

筑波大学

博士（医学）学位論文

SGLT2 阻害薬による肝臓-脳-脂肪の
神経回路を介した体重低下作用の
メカニズムの解明

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

沢田 義一

目次

略語一覽	2
目的	3
対象と方法	5
結果	8
考察	10
結論	11

謝辞

参考文献

図表

略語一覧

DEXA : Dual energy x-ray absorptiometry

DIO : diet induced obesity

HFD : high fat diet

HSL : hormone-sensitive lipase

HVx : hepatic vagotomy

PKA : protein kinase A

SEM : standard error of the mean

SGLT2 : sodium-glucose cotransporter 2

TC : total cholesterol

TG : triglyceride

TOFO : tofogliflozin

UGE : urinary glucose excretion

目的

2型糖尿病は、インスリン抵抗性およびインスリン欠乏による高血糖を特徴とする慢性的な代謝疾患である(1)。近年、2型糖尿病の患者が劇的に増加しており、世界中では3億8,000万人以上が罹患していると報告されている(2)。したがって、糖尿病は現在、世界の公衆衛生の観点において大きな問題となっている。

最近、ナトリウム-グルコース共輸送体2 (SGLT2) 阻害薬は、尿糖排泄による血糖低下作用に加えて、抗肥満作用を有することから注目を集めている(3-4)。SGLT2はKanaiらによって1994年にクローニングされ(5)、腎臓でナトリウム濃度勾配に依存したグルコース再吸収において重要な役割を果たすことが知られているグルコーストランスポーターである。

SGLT2は、主に、近位腎尿細管のS1セグメントに存在し、腎臓グルコース再吸収の約90%を担っている。最近の臨床研究において、SGLT2阻害薬の経口投与が尿中グルコース排泄 (UGE) を誘導して高血糖を改善し、2型糖尿病患者の体重を減少させることが報告されている(6-12)。また、動物実験において、SGLT2阻害薬は糖尿病動物モデルにおける糖代謝および脂質代謝を改善する(13-15)。しかしながら、SGLT2阻害薬の抗肥満作用のメカニズムについては完全には明らかになっていない。

最近、代謝恒常性の潜在的な調節機構として、自律神経系を介した臓器間ネットワークの新しいメカニズムが報告されている(16-17)。特に、肝臓からの神経シグナルの役割について多くの研究が行われている(18-21)。当研究室において、肝グリコーゲンの欠乏は血糖値および血中インスリン/グルカゴンレベルとは無関係に、肝臓-脳-脂肪の神経回路を活性化することによって、白色脂肪組織における脂肪分解を直接促進するという「グリコーゲン枯渇シグナル」の存在を実証した(20)。一方、トホグリフロジン (TOFO) 投与は肝グリコーゲンを低下させること、および脂肪分解に関わるリパーゼの活性を上昇させるという報告がある(22-23)。

これらの背景から、私はSGLT2阻害薬が肝臓におけるグリコーゲン枯渇シグナルを誘発し、

肝臓-脳-脂肪の神経回路を介して脂肪細胞における脂肪分解を活性化し、脂肪量の減少および体重低下をもたらすという仮説を立てた。そこで本研究では、肝臓迷走神経切除 (HVx) マウスモデルを用いて SGLT2 阻害薬の神経回路への関与についての検討を行った。

対象と方法

Materials

TOFO は興和株式会社により提供された。抗 PKA-substrate 抗体(#9621, rabbit) は Cell Signaling Technology 社から購入した。抗 α -チューブリン抗体(#CP06, mouse)は、CALBIOCHEM 社から購入した。マウスインスリン ELISA キットはシバヤギ社から購入した。ケトン test-B 液は三和株式会社より購入した。グルコース CII 試験ワコー、トリグリセリド E-試験ワコーおよびコレステロール E-試験ワコーは Wako 社から購入した。

Animals

C57BL/6J マウス (6 週齢) は CLEA 社から購入した。すべての動物は 14 時間/10 時間の明暗サイクルで温度制御された環境で飼育し、高脂肪食(HFD) (HFD32, オリエンタル酵母、507.6kcal / 100g) および水は自由に摂取させた。HFD 負荷から 2 週間後、マウスに HVx またはその対照群として偽手術(sham)を行った。オペ後の回復期間として 2 週間もうけた後、0.015%の TOFO を含む高脂肪食混餌(HFD+TOFO)を 3 週間投与した。8 時間絶食の条件でマウスを屠殺して血漿、肝臓、精巣上体脂肪を採取し、サンプルを-80°Cで保管した。今回使用した全ての動物は筑波大学動物管理利用委員会の承認を受けたプロトコルに従って麻酔または屠殺した。

選択的迷走神経肝枝切除術(HVx)

Izumida らの報告に従い、8 週齢の雄マウスに迷走神経肝枝切除を施した(20)。開腹中切開を腹側正中線上に行い、次に腹筋壁を切開した。鉗子を使用して胃路靭帯を切断し、胃を静かに引き出して下腹部食道および腹部横隔膜下迷走神経を露出させた。次いで、この迷走神経肝枝を鉗子を用いて切断した。

