

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

リポカリンファミリー分子 **MUP1** の
糖・脂質代謝における役割に関する研究

青木 明

2015 年

目次

緒論	1
第1章 糖尿病・肥満状態に至る以前における MUP1 の糖・脂質代謝に与える影響	
第1節 緒言	3
第2節 実験材料および方法	3
第3節 実験結果	15
第4節 考察	24
第2章 脂肪蓄積／脂肪細胞分化における MUP1 の役割	
第1節 緒言	26
第2節 実験材料および方法	26
第3節 実験結果	32
第4節 考察	40
第3章 雄性マウスの脂肪蓄積における MUP1 の役割	
第1節 緒言	43
第2節 実験材料および方法	44
第3節 実験結果	46
第4節 考察	54
総括	57
謝辞	60
参考文献	61

緒論

Major Urinary Protein (MUP) は、リポカリンファミリーに属し^{1,2)}、その主な産生臓器は肝臓ではあるが全身で発現し血清中に分泌され^{3,4)}、尿中に排泄される低分子のタンパク質である⁵⁾。リポカリンファミリー分子とは、疎水性結合部位を持つ8つのストランドから構成されるβバレル構造という共通の構造を有している。この構造によって、リポカリンファミリー分子は、疎水性の低分子と結合し、様々な疎水性物質のキャリアーとして働くと考えられている⁶⁾。そのうちMUPは、マウスにおけるフェロモンのキャリアーとして働くことが報告されているため、MUPはマウスの個体認識に関与すると考えられている^{1,7,8)}。

近年、他のリポカリンファミリー分子である Retinol binding protein 4 (RBP4)⁹⁻¹¹⁾、Lipocalin 2 (LCN2)¹²⁻¹⁴⁾ といった分子が、疎水性物質のキャリアーとしての機能とは別に、糖・脂質代謝の制御において重要な因子であることが明らかとされ、糖尿病や肥満と関連する疾患における診断マーカーとしての利用といった臨床応用に向けた検討も数多く報告されている¹⁵⁻²⁰⁾。MUPにおいても、そのサブタイプの一つであるMUP1が肝臓における糖新生と脂質合成の調節因子として働くこと²¹⁾、またMUP1が骨格筋におけるミトコンドリア機能の促進によりエネルギー消費と耐糖能を向上すること²²⁾が報告された。これらのことから、MUP1もRBP4やLCN2といったリポカリンファミリー分子と同様に、フェロモンのキャリアーとしての働きに加えて、糖・脂質代謝の制御において何らかの役割を担う可能性が示唆された。

さらにMUP1は、栄養状態に応じた発現プロファイルを示すことが報告されている。肝臓におけるMUP1の発現量は、カロリー制限によって著しく減少し^{23, 24)}、また一晩絶食することによっても減少する一方で、絶食後に再度餌を摂

取することで著しく上昇する²²⁾ことが報告されている。脂肪組織においては、高脂肪食を3~5週間といった短期間摂取することでMUP1の発現量は増加する²⁵⁾一方で、短期間の絶食によりその発現量は減少する²⁶⁾ことが報告されている。つまり、MUP1は糖尿病や肥満といった疾患状態だけではなく、それらの疾患に至る以前の栄養状態においても糖・脂質代謝に影響を及ぼすことが考えられる。さらに、糖尿病・肥満状態マウスの脂肪組織におけるMUP1の発現量は、非疾患マウスと比較して著しくその発現量が低いことも報告されている^{22, 27)}。これらのことから、MUP1の糖・脂質代謝における役割は、栄養状態により異なる可能性が示唆される。しかし、前述したMUP1の糖・脂質代謝への関与を示唆する先行研究は、糖尿病・肥満モデルマウスであるdb/dbマウスに、ウイルスベクターでMUP1を肝臓だけに過剰発現した検討²¹⁾や、精製MUP1蛋白質を外来的に投与した検討²²⁾である。そのため、糖尿病・肥満状態といった疾患に至る以前のMUP1の働きは不明なままであるのが現状である。

そこで本研究では、全身でMUP1を高発現するトランスジェニックマウスを独自に作製し、そのトランスジェニックマウスの解析を行うことで、糖尿病・肥満状態に至るまでのMUP1の生理的意義や生体内における作用部位に関する検討を行った。

第1章 糖尿病・肥満状態に至る以前における MUP1 の糖・脂質代謝に 与える影響

第1節 緒言

糖尿病・肥満状態に至るまでの MUP1 の糖・脂質代謝における役割を検討するために、先ず遺伝子改変マウスを作製することを計画した。一般的にある特定の遺伝子の機能を解析するための有効な方法のひとつに遺伝子欠損動物を用いる方法がある。しかし、MUP ファミリーはゲノム上に連続して存在し、サブタイプ間の遺伝子配列は酷似している。そのため、複数あるサブタイプの中で MUP1 だけを欠損したマウスを作製することは非常に困難である。そこで本検討では、MUP1 を高発現するトランスジェニックマウスを作製することを計画した。また、MUP1 の主な産生臓器は肝臓ではあるものの、全身で発現することが知られており、肝臓以外の他の臓器においても糖・脂質代謝の制御因子としての役割を担っている可能性が考えられる。そのため本検討においては、プロモーターとして Cytomegalovirus early enhancer/ chicken β -actin (CAG) プロモーターを用いて、全身で MUP1 を高発現するトランスジェニック (MUP1-TG) マウスの作製を行い、MUP1 の機能を解析することを試みた。

さらに作製した MUP1-TG マウスを用いて、通常食を摂取させた条件に加え、高脂肪食を短期間摂取させることにより軽度な負荷をかけた状態での検討についても行った。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料および試薬

TRIzol reagent は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、ImProm-II Reverse Transcriptase はプロメガ (東京)、QuantiTect SYBR Green PCR reagent は Qiagen (Valencia, CA, USA)、GSTrap HP、Hi trap protein A HP、Glutathione Sepharose 4B、ECL ウェスタンブロッティング試薬は GE ヘルスケア・ジャパン (日野)、イソプロパノール、クロロホルム、Diethylpyrocarbonate (DEPC)、Tris、Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、プロテアーゼインヒビターカクテル、パラホルムアルデヒド、キシレン、マイヤーヘマトキシリンはナカライテスク (京都)、メタノール、エタノールは関東化学 (東京)、エオシン溶液、トリグリセリド E-テストワコーは和光純薬 (大阪)、オイキッドはアズワン (大阪)、パラフィンはキシダ化学 (大阪)、Quick Taq HS DyeMix は東洋紡 (大阪)、IMMUNO SHOT Reagent はコスモ・バイオ (東京) より購入した。

2-2 Total RNA の調製

マウスの各臓器を得た後、SK ミル (フナコシ、東京) を用いて臓器の破碎を行った。TRIzol reagent を 1.0 mL 加えて 18G 針付シリンジ (TERUMO、東京) を用いて針に 10 数回通し、ゲノムの切断を行った。クロロホルムを 0.2 mL 加えて激しく攪拌し室温で数分間静置後、15,000 g、4°C で 15 分間遠心した。水層を別のチューブに取り、TRIzol reagent 0.4 mL、クロロホルム 0.2 mL を加えて攪拌した。15,000 g、4°C で 10 分間遠心し、水層を別のチューブに取り、等容のクロロホルムを加えて攪拌後、15,000 g、4°C で 5 分間遠心した。さらに、水層を別のチューブに取り、等容量のイソプロパノールを加えて混和した。室温で 10 分間静置後、15,000 g、4°C で 10 分間遠心し、得られた沈殿を 75% エタノール 1 mL

で洗浄後、風乾させた。沈殿を 20 μ L の DEPC 処理水に溶解し、 -80°C で保存した。

2-3 Single strand cDNA の合成

得られた Total RNA を 260 nm の吸光度を測定した後、その Total RNA 1 μ g に 10 μ M mixed oligo dT primer (TP) を 2 μ L 加え、全量が 5 μ L になるように DEPC 処理水を加えた。70 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加熱した後、氷上で急冷した。5x ImProm-II buffer 4 μ L、20 mM MgCl_2 2.4 μ L、10 mM dNTPmix 1 μ L、ImProm-II Reverse Transcriptase 1 μ L を加え、全量 20 μ L とした後、42 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間反応させ、Single strand cDNA を合成した。TE buffer (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) 60 μ L を加え、希釈した。

TP : 5'-GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTVN-3'

(V=A or C or G, N=A or C or G or T)

2-4 ベクターの作製

調製した cDNA を用いて、Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により MUP1 の全長を増幅した。ただし、Forward primer には 5'-CAGACAGACAATCCTATTCCCTACC-3' を用い、Reverse primer には 5'-GGATGCTGTATGGATAGGAAGGGATGATG-3' を用いた。MUP1-TG マウスを作製するため、*pCAG-Cre-polyA* ベクターを *EcoRI* 処理により Cre 遺伝子を取り除き、MUP1 cDNA の全長を組み込んだ。作製したベクターは *pCAG-MUP1* ベクターと名付けた。また、N 末端に Glutathione S-transferase (GST) を持つリコンビナント MUP1 蛋白質 (MUP1-GST) を作製するため、*pGEX-4T-1* ベクター (GEヘルスケア・ジャパン、日野) の *Not I* 処理断片に MUP1 cDNA の全長を組み込んだ。作製したベクターは *pGEX-MUP1* と名付けた。なお、*pCAG-Cre-polyA* ベ

クターは大阪大学 伊川正人先生に御供与頂いた²⁸⁾。定量 Real-time RT-PCR に用いるスタンダードの作製は、調製した cDNA を用いて、Table 1 のプライマーを用いて各条件下において、RT-PCR により Quick Taq HS DyeMix を用いて各遺伝子を増幅させ、*pGEM-T Easy Vector* (プロメガ、東京) に組み込んだ。

2-5 シークエンス解析

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて目的遺伝子のシークエンス解析を行った。作製したプラスミド (300 ng 相当) を鋳型として、Big Dye 4.0 μL 、5 \times Sequencing Buffer 4 μL 、1 pmol/L primer 3.2 μL を混和し、全量が 20 μL となるよう調製した。PCR は、96°C で 2 分間変性させた後、96°C, 30 秒、50°C, 15 秒、60°C, 120 秒を 1 サイクルとして、これを 25 サイクル行なった。反応終了後、反応液全量を 1.7 mL チューブに移し、70% エタノール 80 μL を加えて軽く混和し、室温で 10 分間静置した。その後 15 分間遠心し (18,000 g, 室温)、上清を取り除いた。次に 70% エタノール 100 μL を加えて軽く攪拌した後、10 分間遠心し (18,000 g, 室温)、上清を残さないように注意深く取り除いた。チューブ内に残ったサンプルを 5 分間ほど風乾した後、HiDi Formamide 20 μL に溶解した。シークエンス解析を行なう前に、100°C で 3 分間処理し、直後に急冷することによって DNA を変性させた。シークエンス解析は ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

Table 1. Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions for PCR cloning.

Gene (Accession No.)		Primer sequences Sequence (5' to 3')	PCR condition (35 cycles in all cases)			Product Size (bp)
			Denaturation	Annealing	Elongation	
MUP1 (NM_031188)	Forward	CAGACAGACAAT CCTATTCCCTACC	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 60 sec	648
	Reverse	GGATGCTGTATGG ATAGGAAGGGAT GATG-				
PEPCK (NM_011044)	Forward	GACAGACTCGCC CTATGTG	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	551
	Reverse	TTGTCTTCACTGA GGTGCCAG				
G6Pase (NM_008061)	Forward	GACTGGTTCAACC TCGTCTTC	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	565
	Reverse	GTGTAGTGTCAAG GTGGACC				
FAS (NM_007988)	Forward	GGCTGCTGTTGGA AGTCAG	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	557
	Reverse	AGAGGGGAATGT TACACCTTGC				
Scd1 (NM_009127)	Forward	ATCATACTGGTTC CCTCCTGC	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	531
	Reverse	ACTGTTCAACCAGC CAGGTG				
LPL (NM_008509)	Forward	TCCAGAGTTTGAC CGCCTTC	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	541
	Reverse	CCAGCTGGATCCA AACCAG				
PPAR γ (NM_001127330)	Forward	TGACCTGAAGCTC CAAGAATACCA	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	529
	Reverse	GTCCGTTGTCTTT CCTGTCAAGAT				
PPAR δ (NM_011145)	Forward	TGCCAGGCACTTC TGGAAG	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	548
	Reverse	TCATAGCTCTGCC ACCATC				
β -actin (NM_001101)	Forward	CCCTGAACCCTAA GGCCAACCGTG	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	560
	Reverse	GGCATAGAGGTCT TTACGGATGTCAA CG				

MUP1, Major urinary protein 1; PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6Pase, Glucose-6-phosphatase; FAS, Fatty acid synthase, Scd1, Stearoyl-CoA desaturase 1; LPL, Lipoprotein lipase; PPAR, Peroxisome proliferator-activated receptor

2-6 実験動物

MUP1-TG マウスの作製は、特定非営利活動法人発生工学研究会 (大阪) に委託した。*pCAG-MUP1* ベクターを *Sal I/Pst I* 処理し、得られたフラグメントを雌雄 BDF1 系統マウスの交配より得られた前核期受精卵にマイクロインジェクション法により遺伝子導入を行い、偽妊娠した雌 ICR 系統マウスへ遺伝子導入した受精卵を移植した。遺伝子改変が成功した仔マウスの選別は、仔マウスの尾より抽出したゲノム DNA を用いて、CAG プロモーターを認識する特異的なプライマーを用いて、PCR 法により検出を行った。ただし、Forward primer には 5'-GGCTTCTGGCGTGTGACCGGC-3' を用い、Reverse primer には 5'-CAGAGGGGAAAAAGATCTCAGTGG-3' を用いた。得られた PCR 産物は、アガロースゲルにより電気泳動後、エチジウムブロマイドにより染色して検出した。7 匹のファウンダーマウスにおいて遺伝子導入が確認されたため、野生型 C57BL/6J 系統マウス (日本チャールズリバー、横浜) と交配し、そのうちの 3 匹のファウンダーマウスにおいては、次世代の仔マウスが得られた。本検討における MUP1-TG マウスは、得られた 3 ライン (A1-4, A1-8, A1-13) のうち A1-8 について、野生型 C57BL/6J 系統マウスと戻し交配を行った F7~F10 世代のマウスを用いて検討を行った。マウスは、通常食 (MF; 13 Kcal%fat) または、高脂肪食 (D12492; 60 Kcal%fat) を給餌した。マウスの飼育は、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\% \pm 10\%$ 、明期 12 時間暗期 12 時間の明暗周期下で飼育し、水と餌は自由に摂食させ、本研究におけるすべての動物実験は、「岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会」と「岐阜薬科大学バイオセーフティー委員会」の承認を得た後、十分な動物擁護の配慮下で行った。なお、MF はオリエンタル酵母工業株式会社 (東京)、D12492 はリサーチダイエット社 (New Jersey, USA) より購入した。

2-7 定量 Real-time RT-PCR

マウスの各臓器の Total RNA を抽出し、cDNA を調製した。得られた cDNA を鋳型として、LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて Real-time RT-PCR を行った。なお、Real-time RT-PCR には、QuantiTect SYBR Green PCR reagent と Table 2 のプライマーを用いて各条件下にて行い、内部標準として β -actin を用いて、各測定値を補正した。

Table 2. Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions for quantitative real-time RT-PCR analysis.

