

博士論文

Acetyl-CoA Carboxylase 2 (ACC2) の
阻害に基づく抗糖尿病作用に関する研究

高木 寛之

目次

【序論】	1
【第一章：ACC2 阻害と細胞内のグルコース/脂肪酸の競合機構に関する検証】	
1 - 1. 背景	3
1 - 2. 実験方法	5
1 - 3. 結果	12
1 - 4. 考察	21
1 - 5. 結論	25
【第二章：新規 ACC2 選択的阻害剤を用いた薬理学的検証】	
2 - 1. 背景	26
2 - 2. 実験方法	28
2 - 3. 結果	32
2 - 4. 考察	38
2 - 5. 結論	40
【総括】	41
【参考文献】	42
【略語】	49
【謝辞】	50

【序論】

2 型糖尿病の主要な成因は、膵β細胞からのインスリン分泌の低下と、標的細胞におけるインスリン反応性の低下、すなわちインスリン抵抗性である。生体内のエネルギーバランスが慢性的に供給過多である状態では、脂肪組織以外のインスリン感受性組織に異所性の脂肪が蓄積し、インスリン抵抗性の発症に寄与する (1, 2)。特に、骨格筋はインスリンによる糖取り込みの最大の責任臓器であることから、骨格筋における細胞内脂質 (IMCL, Intramyocellular lipid) の蓄積はインスリン抵抗性と密接に関連する (3, 4)。さらに、種々の IMCL のうちセラミドやジアシルグリセロールといった生理活性脂質は骨格筋細胞内のインスリンシグナルを直接的に阻害することが報告されており (5-7)、骨格筋 IMCL はインスリン抵抗性の主要な発症因子として注目されている。IMCL の代謝にはミトコンドリアにおける脂肪酸酸化の機能が重要であるが、慢性的なエネルギー過多状態によりミトコンドリア機能が障害されると、脂肪酸酸化が不十分となり IMCL の蓄積が引き起こされる。したがって、エネルギー過剰摂取を背景とした現代の 2 型糖尿病において、脂肪酸酸化の亢進を介した骨格筋 IMCL 蓄積の解消が、新たな治療アプローチとして期待されている。

Acetyl-CoA carboxylase (ACC) は細胞内のアセチル CoA をマロニル CoA へ変換する酵素であり、細胞内脂質代謝の重要な調節因子として知られる。ACC は ACC1 と ACC2 の 2 つのアイソザイムが存在する。ACC1 は肝臓や脂肪組織をはじめとした脂肪合成が盛んな組織に強く発現しており、細胞質にマロニル CoA を供給することで脂肪の生合成を促進する (8, 9)。ACC2 は骨格筋などの脂肪酸酸化が活発な組織に主に発現しており、ミトコンドリア近傍のアセチル CoA をマロニル CoA へ変換する (8-10)。ACC2 由来のマロニル CoA は、脂肪酸のミトコンドリアへの流入を促進する酵素である Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) の活性を阻害するため、ACC2 は脂肪酸酸化を負に制御する (11)。したがって、ACC2 の阻害は脂肪酸酸化の亢進を介して骨格筋 IMCL 量の低下、さらにはインスリン抵抗性の改善が期待されるため、ACC2 は 2 型糖尿病治療薬の新規標的分子として注目されている。

本研究では、ACC2 阻害に基づく脂肪酸酸化の亢進が糖尿病治療に有用であるか検証すること

を目的とし、以下2つの研究課題に関して検討を実施した。

1. ACC2 阻害と細胞内のグルコース/脂肪酸の競合機構に関する検証
2. 新規 ACC2 選択的阻害剤を用いた薬理的検証

これらの研究課題に関して得られた知見を以下2章に渡って論述する。

【第一章：ACC2 阻害と細胞内のグルコース/脂肪酸の競合機構に関する検証】

1-1. 背景

肥満や糖尿病患者のインスリン抵抗性状態の骨格筋においては、ミトコンドリアのエネルギー基質消費機能の低下に伴い IMCL の蓄積が見られることが、複数の臨床研究により報告されている (12-14)。さらに、動物実験において、CPT1 阻害による脂肪酸酸化の障害が IMCL 蓄積を介し全身のインスリン抵抗性を惹起すること (15)、逆に CPT1 あるいは Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ の活性化によって骨格筋の脂肪酸酸化が亢進すると全身のインスリン抵抗性が改善することが報告されている (16, 17)。これらの知見は、脂肪酸酸化の亢進というアプローチが 2 型糖尿病治療にとって有用であることを支持するものである。しかしながら、この脂肪酸酸化を標的とした糖尿病の治療戦略に異論を呈する仮説として、“Substrate competition” という概念が古くから提唱されている。Substrate competition は、グルコースと脂肪酸は細胞内エネルギー基質として互いに競合するため、一方の利用促進は他方の利用阻害につながるという概念であり、代表的なモデルとして、Randle らによって提唱された Glucose-fatty acid cycle が存在する。Glucose-fatty acid cycle は、脂肪酸の供給および酸化が過剰に亢進することで脂肪酸酸化の下流代謝物であるミトコンドリア内アセチル CoA が蓄積し、このアセチル CoA がグルコース酸化の律速酵素である Pyruvate dehydrogenase (PDH) を阻害するため、結果としてグルコース利用が抑制される、というモデルである (18, 19)。Glucose-fatty acid cycle は、古くから脂肪毒性によるインスリン抵抗性の発症メカニズムを説明し得る仮説の一つと考えられている。また、アセチル CoA はアセチルカルニチンへ変換されることによりミトコンドリア膜外への輸送が可能となるが、この変換を触媒する酵素である Carnitine acetyltransferase (CrAT) を骨格筋特異的に欠損したマウスでは、脂肪酸酸化からグルコース利用への切り替えが機能せず、耐糖能異常を呈することが報告されており (20)、骨格筋のミトコンドリア内アセチル CoA プールが細胞内エネルギー基質の競合とそれに伴うグルコース代謝異常の原因となることが、近年の研究によっても支持されている。

以上の背景より、骨格筋の脂肪酸酸化亢進に基づいた治療戦略は、IMCL の減少およびインスリン抵抗性の改善効果が期待される一方で、ミトコンドリア内アセチル CoA 蓄積によるグルコース代謝経路の抑制が潜在的に懸念される。したがって、脂肪酸酸化の調節機構を治療標的とするにあたって、その標的とする経路が細胞内グルコース代謝との競合機構を回避し得るかどうかことが重要である。ACC2 に関しては、Knockout (KO) マウスおよび ACC2 阻害剤を用いた複数の先行研究により、ACC2 阻害が骨格筋において脂肪酸酸化の亢進および脂質量の低下作用を有し、さらには全身のインスリン抵抗性の改善をもたらすことが報告されており、魅力的な治療アプローチとなり得ることが示唆されている (21, 22)。しかしながら、ACC2 の阻害が上述の細胞内グルコース代謝との競合機構へどのような影響を与えるかについては詳細に研究されておらず、ACC2 阻害による脂肪酸酸化の亢進が真に有力な治療戦略であるかについては、懐疑的な部分が残る。

本研究は、ACC2 を介した脂肪酸酸化の調節機構が、細胞内グルコース代謝経路に与える影響を明らかにすることを目的とし、新たに作製した ACC2 KO マウスの全身および骨格筋のエネルギー代謝について、グルコースと脂肪酸のエネルギー基質としての競合に焦点を当て解析を実施した。

1-2. 実験方法

ACC2 KO マウスの作製

C57BL/6J 系統由来のマウス ES 細胞において、図 1A で示したターゲティングベクターを用いて相同遺伝子組換えを実施し、ES 細胞を BALB/c マウス由来胚盤胞へマイクロインジェクションしキメラマウスを作製した。Flpe トランスジェニックマウス (RIKEN Bio Resource Center, Tsukuba, Japan) (23) との交配により Neo カセットを除去した。全身の標的遺伝子欠損のため、Cre トランスジェニックマウス (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) (24) と交配し、Cre 遺伝子を C57BL/6J マウスとの交配により除去した。得られた ACC2 ヘテロ欠損マウス同士を交配させ ACC2 KO マウスおよび Wild-type (WT) マウスを作製し、それぞれの系統についてホモ接合体交配により繁殖させた。

動物実験

動物実験は国際実験動物ケア評価認証協会に認証された施設内で、塩野義製薬株式会社の動物実験適正運用委員会によって承認された手順によって実施された。実験には、同週齢の雄の ACC2 KO マウスおよび WT マウスが使用された。マウスは室温 20~23°C、12 時間の明暗サイクルの条件下で個別飼育し、自由摂水および自由摂食とした。飼料は、通常食は CE-2 (CLEA Japan, Tokyo, Japan)、高脂肪食は 58Y1 (Test Diet, St. Louis, MO) を使用した。高脂肪食負荷実験においては、8~9 週齢のマウスに 3 カ月間高脂肪食を負荷した。酵素活性評価、骨格筋代謝物解析およびアシルカルニチン解析については、5~6 時間絶食したマウスからサンプリングした血液あるいは大腿筋サンプルを用いて実施した。その他のサンプリングについては、特に記載のない限り自由摂食下のマウスから採取したサンプルを用いて実施した。大腿筋サンプルは採取後、液体窒素で瞬間凍結させ、解析まで -80°C で保存した。

遺伝子発現解析

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて組織から total RNA を抽出し、High-

Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて 1 本鎖 cDNA を作製した。cDNA サンプルに Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) およびプライマーを添加し、7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) によりリアルタイム定量 Polymerase chain reaction (PCR) 解析を実施した。遺伝子発現レベルはハウスキーピング遺伝子 β -actin による補正後に $\Delta\Delta$ Ct 法により算出し、WT マウスに対する相対値として表した。解析に使用したプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

Target gene	Primer	Sequence
ACC2 (<i>Acacb</i>)	Forward	5'-GGTAGTGGCTTTGAAGGAACTGTC-3'
	Reverse	5'-GATATCGTTGTTCTGGAAGCTCTCG-3'
ACC1 (<i>Acaca</i>)	Forward	5'-GGATGACAGGCTTGCAGCTATG-3'
	Reverse	5'-GGAACGTAAGTCGCCGGATG-3'
β -actin (<i>Actb</i>)	Forward	5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3'
	Reverse	5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'

脂肪酸酸化能の評価

マウス全身の脂肪酸酸化能について、生体ガス分析用質量分析装置 ARCO-2000 (Arco System, Chiba, Japan) を用いて以下の手順で評価した。マウスを 11 週齢時点で通常ケージから代謝チャンバーへ移し、4 日間チャンバー内での環境順化を実施した。実験当日、マウスに ^{13}C 標識のオレイン酸 (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) を混合させた液体飼料 F2LCW (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を 15 ml/kg で強制経口負荷した。飼料負荷後、呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ の比率を、ARCO-2000 を用いて 5.5 分間隔で 3 時間モニターし、脂肪酸酸化能の指標とした。液体飼料は 4.95 g/15mL の濃度になるように調製し、 ^{13}C 標識のオレイン酸の最終濃度は 0.04 mol/L とした。測定中、マウスは自由摂水、絶食条件下においた。

血液パラメータ評価

マウスを6時間絶食処置した後に尾静脈から血液を採取し、22,400gで5分間遠心分離し血漿サンプルを得た。血漿中のグルコース濃度、トリグリセライド濃度および遊離脂肪酸濃度を、日立自動分析装置7180 (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いた酵素法により定量した。血漿中インスリン濃度はマウスインスリン ELISA キット (Shionogi, Osaka, Japan) (25) により定量した。

グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験

マウスを4時間絶食処置した後に、腹腔内よりグルコース (1 g/kg) あるいは Humulin R (0.25 U/kg; Eli Lilly, Kobe, Japan) を投与した。経時的に尾静脈より血液サンプルを採取し、グルコメーター (Arkray, Tokyo, Japan) により血糖値を測定した。

IMCL および EMCL の測定

骨格筋 IMCL および Extramyocellular lipid (EMCL) 量は、Magnetic resonance spectroscopy (MRS) により測定した。MRS の測定には Varian MRI System 7T/210 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用し、高周波 (Radio Frequency) 信号の送受信には直径 24mm の円形の¹H 表面コイルを使用した。イソフルラン麻酔下、37.0 ± 0.5°Cの保温下で、マウスをプラスチック台に仰向けにし、表面コイルを左後肢の前脛骨筋に置いた。前脛骨筋における MR スペクトルは point-resolved spectroscopy sequence (PRESS) を用いて取得し、シークエンスの条件は、repetition time/echo time ; 2000/15 ms、voxel size ; 1.0×1.0×5.0 mm³、averages ; 512、variable pulse power and optimized relaxation delays (VAPOR) water suppression、total acquisition time ; 17 minutes とした。同一の関心領域においてシミングによる静磁場の調整及び水スペクトル抑制パルスの調整を実施した。MRS データは解析用ソフトウェア LCModel (version 6.3) を用いて解析し、IMCL および EMCL 量は総クレアチンに対する比として算出した。

グリコーゲン濃度測定

凍結した大腿筋サンプルを用いて骨格筋中のグリコーゲン濃度を測定した。サンプル調製およびグリコーゲン濃度の測定は、市販の Glycogen Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を用いて、添付のプロトコールに従って実施した。

