

脂質吸収経路を標的とした肥満症治療薬開発
に向けた基盤研究

山口大学大学院 共同獣医学研究科

竹本 光佑

2024年3月

目次

第1章 緒論.....	1
1.1 脂質吸収経路.....	5
1.2 モノアシル/ジアシルグリセロールアシル基転移酵素.....	7
1.3 迷走神経と食欲調節.....	8
1.4 脂質吸収障害と下痢.....	9
1.5 本研究の目的.....	10
第2章 モノアシルグリセロールアシル基転移酵素 2 (MGAT2) 阻害剤の摂餌低下機構.....	11
第1節 背景.....	12
第2節 実験結果.....	13
2.2.1 MGAT2 阻害剤の摂餌低下効果に対するカプサイシン前処置の影響.....	13
2.2.2 MGAT2 阻害剤が延髄孤束核及び他の食欲関連脳領域に与える影響.....	15
2.2.3 MGAT2 阻害剤が食欲調節因子及び小腸組織中脂質含有量に与える影響..	18
第3節 考察.....	23
2.3.1 MGAT2 阻害剤の摂餌低下機構.....	23
2.3.2 MGAT2 阻害剤の摂餌低下効果に関与する食欲調節因子.....	26
2.3.3 MGAT2 阻害剤の創薬的意義.....	27

第 3 章 ジアシルグリセロールアシル基転移酵素 (DGAT) 阻害剤の下痢誘発機構	29
第 1 節 背景	30
第 2 節 実験結果	31
3.2.1 マウスのトリアシルグリセロール吸収経路における DGAT の役割	31
3.2.2 DGAT 阻害剤が下痢及び糞中脂質排泄に与える影響	33
3.2.3 DGAT 阻害剤による病理的变化及び炎症応答	36
3.2.4 DGAT 阻害剤による腸バリア機能障害	40
3.2.5 低用量 DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与による影響	42
第 3 節 考察	46
3.3.1 DGAT 阻害剤の下痢誘発機構	46
3.3.2 DGAT 活性と下痢の関係性	50
3.3.3 ヒト DGAT1 阻害による下痢誘発機構	51
第 4 章 総合考察	52
第 5 章 実験方法	56
5.1 動物と薬物	57
5.2 カプサイシン前処置	58
5.3 摂餌量評価	58

5.4 C-fos 免疫反応性の解析.....	59
5.5 食欲調節因子と小腸組織中脂質含有量の解析.....	60
5.6 トリアシルグリセロール吸収経路の解析.....	61
5.7 下痢、糞中脂質排泄、組織学及び炎症マーカー解析のためのサンプル処理..	62
5.8 下痢の解析.....	63
5.9 糞中脂質排泄の解析.....	63
5.10 組織学的解析.....	64
5.11 腸炎症マーカーの解析.....	64
5.12 腸バリア機能の解析.....	64
5.13 餌の脂質含有量依存的な影響の解析.....	65
5.14 統計解析.....	65
引用文献.....	66
謝辞.....	78

第 1 章 緒論

肥満は体脂肪が過剰に蓄積した状態であり、世界保健機関の診断基準では身体質量指数 (body mass index: BMI) 25 kg/m² 以上が「過体重」、30 kg/m² 以上が「肥満」と定義されている (1)。BMI 30 kg/m² 以上の成人肥満者数は2010年には人口のおよそ11.4%に該当する5億人程度であったと算出されているが、生活習慣や社会環境の変化に伴って2030年時点には人口のおよそ17.5%に該当する10億人程度まで急速に増加すると予測されている (2)。近年、肥満が生活習慣病の発症リスクと共に脳卒中や心筋梗塞などの心血管イベント発症リスクを増加させることで死亡率の上昇に深く関与することが明らかになり、肥満克服に対する医療ニーズが高まってきている (3-5)。一方、日本人を対象としたコホート研究から、BMI 25 kg/m² 以上になると肥満に関連する主要な健康障害 (高血圧, 糖尿病, 高脂血症) を平均1つ以上合併することが示されたため、日本肥満学会の診断基準ではBMI 25 kg/m² 以上が「肥満」と定義されている (6)。2019年におけるBMI 25 kg/m² 以上の成人肥満者数は日本人男性で人口のおよそ32.6%、日本人女性で人口のおよそ19.9%と算出されており、日本においても肥満は克服すべき重大な社会問題となっている (7)。

肥満治療は、これまで食事制限や運動療法などの生活習慣介入に注力されてきた。生活習慣介入は、短期には体重減少に効果的であるが長期的には食欲増進やエネルギー消費低下を引き起こすため、生活習慣介入のみで体重減少を維

持することは困難であることが明らかになっている (8, 9)。一方、ルーワイ胃バイパス手術や胃スリーブ状切除術などの肥満外科手術は長期的な体重減少効果を発揮するが、高い侵襲性や死亡リスクを有する (10)。したがって、肥満に対して有効かつ安全な薬物治療が求められている。肥満の大きな原因の一つが食事の過剰摂取であり、食事に対する欲求が中枢神経によって制御されていることから、肥満症治療薬として開発された化合物の大半は中枢神経に直接作用するものである (11)。しかし、中枢神経は食欲だけでなく循環器の機能や精神機能を制御しており、中枢神経調節薬である Sibutramine や Rimonabant は有効な体重減少効果を発揮していたものの、心筋梗塞や脳卒中発症率の増加あるいは自殺念慮などの許容できない副作用のために市場から撤退した (12, 13)。また、肥満症治療薬として承認されている中枢神経調節薬 Naltrexone/Bupropion には心血管イベント発症リスクの増加、Liraglutide や Semaglutide には悪心/嘔吐の増加などの副作用が存在する (14-16)。食事として摂取した脂質は、炭水化物やたんぱく質と比較してより効率良く同化されて体脂肪に変換される (17, 18)。食事性の脂質は小腸に存在する多種多様な酵素や蛋白により消化、代謝、運搬されて血中に入り、全身に分布した後に余剰分の脂質が体脂肪として蓄えられる (19, 20)。それゆえ、小腸における脂質吸収経路を標的とした肥満症治療薬は、中枢神経調節薬で問題となるような副作用の懸念が低くかつ高い抗肥満効果を発揮する

可能性があることから、魅力的な創薬戦略と考えられる。

1.1 脂質吸収経路

食事として摂取する脂質の大半を占めるトリアシルグリセロール (triacylglycerol, TAG) の吸収調節には、小腸組織内の TAG 代謝が重要な役割を果たしている (図 1)。摂取した TAG は小腸管腔内で膵リパーゼによりモノアシルグリセロール (monoacylglycerol: MAG) 及び脂肪酸 (fatty acid: FA) に消化され、主に近位小腸の吸収上皮細胞に取り込まれる (19)。取り込まれた FA はアシル CoA 合成酵素によって脂肪酸アシル CoA (FA-CoA) に変換され、MAG と共にモノアシルグリセロールアシル基転移酵素 (monoacylglycerol acyltransferase: MGAT) を介してジアシルグリセロール (diacylglycerol: DAG) に合成される。合成された DAG は、FA-CoA と共にジアシルグリセロールアシル基転移酵素 (diacylglycerol acyltransferase: DGAT) を介して TAG に再合成される (19-23)。再合成された TAG は一時的に小腸の吸収上皮細胞内に蓄積するか、外来性脂質の運搬体であるカイロミクロンに組み込まれてリンパ系を介して血中に移り、全身へ運搬される (20)。

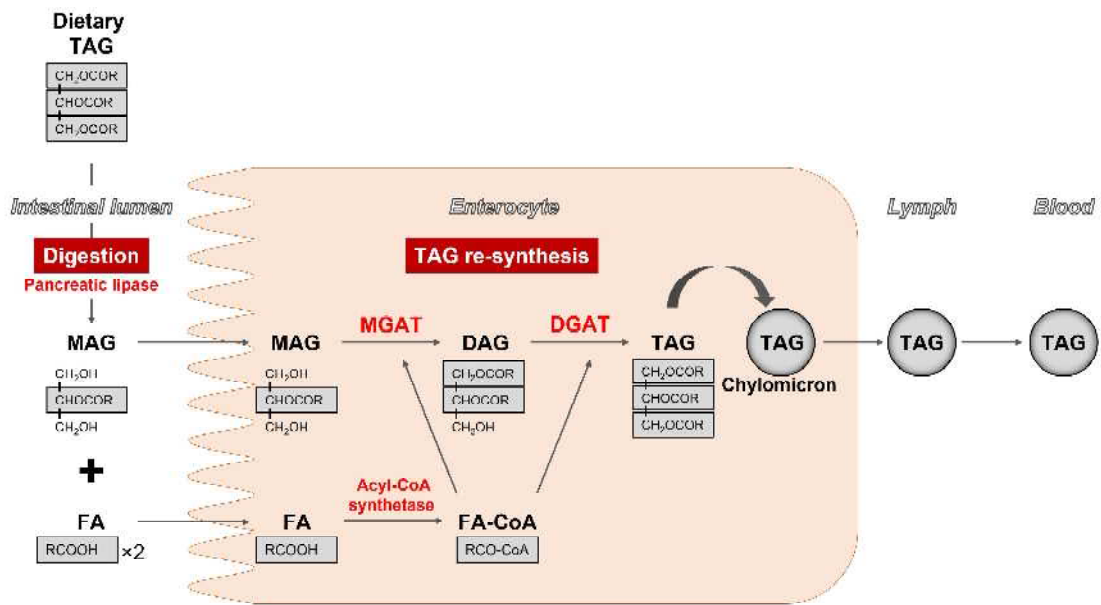


図1 小腸を介したトリアシルグリセロール吸収経路

食事として摂取したトリアシルグリセロール (triacylglycerol: TAG) は小腸管腔内でモノアシルグリセロール (monoacylglycerol: MAG) 及び脂肪酸 (fatty acid: FA) に消化されて吸収上皮細胞に取り込まれる。取り込まれた FA はアシル CoA 合成酵素によって脂肪酸アシル CoA (FA-CoA) に変換され、MAG と共にモノアシルグリセロールアシル基転移酵素 (monoacylglycerol acyltransferase: MGAT) やジアシルグリセロールアシル基転移酵素 (diacylglycerol acyltransferase: DGAT) を介して TAG に再合成され、カイロミクロンに組み込まれてリンパ系を介して血中に移行する。

