結果である. この現象に対する理解を深めるために, 肝脂質代謝に関して, 脂質成合成や脂質酸化という, ふたつの相反する経路に関与する遺伝子の発現量を調べた. FoxO6 活性は食後インスリン分泌によって抑制されることがわかっている. そこで, 食後インスリン分泌による脂質代謝抑制の影響を除外するために, 絶食条件下での検討を行った.

FoxO6-tg は SREBP1-c とその co activator である PGC-1β 及び FAS の mRNA を有意に増大させ, 脂質合成に関与していることが分かった（Fig.1-3 B-D）. また, ACC mRNA の値には違いが認められなかった（Fig.1-3 E）. これらの結果は脂質酸化に重要な酵素である CPT1 や ACOX1 の mRNA 発現量の低下によるものである（Fig.1-3 F, G）. 肝 PPAR-α の値には違いが認められなかった（Fig.1-3 H）. しかしながら脂質合成と肝での脂質の貯蔵に関与する核内レセプターとして知られる PPAR-γ は有意に増大していた（Fig.1-3 I）. これらの結果は免疫ブロットによっても同様に確認しており, PPAR-γ のタンパク質レベルは FoxO6-tg マウスの肝臓で上昇していた（Fig.1-3 J）.



Endocrinology 155 (4), 2011 に掲載済み

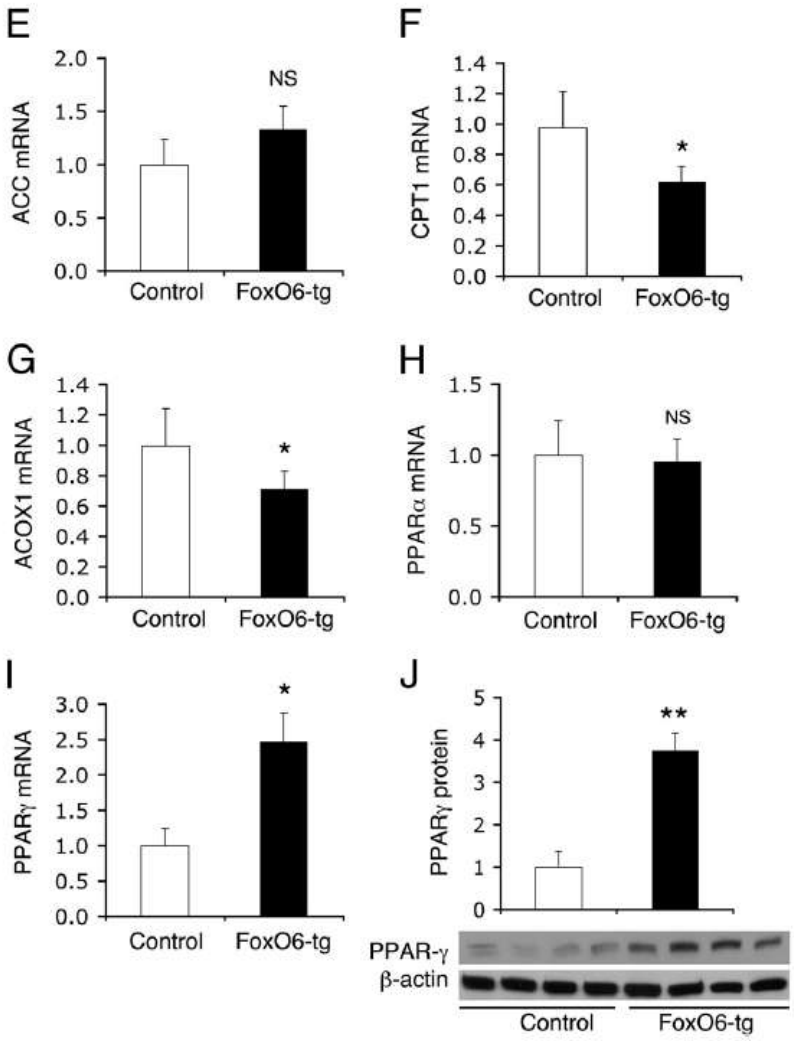


Fig.1-3 FoxO6-tg mice display increased hepatic lipogenesis: *Male FoxO6-tg (n=6, 32 weeks) and age/sex- matched control littermates (n=4) were sacrificed after 16 hour fasting. (A) Liver tissues were retrieved for the determination of hepatic TG content. (B) Aliquots of liver tissues were subjected to real time qRT-PCR analysis for determining hepatic levels of SREBP-1c mRNA. (C) PGC-1β mRNA. (D) FAS mRNA. (E) ACC mRNA. (F) CPT1 mRNA. (G) ACOX1 mRNA. (H) PPAR-α mRNA. (I) PPAR-γ mRNA. using β-actin mRNA as control. (J) Additional aliquots of liver tissues were subjected to immunoblot assay for determining hepatic PPAR-γ protein levels using β-actin protein as control. *p< 0.05 and ** p<0.01 vs. control. NS means not significant.*

Endocrinology 155 (4), 2011 に掲載済み

1.4. FoxO6 が肝 PPAR-γ 発現に与える影響評価

FoxO6 が標的遺伝子の trans-activation を誘発するのではないかと考え, FoxO6 誘導により脂質合成の促進が認められるかについて検討を行った. SREBP-1c は FoxO サブファミリーの直接的な標的ではないことが知られている [29] [30]. そこで, 本研究では FoxO6 と PGC-1β,PPAR-γ との関連について HepG2 細胞を用いて調べた. HepG2 細胞に対する FoxO6-CA 過剰発現により, PPAR-γ の mRNA とタンパク質の有意な発現上昇が認められた. またこの際, PGC-1β の mRNA 及びタンパク質発現には影響を与えなかった（Fig.1-4 A, B）.

FoxO6 が肝臓 PPAR-γ 発現を制御していることを証明するため, HepG2 細胞の PPAR-β 活性が FoxO6 産生で誘導されるかについて調べた. PPRE（PPAR-γ Responsive Element）-directed luciferase reporter system を用いて, アデノウイルスにより FoxO6-CA 遺伝子を導入した際の肝臓 PPAR-γ 活性を評価した（Fig.1-4 C）. その結果, FoxO6 発現を誘導した際の HepG2 細胞において, 何もコードしていない遺伝子投与群と比較して,3 倍の PPAR-γ 活性上昇が認められた（Fig.1-4 E）.

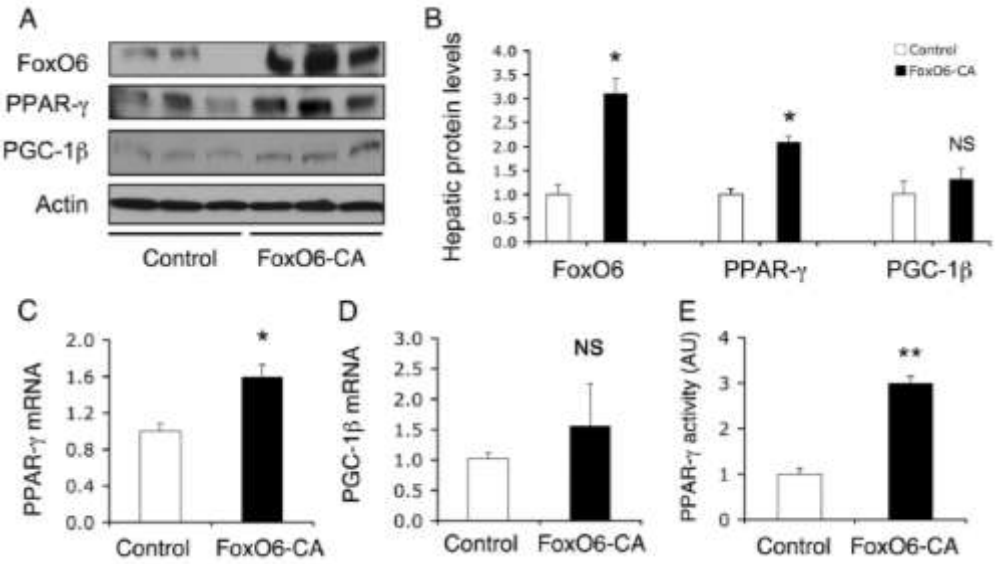


Fig.1-4 FoxO6 regulates hepatic PPAR-gexpression: *HepG2 cells were transduced with Adv-FoxO6-CA and control Adv-vectors (200 pfu/cell). After 24- hour incubation, cells were collected for immunoblot analysis. (A) (B) Hepatic protein levels of FoxO6, PPAR-γ and PGC-1β were determined using Actin protein as control. Aliquots of cells were used for preparing total RNA, which was subjected to real- time qRT-PCR analysis for determining (C) PPAR-γ mRNA and (D) PGC-1β mRNA levels, using β-actin mRNA as control. Furthermore, HepG2 cells were co-transfected with PPREx3-TK-Luc and control pGL4.75 plasmids in the presence of Adv-FoxO6- CA or Adv-Empty control vector. After 24 hour incubation, cells were subjected to dual luciferase activity assay. (E) PPAR-γ activity was defined as the ratio of Firefly vs. Renilla luciferase activity. *p< 0.05 and ** p<0.01 vs. control. NS means not significant.*

Endocrinology 155 (4), 2011 に掲載済み

1.5. 肝培養細胞を用いた FoxO6 による TG 産生促進経路の評価

FoxO6 と肝臓 TG 産生との関連を明らかとするため，次に HepG2 を用いた *in vitro* での実験を行った．アデノウイルスによる FoxO6-CA の過剰発現を誘導した結果, MTP と ApoB48 タンパク質発現量の有意な増大が認められた（Fig.1-5 A, B）．また，メディウム中の TG 量及び ApoB48 タンパク質量も増加した（Fig.1-5 D）．

HepG2 で得られた結果はヒト肝初代培養細胞でも確認できた．アデノウイルスを用いた FoxO6-CA あるいは empty ベクターの投与後に肝細胞とメディウム中に含まれる TG を調べたところ，有意に両群の TG 値を上昇させた（Fig.1-5 E, F）．

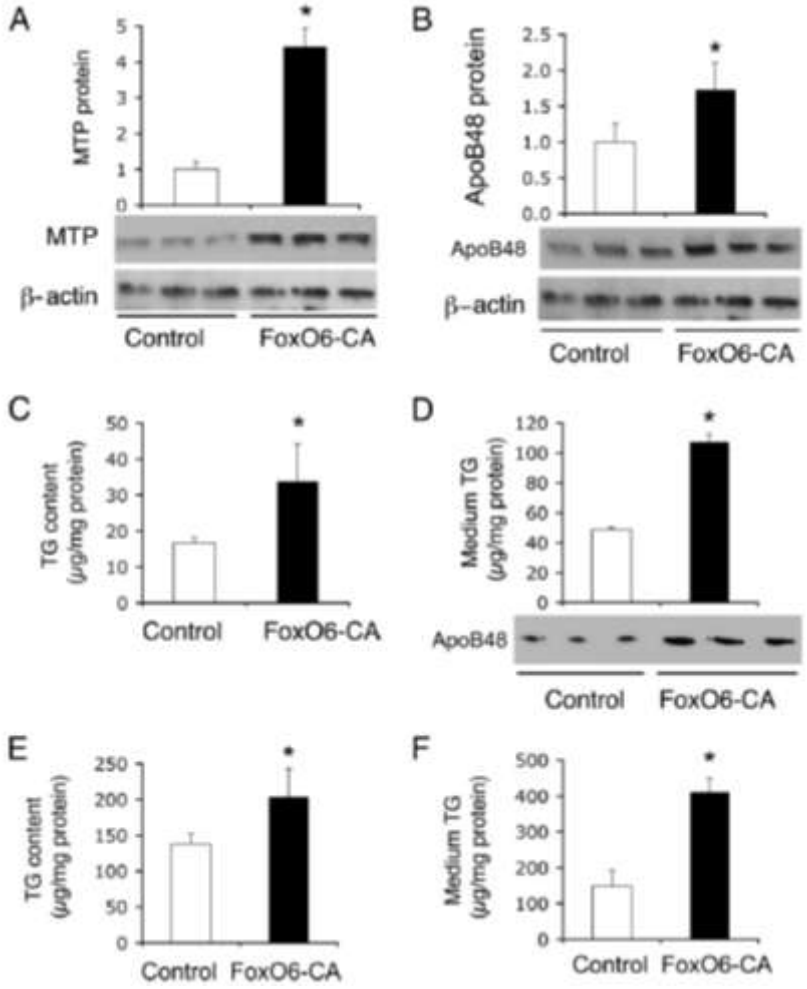


Fig.1-5 FoxO6 stimulates TG production in HepG2 and human hepatocyte: *HepG2 cells were transduced with control Adv- Empty and Adv- FoxO6-CA vectors (200 pfu/cell). After 24- hour incubation, cells were collected for determination of (A) hepatic MTP and (B) ApoB48 protein levels, and (C) intracellular TG levels. Conditioned medium was collected for determination of (D) medium TG andApoB48 levels. Likewise, human primary hepatocytes were transduced with control Adv-Empty and FOxO6-CA vectors (200 pfu/cell). After 24 hour incubation, TG levels were determined in (E) human hepatocytes and (F) conditioned medium. *p< 0.05 vs. control.*

Endocrinology 155 (4), 2011 に掲載済み

1.6. FoxO6 が MTP プロモーターのトランス活性に与える影響評価

FoxO6 が有する 2 つの直列配列は MTP を含む Insulin Response Element: IRE モチーフに結合することが知られている. 従って, FoxO6 による VLDL-TG 合成の促進に FoxO6 が MTP を標的遺伝子として転写をトランス活性していることが予想された. これを証明するため,HepG2 細胞を用いて, FoxO6 の MTP プロモーターへの結合能を MTP promoter-directed luciferase assay により評価した. アデノウイルスによる FoxO6-CA 発現はルシフェラーゼ活性を 2 倍上昇させた（Fig.1-6 B）. ルシフェラーゼ活性の上昇は, Chip assay の結果に見られるように, FoxO6 が MTP プロモーターに結合したことに由来すると考えられる. これを実証するため, FoxO6 のコンセンサス配列が結合する MTP プロモーター側の塩基配列に置換変異を入れ, FoxO6 と変異型 MTP プロモーターとの結合を評価した. IRE モチーフの塩基置換は, FoxO6 の MTP プロモーターへの結合活性を低下させた（Fig.1-6 C）. 同様に Chip assay によっても FoxO6 の MTP プロモーターへの結合能の低下を確認した.

FoxO6 と肝 MTP 発現活性がインスリンによる制御を受けるかについて, FoxO6 存在下でインスリンを加えて MTP プロモーター活性が変化するか dual luciferase assay system を用いて評価した. その結果, FoxO6 の MTP プロモーター活性はインスリンによって抑制された. 同様に, FoxO6-CA も MTP プロモーター活性を上昇させるが, F oxO6-CA はインスリン依存性のリン酸化を受けないため, インスリンによる抑制を回避する結果となった.
さらに, FoxO6 の MTP プロモーター活性の促進が, Akt-CA 存在または非存在下で変化するかについても評価した. Akt はインスリン存在下で標的タンパク質をリン酸化することが知られている. アデノウイルスを用いて Akt-CA を導入した際, インスリン存在下でも FoxO6 由来の MTP プロモーター活性はベースラインになることが証明できた（Fig.1-6 D）.

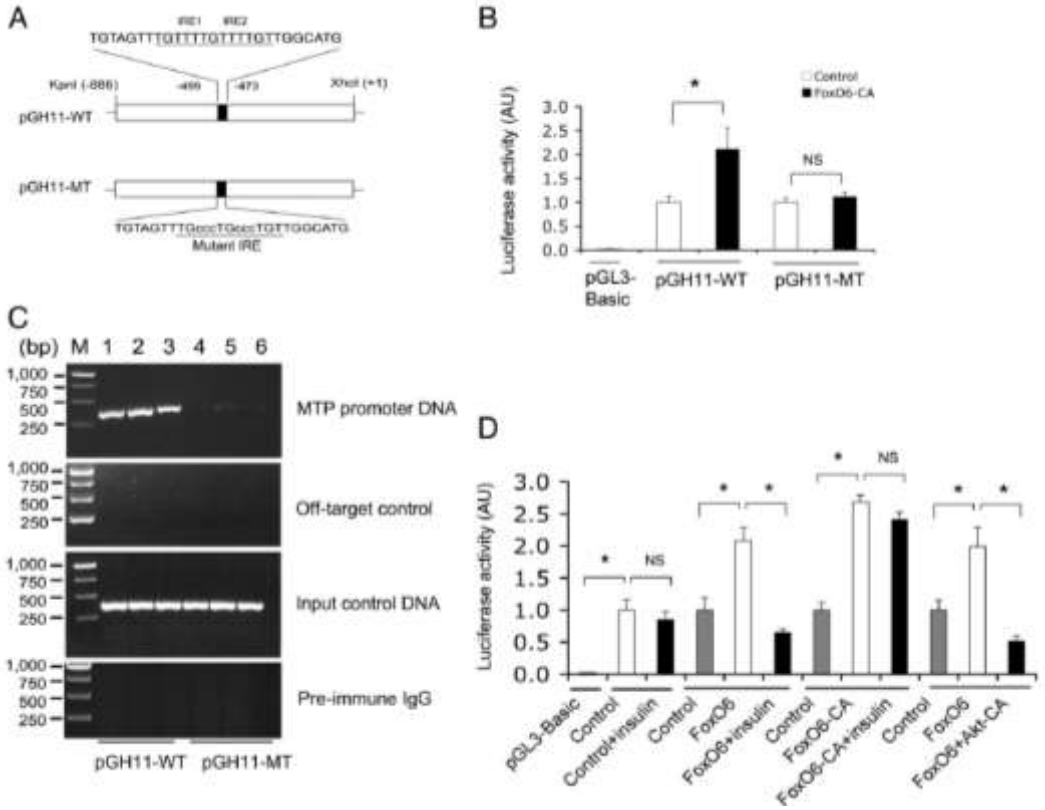


Fig.1-6 FoxO6 binds and stimulates the MTP promoter activity: *(A) Schematic depiction of wild-type (WT) and mutant versions (MT) of the mouse MTP promoter. Nucleotides of wild-type and mutant insulin-responsive element (IRE) motifs were underlined. (B) MTP promoter activity. HepG2 cells were transfected with pGH11-WT or pGH11-MT, followed by transduction with Adv-FoxO6-CA or Adv-Empty control vectors. Plasmid pGL3-basic encoding promoter-less luciferase was used as control for determining baseline luciferase activity. Plasmid pGL4.75 expressing Renilla luciferase was included for normalizing transfection efficiency. After 24-h incubation, cells were subjected to dual luciferase activity assay for determining the MTP promoter activity. (C) ChIP analysis of FoxO6 binding to MTP promoter. HepG2 cells pre-transduced with Adv-FoxO6-CA vector were transfected with pGH11-WT (lanes 1-3) or pGH11-MT (lanes 4-6). After 24-h incubation, cells were subjected to ChIP assay using rabbit anti-FoxO6 antibody or preimmune IgG. Immunoprecipitates were analyzed by PCR assay using primers flanking the IRE DNA motif (-767/-369 nt) in the MTP promoter. This assay produced a 400-bp DNA from immunoprecipitates by anti-FoxO6, but not by preimmune IgG. As input control, aliquots of cell lysates prior to immunoprecipitation were subjected to PCR analysis. As off-target control, primers flanking a distal MTP promoter region (-3,528/-3,045 nt) devoid of IRE motifs were included in PCR analysis. (D) MTP promoter activity in response to insulin or Akt. HepG2 cells were transfected with pGH11-WT, followed by transduction with Adv-FoxO6 or Adv-FoxO6-CA vector using Adv-Empty vector as control in the absence or presence of insulin (100 nM) or presence of Adv-Akt-CA vector (100 pfu/cell) in culture medium. After 24-h incubation, MTP promoter activity in cells was determined using the dual luciferase reporter assay. Data were from 3-5 independent experiments. *P<0.05 vs. control. NS, not significant.*

Endocrinology 155 (4), 2011 に掲載済み

1.7. *db/db* マウスの肝臓 FoxO6 発現抑制による高トリグリセリド血症改善効果の検証

FoxO6 発現抑制による肝脂質代謝に関して，より詳細な検討を行うため, FoxO6 発現が増大する肥満糖尿病モデルである *db/db* マウスに対して RNAi を介した遺伝子発現抑制を誘導した．本ベクター投与により，インスリン抵抗性の肝臓で FoxO6 発現が抑制できることはすでに報告している[6]. FoxO6 の肝臓選択的な発現抑制が肝臓での脂質代謝と高 TG 血症を改善し, *db/db* マウスでみられる脂質異常症を是正すると考えた．

