

肥満とレプチンシグナル異常が生体内のケトン体利用に与える影響

Effect of obesity and leptin signaling on ketone body-utilization  
in brain and skeletal muscle

2011

成島 遼太

Ryota Narishima

## 目次

論文リスト	1
略語リスト	2
緒論	4
第一章	
ラット脳におけるケトン体利用に対する遺伝性肥満の影響	14
第二章	
骨格筋のケトン体利用に対する肥満及びレプチンシグナルの影響	33
第三章	
レプチンシグナルによる視床下部のケトン体利用の制御	49
総括	67
謝辞	69
引用文献	70

## 論文リスト

- 1) Ryota Narishima, Masahiro Yamasaki, Shinya Hasegawa and Tetsuya Fukui, Genetic obesity affects neural ketone body utilization in the rat brain, *Obesity*, **17**: 611-615 (2009)
- 2) Ryota Narishima, Masahiro Yamasaki, Saki Yoshida, Shinya Hasegawa and Tetsuya Fukui, Differential effects of two types of obesity on ketone body utilization in skeletal muscle, *Journal of Health Science*, **57**: 93-98 (2011)
- 3) Ryota Narishima, Masahiro Yamasaki, Shinya Hasegawa, Saki Yoshida, Shinya Tanaka and Tetsuya Fukui, Leptin controls ketone body utilization in hypothalamic neuron, *Neuroscience Letters*, in press.

## 略語リスト

本文中あるいは図表中で用いた略語は以下の通りである。

AACS: acetoacetyl-CoA synthetase

ACC: acetyl-CoA carboxylase

AICAR: aminoimidazole carboxamide ribonucleotide

AMP: adenosine monophosphate

AMPK: 5'-AMP-activated protein kinase

ARC: arcuate hypothalamic nucleus

ATP: adenosine triphosphate

BSA: bovine serum albumin

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

cRNA: complementary ribonucleic acid

dCTP: deoxycytidine triphosphate

DHEA: dehydroepiandrosterone

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

dNTP: deoxynucleotide triphosphate

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FBS: fetal bovine serum

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA

HMGCR: HMG-CoA reductase

HS: horse serum

IKK- $\beta$ : I-kappa B kinase- $\beta$

IRS-1: insulin receptor substrate-1

LR-b: leptin receptor-b

MCP-1: monocyte chemotactic protein-1

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1

PAS: periodic acid-Schiff

PBS: phosphate-buffered saline

PKC- $\theta$ : protein kinase C- $\theta$

PVT: paraventricular thalamic nucleus

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

SCOT: succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA transferase

SD: Sprague-Dawley

SDS: sodium dodecyl sulfate

SSC: saline sodium citrate  
(1 $\times$ SSC; 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate)

SSPE: standard saline phosphate EDTA

STZ: streptozotocin

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$

VMH: ventromedial hypothalamic nucleus

ZF: Zucker fatty

## 緒論

近年、先進国を中心に肥満とそれに伴う生活習慣病が社会的に大きな問題となっている。肥満は、一般的に正常な生理的状态と比較して体脂肪が過剰に蓄積した状態のことであり、体外からのエネルギーの摂取過剰や運動不足などのエネルギー消費不足によってもたらされる単純性肥満と、生体のエネルギー代謝系の異常や内分泌疾患の一部より引き起こされる症候性肥満に分類される。これら肥満の状態と、高血圧、高脂血症、糖尿病などが併発することにより、最終的に虚血性心疾患や脳血管疾患などの動脈硬化症疾患の発症基盤となるメタボリックシンドロームを発症することから、肥満が生体の各組織に与える影響は生理的・病理的な側面からも注目されている<sup>1)</sup>。また、全世界では男性の24%、女性では27%が肥満であること、さらにアジア諸国に比べると欧米諸国では肥満の人々の割合が高く、アメリカでは国民の30%以上が肥満であり、人種や食文化などの要因によりその発症率が増大することも統計的に明らかとなっている<sup>2)</sup>。このように、肥満が世界的な問題となっていることもあり、肥満の予防や治療は、生活習慣病の発症の防止や、虚血性心疾患や脳血管疾患等の致命度のより高い疾病の予防において非常に重要であると考えられている。

さらに最近の研究から肥満時には、単に脂肪細胞の肥大化や細胞数が増加するだけではなく、脂肪組織から産生・分泌されるアディポカインを始めとする生体のエネルギーホメオスタシスの維持に必要な生理活性物質の産生・分泌・細胞への取り込みや感受性に異常が引き起こされ、それに伴い脂肪組織以外の組織における様々なエネルギー代謝の異常が誘発されていることが明らかになりつつある。例えば、脂

肪組織より分泌されるレプチンの感受性は複数の組織で肥満時に低下することが報告されており<sup>3,4)</sup>、これにより脳中枢神経系では摂食やエネルギー代謝のシグナルに障害が生じると共に<sup>5)</sup>、エネルギー消費器官である筋肉においては脂質代謝の減少や異所性の脂質蓄積がおき、それに起因するインスリン抵抗性が惹起される<sup>6)</sup>。また、肥満時の血中遊離脂肪酸の上昇は、それ自体が筋組織などの糖・脂質代謝異常を起こす、いわゆる「脂肪毒性」を誘発することも示唆されている<sup>7)</sup>。

通常、脂肪酸は主にミトコンドリア内において $\beta$ -酸化により代謝され、acetyl-CoA となって TCA cycle に入る。しかし、この脂肪酸の代謝経路からはオキサロ酢酸は産生されず、脂質の $\beta$ -酸化が亢進すると一方的に消費されてしまうため、TCA cycle へ導入され得ない acetyl-CoA がミトコンドリア内へ蓄積する。この余剰な acetyl-CoA はケトン体へと変換されることでミトコンドリア外へ放出される。すなわち、糖尿病時や飢餓状態の様に、糖質の利用や供給が不十分で解糖系から TCA cycle に至る経路が機能しない場合、代償的に脂肪酸酸化が進み、この脂肪酸酸化によって過剰に生成された acetyl-CoA が acetoacetyl-CoA、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) を経てアセト酢酸となり<sup>8)</sup>、これがミトコンドリア外へ移行することで、ミトコンドリア内に acetyl-CoA が蓄積することが抑制されている (Fig 1)。このアセト酢酸より生じる $\beta$ -ヒドロキシ酪酸、およびアセトンの三種の化合物が生体に存在するケトン体であるが、アセトンはアセト酢酸からの非酵素的生成物であり、揮発性で呼気に排出されやすい。アセト酢酸と $\beta$ -ヒドロキシ酪酸はミトコンドリアで酵素的に相互変換されるが、代謝利用される形態はアセト酢酸である。アセト酢酸と $\beta$ -ヒドロキシ酪酸を合わせたものを総ケトン体と称する。重症な糖尿病患者

者では、過剰生成したケトン体により血液が酸性を呈するケトアシドーシスと呼ばれる状態になり、糖尿病性昏睡が引き起こされることが知られている。この様に発見当初にはケトン体は脂肪酸代謝の副産物、あるいは異常代謝によって生体に有害な影響を及ぼす不要の産物と考えられてきたため、その生理的役割について長い間ほとんど検討されることはなかった<sup>9)</sup>。

ケトン体の異化的代謝経路やエネルギー産生物質としての役割についての研究は 1960 年代以降に行われ始め、肝臓で産生されたケトン体が肝臓以外の組織において酸化されエネルギー源として利用されることが見出されて以来、その生理的意義に関する多くの研究がなされるようになった<sup>9)</sup>。特に、脳や筋肉組織においてケトン体は脂肪酸よりはるかに酸化されやすい事が報告されており、絶食や糖尿病などによる糖のエネルギー利用が不足した際にはケトン体がグルコースに代わるエネルギー源として重要な役割を果たしている可能性が示唆されていた<sup>10,11)</sup>。

肝臓以外の組織でケトン体をエネルギー源として利用する場合、まずアセト酢酸がその CoA エステルとなることにより活性化される必要がある。この活性化反応はミトコンドリア画分に存在する succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT: EC 2.8.3.5) によって触媒され、CoA の供与体として succinyl-CoA が利用されることが知られていた<sup>12,13)</sup>。この酵素の活性は個体の成長に応じて変動するが、栄養状態によっては変動しないことが知られている<sup>13)</sup>。従って、飢餓時にエネルギー源としてケトン体の利用が高まるのは血中ケトン体濃度の増加、すなわち基質量の増加によるものと考えられていた。

一方、ケトン体のエネルギー以外の利用系に関する研究も古くから



いくつか行われており、1950年代には Chen ら<sup>14)</sup>がラット肝臓のスライスを用いてアセト酢酸がコレステロールへ取り込まれる事を発見し、ほぼ同じ時期に Blecher ら<sup>15)</sup>によって同様の実験で脂肪酸にも取り込まれる事が報告されている。さらに、Stern らは鳩の肝臓ホモジネートを用いてアセト酢酸が ATP 及び CoA の存在下でクエン酸に変換することを発見した<sup>16)</sup>。肝臓にはアセト酢酸を酸化するための活性化酵素である SCOT が存在しないことから、それまでは肝臓はケトン体代謝においては、ケトン体の生成のみに寄与する臓器と考えられていたが、これらの知見により、肝臓に ATP エネルギーを用いてアセト酢酸を活性化する別の酵素が存在することが予想されることとなった。

1970年代以降には、ケトン体の同化的代謝経路と脂質合成における役割に関する研究も精力的に行われるようになったが、その過程において、1984年に福井、伊藤らによってラット肝臓のサイトゾル画分より acetoacetyl-CoA synthetase (AACS)が単離精製され、これが ATP のエネルギーを介してアセト酢酸に CoA を直接付加し(Fig. 2)、活性化する新規のリガーゼ(国際生化学連合の酵素委員会により新たな EC 番号として EC 6.2.1.16 として分類)であることが明らかとなった<sup>17)</sup>。それを契機に、それまでのケトン体のエネルギー利用に加えて、生体成分の合成原料としての利用に関する研究が注目されるようになった。

現在までに、ラット肝臓<sup>17,18)</sup>、脳<sup>19)</sup>、脂肪組織<sup>20)</sup>、乳腺<sup>21)</sup>、副腎<sup>22)</sup>、マウス肝臓<sup>23)</sup>、ヒヨコ十二指腸<sup>24)</sup>、種々の腫瘍細胞<sup>25)</sup>、において本酵素の存在が報告されている。また、本酵素の活性が SCOT とは異なりサイトゾル画分に局在し<sup>17)</sup>、新生仔の脳<sup>26)</sup> や授乳期の乳腺<sup>21)</sup> など脂質合成の高いと考えられている臓器に活性が高いこと、灌流肝<sup>27)</sup>や脳のスライス実験<sup>28)</sup>においてアセト酢酸が脂質に取り込まれてい

ることから、本酵素は脂質合成に密接に関係している可能性が考えられた。すなわち、生体内には SCOT を介したエネルギー源としてのケトン体利用経路と AACCS を介した合成基質としてのケトン体利用経路の 2 つが存在すると考えられた。

我々はさらに、ラットの肝臓において本酵素の活性、酵素タンパク質量が雄に比べ雌で高く、性差が存在することを明らかにしている。また、ラットの成長に伴い肝臓における本酵素のタンパク質量、酵素活性が変化すること、そしてタンパク質レベルでも酵素活性でも、雄では 4 週齢、雌では 6 週齢において、最も大きな値を示すことを明らかにした<sup>29)</sup>。生後すぐに、酢酸からコレステロールへの取り込みとコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA reductase (HMGCR) の活性が上昇することから<sup>30)</sup>、ラットの成長により本酵素が誘導されることは、肝臓でコレステロールなどの脂質を合成する時にケトン体を利用されている可能性が考えられた。

また、肝臓においてコレステロール低下剤である pravastatin (HMG-CoA reductase 阻害剤) 及び cholestyramine (陰イオン交換樹脂; 胆汁酸再吸収阻害を介してコレステロールを低下させる。) によって本酵素が誘導されることが知られている<sup>31, 32)</sup>。さらに、コレステロール合成の律速酵素である HMGCR が同様の条件下で誘導されることも報告されている<sup>33)</sup>。これらのことから、肝臓において本酵素を介するケトン体利用系はコレステロール合成経路に関連している可能性が考えられた。

このように、AACCS はケトン体であるアセト酢酸を acetoacetyl-CoA として活性化し、この acetoacetyl-CoA は脂質合成の基質となる可能性が強いと考えられることから、肝臓以外の他の脂質合成の盛ん

な組織での本酵素の役割を解明することは生体におけるケトン体の生理的意義を明らかにする上で重要であると言える。しかしながら、本酵素の肝臓以外での生理的な役割は明らかと言えないのが現状である。そのため、本酵素をタンパク質、活性のレベルに加えて遺伝子レベルで検討するために当教室において、pravastatin および cholestyramine を添加した飼料摂取により本酵素を誘導させたラットの肝臓から得た cDNA ライブラリーを用い、本酵素の cDNA をクローニングして、全翻訳領域を決定した<sup>31)</sup>。これにより本酵素の遺伝子レベルでの解析が可能となり、本酵素の遺伝子発現を検討したところ、肝臓以外にも脂質代謝の盛んな組織である脳、白色脂肪組織などで特に高発現していることが明らかとなった。

また、最近の当教室の研究により、AACCS の遺伝子発現が脂肪酸の合成とその蓄積を主な役割とする脂肪組織、特に皮下部脂肪組織においてレプチン受容体の遺伝子変異により遺伝性肥満を示す Zucker fatty rat では減少する一方で、高脂肪食摂取による食餌性肥満時には上昇することが明らかとなっている。すなわち、末梢組織における AACCS を介したケトン体利用への影響は、肥満の成因により異なる可能性が示唆されており<sup>34)</sup>、AACCS とケトン体が肥満と深く関わる可能性が考えられた。肥満はエネルギー摂取量が消費量に比べ過剰になった状態であり、多くの末梢組織で脂質代謝に異常が起きている。実際、脂質分解を主とする筋肉組織では、血中脂質の上昇によって異所的な脂質蓄積やそれに伴うインスリン抵抗性の惹起等<sup>35)</sup>、通常時の脂質消費とは異なる合成系の代謝異常とそれに伴う障害が生じている。また、脂質が $\beta$ -酸化により代謝される際に余剰の acetyl-CoA はアセト酢酸となることから<sup>8)</sup>、肥満時には筋肉組織からのケトン体産生も亢進して

いると考えられる。実際、運動や脂質の過剰摂取により血中ケトン体量が増加することから<sup>36)</sup>、肥満が筋肉細胞内におけるケトン体代謝にも大きく影響を及ぼしている可能性が考えられる。

さらに、ケトン体が糖と並び重要な栄養素となる組織である脳は、末梢組織からの様々な情報に応じて、全身のエネルギー収支のバランス調節を行っていると考えられており、この調節機構が乱れることが末梢組織における肥満による様々な悪影響に大きく関与していると考えられている<sup>37, 38)</sup>。当教室の研究より、脳における AACCS の遺伝子は、扁桃体、海馬、視床<sup>39)</sup>、及び中脳、橋・延髄、大脳皮質、小脳、視床下部<sup>40)</sup>などで特に強いことが明らかとなっている。また、streptozotocin (STZ)誘発 I 型糖尿病モデルラットにおいて、AACCS の遺伝子発現が脳全体で著しく減少する一方で、SCOT の遺伝子発現には変動は認められなかった<sup>40)</sup>。重度の糖尿病時には糖尿病性疼痛やうつ病様の神経障害が起きることが報告されているが<sup>41, 42)</sup>、脳内における 2 つのケトン体利用経路が糖尿病によって異なる影響を受けている可能性が示唆されたことから、神経系において AACCS を介したケトン体の生体物質の合成への利用が広く減少することが、これらの糖尿病時の神経障害と関係する可能性も考えられた。

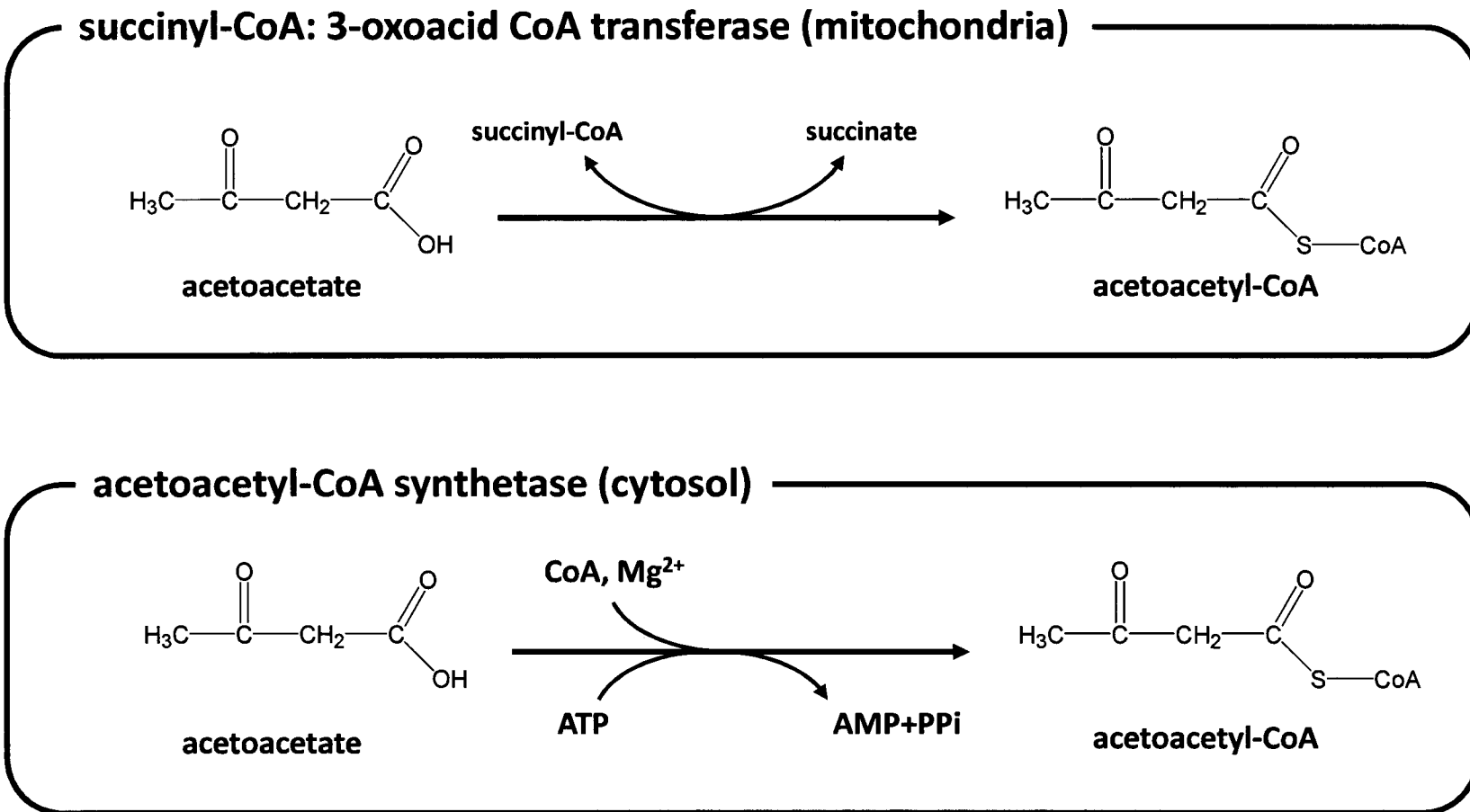
従来、ケトン体は生体であまり重要視されていない物質であった。しかし、ケトン体が血中に相当量存在し、その量が脂質を中心としたエネルギー代謝バランスに応じて大きく変化することと、当教室のケトン体利用酵素、AACCS の研究により得られた様々な知見とを合わせて考えると、ケトン体が生体の脂質を消費する組織エネルギー代謝と、その中枢性の制御において生理的にも病的にも重要な因子である可能性が考えられる。従って、全身のエネルギー消費の大部分を占め生

体内のエネルギー恒常性において特に重要な役割を担う筋肉組織や、末梢組織からの液性因子やシグナル並びに交感神経系を介してエネルギー代謝調節を行っている中枢神経系におけるケトン体利用と、エネルギー代謝状態に異常をきたしている肥満の関連性の研究を行うことは、生体における新たな代謝経路の生理的意義の解明だけでなく、疾患研究を行う上での新規なターゲットのスクリーニングの点からも重要であると考えられる。

以上のことを踏まえ、本研究では肥満とそれに伴う代謝変化が脳内並びに筋肉組織のケトン体利用酵素の遺伝子発現及びケトン体を中心とする脂質代謝に関わる酵素の発現に及ぼす影響を検討した。



