博士論文

遺伝子欠損マウスを用いた
モノアシルグリセロールリパーゼの生理機能の解明

吉田　憲司

目　次

略語一覧.....3

要　旨.....5

第一章　　序　文.....6

第二章　　方　法.....18

第三章　　結　果.....34

第四章　　考　察.....97

第五章　　結　語.....107

参考文献.....108

謝辞.....112

略語一覧

2-AG : 2-arachidonoyl glycerol
AA : arachidonic acid
ABHD5 : α/β hydrolase domain containing 5
ABHD6 : α/β hydrolase domain containing 6
ABHD12 : α/β hydrolase domain containing 12
AEA : N-arachidonoyl ethanolamide
aP2 : adipocyte Protein 2
ATGL : adipose tissue triglyceride lipase
BAT : brown adipose tissue
CAMK II -α : calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
CB1 : cannabinoid receptor 1
CB2 : cannabinoid receptor 2
CCK : cholecystokinin
CD31 : cluster of differentiation 31
CD36 : cluster of differentiation 36
CD68 : cluster of differentiation 68
CGI-58 : comparative gene identification 58
Cpt-1b : carnitine palmitoyltransferase 1B
DAPI : 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
Δ^9-THC : delta9- Tetrahydrocannabinol
DG : diacylglycerol
DGLα : diacylglycerol lipase α
DGLβ : diacylglycerol lipase β
DHA : docosahexaenoic acid
DTT : dithiothreitol
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPA : eicosapentaenoic acid
eWAT : epididymalwhite adipose tissue
FFA : free fatty acid
GC : Gas Chromatography
GC-FID : Gas Chromatography - Flame Ionization Detector
GLP-1 : Glucagon-like peptide-1
HE : Hematoxylin-Eosin
HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HSL : hormone-sensitive lipase
i-FABP : intestinal fatty acid binding protein
iBAT : Interscapular brown adipose tissue
IL-6 : Interleukin-6
LC : Liquid Chromatography
LPL : lipoprotein lipase
Mcp-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
MG : monoacylglycerol
MGL : monoacylglycerol lipase
MS : Mass Spectrometry
NAE : N-acylethanolamine
OA : oleic acid
PCR : Polymerase Chain Reaction
PBS : Phosphate Buffer Saline
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PNPLA2 : patatin-like phospholipase domain containing 2
PYY : Peptide YY
PUFA : polyunsaturated fatty acid
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
sWAT : subcutaneous white adipose tissue
Tg : transgenic
TG : triglyderide, triacylglycerol
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α
UCP-1 : uncoupling protein-1

要　旨

本研究ではモノアシルグリセロールリパーゼ（MGL）の脂質ホメオスタシスにおける機能解明を目的として、MGL 欠損マウスの解析を行った。その結果、MGL 欠損により高脂肪食負荷による肥満が遷延することが明らかになった。そのメカニズムとして MGL が腸管の脂質吸収機構に寄与する可能性を示唆した。また MGL が迷走神経を介した腸 - 脳間の情報伝達に関与し、脂質摂取後の摂食行動に影響を与える可能性を示唆した。本研究により、MGL は摂食行動や脂肪吸収などの生理機能を担う酵素であることが明らかとなった。

第一章　　序　文

1.　　脂肪代謝におけるモノアシルグリセロールの意義

1-1.　中性脂質の構造と分類

脂質は糖質やタンパク質とともに個体にとって重要な栄養源であると同時に、生体を構成する主要な成分の一つである。脂質の構造は多様であり、その物理化学的性質や構造特性に応じて、脂質二重膜の形成、タンパク質の翻訳後修飾、エネルギー源、受容体リガンド（生理活性脂質）、ホルモン前駆体合成、皮膚バリア機能、肺サーファクタント形成など様々な生理機能を担う。

生体を構成する脂質は、炭素、水素、酸素のみから成る単純脂質、また炭素、水素、酸素に加えてリン、窒素、硫黄を含む複合脂質に分類される（図１A）。生体膜を構成するグリセロリン脂質やスフィンゴリン脂質は複合脂質であり、中性脂肪や脂肪酸は単純脂質に分類され、生体内では主にエネルギーの貯蔵を担っている。

中性脂肪はグリセロールの脂肪酸エステル（アシルグリセロール）であり、モノアシルグリセロール（monoacylglycerol、MG）、ジアシルグリセロール（diacylglycerol、DG）およびトリアシルグリセロール（triacylglycerol、TG）の総称である（図１B）。生体内の中性脂肪の大部分を占める TG は主にエネルギーの貯蔵物質として機能するが、DG は細胞内情報伝達物質として細胞機能に必須であり、2-アラキドノイルグリセロール（2-AG、後述）に代表される特定の MG 分子種は細胞間情報伝達物質（脂

質メディエーター）としての役割も知られている。

1-2. 中性脂肪の消化と吸収

食事により摂取された TG は小腸内で胆汁酸によるミセル化を受ける。ミセル化は油-水界面面積を増大させ、膵臓リパーゼによる加水分解を受けやすい状態を作り出す。膵臓リパーゼは TG の *sn*-1 位と *sn*-3 位を加水分解し、1 分子の 2-MG（*sn*-2 位に脂肪酸を持つ MG）と 2 分子の脂肪酸を生成する（図２）。生成された 2-MG と脂肪酸は複合ミセルを形成して小腸上皮細胞の微絨毛表面まで運搬され、脂肪酸は CD36（脂肪酸輸送タンパク質）への結合を介して、2-MG は受動拡散により消化管内腔から小腸上皮細胞に吸収される。吸収された 2-MG と脂肪酸は小腸上皮細胞の小胞体膜に発現する MGAT2（monoacylglyceol acyltransferase 2、モノアシルグリセロールアシル転移酵素 2）および DGAT1（diacylglyceol acyltransferase 1、ジアシルグリセロールアシル転移酵素 1）により再アシル化され、TG として再構築される。MGAT2 および DGAT1 の遺伝子欠損マウスでは消化管の内腔から血中への脂質の移行が抑制されており、高脂肪食を与えても肥満を起こしにくいことが報告されている[1, 2]。小腸上皮細胞で合成された TG はリポタンパク質に組み込まれ、キロミクロンとして腸管組織のリンパ管を経て血中へと移行する。循環血中に移行したキロミクロン中の TG は血管内皮細胞表面に発現するリポタンパク質リパーゼ（lipoprotein lipase、LPL）により、

加水分解を受け、生じた遊離脂肪酸は脂肪や筋肉、肝臓などの組織へと分配され、脂肪組織は余剰の脂肪酸を TG に再合成して蓄積する。

1-3. 脂肪動員と関連酵素

飢餓時や運動時などエネルギー不足に陥ると、脂肪細胞に蓄えられた TG は脂質分解酵素（lipase、リパーゼ）による加水分解を受け（脂肪分解）、脂肪酸とグリセロールとなり血中へと放出される。この現象を脂肪動員と呼び、放出された脂肪酸は筋肉や肝臓へと分配されβ酸化によりエネルギーとして利用される。

脂肪組織における脂肪分解活性が発見されたのは 1932 年であるが、アドレナリン刺激に反応する HSL（hormone-sensitive lipase、ホルモン感受性リパーゼ）が同定される 1964 年まで酵素の実態は不明なままであった[3]。それから間もなく 2 つ目の脂肪分解酵素、モノアシルグリセロールリパーゼ（MGL）がラット脂肪組織より見つかった[4]。HSL の cDNA クローニングは 1988 年に報告され[5]、*in vitro* で TG、DG 分解活性を有することが確認されたが、HSL 欠損マウスの白色脂肪組織において TG 加水分解活性が残存することや HSL 欠損マウスの各種臓器において DG の蓄積が見られること[6]、HSL の DG 分解活性は TG や MG に対する分解活性に比べ 5-10 倍強いことなどから[7]、HSL が主として DG 分解酵素であることと共に、他の TG 分解酵素の存在も示唆された。その後に TG 分解酵素として発見された ATGL（adipose triglyceride

lipase）[8]は主に白色脂肪組織や褐色脂肪組織に発現しており、骨格筋や心筋にも発現が見られる。ATGL は HSL と異なりβ受容体刺激や PKA 依存的なリン酸化による活性化を受けないが、CGI-58（ABHD5）という活性化補助因子の存在が知られている[9]。ATGL の遺伝子欠損マウスを用いた解析から、脂肪組織における TG 分解の律速酵素が HSL ではなく ATGL であることが明らかとなった[10]。ATGL 欠損マウスは脂肪動員が顕著に低下しており、寒冷刺激や絶食に対して脆弱であった。現在 ATGL および HSL は脂肪動員においてそれぞれ TG および DG の分解を担う酵素であると考えられている[10]。

脂肪の消化吸収の場合と異なり、脂肪動員においては TG は完全に分解され、その最終段階は MG の分解である。ATGL や HSL の脂肪動員における重要性はこれまで示されてきたが、MG 分解活性についてはその重要性は明確に示されていない。

1-4. 脂肪動員とエネルギー代謝

脂肪組織には大きく分けて白色脂肪組織と褐色脂肪組織がある。白色脂肪組織（white adipose tissue、WAT）は主に皮下や内臓周囲に存在し、過剰なエネルギーを脂肪滴と呼ばれる大きな構造器官に蓄積させている。褐色脂肪組織（brown adipose tissue、BAT）はげっ歯類では頸部、肩甲骨周辺などに存在し、エネルギー消費や熱産生に寄与する。褐色脂肪細胞はミトコンドリアに富み、脂肪滴を擁するが白色脂肪細胞と異

なり小さい。これら性質の異なる脂肪組織の機能は全身性のエネルギー代謝に寄与しており、肥満症など代謝疾患に影響を与えることが知られている。

白色脂肪細胞は 1 細胞に 1 つの巨大な脂肪滴を持ち、細胞核は辺縁に押しやられ偏在している。この脂肪滴の中心には TG を主とする中性脂質（アシルグリセロール）が集積しており、その周りをリン脂質が一重膜で覆った構造を持つ（図３A）。さらに脂肪滴表面はペリリピンなどのタンパク質が覆っている。飢餓や運動時など生体がエネルギー不足に陥ると、脂肪滴に含まれるアシルグリセロールを加水分解し、血中に脂肪酸を放出させる（脂肪動員）。脂肪組織に存在するいくつかのリパーゼはこの時の脂肪分解に寄与する（図３B）。MGL はこの脂肪滴の分解の際に生じてくる MG を分解し、脂肪動員に寄与する可能性はあるが、現在までに直接的な証拠はない。

白色脂肪組織が脂肪の貯蔵およびエネルギーの供給源として機能しているのに対し、褐色脂肪組織は代謝的熱産生に寄与しており、寒冷環境下の体温維持や肥満の進行にも深い関わりがある。特に褐色脂肪組織に存在するミトコンドリアの内膜には UCP-1（uncoupling protein 1）が豊富に発現しており、熱産生機構に関わる。通常、解糖系やクエン酸回路から得られるエネルギーはいったんミトコンドリア膜を介したプロトン濃度勾配として保存される。ミトコンドリアではこのプロトン濃度勾配のエネルギーを利用し ATP 合成が行われる（酸化的リン酸化）。UCP-1 はミトコンドリアにおいて酸化的リン酸化を脱共役させる特殊なトランスポーターであり、プロトン勾

配を解消することで ATP へと変換されるはずのエネルギーを直接熱へと変換される経路へと導く（酸化的リン酸化の脱共役）。

寒冷刺激などの交感神経の活性化は褐色脂肪細胞表面に発現するβ3 受容体の活性化を促す。褐色脂肪細胞でのβ3 受容体刺激は転写を介して UCP-1 の発現上昇を引き起こすことが知られている。さらに褐色脂肪細胞においても脂肪分解により脂肪酸が生じる。この脂肪酸はエネルギー源となるだけでなく UCP-1 に直接作用し、プロトンのミトコンドリア内への流入を促進する。同時に白色脂肪組織においても脂肪分解が起こり、血中へと遊離脂肪酸の放出が増大する。脂肪分解によって生じた脂肪酸は褐色脂肪組織に分配されることで全身性のエネルギー代謝の亢進が生じる。

このように二つの異なる性質の脂肪組織が担う脂肪動員とエネルギー代謝は肥満の進行に関わる可能性がある。

1-5. MGL の酵素学的および生化学的特徴

MGL 活性はラット脂肪組織において TG や DG を分解する酵素活性とは独立の活性として報告された[11]。この活性は *in vitro* において DTT や EDTA では阻害されず、至適 pH は 8.0 であった[12, 13]。MGL の cDNA クローニングは 1997 年にマウス脂肪組織 cDNA を用いて行われ、302 アミノ酸残基から構成される 33kDa のタンパク質であることが明らかとなった[14]。MGL は酵素活性中心に serine hydrolase ファミリーに

特徴的な GXSXG モチーフを有する[14]。MGL はマウス - ヒト間において非常に高い相同性を持っている（84%）。また部位特異的変異導入法により Ser^{122}、Asp^{239}、His^{269} の 3 つのアミノ酸残基が MGL の酵素活性に必要であることが分かっている。Ser^{122} は GXSXG モチーフに存在し、Asp^{239}、His^{269} は活性中心において Ser^{122} と非常に近い位置に存在している。MGL は DG や TG を基質とせず、MG であれば脂肪酸の種類を問わず基質とするが（図４）、*in vitro* の酵素学的解析からは、不飽和度が高い脂肪酸および、長鎖に比べて中鎖の脂肪酸を有する MG に対して若干の基質選択性があると報告されている。グリセロール骨格に対する脂肪酸エステルの位置は酵素活性に影響せず、1-MG、2-MG 位を同様に代謝する[15]。MGL は一次構造上、膜貫通ドメインを持たず細胞質型の酵素であると考えらるが、酵素活性は膜画分に比較的強く検出される[16]。MGL は大きな疎水性のαヘリックス構造を持っており、この疎水性ドメインで脂質二重膜と相互作用し、表在性タンパク質としての局在を示すことが報告されている[17]。実際、MGL を過剰発現した細胞を免疫染色によって局在を調べると、細胞質とともに細胞膜内側に MGL の局在が認められる[18]。また結晶構造解析や部位特異的変異導入法より、Leu^{167}、Leu^{169}、Leu^{171}、Leu^{174}、Leu^{176} が細胞膜への疎水性相互作用に寄与していると報告されており[19]、MGL は細胞質および細胞膜のどちらにも局在することができると考えられる。

2. 2-アラキドノイルグリセロール（2-AG）の生理機能

2-1. エンドカンナビノイド

大麻草（*cannabis sativa*）の加工品であるマリファナには様々な薬理作用があり、古くから医療品や嗜好品として用いられてきた。大麻草に含まれる化学物質の総称をカンナビノイドといい、代表例の一つである Δ^9-テトラヒドロカンナビノール（Δ^9-THC）は幻覚、高揚感などの精神作用を引き起こす。Δ9-THC はこの他にも体温低下、鎮痛、除脈、免疫抑制といった生理反応も引き起こす。カンナビノイドの生体内における作用メカニズムは不明であったが、1988 年に ^{3}H で放射ラベルした合成カンナビノイド、[^{3}H]-CP55940 を用いたラット脳での結合実験により、受容体を介した反応であることが示唆された[20]。さらにこのカンナビノイド受容体は 1990 年に CB1 受容体（カンナビノイド受容体 1）が[21]、1993 年に CB2 受容体（カンナビノイド受容体 2）が[22]クローニングされ、カンナビノイドの作用点として認知されるようになった。

カンナビノイド受容体のクローニングにより、これらの受容体に対する内因性リガンドの探索が始められた。最初に同定されたのが N-arachidonylethanolamide（アナンダミド、AEA）である[23]。ブタの脳より単離されたアナンダミドはカンナビノイド受容体に対して Δ9-THC と同程度の結合能を示し、マウス輸精管の収縮反応を濃度依存的に引き起こした。3 年後の 1995 年にはラットの脳[24]、イヌの小腸[25]より、ほぼ同時に 2-arachidonyl glyderol（2-AG）が内因性リガンドとして同定された。2-AG は

CB1 受容体に対してアナンダミドよりも高い親和性を有しており[24]、より強いアゴニスト作用を持つと考えられている。

2-2. 2-AG の生合成および分解

2-AG の生合成経路は神経系においてよく研究されている。シナプス後部ニューロンがグルタミン酸などの神経伝達物質によって刺激を受けると、Gq タンパク質やホスホリパーゼ C の活性化によりイノシトールリン脂質の代謝回転が起こり、アラキドン酸を *sn*-2 位に有する DG が産生される。この DG がジアシルグリセロールリパーゼ（DGL）により *sn*-1 位の加水分解を受け、2-AG を生じる。DGL には DGLαと DGLβの 2 つのサブタイプが知られているが[26]、近年遺伝子欠損マウスを用いた研究より、少なくとも脳神経系においては DGLαが 2-AG 産生を担うことが分かっている[27]。

2-AG は CB1 受容体に作用した後、MGL により分解を受ける。脳においては 2-AG 分解活性の約 85%を MGL が担い、残りの活性は ABHD6 と ABHD12 が担うと報告されている[16]。MGL 欠損マウスの脳では 2-AG が野生型マウスの 10 倍程度蓄積がみられる[28-30]。マウスに MGL 特異的阻害剤を投与すると、2-AG 分解が阻害されることで CB1 受容体情報伝達系が活性化されるという報告がある[31-33]。これらの報告より、MGL は少なくとも脳においては 2-AG 量の調節を介してカンナビノイドの生理機能に関わる酵素であることが考えられる。

MGL 欠損マウスの脳では分解されずに蓄積した 2-AG が CB1 受容体を恒常的に活性化させると考えられる。しかし、実際は MGL 欠損マウスの脳では CB1 受容体の脱感作のために CB1 受容体アゴニストによる作用が生じにくいと報告されており、またこの脱感作は MGL 特異的阻害剤である JZL184 の慢性処置によっても引き起こされる[28]。このように、MGL を欠損すると脳において 2-AG が蓄積するが、CB1 受容体の恒常的な活性化は生じず、むしろ CB1 受容体情報伝達系が抑制された状態となる可能性が指摘されている。

2-3. CB1 受容体と高脂肪食誘導性肥満

CB1 受容体欠損マウスは通常食での飼育時において、野生型マウスよりも低体重を示す[34]。また、高脂肪食負荷による肥満もきたしにくい[35]。これまで CB1 受容体インバースアゴニストである SR141617（Rimonabant）投与により摂餌量の顕著な減少および体重減少が見られていたことから[36]、CB1 受容体情報伝達系の抑制は主に食欲減退を引き起こすと考えられた。しかし、神経特異的な CB1 受容体欠損マウスは全身性の CB1 受容体欠損マウスよりも抗肥満効果が低いこと[35]、CB1 受容体インバースアゴニストによる摂食抑制の効果は一過性であったにもかかわらず抗肥満効果が持続することから[36]、中枢性の摂食行動の制御以外にも作用メカニズムが存在する可能性も示唆されていた。CB1 受容体の末梢臓器における発現は低いが、例えば、

肝臓特異的なCB1受容体欠損マウスは高脂肪食負荷による体重増加および脂肪肝が抑制され、2型糖尿病症状が緩和されたという報告[37]や、血液脳関門を通過できないCB1受容体アンタゴニストによる肥満進行の抑制効果やレプチン抵抗性の改善効果に関する報告がある[38, 39]。従って、CB1受容体の機能は中枢における食欲調節機構が主である[40]と考えられるが、肝臓や脂肪組織などの脂質代謝臓器における役割も考慮に入れる必要がある。

3. MGLとメタボリックシンドローム

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に加え高血糖、高血圧、脂質異常症のうちいずれか二つ以上を併せ持った状態であり、動脈硬化など心血管疾患発症頻度を高める要因の一つである。メタボリックシンドロームの根底に位置する内蔵脂肪型肥満が生じると、肥大化した脂肪細胞から多量の遊離脂肪酸が放出され、脂肪組織中の慢性炎症や糖代謝異常への引き金となる。そのため、TGの分解と再合成を担う代謝酵素の働きは脂質ホメオスタシス維持のために重要であり、その機能異常はメタボリックシンドロームの発症や増悪に関係すると考えられる（図５）。MGLはATGLやHSLと共に脂質代謝の盛んな臓器に発現しており、肥満および代謝性疾患に関わる可能性のある酵素である。

最近、MGL欠損マウスに高脂肪食負荷を与え、メタボリックシンドロームへの関

与を示唆する報告がなされた。Taschler らは MGL 欠損マウスに通常食および高脂肪食を与えて、体重、摂餌量、酸素消費量、活動性を比較したが、いずれも野生型マウスとの間に差を認められなかった。しかし、高脂肪食負荷時の耐糖能を評価すると、インスリン性抵抗試験およびグルコース耐性試験の両試験において MGL 欠損マウスでは改善傾向が見られた[30]。一方で、Chanda らは MGL 欠損マウスの体重は通常飼育条件下において低体重を観察しており[29]、MGL 欠損マウスの体重やエネルギー代謝についての一定の見解は得られていない。また既に述べたように、MGL 欠損マウスの脳では 2-AG の蓄積により CB1 受容体の脱感作が生じており、CB1 受容体情報伝達系を含めた詳細な表現型解析は重要であると考えられるが、これまでに肥満やエネルギー代謝の分野でそのような解析はなされていない。

本研究の目的

先行研究により MGL が脳において CB1 受容体情報伝達系を制御すること、また MGL は生体内の MG 分解を担う主要酵素であることが分かってきた。しかし脂肪組織を始めとする脂質代謝臓器における MGL の生理機能や MGL の全身性エネルギー代謝への寄与は分かっていない。本研究では脂質ホメオスタシスにおける MGL の生理機能の解明を目的とし、MGL 欠損マウスを用いて高脂肪食誘導性肥満モデルによる解析を行った。

第二章　　方　法

実験動物

実験に使用したマウスは 8:00AM-8:00PM を明期とした明暗サイクル、22℃の室温下で飼育し、餌（MF；オリエンタル酵母）および水は自由摂取できる状態とした。MGL 欠損マウスは﨑村建司教授、狩野方伸教授らによって作製されたもの[41]を C57BL/6N マウスに 10 回以上戻し交配したものを用いた。CB1 受容体欠損マウスは Andreas Zimmer 教授らによって作成され、C57BL/6J マウスに 10 回以上戻し交配したもの[42]を狩野方伸教授らより供与を受け、これを用いた。これらのマウス系統を用いた実験では、ヘテロ欠損マウス同士の交配によって得られた野生型マウスおよび遺伝子欠損マウスを使用した。CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスの作出は CB1 受容体欠損マウスと MGL 欠損マウスの交配により行った。まず、CB1 受容体欠損マウスと MGL 欠損マウスを交配し、CB1 受容体ヘテロ欠損／MGL ヘテロ欠損マウスを得、このマウスをさらに CB1 受容体欠損マウスと交配し、CB1 受容体ホモ欠損／MGL ヘテロ欠損マウスを得た。CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスの系統を用いた実験では、CB1 受容体ホモ欠損／MGL ヘテロ欠損マウス同士を交配することで得られる CB1 受容体欠損マウスと CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスを使用した。全ての動物実験は医学系研究科動物実験委員会の承認のもと、東京大学動物実験実施規則に従って実施した（医‐P13－027）。

試薬および抗体

脂質標準品のうち、arachidonic acid（AA）、eicosapentaenoic acid（EPA）、docosahexaenoic acid（DHA）、18:2 MG、2-arachidonoyl glycerol（2-AG）、N-palmitoyl ethanolamide（PEA）、N-oleoyl ethanolamide（OEA）、N-arachidonoyl ethanolamide（AEA）、AA-d8、EPA-d5、DHA-d5、2-AG-d8、38:4 DG-d8、PEA-d4、OEA-d4、AEA-d8 は Cayman Chemical 社より、16:0 MG、17:0 MG、18:1 MG、32:0 DG、34:1 DG、36:2 DG、38:4 DG は Avanti Polar Lipids 社より、23:0 FFA、oleic acid は Sigma 社より購入した。

JZL184、(-)-CP55940 は Cayman Chemical 社より購入した。オリーブオイル、tyloxapol、CL-316,243、 BSA（Albumin from bovine serum、A6003）は Sigma 社より購入した。

ラビット抗 MGL ポリクローナル抗体（MGL-Rb-Af200）は Frontier Science より、ラット抗 CD31 モノクローナル抗体（550274）は BD Pharmingen より、ハムスター抗 podoplanin モノクローナル抗体（11-033）は Angiobio 社より購入した。

Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体（A-11034）、Alexa Fluor 546 標識抗ラット IgG 抗体（A-11081）、Alexa Fluor 546 標識抗ハムスターIgG 抗体（A-21111）は Life Technologies 社より購入した。

PBS はナカライテスクより購入した。

その他の試薬類は、特に記載しない限り和光純薬工業（WAKO）より購入した。

マウス組織からの総脂質抽出

マウスを安楽死させた後、各臓器を採取、重量を計測した後、直ちに液体窒素により凍結させた。各臓器は脂質抽出するまで-80℃で保存した。

脂質抽出を始める際は、まず凍結したまま臓器重量を測定した後、2 mL チューブに移し換えて粉砕用クラッシャー（SK-100-D、TOKKEN）を加えて直ちに液体窒素により冷却した。十分に凍結した状態でサンプルの入ったチューブを自動粉砕機装置（TK-AM5-B、TOKKEN）にセットし、1500 rpm で 20 秒間破砕を行った。破砕後は直ちに液体窒素により冷却を行った。

LC-MS による定量分析をする場合は、内部標準物質（AA-d8（1 μg/mL）、EPA-d5（100 ng/mL）、DHA-d5（1 μg/mL）、23:0 FFA（50 μg/mL）、17:0 MG（1 μg/mL）、2-AG-d8（100 ng/mL）、38:4 DG-d8（1 μg/mL）、AEA-d8（100 ng/mL）、OEA-d4（10 ng/mL）、PEA-d4（10 ng/mL））を含むメタノール 1 mL をサンプルの入ったチューブに加え、ローテーター（RT-5、TAITEC）を用いて 4℃で 1 時間抽出を行った。その後クラッシャーを取り去り、得られた懸濁液に対してさらにクロロホルム 1.25 mL、PBS 1 mL を加えてボルテックスした。室温で 10 分間静置した後、クロロホルム 1.25 mL、PBS 1.25 mL を加えてボルテックスし、室温で 3000 rpm、15 分間遠心した。有機溶媒相（下相）を回収し、遠心減圧エバポレーターにより溶媒除去することで総脂質を採取した

（Bligh & Dyer 法[43]）。

総脂質からの目的脂質の粗精製

Bligh & Dyer 法で得られた脂質をクロロホルム : メタノール（1/2, v/v）で再懸濁し、全量の 1/2 をモノアシルグリセロール（MG）、ジアシルグリセロール（DG）、遊離脂肪酸（FFA）の中性脂質の解析、1/10 をリン脂質の解析に用いるため取り分けて遠心減圧エバポレーターにより溶媒を除去した。

中性脂質の解析を行うサンプルは 1mL メタノールに再懸濁し、ソニケーションによりよく溶解させた後に 3 倍量の 0.03%ギ酸水と混合し、メタノールによりコンディショニングした Oasis HLB カートリッジ（10 mg、1 mL、waters）にロードした。その後、0.03%ギ酸水 3 mL、15%エタノールを含む 0.03%ギ酸水 3 mL、石油エーテル 3 mL で洗浄し、200 μL のアセトニトリルにより溶出させた。この溶出液を LC-MS/MS により解析した。

リン脂質の解析を行うサンプルは 1mL メタノールに再懸濁し、室温で 15000 rpm、10 分間遠心した上清を LC-MS/MS により解析した。

液体クロマトグラフィータンデム型質量分析およびによる各脂質の定量

MG、DG、FFA の定量分析には、高速液体クロマトグラフ質量分析計である

LCMS-8040（Shimadzu）を使用した。HPLC による分離には ACQUITY UPLC BEH C8 カラム（1.7 μm、2.1 x 50 mm、Waters）を使用した。移動相には 20 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液（Solvent A）、アセトニトリル（Solvent B）、イソプロパノール（Solvent C）を用い、流速を 0.4 mL/min、カラム温度 40℃でグラジエント分析を行った。グラジエントプログラム［分析時間（%A / %B / %C）］は以下の通りである；0 分（60% / 40 % / 0%）－10 分（5% / 95 % / 0%）－15 分（5% / 95 % / 0%）－15 分（0% / 5 % / 95%）－20 分（0% / 5 % / 95%）－20 分（60% / 40 % / 0%）－23 分（60% / 40 % / 0%）。サンプルの注入量は 5 μL とし、選択反応モニタリング（Selected-Reaction Monitoring ；SRM）分析は図 7 に記述したコリジョンエネルギーおよびトランジションで行った。また各脂質のカラム保持時間の確認および定量のための検量線の作成にはそれぞれの脂質の標準品を用いた。定量は絶対検量線法で行い、内部標準試料として用いた 17:0 MG、2-AG-d8、38:4 DG-d8、AA-d8、EPA-d5、DHA-d5 は組織重量当たりの値を算出するために使用した。

リン脂質の定量分析については、高速液体クロマトグラフ三連四重極型質量分析計である LCMS-8040（Shimadzu）を使用した。HPLC による分離には ACQUITY UPLC BEH C8 カラム（1.7 μm、2.1 x 100 mm、Waters）を使用した。移動相に 5 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液（Solvent A）、アセトニトリル（Solvent B）、イソプロパノール（Solvent C）を用い、流速を 0.35 mL/min、カラム温度 47℃でグラジエント分析を行

った。グラジエントプログラム［分析時間（%A / %B / %C)］は以下の通りである；0分（75% / 20 % / 5%）－20 分（20% / 75 % / 5%）－40 分（20% / 5 % / 75%）－45 分（5% / 5 % / 90%）－50 分（5% / 5 % / 90%）－50 分（75% / 20 % / 5%）－55 分（75% / 20 % / 5%)。サンプルの注入量は 5 μL とした。選択反応モニタリング（Selected-Reaction Monitoring ；SRM）分析は図 6 に記述したコリジョンエネルギーおよびトランジションで行った。

組織中におけるトリグリセリド（TG）の定量

Bligh & Dyer 法で得られた総脂質をイソプロパノール : Triton x 100（9/1、v/v）溶液に再懸濁し、Labassay^{TM} Triglyceride（Wako）を用いた酵素法により各組織中の TG 量を測定した。

MG 加水分解活性（2-AG 分解活性）

マウス凍結組織を氷上でよく冷やした 10 倍重量の抽出バッファー（100 mM トリス塩酸 pH 8.0、250 mM スクロース、20 μM DTT、1 mM EDTA、プロテアーゼインヒビターComplete）中で、ヒスコトロン（マイクロテック・ニチオン）を用いて破砕した。この溶液を 4℃、9,000 x *g* で 10 分間遠心し、得られた上清を粗抽出酵素源として酵素活性測定実験に用いた。タンパク質濃度の定量は、プロテインアッセイキット（BioRad）

を用いてブラッドフォード法によって行った。

粗抽出酵素源を 100 μg/mL の濃度に抽出バッファーで調整した。20 μL のサンプルに対し、100 μM の JZL184（DMSO 溶液）もしくは DMSO を 5 μL 加えて 37℃、10 分プレインキュベーションした。その後、基質として 200 μM の 2-AG を 25 μL 加え、最終基質濃度が 100 μM となるようにし、37℃、10 分インキュベーションした。次に反応停止液として内部標準物質 AA-d8（100 ng/mL）を含むメタノールを 1 ml 加えた。この溶液を 3 倍量の 0.03%ギ酸水と混合し、メタノールによりコンディショニングした Oasis HLB カートリッジ（10 mg、1 mL、waters）に負荷した。その後、0.03%ギ酸水 3 mL、15%エタノールを含む 0.03%ギ酸水 3 mL、石油エーテル 3 mL で洗浄し、200 μL のアセトニトリルにより溶出させた。溶出液に含まれる AA および AA-d8 を LC-MS/MS により検出することで MG 加水分解活性の評価を行った。

LC は ACQUITY UPLC（Waters）を用い、MS は三重四重極質量分析計 TSQ Quantum Ultra（Thermo Fisher Scientific）を使用した。UPLC による分離には ACQUITY UPLC BEH C8 カラム（1.7 μm、2.1 x 30 mm、Waters）を使用した。移動相に 20 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液（Solvent A）、アセトニトリル（Solvent B）を用い、流速を 0.2 mL/min としてグラジエント分析を行った。グラジエントプログラム［分析時間（%A / %B）］は以下の通りである；0 分（80% / 20 %）－6.5 分（5% / 95 %）－15 分（5% / 95 %）－15 分（80% / 20 %）－18 分（80% / 20 %）。サンプルの注入量は 5 μL とした。選択

反応モニタリング（Selected-Reaction Monitoring ；SRM）分析は図６に記述したコリジョンエネルギーおよびトランジションで行った。また各脂質のカラム保持時間の確認および定量のための検量線の作成には AA の標準品を用いた。定量は絶対検量線法で行い､内部標準試料として用いた AA-d8 は組織重量当たりの値を算出するために使用した。