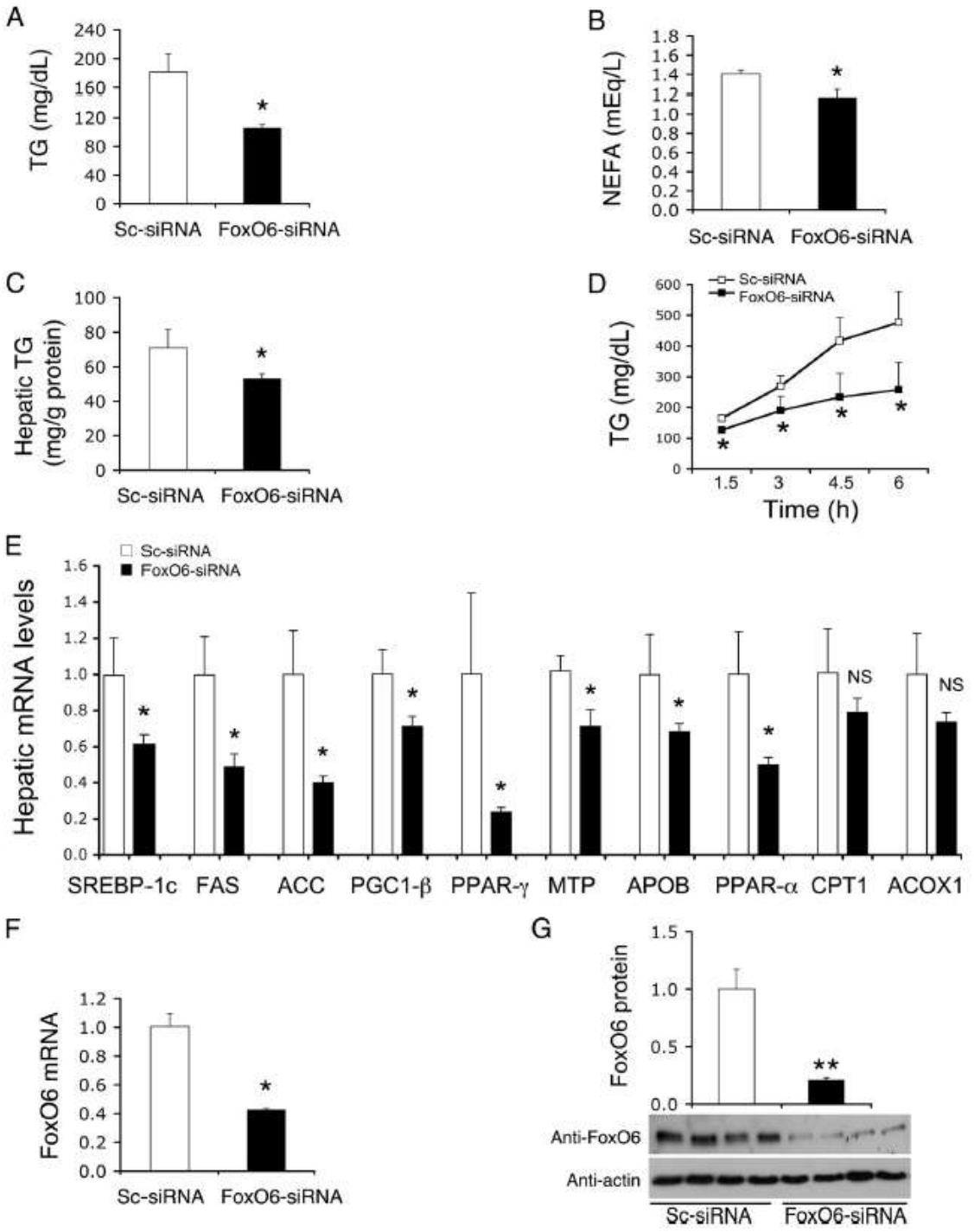
糖尿病モデルである *db/db* にアデノウイルスを用いて FoxO6-shRNA ベクター及びコントロールとして Scramble（Sc）-shRNA ベクターを静脈内投与し，脂質代謝を調べた．FoxO6-shRNA ベクターの投与は肝臓で他の FoxO ファミリーメンバーの発現に影響を与えないことは報告済みである[6]．本ベクターの投与により，血中 TG と遊離脂肪酸値の有意な減少が認められた（Fig.1-7 A, B）．さらに, FoxO6 発現の抑制は *db/db* マウスの肝臓 VLDL-TG 合成を有意に抑制した（Fig.1-7 C, D）．

次に, FoxO6 の発現抑制が脂質合成と脂質過酸化のどちらに影響しているのかを調べた．脂質合成関連遺伝子として SREBP1c, FAS, ACC, PGC-1ß, PPAR-γ を選択した．全ての遺伝子において有意な発現抑制が認められた．また，肝 MTP と ApoB の mRNA 発現量に関しても抑制が認められた（Fig.1-7 E）．これら遺伝子発現抑制は血中 VLDL-TG 産生抑制に寄与していると考えられる．肝臓の FoxO6 発現に関して評価した結果, mRNA 及びタンパク質の両方で shRNA ベクター投与による有意な減少が認められた（Fig.1-7 F, G）．

さらに, *db/db* マウスの FoxO6-shRNA ベクター投与により, PPAR-α の mRNA 発現量の有意な減少が認められた一方で, CPT1 と ACOX1 の発現量には変化が認められなかった．また, sc-shRNA と FoxO6-shRNA 投与群での体重変化に違いは認められなかった（38.7 ± 0.33 g v.s. 39.5 ± 0.43 g, N.S.）．これらの結果より，肝 VLDL 合成の抑制が血中 TG 代謝と *db/db* マウスの脂質代謝の改善に寄与していると考えられる．

Fig.1- 7 Effect of hepatic FoxO6 knockdown on TG metabolism in db/db mice:

*(A) Plasma TG levels. (B) Plasma NEFA levels. (C) Hepatic TG content. (D) Hepatic VLDL-TG production. Plasma TG levels were determined at different times post tyloxapol administration. (E) Hepatic mRNA levels of key enzymes in lipogenesis, VLDL-TG production and fatty acid oxidation. (F) FoxO6 mRNA levels. (G) FoxO6 protein levels. Diabetic db/db mice (male, 12 weeks old) were randomly assigned to two groups (n=7), which were treated with $1.5x10^{11}$ pfu/kg of FoxO6-shRNA or Sc-shRNA control vector. Plasma TG and NEFA levels were determined at day 10 after vector administration. VLDL production was determined at day 11 post vector administration. Mice were sacrificed after 16-h fasting at day 12 and liver tissues were collected for the determination of hepatic TG content and hepatic mRNA levels by real-time qRT-PCR assay using β-actin mRNA as control. Hepatic FoxO6 protein levels were determined by anti-FoxO6 immunoblot assay using anti-actin antibody as control. *P<0.05 and *P<0.01 vs. control. NS, not significant.*



Endocrinology 155 (4), 2011 に掲載済み

考察

本研究では, *in vivo* 及び *in vitro* において FoxO6 による肝臓 MTP 発現と VLDL-TG 合成の制御に関する役割を明らかとした. MTP は小胞体常在性タンパク質であり, VLDL-TG 構築の律速段階に関与し, 中性脂質を新生 ApoB ポリペプチド鎖へと運搬する働きを有する[12,27,31]. 今回 FoxO6 が MTP プロモーターを標的として結合することで, 転写をトランス活性し, 肝臓での MTP 合成を促進させることを示した. この活性化により FoxO6-tg マウスでは VLDL-TG 合成が促進され, 血清 TG が上昇する. これらの経路は HepG2 細胞においても認められ, FoxO6 は肝細胞での MTP 合成を活性化させ, VLDL-TG と ApoB 分泌を有意に促進した. さらに, FoxO6 による肝臓 MTP 発現の促進はインスリン（厳密には Akt-CA）により抑制された. このことにより, インスリンを介した FoxO6 のリン酸化により, FoxO6 の標的プロモーターDNA への結合抑制が示唆された[6]. 一方で, FoxO6-CA による MTP 発現の促進はインスリン刺激による抑制を回避した. つまり, FoxO6-CA はインスリンによる FoxO6 リン酸化を回避したため, MTP 発現抑制を示さなかったと考察される[6]. また, 糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスへの shRNA 導入による FoxO6 のノックダウンは, インスリン抵抗性の肝臓での MTP 発現を低下させ, 肝臓由来の VLDL-TG を有意に低下させた. これらの結果を総合させると, FoxO6 によるインスリンシグナルを介した肝臓 MTP 発現制御が肝臓での VLDL-TG 合成を調節していることを明らかとした.

FoxO6-tg マウスにおいて, FoxO6 の過剰産生は脂質合成を促進し, 肝臓での脂質蓄積を増大させた. また FoxO6 は肝臓での PPAR-γ 発現を亢進させた. PPAR-γ は核受容体であり, レチノイド X 受容体と複合体を形成し, 肝臓での脂質合成を促進する[32-35]. 肝臓特異的な PPAR-γ の欠損は脂質合成を抑制し, 肝臓の脂質蓄積を減少させる[32,34]. その結果, 脂肪肝を抑制する. PPAR-γ は脂肪過多, あるいは食事由来の肥満マウス肝臓, また臨床で脂肪肝を有する肥満患者において有意に発現増大している[36,37]. これらのデータは PPAR-γ がインスリン抵抗性に応答した肝臓での脂質合成や蓄積に重要であることを示している[37]. しかしながら, 肝臓での PPAR-γ 活性の上昇とインスリン抵抗性との関連はよく理解できていない. 本研究では FoxO6 がインスリン抵抗性と PPAR-γ 活性の上昇に関与する重要な因子であることを明らかとした. インスリンによる抑制が欠損すると FoxO6 活性の抑制が外れ, 結果的にインスリン抵抗性状態が誘導される[6]. 肥満や 2 型糖尿病時の PPAR-γ 発現促進は脂質合成を亢進し, 肝臓での異常な脂肪の蓄積を誘導すると考えられる. インスリン抵抗性マウスである糖尿病 *db/db* マウスの肝臓 FoxO6 のノックダウンが PPAR-γ 発現を有意に減少させ, 肝臓での脂質合成と脂肪量の減少に寄与したことが, これを裏付ける結果であると言える.

インスリン抵抗性は高 TG 血症と密接に関与しているが, インスリン抵抗性と高トリグリセリド血症を結び付ける因子は病理学的機序としてまだ解明されていない[12]. 本研究では FoxO6 が肝臓での MTP や ApoB 発現を誘導し, VLDL-TG 分泌を増大させることを述べた. この現象は FoxO6-tg マウス及び HepG2 培養細胞やヒト肝初代培養細胞でも確認しており,

FoxO6 由来の VLDL-TG 分泌は，過剰な脂肪蓄積に対して代償的に働いている可能性を示唆している．同様の観点から，Kamagate らは FoxO1 によるインスリン依存的な MTP 抑制が肝 VLDL-TG 分泌を制御していることを報告している[24]．FoxO1 と同じく FoxO6 も，絶食時もしくは摂食時のインスリン刺激により活性が抑制される[6,27]．FoxO6 発現は肥満や 2 型糖尿病マウスのインスリン抵抗性時に活性が上昇し，調節が解除される[6,27]．一方で，FoxO1 ではインスリン刺激依存的に核外移行が生じるのに対し，FoxO6 ではこれが見られず，FoxO6 のインスリン刺激による標的遺伝子発現調節は異なる機構で生じていると考えられる．インスリン刺激は FoxO6 のリン酸化を誘起し，肝細胞での細胞内動態を変化させることなくその転写活性を抑制する[6]．このことから，インスリン刺激は Akt/PKB の下流で二股に分かれ，FoxO1 と FoxO6 に対して絶食状態から摂食状態へと代謝変動に応答する際に,VLDL-TG 合成を調節しているものと推察される．

ここで FoxO6-tg マウスでは血清 NEFA が有意に上昇している点について考察する．これは FoxO6-tg マウスの VLDL-TG 合成過剰に由来して NEFA が肝臓へ流入していることを意味する．またこの起源は FoxO6 による脂肪酸化抑制によるものと推察される．FoxO6-tg マウスの肝臓で，脂質酸化経路の鍵となる CPT1 と ACOX1 の二つの酵素の発現が有意に減少していた．しかしながら，HepG2 細胞でのアデノウイルスによる FoxO6 の活性化は，脂肪酸の酸化に有意な変化をもたらさなかった．つまり FoxO6 は肝臓での脂肪酸の酸化に直接的に関与していないと考察される．他の可能性として，NEFA の上昇は,脂質合成促進による脂肪組織の TG 貯蔵増大がインスリン反応を変化させた結果が考えられる．FoxO6-tg マウスは糖代謝異常をもたらし，高インスリン血症及びインスリン抵抗性を誘起した[6]．一方で糖尿病 *db/db* モデルマウスへの shRNA 誘導による FoxO6 の欠損はインスリン抵抗性の肝臓でのインスリン感受性を改善し，血中インスリン濃度の減少，糖代謝及びインスリン代謝の改善をもたらした．VLDL-TG 合成過剰はインスリン抵抗性の肝臓で脂肪肝を誘起するが，*db/db* マウスに対する FoxO6-shRNA 誘導はこれを抑制した結果として血清 NEFA 濃度を減少させたと考えられる．従って，肝臓での VLDL-TG 合成を介して，FoxO6 は NEFA 代謝に対しても影響を及ぼしたと推察される．FoxO6 と脂肪酸酸化に関しては，病理学及び生理学的観点からのより詳しい研究が必要である．

小腸での TG-rich な粒子形成は肥満や 2 型糖尿病に重要な因子であることが知られている[38,39]．FoxO6 もまた，小腸での発現が認められている[6]．したがって，FoxO6-tg マウスは FoxO6-CA を肝臓特異的に発現しているが，FoxO6-tg マウスの高トリグリセリド血症獲得に際して，小腸由来の TG-rich なリポタンパク質合成経路に関して完全に否定することはできない．FoxO6 トランスジェニックマウスに関して，今後，FoxO6 の小腸におけるリポタンパク質合成経路への寄与を調べる必要がある．

以上のことより，本研究では FoxO6 がインスリン刺激を受けて肝臓 MTP 発現を介した VLDL-TG 合成を制御する重要な転写調節因子であることを明らかとした．インスリン抵抗性時の肝臓における，FoxO6 活性抑制の異常は，肝臓での MTP や ApoB の過剰産生を引

き起こし, 異常な VLDL-TG 合成を誘導する. その結果, 2 型糖尿病での高トリグリセリド血症が誘起される. 肝臓での FoxO6 のノックダウンは MTP や ApoB 発現を抑制し, インスリン抵抗性の肝臓での VLDL-TG 合成を是正する. このことにより糖尿病モデルである *db/db* マウスの高トリグリセリド血症が抑制された. 従って選択的 FoxO6 活性の抑制は, インスリン抵抗性の肝臓において脂質代謝を改善するうえで重要であり, 2 型糖尿病時の肝臓での脂質代謝と VLDL-TG の過剰産生の二つを同時に抑制できる可能性を秘めている.

第二章
FoxO6 欠損マウスを用いた
２型糖尿病抑制効果の検証

第二章
FoxO6 欠損マウスを用いた 2 型糖尿病抑制効果の検証

緒言

糖新生はラクトース，グリセロールやアミノ酸といった非単糖をグルコースに変換する重要な代謝機構である [40,41]．糖新生は主に肝臓で生じる経路であり，健康な個体の長期絶食時には 80 %のグルコースが肝臓で産生される．糖新生は食事由来のホルモン分泌により厳密に制御されている [42]．食後のインスリン分泌により，糖新生活性が低下し，糖産生が制限される [41,43-46]．その結果，食後のグルコース産生量とグリコーゲン保持量の持続化は抑制される [47-49]．一方，絶食時には糖新生活性が上昇するよう刺激が入る [50-53]．インスリンとグルカゴンと言ったふたつの相反するホルモンが互いに作用しあい，摂食と絶食時の肝臓代謝反応が急速にシフトして生理学的範囲内で血糖値を維持している [41]．肝臓でのインスリンシグナルに対する刺激が減弱すると，肝臓での糖新生が不変化する．その結果，糖の異常産生が生じ,糖尿病時に見られる絶食時の高血糖を引き起こす．しかしながら，インスリン反応と糖新生に関する分子機構は完全に明らかとなっていない．

Akt/PKB の基質である FoxO1 はインスリン依存性の肝糖代謝を制御している [19,54]．インスリン非存在下では肝臓での PEPCK（posphoenolpyruvate carboxykinase）や G6Pase（glucose-6- phosphatase）といった糖新生初期と後期の重要酵素の発現が活性化され，その結果肝臓での糖新生が更新する [30,55]. PGC-1α は FoxO1 の co-activator であり，肝臓での糖新生活性を増強させる [47]．上記機構は，FoxO1 が PEPCK や G6Pase の Insulin Responsive Elemrnt （IRE）として知られる DNA モチーフ（TG/ATTTT/G）に結合することからも明らかである [56-58]．インスリン刺激に応答して FoxO1 は Akt/PKB タンパク質複合体によりリン酸化され，核から細胞質へと移行する．その結果，糖新生関連遺伝子発現活性を抑制する [27,54,59]．これらのデータは FoxO1 によるインスリン刺激を介した肝糖新生制御機構の重要性を示唆している．しかし, FoxO1 の肝臓での欠損はホルモン刺激による肝糖新生制御を完全に消失させないとの報告がある [24]．また, FoxO1 の肝臓での欠損は糖新生活性の一部を抑制するが，インスリンやグルカゴン刺激を抑止しない [27]．以上のことより，インスリン刺激による肝臓の糖新生制御には FoxO1 以外の因子が関与していると言える [27,60,61]．

Kim らは近年 FoxO6 が肝糖新生制御に重要な因子であることを述べている [6]．FoxO6 はげっ歯類やヒト肝臓で合成され,培養肝細胞や肝臓での糖産生活性を有している．この糖産生は cAMP を介してグルカゴンにより増強され，インスリンにより抑制される．FoxO6 のインスリンを介した肝糖新生の抑制機構は他の因子とは異なっている [19,27,62,63]. FoxO1 はインスリン刺激により核から細胞質への移行が生じるのに対し，FoxO6 の場合インスリンに応答した核外移行を生じない [6]．しかしながら，インスリンは FoxO6 のリン酸化を誘起し，細胞内動態を変えることなく核での DNA 結合能を変化させる．肝での糖新生調節機能と同

様に，FoxO6 の活性は通常肝臓で一定レベルに保たれているが，絶食時に急激に増大する．さらに，インスリン抵抗性時の肝臓では異常上昇し，食事由来の肥満マウスや糖尿病モデル *db/db*マウスでの空腹時高血糖を引き起こす. FoxO6 トランスジェニックマウスは糖尿病予備軍状態となり，空腹時高血糖や糖代謝異常，高インスリン血症を獲得する [6]．しかし，FoxO6 がインスリンにより肝糖新生を制御しているという具体的な役割についてはまだ明らかとなっていない．同様に, FoxO6 がインスリンシグナルを介して肥満や糖尿病時の肝臓糖新生を改善し得るかについても報告はない．

FoxO6 が有する，肝糖新生と肥満糖尿病時の空腹時高血糖への生理学的役割について理解するため, FoxO6 遺伝子を取り除いた. FoxO1 ノックアウトマウスが異常な胚分裂を示すのに対して, FoxO6 ノックアウトマウスは正常に成長し，コントロールマウスと同様の体重増加を示した [64]．したがって, FoxO6 ノックアウトマウスは肝臓での FoxO6 欠損時のインスリンに応答した糖新生経路を評価するのにふさわしいモデルであると言える．

そこで FoxO6 の欠損が肝糖新生を是正し，高脂肪食摂取時のインスリン抵抗性と糖代謝異常を抑制することを検証した．

結果

2.1. FoxO6 欠損による糖代謝への影響評価

FoxO6 欠損による糖代謝への影響を調べるため, FoxO6 $^{+/-}$ heterozygous マウスを交配し, homozygous knock out マウス （FoxO6-KO）を得た （Fig.2-1 A, B）. FoxO のサブファミリーとして知られる FoxO1 の全身 KO マウスは, 胚分裂に異常をきたし生後間もなく死亡することが知られている. FoxO6-KO マウスは全身 KO マウスであるが, 生存可能であった. 通常食摂取の際には, FoxO6-KO マウス （n=14）はコントロールである WT マウス（n=7）と同様の体重増加を示した（Fig.2-1 C）. 一方で, 有意な絶食時低血糖を示した（Fig.2-1 D）. また食後血糖値に関しては, WT マウスに比較して減少傾向を示した（113 ± 166 vs. 130 ± 20 mg/dL, p=0.05）. 糖負荷試験の結果, FoxO6-KO マウスは血糖値を有意に改善し（Fig.2-1 E）, Area under the curve（AUC）を有意に減少させた（Fig.2-1 F）.