Gene (Accession No.)	Primer sequences	PCR condition (40 cycles in all cases)			Product Size (bp)	
		Sequence (5' to 3')	Denaturation	Annealing		Elongation
MUP1 (NM_031188)	Forward Reverse	CAGACAGACAAT CCTATTCCCTACC GTCAGAGGCCAG GATAATAGTATGC CATTC	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	108
PEPCK (NM_011044)	Forward Reverse	GTCGAATGTGTGG GCGATG TTGTCTTCACTGA GGTGCCAG	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	118
G6Pase (NM_008061)	Forward Reverse	GACTGGTTCAACC TCGTCTTC CATAGTATACACC TGCTGCGC	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	181
FAS (NM_007988)	Forward Reverse	GGCTGCTGTTGGA AGTCAG ACCATGCTGTAGC CCAGAAG	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	160
Scd1 (NM_009127)	Forward Reverse	ATCATACTGGTTC CCTCCTGC CCGTGCCTTGTA GTTCTGTG	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	126
LPL (NM_008509)	Forward Reverse	TCCAGAGTTTGAC CGCCTTC GTCCTCAGCTGTG TCTTCAG	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	113
PPAR γ (NM_001127330)	Forward Reverse	TGACCTGAAGCTC CAAGAATACCA GAAGGTTCTTCAT GAGGCCTGTTGTA	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	108
PPAR δ (NM_011145)	Forward Reverse	GTATGCGCATGGG ACTCAC TCATAGCTCTGCC ACCATC	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	109
β -actin (NM_001101)	Forward Reverse	CCCTGAACCCTAA GGCCAACCGTG GCCTGTGGTACGA CCAGAGGCATAC	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	113

2-8 抗 MUP1 抗体の作製

抗 MUP1 抗体は、*pGEX-MUP1* ベクターをトランスフォーメーションした大腸菌 BL21/DE を作製し、その大腸菌により作製したリコンビナント MUP1-GST 蛋白質をウサギに免疫して得られた抗血清より作製した。

大腸菌より得られたリコンビナント MUP1-GST 蛋白質は、GSTrap HP を用いて精製した。Wash binding buffer として PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, (pH 7.3))、溶出 buffer として 50 mM Tris-HCl, 10 mM 還元型 glutathione, (pH 8.0) を調製した。カラムに 5mL 注射シリンジを接続し、Wash binding buffer を 5 回、カラムボリューム量添加して、シリンジを押し、洗浄を行うことにより、平衡化を行った。シリンジにリコンビナント MUP1-GST 蛋白質溶液を注射シリンジに 2.5 mL 添加し、シリンジを押し、カラムに加えた。カラムを Wash binding buffer で 5 回、カラムボリューム量を添加して、シリンジを押し洗浄した。カラムを溶出 buffer で 3 回、カラムボリューム量を添加して、シリンジを押し洗浄した。再度 Wash binding buffer を 5 回、カラムボリューム量添加して、シリンジを押し、洗浄を行うことにより、平衡化を行い、上記の操作を繰り返して精製を行った。

精製した GST-MUP1 蛋白質をシグマアルドリッチジャパン (東京) への委託にてウサギに免疫し、抗血清を得た。

得られた抗血清は Hi trap protein A HP を用いて抗体を精製した (リコンビナント MUP1-GST 蛋白質の精製と同様)。Wash Binding buffer として 20 mM Sodium phosphate (pH 7.0)、溶出 buffer として 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7)、中性 buffer として 1 M Tris-HCl (pH 9.0) を調製した。カラム内の液を遠心 (30 秒 100 g) にて溶液を除去した。Wash binding buffer を 600 μ L を加え、遠心 (30 秒 100 g) し、溶液を除去した。カラムに抗血清 600 μ L を加え、蓋をした後 4 分間穏やかに攪

拌した後、遠心 (30 秒 100 g) し、溶液を除去した。カラムに Wash binding buffer 600 μ L を加え、遠心 (30 秒 100 g) した後、再度 Wash binding buffer 600 μ L を加え、遠心 (30 秒 100 g) をしてカラムを洗浄した。カラムに溶出 buffer 400 μ L 加えて軽く攪拌後、事前に中性 buffer を 30 μ L 添加した Collection チューブにカラムをセットし、遠心 (30 秒 100 g) して抗体を得た (2 度行った)。

さらに、抗 GST 抗体を除くため、精製した抗体を Glutathione Sepharose 4B を用いて、GSTrap HP を通した素通り画分を抗 MUP1 抗体として得た。Wash binding buffer として 20 mM リン酸 buffer (0.2 M Na_2HPO_3 , 0.2 M NaH_2PO_3 (pH7.0)) を調製した。カラムに 5mL 注射シリンジを接続し、Wash binding buffer を 5 回、カラムボリューム量添加して、シリンジを押し、洗浄を行うことにより、平衡化を行った。シリンジに得られた抗体を注射シリンジに 2.5 mL 添加し、シリンジを押し、カラムに加えた。カラムを Wash binding buffer を通して、抗 MUP1-抗体を得た。

2-9 ウェスタンブロット

肝臓はホモジナイズし、血清はマウスの血液を遠心 (30 秒 1000 g) により分離した。得られた肝臓、血清に加えマウスの尿について、DMSO にて 100 \times プロテアーゼインヒビターカクテルを調製して PBS (pH 7.3) に 100 倍希釈にて加え、調製した PBS を溶媒として蛋白質サンプルを調製した。調製したサンプルは、15% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide ゲルを用いて電気泳動をした後、Polyvinylidene difluoride 膜へ転写した。転写後、PBS (pH 7.3) を溶媒とした 5 w/v % ECL Blocking Agent にて 1 時間ブロッキングを行い、IMMUNO SHOT Reagent 1 を溶媒として作製した抗 MUP1 抗体 (1000 倍希釈) を 1 次抗体として 4 $^{\circ}$ C 一晩反応後、IMMUNO SHOT Reagent 2 を溶媒として Peroxidase 標識した抗

ウサギ IgG 抗体 (2000 希釈) を 2 次抗体として室温にて 1 時間反応後、ECL ウ
エスタンプロットティング試薬を用いてバンドの検出を行った。

2-10 脂肪組織の病理学的な形態観察

脂肪組織の一部を包埋カセットに入れ、4% パラホルムアルデヒド液にて浸漬
させた後、1:1 メタノール/キシレン液にて脱脂 (一晚) を行った。そして、70%
エタノール (30 分)、80% エタノール (30 分)、95% エタノール (30 分)、無水エ
タノール (一晚)、キシレン (30 分 3 回)、1:1 キシレン/パラフィン (30 分)、
パラフィン (30 分 2 回) の順で浸漬し、脱脂・脱水・透徹を行った。次に、パ
ラフィン包埋し、ミクロトームを用いて 14~18 μm の薄切切片を作成した。スラ
イドガラスに伸展させた切片を 35°C にて一晚インキュベートした後、キシレン
(5 分 2 回)、100% エタノール (5 分 2 回)、90% エタノール (1 分)、70% エ
タノール (1 分)、蒸留水 (10 分 2 回)、ヘマトキシリン液 (10 分)、流水 (10 分)、
蒸留水 (数秒)、0.5% 塩酸/70% エタノール液 (1、2 回浸す)、流水 (5 分)、PBS
(数秒)、0.1% アンモニア水 (数秒)、エオシン染色液 (2 分)、95% エタノール (1
分)、99% エタノール (1 分)、無水エタノール (1 分 2 回)、キシレン (5 分 2
回) の順で各試液の入った染色瓶にて浸漬し、ヘマトキシリン・エオシン染色を
行った。その後、オイキッドにて封入し、脂肪組織の形態観察を行った。

2-11 血清中トリグリセリド濃度の測定

マウスより採血し、遠心操作により分離した血清をトリグリセリド E-テスト
ワコーを用いた比色法にて測定した。添付の溶液にて発色液を調製し、血清に
150 倍容量の発色液を加えて 37°C、5 分反応させた。同時に添付の基準液 (グリ
セリン 31.2 mg/dL トリオレイン 300 mg/dL 相当) も同様に反応させ、検量線を

作成した。測定は、595 nm の波長をマイクロプレートリーダーにて検出した²⁹⁾。

2-12 統計処理

統計処理は、SPSS 15.0J ソフト (IBM, Chicago, IL) を用いて Student's t 検定により行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

第3節 実験結果

3-1 MUP1-TG マウスの樹立と性状解析

全身で MUP1 を高発現する MUP1-TG マウスの作製を行ったところ、7 匹のファウンダーマウスを得ることができた。そのうち、3 匹のファウンダーマウス (ライン A1-4、A1-8、A1-13) においては、正常な繁殖機能が認められ仔マウスを得ることができたことから、ライン化に成功した。その中でも、特に MUP1 の発現量が高いライン A1-8 の通常食摂取時における MUP1 mRNA 発現量の測定を行った。結果、雌性 MUP1-TG は野生型マウスと比較して、肝臓、腎臓、脂肪組織、子宮、脳といった臓器において MUP1 mRNA 発現量が有意に高いことが確認された (Fig. 1A)。また雄性 MUP1-TG マウスにおいては肝臓でこそ MUP1 mRNA 発現の増加は確認できなかったものの、腎臓、脾臓、脂肪組織、精巣、脳といった臓器においては発現量が有意に高いことが確認された (Fig. 1A)。さらに、尿、肝臓、血清における MUP1 蛋白質量をウェスタンブロット法により解析を行った。結果、雌雄共に MUP1-TG マウスは野生型マウスと比較して、尿、肝臓、血清における MUP1 蛋白質量が高いことが認められた (Fig. 1B)。以上の結果より、全身で MUP1 を高発現する MUP1-TG マウスの作製に成功した。また、野生型マウスと比較した際に雌性 MUP1-TG マウスは肝臓の MUP1 mRNA 発現量が有意に高いことから、MUP1 の糖・脂質代謝における役割を検討するには、雌性マウスを用いることでより MUP1 の機能を抽出することができると考えられた。

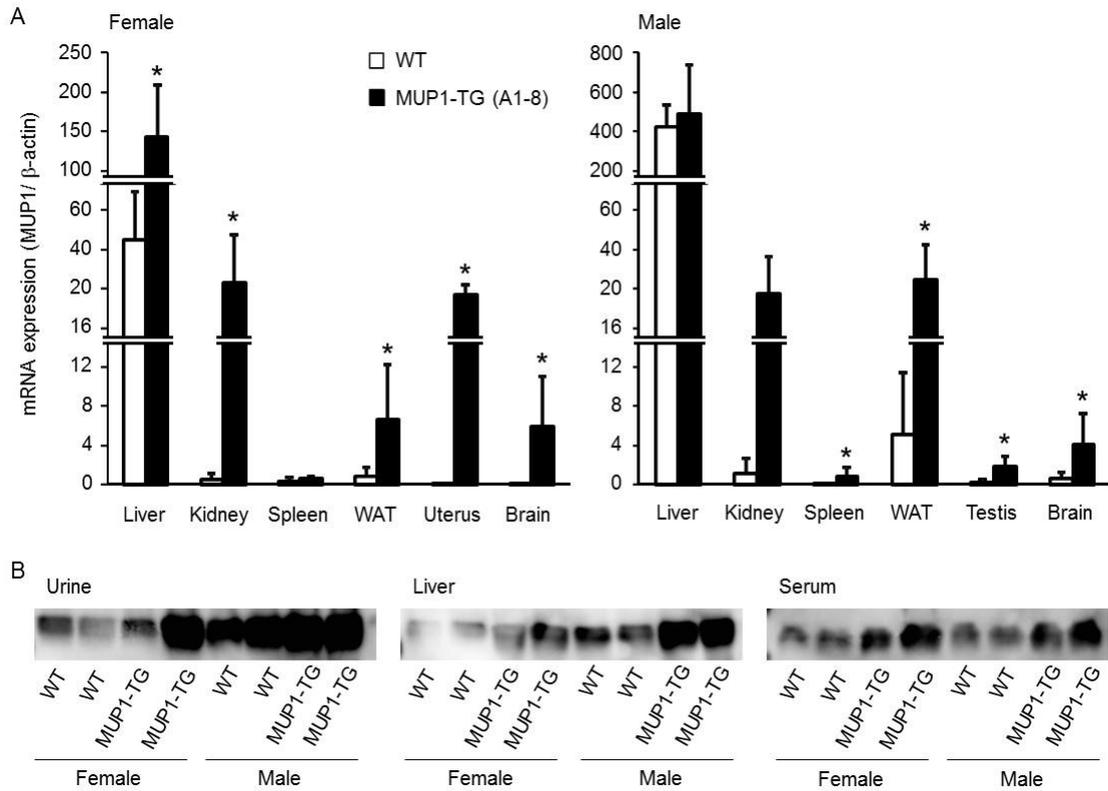


Fig. 1. Analysis of MUP1 levels in line A1-8 MUP1-TG mice. At 10 weeks of age, F7 generation MUP1-TG mice and wild-type (WT) littermate mice were fasted overnight, then euthanized for removal of liver, kidney, spleen, white adipose tissue (WAT), brain and uterus (or testis), and urine and blood collection. (A) MUP1 mRNA levels of each tissue in female and male mice were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=5-7$). * $p<0.05$, compared with WT mice. (B) MUP1 protein levels of urine sample (7.5 μ g), liver extracts sample (75 μ g) and serum sample (60 μ g) were prepared and immunoblotted with anti-MUP1 antibody.

3-2 通常食摂取下における MUP1 の糖・脂質代謝に与える影響

雄性 db/ db マウスを用いた先行研究においては、MUP1 は肝臓における糖新生と脂肪酸合成を抑制することで糖・脂質代謝の制御因子として働くことが報告されている²¹⁾。そこで、本検討においても MUP1 の糖・脂質代謝に与える影響を検討するために、より MUP1 を高発現することが確認された雌性 MUP1-TG マウスを用いて、MUP1 の糖・脂質代謝に与える影響を検討した。通常食を摂取させた雌性 MUP1-TG マウスは健康に成長し、体重と肝臓、生殖器周りの白色脂肪組織重量においては野生型マウスと差は認められなかった (Fig. 2)。そして、db/ db マウスを用いた先行研究において MUP1 による抑制作用が認められた肝臓の糖新生と脂肪酸合成に関与する遺伝子の mRNA 発現量を測定した。結果、MUP1-TG マウスにおいては、野生型マウスと比較して測定した遺伝子発現量に差は認められなかった (Table 3)。

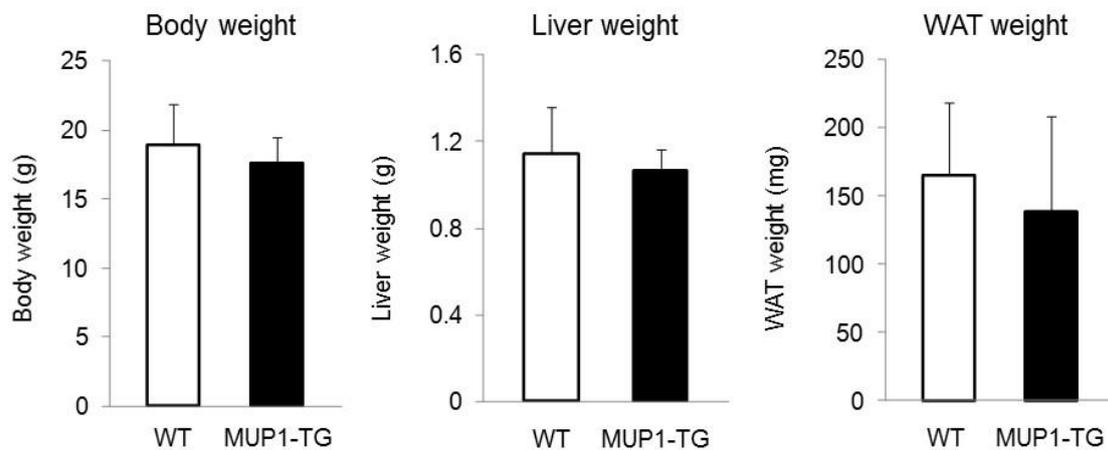


Fig. 2. Body weight, liver weigh and white adipose tissue (WAT) mass of MUP1-TG mice fed a standard chow diet. At 10 weeks of age, female MUP1-TG mice and wild-type littermate mice were fasted overnight, then euthanized for removal of liver and WAT. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=5-7$).

Table 3. MUP1-overexpression has no effect on the mRNA expression of glucose or lipid metabolism related genes in mice fed a standard chow diet.

Gene	Organ	WT	MUP1-TG
PEPCK	Liver	0.57 \pm 0.62	1.21 \pm 1.36
	Kidney	1.44 \pm 1.34	1.35 \pm 1.13
G6Pase	Liver	0.10 \pm 0.11	0.23 \pm 0.23
	Kidney	0.22 \pm 0.21	0.27 \pm 0.20
FAS	Liver	0.012 \pm 0.010	0.0036 \pm 0.0032
	WAT	0.044 \pm 0.027	0.024 \pm 0.032
Scd1	Liver	0.43 \pm 0.21	0.31 \pm 0.17
	WAT	0.34 \pm 0.39	0.24 \pm 0.28
LPL	Liver	0.0044 \pm 0.0033	0.0061 \pm 0.0076
	WAT	0.096 \pm 0.012	0.096 \pm 0.069
PPAR γ	Liver	0.0077 \pm 0.0045	0.016 \pm 0.015
	WAT	0.096 \pm 0.14	0.050 \pm 0.062
PPAR δ	WAT	0.0026 \pm 0.0048	0.0050 \pm 0.011
	Muscle	0.021 \pm 0.020	0.030 \pm 0.021

mRNA expression data were normalized to β -actin expression.. Results are expressed as mean \pm 1 standard deviation ($n=5-7$). WAT; White adipose tissue.