高インスリン正常血糖クランプ法

イソフルラン麻酔下、マウスの右頸静脈にインスリン及びグルコース注入用のカテーテルを挿入し、試験用のマウスを作製した。マウスにカテーテルより Humulin R を持続注入 (10.5 mU/kg/min) した状態で、正常血糖値 (100~120 mg/dL) を維持するために、カテーテルよりグルコース水溶液 (25%糖液) を可変量注入した。血糖値のモニターは 10 分間隔で実施し、尾静脈より採取した血液サンプルを用いてグルコメーターにより測定した。正常血糖値を 40 分間維持した際のグルコース注入速度 (GIR, Glucose infusion rate) の平均値をインスリン感受性の指標として算出した。マウスは試験前日から試験終了まで絶食条件下においた。

骨格筋インスリンシグナル解析

イソフルラン麻酔下、一晚絶食したマウスの右頸静脈にカテーテルを挿入した。マウス覚醒後、カテーテルより Humulin R (0.125 U/kg) あるいは生理食塩水を注入し、注入 3 分後にペントバルビタールにより安楽死させ、大腿筋を速やかに採取した。大腿筋における Akt タンパクのリン酸化レベルをウェスタンブロットにより解析し、骨格筋インスリン感受性の指標とした。

ウェスタンブロット解析

骨格筋および肝臓の総タンパク抽出は Protease inhibitor および Phosphatase inhibitor 含有の Lysis buffer を用いて標準的なプロトコールに従って実施した。抽出した総タンパク試料を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施し、泳動後のゲルから Polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンへタンパクを転写した。ACC タンパクの検出には、1 次抗体として anti-ACC protein

antibody (1:1000; catalog no. 3676; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を、2次抗体として HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:20,000; catalog no. NA934; GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) を使用した。GAPDH タンパクの検出には、HRP-conjugated anti-GAPDH antibody (1:500; catalog no. 3683S; Cell Signaling Technology) を使用した。Akt タンパクの検出には、1次抗体として anti-Akt Ser473 antibody (1:1000; catalog no. 9271; Cell Signaling Technology) あるいは anti-Akt antibody (1:1000; catalog no. 9272; Cell Signaling Technology) を、2次抗体として HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:2000; catalog no. 7074; Cell Signaling Technology) を使用した。タンパクシグナルは化学発光法により検出し、ACC タンパクおよびGAPDHタンパクの検出にはECL Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare) を、Akt タンパクの検出には Lumi GLO reagent (Cell Signaling Technology) を使用し、シグナルの定量は VersaDoc 5000MP Imaging System (Bio-Rad, Richmond, CA) および Quantity One software (Bio-Rad)を用いて実施した。

酵素活性評価

Isocitrate dehydrogenase および Citrate synthase は、それぞれ市販の Isocitrate Dehydrogenase Colorimetric Assay Kit (Abcam, Cambridge, MA) および Citrate Synthase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, Mountain View, CA) を用いて測定した。凍結した大腿筋サンプルにキット付属のアッセイバッファーおよびステンレスビーズを加え、TissueLyser II (Qiagen) を用いて大腿筋をホモジナイズした。ホモジネートを、Isocitrate dehydrogenase の測定では 13,000g、10 分間、Citrate synthase の測定では 10,000g、5 分間、それぞれ遠心処理した後、上清を採取し大腿筋の Lysate を得た。Lysate サンプルの酵素活性は、各キット添付のプロトコールに従って分光光度的に測定した。

CrAT の活性測定については、凍結した大腿筋サンプルに CellLytic MT lysis buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を加えハサミでミンスした後、ステンレスビーズと TissueLyser II を用いて大腿筋をホモジナイズした。ホモジネートを 13,000g、10 分間遠心処理した後、上清を採取

し大腿筋の Lysate を得た。Lysate サンプルの酵素活性は、既報 (20, 26) の方法に準じて、カルニチン依存的にアセチル CoA から遊離する Free-CoA と DTNB(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic)) の反応物を 412 nm で分光光度的に測定することで評価した。Lysate サンプル中の CrAT のタンパク量は市販の Mouse CRAT ELISA Kit (LifeSpan BioScience, Seattle, WA) を用いて測定した。

すべての酵素活性評価について、分光光度分析法における吸光度の測定には VersaMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いた。

骨格筋代謝物解析

解糖系代謝物のうち Glucose 6-phosphate、Fructose 6-phosphate および Fructose 1,6-bisphosphate 濃度の測定および解析は、Human Metabolome Technologies (Yamagata, Japan) の C-SCOPE analysis によって実施された。

上記以外の解糖系代謝物、アセチル CoA、マロニル CoA およびクエン酸回路代謝物の濃度測定については、凍結した大腿筋サンプルにステンレスビーズを加え、ShakeMaster Auto machine (BioMedical Science, Tokyo, Japan) を用いて粉碎し、粉碎した大腿筋サンプルに 4 倍量のバッファ (6%過塩素酸および 4%リン酸水溶液) を加えてホモジナイズした。ホモジネートを 15,000g で 5 分間遠心処理した後、上清をポリプロピレンバイアルに移し、Nexera MP (Shimadzu, Kyoto, Japan) および API5000 (Sciex, Toronto, Canada) を用いて Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis を実施した。長鎖のアシル CoA (C16-CoA および C18-CoA) 濃度の測定については、凍結した大腿筋サンプルにステンレスビーズを加え、ShakeMaster Auto machine を用いて粉碎し、粉碎した大腿筋サンプルに 4 倍量のバッファ (6%過塩素酸および 4%リン酸を含む 75%メタノール溶液) を加えてホモジナイズした。ホモジネートを 15,000g で 5 分間遠心処理した後、上清をガラスバイアルに移し、NexeraMP および QTRAP6500 (Sciex) を用いて LC-MS analysis を実施した。得られた LC-MS データを Analyst, version 1.6.2 (Sciex) を用いて解析し、定量値を得た。

アシルカルニチン解析

血漿中アシルカルニチン濃度の測定では、血漿サンプルと内部標準（D9-C0-カルニチンおよび D3-C16-カルニチン）をメタノール中で混合し、ボルテックスした。サンプルを 15,000g で 5 分間遠心し、上清をガラスバイアルに移して Nexera MP および API5000 を用いて LC-MS analysis を実施した。得られた LC-MS データを Analyst, version 1.6.2 を用いて解析し、定量値を得た。骨格筋アシルカルニチン濃度の測定では、粉碎した大腿筋サンプルを ShakeMaster Auto machine を用いてメタノール中でホモジナイズし、ホモジネートと内部標準（D9-C0-カルニチンおよび D3-C16-カルニチン）をメタノール中で混合し、ボルテックスした。サンプルを 15,000g で 5 分間遠心し、上清をガラスバイアルに移して Ultraperformance liquid chromatography (Waters, Milford, MA) および LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX) を用いて LC-MS analysis を実施した。得られた LC-MS データを Xcalibur, version 2.2 (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析し、定量値を得た。

統計解析

全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で表記した。群間の統計学的な比較には Welch's t-test を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。

1-3. 結果

ACC2 KO マウスにおける ACC2 遺伝子欠損の確認

ACC2 の Biotin carboxylase domain をコードするエクソン 15 からエクソン 18 を標的として遺伝子相同組換えを行い、ACC2 KO マウスを作製した (図 1A)。ACC2 は骨格筋、肝臓および心臓において高発現しており、脂肪組織においても発現していることが報告されている (8, 27-29)。ACC2 KO マウスにおいて、ACC2 遺伝子が欠損していることを確認するため、これらの組織における ACC1 および ACC2 遺伝子の発現レベルについて定量 PCR により測定した。その結果、ACC2 KO マウスから採取した組織において、ACC2 遺伝子の発現は完全に消失しており (図 1B)、ACC1 遺伝子の発現は WT マウスと同等であることが確認された (図 1C)。次に、ACC1 および ACC2 タンパクの双方を認識するモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを実施したところ、ACC2 KO マウスの骨格筋では WT マウスと比較して ACC タンパクの発現が著しく消失していた (図 1D)。一方、ACC1 の発現が優位である肝臓においては、ACC2 KO マウスと WT マウスの ACC タンパク発現レベルは同程度であった (図 1E)。同様に、ACC2 KO マウスにおいて、主に ACC2 由来である骨格筋マロニル CoA の量に関しては強い減少が確認された一方で (図 1F)、ACC1 の寄与が大きい肝臓マロニル CoA 量に関しては軽度な減少が確認された (図 1G)。さらに、ACC2 遺伝子の欠損を機能的な側面から確認するため、全身の脂肪酸酸化能について評価した。¹³C で標識されたオレイン酸を含む脂肪食を経口負荷したところ、ACC2 KO マウスでは WT マウスと比較して呼気中 CO₂ に占める ¹³CO₂ の割合が有意に高いことが確認され、ACC2 欠損によって全身の脂肪酸酸化能が亢進していることが示唆された (図 1H)。

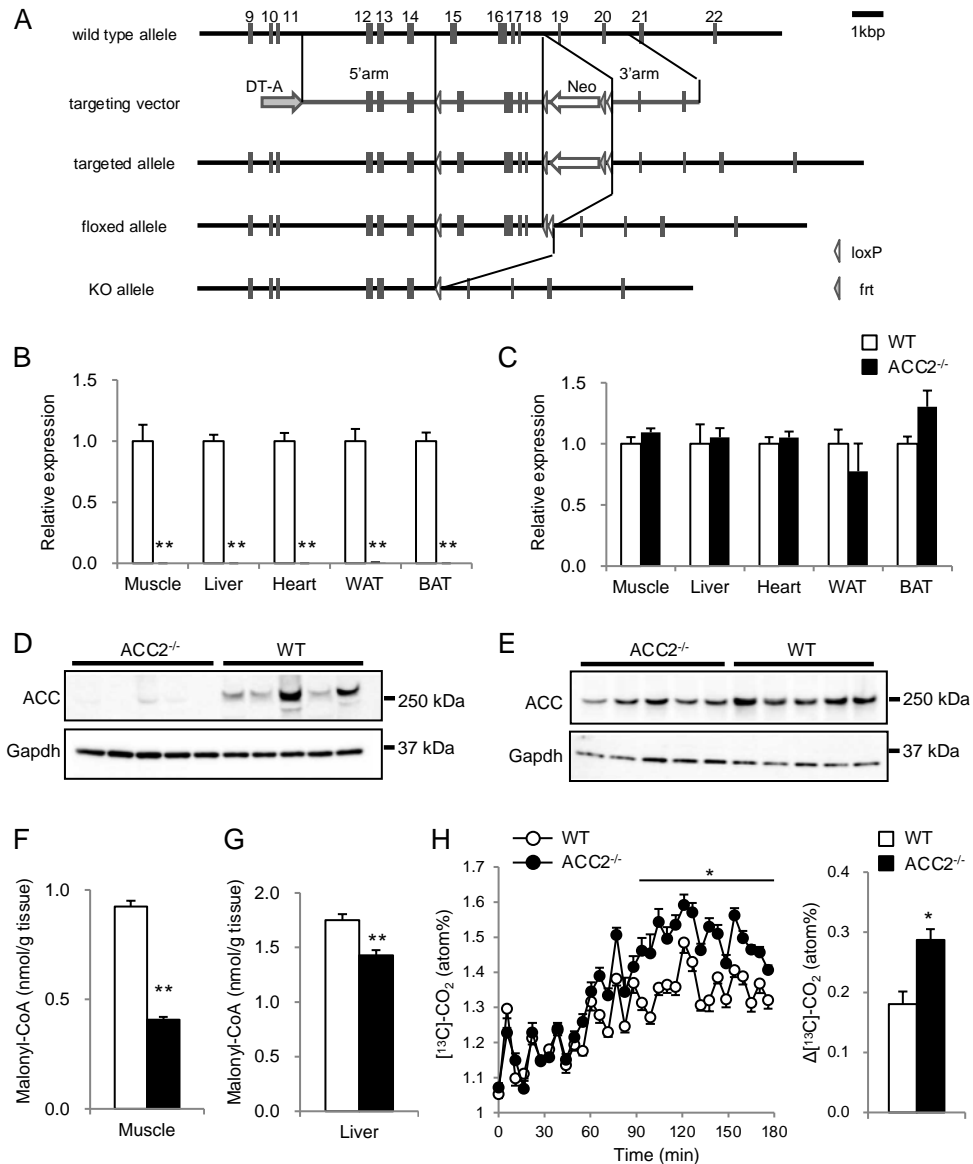


図 1. ACC2 KO マウスの作製と遺伝子欠損の確認

(A) 遺伝子ターゲティング戦略の模式図。灰色のボックスはエクソンを示し、ボックス上の数字はエクソン番号を示す。

(B, C) WT および ACC2 KO マウスの各組織における ACC2 (B) および ACC1 (C) の mRNA 発現レベル (n = 4-5)。

(D, E) WT および ACC2 KO マウスの骨格筋 (D) および肝臓 (E) から抽出したタンパクを用いたウェスタンブロット解析。ACC タンパクのシグナルは 250kDa 付近に確認された (n = 5)。

(F, G) WT および ACC2 KO マウスの骨格筋 (F) および肝臓 (G) のマロニル CoA 量 (n = 10)。

(H) WT および ACC2 KO マウスに脂肪酸を経口負荷し、全身の脂肪酸酸化能について評価した (n = 10)。¹³C 標識のオレイン酸を混合させた液体飼料を強制経口投与後、呼気中の ¹³CO₂ と ¹²CO₂ の比率を 3 時間モニターし (左図)、ベースラインからの変化を算出した (右図)。

P* < 0.05, *P* < 0.01 vs WT マウス。全てのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表記した。

BAT, Brown adipose tissue; DT-A, Diphtheria toxin A; WAT, White adipose tissue.