1.2 モノアシル/ジアシルグリセロールアシル基転移酵素

MGAT には同じ合成反応を触媒する MGAT1、MGAT2、MGAT3 の 3 種のアイソフォームが存在し、マウス小腸組織では MGAT2、ヒト小腸組織では MGAT2 と MGAT3 が高発現している (21, 24)。一方、DGAT には DGAT1 と DGAT2 の 2 種のアイソフォームが存在し、マウス小腸組織では DGAT1 と DGAT2、ヒト小腸組織では DGAT1 が高発現している (22, 23)。マイクロソームを用いた酵素アッセイ研究から、マウス小腸組織だけでなくヒト小腸組織においても特異的な MGAT2 阻害剤が FA-CoA と MAG からの DAG 合成反応を最大で 80%以上抑制すること、マウス小腸組織において特異的な DGAT1 阻害剤が FA-CoA と DAG からの TAG 合成反応を最大で 90%以上抑制することが明らかになっている (25, 26)。これらの知見から、ヒトやマウスの小腸組織では主に MGAT2 及び DGAT1 が TAG 合成を制御していると考えられており、数多くの MGAT2 や DGAT1 の特異的な阻害剤が肥満及び肥満関連代謝性疾患に対する治療薬として開発されている。

MGAT2 や DGAT1 をコードする遺伝子を欠損させたマウスは高脂肪餌誘発の肥満に抵抗性を有し、それらの特異的な阻害剤は抗肥満効果を発揮する (27-32)。近年、齧歯類において MGAT2 阻害や DGAT1 阻害が、摂取した TAG の血中移行を抑制するだけでなく高脂肪餌の摂取量を低下させることが報告され、それ

らの抗肥満効果に TAG 吸収抑制だけでなく摂餌低下が関与することが示唆されている (28, 30-32)。MGAT2 遺伝子欠損マウス及び DGAT1 遺伝子欠損マウスでは、脂質経口負荷後に消化管から分泌される満腹ホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) の血中濃度が上昇する (27, 28, 33)。また、MAG の一種である 2-オレオイルグリセロール (2-oleoyl glycerol: 2-OG) を近位小腸に注入することにより血中 GLP-1 濃度が上昇する (34)。これらの知見から、血中 GLP-1 濃度の上昇が MGAT2 阻害や DGAT1 阻害による摂餌低下効果に関与すると考えられているが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

1.3 迷走神経と食欲調節

迷走神経は、栄養由来シグナルを伝達することで食事の摂取量調節に重要な役割を果たしている (35)。摂取した TAG は小腸で消化された後、オレオイルエタノールアミド (oleoylethanolamide: OEA) や消化管ホルモン (ペプチド YY [peptide YY: PYY], GLP-1) などの食欲調節因子の産生を誘発する (36-38)。OEA、PYY や GLP-1 は、食欲関連脳領域でありかつ迷走神経を介して小腸と接続する延髄孤束核の神経細胞を活性化させる (39-41)。さらに、それらの TAG 由来食欲調節因子は摂餌低下効果を発揮するが、それらの摂餌低下効果は迷走神経除去や迷走神経機能を障害させるカプサイシン前処置により消失する (39, 42)。

MGAT2 や DGAT1 が小腸における TAG 吸収の調節に大きな役割を担っていることを考慮すると、迷走神経を介したシグナルが MGAT2 阻害や DGAT1 阻害の摂餌低下効果に関与している可能性がある。

1.4 脂質吸収障害と下痢

小腸において脂質吸収を調節する細胞内プロセスの障害は、先天性下痢疾患に関連している (43-46)。例えば、小腸の吸収上皮細胞で TAG の輸送を調節するミクロソームトリグリセリド転送タンパク質遺伝子や Secretion Associated Ras Related GTPase 1B 遺伝子の変異は、ヒトで TAG 吸収不良だけでなく脂肪便を誘発する (43-45)。この脂肪便は、小腸の吸収上皮細胞における過剰な TAG 蓄積によって引き起こされると考えられている (47-49)。一方、興味深いことに、吸収上皮細胞で TAG 合成を触媒する DGAT1 遺伝子の機能喪失型変異は、ヒトで TAG 吸収不良と共に重篤な水様性下痢を誘発する (46)。なお、DGAT1 遺伝子欠損マウスでは、TAG の血中移行低下は認められているが下痢に関連する表現型は報告されておらず (29, 50)、ヒトで DGAT1 遺伝子変異が下痢を引き起こすメカニズムは明らかになっていない。

1.5 本研究の目的

本研究は、小腸 TAG 再合成の鍵となる MGAT2 や DGAT1 の阻害によって誘発される摂餌低下や水様性下痢の発症メカニズムを解明し、脂質吸収経路を標的とした新たな肥満症治療薬開発の基盤を形成することを目的に実施した。第 2 章では、特異的な MGAT2 阻害剤 (31) を用いて、マウスにおける MGAT2 阻害誘発の摂餌低下への迷走神経の関与について検討した。第 3 章では、ヒト小腸と異なり、マウス小腸では DGAT1 だけでなく DGAT2 も高発現していることから (22, 23)、特異的な DGAT1 阻害剤及び DGAT2 阻害剤 (51, 52) を用いて、マウスで DGAT1 や DGAT2 の単独阻害あるいは DGAT1 と DGAT2 の同時阻害が水様性下痢を誘発するか検討した。さらに、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害により認められた下痢の誘発機構について検討した。

第 2 章

モノアシルグリセロールアシル基転移酵素 2 (MGAT2) 阻害剤の摂餌低下機構

第1節 背景

齧歯類において、遺伝的及び薬理的な MGAT2 阻害は小腸を介した TAG の血中移行を抑制するだけでなく高脂肪餌の摂取量を低下させる (28, 30, 31)。しかし、その摂餌低下と小腸を介した食欲調節に重要な役割を担っている迷走神経の関係性については解明されていない。本研究では、MGAT2 阻害の摂餌低下効果に対する求心性迷走神経経路の関与について検討することで、脂質吸収経路阻害による摂餌低下機構の一つを解明することを目的に研究を行った。

第 2 節 実験結果

2.2.1 MGAT2 阻害剤の摂餌低下効果に対するカプサイシン前処置の影響

マウスに対する過剰量のカプサイシン前処置は、迷走神経機能を障害する (53)。MGAT2 阻害剤の摂餌低下効果に対する迷走神経の関与を明らかにするため、過剰量のカプサイシンを前処置したマウスの摂餌量に対する MGAT2 阻害剤の影響を評価した。

溶媒だけを投与した群では、カプサイシン非処置マウスとカプサイシン処置マウスにおいて、高脂肪餌の絶食-再給餌後 2 時間及び 4 時間の摂餌量に差は認められなかった (図 2)。一方、MGAT2 阻害剤 (10 mg/kg) の単回投与は、カプサイシン非処置マウスで溶媒投与群と比較して高脂肪餌の絶食-再給餌後 2 時間及び 4 時間の摂餌量を有意に減少させたが、この摂餌低下効果はカプサイシン処置マウスでは消失した (図 2)。

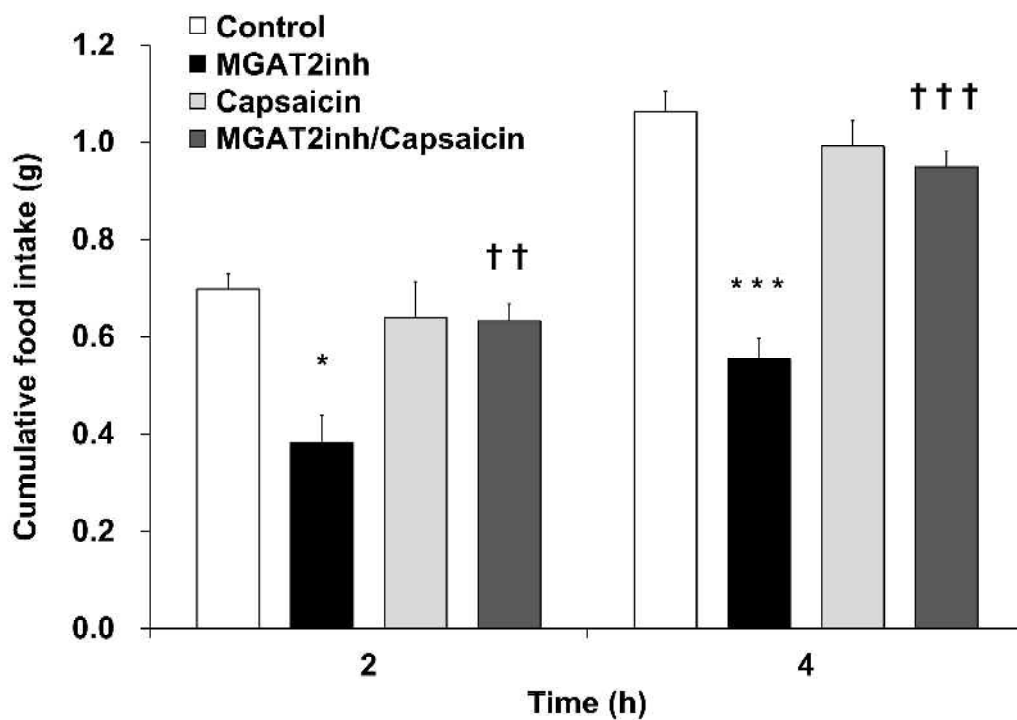


図 2 高脂肪餌再給餌後におけるカプサイシン前処置マウスの摂餌量に対する MGAT2 阻害剤の影響

カプサイシン非処置マウスとカプサイシン処置マウスを一晩絶食させ、それぞれのマウスに溶媒 (Control, Capsaicin) あるいは MGAT2 阻害剤 (MGAT2inh; 10 mg/kg, MGAT2inh/Capsaicin) を経口投与した。その後高脂肪餌を再給餌し、給餌開始後 2 時間及び 4 時間の摂餌量を測定した。N = 5。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (Control との比較, Tukey's multiple comparison test)、†† $P < 0.01$ 、††† $P < 0.001$ (MGAT2inh との比較, Tukey's multiple comparison test)。

2.2.2 MGAT2 阻害剤が延髄孤束核及び他の食欲関連脳領域に与える影響

MGAT2 阻害剤が求心性迷走神経経路を活性化するか明らかにするため、求心性迷走神経の投射先である延髄孤束核において、神経細胞活性化マーカーc-fos の免疫反応性に対する MGAT2 阻害剤の影響を評価した。

MGAT2 阻害剤を投与したマウスでは、高脂肪餌の絶食-再給餌 2 時間後における延髄孤束核の c-fos 陽性細胞数が、溶媒だけを投与したコントロール群の陽性細胞数と比較して有意に増加した (図 3A, 3B, 3G)。また、MGAT2 阻害剤は、コントロールと比較し、延髄孤束核に隣接して食欲に影響を与える延髄最後野領域の c-fos 陽性細胞数を増加させた (図 3A, 3B, 3H)。一方、視床下部の食欲関連脳領域である弓状核及び室傍核における c-fos 陽性細胞数については、コントロール群と MGAT2 阻害剤投与群の間で差が認められなかった (図 3C-3F, 3I, 3J)。