3-3 短期間高脂肪食摂取時における MUP1 の糖・脂質代謝に与える影響

高脂肪食を利用した研究の多くは、5、6 ヶ月など比較的長期間動物に高脂肪食を摂取させて、肥満状態の動物を解析することで研究がなされている^{30, 31)}。一方本検討は、糖尿病・肥満状態に至る以前の通常状態や軽度な負荷状態における MUP1 の糖・脂質代謝における役割を検討することが目的であるため、比較的短期間である 8 週間高脂肪食を摂取させて検討を行った。

4 週齢の雌性 MUP1-TG マウスに 8 週間高脂肪食を摂取させた結果、肝臓重量においては野生型マウスとの差が認められなかった一方で、高脂肪食摂取による体重増加に対して MUP1-TG マウスはその増加に対する有意な抑制が認められた (Fig. 3A)。さらに生殖器周りの白色脂肪組織において、高脂肪食摂取による重量増加に対して MUP1-TG マウスは有意な抑制が認められ、脂肪組織の形態観察においても、脂肪細胞の肥大化が MUP1-TG マウスにおいては抑制されていることが観察された (Fig. 3A, B)。また、血清中トリグリセリド濃度を測定した結果、野生型マウスにおいては通常食摂取と比較して高脂肪食摂取により有意な増加が認められた一方で、MUP1-TG マウスにおいては高脂肪食摂取による増加が抑制され、血清中トリグリセリド濃度は通常食摂取時のレベルまで抑制された (Fig. 3C)。

次に、糖・脂質代謝に関わる遺伝子発現量の検討を行った。結果、MUP1-TG マウスの脂肪組織における Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ mRNA 発現量が野生型マウスと比較して有意に高いことが認められ (Fig. 4)、測定したその他の遺伝子発現量については、MUP1-TG マウスと野生型マウスとの間で差は認められなかった (Table 4)。さらに、各臓器の高脂肪食摂取による MUP1 mRNA の発現変化について検討を行った結果、野生型マウスの各臓器における MUP1 mRNA 発現量は高脂肪食摂取により増加し、特に脂肪組織におけ

る発現量は高脂肪食摂取により 30 倍と劇的な増加が確認された (Fig. 5)。

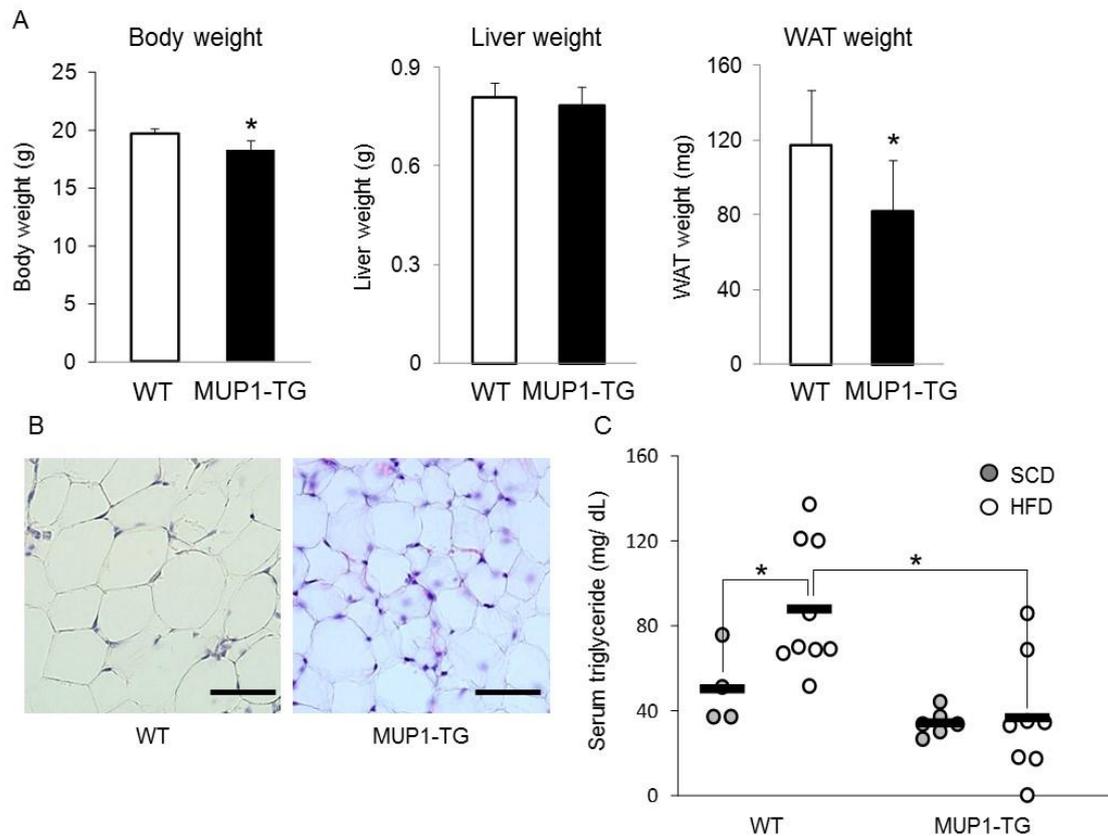


Fig. 3. Female MUP1-TG mice were resistance to short-term high-fat diet (HFD)-induced obesity. Female MUP1-TG mice and wild-type (WT) littermate mice were fed a HFD from 4 weeks of age until 12 weeks of age, or fed a standard chow diet (SCD) until 10 weeks of age. The mice were fasted overnight, then euthanized for removal of liver and white adipose tissue (WAT), and blood collection. (A) Total body weight, liver weight and WAT weight. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=9-12$). * $p<0.05$, compared with WT mice. (B) Histology of WAT in MUP1-TG mice and WT mice. Sections from WAT were stained with H&E. Bars indicate 200 μ m. (C) Serum triglycerides concentrations were analyzed using biochemical test kits (as described in the Materials and methods). The horizontal bars represent the means ($n=4-9$). * $p<0.05$, compared with WT mice.

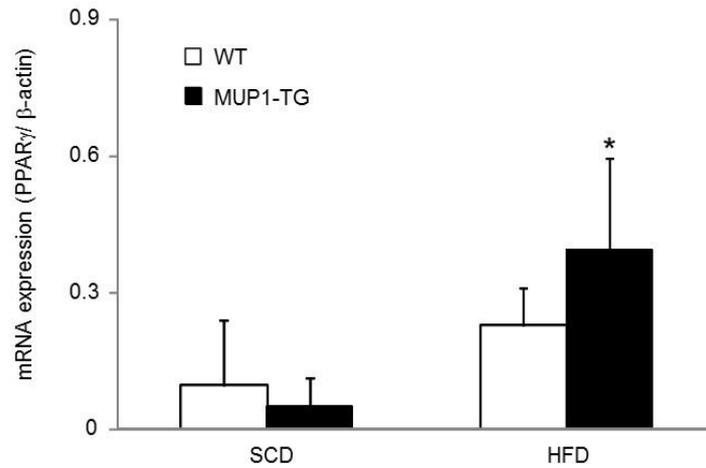


Fig. 4. PPAR γ expression is increased in adipose tissue of female MUP1-TG mice fed a high-fat diet (HFD). Female MUP1-TG mice and wild-type (WT) littermate mice were fed a HFD from 4 weeks of age until 12 weeks of age, or fed a standard chow diet (SCD) until 10 weeks of age. The mice were fasted overnight, then euthanized for isolation of total RNA from white adipose tissue. PPAR γ were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=6-12$). * $p<0.05$, compared with wild-type mice.

Table 4. The effect of MUP1 on the mRNA expression of glucose or lipid metabolism related genes in mice fed a high-fat diet.

Gene	Organ	WT	MUP1-TG
PEPCK	Liver	0.98 ±1.59	2.50±3.28
	Kidney	0.893±0.916	1.62±1.63
G6Pase	Liver	0.025±0.042	0.035±0.044
	Kidney	0.022±0.039	0.027±0.035
FAS	Liver	0.000072±0.000064	0.00016±0.00023
	WAT	0.00028±0.00029	0.00026±0.00027
Scd1	Liver	0.012±0.014	0.023±0.031
	WAT	0.048±0.027	0.073±0.063
LPL	Liver	0.0099±0.0095	0.022±0.033
	WAT	0.40±0.41	0.43±0.49
PPAR γ	Liver	0.046±0.036	0.063±0.063
	WAT	0.23±0.083	0.40±0.20 [†]
PPAR δ	WAT	0.0028±0.0032	0.0080±0.0017
	Muscle	0.0058±0.051	0.024±0.034

mRNA expression data were normalized to β -actin expression.. Results are expressed as mean \pm 1 standard deviation (n=5-7). [†] p <0.05, compared with wild-type mice. WAT; White adipose tissue.

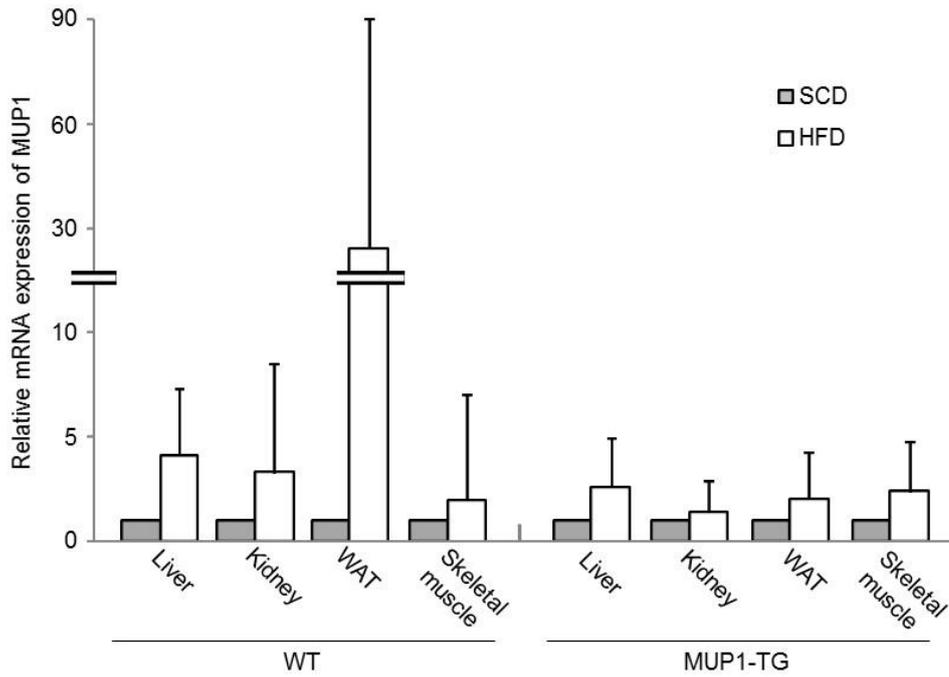


Fig. 5. The level of MUP1 in white adipose tissue (WAT) is increased by feeding a high-fat diet (HFD). Female MUP1-TG mice and wild-type (WT) littermate mice were fed a HFD from 4 weeks of age until 12 weeks of age, or fed a standard chow diet (SCD) until 10 weeks of age. The mice were fasted overnight, then euthanized for isolation of total RNA from liver, kidney, WAT and skeletal muscle. MUP1 were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=3-12$).

第4節 考察

本検討により、MUP1 を全身で高発現する MUP1-TG マウスの作製に成功し (Fig. 1)、その雌性 MUP1-TG マウスは短期間の高脂肪食誘導性の脂肪蓄積を伴う体重増加と血清中トリグリセリド濃度増加に対して抵抗性であった (Fig. 3)。このことから、MUP1 は脂肪蓄積の抑制因子として働くことを初めて見出すことができた。

糖・脂質代謝に関する研究は、しばしば糖尿病・肥満モデル動物を用いて検討が行われる。そのうち db/ db マウスは、摂食ホルモンであるレプチンの受容体を欠損することにより、過食による著明な肥満と高血糖を呈することから 2 型糖尿病や肥満のモデルマウスとして汎用されている。Zhou らはこの db/ db マウスにアデノウイルスベクターを用いて MUP1 を肝臓で高発現させたところ、肝臓における糖新生促進遺伝子 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) , Glucose 6-phosphatase (G6Pase)) と脂肪酸合成に関わる遺伝子 (Fatty acid synthase (FAS) , Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1), PPAR γ) の発現量が減少することを見出した²¹⁾。しかし本検討においては、通常食摂取させた MUP1-TG マウスと野生型マウスとの間で、肝臓における上記の遺伝子発現量に差は認められず (Table 3)、先行研究と異なる結果が得られた。このことより、MUP1 は糖・脂質代謝のホメオスタシスが十分に保たれた通常食摂取時は糖・脂質代謝に影響を及ぼさない、もしくは遺伝子改変させなくとも既に発現している内因性 MUP1 の発現量で十分にホメオスタシスを維持できる可能性が考えられた。

一方で、MUP1 は栄養状態に応じてその発現プロファイルが変動することも報告されている。肝臓における MUP1 の発現量は、カロリー制限によって著しく減少し^{23, 24)}、また一晩絶食することによっても減少する一方で、絶食後に再度

餌を摂取することで著しく上昇する²²⁾ことが報告されている。さらに、糖尿病や肥満に関わる遺伝子座が導入されたコンジェニック系統であり肥満を呈することが知られている *tabw2* マウス²⁷⁾ や *db/db* マウス²¹⁾ といった糖尿病・肥満モデルマウスにおいても、肝臓における MUP1 の発現量は減少することが報告されている。一方本検討では、糖尿病・肥満状態に至る以前の MUP1 における役割を検討するために比較的短期間である 8 週間高脂肪食を摂取させた。その結果、通常食摂取と比較して 8 週間の高脂肪食摂取により野生型マウスの肝臓、腎臓、骨格筋における MUP1 の発現量は 2~4 倍程度増加し、さらに脂肪組織における MUP1 の発現量は約 30 倍と他臓器よりも顕著に増加した。このことは、より短期間である 3~5 週間の高脂肪食摂取時の脂肪組織における MUP1 の発現量は著しく増加することが先行研究においても報告されている²⁵⁾。つまり、今回の 8 週間の高脂肪食摂取の条件は、*db/db* マウスなどの糖尿病・肥満モデルマウスとは異なり、糖尿病・肥満といった疾患状態には至っていない軽度に負荷がかかった栄養状態であることが裏付けられると共に、糖・脂質代謝における MUP1 の生理的機能は栄養状態により異なる可能性が示唆された。さらに、*db/db* マウスを用いた先行研究では MUP1 は肝臓や骨格筋において機能することが報告されたものの、本検討においては 8 週間の高脂肪食摂取により MUP1 の発現量が野生型マウスの脂肪組織において顕著に増加し、さらに MUP1-TG マウスにおいて高脂肪食摂取による脂肪蓄積の増加抑制と血清中トリグリセリド濃度の増加抑制が認められたことから、糖尿病・肥満状態に至る以前の MUP1 は、肝臓や骨格筋ではなく脂肪組織において脂肪蓄積の抑制因子として機能すると考えられた。

第2章 脂肪蓄積／脂肪細胞分化における MUP1 の役割

第1節 緒言

第1章の検討により、MUP1 が脂肪組織において脂肪蓄積を抑制することが初めて明らかとなった。脂肪細胞分化は、段階的に分化が進むことが知られており、各段階で様々な遺伝子が誘導されることで脂肪細胞の分化が促進される。脂肪細胞分化において必要不可欠なマスターレギュレーターである PPAR γ ^{32, 33)} は、C/EBP β 、 δ ^{34, 35)} といった分化の初期段階において機能する転写因子によって発現が誘導される。そして、誘導された PPAR γ によって脂肪細胞分化を促進する CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) α 、Adipocyte protein 2 (aP2)、CD36、Glucose transporter 4 (GLUT4) といった種々の関連遺伝子発現が誘導されることで脂肪細胞分化は進行することが知られている。そこで、脂肪組織における MUP1 の役割を検討するにあたり、マウス胎生繊維芽細胞 (MEF) を用いた *in vitro* アッセイ系を樹立し、脂肪細胞分化における MUP1 の影響を検討した。