**Fig. 2 Reaction of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA transferase and acetoacetyl-CoA synthetase**



## 第一章

### ラット脳におけるケトン体利用に対する遺伝性肥満の影響

#### 1. 緒言

緒論で述べたように、肥満時には生体内の様々な生理活性物質の代謝異常が誘発される。例えば、肥満により肥大化した脂肪細胞から **monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)** が大量に発現・分泌され、マクロファージが脂肪組織に浸潤し、肥大化した脂肪細胞と相互作用することによって **tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )** や **plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)** の分泌・産生を増加させる<sup>43)</sup>。増加した TNF- $\alpha$  はインスリンによる糖取り込みの抑制や血中遊離脂肪酸の増加を導き、骨格筋や脂肪組織におけるインスリン抵抗性を惹起する<sup>44)</sup>。また、PAI-1 は線溶系を阻害し、血栓形成を促進すること<sup>45)</sup>が報告されており、心臓や脳における血管疾患のリスクを上昇させると考えられている。

また中枢神経系においても、レプチンなどの食欲抑制ホルモンを介した末梢組織に対してのエネルギー消費亢進や摂食行動へのシグナル伝達が減弱することにより、満腹感の低下による過食や、末梢組織である骨格筋における脂肪酸酸化の抑制を引き起こすと考えられている<sup>46)</sup>。

酸化による脂肪酸の消費は主にミトコンドリア内で $\beta$ -酸化によって行われているが、その際余剰な脂肪酸はケトン体へと代謝される。このことから、緒論でも述べたように、ケトン体は脂質代謝が亢進することによって生じる副産物であると考えられていた。しかし近年、ケ



トン体が様々な組織でエネルギーとして積極的に利用されることが明らかになっている<sup>9)</sup>。特に、脳においてはグルコースが主なエネルギー源として知られているが、飢餓時や糖尿病時などグルコースの利用が損なわれたときに、ケトン体が代替エネルギーとして積極的に使われることが知られており、ケトン体が糖質に並ぶ重要な栄養素として考えられるようになりつつある。

ケトン体を細胞のミトコンドリアでエネルギー源として利用する経路で働く酵素である SCOT はアセト酢酸への CoA 転移を触媒し、活性化することにより、ケトン体を ATP 産生に再利用させると考えられている<sup>12,13)</sup>。一方、当教室で単離した AACCS は様々な組織のサイトゾル分画に存在し、アセト酢酸を acetoacetyl-CoA に活性化し(Fig. 2)、同じサイトゾルに存在する脂肪酸合成やコレステロール合成へケトン体を再利用する際に働く酵素であると考えられている。従って、AACCS は従来から知られているミトコンドリアの SCOT を介したエネルギー利用経路とは異なり、脂質合成へのケトン体の利用を促す重要な酵素であると考えられる。実際、我々は AACCS が脂肪組織、肝臓、脳といった脂質代謝が盛んな組織に高発現していることを明らかにしているが、特に脳は脂質そのものが血液脳関門を通らないこともあり、ケトン体が特に重要な栄養素となる組織であることから、AACCS が脳の脂質代謝において重要な役割を担っている可能性が考えられる。

脳における AACCS の遺伝子発現は、矢状切片を用いた当教室の大貫らの研究により、大脳皮質・海馬・視床下部などで高発現していることが明らかとなっており、その発現パターンは SCOT とは異なり、コレステロール合成の律速酵素である HMGCR と類似していた<sup>40)</sup>。

しかし、第三脳室周辺部を中心とした脳の中央部における AACCS の

遺伝子発現は未だに明らかになっていない。第三脳室とは、髄液で満たされた脳室系を構成する一つであり、グルコース、脂肪酸、ホルモン、神経内分泌因子、そしてケトン体のような多くの生理活性物質や栄養因子を含む脳脊髄液の通り道であることから<sup>47)</sup>、脳脊髄液中の液性情報がこの領域を介して脳内の神経系に影響を与えている可能性が考えられる。このことから、第三脳室周辺部における AACS の遺伝子発現を調べることは、この領域での脂質代謝を明らかにする上で重要であると考えられる。そこで、脳冠状切片を用いて、AACS の遺伝子発現分布の検討を行った。

また、肥満時には筋肉や脂肪組織などの末梢組織で脂質代謝に異常が起きているだけでなく、中枢神経系においてもエネルギーホメオスタシスの維持に重要な役割を担っているシグナル伝達に異常が起きていることから、肥満による影響を受けていると考えられている<sup>48)</sup>。この末梢と中枢を結ぶ因子の一つであるレプチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、摂食中枢のある視床下部のレプチン受容体を介して食欲抑制やエネルギー消費を促すと考えられている<sup>49,50)</sup>。レプチン受容体に異常があり、肥満を示すモデル動物として Zucker fatty (ZF) rat が知られている<sup>51,52)</sup>。ZF rat は、レプチン受容体遺伝子の点変異により、受容体を介したシグナル伝達が正常に伝わらないため、食欲亢進による摂食量の増加と筋組織を中心としたエネルギー消費の減少により全身のエネルギーバランスが破綻して肥満を示す遺伝性肥満モデルラットである<sup>52,53)</sup>。また、高インスリン血症を呈している一方で、血中グルコース濃度には変化が見られないことが知られている<sup>51)</sup>。さらに、ZF rat の血中ケトン体濃度は、肝臓においてケトン体産生と $\beta$ -酸化が重度に障害されているため、通常群(Zucker lean rat)に比

べ低い値を示す<sup>54)</sup>。現在までに当教室では、この ZF rat において、末梢組織である皮下部脂肪組織で AACCS の遺伝子発現が減少する一方で、SCOT の遺伝子発現は変動しないことを明らかにしている<sup>34)</sup>。興味深いことに、ZF rat における AACCS の遺伝子発現は、レプチンシグナルを介して脂肪酸の $\beta$ -酸化を制御している acetyl-CoA carboxylase (ACC)-2 の遺伝子発現プロフィールに類似していた<sup>34,55)</sup>。脂肪酸の $\beta$ -酸化はケトン体産生の増大をもたらすことから、レプチンシグナル不全による影響を ACC-2 と AACCS が共通して受けている可能性も考えられた。

これらのことより、末梢組織で見られた AACCS によるケトン体利用の肥満による影響が、中枢神経系でも起きている可能性が考えられた。そこで、ZF rat の各脳領域における AACCS の遺伝子発現を通常群と比較し、肥満による影響があるかどうかと肥満による影響に領域特異性があるかを合わせて検討した。

## **2. 試薬及び方法**

### **2.1. 実験動物**

8 週齢の雄性 Zucker 系の肥満型ラット(fatty: *fa/fa*)及び、痩せ型ラット(lean: *+/+*)を三協ラボサービス(Japan)から購入し、無菌的に搬出されたものを少なくとも 3 日間、環境に順応させたのち実験に供した。

本動物実験は、星薬科大学動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得た上で、動物に対する倫理面を十分に考慮し、使用動物数を最小限にして実験を行った。

### **2.2. 血中グルコース濃度の測定**

2.1.に従って飼育した個体より採取した血液を試料とした。 $\alpha$ 型グルコースをムタロターゼにより $\beta$ 型グルコースに変換し、すべて $\beta$ 型グルコースとして測定した。 $\beta$ 型グルコースをグルコオキシダーゼで酸化した際発生する過酸化水素を、ペルオキシダーゼの作用によりフェノールと 4-アミノアンチピリンの間で定量的に酸化縮合させ、生成した赤色の色素を波長 505nm で吸光度測定することで行った<sup>56)</sup>。試薬はグルコース CII-テストワコー(Wako, Japan)を用いた。

### **2.3. 血中総ケトン体濃度の測定**

2.1.に従って飼育した個体より採取した血液を試料とした。アセト酢酸の測定は、アセト酢酸を $\beta$ -ヒドロキシ酪酸脱水素酵素により $\beta$ -ヒドロキシ酪酸に転換する際、減少する NADH 量を波長 340nm で吸光度測定することで行った。 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の測定は、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸を $\beta$ -ヒドロキシ酪酸脱水素酵素によりアセト酢酸に転換する際、生成する NADH 量を波長 340nm

で吸光度測定することで行った。これらアセト酢酸量と $\beta$ -ヒドロキシ酪酸量をあわせて総ケトン体量とした<sup>57)</sup>。試薬はアセト酢酸の測定にはケトンテスト A「三和」(Sanwa Kagaku, Japan)を、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の測定にはケトンテスト B「三和」(Sanwa Kagaku)を用いた。

## 2.4. *In situ* hybridization 法

### 2.4.1. 新鮮凍結脳切片の作製

8週齢の雄性 Zucker 系ラットの肥満型ラット(fatty: *fa/fa*)及び、痩せ型ラット(lean: *+/+*)の脳組織を摘出し、ドライアイスパウダーで瞬時に凍結した。これを cryostat を使い、coronal 方向に 16 $\mu$ m の厚さでスライスし、ゼラチン及び poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, U.S.A.)でコーティングしたスライドグラスに貼り付けて作製した。

### 2.4.2. *In situ* hybridization 法に用いるプローブの作製

ラット肝臓から AACS 及び HMGCR、ラット脳から SCOT、ラット脂肪組織から ACC-1 の遺伝子をそれぞれの特異的プライマーを用いて RT-PCR により増幅、単離し、pGEM-T vector (Promega, U.S.A.)にサブクローニングした。そのプラスミドの SP6 または T7 領域付近を制限酵素消化して直鎖状にし、cDNA template を作製した。各遺伝子のプライマーは下記に示したものをを用いた。

rat AACS (2020bp)

sense: 5'-ATG TCC AAG CTG GCA CGG CT-3'

anti-sense: 5'-TTC AGA AGT CCT GCA GCT CA-3'

rat HMGCR (2351bp)

sense: 5'-ACG GTG ACA CTT ACT ATC TG-3'

anti-sense: 5'-ACC ATG TGA CTT CTG ACA AG-3'

rat SCOT (805bp)

sense: 5'-ATG ACG CCG CAG GGA ACG TT-3'

anti-sense: 5'-TGC ATT GCG CCG AGC ATC GT-3'

rat ACC-1 (1515bp)

sense: 5'-GTC CGT GTC TGA AGA CAA CT-3'

anti-sense: 5'-TCC TGA ACT GTT CCA GAG CT-3'

この cDNA template の目的配列と相補鎖となる方向の上流にある SP6 または T7 領域から polymerase を用いて切断面である下流に向かい 37°C、30 分 (T7 polymerase の場合) または 60 分 (SP6 polymerase の場合) の条件で転写反応を行い uridine 5'-[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] thiotriphosphate (PerkinElmer, U.S.A.) で標識した cRNA をそれぞれ生成した。反応物を 37°C、15 分で DNase と反応させて鋳型 DNA であるプラスミドを消化し、エタノール沈殿法により精製を行った。この精製物を 60 mM 炭酸ナトリウム、40 mM 炭酸水素ナトリウムにより 60°C、下記式に基づいた時間によってアルカリ水解を行い 200bp の長さの RNA を作製した。

$$X(\text{min}) = \frac{L_o \cdot L_f}{0.11 \times L_o \times L_f} \quad \begin{array}{l} L_o: \text{転写後の長さ} \\ L_f: \text{希望する長さ} \end{array}$$

合成した cRNA probe 溶液は液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、以降の実験に用いた。

### 2.4.3. *In situ* hybridization 法を用いた AACS, SCOT, HMGCR 及び ACC-1 遺伝子の脳組織における発現分布の検討

2.4.1. で作製した新鮮凍結脳切片を前処理として 4% formaldehyde solution で 15 分間固定し、1 mg/ml proteinase K (Sigma-Aldrich) solution で 10 分間消化後、acetylation buffer (10 mM triethanolamine、0.15 M NaCl、3 mM HCl、0.03 M acetic anhydride) 処理を 10 分間行ってアセチル化し、脱脂、脱水処理を行った。この切片を hybridization buffer (4 × SSC、20 mM dextran sulfate solution、50% formamide、2.5 × Denhardt's solution、5 mM EDTA、20 mM DTT、0.5 mg/ml tRNA、0.1 mg/ml salmon sperm DNA) で 55°C、1 時間 prehybridization した。その後、新たな hybridization buffer に前述の通り調製した uridine 5'-[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] thiotriphosphate (PerkinElmer) で標識した AACS, SCOT, HMGCR 及び ACC-1 遺伝子の cRNA probe を、放射活性が  $1.0 \times 10^7$  cpm/ml になるように加え、55°C で hybridization を行った。17 時間後、切片を 2×SSC で 4 回 wash し、40 $\mu$ g/ml RNaseA (Sigma-Aldrich) solution に 37°C、30 分反応させた後、再度 2×SSC 50% formamide で 2 回 wash した。この切片を BIOMAX MS Film (Eastman Kodak, U.S.A.) に 10 日間露光させてフィルムを現像した。さらにこれらの切片は autoradiography emulsion (Eastman Kodak) を用いた dipping 法による microautoradiography を行い、3 週間露光させ遺伝子発現を可視化した後、0.1 % cresyl violet (CHROMA-GESELLSCHAFT, Germany) 染色液で組織染色し、細胞観察を行った。

### 2.5. 統計処理

全てのデータは平均 $\pm$ 標準偏差(means  $\pm$  SEM)として表示した。平均値の有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。

### 3. 結果

#### **3.1. Zucker lean rat の脳冠状切片における AACCS mRNA の発現分布**

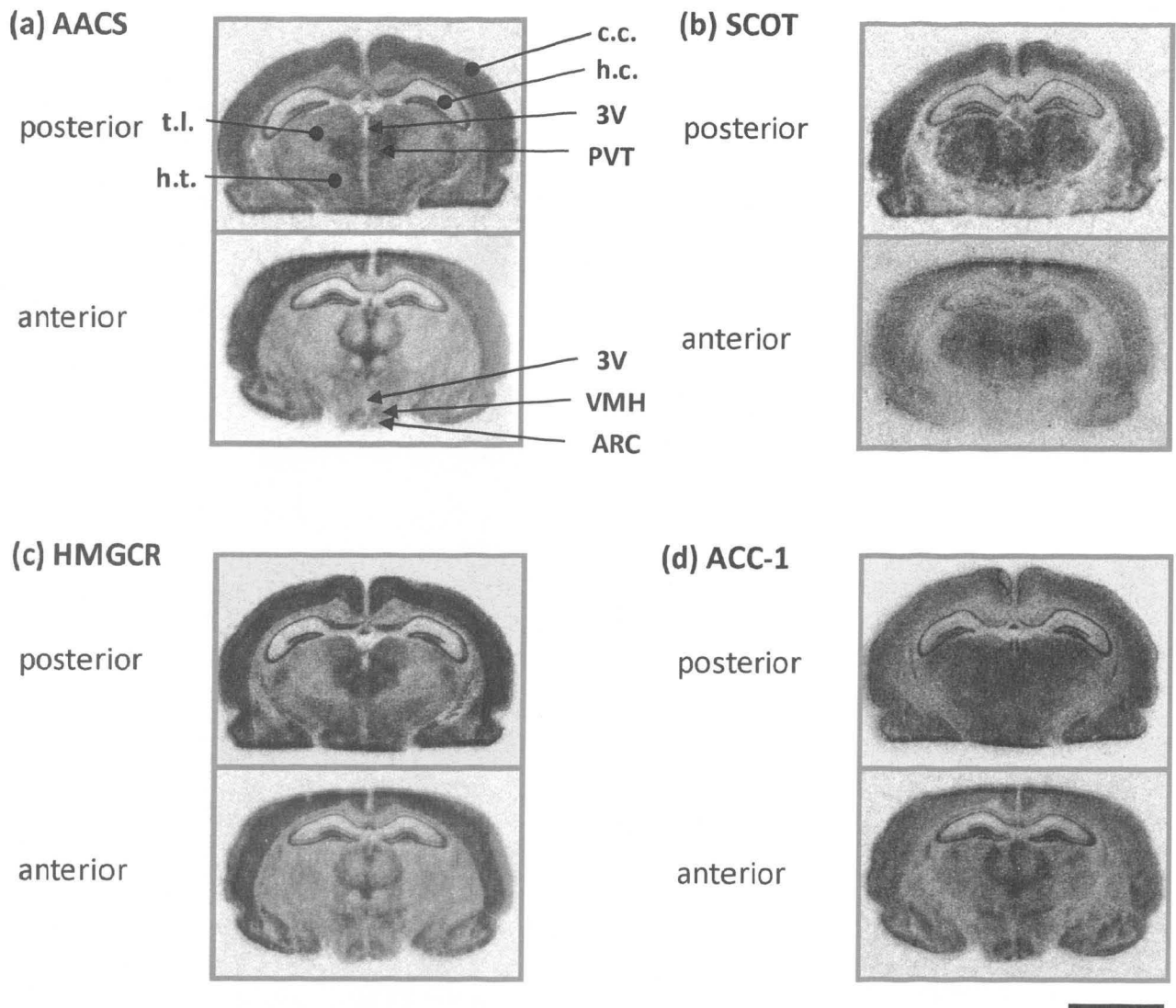
Zucker lean rat の脳冠状切片を作製し、*in situ* hybridization 法を用いて、AACCS の遺伝子発現分布の検討を行った。その結果、AACCS 遺伝子は既報と同じく大脳皮質、海馬、視床下部において強く発現していた。特に、視床下部においては、AACCS 遺伝子が、腹内側核 (ventromedial hypothalamic nucleus: VMH) 及び弓状核 (arcuate hypothalamic nucleus: ARC) で強く発現していることが新たに明らかになった (Fig. 3a)。また、興味深いことに、矢状切片では発現が弱いと考えられていた<sup>40)</sup>視床領域においても AACCS 遺伝子が局所的に発現していることが明らかになった (Fig. 3a)。特に、第三脳室周辺部である paraventricular thalamic nucleus (PVT) の後部で特異的に高発現していた (Fig. 3a)。これらのいずれの領域においても、AACCS 遺伝子は Nissl 染色で薄く染まる細胞に局在していたことから、AACCS は神経細胞に発現していると考えられた。また、AACCS の遺伝子発現分布を、ミトコンドリア内でケトン体をエネルギー産生系へと導く SCOT、コレステロール合成の律速酵素である HMGCR、及び脂肪酸合成の律速酵素である ACC-1 の遺伝子と比較した。その結果、AACCS の遺伝子発現分布は、視床の全領域で強く発現していた SCOT (Fig. 3b) や ACC-1 (Fig. 3d) の遺伝子発現とは明らかに異なる一方で、第三脳室周辺の局在が見られる HMGCR の遺伝子発現分布と類似していた (Fig. 3c)。また、SCOT 遺伝子の視床下部における発現は AACCS と比較して低いレベルでしか検出されなかった (Fig. 3b)。



### 3.2. ラット脳における AACCS の遺伝子発現に対する遺伝性肥満の影響

次に、ラット脳における AACCS の遺伝子発現に対する遺伝性肥満の影響を検討するために、遺伝性肥満を示す ZF rat の脳冠状切片を用いて、*in situ* hybridization 法により痩せ型同腹子である Zucker lean rat (通常群)における AACCS の遺伝子発現と比較検討した。

通常群と ZF rat の生理的パラメーターを Table 1 に示した。ZF rat の体重は通常群よりも顕著に高く、肥満を呈していた (Table 1)。また、血中ケトン体濃度は ZF rat で低値を示したが、血中グルコース濃度は正常な値を示した。次に、各種酵素の遺伝子発現に肥満に伴う変動があるかを調べたところ、ZF rat における AACCS の遺伝子発現は、PVT 領域で通常群と比較して有意に上昇していたが (Fig. 4a and 6a)、大脳皮質においては有意な変動は認められなかった (Fig. 6a)。対照的に、視床下部領域の VMH 及び ARC においては ZF rat では有意に減少していた (Fig. 4a and Fig. 6a)。一方、SCOT の遺伝子発現は ZF rat で PVT 領域でのみわずかに減少していたが、VMH 及び ARC 領域においては有意な変動は認められなかった (Fig. 4b and Fig. 6b)。また、HMGCR (Fig. 5a and Fig. 7a) 及び ACC-1 (Fig. 5b and Fig. 7b) の遺伝子発現は両群間でいずれの脳領域においても有意な変動が認められなかった。