全身の糖代謝評価

ACC2 KO マウスの全身の代謝パラメータについて解析し、WT マウスと比較した。体重については ACC2 KO マウスと WT マウスの間に有意な差は見られなかった (図 2A)。血中のグルコース濃度、トリグリセライド濃度および遊離脂肪酸濃度についても両群で同等であったが (図 2B-D)、血中のインスリン濃度については ACC2 KO マウスで有意に低い値を示した (図 2E)。次に、全身の糖代謝について詳細に解析するために、グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験を実施した。ACC2 KO マウスでは WT マウスと比較して耐糖能が有意に高く (図 2F)、インスリン応答性の血中グルコース消失についても有意に亢進していた (図 2G)。これらの結果から、ACC2 の遺伝的欠損は全身レベルでエネルギー基質の競合を引き起こすことはなく、むしろ糖利用の亢進をもたらす可能性が示唆された。

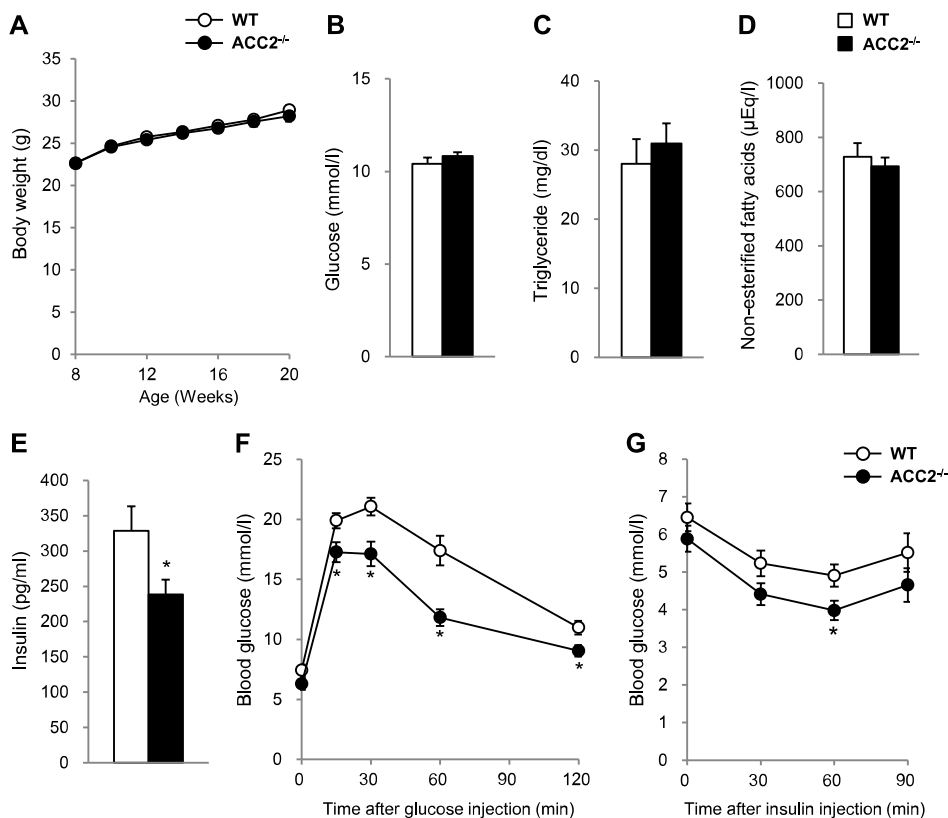


図 2. 通常食条件における WT および ACC2 KO マウスの全身の糖代謝パラメータ評価

(A) 8 週齢から 20 週齢までの体重変化 (n=9-10)。(B-E) 8 週齢時点の血漿中グルコース濃度 (B)、トリグリセライド濃度 (C)、遊離脂肪酸濃度 (D) およびインスリン濃度 (E) (n=10)。

(F, G) 8 週齢時点のグルコース負荷試験 (F) およびインスリン負荷試験 (G) の結果 (n=8)。

* $P < 0.05$ vs WT マウス。全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で表記した。

骨格筋における脂質代謝およびグルコース代謝の解析

ACC2 の遺伝的欠損による骨格筋脂質量への影響について検証するため、骨格筋における IMCL および EMCL の量について MRS により測定した。ACC2 KO マウスの骨格筋において、EMCL 量については WT マウスと同程度であったが、IMCL 量は顕著な減少が確認された (図 3A)。また、ACC2 KO マウスの骨格筋において、C16:0、C18:0、C18:1-CoA などの長鎖アシル CoA 量の減少 (図 3B)、長鎖アシルカルニチン量の増加およびフリーのカルニチン量の減少が認められた (図 3C、3D)。これらの結果から、ACC2 遺伝的欠損時の骨格筋においては、アシル CoA からアシルカルニチンへの変換が亢進することにより、アシル CoA のミトコンドリア脂肪酸酸化経路への流入が促進し、その結果 IMCL 量が減少する可能性が示唆された。

次に、骨格筋におけるグルコース代謝について検証するため、解糖系代謝物の量およびグリコーゲン量を評価したところ、いずれの代謝物についても ACC2 KO マウスと WT マウスで有意な差は認められなかった (図 3E、3F)。

さらに、注目すべきことに、ACC2 KO マウスの骨格筋において、脂肪酸酸化の亢進を示唆する代謝物変動が確認された一方で、その下流代謝物であるアセチル CoA 量の蓄積は見られず、むしろ有意な低下が確認された (図 3G)。

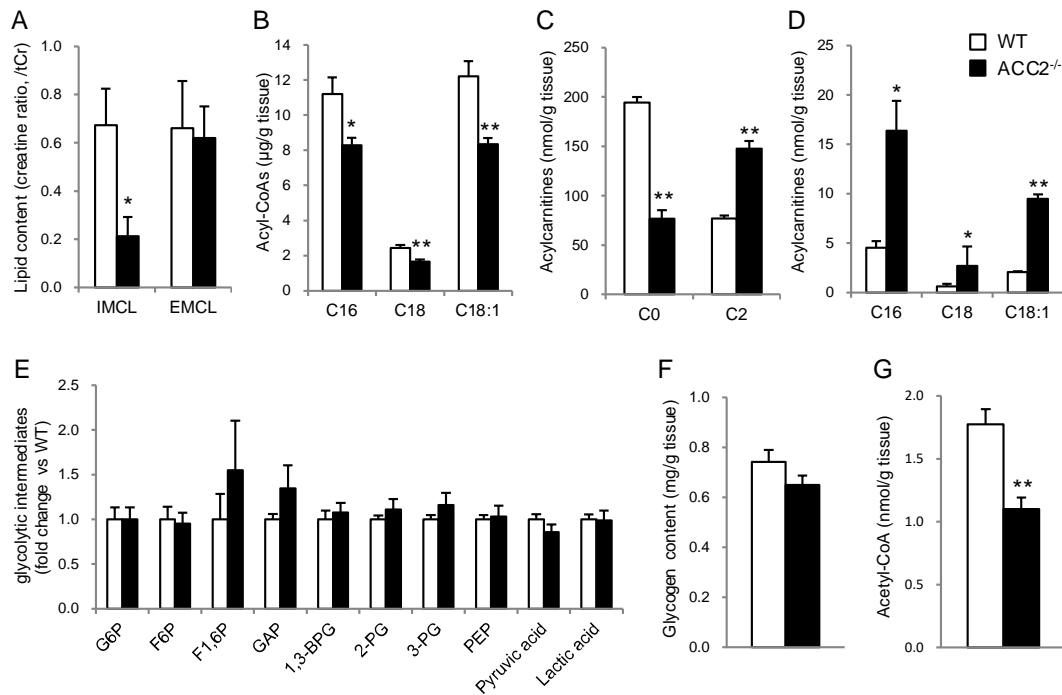


図3. 通常食条件における WT および ACC2 KO マウスの骨格筋代謝物プロファイル

(A) 前脛骨筋の IMCL および EMCL レベルを ¹H-MRS により測定した。IMCL および EMCL レベルは総クレアチンに対する比として算出した (n = 4-5)。

(B) 大腿筋の長鎖アシル CoA 量 (n = 8)。(C) 大腿筋のフリーカルニチン (C0) およびアセチルカルニチン (C2) 量 (n = 5)。(D) 大腿筋の長鎖アシルカルニチン量 (n = 5)。(E) 大腿筋の解糖系代謝物量 (n = 10)。(F) 大腿筋のグリコーゲン量 (n = 6)。(G) 大腿筋のアセチル CoA 量 (n = 10)。

P* < 0.05, *P* < 0.01 vs WT マウス。全てのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表記した。

1,3-BPG, 1,3-bisphosphoglyceric acid; F1,6P, Fructose 1,6-bisphosphate; F6P, Fructose 6-phosphate; G6P, Glucose 6-phosphate; GAP, Glyceraldehyde 3-phosphate; PEP, Phosphoenolpyruvic acid; PG, Phosphoglyceric acid.

骨格筋におけるアセチル CoA 代謝の解析

ACC2 の遺伝的欠損による骨格筋アセチル CoA 代謝への影響を検証するため、はじめにミトコンドリア内アセチル CoA の主要な利用経路であるクエン酸回路に着目し、その代謝物と酵素活性を測定した。WT マウスと比較して、ACC2 KO マウスの骨格筋では多くのクエン酸回路代謝物についてその含量の有意な増加が認められた (図 4A)。また、クエン酸回路の律速酵素の活性を測定したところ、Citrate synthase の酵素活性について差は認められなかったが、Isocitrate dehydrogenase の酵素活性は ACC2 KO マウスにおいて有意な亢進が認められた (図 4B、4C)。

クエン酸回路に加え、CrAT を介したアセチルカルニチンの生成もまた、ミトコンドリア内アセチル CoA を基質として利用する経路として知られている。そこで、骨格筋におけるアセチルカルニチン生成について検証したところ、ACC2 KO マウスでは骨格筋のアセチルカルニチン量が有意に増加していた (図 3C)。次に、アセチル CoA からアセチルカルニチンへの変換には CrAT の比活性が特に重要であることが報告されているため (26)、骨格筋における CrAT の比活性について測定した。ACC2 KO マウスの骨格筋 Lysate では WT マウスと比較して CrAT 活性が 37% 減少していたが (図 4D)、CrAT タンパク量は 72% の減少が見られ (図 4E)、結果として CrAT の比活性は 2 倍程度の有意な増加が認められた (図 4F)。

骨格筋の CrAT を介したアセチルカルニチンの生成は、アセチルカルニチンの血中への排出に反映されるため (30)、血中のアセチルカルニチン濃度について測定した。骨格筋と同様に、ACC2 KO マウスでは血漿中アセチルカルニチン濃度についても有意な上昇が確認された (図 4G)。中鎖アシルカルニチンおよび長鎖アシルカルニチンについては、血漿中濃度の上昇は認められなかった (図 4H)。

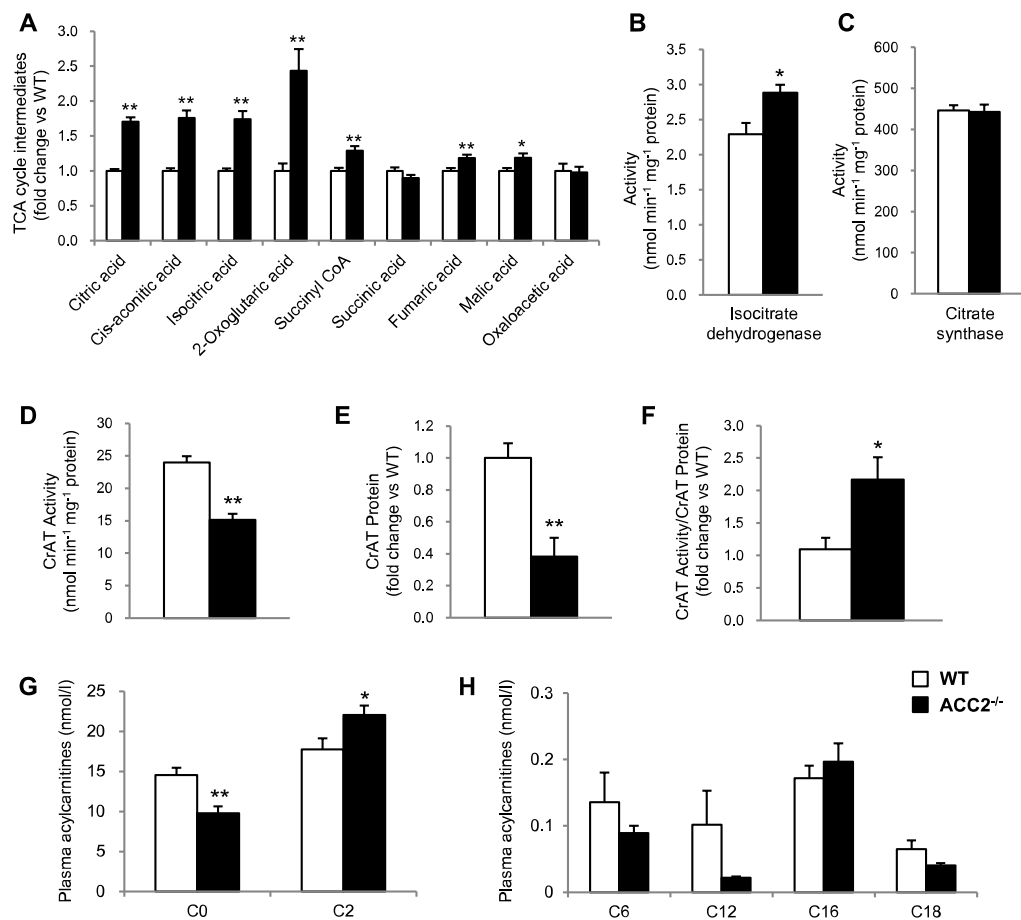


図4. 通常食条件における WT および ACC2 KO マウスの骨格筋アセチル CoA 代謝の評価

(A) 大腿筋のクエン酸回路 (TCA cycle) 代謝物量 (n = 10)。

(B, C) 大腿筋ライセートを用いたクエン酸回路の酵素活性評価。Isocitrate dehydrogenase の酵素活性 (B) および Citrate synthase の酵素活性 (C) について測定した (n = 7-10)。