DEXA 解析

PIXImus2 DEXA (GE Medical Systems) を用いて、除脂肪体重(lean mass)および脂肪体重(fat mass)の組成およびその合算値である body weight (B.W.)を測定した。

mRNA 測定

mRNA 測定は既報に従い実施した(24-25)。Sepasol-RNA I (Nacalai Tesque) を用いて組織からの全 RNA を調製し、cDNA 合成に使用した (Invitrogen)。リアルタイム PCR は、SYBR Green マスターミックス (Roche Diagnostics) を使用して ABI Prism 7300 System (Applied Biosystems) を用いて行った。

プライマー配列は下記の通りである。

Pck1 5'-TGTCATCCGCAAGCTGAAGA-3' 5'-TTCGATCCTGGCCACATCTC-3'

G6pc 5'-CGGCGCAGCAGGTGTATACTAT-3' 5'-CAGAATCCCAACCACAAGATGA-3'

Cpt1a 5'-CCTGGGCATGATTGCAAAG -3' 5'-GGACGCCACTCACGATGTT -3'

Ppara 5'-CCTCAGGGTACCACTACGGAGT -3' 5'-GCCGAATGTTGCGCCGAA -3'

Fgf21 5'-CCTCTAGGTTTCTTTGCCAACAG -3' 5'-AAGCTGCAGGCCTCAGGAT -3'

Rplp0 5'-GAAGACAGGGCGACCTGGAA -3' 5'-TTGTCTGCTCCCACAATGAAGC -3'

比較サイクル閾値法を用いてデータを分析し、mRNA 発現を Rplp0 発現に対して相対的に評価した。

イムノプロット解析

イムノブロッティングは、既報に従い実施した(26-27)。組織抽出物を SDS-PAGE により分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンに転写した。TBS-T (10mM トリス、pH8.0, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) の 5% スキムミルクで 30 分間ブロッキングした後、メンブレンを 1 次抗体として抗 PKA-substrate 抗体および抗 α -チューブリン抗体と共に 4°C で 16 時間インキュベートした。その後 PVDF メンブレンを 10 分間洗浄し、3 回繰り返した。次に 2 次抗体として、HRP 標識された抗ウサギまたは抗マウス抗体と 1 : 5,000 希釈で 1 時間インキュベートした。ECL ウェスタンブロット検出システム (GE Healthcare) を用いて化学発光を検出し、ChemiDoc™ XRS + (BioRad) および IMAGE LAB™ ソフトウェア (BioRad) で解析を行った。

肝グリコーゲン測定

肝グリコーゲン含量は、既報に従い測定した(20)。肝臓の小片を 30% KOH に溶解し、66% EtOH を加え、次いで -20°C で 1 時間静置した。その後、8000rpm で遠心分離し、上清を除去した。残ったペレットを純水で溶解し、酢酸緩衝液 (0.2M, pH4.5) およびアミログルコシダーゼを添加し、グルコース CII-test Wako (Wako) で測定した。

統計解析

結果は、平均 ± 標準誤差 (SEM) として表した。群間の統計学的差異は、Mann-Whitney U 検定を用いて分析した。P < 0.05 を統計学的有意差とした。

結果

HVx は TOFO による体重低下および脂肪量抑制作用を減弱させた

食餌誘発性肥満(DIO)マウスに HVx を施し、高脂肪食 TOFO 混餌を 3 週間負荷した。図 1A、B に示すように、TOFO は体重および脂肪量の増加を抑制した。そして、TOFO の作用は HVx によって有意に減弱した (図 1A、B)。一方、lean mass には群間での変化は認められず (図 1C)、体重の変化は主に脂肪量の減少によるものであることが示唆された。図 1D に示すように、摂餌量は群間で変化しておらず、HVx 群と sham 群間での脂肪量の差はエネルギー摂取量に起因しない可能性が示唆された。

TOFO は HVx および sham の両群における肝グリコーゲン量を減少させた

神経系を介した脂肪分解の誘導に肝グリコーゲンの低下が重要であるとの報告(20)から、DIO マウスにおける肝グリコーゲン量を測定した。図 1E に示すように、TOFO は HVx 群および sham 群の両方における肝グリコーゲン量を有意に低下させた。Sham 群と同程度の肝グリコーゲン低下にもかかわらず、HVx 群のマウスの脂肪量は、肝臓からの神経シグナルの遮断のために TOFO に対する応答性の低下を示した。

HVx と sham 群間における血中パラメータは同程度であった

次に、血中パラメータの影響を測定した。血糖値とインスリン値は TOFO によって有意に低下したが、HVx 群と sham 群間に差はなかった (図 2A、B)。ケトン体は TOFO によって有意に増加しており、脂肪酸の β 酸化が増加してエネルギー源が糖質から脂肪に変化している可能性が示唆された (図 2C)。グループ間で血中 TG および TC に差はなかった (図 2D、E)。これらの結果は、血液パラメータが HVx の影響を受けないことを示唆している。

HVx と sham 群間の肝臓遺伝子発現に差はない

肝臓遺伝子発現に対する TOFO および HVx の影響を調べるために測定を行った。TOFO 投与により糖新生系遺伝子である Pck1 および G6pc の遺伝子発現はわずかに増加したものの、HVx 群と sham 群の間に差は認められなかった(図 3A、B)。Cpt1a、Ppar α および Fgf21 といった脂質代謝に関わる遺伝子についても HVx 群と sham 群との間に差異を示さなかった(図 3C-E)。これらの結果から、肝臓遺伝子発現が HVx の影響を受けないことが示唆された。