また、PPAR γ は脂肪蓄積の制御においても必要不可欠な遺伝子である。高脂肪食摂取による脂肪蓄積の増加には PPAR γ の両アレルが必要であり、PPAR γ のヘテロ欠損によって高脂肪食摂取による脂肪蓄積の増加は抑制されることが報告されている³⁶⁾。そこで、MUP1 の脂肪組織における役割を検討するにあたり、PPAR γ との関与に着目した検討を行うために PPAR γ 欠損マウスを用いて検討も合わせて行った。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料および試薬

トリプシン、Duibecco's Modified Eagle's Medium 4.5g/L Glucose with L-Glutamine and Sodium Pyruvate (DMEM)、Penicillin - Streptomycin Mixed Solution、2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸、L-Glutamine Stock Solution、DMSO、Oil Red O、イソプロパノールはナカライテスク（京都）、ピルビン酸ナトリウム、3-isobutyl-1-methylxantin (IBMX)、デキサメタゾンとは和光純薬（大阪）、胎児牛血清（FCS）は Biowest (Nuaille, France)、ヒトインスリンはシグマアルドリッチジャパン（東京）、ロジグリタゾンはケイマンケミカル (Michigan, USA)より購入した。

2-2 初代培養 MEF の樹立と脂肪細胞分化誘導

MEF 培養液として、非働化した 10% FCS、55 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 μ M 非必須アミノ酸、2 mM-L-Glutamine Stock Solution、100 IU/mL: 100 mg/mL Penicillin - Streptomycin Mixed Solution を DMEM 培地に加え、調製した。MEF は、雌性野生型 C57BL/6J 系統マウスと雄性 MUP1-TG マウスを交配させ、プラグを確認した妊娠マウスを用いて、胎齢 13.5 日から 15.5 日齢の胎仔を無菌状態にて摘出した。摘出した胎仔は、頭部と内臓を取り除き残った部位を 0.1% トリプシンおよび 0.53 mM EDTA を含む PBS (pH 7.4) (EDTA/ PBS) 500 μ L を加えて組織を細断した。5 mL EDTA/ PBS と 4 mL 0.25%トリプシンを加えて攪拌後、37°C 150min⁻¹で 20 分間振とうした。さらに 6 mL EDTA/ PBS と 4 mL 0.25%トリプシンを加えて攪拌後、37°C 150 min⁻¹で 20 分間振とうした。振とう後、軽く攪拌して数十秒静置後の上清を得て、遠心 (10 分 100 g)した。遠心後に得られた沈殿に MEF 培養液を加え、37°C、5% CO₂の条件下で培養し維持した。

脂肪分化誘導は、上記の培養液に 0.5 mM IBMX、1 μ M デキサメタゾン、10 μ g / mL ヒトインスリン、100 nM ロジグリタゾンを加え分化誘導培地とした。分化誘導培地は、2 日おきに新鮮な培地と交換した。

2-3 Oil Red O 染色

Oil Red O 染色液は、3% Oil Red O を 60% イソプロパノールに溶解して作製した。脂肪細胞分化誘導した細胞の培地を取り除き、PBS で洗浄した後、氷冷した終濃度 4% パラホルムアルデヒドを 2 mL / well 添加し、20 分静置した。液を取り除いた後、PBS で洗浄し、60% イソプロパノールを添加して 1 分間静置した。液を取り除いた後 Oil Red O 染色液を添加して 20 分静置した。液を取り除いた後、イソプロパノールで洗浄し、さらに PBS で洗浄して、室温で自然乾燥させた。

2-4 実験動物

第 1 章 第 2 節 2-6 実験動物に準じた。

ただし、PPAR γ ヘテロ欠損マウスは、東京大学 門脇孝先生³⁶⁾より御供与頂き、同腹の野生型仔マウスを対照群として使用した。

2-5 半定量的 RT-PCR

MEF より Total RNA を抽出し、cDNA を作製した。Quick Taq HS DyeMix と Table 5 のプライマーを用いて各条件下により PCR を行い、PCR 産物をアガロースゲルにより電気泳動後、エチジウムブロマイドにより染色して検出した。また、内部標準として β -actin を用いた。

Table 5. Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions for standard RT-PCR analysis.

Gene (Accession No.)		Primer sequences Sequence (5' to 3')	PCR condition (35 cycles in all cases)			Product Size (bp)	
			Denaturation	Annealing	Elongation		
MUP1 (NM_031188)	Forward	CAGACAGACAAT CCTATTCCCTACC	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	693	
	Reverse	GTCAGAGGCCAG GATAATAGTATGC CATTC					
PPAR γ 2 (NM_011146.3)	Forward	GGTGAAACTCTG GGAGATTC	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec		268
	Reverse	CAACCATTGGGTC AGCTCTTG					
C/EBP β (NM_009883)	Forward	AGCTGAGCGACG AGTACAAG	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	199	
	Reverse	GGCAGCTGCTTG AACAAGTTC					
C/EBP δ (NM_007679)	Forward	ACAGGAAGCTGC AGCTTGG	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec		536
	Reverse	GTAGAGGCAACG AGGAATCAAG					
β -actin (NM_001101)	Forward	CCCTGAACCCTAA GGCCAACCGTG	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	560	
	Reverse	GGCATAGAGGTCT TTACGGATGTC CG					

MUP1, Major urinary protein 1; PPAR γ 2, Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2; C/EBP, CCAAT-enhancer-binding protein

2-6 定量 Real-time RT-PCR

第1章 第2節 2-7 定量 Real-time RT-PCR に準じた。ただし、aP2, CD36, GLUT4, C/EBP α , C/EBP α , C/EBP α のスタンダードの作製は、Table 6 のプライマーと各条件にて行い *pGEM-T Easy Vector* に組み込んだ。測定には、Table 7 プライマーと各条件により行った。

2-7 シーケンス解析

作製したプラスミドのシーケンス解析を行った。なお、方法は第1章 第2項 2-5 シーケンス解析に準じた。

Table 6. Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions for PCR cloning.

Gene (Accession No.)		Primer sequences Sequence (5' to 3')	PCR condition (35 cycles in all cases)			Product Size (bp)	
			Denaturation	Annealing	Elongation		
aP2 (NM_024406)	Forward	AAATGTGTGATGC CTTTGTGGGA	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 60 sec	417	
	Reverse	GGCCTCTTCCTTT GGCTCATG					
CD36 (NM_001159558)	Forward	TTCATCACCAATG GTCCCAG	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec		559
	Reverse	TCCGAACACAGC GTAGATAG					
GLUT4 (NM_009204)	Forward	CCAACAGCTCTCA GGCATCAAT	94 °C 15 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	550	
	Reverse	TGAGATCTGGTCA AACGTCCG					
C/EBP α (NM_007678)	Forward	AAAGCCAAGAAG TCGGTGGAC	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec		645
	Reverse	AGAGGAAGCAGG AATCCTCC					
C/EBP β (NM_009883)	Forward	AGCTGAGCGACG AGTACAAG	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	505	
	Reverse	GGCTGACAGTTAC ACGTGTG					
C/EBP δ (NM_007679)	Forward	ACAGGAAGCTGC AGCTTGG	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec		536
	Reverse	GTAGAGGCAACG AGGAATCAAG					

aP2, Adipocyte protein 2; GLUT4, Glucose transporter 4; C/EBP, CCAAT-enhancer-binding protein

Table 7. Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions for quantitative real-time RT-PCR analysis.

Gene (Accession No.)		Primer sequences Sequence (5' to 3')	PCR condition (40 cycles in all cases)			Product Size (bp)
			Denaturation	Annealing	Elongation	
aP2 (NM_024406)	Forward	AAATGTGTGATGC CTTTGTGGGA	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 60 sec	125
	Reverse	CCACTTTCCTTGT GGCAAAGCC				
CD36 (NM_001159558)	Forward	GCCAAGCTATTGC GACATG	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	108
	Reverse	TCCGAACACAGC GTAGATAG				
GLUT4 (NM_009204)	Forward	TTCCAGTATGTTG CGGATGCTAT	94 °C 15 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	118
	Reverse	TGAGATCTGGTCA AACGTCCG				
C/EBP α (NM_007678)	Forward	AAAGCCAAGAAG TCGGTGGAC	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	181
	Reverse	CTTTATCTCGGCT CTTGCGC				
C/EBP β (NM_009883)	Forward	AGCTGAGCGACG AGTACAAG	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	160
	Reverse	ACAGCTGCTCCAC CTTCTTC				
C/EBP δ (NM_007679)	Forward	ACAGGAAGCTGC AGCTTGG	94 °C 15 sec	62 °C 30 sec	72 °C 30 sec	126
	Reverse	CATGCGCAGTCTC TTCCTC				

2-8 血清中トリグリセリド濃度の測定

第1章 第2節 2-8 血清中トリグリセリド濃度の測定に準じた。

2-9 統計処理

第1章 第2節 2-12 統計処理に準じた。

第3節 実験結果

3-1 脂肪細胞分化過程における MUP1 の影響

野生型 MEF と MUP1-TG の MEF (TG-MEF) をそれぞれ調製し、脂肪分化誘導実験を行った。まず、各 MEF における MUP1 mRNA 発現量を測定した結果、TG-MEF は野生型 MEF と比較して MUP1 を常に高発現していることが確認できた (Fig. 6)。次に、脂肪細胞分化誘導を行った際の PPAR γ 、C/EBP α 、aP2、CD36、GLUT4 の mRNA 発現量を測定した。その結果、脂肪細胞分化誘導 2 日、4 日後の TG-MEF における C/EBP α 、aP2、CD36、GLUT4 発現量は、野生型 MEF と比較して有意な抑制が認められ、PPAR γ についても 2 日後の発現量が有意に抑制されていた (Fig. 7A)。しかし、脂肪細胞分化 4 日後以降の各遺伝子発現量は、TG-MEF と野生型 MEF との間で差は認められなかった (Fig. 6)。

次に MUP1 の脂肪滴蓄積に与える影響を検討するために、MEF を脂肪細胞分化誘導 10 日後に Oil Red O 染色により脂肪滴の観察を行った。結果、野生型 MEF において認められた脂肪滴の蓄積が TG-MEF においては抑制されていることが観察された (Fig. 7B)。

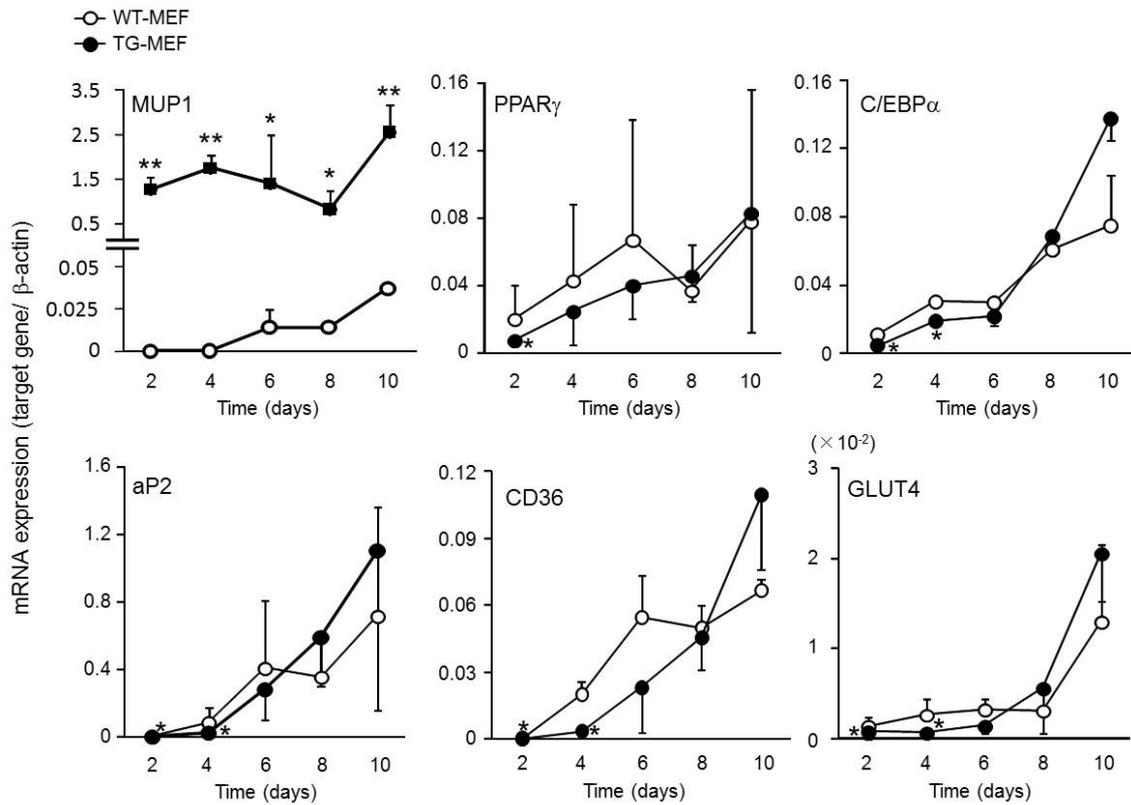


Fig. 6. The effect of MUP1-overexpression on adipocyte differentiation-related gene expressions. Mouse embryonic fibroblasts from MUP1-TG mice (TG-MEF) and wild-type mice (WT-MEF) were cultured in the presence of the differentiation medium, and total RNA was isolated at the indicated time after induction. mRNA expression of MUP1, PPAR γ , C/EBP α , aP2, CD36 and GLUT4 genes were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=3-6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with WT-MEF.

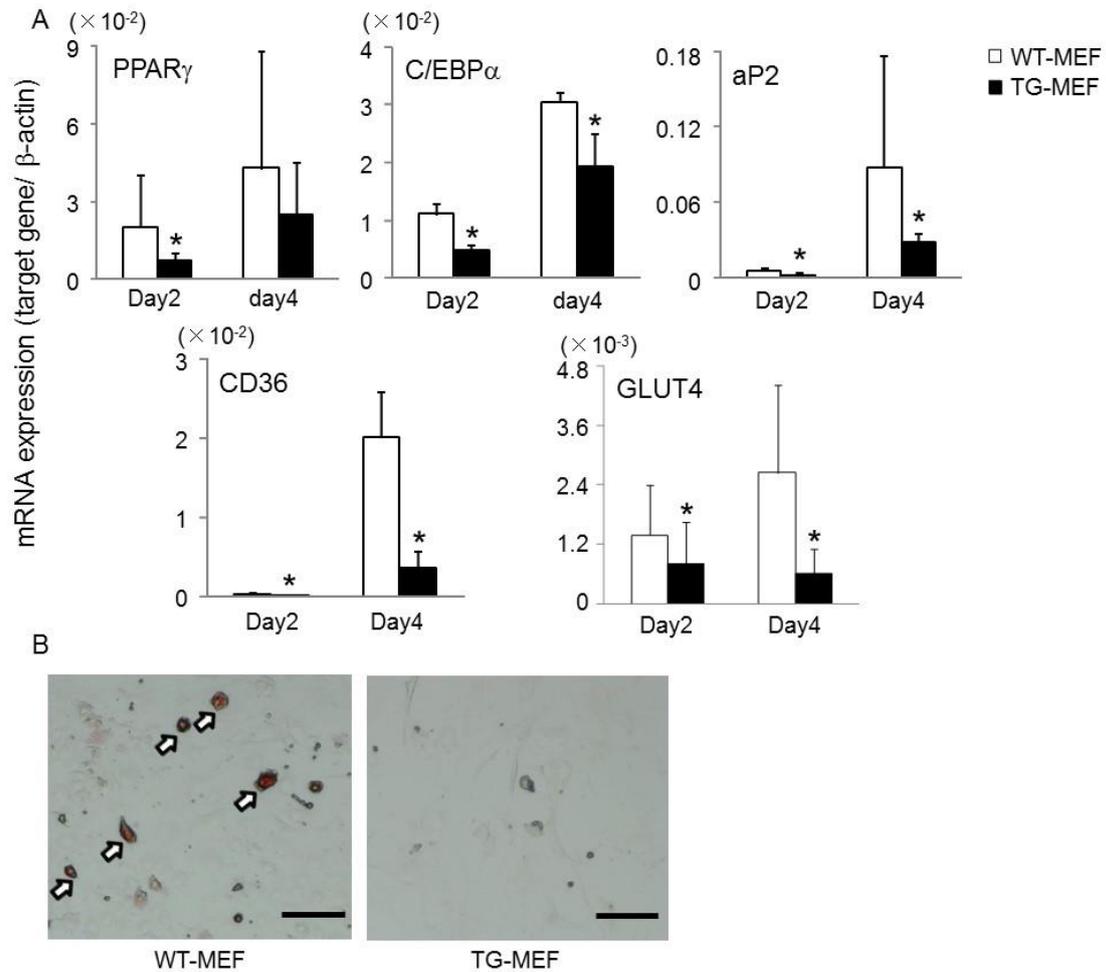


Fig. 7. Overexpression of MUP1 inhibits adipocyte differentiation in the early stage. Mouse embryonic fibroblasts from MUP1-TG mice (TG-MEF) and wild-type mice (WT-MEF) were cultured in the presence of the differentiation medium. (A) mRNA expression of PPAR γ , C/EBP α , aP2, CD36 and GLUT4 genes at 2 days and 4 days after induction. Total RNA was isolated from MEF at the indicated time after induction, and mRNA expression of each gene was analyzed by quantitative real-time RT-PCR. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=3-6$). * $p<0.05$, compared with WT-MEF. (B) Lipid droplet in TG-MEF and WT-MEF. At 10 days after induction of differentiation, MEF were fixed with paraformaldehyde and stained with Oil Red O. Arrowheads indicate lipid droplets (note that not all the droplets are marked).