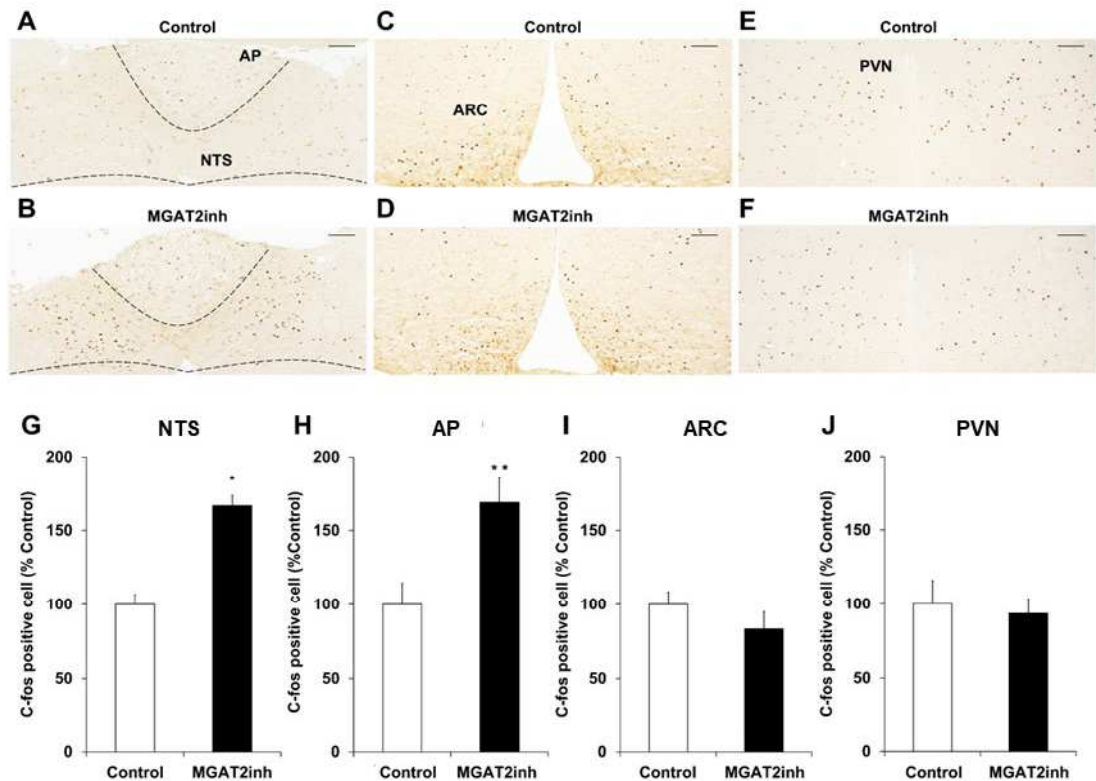


図3 高脂肪餌再給餌後におけるマウス延髄の孤束核及び最後野 (A, B, G, H)、マウス視床下部の弓状核 (C, D, I) 及び室傍核 (E, F, J) の c-fos 免疫反応性に対する MGAT2 阻害剤の影響

一晩絶食させたマウスに溶媒 (Control) あるいは MGAT2 阻害剤 (MGAT2inh; 10 mg/kg) を経口投与した。その後に高脂肪餌を再給餌し、給餌開始 2 時間後における延髄の孤束核 (nuclei of solitary tract: NTS) と最後野 (area postrema: AP)、視床下部の弓状核 (arcuate nucleus: ARC) と室傍核 (paraventricular hypothalamic nucleus: PVN) における c-fos 陽性細胞数を計測し、コントロール群に対する割合

として表示した。スケールバーは、100 μm を表している。N = 8 (G, I, J)。N = 7 (H)。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Control との比較, two-tailed Welch's t-test)。

2.2.3 MGAT2 阻害剤が食欲調節因子及び小腸組織中脂質含有量に与える影響

MGAT2 阻害剤が摂餌低下を誘発するメカニズムを明らかにするため、求心性迷走神経経路を活性化する食欲調節因子である OEA、PYY 及び GLP-1 に対する MGAT2 阻害剤の影響を評価した。

MGAT2 阻害剤は、コントロールと比較して高脂肪餌の絶食-再給餌 2 時間後の空腸組織中 OEA 含有量を有意に増加させた (図 4A)。一方、再給餌後の回腸組織中 OEA 含有量、血中 PYY 及び total GLP-1 濃度に対する MGAT2 阻害剤の影響は認められなかった (図 4A-4C)。次に、脂質を経口で大量にボラス投与したマウスを用いて同様の検討を実施した。MGAT2 阻害剤は、コントロールと比較して脂質ボラス投与 1 時間後の空腸及び回腸組織中 OEA 含有量を有意に増加させ、血中 PYY 及び total GLP1 濃度を有意に上昇させた (図 4D-4F)。

MGAT2 阻害と食欲調節因子の関係性をさらに理解するため、食欲調節因子を測定した際と同一条件下で小腸組織中脂質含有量に対する MGAT2 阻害剤の影響を評価した。

高脂肪餌の絶食-再給餌 2 時間後においては、MGAT2 阻害剤はコントロールと比較して空腸組織中 TAG 含有量を有意に減少させ、空腸組織中 FA 含有量を有意に増加させた (図 5A, 5B)。一方、再給餌後の空腸組織中 2-OG 含有量及び回腸組織中 TAG、FA、2-OG 含有量に対する MGAT2 阻害剤の影響は認められなか

った (図 5A-5C)。脂質ボラス投与 1 時間後においては、MGAT2 阻害剤はコントロールと比較して空腸及び回腸組織中 TAG 含有量を有意に減少させ、空腸及び回腸組織中 FA 含有量及び回腸組織中 2-OG 含有量を有意に増加させた (図 5D-5F)。一方、空腸組織中 2-OG 含有量に対する MGAT2 阻害剤の影響は認められなかった (図 5F)。

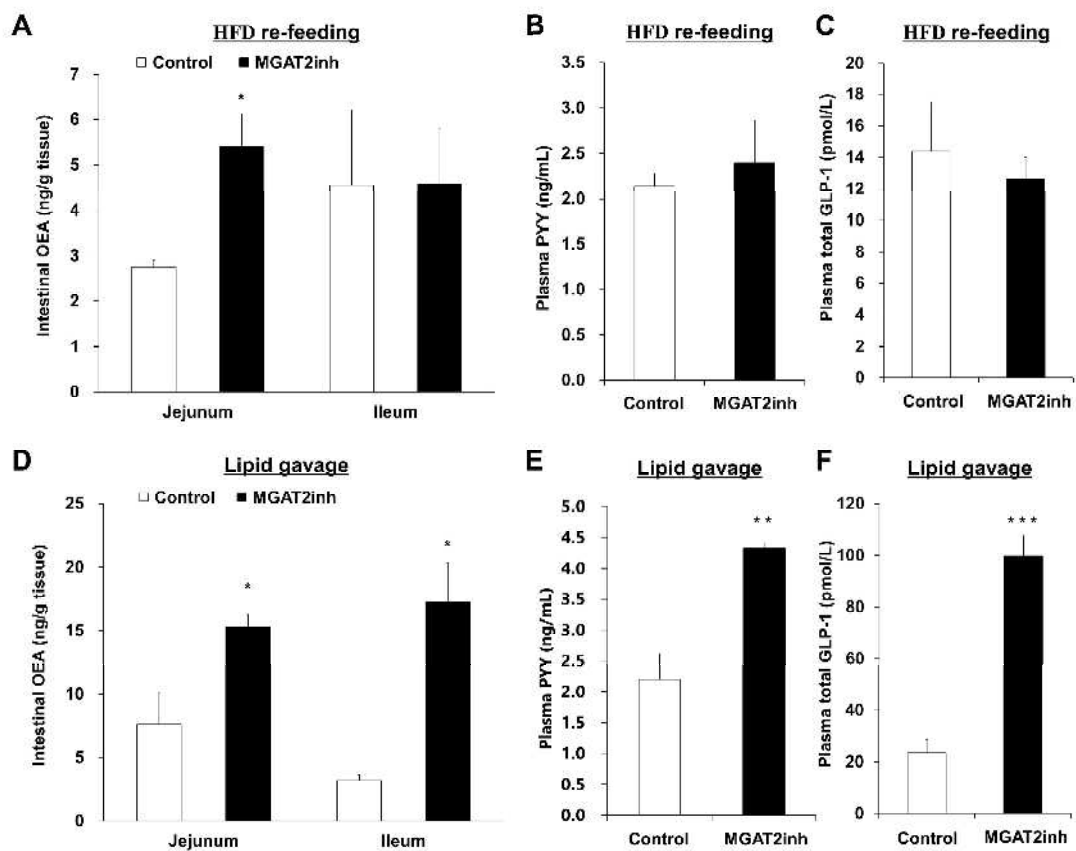


図 4 高脂肪餌再給餌後あるいは脂質ボラス投与後におけるマウスの小腸組織中オレオイルエタノールアミド含有量 (A, D)、血中ペプチド YY 濃度 (B, E) 及び血中総グルカゴン様ペプチド-1 濃度 (C, F) に対する MGAT2 阻害剤の影響

一晩絶食させたマウスに溶媒 (Control) あるいは MGAT2 阻害剤 (MGAT2inh; 10 mg/kg) を経口投与した。その後高脂肪餌を再給餌し、給餌開始 2 時間後 (high fat diet [HFD] re-feeding) あるいは脂質ボラス投与 1 時間後 (Lipid gavage) において、小腸組織中オレオイルエタノールアミド (oleoylethanolamide: OEA) 含

有量は液体クロマトグラフィー-質量分析法により定量し、血中ペプチド YY (peptide YY: PYY) 及び総グルカゴン様ペプチド-1 (total glucagon-like peptide-1: total GLP-1) 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットにより定量した。N = 4 (A)。N = 5 (B-F)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (Control との比較, two-tailed Welch's t-test)。