(D-F) 大腿筋ライセートを用いた CrAT の酵素活性評価。ライセート中の CrAT 活性 (D) および CrAT タンパク量 (E) を測定し、CrAT の比活性 (F) を算出した (n = 7)。

(G) 血漿中のフリーカルニチン (C0) およびアセチルカルニチン (C2) 濃度 (n = 10)。

(H) 血漿中の中鎖および長鎖アシルカルニチン濃度 (n = 10)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT マウス。全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で表記した。

高脂肪食負荷時の IMCL 量およびインスリン抵抗性の評価

慢性的なエネルギー過剰状態において、ACC2 の遺伝的欠損によるエネルギー代謝への影響を検証するため、高脂肪食を長期間負荷した ACC2 KO マウスおよび WT マウスについて解析を実施した。ACC2 KO マウスでは WT マウスと比較して高脂肪食による体重増加が有意に抑制され

た (図 5A)。インスリン感受性について解析するため、体重が同程度である ACC2 KO マウスおよび WT マウスを用いて高インスリン正常血糖クランプを実施した。ACC2 KO マウスでは WT マウスと比較して正常血糖値を維持する平均 GIR 値が約 1.8 倍高く、全身のインスリン抵抗性の著しい改善が確認された (図 5B、5C)。クランプ試験における血漿中インスリン濃度は両群でほぼ同等であった (図 5D)。さらに骨格筋特異的なインスリン感受性を検証するため、骨格筋における Akt タンパクのリン酸化を評価したところ、ACC2 KO マウスでは WT マウスと比較してインスリン応答性の Akt リン酸化が 1.6 倍亢進していた (図 5E)。これらの結果から、ACC2 の遺伝的欠損による全身のインスリン抵抗性改善には、骨格筋のインスリン感受性亢進が寄与することが示唆された。

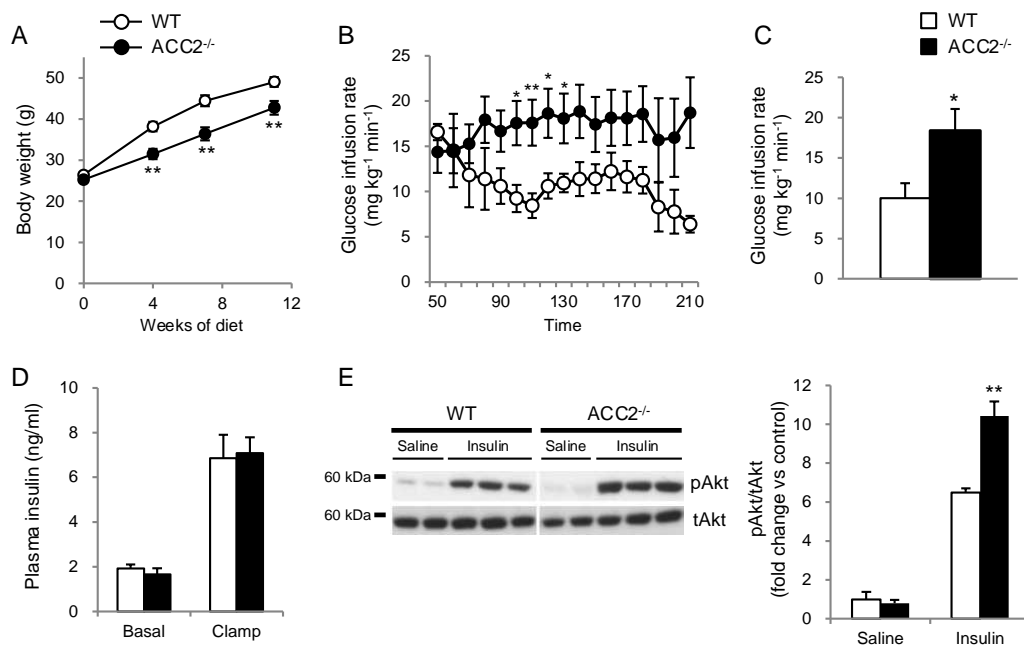


図 5. 3 ヶ月の高脂肪食負荷条件における WT および ACC2 KO マウスのインスリン抵抗性評価

(A) 高脂肪食負荷後の体重変化 (n = 7-10)。

(B-D) 高脂肪食負荷開始 3 ヶ月後に高インスリン正常血糖クランプ法を実施 (n = 6-8)。GIR の経時的な推移 (B)、正常血糖値を 40 分間維持した時の平均 GIR (C) およびクランプ法開始前後の血漿中インスリン濃度 (D)。

(E) 高脂肪食負荷開始 3 ヶ月後に、インスリンあるいは生理食塩水負荷時の大腿筋におけるリン酸化 Akt および total Akt のタンパク量をウェスタンブロットにより評価した (左図)。各バンドの発光シグナル強度をデンストメーターにより定量後、pAkt/total Akt 値を算出し、生理食塩水を負荷した WT マウスの平均値を 1 とした相対値で表した (右図) (n = 3-5)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT マウス。全てのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表記した。

高脂肪食負荷時の骨格筋代謝物解析

先行研究において、高脂肪食負荷はクエン酸回路代謝物量の低下やアセチルカルニチン生成の障害といった、アセチル CoA 代謝の異常をもたらすことが報告されている (26, 31)。そこで、次に高脂肪食負荷時の骨格筋代謝物について解析した。ACC2 KO マウスおよび WT マウスにおいて、骨格筋 IMCL 量は高脂肪食負荷により顕著に増加したが、ACC2 KO マウスでは WT マウスよりも有意に低いレベルを維持していた (図 6A)。また、ACC2 KO マウスにおいて長鎖アシルカルニチン量の有意な増加が確認された (図 6C)。さらに、通常食条件の解析と同様に、ACC2 KO マウスにおいてアセチルカルニチン量の増加 (図 6B)、アセチル CoA 量の低下 (図 6D) およびクエン酸回路代謝物量の増加が確認された (図 6E)。総じて、ACC2 KO マウスにおける高脂肪食負荷時の骨格筋代謝物プロファイルは、通常食条件の結果と同様の傾向を示した。

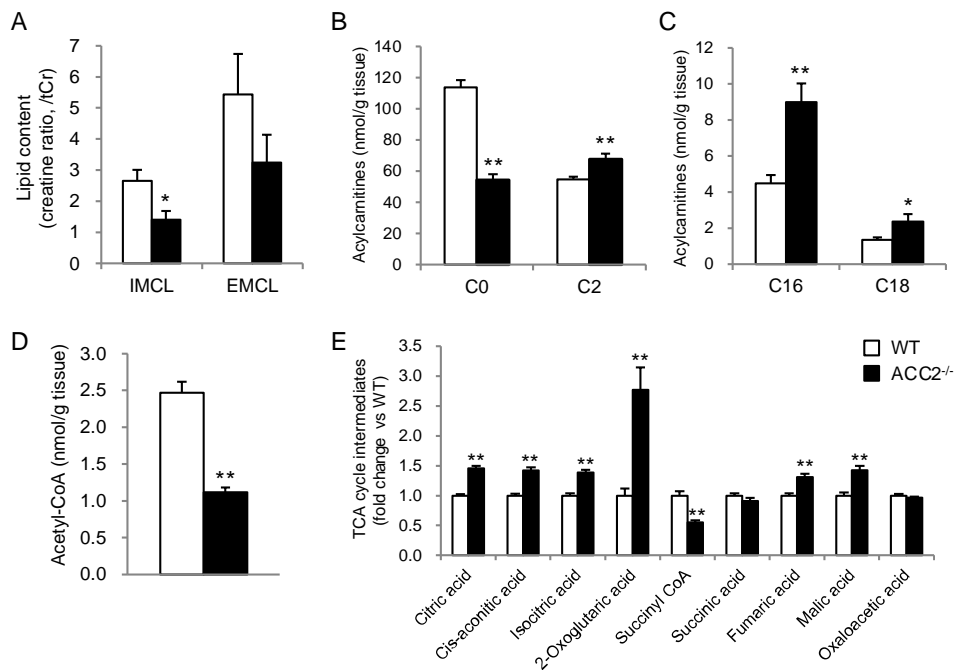


図 6. 3 ヶ月の高脂肪食負荷条件における WT および ACC2 KO マウスの骨格筋代謝物プロファイル

(A) 前脛骨筋の IMCL および EMCL レベルを ¹H-MRS により測定した。IMCL および EMCL レベルは総クレアチンに対する比として算出した (n = 5)。

(B) 大腿筋のフリーカルニチン (C0) およびアセチルカルニチン (C2) 量 (n = 10)。

(C) 大腿筋の長鎖アシルカルニチン量 (n = 10)。(D) 大腿筋のアセチル CoA 量 (n = 10)。

(E) 大腿筋のクエン酸回路 (TCA cycle) 代謝物量 (n = 10)。

*P < 0.05, **P < 0.01 vs WT マウス。全てのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表記した。

1-4. 考察

本章では、ACC2 により制御される脂肪酸酸化経路と全身および骨格筋のグルコース代謝との関連について焦点を当て、解析を実施した。ACC2 KO マウスにおいて、全身のグルコース代謝は障害されておらず、耐糖能およびインスリン応答性のグルコース利用能はむしろ亢進していた。骨格筋代謝物の解析では、ACC2 KO マウスにおいて長鎖アシルカルニチン形成の亢進および IMCL 量の低下など、脂肪酸酸化の亢進を示唆する変動が見られたが、解糖系代謝物の蓄積は見られず、グルコース代謝が抑制されていないことが示唆された。重要なことに、ACC2 KO マウスの骨格筋では、脂肪酸酸化の代謝産物でありグルコース利用抑制の原因となるアセチル CoA の量が有意に減少していた。さらに、ACC2 KO マウスの骨格筋において、ミトコンドリアのアセチル CoA プールを消費する 2 つの主要な経路であるクエン酸回路とアセチルカルニチン生成が亢進していた。以上より、ACC2 が欠損した骨格筋においては、長鎖アシル CoA のミトコンドリア脂肪酸酸化経路への流入とともに、アセチル CoA 代謝経路の亢進が生じるため、グルコース利用障害の原因となるミトコンドリア内アセチル CoA プールが蓄積せずに IMCL 量が顕著に低下することが明らかとなった (図 7)。

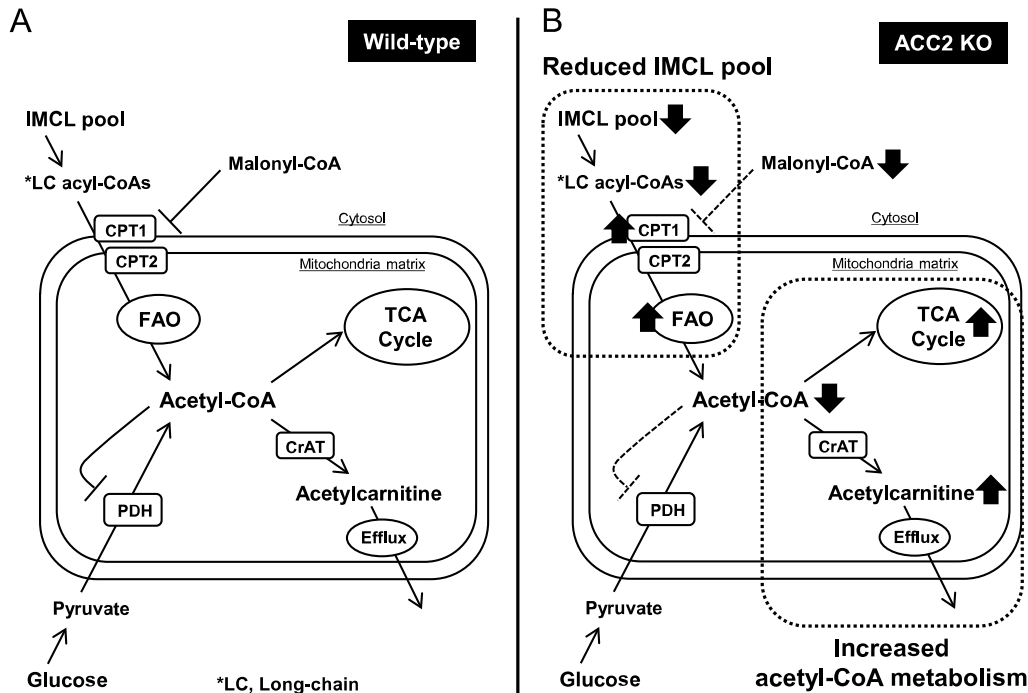


図7. ACC2 欠損による骨格筋エネルギー代謝経路の変化

(A) IMCL はミトコンドリア内脂肪酸酸化 (FAO, Fatty acid oxidation) によってアセチル CoA まで分解されるが、アセチル CoA が蓄積すると PDH 活性が阻害されグルコース代謝の抑制をもたらす。