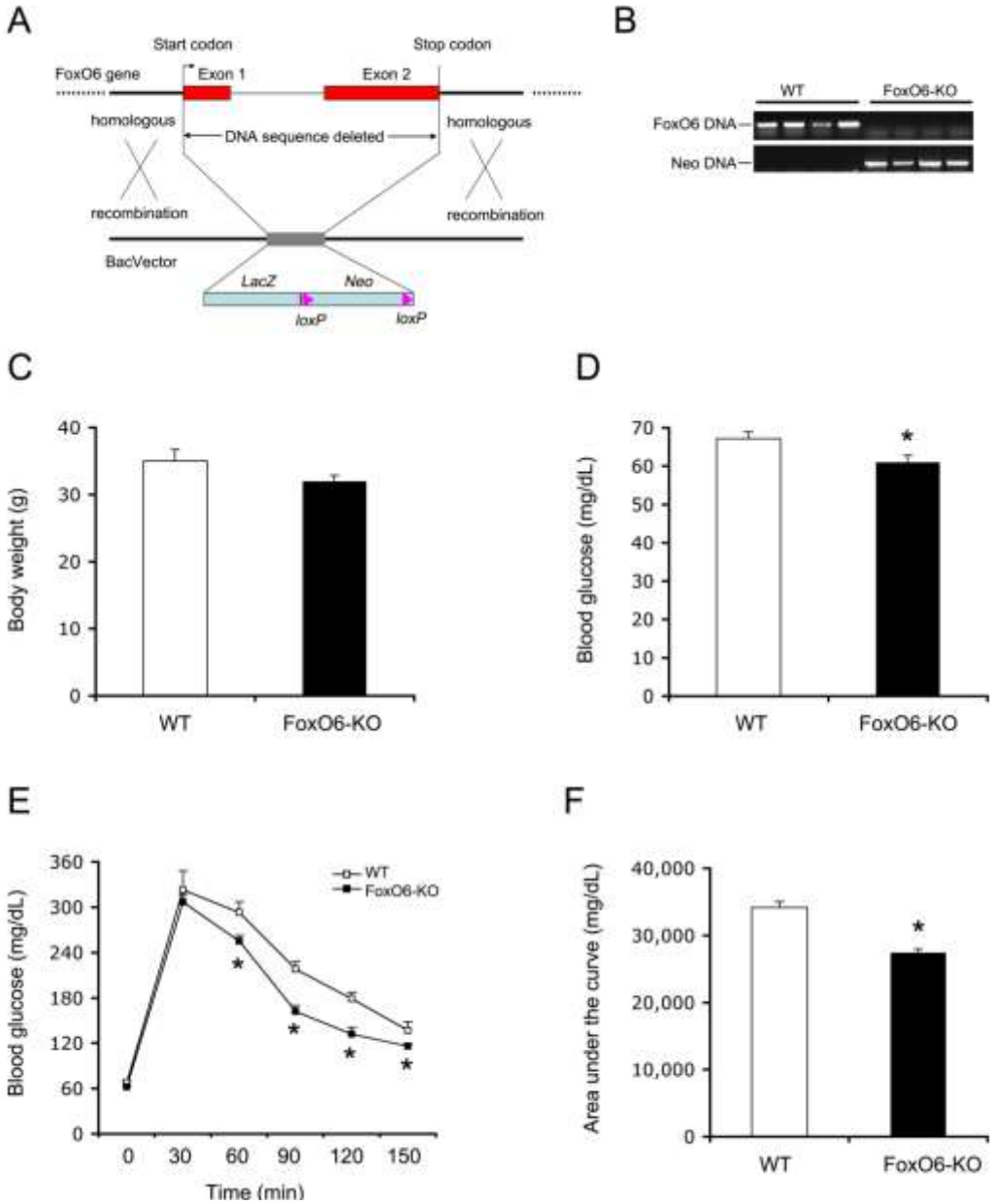


Fig. 2-1. Effect of FoxO6 deletion on glucose metabolism:

*(**A**) Schematic depiction of FoxO6 gene deletion. Shown is the FoxO6 locus on the chromosome 4. Neo stands for the neomycin-resistant gene. LacZ encodes bacterial β-galactosidase. (**B**) Genotyping of WT and FoxO6-KO mice. Genomic DNA isolated from mouse tail was subjected to PCR analysis, using primers specific for FoxO6 or Neo gene. PCR products were resolved by agarose gel electrophoresis. (**C**) Body weight. (**D**) Blood glucose. Blood glucose levels were determined after overnight fasting. (**E**) Glucose tolerance test. (**F**) Area under curve. Area under the curve (AUC) was calculated from blood glucose profiles during glucose tolerance test. Data in panels C-F were obtained frommale FoxO6-KO mice (n=14) and age/sex-matched wild-type (WT) littermates (n=7) on regular chow at 4 months of age. *P<0.05 vs. WT control.*

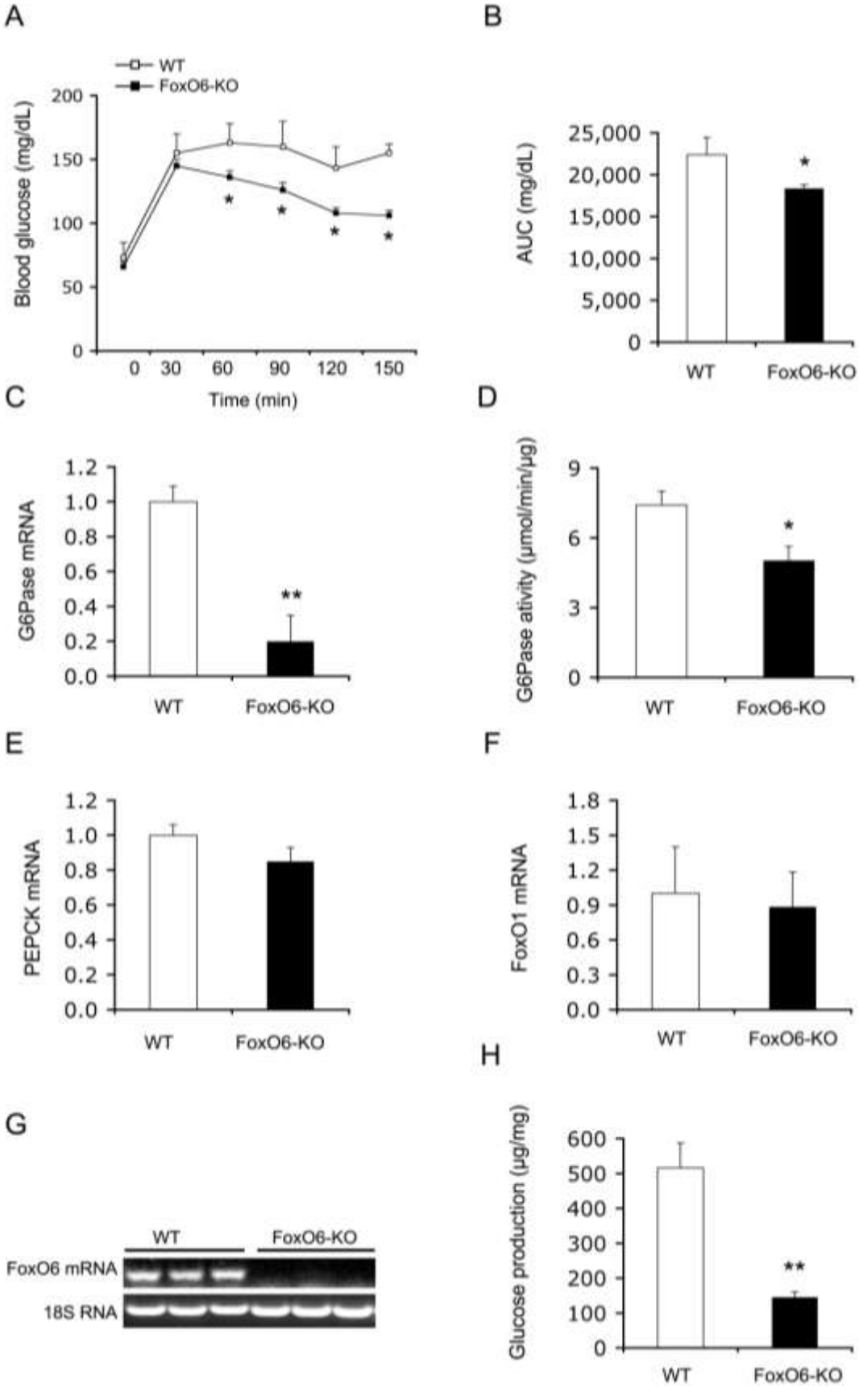
2.2. FoxO6 欠損が肝糖新生に与える影響評価

FoxO6 欠損が長時間絶食時後の糖負荷試験で血糖値を改善した理由を明らかとするため, ピルビン酸負荷試験を行った. 本試験はグルコースの基質であるピルビン酸を投与後, 経時的に血糖値を測定するものである. 肝臓でピルビン酸からグルコースへの変換が生じた際には血糖値の上昇としてその結果が反映されるため, 直接的に肝臓の糖新生経路の活性化を評価することができる. 本試験の結果, FoxO6-KO マウスは有意な血糖値（Fig.2-2 A）及び AUC （Fig.2-2 B）の低下を示した. これは FoxO6 の欠損が肝での糖新生活性を低下させたためであると考えられる. そこで肝糖新生の必須酵素として知られる PEPCK 及び G6Pase の mRNA 発現量を評価した. 肝臓での G6Pase の mRNA 発現量の有意な減少（Fig.2-2 C）とそれに基づく G6Pase 活性の低下（Fig.2-2 D）を確認した. 一方, 肝臓における PEPCK の mRNA 発現量は FoxO6-KO と WT 間で変化が認められなかった（Fig.2-2 E）. また FoxO1 の発現量にも影響を与えなかった（Fig.2-2 F）. 従って FoxO6 の欠損による糖新生の改善は,FoxO1 活性変化によって生じる二次的変化ではないことが言える. また, FoxO6 の欠損は肝 FoxO6 mRNA 発現量の低下からも確認しており, FoxO6-KO マウスでは検出されなかった（Fig.2-2 G）.

FoxO6 の欠損が肝臓での糖新生を改善したことを *in vitro* でも証明するため, FoxO6-KO 及び WT マウスの肝臓を摘出し, 肝初代培養細胞を作製し, 糖産生評価試験を行った. 具体的には, マウスでの空腹時を模倣するため, 細胞培養液中に cAMP 存在下でデキサメサゾンを添加し, 非添加時と比較して糖産生量に変化があるかを評価した. FoxO6-KO 肝初代培養細胞は cAMP とデキサメサゾンに応答した糖産生能の低下を認めた（Fig.2-2 H）.

Fig. 2-2 Effect of FoxO6 deletion on hepatic gluconeogenesis (Right):

*(**A**) Pyruvate tolerance test. (**B**) AUC. The AUC was calculated from blood glucose profiles during pyruvate tolerance test. (**C**) G6Pase mRNA levels. (**D**) Hepatic G6Pase activity. (**E**) PEPCK mRNA levels. (**F**) FoxO1 mRNA levels. (**G**) Hepatic FoxO6 mRNA. Mice were sacrificed after overnight fasting. Liver tissues were subjected to real-time qRT-PCR analysis for determining hepatic mRNA expression. Aliquots of liver tissues were subjected to G6Pase activity assay for determining hepatic G6Pase activity in FoxO6-KO and WT mice. (**H**) Glucose production in mouse primary hepatocytes. Mouse primary hepatocytes of FoxO6-KO and WT mice were cultured in the absence or presence of 8-cpt-cAMP (cAMP analog, 500 μM) and dexamethasone (100 μM). Each condition was run in six replicates. After 24-h incubation, the amount of glucose released from hepatocytes into culture medium was determined. Data in panels A-G were obtained from male FoxO6-KO mice (n=14) and age/sex-matched WT littermates (n=7) on regular chow at 4 months of age. *P <0.05 and **P<0.01 vs. WT control.*


A
WT
FoxO6-KO
Blood glucose (mg/dL)
200
150
100
50
0
0 30 60 90 120 150
Time (min)
B
AUC (mg/dL)
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
WT
FoxO6-KO
C
G6Pase mRNA
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
WT
FoxO6-KO
D
G6Pase ativity (μmol/min/μg)
9
6
3
0
WT
FoxO6-KO
E
PEPCK mRNA
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
WT
FoxO6-KO
F
FoxO1 mRNA
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
WT
FoxO6-KO
G
WT
FoxO6-KO
FoxO6 mRNA
18S RNA
H
Glucose production (μg/mg)
600
500
400
300
200
100
0
WT
FoxO6-KO

2.3. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損が糖代謝に与える影響評価

FoxO6 欠損による肝糖新生活性の低下は血糖値の改善をもたらした. FoxO6 の異常な高発現の持続が認められる, 食事由来の肥満糖尿病モデルの *db/db* マウスでは, 絶食時の高血糖とそれに基づく糖尿病の発症が認められている [6]. そこで次に, FoxO6 の欠損は高脂肪食投与によるインスリン抵抗性と糖代謝不全を抑制できるかという点について検討した. 4 週齢の FoxO6-KO マウス（n=9）と WT マウス（n=9）に 16 週間高脂肪食を与え, 食事由来の肥満を誘導した. 両群共に高脂肪食の摂取により肥満化した. FoxO6-KO 群では, WT 群と比較して体重増加の抑制を示した（Fig.2-3 A）. また, 体重補正後の体脂肪量（Fig.2-3 B）及び除脂肪組織量（Fig.2-3 C）は, 両群間での差は認められなかった. また, FoxO6-KO 群では, 体重増加の抑制と一貫して食事摂取量の低下が認められた（Fig.2-3 D）.

16 週間の高脂肪食の摂取により, コントロールである WT マウス群で絶食時の高血糖と糖代謝の異常を認めた（Fig.2-3 E）. 一方でこれらの代謝異常は FoxO6-KO で改善され, 空腹時及び摂食時における有意な血糖値の低下（Fig.2-3 E）と耐糖能の改善（Fig.2-3 F）が認められた.

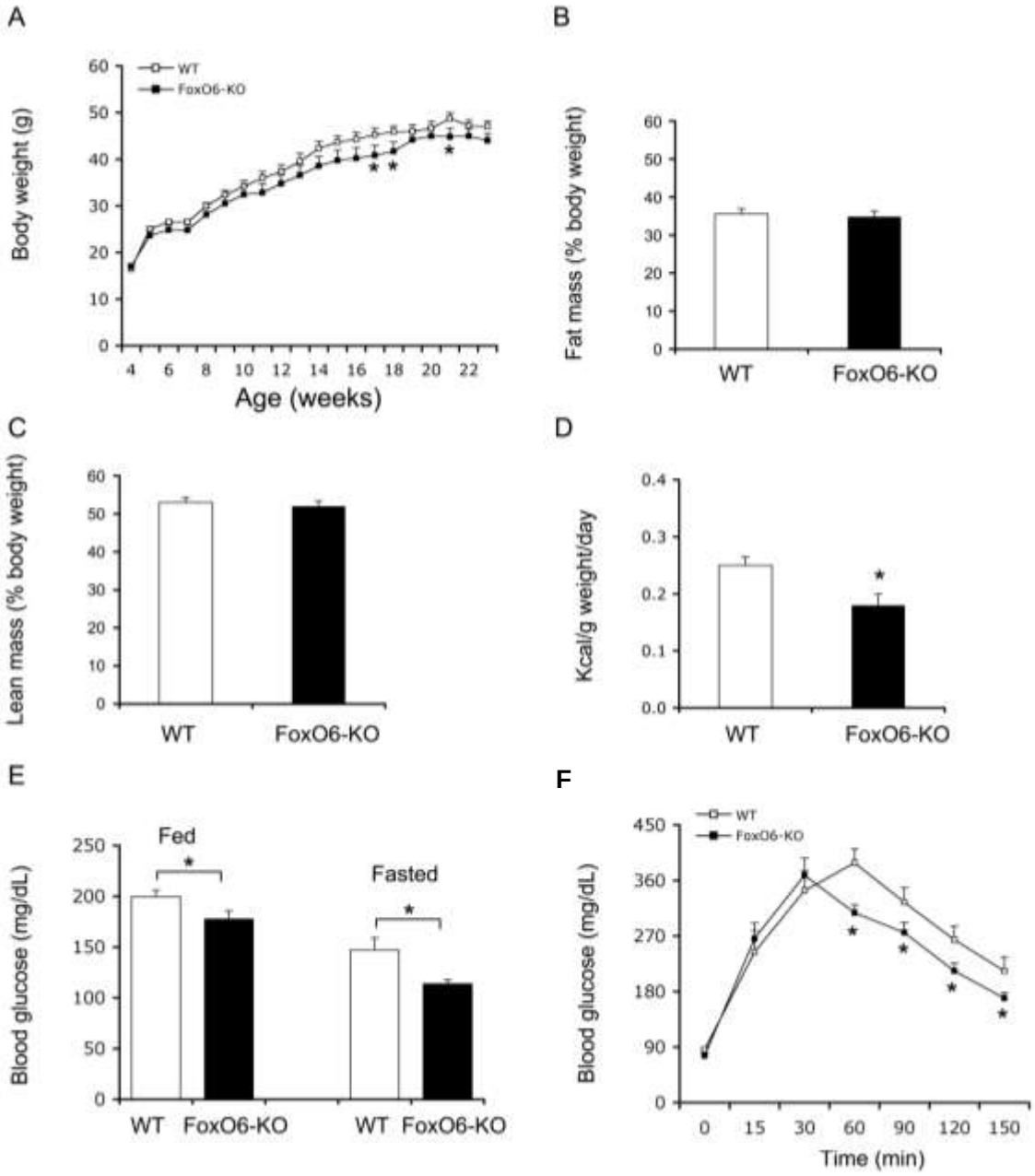
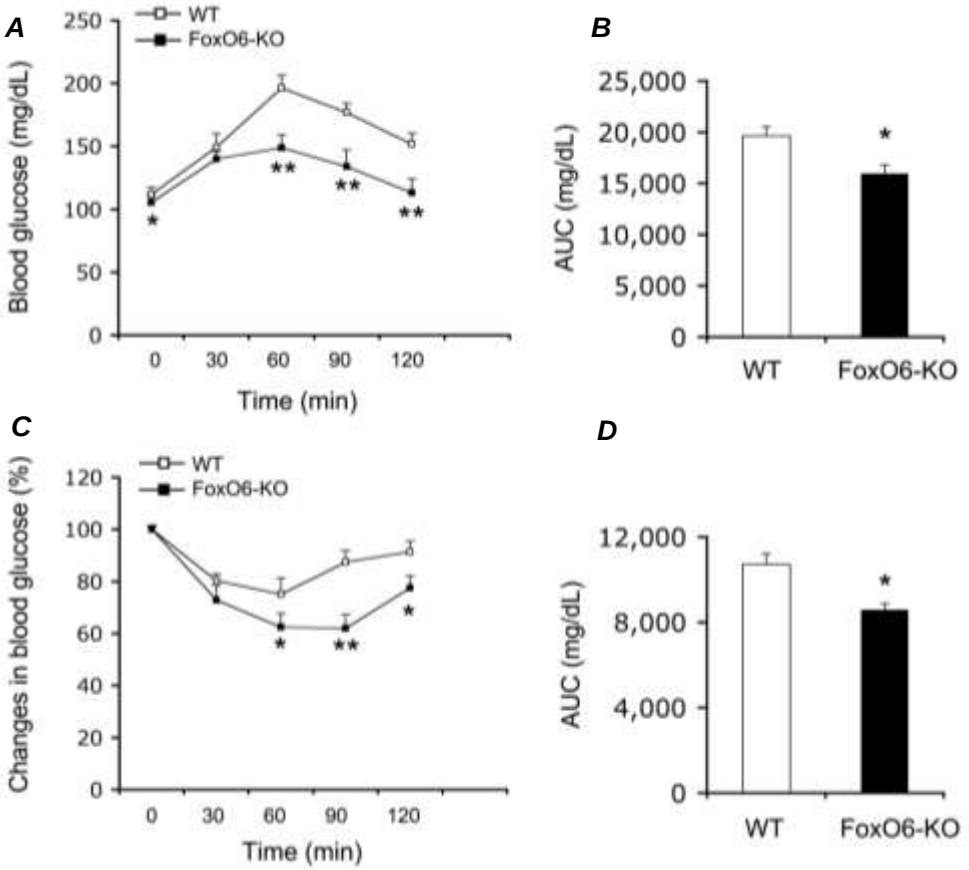


Fig. 2-3 Glucose metabolism in FoxO6-KO mice on high fat diet:

*(**A**) Growth curve. Mice were fed high fat diet at 4 weeks of age. Body weight was determined weekly. (**B**) Fat mass. Fat mass was determined by MRI. (**C**) Lean mass. Lean mass was determined by MRI. (**D**) Food intake. Food intake was determined for two consecutive days after 16 weeks of high fat feeding. (**E**) Blood glucose levels. Fed blood glucose levels were determined in fed states and fasting blood glucose levels were determined after overnight fasting. (**F**) Glucose tolerance test. Data were obtained from high fat-fed male FoxO6-KO (n=9) and age/sex-matched WT littermates (n=9) at 20-22 weeks of age. *P<0.05 vs. WT control.*

高脂肪食由来の FoxO6-KO マウスの糖代謝の改善は，ピルビン酸負荷試験によっても確認できた（Fig.2-4 A）．本試験下で FoxO6-KO マウス群の有意な血糖値の低下（Fig.2-4 B）と AUC の減少（Fig.2-4 C）を認めた．従って, FoxO6 の欠損は肝臓での糖新生を抑制し，食後血糖値を改善したと言える．次に FoxO6 の欠損が高脂肪食摂取の肥満モデルにおいて，インスリン感受性改善に有益であることを証明するために，インスリン負荷試験を行った．FoxO6-KO マウス群では，本試験下で有意な血糖値の低下（Fig.2-4 C）と AUC の減少（Fig.2-4 D）を認めた．これらの結果との相関を示すために，インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR を求めたところ，WT 群と比較して FoxO6-KO 群は有意に低い値を示した（Fig.2-4 E）．この値は絶食時の高インスリン血症の改善（Fig.2-4 F）に基づくものであると言える．

FoxO6 の欠損が糖代謝を改善した作用機序を説明する理由のひとつとして，FoxO6 欠損による糖新生関連遺伝子に着目した．G6Pase の mRNA 発現量は約 40 % 低下しており（Fig.2-4 G）, PEPCK 値も低下傾向を示した（Fig.2-4 H）ことからも, FoxO6 の欠損が糖新生改善に影響を与えたといえる．