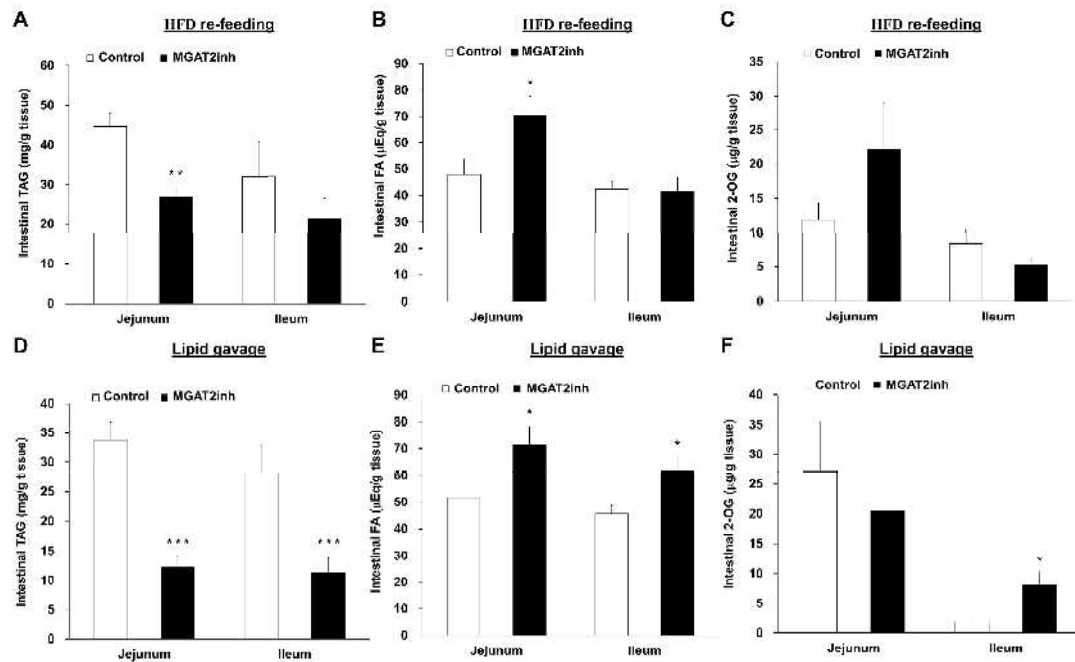


図5 高脂肪餌再給餌後あるいは脂質ボーラス投与後におけるマウスの小腸組織中 TAG 含有量 (A, D)、FA 含有量 (B, E) 及び 2-オレオイルグリセロール含有量 (C, F) に対する MGAT2 阻害剤の影響

一晩絶食させたマウスに溶媒 (Control) あるいは MGAT2 阻害剤 (MGAT2inh; 10 mg/kg) を経口投与した。その後高脂肪餌を再給餌し、給餌開始 2 時間後 (HFD re-feeding) あるいは脂質ボーラス投与 1 時間後 (Lipid gavage) において、小腸組織中 TAG 及び FA 含有量は酵素法により定量し、2-オレオイルグリセロール (2-oleoyl glycerol: 2-OG) 含有量は液体クロマトグラフィー-質量分析法により定量した。N = 8 (A, B)。N = 5 (C, F)。N = 13 (D, E)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (Control との比較, two-tailed Welch's t-test)。

第3節 考察

本研究では、MGAT2 阻害剤の摂餌低下効果に末梢の迷走神経経路が関与しているか明らかにすることを目的としてマウスを用いた検討を行った。特異的な MGAT2 阻害剤 (31) の摂餌低下効果が迷走神経機能を障害するカプサイシン前処置により消失したことから、MGAT2 阻害剤の摂餌低下に迷走神経が関与することが明らかになった。また、高脂質負荷条件下において MGAT2 阻害剤が延髄孤束核の c-fos 発現量を増加させ、小腸組織中 OEA 含有量の増加や血中消化管ホルモン (PYY, total GLP-1) 濃度を上昇させたことから、これらが迷走神経の活性化とその後の摂餌低下に重要なメカニズムであることが示唆された。

2.3.1 MGAT2 阻害剤の摂餌低下機構

新規肥満症治療薬の創出を考えた場合、小腸を介した TAG 吸収に関与する MGAT2 は魅力的な創薬ターゲットと考えられる。近年、マウスで MGAT2 阻害剤が TAG 吸収抑制だけでなく摂餌低下を引き起こすことが報告されたが (30, 31)、そのメカニズムは解明されていない。

本研究において、薬理的な MGAT2 阻害は高脂肪餌の絶食-再給餌後の摂餌量を低下させ、その摂餌低下効果はカプサイシン前処置により迷走神経を障害させた際に消失した。さらに、MGAT2 阻害剤は高脂肪餌の絶食-再給餌後に迷走

神経から求心性入力を受け取る延髄孤束核の c-fos 発現量を増加させ、空腸組織中 OEA 含有量も上昇させた。脂質ボラス投与後においては、MGAT2 阻害剤は既報と同様に血中 PYY 及び total GLP-1 濃度を上昇させ (30, 54)、さらに空腸及び回腸組織中 OEA 含有量も上昇させた。OEA、PYY や GLP-1 は求心性迷走神経を介して摂餌低下効果を発揮すると考えられている (38, 42)。これらの知見から、MGAT2 阻害剤は小腸組織中 OEA 含有量の増加や血中 PYY 及び GLP-1 濃度の上昇による求心性迷走神経経路の活性化を介してマウスの摂餌量を低下させる可能性が示唆された (図 6)。

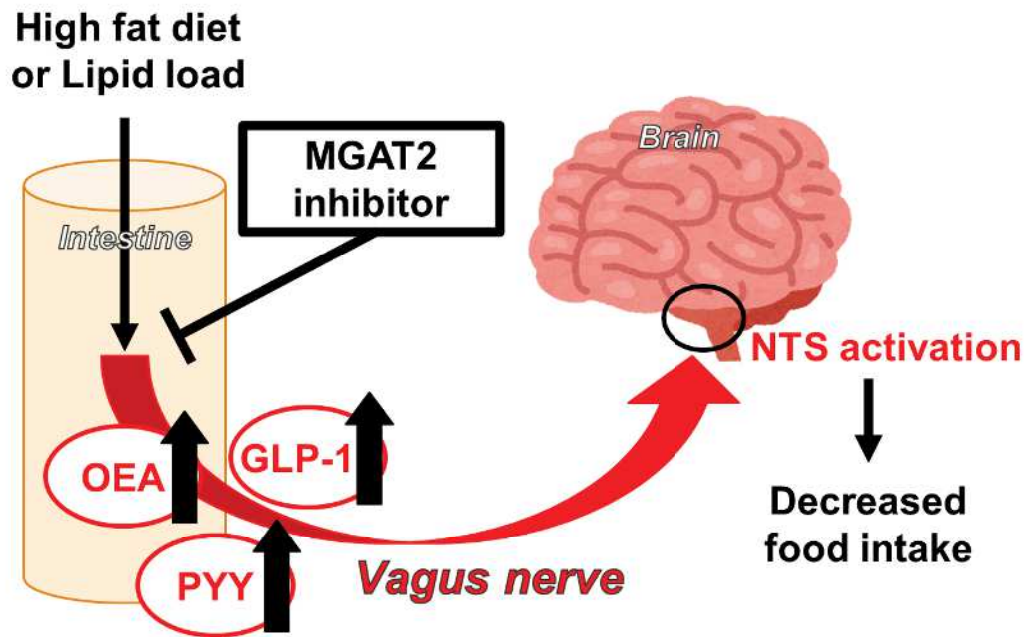


図 6 マウスにおける MGAT2 阻害剤の摂餌低下機構仮説

高脂質負荷条件下において、MGAT2 阻害により脂質誘発食欲調節因子である OEA、PYY、GLP-1 の産生が亢進する。その結果、求心性迷走神経を介して NTS 神経が活性化されて摂餌量が低下する。

2.3.2 MGAT2 阻害剤の摂餌低下効果に關与する食欲調節因子

高脂肪餌の絶食-再給餌後、MGAT2 阻害剤は血中 PYY 及び total GLP-1 濃度には影響を与えずに空腸組織中 OEA 含有量を増加させ、その増加は空腸組織中 TAG 含有量の低下と空腸組織中 FA 含有量の増加を伴っていた。OEA は、主に空腸を含む近位小腸領域で主要な FA であるオレイン酸から生成される (38)。MGAT2 がオレイン酸からの TAG 合成に關与することから (25)、MGAT2 阻害は空腸組織中でオレイン酸の含有量を増加させ、それに伴って OEA 含有量の増加を誘発したと考えられる。本研究で未検討の他の食欲調節因子が MGAT2 阻害の摂餌低下効果に寄与している可能性はあるが、これらの知見は、PYY や GLP-1 ではなく、OEA の産生亢進が高脂肪餌負荷条件下におけるマウスの摂餌低下に強く關与していることを示唆している。

高脂肪餌の絶食-再給餌後とは異なり、大量の脂質をボラス投与した後では空腸及び回腸組織中 OEA 含有量、血中 PYY 及び total GLP-1 濃度の全てが MGAT2 阻害剤により増加した。それらの増加には空腸及び回腸組織中 TAG 含有量の低下、空腸及び回腸組織中 FA 含有量の増加、回腸組織中 2-OG 含有量の増加を伴っていた。これまでの研究から、脂質をボラス投与したマウスで、MGAT2 阻害は TAG 吸収抑制を介して遠位小腸領域への FA や MAG の流入を増加させることが示されている (27, 30)。PYY や GLP-1 は、FA や 2-OG に応答し

て、主に遠位小腸粘膜に分布する L 細胞から分泌される (55, 56)。それゆえ、MGAT2 阻害条件下において、脂質ボラス投与後には大量の脂質負荷が起因となって遠位小腸への FA や 2-OG の流入が誘導され、血中 PYY 及び total GLP-1 濃度上昇が引き起こされた可能性がある。一方、高脂肪餌の絶食-再給餌後には遠位小腸への脂質流入が生じておらず、MGAT2 阻害に伴う回腸での脂質含有量の変化やそれに伴う食欲調節因子の産生促進が起こらなかったと考えられる。

2.3.3 MGAT2 阻害剤の創薬的意義

本研究結果は、MGAT2 が末梢神経刺激を介して食欲を制御するための治療標的となることを示している。これまでに承認された肥満症治療薬の大半は、中枢神経を直接刺激して食欲を制御しており、心血管イベント発症リスクの増加や悪心/嘔吐の増加などの中枢性副作用を有する (14-16)。一方、肥満外科手術であるルーワイ胃バイパス術は中枢性の有害事象なく強力な抗肥満効果を発揮するが、高い侵襲性と死亡リスクを有する (57-61)。ルーワイ胃バイパス術は脂質吸収経路を遠位小腸に再構築することにより、結果として OEA、PYY 及び GLP-1 産生の亢進や高脂肪餌の摂取低下を誘発する (62, 63)。これらの生理学的変化は、薬理的な MGAT2 阻害によって誘導されるものと類似している。中枢神経機能に対する MGAT2 阻害の詳細な影響は依然として明らかになっていな

いが、MGAT2 阻害剤は中枢神経に直接作用せずに食欲を制御可能であるため、低い中枢性副作用懸念で強力な薬効を発揮する非侵襲的で魅力的な治療戦略となる可能性がある。