(B) ACC2 欠損はマロニル CoA の低下による CPT1 の活性化を介して長鎖 (LC) アシル CoA のミトコンドリア内脂肪酸酸化経路への流入を増加させるため、IMCL の分解が亢進する。さらに、ACC2 欠損はクエン酸回路 (TCA cycle) およびアセチルカルニチン生成をともに活性化させるため、脂肪酸酸化の亢進状態においてもアセチル CoA の蓄積が生じない。結果として、ACC2 欠損状態において、IMCL 分解の亢進は PDH 活性およびグルコース代謝の抑制をもたらさないと考えられる。

高脂肪食負荷条件は、クエン酸回路代謝物の枯渇やアセチルカルニチン生成の障害を引き起こすことが知られており (26, 31)、脂肪酸酸化亢進とグルコース利用障害との関係がより顕在化しやすい条件である。本研究において、ACC2 遺伝的欠損時の骨格筋では、高脂肪食負荷条件においてもクエン酸回路とアセチルカルニチン生成がアセチル CoA 処理のために適切に機能し、その結果、ACC2 欠損は高脂肪食誘導性の骨格筋 IMCL 蓄積とインスリン抵抗性惹起に対し抑制的に働くことが示された。さらに、ACC2 KO マウスの骨格筋においてインスリン応答性の Akt リン酸化が亢進していたことから、ACC2 の遺伝的欠損が骨格筋グルコース代謝を障害することはなく、むしろインスリン感受性の亢進に働くことが示唆された。また、通常食および高脂肪食負

荷のいずれの条件においても、ACC2 KO マウスの骨格筋では長鎖アシルカルニチン量が顕著に増加していた。いくつかの先行研究においては、長鎖アシルカルニチンの蓄積が脂肪酸酸化の過剰な亢進とインスリン抵抗性を結びつける因子と考えられているが (32, 33)、本結果から、骨格筋の長鎖アシルカルニチン蓄積は単に脂肪酸酸化の亢進を反映する変化であり、インスリン抵抗性の惹起には直接的な影響を与えないことが示唆される。

骨格筋における脂質の過剰供給とそれに伴う脂肪酸酸化の亢進がグルコース利用への切り替えを障害しインスリン抵抗性を惹起するという知見が、過去数十年間にわたって、複数の研究により示されており、Substrate competition という概念を支持している (18, 31, 34)。これらの研究成果は、ミトコンドリアにおける脂質の供給と酸化能力の不均衡がグルコース代謝の障害に本質的に関与することを意味しており、脂肪酸酸化の亢進それ自体を否定するものではない。すなわち、脂質の供給量がミトコンドリアの酸化能力を超過した状況下では、クエン酸回路の障害やアセチル CoA の蓄積などを伴う不完全な脂肪酸酸化が生じ、グルコース代謝を障害することとなる。したがって、ミトコンドリアの酸化能力を増加せずに単にエネルギー基質の脂肪酸への切り替えを促すようなアプローチでは、グルコース代謝が改善することはなく、不完全な脂肪酸酸化とグルコース利用阻害が引き起こされると思われる。逆に、ミトコンドリア内のその下流代謝経路と連動した脂肪酸酸化であれば、その亢進により骨格筋細胞内の脂質ストレスは解消されインスリン抵抗性の減弱をもたらすと思われる (16, 35)。本研究において、ACC2 の遺伝的欠損は、骨格筋の脂肪酸酸化亢進と IMCL 減少のみならず、クエン酸回路およびアセチルカルニチン生成の活性化を伴い、アセチル CoA 量の低下をもたらすことが示された。これは、ACC2 遺伝的欠損による骨格筋脂質代謝の変動は、その下流のミトコンドリア内アセチル CoA 代謝と適切に連動しているため、グルコース代謝に支障を来すことなく IMCL 蓄積を解消することができると考えられる。

骨格筋において脂質の利用能が上昇し脂肪酸酸化が亢進した状況下では、代償的にミトコンドリアの酸化能力が上昇する可能性が示唆されている (36, 37)。また、アセチルカルニチンはミトコンドリアの代謝機能を亢進させることが報告されている (38, 39)。したがって、ACC2 の遺伝的欠損におけるミトコンドリア内代謝プロセスの亢進には、脂肪酸利用能上昇時の代償機構やア

セチルカルニチン生成の亢進が寄与している可能性が考えられる。また、興味深いことに、CrAT および CPT1 はともに Carnitine acyltransferase family に属する酵素であり、類似の触媒ドメインを有する (40)。また、最近の研究において、マロニル CoA が CPT1 活性を抑制するように、長鎖のアシル CoA が CrAT 活性を抑制し得ることが報告されている (26)。本研究において、ACC2 の遺伝的欠損は骨格筋においてマロニル CoA および長鎖アシル CoA のいずれも低下させることが確認されており、ACC2 は細胞内アシル CoA プロファイルを全体的に変化させることにより CPT1 および CrAT 活性をともに制御する因子である可能性が示唆される。ACC2 欠損状態におけるミトコンドリア機能亢進のメカニズムを解明するためには、さらなる検証が必要である。

先行研究において、Choi らは ACC2 KO マウスが高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性に対し抑制的であることを (21)、また、Glund らは ACC2 阻害剤が糖尿病モデルマウスにおいて血糖値の改善作用を示すことを (22)、それぞれ報告しており、ACC2 阻害が糖尿病の改善をもたらすことが示唆されている。しかしながら、これらの先行研究とは反して、Hoehn らや Brandon らは、ACC2 KO マウスでは全身の脂肪酸酸化の亢進が見られる一方で、グルコース代謝には有益な作用をもたらさないことを報告している (41, 42)。これら先行研究の間で ACC2 KO マウスの表現型に差異が生じた理由は明らかではないが、いずれの研究においても ACC2 阻害による脂肪酸酸化亢進と Substrate competition との関係を明確にしていない点が、ACC2 の糖尿病治療標的としての可能性を結論付けられない一因となっていた。したがって、ACC2 により制御される脂肪酸酸化経路がアセチル CoA 蓄積を抑制するメカニズムを有することを示した本研究は、ACC2 を標的とした糖尿病治療戦略の進展にとって重要な知見を提供するものと考えられる。今後、本研究の示したメカニズムが、薬理学的研究によっても支持されることが期待される。

1-5. 結論

本章において、ACC2 の遺伝的欠損は全身および骨格筋レベルのいずれにおいても、グルコース代謝と競合することなく脂質消費の亢進をもたらすことが明らかになった。また、このグルコース代謝との競合を回避するメカニズムとしては、クエン酸回路およびアセチルカルニチン生成の亢進に起因した骨格筋アセチル CoA プールの減少が考えられた。さらに、慢性的に脂質供給が過剰な条件においても、これらのミトコンドリア内アセチル CoA 代謝の亢進は維持されており、その結果、ACC2 の遺伝的欠損は高脂肪食誘導性の IMCL 蓄積とインスリン抵抗性に対し防御的に働いた。本研究の結果は、ACC2 阻害によるインスリン抵抗性改善のメカニズムを、細胞内エネルギー代謝の競合機構の回避という観点から解明した新たな知見であり、ACC2 が 2 型糖尿病治療の魅力的な標的因子であることを示す新たなエビデンスである。

【第二章：新規 ACC2 選択的阻害剤を用いた薬理的検証】

2-1. 背景

これまでに、ACC2 のエネルギー代謝における役割について研究した報告は数多くあるが、ACC2 阻害剤の抗糖尿病作用について研究した報告は少数である。A-908292 (図 8A) は、初めに代謝改善作用が論文報告された ACC2 選択的阻害剤であり、糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスにおいて血中トリグリセライドおよび血糖値の有意な低下作用を示した(43)。しかしながら、A-908292 の光学異性体であり ACC2 阻害活性がわずかである A-875400 についても同様の作用が確認されたことから、A-908292 は ACC2 阻害活性とは非依存的な代謝改善作用を有することが示唆された(43)。とりわけ、第一章および先行研究(21)において ACC2 の遺伝的欠損は血中トリグリセライド濃度の低下をもたらさなかったことから、A-908292 による血中トリグリセライドの強い低下に関しては化学構造由来のオフターゲット作用の可能性が高いと考えられる。(S)-9c (図 8B) は、薬理作用が報告されているもう一つの ACC2 選択的阻害剤であり、糖尿病モデルマウスである db/db マウスにおいて骨格筋 IMCL の低下作用と血糖値の改善作用を示した(22)。この研究結果は、ACC2 阻害が IMCL 低下さらには糖尿病態の改善をもたらすことを示唆するエビデンスである。しかしながら、(S)-9c は血中トリグリセライドの強い低下作用を有しており、また、その化学構造が A-908292 と非常に類似していることから(22, 44)、A-908292 と同様に ACC2 阻害非依存的な代謝改善作用を有する可能性が懸念される。さらに、(S)-9c と A-908292 はともに化学構造由来の中枢毒性を有することが示されている(45)。したがって、これまでに ACC2 阻害剤の抗糖尿病作用に関する検討は試みられてきたものの、ACC2 の薬理的阻害が、オフターゲットの代謝改善作用や中枢毒性とは独立して糖代謝に有益な作用をもたらすかについては、いまだ不明瞭なままである。

近年、新たな ACC2 選択的阻害剤として Compound 2e (図 8C) の創製が報告された(46)。本研究は、ACC2 の薬理的阻害が糖代謝へ与える影響を明らかにすることを目的とし、Compound 2e の毒性と標的特異性を評価した上で、上述のような明らかなオフターゲット作用の見られない

条件下において、Compound 2e の高血糖病態およびインスリン抵抗性に対する改善作用について db/db マウスを用いて検討した。

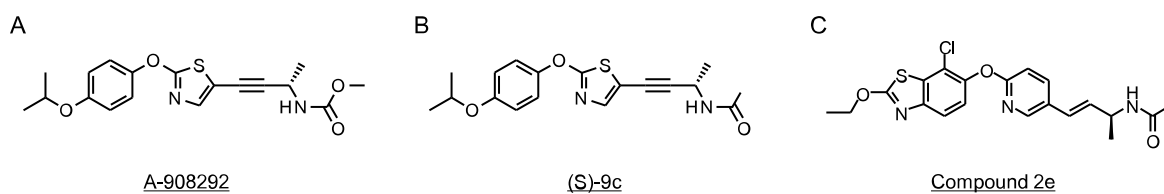


図 8. ACC2 阻害剤の化学構造

2-2. 実験方法

使用化合物

Compound 2e および A-908292 は塩野義製薬株式会社の医薬研究センターにおいて、既報 (44, 46) の手順に従い、合成した。ラット毒性試験においては、ポリエチレングリコール 400/Tween 80 (95:5 by volume) を媒体として用い、それ以外の試験においては 0.5% Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) を媒体として用いた。化合物および媒体の投薬は経口投与により実施した。

動物実験

動物実験は国際実験動物ケア評価認証協会に認証された施設内で、塩野義製薬株式会社の動物実験適正運用委員会によって承認された手順によって実施された。Sprague-Dawley ラットは Charles River Japan (Kanagawa, Japan) より購入した。db/db マウス (BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl) と db/m マウスは CLEA Japan より購入した。ACC2 KO マウスと WT マウスは第一章に記載の方法で作製されたものを使用した。すべての動物実験は雄の動物を用いて実施した。実験動物は室温 20~23°C、12 時間の明暗サイクルの条件下で個別飼育し、自由摂水および自由摂食とした。飼料は通常食とし、マウスには CE-2、ラットには CRF-1 (Charles River Japan) を用いた。

ラット毒性試験

6 週齢の Sprague-Dawley ラットを体重により 2 群に分け、Compound 2e (50 mg/kg per day) あるいは媒体を 1 日 1 回、4 日間経口投与した。一般状態の観察は 1 日 3 回 (投薬前、投薬後および正午頃) 実施した。体重および摂食量は毎日測定した。4 日間の投薬終了後、血液および組織をサンプリングし、血液学的検査、血液生化学的検査、組織病理学的検査を行った。組織病理学的検査では、主要組織のヘマトキシリン・エオジン染色標本を評価した。また、毒性試験における薬物動態パラメータの評価のため、別に用意した 6 週齢の Sprague-Dawley ラットに Compound