3-2 脂肪細胞分化の初期段階における MUP1 の影響

脂肪細胞分化の初期段階における MUP1 の役割について検討を行うために、脂肪細胞分化誘導後 24 時間以内と 4 日、8 日後における MUP1 の発現量に加え、PPAR γ のアイソフォームのうち脂肪細胞特異的な機能を果たす PPAR γ 2^{32, 37)} の発現量について、MEF に脂肪細胞分化誘導をかけて検討を行った。結果、TG-MEF における MUP1 は、脂肪細胞分化誘導前から常に高いレベルで発現していることが確認できた (Fig. 8A)。野生型 MEF における MUP1 の発現は、脂肪細胞分化誘導 6 時間後より発現が確認されて 18 時間後に発現量のピークが認められ、その後一旦発現が減少したものの、脂肪細胞分化誘導 8 日後に再び発現の増加が認められた (Fig. 8A)。一方、PPAR γ 2 の発現は、TG-MEF と野生型 MEF 共に脂肪細胞分化 4 日後から初めて発現が認められた (Fig. 8A)。次に、脂肪細胞分化の初期段階において機能することが知られている転写因子である C/EBP β 、 δ mRNA 発現量を測定した。結果、どちらの mRNA 発現量も、野生型 MEF および TG-MEF において時間依存的に発現量の増加が認められた。しかし TG-MEF においては、脂肪細胞分化誘導 18 時間後の C/EBP δ 発現量の増加が有意に抑制されており、TG-MEF における C/EBP β の発現誘導の遅れが観察された (Fig. 8B)。

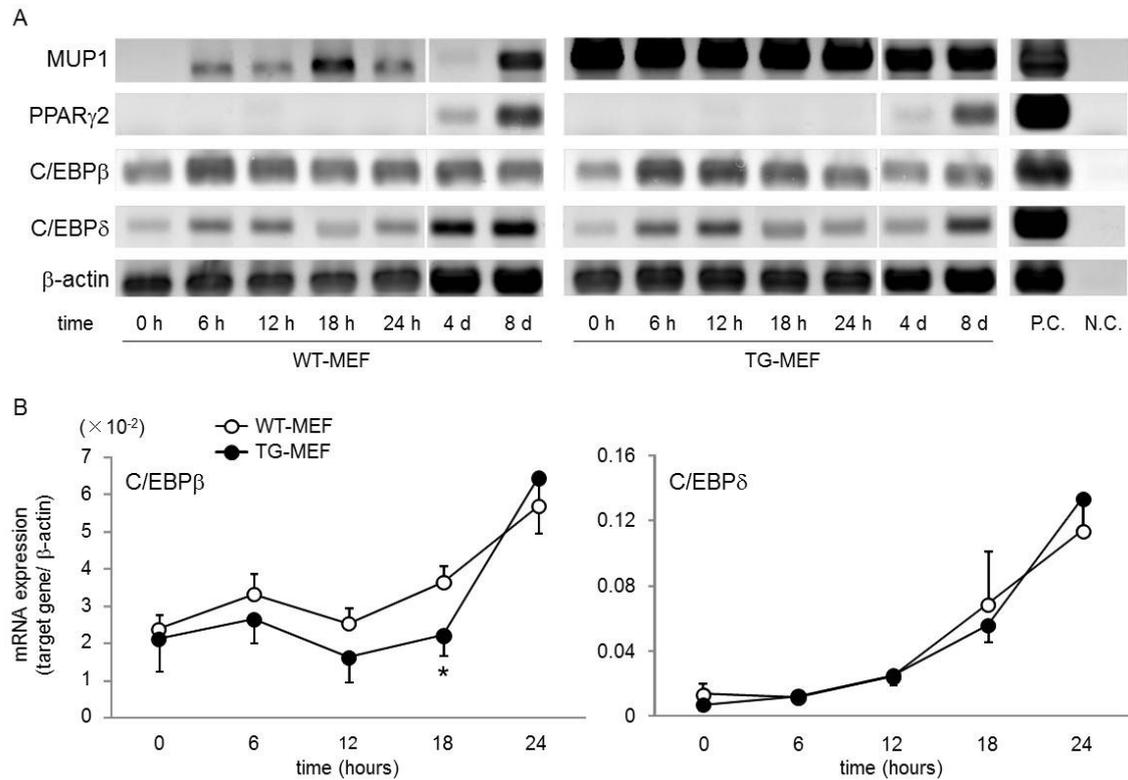


Fig. 8. Expression profiles of MUP1, PPAR γ 2, C/EBP β and C/EBP δ in the early stage of adipocyte differentiation in TG-MEF and WT-MEF. Mouse embryonic fibroblasts from MUP1-TG mice (TG-MEF) and wild-type mice (WT-MEF) were cultured in the presence of the differentiation medium, and total RNA was isolated at the indicated time after induction. (A) RT-PCR analysis of MUP1, PPAR γ 2, C/EBP β and C/EBP δ in WT-MEF and TG-MEF. Expression plasmids for each gene were used as positive controls (P.C.). Data are representative of at least two independent experiments. N.C., negative control (B) mRNA expression of C/EBP β and C/EBP δ genes were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. Results are expressed as the mean \pm 1 standard deviation ($n=4$). * $p<0.05$, compared with WT-MEF.

3-3 脂肪蓄積における MUP1 と PPAR γ との関与

前項までの MEF を用いた *in vitro* アッセイ系によって、MUP1 は脂肪細胞分化の抑制因子として働き、その作用の一つとして脂肪細胞分化の初期段階における転写因子である C/EBP β の発現を調節することにより発揮される可能性が示唆された。また第 1 章においては、MUP1-TG マウスに短期間高脂肪食摂取させた *in vivo* の系によって、MUP1 は脂肪蓄積の抑制作用を発揮することが明らかとなった (Fig. 5)。C/EBP β を含む脂肪細胞分化の初期段階に発現する転写のほとんどは、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ の発現誘導に関与することによって脂肪細胞分化の制御機能を発揮する。つまり、MUP1-TG マウスにおいて認められた脂肪蓄積抑制作用が、MUP1 による脂肪細胞分化の初期段階における転写因子の発現調節に起因するのであれば、*in vivo* の系においても MUP1 は少なからず PPAR γ との関与によって脂肪蓄積抑制作用を発揮することが考えられる。そこで、PPAR γ の発現が減弱した際の MUP1 の脂肪蓄積抑制作用に与える影響を、PPAR γ 欠損マウスを用いて検討した。PPAR γ ホモ欠損マウスは胎生致死であるため本検討に用いることができないが^{36, 38)}、PPAR γ ヘテロ欠損 (PPAR γ (+/-)) マウスでも脂肪組織などにおいて PPAR γ の発現の減弱が確認されており、また高脂肪食摂取による脂肪蓄積の増加は PPAR γ ヘテロ欠損だけで十分抑制されることが知られているため、本検討では PPAR γ (+/-)マウスを用い、MUP1-TG マウスの交配により MUP1 (+)/ PPAR γ (+/-) マウスを作製して検討を行った。

4 週齢の雌性マウスに 8 週間高脂肪食を摂取させたところ、MUP1-TG マウスにおいて高脂肪食摂取による体重と生殖器周りの脂肪組織重量の増加抑制が認められた一方、MUP1 (+)/ PPAR γ (+/-) マウスにおいては、野生型マウスと比較して体重と生殖器周りの脂肪組織重量の有意な差は認められず、MUP1 による作

用が PPAR γ ヘテロ欠損により減弱された (Fig. 9A, B)。さらに、血清中トリグリセリド濃度においても、MUP1-TG マウスにおいて有意に抑制された一方で、MUP1 (+)/ PPAR γ (+/-) マウスにおいては野生型マウスと比較して有意な差は認められず、MUP1 の作用が PPAR γ ヘテロ欠損により減弱された (Fig. 9C)。

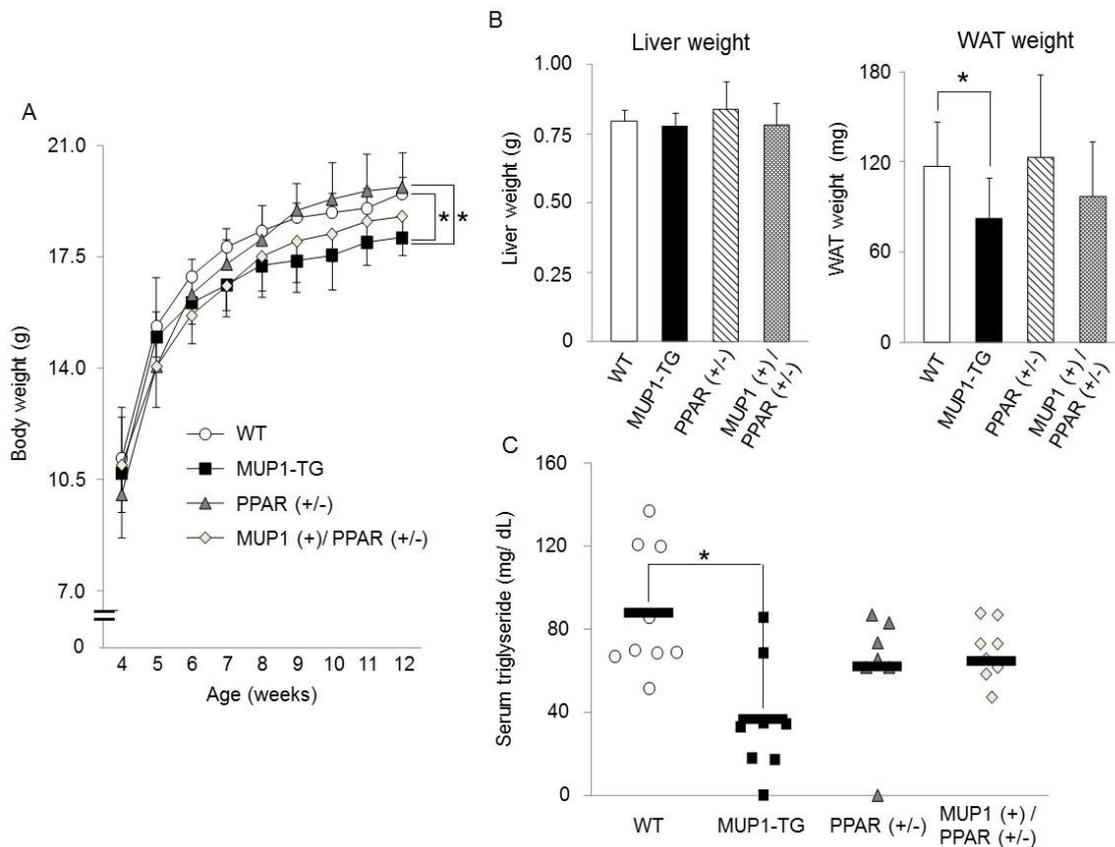


Fig. 9. The potential relationship between MUP1 and PPAR γ in high-fat diet (HFD)-induce obesity. MUP1 (+)/ PPAR γ (+/-) mice were generated by intercrossing MUP1-TG mice and heterozygous PPAR γ -deficient (PPAR γ (+/-)) mice. Female mice were fed a HFD from 4 weeks of age until 12 weeks of age. (A) Total body weight change were monitored every week throughout the experiment. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=7-10$). * $p<0.05$, compared with MUP1-TG mice. (B) Weight of liver and white adipose tissue (WAT). At 12 weeks of age, the mice were fasted overnight, then euthanized for removal of liver and WAT. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=7-10$). * $p<0.05$, compared with WT mice. (C) Serum triglycerides concentrations were analyzed using biochemical test kits (as described in the Materials and methods). At 12 weeks of age, the mice were fasted overnight, then euthanized for blood collection. The horizontal bars represent the means ($n=7-10$). * $p<0.05$, compared with wild-type mice.

第4節 考察

MEFを用いた *in vitro* の検討において、MUP1を高発現する TG-MEF では、野生型 MEF と比較して脂肪滴蓄積の抑制が認められた (Fig. 7B)。また脂肪細胞分化を促進する遺伝子である C/EBP α 、aP2、CD36、GLUT4 の発現量は、TG-MEF において脂肪細胞分化誘導 2 日と 4 日後に抑制され、PPAR γ の発現量も脂肪細胞分化誘導 2 日では有意な抑制が観察された (Fig. 7A)。一方、脂肪細胞分化 4 日後以降においては TG-MEF と野生型 MEF との間にそれらの遺伝子発現量に差は認められなかった (Fig. 6)。このことより、MUP1 は脂肪細胞分化の抑制因子として働くことが考えられると共に、MUP1 による作用は脂肪細胞分化の比較的早期に発揮される可能性が示唆された。そこで、脂肪細胞分化の初期段階に発現が誘導され、分化誘導の引き金となる転写因子である C/EBP β 、 δ などの発現に対する MUP1 の影響について検討を行った。まず、内因性 MUP1 が脂肪細胞分化に応じてどのような発現プロファイルを示すのかを検討するため、野生型 MEF における MUP1 の発現を検討したところ、脂肪分化誘導前には発現が認められなかった MUP1 は、脂肪細胞分化誘導 18 時間後に発現のピークになった後、一旦その発現が減少し、その後再度発現の増加が認められた (Fig. 8A)。一方、PPAR γ の脂肪細胞特異的なアイソフォームである PPAR γ 2 の野生型 MEF における発現は、脂肪細胞分化誘導 4 日後から認められ始めた (Fig. 8A) ことから、MUP1 は PPAR γ が機能する以前から脂肪細胞の分化制御を行っている可能性が示唆された。さらに各 MEF における C/EBP β 、 δ の発現量を定量したところ、内因性 MUP1 の発現ピークが認められた脂肪細胞分化誘導 18 時間後において、野生型 MEF と比較して TG-MEF における C/EBP β の発現量が有意な抑制が認められた。このことより MUP1 は、C/EBP β の発現誘導を抑制することによって、PPAR γ 、

C/EBP α などの脂肪細胞分化を促進する遺伝子発現を抑制する可能性が示唆された (Fig. 10)。

PPAR γ と C/EBP α は、どちらも脂肪細胞分化において主要な転写因子であり、様々な遺伝子発現を制御することによって脂肪細胞分化を促進することが知られているものの、C/EBP α は脂肪細胞分化に必要不可欠ではないことが報告されている^{32, 33)}。一方 PPAR γ においては、脂肪細胞分化において必要不可欠なマスターレギュレーターであることが PPAR γ 欠損マウスを用いた検討により報告されている。第1章 3-3 項において、高脂肪食摂取による脂肪蓄積増加に対して MUP1 の過剰発現が抑制的に作用することが示されたが、この抑制作用が PPAR γ の発現が抑制されることによって誘導される脂肪細胞分化抑制に起因するのであれば、MUP1-TG マウスで認められたフェノタイプは PPAR γ の発現に依存していると考えられる。そこで本検討においては、いくつかの組織で PPAR γ の発現量が減少している PPAR γ (+/-) マウス³⁶⁾と MUP1-TG マウスを交配させることにより作製した MUP1 (+)/ PPAR γ (+/-) マウスを用いて、脂肪蓄積における MUP1 と PPAR γ との関与について検討を行った。雄性 PPAR γ (+/-) マウスを用いた先行研究において、PPAR γ (+/-) マウスは 15 週間の高脂肪食摂取により誘導される体重増加に対して抵抗性であったと報告されているが、雌性マウスを用いた本検討においては 8 週間の高脂肪食摂取では雌性 PPAR γ (+/-) マウスと野生型マウスとの間に体重の有意な差は認められず (Fig. 9A)、先行研究とは異なる結果となった。この原因としては、本研究の高脂肪食摂取条件が先行研究よりも短期間であることと、雌性マウスを用いたことによる雌雄差の影響である可能性が考えられた。