第3章

ジアシルグリセロールアシル基転移酵素 (DGAT) 阻害剤の下痢誘発機構

第1節 背景

DGAT は DGAT1 と DGAT2 の 2 種のアリソフォームからなる (22, 23)。ヒト DGAT1 遺伝子の機能喪失型変異を有する患者は重篤な水様性下痢を呈するが、DGAT1 機能と下痢の関係性は解明されていない (46)。一方、ヒト表現系とは異なり、DGAT1 遺伝子欠損マウスは健康であると報告されている (29, 50)。DGAT1 のみが高発現するヒト小腸組織と異なり、マウス小腸組織では DGAT1 と DGAT2 が共に高発現しているが、DGAT2 遺伝子欠損マウスが生後すぐに死亡するため小腸組織における DGAT2 の生理的役割は明らかになっていない (22, 23, 64)。

本研究では、マウスにおける DGAT1 阻害剤や DGAT2 阻害剤の単独投与あるいは同時投与が下痢を誘発するか検証した。さらに、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害により認められた下痢の発症メカニズムについて検討することで、脂質吸収経路阻害による下痢誘発機構の一つを解明することを目的に研究を行った。

第 2 節 実験結果

3.2.1 マウスのトリアシルグリセロール吸収経路における DGAT の役割

マウスの TAG 吸収経路における DGAT1 及び DGAT2 の役割を明らかにするため、¹⁴C 標識 TAG を含むコーンオイルをマウスに経口でボーラス投与してから 1 時間後、血中 ¹⁴C 標識 TAG のサロゲートである血漿中放射能に対する DGAT1 阻害剤及び DGAT2 阻害剤の影響を評価した。

DGAT1 阻害剤 (3 mg/kg) の単独投与は溶媒だけを投与したコントロールと比較して血漿中放射能を有意に減少させたが、DGAT2 阻害剤 (7.5 mg/kg) の単独投与は血漿中放射能に影響を与えなかった (図 7A)。一方、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与は、DGAT1 阻害剤の単独投与と比較してさらに血漿中放射能を有意に減少させた (図 7A)。

次に、¹⁴C 標識 TAG をマウスに経口でボーラス投与してから 1 時間後の十二指腸組織中の放射性標識 TAG 及び DGAT 基質 (FA, DAG) に対する DGAT1 阻害剤及び DGAT2 阻害剤の影響を評価した。

DGAT1 阻害剤あるいは DGAT2 阻害剤の単独投与はコントロールと比較して十二指腸組織中の放射性標識 TAG、FA 及び DAG 含有量に影響を与えなかったが、各阻害剤の同時投与はそれらの含有量を有意にかつ大幅に低下させた (図 7B-7D)。

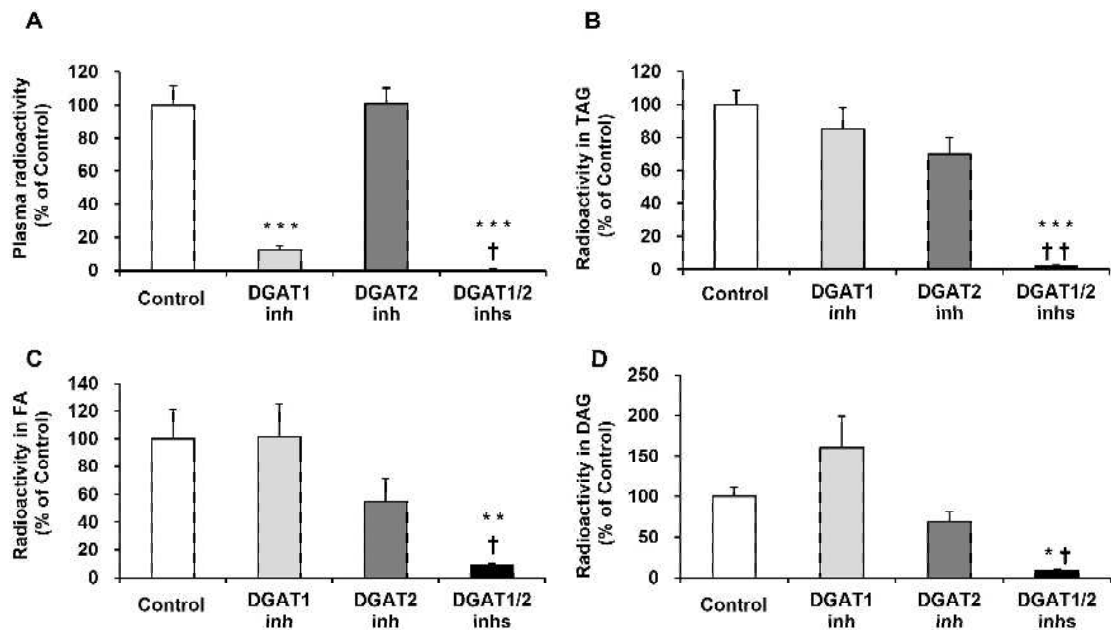


図7 ^{14}C 標識 TAG 経口投与後におけるマウス血漿中 (A) 及び十二指腸組織中脂質画分 (B-D) の放射能に対する DGAT 阻害剤の影響

一晩絶食させたマウスに、溶媒 (Control) や、DGAT1 阻害剤 (DGAT1inh; 3 mg/kg) と DGAT2 阻害剤 (DGAT2inh; 7.5 mg/kg) を単独あるいは同時投与 (DGAT1/2inhs) した後、 ^{14}C 標識 TAG を含む脂質を経口投与した。脂質負荷 1 時間後に血漿と十二指腸組織サンプル中の放射能を測定してコントロール群に対する割合として表示した。N = 4。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (Control との比較, Dunnett's multiple comparison test)。† $P < 0.05$ 、†† $P < 0.01$ (DGAT1inh との比較, two-tailed Welch's t-test)。

3.2.2 DGAT 阻害剤が下痢及び糞中脂質排泄に与える影響

高脂肪餌負荷条件下において、DGAT1 阻害剤あるいは DGAT2 阻害剤を単独投与したマウスに異常な所見は認められなかった。一方、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与を繰り返すと、全てのマウスが下痢を呈した (図 8A)。

なお、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害による下痢は、餌の脂肪含有率が 60% kcal から 32% kcal に下がるにつれて改善し、通常餌 (12% kcal 脂肪含有飼料) 負荷条件下で消失した (図 9)。DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与はコントロールと比較して糞中水分含有量を有意に増加させたが、どちらか一方の単独投与ではそのような変化が認められなかった (図 8B)。

次に、DGAT1 や DGAT2 の阻害が脂質吸収経路にどのように影響するか明らかにするため、高脂肪餌負荷マウスの糞中脂質排泄量に対する DGAT1 阻害剤及び DGAT2 阻害剤の影響を評価した。

DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与はコントロールと比較して糞中 FA 含有量を有意に増加させたが、糞中 TAG 含有量には影響を与えなかった (図 8C, 8D)。また、どちらか一方の単独投与では糞中 FA、TAG 含有量に影響を与えなかった。

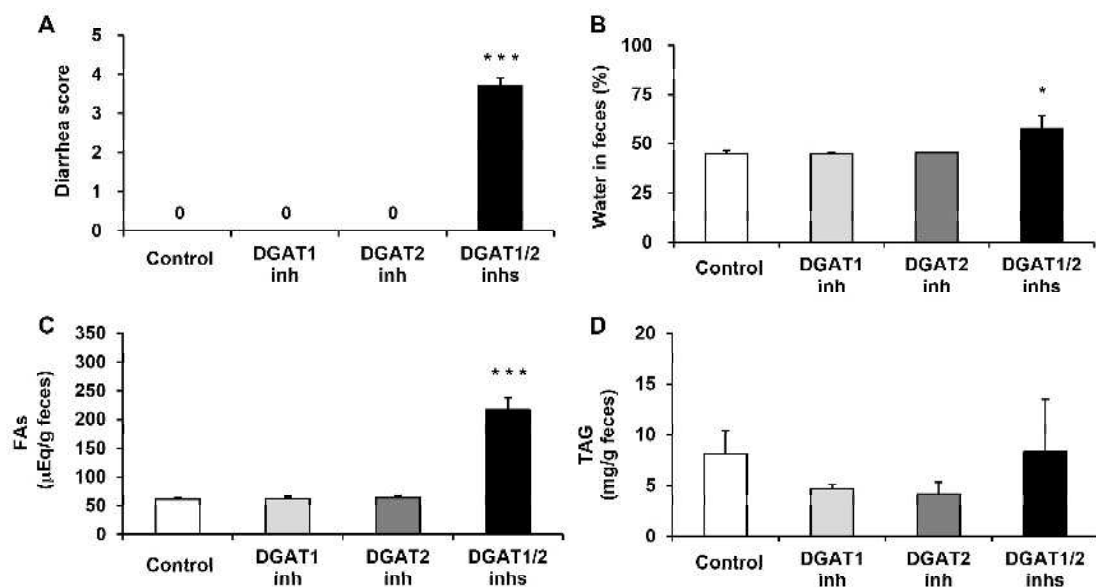


図 8 高脂肪餌負荷条件下でのマウスの下痢スコア (A)、糞中水分含有量 (B)、糞中 FA 含有量 (C) と糞中 TAG 含有量 (D) に対する DGAT 阻害剤の影響

高脂肪餌負荷条件下でマウスに2日間、1日2回、溶媒 (Control) や、DGAT1 阻害剤 (DGAT1inh; 3 mg/kg) と DGAT2 阻害剤 (DGAT2inh; 7.5 mg/kg) を単独あるいは同時投与 (DGAT1/2inhs) し、期間中の全ての糞便を採取した。下痢スコアは各糞便サンプルの柔らかさと外観から採点し、水分含有量は糞の湿重量から乾燥重量を引いて算出した。糞中 FA 及び TAG 含有量は、酵素アッセイにより定量した。N = 7。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (Control との比較, Dunnett's multiple comparison test)。