TOFO による PKA 基質タンパク質のリン酸化の亢進が HVx により減弱した

我々は以前に、絶食時における肝グリコーゲンの減少が肝臓-脳-脂肪の神経回路を介して白色脂肪組織における脂肪分解を促進し、脂肪分解に関与するホルモン感受性リパーゼ(HSL)のリン酸化が HVx によって減弱することを実証した(20)。絶食時には交感神経を介した白色脂肪組織での PKA 活性化がおこり、その結果として脂肪細胞内で PKA 基質タンパク質のリン酸化が亢進する。HSL が PKA 経路を介してリン酸化されていることはよく知られており、我々は脂肪細胞における PKA 経路が TOFO による肝臓-脳-脂肪の神経回路の活性化に関与しているかどうかを確認した。TOFO は、白色脂肪組織において PKA 基質タンパク質のリン酸化を増加させ、期待されるように HVx によって TOFO の作用が減弱した(図 4A)。図 4A に示されるのと同様に、リン酸化タンパク質は、絶食条件下においても増加した(図 4B)。この結果から、脂肪量低下に対する TOFO の作用は、絶食時における肝臓-脳-脂肪の神経回路を介した脂肪量の調節経路と同様のメカニズムが働いていることが示唆された。

考察

本研究から、SGLT2 阻害薬がグリコーゲン枯渇シグナルを誘発して、肝臓-脳-脂肪の神経回路を活性化し、脂肪細胞における PKA 活性化をもたらすことで脂肪量低下および体重低下を引き起こしている可能性が示唆された。肝臓-脳-脂肪の神経回路の存在は 2006 年に Uno らによって最初に報告された(18)。Uno らは、迷走神経肝枝が肝臓に過剰な脂肪蓄積があるときに脂肪を分解するためのシグナルを送る調節機構を見出した。これらのシグナルは肝臓-脳-脂肪の神経回路を通過した後、最終的に交感神経系を活性化して白色脂肪組織における脂肪分解を促進する。この重要な発見は、高栄養状態では、求心性神経シグナル（迷走神経シグナル）が脂肪分解およびエネルギー消費を加速し、体重ホメオスタシスの維持に寄与することを示唆している。肝臓-脳-脂肪の神経回路の発見後、この神経回路が空腹時の脂肪動員において重要な役割を果たすことを見出した(17,20)。この研究の応用として、本研究では、SGLT2 阻害薬によって引き起こされるグリコーゲン枯渇シグナルが、空腹時と同様にこの神経回路を活性化することを見出した。この結果より、ニューロンネットワークが体重ホメオスタシスにおいて重要な役割を果たすことがさらに支持される。SGLT2 阻害薬の投与は摂餌量を増加させることが報告されている(22,29,30)。しかし、高脂肪食で実験を行った本研究では、TOFO 投与によっても摂餌量の増加は見られなかったため、SGLT2 阻害薬によって誘発される摂餌量の増加は摂餌内容によって異なるメカニズムが存在することを示唆している。SGLT2 阻害薬による摂餌量の増加のメカニズムは、一般に、尿中グルコース排泄の増加に対する補償として理解されるが、正確なメカニズムは不明であり、上記の発見は興味深い。SGLT2 阻害薬による摂餌量の増加、過食症の問題もまた臨床的な観点から重要であるため、さらなる調査が必要である。

今回の研究では、TOFO の脂肪量低下に対する作用は、HVx によって完全にはキャンセルされなかった。1つの原因としてはインスリン作用の寄与が考えられる。血中インスリン量の低下による脂肪組織でのインスリン作用は、細胞内の cAMP-PKA 経路を活性化すること

が知られており、その結果として脂肪分解を誘導する(31)。

この研究では TOFO によってインスリンが減少し、TOFO 以外の SGLT2 阻害薬においても一般的にインスリンを低下させることを考えると、TOFO による脂肪量低下の少なくとも一部は、神経に加えて血中インスリン量もしくはインスリン作用の低下に起因する可能性が示唆される(29,30,32)。TOFO による脂肪量低下のメカニズムに関与する可能性のある他の候補として、液性因子である FGF21 を挙げることができる。FGF21 は脂肪細胞における脂肪分解を調節することが知られている(33)。今回の研究では、血液中を循環する FGF21 の主な供給源である肝臓における Fgf21 遺伝子発現は TOFO によって有意な変化はなく、TOFO による脂肪減少に対する FGF21 の寄与を否定する結果となった(34)。

結論

SGLT2 阻害薬の抗肥満作用は肝臓-脳-脂肪の神経回路を介した作用が関与していることが示された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始にわたって御指導、御助言を賜りました

筑波大学 医学医療系 島野仁 教授に深謝致します。

筑波大学医学医療系 矢作直也 准教授には本研究のテーマ設定、日々の実験内容についてのディスカッション、論文作成に至るまで終始多大なる御協力を賜りました。心より御礼申し上げます。

筑波大学医学医療系 武内謙憲 助教には研究活動開始当初から現在に至るまで、研究活動を行う上で重要なことすべてを懇切丁寧に御指導頂きました。謹んで御礼申し上げます。

本研究の一部は、新学術領域・転写代謝システム計画研究「代謝シグナルが投射されるゲノム領域の同定と転写環境調節機構の解明」によります。

また、日々の実験を進めていくにあたり、多大なる御協力、御支援をいただきました筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病代謝内科研究室の方々に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、尊い命を捧げてくれた実験動物のご冥福をお祈り致します。