MG 加水分解活性（2-AG 分解活性）は 1 μg のタンパク質（酵素源）が 1 分間に産出した AA 量（μg）として算出した。

高脂肪食負荷による肥満モデル

高脂肪食として High Fat Diet 32（日本クレア）を用いた（図７）。高脂肪食負荷は全てのマウスにおいて生後 6 週令より行い、毎日体重および摂餌量を測定した。摂餌量は前日にあらかじめ測定した餌の重量から当日に残っていた餌の重量を差し引くことで求めた。

組織重量の測定

通常食、または高脂肪食負荷マウスを 16 時間絶食させた後、肝臓、精巣上体周囲内臓脂肪組織（epididymalwhite adipose tissue、eWAT）、鼠蹊部皮下脂肪組織（subcutaneous white adipose tissue、sWAT）を摘出し、組織重量を測定した。

マウス内臓脂肪組織（精巣上体周囲脂肪組織）および肝臓の HE 染色

高脂肪食負荷を 8 週間行ったマウスについて、精巣上体周囲脂肪組織および肝臓を摘出し、10%ホルマリン液（マイルドホルム、WAKO）による固定を行った。パラフィン切片の作成および HE 染色は新組織化学研究所に受託した。

インスリン抵抗性試験

本試験では遺伝子組み換えヒトインスリン（ノボリン R 注、ノボノルディスク）を使用した。インスリン溶液として 0.1%BSA 生理食塩水 10 mL に 100 U/mL インスリンを 7.5 μL 加えたものを使用した。

マウスを 4 時間絶食させた後、インスリン溶液を 0.75U/kg 体重で腹腔内投与し、経時的（0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 分）に尾静脈より出血させ、グルテスト Neo スーパー（三和化学研究所）およびグルテスト Neo センサーチップ（三和化学研究所）を用いて血中のグルコース濃度を測定した。

経口グルコース負荷試験

本試験ではグルコース溶液として食塩水 10 mL に 1.5 g の D(+)-glucose（Wako）を溶解させたものを使用した。

マウスを 16 時間絶食させた後、グルコース溶液を 1.5 g/kg 体重で経口投与し、経時的（0, 15, 30, 60, 90, 120 分）に尾静脈より出血させ、グルテスト Neo スーパー（三和化学研究所）およびグルテスト Neo センサーチップ（三和化学研究所）を用いて血中のグルコース濃度を測定した。なお経口投与はディスポーザブル経口ゾンデ（6202、フチガミ器械）を使用して行った。

安静時、および薬剤投与後の体温測定

マウス安静時体温は午後 1 時の直腸内温度としてげっ歯類直腸用プローブ RET-3（Physitemp）を接続した温度記録装置（ハンディーロガー、CHINO）を用いて計測した。

マウス組織からの総 RNA 抽出

マウス組織からの総 RNA の抽出は ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて行った。さらに調整した総 RNA を RNeasy Mini kit（QIAGEN）に供することでゲノム由来 DNA を含まない総 RNA として調整した。精製したマウス組織由来 RNA 1 μg を鋳型として、Superscript III 逆転写酵素（Invitrogen）により cDNA を作成した。プライマーには Oligo dT primer（Invitrogen）を用いた。定量的 RT-PCR は各遺伝子に特異的なプライマー（図９）と LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I（Roche Applied Science）を用

いて、LightCycler 1.5（Roche Applied Science）により行った。cDNA は逆転写反応後の生成物を 20 倍希釈したものを使用した。

摂餌制限（Pair-feeding）条件下における高脂肪食負荷誘導性肥満モデルの評価

MGL 欠損マウスの高脂肪食摂取量を予備検討により測定し、その結果をもとに高脂肪食負荷開始 1 日目から 5 日目まであらかじめ定められた量の餌を野生型マウスおよび MGL 欠損マウスに与えた（1 日目：2 g、2 日目：2.5 g、3 日目：3 g、4 日目：3.5 g、5 日目 3.5 g）。6 日目以降は自由摂食条件下で摂餌量および体重を測定した。

脂肪負荷試験

経口脂肪負荷試験の際はマウスを 4 時間絶食させた後、オリーブオイル（Sigma）を 200 μl 経口より投与し経時的に尾静脈より出血させ、ヘパリンコートされたガラス毛細管マイクロピペット（Drummond Scientific）により採血を行い、4℃、4,000 rpm で 2 分間遠心して血漿を得た。血漿中 TG は LabassayTM Triglyceride（Wako）を用いた酵素法により定量した。

リポタンパク質リパーゼ阻害剤、tyloxapol を処置して脂質吸収能を評価する実験においては、マウスの絶食を 16 時間として、tyloxapol（500 mg/kg）の腹腔内投与はオリーブオイルの投与と同時に実施した。

腹腔内に投与した脂質の吸収を評価する実験においては、マウスの絶食を 16 時間として、tyloxapol の腹腔内投与を行い、2 時間後に 200 μl の Intralipid（フレゼニウスカービジャパン）を腹腔内投与した。

空腸組織の免疫染色

マウスを安楽死後に腸管を摘出し、幽門より 10-12 cm の部位を切り取った。このサンプルを OCT コンパウンド（サクラファインテック）で包埋し、液体窒素で冷やしたイソペンタンにより凍結させた。凍結切片の作成はクライオスタット（Leica）を用いて行い、厚さ 6 μm の切片を得た。作成した凍結切片は 10%ホルマリン液（マイルドホルム、WAKO）による固定を 10 分間行い、洗浄後 0.1% Triton x 100 を用いて 5 分間透過処理を行った。さらに室温で 30 分間 3% BSA/PBS でブロッキングを行い、抗体反応を行った。一次抗体（いずれも 3% BSA/PBS 溶液に 1：100 の抗体濃度）を 4℃で一晩処理し、洗浄に次いで蛍光標識二次抗体（いずれも 3% BSA/PBS 溶液に 1：1000 の抗体濃度）を室温で 1 時間反応させた。十分に反応させた後、10 ng/ml に調整した DAPI（D1306、invtrogen）水溶液で 3 分間染色し、水性封入剤 Fluorescence Mounting Medium（S3023、DAKO）を用いて封入した。

蛍光画像の取得は倒立蛍光顕微鏡 ECLIPSE Ti（NIKON）を用いて行った。

糞便中の総脂肪酸鎖の定量

糞便中の総脂肪酸の解析は、GC-FID（Gas Chromatography - Flame Ionization Detector、ガスクロマトグラフィー・水素炎イオン化検出法）法で行った。マウスより新鮮な糞便を採取し、水分除去の目的で凍結乾燥した。凍結乾燥後に重量を測定した後、2 mL チューブに移し換えて粉砕用クラッシャー（SK-100-D、TOKKEN）を加え、自動粉砕機装置（TK-AM5-B、TOKKEN）にセットし、1500 rpm で 20 秒間破砕を行った。破砕後は 23:0 FFA（50 μg/mL）を含む脂肪酸メチル化キット（ナカライテスク）に付属の抽出液 1 mL をサンプルの入ったチューブに加え、ローテーター（RT-5、TAITEC）を用いて 4℃で 1 時間抽出を行った。その後、脂肪酸メチル化キット（ナカライテスク）およびメチル化脂肪酸精製キット（ナカライテスク）により総脂肪酸（遊離脂肪酸および脂肪酸エステル）のメチル化を行い、遠心減圧エバポレーターで溶媒除去することで脂肪酸メチルエステルを得た。これをジクロロメタン 100 μL に再懸濁し、分析に供した。GC 装置およびカラムは GC-2010 Plus（Shimadzu）、FAMEWAX フューズドシリカカラム（30 m x 0.25 mm、液相膜厚 0.25 mm、RESTEK）を使用し、昇温グラジエントで分離、検出した。温度グラジエントプログラムは以下の通りである；140℃－（11.0℃/分）200℃－（3.0℃/分）225℃－（20.0℃/分）240℃－240℃（4.3 分）。サンプルの注入量は 1 μL とし、スプリット比 1 : 100 のスプリット注入法により行った。注入口温度は 240℃、キャリアガスはヘリウムとした。各脂肪酸メチルエステル

のカラム保持時間の確認および定量のための検量線の作成には Supelco® 37 Component FAME Mix（Sigma）を用いた。定量は絶対検量線法で行い、内部標準試料として用いた 23:0 FFA は糞便の重量当たりの値を算出するために使用した。

β3 受容体刺激による脂肪組織の脂肪分解活性の評価

β3 受容体選択的アゴニストである CL-316243（0.25 mg/kg）をマウスに腹腔内投与後、経時的に尾静脈から出血させ、ヘパリンコートされたガラス毛細管マイクロピペット（Drummond Scientific）により採血を行い、血漿を得た。血漿中の遊離脂肪酸値の測定は LabassayTM NEFA（Wako）を、グリセロール値の測定は Free Glycerol Reagent（Sigma）を用いた酵素法により算出した。

寒冷刺激による体温変化の推移の評価

体温測定は動物用直腸プローブ RET-3（Physitemp）およびハンディーロガー（CHINO）を用いて直腸内温度を計測した。はじめに室温 22℃環境下で午前 9 時よりマウスの体温を 1 時間おきに測定することで、マウスに直腸での体温測定を順応させた。その後午前 12 時より恒温機である LTI-1200E（EYELA）にケージごと搬入し、自由飲水のみ可能な環境下で 4℃の寒冷刺激を与えた。4℃環境で午前 12 時から 30 分おきに午後 5 時までの 5 時間分の体温測定を行うことで寒冷刺激時の体温変化の推移を評価した。

高脂肪食に対する嗜好性の評価

摂食量の測定にはマウス用餌箱（マルチフィーダー、シンファクトリー）を使用した。マウスが適切に餌箱からの摂餌が行えるように三日間順応させてから実験を行った。1 ケージに 2 つの餌箱を用意し、一方は通常食（MF）、もう一方は高脂肪食（HFD32）を入れておき、マウスはどちらにも自由にアクセスできる条件下で餌を選ばせた。この際 1 日分の通常食および高脂肪食の減り具合より、各餌の摂餌量を記録した。同様の実験を 1 週間続けて行い、7 日間の通常食および高脂肪食における摂餌量を測定した。

オリーブオイル投与後における摂餌量の評価

マウスを 16 時間絶食した後に、オリーブオイル（Sigma）、もしくはコントロールとして生理食塩水を 200 μL 経口投与し、4 時間自由飲水のみ可能な環境下で飼育した。次に予め重量を測定しておいた餌（通常食）を与え、経時的に餌重量を測定してマウスの累積摂餌量を算出した。オリーブオイルを腹腔内投与する場合は、同様の手順で実験を行い、投与時のみ 23G 注射針（Terumo）を用いてオリーブオイルを 200 μL 腹腔内投与した。高脂肪食負荷をしたマウスを用いる場合は、餌を通常食ではなく、高脂肪食を用いた。

迷走神経切除術

麻酔器（小動物用イソフルラン麻酔器モデル 400、バイオリサーチ社）を用いた吸入麻酔下でマウスを開腹した。実体顕微鏡下で食道側面に沿って存在する迷走神経を切断した。この際は、肝枝（肝臓を支配する迷走神経）を残して、消化管側を前肢と後肢の両側とも切断した。切除後に開腹部を縫合し、7-10 日間通常飼育し、摂餌量が十分に回復したことを確認後、オリーブオイル経口投与後における摂餌量の評価を行った。

第三章　　結　果

1.　各マウス組織における MGL の発現および酵素活性

1-1.　MGL および CB1 受容体遺伝子の組織発現分布

はじめに、マウス組織を用いて定量 RT-PCR 法を行い、MGL 遺伝子（*Mgll*）および CB1 受容体遺伝子（*Cnr1*）の組織発現分布を調べた。MGL 遺伝子は脂肪組織および脳において高い発現が認められた（図９A）。肝臓、心臓、肺、精巣などにおいては中程度の発現が認められ、消化管を含むその他の組織においても有意な発現が確認された（図１０A）。高発現の見られた脂肪組織および脳に関してさらに検討を行ったところ、内臓脂肪（精巣上体周囲白色脂肪組織、eWAT）、皮下脂肪（鼠蹊部皮下白色脂肪組織、sWAT）、褐色脂肪組織（肩甲骨間褐色脂肪組織、iBAT）のいずれのタイプの脂肪組織においても脳に比べて高いレベルの発現が認められた（図９B）。これに対し、CB1 受容体遺伝子の発現はほぼ脳に限局しており、脂肪組織やその他の組織ではほとんど発現が認められなかった（図９C）。これらの結果から MGL が、特に脳以外の組織において、CB1 受容体に依存しない様式で機能する可能性を示唆するものと考えられた。

1-2.　マウス組織中の MG 加水分解活性

次に、MGL の発現が高かった脳、脂肪組織、肝臓についてそれぞれの組織から抽

出したタンパク質中に含まれる MG 加水分解活性を *in vitro* で測定、評価した。MGL 欠損マウスの脳組織中の MG 加水分解活性は野生型マウスと比べて約 20%に低下していた（図１０A）。白色脂肪組織（eWAT）および褐色脂肪組織（iBAT）中の MG 分解活性についても、MGL 欠損マウスでは野生型マウスに比べてそれぞれ約 25%、約 40%に低下が認められ（図１０B および C）、肝臓中の MG 分解活性は約 65%程度に低下していた（図１０D）。脳および脂肪組織の MG 分解活性は、野生型マウス由来のタンパク質抽出液を MGL 選択的阻害剤 JZL184（終濃度 1 μM、10 分間）で前処理することにより、MGL 欠損マウスにおいて見られる活性と同程度に低下したことから、差分に相当する活性が MGL 酵素活性であることが矛盾なく示された（図１１A-C）。一方、肝臓では、JZL184 により阻害を受ける MGL 以外の MG 分解酵素の存在が示唆された。

以上結果から、MGL 高発現臓器である脳、脂肪組織および肝臓において、MGL は総 MG 加水分解活性の 35 - 80%を担う主要な MG 分解酵素であることが確認された。また肝臓には JZL184 により阻害される、MGL 以外の MG 分解酵素の存在が示唆された。

1-3. MGL 欠損による組織中のモノアシルグリセロール（MG）量の変化

次に、上述の MGL 高発現臓器において、MGL 欠損が組織中の MG 量に与える影

響を調べた。野生型マウスおよびMGL欠損マウスの脳、脂肪組織（eWAT）および肝臓から脂質を抽出し、LC-MS法によりMG量を測定した。MGL欠損マウスの脳組織においては、すでに報告のある通り、顕著な2-AG（20：4 MG）の蓄積が見られ、その他の脂肪酸を有するMG（16：0 MG、18：1 MG、18：2 MG）についても野生型マウスに比べて有意に高い含有量が認められた（図１１A)。脂肪組織においても測定したすべてのMG分子種についてMGL欠損マウスで顕著な増加を認めた（図１１B)。脳では20：4 MG、脂肪組織では18：1 MGおよび18：2 MGの蓄積が主だったが、これらは各組織において元来含有量の多いMG分子種であり、それらの臓器においてMGLが特定のMG分子種を選択的に分解することを示唆するものではなかった。

一方で、肝臓で主要なMG分子種として検出される18：1 MGおよび18：2 MGの含有量については、MGL欠損による増加は有意ではなく、比較的含有量の少ない成分である16：0 MGおよび20：4 MGに有意な増加を認めた（図１１C)。この結果は、肝臓においては全MG分解活性に占めるMGLの寄与が脳や脂肪組織のそれに比べて高くないという結果（図１０）と矛盾しないものであると考えられた。

以上の結果から、MGL発現臓器におけるMGL欠損は、様々なMG分子種の蓄積を引き起こすことが分かった。

1-4. MGL 欠損による他の脂質量の変化

MGL 欠損による MG 量の変化が、他の脂質分子種の量に影響を与える可能性を考え、MG 以外の脂質についても比較解析を試みた（図１２、１３）。

MG の蓄積に伴い代謝前駆体である DG の蓄積が起こる可能性が考えられたが、野生型マウスと MGL 欠損マウスの脳、脂肪組織および肝臓において、主要な DG 分子種の量に有意な差は見られなかった（図１２）。

MG 分解により生じる脂肪酸が MGL 欠損により減少する可能性を考え、多価不飽和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid, PUFA）の量を測定した。MGL 欠損マウスの脳ではアラキドン酸（AA、20：4 FFA）の有意な減少が見られ、これは既に報告されている結果と一致するものであった（図１３）。脳では、ドコサヘキサエン酸（DHA、22：6 FFA）量の減少も認められた（図１３）。脂肪組織では AA、EPA、DHA のいずれも MGL 欠損により統計的な有意差は得られなかったものの、総じて若干の低下傾向を認めた。肝臓については、PUFA 含量に有意な違いは認められなかった（図１３）。

これらの結果から、MGL 欠損は MG の蓄積だけでなく、組織中の遊離脂肪酸の低下を起こす臓器があることが明らかとなった。

2. MGL 欠損マウスを用いた高脂肪食誘導性肥満モデルの解析

MGL が脂肪組織や肝臓など脂質代謝の活発な組織に高発現しており、組織中の MG

量や脂肪酸量に影響を与える可能性が示唆されたことから、MGL が生体内脂質ホメオスタシスにおいて何らかの役割を果たしている可能性を考え、MGL 欠損マウスを用いた高脂肪食負荷誘導性肥満モデルの評価を行った。

2-1. 高脂肪食負荷による肥満誘導

野生型マウスおよび MGL 欠損マウスに通常食もしくは高脂肪食を与え、体重の変化を比較した。通常食の自由摂取条件下で飼育した場合、野生型マウスと MGL 欠損マウスの間で、体重およびその変化に有意な違いは認められなかった（図１５A)。これに対し、高脂肪食の自由摂取条件下で飼育した場合、MGL 欠損マウスでは野生型マウスと比べて体重増加の抑制が認められた（図１４B)。

野生型マウスと MGL 欠損マウスで摂食量に違いがないかどうかを調べたところ、通常食では野生型マウスと MGL 欠損マウスの間に違いは見られなかったのに対し、高脂肪食では、MGL 欠損マウスが一過的（高脂肪食開始から約 5 日間）に、野生型マウスに比べて摂食量が少ないことが分かった（図１５)。MGL 欠損マウスにおける一過的な摂食量低下により、高脂肪食による肥満誘導の違いが説明されるかどうかを検証するため、MGL 欠損マウスと野生型マウスが同じ量の高脂肪食を摂取するように最初の 5 日間の餌投与量を調節した条件 (pair-feeding) 下で、体重変化を評価した。Pair-feeding 条件下においても、MGL 欠損マウスは野生型マウスに比べて体重増加の

抑制が見られた（図１６）。従って、MGL 欠損マウスの肥満抑制の主たる原因は摂食量の低下によるものではないと考えられた。

2-2.　肥満に伴う耐糖能異常

高脂肪食負荷による肥満モデルでは通常、肥満に伴う耐糖能の低下が生じる。MGL 欠損が高脂肪食摂取による耐糖能異常に与える影響を検討するため、通常食または高脂肪食を7－8週間投与したマウスを用いて耐糖能の評価を行った。通常食条件では、インスリン耐性試験、経口グルコース耐性試験のいずれについても、野生型マウスと MGL 欠損マウスの間に違いは見られなかった（図１７A、B）。一方、高脂肪食負荷により野生型マウスで見られた顕著なインスリン耐性およびグルコース不耐性は、MGL 欠損マウスにおいて共に有意な改善が認められた（図１７C、D）。

2-3.　脂肪蓄積

高脂肪食負荷による肝臓および脂肪組織への脂肪蓄積について、HE 染色標本による組織学的評価を行った。高脂肪食を 8 週間投与すると、野生型マウスの肝臓では多数の脂肪滴の蓄積を認められたが、MGL 欠損マウスでは脂肪蓄積は顕著ではなかった（図１８）。内臓脂肪（eWAT）組織の比較においては、野生型マウスで見られた脂肪細胞の肥大やマクロファージの浸潤が MGL 欠損マウスでは見られなかった（図１

９）。MGL 欠損マウスにおけるマクロファージの浸潤の低下は、脂肪組織から RNA を抽出し、マクロファージマーカー（CD68）および、炎症性サイトカイン（MCP-1、TNF-α）の遺伝子発現を比較することによっても確認した（図１９）。

高脂肪食負荷による肥満モデルでは、長期の高脂肪食負荷により肥大化した内臓脂肪は、その後、脂肪細胞の細胞死を伴う萎縮を起こし、肝臓への顕著な異所性脂肪蓄積の亢進が起こることが知られている[44]。そこで、野生型マウスおよび MGL 欠損マウスへの高脂肪食負荷を長期に継続し、脂肪および肝臓の組織重量を測定することで脂肪蓄積を評価した。高脂肪食を 8 週間投与した時点において、MGL 欠損マウスの皮下脂肪重量（sWAT、図２０A）および内臓脂肪重量（eWAT、図２０B）は、ともに野生型マウスに比べて有意に少なく、脂肪蓄積が抑制されていることがわかった。さらに高脂肪食投与を 24 週間まで継続したところ、皮下脂肪重量に顕著な違いは認められなくなった（図２０A）。内臓脂肪重量は、野生型では 8 週間後以降に減少し組織の萎縮を示唆したのに対し、MGL 欠損マウスでは増加を続け、24 週間投与後の時点では野生型マウスの内臓脂肪重量より重くなった（図２０B）。肝臓重量は、高脂肪食の投与により 24 週間後まで単調に増加を続けたが、MGL 欠損マウスでは、野生型に比べて肝臓重量の増加は抑制されていた。（図２０C）。肝臓への脂肪蓄積の違いは、剖検による肉眼所見とも矛盾しない結果であった（図２０E）。

高脂肪食を長期投与した際のマウスの体重を比べると、どの時点においても MGL

欠損マウスの体重は野生型マウスに比べて有意に少なかったが、8 週間の時点で見られた体重差はその後広がることはなかった（図２０D）。したがって、MGL 欠損マウスも高脂肪食の長期投与によって最終的には肥満をきたすと考えられた。

3. CB1 受容体欠損マウスおよび CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスを用いた高脂肪食誘導性肥満モデルの解析

MGL 欠損マウスは高脂肪食による肥満およびメタボリックシンドローム発症の抑制が見られることが明らかとなった。MGL は中枢系において 2-AG を分解することにより CB1 受容体シグナル系を抑制することが知られているため、高脂肪食負荷に対する抗肥満の表現型も、脳やその他の組織における 2-AG－CB1 受容体系により説明される可能性がある。一方、序文で述べたように、MGL 欠損マウスの脳では CB1 受容体の脱感作が指摘されており[28, 29]、MGL 欠損マウスは CB1 受容体欠損マウス様の表現型を呈する可能性が考えられる。実際、CB1 受容体欠損マウスは野生型マウスに比べて肥満をきたしにくいことが報告されており[35]、CB1 受容体が肥満に関係することは明らかである。そこで CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスを作出し、CB1 受容体単独欠損マウスと比較を行うことにより、CB1 受容体の非存在下で MGL 欠損による抗肥満作用が確認されるかどうかについて検討することにした。同検討に用いた CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスおよび CB1 受容体欠損マウスは、CB1 受容体欠損

マウス系統（C57BL/6J の遺伝子的背景）と MGL 欠損マウス系統（C57BL/6N の遺伝子的背景）から作出した CB1 受容体ホモ欠損／MGL ヘテロ欠損マウス同士の交配より得ている。これらのマウスは C57BL/6J または N の野生型マウスと単純に比較することができないため、野生型マウスと CB1 受容体欠損マウスの比較は別の実験として行った（図２１）。

3-1. 体重増加および脂肪蓄積

まず CB1 受容体欠損マウスおよび野生型マウスについて体重および摂餌量と比較した。CB1 受容体欠損マウスは、通常食および高脂肪食摂取時のいずれの場合においても野生型と同程度の摂餌量を示したが（図２１B-E)、体重については通常食摂取時より低体重を示し、高脂肪食負荷による体重増加も生じにくかった（図２１A)。これらは以前の報告と矛盾しない結果であり、CB1 受容体欠損によっても肥満の進行が顕著に抑制されることが確認できた。

次に通常食および高脂肪食を与えた時の CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスの体重変化を対照群である CB1 受容体欠損マウスと比較した。通常食による飼育時の体重変化は CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスと CB1 受容体欠損マウスとの間に差は見られなかった（図２２A)。高脂肪食負荷時においては、CB1 受容体を欠損するだけで肥満の進行が抑制されるため（図２１)、高脂肪食を長期間負荷することにより体

重増加を評価した。その結果、CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスでは CB1 受容体欠損マウスと比較し体重増加が抑制されており（図２２B)、高脂肪食負荷後の組織（肝臓、内臓脂肪、皮下脂肪）重量についても低い値を示した（図２２C)。以上の結果から、野生型マウスと比較し、CB1 受容体を欠損したマウスは高脂肪食による肥満をきたしにくいが（図２１A)、CB1 受容体の遺伝子欠損の背景で MGL を欠損させるとさらなる抗肥満効果が確認できた（図２２B および C)。

即ち、MGL 欠損による抗肥満効果は CB1 受容体非存在下でも確認されたことから、MGL は 2-AG－CB1 受容体系に依存しない様式で肥満誘導に関わることが示唆された。

3-2. 摂餌量

次に、通常食および高脂肪食を与えた時の CB1 受容体欠損マウスと CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスの摂餌量を比較した。通常食で飼育した際の摂餌量は CB1 受容体欠損マウスと CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスの間に差は見られなかった（図２３A-D)。高脂肪食負荷時の摂餌量は、CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスでは高脂肪食を開始後約 3 日間、CB1 受容体欠損マウスと比べて有意に少ない値を示した（図２３E-H)。しかし、5 日目以降は個体あたりの摂餌量は CB1 受容体欠損マウスと同等であった。

この結果から、MGL 欠損マウスに高脂肪食を与えた際に見られた一過性の摂餌量低下（図１５を参照）は、2-AG－CB1 受容体系に依存しない表現型であることが分かった。

3-3. 耐糖能

CB1 受容体欠損マウスと CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスに高脂肪食を 16 週間投与した後、インスリン抵抗性試験と経口グルコース耐性試験を行った。CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスは CB1 受容体欠損マウスに比べ、全身性のインスリン抵抗性および、血中グルコースクリアランスの有意な改善が見られた（図２４A、B）。

以上の結果より、MGL 欠損による耐糖能の改善は CB1 受容体の有無によらず生じる現象であることが明らかとなった。

4. MGL 欠損による抗肥満作用メカニズム

ここまでの検討により、MGL 欠損マウスは高脂肪食負荷による肥満をきたしにくいことが明らかとなった。MGL 欠損マウスにおける抗肥満メカニズムを明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。

4-1. 経口脂肪負荷後の血中 TG 濃度

経口摂取した脂質の吸収に違いがないかを検討するため、オリーブオイル（TG を主成分とする植物油で、TG に含まれる脂肪酸の 7 割以上がオレイン酸）を強制経口投与した後の血中 TG 濃度を経時的に測定した。野生型マウスでは投与後 2 時間をピークとして血中 TG 値が上昇し、4 時間後には投与前と同程度の値となった（図２５）。MGL 欠損マウスでは野生型マウスと同様に 2 時間をピークとする一過性な血中 TG 濃度の上昇が見られたが、濃度上昇は野生型マウスと比べて有意に抑制されていた（図２５）。

次に、マウスにリポタンパク質リパーゼ（lipoprotein lipase, LPL）阻害剤 tyloxapol の腹腔内投与することで血中 TG の分解を抑制した条件下で同様の実験を行った（図２６A）。マウスに LPL 阻害剤を投与するとオリーブオイルの投与無しで血中 TG 濃度は上昇したが、野生型マウスと MGL 欠損マウスの間に顕著な差が認められず（図２６B）、CB1 受容体欠損マウスと CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスの比較においても同様であった（図２６C）。マウスにオリーブオイルを投与すると、野生型マウスでは血中 TG 濃度の顕著な上昇が見られたのに対し、MGL 欠損マウスでは血中 TG 濃度の上昇は大幅に抑制されていた（図２６B）。この結果は、CB1 受容体欠損マウスと CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスの比較においても同様であった（図２６C）。

さらに、これらの現象が脂質の吸収経路に依存するかを調べるために、経口投与ではなく、腹腔内にトリグリセリド（20%TG 溶液、Intralipid®）を注射により投与し

た（図２７A）ところ、野生型マウスおよびMGL欠損マウスのいずれにおいても、顕著かつ同等な血中TG濃度の上昇が観察され（図２７B)、この結果は、CB1受容体欠損マウスとCB1受容体／MGL二重欠損マウスの比較においても同様であった（図２７C)。これら結果から、MGL欠損マウスにおいては、消化管を介した脂質吸収の障害が起きている可能性が示唆され、かつ、そのメカニズムはCB1受容体非依存的であると考えられた。

4-2.　<u>消化管における MGL の発現</u>

MGL欠損による脂質吸収障害が、MGLの消化管における機能を示唆していると考え、脂質吸収部位である空腸組織におけるMGLの発現の検討を行った。遺伝子発現レベルが脂肪組織や脳などに比べて低いことについては既に検討済みである（図９)。空腸組織中のMG分解活性については、MGL欠損マウスと野生型マウスの比較、および、MGL阻害剤JZL184により阻害されるMG分解活性の評価により、空腸におけるMG分解活性の約半分がMGLによるものであることが確認された（図２８)。小腸におけるMGLの比活性は0.35 μg/min/μg protein程度であり、脳（0.36 μg/min/μg protein）や白色脂肪組織（0.95 μg/min/μg protein）などのMGL高発現組織に準ずる活性を有しており（図１０および図２８)、酵素学的な観点からはMGLが空腸組織において機能する可能性を示唆し得る結果であった。

さらに、MGL が空腸のどの部位もしくは細胞種に発現しているかを蛍光免疫染色法により検討した（図２９）。野生型マウスおよび MGL 欠損マウス由来の空腸組織を抗 MGL ポリクローナル抗体により染色すると、野生型マウスにおいて絨毛内の粘膜固有層に強い蛍光シグナルが確認された。粘膜固有層は微小血管およびリンパ管に富む領域であることから、さらに検討を行ったところ、MGL の染色パターンは血管内皮細胞のマーカーである CD31 の染色パターンと比較的良く一致し（図２９A）、リンパ管内皮細胞のマーカーである podoplanin の染色パターンとは一致しなかった（図２９B）。これらの結果から、MGL は絨毛の微小血管内皮細胞に発現していると考えられた。

4-3.　MGL 欠損による脂質吸収関連タンパク質遺伝子の発現変動

MGL 欠損による脂質吸収障害が、腸管上皮細胞における脂質吸収関連タンパク質の発現変動により説明される可能性を考え、遺伝子発現解析を行った。脂肪酸輸送担体として知られる CD36[45]、管腔から取り込んだ MG を DG に合成するアシル転移酵素 MGAT2[46]、DG から TG を合成するアシル転移酵素 DGAT1[47]および DGAT2[48]の発現量は、摂食時、絶食時のいずれにおいても、MGL の欠損により影響を受けなかった（図３０）ことから、MGL はこれらの遺伝子発現変動を調節することにより脂質吸収に影響を与えているのではないと考えられた。

4-4.　オリーブオイル投与後の腸管組織の脂質解析

MGL 欠損マウスにおいて脂肪吸収のどの段階で障害されているかを知るために、絶食時（オリーブオイル投与前）およびオリーブオイル投与 2 時間後の空腸組織中の脂質代謝物の量を比較した（図３１A)。オリーブオイルの投与により、組織中の TG 量は野生型マウス、MGL 欠損マウスともに顕著な増加が見られた。野生型マウスと MGL 欠損マウスを比較すると絶食時においては、MGL 欠損マウスの空腸組織中の TG 量は若干低い傾向にあったが、オリーブオイル投与 2 時間後においては顕著な違いが見られなかった（図３１B)。CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスと CB1 受容体欠損マウスの比較においても、同様の傾向が見られた（図３１C)。

組織中の MG 量についても、オリーブオイルの投与により、野生型マウス、MGL 欠損マウスともに顕著な増加が見られたが､野生型と MGL 欠損マウスを比較すると、オリーブオイル投与 2 時間後では、MGL 欠損マウスの方が有意ではないが若干少ない傾向が見られた（図３１D)。一方、絶食時の MG 量は MGL 欠損マウスの方が多かったが､これは､MGL 欠損マウスの脂肪組織や脳において MG の蓄積が見られた（図１１）ことと矛盾しない結果であった。組織中の DG および FFA 量は、オリーブオイル投与により MG の場合と同様、野生型マウス、MGL 欠損マウスともに顕著な増加が見られたと同時に野生型マウスと MGL 欠損マウスの比較においては MGL 欠損マ