**Fig. 3 Expression profiles of AACS and other enzyme mRNAs in coronal sections of Zucker lean rat brain**

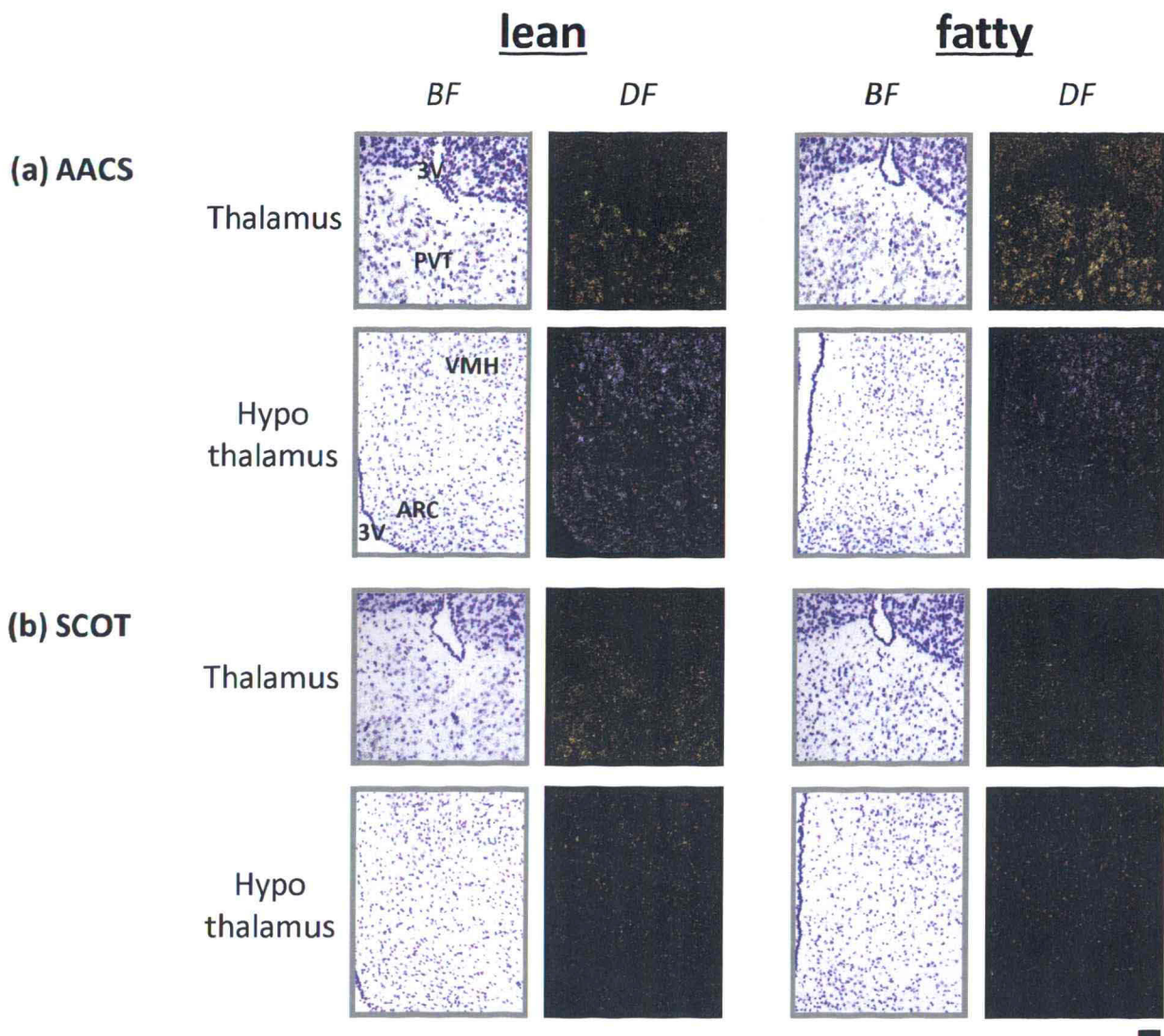
Coronal sections of anterior (lower panels) and posterior (upper panels) part of the cerebrum were prepared from adult male Zucker lean rats (8 weeks old). These sections were examined by *in situ* hybridization with a  $^{35}\text{S}$ -labeled AACS (a), SCOT (b), HMGCR (c) and ACC-1 (d) cRNA probes. Scale bar indicates 5.0 mm. The abbreviations are listed below.

c.c.: cerebral cortex; h.c.: hippocampus; t.l.: thalamus; h.t.: hypothalamus; PVT: paraventricular thalamic nucleus; 3V: third ventricle; VMH: ventromedial hypothalamic nucleus; ARC: arcuate hypothalamic nucleus.

Table 1 Body weight, plasma glucose, and plasma ketone body levels of Zucker lean and fatty rats

	lean (+/+)	fatty ( <i>fa/fa</i> )
Body weight (g)	211.8 ± 8.6	278.1 ± 12.5*
Plasma Glucose (mg/dl)	140.3 ± 19.0	152.5 ± 23.4
Plasma Ketone body: total (μmol/l)	365.1 ± 49.6	176.5 ± 55.1***
Plasma Ketone body: acetoacetate (μmol/l)	204.9 ± 35.8	63.3 ± 16.6***

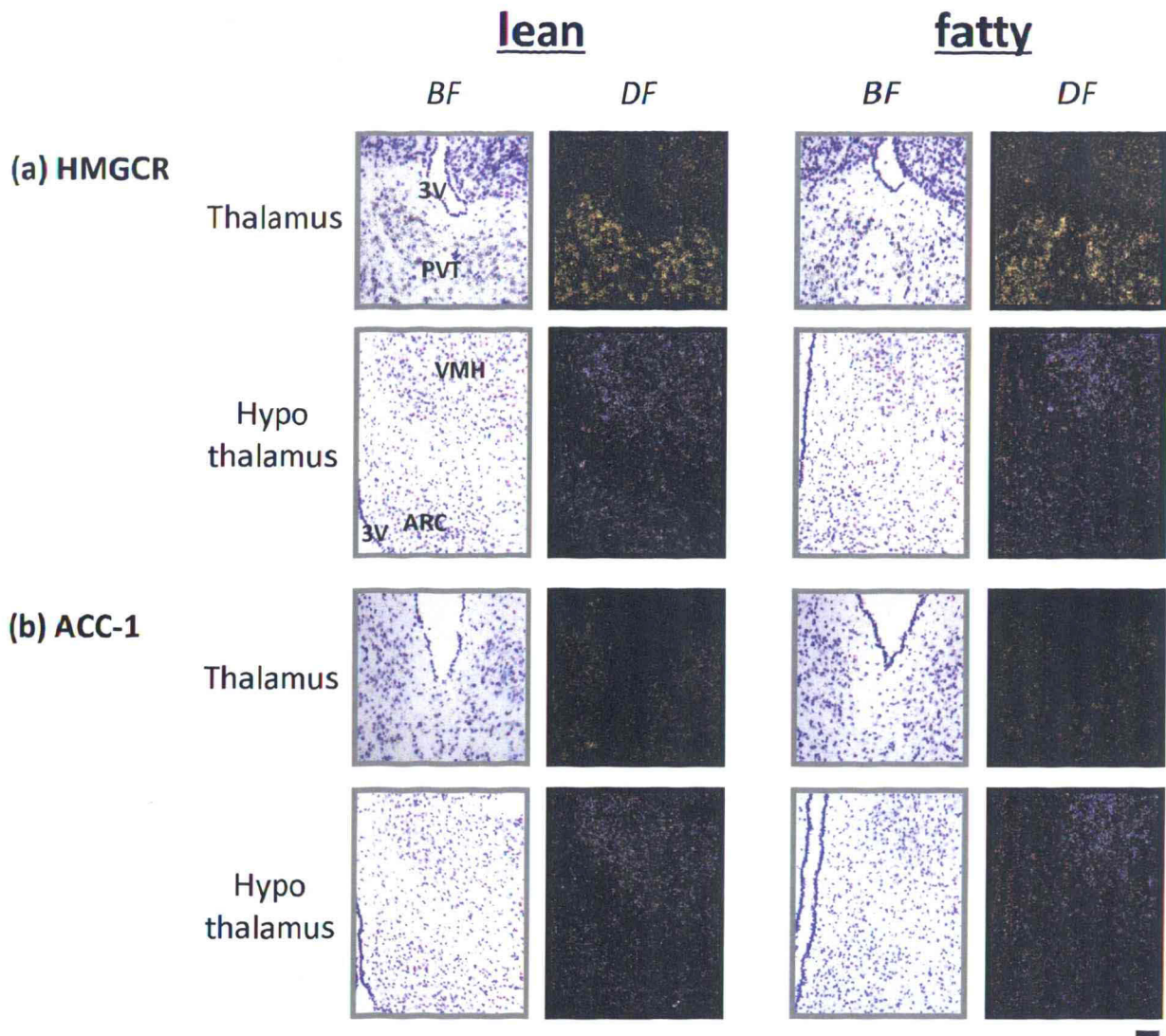
Values represent the means ± SEM (n = 6). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared with lean littermates.



**Fig. 4 Representative emulsions of sections hybridized to <sup>35</sup>S-labeled probes for AACCS and SCOT mRNAs in the thalamus and hypothalamus of genetically obese Zucker rats or their lean littermates**

Coronal sections from adult male Zucker fatty rats (right panels) and their lean littermates (left panels) were examined by *in situ* hybridization with <sup>35</sup>S-labeled AACCS (a) and SCOT (b) cRNA probes. These were dipped in liquid emulsion and stained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. Scale bar indicates 50 μm. The abbreviations are listed below.

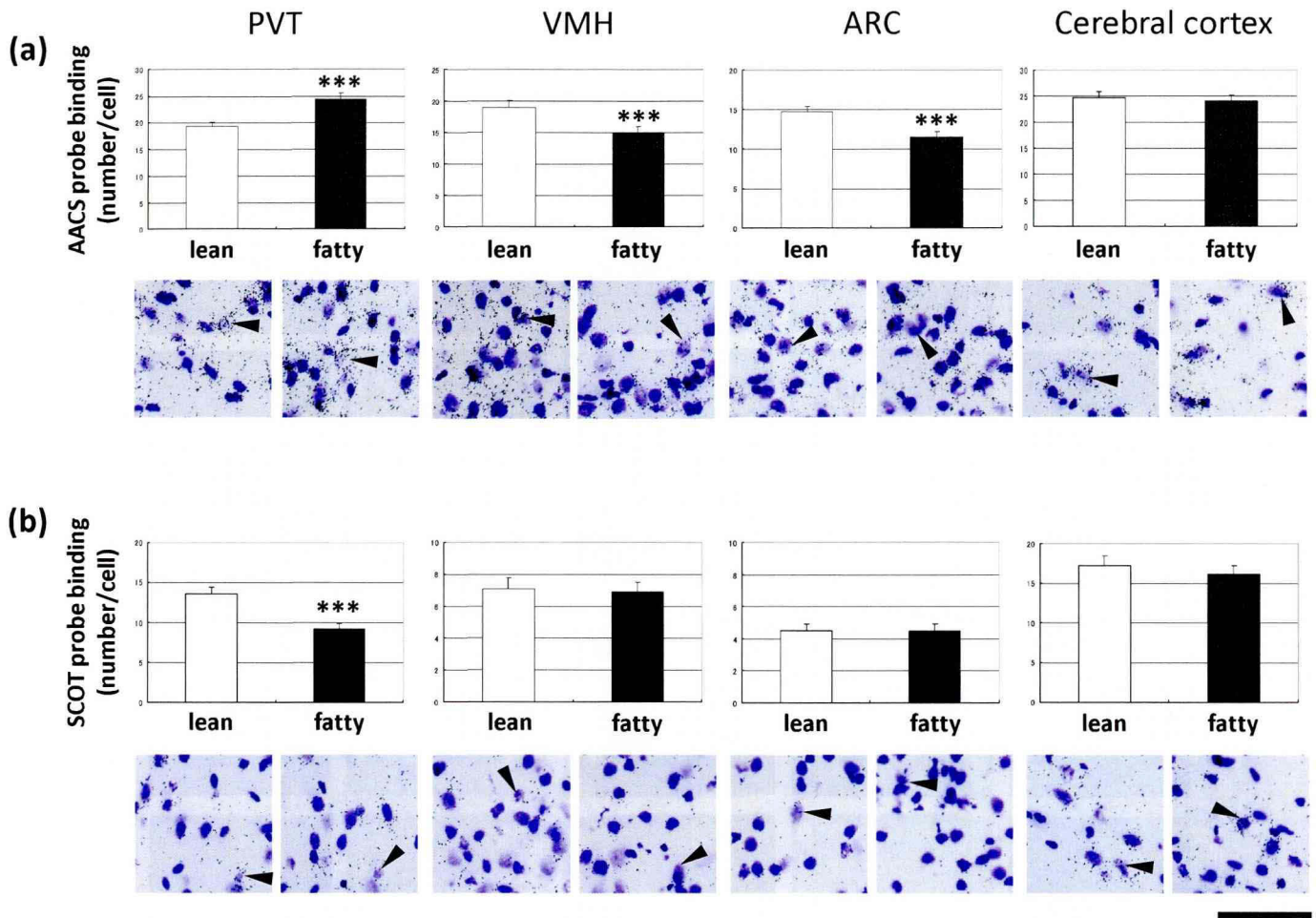
BF: bright field; DF: dark field; PVT: paraventricular thalamic nucleus; 3V: third ventricle; VMH: ventromedial hypothalamic nucleus; ARC: arcuate hypothalamic nucleus.



**Fig. 5 Representative emulsions of sections hybridized to  $^{35}\text{S}$ -labeled probes for HMGCR and ACC-1 mRNAs in the thalamus and hypothalamus of genetically obese Zucker rats or their lean littermates**

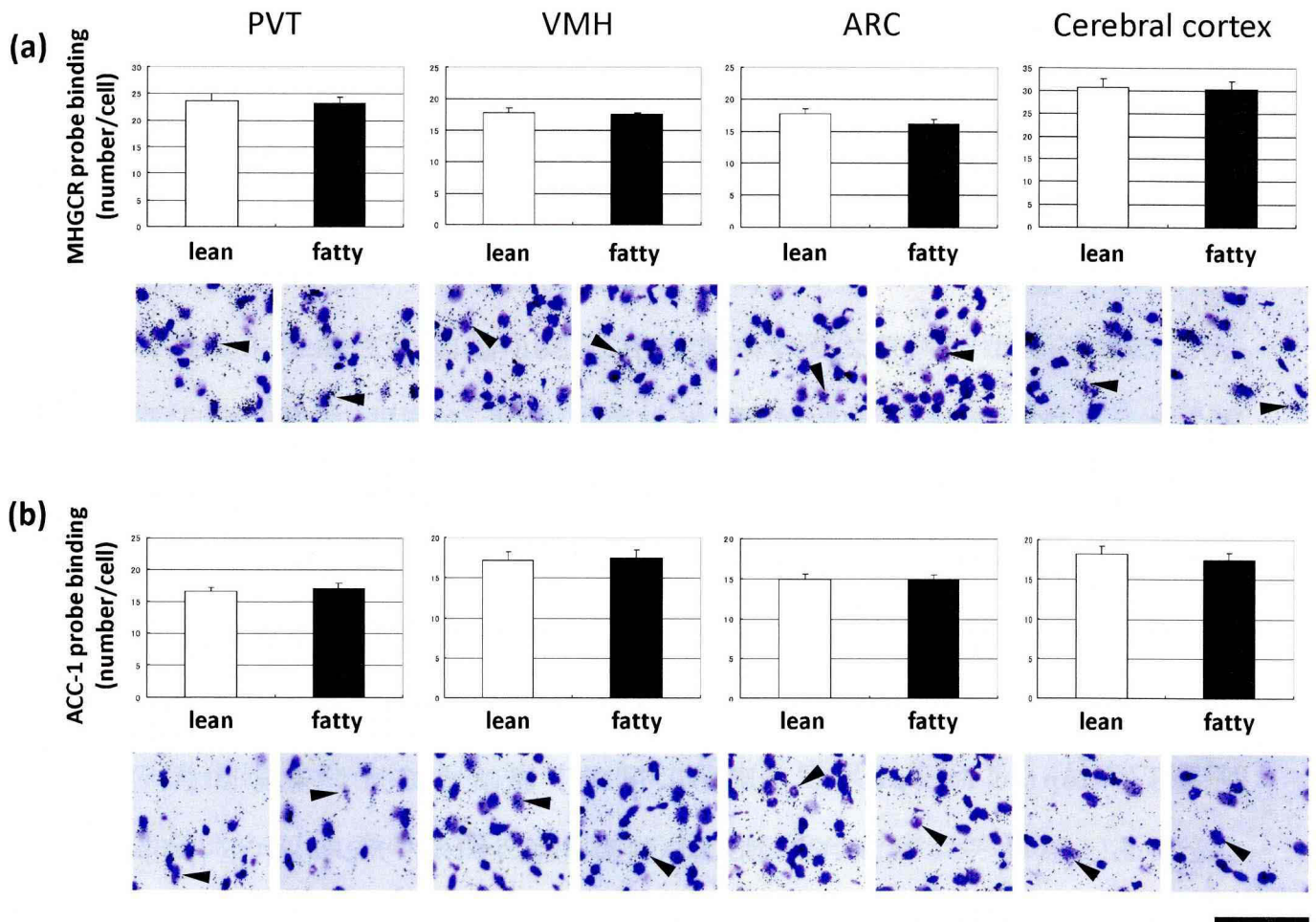
Coronal sections from adult male Zucker fatty rats (right panels) and their lean littermates (left panels) were examined by *in situ* hybridization with  $^{35}\text{S}$ -labeled HMGCR (a) and ACC-1 (b) cRNA probes. These were dipped in liquid emulsion and stained with cresyl violet after 3 weeks of exposure. Scale bar indicates 50  $\mu\text{m}$ . The abbreviations are listed below.

BF: bright field; DF: dark field; PVT: paraventricular thalamic nucleus; 3V: third ventricle; VMH: ventromedial hypothalamic nucleus; ARC: arcuate hypothalamic nucleus.



**Fig. 6 AACS and SCOT mRNA levels in the cerebral cortex, thalamus and hypothalamus of genetically obese Zucker rats**

Quantitative analysis of the radioreactivity of AACS (a) and SCOT (b) cRNA probes is shown in upper panels. The data are expressed as silver grain-numbers per cell. Each bar represents the means  $\pm$  SEM. Lower panels show microscopic views of the PVT, the VMH, the ARC and the cerebral cortex of Zucker fatty (right) and lean (left) rats. Filled arrows indicate neural-like cells. Scale bar indicates 50  $\mu$ m. \*\*\* $p < 0.001$  compared with lean littermates.