最後になりましたが、私生活ならびに研究外活動を支えていただいた家族、親族、先輩、友人、後輩の方々に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] P. Zimmet, K. G. Alberti, and J. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic, *Nature* 414 (2001) 782-787.
- [2] L. Guariguata, D. R. Whiting, I. Hambleton, J. Beagley, U. Linnenkamp, and J. E. Shaw, Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035, *Diabetes Res Clin Pract* 103 (2014) 137-149.
- [3] M. Suzuki, M. Takeda, A. Kito, M. Fukazawa, T. Yata, M. Yamamoto, T. Nagata, T. Fukuzawa, M. Yamane, K. Honda, Y. Suzuki, and Y. Kawabe, Tofogliflozin, a sodium/glucose cotransporter 2 inhibitor, attenuates body weight gain and fat accumulation in diabetic and obese animal models, *Nutr Diabetes* 4 (2014) e125.
- [4] B. Lin, N. Koibuchi, Y. Hasegawa, D. Sueta, K. Toyama, K. Uekawa, M. Ma, T. Nakagawa, H. Kusaka, and S. Kim-Mitsuyama, Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice, *Cardiovasc Diabetol* 13 (2014) 148.
- [5] Y. Kanai, W. S. Lee, G. You, D. Brown, and M. A. Hediger, The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose, *J Clin Invest* 93 (1994) 397-404.
- [6] M. A. Abdul-Ghani, L. Norton, and R. A. DeFronzo, Efficacy and safety of SGLT2 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Curr Diab Rep* 12 (2012) 230-238.
- [7] B. Komoroski, N. Vachharajani, Y. Feng, L. Li, D. Kornhauser, and M. Pfister, Dapagliflozin, a novel, selective SGLT2 inhibitor, improved glycemic control over 2 weeks in patients with type 2 diabetes mellitus, *Clin Pharmacol Ther* 85 (2009) 513-519.
- [8] J. F. List, V. Woo, E. Morales, W. Tang, and F. T. Fiedorek, Sodium-glucose cotransport

inhibition with dapagliflozin in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 32 (2009) 650-657.

[9] K. Stenlof, W. T. Cefalu, K. A. Kim, M. Alba, K. Usiskin, C. Tong, W. Canovatchel, and G. Meininger, Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise, *Diabetes Obes Metab* 15 (2013) 372-382.

[10] J. Rosenstock, N. Aggarwal, D. Polidori, Y. Zhao, D. Arbit, K. Usiskin, G. Capuano, and W. Canovatchel, Dose-ranging effects of canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, as add-on to metformin in subjects with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 35 (2012) 1232-1238.

[11] C. J. Bailey, J. L. Gross, A. Pieters, A. Bastien, and J. F. List, Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with metformin: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* 375 (2010) 2223-2233.

[12] W. T. Cefalu, L. A. Leiter, K. H. Yoon, P. Arias, L. Niskanen, J. Xie, D. A. Balis, W. Canovatchel, and G. Meininger, Efficacy and safety of canagliflozin versus glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin (CANTATA-SU): 52 week results from a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial, *Lancet* 382 (2013) 941-950.

[13] C. Clar, J. A. Gill, R. Court, and N. Waugh, Systematic review of SGLT2 receptor inhibitors in dual or triple therapy in type 2 diabetes, *BMJ Open* 2 (2012).

[14] F. R. Macdonald, J. E. Peel, H. B. Jones, R. M. Mayers, L. Westgate, J. M. Whaley, and S. M. Poucher, The novel sodium glucose transporter 2 inhibitor dapagliflozin sustains pancreatic function and preserves islet morphology in obese, diabetic rats, *Diabetes Obes Metab* 12 (2010) 1004-1012.

[15] Y. Liang, K. Arakawa, K. Ueta, Y. Matsushita, C. Kuriyama, T. Martin, F. Du, Y. Liu, J. Xu, B. Conway, J. Conway, D. Polidori, K. Ways, and K. Demarest, Effect of canagliflozin on renal threshold for glucose, glycemia, and body weight in normal and diabetic animal models, *PLoS One* 7 (2012) e30555.

[16] T. Yamada, Y. Oka, and H. Katagiri, Inter-organ metabolic communication involved in energy

homeostasis: potential therapeutic targets for obesity and metabolic syndrome, *Pharmacol Ther* 117 (2008) 188-198.

[17] N. Yahagi, Hepatic Control of Energy Metabolism via the Autonomic Nervous System, *J Atheroscler Thromb* 24 (2017) 14-18.

[18] K. Uno, H. Katagiri, T. Yamada, Y. Ishigaki, T. Ogihara, J. Imai, Y. Hasegawa, J. Gao, K. Kaneko, H. Iwasaki, H. Ishihara, H. Sasano, K. Inukai, H. Mizuguchi, T. Asano, M. Shiota, M. Nakazato, and Y. Oka, Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity, *Science* 312 (2006) 1656-1659.

[19] S. Tsukita, T. Yamada, K. Uno, K. Takahashi, K. Kaneko, Y. Ishigaki, J. Imai, Y. Hasegawa, S. Sawada, H. Ishihara, Y. Oka, and H. Katagiri, Hepatic glucokinase modulates obesity predisposition by regulating BAT thermogenesis via neural signals, *Cell Metab* 16 (2012) 825-832.