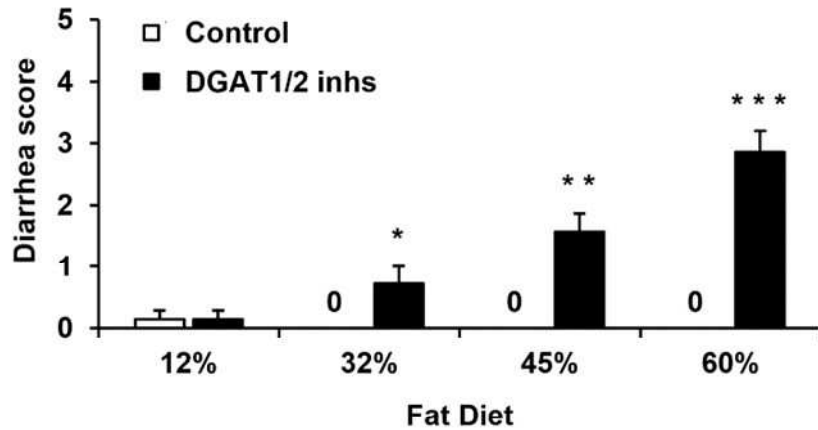


図 9 通常餌 (12% kcal 脂肪含有飼料) あるいは高脂肪餌 (32, 45, 60% kcal 脂肪含有飼料) 負荷条件下でのマウスの下痢スコアに対する DGAT 阻害剤の影響

通常餌あるいは高脂肪餌負荷条件下でマウスに2日間、1日2回、溶媒 (Control) あるいは DGAT1 阻害剤 (3 mg/kg) と DGAT2 阻害剤 (7.5 mg/kg) を同時投与 (DGAT1/2 inh) し、期間中の全ての糞便を採取した。下痢スコアは、各糞便サンプルの柔らかさと外観から採点した。N=7。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (Control との比較, two-tailed Welch's t-test)。

3.2.3 DGAT 阻害剤による病理的变化及び炎症応答

DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与が水様性下痢を誘発するメカニズムを明らかにするため、高脂肪餌負荷マウスの小腸組織に対する DGAT1 阻害剤及び DGAT2 阻害剤の影響を評価した。

DGAT1 と DGAT2 の同時阻害は小腸管腔内の水分蓄積を誘発した (図 10A)。さらに、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤を同時投与したマウスにおいて、十二指腸と空腸では陰窩の過形成や絨毛の短縮が観察されたが、回腸では認められなかった (図 10B)。DGAT1 阻害剤あるいは DGAT2 阻害剤を単独投与したマウスでは、これらの病理学的変化が認められなかった。一方、多数の細胞質内空胞が DGAT1 阻害剤単独投与マウスの空腸で観察されたが、DGAT2 阻害剤単独投与マウスや DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤を同時投与したマウスではその変化が認められなかった (図 10B)。

DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与によって誘発される小腸の病理学的変化に対する炎症応答の関与を明らかにするため、高脂肪餌負荷マウスにおいて腸炎症マーカーであるプロスタグランジン E₂ (prostaglandin E₂: PGE₂) の小腸組織中含量及びカルプロテクチンの糞中含量 (65, 66) に対する DGAT1 阻害剤及び DGAT2 阻害剤の影響を評価した。

DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与は、コントロールと比較して十二

指腸及び空腸組織中 PGE₂ 含有量や糞中カルプロテクチン含有量を有意に増加させたが、回腸組織中 PGE₂ 含有量には影響を与えなかった (図 10C-10F)。DGAT1 阻害剤あるいは DGAT2 阻害剤の単独投与マウスでは、これらの腸炎症マーカーの変化が認められなかった。

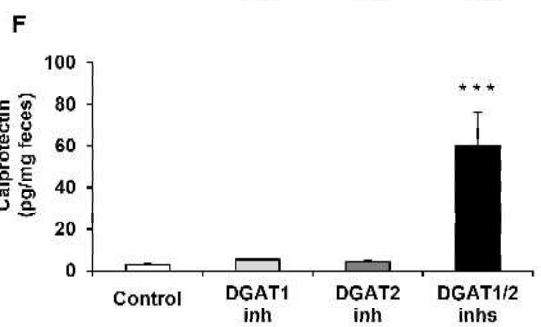
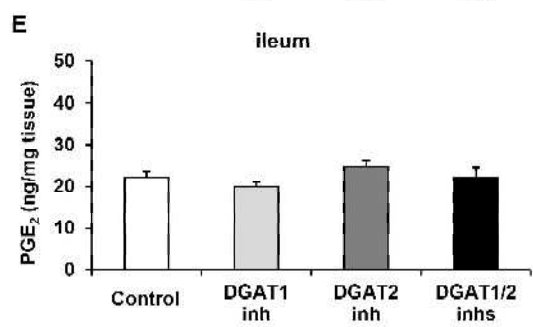
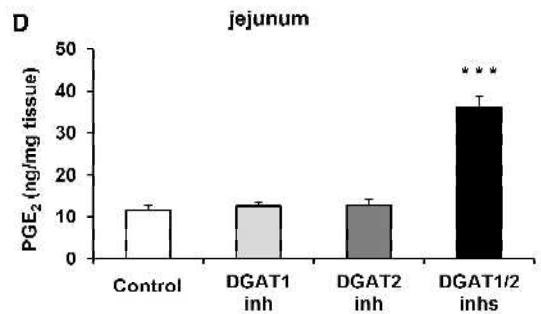
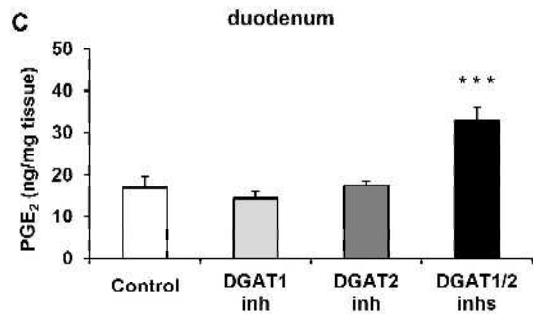
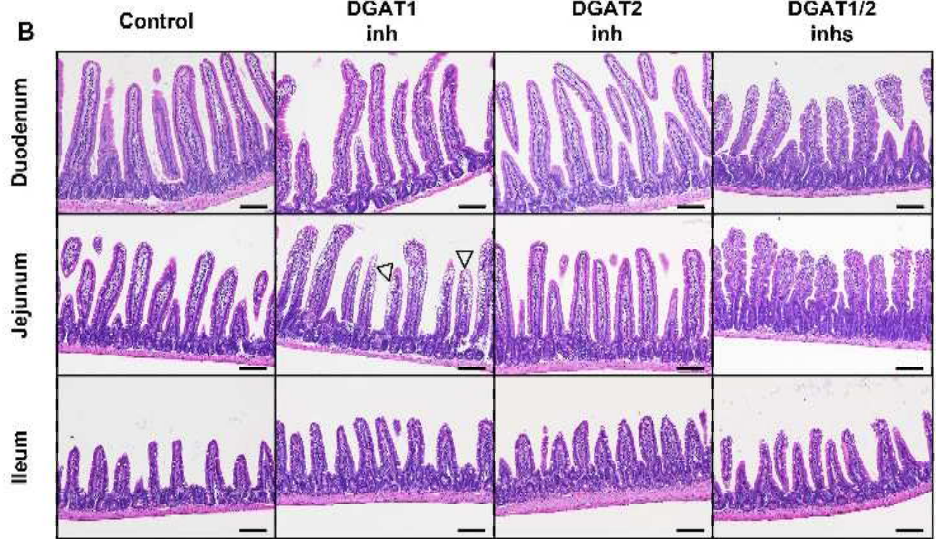
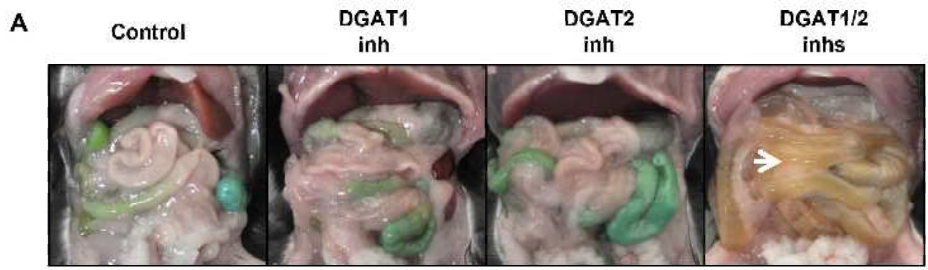


図 10 高脂肪餌負荷条件下でのマウス小腸の肉眼的所見 (A)、小腸組織像 (B)、小腸組織中プロスタグランジン E₂ 含有量 (C-E) 及び糞中カルプロテクチン含有量 (F) に対する DGAT 阻害剤の影響

高脂肪餌負荷条件下でマウスに 3 日間、1 日 2 回、溶媒 (Control) や、DGAT1 阻害剤 (DGAT1inh; 3 mg/kg) と DGAT2 阻害剤 (DGAT2inh; 7.5 mg/kg) を単独あるいは同時投与 (DGAT1/2inhs) し、期間中の全ての糞便を採取した。DGAT 阻害剤を最終投与した 4 時間後、マウスを安楽死させて小腸組織サンプルを採取した。矢印は、水分で満たされた小腸を示している (A)。小腸組織サンプルの切片は、ヘマトキシリン・エオシン染色を施した。矢尻は、多数の細胞質内空胞を示している。スケールバーは、100 μ m を表している (B)。小腸組織中プロスタグランジン E₂ (prostaglandin E₂: PGE₂) 含有量と糞中カルプロテクチン含有量は、ELISA キットにより定量した (C-F)。N = 7 (C-E)。N = 4 (F, DGAT1/2inhs)。N = 7 (F, 他の全ての投与群)。^{***} $P < 0.001$ (Control との比較, Dunnett's multiple comparison test)。

3.2.4 DGAT 阻害剤による腸バリア機能障害

DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与マウスで認められた小腸管腔内の水分蓄積の原因を明らかにするため、親水性高分子の蛍光標識デキストラン (fluorescein isothiocyanate-dextran: FD4) の腸管膜透過性を指標として、腸バリア機能に対する DGAT1 阻害剤及び DGAT2 阻害剤の影響を評価した。

DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与は、コントロールと比較し、FD4 を経口投与してから 5 時間後の血中 FD4 濃度を有意に増加させた (図 11)。一方、どちらか一方の単独投与は血中 FD4 濃度に影響を与えなかった。