**Fig. 7 HMGCR and ACC-1 mRNA levels in the cerebral cortex, thalamus and hypothalamus of genetically obese Zucker rats**

Quantitative analysis of the radioreactivity of HMGCR (a) and ACC-1 (b) cRNA probes is shown in upper panels. The data are expressed as silver grain-numbers per cell. Each bar represents the means  $\pm$  SEM. Lower panels show microscopic views of the PVT, the VMH, the ARC and the cerebral cortex of Zucker fatty (right) and lean (left) rats. Filled arrows indicate neural-like cells. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

#### 4. 考察

本章の実験結果より、レプチン受容体の遺伝子異常により遺伝性の肥満を示す ZF rat の ARC 及び VMH において、AACCS の遺伝子発現が減少する一方で、SCOT の遺伝子発現は変動しないことが明らかとなった。ZF rat はレプチン受容体遺伝子の 806 番目のアデニンがシトシンへとミスセンス突然変異が起こっており、その結果、269 番目のアミノ酸がグルタミンからプロリンへと置換し、受容体からのシグナル伝達が正常に伝わらないため、摂食増加とエネルギー消費の減少によりエネルギーバランスが破綻して肥満を示す<sup>52,53)</sup>。この変異領域を含み、レプチン受容体の中でもシグナル伝達能を有するロングフォーム型受容体(leptin receptor-b: LR-b)は視床下部領域で強く発現していることから、食欲やエネルギー消費の制御を含むレプチンの中枢作用はこの領域にある LR-b を介して作用を示すと考えられている<sup>58,59)</sup>。AACCS の遺伝子が ARC ならびに VMH の両領域において強く発現し、かつ遺伝性肥満により領域特異的な発現抑制を受けていたことから、この領域では AACCS を介したケトン体利用経路がレプチンシグナルにより制御を受けていると考えられる。また、SCOT には肥満による影響が認められなかったことから、中枢性の食欲調節にはケトン体からのエネルギー産生ではなく、AACCS を介して合成された生理活性物質が関与する可能性が考えられる。

また、AACCS の遺伝子発現が ZF rat の PVT において増加する一方で、SCOT の遺伝子発現が減少することも明らかになった。PVT は、脳脊髄液の通り道である第三脳室に接している。脳脊髄液中の生理活性物質は、脳に分布する毛細血管から吸収されることが知られており、脳



脊髄液中には血中と比べると低濃度ではあるがケトン体や脂肪酸なども十分量含まれている<sup>60)</sup>。また、レプチンシグナルの伝達能を持つLR-bもほとんど発現していないことから<sup>61)</sup>、視床のこの領域においてはレプチンではなく、ケトン体などの循環血中から脳脊髄液に入る末梢の液性因子がAACS並びにSCOTの遺伝子発現を調節し、PVT領域における生理活性物質合成及びエネルギー産生の両経路に対するケトン体利用に影響を与えている可能性が考えられる。

また、BhatnagarらによりPVTの後部領域の破壊は摂食亢進、体重増加、エネルギー消費の減少を導くことが報告されている<sup>62)</sup>。さらに、PVTには視床下部の種々の領域からの求心性神経<sup>63)</sup>と、amygdalaなどへの遠心性神経が存在することから<sup>64)</sup>、脳幹や視床下部を通じた末梢の消化器情報やエネルギーの日内変動の情報を統合し、大脳辺縁系へと伝え、辺縁系の機能を調節する機能を担うと考えられている<sup>64)</sup>。このような中枢と末梢の情報が集積する領域で、肥満によりAACSの遺伝子発現が食欲を調節する視床下部領域とは対照的な変動をしていることから、肥満によるケトン体の基質としての利用の変動が、中枢と末梢の情報交換を介する生理活性物質の合成の異常を引き起こし、神経系の代謝性疾患の原因になる可能性も考えられる。

このケトン体から合成される生理活性物質として、コレステロールやその後の代謝産物であるニューロステロイドなどが考えられる。ニューロステロイドの作用として、学習や記憶、本能制御に関わっているという報告がある<sup>65,66)</sup>。従って、これらのニューロステロイドの作用がケトン体からAACSを介して合成される経路によって調節されており、視床・視床下部の機能と肥満による代謝変動の影響の原因となっている可能性が考えられる。また、肥満時にはAACSが領域特異的

な影響を受ける一方、HMGCR には影響が認められなかった。このことから、AACS を介して活性化したケトン体が、その代謝産物であるメバロン酸からのイソプレニル化などタンパク翻訳後修飾に向かっている可能性も考えられる。

このように、AACS は遺伝性肥満により中枢神経において領域特異的な影響を受けていることが明らかになった。このことは、AACS を介したケトン体代謝経路が組織やそれを構成する細胞ごとに独立した制御を受けること示唆している。そこで次章では、末梢組織における検討を行うことにした。

## 第二章

### 骨格筋のケトン体利用に対する肥満及びレプチンシグナルの影響

#### 1. 緒言

第一章において、AACS の遺伝子発現がレプチンシグナル不全による遺伝性の肥満において視床下部領域で特異的に減少することが明らかとなった。それに加え、当教室の以前の研究から、皮下部脂肪組織において高脂肪食を摂取させることによる食餌性肥満時に AACS の遺伝子発現が上昇し、一方でレプチンシグナル不全による遺伝性肥満時には減少することが明らかとなっている<sup>34)</sup>。このように、AACS は肥満で発現が変動するだけでなく、肥満を引き起こす原因の違いによっても影響が異なることから、AACS と肥満によるエネルギー代謝の変化やその増悪との間には深い相関関係があることが予想される。

また、我々は AACS 遺伝子が大腿筋等の骨格筋や心筋といった筋肉組織においても発現していることを確認している(未発表データ)。筋肉組織はグルコースや遊離脂肪酸を積極的に取り込み消費するエネルギー消費組織である。しかし、過栄養状態が持続することによりエネルギー系の代謝異常が生じ、組織内への異所的な脂質蓄積量の増大やそれに起因するインスリン抵抗性が惹起されることが知られている。その機序としては、各種炭素鎖長を持つ acyl-CoA や diacylglycerol 等の脂質代謝産物の筋細胞内における増加による I-kappa B kinase- $\beta$  (IKK- $\beta$ )、protein kinase C- $\theta$  (PKC- $\theta$ )といったセリン・スレオニンキナーゼの活性化、そして insulin receptor substrate-1 (IRS-1) のセリン残基のリン酸化が挙げられる<sup>67,68)</sup>。これらのことから、肥満やそ

れに伴う脂質代謝産物の量的変化に、当教室で主に検討してきた脂質合成の盛んな脂肪組織や肝臓だけでなく、脂質分解を主とする筋肉組織においてもケトン体利用経路と関係する可能性が考えられた。

さらに、レプチンを視床下部内に処置したときに骨格筋の 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK)が活性化される一方、交感神経切除によりその活性が抑制されることが報告されており<sup>69)</sup>、骨格筋のエネルギー代謝には視床下部からの中枢由来の神経シグナルが重要な働きを担っている。第一章に示したように、レプチンシグナル不全により視床下部における AACCS の遺伝子が特異的な発現変動を示したことから、筋肉組織においてもケトン体代謝が肥満並びにレプチンシグナル不全により影響を受ける可能性が考えられた。

そこで、本章では異なる成因による肥満が筋肉組織のケトン体代謝に及ぼす影響をケトン体利用酵素の遺伝子発現を解析することにより検討した。

## **2. 試薬及び方法**

### **2.1. 実験動物**

8 週齢の雄性 Zucker 系の肥満型ラット(fatty: *fa/fa*)及び、痩せ型ラット(lean: +/+)を三協ラボサービス(Japan)から、4 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD)系ラットを東京実験動物(Japan)から購入し、無菌的に搬出されたものを少なくとも 3 日間、環境に順応させたのち実験に供した。

本動物実験は、星薬科大学動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得た上で、動物に対する倫理面を十分に考慮し、使用動物数を最小限にして実験を行った。

### **2.2. ラットへの高脂肪食負荷**

4 週齢の雄性 SD 系ラットを一日絶食させた後、通常食(MF; 炭水化物 47.5%, 蛋白質 23.6%, 脂質 5.3%, Oriental Yeast, Japan)摂取群 と高脂肪食(F2HFD2; 炭水化物 7.5%, 蛋白質 24.5%, 脂質 60.0%, Oriental Yeast)摂取群とに分け、自由摂食下で 6 週間飼育した。

### **2.3. 血中グルコース濃度並びに血中総ケトン体濃度の測定**

2.2.に従って飼育した個体、及び 8 週齢の雄性 Zucker 系の肥満型ラット(fatty: *fa/fa*)並びに痩せ型ラット(lean: +/+)より採取した血液を試料とした。血中グルコース濃度並びに血中総ケトン体濃度の測定方法は第一章に記載した方法に準ずる。

## 2.4. 組織からの RNA 抽出

2.2.に従って飼育した個体、および 8 週齢の雄性 Zucker 系ラットの肥満型ラット(fatty: *fa/fa*) 並びに痩せ型ラット (lean: *+/+*) より、左右後肢の腓腹筋を摘出した。これらの組織をポリトロンホモジナイザーによりホモジナイズした後、ISOGEN (Nippon gene, Japan)を用いて total RNA を抽出した。

## 2.5. C2C12 細胞の筋肉細胞への分化誘導、及びグルコース、レプチン添加並びに RNA 抽出

C2C12 マウス筋芽細胞(RIKEN Cell Bank, Japan) は 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, U.S.A.)を添加した 4.5 mg/ml のグルコースを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen)中、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°Cで培養した。播種 48 時間後、分化誘導群は培地を 2% horse serum (HS, Invitrogen) を含む DMEM に交換して分化誘導を行った。その後 7 日間培養を行い、培地を 1% BSA (Sigma-Aldrich, U.S.A.)添加無血清 DMEM 培地で 2 時間培養後、グルコース(Wako)または human recombinant leptin protein (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)を処理し、24 時間培養後に RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, U.S.A.)を用いて total RNA を抽出した。

## 2.6. PAS 染色

2.5.の方法で培養した C2C12 細胞を 15%ホルマリン/ PBS 溶液で 20 分固定し、蒸留水で 3 分×2 回洗浄し、1%過ヨウ素酸溶液 (Wako)で 10 分間酸化した。蒸留水で洗浄後、Schiff 試薬 (Nacalai tesque, Japan) で 10 分間反応させ、亜硫酸水 (Wako) で 2 分×3 回洗浄した。蒸留水で 3 分×3 回の色出しを行い、顕微鏡写真を撮影した。

## 2.7. Oil red O 染色

2.5.の方法で培養した C2C12 細胞を 15%ホルマリン/ PBS 溶液で 20 分固定し、蒸留水で 30 秒、60% isopropanol で 1 分洗浄し、oil red O 液(0.18% oil red O (Sigma-Aldrich) / 60% isopropanol) につけ、37°Cで 10 分間インキュベートした。その後、60% isopropanol で 2 分、蒸留水で 3 分洗浄した後に顕微鏡写真を撮影した。

## 2.8. Northern blot analysis

### 2.8.1. Northern blot analysis に用いるプローブの作製

マウス脳から mouse AACS 及び mouse SCOT、ラット肝臓から rat AACS、ラット脳から rat SCOT の遺伝子をそれぞれの特異的プライマーを用いて RT-PCR により増幅、単離し、pGEM-T vector (Promega)にサブクローニングし、cDNA template を作製した。ラットの各遺伝子のプライマーは第一章の 2.4.2.に記載したものを、マウスの各遺伝子のプライマーは下記に示したものをを用いた。

#### mouse AACS (2065bp)

sense: 5'-TCC GCA ACC ATG TCC AAG CT-3'

anti-sense: 5'-ATC ACA TGC ACA GCT GGA TG-3'

#### mouse SCOT (1574bp)

sense: 5'-CGA AGA TGG CGG CTC TCA AA-3'

anti-sense: 5'-GAT GCT TCA AGT TGA AAT CT-3'

### 2.8.2. Northern blot analysis による各種遺伝子発現の検討

2.4.、2.5. の方法で得られた total RNA (2.4.: 30  $\mu$ g, 2.5.: 10  $\mu$ g)をホルムアミド変性アガロースゲル(1%)を用いて電気泳動した。分離した RNA を 20  $\times$ SSC (1 $\times$ SSC = 0.15M NaCl / 0.015M sodium citrate)中 overnight で Hybond N<sup>+</sup> (GE Healthcare Bioscience, U.K.) に転写し、UV 照射による固定化をした後、さらに 80°C で 2 時間乾燥固定し、blotting 膜を作製した。その後、ハイブリダイゼーションバッファー(5 $\times$ SSPE、20mM sodium dextran sulfate、50% formamide、0.1mg/ml salmon sperm DNA、5 $\times$ Denhardt's solution)中で 42°C、4 時間プレハイブリダイゼーションした。その後、新たなハイブリダイゼーションバッファーに  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (PerkinElmer, U.S.A.)で標識した目的遺伝子の cDNA プローブを加え、42°C でハイブリダイゼーションを行った。18 時間後、膜を 2 $\times$ SSC / 0.1% SDS 中室温で 5 分間 3 回洗浄し、更に 0.25 $\times$ SSC / 0.1% SDS 中 65°C で 30 分間 2 回洗浄した。この膜をイメージングプレートに 18 時間露光後、Typhoon 9410 (GE Healthcare Bioscience) を用いて解析した。

### 2.9. 統計処理

全てのデータは平均 $\pm$ 標準偏差(means  $\pm$  SEM)として表示した。平均値の有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。



### **3. 結果**

#### **3.1. ラット骨格筋における AACCS の遺伝子発現に対する遺伝性肥満と食餌性肥満の異なる影響**

高脂肪食を 6 週間摂取させた食餌性肥満ラット(High fat diet-fed rat: HFD rat)と、遺伝性肥満ラット(Zucker fatty rat: ZF rat)の 2 種の異なる肥満モデル動物を用いて、骨格筋におけるケトン体利用酵素の遺伝子発現に対する肥満の影響を検討した。その結果、HFD rat では通常食を与えた群と比較して、血中グルコース濃度が 16.7%増加し、血中総ケトン体濃度も約 6 倍増加していた(Table 2)。このときの骨格筋における AACCS の遺伝子発現には有意な変動が認められなかったが(Fig. 8a)、SCOT の遺伝子発現は有意に減少していた(Fig. 8b)。一方、ZF rat の血中パラメータは通常群(Zucker lean rat)と比較して血中グルコース濃度には変化がなく、血中総ケトン体濃度は 51.7%減少していた(Table 2)。このときの骨格筋における AACCS の遺伝子発現は有意に減少していたが(Fig. 8c)、SCOT の遺伝子発現には有意な変動は認められなかった(Fig. 8d)。

#### **3.2. 筋芽細胞と分化した筋肉細胞間における AACCS の遺伝子発現に対する高濃度グルコースの影響の差異**

血中グルコース濃度は高脂肪食を与えたラットで顕著に増加していた(Table 2)。このことから、HFD rat と ZF rat の骨格筋における AACCS と SCOT の遺伝子発現パターンの違いは体液中のグルコース濃度による可能性がある。そこで、マウス筋芽細胞である C2C12 細胞にグルコースを処理することにより、骨格筋細胞におけるケトン体利用に対す

る過栄養状態の影響を検討した。まず、C2C12 細胞にグルコースを処理したときのグリコーゲン及び脂質の細胞への蓄積を PAS 染色並びに oil red O 染色により検討した。その結果、この過栄養状態においてグリコーゲン並びに脂質の蓄積は C2C12 細胞で認められなかった(Fig. 9)。次に、C2C12 細胞におけるケトン体利用酵素の遺伝子発現に対する過栄養状態の影響を検討した。AACS の遺伝子発現は分化した C2C12 細胞において高濃度のグルコース処理で減少したが、未分化細胞においては上昇した(Fig. 10a)。対照的に、SCOT の遺伝子についてはグルコース処理による影響は認められなかった(Fig. 10b)。

### 3.3. 筋細胞におけるケトン体利用に対するレプチンの影響

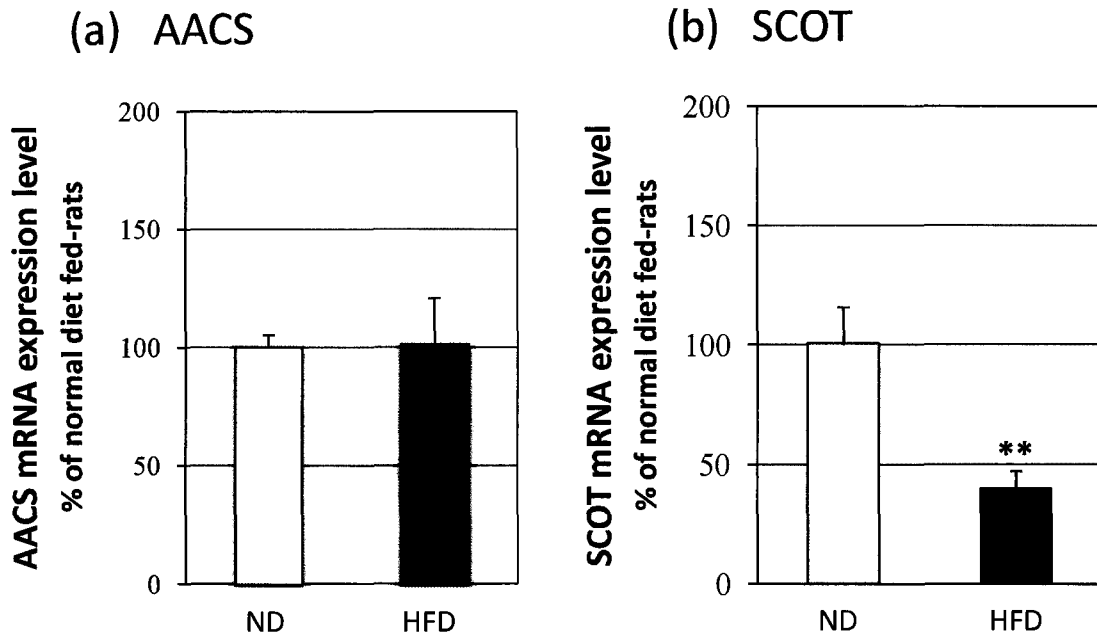
ZF rat における血中グルコース濃度には通常群と比較して顕著な変化は認められなかったが(Table 2)、AACS の遺伝子発現は有意に減少していた(Fig. 8c)。ZF rat はレプチン応答性を欠如していることから<sup>70)</sup>、骨格筋における AACS の遺伝子発現がレプチンシグナルにより正に制御を受けている可能性が考えられた。そこで、C2C12 細胞にレプチンを処理し、AACS の遺伝子発現を検討した。その結果、AACS の遺伝子発現はレプチン濃度依存的に有意に上昇した(Fig. 11a)。対照的に、SCOT の遺伝子発現には有意な変動は認められなかった(Fig. 11b)。また、未分化 C2C12 細胞ではいずれの酵素にも発現量に変動は認められなかった(未掲載データ)。

Table 2 Body weight and blood parameters of two types of obese rats

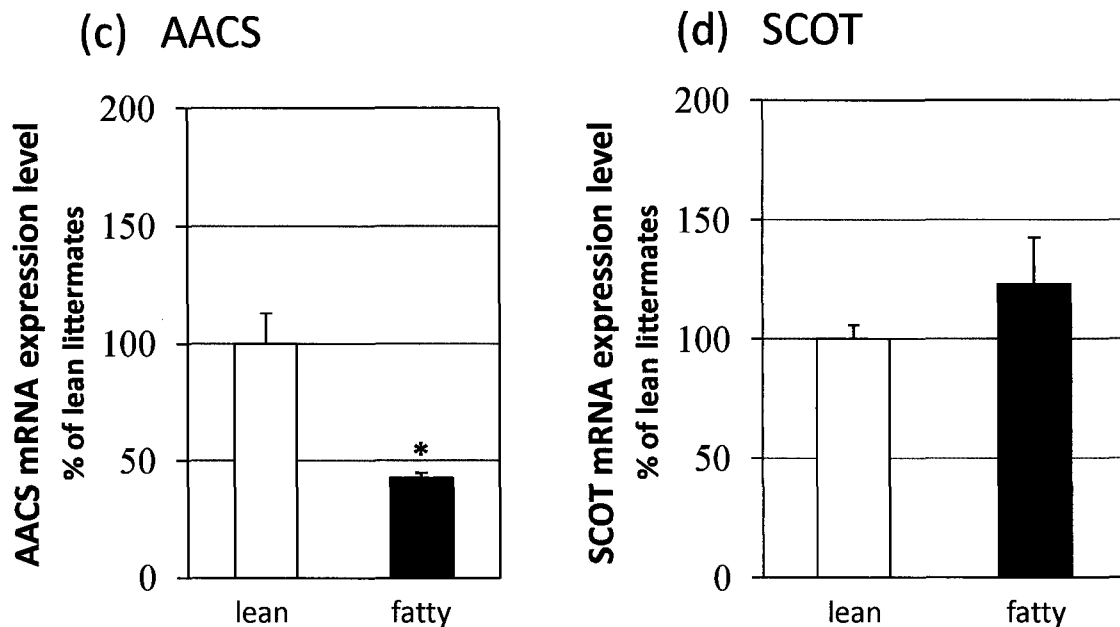
	Diet-induced obese rat		Zucker rat	
	normal diet	high-fat diet	lean (+/+)	fatty ( <i>fa/fa</i> )
Body weight (g)	597.6 ± 39	631.9 ± 27	211.8 ± 8.6	278.1 ± 13*
Plasma glucose (mg/dl)	132.5 ± 3.7	154.7 ± 13*	140.3 ± 19	152.5 ± 23
Plasma total ketone body (μmol/l)	217.8 ± 30	1308 ± 410***	365.1 ± 50	176.5 ± 67**

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the ND or lean littermates.