[20] Y. Izumida, N. Yahagi, Y. Takeuchi, M. Nishi, A. Shikama, A. Takarada, Y. Masuda, M. Kubota, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, Y. Iizuka, K. Itaka, K. Kataoka, S. Shioda, A. Nijima, T. Yamada, H. Katagiri, R. Nagai, N. Yamada, T. Kadowaki, and H. Shimano, Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization, *Nat Commun* 4 (2013) 2316.

[21] K. Uno, T. Yamada, Y. Ishigaki, J. Imai, Y. Hasegawa, S. Sawada, K. Kaneko, H. Ono, T. Asano, Y. Oka, and H. Katagiri, A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals, *Nat Commun* 6 (2015) 7940.

[22] A. Obata, N. Kubota, T. Kubota, M. Iwamoto, H. Sato, Y. Sakurai, I. Takamoto, H. Katsuyama, Y. Suzuki, M. Fukazawa, S. Ikeda, K. Iwayama, K. Tokuyama, K. Ueki, and T. Kadowaki, Tofogliflozin Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Accelerates Lipolysis in Adipose Tissue in Male Mice, *Endocrinology* 157 (2015) 1029-1042.

[23] Y. Chiba, T. Yamada, S. Tsukita, K. Takahashi, Y. Munakata, Y. Shirai, S. Kodama, Y. Asai, T. Sugisawa, K. Uno, S. Sawada, J. Imai, K. Nakamura, and H. Katagiri, Dapagliflozin, a

Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Acutely Reduces Energy Expenditure in BAT via Neural Signals in Mice, *PLoS One* 11 (2016) e0150756.

[24] A. Shikama, H. Shinozaki, Y. Takeuchi, T. Matsuzaka, Y. Aita, T. Murayama, Y. Sawada, X. Piao, N. Toya, Y. Oya, A. Takarada, Y. Masuda, M. Nishi, M. Kubota, Y. Izumida, Y. Nakagawa, H. Iwasaki, K. Kobayashi, S. Yatoh, H. Suzuki, H. Yagyu, Y. Kawakami, N. Yamada, H. Shimano, and N. Yahagi, Identification of human ELOVL5 enhancer regions controlled by SREBP, *Biochem Biophys Res Commun* 465 (2015) 857-863.

[25] M. Nishi-Tatsumi, N. Yahagi, Y. Takeuchi, N. Toya, A. Takarada, Y. Murayama, Y. Aita, Y. Sawada, X. Piao, Y. Oya, A. Shikama, Y. Masuda, M. Kubota, Y. Izumida, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, M. Sekiya, Y. Iizuka, Y. Kawakami, T. Kadowaki, N. Yamada, and H. Shimano, A key role of nuclear factor Y in the refeeding response of fatty acid synthase in adipocytes, *FEBS Lett* 591 (2017) 965-978.

[26] N. Yahagi, H. Shimano, T. Matsuzaka, Y. Najima, M. Sekiya, Y. Nakagawa, T. Ide, S. Tomita, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, T. Gotoda, R. Nagai, S. Kimura, S. Ishibashi, J. Osuga, and N. Yamada, p53 Activation in adipocytes of obese mice, *J Biol Chem* 278 (2003) 25395-25400.

[27] Y. Takeuchi, N. Yahagi, Y. Aita, Y. Murayama, Y. Sawada, X. Piao, N. Toya, Y. Oya, A. Shikama, A. Takarada, Y. Masuda, M. Nishi, M. Kubota, Y. Izumida, T. Yamamoto, M. Sekiya, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, O. Urayama, Y. Kawakami, Y. Iizuka, T. Gotoda, K. Itaka, K. Kataoka, R. Nagai, T. Kadowaki, N. Yamada, Y. Lu, M. K. Jain, and H. Shimano, KLF15 Enables Rapid Switching between Lipogenesis and Gluconeogenesis during Fasting, *Cell Rep* 16 (2016) 2373-2386.

[28] M. W. Anthonsen, L. Ronnstrand, C. Wernstedt, E. Degerman, and C. Holm, Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro, *J Biol Chem* 273 (1998) 215-221.

[29] J. J. Devenny, H. E. Godonis, S. J. Harvey, S. Rooney, M. J. Cullen, and M. A. Pelleymounter,

Weight loss induced by chronic dapagliflozin treatment is attenuated by compensatory hyperphagia in diet-induced obese (DIO) rats, *Obesity (Silver Spring)* 20 (2012) 1645-1652.

[30] F. Naznin, H. Sakoda, T. Okada, H. Tsubouchi, T. M. Waise, K. Arakawa, and M. Nakazato, Canagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, attenuates obesity-induced inflammation in the nodose ganglion, hypothalamus, and skeletal muscle of mice, *Eur J Pharmacol* 794 (2017) 37-44.

[31] J. Zhang, C. J. Hupfeld, S. S. Taylor, J. M. Olefsky, and R. Y. Tsiens, Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes, *Nature* 437 (2005) 569-573.

[32] L. Xu, N. Nagata, M. Nagashimada, F. Zhuge, Y. Ni, G. Chen, E. Mayoux, S. Kaneko, and T. Ota, SGLT2 Inhibition by Empagliflozin Promotes Fat Utilization and Browning and Attenuates Inflammation and Insulin Resistance by Polarizing M2 Macrophages in Diet-induced Obese Mice, *EBioMedicine* 20 (2017) 137-149.