一方で、MUP1-TG マウスにおいては野生型マウスと比較して高脂肪食摂取による体重増加の抑制が認められたが、MUP1 (+)/ PPAR γ (+/-) マウスにおいては

野生型マウスとの間に体重の差は認められなくなった (Fig. 9A)。さらに脂肪重量と血清中トリグリセリド濃度についても、MUP1-TG マウスは野生型マウスと比較して有意な増加抑制が認められていたが、MUP1 (+)/ PPAR γ (+/-) マウスにおいては野生型マウスとの間に差が認められなくなった (Fig. 9B, C)。すなわち、PPAR γ の発現を減弱させることにより、MUP1による脂肪蓄積を伴う体重増加抑制と血清中トリグリセリド濃度の増加抑制作用がキャンセルされた。この結果は先の仮説を指示するものであり、MUP1の脂肪蓄積作用は、PPAR γ の発現制御を介した脂肪細胞分化の抑制より発揮されると考えられた (Fig. 10)。

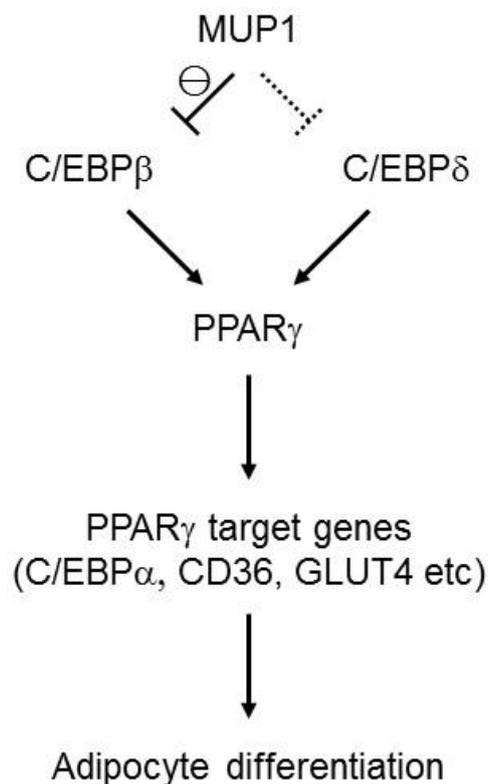


Fig. 10. Possible models for the role of MUP1 in adipocyte differentiation. MUP1 may inhibit C/EBP β , which induces the expression levels of PPAR γ and subsequently induces PPAR γ target genes. These pathways lead to the induction of adipogenic gene expressions and subsequent adipocyte differentiation.

第3章 雄性マウスの脂肪蓄積における MUP1 の役割

第1節 緒言

これまでの検討では、MUP1-TG マウスと野生型マウスにおける MUP1 の発現量の差が雄性マウスよりも雌性マウスの方がより顕著に認められたため (Fig. 1)、雌性マウスを用いた検討を優先して行った。一方で MUP1 は、典型的なアンドロゲン応答遺伝子であり、その発現量は雌よりも雄の発現量が高いことが知られている^{39, 40)}。そのため、内因性の MUP1 は雄の発現量が高いということ を考慮すると、雌性マウスを用いて見出した MUP1 の糖・脂質代謝における役割は、雄性マウスにおいても同様に認められるかを検討する必要があると考えられる。そこで雌性 MUP1-TG マウスについて行った短期間の高脂肪食負荷試験を雄性 MUP1-TG マウスについても行った。

ある特定の遺伝子の機能を解析するためには遺伝子欠損動物を用いることが有効であるが、MUP ファミリーはゲノム上に連続して存在し、サブタイプ間の遺伝子配列は酷似しているため、MUP1 だけを欠損したマウスを作製することは非常に困難であることは第1章で述べた。その一方で、MUP1 は典型的なアンドロゲン応答遺伝子であることから、主要なアンドロゲン産生臓器である精巣を摘出する去勢手術により MUP1 抑制状態を作製することができると考えられる。また興味深いことに、去勢によっても肥満が誘導されることが既に臨床的な知見によって数多く報告されている⁴¹⁻⁴⁴⁾。しかし、去勢による肥満の誘導機構の詳細は明らかとなっていないのが現状である。その原因としては、去勢動物における糖・脂質代謝制御状態や脂肪蓄積等に関する知見が乏しく、臨床的な知見を反映した去勢による肥満を誘発した動物モデルの確立がなされていないこ

とが理由として挙げられる。そこで本研究では先ず、去勢による肥満誘導マウスモデルの確立と糖・脂質代謝制御状態の解析を行った。そして確立した去勢肥満誘導マウスモデルの知見を元に、MUP1-TG マウスを用いて去勢状態に MUP1 を補った際のフェノタイプを解析することで、雄における MUP1 の機能解析を試みた。

第 2 節 実験材料および方法

2-1 実験動物

第 1 章 第 2 節 2-6 実験動物に準じた。

ただし、9 週齢の雄性 MUP1-TG マウスに去勢手術または偽手術を行った。なお、手術はイソフルランガス麻酔器 (エルエムエス社) を用いて、麻酔下により行った。

2-2 定量 Real-time RT-PCR

第 1 章 第 2 節 2-7 定量 Real-time RT-PCR に準じた。

2-3 血清中トリグリセリド、遊離脂肪酸、グルコース濃度の測定

第 1 章 第 2 節 2-11 血清中トリグリセリド濃度の測定に準じた。遊離脂肪酸は NEFA C-テストワコー (和光純薬、大阪) を用いた比色法にて測定した。添付の溶液にて発色液を調製し、血清に 200 倍容量の発色液を加えて 37°C、5 分反応させた。同時に添付の基準液 (オレイン酸 1mEq/ L) も同様に反応させ、検量線を作成した。測定は、570 nm の波長をマイクロプレートリーダーにて検出した。グルコースはグルコース CII-テストワコー (和光純薬、大阪) を用い

た比色法にて測定した。添付の溶液にて発色液を調製し、血清に 150 倍容量の発色液を加えて 37°C、5 分反応させた。同時に添付の基準液 (ブドウ糖 200 mg/dL, 500 mg/dL) も同様に反応させ、検量線を作成した。測定は、主波長 490 nm、副波長 595 nm をマイクロプレートリーダーにて検出した。

2-4 ウェスタンブロット

第 1 章 第 2 節 2-9 ウェスタンブロットに準じた。

2-5 統計処理

第 1 章 第 2 節 2-12 統計処理に準じた。

第3節 実験結果

3-1 雄性 MUP1-TG マウスにおける短期間高脂肪食負荷試験

4週齢の雄性 MUP1-TG マウスに8週間高脂肪食を摂取させたところ、野生型マウスと比較して高脂肪食摂取による体重と生殖器周りの脂肪組織重量増加の有意な抑制が認められた (Fig. 11A, B)。一方、血清中トリグリセリド濃度については、雄性 MUP1-TG マウスと野生型マウスとの間に差は認められなかった (Fig. 11C)。

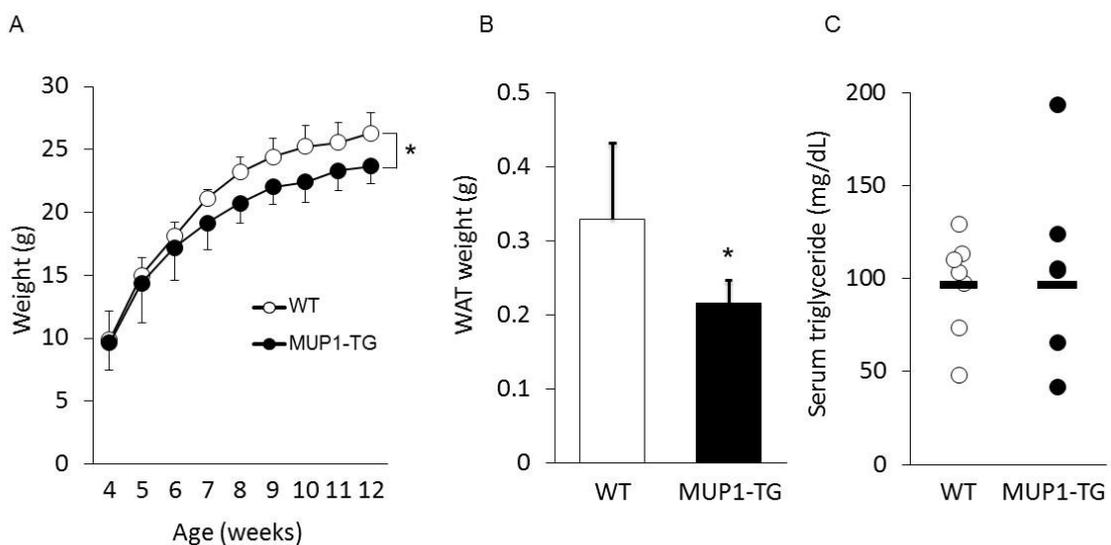


Fig. 11. Male MUP1-TG mice were resistance to short-term high-fat diet (HFD)-induced adipose tissue mass but not lipidemia. Male MUP1-TG mice and wild-type (WT) littermate mice were fed a HFD from 4 weeks of age until 12 weeks of age. (A) Total body weight change were monitored every week throughout the experiment. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=8-10$). * $p<0.05$, compared with wild-type mice. (B) Weight of liver and WAT. At 12 weeks of age, the mice were fasted overnight, then euthanized for removal of liver and WAT. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=8-10$). * $p<0.05$, compared with wild-type mice. (C) Serum triglycerides concentrations were analyzed using biochemical test kits (as described in the Materials and methods). At 12 weeks of age, the mice were fasted overnight, then euthanized for blood collection. The horizontal bars represent the means

(n=6-8).

3-2 去勢手術による肥満誘導マウスモデルの作製

近年、ラットを用いた先行研究において、去勢手術後 71 日後において、脂肪組織における脂肪蓄積が亢進することが報告された⁴⁶⁾。この報告は、去勢による骨重量への影響を主たる研究目的としているものの、齧歯類において去勢による肥満誘導を行うために有用な知見であると考えられる。そこで本検討においては、9 週齢の雄性野生型マウスに去勢手術を施し、経日的に体重のモニタリングを行うとともに、9 週間後に解剖を行い、血清マーカーや各臓器についての解析を行った。

去勢手術 3、4、6、7、8、9 週間後において、偽手術マウスと比較して去勢マウスにおける体重の減少が認められ、また去勢後 3、6、8、9 週間後において、摂餌量の減少が認められた (Fig. 12)。去勢 9 週間後に解剖をした結果、肝臓重量においては、偽手術マウスと比較して去勢マウスにおいて減少が認められたが、体重あたりの肝臓重量には差が認められなかった (Fig. 13)。一方生殖器周りの脂肪組織重量においては、偽手術マウスと比較して去勢マウスにおいて増加傾向が認められ、さらに去勢マウスの体重あたりの脂肪重量は有意な増加が認められた (Fig. 13)。

さらに、血清中トリグリセリド、遊離脂肪酸、グルコース濃度を測定したところ、測定したすべての血清マーカーについて、偽手術マウスと比較して去勢マウスにおいて有意な増加が認められた (Fig. 14)。次に肝臓と脂肪組織の糖・脂質代謝に関与する各遺伝子発現量を測定した結果、脂肪酸合成に関わる遺伝子発現量は去勢マウスと偽手術マウスの間に差は認められなかった (Fig. 15A) 一方、肝臓の糖新生促進因子である G6Pase 発現量は、偽手術マウスと比較して去勢マウスにおいて有意に増加していることが認められた (Fig. 15B)。以上の

結果より、去勢 9 週間後に解析することにより、去勢による肥満を誘導したマウスモデルを確立することができた。さらに、去勢マウスにおける肝臓の MUP1 mRNA 発現量は、偽手術マウスと比較して有意に減少していることが確認できた (Fig. 15C)。

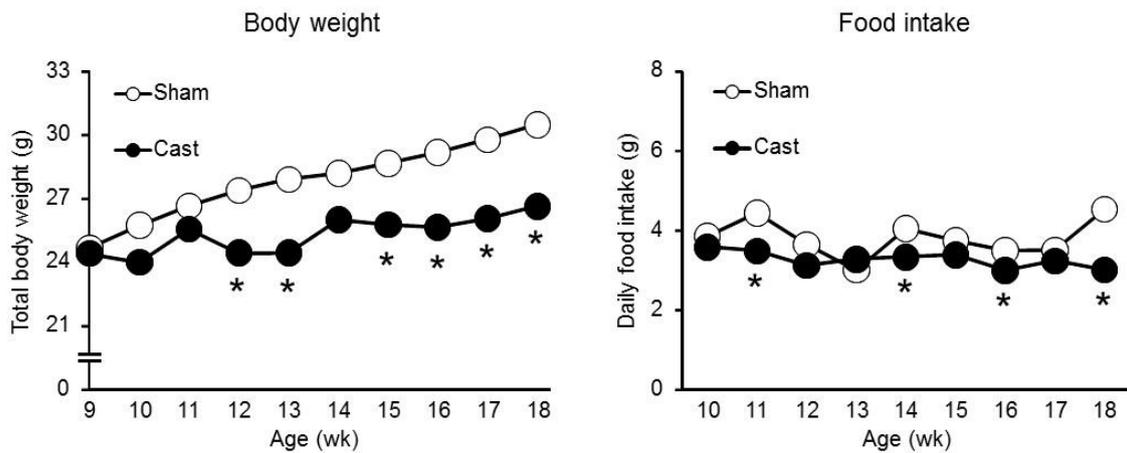


Fig. 12. Effect of surgical castration on total body weight and food intake in mice. Male C57BL6/ J mice were castrated (Cast) or sham-operated (Sham) at 9 weeks old and fed a standard chow diet. Total body weight change and food intake were monitored every week throughout the experiment. Results are expressed as means ($n=12-14$). * $p<0.05$, compared with sham-operated mice.

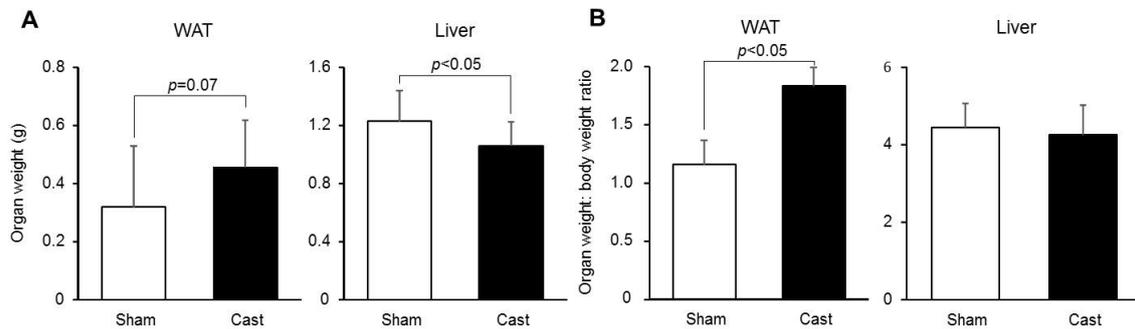


Fig. 13. An increase in white adipose tissue (WAT) and liver weight of castrated mice. Male C57BL6/ J mice were castrated (Cast) or sham-operated (Sham) at 9 weeks old and fed a standard chow diet. At 18 weeks of age, the mice were fasted overnight, then euthanized for removal of WAT and liver. (A) Weight of WAT and liver. (B) The

ratio of each organ weight to total body weight. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=12-14$).