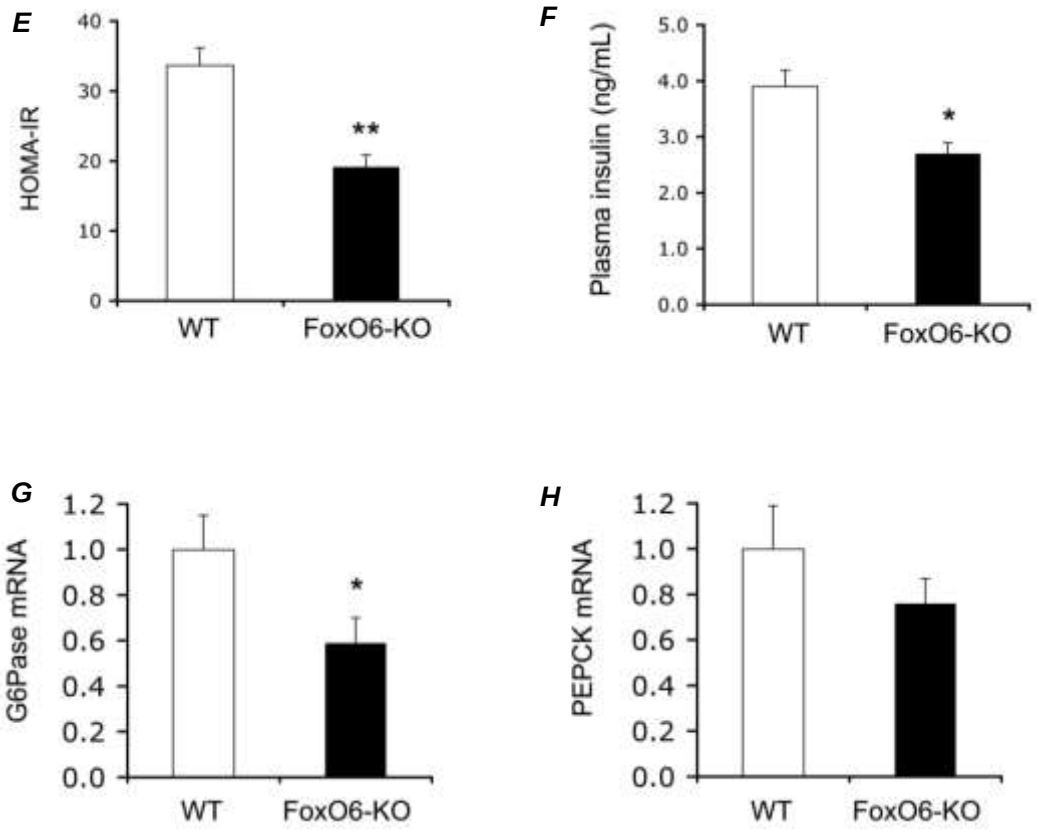


Fig. 2-4 Effect of FoxO6 depletion on hepatic gluconeogenesis and insulin sensitivity in high fat-fed FoxO6-KO mice:

(A) *Pyruvate tolerance test. (**B**) AUC. AUC was calculated from blood glucose profiles during pyruvate tolerance test. (**C**) Insulin tolerance test. Mice were injected intraperitoneally with regular human insulin (1.5 IU/kg),followed by determination of blood glucose levels. (**D**) AUC. AUC was calculated from blood glucose profiles during insulin tolerance test. (**E**). HOMA-IR. (**F**) Fasting plasma insulin levels. Plasma insulin levels were determined after overnight fasting.* ***(G)*** *G6Pase mRNA levels.* ***(H)*** *PEPCK mRNA levels. Data were obtained from high fat-fed male FoxO6-KO (n=9) and age/sex matched WT littermates (n=9) at 20-22 weeks of age. Hepatic G6Pase and PEPCK mRNA levels were determined by real-time qRT-PCR using 18S RNA as control. *P<0.05 vs. WT control.*

2.4 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損がエネルギー代謝に与える影響評価

肥満存在下の FoxO6 の欠損がもたらす糖新生の抑制とそれに基づく糖代謝の改善に関して, より生理学的に評価するため, 高脂肪食摂取 FoxO6-KO 及び WT マウスを用いてエネルギー代謝試験を行い, Respiratory Exchange Ratio （RER: 呼吸商）を算出した. 呼吸商は発生した二酸化炭素と消費された酸素の比を意味し, 呼吸症が 1 の場合は糖質の燃焼を, 0.8 ではタンパク質, 0.7 では脂質の代謝を意味する. FoxO6-KO 群では WT 群と比較して, 有意に暗期の呼吸商を減少させた（Fig.2-5 A, B）. またそのときの値が 0.7 程度であることから, FoxO6-KO マウスは脂肪燃焼を促進していることが明らかとなった. また酸素消費量に関しても, 有意差はないものの FoxO6-KO 群で増大傾向が認められていることから（Fig.2-5 C, D）, FoxO6 の欠損が遊離脂肪酸を基質とするエネルギー消費を増大させていると結論づけられる.

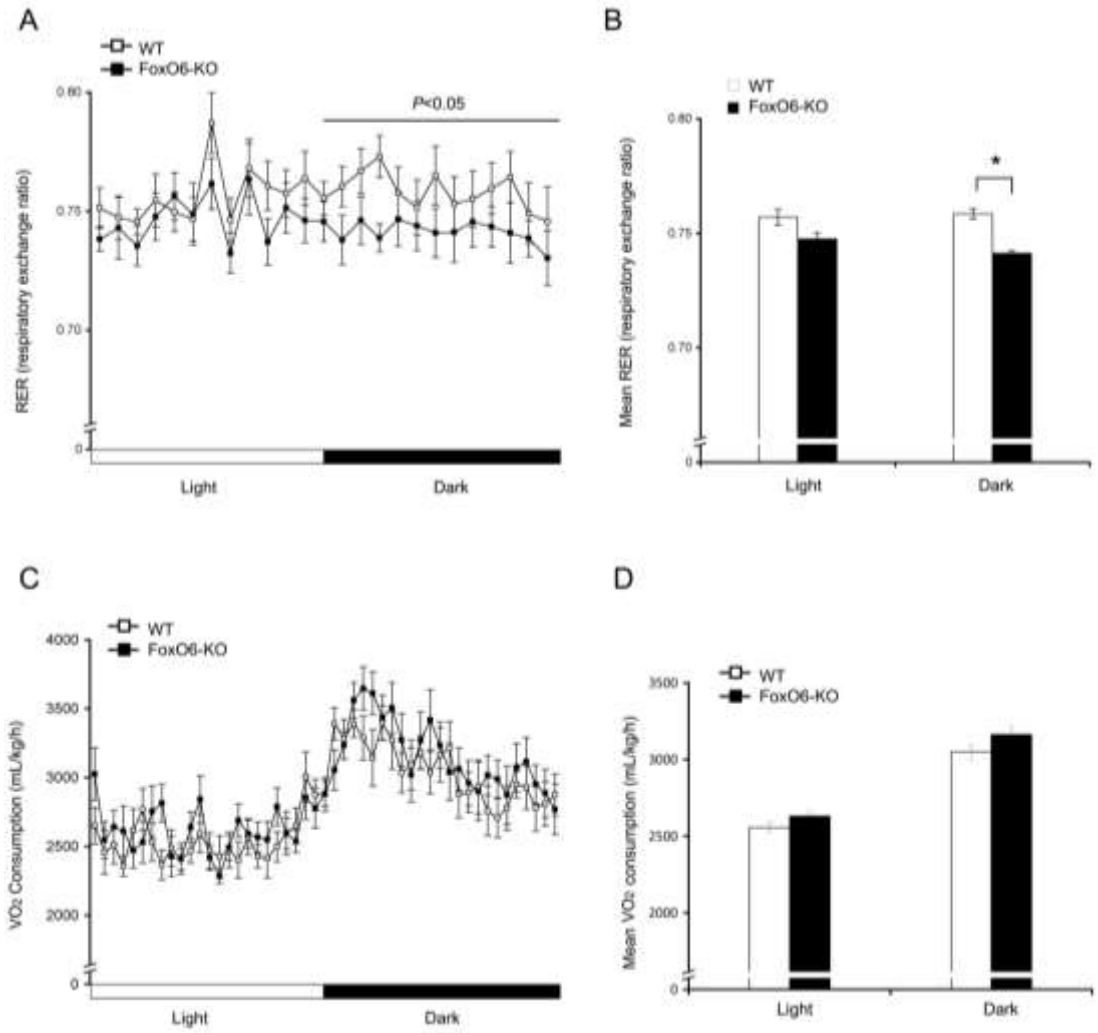


Fig. 2-5 Effect of FoxO6 depletion on energy homeostasis in high fat-fed FoxO6-KO mice:

(A) *Male FoxO6-KO (n=9, 22 weeks old) and age/sex-matched WT littermates (n=9) after 16-weeks of high fat feeding were subjected to metabolic cage studies for determining oxygen consumption rate during a 24-h period (**B**) and mean oxygen consumption rate in a 12-h light/dark cycle. (**C**) The respiratory exchange ratio during a 24-h period and (**D**) the mean respiratory exchange ratio in a 12-h light/dark cycle were determined. *P<0.05 vs. WT control.*

2.5. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損が肝クッパー細胞浸潤に与える影響評価

FoxO6 欠損によるインスリン感受性の増大と糖代謝改善の作用機序に関して，より深い理解を得るために免疫組織化学的検査を行った．インスリン抵抗性に起因される肥満や 2 型糖尿病時にはクッパー細胞の浸潤が認められる[65]．そこで，マクロファージのマーカーとして知られる抗 F4/80 抗体を用いて，肝局在型のマクロファージであるクッパー細胞の浸潤を評価した[66,67]．その結果，高脂肪食摂取条件下の FoxO6-KO マウス肝臓で有意なクッパー細胞の減少が認められた（Fig.2-6 A-C）．また，C-C chemokine receptor 2 （CCR2）は末梢組織でのマクロファージ細胞の動員を制御する重要な因子として知られているが，FoxO6-KO マウスでの CCR2 肝臓 mRNA 発現量の有意な低下が認められた（Fig.2-6 D）．また肝 F4/80 の mRNA 発現量に関しては，有意差がないものの減少傾向を認め，マクロファージ等の単球マーカーとして知られる CD68 値は有意に低下していた（Fig.2-6 D）．以上の結果より，FoxO6 の欠損は肝臓でのマクロファージ及び炎症マーカーの減少をもたらすことが明らかとなった．

加えて，高脂肪食を与えた FoxO6-KO マウスと WT マウスの肝臓における炎症性サイトカイン TNFα，IL-6，IL-1β と，ケモカイン CCL2，CCL3，CCL7 の発現量を評価した．FoxO6-KO マウスでは肝 TNFα 及び IL-1β の mRNA において減少傾向が認められたものの，WT 群と比較して有意な差は得られなかった．IL-6，CCL2，CCL3 及び CCL7 の mRNA 発現量に関しては，FoxO6-KO マウス群と WT 群間で有意な差は認められなかった（Fig.2-6 D）．

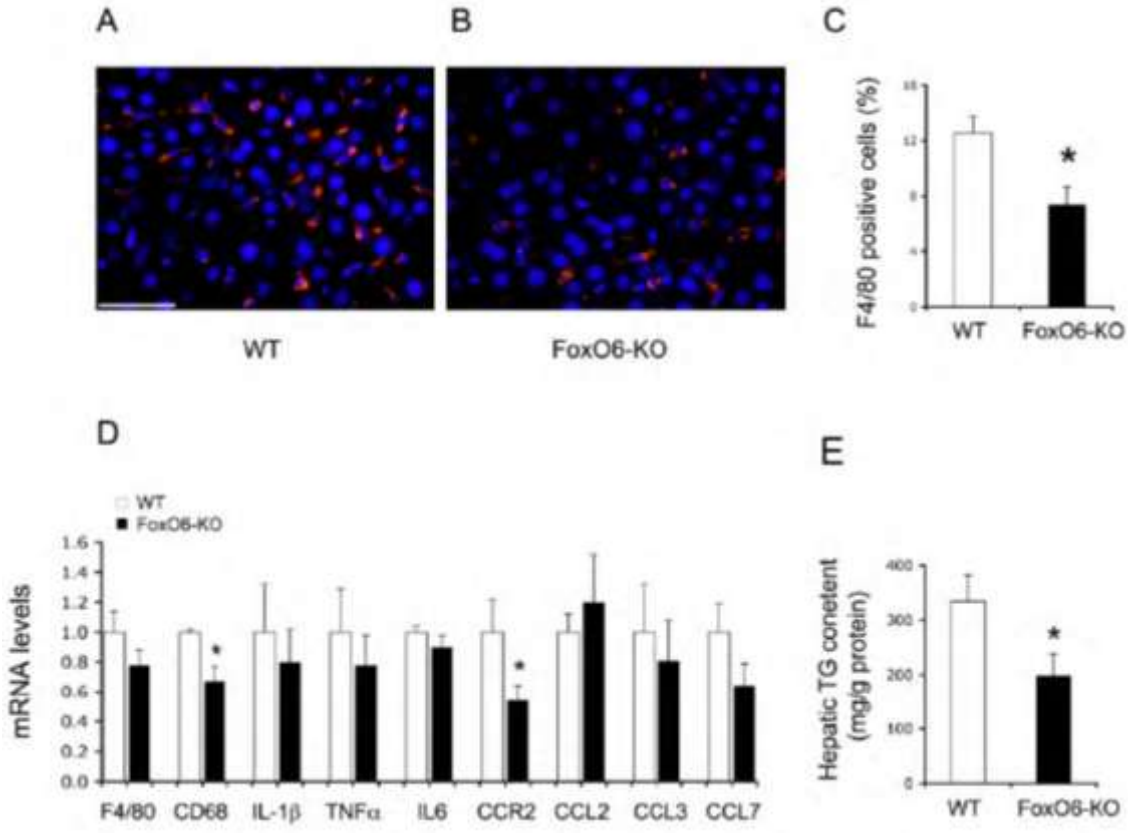


Fig. 2-6 Effect of FoxO6 depletion on Kupffer cell content in the liver:

*Liver tissues were obtained from high fat-fed WT control (**A**) and FoxO6-KO mice (**B**) as described in Fig.2-5. Frozen sections of liver tissues were subjected to anti-F4/80 immunohistochemistry. (**C**) F4/80 positive cells (stained red) were counted and normalized to the total number of cells (with nuclei stained blue by DAPI) in liver sections. (**D**) Aliquots of liver tissues (20 mg) were used for the preparation of total RNA, which was subjected to real-time qRT-PCR for determining F4/80, CD68, IL-1ß, TNFα, IL6, CCR2, CCL2, CCL3 and CCL7 mRNA levels. (**E**) In addition, aliquots of liver tissues (20 mg) were used for determining hepatic lipid content, which was defined as mg TG per gram of liver protein. *P<0.05 vs. WT control. Bar, 50 µm.*

2.6. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損が肝臓脂質代謝に与える影響評価

FoxO6 欠損が肝臓脂質代謝に与える影響を調べるため，肝臓 TG 量を評価した．高脂肪食摂取 FoxO6-KO マウスでは WT マウスに比較して，有意な肝臓 TG 量の低下を示した（Fig. 2-7 A）．さらに，肝臓凍結切片を作製し，Oil red O 染色により肝臓脂肪滴を染色した．その結果，FoxO6-KO マウスは WT マウスに比較して肝臓の脂肪滴が減少していることが明らかとなった．これらの結果は，FoxO6-KO マウスが肝臓でのクッパー細胞集積を抑制し，糖代謝を改善したことに由来するものであると考えられる（Fig. 2-7 B）．

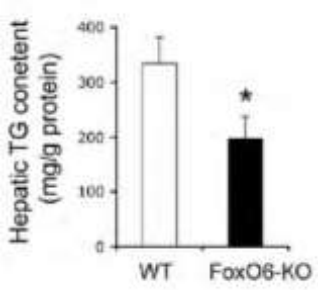


Fig. 2-7 (A)

*Aliquots of liver tissues (20 mg) were used for determining hepatic lipid content, which was defined as mg TG per gram of liver protein. *P<0.05 vs. WT control.*

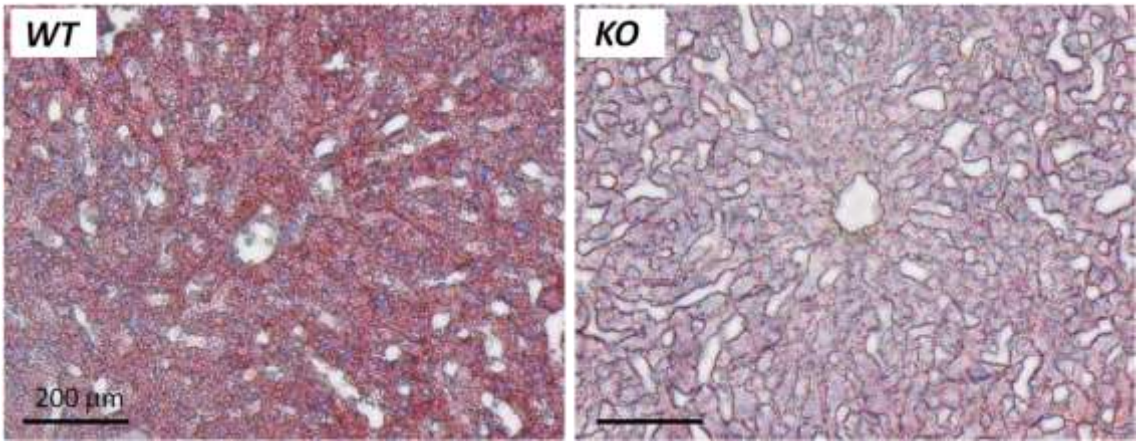


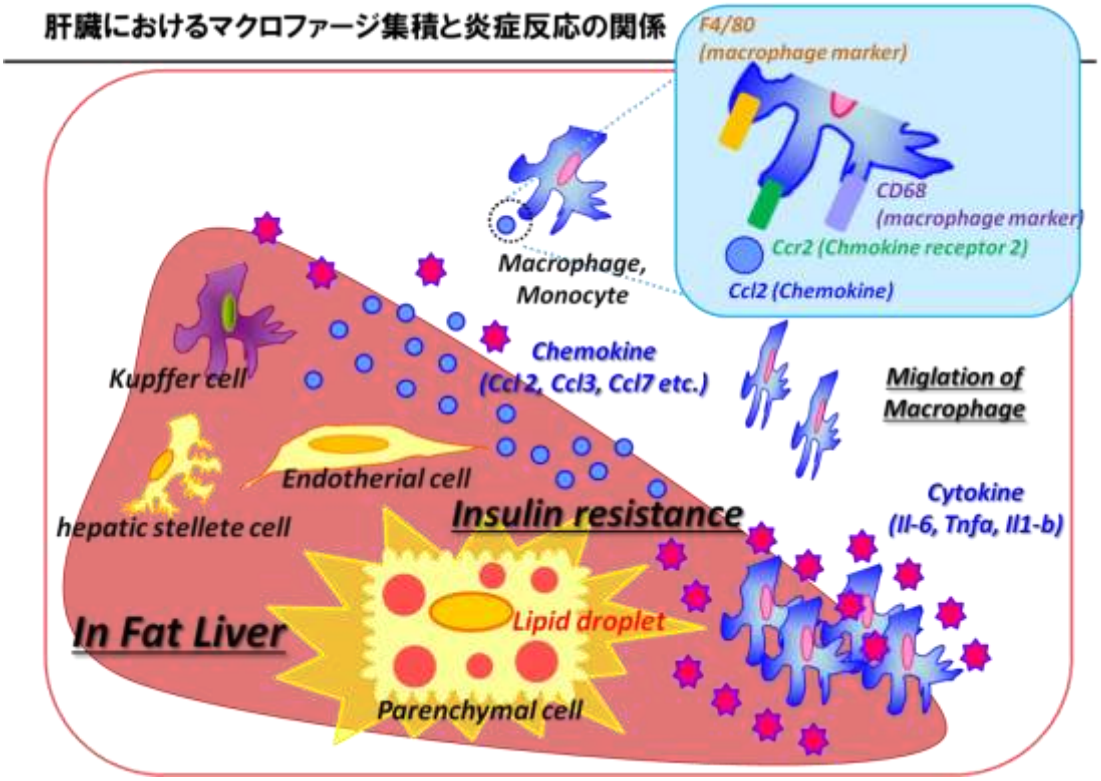
Fig. 2-7 (B)

Liver frozen were cut 6 μm of thicks. Oil red O staining were performed. Bar, 200 μm.