## Diet-induced obesity

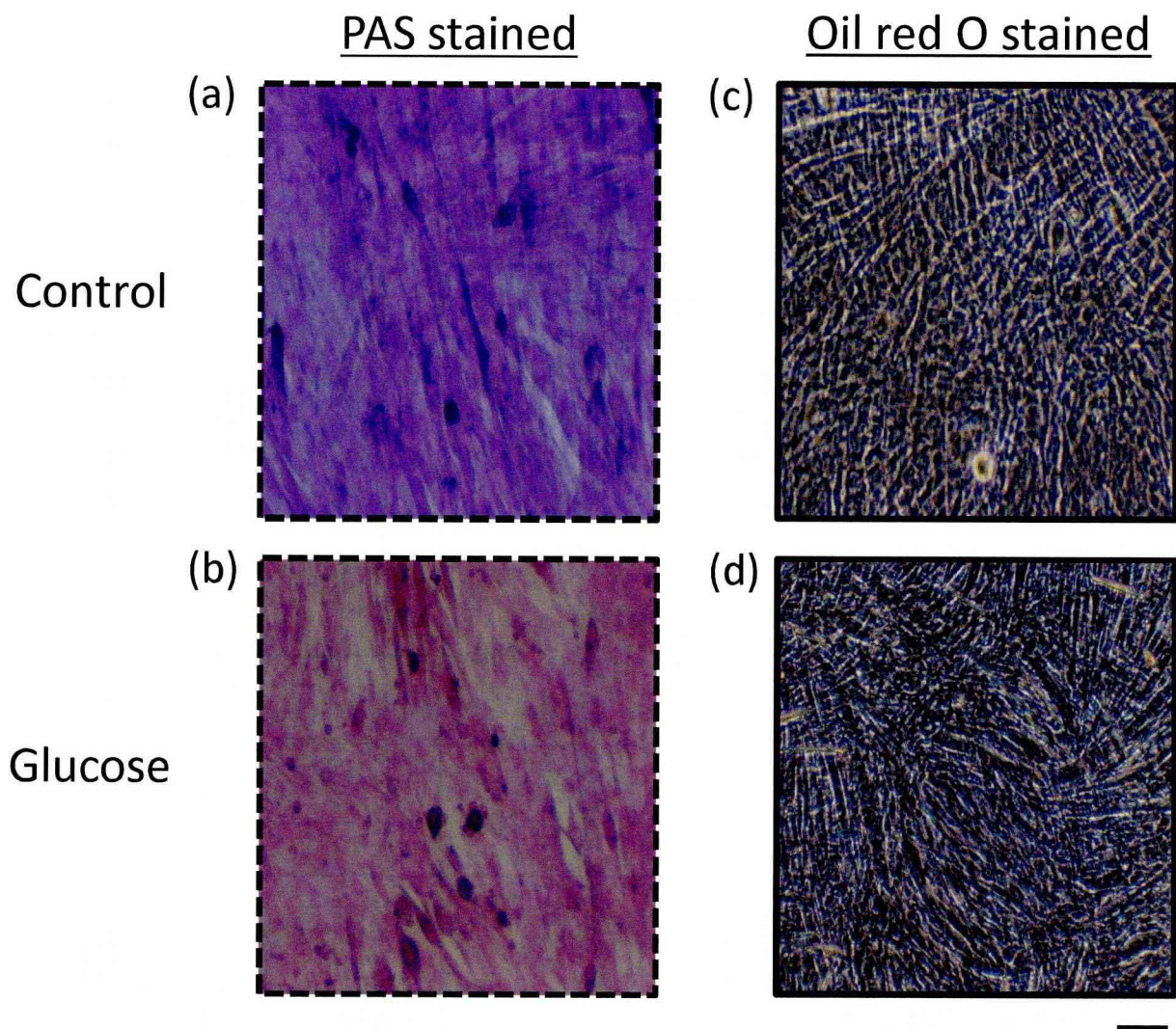


## Genetic obesity



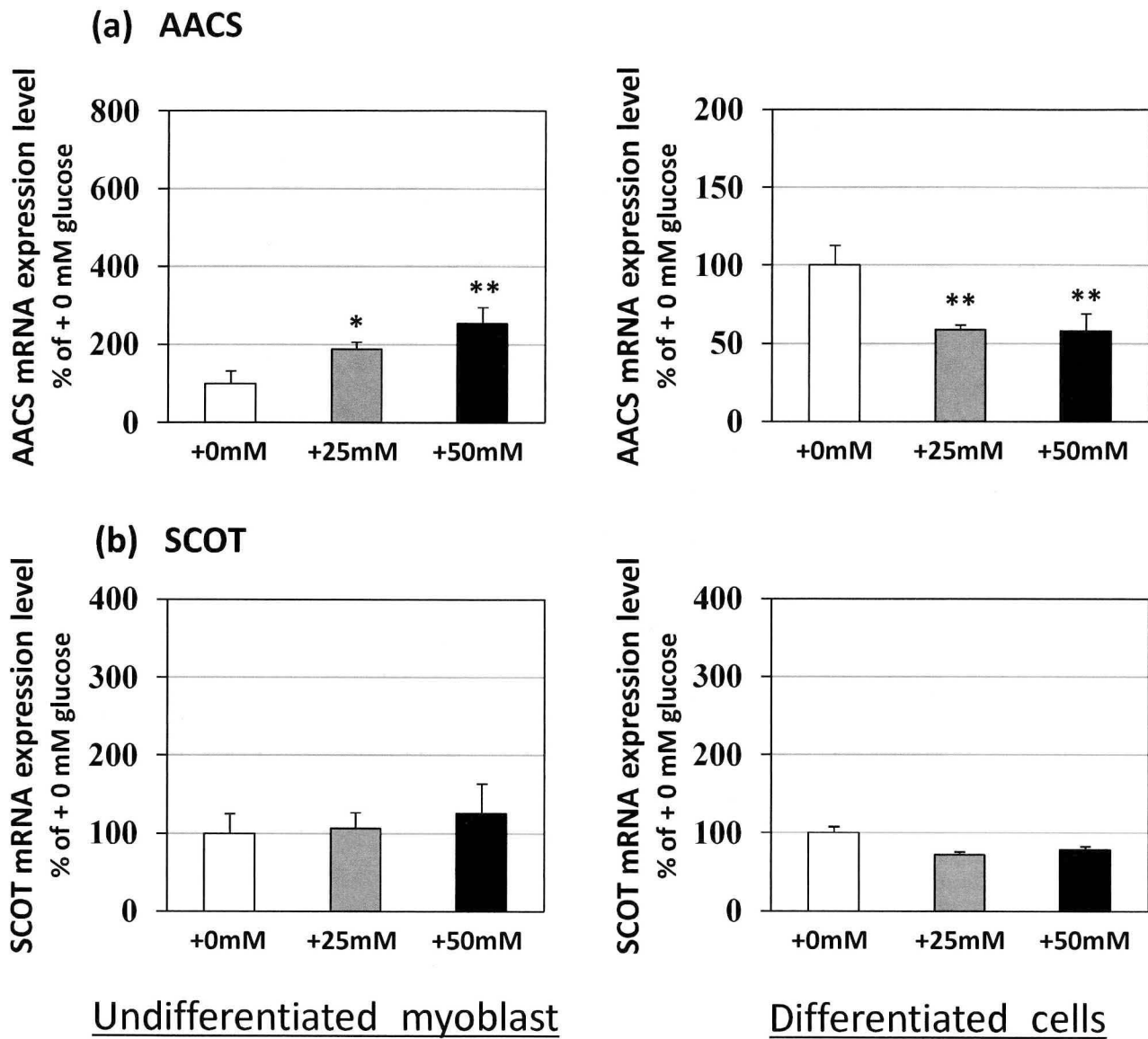
**Fig. 8 Expression of AACS and SCOT mRNA in soleus muscles of high fat diet-fed rats and obese Zucker rats**

Total RNAs were prepared from soleus muscles of high fat diet-fed rats (a, b) and obese Zucker rats (c, d), and subjected to Northern blot analysis with AACS (a, c) and SCOT (b, d) cDNA probes. ND, HFD, fatty and lean indicate normal diet-fed rats, high fat diet-fed rats, obese Zucker rats and their lean littermates, respectively. Each bar represents the means  $\pm$  SEM (n=3). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  compared with the ND or lean littermates.



**Fig. 9 Effect of glucose treatment on glycogen and lipid accumulation in C2C12 cells**

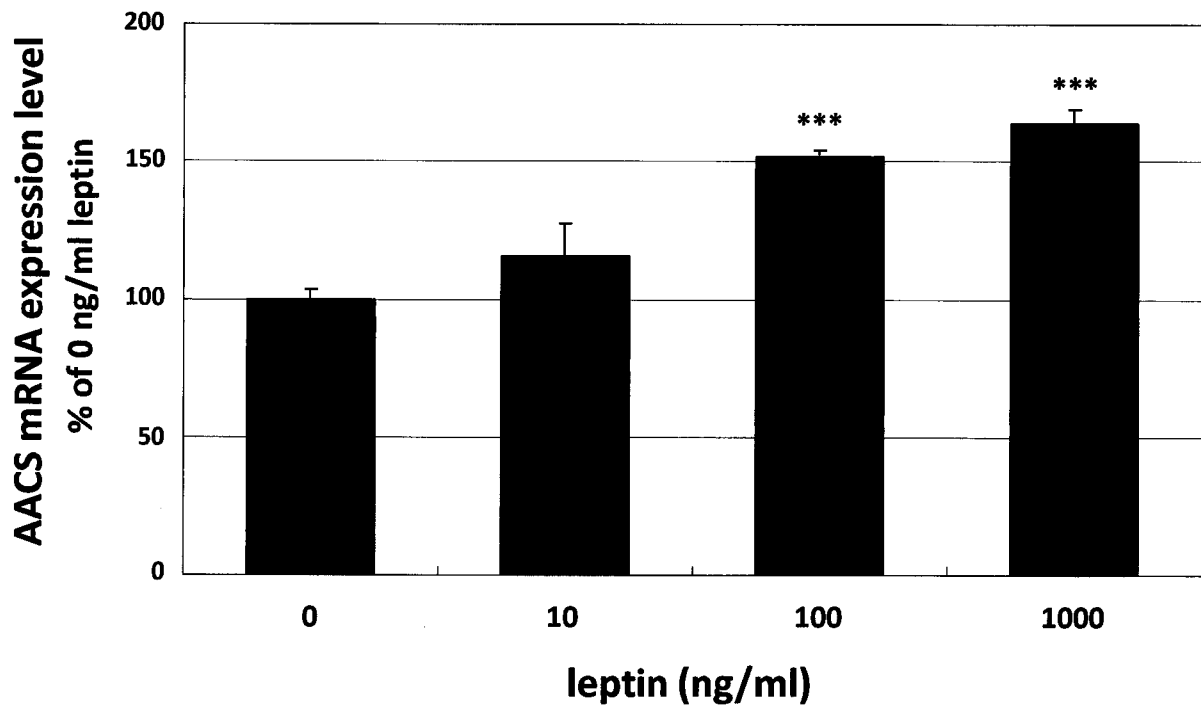
C2C12 myoblast cells were maintained in differentiation medium for 2 days and treated with glucose (b, d) for 6 days. Glycogen was stained with periodic acid-Schiff reagent (a, b) and lipid droplets were stained with oil red O (c, d). Scale bar = 40  $\mu\text{m}$ .



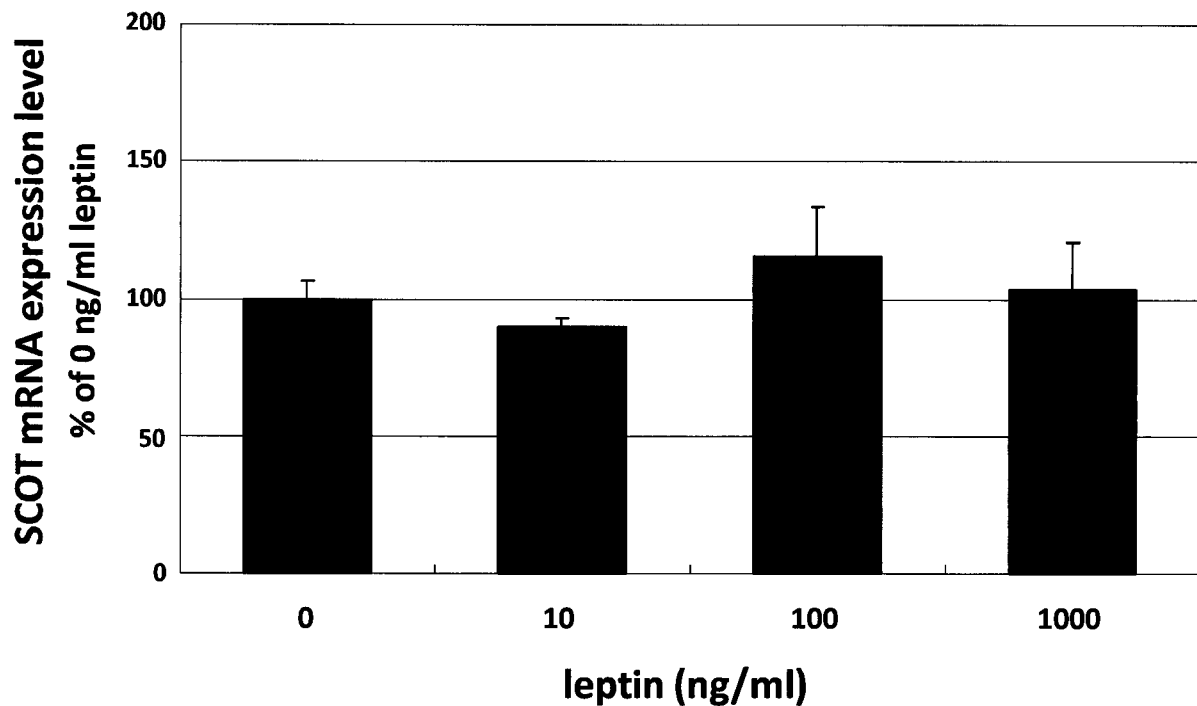
**Fig. 10 Effect of glucose on gene expression levels of AACS and SCOT in C2C12 cells**

C2C12 cells were induced (left panels) or not induced (right panels), then treated with glucose. After 6 days, total RNAs were isolated from each cells, and subjected to Northern blot analysis for AACS (a) and SCOT (b). Each bar represents the means  $\pm$  SEM (n=3). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  compared with the +0mM glucose-treated cells.

**(a) AACS**



**(b) SCOT**



**Fig. 11 Effect of leptin treatment on AACS and SCOT mRNA expression levels in mouse differentiated C2C12 cell line**

C2C12 cells maintained in differentiation medium for 10 days, and treated with leptin protein (10, 100, 1000 ng/ml). After 24 hour total RNAs were isolated, and subjected to Northern blot analysis for AACS (a) and SCOT (b). Each bar represents the means  $\pm$  SEM (n = 3). \*\*\*  $p < 0.001$  compared with 0 ng/ml leptin.

#### 4. 考察

食餌性肥満ラットでは血中グルコース濃度は僅かに上昇し、血中ケトン体濃度は大きく上昇していた。このときの骨格筋組織における AACCS の遺伝子発現には有意な変動は認められなかったが、SCOT の遺伝子発現は有意に減少していた。これらの結果から、食餌性肥満における骨格筋でのケトン体利用については ATP 産生系の利用のみが低下し、ケトン体のエネルギーへの利用よりも、糖質を中心とした他の栄養素の消費が優先されている可能性が示唆された。この骨格筋での利用が低下したケトン体は、尿中に排泄されると共に、食餌性肥満時に AACCS の遺伝子発現が上昇し、ケトン体からの脂質合成が亢進していることが明らかとなっている皮下部脂肪組織<sup>34)</sup>を中心としたエネルギー蓄積組織で脂質合成へと利用される可能性が考えられる。

さらに、過栄養状態におけるケトン体利用を検討するため、マウス筋芽細胞である C2C12 細胞にグルコースを処理したときの AACCS 並びに SCOT の遺伝子発現を検討した。この過栄養状態では、グルコースによるグリコーゲン量の増加並びに脂肪滴の形成が認められなかったことから (Fig. 9)、細胞内のエネルギー蓄積系の亢進は起きていないと考えられる。このとき、AACCS の遺伝子発現は未分化細胞では上昇する一方で、分化した細胞では減少した。対照的に、SCOT の遺伝子発現はどちらの細胞でも有意な変動は認められなかった。グルコースによるケトン体利用経路に対する *in vitro* の系における影響は HFD rat で認められたものと一致しなかったことは、筋肉細胞の分化の程度で糖による影響が異なることが一因であると考えられる。また、SCOT の発現にはいずれの系においても大きな変動が認められなかったこと



から、ケトン体のエネルギーとしての消費は筋細胞の分化状態に関わらず、グルコースによる過栄養の影響を受けにくいことが考えられる。また、食餌性肥満ラットの骨格筋における AACCS の遺伝子発現に変動がなかったことは、未分化及び分化した骨格筋細胞に対するグルコースの相反する影響により相殺された可能性と、グルコース以外の因子による発現維持を受けている可能性が考えられる。従って、さらに長期間の高脂肪食により肥満を進行させた場合には、重度の糖尿病を呈し、AACCS の遺伝子発現へ影響が出る可能性があるが、本実験系の期間ではそれが認められる程度まで肥満状態が至らなかったのではないかと考えられた。

一方、食欲抑制ホルモンであるレプチンの受容体異常により肥満を示す遺伝性肥満ラットでは、既に知られている ZF rat の血中パラメーターと同様に、血中グルコース濃度は正常値であり、血中ケトン体濃度は低値であった。このとき、骨格筋における AACCS の遺伝子発現は有意に減少していたが、SCOT の遺伝子発現には有意な変動は認められなかった。また、レプチンは分化した C2C12 筋細胞における AACCS の遺伝子発現を上昇させる一方で、SCOT の遺伝子発現に対しては影響を与えなかった。これらのことは、レプチンが筋細胞における AACCS とそれを介したケトン体利用を維持する上で重要な因子であることを示唆している。レプチンは骨格筋における脂肪酸酸化の重要な制御因子であることがよく知られている<sup>71)</sup>。ケトン体はミトコンドリア内で脂肪酸の $\beta$ -酸化から主に産生されることから、レプチンにより脂肪酸酸化が亢進すると細胞内のケトン体量も上昇すると考えられる。ケトン体の過剰生成はケトアシドーシスを引き起こし、重篤な疾患を導く。例えば、重症な糖尿病患者では糖質が利用出来ない状態となり、脂肪

酸の代謝が亢進することによりケトン体が過剰生成し、ケトアシドーシス状態になり糖尿病昏睡を引き起こすことが知られている<sup>9)</sup>。従って、レプチンは骨格筋においてエネルギー消費だけではなく、AACCSを介したケトン体からの脂質への再利用系も誘導することで、脂肪酸酸化に伴い生成したケトン体の消費を促進し、高脂肪食などによる血中における過剰なケトン体量の増加に対応している可能性が示唆された。

このように、AACCSを介したケトン体利用経路と遺伝性肥満による変動には、レプチンシグナルが関係していることが疑われた。そこで次章では、その可能性を検討することにした。

## 第三章

### レプチンシグナルによる視床下部のケトン体利用の制御

#### 1. 緒言

第一章、第二章の結果より、AACS は肥満、特にレプチンシグナルの異常によって特異的な影響を受けることが明らかとなった。

レプチンはポジショナルクローニング法を用いて自然発症の遺伝性肥満を示す *ob/ob* マウスの病因遺伝子から同定され<sup>72)</sup>、その後の研究により、成熟した脂肪細胞から脂質蓄積に伴って分泌され、摂食行動やエネルギー代謝に関わる因子であることが明らかにされている<sup>50,71)</sup>。レプチンの作用は、その受容体であるレプチン受容体、特に細胞内シグナルドメインを含むロングフォーム型受容体(leptin receptor-b: LR-b)に結合することにより起こる。脂肪組織や筋肉などの末梢組織では、レプチンが脂肪酸の酸化<sup>73)</sup>およびグルコース利用の亢進<sup>74)</sup>などの作用を示すことが報告されている。また、中枢神経系においても食欲抑制、エネルギー消費の亢進並びに内分泌機能の制御に関わっていることが報告されている<sup>48)</sup>。第一章、第二章の結果から、レプチン受容体によるシグナル伝達不全による遺伝性肥満により、中枢神経系である視床下部及び末梢組織である骨格筋においてケトン体をエネルギー産生系へ利用する SCOT の遺伝子発現ではなく、脂質合成系へ利用する AACS の遺伝子発現が特異的に減少することが明らかとなった。視床下部は脳内でも特に LR-b の発現に富んでいる領域であり<sup>75)</sup>、レプチンはこの領域に存在する LR-b に結合することにより、食欲抑制やエネルギー消費の亢進を引き起こしていると考えられている<sup>72,76)</sup>。また、

骨格筋においても LR-b は発現しており 77)、レプチンがこの受容体を介して直接的に骨格筋における脂肪酸酸化を亢進していることも知られている 78)。この中枢神経系と末梢組織でのレプチン作用には、共にレプチンシグナルの下流因子である AMPK が重要な役割を担っていると考えられている 59,79)。さらに、第二章の結果からレプチンにより筋細胞の AACCS の遺伝子発現のみが上昇したことからも、AACCS を介したケトン体利用がレプチンシグナルの制御下にある可能性が考えられた。しかし、ここまでのデータからは、この AACCS に対する影響が Zucker fatty (ZF) rat 固有のものであり、レプチンシグナルの直接の影響でない可能性が捨てきれない。