2e (50 mg/kg) を単回経口投与し、投与 1、3、6、8 および 24 時間後に尾静脈より採血を実施した。得られた血漿サンプルを Compound 2e 濃度の測定に供した。

マウス単回投与試験

Compound 2e の薬物動態プロファイルは、7 週齢の db/db マウスを用いて評価した。Compound 2e の経口投与 1、3、6、8、24 および 48 時間後に尾静脈より採血し、得られた血漿サンプルを Compound 2e 濃度の測定に供した。

骨格筋マロニル CoA 量は、10 週齢の db/db マウスおよび 23 週齢の ACC2 KO マウスを用いて評価した。マウスに Compound 2e あるいは媒体の経口投与と同時に絶食処置を実施、投与 6 時間後に大腿筋をサンプリングし、マロニル CoA 量の測定に供した。

骨格筋アシルカルニチン、IMCL および EMCL 量は、8 週齢の db/db マウスを用いて第一章に記載の方法により評価した。アシルカルニチン量の評価は投与 3 時間後、IMCL および EMCL 量の評価は投与 24 時間後に実施した。

トリグリセライド低下作用の評価

21 週齢の ACC2 KO マウスを体重、血糖値および血中トリグリセライド濃度をもとに 3 群に分け、Compound 2e (2.5 mg/kg)、A-908292 (15 mg/kg) あるいは媒体を 1 日 2 回、4 日間経口投与した。4 日間の投与終了後、非絶食下で尾静脈より採血し、得られた血漿サンプルを血中トリグリセライド濃度の測定に供した。

抗糖尿病作用の評価

6 週齢の db/db マウスに 0.5% HPMC を用いた馴化投与を 1 週間実施した後、7 週齢時点で体重、摂食量、血糖値および Hemoglobin A1c (HbA1c) 値をもとに群分けし、Compound 2e (1.7 mg/kg) あるいは媒体の 1 日 2 回、8 週間投与を開始した。体重および摂食量は毎日測定した。反

復投与開始 5 週から 7 週後にかけて、5 時間絶食条件（投与 5 週後）、非絶食条件（投与 6 週後）あるいは一晩絶食条件（投与 7 週後）において尾静脈より採血を実施し、得られた血漿サンプルを血中代謝パラメータの測定に供した。最終投与 18 時間後に、イソフルラン麻酔下で下大静脈より採血を実施し、その後速やかに大腿筋サンプルを採取した。得られた血漿サンプルは Compound 2e 濃度の測定に、大腿筋サンプルはマロニル CoA 量の測定に、それぞれ供した。

インスリン感受性の評価

6 週齢（高インスリン正常血糖クランプ法）あるいは 9 週齢（インスリン負荷試験）の db/db マウスに、抗糖尿病作用の評価と同様に馴化投与、群分けおよび投薬を実施した。

高インスリン正常血糖クランプ法は、6 週間の投薬後、第一章に記載の方法により実施した。なお、グルコース水溶液は 20%糖液を使用し、正常血糖値は（90~130 mg/dL）とした。

インスリン負荷試験は、7 週間の投薬後、第一章に記載の方法により実施した。なお、マウスの絶食時間は 5 時間、Humulin R 投与量は 0.8 U/kg とした。

化合物濃度測定

血漿中の Compound 2e 濃度は、API5000 および Analyst を用いて、Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis によって測定した。投与 0 から 24 時間後の Area under plasma concentration-time curve ($AUC_{0-24\text{ hour}}$)、Maximum plasma concentration (C_{max})および Trough plasma concentration ($C_{24\text{ hr}}$) は各採血ポイントにおける実測値から算出した。

血液代謝パラメータ測定

血漿中グルコース濃度、血漿中トリグリセライド濃度および HbA1c 値は日立自動分析装置 7180 を用いた酵素法により定量した。血漿中インスリン濃度はマウスインスリン ELISA キット (Shionogi) (25) により定量した。

マロニル CoA 量の測定

凍結した大腿筋サンプルにホモジナイズバッファーを添加し、ハンドヘルドホモジナイザーを用いて破碎した。ホモジナイズバッファーは蒸留水／過塩素酸／リン酸溶液（43:5:2 by volume）を用い、添加量は大腿筋サンプルの 10 倍量とした。遠心後、サンプル上清中のマロニル CoA 濃度を LC-MS/MS analysis により測定した。LC-MS/MS analysis には Waters Micromass Quattro Ultima Pt (Micromass, Manchester, UK)を用いた。

統計解析

長期反復投与試験において、群分け時の各パラメータの均一性は one-way analysis of variance によって確認した。全てのデータは平均±標準誤差（SEM）で表記した。群間の統計学的な比較には Student's t-test を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。

2-3. 結果

ラット毒性試験

ラットに Compound 2e (50 mg/kg per day) を4日間投与した際の毒性学的な所見を表1に示した。一般状態観察においては、軟便以外の異常所見は見られず、軟便については媒体投与群でも見られたことから媒体起因性のものと推察された。Compound 2eの投与は、体重および摂食量に影響を与えず、血液学的検査および組織病理学的検査においても異常は認められなかった。血液生化学的検査において、血漿中総コレステロール値に中程度の上昇が見られたが、組織病理学的検査ではこれに関連する異常所見はなく、そのほかの血液生化学パラメータは正常値であった。また、Compound 2e 50 mg/kg 投与時の C_{max} 値は 34.6 µg/ml、AUC_{0-24 hour} は 620 µg*h/ml であり、後述の薬理試験における各数値と比較して非常に高い値であった。以上より、ラット毒性試験において Compound 2e の良好な忍容性が確認された。

Parameter	Results
Body weight	No significant difference from vehicle group
Food intake	No significant difference from vehicle group
Clinical signs	No abnormalities in general appearance and behavior Loose stool was observed in both groups (1/3 rat)
Histopathology	No histopathological abnormalities
Hematology	No significant difference from vehicle group
Blood biochemical parameters	Mild increase in plasma total cholesterol (vehicle vs. compound 2e: 76 ± 7 mg/dL vs. 101 ± 3 mg/dL; p < 0.05)
Toxicokinetic parameters	
-AUC _{0-24hr} (µg*hr/mL)	620 ± 105
-C _{max} (µg/mL)	34.6 ± 5.0
-C _{24hr} (µg/mL)	17.5 ± 4.4

表1. Compound 2e のラット毒性試験

6週齢の雄の Sprague-Dawley ラットに Compound 2e (50 mg/kg/day) を4日間反復経口投与し、毒性学的パラメータを媒体投与群と比較した (n = 3)。薬物動態パラメータは Compound 2e を 50 mg/kg で単回経口投与し、評価した (n = 2)。全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で表記した。

db/db マウス単回薬理試験

はじめに db/db マウスにおいて Compound 2e の薬物動態パラメータを評価した。Compound 2e は良好かつ用量依存的な血中暴露を示し (図 9A)、5 mg/kg 投与時の Cmax 値は 3.9 µg/ml、AUC_{0-24 hour} は 74.2 µg*h/ml でありラット毒性試験と比較して 1/8 以下の低い値であった。続いて、Compound 2e の ACC2 阻害活性および脂質代謝への作用について、骨格筋において検証した。Compound 2e の 1.7 mg/kg および 5 mg/kg 単回投与により、ACC の反応生成物であるマロニル CoA 量は骨格筋において有意に低下した (図 9B)。また、Compound 2e の 2.5 mg/kg 単回投与により、脂肪酸酸化の指標となる長鎖アシルカルニチン量は骨格筋において有意に増加した (図 9C)。さらに、db/db マウスの骨格筋 IMCL 量は db/m マウスと比較して顕著に高かったが、Compound 2e の 2.5 mg/kg 単回投与により db/m マウスと同レベルまで減少した (図 9D)。これらの結果から、Compound 2e は骨格筋において ACC2 阻害に基づく脂肪酸酸化の亢進と IMCL の減少をもたらすことが示された。

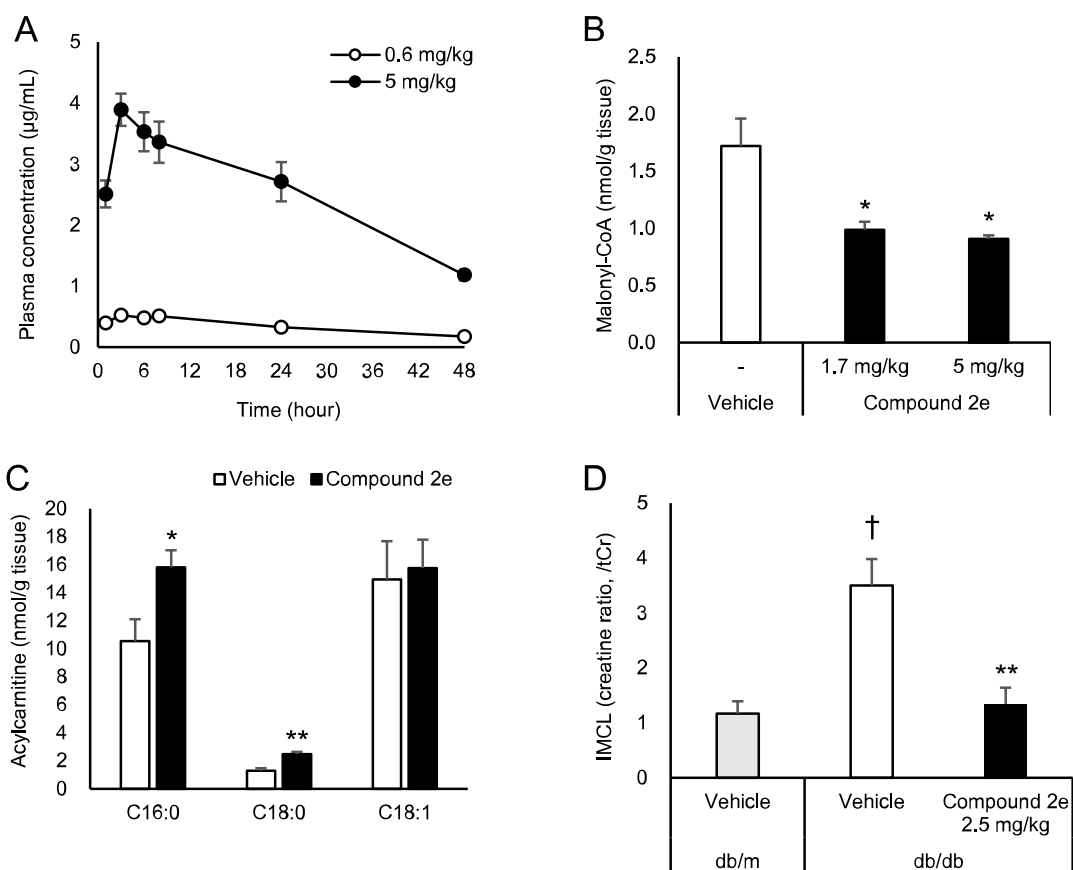


図9. db/db マウスにおける Compound 2e の薬物動態および薬理作用の評価

(A) Compound 2e 単回経口投与後の血漿中薬物濃度の経時変化 (n = 3)。

(B) Compound 2e あるいは媒体投与 6 時間後の大腿筋におけるマロニル CoA 量 (n = 4)。

(C) Compound 2e (2.5 mg/kg) あるいは媒体投与 3 時間後の大腿筋における長鎖アシルカルニチン量 (n = 6)。

(D) Compound 2e あるいは媒体投与 24 時間後の前脛骨筋の IMCL レベル。IMCL レベルは ¹H-MRS により測定し、総クレアチンに対する比として算出した (n = 4-7)。

P* < 0.05, *P* < 0.01 vs 媒体投与群、†*P* < 0.01 vs db/m マウス。全てのデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表記した。

ACC2 KO マウス特異性試験

次に、ACC2 KO マウスを用いて Compound 2e の ACC2 非依存的な薬理作用の有無について検討した。db/db マウスの結果とは対照的に、ACC2 KO マウスにおいては、Compound 2e の 2.5 mg/kg および 5 mg/kg 単回投与は骨格筋のマロニル CoA 量に有意な影響を与えなかった (図 10A)。さらに、Compound 2e が A-908292 と同様のオフターゲット作用を有するか検証するた

め、4日間反復投与による血中トリグリセライドの低下作用について評価した。既報(43)の結果と一致して、A-908292 (15 mg/kg twice daily) 投与群では明確な血中トリグリセライド濃度の低下が確認された一方で、Compound 2e (2.5 mg/kg twice daily) 投与群においては血中トリグリセライド濃度の有意な変化は認められなかった(図10B)。これらの結果から、Compound 2eは、ACC2阻害活性を有する用量域において、ACC2非依存的にトリグリセライド代謝に影響するようなオフターゲット活性を有さないことが明らかとなった。