Red: Oilred O (Lipid)

Blue: Haematoxylin (Nucleus)

ここで，肝臓におけるマクロファージ集積と炎症反応の関係を解説する．



肥満やインスリン抵抗性時に見られる脂肪肝では，脂肪の集積により肝臓軽度の炎症が生じることが知られている [68]．すると血管を構成する内皮細胞や繊維が細胞等から炎症誘起物質である（CCL2,CCL3,CCL7）と呼ばれるケモカインが分泌される [69] [70]．このケモカインを認識したマクロファージや単球がシグナルを送り，血管外から肝細胞内へのマクロファージの浸潤を誘起する．肝細胞内に集積してきたマクロファージや単球などは IL-6, TNFα, IL1β といった炎症サイトカインを放出し，肝臓でのインスリン抵抗性を悪化させる [66] [71]．また ,マクロファージはマーカーとして F4/80 や CD68 を高発現しており，近年の報告により，マクロファージ上に発現するケモカイン受容体の CCR2 がケモカインリガンドの CCL2 を認識することでマクロファージ浸潤を誘導することが知られている [66]．本研究では，FoxO6 の欠損がこれら因子を介した,肝臓でのマクロファージの集積を抑制するかについて検証した．

2.7. 肥満糖尿病モデルマウスの FoxO6 欠損が脂肪組織マクロファージ浸潤に与える影響評価

FoxO6-KO マウスの肝臓でマクロファージの浸潤が減少していたことから, インスリン抵抗性獲得臓器として重要な脂肪組織への影響を調べるために, 肝臓と同様に抗 F4/80 抗体を用いた免疫組織化学的検査を行った. FoxO6-KO 群では WT 群と比較して, 脂肪組織でも有意なマクロファージの減少を認めた(Fig.2-8 A-C). さらに驚くべきことに, FoxO6-KO マウスでは脂肪細胞体積が減少していることが明らかとなった（Fig.2-8 D）. これらの結果は全身におけるインスリン感受性増大させ, 糖代謝を改善した結果であると考えられる. マクロファージの浸潤に関して, 脂肪組織の間質細胞を単離し qRT-PCR を行った結果, 脂肪組織でも肝臓と同様に CCR2 の mRNA 発現量が低下していた（Fig.2-8 E）. またマクロファージマーカーに関しても同様に F4/80 と CD68 （Fig.2-8 E）の mRNA 発現量の低下が認められた. さらに, 高脂肪食摂取 FoxO6-KO マウスの脂肪組織の間質細胞中では, WT マウスに比較して, 炎症サイトカインである TNFα, IL-6 及び IL-1β の減少及びケモカインである CCL2, CCL3, CCL7 の発現量が減少していることが明らかとなった（Fig.2-8 E）.

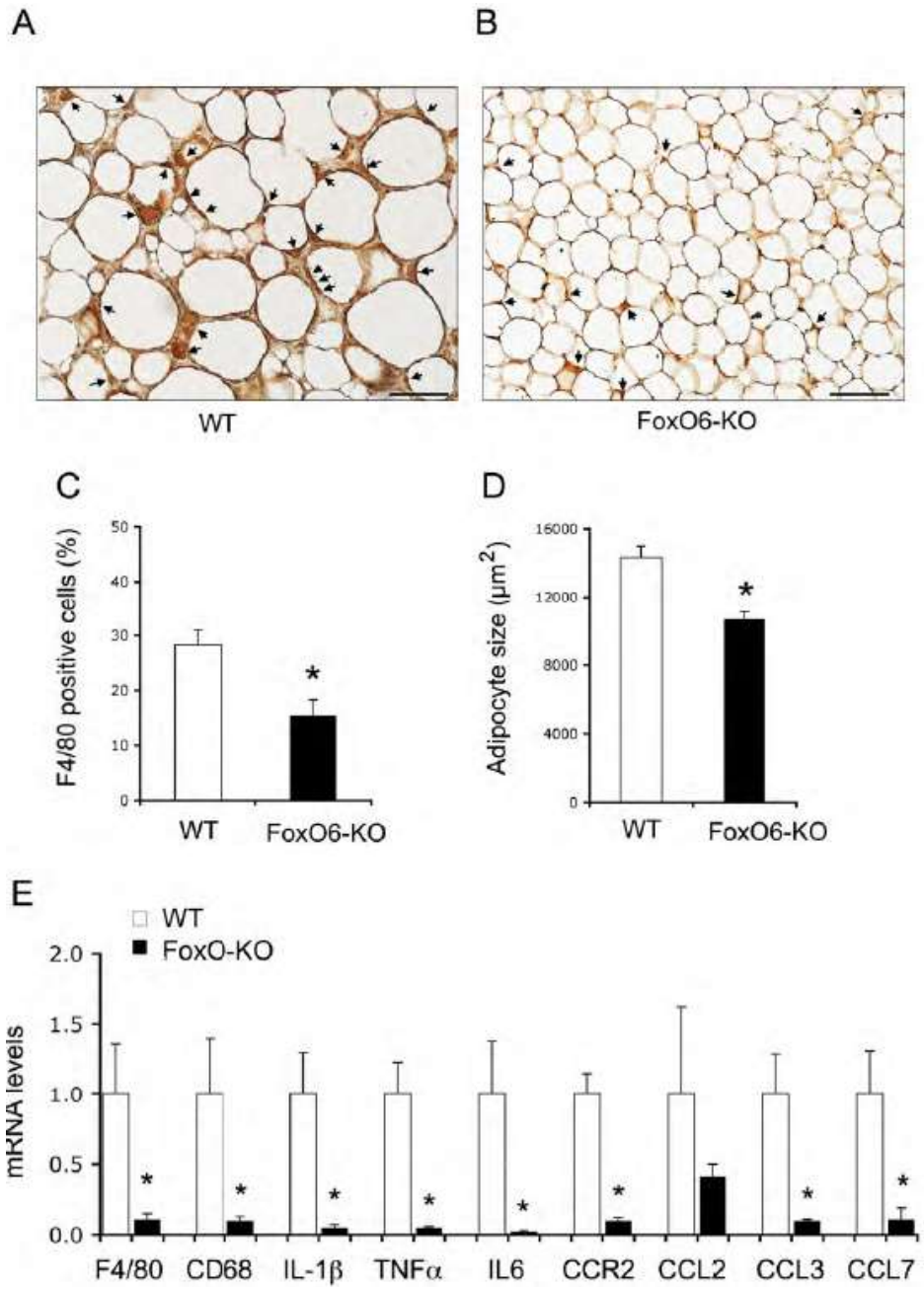


Fig. 2-8 Effect of FoxO6 depletion on macrophage infiltration in adipose tissues:

*Adipose tissues were procured from high fat-fed (**A**) WT control and (**B**) FoxO6-KO mice. Paraffin-embedded adipose tissues were subjected to anti- F4/80 immunohistochemistry. Arrows show F4/80 positive cells. (**C**) F4/80 positive cells (stained brown) were scored and normalized to the total number of adipose cells. (**D**) In addition, the size of adipose cells were determined and compared between control and FoxO6-KO groups. Epididymal adipose tissues were minced for the preparation of stromal vascular cells. (**E**) Total RNA was isolated from stromal vascular cells and subjected to real-time qRT-PCR for determining F4/80, CD68, IL-1β, TNFα, IL-6, CCR2, CCL2, CCL3 and CCL7 mRNA levels. *P<0.05 vs. WT control. Bar, 100 μm.*

考察

本研究では，FoxO6 欠損がマウスの肝臓糖新生及び糖代謝に与える影響を明らかとした．FoxO6 の欠損は肝臓糖新生を抑制し，顕著な食後及び絶食時血糖値の改善をもたらした．この結果は，通常または高脂肪食摂取 FoxO6-KO マウスの両方で確認された．さらに，FoxO6 欠損肝初代培養細胞での cAMP を介したグルカゴン応答性の糖産生に関して，有意な減少が認められた．コントロールとして FoxO6-KO マウス肝臓の FoxO1 発現量を評価し，FoxO6 の欠損が肝臓での FoxO1 発現変動の結果として代償的に生じるものではないことを証明した．これらの結果から，FoxO6 は FoxO1 とは独立して肝糖新生を制御していることが示唆された．本現象は，FoxO6 トランスジェニックマウスが FoxO1 とは独立して糖新生を活性化し，絶食時高血糖を誘起した結果と相同している [6]．

過剰な肝臓での糖産生は，肥満や 2 型糖尿病時の空腹時血糖値の上昇に寄与している．これはインスリンによる肝糖新生の抑制の障害が起因すると考えられるが，実際にインスリン作用の障害が糖新生を異常活性するかどうかについては明らかとなっていない．本結果は FoxO6 欠損が肝臓での糖産生を抑制するのに有用であること，また高脂肪食摂取時でも FoxO6 欠損により糖代謝異常を改善可能であることを示した．これまでに，肥満や 2 型糖尿病時に肝臓での FoxO6 発現が上昇すると，絶食時高血糖とそれに引き続く糖代謝の異常が生じることが明らかとなっている [6]．また，肥満糖尿病モデルである肝臓インスリン抵抗性時の選択的 FoxO6 のノックダウンは肝臓糖新生と絶食時高血糖を抑制可能であることも報告されている [6]．本研究の結果は，これら以前の報告と一致しており，FoxO6 と絶食時高血糖の発症機序との関連性をより重要づけるものである．肥満や 2 型糖尿病時の FoxO6 の抑制回避がインスリン作用の異常応答と肝糖新生の制御不能に関与することを示す結果となった．

FoxO6 は FoxO1 と機能構造的に類似しているが，FoxO6 は FoxO1 と根本的に異なっている [22]．以下にその相違点を述べる．FoxO6 は FoxO1 のアミノ酸配列を高度に保持している（>70%）．FoxO6 は DNA に結合する特定のアミノ酸配列として T26 と S184 を有しており，これら二つが AKT/PKB タンパク質からのリン酸化を受けることが知られている．一方 FoxO1 は T24, S256, S319 の三つのリン酸化部位を持っている．さらに FoxO6 は FoxO1 のカルボキシル部位にあるとされる核移行性シグナル Nuclear Export Signal: NES を欠損している [19]．FoxO6 は FoxO1 と異なり，インスリン応答による下流遺伝子の制御に核外移行を必要としない [6]．本研究においても，FoxO1 との新たな相違点を明らかとした．本研究では FoxO6 の全身ノックアウトモデルを用いているが，FoxO1 の全身欠損モデルは胚発生から 11.5 日で死亡する一方で，FoxO6 では生存可能であることが分かった [64]．この結果は FoxO6 が FoxO1 と進化の過程で区別されることを立証している [22]．

高脂肪食摂取は肥満を生じることが知られているが，FoxO6-KO マウスはコントロールモデルと比較してこれを抑制し，インスリン感受性を顕著に改善した．これは，肝での FoxO6 欠損が空腹時の高血糖と高インスリン血症を改善したことに由来すると考えられる．

さらに高脂肪食摂取 FoxO6-KO マウスは WT マウスと比較して，エネルギー消費を上昇させ，体重増加の抑制を獲得している．これらの結果も同様に，高脂肪食摂取時のインスリン感受性の改善に寄与していると考察される．

肝臓や脂肪などの末梢組織でのマクロファージの浸潤増大は肥満や 2 型糖尿病時のインスリン抵抗性と関連することが知られている [66,67]．Huang らは肝臓でのクッパー細胞の欠損が食事性のインスリン抵抗性の獲得と糖代謝の異常を抑制することを報告している [72]．Obstfeld らの研究では CCR2 が末梢組織でのマクロファージの集積に重要な役割を担っていることを示している [73]．CCR2 欠損マウスは全身性のインスリン感受性と糖代謝を改善する [74]．本研究でも，FoxO6 の欠損が肝臓や脂肪組織でマクロファージの浸潤を抑制した結果，高脂肪食摂取時の糖代謝やインスリン感受性を改善している．またこれまでの報告と同様に本研究でも，FoxO6-KO マウスのマクロファージ細胞 CCR2 発現低下が認められた．

FoxO6-KO マウスにおいて，脂肪組織中のマクロファージでの TNFα，IL-1ß，IL-6 及び CCL2 の mRNA 発現量は有意に低下しているにも関わらず，全身における血清中炎症性サイトカイン TNFα，IL-1ß 及び IL-6 またケモカインである CCL2 値に変化は認められなかった（なお，血中 IL-1ß 濃度は検出限界値以下であった．data not shown）．この考察として，FoxO6 の欠損により，脂肪組織中のマクロファージ産生は低下したものの，肝臓や肺といった他の末梢組織に常在するマクロファージの発現に変化を与えていない可能性が考えられる．肥満や糖尿病時における末梢組織でのマクロファージ集積とそれらによりもたらされる炎症サイトカインやケモカインの発現変動がどのように FoxO6 による制御を受けているかに関して，今後より詳細な検証が必要である．

以上をまとめると，本研究で FoxO6 は独立してインスリン刺激に応答し，糖新生を制御していることを明らかとした．FoxO6 の欠損はマウス肝臓での糖新生活性を抑制し，絶食時の血糖値の低下をもたらした．さらに，FoxO6 を欠損した肝臓や脂肪組織ではマクロファージの集積を顕著に減少させた．これらの効果は，空腹時の高血糖や高インスリン血症の改善に寄与しており，FoxO6-KO マウスで高脂肪食投与によるインスリン抵抗性や糖代謝異常の獲得の抑制に成功した．本研究により，FoxO6 活性の抑制が，肥満や 2 型糖尿病時に見られる過剰な肝糖産生の抑止や血糖コントロールの改善に有用であることを *in vivo* において証明できたと言える．

第三章
核酸医薬への展望

第三章
核酸医薬への展望

緒言

1998 年に Fire と Mello により発見された RNA interference （RNAi）は, RNA を細胞内に導入することにより, その塩基配列特異的に mRNA を切断することで特定の遺伝子発現が抑制される現象である [75]. 2001 年に 21 mer 程度の小分子二本鎖 RNA（small interfering RNA; siRNA）を哺乳動物細胞に導入することで, RNAi が引き起こされることが見出された [76]. 現在, siRNA を用いた標的遺伝子発現の抑制は, これまで治療や完治が困難であった疾患に対する次世代医薬品―核酸医薬になり得るとして期待されている [9].

Table 1 | **Modes of siRNA delivery and potential targets**

Mode of administration	Potential organ target	Potential disease target
Topical	Eye	Macular degeneration
	Skin	Atopic dermatitis
	Vagina	Herpes simplex virus
	Rectum	Inflammatory bowel disease
Local/direct	Lung	SARS
	Brain	Huntington's disease
	Spinal cord	Chronic pain
	Isolated tumour	Glioblastoma multiforme
Systemic	Liver	Hypercholesterolaemia
	Heart	Myocardial infarction
	Kidney	Kidney disease
	Metastasized tumours	Ewing's sarcoma

SARS, severe acute respiratory syndrome; siRNA, small interfering RNA.

Table 3-1 Modes of siRNA delivery and potential targets:

There are several tissues that are amenable to topicalor localized therapy, including the eye, skin, mucus membranes, and local tumours. （Whitehead KA et al, Nature reviews. Drug discovery. 2009）

しかしながら, RNA は生体内で普遍的に発現しているヌクレアーゼにより容易に分解されるため, 非常に不安定である. また, RNA 自体が負電荷を帯びており, 親水性であることから細胞膜透過性が低く, 速やかな腎排泄を受けやすいといった問題点を有している. これに対して, 本研究室では, 標的部位に選択的にかつ効率的に核酸送達するための非ウイルスベクターとして, 多機能性エンベロープ型ナノ構造体（MEND）の開発を進めてきた.

核酸を脂質膜で内封することでヌクレアーゼによる分解を防ぐとともに，脂質が有する疎水性作用により細胞膜透過性を改善する．さらにリガンドや PEG といった機能性素子の修飾により，体内動態及び細胞内動態の両制御を可能としている [77] [78]．近年では，肝臓や肺を始め，脂肪細胞やミトコンドリアへの MEND による siRNA 送達を多数報告している [79] [80-82]．また，肝臓への siRNA 送達に関して，2011 年に STR-R8: DOPE: Chol-GALA = 18: 77.5: 4.5 の脂質組成からなる R8-GALA MEND が，肝臓に対して効率的な siRNA 送達が可能であること，またその結果，実質細胞に発現する標的 Scavenger receptor classB,type 1（SRB1）遺伝子に対する遺伝子発現抑制を誘起可能であることを報告している [83]．

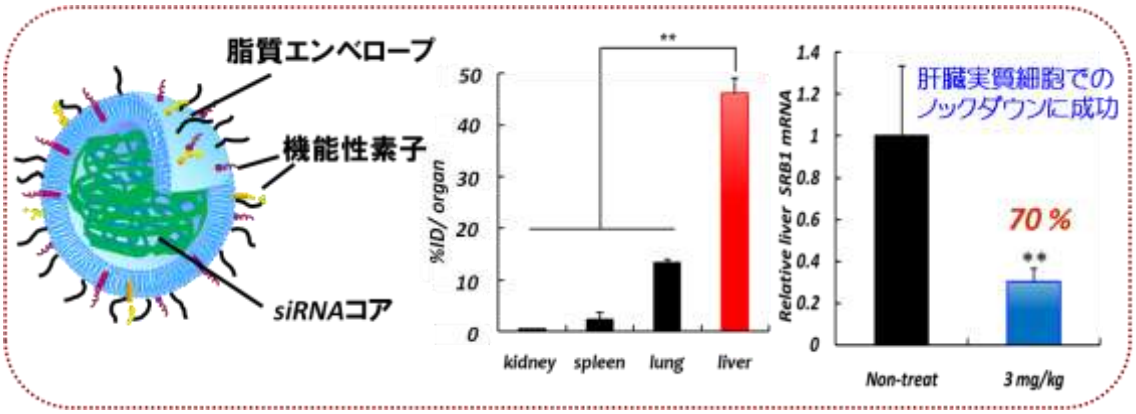


Fig 3-1 . Multifunctional envelope-type nano device (MEND):

(Left) *Schematic representation of MEND. MEND is designed to control intracellular trafficking of nano carriers as well as to control tissue distribution.*

（Kogure K et al, Adv Drug Deliv Rev, 2008, modified）

(Middle) *Biodistribution of R8-GALA MEND in mice. The accumulation in the liver was significantly higher compared to other tissues, indicating that R8-GALA MEND has a high selectivity for the liver.*

(Right) *R8 –GALA MEND mediated silencing of SR-BI in mice. Liver SR-BI mRNA levels normalized to β-actin mRNA measured 24 h after single intravenous injections.*

(Hayashi Y and Yamauchi J et al, Int J Pharm, 2011, modified)

さらに，近年では，佐藤らが見いだした新規 pH 応答性脂質 YSK-05 を用いた YSK-05: Cholesterol: PEG2k-DMG = 70: 30: 3 の脂質組成からなる MEND が，肝臓で非常に強力なノックダウンを可能とすることを報告している [84]．そこで，この肝臓標的キャリアによる遺伝子発現抑制技術を用いて，本研究で見いだされた標的遺伝子を核酸医薬へ応用できないかと考えた．

結果

3.1. FoxO6 siRNA 内封 YSK-05 MEND の作製

FoxO6 に対する siRNA を, YSK-05: Cholesterol: PEG2k-DMG = 70: 30: 3 の脂質組成の YSK-05 MEND に内封し，下記の粒子を得た（Table. 3-2）. また siRNA の封入率及び回収率はともに約 90 %であった.

	Size (nm)	ζ-potential (mV)	PdI	Encapsulation ratio (%)	Recovery rate (%)
Liposome	86	7.5	0.22		
MEND	86	1.3	0.17	87	86

Table 3-2 Physicochemical properties of the YSK-05 Liposomes and YSK-05 MEND:

3.2. YSK-05 MEND を用いた肝臓 FoxO6 のノックダウン効果

2.5 mg/kg の FoxO6 siRNA 内封 YSK-05MEND を, C57BL/6 J マウスに尾静脈より投与した. 投与から 24 時間後にマウスを安楽死させ, 回収した肝臓を用いて qRT-PCR を行い, FoxO6 発現量を評価した. その結果, 本キャリアは肝臓で約 60 %程度, FoxO6 mRNA 発現量を抑制可能であることを確認した（Fig. 3-2）.

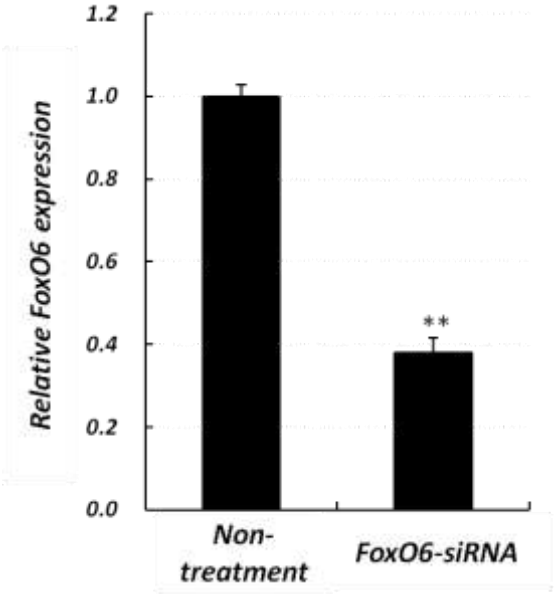


Fig.3-2 Liver silencing effect of FoxO6 siRNA loaded YSK-05 MEND:

*YSK-05MEND mediated silencing of FoxO6 in mice. Liver FoxO6 mRNA levels were normalized to β actin mRNA measured 24 h after single intravenous injections. **P<0.01, unpaired student's t-test, vs. Non treatment.*

3.3. YSK-05 MEND を用いた肝臓 FoxO6 のノックダウンによる糖新生抑制効果

続いて, FoxO6 siRNA 内封 YSK-05MEND の投与による，血糖値に対する影響を調べた. 0.5 mg/kg siRNA 相当量の MEND の尾静脈投与から 3 日後において，コントロールである Luc siRNA 投与群と比較して FoxO6 siRNA 投与群でのみ血糖値の低下が確認できた．また, MEND 投与から 2 週間後にマウスを 16 時間絶食させ, 2 g/kg のピルビン酸負荷試験時を行った．その結果, FoxO6 siRNA 内封 MEND の投与マウス群でのみ，有意な血糖値の低下が認められた．さらに，糖新生関連遺伝子である G6Pase 発現の抑制傾向が認められた．以上のことから, FoxO6 siRNA 内封 YSK-05 MEND は糖新生を抑制可能であることを明らかとした（Fig. 3-3）.