ウスの方が若干少ない傾向が見られた（図３１D）。なお、MG、DG、FFA のいずれについても、オリーブオイル投与後の組織中で顕著に増加の見られた分子種は、オリーブオイルに由来するオレイン酸（18：1 FFA）やリノール酸（18：2 FFA）を含む分子種であった。一方、リン脂質でもオレイン酸（18 : 1 FFA）やリノール酸（18 : 2 FFA）を含む分子種にはオリーブオイルの投与により増加が見られたが、野生型マウスと MGL 欠損マウスの間に差は見られなかった（図３１E-H）。

以上の結果から、MGL 欠損マウスでは食事中の脂質（消化物）の腸管組織への取り込みが抑制されている可能性が考えられた。

4-3. 糞便への脂質の排出

MGL 欠損マウスにおいては吸収されなかった脂質が糞便中に排出されている可能性を考え、通常食飼育または高脂肪食負荷を行ったマウスより糞を回収し、GC-FID 法により総脂肪酸の解析を行った（図３２）。通常食飼育と高脂肪食負荷を行ったマウスの糞中にはいずれも、パルミチン酸（16：0 FFA）、ステアリン酸（18：0 FFA）、オレイン酸（18：1 FFA）が多く含まれていたが、通常食飼育マウスの糞にリノール酸（18：2 FFA）が多く含まれていたのに対し、高脂肪食負荷を行ったマウスの糞中にはリノール酸含量は少なかった。

通常食飼育したマウスの糞を野生型マウスと MGL 欠損マウスで比較した場合、全

く違いは認められなかった（図３２A)。高脂肪食負荷を行ったマウスでは、野生型マウスの糞に比べて MGL 欠損マウスの糞に含まれる脂肪酸量が若干多い傾向があったが、有意な違いではなかった（図３２B)。

以上の結果より、MGL 欠損マウスの腸管における脂質吸収の低下は、糞便への顕著な脂質排出を伴うわけではないことが分かった。

4-6. 脂肪分解および熱産生

MGL 欠損マウスを高脂肪食負荷した際に見られる肥満の抑制は、脂質吸収の低下以外にも、エネルギー消費の変化によって説明される可能性がある。単離した脂肪組織をβ受容体アゴニストにより刺激した際に見られる脂肪酸およびグリセロールの遊離が MGL 欠損マウス由来の脂肪組織においては減弱することが報告されている[30]。そこで、野生型マウスおよび MGL 欠損マウスにβ3 受容体アゴニスト CL316243 を腹腔内投与した後に見られる血中 FFA 濃度および血中グリセロール濃度の上昇を測定することにより、MGL が脂肪動員に関わるかどうかを検討したところ、血中 FFA 濃度上昇、血中グリセロール濃度上昇のいずれも MGL 欠損マウスでは野生型マウスに比べ減弱しており、MGL は脂肪動員に関わることが確認された（図３３A および B)。脂肪組織中のβ3 受容体、脂肪動員において TG および DG の分解を担う酵素である ATGL および HSL の遺伝子発現に関して、MGL 欠損による影響は認められなかった

（図３３C）ことから、MGL の MG 分解活性が重要であると考えられた。

飢餓や寒冷刺激などにより誘導される白色脂肪組織における脂肪分解は、脂肪酸β酸化や褐色脂肪組織などにおける熱産生などによりエネルギー消費を引き起こすことから、野生型マウスおよび MGL 欠損マウスの平時の体温、および、マウスを寒冷刺激した際の体温維持能を比較した。通常飼育環境下における体温（直腸温測定による深部体温）は野生型マウスと MGL 欠損マウスの間に違いは見られなかった（図３４）。マウスを通常環境温度（22℃）から寒冷環境（4℃）に移すと、体温の低下が観察されたが、MGL 欠損マウスは野生型マウスに比べてより体温低下の程度が大きい傾向にあった（図３５A）。CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスと CB1 受容体欠損マウスと比較した場合も、体温低下の程度は CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスのほうが大きい傾向が見られた（図３５B）。同試験を絶食条件で行うために生じる体重変化を比較したところ両遺伝子型の間に有意な差異は見出されず（図３５C）、褐色脂肪組織における熱産生関連遺伝子である UCP-1 および脂肪酸β酸化に関わる遺伝子である CPT-1βの発現量についても MGL 欠損マウスは野生型マウスに比べ若干高い値を示したが有意な差ではなかった（図３４B）。これらの結果から、MGL 欠損マウスは通常の環境下では熱産生に顕著な違いはなく、寒冷刺激時においても熱産生は野生型マウスに比べてむしろ低いことが示唆されたため、MGL 欠損マウスの抗肥満作用は熱産生の違いにより説明されるものではないと考えられた。

5. MGL 欠損マウスの摂食行動の解析

高脂肪食誘導性肥満モデルにおける MGL 欠損マウスの抗肥満効果が摂餌量とは無関係であることは、pair-feeding 実験（図１６）において既に示したとおりであるが、MGL 欠損マウスに高脂肪食を与えた際に一過的な摂餌量低下がみられ、また、それが CB1 受容体に依存しない表現型であったこと（図１５および図２３）から、MGL はこれまでに知られていないメカニズムで摂食行動に関与する可能性が考えられた。そこでまず、MGL 欠損がマウスの高脂肪食に対する嗜好性に影響するかどうかを行動学的手法により検討した（図３６A および B)。それぞれ通常食と高脂肪食の入った 2 つの餌箱をマウスに与えて摂餌量を測定すると、野生型マウスは 1 日目から通常食より高脂肪食を好んで摂取し、2 日目以降は通常食をほとんど食べなくなったのに対し、MGL 欠損マウスでは、高脂肪食の摂取量は徐々に増加するという違いが見られた（図３６C)。同じ実験を CB1 欠損マウスおよび CB1/MGL 二重欠損マウスを用いて行うと、両遺伝子型ともに、野生型マウスに比べて高脂肪食嗜好性の大幅な低下が見られたが、CB1/MGL 二重欠損マウスは CB1 単独欠損マウスと比べてより高脂肪食への嗜好性が低い傾向にあった（図３６D)。

MGL 欠損による高脂肪食嗜好性の低下が、脂肪を摂取したことにより引き起こされる現象である可能性を検討するために、マウスにオリーブオイルを強制経口投与し

た後の摂食行動を測定した（図３７）。野生型マウスにオリーブオイルを経口投与すると、生理食塩水を投与した時と比べて若干の摂餌量の低下が見られるのみであったが、MGL 欠損マウスでは著しい摂餌量の低下が見られた（図３７B）。同様の実験をCB1 受容体／MGL 二重欠損マウスを用いて行った場合も、オリーブオイル投与により、対照である CB1 受容体欠損マウスに比較して著しい摂餌量の低下が見られた（図３７C）。従って、MGL 欠損マウスにおける脂肪摂取後の摂餌量低下は CB1 受容体に依存しないメカニズムで引き起こされると考えられた。また、オリーブオイルを腹腔内に投与した場合には摂餌量の低下は見られなかったことから、腸管を介した脂肪吸収がこの表現型に重要であると考えられた（図３７D）。さらに高脂肪食を 6 週間負荷し、MGL 欠損マウスの摂餌量が野生型マウスと同程度となった条件下で、オリーブオイル経口投与後の摂餌量を比較すると、MGL 欠損による顕著な摂餌量の低下が見られなくなった（図３７E）。

食後に腸管から放出される摂食抑制性ホルモンは迷走神経を介して脳へ情報を伝達することで作用を発揮する。MGL 欠損マウスにおけるオリーブオイル経口投与後の摂餌量が低下する現象が迷走神経を介して引き起こされている可能性を考え、野生型マウスと MGL 欠損マウスに迷走神経切除術を施した後、オリーブオイル投与後の摂餌量の評価を行った（図３８A）。野生型マウスでは迷走神経切除術により、オリーブオイル経口投与後の摂餌量に違いは見られなかったが、MGL 欠損マウスでは迷走

神経切除術を施すと完全な回復は見られなかったものの偽手術群に比べて摂餌量の有意な回復が見られた（図３８B)。このことから、MGL 欠損マウスにおいて生じる脂肪摂取後の摂餌量の低下に、少なくとも迷走神経を介したメカニズムが関与していると考えられた。

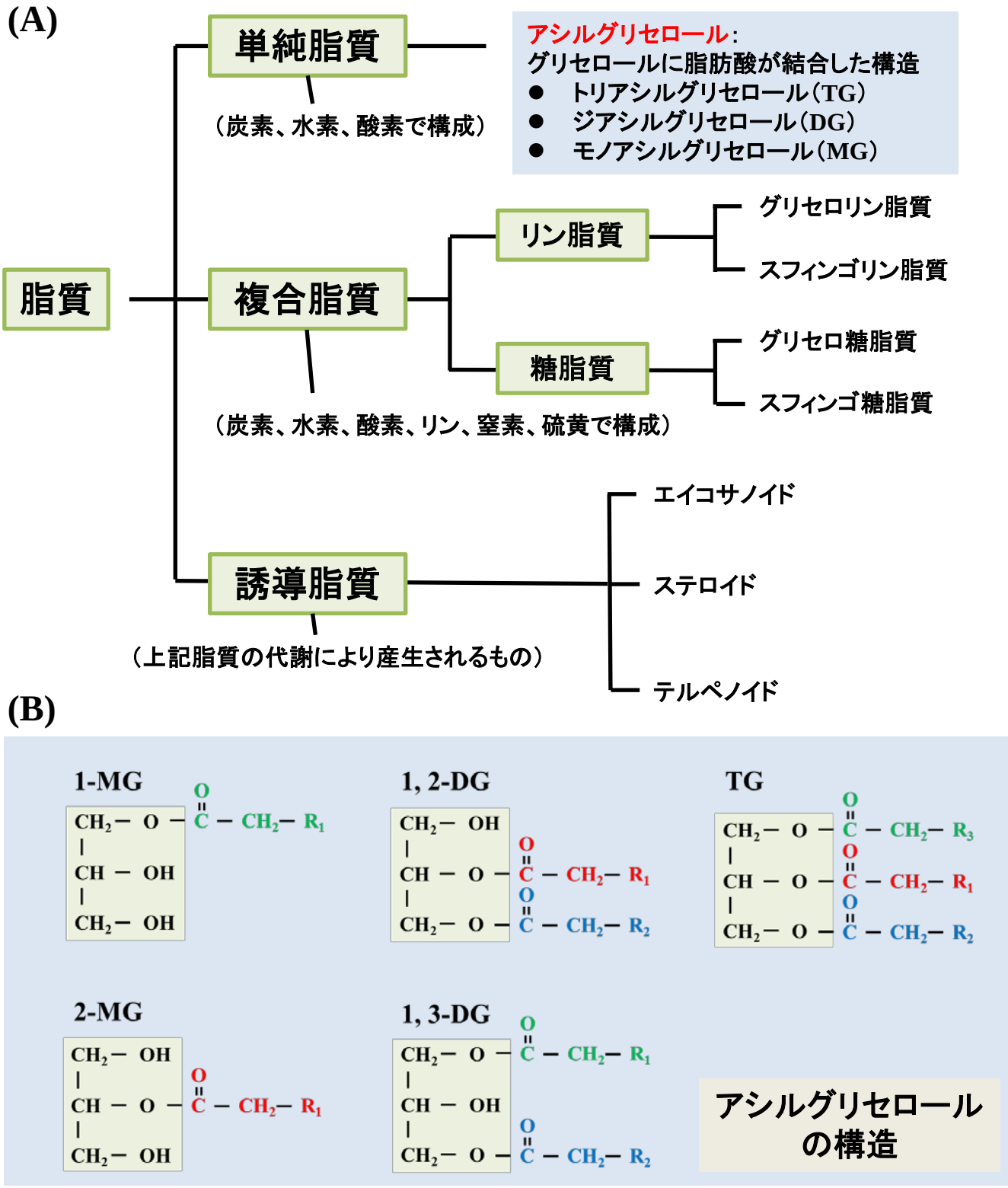


図1．脂質の分類
(A)脂質の分類を示した。TGを始めとするアシルグリセロールは単純脂質に分類される。
(B)アシルグリセロールの構造を示した。MGとDGは脂肪酸のエステル化部位によって図のような表記がなされる。

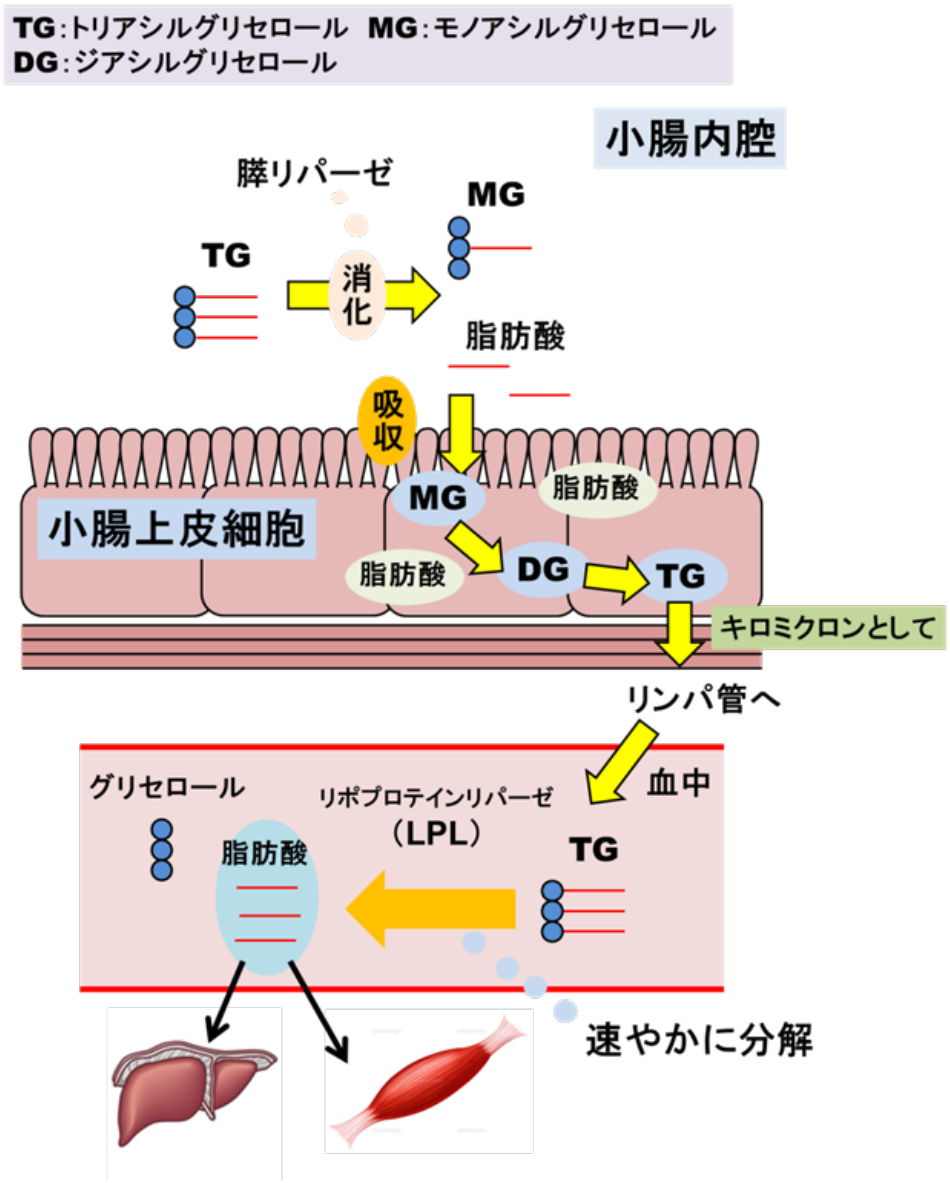
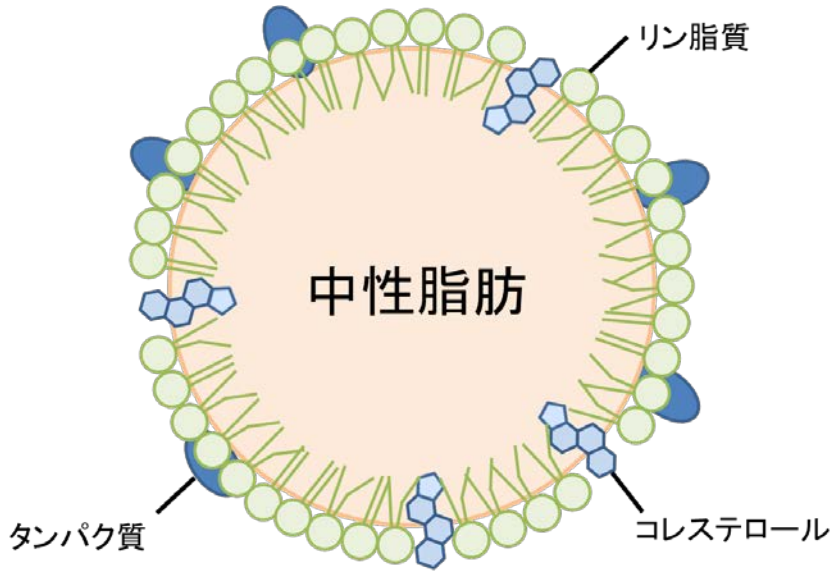


図2. 脂質吸収のメカニズム

経口摂取したTGは膵リパーゼによる分解を受け、MGと遊離脂肪酸が生じる。これらは小腸上皮細胞に取り込まれ、小胞体において再アシル化される。ここで生じたTGはコレステロールやリン脂質、アポリポタンパク質とともにキロミクロンを形成する。キロミクロンは腸管のリンパ管に集合し、やがて血中へと合流する。

血中ではリポプロテインリパーゼがTG分解を担っており、TGはすぐさま遊離脂肪酸へと分解される。この遊離脂肪酸は肝臓や筋肉へと吸収され、エネルギーとなる。

(A)



(B)

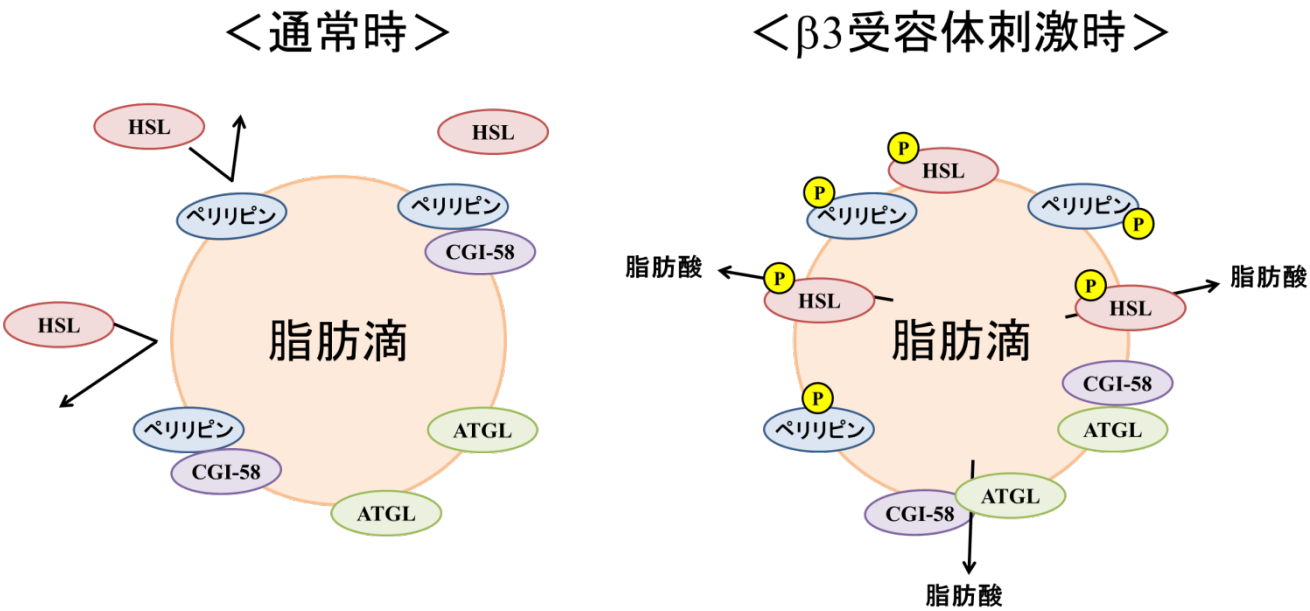


図3.　脂肪組織における脂肪分解

(A)脂肪滴の構造を示した。脂肪滴の中心にはTGを始めとしたアシルグリセロールが存在する。その周りをリン脂質の一重膜が覆う。

(B)通常時およびβ3受容体刺激時の脂肪滴周辺の変化を示した。
通常時はHSLは脂肪滴に作用することはできないが、β3受容体刺激時はペリリピンのリン酸化により脂肪滴に近づき、脂肪分解に寄与できるようになる。ペリリピンのリン酸化によりCGI-58はATGLと結合し、ATGLの酵素活性を上昇させる。分解によって生じる脂肪酸は血中へ放出されて、各臓器に送られる。

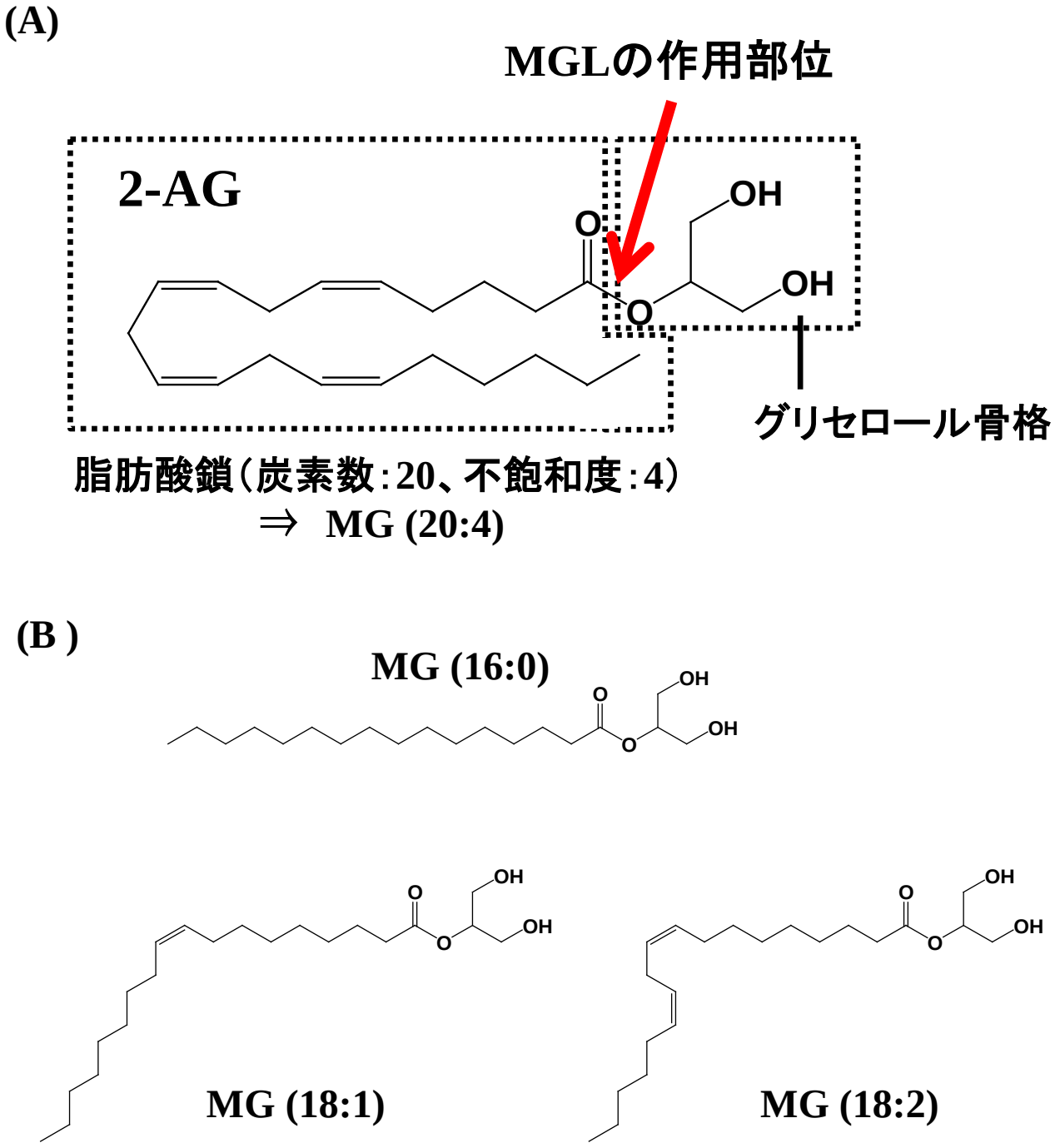
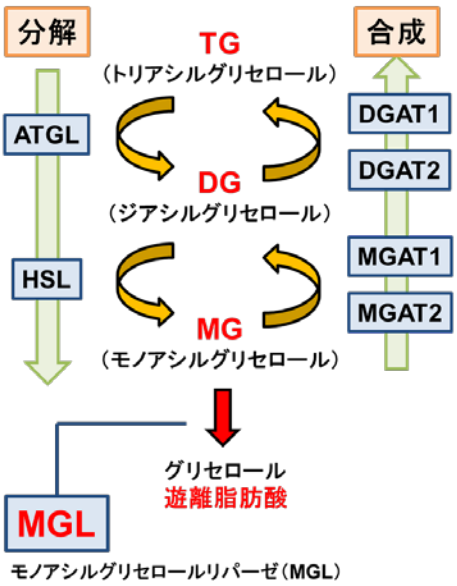


図4．モノアシルグリセロールの構造とMGLの作用部位
（A）2-AGの構造を示した。モノアシルグリセロール（MG）はグリセロール骨格に一つの脂肪酸鎖が結合した構造を持つ。脂肪酸鎖の炭素数と不飽和度により生体には様々なMGが存在する。矢印はMGLによる作用部位を示した。
（B）生体内に存在するその他の主要なMGの構造を示した。
（A）、（B）カッコ内の数字がそれぞれ炭素数、不飽和度を示した。

(A)



(B)

高脂肪食負荷誘導性肥満モデルにおける遺伝子欠損マウスの表現型

遺伝子欠損マウス	表現型	Reference
ATGL欠損マウス	肥満を呈する。 （組織中にTG蓄積、エネルギー消費減少）	[10]
HSL欠損マウス	肥満をきたしにくい。 （エネルギー消費増大）	[52]
MGAT2欠損マウス	肥満をきたしにくい。 （脂質吸収不全、エネルギー消費増大）	[1]
DGAT1欠損マウス	肥満をきたしにくい。 （脂質吸収不全、エネルギー消費増大）	[2]
MGAT1欠損マウス	未報告	
DGAT2欠損マウス	未報告	

図5．TGの分解および合成を担う代謝酵素とその遺伝子欠損マウスの表現型

（A）中性脂質を代表するトリアシルグリセロール（TG）は脂肪酸の貯蔵形態であり、必要に応じてATGLやHSLにより分解されエネルギー源として脂肪酸を循環中に供給する。一方、エネルギー過多の状態においては、脂肪酸は脂肪組織に取り込まれMGATやDGATによりTGに再合成される。これら代謝酵素の働きは脂質ホメオスタシス維持のために重要であり、その機能異常はメタボリックシンドロームの発症や増悪に関係する可能性がある。

（B）高脂肪食誘導性肥満モデルに関する中性脂質代謝酵素欠損マウスの表現型を示す。

ATGL、HSLはともに脂肪組織に強い発現を示し、脂肪分解に寄与するが、肥満モデルの表現型は異なる。ATGLを欠損すると、エネルギーとしてTGを利用できないため各組織に脂肪滴が蓄積し、野生型よりも肥満をきたしやすい。HSLを欠損した場合も、ATGL同様に脂肪分解が抑制されるため、脂肪酸をエネルギー源にできない。しかし高脂肪食負荷時の表現型はATGL欠損マウスと異なり、HSL欠損マウスは高脂肪食を与えても肥満をきたしにくい。その原因は明らかではないが、脂肪分解の障害による代償反応として褐色脂肪組織の機能亢進が生じ、エネルギー消費が亢進することが指摘されている。また、高脂肪食負荷時のインスリン抵抗性に関しては両遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて良好である。

MGAT2、DGAT1は小腸に発現が高く、その機能欠損は脂質吸収の障害をきたし、肥満の進行が抑制される。MGAT2欠損マウス、DGAT1欠損マウスともに高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性は野生型マウスに比べて生じにくい。

ATGL : adipose tissue triglyceride lipase, HSL : hormone-sensitive lipase, DGAT1 : diacylglycerol acyltransferase 1, DGAT2 : diacylglycerol acyltransferase 2, MGAT1 : monoacylglycerol acyltransferase 1, MGAT2 : monoacylglycerol acyltransferase 2, MGL : monoacylglycerol lipase

(A)

脂質	極性	SRM トランジション	コリジョンエネルギー (eV)
32:0 DG	positive	586 → 313	−18
34:1 DG	positive	612 → 313	−21
36:2 DG	positive	638 → 339	−23
38:4 DG	positive	662 → 341	−18
38:4 DG−d8	positive	670 → 341	−24
EPA	negative	301 → 257	10
EPA−d5	negative	306 → 262	11
DHA	negative	327 → 229	12
DHA−d5	negative	332 → 288	11
AA	negative	303 → 303	8
AA−d8	negative	311 → 311	7
OA	negative	281 → 281	11
16:0 MG	negative	329 → 253	12
17:0 MG	negative	343 → 269	15
18:1 MG	negative	355 → 281	13
18:2 MG	negative	353 → 279	11
20:4 MG	negative	377 → 303	10
20:4 MG−d8	negative	385 → 311	12

(B)

脂質	極性	SRM トランジション	コリジョンエネルギー (eV)
Phosphatidylcholine (PC)	positive	$[M+H]^+$ → 184	−39
Phosphatidylethanolamine (PE)	positive	$[M+H]^+$ → $[M+H]^+$ −141	−25
Phosphatidylinositol (PI)	negative	$[M-H]^-$ → 241	54
Phosphatidylserine (PS)	negative	$[M-H]^-$ → $[M-H]^-$ −87	28

図6. 選択反応モニタリング（Selected-Reaction Monitoring ；SRM）分析におけるコリジョンエネルギーおよびトランジションの条件
（A）MG、DG、FFAの条件を示した。
（B）リン脂質の条件を示した。

原料名	%
ミルクカゼイン	24.50
卵白粉末	5.00
L-シスチン	0.43
粉末牛脂（牛脂80%含有）	15.88
紅花油（高オレイン酸タイプ）	20.00
結晶セルロース	5.50
マルトデキストリン	8.25
乳糖	6.93
ショ糖	6.75
AIN93ビタミン混合	1.40
AIN93Gミネラル混合	5.00
重酒石酸コリン	0.36
第3ブチルヒドロキノン	0.002
計	100.00

一般成分値（飼料100g中）	g
水分	6.2
粗タンパク質	25.5
粗脂肪	32.0
粗繊維	2.9
粗灰分	4.0
可溶性無窒素物	29.4
カロリー (kcal/100g)	507.6
Fat kcal (%)	56.7

脂肪酸含有量（飼料100g中）	g	%
総量	31.90	100
飽和	7.10	22.3
不飽和一価	21.18	66.5
不飽和多価	3.30	10.4
ミリスチン酸（14:0）	0.35	1.1
ミリストレイン酸（14:1）	0.10	0.3
ペンタデカン酸（15:0）	0.03	0.1
パルミチン酸（16:0）	4.03	12.6
パルミトレイン酸（16:1）	0.38	1.2
ヘプタデカン酸（17:0）	0.13	0.4
ヘプタデセン酸（17:1）	0.10	0.3
ステアリン酸（18:0）	2.40	7.5
オレイン酸（18:1）	20.50	64.3
リノール酸（18:2）	3.26	10.2
リノレン酸（18:3）	0.06	0.2
アラキジン酸（20:0）	0.10	0.3
イコセン酸（20:1）	0.10	0.3
ベヘン酸（22:0）	0.06	0.2
未同定	0.26	0.8