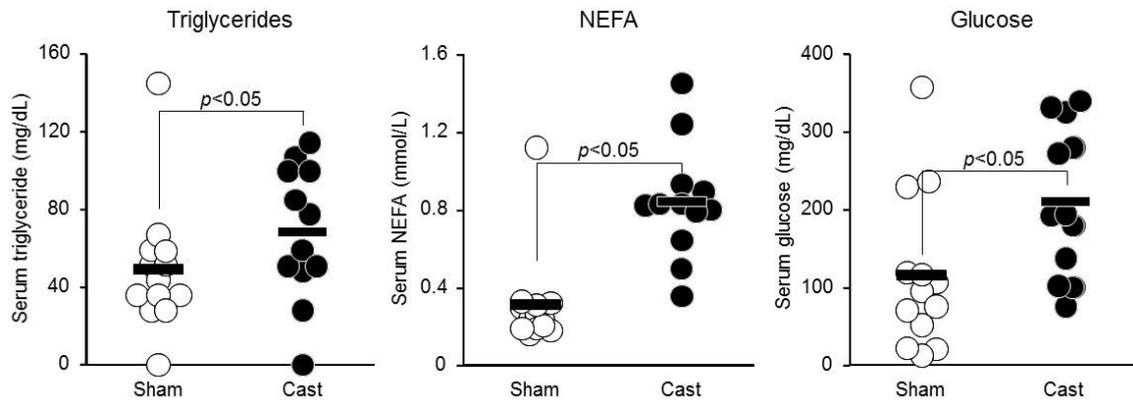


Fig. 14. Hyperlipidemia and hyperglycemia induced by the castration. Male C57BL6/ J mice were castrated (Cast) or sham-operated (Sham) at 9 weeks old and fed a standard chow diet. At 18 weeks of age, the mice were fasted overnight and euthanized for blood collection. Serum triglycerides, nonesterified fatty acids (NEFA), and glucose concentrations were analyzed using biochemical test kits (as described in the Materials and methods). The horizontal bars represent the means. ($n=12-14$)

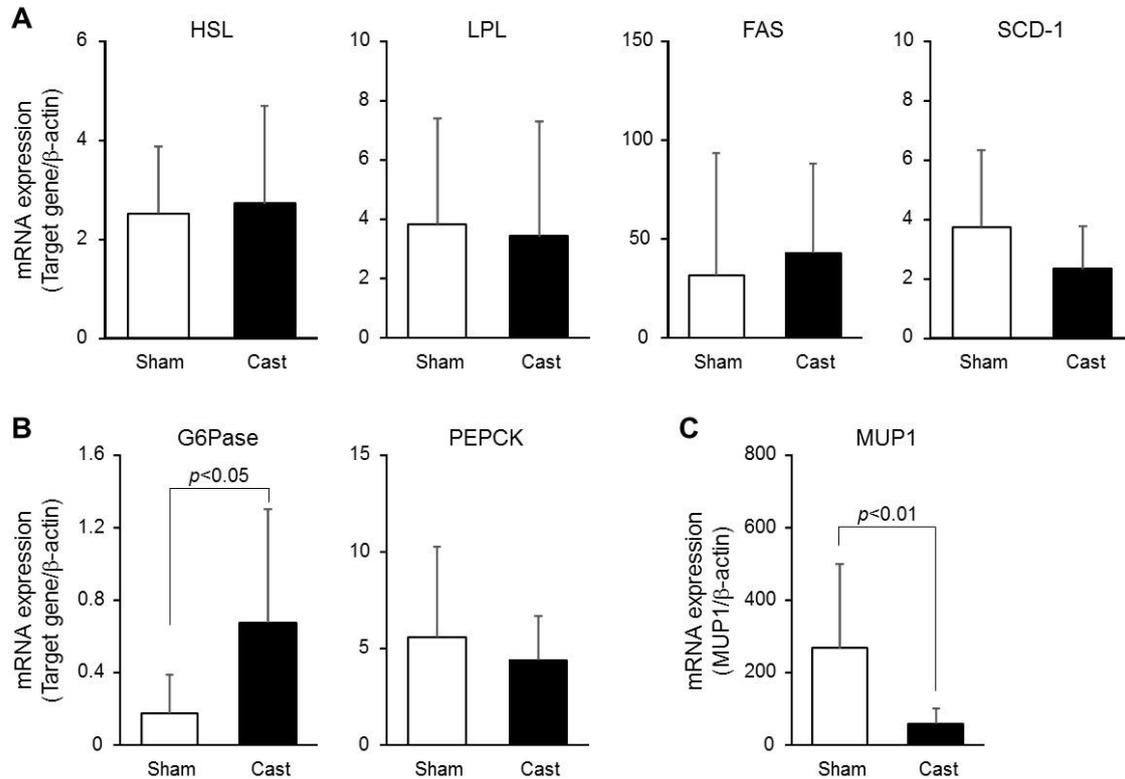


Fig. 15. Castration induces hepatic gluconeogenesis and decreases androgen activity. Male C57BL6/ J mice were castrated (Cast) or sham-operated (Sham) at 9 weeks old and fed a standard chow diet. At 18 weeks of age, the mice were fasted overnight, and euthanized for isolation of total RNA from liver and white adipose tissue (WAT). mRNA expression of genes involved in (A) adipocyte lipid metabolism, including HSL, LPL, FAS, and SCD-1; (B) hepatic gluconeogenesis, including G6Pase and PEPCK; and (C) MUP1 were analyzed by real-time RT-PCR. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=12-14$).

3-3 去勢に伴う肥満に対する MUP1 の影響

前項の検討により、去勢による肥満誘発マウスモデルの確立に成功した。また確立した去勢マウスでは、MUP1 の発現が著しく抑制されていた。そこで去勢によって誘導される肥満に対して、MUP1 はどのような影響を与えるかを検討するために、去勢した MUP1-TG マウスについて解析を行った。

まず、MUP1 の発現量に与える去勢の影響を検討するために、9 週齢の MUP1-TG マウスに去勢手術を行い9 週間飼育し、血清中 MUP1 蛋白質量を測定した。結果、野生型マウスにおいては、去勢により著しく MUP1 の発現量が減少した一方で、MUP1-TG マウスにおいては去勢をしても MUP1 を高いレベルで維持することが確認できた (Fig. 16)。体重については、去勢した野生型マウスと比較して去勢した MUP1-TG マウスにおいて体重の有意な抑制が確認された (Fig. 17)。さらに生殖器周りの脂肪組織重量についても、野生型マウスにおいて認められた重量の増加は、MUP1-TG マウスにおいては抑制され、去勢群と偽手術群との間に差は認められなかった (Fig. 17)。また、血清マーカーについても、血清中遊離脂肪酸濃度こそ去勢により増加したものの、MUP1-TG マウスにおける血清中トリグリセリドとグルコース濃度は、去勢群と偽手術群との間に差は認められなかった (Fig. 18)。さらに、肝臓における G6Pase の発現量は、MUP1-TG マウスにおいては去勢群と偽手術群との間に差は認められなかった (Fig. 19)。

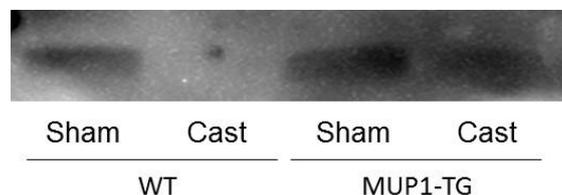


Fig. 16. Male MUP1-TG mice maintain high expression levels of MUP1 after castration. Male MUP1-TG mice and wild-type (WT) mice were castrated (Cast) or sham-operated (Sham) at 9 weeks old and fed a standard chow diet. At 18 weeks of age, the mice were fasted overnight, and euthanized for blood collection. Serum sample were prepared and immunoblotted with anti-MUP1 antibody.

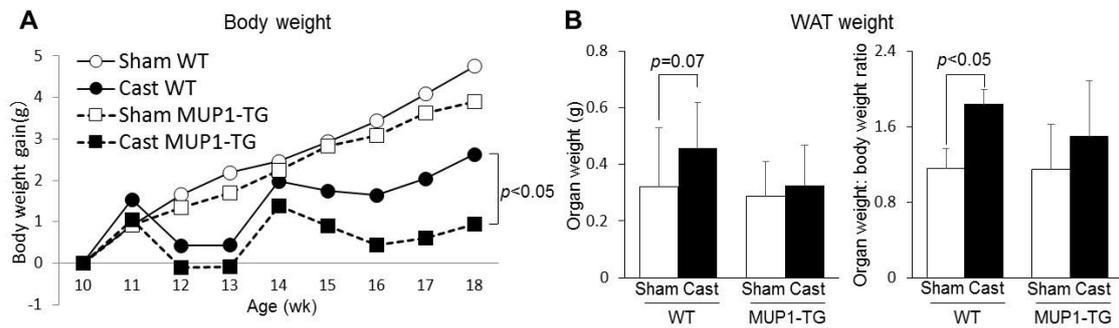


Fig. 17. Male MUP1-TG mice were resistance to castration-induced obesity. Male MUP1-TG mice and wild-type (WT) mice were castrated (Cast) or sham-operated (Sham) at 9 weeks old and fed a standard chow diet. (A) Total body weight change were monitored every week throughout the experiment. (B) Weight of white adipose tissue (WAT) and the ratio of WAT weight to total body weight. At 18 weeks of age, the mice were fasted overnight, then euthanized for removal of WAT. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation. ($n=8-12$).

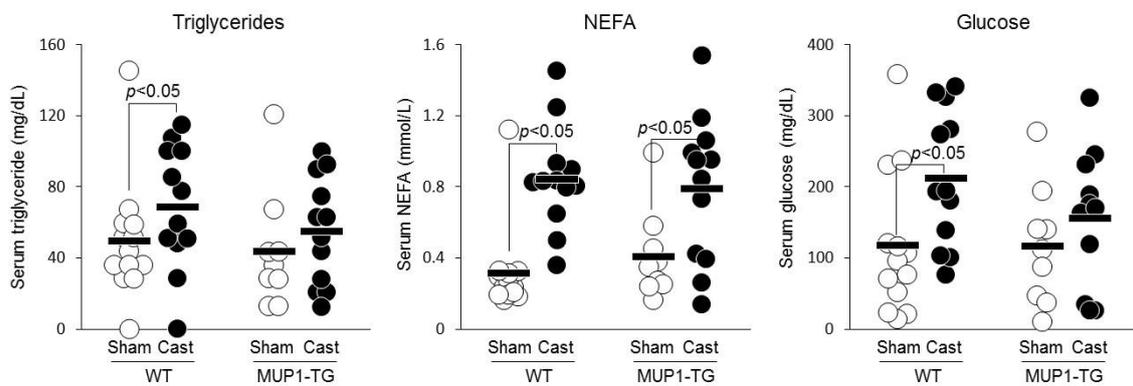


Fig. 18. Overexpression of MUP1 inhibits increase of castration-induced serum triglycerides and glucose concentrations. Male MUP1-TG mice and wild-type (WT) mice were castrated (Cast) or sham-operated (Sham) at 9 weeks old and fed a standard chow diet. At 18 weeks of age, the mice were fasted overnight, then euthanized for blood collection. Serum triglycerides, nonesterified fatty acids (NEFA) and glucose concentrations were analyzed using biochemical test kits (as described in the Materials and methods). The horizontal bars represent the means ($n=9-12$).

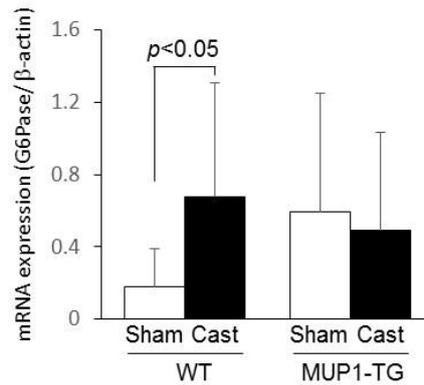


Fig. 19. Overexpression of MUP1 inhibits increase of castration-induced hepatic G6Pase expression. Male MUP1-TG mice and wild-type (WT) mice were castrated (Cast) or sham-operated (Sham) at 9 weeks old and fed a standard chow diet. At 18 weeks of age, the mice were fasted overnight, then euthanized for isolation of total RNA from liver. G6Pase were analyzed by real-time RT-PCR. Results are expressed as means \pm 1 standard deviation ($n=9-12$).

第4節 考察

MUP1 はアンドロゲンによって誘導されるため、雌性マウスよりも雄性マウスの発現量が高いことが知られている。そこで本章においては、MUP1 の雄性マウスにおける役割について検討を行った。まず、雄性 MUP1-TG マウスに 8 週間高脂肪食を摂取させた。その結果、雌性 MUP1-TG マウスと同様に雄性 MUP1-TG マウスにおいても、高脂肪食を摂取による体重と脂肪重量増加に対して抑制的であった (Fig. 11A, B)。このことから、雄性マウスにおいても MUP1 は脂肪蓄積の抑制作用を担うことが示唆された。しかし、血清中トリグリセリド濃度については、雌性 MUP1-TG マウスで認められた抑制 (Fig. 3C) が雄性 MUP1-TG マウスにおいては認められず (Fig. 11C)、MUP1 の作用には一部雌雄差が存在することが考えられた。しかし雄の MUP1-TG マウスでは肝臓における MUP1 発現が雌ほど過剰になっていないことから、肝臓における MUP1 の発現量の違いに起因する可能性も考えられる。

ある特定の遺伝子の機能を解析するためには遺伝子欠損動物を用いることが有効であるが、前述のとおり MUP1 だけを欠損したマウスを作製することは非常に困難である。そこで本研究では、MUP1 が典型的なアンドロゲン応答遺伝子であることを利用し、去勢手術により MUP1 抑制状態を誘導することで雄における MUP1 の糖・脂質代謝系に対する生理学的意義の解明を試みた。既に臨床的には去勢によっても肥満が誘導されることから⁴¹⁻⁴⁴⁾、去勢が肥満誘導に関わることは自明となっているものの、マウスにおいては去勢状態での肥満誘導条件や脂肪蓄積等に関する知見が乏しい。そこで、まずは去勢による肥満誘導マウスモデルの確立を行った。雄性野生型マウスを去勢して 9 週間後に解析を行ったところ、偽手術マウスと比較して体重増加の抑制が認められた (Fig. 12)。

去勢により体重増加が抑制されることは、先行研究でも報告されており、去勢による骨や筋肉の重量減少が体重増加抑制につながった可能性が考えられた。その一方で、脂肪組織については重量の増加傾向が認められ、また体重あたりの重量では有意な増加が認められた (Fig. 13)。さらに、血清マーカーを測定した結果、血清中トリグリセリドと遊離脂肪酸濃度は共に去勢マウスで有意な増加が認められた (Fig. 14)。血清マーカーについては、臨床的な先行研究においても、去勢手術により脂肪重量増加するケースで血清中トリグリセリドと遊離脂肪酸の両マーカーが増加することが報告されている^{41, 47)}ことから、本検討におけるマウスモデルは去勢による肥満を反映した適切なモデルであると考えられた。

さらに、去勢マウスモデルの各臓器における糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量についても検討を行った。脂肪重量が増加しているため、脂肪組織における遺伝子の変動が期待されたが、予想に反し、脂肪組織における脂質代謝に関わる遺伝子の発現量は、測定したいずれの遺伝子も去勢マウスと偽手術マウスとの間で差は認められなかった (Fig. 15A)。一方、肝臓における糖新生の律速酵素である G6Pase と PEPCK の発現量を測定した結果、偽手術マウスと比較して去勢マウスの肝臓における G6Pase 発現量の有意な増加が認められた (Fig. 15B)。血清マーカーの検討で血清中グルコース濃度の増加が認められたが (Fig. 14)、これは肝臓の G6Pase 発現量の増加が一部起因している可能性が考えられた。肝臓の G6Pase に関する先行研究としては、G6Pase のみ過剰発現することによって、肝臓由来のグルコース産生を促進し、初期の 2 型糖尿病に似た病態を示すことが報告されている^{48, 49)}。つまり本検討においても、去勢に伴い脂肪組織における各遺伝子発現が変動するよりも、むしろ G6Pase を含む肝臓の糖新生に異常をきたすことで血清中グルコース濃度の増加を伴う肥満を誘発した可能性が考え

られた。さらに、去勢マウスの肝臓における MUP1 の発現量は、偽手術マウスと比較して有意に減少していた (Fig. 15C) ことから、MUP1 は去勢による肥満の誘導にも何らかの関与をしている可能性が考えられた。