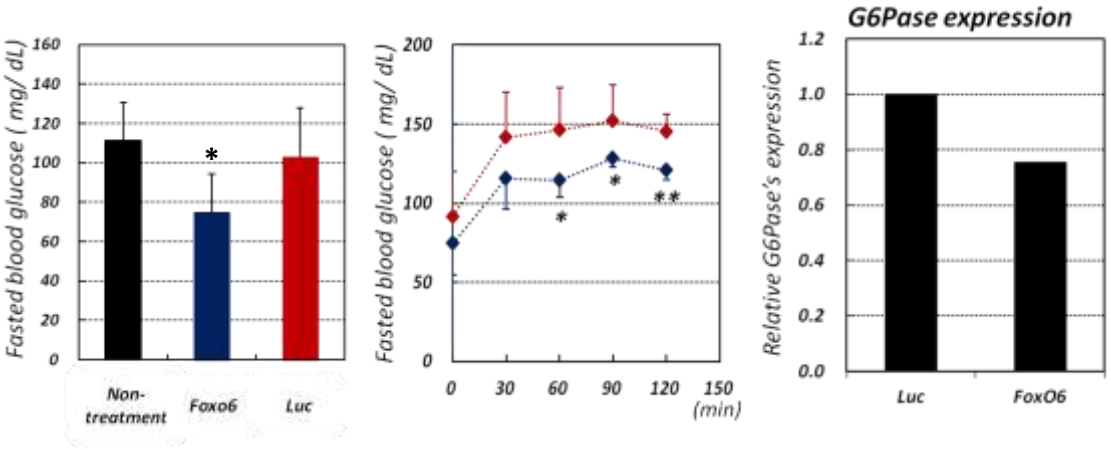


Fig 3-3 Effect of FoxO6 KD by YSK-05 MEND on glucose metabolism:

(Left) *Normal blood glucose levels were measured 3 days after administration at the dose of 0.5 mg/kg FoxO6 siRNA loaded YSK-05 MEND. *<0.05, one-way ANOVA, followed by Bonferroni vs. NT control.*

(Middle) *Pyruvate tolerance test was performed at 14 days after administration of MEND. *p<0.05, ** p< 0.01, unpaired student's t-test. vs. Luc*

(Right) *YSK-05 MEND mediated silencing of gluconeogenesis gene in mice liver. Liver G6Pase mRNA levels normalized to β actin mRNA measured 24 h after single intravenous injections.*

3.4. YSK-13 MEND を用いた肝臓 FoxO6 のノックダウンによる糖尿病治療効果

MEND を用いた肝臓 Foxo6 ノックダウンによる糖尿病治療効果を評価するため，高脂肪食モデルマウスを用いて，4 週間の投与実験を行った．本モデルマウスは，生後 4 週齢から継続的に高脂肪食を与え，食事由来の肥満を誘導したものであり，高脂肪食開始から 10 週間目に投与を開始している（生後 14 週齢目）．確実な治療効果を得るために，より肝臓ノックダウン活性が高い最新の pH 応答脂質である YSK-13-C3 を含有する MEND を用いた（脂質組成は YSK-13-C3: Chol: PEG2k DMG=70: 30: 3）．佐藤らは，本脂質を用いて現段階で世界最高峰のキャリアと同等のノックダウン活性を得ることに成功している [85]．また高脂肪食モデルマウスを用いた実験に関して，持続的な遺伝子発現抑制を得るために，50 μg siRNA/mouse 相当量 MEND の 5 日おきの連続投与を行った．なお，15 週間高脂肪食を与えた肥満糖尿病モデルマウスにこの YSK-13 MEND を尾静脈より単回投与した際の，投与 3 日後における肝臓での FoxO6 発現を確認したところ，約 50 %のノックダウン効果を確認している（data not shown）．MEND の連続投与実験の結果， FoxO6 siRNA 内封 MEND 投与群では，2 回目の投与から投与後 30 日目まで一貫して有意な体重増加抑制効果が認められた（Fig.3-4 A）．また，食後血糖値に関しても FoxO6 MEND 投与群でコントロール MEND 投与群と比較して，有意な血糖値の低下が認められた（Fig.3-4 B）．1 g/kg 体重のグルコースを用いた糖負荷試験の結果，FoxO6 MEND 投与群ではグルコースの腹腔内投与 30 分後において血糖値を有意に改善し（Fig.3-4 C），Area under the curve（AUC）を有意に減少させた（Fig.3-4 D）．一方で空腹時血糖値に関しては，FoxO6 MEND 投与群と他の 2 群間で有意な差は認められなかった（Fig.3-4 E）．そこで，投与開始から 33 日後に一晩絶食させた全てのマウスを開腹し，肝臓及び脂肪組織を摘出した．このときの FoxO6 siRNA 内封 MEND 投与群マウスは，NT 群，コントロール siRNA 内封 MEND 投与群に比較して体重減少傾向を示した（Fig.3-5 A, B）．肝臓の肉眼的所見について，NT 群では脂肪肝様の白色化した肝臓が観察されたが，FoxO6 siRNA 投与群ではこのような所見は認められなかった（Fig.3-5 C）．また，肝臓臓器重量に関して，FoxO6 MEND 投与群は他の 2 群に比較して減少傾向を示した（Fig.3-5 D）．これは FoxO6 のノックダウンにより肝臓脂質及びグリコーゲンの蓄積を抑制したことによるものであると推察される．脂肪組織に関して，FoxO6 MEND 投与群では組織重量の減少傾向を示した（Fig.3-5 E）．

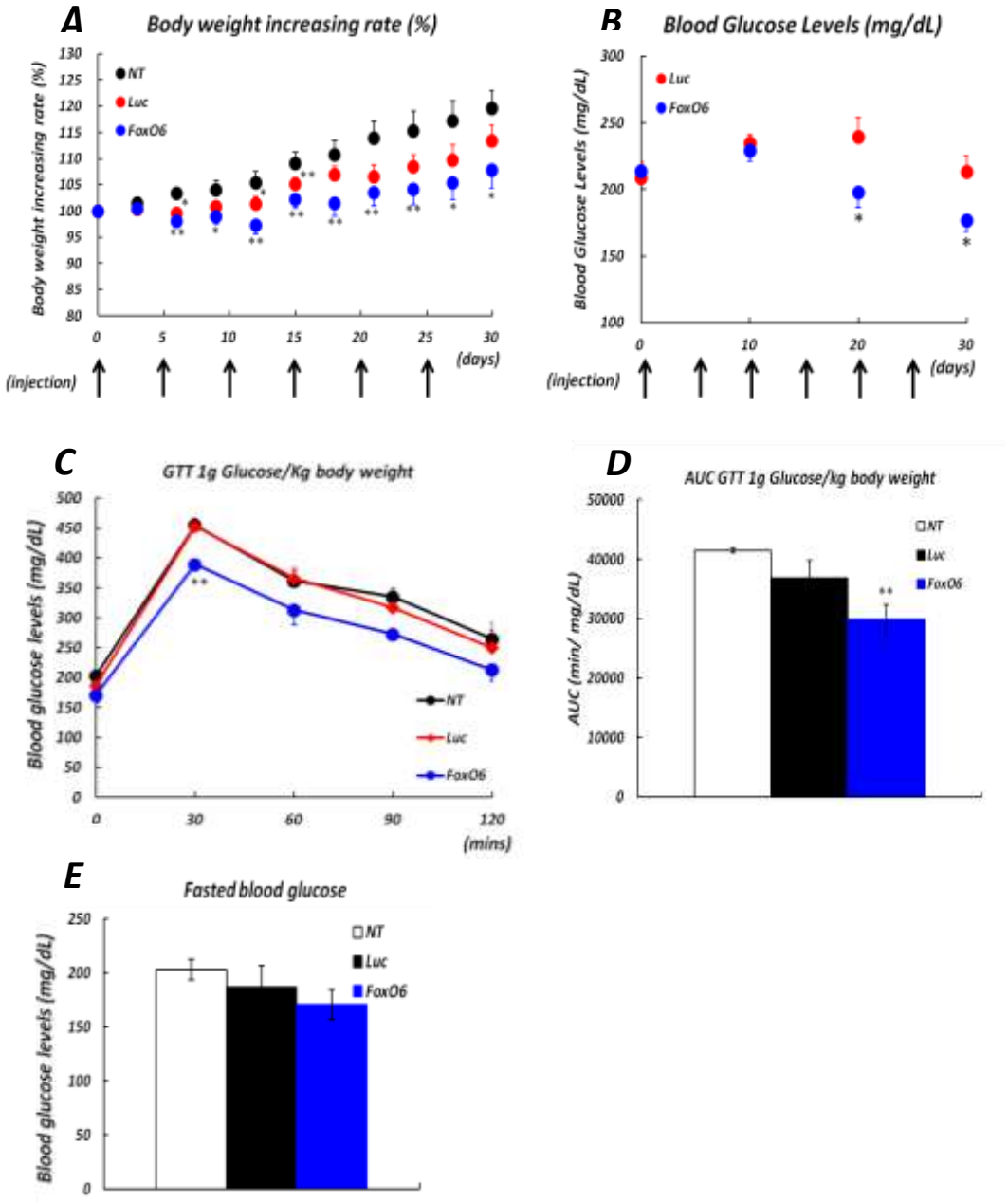


Fig. 3-4 Effect of FoxO6 knock down by YSK-13 MEND on glucose metabolism:

*(**A**) Glowth curve. Mice were fed high fat diet at 4 weeks of age. MEND was treated for 4 weeks, started at the age of 14 weeks to 18 weeks on HFD. (**B**) Blood glucose levels. Fed blood glucose levels were determined. (**C**) Glucose tolerance test. 1g/ kg bodyweight Glucose was administrated by i.p. injection. (**D**) AUC. AUC was calculated from blood glucose profiles during glucose tolerance test. (**E**) Fasted blood glucose levels were masured after 16 hrs fasting. *P<0.05, **p< 0.01, one-way ANOVA, followed by Bonferroni vs. NT control.*

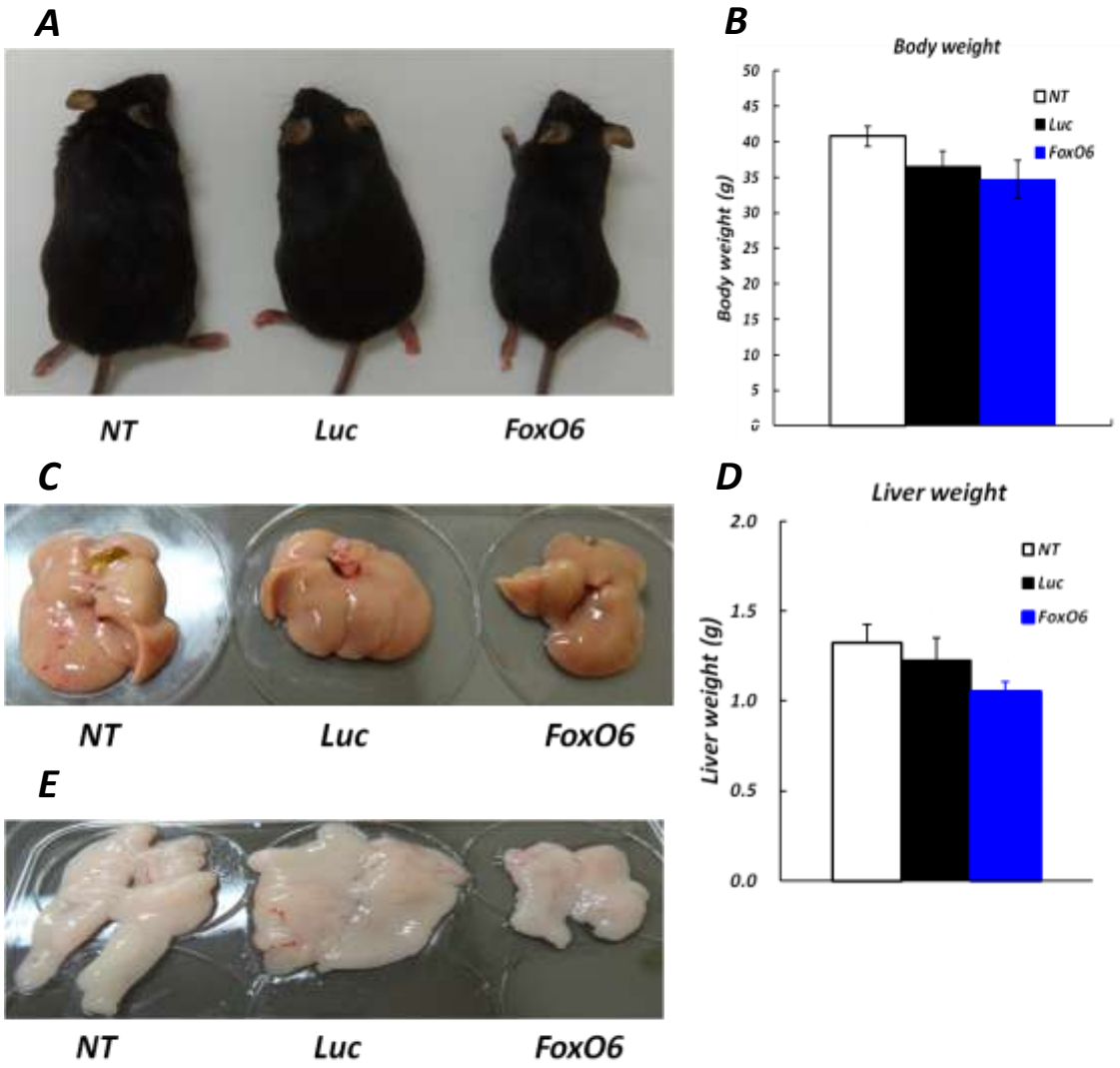


Fig. 3-5 Effect of FoxO6 knock down by YSK-13 MEND on glucose metabolism:

*(**A**) The appearance of representative MEND treated and control mice, and their (**B**) Body weight, (**C**) liver and (**D**) liver weight. (**E**) Adipose tissue.*

考察

本章では第一章及び二章により見出された 2 型糖尿病遺伝子 FoxO6 に対して，非ウイルスベクターを用いた発現抑制を試みた．その結果, YSK-05 MEND は肝臓 FoxO6 に対して十分な RNAi 効果を誘起可能であることを明らかとした．さらに，本ベクターによる FoxO6 mRNA 発現抑制効果は，肝臓での糖新生を抑制可能であることがわかった．そこで糖尿病治療効果を評価するために，よりノックダウン活性の高い YSK-13 MEND を用いて[84]，高脂肪食誘導モデルマウスに対する連続投与実験を行った． 50 μg/mouse siRNA 相当量の MEND の 4 週間における連続投与の結果，高脂肪食摂取マウスの体重増加抑制及び食後血糖値の低下，さらに糖負荷試験時の耐糖能の改善が認められた．本キャリア投与時に肝臓の FoxO6 mRNA 発現抑制が生じることはすでに確認済みであるため，これらの改善効果は，FoxO6 のノックダウンによる糖質代謝及びインスリン抵抗性の改善に由来するものだと考えられる．また，肝臓・脂肪に対して肉眼所見では改善傾向が認められたが，個体間でのばらつきが大きく，数値化した際の有意差は得ることができなかった．今後，肝臓や脂肪組織でのノックダウン評価を行うとともに，糖質・脂質及びインスリン代謝に対する影響を定性かつ定量的に評価することで，MEND 投与による各組織に対する糖尿病改善効果を明らかとしていきたい．また，第二章では FoxO6 の欠損が肝臓及び脂肪組織でのマクロファージ浸潤抑制を介してインスリン抵抗性を改善することを述べたが，その際には全身欠損モデルを用いており，これらの効果は FoxO6 が全身で網羅的に欠損されているためである可能性を否定できない．現時点で FoxO6 の主な標的臓器は肝臓であると考えられており[6 8]，われわれの肝臓標的キャリアを用いて肝臓特異的に FoxO6 の発現抑制を行った場合の，脂肪組織への影響を解析することは，インスリン抵抗性と臓器間での情報伝達を明らかにする点で非常に重要なデータになると考えている（Fig.3-6）．なかでも，MEND 投与後における肝臓並びに脂肪組織でのマクロファージ浸潤抑制効果を見ることは必須の課題であり，早急に確認する必要がある．

以上をまとめると，本研究では肝臓標的キャリアによる糖尿病有用標的遺伝子 FoxO6 の発現抑制が，肝臓での糖新生抑制を介して糖尿病治療効果を誘起できる可能性を見出すことに成功した．今後の研究で本キャリアの糖尿病治療への有用性を証明することが期待される．

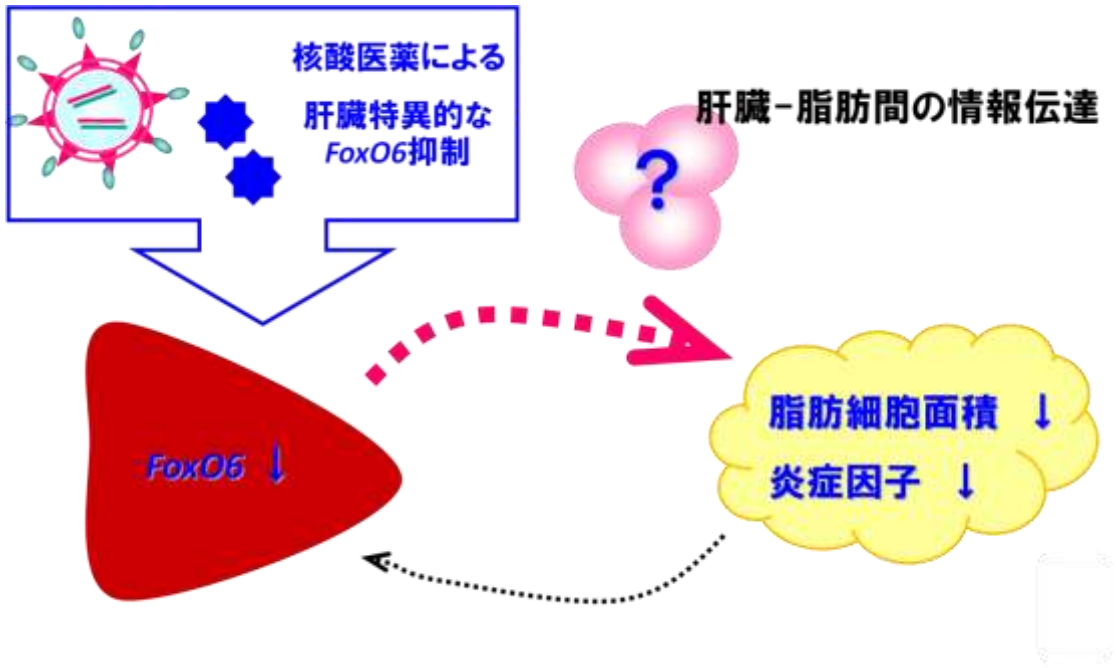


Fig.3-6 Liver specific Knock Down of FoxO6 mediated by YSK-MEND could find novel molecular mechanisms between liver- adipose interaction through insulin resistance:

We already reported that YSK-MEND can lead liver specific silencing of gene in mice. Our question is whether FoxO6 liver specific KD can affect adipose tissue such as reducing inflammation and adipose cell size.

結語

結語

本研究において, 2 型糖尿病分子メカニズムの解明と核酸医薬への展望に関する以下の知見が得られた.

1）FoxO6 の過剰発現は肝臓での MTP 活性を亢進し, VLDL-TG と ApoB 48 分泌を有意に促進させることで高トリグリセリド血症を誘発することを明らかとした.

2）FoxO6 の欠損は絶食時高血糖や高インスリン血症の改善をもたらすとともに, 食事由来のインスリン抵抗性や糖代謝異常を抑制可能であることを明らかとした.

3）FoxO6 siRNA 内封 YSK-MEND が, 肝臓 FoxO6 mRNA の発現抑制により糖新生抑制をもたらすことで, 高脂肪食由来肥満モデルマウスに対して糖尿病治療効果を誘起できる可能性を見出した.

本研究により, FoxO6 が 2 型糖尿病治療の有用標的遺伝子である可能性が強く示唆されたとともに, MEND を用いた本遺伝子の発現抑制が糖尿病治療に有用である可能性を示した. 本知見が今後の 2 型糖尿病研究並びに核酸医薬の開発に大きく貢献できることを期待し, 本稿を終える.