図7.　本研究で用いた高脂肪食（HFD32）の組成

Gene	Sequence	
	Forward	Reverse
36B4	5'-gtcctggcattgtctgtggag-3'	5'-gactcttcctttgcttcagctttg-3'
Abhd6	5'-caagatcaaggtcccgacaca-3'	5'-ccgaatggccacagttttcc-3'
Abhd12	5'-caaagtccagtttatccccttttcac-3'	5'-agtctcagtgctggcgttcc-3'
Adrb3	5'-cctgttgaagccaggcagag-3'	5'-ggggcaaccagtcaagaaga-3'
Atgl	5'-tgaaagagcagacgggtagca-3'	5'-agtggcacagagggcagaga-3'
Cd36	5'-caagccagctagaaaaatagaagca-3'	5'-gcaacaaacatcaccactccaa-3'
Cd68	5'-ctccctgtgtgtctgatcttgct-3'	5'-ctgtgctttctgtggctgtaggt-3'
Cnr1	5'-cgtgttccaccgcaaagatag-3'	5'-gcaatagtccacatcaagcaaaag-3'
Cpt-1b	5'-gatgatggctacggggtctct-3'	5'-aacagtgcttggcggatgtg-3'
Dgat1	5'-ttttgacctcagccttcttcca-3'	5'-tgcattgccatagttcccttg-3'
Dgat2	5'-tgccctactccaagcccatc-3'	5'-gtcagttcacctccagcacctc-3'
Hsl	5'-cctctacacgtcacccatagtcaag-3'	5'-cggcagatcttctaccactttcag-3'
Ccl2	5'-ccactcacctgctgctactcatt-3'	5'-cagcacagacctctctcttgagc-3'
Mgat2	5'-catctccctccctctcttcca-3'	5'-ggtccacctcctcccttgag-3'
Mgll	5'-cagagaggccaacctacttttc-3'	5'-atgcgccccaaggtcatattt-3'
Tnfa	5'-ccagaccctcacactcagatcat-3'	5'-tggcaccactagttggttgtctt-3'
Ucp-1	5'-acacctgcctctctcggaaa-3'	5'-taggctgcccaatgaacact-3'

図8.　定量RT-PCRに用いた各遺伝子における特異的プライマーの配列

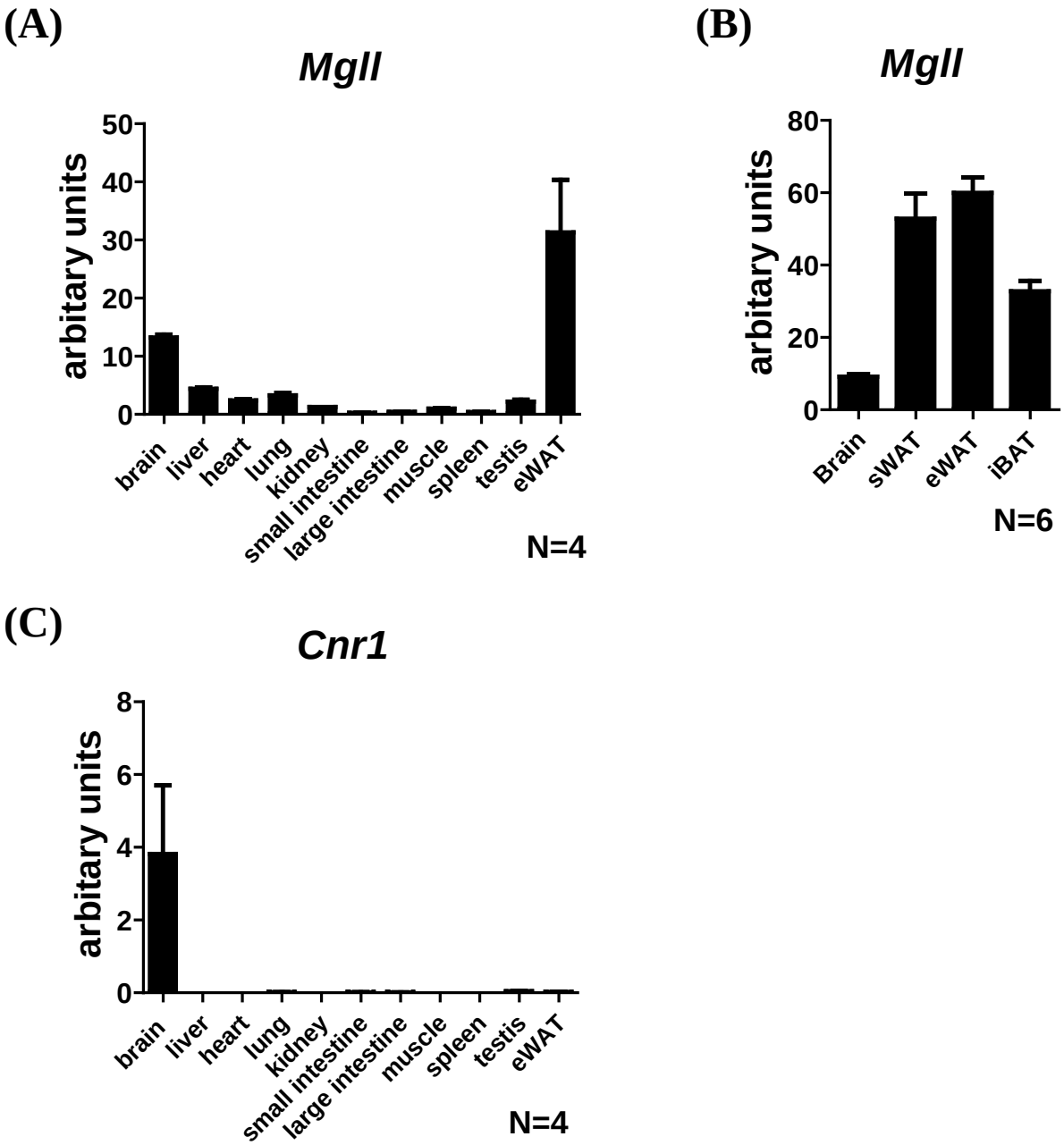


図9．CB1受容体およびMGLの臓器発現分布

MGL遺伝子（Mgll）（A、B）およびCB1受容体遺伝子（Cnr1）（C）のmRNA組織発現分布を定量RT-PCR法により測定した。発現量は36B4遺伝子を用いて標準化し、測定値は平均値±SEM（N=4-6）として表した。brain : 脳、liver : 肝臓、heart : 心臓、lung : 肺、kidney : 腎臓、small intestine : 小腸、large intestine : 大腸、muscle : 筋肉、spleen : 脾臓、testis : 精巣、WAT : 白色脂肪組織、sWAT : 鼠蹊部皮下白色脂肪組織、eWAT : 精巣上体周囲白色脂肪組織、iBAT : 肩甲骨間褐色脂肪組織

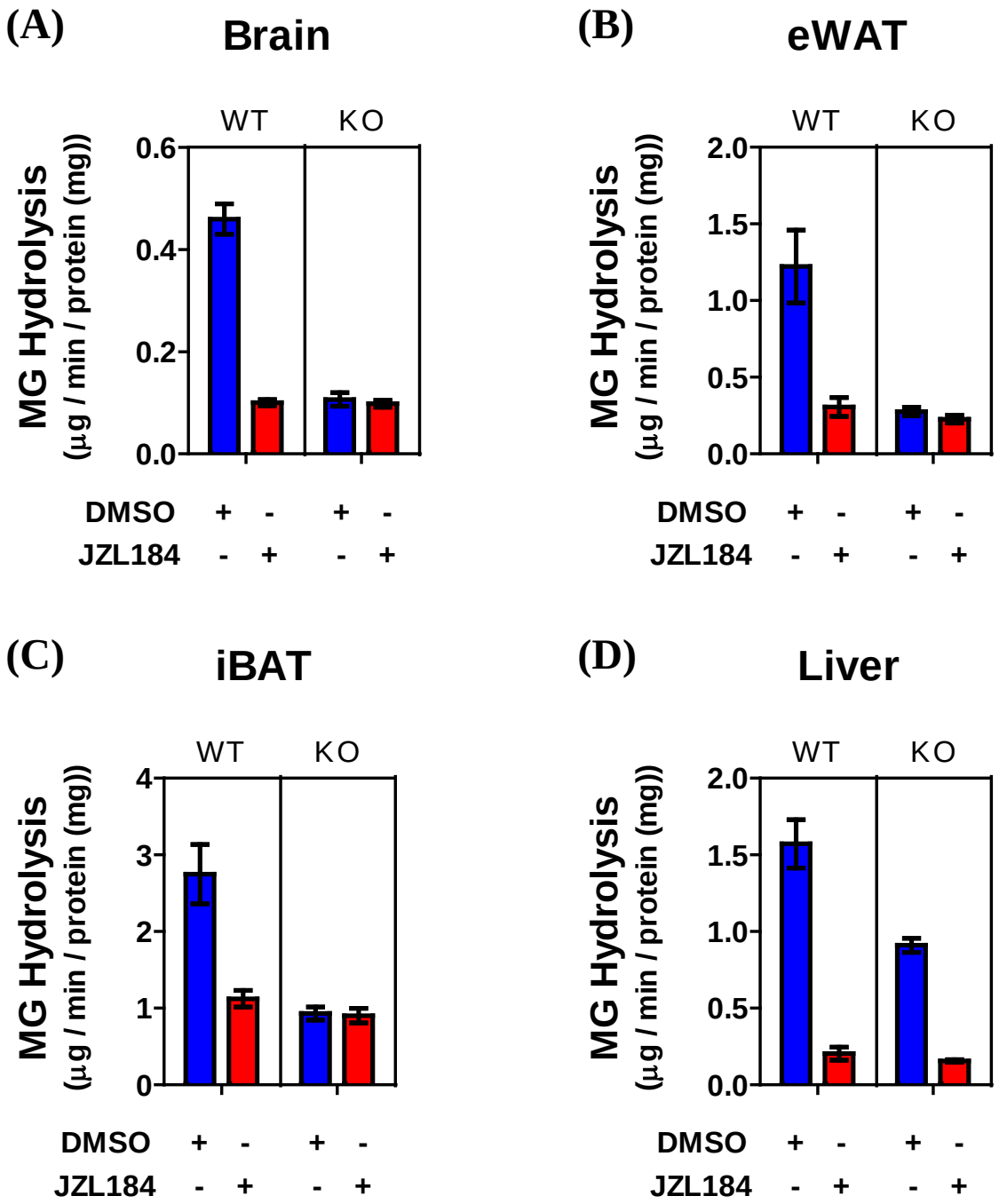


図10． 各臓器におけるモノアシルグリセロール加水分解活性

各組織におけるMG加水分解活性を調べた。
MGL選択的阻害剤、JZL184は1 μMでMG加水分解反応開始10分前に処理した。
酵素反応は組織から抽出したタンパク質（2 μg）を酵素源に2-AG（100 μM）を基質とし、37℃、10分間行った。MG加水分解活性（2-AG分解活性）は1 μgのタンパク質（酵素源）が1分間に産出したAA量（μg）として算出した。それぞれ（A）脳、（B）肝臓、（C）精巣上体周囲白色脂肪組織（eWAT）、（D）肩甲骨間褐色脂肪組織（iBAT）のMG加水分解活性を表した。測定値は平均値±SEMで示した。（N=5）

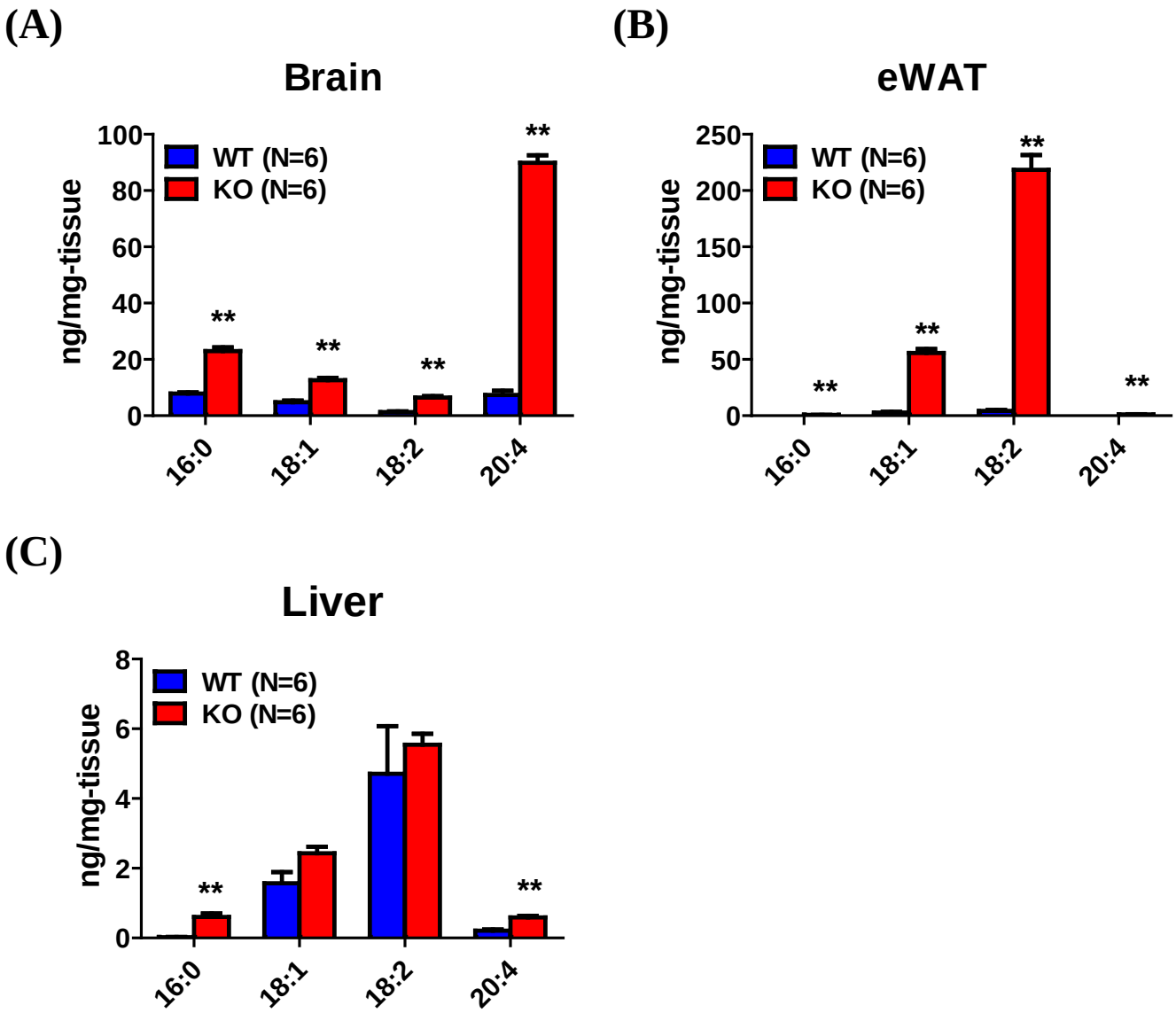


図11.　各臓器におけるモノアシルグリセロール（MG）量

各組織中のMGをLC-MS/MS法により定量し、野生型マウスとMGL欠損マウスを比較した。内部標準物質としては17:0 MGを用い、各MGの標準物質から検量線を作成し、組織中のMG量を算出した。

（A）脳組織中の各MG分子種の存在量。（B）精巣上体周囲白色脂肪組織（eWAT）組織中の各MG分子種の存在量。（C）肝臓組織中の各MG分子種の存在量。測定値は平均値±SEMで示した。（N=6）、**, $p<0.01$, Mann-whitney U-test

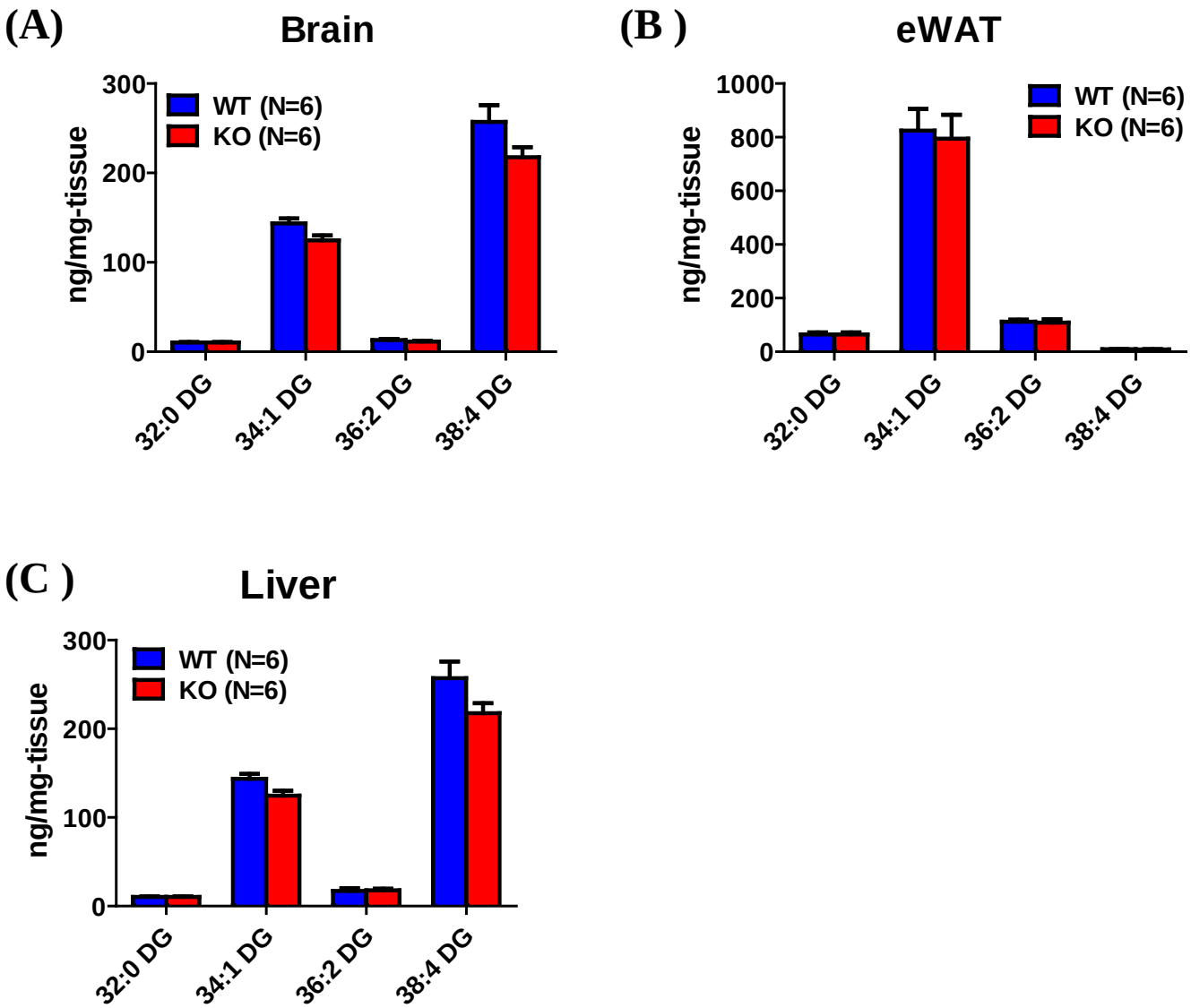


図12. 各臓器におけるジアシルグリセロール（DG）量

各組織中のDGをLC-MS/MS法により定量し、野生型マウスとMGL欠損マウスを比較した。内部標準物質としては38:4-d8 DGを用い、各DGの標準物質から検量線を作成し、組織中のDG量を算出した。

（A）脳組織中の各DG分子種の存在量。（B）精巣上体周囲白色脂肪組織（eWAT）組織中の各DG分子種の存在量。（C）肝臓組織中の各DG分子種の存在量。測定値は平均値±SEMで示した。（N=6）、**, $p<0.01$, Mann-whitney U-test

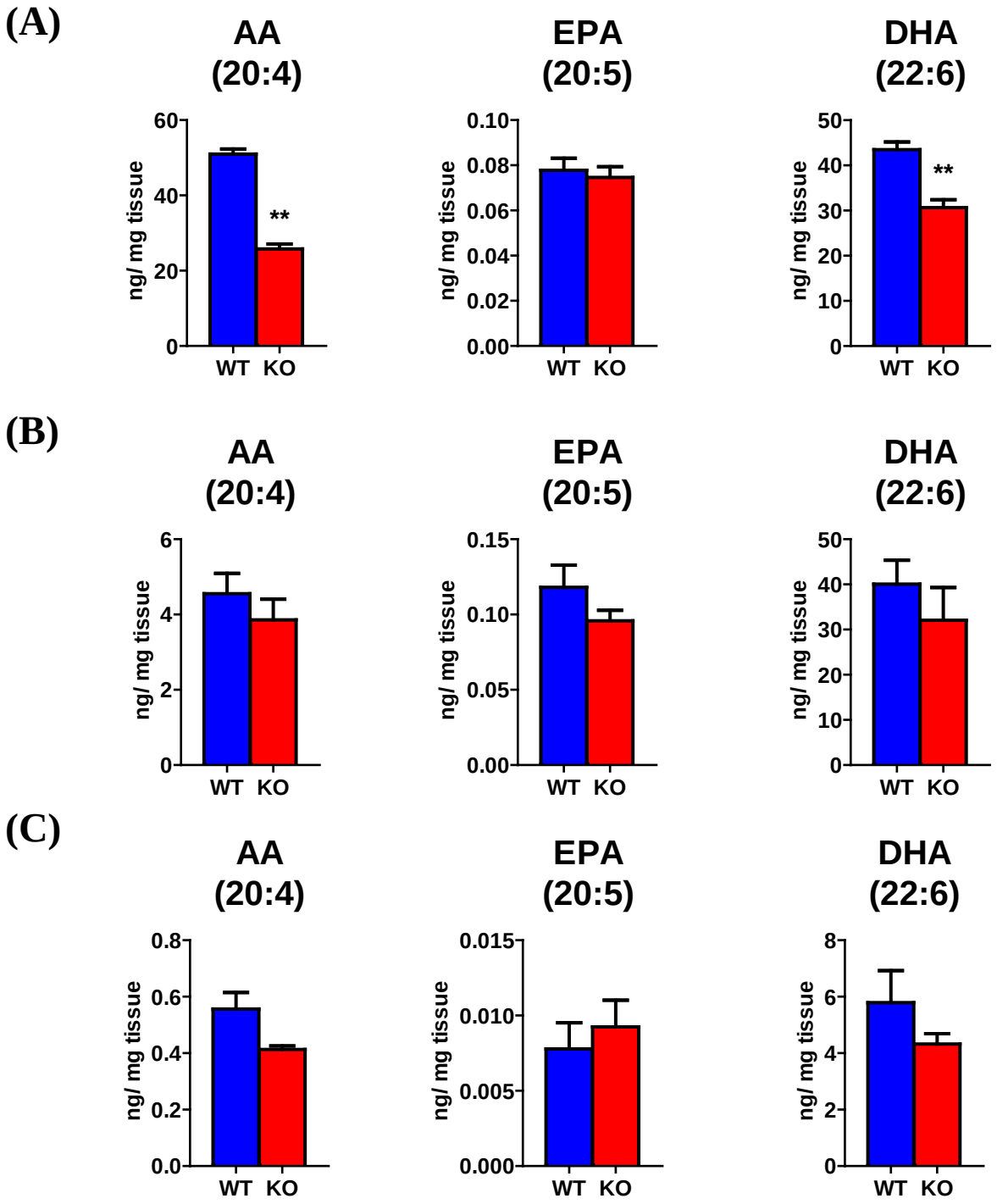


図13．各臓器における遊離脂肪酸（FFA）量

各組織中のFFAをLC-MS/MS法により定量し、野生型マウスとMGL欠損マウスを比較した。内部標準物質としてはそれぞれAA-d8、EPA-d5、DHA-d5を用い、各FFAの標準物質から検量線を作成し、組織中のFFA量を算出した。

（A）脳組織中の各FFA分子種の存在量。（B）精巣上体周囲白色脂肪組織（eWAT）組織中の各FFA分子種の存在量。（C）肝臓組織中の各FFA分子種の存在量。測定値は平均値±SEMで示した。（N=6）、**, $p<0.01$, Mann-whitney U-test

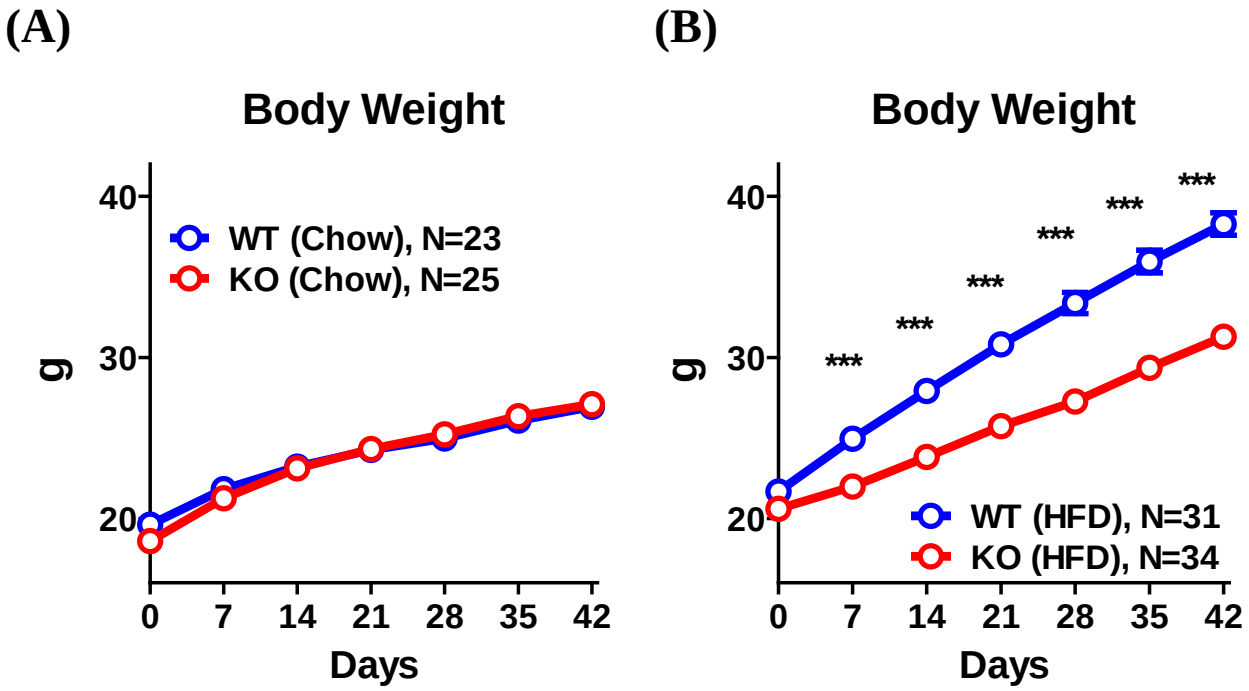


図14.　通常食および高脂肪食負荷時の体重増加の推移

6週令の野生型マウスおよびMGL欠損マウスに（A）通常食、もしくは（B）高脂肪食を与えた際の体重増加の推移を示した。体重測定は高脂肪食負荷開始より6週間継続して行った。（A）通常食（MF：3.59kcal）での飼育時の体重増加を測定した。（平均値±SEM、N=23-25）（B）高脂肪食（HFD32：5.07kcal）負荷時の体重増加を測定した。（平均値±SEM、N=31-34）***, $p<0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

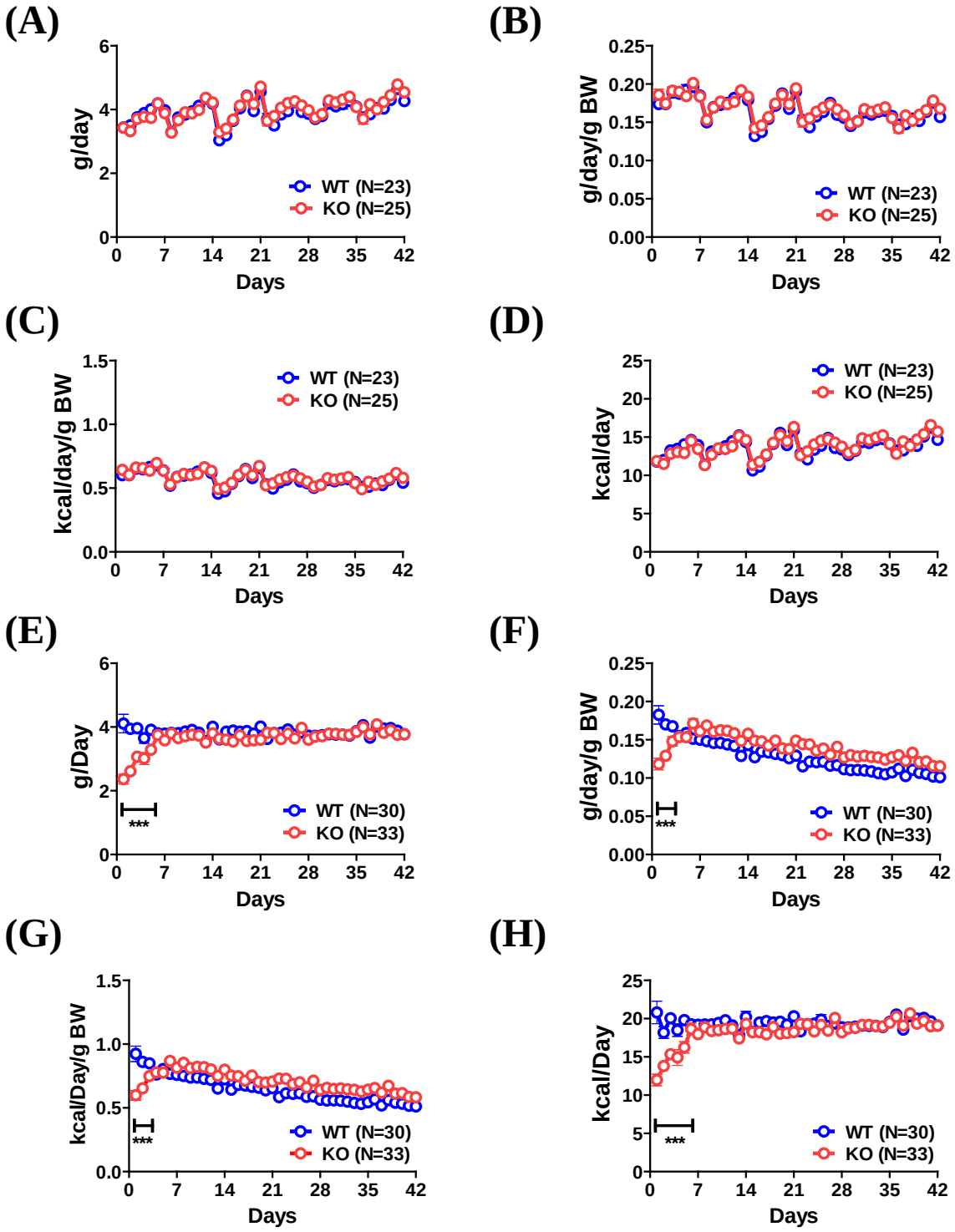


図15.　通常食もしくは高脂肪食で飼育した際の摂餌量

（A-D）通常食（MF：3.59kcal）で飼育時の1日当たりの野生型およびMGL欠損マウスの摂餌量。同一データを（A）：g/Day、（B）：g/Day/BW.g、（C）：kcal/Day/BW.g、（D）：kcal/Day で表示した。測定値は平均値±SEMで示した。（N=23-25）

（E-H）高脂肪食（HFD32：5.07kcal）負荷時の1日当たりの野生型およびMGL欠損マウスの摂餌量。同一データを（E）：g/Day、（F）：g/Day/BW.g、（G）：kcal/Day/BW.g、（H）：kcal/Day で表示した。測定値は平均値±SEMで示した（N=30-33）。***, $p<0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