そこで、去勢によって誘導される雄の肥満モデルにおける MUP1 の影響について検討を行うため、確立したプロトコールに基づき、MUP1-TG マウスに去勢手術を施して検討を行った。まず、去勢による MUP1 の発現量に与える影響について検討を行うため、血清中 MUP1 蛋白質量を測定した。結果、去勢した野生型マウスの肝臓における MUP1 mRNA 発現量が減少した結果 (Fig. 15C) を反映して、野生型マウスの血清中 MUP1 蛋白質量は偽手術マウスと比較して著しい低下が認められた (Fig. 16)。一方 MUP1-TG マウスにおいては、去勢手術を施しても血清中 MUP1 蛋白質量は高いレベルで維持された。その去勢した MUP1-TG マウスの脂肪重量を測定した結果、野生型マウスでは去勢により脂肪重量が増加した (Fig. 13) 一方で、MUP1-TG マウスにおいては去勢群と偽手術群の差は認められず、去勢による影響が MUP1 により抑制された (Fig. 17)。さらに、野生型マウスにおいて認められた血清中トリグリセリドとグルコース濃度の増加に加え、肝臓の G6Pase 発現量の増加についても、MUP1-TG マウスにおいては去勢による影響が抑制されていた (Fig. 19)。すなわち、MUP1 の発現が著しく低下した去勢状態における糖・脂質代謝の異常に対して、MUP1 を正常レベルまで回復させることによって明かな改善効果が認められた。このことから、雄性においても MUP1 は脂肪蓄積の抑制因子として働くことが裏付けられたと共に、去勢による肥満の誘導機構の一つに MUP1 の発現低下が関与することが示された。

総括

リポカリンファミリー分子は、8つのストランドからなる β バレル構造と末端に疎水性リガンド結合部位の蛋白質の共通した構造を持つことから、各々が疎水性物質のキャリアーとして機能すると考えられている。その機能とは別に近年、糖尿病や肥満などの病態との因果関係を示す報告がなされた。特に、RBP4やLCN2に関しては、臨床応用に向けた研究が世界各地の研究者によって進められており、近い将来、診断マーカー等に利用されることが期待されている。さらに、リポカリンファミリー分子の一つであるMUP1も、糖・脂質代謝に影響を及ぼす報告がなされたものの、糖尿病・肥満モデルマウスであるdb/dbマウスを用いているため、糖尿病・肥満状態に至るまでのMUP1における影響については不明なままである。さらに、糖尿病・肥満状態においてMUP1の発現量が減少するなど、栄養状態においてMUP1の発現量は変動することも報告されている。すなわち、糖尿病・肥満状態における限定的な検討だけではMUP1の作用を確定するには不十分であることが考えられた。そこで本検討においては、糖尿病・肥満状態に至る以前のMUP1の糖・脂質代謝における役割について検討を行った。

第1章では、先ずMUP1の糖・脂質代謝における役割を検討するために、MUP1を全身で高発現するMUP1-TGマウス作製を試み、作製に成功した。MUP1による肝臓の糖新生と脂肪酸合成を促進する遺伝子発現の抑制がdb/dbマウスを用いて報告されている一方、通常食摂取時の雌性MUP1-TGマウスにおいて、それら遺伝子発現量はMUP1により変動しなかった。さらに短期間高脂肪食摂取させたところ、雌性MUP1-TGマウスは体重と脂肪重量増加と血清中トリグリセリ

ド濃度増加に対して抵抗性であった。また糖尿病・肥満状態における肝臓や脂肪組織では MUP1 の発現量が低下することが先行研究で報告されていたが、今回の条件では野生型マウスにおける MUP1 の発現量が各臓器で増加し、特に脂肪組織における発現増加が著しいことを見いだした。以上のことから、栄養状態に応じて MUP1 の機能やその作用部位は異なることが考えられ、さらに糖尿病・肥満状態に至る以前の栄養状態において MUP1 は脂肪組織における脂肪蓄積抑制作用を発揮することが世界で初めて明らかとなった。

第 2 章では、MUP1 の脂肪組織における役割についてより詳細な検討を行うために、MEF を用いた脂肪細胞分化モデルアッセイを行った。その結果、MUP1-TG の TG-MEF における PPAR γ を含む脂肪細胞分化を促進する遺伝子発現量は分化の比較的早期において抑制され、脂肪滴蓄積も抑制されていた。さらに、脂肪細胞分化の初期段階における MUP1 の役割について検討を行ったところ、内因性 MUP1 は脂肪細胞分化の初期段階である分化誘導 6 時間後から発現し、初期段階に機能する転写因子である C/EBP β 発現量は TG-MEF において分化誘導 18 時間後において抑制されていた。次に、脂肪細胞分化において必要不可欠である PPAR γ と MUP1 との脂肪蓄積における関与に着目して検討を行った。MUP1-TG マウスと PPAR γ (+/-) マウスを交配し、MUP1 (+)/ PPAR γ (+/-) マウスを作製して高脂肪食を摂取させて検討した結果、MUP1 による体重増加を伴う脂肪重量増加と血清中トリグリセリド濃度の増加の抑制作用は、PPAR γ ヘテロ欠損により減弱した。これらのことから、MUP1 は PPAR γ と何らかの関与によって脂肪蓄積抑制作用を発揮することが考えられ、その作用の一部は C/EBP β の発現調節に起因する可能性が示唆された。

第3章では、雄性マウスにおける MUP1 の脂肪蓄積抑制作用についても検討した。雄性 MUP1-TG マウスに短期間高脂肪食を摂取させたところ、雄性 MUP1-TG マウスにおいても雌性 MUP1-TG マウスと同様に脂肪重量の増加抑制を伴う体重増加の抑制が認められた。さらに去勢による肥満誘導に対する MUP1 影響について検討するためにまずは、去勢による肥満誘導マウスモデルの作製を行った。去勢9週間後に解析を行うことで脂肪重量の増加が確認され、目的のマウスモデルの作製に成功した。そこでこのマウスモデルを用いて、MUP1-TG に去勢手術を行うことで検討を行った。結果、去勢した野生型マウスは MUP1 の著しい発現低下に伴い脂肪蓄積が増加した一方で、去勢した MUP1-TG マウスにおいては MUP1 の発現は高いレベルで維持され、脂肪蓄積増加の抑制が認められた。このことから、雄性マウスにおいても MUP1 は脂肪蓄積抑制作用を発揮することが裏付けられたと共に、去勢による肥満の誘導機構の一つには MUP1 の発現低下が関与することが示唆された。

以上の結果より、リポカリンファミリー分子である MUP1 を全身で高発現する MUP1-TG マウスの作製に成功し、MUP1 は脂肪組織における脂肪蓄積抑制作用を有することが新たに見出され、その作用は PPAR γ との何らかの関与によって発揮されることが示唆された。さらに、去勢による肥満の誘導機構の一つには MUP1 の発現低下が関与する可能性も見出された。本研究成果は、未だ明らかとなっていない MUP1 の生理的意義の解明に大きく貢献する新たな知見を提供するだけでなく、リポカリンファミリー分子の臨床応用に向けた研究の足掛かりとなる可能性も考えられる。

謝辞

本研究に関して、指導教官として終始ご指導ご鞭撻を賜りました本学 薬物治療学研究室 保住功教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の推進にあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました本学 衛生学研究室 永瀬久光教授ならびに中西剛准教授に深謝いたします。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました本学 生化学研究室 五十里彰教授、本学 臨床薬剤学研究室 足立哲夫教授、本学 分子生物学研究室 福光秀文教授に深謝いたします。

本研究における実験の実施にあたりご協力いただきました、井口拓馬博士、小黒浩之修士、藤谷航平学士、高木康平学士に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご指導ご協力を賜りました、大阪大学 微生物病研究所・附属感染動物実験施設 伊川正人教授、東京大学大学院医学系研究科 代謝栄養病態学 門脇孝教授、横浜市立大学大学院医学研究科 肝胆膵消化器病学教室 中島淳教授、鳥取大学医学部 臨床薬理学教室 和田孝一郎教授、摂南大学理学部生命化学科 環境毒性学研究室 木村朋紀准教授ならびに本学 衛生学研究室の諸氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) Bocskei Z, Groom CR, Flower DR, Wright CE, Phillips SE, Cavaggioni A, Findlay JB, North AC: Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature*, **360**, 186-188 (1992).
- 2) Finlayson JS, Asofsky R, Potter M, Runner CC: Major urinary protein complex of normal mice: origin. *Science*, **149**, 981-982 (1965).
- 3) Berger FG, Szoka P: Biosynthesis of the major urinary proteins in mouse liver: a biochemical genetic study. *Biochem. Genet.*, **19**, 1261-1273 (1981).
- 4) Shaw PH, Held WA, Hastie ND: The gene family for major urinary proteins: expression in several secretory tissues of the mouse. *Cell*, **32**, 755-761 (1983).
- 5) Kimura H, Odani S, Nishi S, Sato H, Arakawa M, Ono T: Primary structure and cellular distribution of two fatty acid-binding proteins in adult rat kidneys. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5963-5972 (1991).
- 6) Flower DR: The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.*, **318 (Pt 1)**, 1-14 (1996).
- 7) Peele P, Salazar I, Mimmack M, Keverne EB, Brennan PA: Low molecular weight constituents of male mouse urine mediate the pregnancy block effect and convey information about the identity of the mating male. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 622-628 (2003).
- 8) Sharrow SD, Vaughn JL, Zidek L, Novotny MV, Stone MJ: Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Sci.*, **11**, 2247-2256 (2002).
- 9) Feng S, Zhu Y, Yan C, Wang Y, Zhang Z: Retinol binding protein 4 correlates with and is an early predictor of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus patients. *J. Biomed. Res.*, **29**, (2015).
- 10) Wolf G: Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr. Rev.*, **65**, 251-256 (2007).
- 11) Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, **436**, 356-362 (2005).
- 12) De la Chesnaye E, Manuel-Apolinar L, Zarate A, Damasio L, Espino N, Revilla-Monsalve MC, Islas-Andrade S: Lipocalin-2 plasmatic levels are reduced in patients with long-term type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **8**, 2853-2859 (2015).

- 13) Jin D, Guo H, Bu SY, Zhang Y, Hannaford J, Mashek DG, Chen X: Lipocalin 2 is a selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and function in lipid homeostasis and energy expenditure. *FASEB J.*, **25**, 754-764 (2011).
- 14) Wu G, Li H, Zhou M, Fang Q, Bao Y, Xu A, Jia W: Mechanism and clinical evidence of lipocalin-2 and adipocyte fatty acid-binding protein linking obesity and atherosclerosis. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **30**, 447-456 (2014).
- 15) Fiseha T: Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Biomarker research*, **3**, 16 (2015).
- 16) Bacci MR, Cavallari MR, de Rozier-Alves RM, Alves Bda C, Fonseca FL: The impact of lipocalin-type-prostaglandin-D-synthase as a predictor of kidney disease in patients with type 2 diabetes. *Drug Des. Devel. Ther.*, **9**, 3179-3182 (2015).
- 17) Arun O, Celik G, Oc B, Unlu A, Celik JB, Oc M, Duman A: Renal effects of coronary artery bypass graft surgery in diabetic and non-diabetic patients: a study with urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and serum cystatin C. *Kidney Blood Press. Res.*, **40**, 141-152 (2015).
- 18) Park H, Green MH, Shaffer ML: Association between serum retinol-binding protein 4 concentrations and clinical indices in subjects with type 2 diabetes: a meta-analysis. *J. Hum. Nutr. Diet.*, **25**, 300-310 (2012).
- 19) Riaz S, Alam SS, Srail SK, Skinner V, Riaz A, Akhtar MW: Proteomic identification of human urinary biomarkers in diabetes mellitus type 2. *Diabetes Technol. Ther.*, **12**, 979-988 (2010).
- 20) Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares J, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L: Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J. Intern. Med.*, **262**, 496-503 (2007).
- 21) Zhou Y, Jiang L, Rui L: Identification of MUP1 as a regulator for glucose and lipid metabolism in mice. *J. Biol. Chem.*, **284**, 11152-11159 (2009).
- 22) Hui X, Zhu W, Wang Y, Lam KS, Zhang J, Wu D, Kraegen EW, Li Y, Xu A: Major urinary protein-1 increases energy expenditure and improves glucose intolerance through enhancing mitochondrial function in skeletal muscle of diabetic mice. *J. Biol. Chem.*, **284**, 14050-14057 (2009).
- 23) Dhahbi JM, Kim HJ, Mote PL, Beaver RJ, Spindler SR: Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 5524-5529 (2004).

- 24) Miller RA, Chang Y, Galecki AT, Al-Regaiey K, Kopchick JJ, Bartke A: Gene expression patterns in calorically restricted mice: partial overlap with long-lived mutant mice. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 2657-2666 (2002).
- 25) Van Schothorst EM, Franssen-van Hal N, Schaap MM, Pennings J, Hoebee B, Keijer J: Adipose gene expression patterns of weight gain suggest counteracting steroid hormone synthesis. *Obes. Res.*, **13**, 1031-1041 (2005).
- 26) van Schothorst EM, Keijer J, Pennings JL, Opperhuizen A, van den Brom CE, Kohl T, Franssen-van Hal NL, Hoebee B: Adipose gene expression response of lean and obese mice to short-term dietary restriction. *Obesity*, **14**, 974-979 (2006).
- 27) Kim HY, Stewart TP, Wyatt BN, Siriwardhana N, Saxton AM, Kim JH: Gene expression profiles of a mouse congenic strain carrying an obesity susceptibility QTL under obesigenic diets. *Genes Nutr.*, **5**, 237-250 (2010).
- 28) Matsumura H, Hasuwa H, Inoue N, Ikawa M, Okabe M: Lineage-specific cell disruption in living mice by Cre-mediated expression of diphtheria toxin A chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 275-279 (2004).
- 29) Wu X, Iguchi T, Hirano J, Fujita I, Ueda H, Itoh N, Tanaka K, Nakanishi T: Upregulation of sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression in adrenals increases norepinephrine production and aggravates hyperlipidemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1020-1028 (2007).
- 30) Murase T, Mizuno T, Omachi T, Onizawa K, Komine Y, Kondo H, Hase T, Tokimitsu I: Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *J. Lipid Res.*, **42**, 372-378 (2001).
- 31) Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN: Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, **37**, 1163-1167 (1988).
- 32) Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS: PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.*, **16**, 27-32 (2002).
- 33) Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM: C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.*, **16**, 22-26 (2002).
- 34) Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA: The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30057-30060 (1998).
- 35) Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S: Defective adipocyte differentiation

- in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.*, **16**, 7432-7443 (1997).
- 36) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al.: PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell*, **4**, 597-609 (1999).
 - 37) Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM: mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.*, **8**, 1224-1234 (1994).
 - 38) Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM: PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell*, **4**, 585-595 (1999).
 - 39) Mullany LK, Hanse EA, Romano A, Blomquist CH, Mason JI, Delvoux B, Anttila C, Albrecht JH: Cyclin D1 regulates hepatic estrogen and androgen metabolism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **298**, G884-895 (2010).
 - 40) Hastie ND, Held WA, Toole JJ: Multiple genes coding for the androgen-regulated major urinary proteins of the mouse. *Cell*, **17**, 449-457 (1979).
 - 41) Hakimian P, Blute M, Jr., Kashanian J, Chan S, Silver D, Shabsigh R: Metabolic and cardiovascular effects of androgen deprivation therapy. *BJU Int.*, **102**, 1509-1514 (2008).
 - 42) Shastri BR, Yaturu S: Metabolic complications and increased cardiovascular risks as a result of androgen deprivation therapy in men with prostate cancer. *Prostate Cancer*, **2011**, 391576 (2011).
 - 43) Smith MR, Finkelstein JS, McGovern FJ, Zietman AL, Fallon MA, Schoenfeld DA, Kantoff PW: Changes in body composition during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 599-603 (2002).
 - 44) Walsh PC: Immediate versus deferred treatment for advanced prostatic cancer: initial results of the Medical Research Council trial. The Medical Research Council Prostate Cancer Working Party Investigators Group. *J. Urol.*, **158**, 1623-1624 (1997).
 - 45) Floryk D, Kurosaka S, Tanimoto R, Yang G, Goltsov A, Park S, Thompson TC: Castration-induced changes in mouse epididymal white adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **345**, 58-67 (2011).

- 46) Koncarevic A, Cornwall-Brady M, Pullen A, Davies M, Sako D, Liu J, Kumar R, Tomkinson K, Baker T, Umiker B, Monnell T, Grinberg AV, Liharska K, Underwood KW, Ucran JA, Howard E, Barberio J, Spaits M, Pearsall S, Seehra J, Lachey J: A soluble activin receptor type IIb prevents the effects of androgen deprivation on body composition and bone health. *Endocrinology*, **151**, 4289-4300 (2010).
- 47) Saylor PJ, Smith MR: Metabolic complications of androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J. Urol.*, **181**, 1998-2006; discussion 2007-1998 (2009).
- 48) Seoane J, Trinh K, O'Doherty RM, Gomez-Foix AM, Lange AJ, Newgard CB, Guinovart JJ: Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 26972-26977 (1997).
- 49) Trinh KY, O'Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB: Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31615-31620 (1998).