ZF rat と同様にレプチンシグナルの伝達異常により肥満を示すモデル動物としては *db/db* マウス及び *ob/ob* マウスが存在する。*db/db* マウスは ZF rat と同様にレプチン受容体遺伝子の点変異により 80)、*ob/ob* マウスはレプチン遺伝子の変異により 72)レプチンシグナルの伝達異常を引き起こして遺伝性肥満を示し、共に早期から血糖値及び血中インスリン濃度が高値を示すモデル動物である 72,80)。そこで本章では、第一章における ZF rat における AACCS の遺伝子発現の減少がレプチンシグナルの不全によるものであることを明確にするために、ZF rat において AACCS の遺伝子発現の減少が観察された視床下部領域に着目し、レプチン受容体異常のある *db/db* マウス及びレプチンタンパクそのものに異常のある *ob/ob* マウスを用いて、脳における AACCS の遺伝子発現に対するレプチンシグナル不全の影響を検討した。また、その作用経路を明らかにする目的で、胎仔脳初代培養細胞、視床下部細胞株 N41 細胞を用い、*in vitro* において AACCS の遺伝子発現に対するレプチンシグナルの影響を検討した。

## **2. 試薬及び方法**

### **2.1. 実験動物**

8週齢の雄性 *db/db* マウス、*ob/ob* マウス及び、それぞれの痩せ型マウス(+/+)<sup>+</sup>を日本チャールズリバー(Japan)から購入し、無菌的に搬出されたものを少なくとも3日間、環境に順応させたのち実験に供した。

本動物実験は、星薬科大学動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得た上で、動物に対する倫理面を十分に考慮し、使用動物数を最小限にして実験を行った。

### **2.2. *In situ* hybridization 法**

#### **2.2.1. 新鮮凍結脳切片の作製**

8週齢の雄性 *db/db* マウス、*ob/ob* マウス及び、それぞれの痩せ型マウス(+/+)<sup>+</sup>の脳組織を摘出し、ドライアイスパウダーで瞬時に凍結した。これを cryostat を用い、coronal 方向に 16 $\mu$ m の厚さでスライスし、ゼラチン及び poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, U.S.A.) でコーティングしたスライドグラスに貼り付けて作製した。

#### **2.2.2. *In situ* hybridization 法に用いるプローブの作製**

マウス脳から AACCS 遺伝子の特異的プライマーを用いて RT-PCR により増幅、単離し、pGEM-T vector (Promega, U.S.A.) にサブクローニングした。そのプラスミドの SP6 または T7 領域付近を制限酵素消化して直鎖状にし、cDNA template を作製し、その template を用いてプローブを作製した。プローブ作製法は、第一章に記載した方法に準ず

る。AACS 遺伝子のプライマーは第二章の 2.8.1.に記載したものを用いた。

### 2.2.3. *In situ* hybridization 法を用いた AACS 遺伝子の脳組織における発現分布の検討

2.2.1.で作製した新鮮凍結脳切片を用いて、*in situ* hybridization 法を行った。*In situ* hybridization 法の方法は第一章に記載した方法に準ずる。

### 2.3. マウス胎仔脳細胞初代培養及び、細胞へのレプチン添加ならびに RNA 抽出

妊娠 15 - 16 日の ddY 系雌性マウス(Tokyo Laboratory Animals Science Co., Japan)より胎仔脳を摘出し、papain (Fluka, U.S.A.) を 10 units/ml、DNase I を 0.01%の濃度となるように加えた PBS (Invitrogen, U.S.A.)中で、37°Cで 30 分振とうした。その後、胎仔脳を 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen)、及び 10 units/ml penicillin-10 µg/ml streptomycin (Invitrogen) 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen)中に入れ換え、ピペッティングにより細胞を分散させた後、ポリエチレンイミン (Sigma-Aldrich)でコーティングした 6 well dish に  $2.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞を播種した。24 時間後に 5µM cytosine arabinoside (Wako, Japan)を加え、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°Cで培養した。細胞播種 3 日後に human recombinant leptin protein (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) を処理し、24 時間培養後に RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, U.S.A.) を用いて total RNA を抽出した。

## **2.4. N41 細胞培養及び、レプチン、AICAR、Compound C 添加ならびに RNA 抽出**

マウス不死化視床下部細胞株 N41 細胞 (Cosmo Bio Co., Japan) は 10% FBS (Invitrogen)、20mM グルコース (Wako) 及び 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen) 添加 DMEM (Invitrogen) 中、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃ で培養した。播種 48 時間後に培地を 1% BSA (Sigma-Aldrich) 添加無血清 DMEM 培地で 2 時間培養後、human recombinant leptin protein (Santa Cruz Biotechnology)、aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR, Calbiochem) 並びに compound C (Calbiochem) を処理し、24 時間培養後に RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。

## **2.5. Northern blot analysis**

### **2.5.1. Northern blot analysis に用いるプローブの作製**

第二章に記載した方法に準ずる。

### **2.5.2 Northern blot analysis による各種遺伝子発現の検討**

2.3.、2.4.の方法で得られた total RNA (8 µg) を用いて、Northern blot analysis を行った。Northern blot analysis の方法は第二章に記載した方法に準ずる。

## **2.6. RT-PCR 法による各種遺伝子発現の検討**

cDNA は、2.3.、2.4.の方法で得られた total RNA (4 µg) を 1× First-Strand Buffer (Invitrogen)、2mM dNTP (Takara Bio)、10mM

DTT (Invitrogen)、0.5 $\mu$ g Random Primer (Takara Bio)、10units RNase inhibitor (Wako)及び 200units MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)を含む反応液(final 20 $\mu$ l)中で 37 $^{\circ}$ Cで 1時間反応させて合成した。RT-PCR 法は得られた cDNA (1  $\mu$ l)を鋳型として、1 $\times$ Ex Taq Buffer、0.2mM dNTP、0.4 $\mu$ M 目的遺伝子の特異的プライマー(mAACS sense: TCC GCA ACC ATG TCC AAG CT; mAACS anti-sense: AGC TCG TGA TGC ATC TGT AC; mSCOT sense: CGA AGA TGG CGG CTC TCA AA; mSCOT anti-sense: GAT GCT TCA AGT TGA AAT CT; mLR-b sense: TCT TCT GGA GCC TGA ACC CAT TTC; mLR-b anti-sense: TTC TCA CCA GAG GTC CCT AAA CT)及び 1.25 units EX Taq polymerase (Takara Bio)を含む反応液中で行った。温度条件は denaturation temperature として 94  $^{\circ}$ Cで 30 秒、annealing temperatureとして 60 $^{\circ}$ Cで 42秒、elongation temperatureとして 72 $^{\circ}$ Cで 1分とした。得られた PCR 産物のうち 1  $\mu$ lを 1%アガロースゲルで電気泳動し分離し、エチジウムブロマイドで染色後、Lumi viewer (AISIN / TAI TEC, Japan) を用いて遺伝子発現量の解析を行った。

## 2.7. 統計処理

全てのデータは平均 $\pm$ 標準偏差(means  $\pm$  SD)として表示した。平均値の有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。



### 3. 結果

#### 3.1. マウス脳における AACCS の遺伝子発現に対する遺伝性肥満の影響

マウス脳における AACCS の遺伝子発現に対するレプチンシグナル不全による遺伝性肥満の影響を検討するために、*db/db* 及び *ob/ob* マウスの脳冠状切片を用いて、*in situ* hybridization 法によりそれぞれの痩せ型同腹子における AACCS の遺伝子発現と比較検討した。

その結果、視床下部領域の ARC 及び VMH (Fig. 12 and 13, middle panels)における AACCS の遺伝子発現は *db/db* (Fig. 12b)及び *ob/ob* (Fig. 13b)マウスの両群共にそれぞれの痩せ型同腹子マウスよりも減少していた (Fig. 12a-b and 13a-b)。一方、大脳皮質においてはそのような変化は認められなかった (Fig. 12 and 13, lower panels)。

ZF rat に加え、*db/db* マウス及び *ob/ob* マウスのいずれの遺伝性肥満においても、ARC、VMH で AACCS の遺伝子発現が減少していたことから、レプチンが視床下部領域で AACCS の遺伝子発現を制御している可能性が類推された。

#### 3.2. 神経細胞における AACCS の遺伝子発現に対するレプチンの影響

レプチンが視床下部神経細胞における AACCS の遺伝子発現を制御しているかどうかを、胎仔脳初代培養細胞及びマウス不死化視床下部細胞株である N41 細胞にレプチンを処理して、RT-PCR 法及び Northern blot analysis により検討した。N41 細胞とは、CELLutions Biosystems Inc.がマウス胎仔視床下部初代培養細胞に SV40 T-Ag をトランスフェクションし、細胞を不死化することにより作製された細胞である<sup>81)</sup>。この細胞株は、LR-b を含む生物活性を保持する受容体や酵素マーカー

及び神経ペプチドが発現しており、代謝性疾患を始めとする中枢神経系疾患の *in vitro* アッセイが出来ることから、脳における内分泌疾患の研究に有用な細胞である<sup>81)</sup>。

レプチンを処理した胎仔脳初代培養細胞における AACCS の遺伝子発現は、レプチン処理 24 時間後で有意な増加が認められた(Fig. 14a)。それに加え、レプチンは濃度依存的に AACCS の遺伝子発現を有意に上昇させた(Fig. 14c)。対照的に、SCOT の遺伝子発現はレプチン処理により影響を受けなかった(Fig. 14b and 14d)。また、N41 細胞における AACCS の遺伝子発現は、1.25ng/ml のレプチン処理により上昇した(Fig. 15a)。一方で、SCOT の遺伝子発現には有意な変動は認められなかった(Fig. 15b)。このときの LR-b の遺伝子発現は AACCS の遺伝子発現と同様に 1.25ng/ml のレプチンを処理したときのみ上昇した(Fig. 15c)。

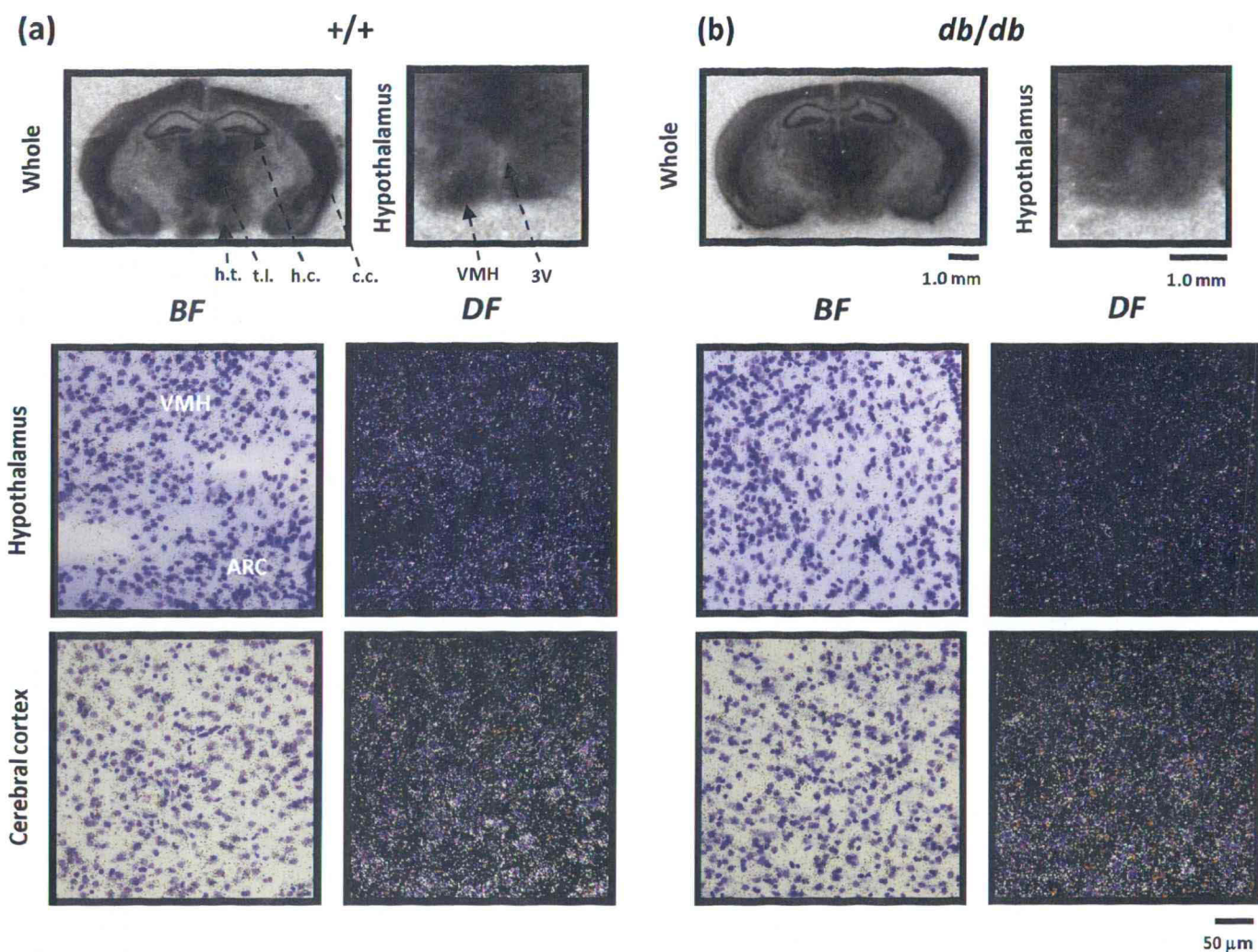
### 3.3. 神経細胞における AACCS の遺伝子発現に対する AMPK 活性の関与

レプチンシグナルは 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK)活性の制御に関わることが知られている。AMPK はセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞内の AMP 濃度の上昇により活性化し、ATP を消費する脂肪酸合成、コレステロール合成など同化作用を抑制するとともに、ATP 産生を促進する解糖系、脂肪酸酸化など異化作用を促進する燃料センサーとして知られている<sup>82,83)</sup>。さらに、近年の研究から骨格筋<sup>71)</sup>、肝臓<sup>84)</sup>及び脳の視床下部<sup>59)</sup>で生体エネルギー代謝を調節する重要なシグナル分子の一つとして注目されるようになっている。実際、腓腹筋において、レプチンは AMPK を活性化することにより脂肪酸酸化を亢進する<sup>57)</sup>。一方、視床下部においてレプチンは、AMPK 活性を低下させ摂食量の抑制を導くこと、AMPK の活性化剤である AICAR は摂食量

の増加を導くことが報告されている<sup>85)</sup>。これらの発見は末梢と中枢神経系の両方でレプチンの作用に対して、AMPK が重要なメディエーターとして作用することを示している。

そこで、レプチン-AMPK シグナル経路が視床下部におけるケトン体利用の制御に関わるかどうかを検討するために、AMPK の活性化剤である AICAR 及び阻害剤である compound C を N41 細胞に処理し、AACCS の遺伝子発現を検討した。

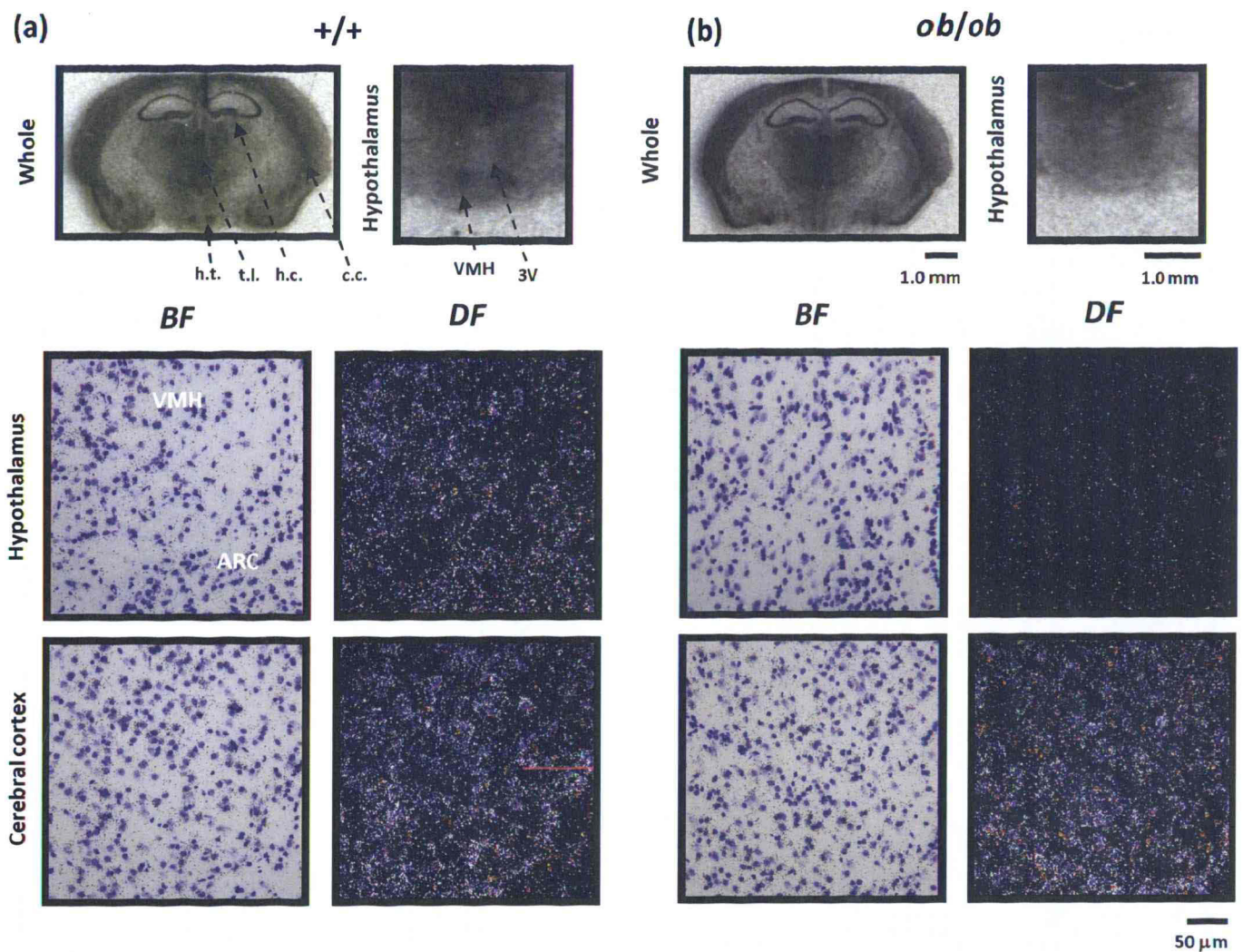
その結果、AACCS の遺伝子発現は AMPK 活性化剤により vehicle 処理群と比較して 28%減少し(Fig. 16a: left panels)、阻害剤により約 4.5 倍上昇した(Fig. 16a: right panels)。一方で、SCOT の遺伝子発現は阻害剤によりわずかに上昇が認められたが、AACCS ほどの大きな影響は認められなかった(Fig. 16b)。



**Fig. 12 Expression profile of AACS mRNA in coronal sections of *db/db* mice**

Coronal brain sections were prepared from adult male *db/db* (b) mice as well as their lean littermates (a). These sections were examined by *in situ* hybridization with a  $^{35}\text{S}$ -labeled AACS cRNA probe. The abbreviations are listed below.

BF: bright field; DF: dark field; c.c.: cerebral cortex; h.c.: hippocampus; t.l.: thalamus; h.t.: hypothalamus; 3V: third ventricle; VMH: ventromedial hypothalamic nucleus; ARC: arcuate hypothalamic nucleus.

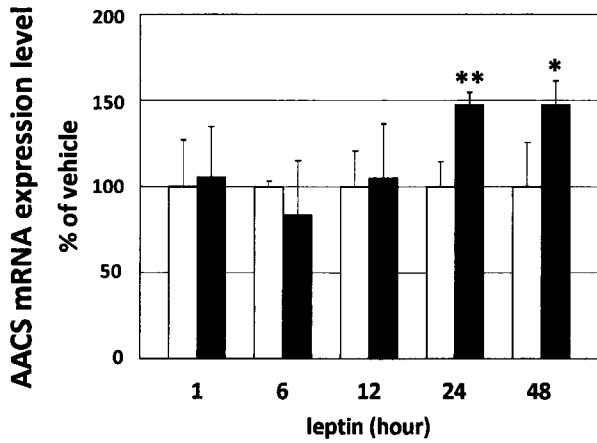


**Fig. 13 Expression profile of AACS mRNA in coronal sections of *ob/ob* mice**

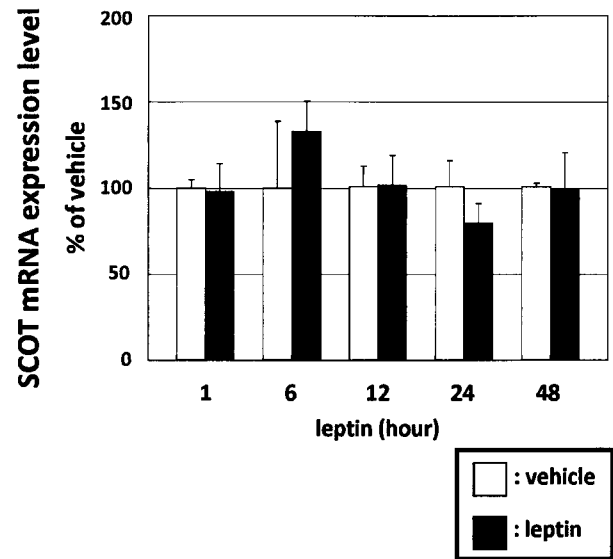
Coronal brain sections were prepared from adult male *ob/ob* (b) mice as well as their lean littermates (a). These sections were examined by *in situ* hybridization with a  $^{35}\text{S}$ -labeled AACS cRNA probe. The abbreviations are listed below.