[33] Y. Hotta, H. Nakamura, M. Konishi, Y. Murata, H. Takagi, S. Matsumura, K. Inoue, T. Fushiki, and N. Itoh, Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver, *Endocrinology* 150 (2009) 4625-4633.

[34] C. Cicione, C. Degirolamo, and A. Moschetta, Emerging role of fibroblast growth factors 15/19 and 21 as metabolic integrators in the liver, *Hepatology* 56 (2012) 2404-2411.

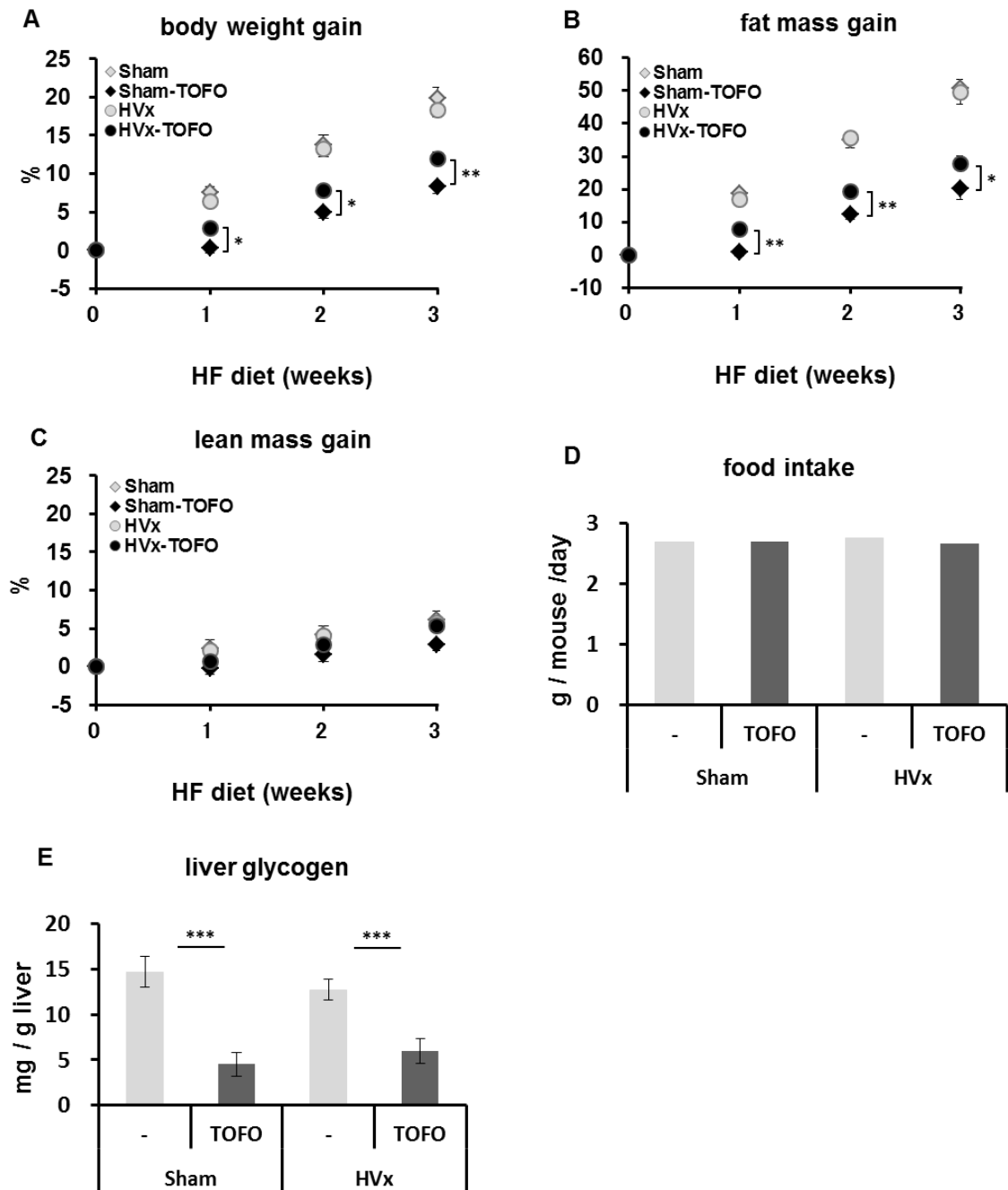


Fig1 肝グリコーゲン低下にもかかわらず、HVxはTOFOの体重低下及び脂肪量抑制作用を減弱させた

麻酔下でDEXAを用いてbody weight (A)、fat mass (B)、lean mass (C)を測定した。

(D)摂餌量 (E)肝グリコーゲン測定

結果は平均値±標準偏差(n=10-12)で表示し、Mann-Whitney U-testで解析してP<0.05未満を有意とした>(*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)