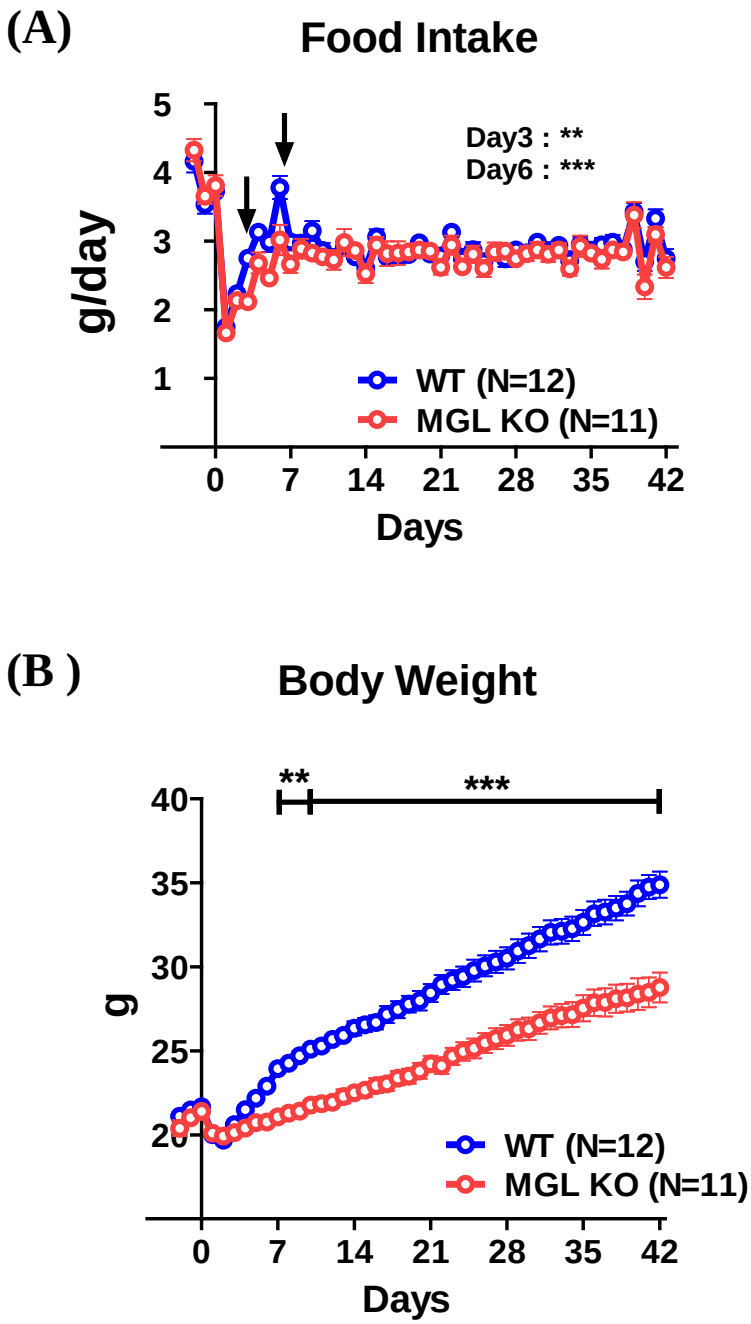


図16．摂餌制限（Pair-feeding）条件下での高脂肪食による体重増加の比較

野生型とMGL欠損マウスの摂餌量を同等に調節した際の、高脂肪食負荷による体重増加の推移を示した。

（A）摂餌制限により野生型とMGL欠損マウスで揃えた時の摂食量を示した。（平均値±SEM、N=11-12）、**, p<0.01, ***, p<0.001, , two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

（B）摂食量を野生型とMGL欠損マウスで揃えた時の体重増加を示した。（平均値±SEM、N=11-12）、**, p<0.01, ***, p<0.001, , two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

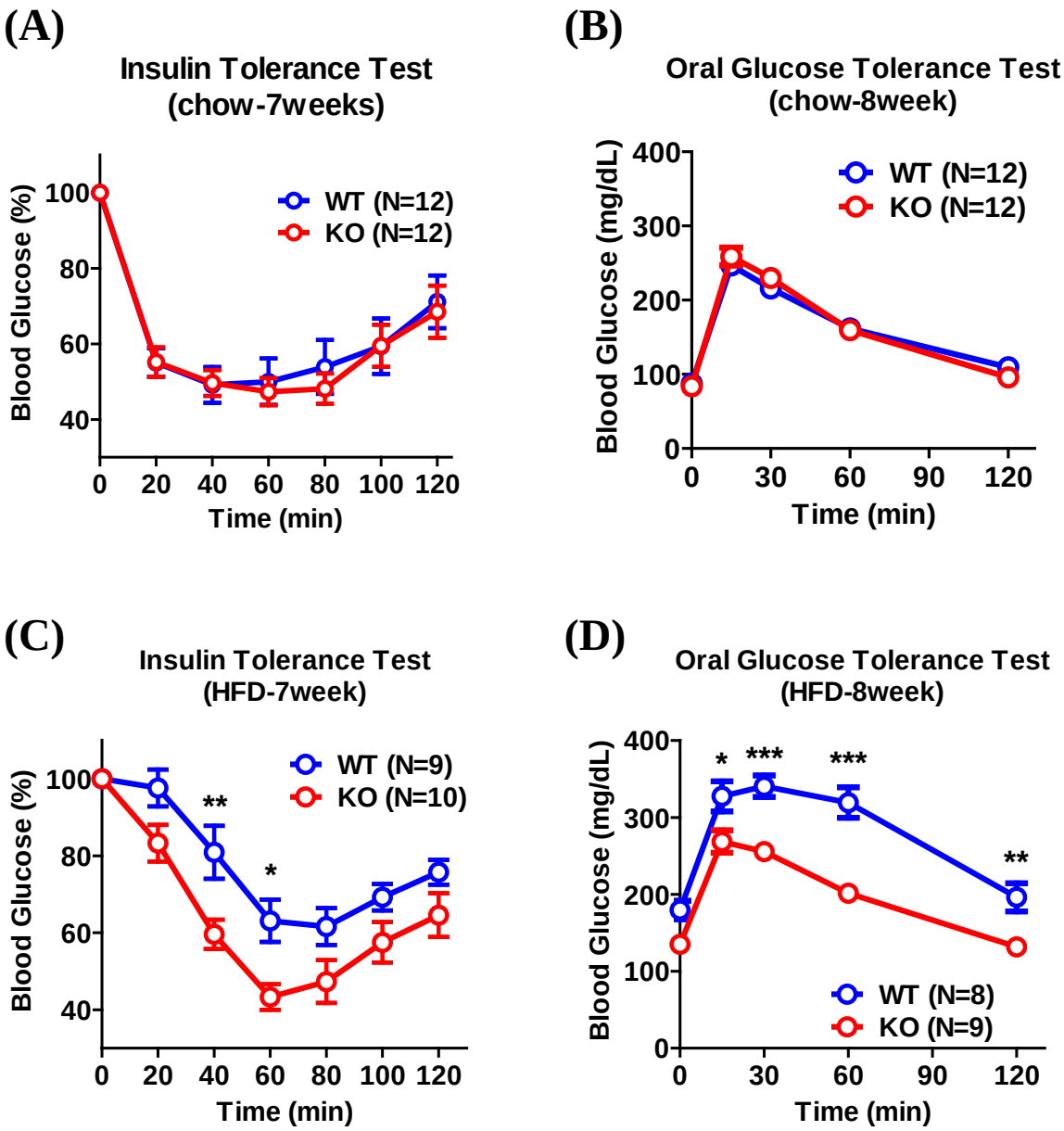


図 17. 通常食および高脂肪食負荷時の耐糖能の評価

通常食負荷時の（A）インスリン抵抗性試験（平均値±SEM、N=12）、および（B）経口グルコース耐性試験（平均値±SEM、N=12）の結果を示した。また、高脂肪食負荷時の（C）インスリン抵抗性試験（平均値±SEM、N=9-10）、および（D）経口グルコース耐性試験（平均値±SEM、N=8-9）の結果を示した。インスリン抵抗試験はマウスを4時間絶食させた後、インスリン（0.75U/kg）を腹腔内投与し、その後の血糖値を測定した。経口グルコース負荷試験はマウスを16時間絶食させた後、グルコース（1.5 g/kg）を経口投与し、その後の血糖値を測定した。

*, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

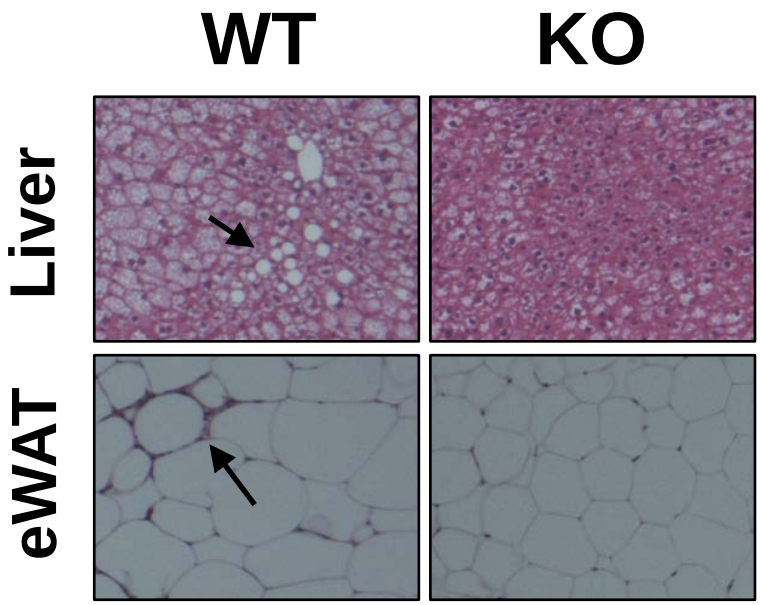


図18.　高脂肪食8週間負荷時の肝臓および精巣上体周囲白色脂肪組織のHE染色像
上段：肝臓のHE染色像。野生型マウスでは高脂肪食負荷により肝臓に白く抜けた脂肪滴（矢印）が確認できるが、MGL欠損マウスではその所見が顕著ではない。
下段：精巣上体周囲白色脂肪組織のHE染色像。野生型マウスでは高脂肪食負荷により脂肪細胞の肥大化やマクロファージの浸潤がみられるが（矢印）、MGL欠損マウスではその所見が顕著ではない。

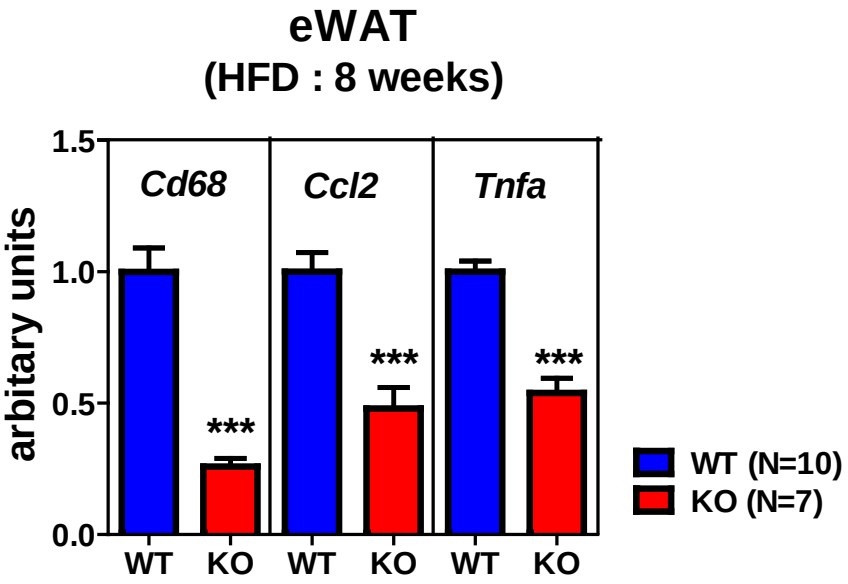


図19.　高脂肪食8週間負荷時の精巣上体周囲白色脂肪組織のmRNA発現量
高脂肪食を8週間負荷したマウスより脂肪組織（eWAT）を摘出し、各遺伝子についてmRNA発現量を定量RT-PCR法により定量した。いずれも、36B4の発現量値で標準化した値を示した（平均値±SEM、N=7-10）。***, $p<0.001$, Mann-whitney U-test

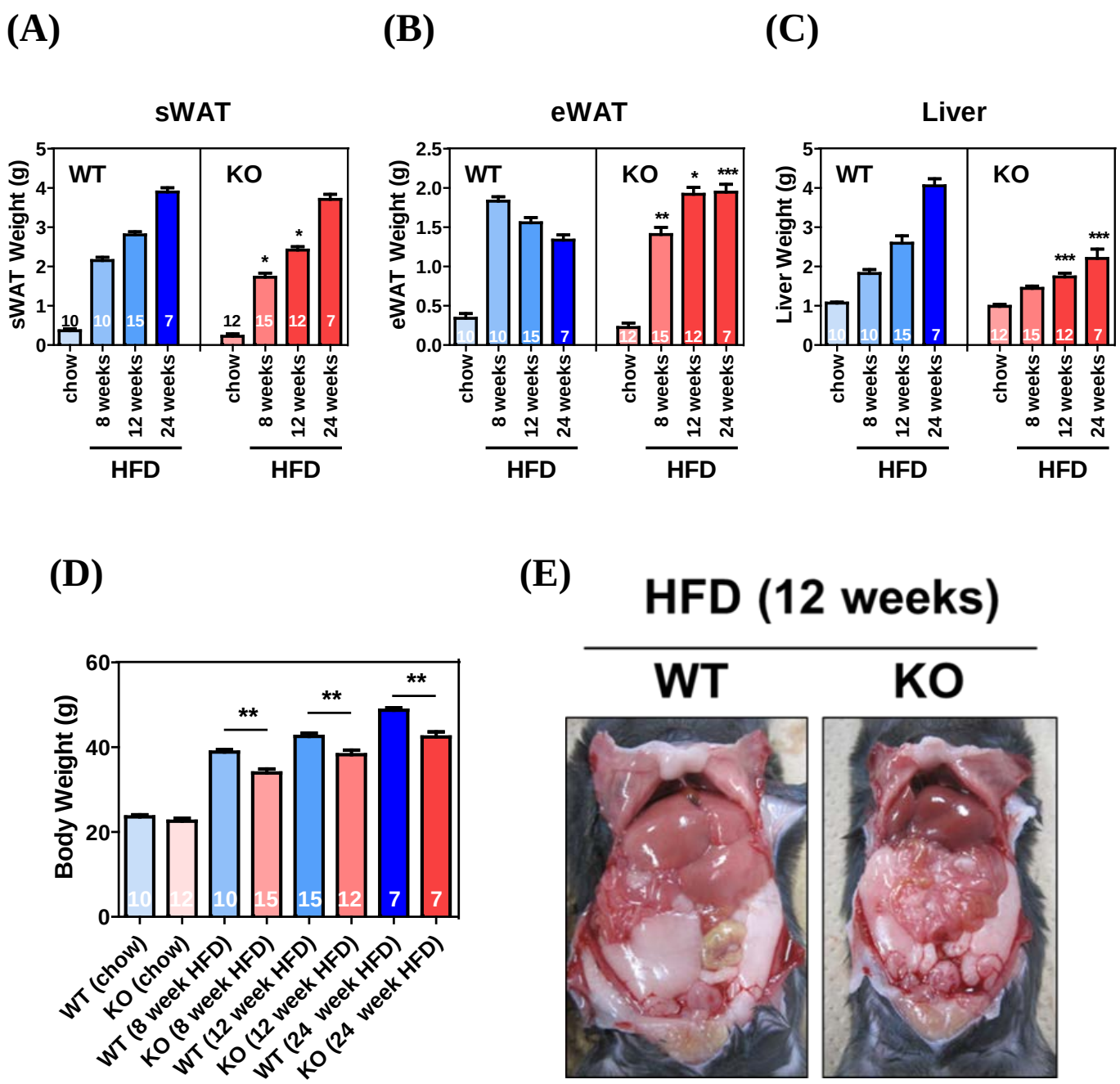


図 20.　通常食および高脂肪食負荷したマウスの絶食時における各組織重量

通常食で飼育したマウスおよび高脂肪食を8、12、24週間負荷したマウスの絶食時の体重および組織重量。(A)鼠蹊部皮下白色脂肪組織重量、(B)精巣上体周囲白色脂肪組織重量、(C)肝臓重量、(D)体重を示した。測定値は平均値±SEMで示した。(N=7-15)(E)高脂肪食12週間負荷時の写真を示した。野生型マウスとMGL欠損のそれぞれ対応週令について統計解析を行った。
*, p<0.5, **, p<0.01, ***, p<0.001, Mann-whitney U-test

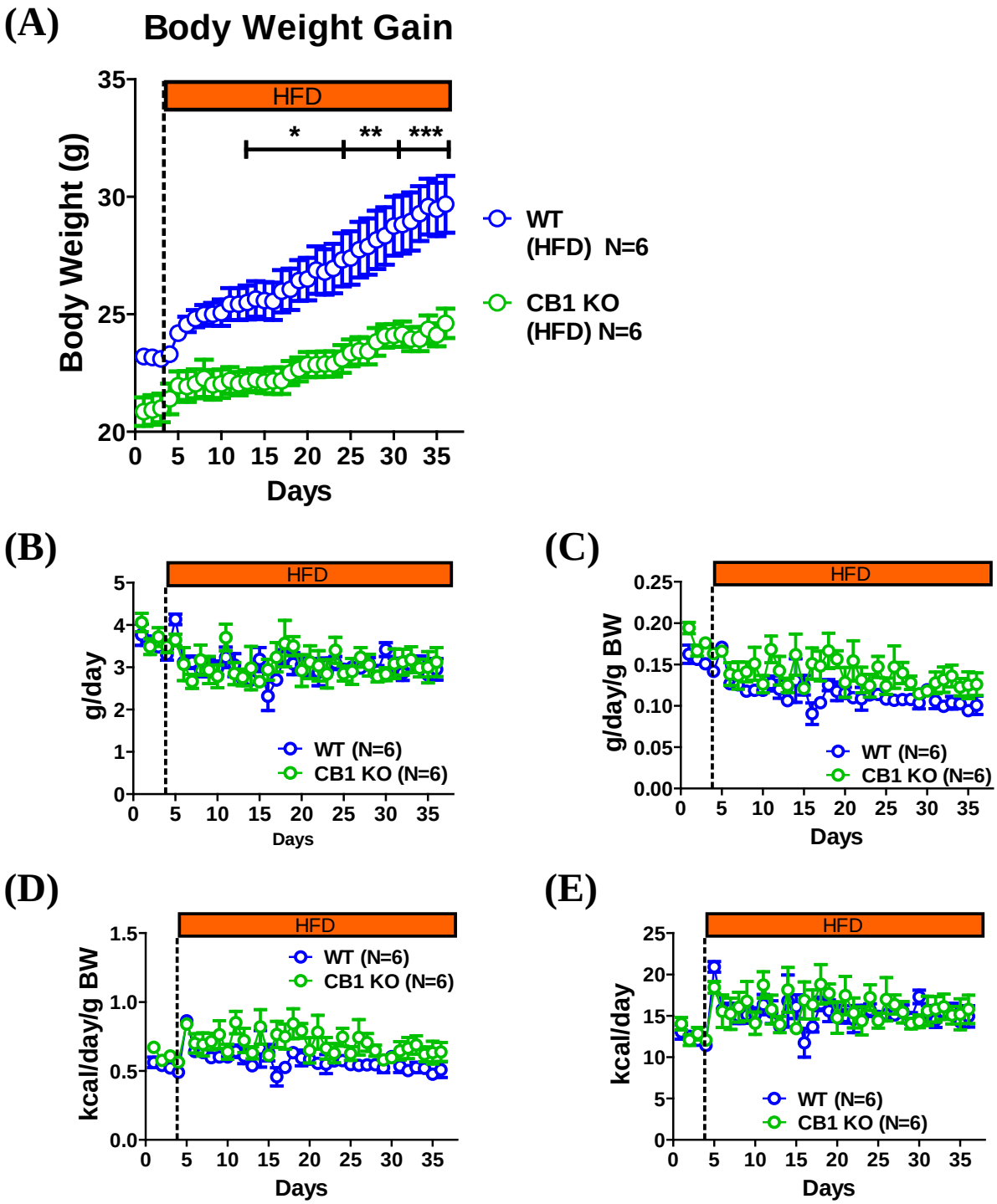


図21. 通常食(Day1-4)および高脂肪食負荷時(Day5-36)の体重増加、摂餌量の推移

野生型マウスおよびCB1受容体欠損マウスに通常食(MF:3.59kcal、Day1-4)および高脂肪食(HFD32:5.07kcal 、Day5-36)を与えた。

(A) 通常食および高脂肪食で飼育時の体重増加を示した。測定値は平均値±SEM(N=6)で示した。*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

(B-E)通常食および高脂肪食で飼育時の1日当たりの野生型およびCB1受容体欠損マウスの摂餌量。同一データを(B):g/Day、(C):g/Day/BW.g、(D):kcal/Day/BW.g、(E):kcal/Day で表示した。測定値は平均値±SEM(N=6)で示した。

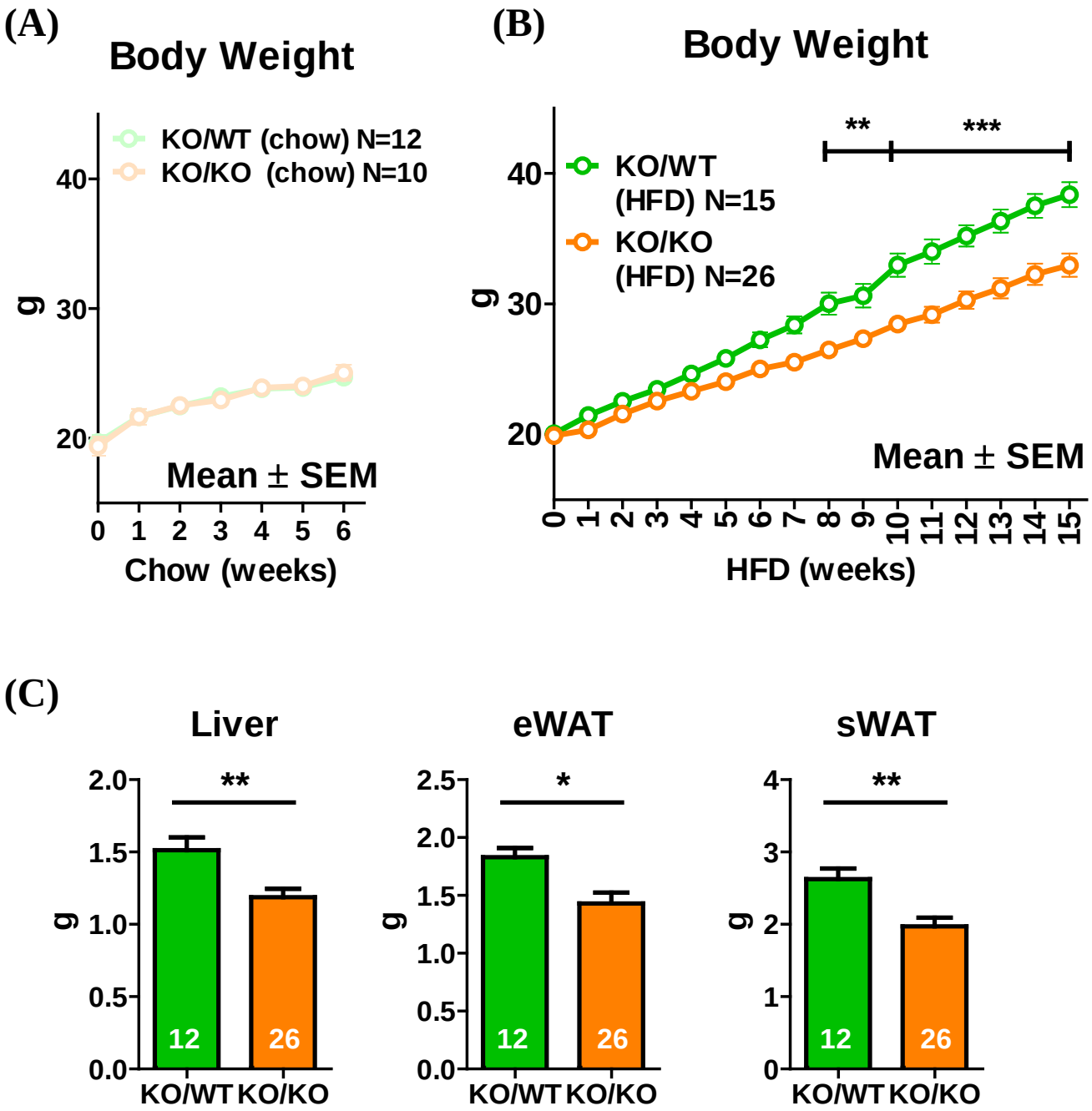


図22.　通常食および高脂肪食負荷時の体重増加、各組織重量の推移

CB1受容体欠損マウス（KO/WT）およびCB1受容体/MGL二重欠損マウス（KO/KO）に（A)通常食（MF：3.59kcal）および（B）（C）高脂肪食（HFD32：5.07kcal）を与えた。

（A) 通常食で飼育した時の体重増加を示した。測定値は平均値±SEM（N=15-26）で示した。

（B）高脂肪食負荷時の体重増加を示した。。測定値は平均値±SEM（N=10-12）で示した。

**, p<0.01, ***, p<0.001, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

（C）高脂肪食16週間負荷時の肝臓、精巣上体周囲脂肪組織（eWAT）、鼠蹊部皮下脂肪組織（sWAT）組織重量を示した。測定値は平均値±SEMで示した（N=12-26）。*, p<0.05, **, p<0.01, Mann-whitney U-test

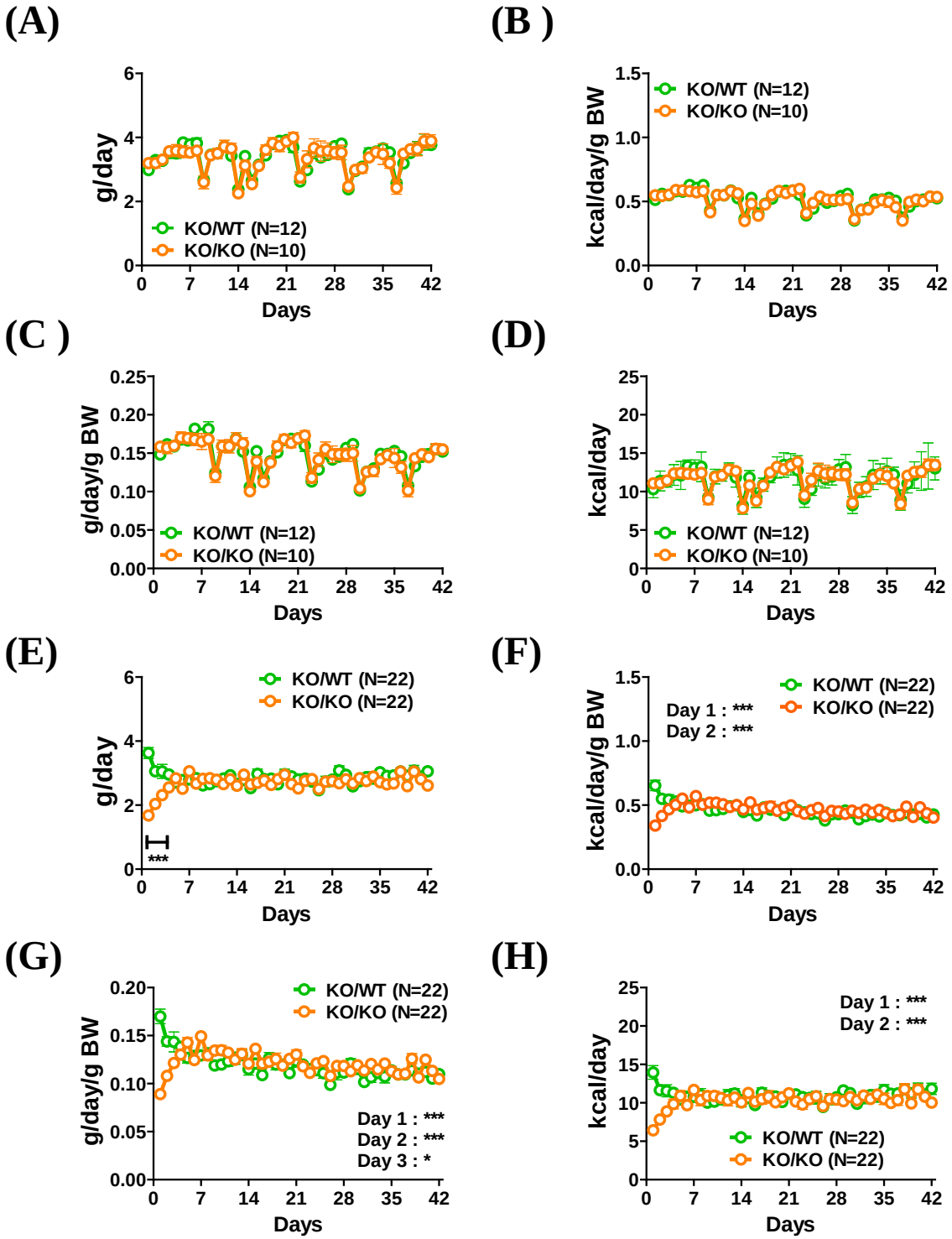


図23. 通常食もしくは高脂肪食で飼育した際の摂餌量

（A-D）通常食（MF：3.59kcal）で飼育時の1日当たりCB1受容体欠損（KO/WT）マウスおよびCB1受容体/MGL二重欠損（KO/KO）マウスの摂餌量。同一データを（A）：g/Day、（B）：g/Day/BW.g、（C）：kcal/Day/BW.g、（D）：kcal/Day で表示した。測定値は平均値±SEMで示した。（N=10-12）

（E-H）高脂肪食（HFD32：5.07kcal）負荷時の1日当たりCB1欠損（KO/WT）マウスおよびCB1受容体/MGL二重欠損（KO/KO）マウスの摂餌量。同一データを（E）：g/Day、（F）：g/Day/BW.g、（G）：kcal/Day/BW.g、（H）：kcal/Day で表示した。測定値は平均値±SEMで示した（N=22）。***, $p<0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

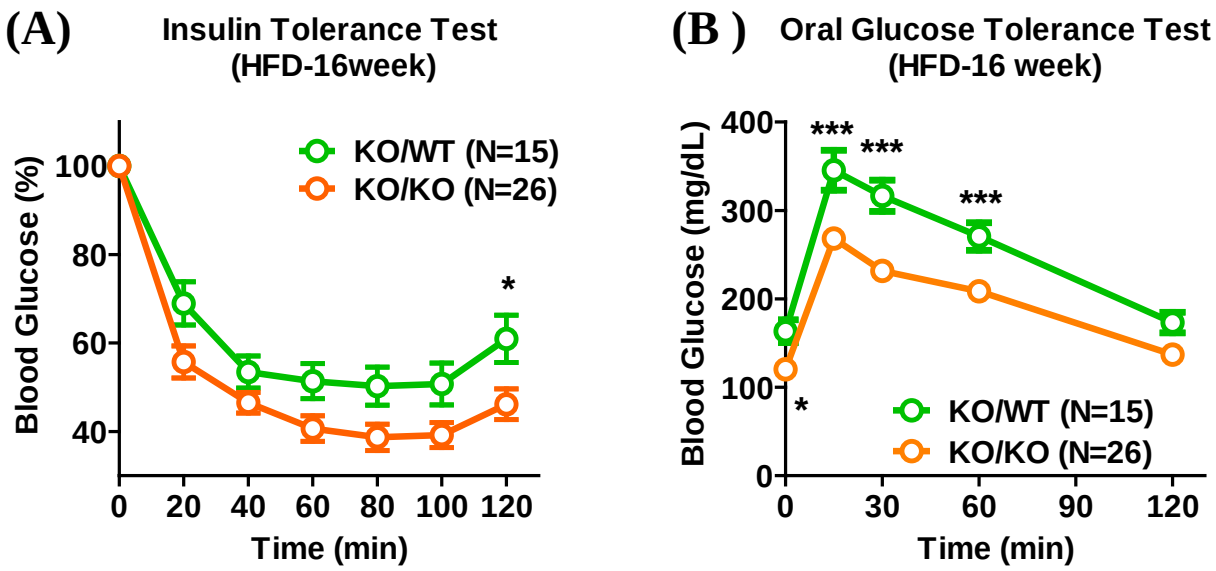
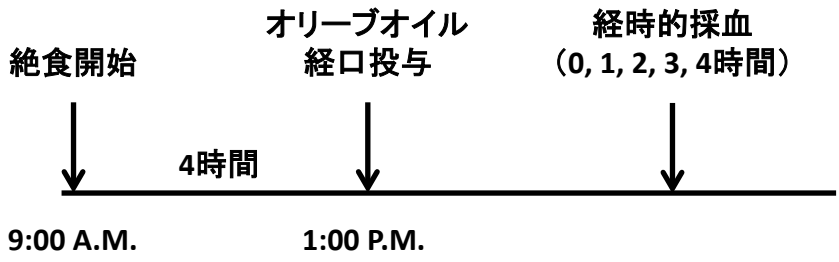


図 24. 高脂肪食16週間負荷時の耐糖能の評価

高脂肪食16週間負荷時の（A）インスリン抵抗性試験および（B）経口グルコース耐性試験の結果を示した。インスリン抵抗試験はマウスを4時間絶食させた後、インスリン（0.75U/kg）を腹腔内投与し、その後の血糖値を測定した。経口グルコース負荷試験はマウスを16時間絶食させた後、グルコース（1.5 g/kg）を経口投与し、その後の血糖値を測定した。測定値は平均値±SEMで示した（N=15-26）。*, $p<0.05$, ***, $p<0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

(A)



(B)