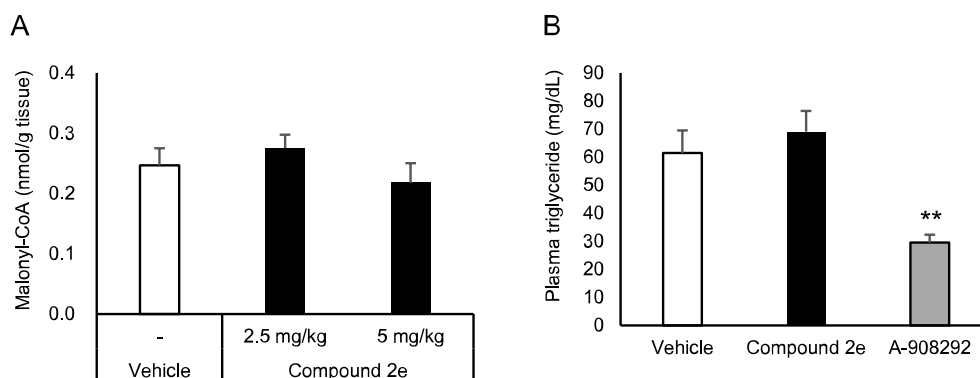


図10. ACC2 KO マウスを用いた標的特異性の評価

(A) Compound 2e あるいは媒体投与6時間後の大腿筋におけるマロニル CoA 量 (n = 5)。

(B) 血漿中トリグリセライド濃度に対するオフターゲット作用の評価。Compound 2e (2.5 mg/kg)、A-908292 (15 mg/kg) あるいは媒体を1日2回、4日間経口投与後、血漿中のトリグリセライド濃度を測定した (n = 7)。

** $P < 0.01$ vs 媒体投与群。全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で表記した。

db/db マウス抗糖尿病作用評価

Compound 2e の ACC2 阻害に基づく抗糖尿病作用を評価するため、db/db マウスにおいて Compound 2e (1.7 mg/kg twice per day) の8週間の長期反復投与試験を実施した。Compound 2e 投与群の体重は、投与開始6週間までは媒体群と同様であったが、7~8週間では媒体群と比較して有意に増加した(図11A)。摂食量は試験期間を通じて両群において有意な差は認められなかった(図11B)。媒体群と比較して、Compound 2e 投与群では投与5週後の血糖値(図11C)および投与6~7週後のHbA1c値(図11D)の有意な低下が確認された。血中のインスリン濃度については、Compound 2e 投与群で高い値を示したが、有意な変化ではなかった(図11E)。また、

Compound 2e の長期反復投与によっても、血中トリグリセライド濃度の低下は見られなかった (図 11F)。最終投与 6 時間後および 18 時間後の血中 Compound 2e 濃度はそれぞれ 1.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ラット毒性試験のトラフ血中濃度 (表 1) と比較して 1/10 以下の低い値であった。最終投与 18 時間後の骨格筋マロニル CoA 量は、Compound 2e 投与群で顕著に低かった (図 11G)。このことから、Compound 2e による ACC2 阻害作用は試験期間を通じて維持されていたことが示唆された。

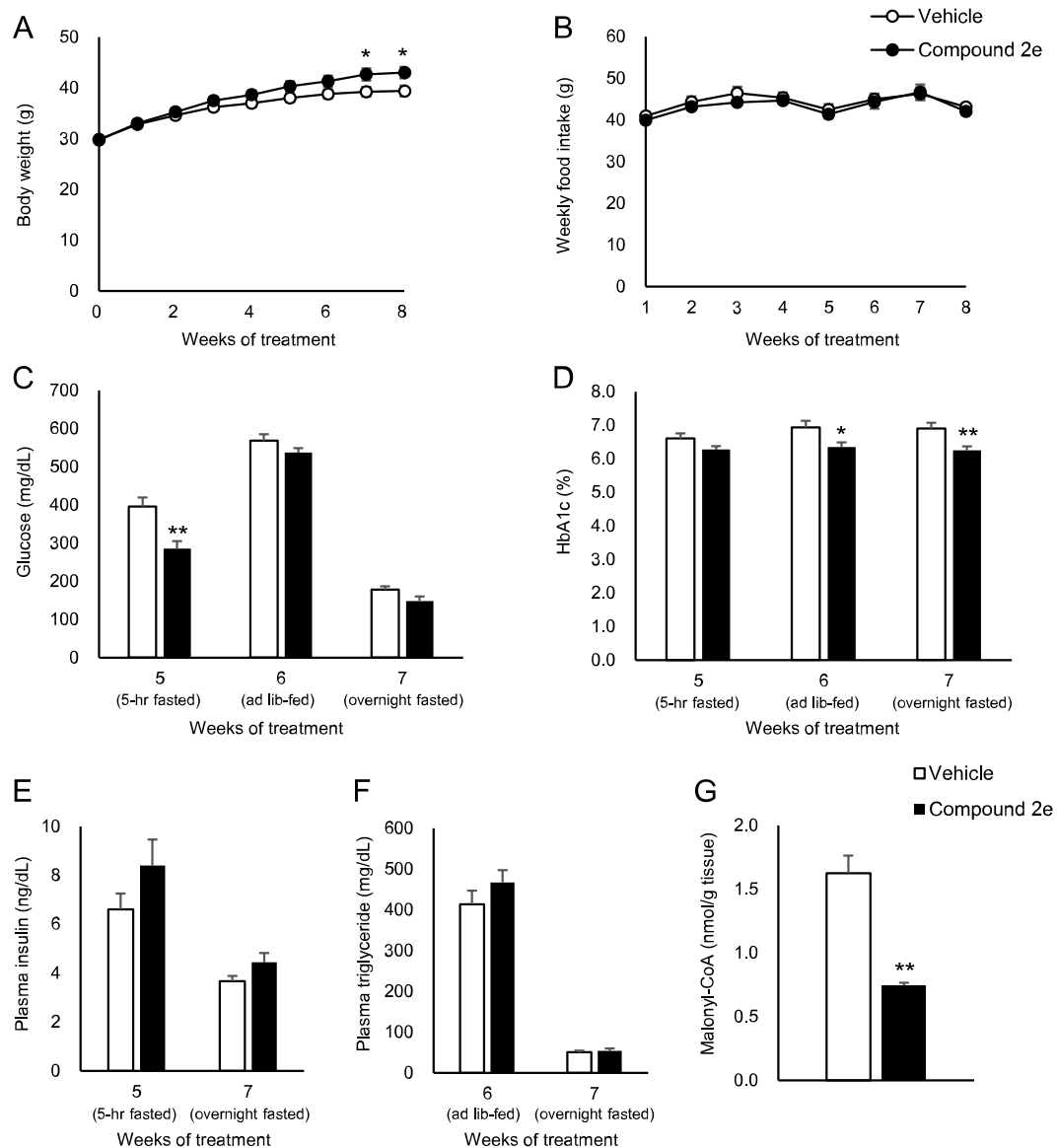


図 11. db/db マウス長期反復投与試験における Compound 2e の抗糖尿病作用

(A, B) 反復投与期間における体重推移 (A) と摂食量 (B) (n = 8-9)。

(C-F) 反復投与期間における血中代謝パラメータ。血糖値 (C)、HbA1c 値 (D)、血中インスリン濃度 (E) お

よび血中トリグリセライド濃度 (F) (n = 8-9)。

(G) Compound 2e あるいは媒体最終投与 18 時間後の大腿筋におけるマロニル CoA 量 (n = 6)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 媒体投与群。全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で表記した。

インスリン抵抗性評価

Compound 2e の抗糖尿病作用についてさらに解析するため、db/db マウスにおいて、高インスリン正常血糖クランプ試験およびインスリン負荷試験を実施し全身のインスリン抵抗性を評価した。クランプ試験において、Compound 2e の 6 週間投与群では媒体群と比較して正常血糖値を維持する平均 GIR 値が顕著に高く、全身のインスリン抵抗性の著しい改善が示された (図 12A)。同様に、インスリン負荷試験において、Compound 2e の 7 週間投与群ではインスリン応答性の血中グルコース消失が有意に亢進していた (図 12B)。これらの結果から、Compound 2e の抗糖尿病作用にはインスリン抵抗性の改善が大きく寄与していることが示唆された。

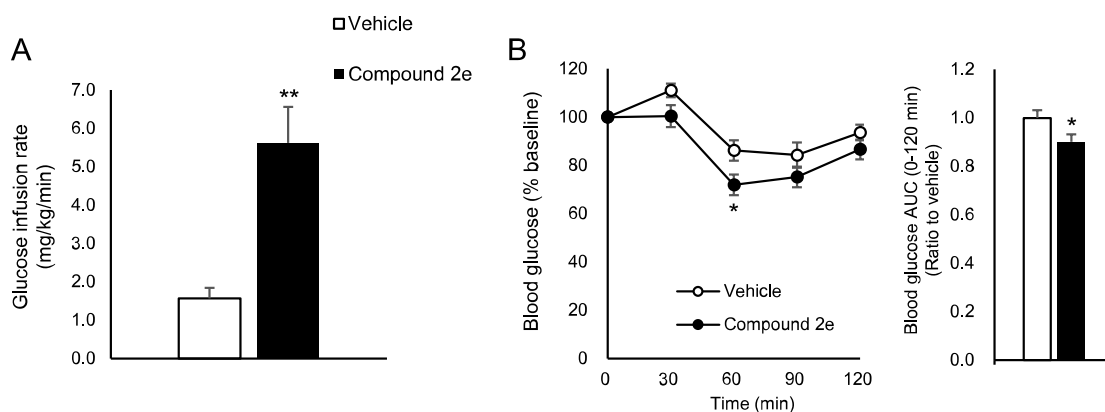


図 12. db/db マウス長期反復投与試験における Compound 2e のインスリン抵抗性改善作用

(A) 6 週間の反復投与後、高インスリン正常血糖クランプ法を実施し、正常血糖値を 40 分間維持した時の平均 GIR をインスリン感受性の指標として算出した (n = 5-7)。

(B) 7 週間の反復投与後、インスリン負荷試験を実施した。血糖値変化率の経時推移 (左図) および AUC (右図) (n = 9-10)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 媒体投与群。全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で表記した。

2-4. 考察

第一章および先行研究 (21) により ACC2 KO マウスは糖代謝改善の表現型を呈することが示されており、これらの知見は ACC2 が抗糖尿病治療の標的因子となり得ることを支持している。しかしながら、KO マウスを用いた解析は標的因子が先天的かつ完全に除去される点や遺伝子破壊のストラテジーにより表現型に違いが生じ得る点など、治療標的としての有望性を判断する上でいくつかの留意すべき点が存在する。実際、ACC2 に関しては、その遺伝的欠損が糖代謝改善をもたらさなかったという報告も存在する (41, 42)。したがって、ACC2 阻害による抗糖尿病作用を証明するためには、薬理的な研究は非常に重要である。残念ながら、既報の ACC2 阻害剤は、全身のエネルギー代謝に影響を与え得るオフターゲット作用が報告されており (43, 45)、ACC2 阻害剤の薬理作用の検証には適当ではない。本研究の目的は、新たな ACC2 阻害剤である Compound 2e を用いて、既存化合物の有するオフターゲット作用を示さない条件下で ACC2 阻害の抗糖尿病作用を検証することである。

既存化合物の有する重要なオフターゲット作用の一つは、化学構造由来の代謝改善作用であり、A-908292 を用いた過去の薬理研究により示されている (43)。血中トリグリセライドの強力な低下を特徴とするこのオフターゲット作用には、PPAR α 経路の活性化が関与することが、Abbott の研究グループにより報告されている (43)。また、もう一つの ACC2 阻害剤である (S)-9c も血中トリグリセライドの強力な低下作用を有することが示されている (22)。ここで問題となるのは、(S)-9c の化学構造は A-908292 と非常に類似しているにも関わらず、既報においては (S)-9c が ACC2 非依存的な代謝改善作用を有するかについては検討されていない点である。血中のトリグリセライドや PPAR α 経路は糖代謝に大きな影響を与えるファクターであることから (47, 48)、これら既存の ACC2 阻害剤を用いた研究は、ACC2 阻害による抗糖尿病作用の証明には不十分である。本研究において、A-908292 投与は ACC2 KO マウスにおいて血中トリグリセライドの強力な低下作用を示し、A-908292 がオフターゲット性の代謝改善作用を有することは確定的となった。重要なことに、Compound 2e は骨格筋のマロニル CoA 低下、脂肪酸酸化亢進および IMCL 低下といった ACC2 阻害に起因する薬理作用をもたらす用量において、ACC2 KO マウスの血中

トリグリセライド濃度に影響を与えなかった。この結果から、Compound 2e は、少なくとも骨格筋 ACC2 の阻害作用を示す用量においては、A-908292 と同様のオフターゲット性の代謝改善作用を有さないことが明らかとなった。さらに、db/db マウス長期反復投与試験において、Compound 2e は血糖値の改善作用を示した一方で血中トリグリセライド濃度には影響を与えなかったことから、ACC2 阻害そのものは血中トリグリセライド濃度には影響せず、トリグリセライド代謝とは独立して抗糖尿病作用をもたらすことが明らかとなった。

既存の ACC2 阻害剤のもう一つの懸念は、中枢性の毒性である。A-908292 および(s)-9c のどちらも、麻酔下のラットにおいててんかんを惹起することが報告されている (45)。さらに、このような強い毒性作用があるにも関わらず、どちらの化合物についても既報においてその毒性用量と薬効用量との関係を考察するための薬物動態プロファイルが提示されておらず、中枢毒性が薬理作用に影響し得るかどうか不明である。本研究において、Compound 2e は高用量の反復投与によっても中枢症状を含め深刻な毒性は示さなかった。それに加えて、無毒性用量よりもはるかに低い血漿中薬物濃度域において、Compound 2e による骨格筋 IMCL 低下作用や抗糖尿病作用が確認された。この結果は、毒性作用による影響を排除した条件において、ACC2 の薬理的阻害は抗糖尿病作用をもたらすことを示す結果である。