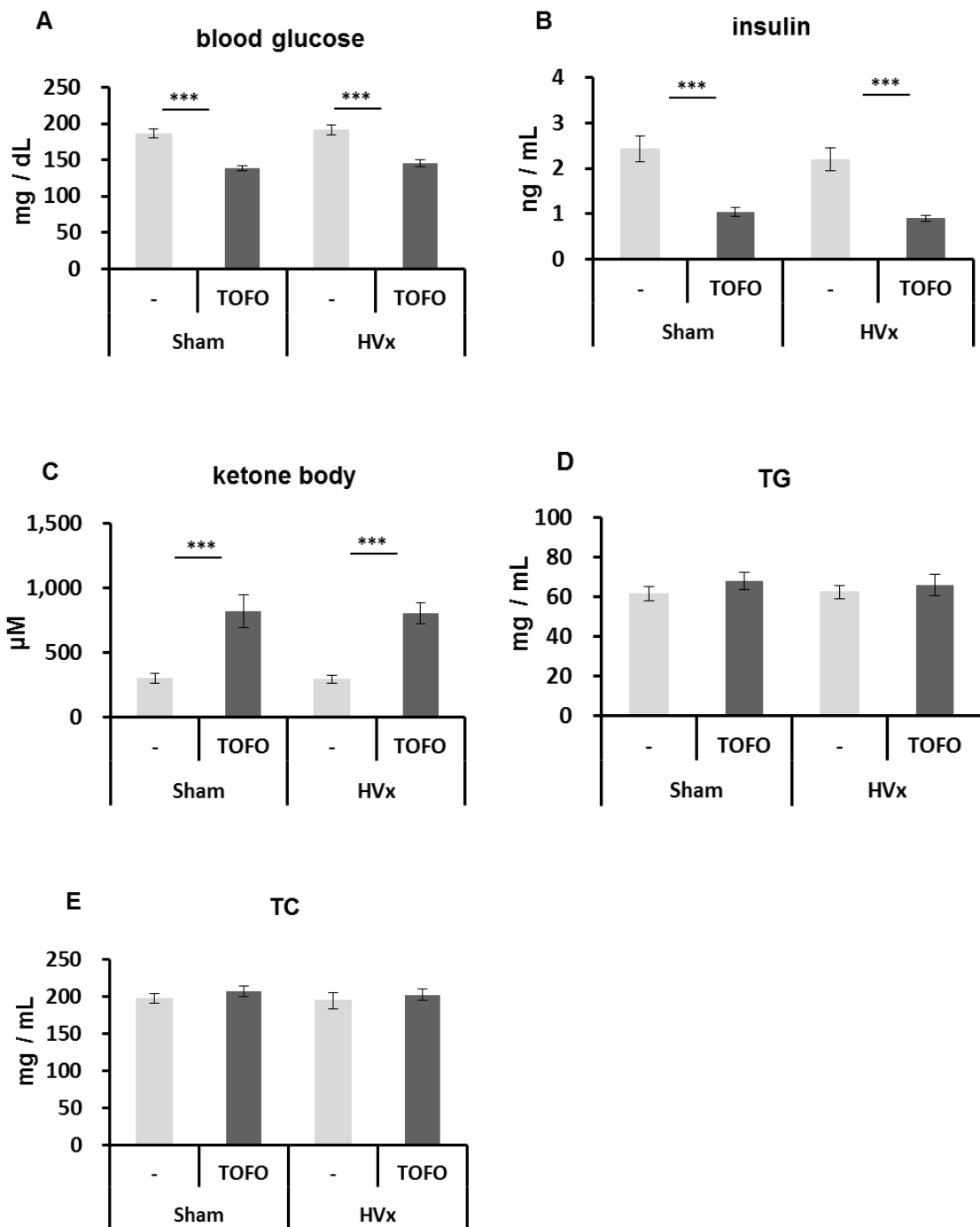


Fig2 DIO マウスにおける HVx と TOFO の血中パラメータに与える影響

(A)血糖値は Ad lib 状態で測定した。(B)インスリン、(C)ケトン体、(D)TG 及び(E)TC は 8 時間絶食の条件で測定した。

結果は平均値±標準偏差(n=10-12)で表示し、Mann-Whitney U-test で解析して P<0.05 未満を有意とした。(***)P<0.001)