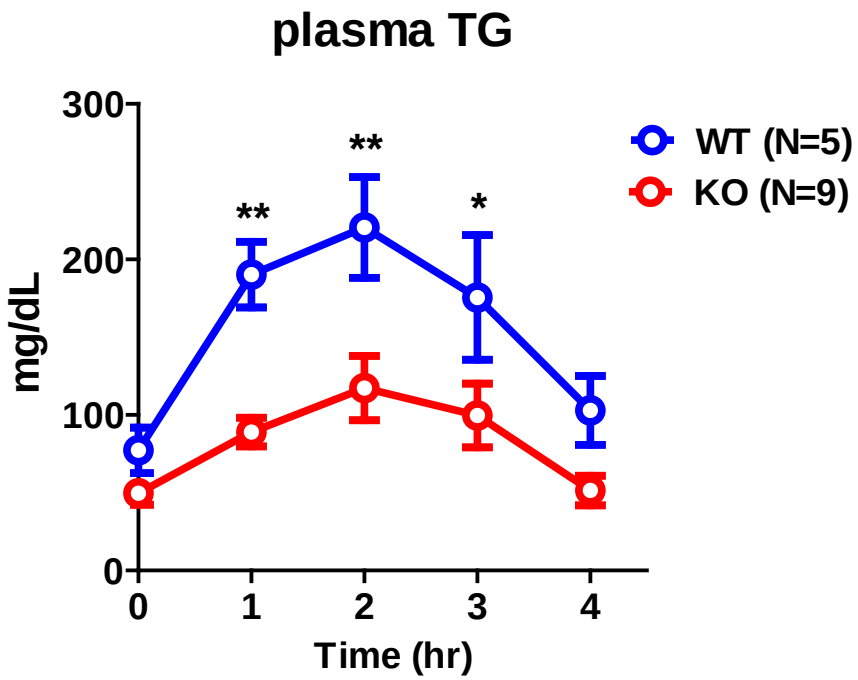


図25．経口脂肪負荷試験による脂質吸収能の評価
（A）本実験のプロトコールを示した。マウスを4時間絶食させた後、オリーブオイル200 μLを経口投与し、経時的に尾静脈より採血し、血中TG濃度を測定した。
（B）オリーブオイル経口投与後の血漿TG値の時間的推移。測定値は平均値±SEMで示した（N=5-9）。*, $p<0.05$, **, $p<0.01$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

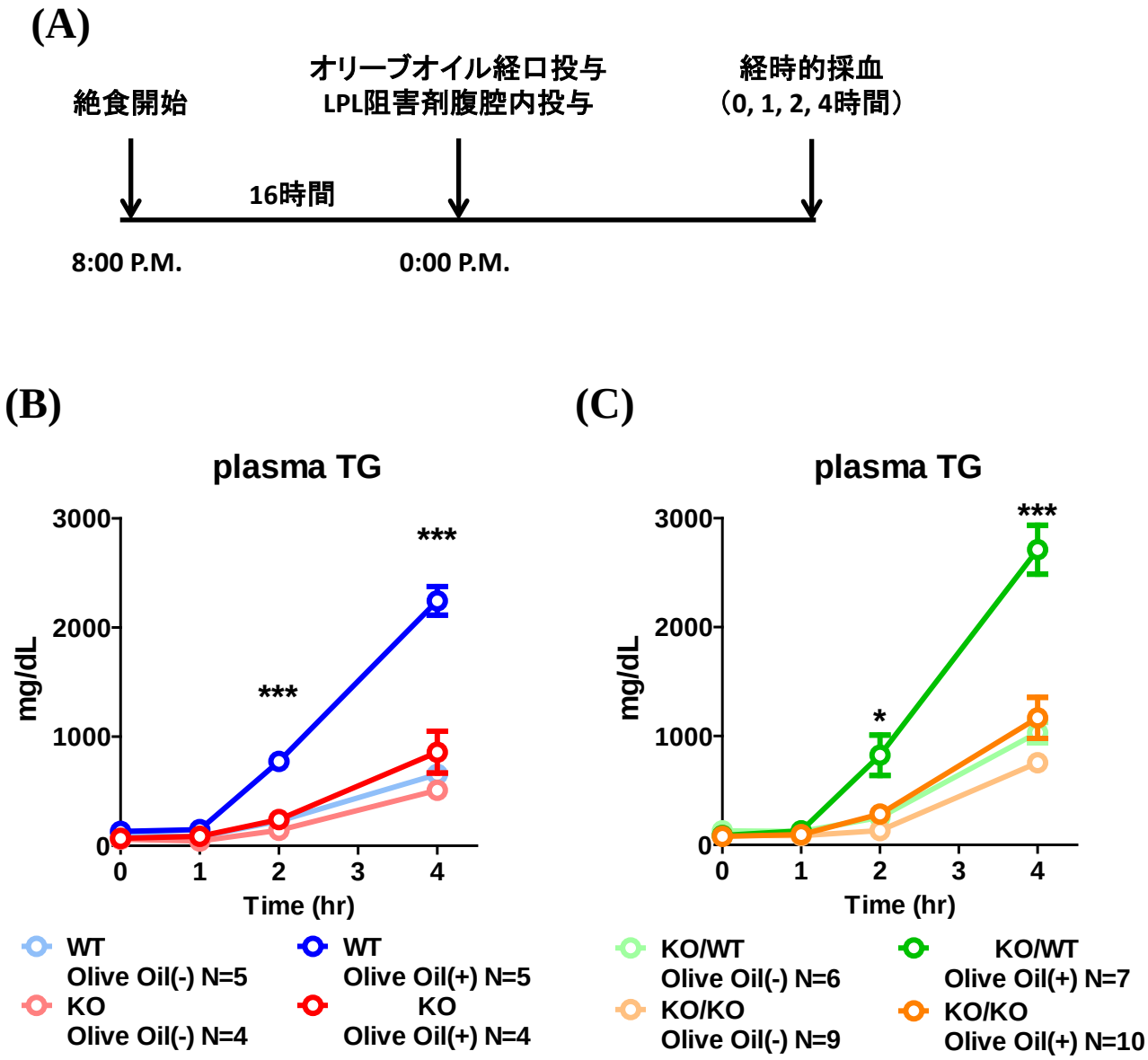


図26．LPL阻害剤処置下での経口脂肪負荷試験による脂質吸収能の評価

（A）本実験のプロトコールを示した。マウスを16時間絶食させた後、LPL阻害剤、tyloxapol（500 mg/kg）の腹腔内投与、オリーブオイル200 μLの経口投与を同時に行い、経時的に尾静脈より採血し、血中TG濃度を測定した。

（B）野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおけるオリーブオイル経口投与後の血漿TG値の時間的推移。測定値は平均値±SEMで示した（N=4-5）。

（C）CB1受容体欠損マウス（KO/WT）およびCB1受容体/MGL二重欠損マウス（KO/KO）におけるオリーブオイル経口投与後の血漿TG値の時間的推移。測定値は平均値±SEMで示した（N=6-10）。

*, $p<0.05$, ***, $p<0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

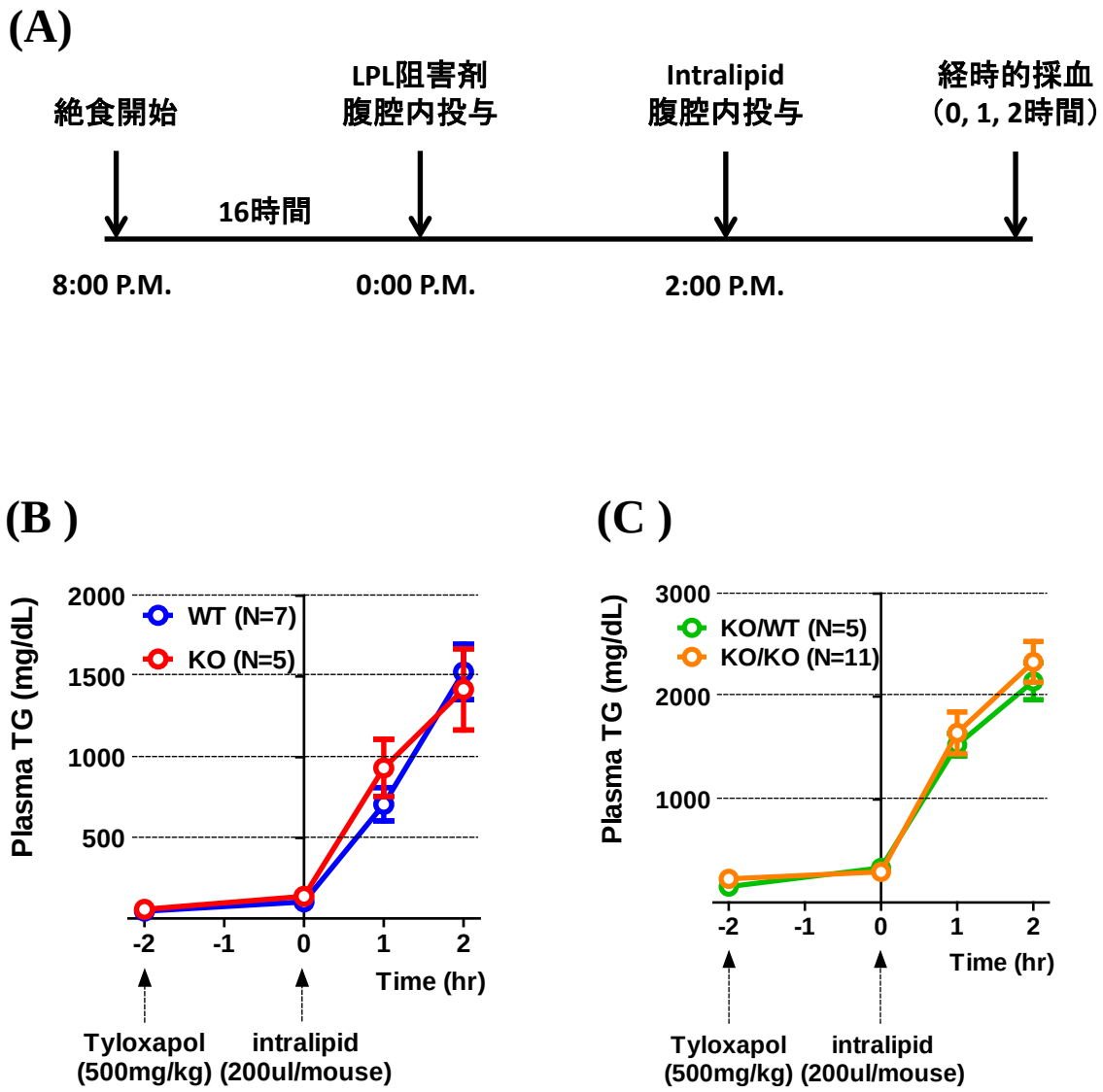


図27．LPL阻害剤処置下での腹腔脂肪負荷試験による脂質吸収能の評価
（A）本実験のプロトコールを示した。マウスを16時間絶食させた後、LPL阻害剤、tyloxapol（500 mg/kg）の腹腔内投与し、2時間後にIntralipid（20%TG溶液）を200 μL腹腔内投与し、経時的に尾静脈より採血し、血中TG濃度を測定した。
（B）野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおけるIntralipid腹腔内投与後の血漿TG値の時間的推移。測定値は平均値±SEMで示した（N=5-7）。
（C）CB1受容体欠損マウス（KO/WT）およびCB1受容体/MGL二重欠損マウス（KO/KO）におけるIntralipid腹腔内投与後の血漿TG値の時間的推移。測定値は平均値±SEMで示した（N=5-11）。

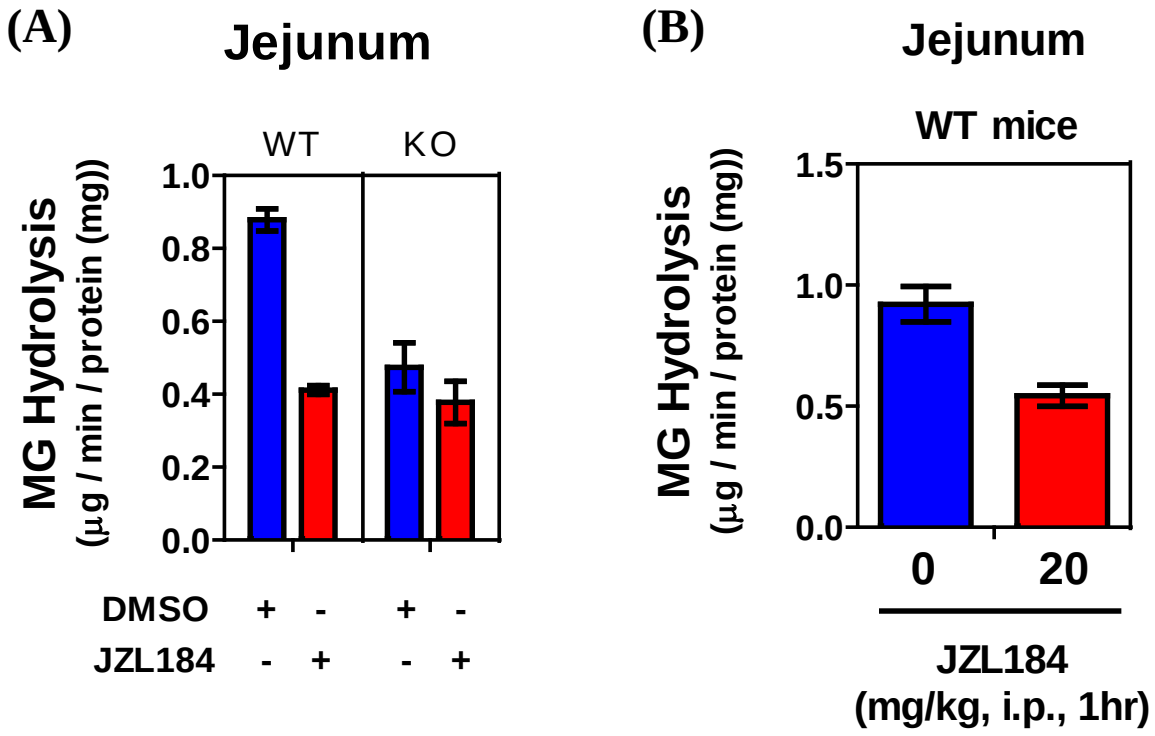


図28．空腸におけるモノアシルグリセロール加水分解活性の測定

空腸組織におけるMG加水分解活性を調べた。

（A）野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおける空腸組織中のMG加水分解活性とMGL選択的阻害剤による効果を調べた。

MGL選択的阻害剤、JZL184は1 μMで加水分解反応開始10分前に処理した。

（B）野生型マウスにMGL選択的阻害剤および対照群を投与した時のMG加水分解活性を調べた。

JZL184（20 mg/kg）を腹腔内投与し、1時間後に摘出した空腸を用いた。

酵素反応は組織から抽出したタンパク質（2 μg）を酵素源に2-AG（100 μM）を基質とし、37℃、10分間行った。MG加水分解活性（2-AG分解活性）は1 μgのタンパク質（酵素源）が1分間に産出したAA量（μg）として算出した。（平均値±SEM、N=6）。

(A)

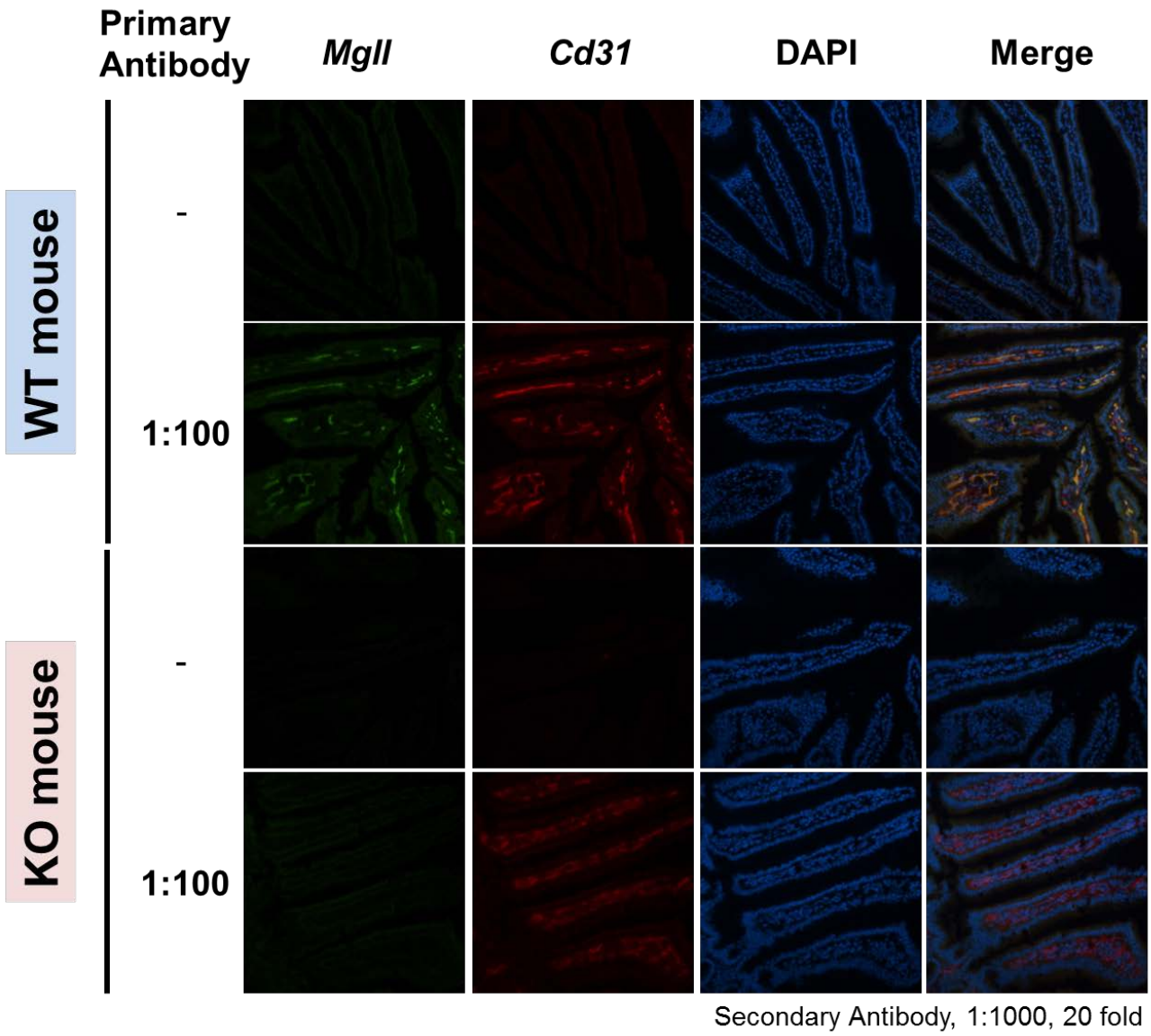


図29．空腸におけるMGLの免疫染色像
（A） MGLと血管内皮細胞マーカーであるCd31との共染色像を示した。
緑色：一次抗体としてrabbit anti-mMGL polyclonal antibody、二次抗体としてAlexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG antibodyを用いた染色像を示した。
赤色：一次抗体としてrat anti-mCD31 monoclonal antibody、二次抗体としてAlexa Fluor 546 Goat Anti-Rat IgG antibodyを用いた染色像を示した。
青色：DAPIによる核染色を示した。

(B)

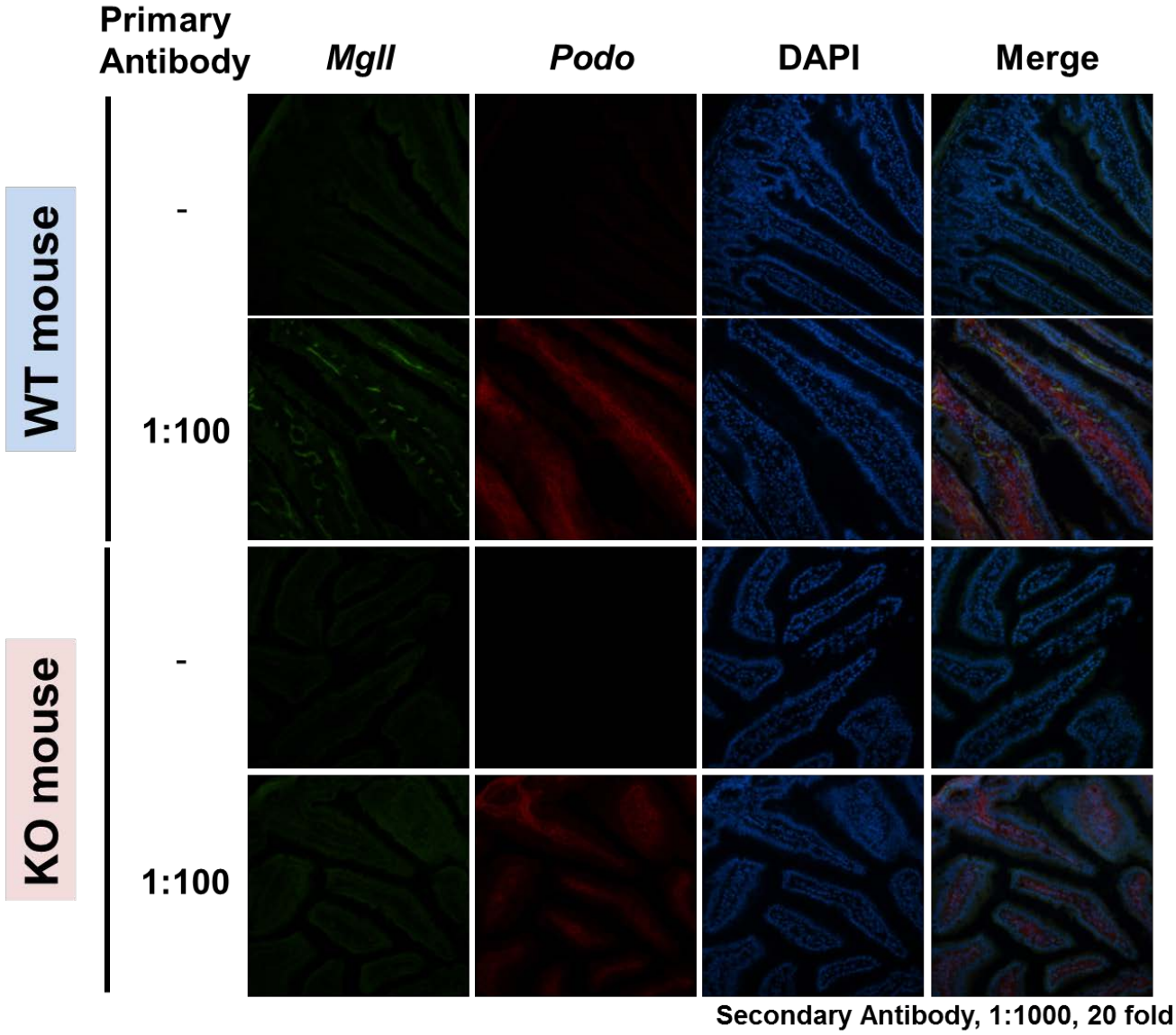


図29．空腸におけるMGLの免疫染色像（前頁のつづき）
（B） MGLとリンパ管内皮細胞マーカーであるPodoplaninとの共染色像を示した。
緑色：一次抗体としてrabbit anti-mMGL polyclonal antibody、二次抗体としてAlexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG antibodyを用いた染色像を示した。
赤色：一次抗体としてhamster anti-podoplanin monoclonal antibody、二次抗体としてAlexa Fluor 546 Goat Anti-Hamster IgG antibodyを用いた染色像を示した。
青色：DAPIによる核染色を示した。

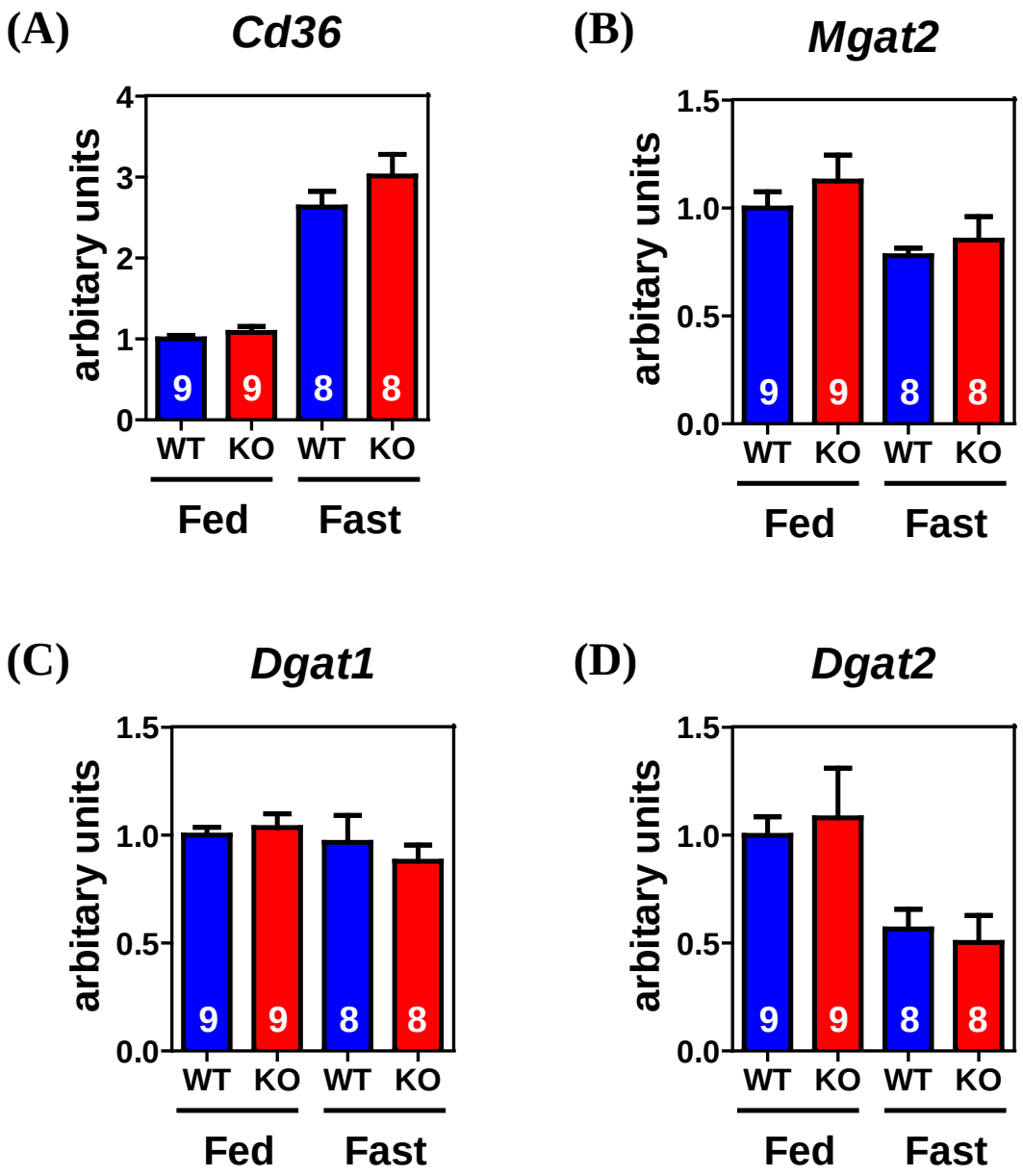


図30．摂食時および絶食時のマウス空腸での脂質吸収関連酵素のmRNA発現量の比較

摂食時および絶食時における空腸の脂質吸収に関わる酵素（A：CD36、B：MGAT2、C：DGAT1、D：DGAT2）のmRNA量を定量RT-PCR法によって定量した。発現量は36B4の発現量で正規化した値を示した。測定値は平均値±SEMで示した（N=8-9）。

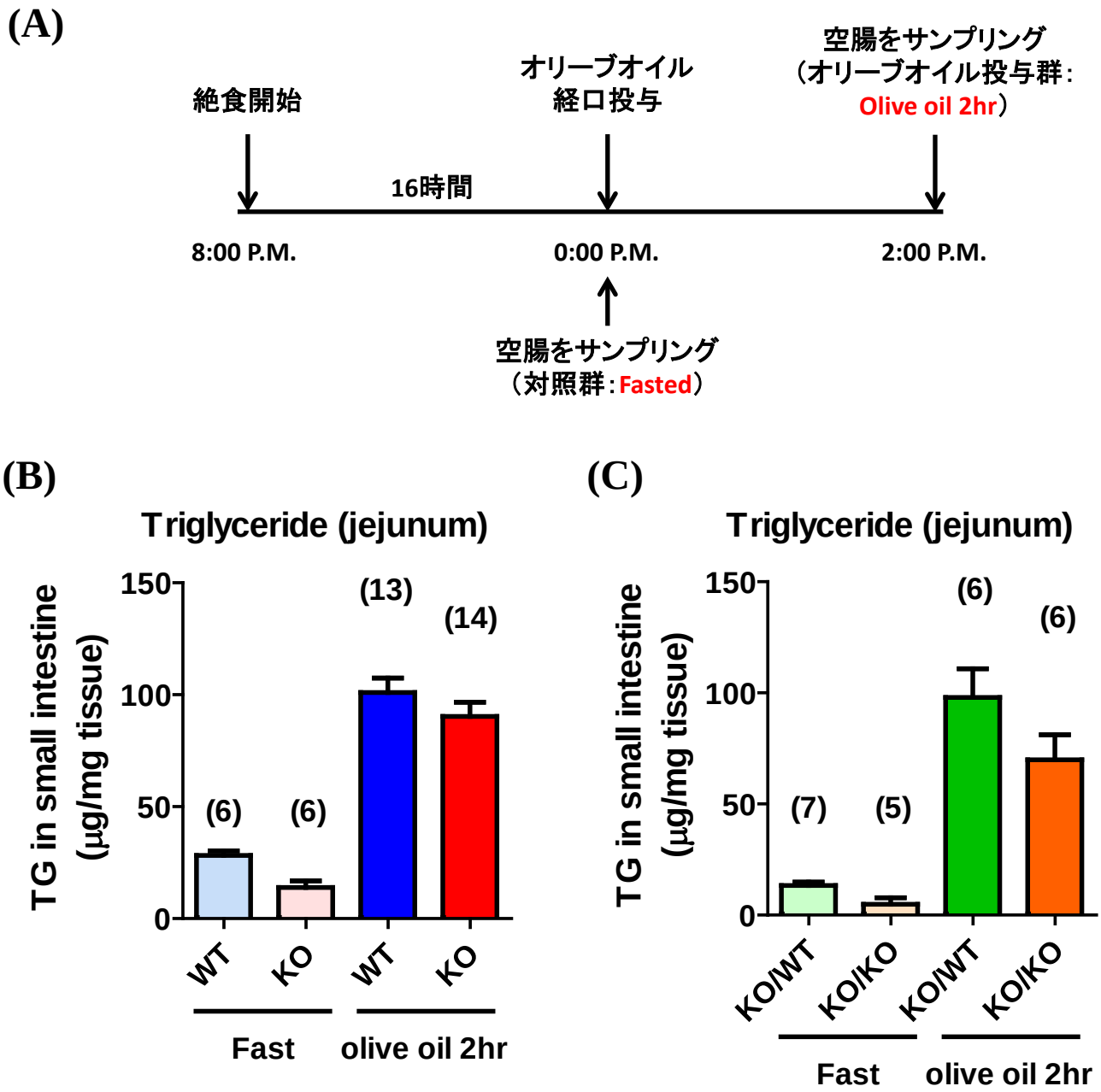


図 31．オリーブオイル経口投与による空腸組織中のTG量の変化
（A）本実験のプロトコールを示した。マウスを16時間絶食させた後、オリーブオイル200 μLを経口投与し、2時間後に空腸を摘出した。対照群はオリーブオイルを与えず、絶食16時間後に空腸を摘出した。摘出した空腸は脂質抽出後にTGを測定し、組織重量あたりのTG量を算出した。
（B）野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおけるオリーブオイル経口投与による空腸組織中のTG量を示した（平均値±SEM、N=6-14）。
（C）CB1受容体欠損マウス（KO/WT）およびCB1受容体/MGL二重欠損マウス（KO/KO）におけるオリーブオイル経口投与による空腸組織中のTG量を示した（平均値±SEM、N=5-7）。