本研究の db/db マウス長期反投与試験において、Compound 2e 投与群は媒体投与群と比較して試験後半の体重が有意に高い結果となり、第一章の高脂肪食負荷条件における ACC2 KO マウスの結果と一致しない結果であった。これに関して、いくつかの先行研究において、db/db マウスの体重増加は糖尿病の進行に伴い消失し、糖尿病の治療は持続的な体重増加をもたらすことが報告されている (49, 50)。したがって、上述の試験後半に見られた体重増加は、Compound 2e 投与による糖尿病態の改善を反映した結果であると考えられる。

2-5. 結論

本章において、新たに創製された ACC2 阻害剤である Compound 2e は、db/db マウスにおいてインスリン抵抗性および高血糖状態の改善作用を示すことが明らかとなった。重要なことに、これらの Compound 2e の作用は、既存の ACC2 阻害剤で見られたオフターゲット性の中枢毒性や代謝改善作用が見られず、かつ、ACC2 阻害に起因する骨格筋代謝の変動を伴う用量域において確認された。これらの結果は、ACC2 の薬理的阻害が 2 型糖尿病の治療に有望なアプローチとなることを示す重要な知見を提供するものと考えられる。

【総括】

第一章の ACC2 KO マウスを用いた研究により、ACC2 の阻害はグルコース代謝経路を抑制せずに脂肪酸酸化を亢進するメカニズムを有し、ACC2 の遺伝的欠損は高脂肪食誘導性の骨格筋 IMCL 蓄積およびインスリン抵抗性を抑制することが明らかとなった。さらに、第二章の Compound 2e を用いた研究により、ACC2 の薬理的阻害は、遺伝的欠損と同様に、骨格筋 IMCL の低下作用および抗糖尿病作用を有することが示された。本研究結果は、ACC2 阻害に基づく脂肪酸酸化の亢進が、骨格筋 IMCL の減少とインスリン抵抗性の改善に有効であり、2 型糖尿病の新たな治療法となる可能性を示す有力なエビデンスを提供するものである。

【参考文献】

1. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 2012;**148**(5):852–871.
2. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A, Klein S. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;**106**(36):15430–15435.
3. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999;**42**(1):113–116.
4. Virkamäki A, Korshennikova E, Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, Halavaara J, Häkkinen AM, Yki-Järvinen H. Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes*. 2001;**50**(10):2337-2343.
5. Stratford S, Hoehn KL, Liu F, Summers SA. Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem*. 2004;**279**(35):36608–36615.
6. Adams II JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes*. 2004;**53**(1):25–31.
7. Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M, Zhang D, Jelenik T, Müller J, Herder C, Nowotny P, Shulman GI, Roden M. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;**111**(26):9597-9602.
8. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*. 2006;**34**(Pt 2):223–227.
9. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res*.

2009;**50**(Suppl):S138–S143.

10. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;**97**(4):1444–1449.

11. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 1997;**244**(1):1–14.

12. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol*. 1999;**277**(6 Pt 1):E1130–E1141.

13. Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;**279**(5):E1039–E1044.

14. Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes*. 2006;**55**(Suppl 2):S9–S15.

15. Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill J, McGarry JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes*. 2001;**50**(1):123–130.

16. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;**100**(26):15924–15929.

17. Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio MA, Kraegen EW. Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2009;**58**(3):550–558.

18. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in

insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963;**1**(7285):785–789.

19. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*. 1998;**14**(4):263–283.

20. Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, Ilkayeva OR, Stevens RD, Kheterpal I, Zhang J, Covington JD, Bajpeyi S, Ravussin E, Kraus W, Koves TR, Mynatt RL. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab*. 2012;**15**(5):764–777.

21. Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, Liu ZX, Kim S, Kulkarni A, Distefano A, Hwang YJ, Reznick RM, Codella R, Zhang D, Cline GW, Wakil SJ, Shulman GI. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;**104**(42):16480–16485.

22. Glund S, Schoelch C, Thomas L, Niessen HG, Stiller D, Roth GJ, Neubauer H. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase 2 enhances skeletal muscle fatty acid oxidation and improves whole-body glucose homeostasis in db/db mice. *Diabetologia*. 2012;**55**(7):2044–2053.

23. Kanki H, Suzuki H, Itohara S. High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background. *Exp Anim*. 2006;**55**(2):137–141.

24. Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*. 1995;**23**(24):5080–5081.

25. Imai S, Naito S, Takahashi T, Yamauchi A, Nakamura E, Sato M, Mitsuda Y, Takagi H, Numata Y, Fujii I, Yamane S. Development of an ultrasensitive immunoassay using affinity matured antibodies for the measurement of rodent insulin. *Anal Biochem*. 2015;**473**:72–79.

26. Seiler SE, Martin OJ, Noland RC, Slentz DH, DeBalsi KL, Ilkayeva OR, An J, Newgard CB, Koves TR, Muoio DM. Obesity and lipid stress inhibit carnitine acetyltransferase activity. *J Lipid*

Res. 2014;**55**(4):635–644.

27. Ha J, Lee JK, Kim KS, Witters LA, Kim KH. Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;**93**(21):11466–11470.
28. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem.* 1997;**272**(16):10669–10677.
29. Widmer J, Fassih KS, Schlichter SC, Wheeler KS, Crute BE, King N, Nutile-McMenemy N, Noll WW, Daniel S, Ha J, Kim KH, Witters LA. Identification of a second human acetyl-CoA carboxylase gene. *Biochem J.* 1996;**316**(Pt 3):915–922.
30. Noland RC, Koves TR, Seiler SE, Lum H, Lust RM, Ilkayeva O, Stevens RD, Hegardt FG, Muoio DM. Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J Biol Chem.* 2009;**284**(34):22840–22852.
31. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* 2008;**7**(1):45–56.
32. Liepinsh E, Makrecka-Kuka M, Makarova E, Svalbe B, Sevostjanovs E, Grinberga S, Kuka J, Dambrova M. Decreased acylcarnitine content improves insulin sensitivity in experimental mice models of insulin resistance. *Pharmacol Res.* 2016;**113**(Pt B):788–795.
33. Aguer C, McCoin CS, Knotts TA, Thrush AB, Ono-Moore K, McPherson R, Dent R, Hwang DH, Adams SH, Harper ME. Acylcarnitines: potential implications for skeletal muscle insulin resistance. *FASEB J.* 2015;**29**(1):336–345.
34. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes.* 2000;**49**(5):677–683.
35. Koves TR, Li P, An J, Akimoto T, Slentz D, Ilkayeva O, Dohm GL, Yan Z, Newgard CB, Muoio DM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic

remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem*. 2005;**280**(39):33588–33598.

36. Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS, Cooney GJ. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes*. 2007;**56**(8):2085–2092.

37. Garcia-Roves P, Huss JM, Han DH, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E, Chen M, Holloszy JO. Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;**104**(25):10709–10713.

38. Hagen TM, Liu J, Lykkesfeldt J, Wehr CM, Ingersoll RT, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames BN. Feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to old rats significantly improves metabolic function while decreasing oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;**99**(4):1870–1875.

39. Cassano P, Sciancalepore AG, Pesce V, Flück M, Hoppeler H, Calvani M, Mosconi L, Cantatore P, Gadaleta MN. Acetyl-L-carnitine feeding to unloaded rats triggers in soleus muscle the coordinated expression of genes involved in mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;**1757**(9-10):1421–1428.

40. Jogl G, Hsiao YS, Tong L. Structure and function of carnitine acyltransferases. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;**1033**(1):17–29.

41. Hoehn KL, Turner N, Swarbrick MM, Wilks D, Preston E, Phua Y, Joshi H, Furler SM, Larance M, Hegarty BD, Leslie SJ, Pickford R, Hoy AJ, Kraegen EW, James DE, Cooney GJ. Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. *Cell Metab*. 2010;**11**(1):70–76.

42. Brandon AE, Stuart E, Leslie SJ, Hoehn KL, James DE, Kraegen EW, Turner N, Cooney GJ. Minimal impact of age and housing temperature on the metabolic phenotype of *Acc2*^{-/-} mice. *J Endocrinol*. 2016;**228**(3):127–134.

43. Waring JF, Yang Y, Healan-Greenberg CH, Adler AL, Dickinson R, McNally T, Wang X,

- Weitzberg M, Xu X, Lisowski A, Warder SE, Gu YG, Zinker BA, Blomme EA, Camp HS. Gene expression analysis in rats treated with experimental acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors suggests interactions with the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;**324**(2):507–516.
44. Gu YG, Weitzberg M, Clark RF, Xu X, Li Q, Zhang T, Hansen TM, Liu G, Xin Z, Wang X, Wang R, McNally T, Zinker BA, Frevert EU, Camp HS, Beutel BA, Sham HL. Synthesis and structure-activity relationships of N-{3-[2-(4-alkoxyphenoxy)thiazol-5-yl]-1-methylprop-2-ynyl}carboxy derivatives as selective acetyl-CoA carboxylase 2 inhibitors. *J Med Chem.* 2006;**49**(13):3770-3773.
45. Gu YG, Weitzberg M, Clark RF, Xu X, Li Q, Lubbers NL, Yang Y, Beno DW, Widomski DL, Zhang T, Hansen TM, Keyes RF, Waring JF, Carroll SL, Wang X, Wang R, Healan-Greenberg CH, Blomme EA, Beutel BA, Sham HL, Camp HS. N-{3-[2-(4-alkoxyphenoxy)thiazol-5-yl]-1-methylprop-2-ynyl}carboxy derivatives as acetyl-coA carboxylase inhibitors--improvement of cardiovascular and neurological liabilities via structural modifications. *J Med Chem.* 2007;**50**(5):1078-1082.
46. Nishiura Y, Matsumura A, Kobayashi N, Shimazaki A, Sakamoto S, Kitade N, Tonomura Y, Ino A, Okuno T. Discovery of a novel olefin derivative as a highly potent and selective acetyl-CoA carboxylase 2 inhibitor with in vivo efficacy. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018;**28**(14):2498-2503.
47. Ye JM, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen EW. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes.* 2001;**50**(2):411-417.
48. Kim H, Haluzik M, Asghar Z, Yau D, Joseph JW, Fernandez AM, Reitman ML, Yakar S, Stannard B, Heron-Milhavet L, Wheeler MB, LeRoith D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes.* 2003;**52**(7):1770-1778.
49. Gibbs EM, Stock JL, McCoid SC, Stukenbrok HA, Pessin JE, Stevenson RW, Milici AJ, McNeish

JD. Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4). *J Clin Invest.* 1995;**95**(4):1512-1518.

50. Arakawa K, Ishihara T, Oku A, Nawano M, Ueta K, Kitamura K, Matsumoto M, Saito A. Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na(+)-glucose cotransporter inhibitor T-1095. *Br J Pharmacol.* 2001;**132**(2):578-586.

【略語】

ACC, Acetyl-CoA carboxylase

AUC, Area under plasma concentration-time curve

C_{24hr} , Trough plasma concentration

C_{max} , Maximum plasma concentration

CPT1, Carnitine palmitoyltransferase 1

CrAT, Carnitine acetyltransferase

EMCL, Extramyocellular lipid

GIR, Glucose infusion rate

HbA1c, Hemoglobin A1c

HPMC, Hydroxypropyl methylcellulose

IMCL, Intramyocellular lipid

KO, Knockout

LC-MS, Liquid chromatography–mass spectrometry

LC-MS/MS, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

MRS, Magnetic resonance spectroscopy

PCR, Polymerase chain reaction

PDH, Pyruvate dehydrogenase

PPAR, Peroxisome proliferator-activated receptor

WT, Wild-type

【謝辞】

本研究の発表にあたり、多大なご助力、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 池谷裕二教授に心より感謝申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、有益なご助言とご指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 關野祐子特任教授、同研究科 河野望准教授、同研究科 小山隆太准教授、同研究科 竹内春樹特任准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に関し、直接のご指導ならびにご鞭撻を賜りました塩野義製薬株式会社 雪岡日出男博士、能登谷満博士、南部宏英博士、島崎淳行博士に深く感謝致します。

最後に、本研究にご協力頂きました共著者の皆様をはじめ、塩野義製薬株式会社医薬研究本部ならびにバイオマーカー研究開発部、シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社の皆様に心よりお礼申し上げます。

本学位論文は下記の原著論文を基に作成されたものである。

Takagi H, Ikehara T, Kashiwagi Y, Hashimoto K, Nanchi I, Shimazaki A, Nambu H, Yukioka H. ACC2 deletion enhances IMCL reduction along with acetyl-CoA metabolism and improves insulin sensitivity in male mice. *Endocrinology*. 2018;**159**(8):3007–3019.

Takagi H, Tanimoto K, Shimazaki A, Tonomura Y, Momosaki S, Sakamoto S, Abe K, Notoya M, Yukioka H. A novel acetyl-CoA carboxylase 2 selective inhibitor improves whole-body insulin resistance and hyperglycemia in diabetic mice through target-dependent pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020;**372**(3):256-263.

Notice: Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.