BF: bright field; DF: dark field; c.c.: cerebral cortex; h.c.: hippocampus; t.l.: thalamus; h.t.: hypothalamus; 3V: third ventricle; VMH: ventromedial hypothalamic nucleus; ARC: arcuate hypothalamic nucleus.

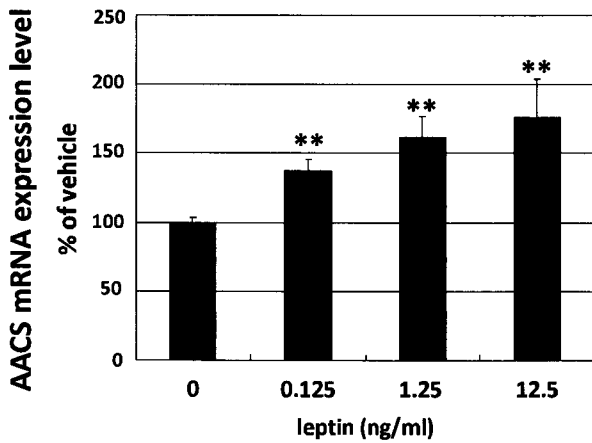
(a) AACS



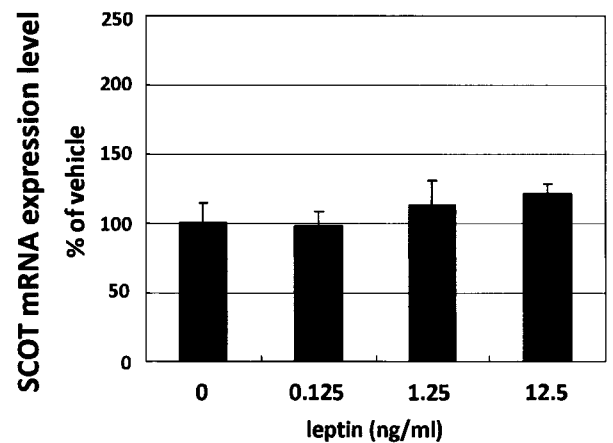
(b) SCOT



(c) AACS

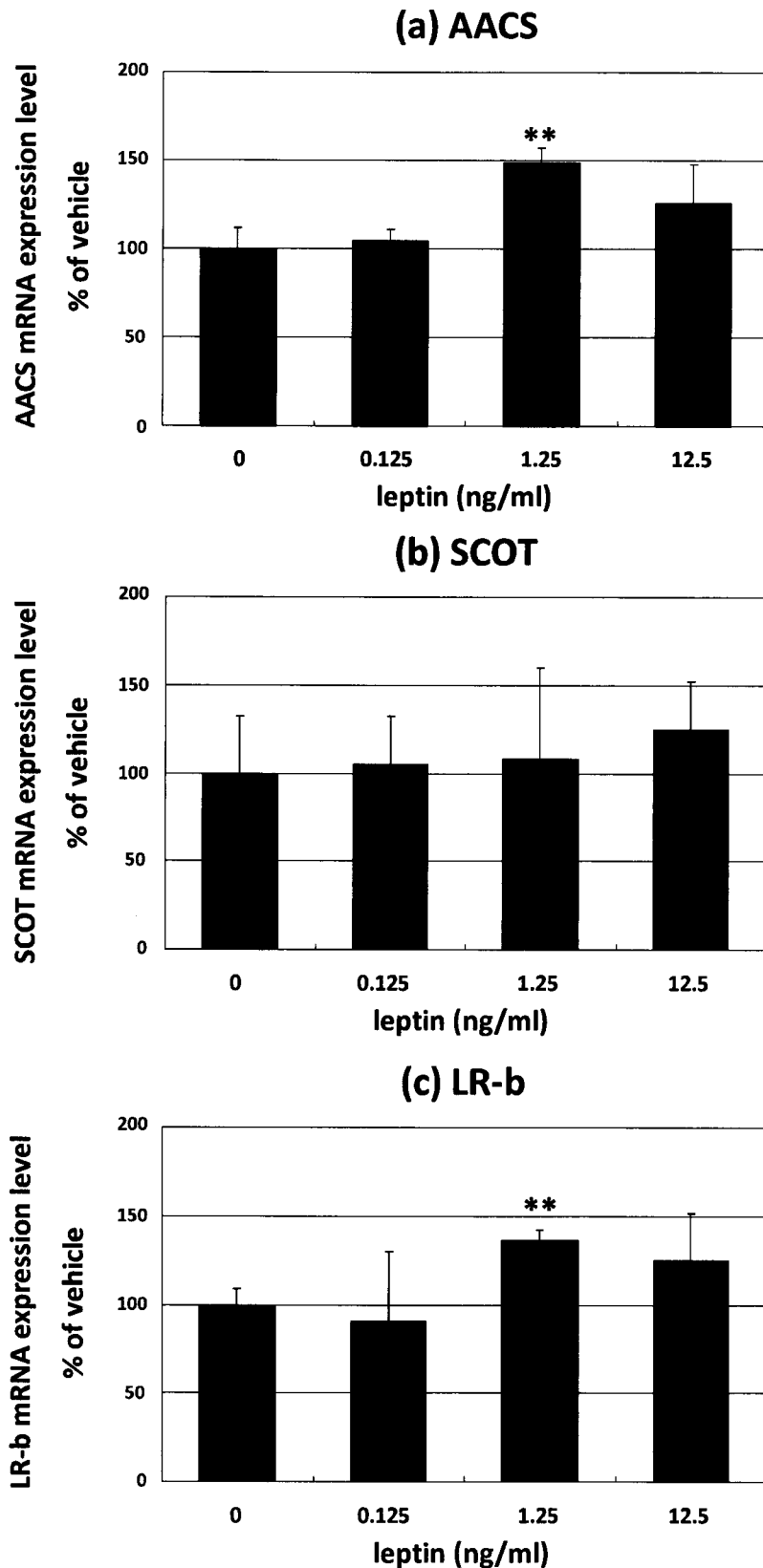


(d) SCOT



**Fig. 14 Effect of leptin treatment on AACS and SCOT mRNA expression levels in the mouse primary embryonic brain cells**

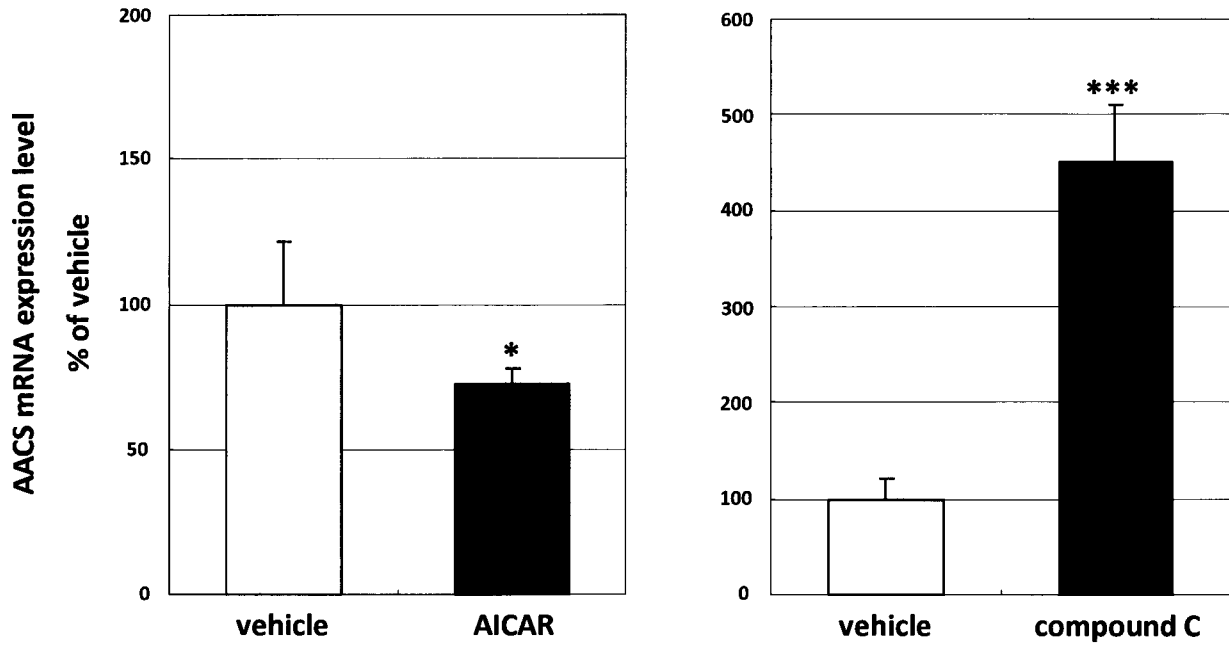
(a) and (b), Mouse primary embryonic brain cells were cultured for 3 days, and treated with 12.5 ng/ml leptin protein. After 1, 6, 12, 24, or 48 hour total RNAs were isolated, and subjected to RT-PCR analysis for AACS (a) and SCOT (b). Each bar represents the means  $\pm$  SD (n = 6). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  compared with vehicle. (c) and (d), Cultured mouse primary embryonic brain cells treated with leptin protein (0.125, 1.25, 12.5 ng/ml). After 24 hour total RNAs were isolated and subjected Northern blot analysis for AACS (c) and SCOT (d). Each bar represents the means  $\pm$  SD (n = 6). \*\*  $p < 0.01$  compared with 0 ng/ml leptin.



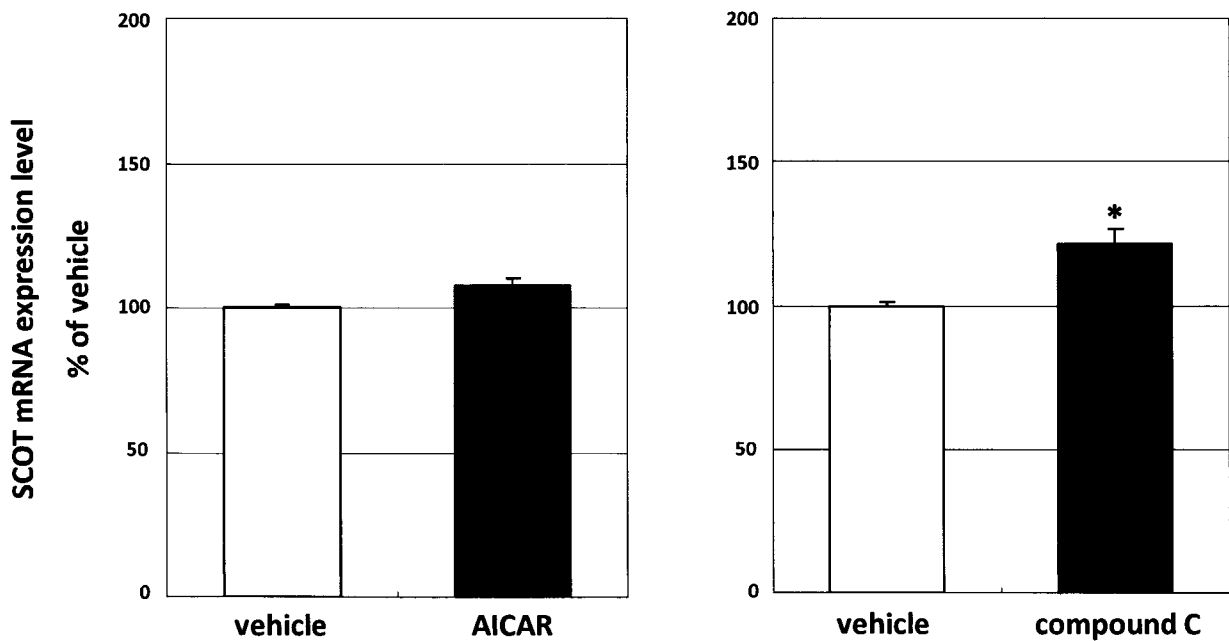
**Fig. 15 Effect of leptin treatment on AACS, SCOT and LR-b mRNA expression levels in mouse immortalized hypothalamic cell line N41 cell**

Mouse immortalized hypothalamic cell line N41 cells were cultured for 3 days, and treated with leptin protein (0.125, 1.25, 12.5 ng/ml). After 24 hour total RNAs were isolated, and subjected to Northern blot analysis for AACS (a) and SCOT (b) and to RT-PCR analysis for LR-b (c). Each bar represents the means  $\pm$  SD (n = 4). \*\*  $p < 0.01$  compared with 0 ng/ml leptin.

(a)



(b)



**Fig. 16 Effect of AMPK activator or inhibitor on AACCS and SCOT mRNA expression levels in mouse immortalized hypothalamic cell line N41 cell**  
Mouse immortalized hypothalamic cell line N41 cells were cultured for 3 days, and treated 1mM AICAR or 10 $\mu$ M compound C. After 24 hour total RNAs were isolated, and subjected to Northern blot analysis for AACCS (a) and SCOT (b). Each bar represents the means  $\pm$  SD (n = 4). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared with vehicle.



#### 4. 考察

本章の結果から、第一章の ZF rat の結果と同様にレプチンシグナル異常により肥満を示す *db/db* 及び *ob/ob* マウスにおける視床下部、特に食欲中枢として知られている ARC 及び VMH で AACS の遺伝子発現が減少することが明らかとなった。また、LR-b の発現が認められた胎仔脳初代培養細胞並びに視床下部細胞株である N41 細胞における AACS の遺伝子発現がレプチンにより上昇することも明らかとなった。これらの結果より、視床下部における遺伝子発現もレプチンシグナルによって正に制御されている可能性が示唆された。

また、AACS の遺伝子発現は視床下部神経細胞における AACS の遺伝子発現が AMPK 阻害剤により上昇する一方で、AMPK 活性化剤で減少することも明らかとなった。これは、箕越らにより報告された視床下部におけるレプチンと AMPK 活性の関係と一致するものであった<sup>59)</sup>。さらに、同様の検討を骨格筋細胞株である C2C12 細胞で行ったところ、AACS の遺伝子発現は N41 細胞とは逆に AMPK 活性化剤により上昇し、AMPK 阻害剤により減少するという結果も得ている(未発表データ)。レプチンは AMPK 活性を中枢神経系では抑制する一方、末梢組織では逆に促進することが知られていることから<sup>59,71)</sup>、レプチンによる AACS の遺伝子発現の制御には、中枢・末梢共に AMPK を介したシグナル伝達経路が関わっている可能性が高いと考えられる。

レプチンは脂肪細胞由来のアディポカインの中でもエネルギーの摂取量と消費量の双方に関与する肥満抑制ペプチドであることから<sup>49)</sup>、肥満と生活習慣病に対する最も重要な因子の一つである。実際、シグナル伝達不全によるレプチン抵抗性はヒトの肥満においても認められ

ている<sup>3)</sup>。このような痩身性のアディポカインにより AACCS の遺伝子発現が正に制御されていることは、AACCS を介したケトン体利用経路の亢進が肥満時にその増悪を抑制する方向に働いている可能性を想起させるものである。また、レプチンは脳虚血などの低酸素状態<sup>86)</sup>及び 6-ヒドロキシドパミンにより誘発される脳神経細胞死<sup>87)</sup>に対して保護作用を持つことが報告されている。さらに、糖を全く含まないケトン食が難治性小児てんかんに対する食事療法に 1900 年初頭より用いられていること<sup>88)</sup>やアセト酢酸が脳で虚血時に引き起こされるポリグルタミン凝集による神経細胞障害の保護をする<sup>89)</sup>などの報告があることから、ケトン体の神経保護作用も注目されている。第一章に示したように、脳における AACCS の遺伝子発現がコレステロール合成の律速酵素である HMGCR と類似した局在を示していたことや、Chen らが報告している肝スライスを用いたケトン体のコレステロールへの取り込み実験の結果から<sup>14)</sup>、脳内においてケトン体が AACCS を介してコレステロール合成へと利用されている可能性が考えられる。第一章でも言及したように、コレステロールを基質とした脳内の神経伝達系に関わる因子としては、Baulieu らによって発見されたニューロステロイドが知られており<sup>90)</sup>、外傷性脳障害<sup>91)</sup>や神経変性疾患<sup>92)</sup>に対して神経保護作用を持つことが知られている。神経保護作用を有するニューロステロイドとしては dehydroepiandrosterone (DHEA) が知られているが、食餌由来の DHEA 及び DHEA の腹腔内処置は食欲を抑制するという報告もあることから、このニューロステロイドは食欲応答に対して重要な働きをしていると考えられている<sup>93)</sup>。これらのことから、レプチンによりケトン体からコレステロールを介したニューロステロイドの合成に至る経路が活性化することで、保護作用だけではなく、食欲調節

にケトン体が関与している可能性も考えられる。

一方で、第一章で示したように、レプチンシグナル伝達不全による肥満は視床下部における HMGCR の遺伝子発現には影響しなかった。このことは、ケトン体からのコレステロール合成系が HMGCR を律速とせず、基質量に依存する系である可能性を示している。また、もう一つの可能性として、AACS で活性化したケトン体がコレステロール合成ではなく、低分子量 G タンパク質などのイソプレニル化に利用されている可能性も考えられる。イソプレニル化には Rab や Rho の C 末端システインが修飾されるグラニルグラニル化と、Ras が受けるファルネシル化があり、これらの翻訳後修飾により Ras などの細胞膜への移行が起こることでシグナル伝達が促進する。実際、HMGCR の阻害剤であるスタチンがグラニルグラニル化を阻害し、抗がん作用に関わることが報告されている<sup>94)</sup>。従って、ケトン体がイソプレニル化によるタンパク質の翻訳修飾に関与し、この経路の方が肥満によって影響を受けている可能性も考えられる。

いずれの場合においても、ケトン体から合成される生理活性物質が、神経や筋肉組織の機能や分化に関わり、その調節をレプチンが行っている可能性が考えられる。また、脂質中心の食事は血中ケトン体量を上昇させることも合わせて考えると、レプチンによりこの上昇したケトン体の生体内物質の合成基質としての利用経路が活性化することは、AACS を介した合成へのケトン体利用経路が肥満に対して抑制に働いている可能性を示唆するものである。さらに、肥満に伴うレプチン抵抗性などのシグナル伝達不全時にケトン体利用の調節機構が障害を受けることが、肥満の増悪と生活習慣病発症を引き起こす可能性も考えられる。

このように、本研究により得られた知見は、骨格筋及び視床下部における AACCS 及びケトン体利用のレプチンによる制御が、エネルギーバランスの維持と肥満の予防や治療・診断における新しいターゲットとなる可能性を示唆するものであると考えられる。

## 総括

本研究により、以下の結果が得られた。

1. 脳における AACCS の遺伝子が 大脳皮質、海馬だけではなく、視床下部の VMH、ARC 及び視床の PVT 領域において特異的に強く発現していることが明らかとなった。また、レプチンシグナル伝達不全による遺伝性肥満に伴い、脳内の AACCS の遺伝子発現が視床下部の VMH、ARC 領域で特異的に減少していた。
2. 骨格筋における AACCS の遺伝子発現がレプチンシグナル伝達不全により減少することが明らかとなった。また、培養骨格筋細胞においてレプチンが AACCS の遺伝子発現を上昇させることが明らかとなった。
3. レプチンが初代培養及び視床下部神経培養細胞株における AACCS の遺伝子発現を上昇させることが明らかとなった。また、AACCS の遺伝子発現がレプチンシグナル経路の下流に存在する AMPK の活性に制御されていることが明らかとなった。

以上の結果より、レプチンは従来から知られていた食欲抑制や脂質代謝の亢進作用に加えて、脳視床下部及び骨格筋における AACCS の遺伝子発現誘導を介して、ケトン体代謝にも影響する因子であることが明らかとなった。また、その伝達経路はレプチンによる脂質代謝や食欲調節作用への関与が報告されている AMPK を介した経路に制御されている可能性が示唆された。