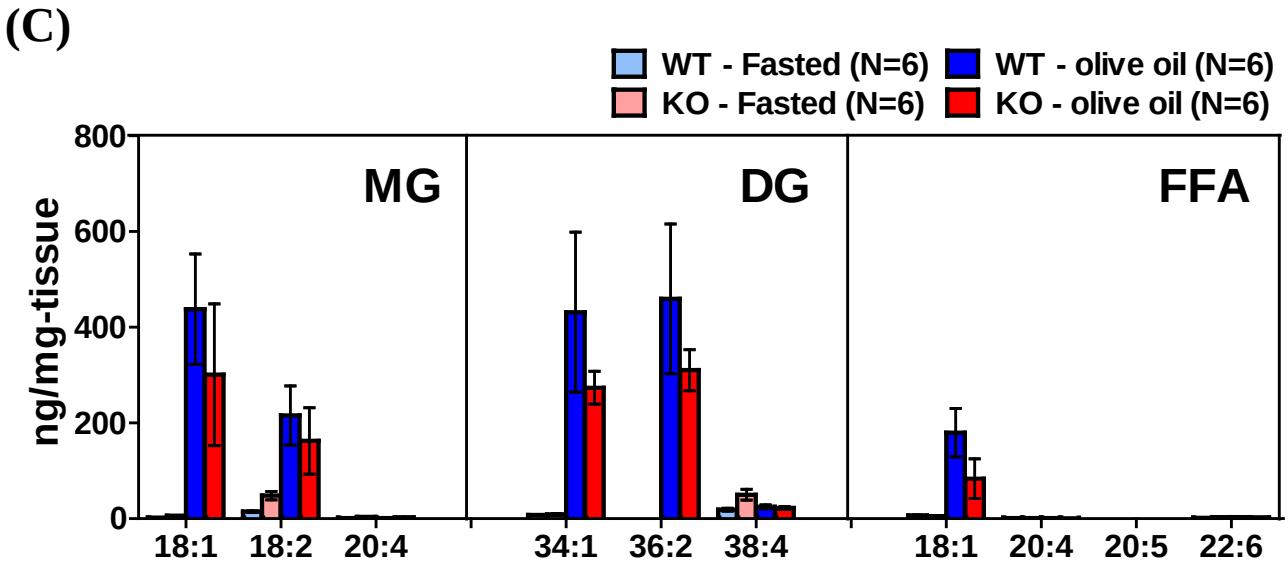


図 31．オリーブオイル経口投与による空腸組織中のMG、DG、FFA量の変化
（D）野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおけるオリーブオイル経口投与による空腸組織中のMG、DG、FFA量を示した（平均値±SEM、N=6）。

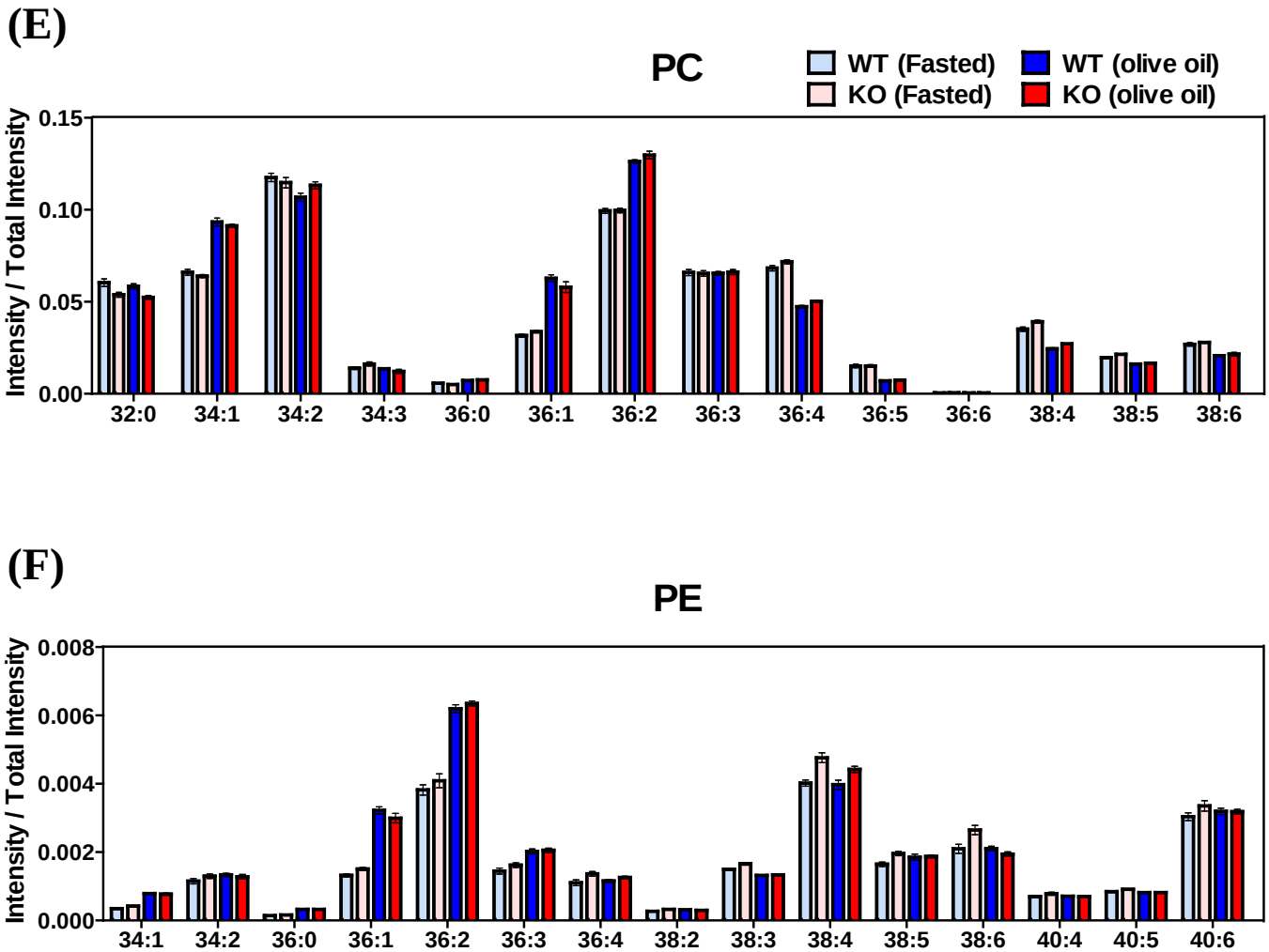
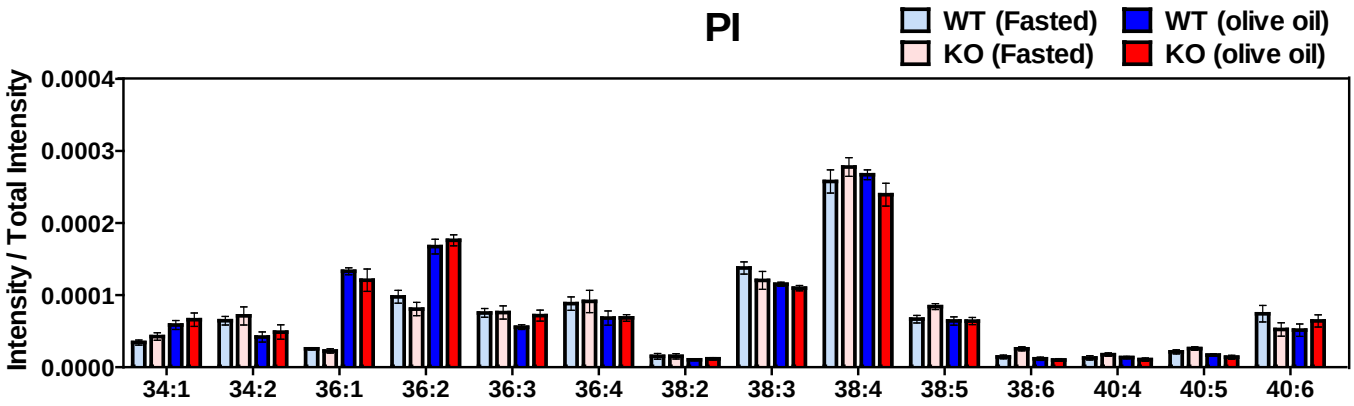


図 31．オリーブオイル経口投与による空腸組織中のリン脂質量の変化
野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおけるオリーブオイル経口投与による空腸組織中の（E）PC（ホスファチジルコリン）、（F）PE（ホスファチジルエタノールアミン）量を示した（平均値±SEM、N=6）。

(G)



(H)

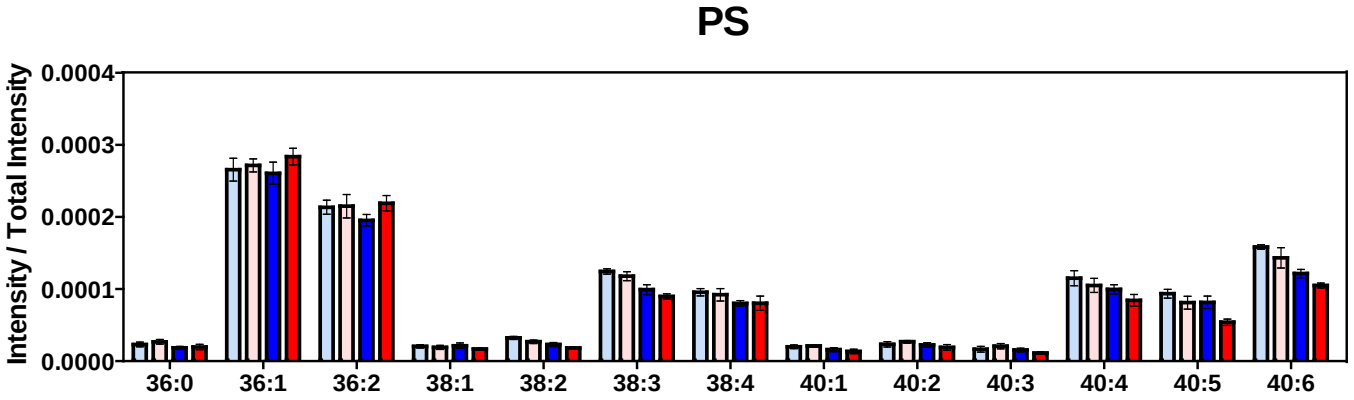
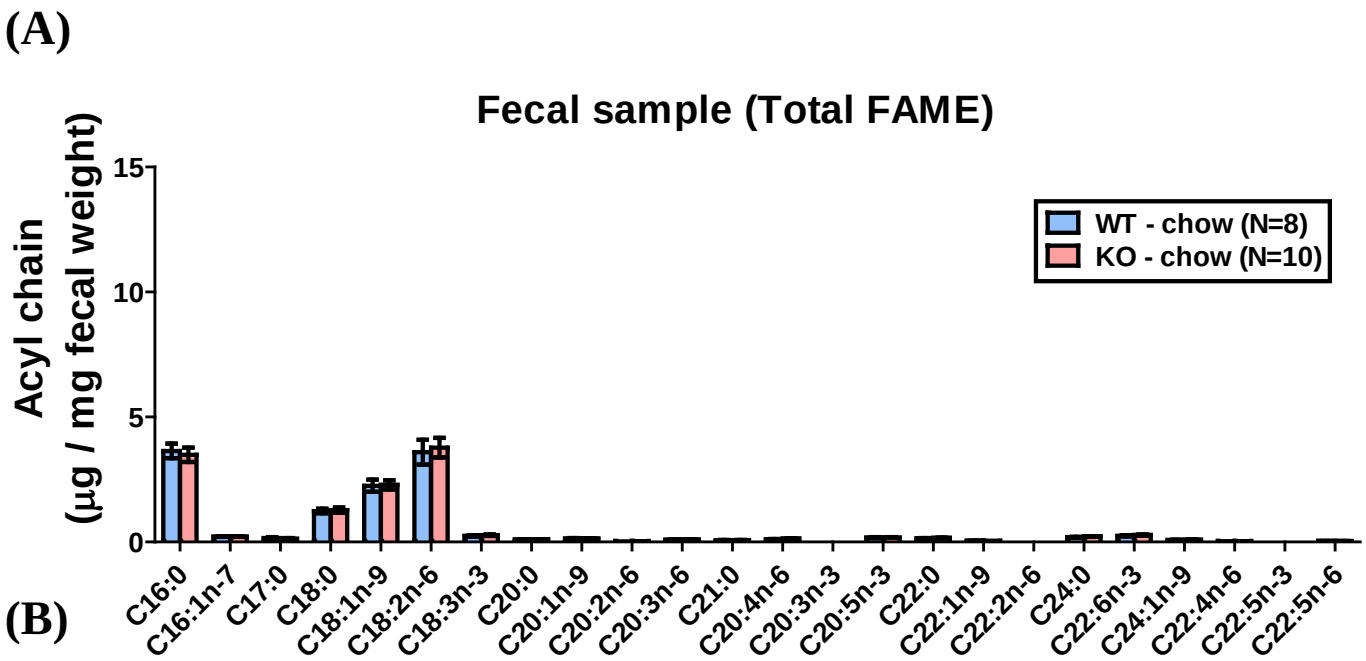


図 31．オリーブオイル経口投与による空腸組織中のリン脂質量の変化（前頁のつづき）
野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおけるオリーブオイル経口投与による空腸組織中の（G）PI（ホスファチジルイノシトール）、（H）PS（ホスファチジルセリン）量を示した（平均値±SEM、N=6）。



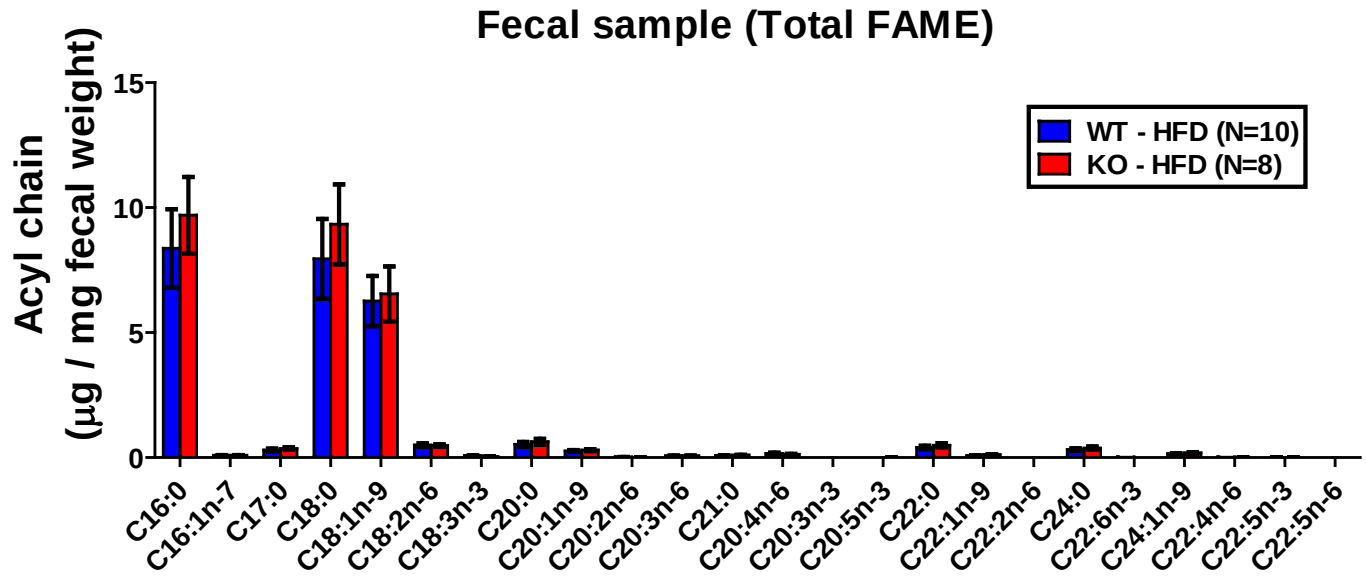


図 32. 通常食および高脂肪食負荷時の糞便中の総脂肪酸の定量

糞便中の総脂肪酸をGC-FID法により定量した。

(A)通常食で飼育時のマウスから採取した糞便中の総脂肪酸量を示した。測定値は平均値±SEMで示した(N=8-10)。

(B)高脂肪食負荷時のマウスから採取した糞便中の総脂肪酸量を示した。測定値は平均値±SEMで示した(N=8-10)。

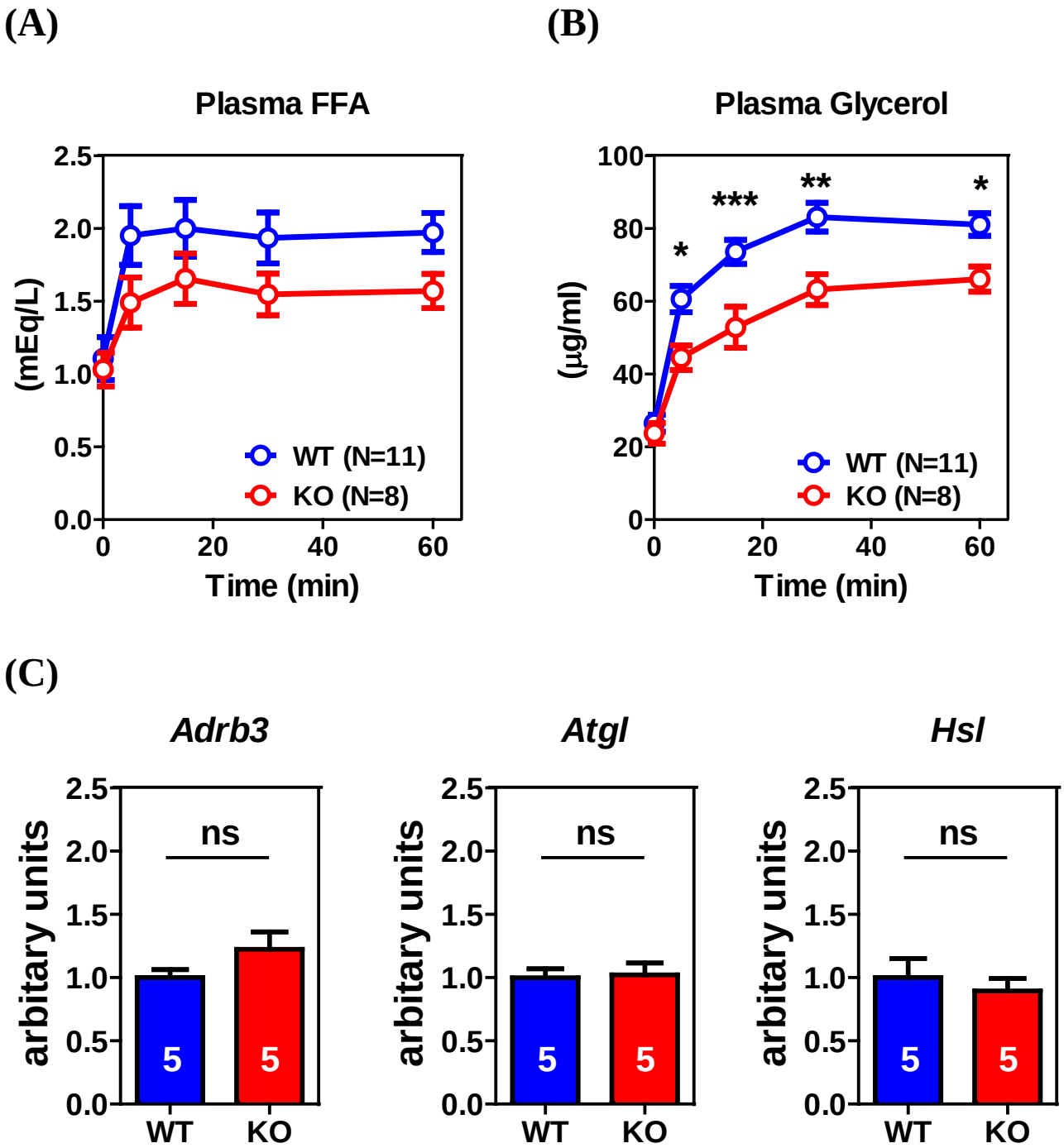


図33. β3受容体アゴニストによる脂肪動員作用とMGL欠損の影響

β3容体アゴニスト（CL-316243, 0.25 mg/kg）腹腔内投与後の（A）遊離脂肪酸および（B）グリセロールの血中濃度の変化を示した。測定値は平均値±SEMで示した（N=7-8）。

*, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

（C）定量RT-PCR法による精巣上体周囲内臓脂肪組織中のβ3受容体、ATGL、HSLのmRNA発現量を示した。いずれも36B4の発現量で標準化した値を示した。測定値は平均値±SEMで示した（N=5）。

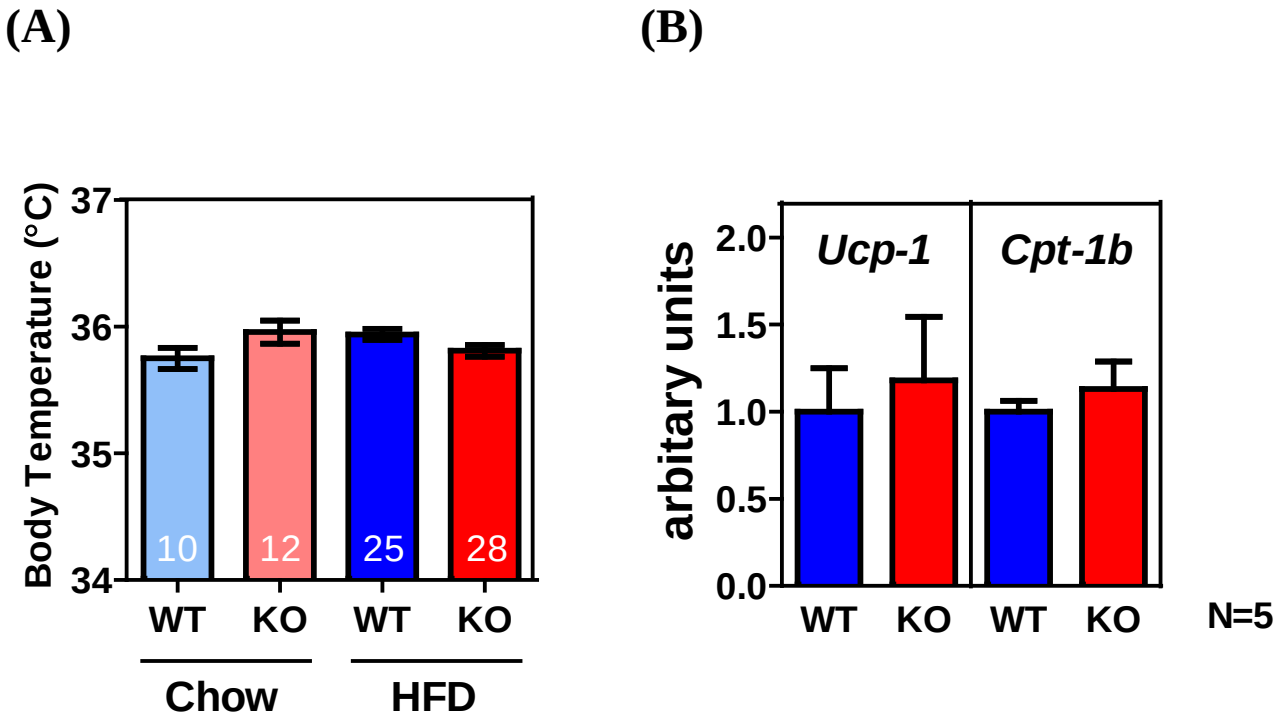


図34．通常食および高脂肪食6週間負荷時の深部体温
（A）午後1時における直腸内温度を深部体温として各マウスの体温を測定した。測定値は平均値±SEMで示した（N=10-28）。
（B）褐色脂肪組織における熱産生関連分子であるUCP-1、β酸化関連分子CPT-1bのmRNA発現量を定量RT-PCR法により定量した。いずれも、36B4の発現量値で正規化した値を示した（平均値±SEM、N=5）

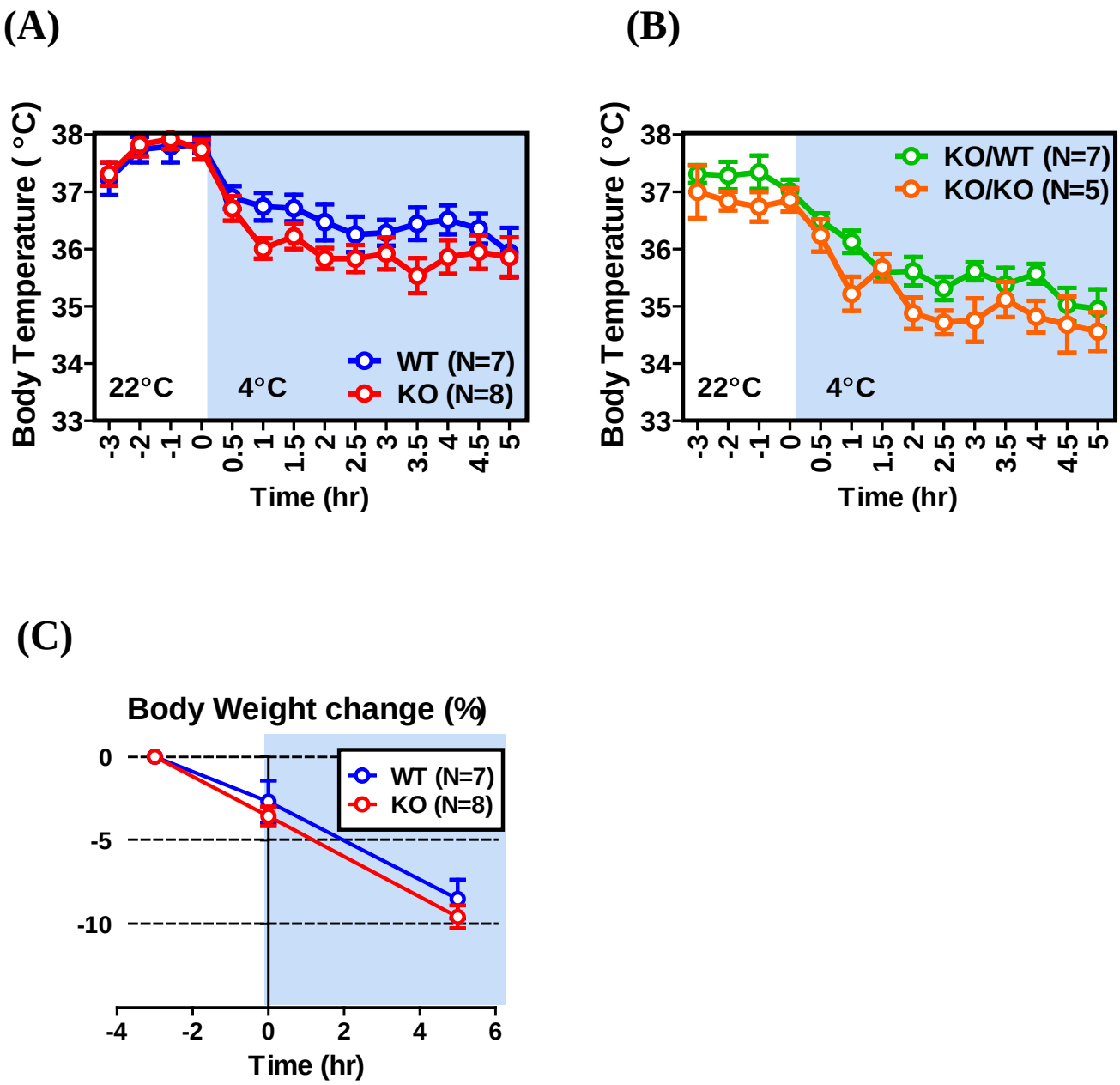
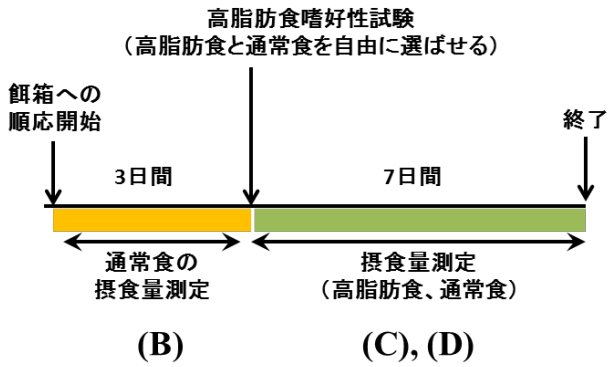


図35．寒冷刺激下（4℃）での体温変化および体重変化

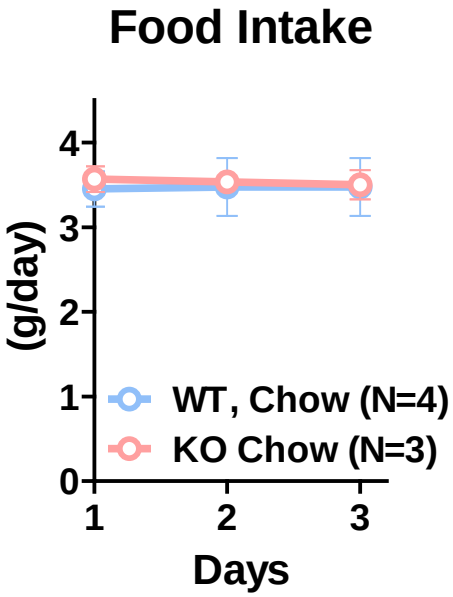
4℃の環境下におかれた時のマウスの深部体温を経時的に直腸より測定した。
（A）野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおける体温変化を示した。（平均値±SEM、N=7-8）
（B）CB1欠損マウス（KO/WT）およびCB1/MGL二重欠損マウス（KO/KO）における体温変化を示した。（平均値±SEM、N=5-7）
（C）野生型マウスおよびMGL欠損マウスにおける体重変化を示した。（平均値±SEM、N=7-8）

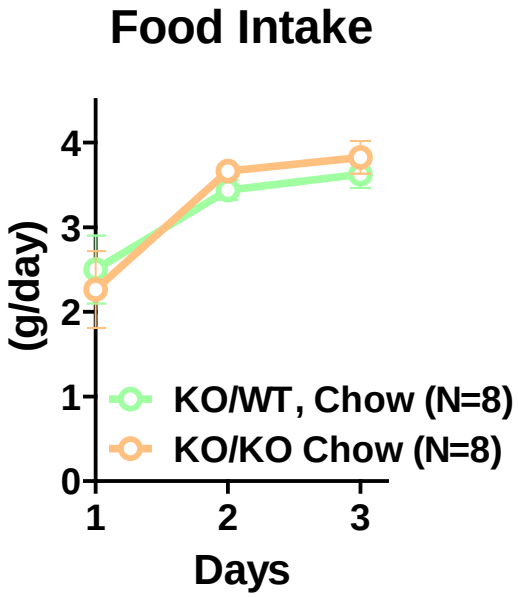
(A)



(B)

図36. 高脂肪食嗜好性試験（餌箱への順応）
（A）高脂肪食嗜好性の評価の一連のプロトコールを示した。
（B）高脂肪食嗜好性試験を始める前段階として、餌箱（マルチフィーダー）から餌を得る行為をマウスに習慣付けた。順応の指標として摂餌量を3日間測定し、マウスが順応したことを確認した。（B）に順応期間の摂食量を示した（平均値±SEM、N=3-8）。
野生型マウス：WT、MGL欠損マウス：KO、CB1欠損マウス：KO/WT、CB1/MGL二重欠損マウス：KO/KO





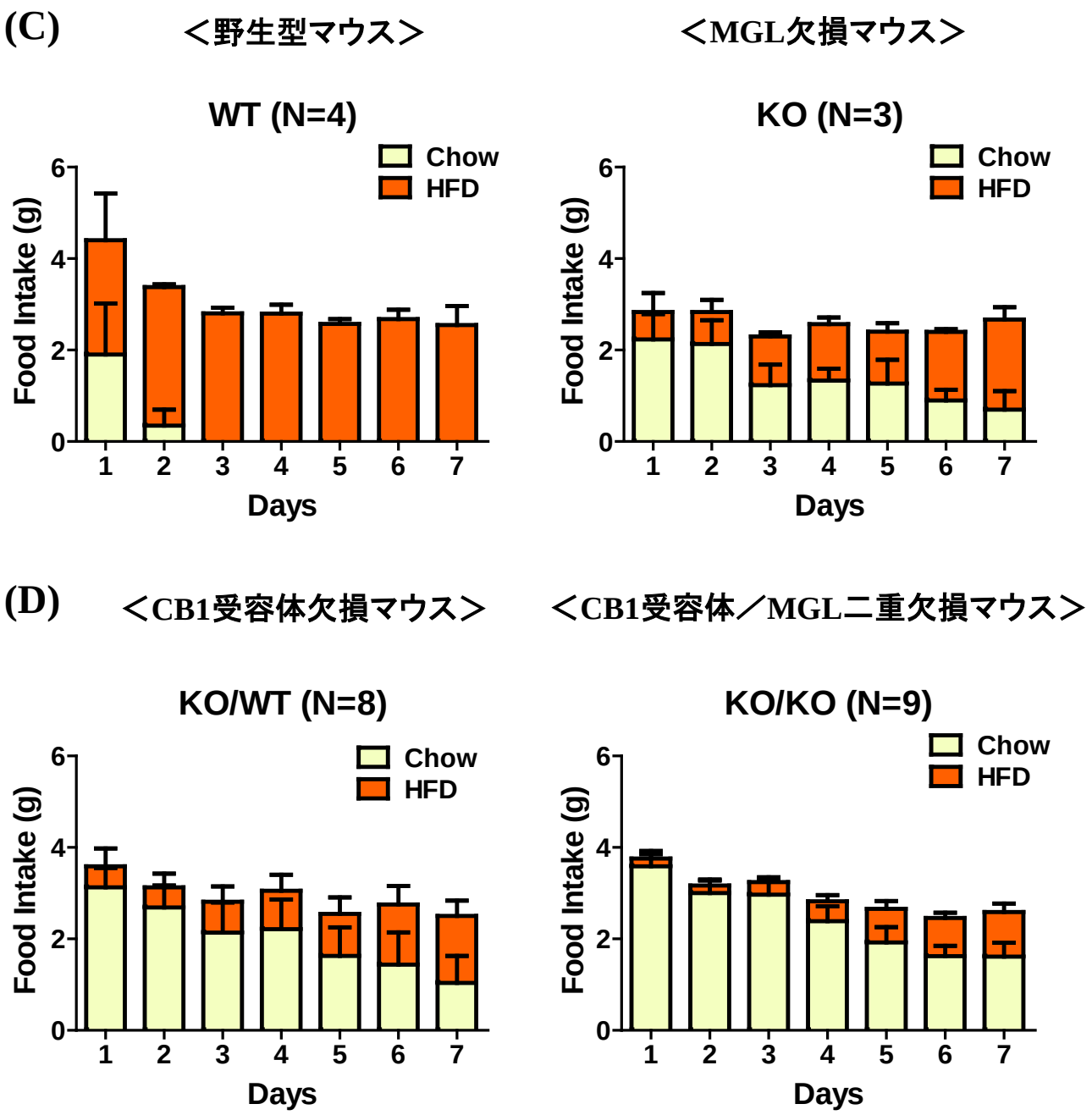


図36．高脂肪食嗜好性試験（前頁のつづき）

餌箱を2種類用意し、片方に通常食、もう片方に高脂肪食を入れた。マウスが通常食および高脂肪食を自由に選択できる状況下で、摂餌させた時の摂食量を示した。

(C)野生型マウスおよびMGL欠損マウスのそれぞれの餌の摂取量を7日間測定した結果を示した。（平均値±SEM、N=3-4）

(D) CB1欠損（KO/WT）マウスおよびCB1/MGL二重欠損（KO/KO）マウスのそれぞれの餌の摂取量を7日間測定した結果を示した。（平均値±SEM、N=8-9）