実験方法

１．実験材料

脂質・タンパク質関連

Cholesterol	AVANTI POLAR LIPIDS
Ethanol	ナカライテスク

緩衝液

HEPES	DOJINDO
PBS	ナカライテスク

キット

BCA Protein Assay Kit	PIERCE
High Capacity RNA-to-cDNA Kit (#4287406)	Applied Biosystems

細胞培養関連

L-Glutamine（100×）	Invitrogen
FBS,2.5%トリプシン溶液	Invitrogen
PBS (-)	Invitrogen
細胞培養用ディッシュ（10 cm）	Falcon
コニカルチューブ（15 mL,50 mL）	Falcon
CELL SCRAPER	IWAKI
Collagenase （#034-10533）	SIGMA
Trypson inhibitor,from Glycine max (soybean) （#T9128-500MG）	SIGMA
William's E medium	SIGMA

siRNA

Luc

Sense: 5'- GCGCUGCUGGUGCCAACCCTT -3'

Anti-sense: 5'-GGGUUGGCACCAGCAGCGCTT -3'

FoxO6

Sense:5'-CCAAGUUCCUGCGCAUCAATT-3'

Anti-sense: 5'-UUGAUGCGCAGGAACUUGGTT -3'

その他

96 well plate	CORNING
DEPC処理水	ナカライテスク
SYBR Green Realtime PCR Master Mix	東洋紡績株式会社
TRIZOL regent（#15596-026）	Invitrogen
Hoechst 33342（#346-07951）	DOJINDO
RiboGreen（#P11495）	Invitrogen
TritonX-100	SIGMA

2. 実験機器

測定機器

1420 Multilabel Counter VICTOR3	Perkin Elmer
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems
Spectrophotometer DU 640B	Beckman
Zeta Sizer（Nano-ZS）	Malvern
吸光光度計（DU-700）	Beckman
リアルタイム定量PCR（Mx3000P QPCR System）	Agilent Technologies

培養関連

クリーンベンチ（NS-13B）	BIOLABO
クリーンベンチ（VG-1304L）	AIRTECH
自動炭酸ガス細胞培養装置（BNA-111）	ESPEC
自動炭酸ガス細胞培養装置	SANYO
自動炭酸ガス細胞培養装置	NAPCO
恒温振とう培養機（BR-11UM）	TAITEC
恒温振とう培養機（BR-11FM）	TAITEC

遠心関連

Centrifuge 5415R	Eppendorf
小型遠心機（CHIBITAN-R）	Millipore
低速冷却遠心機（CF7D2）	HITACHI

その他

THE BELLY DANCER（#4702610）	Stovall Life Science
Power Pac Basic（#EPS 1001）	BIO-RAD
ボルテックス（VORTEX-GENIE2）	Scientific Industries

pH メーター（Docu-pH Meter） **satorius**
ホモジナイザー（POLYTRON） **KINEMATICA**

3. 試薬調製

10 mM HEPES buffer（HB）の調整

HEPES（DOJINDO）119.2 mg を秤量し, DDW 40 mL に溶解後 1N NaOH で pH 7.4 に合わせた. これを DDW で 50 mL にメスアップし, 0.2 μm のフィルターろ過により滅菌した. （4 °C 保存）

4. 一般操作

統計解析

統計処理には Stat View software（Abacus Concepts,CA）を用い, Student's t test あるいは,analysis of variance（ANOVA）による多重比較を行った. 実験データは, 3 匹（回）以上の実験値の平均値 ± 標準誤差で示した. $P<0.05$ の場合を有意差ありとした.

5. 第一章の実験

FoxO6-CA tg マウスを用いた動物実験

6 週齢の *db/db* マウス及び heterozygous *db/+* マウスは Jackson Laboratory （Bar Harbour, ME）より購入した. マウスは通常食及び水を自由に摂食・飲料できる 12 時間の明/暗期下で飼育した. FoxO6 トランスジェニックマウスは, 肝臓にて, 持続的に活性化した FoxO6-S184A （FoxO6-CA）アレルを発現している. また FoxO6 トランスジェニックマウスに関して, 本実験ではオスメスともに使用している. 血液学的検査に関して, マウスは 16 時間絶食させ, 尾静脈より採血後した. 血液は EDTA-K がコートされたキャピラリーチューブ（Sarstedt, Numbrecht, Germany） に回収した. また, 本動物実験はピッツバーグ大学の動物実験安全倫理に基づいて行った.

細胞培養実験

HepG2 細胞は American Type Culture Collection （ATCC, Virginia, USA）より購入した. 細胞は Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM, Lonza, Walkersville, MD）により培養し, FoxO6 アレルを持続的に活性化させるための Adv-FoxO6-CA ベクター及びコントロールとして Adv-Empty ベクターを導入した. FoxO6 選択的 RNAi 効果を誘導させる際には, Ad-FoxO6-shRNA ベクターを, またコントロールとして Ad-Sc-shRNA ベクターを導入した. Adv-Akt-CA は Akt を持続的に活性化させるための配列を有している. これらのアデノウイルスベクターは全て HEK 293 細胞を用いて精製した.

ヒト肝臓初代培養細胞を用いた実験

ヒト肝臓初代培養細胞はピッツバーグ大学における Tissue Cell Distribution System（NIH Contract HHSN276200017C）を介して以下のドナーから提供された．ドナーは 51 歳の女性であり，肥満や糖尿病の既往歴はない．細胞は 12 well のコラーゲンコートされたプレートに対して, 2 x 10^5 cells/well の濃度で播種した．

免疫沈降反応

肝臓 20 mg を,protease inhibitor cocktail （Pierce）を含んだ 400 µL の M-PER バッファー中でホモジナイズした．適量（500 µg）の肝臓タンパクを用いて, anti-FoxO6 または anti-PPARγ（Santa Cruz）抗体とインキュベーションした．続いて Protein-A-agarose 結合免疫沈降反応を行った．免疫沈降反応は PBS に Tween-20（最終濃度が 0.25 %）を混合した溶液を用いて洗浄し, anti- FoxO6 及び anti- PPARγ に対して免疫ブロットを行った．

RNA 抽出および qRT-PCR 実験

肝臓 20 mg または HepG2 細胞 （～2 x 10^6 cells）を用いて RNA 抽出を行った．抽出には RNeasy Mini Kit （QUIAGEN, Valencia, CA）を用いた. qRT-PCR は RNA 濃度測定後に，適量の RNA を用いて Roche Light Cycler-RNA amplification kit （Roche Diagnostics, Indianapolis, IN）により行った．使用したプライマーIntegrated DNA Technologies（Coralville, IA より購入）は以下の通りである．

FoxO6
Forward 5’-GAAGAGCTCCCGACGGAACG-3’
Reverse 5’-TTCAGCATCCACCATGAACT-3’

MTP
Forward 5′-TCCAGGGTGGTCTAGCTAT-3′
Reverse 5′-CCTTGTCCATCTGCATGCA-3′

ACOX-1
Forward 5′-TCCCGATCTGCGCAAGGAGC-3′
Reverse 5’-CTGGTGAAGCAAGGTGGGCA-3’

PPAR-α
Forward 5’-CCTGAACATCGAGTGTCGAATAT-3’
Reverse 5’-GGTCTTCTTCTGAATCTTGCAGCT-3’

PPAR- γ
Forward 5’-GGAATCAGCTCTGTGGACCT -3’
Reverse 5’-TGAGGCCTGTTGTAGAGCTG-3’

SREBP-1c
Forward 5’-GGAGCCATGGATTGCACATT-3’
Reverse 5’-GCTTCCAGAGAGGAGGCCAG-3’

CPT1
Forward 5’-GCACTGCAGCTCGCACATTACAA-3’
Reverse 5’-CTCAGACAGTACCTCCTTCAGGAA-3’

ACC
Forward 5’-TGACAGACTGATCGCAGAGAAAG-3’
Reverse 5’-TGGAGAGCCCCACACACA-3’

FAS
Forward 5’-GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT-3’
Reverse 5’-AGAGACGTG TCACTCCTGGACTT-3’

ApoB
Forward 5’-TGCGGACGCCGTTACTGCTG-3’
Reverse 5’-CAGATTTGGGGGACCTCCAG-3’

PGC-1ß
Forward 5’-GCTCTCGTCCTTCTTCCTCA-3’
Reverse 5’-GTAAGCGCAGCCAAGAGAG-3’

hPPAR-γ
Forward 5’-GACACAGAGATGCCATTCTG-3’
Reverse 5’-AGATGCAGGCTCCACTTTGA-3’

ß-actin
Forward 5’-CGGAATGTAGCAGCAGCTTCA-3’
Reverse 5’-GTCACTGATGCCTGAAATCAT-3’

***All primers were for mouse mRNA species except for the ones labeled with "h" for human mRNA species.**

免疫ブロット反応

HepG2 細胞 （～1 x 10^6 cells）を 2 µl の Halt Protease inhibitor cocktail （Pierce）を含んだ 200 µL の M-PER バッファー中でホモジナイズした. 続いて 13, 000 rpm で 10 分間遠心し, 上清サンプルを実験に用いた. また肝臓サンプル 20 mg に関しては, 4 µl の Halt Protease inhibitor cocktail（Pierce）を含んだ 400 µL の M-PER バッファー中でホモジナイズした. その後, 同様に遠心処理し, 得られたサンプルを 4-20 %の SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分離し, rabbit anti-FoxO6, anti-PGC-1ß, anti- PPARγ, anti-ApoB, anti-LPL, anti- HL, anti-MTP, anti-albumin または anti-actin 抗体を用いて免疫ブロットを行った. また, タンパク質のバンドはオートラジオグラフィーにより検出し, NIH image software により定量を行った.

リポタンパク質リパーゼの測定

マウス尾静脈より 300 IU/kg body weight のヘパリンを投与し, 10 分後に尾静脈より血液（20 µl）を回収した. リポタンパク質リパーゼ（LPL）活性は LPL activity kit（Roar Biochemical Inc., New York, NY）のプロトコロルに基づいて測定した.

VLDL-TG 産生量の測定

マウスを 16 時間絶食させ, TG クリアランスを阻害するための tyloxapol（1 g/kg, Sigma Aldrich, St. Louis, MO）を腹腔内投与した. 尾静脈より異なるタイムコースで血液（20 µl）を回収し, 血中 TG 量を測定した. VLDL-TG 産生量は肝臓 TG 産生量により補正することで算出した.

肝臓脂質量の測定

肝臓サンプル 20 mg を 400 µL の HPLC-grade acetone でホモジナイズした. 室温で一晩放置した後, 50 µL のサンプル上清を用いて Infinity triglyceride reagent（Thermo Electron）により TG 量を測定した. 肝臓脂質量は g あたりの肝臓タンパク量で補正することで算出した.

糞便中脂質量の測定

24 時間後の摂食及び絶食状態の個々のマウスから糞便を回収した. 150 mg の糞便を 400 µL の HPLC-grade acetone に溶解させた. 室温で一晩放置した後, 50 µL のサンプル上清を用いて Infinity triglyceride reagent（Thermo Electron）のプロトコルに従い, TG 量を測定した. 糞便中脂質量は g あたりの糞便中タンパク量で補正することで算出した.

リポタンパク質 FPLC 画分の抽出

FoxO6 及びコントロールマウスより回収した 400 µL の血清を two head-to-tail linked Tricon high performance SUperose S-610/300 GL カラムに滴下し，FPLC（GE HealthCare, Piscataway, NJ ）システムを用いてリポタンパク質画分を分けた. 溶出には PBS を用い, 0.25 ml/min の溶出速度で溶出した. その後 500 µl の抽出サンプルを用いて TG 濃度を測定した.

PPAR-γ 活性の測定

PPAR-γ 活性は, PPRE-dilected luciferase 活性を測定することで求めた. HepG2 細胞に *Firefly luciferase* を発現する PPREx3-TK-Luc（Addgene, Cambridge, MA）及び *Renilla luciferase* を発現する pGL4.75 （Promega, Madison, WI）を導入した後, Adv-Empty もしくは Adv-FoxO6 ベクターを 200 pfu/cell の濃度で導入した. 24 時間インキュベーションした後に細胞を回収し, dual luciferase activity assay を行った. PPAR-γ 活性は *Firefly* と *Renilla* luciferase 活性の比により算出した.

免疫沈降

Chromatin immunopercipitation （Chip）は, FoxO6 と MTP プロモーターDNA の分子間相互作用を検出するために行った. 肝臓サンプル （20 mg） を 1 % formaldehyde 溶液で 15 分間固定後, PBS バッファーで洗浄した. 次に 400 µl の肝臓サンプルを用いて anti-FoxO6 または control pre-immune IgG 抗体及び ChIP assay kit （Upstate Biotechnology）によりクロマチン免疫沈降反応を行った. 検出には PCR assay を用いた. 共免疫沈降 DNA の検出には, PPAR-γ プロモーター特異的なプライマーとして, mouse PPAR-γ promoter の proximal region (-693/-360 nt) を含む（ forward 5'-CATTCGCCTTCATAACATTC-3', reverse 5'- CTTGCTCCTCACAGCCGCT-3'）を用いた. また, off-target control として mouse PPAR-γ coding region （134/401 nt）を含む以下のプライマー（ forward 5'- GGAATCAGCTCTGTGGACCT-3', reverse 5'-TGAGGCCTGTTGTAGAGCTG-3'）を用いた. HepG2 cells （2 x 10^6 cells）に関して, Adv-FoxO6 vector （200 pfu/cell）を triplicate で導入し, 24 時間のインキュベーション後に細胞を回収した. その後 FoxO6 と PPAR-γ promoter DNA の分子間相互作用を検出するために, human PPAR-γ promoter の（-692/-437 nt）を含むプライマー（forward 5'-GATGGACAGCGTGGCAGGAA-3', reverse 5'-GATCGGTGGTGCTGCACACT-3'） を用いた. off-target として flanks the human PPAR-γ coding region (302/521 nt)を含むプライマー（ forward 5'-CTCCGTGGATCTCTCCGTAA-3', reverse 5'-CTTCTCAGAATAATAAGGTG-3' ） を用いた.

MTP プロモーター活性の測定

6 well プレートに播種した HepG2 細胞に 200 pfu/cell の Adv-FoxO6-CA または Adv-Empty ベクターを導入した. 続いて 2 μg の MTP プロモーター配列を有するルシフェラーゼ pGH11-WT （wild type）または pGH-11-MT（mutant）プラスミド DNA をトランスフェクションした. プロモーター配列を有していない pGL-3 プラスミド DNA はルシフェラーゼ活性のバックグラウンドを検出するためのコントロールとして用いた. また,*Renilla luciferase* を発現する pGL4.75 によりトランスフェクション活性を補正した. これらベクターを添加して 24 時間後の細胞を用いて, MTP プロモーター活性を測定した.

6. 第二章の実験

FoxO6-KO マウスを用いた動物実験

FoxO6 遺伝子はクロモソーム 4 に位置する. *FoxO6* 遺伝子の欠損に関しては, C57BL/6N マウス由来の FoxO6_BF6 胚由来ステムセルを用いて, UC Davis KOMP Repository （University of Calfornia Davis, CA）の協力のもと, *FoxO6* コーディング領域を除去した. *FoxO6* 遺伝子の欠損は以下プライマーにより, *FoxO6* 遺伝子のエキソン 1-2 間を検出することで確認した.

FoxO6-KO Forward ：5’-CAGGAGTAGCCGAGGGTTCC-3’
FoxO6 KO Reverse ：5’-AGCGGACCATCCAGTCGTAG3’

コントロールとして, *FoxO6* アレルに *LacZ* と *Neo* が挿入されていることを, 以下のプライマーを用いて確認した.

LacZ geneForward ：5’-GGTAAACTGGCTCGGATTAGGG-3’
LacZ geneReverse ：5’-TTGACTGTAGCGGCTGATGTTG-3’

Neo cDNA Forward ：5’-TTCGGCTATGACTGGGCACAACAG-3’
Neo cDNA Reverse ：5’-TACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTG-3’

FoxO6_BF6 胚由来ステムセルは BALB/c のブラストサイトにマイクロインジェクションし, 偽妊娠フォスターマウスに移植した. FoxO6 遺伝子を欠損させたキメラマウスは, C57BL/6 J バックグラウンドのマウスを用いて 7 系代まで交配させた. マウスは, 12 時間の明/暗サイクル下で無菌ケージに入れ, 通常食もしくは脂肪を 60 kcal %含む高脂肪食を与え, 水は適宜与えた. 血液化学検査を行う際には, 1 晩絶食させ, 尾静脈より EDTA カリウムでコートされた毛細採血管に採血した. 血中グルコースの測定にはグルコメーターを用い, 血清インスリン値の測定にはマウスインスリン酵素反応キットを用いた. インスリン抵抗性の指標として, HOMA-IR=（Fasting glucose （mmol/L）× Fasting Insulin （mU/L））

/22 を用いた. メスマウスの性ホルモンに由来する糖代謝変動を除外するため, 全ての動物実験はオスのマウスを用いた. また, 本動物実験はピッツバーグ大学の動物実験安全倫理に基づいて行った.

糖代謝試験

マウスを一晩絶食させ, 2 g/kg body weight のグルコースを腹腔内投与した.

ピルビン酸負荷試験

マウスを一晩絶食させ, 2 g/kg body weight のピルビン酸を腹腔内投与した.

インスリン負荷試験

Regular human insulin （Eli Lilly, Indianapolis, IN）を 1.5 IU/kg body weight を腹腔内投与した.

脂肪体積の測定

脂肪体積及び脂肪組織外体積は, EchoMRI-100 system （Echo Medical Systems, Houston, TX）を用いて測定した.

エネルギー代謝の測定

Oxymax Lab Animal Monioring System（Columbus Instruments, Columbus, OH）を用いて,マウスは飲食・飲水が自由にできる環境下で代謝ケージに個飼いした. 2 日間このケージで飼育した後, マニュアルに従い 48 時間をピリオドとし,酸素消費量と呼吸商を算出した.

マウス肝初代培養細胞

マウスの肝初代培養細胞は, CD1 マウスを用いて行った. CO_2 でマウスを安楽死させた後, 門脈より HBSS supplemented with EGTA （1 mM）を 10 mL 流し, 続いて EGTA-free HBSS を 10 mL, さらに HBSS supplemented with type 5 collagenase（1.95 mg/mL, Sigma）を 10 mL 流した. 肝臓を回収し, 細かく刻んで 37 °C で 10 分間インキュベートした. 細胞を HBSS 中に分散させ, 100 µm のナイロンメッシュに 3 回通した後, コラーゲンコートした 12 well プレートに dexamethasone, insulin, GA-1000 を添加した hepatocyte maintenance medium （LONZA）を用いて 2 x10^5 cells/well で播種した.

グルコース産生量の測定

マウス肝初代培養細胞をコラーゲンコートした 12-well プレートに 2 x10^5 cells/well の濃度で播種した. 24 時間のインキュベーション後に pre-warmed PBS で洗浄し, 1 mL ピルビン

酸を加えた glucose free glutamine containing DMEM を 2 mL を加えて 8-cpt-AMP（cAMP analog, 500 µL）及び dexamethason （100 µM）存在下もしくは非存在下で 6 時間インキュベートした. メディウムと肝初代培養細胞を回収し, glucose oxidase reagent（Sigma-Aldrich）を用いてメディウム溶液中のグルコースを測定し, 肝細胞のタンパク質量で補正した.

RNA の単離と qRT-PCR

RNA はマウス肝臓 20 mg 中より TRIZOL を用いて推奨プロトコルに基づいて抽出した. qRT-PCR は Roche Light Cycler-RNA amplification kit（Roche Diagnostics, Indianapolis, IN）を用いて絶対定量法により行った. 用いたプライマーを以下に示す.

FoxO1
Forward 5’- AAGAGCGTGCCCTACTTCAA-3’
Reverse 5’-CTCTTGCCCAGACTGGAGAG-3’

G6Pase
Forward 5’- TGCAAGGGAGAACTCAGCAA-3’
Reverse 5’-GGACCAAGGAAGCCACA-3’

PEPCK
Forward 5’- ATCCAGGGCAGCCTCGA-3’
Reverse 5’-AGCATTGCCTTCCACGAACT-3’

反応には, 適量（250 ng in 10 µl）の肝臓 RNA を用いた. RNA サンプルと 4 µl の LightCycler RT-PCR reaction mix SYBR green I, 2.5 µl の 25 mM $MgCl_2$, 2 µl の primer mix (25 µM の forward 及び reverse プライマーを用いた), 1 µl の RNase-free H_2O, 0.5 µl の LightCycler RT-PCR enzyme mix を最終溶液量が 20 µl になるようにキット内のキャピラリーチューブ内で混合した. また, 適量の denatured cDNA (~250 bp)を各プライマーごとに 0.3, 1, 3, 10, 30 ng の濃度で反応をかけ, 検量線をひいた. RNA を含まない混合溶液をネガティブコントロールとした. 全ての反応は RT を 55°C で 10 min, PCR 増幅反応は 1 cycle あたり（95°C を 30 s, 55°C を 10 s, 72°C を 14 s）を 30 cycles 繰り返した. cycle threshold（Ct）値は検量線と未知サンプルの濃度から算出した.

未成熟脂肪細胞の単離

脂肪組織を回収し, 細かく刻んだ. Collagenase 2（C6885, Sigma Aldrich）を含む 10 mL KRB（Kreb-Ringer bicarbonate, pH 7.4）を用いて 37 °C で 40 分間浸透し, 100 µm のナ

イロンメッシュに通した. 3, 000 rpm で 5 分間遠心し, 未成熟脂肪細胞を得た.