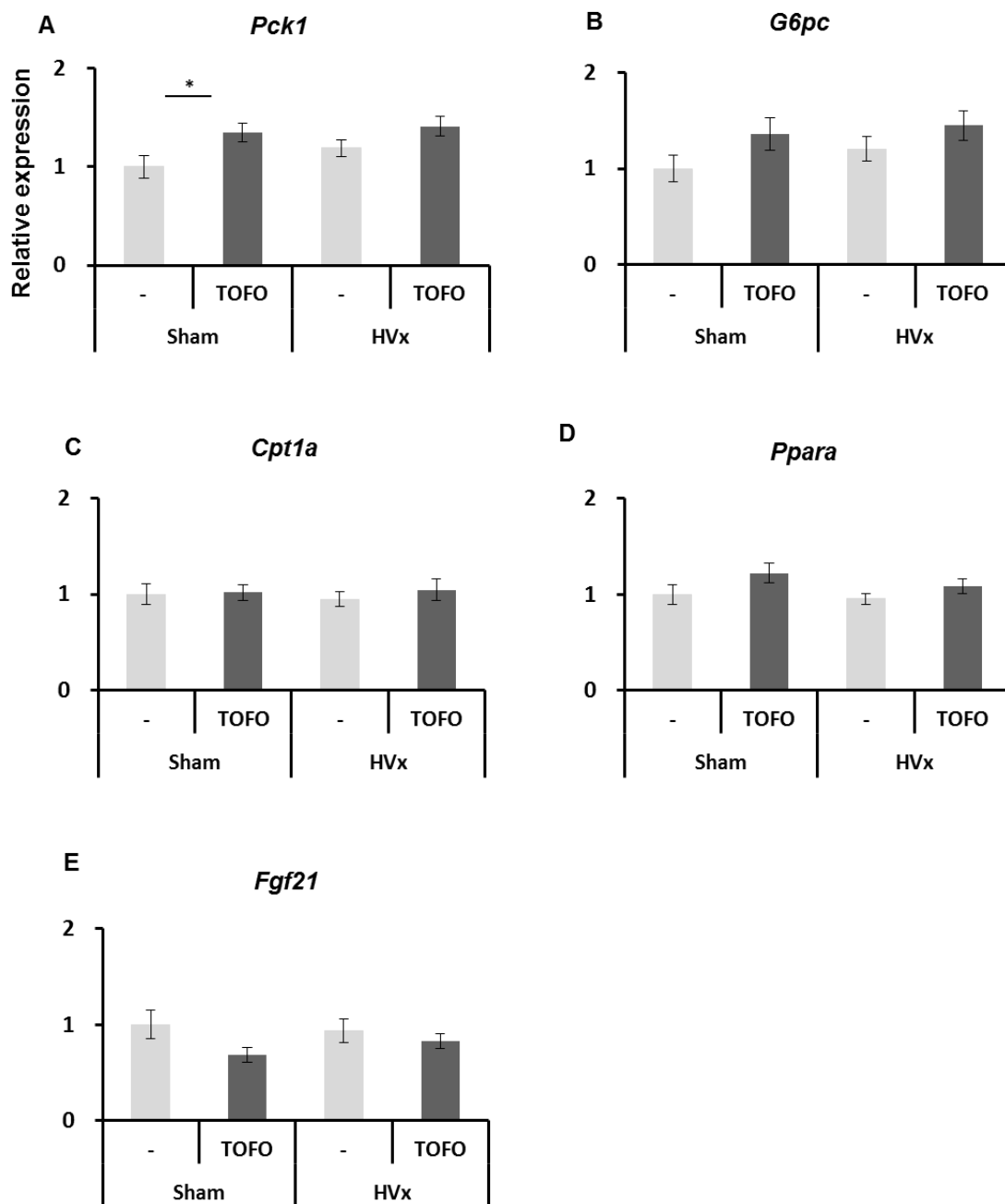


Fig3 DIO マウスにおける HVx と TOFO の肝臓遺伝子発現に与える影響

糖新生系に関わる遺伝子 *Pck1* (A) and *G6pc* (B)及び脂肪酸酸化に関わる遺伝子 *Cpt1a*(C)、*Ppara*(D)および *Fgf21* (E)について測定を行った。

結果は平均値±標準偏差(n=10-12)で表示し、Mann-Whitney U-test で解析して P<0.05 未満を有意とした。(*P<0.05)

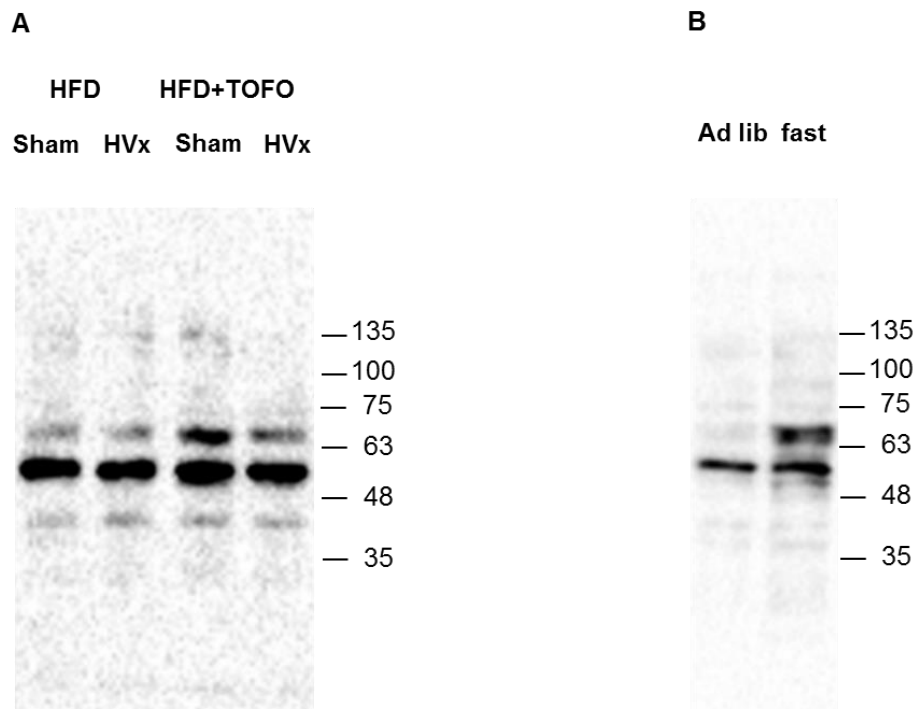


Fig4 HVx は精巣上体脂肪組織において TOFO による PKA 基質タンパク質のリン酸化亢進を減弱させる

(A)TOFO 投与による PKA 基質タンパク質のリン酸化亢進が HVx では減弱した。

(B)Ad lib に対して絶食時(fast)における PKA 基質タンパク質のリン酸化亢進は TOFO 投与による亢進と似た傾向を示した。