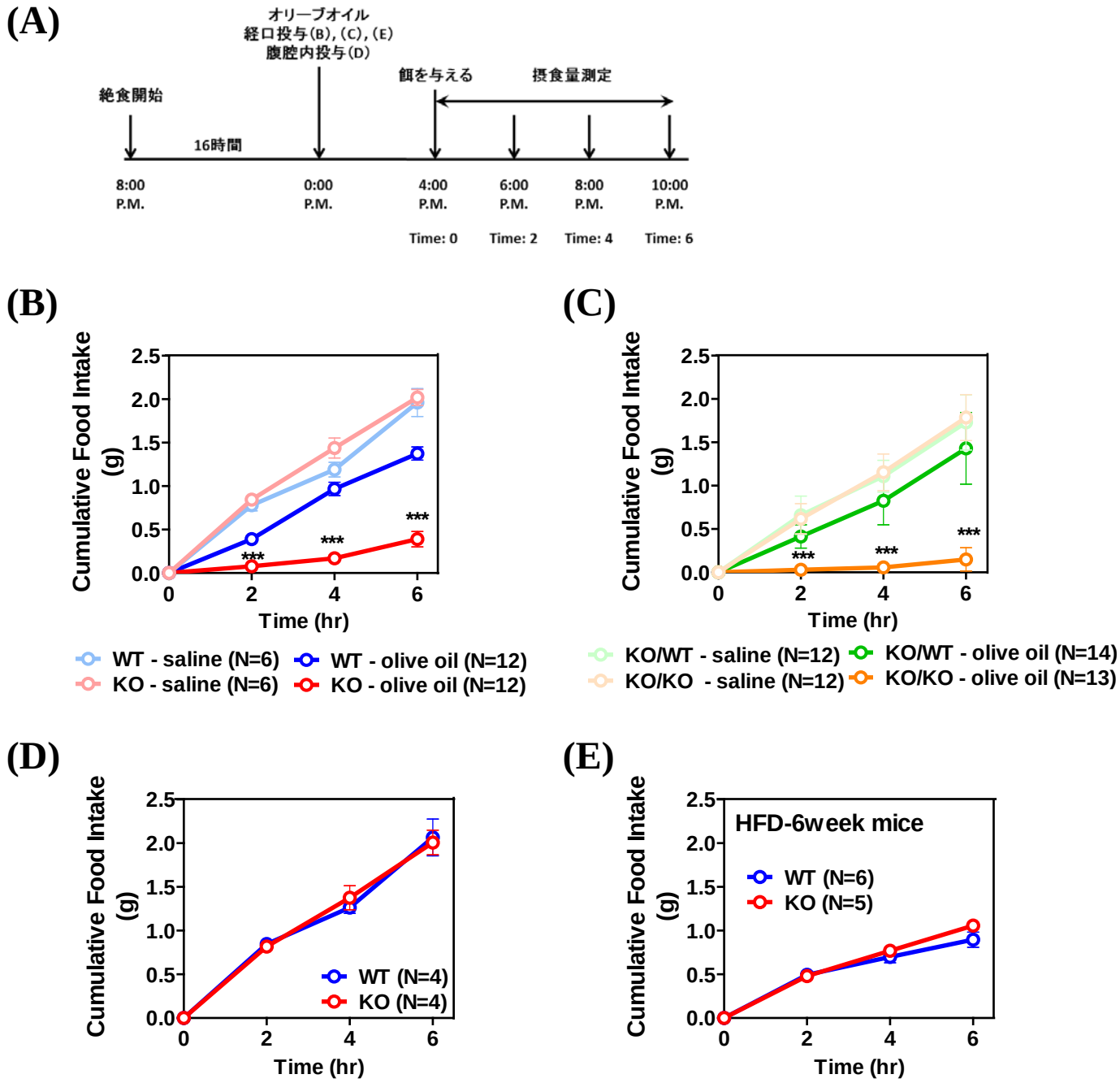
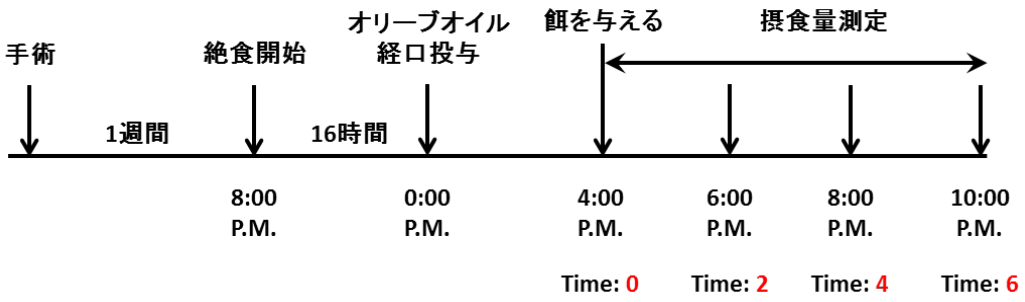


図37．経口オリーブオイル投与後の摂餌量の変化

(A)本実験系のプロトコールを示した。マウスを16時間絶食させた後、200 μLのオリーブオイルを経口投与し、4時間飼育した。その後餌を与え、摂餌量を測定した。オリーブオイルの対照群としては生理食塩水経口投与群を用いた。(B)野生型マウスおよびMGL欠損の経口オリーブオイル投与後の摂餌量の時間的推移を示した。(平均値±SEM、N=6-12)(C)CB1受容体欠損(KO/WT)マウスおよびCB1受容体／MGL二重欠損(KO/KO)マウスにおける経口オリーブオイル投与(200 μl)後の摂餌量の時間的推移を示した。(平均値±SEM、N=12-14)。(D)オリーブオイルを腹腔内投与(200 μl)した後の摂餌量の時間的推移を示した。(平均値±SEM、N=4)(E)高脂肪を6週間負荷したマウスに経口オリーブオイル投与(200 μl)した後の摂餌量の時間的推移を示した。(平均値±SEM、N=5-6)

***, $p<0.001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

(A)



(B)

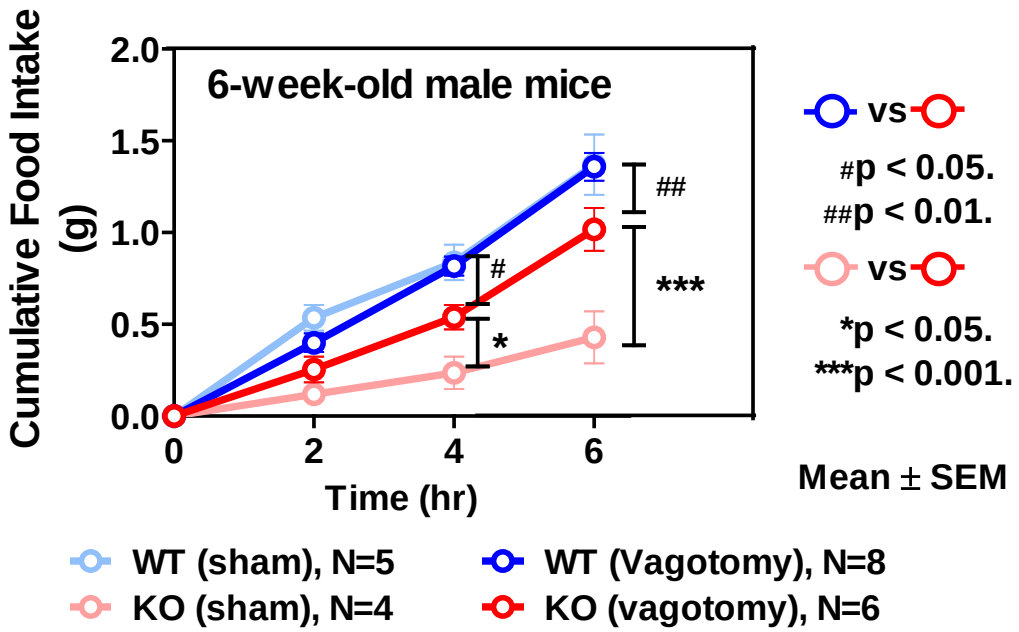


図38．迷走神経切除術による経口オリーブオイル投与後の摂食量への影響
（A）本実験系のプロトコールを示した。手術後の工程は図38（A）と同様である。
（B）迷走神経切除術群および偽手術群を施した野生型マウス、MGL欠損マウスの経口オリーブオイル投与後の摂餌量の時間的推移を示した。（平均値±SEM、N=4-8）
WT (vagotomy) versus KO (vagotomy) : #, $p<0.05$, ##, $p<0.01$,
KO (sham) versus KO (vagotomy) : *, $p<0.05$, ***, $p<0.001$,
two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post test

第四章　　考　察

本研究は、MGL の生理機能の解明を目的とし、本酵素の遺伝子欠損マウスを用いて詳細な解析を行ったものである。本研究では、MGL 欠損が CB1 受容体非依存的に高脂肪食による肥満の進行を抑制することを示し、過栄養摂取時に生じる肥満の進行メカニズムに MGL が強い寄与を示すことを明らかにした（図１４B)。また MGL 欠損マウスでは脂質吸収能の低下が見られる一方（図２５、２６)、脂肪組織からの脂肪動員は抑制されることを明らかにした（図３３)。これらの結果から MGL は摂食時の効率的な脂質吸収機構を担う可能性を示した。さらに、MGL 欠損マウスは脂質を経口摂取した後の摂餌量の減少が見られ、この摂餌抑制は CB1 受容体非依存的に生じることを見出した（図３７)。CB1 受容体は食欲への関与がよく知られているが、本研究では、新たに MGL が CB1 受容体非依存的に脂質摂取後の摂食行動に影響を与える可能性を示した。

1.　<u>脂質吸収における MGL の役割</u>

MGL 欠損マウスは高脂肪食により誘導される肥満およびメタボリックシンドローム症状に抵抗性を示した（図１４－２０)。そのメカニズムの検討において、オリーブオイル経口投与後の血中 TG 濃度上昇が MGL 欠損マウスでは抑制されることを見出し（図２５、２６)、MGL が脂質吸収に関わる可能性を示す結果であると考えた。

この実験は、マウスに比較的高用量の脂肪（オリーブオイル、主成分はTG）を単回投与し、短時間（０～４時間）の血中TG濃度を比較したものであるため、高脂肪食誘導性肥満モデルとは摂取する脂肪の量や観察時間（＞６週間）が異なる点に注意が必要であるが、MGL欠損マウスにおいて、食事として摂取した脂質の吸収に何らかの違いを生じる可能性を十分示唆していると考えられる。

高脂肪食負荷モデルにおいては、対照実験である通常食条件においてMGL欠損マウスと野生型マウスに体重差は認められず、高脂肪食投与時にのみ体重増加の違いを認めた（図１４）。この結果が腸管の脂質吸収能により説明されると仮定した場合、MGL欠損マウスは通常食の条件では十分な脂質吸収能を有しており、多量の脂質が腸管に流入する高脂肪食負荷の条件においてのみ、脂肪吸収能の低下が体重増加率の低下として現れたという可能性が考えられる。

食餌由来の脂質吸収が低下している場合、吸収されなかった脂質は糞便に排出されると考えられるため、糞便中の総脂肪酸を野生型マウスとMGL欠損マウスで比較したが、顕著な違いを見出すことはできなかった（図３２）。この結果からは２つの可能性が考えられる。１つは、高脂肪食負荷モデルにおける野生型マウスとMGL欠損マウスの脂肪吸収量の違いは（オリーブオイル投与実験における血中TG濃度上昇の差異に比べれば）本来僅かであり、糞便中に排出される脂肪酸量の差異も僅かであるという可能性である。高脂肪食誘導性肥満モデルにおいて体重差を生じるために必要

な日々のエネルギー摂取量の違いは僅かで十分であると考えられる。２つ目の可能性は、MGL 欠損マウスは脂肪吸収量が減少しているのではなく、遷延しているという可能性である。今回、オリーブオイル経口投与実験において血中 TG 濃度の測定を４時間後までしか行っておらず、MGL 欠損マウスが長時間を掛けて全ての脂質を吸収する可能性は否定できない。いずれの仮説も脂質の吸収速度が低下しているという点は同じであるが、脂質吸収の遷延の場合は最終的な摂取カロリー量に変化がないため、高脂肪食負荷による肥満に対して抑制的に働くかどうかに関しては検討が必要である。しかし、脂質吸収速度の低下が全身性の酸素消費量の亢進を引き起こすとの報告もあり[49]、MGL 欠損マウスでもそのようなことが起こっている可能性はある。

MGL 欠損マウスの腸管における脂肪吸収低下のメカニズムとして、管腔から腸管上皮細胞への MG および FFA の取り込み、腸管上皮細胞における TG 再合成、キロミクロンの合成、乳糜管への分泌等のいずれか、または複数の過程に MGL が関わる可能性が考えられる。MGL 欠損マウスにおいてオリーブオイル投与後の空腸組織中の MG、DG、TG が野生型マウスに比べて少ない傾向にあったことは（図３１B-D)、管腔から腸管上皮細胞への MG または、FFA の取り込みの低下を示唆する結果であった。一方、腸管上皮細胞における TG 再合成が MGL 欠損による影響を受けている可能性は考えにくい。例えば、腸管特異的 MGAT2 欠損マウスでは腸管における TG 再合成が障害されることが報告されているが、このマウスでは MGAT による DG 合

成が行われなくなることにより組織中の MG 量は増加する[49]。これに対して MGL 欠損マウスでは、オリーブオイル投与後の空腸組織中の TG 量の著しい増加は両遺伝子型で同等であり、TG 再合成の前駆体である MG や DG の蓄積も見られないからである。キロミクロン合成が顕著に低下している可能性も考えにくい。キロミクロン合成に関わる MTP（microsomal triglyceride transfer protein）の遺伝子欠損マウスでは、小腸組織に顕著な脂肪蓄積が生じるが[50]、MGL 欠損マウスではそのような現象もしくは傾向は認められず TG 量はむしろ野生型マウスよりも少ない（図３１B、C）乳糜管への分泌については本研究では検討を行っていないが、乳糜管への分泌障害はキロミクロン合成障害と同じく、小腸組織において脂肪蓄積を生じると考えられ、MGL 欠損マウスの表現型を説明するのは困難である。以上の考察からは、MGL が腸管上皮細胞への脂質取り込みに関わる可能性が比較的考えやすいが、他の可能性が排除された訳ではなく、さらに詳細な検討が必要である。

小腸における MGL 発現細胞を蛍光免疫染色法により検討したところ、絨毛中の微小血管内皮細胞に強い蛍光シグナルが確認され、MGL が機能している可能性を示唆したが（図２９A)、これまで腸管の血管内皮細胞が脂質吸収を制御するという報告はなく、MGL 欠損マウスの表現型を説明できる単純な仮説も存在しない。一方、腸管上皮細胞における MGL の発現を蛍光免疫染色法で明確に確認することができなかったが、全く発現していないことを証明することは困難である。Chon らは MGL を腸

管上皮特異的に過剰発現したトランスジェニックマウスを作製し、このマウスが高脂肪食負荷により顕著な肥満をきたすことを報告した[51]。同報告は、本研究においてMGL欠損マウスが肥満に抵抗性を示すことと一見矛盾しないように思われるが、腸管上皮特異的MGLトランスジェニックマウスでは摂餌量の増加やエネルギー消費の低下が顕著であったことから、MGL欠損マウスの表現型と単純な裏表の関係ではないようである。脂質吸収におけるMGLの作用機序を解明するためには、本研究で得られた情報を元に、腸管上皮細胞および小腸微小血管内皮細胞に特異的な遺伝子欠損マウスを作出、解析することが必要であると考えられる。

以上、MGL欠損マウスにおいては何らかのメカニズムによって脂質吸収の遷延が生じていると考えられるが、この脂質吸収の遷延が高脂肪食負荷による肥満に対して抑制的に働いているかはさらなる検討が必要である。今後、高脂肪食摂取時など、脂肪を主にエネルギーとする餌を摂取時の酸素消費量や呼吸商、活動量についても比較検討を行うことでMGL欠損における全身性のエネルギー代謝の実態が解明できることが期待される。

2. 脂肪分解における MGL の役割

MG加水分解活性を有する酵素の中で、MGLが脂肪組織における主要なMG分解酵素であることは先行研究により示されていたが[30]、脂肪分解におけるMGLの寄

与および意義については、MGL 欠損マウスや MGL 特異的阻害剤などによる検討が待たれていた。最近、Taschler らは MGL 欠損マウスから単離した脂肪組織をイソプロテレノールによりβ受容体刺激すると、野生型マウス由来の脂肪組織と比べて、脂肪酸遊離およびグリセロール放出が減少することを報告している[30]。今回の研究では、MGL 欠損マウスにβ3 受容体アゴニストを腹腔内に投与したところ、血中 FFA およびグリセロールの増加が野生型マウスに比べて減弱していたことから、MGL が ATGL や HSL と共に脂肪分解に寄与することが、より明確に示された（図３３）。

高脂肪食誘導性肥満における脂肪分解の意義については議論の余地がある（図５）。HSL 遺伝子欠損マウスは高脂肪食を与えても肥満になりにくい一方で[52]、ATGL 欠損マウスは脂肪蓄積をきたすことが報告されている[10]。ATGL 欠損マウスでは、通常食条件下でも脂肪蓄積を生じると同時に、絶食時や寒冷時に脂肪分解によるエネルギー産生や熱産生ができなくなっており、これらは ATGL 欠損による脂肪分解の障害のためであると説明される。HSL 欠損マウスが肥満を生じにくい理由は完全には理解されておらず、脂肪分解の障害によると考えられる脂肪細胞の肥大が見られるにもかかわらず、脂肪組織の肥大化は起こらない。ATGL 欠損マウスの場合とは異なり、HSL 欠損マウスではエネルギー消費および熱産生が増大（高体温）する。今回、MGL 欠損マウスでは高脂肪食による肥満の抑制が見られ、HSL 欠損マウスの表現型の共通性が考えられたが、HSL 欠損マウスが「痩せ（lean）」の表現型を示すのに対し、MGL

欠損マウスは通常食では野生型マウスとの間に違いは見らない点や、高脂肪食の長期投与により肥満を誘導できる点が異なっていた（図２０）。また、MGL 欠損マウスにおいては、寒冷刺激による熱産生が若干低下する傾向にあり、ATGL 欠損マウスの表現型との共通性を認めたが、ATGL 欠損マウスほど顕著な差異ではなかった。これは、ATGL が脂肪分解の最初の段階を担う酵素として支配的な役割を持つのに対し、MGL は脂肪分解の最終段階にのみ関わる酵素であることにより説明できると考えられる。本研究では MGL が脂肪分解に関わることを明らかにしたが、エネルギー消費能の低下により MGL 欠損マウスにおける肥満抑制を直接的に説明することはできないため、既に述べた脂質吸収やその他のメカニズムにより説明されると考えるのが妥当であろう。

3. MGL による摂食行動調節

MGL 欠損マウスでは、餌を通常食から高脂肪食に切り替えた際、数日間の一過性の摂餌量低下が見られ（図１５）、MGL 欠損マウスは高脂肪食に対する嗜好性が低かったため（図３６）、MGL は脂肪の吸収や代謝だけでなく摂食行動にも関わるのではないかと考えた。オリーブオイルを強制経口投与した後の摂食量が MGL 欠損マウスで顕著に減少したことから、MGL は脂肪摂取後の摂食行動に関わることが示唆された（図３７B）。

中枢系において 2AG-CB1 シグナル系は食欲に関わることが知られており、先行研究において CB1 受容体欠損マウスは高脂肪食を好まないことが報告されている[53]。従って、MGL 欠損マウスにおける摂食行動の変化は CB1 受容体シグナルの変化によって説明される可能性が考えられたが、CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスを用いた解析において、MGL 欠損マウスにおけるオリーブオイル投与後の摂食量低下が CB1 受容体の有無に依存しなかったことから（図３７C)、MGL はこれまでに知られていないメカニズムを介して摂食行動へ影響を与えることを示すに至った。

最初に実施した高脂肪食に対する嗜好性を評価する実験と、次に行ったオリーブオイル投与後の摂餌量を測定する実験を対比すると、その CB1 受容体に対する依存性に違いが見られた。高脂肪食嗜好性は、CB1 受容体欠損に依存する部分が大きく、CB1 受容体／MGL 二重欠損マウスと対照（CB1 単独欠損）マウスの違い（MGL 欠損による効果）は顕著ではなかった（図３６）のに対し、オリーブオイル投与後の摂餌量を測定した場合は、CB1 受容体への依存性はほとんど見られなかった（図３７）。先行研究において、MGL 欠損マウスの神経系では、過剰に蓄積した 2-AG により CB1 受容体が不活性化していることが報告されており[29]、高脂肪食嗜好性の顕著な低下の主要な部分は CB1 受容体シグナルの消失により説明されると考えられる。

MGL 欠損マウスにおけるオリーブオイル投与後の摂餌量低下は、オリーブオイルを経口投与した場合にのみ見られ、腹腔内に投与した場合には見られない現象であっ

たため（図３７D)、消化管を経由して脂質が吸収される過程のどこかに摂食行動に影響を与えるメカニズムが存在すると考え、迷走神経遮断術を行ったところ MGL 欠損マウスの摂食量が有意に回復した（図３８）。食物が消化管を通過し吸収がおこる際に消化管から摂食抑制ホルモンが分泌されることが知られており、例えば、GLP-1 や PYY は L 細胞から、CCK は I 細胞から分泌され、迷走神経を通じて脳へと情報が伝達される[54-56]。実際に MGL がこれらの因子を介して摂食行動に関わるかどうかは不明であり、詳細な検討が必要である。また高脂肪食の長期負荷により MGL 欠損で生じる摂餌抑制は見られなくなることから（図３７E)、このメカニズムを仲介する因子自身の制御は栄養状態の変化によって影響を受けるのかもしれない。

これまで脂質の経口投与により摂餌量の減少が見られる、あるいは高脂肪食を開始直後に摂餌量の減少が見られるといった表現型を持つ遺伝子欠損マウスは報告がなかったが、最近、Nelson らは腸管上皮特異的 MGAT2 欠損マウスにおいて餌を通常食から高脂肪食に変更した際に、一過的な摂餌量の低下が生じることを報告した[49]。MGAT2 は腸管上皮において MG から DG を合成する酵素であり（図２)、MGAT2 の欠損により MG の蓄積が生じる。MGL 欠損マウスも腸管組織中の MG の蓄積を起こすため、腸管上皮の MG もしくはその代謝物が摂食調節に関わる可能性が考えられる。摂食行動に関係する脂質代謝物としては、N アシルエタノールアミンの一種である oleoylethanolamide (OEA) が腸管の PPAR-α受容体を介して摂食を抑制することが

報告されているが[57]、MG 代謝との関係は不明である。未知の脂質代謝物が関係している可能性も考えられるため、MGL 欠損マウスと野生型マウスの腸管組織を用いたリピドミクス解析による脂質探索を行うなど、詳細なメカニズムの解明に向けた取り組みが今後の課題である。

第六章　　結　語

本研究において、MGL は高脂肪食による肥満誘導に重要な酵素であることを示した。また、そのメカニズムとして、MGL が腸管における脂質吸収機構に関わる可能性を示した。さらに、MGL が迷走神経を介したメカニズムで脂肪摂取後の摂食行動に影響を与えることを示した。これらの表現型はいずれも CB1 受容体に依存しないことを示した。本研究により、MGL は従来知られていたエンドカンナビノイド系の調節機能に加え、摂食行動や脂肪吸収、脂肪分解など、様々な生理機能を担う酵素であることが明らかとなった。

参考文献

1. Yen, C.L., et al., *Deficiency of the intestinal enzyme acyl CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 protects mice from metabolic disorders induced by high-fat feeding.* Nat Med, 2009. **15**(4): p. 442-6.
2. Smith, S.J., et al., *Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat.* Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 87-90.
3. Rizack, M.A., *Activation of an Epinephrine-Sensitive Lipolytic Activity from Adipose Tissue by Adenosine 3',5'-Phosphate.* J Biol Chem, 1964. **239**: p. 392-5.
4. Vaughan, M., J.E. Berger, and D. Steinberg, *Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue.* J Biol Chem, 1964. **239**: p. 401-9.
5. Holm, C., et al., *Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3.* Science, 1988. **241**(4872): p. 1503-6.
6. Haemmerle, G., et al., *Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis.* J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4806-15.
7. Fredrikson, G., et al., *Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties.* J Biol Chem, 1981. **256**(12): p. 6311-20.
8. Zimmermann, R., et al., *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase.* Science, 2004. **306**(5700): p. 1383-6.
9. Lass, A., et al., *Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome.* Cell Metab, 2006. **3**(5): p. 309-19.
10. Haemmerle, G., et al., *Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase.* Science, 2006. **312**(5774): p. 734-7.
11. Kupiecki, F.P., *Partial purification of monoglyceride lipase from adipose tissue.* J Lipid Res, 1966. **7**(2): p. 230-5.
12. Tornqvist, H., L. Krabisch, and P. Belfrage, *Simple assay for monoacylglycerol hydrolase activity of rat adipose tissue.* J Lipid Res, 1974. **15**(3): p. 291-4.
13. Tornqvist, H. and P. Belfrage, *Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue.* J Biol Chem, 1976. **251**(3): p. 813-9.
14. Karlsson, M., et al., *cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases.* J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 27218-23.
15. Navia-Paldanius, D., J.R. Savinainen, and J.T. Laitinen, *Biochemical and pharmacological characterization of human alpha/beta-hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12).* J Lipid Res, 2012. **53**(11): p. 2413-24.

16. Blankman, J.L., G.M. Simon, and B.F. Cravatt, *A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol.* Chem Biol, 2007. **14**(12): p. 1347-56.
17. Labar, G., et al., *Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling.* Chembiochem, 2010. **11**(2): p. 218-27.
18. Dinh, T.P., et al., *Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10819-24.
19. Schalk-Hihi, C., et al., *Crystal structure of a soluble form of human monoglyceride lipase in complex with an inhibitor at 1.35 A resolution.* Protein Sci, 2011. **20**(4): p. 670-83.
20. Devane, W.A., et al., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.* Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.
21. Matsuda, L.A., et al., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.* Nature, 1990. **346**(6284): p. 561-4.
22. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.* Nature, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
23. Devane, W.A., et al., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.* Science, 1992. **258**(5090): p. 1946-9.
24. Sugiura, T., et al., *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **215**(1): p. 89-97.
25. Mechoulam, R., et al., *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.* Biochem Pharmacol, 1995. **50**(1): p. 83-90.
26. Bisogno, T., et al., *Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain.* J Cell Biol, 2003. **163**(3): p. 463-8.
27. Tanimura, A., et al., *The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission.* Neuron, 2010. **65**(3): p. 320-7.
28. Schlosburg, J.E., et al., *Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system.* Nat Neurosci, 2010. **13**(9): p. 1113-9.
29. Chanda, P.K., et al., *Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system.* Mol Pharmacol, 2010. **78**(6): p. 996-1003.
30. Taschler, U., et al., *Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance.* J Biol Chem, 2011. **286**(20): p. 17467-77.
31. Makara, J.K., et al., *Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus.* Nat Neurosci, 2005. **8**(9): p. 1139-41.
32. Hashimotodani, Y., T. Ohno-Shosaku, and M. Kano, *Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus.* J Neurosci, 2007. **27**(5): p. 1211-9.

33. Long, J.Z., D.K. Nomura, and B.F. Cravatt, *Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism.* Chem Biol, 2009. **16**(7): p. 744-53.

34. Cota, D., et al., *The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis.* J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 423-31.

35. Quarta, C., et al., *CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance.* Cell Metab, 2010. **11**(4): p. 273-85.

36. Colombo, G., et al., *Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716.* Life Sci, 1998. **63**(8): p. PL113-7.

37. Osei-Hyiaman, D., et al., *Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice.* J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3160-9.

38. Tam, J., et al., *Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity.* J Clin Invest, 2010. **120**(8): p. 2953-66.

39. Tam, J., et al., *Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance.* Cell Metab, 2012. **16**(2): p. 167-79.

40. Pang, Z., et al., *The central cannabinoid CB1 receptor is required for diet-induced obesity and rimonabant's antiobesity effects in mice.* Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(10): p. 1923-34.

41. Uchigashima, M., et al., *Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus.* J Neurosci, 2011. **31**(21): p. 7700-14.

42. Zimmer, A., et al., *Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5780-5.

43. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.

44. Strissel, K.J., et al., *Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications.* Diabetes, 2007. **56**(12): p. 2910-8.

45. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein.* J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11811-6.

46. Cao, J., et al., *Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2.* J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13860-6.

47. Cases, S., et al., *Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13018-23.

48. Cases, S., et al., *Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(42): p. 38870-38876.

49. Nelson, D.W., et al., *Intestine-specific deletion of acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) 2 protects mice from diet-induced obesity and glucose intolerance.* J Biol Chem, 2014. **289**(25): p. 17338-49.

50. Xie, Y., et al., *Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency.* J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 4075-86.

51. Chon, S.H., et al., *Over-expression of monoacylglycerol lipase (MGL) in small intestine alters endocannabinoid levels and whole body energy balance, resulting in obesity.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43962.

52. Strom, K., et al., *Attainment of brown adipocyte features in white adipocytes of hormone-sensitive lipase null mice.* PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1793.

53. Ward, S.J. and L.A. Dykstra, *The role of CB1 receptors in sweet versus fat reinforcement: effect of CB1 receptor deletion, CB1 receptor antagonism (SR141716A) and CB1 receptor agonism (CP-55940).* Behav Pharmacol, 2005. **16**(5-6): p. 381-8.

54. Koda, S., et al., *The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats.* Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2369-75.

55. Edwards, G.L., E.E. Ladenheim, and R.C. Ritter, *Dorsomedial hindbrain participation in cholecystokinin-induced satiety.* Am J Physiol, 1986. **251**(5 Pt 2): p. R971-7.

56. Abbott, C.R., et al., *The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway.* Brain Res, 2005. **1044**(1): p. 127-31.

57. Fu, J., et al., *Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha.* Nature, 2003. **425**(6953): p. 90-3.

謝辞

本研究は東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻において、2011 年 4 月から 2015 年 3 月まで、清水孝雄特任教授、北芳博准教授のもとに行ったものである。また迷走神経切除術の実験的手技については東北大学大学院薬学系研究科の青木淳賢教授、可野邦行研究助教にご教授いただいた。MGL 欠損マウス、CB1 受容体欠損マウスは東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻生理学講座神経生理学分野の狩野方伸教授、新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野の﨑村建司教授、山崎真弥博士よりご供与いただいた。

本研究の遂行に当たり、様々なご助言、ご指導をいただいた清水孝雄特任教授、北芳博准教授、リピドミクス社会連携講座の皆様、国立国際医療研究センター脂質シグナリングプロジェクトの皆様に深く感謝するとともに、この場を借りてお礼申し上げさせていただきます。