G6Pase 活性の測定

40 mg の肝臓組織を 400 µl の microsome buffer （20 mM Tris-Cl pH7.9, 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose）中でホモジナイズし, 4, 000 x g で 10 分間遠心した. 上清を回収し, 100, 000 rpm で 30 分間遠心した. 得られたペレット中の microsome を 500 µl の microsome buffer で再懸濁させた. 50 µl の microsomes （タンパク質量で 500 µg/mL）を 100 µl の G6Pase assay buffer （1 % Ammonium Molybdate solution made in 5 M H_2SO_4, 5 % Ferrous Sulfate Hepathydrate made in PBS）と混合し, 50 µl の glucose-6-phosphate （200 mM）を加えて最終量を 200 µl とし, 96 well の microplate を用いた. 同上の microplate に phosphorus solution （650 mM KH_2PO_4）と 100 µl の G6Pase assay buffer を用いて, Pi 濃度が 30-150 µM になるように 1 well あたり 200 µl で混合した. Pi 量は A660 nm で検出した. Negative control として, microsome を含まない well を 3 well 同じ plate 上で測定した. 37 °C で 15 分間インキュベートした後, 吸光度を測定した. G6Pase 活性は Pi 産生量（µmol）/unit time（min）/µg of cellular microsomes とした.

脂肪組織のパラフィン切片作製

マウスを安楽死させた後, 精巣上体白色脂肪組織を摘出し, 適量（15 mL チューブで 10 mL）の 4 % paraformaldehyde を用いて 4℃ で一晩振とう固定した. 固定サンプルを 1 X PBS を用いて 4 °C, 5 分間の振とう洗浄を 2 回行った. 続いて 50 % EtOh で 4 °C, 5 分間, さらに 70 % EtOh 4 °C, 5 分間の振とう洗浄をそれぞれ 2 回ずつ行った. 脂肪組織をパラフィン切片作製用カセットに入れ, 機械にかけた. なお, 機械にかけるまでの間はサンプルを 4 °C 70 % EtOh 中に保存した. 翌日, サンプルを機械から取り出し, パラフィン中に包埋した. 包埋後のサンプルは室温で保存した. また, 切片の作製には 6 µm の薄さになるように SHANDON FINESSE 325 （Thermo）を用いた. TISSUE FLOTATION BATH #3120071 （Thermo）に切片を浮かべてスライドグラスに移した後, SECTION DRYER #3120075 （Thermo）で一晩乾燥させた後, 染色までの間室温で保存した.

免疫化学検査

マウスを安楽死させた後, 肝臓組織を摘出し, 4 % paraformaldehyde で 4 °C 一晩固定後に 30 % sucrose で置換した. 凍結切片は MICROM HM 520 を用いて 6 µm で作成し, rat anti F4/80 抗体（Invitrogen）を用いて F4/80 を免疫した（50 倍希釈）後, 二次抗体に Cy3-conjugated donkey anti-rat IgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories）を用いて検出した（200 倍希釈）. 核は 4', 6-diamidino-2-phenylindole（DAPI, Sigma-Aldrich）を用いて染色した. 顕微鏡は Aviovert 200 fluorescent microscope （Zeiss, Oberkochen, Germany）を用いた. 脂肪組織は 10 %の formalin で固定後にパラフィンに包埋した. パラ

フィン切片は 6 µm で作成し, 一次抗体に rat anti F4/80 抗体を用い（30 倍希釈）, 二次抗体として biotynylated anti-rat IgG (BA-4001, Vector Laboratory) を用いた (300 倍希釈). F4/80 陽性細胞は Vectastain Elite ABC Kit（Vector Laboratory）を用いて検出した.

オイルレッド O 染色

100 % isopropanol を用いて 0.5 % Oil red O 試薬を調整し, 染色直前に MilliQ と 3:2 で混合した. 混合溶液を 20 分間室温で放置し, filter ろ過後にプラスチック容器に入れた. 凍結スライドサンプルを 30 分間, 調整した染色溶液に室温放置することにより染色した. 顕微鏡観察前に染色スライドサンプルを MilliQ で洗浄し, カバーグラスをかけて観察した.

7. 第三章の実験

マウスの飼育

C57BL/6J オス 6-10 週齢のマウス及び, CD1 オス 10 週齢のマウスはそれぞれ三協ラボサービス, ホクドーから購入し, 通常食を与えて任意の期間飼育した. DIO（diet induced obesity）マウスは C57BL/6J オス 4 週齢のマウスに HFD（D12492）を与え, 任意の期間飼育した.

血糖値の測定

Normal blood glucose は通常摂食下でマウス尾静脈より採血し, 血糖測定機器（Bayer: BREEZE2）を用いて血糖値を測定した. Fasting glucose においては, 12 または 16 時間絶食後に同様の方法で血糖値を測定した.

YSK-05 及び YSK-13 MEND の調製

10 mM YSK05 または YSK13, 10 mM Chol, 2 mM mPEG2k-DMG, 90% t-BuOH を 210 µL, 90 µL, 45 µL, 55 µL ずつ混合した. 2 mg/mL siRNA を用いて 1 本あたり 80 µg の濃度になるように siRNA 溶液をとり, DDW で 200 µL までメスアップした. これをボルテックスミキサーで撹拌した脂質溶液に全量滴下した. 1 mL シリンジ, 25 G 針を用いて全量回収し, 2.0 mL の 20 mM クエン酸バッファー（pH4.0）をボルテックスミキサーで撹拌しているところにゆっくり全量注入し, 粒子を形成させた. PBS （pH7.4）で希釈し, Amicon Ultra-15（MWCO 50 kDa）を用いて限外ろ過を 2 回行ない, 適当な容量となるように PBS（pH7.4）でメスアップした.

RiboGreen を用いた封入/回収率の定量

MEND 調製時に使用した 2 mg/mL siRNA 溶液を 10 mM HEPES buffer で 2000 倍希釈し, 1000 ng/mL とした. さらに 10 mM HEPES buffer で 2 倍の系列希釈を作製した. MEND

溶液は回収率 100%と仮定した時に 1000 ng/mL 以下の濃度となるように 10 mM HEPES buffer で希釈した（200 倍希釈）. 10 mM HEPES buffer,10 w/v % TritonX-100 と Ribogreen（Life Technologies）を混合することで 0.2% TritonX, 1/400 × Ribogreen とした. 蛍光測定用黒色 96-well plate（corning）上で, siRNA あるいは MEND 溶液と, Ribogreen 等の入った溶液を 100 μL ずつ混合し, 蛍光強度を測定した. siRNA の検量線から TritonX-100（±）における MEND 溶液中の siRNA 濃度を求め, それらの値から siRNA の濃度や回収率,封入率を算出した.

MEND 投与実験

CD1 または C57BL/6 J オスマウスの尾静脈から 0.5 ~ 2.5 mg/kg siRNA 相当量の MEND を投与した. 投与後任意の時間でエーテルよりマウスを処置した後, 心臓より採血し, 肝臓を摘出した. 肝臓重量を測定後, 肝臓全量を細かく切り刻み, 任意の量をエッペンチューブに入れて-80 °C または-20 °C 保存した. 高脂肪食マウスに対する投与実験では, 50 μg/mouse siRNA 相当量の MEND を尾静脈より投与した.

RNA 抽出

TRIZOL Reagent の推奨プロトコルに従い, RNA を抽出した. その後 RNA の濃度および OD 比 260/230, 260/280 を測定し, 逆転写反応に必要な RNA 量が得られていることを確認した.

逆転写反応

High Capacity RNA-to-cDNA Kit（Applied Biosystems）のプロトコルの一部を改変して逆転写反応を行った. 抽出した RNA 溶液を RNA 量が 250 ng ~1 μg となるようにとり, DDW で 4.5 μl とした. その後 5 μl の 2 x RT Buffer を加え, 65 °C で 5 min 熱変性させた. その後 4 °C に急冷させ 20x Enzyme を 0.5 μl 加えた. 25 °C で 5 min アニーリングさせた後 42 °C で 1 hr 逆転写反応を行った. その後 95°C で 5 min に保つことで反応を止め, 4 °C に急冷して cDNA 溶液を得た.

qRT-PCR

測定は Agilent Stratagene Mx3000P QPCR System で行った. また, 定量は SYBR Green を用いた相対定量法（ΔΔCt 法）を用いて, mRNA の定量を行った.

cDNA 溶液	2 μL
SYBER Green Realtime PCR Master Mix（TOYOBO QPK-201）	12.5 μL
20 μM F.P	0.25 μL
20 μL R.P	0.25 μL

上記 25 μL を調整し, Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System の推奨プロトコル

に従って行った.（95 °C　10 min 1 cycle, 95 °C　15 sec, 60°C　1min 40 cycle）

参考文献

参考文献

1. Atlas-poster-2014. *http://www.idf.org/diabetesatlas*.
2. Moller DE. New drug target for type2 diabetes. *Nature*. 2001;414:821-827
3. Campbell P. Obesity and diabetes. *Nature*. 2006;444
4. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005;22:674-682
5. Michael MD. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Molecular Cell.* 2000;6:87-97
6. Kim DH, Perdomo G, Zhang T, Slusher S, Lee S, Phillips BE, et al. Foxo6 integrates insulin signaling with gluconeogenesis in the liver. *Diabetes*. 2011;60:2763-2774
7. Bard JM, Charles MA, Juhan-Vague I, Vague P, Andre P, Safar M, et al. Accumulation of triglyceride-rich lipoprotein in subjects with abdominal obesity : The biguanides and the prevention of the risk of obesity (bigpro) 1 study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21:407-414
8. Kim DH, Zhang T, Lee S, Calabuig-Navarro V, Yamauchi J, Piccirillo A, et al. Foxo6 integrates insulin signaling with mtp for regulating vldl production in the liver. *Endocrinology*. 2014;155:1255-1267
9. Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: Advances in sirna delivery. *Nature reviews. Drug discovery*. 2009;8:129-138
10. Shim MS, Kwon YJ. Efficient and targeted delivery of sirna in vivo. *The FEBS journal*. 2010;277:4814-4827
11. Nakamura T, Yamazaki D, Yamauchi J, Harashima H. The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves alpha-galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2013;171:216-224
12. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (vldl) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2011;22:353-363
13. Marcoux C, Tremblay M, Fredenrich A, Davignon J, Cohn JS. Lipoprotein distribution of apolipoprotein c-iii and its relationship to the presence in plasma of triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Metabolism: clinical and experimental*. 2001;50:112-119
14. Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*. 2013;56:949-964
15. Farezon J. Structure and metabolic fate of triacylglycerol- and phospholipid-rich

particles of commercial parenteral fat emulsions. *Nutrition*. 1999;15:44-50

16. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*. 2014;2014:943162
17. Zhao Y, Wang Y, Zhu WG. Applications of post-translational modifications of foxo family proteins in biological functions. *Journal of molecular cell biology*. 2011;3:276-282
18. Haeusler RA, Kaestner KH, Accili D. Foxos function synergistically to promote glucose production. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285:35245-35248
19. Accili D, Arden KC. Foxos at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 2004;117:421-426
20. Gross DN, van den Heuvel AP, Birnbaum MJ. The role of foxo in the regulation of metabolism. *Oncogene*. 2008;27:2320-2336
21. Lu M, Wan M, Leavens KF, Chu Q, Monks BR, Fernandez S, et al. Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic akt and foxo1. *Nature medicine*. 2012;18:388-395
22. Kim DH, Zhang T, Lee S, Dong HH. Foxo6 in glucose metabolism (foxo6). *Journal of diabetes*. 2013;5:233-240
23. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. Foxo transcription factors; regulation by akt and 14-3-3 proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813:1938-1945
24. Kamagate A, Qu S, Perdomo G, Su D, Kim DH, Slusher S, et al. Foxo1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic vldl production in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118:2347-2364
25. 泉井 亮, 金田 研司. 人体の正常構造と機能 iv 肝・胆・膵. *日本医事新報社*. 2012;4:1-84
26. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114:147-152
27. Kamagate A, Dong HH. Foxo1 integrates insulin signaling to vldl production. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 2008;7:3162-3170
28. 加門 淳司, 山内 敏正, 寺内 康夫, 窪田 直人, 門脇 孝. Pparγとアディポネクチンによる糖・脂質代謝制御メカニズムの解明. *日本薬理学雑誌*. 2003;122:294-300
29. Matsumoto M, Han S, Kitamura T, Accili D. Dual role of transcription factor foxo1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116:2464-2472
30. Qu S, Altomonte J, Perdomo G, He J, Fan Y, Kamagate A, et al. Aberrant forkhead box o1 function is associated with impaired hepatic metabolism. *Endocrinology*. 2006;147:5641-5652

31. Ginsberg HN, Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein b metabolism. *Journal of lipid research*. 2009;50 Suppl:S162-166
32. Moran-Salvador E, Lopez-Parra M, Garcia-Alonso V, Titos E, Martinez-Clemente M, Gonzalez-Periz A, et al. Role for ppargamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25:2538-2550
33. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:34268-34276
34. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, et al. Liver-specific disruption of ppargamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111:737-747
35. Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, et al. Hepatic fatty acid transporter cd36 is a common target of lxr, pxr, and ppargamma in promoting steatosis. *Gastroenterology*. 2008;134:556-567
36. Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, et al. Increased expression of ppargamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;336:215-222
37. Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of ppar-gamma mrna expression in the liver of obese patients: An additional reinforcing lipogenic mechanism to srebp-1c induction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96:1424-1430
38. Risser TR, Reaven GM, Reaven EP. Intestinal very low density lipoprotein secretion in insulin-deficient rats. *Diabetes*. 1978;27:902-908
39. Avramoglu RK, Qiu W, Adeli K. Mechanisms of metabolic dyslipidemia in insulin resistant states: Deregulation of hepatic and intestinal lipoprotein secretion. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2003;8:d464-476
40. Edgerton DS, Johnson KM, Cherrington AD. Current strategies for the inhibition of hepatic glucose production in type 2 diabetes. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2009;14:1169-1181
41. Wahren J, Ekberg K. Splanchnic regulation of glucose production. *Annual review of nutrition*. 2007;27:329-345
42. Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efendic S, Brunengraber H, et al. Contributions by kidney and liver to glucose production in

the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*. 1999;48:292-298

43. Tonelli J, Kishore P, Lee DE, Hawkins M. The regulation of glucose effectiveness: How glucose modulates its own production. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2005;8:450-456
44. Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, Vuguin P, Chen W, Hawkins M, et al. Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:27758-27763
45. Massillon D, Chen W, Hawkins M, Liu R, Barzilai N, Rossetti L. Quantitation of hepatic glucose fluxes and pathways of hepatic glycogen synthesis in conscious mice. *The American journal of physiology*. 1995;269:E1037-1043
46. Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual review of physiology*. 1992;54:885-909
47. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through foxo1-pgc-1alpha interaction. *Nature*. 2003;423:550-555
48. Fisher SJ, Kahn CR. Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111:463-468
49. Edgerton DS, Ramnanan CJ, Grueter CA, Johnson KM, Lautz M, Neal DW, et al. Effects of insulin on the metabolic control of hepatic gluconeogenesis in vivo. *Diabetes*. 2009;58:2766-2775
50. Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Screaton RA, Jeffries S, et al. The creb coactivator torc2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*. 2005;437:1109-1111
51. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature*. 2008;456:269-273
52. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2003;284:E671-678
53. Zhang L, Rubins NE, Ahima RS, Greenbaum LE, Kaestner KH. Foxa2 integrates the transcriptional response of the hepatocyte to fasting. *Cell metabolism*. 2005;2:141-148
54. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. Foxo proteins in insulin action and metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005;16:183-189
55. Altomonte J, Richter A, Harbaran S, Suriawinata J, Nakae J, Thung SN, et al. Inhibition of foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic

mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2003;285:E718-728

56. Ayala JE, Streeper RS, Desgrosellier JS, Durham SK, Suwanichkul A, Svitek CA, et al. Conservation of an insulin response unit between mouse and human glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoters: Transcription factor fkhr binds the insulin response sequence. *Diabetes*. 1999;48:1885-1889

57. Streeper RS, Svitek CA, Chapman S, Greenbaum LE, Taub R, O'Brien RM. A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:11698-11701

58. Vander Kooi BT, Streeper RS, Svitek CA, Oeser JK, Powell DR, O'Brien RM. The three insulin response sequences in the glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter are functionally distinct. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:11782-11793

59. Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, et al. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase balpha and the forkhead transcription factor fkhr. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:36324-36333

60. Matsumoto M, Pocai A, Rossetti L, Depinho RA, Accili D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor foxo1 in liver. *Cell metabolism*. 2007;6:208-216

61. Rodgers JT, Haas W, Gygi SP, Puigserver P. Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis. *Cell metabolism*. 2010;11:23-34

62. Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, et al. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by fkhr (foxo1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:45276-45284

63. Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA, et al. Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of foxo1: Characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *The Biochemical journal*. 2004;378:839-849

64. Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, et al. Abnormal angiogenesis in foxo1 (fkhr)-deficient mice. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:34741-34749

65. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. *Journal of hepatology*. 2009;51:212-223
66. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112:1796-1808
67. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:175-184
68. Biddinger SB, Kahn CR. From mice to men: Insights into the insulin resistance syndromes. *Annual review of physiology*. 2006;68:123-158
69. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147:577-594 e571
70. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors rankl and osteoprotegerin. *Circulation research*. 2004;95:1046-1057
71. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine*. 2012;18:363-374
72. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, et al. Depletion of liver kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes*. 2010;59:347-357
73. Obstfeld AE, Sugaru E, Thearle M, Francisco AM, Gayet C, Ginsberg HN, et al. C-c chemokine receptor 2 (ccr2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes*. 2010;59:916-925
74. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. Ccr2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116:115-124
75. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans. *Nature*. 1998;391:806-811
76. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide rnas mediate rna interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411:494-498
77. Kogure K, Akita H, Yamada Y, Harashima H. Multifunctional envelope-type nano device (mend) as a non-viral gene delivery system. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60:559-571
78. Kogure K, Moriguchi R, Sasaki K, Ueno M, Futaki S, Harashima H. Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration

method. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2004;98:317-323

79. Kusumoto K, Akita H, Ishitsuka T, Matsumoto Y, Nomoto T, Furukawa R, et al. Lipid envelope-type nanoparticle incorporating a multifunctional peptide for systemic sirna delivery to the pulmonary endothelium. *ACS nano*. 2013;7:7534-7541
80. Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Akita H, Harashima H. Multifunctional enveloped nanodevices (mends). *Advances in genetics*. 2014;88:139-204
81. Yamauchi J, Hayashi Y, Kajimoto K, Akita H, Harashima H. Comparison between a multifunctional envelope-type nano device and lipoplex for delivery to the liver. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2010;33:926-929
82. Yamada Y. [development of the mito-porter, a nano device for mitochondrial drug delivery via membrane fusion]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2014;134:1143-1155
83. Hayashi Y, Yamauchi J, Khalil IA, Kajimoto K, Akita H, Harashima H. Cell penetrating peptide-mediated systemic sirna delivery to the liver. *International journal of pharmaceutics*. 2011;419:308-313
84. Sato Y, Hatakeyama H, Hyodo M, Akita H, Harashima H. [development of an efficient short interference rna (sirna) delivery system with a new ph-sensitive cationic lipid]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2012;132:1355-1363
85. Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, Tam YK, Chen J, Du X, et al. Maximizing the potency of sirna lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2012;51:8529-8533

謝辞

謝辞

本研究に従事する機会を与えて頂き，また，本研究を遂行するにあたり様々な面でのご指導, ご鞭撻を賜りました，北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室教授・原島秀吉先生に心より感謝致します.

I would like to express my sincere appreciation to Associate professor. H. Henry Dong,Rangos Research Center,Children's Hospital of Pittsburgh,University of Pittsburgh School of Medicine,for accepting me in his lab for one year and eight month and gave me wonderful opportunity to work on this thesis. I am really happy to get his whole hearted guidance and grateful suggestions at there.

本研究を遂行するにあたり，直接の御指導・御教示と数々の有益なる御助言，ならびに深い御理解を頂きました，北海道大学大学院薬学研究院　未来創剤学研究室特任准教授・梶本和昭先生に深く感謝致します.

本研究を遂行するにあたり，御指導・御教示と数多くの有益なる御助言を頂きました，北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室　准教授・秋田英万先生に深く感謝致します.

本研究を遂行するにあたり有益なる御助言や多くの励ましのお言葉を頂きました，北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室　助教・山田勇磨先生, 中村孝司先生，同未来創剤学研究室　特任助教・桜井遊先生，佐藤悠介先生に深く感謝致します.

本論文を審査して頂き，貴重な御意見を頂きました，北海道大学大学院薬学研究院　臨床病態解析学研究室　教授・武田宏司先生に深く感謝致します.

本研究を遂行するにあたり，実験手法の御指導のみならず，研究を行う上での心構えを御助言頂きました林康弘先生，兵藤守先生，畠山浩人先生並びに，大鵬薬品工業株式会社楠本憲司研究員に心より感謝致します.

I would like to thank to Dr. Virtu Calabuig-Navarro,Dr. Sojin Lee,Dr. Ting Zhang and Dr. Asako Tajima,Dr. Chiyo Shiota,Ms. Yun-Zi Liu for helping my lab work and also daily life in Pittsburgh. You all gave me continuous encouragement and grateful advice.

I really appreciate all the support which you gave me and I miss that lovely coffee/ lunch time with you all.

研究生活を送る上で，様々な面で支えて頂き，数え切れないくらいの思い出を共にしてきました，6 研のみなさま，並びに北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室の諸先輩, 後輩の皆さまに感謝致します.

最後になりましたが，長い学生生活の間，いかなる時も私を支えて下さった両親と二人の姉，そして友人に心から感謝致します.