レプチンは脂肪細胞由来のアディポカインの中でも、中枢と末梢

に働きかけ、エネルギーの摂取量と消費量の双方に関与する肥満抑制ペプチドであり、肥満と生活習慣病を関連付ける上で重要な因子である。

また、脂質の占める割合の高い食事はその代謝に伴い血中ケトン体量を上昇させることも合わせて考えると、AACCS を介したケトン体の生体内物質の合成基質としての利用経路が、エネルギー代謝調節によって肥満抑制に関与するレプチンにより活性化することは、このケトン体利用経路が肥満に対して抑制的に働く可能性を示唆するものである。

従って、本研究の成果から、末梢組織である骨格筋及び中枢神経系である視床下部における AACCS 及びケトン体利用の制御が生体におけるエネルギーバランスの維持における新しい治療や診断に対するターゲットとなる可能性が示唆される。

## 謝辞

本研究にあたり、御懇篤なる御鞭撻を賜りました、星薬科大学衛生化学教室 福井 哲也 教授に謹んで感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり貴重な御助言と御指導を賜りました、星薬科大学微生物学教室 辻 勉 教授、及び臨床化学教室 輪千 浩史 准教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始御親切な御指導、御助言を賜りました星薬科大学衛生化学教室 山崎 正博 准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行にあたり、様々な御指導、御助言を頂きました星薬科大学衛生化学教室 渡辺 聡 助教に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、様々な御指導、御助言を頂きました星薬科大学衛生化学教室 長谷川 晋也 助手に深く感謝申し上げます。

本研究にあたり、多大なる御協力を頂きました、吉田 沙樹 氏、田島 亜由美 氏、野々村 磨つ 氏、吉田 佳織 氏、渡邊 優子 氏、尾崎 正太郎 氏、楠瀬 美祐 氏、柴野 瑞穂 氏ならびに星薬科大学衛生化学教室の皆様は厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行に御協力頂きました星薬科大学創剤構築研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。

最後に、常に協力してくれた父 一、母 智子、妹 歩美に感謝致します。

## 引用文献

- 1) B. M. Spiegelman, and J. S. Flier, Obesity and the regulation of energy balance, *Cell*, **104**: 531-543, 2001.
- 2) WHO monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease
- 3) J. F. Caro, M. K. Sinha, J. W. Kolaczynski, P. L. Zhang, and R. V. Considine, Leptin: the tale of an obesity gene, *Diabetes* **45**: 1455-1462, 1996.
- 4) B. M. Spiegelman, and J. S. Flier, Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture, *Cell* **87**: 377-389, 1996
- 5) H. Münzberg, and M. G. Myers, Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance, *Nat. Neurosci.* **8**: 566-570, 2005.
- 6) R. B. Ceddia, W. N. William Jr, and R. Curi, The response of skeletal muscle to leptin, *Front Biosci.* **6**: D90-D97, 2001.
- 7) R. H. Unger, and L. Orci, Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. Suppl* **4**: S28-S32, 2000.
- 8) J. D. McGarry, and D. W. Foster, Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production, *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 395-420, 1980.
- 9) E. A. Newsholme, and S. Start, "Regulation of Metabolism"  
John Wiley & Sons, London 中沢淳, 森正敬 訳 「動物の代謝調節」  
講談社サイエンティフィック pp. 320-344, 1973.
- 10) O. E. Owen, A. P. Morgan, H. G. Kemp, J. M. Sullivan, M. G. Herrera, and G. F. Cahill, Jr., Brain metabolism during fasting, *J. Clin. Invest.* **46**: 1589-1595, 1967.



- 11) W. M. Pardridge, Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids, and ketone bodies, *Adv. Exp. Med. Biol.* **291**: 43-53, 1991.
- 12) D. H. Williamson, M. W. Bates, M. A. Page, and H.A. Krebs, Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues, *Biochem. J.* **121**: 41-47, 1971.
- 13) A. M. Robinson, and D. H. Williamson, Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues, *Physiol. Rev.* **60**: 143-187, 1980.
- 14) R. W. Chen, D. D. Chapman, and I. L. Chaikoff, Acetoacetate conversion to fatty acids in liver: the role of insulin and the nutritional state of the animal, *J. Biol. Chem.* **205**: 383-393, 1953.
- 15) M. Blecher, and S. Gurin, The conversion of radioactive acetoacetate to cholesterol by surviving rat liver slices, *J. Biol. Chem.* **209**: 953-962, 1954.
- 16) J. R. Stern, and S. Ochoa, Enzymatic synthesis of citric acid. I. Synthesis with soluble enzymes, *J. Biol. Chem.* **191**: 161-172, 1951.
- 17) M. Ito, T. Fukui, M. Kamokari, T. Saito, and K. Tomita, Purification and characterization of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta.* **794**: 183-193, 1984.
- 18) J. D. Bergstrom, and J. Edmond, A radiochemical assay for acetoacetyl-CoA synthetase, *Anal. Biochem.* **149**: 358-364, 1985.
- 19) Y. Y. Yeh, J. R. Ginsburg, and T. B. Tso, Changes in lipogenic capacity and activities of ketolytic and lipogenic enzymes in brain regions of developing rats, *J. Neurochem.* **40**: 99-105, 1983.
- 20) D. H. Williamson, and V. Ilic, Activities of enzymes of acetoacetate metabolism in rat brown adipose tissue during development, *Biochem. J.* **231**: 773-775, 1985.

- 21) B. M. Buckley, and D. H. Williamson, Acetoacetyl-CoA synthetase; a lipogenic enzyme in rat tissues, *FEBS Lett.* **60**: 7-10, 1975.
- 22) J. D. Bergstrom, G. A. Wong, P. A. Edwards, and J. Edmond, The regulation of acetoacetyl-CoA synthetase activity by modulators of cholesterol synthesis in vivo and the utilization of acetoacetate for cholesterologenesis, *J. Biol. Chem.* **259**: 14548-14553, 1984.
- 23) S. Rous, Fasting and insulin regulation of the utilization of acetoacetate for fatty acid synthesis, *Arch. Biochem. Biophys.* **179**: 328-333, 1977.
- 24) G. J. Caamaño, M. A. Sánchez-del-Castillo, J. Iglesias, E. García-Peregrín, and A. Linares, Ketone body utilization in duodenum. Differential effect of fasting on lipogenesis from acetoacetate and 3-hydroxybutyrate, *Biochem. Int.* **19**: 855-861, 1989.
- 25) M. J. Tisdale, Role of acetoacetyl-CoA synthetase in acetoacetate utilization by tumor cells, *Cancer Biochem. Biophys.* **7**: 101-107, 1984.
- 26) B. M. Buckley, and D. H. Williamson, Acetoacetate and brain lipogenesis: developmental pattern of acetoacetyl-coenzyme A synthetase in the soluble fraction of rat brain, *Biochem. J.* **132**: 653-656, 1973.
- 27) G. Endemann, P. G. Goetz, J. Edmond, and H. Brunengraber, Lipogenesis from ketone bodies in the isolated perfused rat liver. Evidence for the cytosolic activation of acetoacetate, *J. Biol. Chem.* **257**: 3434-3440, 1982.
- 28) M. S. Patel, and O. E. Owen, Lipogenesis from ketone bodies in rat brain. Evidence for conversion of acetoacetate into acetyl-coenzyme A in the cytosol, *Biochem. J.* **156**: 603-607, 1976.

- 29) M. Nakamoto, N. Takahashi, A. Iwahori, H. Sato, and T. Fukui, Effects of development on acetoacetyl-CoA synthetase biosynthesis in rat liver, *Biol. Pharm. Bull.* **22**: 981-983, 1999.
- 30) S. Leoni, S. Spagnuolo, L. Conti-Devirgiliis, L. Dini, M. T. Mangiantini, and A. Trentalance, Cholesterogenesis and related enzymes in isolated rat hepatocytes during pre- and postnatal life, *J. Cell Physiol.* **118**: 62-66, 1984.
- 31) A. Iwahori, N. Takahashi, M. Nakamoto, M. Iwama, and T. Fukui, cDNA-derived amino acid sequence of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver, *FEBS Lett.* **28**: 239-243, 2000.
- 32) M. Ito, T. Fukui, T. Saito, and K. Tomita, Acetoacetyl-CoA synthetase specific activity and concentration in rat tissues, *Biochim. Biophys. Acta.* **876**: 280-287, 1986.
- 33) T. Fujioka, F. Nara, Y. Tsujita, J. Fukushige, M. Fukami, and M. Kuroda, The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, in rats, *Biochim. Biophys. Acta.* **1254**: 7-12, 1995.
- 34) M. Yamasaki, S. Hasegawa, T. Kitani, K. Hidai, and T. Fukui, Differential effects of obesity on acetoacetyl-CoA synthetase gene in rat adipose tissues, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**: 617-622, 2007.
- 35) M. Yuan, N. Konstantopoulos, J. Lee, L. Hansen, ZW. Li, M. Karin, SE. Shoelson, Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or target disruption of IKKbeta, *Science*, **293**: 1673-1677, 2001.
- 36) E. W. Askew, G. L. Dohm, and R. L. Huston, Fatty acid and ketone body metabolism in the rat: response to diet and exercise, *J. Nutr.* **105**: 1422-1432, 1975.

- 37) M. K. Badman, and J. S. Flier, The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars, *Science* **307**: 1909-1914, 2005.
- 38) T. Yamada, H. Katagiri, Y. Ishigaki, T. Ogihara, J. Imai, K. Uno, Y. Hasegawa, J. Gao, H. Ishihara, A. Niijima, H. Mano, H. Aburatani, T. Asano, and Y. Oka, Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation, *Cell Metab.* **3**: 223-229, 2006.
- 39) M. Ohgami, N. Takahashi, M. Yamasaki, and T. Fukui, Expression of acetoacetyl-CoA synthetase, a novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, in human brain, *Biochem. Pharmacol.* **65**: 989-994, 2003.
- 40) M. Ohnuki, N. Takahashi, M. Yamasaki, and T. Fukui, Different localization in rat brain of the novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, as compared to succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase, *Biochim. Biophys. Acta.* **1729**: 147-153, 2005.
- 41) C. Courteix, A. Eschalier, and J. Lavarenne, Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain, *Pain* **53**: 81-88, 1993.
- 42) P. S. Ciechanowski, W. J. Katon, and J. E. Russo, Depression and diabetes: impact of depressive symptoms on adherence, function, and costs, *Arch. Intern. Med.* **160**: 3278-3285, 2000.
- 43) S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, A. W. Ferrante Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.* **112**: 1796-1808, 2003.
- 44) G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman, Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science* **259**: 87-91, 1993.

- 45) I. Shimomura, T. Funahashi, M. Takahashi, K. Maeda, K. Kotani, T. Nakamura, S. Yamashita, M. Miura, Y. Fukuda, K. Takemura, K. Tokunaga, and Y. Matsuzawa, Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity, *Nat. Med.* **2**: 800-803, 1996.
- 46) G. J. Morton, Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism, *J. Physiol.* **583**: 437-443, 2007.
- 47) X. P. Xu, D. Erichsen, Sl. Börjesson, M. Dahlin, P. Amark, and F. Elinder, Polyunsaturated fatty acids and cerebrospinal fluid from children on the ketogenic diet open a voltage-gated K channel: a putative mechanism of antiseizure action, *Epilepsy Res.* **80**: 57-66, 2008.
- 48) A. Guijarro, A. Laviano, and M. M. Meguid, Hypothalamic integration of immune function and metabolism. *Prog. Brain Res.* **153**: 367-405, 2006.
- 49) J. M. Friedman, and J. L. Halaas, Leptin and the regulation of body weight in mammals, *Nature* **395**: 763-770, 1998.
- 50) N. Satoh, Y. Ogawa, G. Katsuura, M. Hayase, T. Tsuji, K. Imagawa, Y. Yoshimasa, S. Nishi, K. Hosoda, and K. Nakao, The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats, *Neurosci. Lett.* **224**: 149-152, 1997.
- 51) G. A. Bray, The Zucker-fatty rat: a review, *Fed. Proc.* **36**: 148-153, 1977.
- 52) M. S. Phillips, Q. Liu, H. A. Hammond, V. Dugan, P. J. Hey, C. J. Caskey, and J. F. Hess, Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nat. Genet.* **13**: 18-19, 1996.

- 53) T. Yamashita, T. Murakami, M. Iida, M. Kuwajima, and K. Shima, Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction, *Diabetes* **46**: 1077-1080, 1997.
- 54) M. I. Malewiak, S. Griglio, and X. Le Liepvre, Relationship between lipogenesis, ketogenesis, and malonyl-CoA content in isolated hepatocytes from the obese Zucker rat adapted to a high-fat diet, *Metabolism* **34**: 604-611, 1985.
- 55) L. Abu-Elheiga, W. R. Brinkley, L. Zhong, S. S. Chirala, G. Woldegiorgis, S.J. Wakil, The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 1444-1449, 2000.
- 56) I. Miwa, J. Okudo, K. Maeda, and G. Okuda, Mutarotase effect on colorimetric determination of blood glucose with  $\beta$ -D-glucose oxidase. *Clin. Chim. Acta.* **37**: 538-540, 1972.
- 57) Y. Harano, K. Kosugi, T. Hyosu, S. Uno, Y. Ichikawa, and Y. Shigeta, Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies. *Clin. Chim. Acta.* **134**: 327-336, 1983.
- 58) S. H. Bates, W. H. Stearns, T. A. Dundon, M. Schubert, A. W. Tso, Y. Wang, A. S. Banks, H. J. Lavery, A. K. Haq, E. Maratos-Flier, B. G. Neel, M. W. Schwartz, and M. G. Myers, Jr., STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction, *Nature* **421**: 856-859, 2003.
- 59) Y. Minokoshi, T. Alquier, N. Furukawa, Y. B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Foufelle, P. Ferré, M. J. Birnbaum, B.J. Stuck, and B. B. Kahn, AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus, *Nature* **428**: 569-574, 2004.

- 60) D. Greitz, and J. Hannerz, A proposed model of cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography, *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* **17**: 431-438, 1996.
- 61) X. M. Guan, J. F. Hess, H. Yu, P. J. Hey, and L. H. Ploeg, Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain, *Mol. Cell Endocrinol.* **133**: 1-7, 1997.
- 62) S. Bhatnagar, and M. F. Dallman, The paraventricular nucleus of the thalamus alters rhythms in core temperature and energy balance in a state-dependent manner, *Brain Res.* **851**: 66-75, 1999.
- 63) P. E. Sawchenko, and L. W. Swanson, The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat, *J. Comp. Neurol.* **218**: 121-144, 1983.
- 64) M. M. Moga, R. P. Weis, and R. Y. Moore, Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat, *J. Comp. Neurol.* **359**: 221-238, 1995.
- 65) I. H. Zwain, and S. S. Yen, Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain, *Endocrinology* **140**: 3843-3852, 1999.
- 66) T. Kimoto, T. Tsurugizawa, Y. Ohta, J. Makino, Ho. Tamura, Y. Hojo, N. Takata, and S. Kawato, Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis, *Endocrinology* **142**: 3578-3589, 2001.
- 67) J. K. Kim, Y. J. Kim, J. J. Fillmore, Y. Chen, I. Moore, J. Lee, M. Yuan, Z. W. Li, M. Karin, P. Perret, S. E. Shoelson, and G. I. Shulman, Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate, *J. Clin. Invest.*, **108**: 437-446, 2001.

- 68) J. K. Kim, J. J. Fillmore, M. J. Sunshine, B. Albrecht, T. Higashimori, D. W. Kim, Z. X. Liu, T. J. Soos, G. W. Cline, W. R. O'Brien, D. R. Littman, and G. I. Shulman, PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance, *J. Clin. Invest.*, **114**: 823-827, 2004.
- 69) R. H. Unger, Y. T. Zhou, and L. Orci, Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 2327-2332, 1999.
- 70) D. W. White, D. W. Wang, S. C. Chua, J. P. Morgenstern Jr, R. L. Leibel, H. Baumann, and L. A. Tartaglia, Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Glu à Pro extracellular domain fatty mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 10657-10662, 1997.
- 71) Y. Minokoshi, Y. B. Kim, O. D. Peroni, L. G. Fryer, C. Müller, D. Carling, and B. B. Kahn, Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nature* **415**: 339-343, 2002.
- 72) Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* **372**: 425-432, 1994.
- 73) M. Shimabukuro, K. Koyama, G. Chen, M. Y. Wang, F. Trieu, Y. Lee, C. B. Newgard, and R. H. Unger, Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 4637-4641, 1997.
- 74) J. L. Wang, N. Chinookoswong, S. Scully, M. Qi, and Z. Q. Shi, Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo, *Endocrinology* **140**: 2117-2124, 1999.



- 75) J. G. Mercera, N. Hoggardb, L. M. Williamsa, C. B. Lawrencea, L. T. Hannah, and P. Trayhurn, Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization, *FEBS Let.* **387**: 113-116, 1996.
- 76) M. W. Schwartz, S. C. Woods, D. Porte Jr, R. J. Seeley, and D. G. Baskin, Central nervous system control of food intake, *Nature* **404**: 661-671, 2000.
- 77) N. Hoggard, J. G. Mercer, D. V. Rayner, K. Moar, P. Trayhurn, and L. M. Williams, Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**: 383-387, 1997.
- 78) D. M. Muoio, G. L. Dohm, F. T. Fiedorek, E. B. Tapscott, and R. A. Coleman, Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle, *Diabetes* **46**: 1360-1363, 1997.
- 79) A. Suzuki, S. Okamoto, S. Lee, K. Saito, T. Shiuchi, and Y. Minokoshi, Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase, *Mol. Cell Biol.* **27**: 4317-4327, 2007.
- 80) H. Chen, O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, J. Culpepper, K. J. Moore, R. E. Breitbart, G. M. Duyk, R. I. Tepper, and J. P. Moregenstern, Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice, *Cell* **84**: 491-495, 1996.

- 81) D. D. Belsham, F. Cai, H. Cui, S. R. Smukler, A. M. Salapatek, and L. Shkreta, Generation of a phenotypic array of hypothalamic neuronal cell models to study complex neuroendocrine disorders, *Endocrinology* **145**: 393-400, 2004.
- 82) D. G. Hardie, D. Carling, and M. Carlson, The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?, *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 821-855, 1998.
- 83) D. G. Hardie, and S. A. Hawley, AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited, *Bioessays* **23**: 1112-1119, 2001.
- 84) D. G. Hardie, and D. Carling, The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?, *Eur. J. Biochem.* **246**: 259-273, 1997.
- 85) U. Andersson, AMP-activated protein kinase plays a role in control of food intake, *J. Biol. Chem.* **279**: 12005-12008, 2004.
- 86) F. Zhang, S. Wang, A. P. Signore, and J. Chen, Neuro-protective effects of leptin against ischemic injury induced by oxygen-glucose deprivation and transient cerebral ischemia, *Stroke* **38**: 2329-2336, 2007
- 87) Z. Weng, A. P. Signore, Y. Gao, S. Wang, F. Zhang, T. Hastings, X. M. Yin, and J. Chen, Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling, *J. Biol. Chem.* **282**: 34479-34491, 2007.
- 88) M. Gasior, M. A. Rogawski, and A. L. Hartman, Neuro-protective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behav. Pharmacol.* **17**: 431-439, 2006.

- 89) L. Massieu, P. Del, Río, and T. Montiel, Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates, *Neuroscience* **106**: 669-677, 2001.
- 90) E. E. Baulieu, and P. Robel, Neurosteroids: a new brain function?, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **37**: 395-403, 1990.
- 91) J. W. VanLandingham, S. M. Culter, S. Virmani, S. W. Hoffman, D. F. Covey, K. Krishnan, S. R. Hammes, M. Jamnongjit, and D. G. Stein, The enantiomer of progesterone acts as a molecular neuroprotectant after traumatic brain injury, *Neuropharmacology* **51**: 1078-1085, 2006.
- 92) P. A. Lapchak, and D. M. Araujo, Preclinical development of neurosteroids as neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative diseases, *Int. Rev. Neurobiol.* **46**: 379-397, 2001.
- 93) F. Catalina, S. G. Speciale, V. Kumar, L. Milewich, and M. Bennett, Food restriction-like effects of dietary dehydroepiandrosterone. Hypothalamic neurotransmitters and metabolites in male C57BL/6 and (C57BL/6 × DBA/2) F1 mice, *Exp. Biol. Med.* **226**: 208-215, 2001.
- 94) W. W. Wong, J. Dimitroulakos, M. D. Minden, and L. Z. Penn, HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis, *Leukemia* **16**: 508-519, 2002.