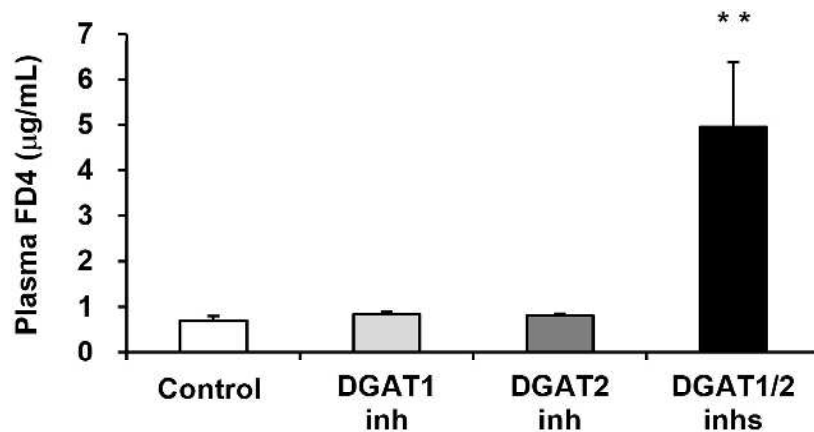


図 11 高脂肪餌負荷条件下でのマウスの蛍光標識デキストランの腸管膜透過性に対する DGAT 阻害剤の影響

高脂肪餌負荷条件下でマウスに2日間、1日2回、溶媒 (Control) や、DGAT1 阻害剤 (DGAT1inh; 3 mg/kg) と DGAT2 阻害剤 (DGAT2inh; 7.5 mg/kg) を単独あるいは同時投与 (DGAT1/2inhs) した。DGAT 阻害剤を最終投与した直後、蛍光標識デキストラン (fluorescein isothiocyanate-dextran: FD4; 22 mg/kg) を経口投与した。FD4 投与5時間後に血漿サンプルを採取し、血中 FD4 濃度は蛍光強度を測定することで定量した。N = 4 (DGAT1/2inhs)。N = 5 (他の全ての投与群)。^{**} $P < 0.01$ (Control との比較, Dunnett's multiple comparison test)。

3.2.5 低用量 DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与による影響

DGAT 阻害による TAG 吸収抑制効果と下痢の関係性を明らかにするため、DGAT2 阻害条件下において DGAT1 阻害剤の TAG 吸収に対する用量依存的な影響を評価し、単独投与で最大の TAG 吸収抑制効果を発揮するように用量設定した DGAT1 阻害剤 (3 mg/kg) と比較した。

DGAT1 阻害剤 (0.03, 0.1, 3 mg/kg) と DGAT2 阻害剤の同時投与は用量依存的に ^{14}C 標識 TAG 経口投与後の血漿中放射能を有意に低下させ、低用量の DGAT1 阻害剤 (0.03 mg/kg) と DGAT2 阻害剤の同時投与による TAG 吸収抑制効果は DGAT1 阻害剤 (3 mg/kg) の単独投与よりも有意に弱かった (図 12)。一方、その低用量の DGAT1 阻害剤 (0.03 mg/kg) と DGAT2 阻害剤の同時投与は、DGAT1 阻害剤 (3 mg/kg) の単独投与による影響 (図 8A, 図 8C, 図 10D, 図 10F) と異なり、高脂肪餌負荷条件下で下痢スコアを有意に増加させ、また、糞中 FA 含有量、空腸組織中 PGE_2 含有量や糞中カルプロテクチン含有量を増加させる傾向にあった (図 13)。

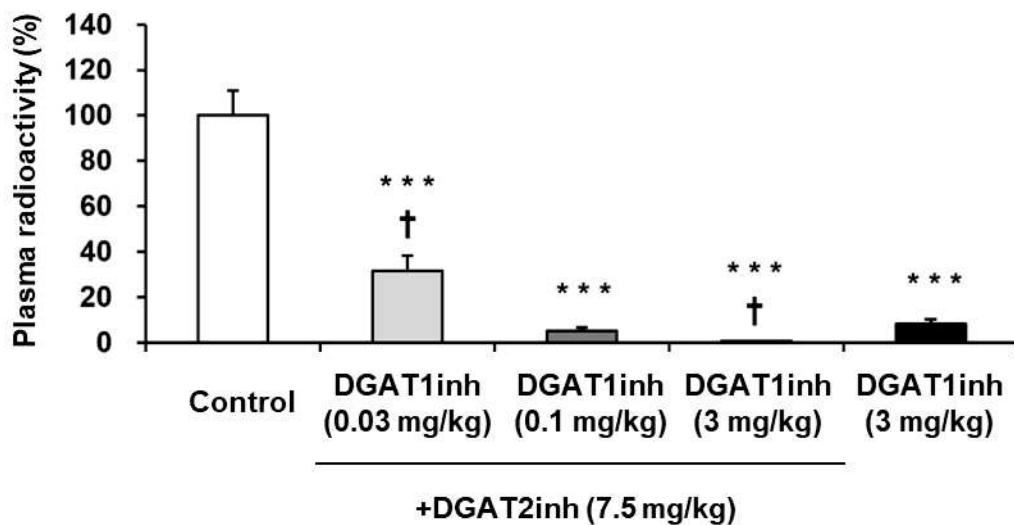


図 12 ^{14}C 標識 TAG 経口投与後におけるマウスの血漿中放射能に対する DGAT 阻害剤の用量依存的な影響

一晩絶食させたマウスに溶媒 (Control)、DGAT1 阻害剤 (DGAT1inh; 0.03, 0.1, 3 mg/kg) と DGAT2 阻害剤 (DGAT2inh; 7.5 mg/kg) を同時投与、あるいは DGAT1 阻害剤 (3 mg/kg) を単独投与した後、 ^{14}C 標識 TAG を含む脂質を経口投与した。脂質負荷 1 時間後に血漿サンプルを採取し、サンプル中の放射能を測定してコントロール群に対する割合として表示した。N = 5。*** $P < 0.001$ (Control との比較, Dunnett's multiple comparison test)、† $P < 0.05$ (DGAT1inh との比較, two-tailed Welch's t-test)。

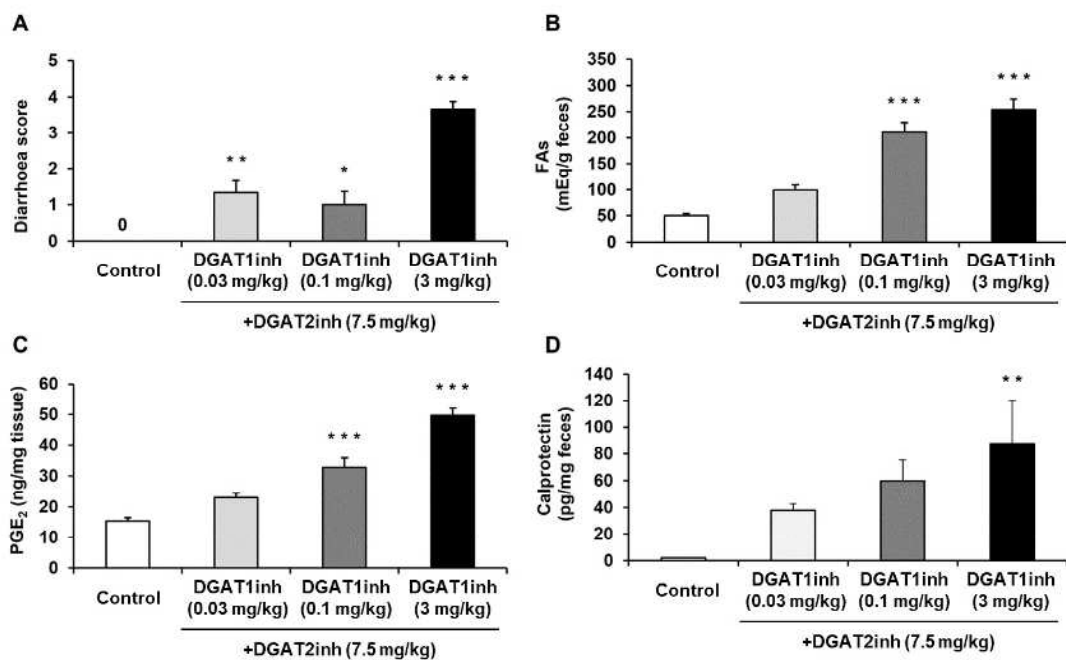


図 13 高脂肪餌負荷条件下でのマウスの下痢スコア (A)、糞中 FA 含有量 (B)、空腸組織中 PGE₂ 含有量 (C) 及び糞中カルプロテクチン含有量 (D) に対する DGAT 阻害剤の用量依存的な影響

高脂肪餌負荷条件下でマウスに、下痢スコアや糞中 FA 含有量解析時には 2 日間、空腸組織中 PGE₂ 含有量や糞中カルプロテクチン含有量解析時には 3 日間、1 日 2 回、溶媒 (Control) あるいは DGAT1 阻害剤 (DGAT1inh; 0.03, 0.1, 3 mg/kg) と DGAT2 阻害剤 (DGAT2inh; 7.5 mg/kg) を同時投与し、期間中の全ての糞便を採取した。下痢スコアは、各糞便サンプルの柔らかさと外観から採点した。糞中 FA 含有量は酵素アッセイにより定量し、小腸組織中 PGE₂ 含有量と糞中カルプロテクチン含有量は ELISA キットにより定量した。N = 6。**P* < 0.05、***P* < 0.01、

*** $P < 0.001$ (Control との比較, Dunnett's multiple comparison test)。

第3節 考察

本研究では、マウスで DGAT1 や DGAT2 の単独阻害あるいは同時阻害が水様性下痢を誘発するか、また、水様性下痢がどのように誘発されるのか明らかにすることを目的として検討を行った。特異的な DGAT1 阻害剤や DGAT2 阻害剤 (51, 52) の単独投与が水様性下痢を誘発しなかった一方、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与が高脂肪餌負荷条件下では重篤な水様性下痢を誘発することが明らかになった。また、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害によって誘発される下痢が糞中 FA 排泄量の増加、小腸組織中 PGE₂ 含有量や糞中カルプロテクチン含有量などの腸炎症マーカーの増加、腸バリア機能障害の指標となる FD4 腸管膜透過性の増加を併発したことから、小腸 FA 代謝の調節不全、炎症応答変化や腸バリア機能障害は DGAT1 と DGAT2 の同時阻害によって誘発される下痢に重要なメカニズムであることが示唆された。

3.3.1 DGAT 阻害剤の下痢誘発機構

新規肥満症治療薬の創出を考えた場合、小腸を介した TAG 吸収に関与する DGAT1 は魅力的な創薬ターゲットと考えられる。近年、DGAT1 遺伝子の機能喪失型変異はヒトで重篤な水様性下痢を誘発することが報告されたが (46)、そのメカニズムは解明されていない。

本研究で、薬理的な DGAT1 と DGAT2 の同時阻害は高脂肪餌負荷マウスにおいて重篤な水様性下痢を誘発した。さらに、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤を同時に投与したマウスは、下痢と共に十二指腸や空腸における陰窩の過形成や絨毛の短縮を呈した。この近位小腸での病理学的変化は小腸組織中 PGE₂ 含有量や糞中カルプロテクチン含有量の増加などの炎症性反応変化を伴っていたため、腸傷害が発生していたと考えられる。さらに、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与マウスでは、腸バリア機能障害を示唆する FD4 腸管膜透過性の増加や小腸管腔内の水分蓄積が認められた。腸傷害や腸炎症は腸バリア機能障害に寄与し (67, 68)、腸バリア機能障害は管腔内への滲出液増加による水様性下痢を誘発する (67, 69)。それゆえ、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害は、腸炎症及び腸傷害を引き起こすことにより、バリア機能障害とそれに伴う水様性下痢を誘発すると考えられる (図 14)。

DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与は、放射性標識 TAG の経口投与後の血漿中及び十二指腸組織中放射性標識 TAG 含有量を減少させ、高脂肪餌負荷条件下で糞中 FA 含有量を増加させた。これらの結果は、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害が、小腸の吸収上皮腸細胞における FA 代謝不全を介して腸粘膜への FA 曝露を増強させたことを示唆している。過剰量の FA は細胞傷害性作用を発揮し (70, 71)、過剰な FA の経口摂取はマウスでもヒトでも炎症性腸疾患リスクを上昇

させる (72, 73)。これらの知見を考慮すると、腸粘膜への過剰な FA 曝露が、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害によって誘発される腸傷害のトリガーとなっている可能性が高い。なお、十二指腸や空腸などの近位小腸では、回腸と比較して管腔内から吸収上皮細胞への FA 取り込みに関わる分子の発現量が高い (74, 75)。DGAT1 阻害剤及び DGAT2 阻害剤を同時投与したマウスにおいて、十二指腸や空腸では腸炎症や腸傷害に関連した変化が認められた一方、回腸ではそのような変化が認められなかった。それゆえ、DGAT1 と DGAT2 を同時に阻害した際には、近位小腸で吸収上皮細胞へ取り込まれた FA の解毒化が不十分となって腸傷害が誘発され、下痢が発症すると考えられる (図 14)。

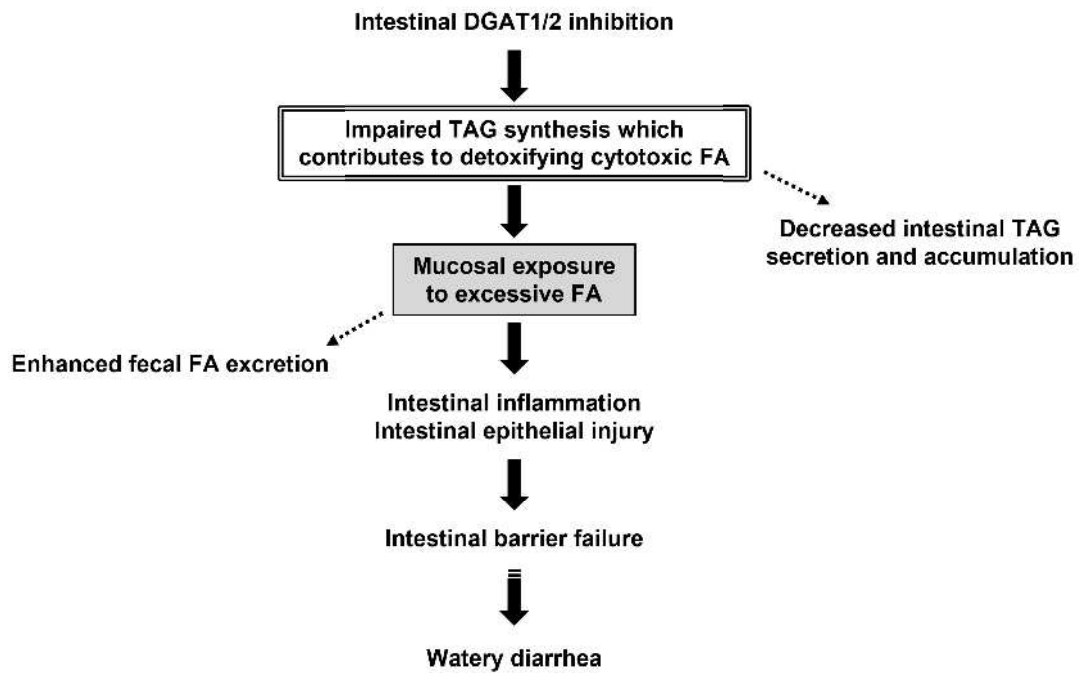


図 14 マウスにおける DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与による下痢誘発機構仮説

高脂肪餌負荷条件下において、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害により小腸の吸収上皮細胞内で細胞傷害性 FA の解毒に寄与する TAG 合成反応が障害される。その結果、小腸を介した血中への TAG 分泌や小腸吸収上皮細胞中の TAG 蓄積が抑制されるだけでなく、FA が腸粘膜に過剰に曝露する。過剰な FA は糞中に排泄されると共に腸炎症や腸傷害を誘発するため、腸バリア機能障害に伴う水様性下痢が発症する。

3.3.2 DGAT 活性と下痢の関係性

DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与が下痢を誘発した一方、DGAT1 阻害剤や DGAT2 阻害剤の単独投与は下痢を誘発しなかった。DGAT2 阻害剤の単独投与は放射性標識 TAG 経口投与後の血漿中放射性標識 TAG 含有量に影響を与えなかったが、DGAT1 阻害剤の単独投与は血漿中放射性標識 TAG 含有量を低下させており、これは DGAT2 阻害剤を追加することで更に低下した。また、十二指腸組織中の放射性標識 TAG 含有量は DGAT1 阻害剤あるいは DGAT2 阻害剤の単独投与による影響を受けなかったが、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤を同時投与することによって低下した。これらの結果は、マウス小腸では DGAT1 が TAG 吸収における優勢な DGAT アイソフォームであり、また、DGAT1 活性が阻害された際に DGAT2 が代償的な役割を果たすことを示唆している。DGAT1 阻害剤の単独投与よりも脂質吸収への影響が小さい低用量 DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与は、下痢を誘発した。これもまた DGAT2 の代償的な役割を示唆するものである。なお、高脂肪餌負荷条件下において、DGAT1 阻害剤投与マウスの空腸で細胞質内空胞の増加が観察された。これは以前に報告された DGAT1 遺伝子欠損マウスの小腸で中性脂肪染色により観察された脂肪滴の像 (50) と類似していることから、小腸の吸収上皮細胞に蓄積した TAG である可能性が高い。それゆえ、DGAT1 阻害剤投与マウスの小腸で認められた形態学

的变化は、水様性下痢の発症に関与しなかったと考えられる。

3.3.3 ヒト DGAT1 阻害による下痢誘発機構

ヒトで DGAT1 阻害剤は高脂肪食摂取条件下で糞中 FA やカルプロテクチン含有量を増加させ、下痢を誘発する (76)。また、DGAT1 遺伝子の機能喪失型変異を持つ患者は、重篤な水様性下痢を発症すると共に絨毛の短縮を呈する (46)。これらの生理学的変化は、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与マウスのものと類似している。マウス小腸と違ってヒト小腸では DGAT1 のみが高発現しているため (22, 23, 46)、ヒトでの DGAT1 阻害とマウスでの DGAT1 及び DGAT2 阻害の類似性は小腸における DGAT1 及び DGAT2 の発現種差が起因となっている可能性が高い。それゆえ、ヒトでの遺伝的あるいは薬理的な DGAT1 阻害によって誘発される下痢に関しても、マウスと同様に小腸 FA 代謝の調節不全や腸バリア機能障害が寄与していると考えられる。

第4章 総合考察

脂質吸収経路を標的とする肥満症治療薬は、これまで数多く開発されてきた中枢神経調節薬で問題となるような副作用の懸念が低く、かつ高い抗肥満効果を発揮する可能性がある。したがって、小腸を介した TAG 吸収に重要な役割を担う MGAT2 及び DGAT1 が肥満及び肥満関連代謝性疾患に対する治療薬のターゲットとして注目されている。本研究では、MGAT2 阻害剤や DGAT1 阻害剤などの脂質吸収経路を標的とした肥満症治療薬の開発に向けた基盤形成を目的として、MGAT2 阻害剤の摂餌低下機構並びに DGAT 阻害剤の下痢誘発機構に着目して検討を行った。

第 2 章では、MGAT2 阻害剤の摂餌低下に対する迷走神経の関与について検討した。MGAT2 阻害剤は高脂肪餌負荷条件下においてマウスの摂餌量を低下させた。その摂餌低下効果はカプサイシン前処置により迷走神経機能を障害させたマウスで消失した。また、高脂肪餌負荷条件下において、MGAT2 阻害剤は求心性迷走神経の投射先である延髄孤束核で神経細胞活性化マーカー *c-fos* の陽性細胞数を増加させ、空腸組織中 TAG 含有量の低下と空腸組織中 FA 含有量の増加を伴って求心性迷走神経を介した食欲調節因子である OEA の空腸組織中含量を増加させた。一方、脂質ボラス投与条件下において、MGAT2 阻害剤は高脂肪餌負荷条件下と同様の空腸組織中の変化だけでなく、回腸組織中 TAG 含有量の低下と回腸組織中 FA 及び 2-OG 含有量の増加を伴って回腸組織中 OEA 含

有量を増加させ、かつ、同じく求心性迷走神経を介した食欲調節因子である total GLP-1、PYY の血中濃度を増加させた。これらの結果から、MGAT2 阻害剤が末梢の迷走神経を刺激することで摂餌低下効果を発揮することが示唆され、中枢性副作用懸念の低い新たな抗肥満治療戦略となる可能性が示された。2023 年時点において、いくつかの MGAT2 阻害化合物が肥満及び肥満関連代謝性疾患治療薬として開発されており、今後の臨床応用が期待される。

第 3 章では、マウスで DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与が高脂肪餌負荷条件下において水様性下痢を誘発することを明らかにし、その作用機序を検討した。DGAT1 及び DGAT2 を阻害したマウスでは、下痢と共に十二指腸や空腸における陰窩の過形成や絨毛の短縮が誘発され、同じく十二指腸や空腸組織中における PGE₂ 含有量や糞中カルプロテクチン量が増加した。さらに、DGAT1 及び DGAT2 の阻害は腸バリア機能障害のマーカーである FD4 腸管膜透過性を増加させた。近位小腸における病理学的変化が炎症性反応の変化を伴っていたことから、腸傷害が発生していたと考えられる。腸傷害が腸バリア機能障害に寄与することや腸バリア機能障害が管腔内への滲出液増加による下痢を誘発することを考慮すると、DGAT1 と DGAT2 の同時阻害は腸傷害を介して腸バリア機能障害やそれに伴う水様性下痢を誘発すると考えられる。これらの知見は、生体内において DGAT 活性が正常な腸バリア機能の維持に重要な役割を

担っていることを示唆している。

本研究では、マウスで MGAT2 阻害剤が求心性迷走神経を介して食欲を制御すること、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤の同時投与が腸バリア機能障害を伴う重篤な水様性下痢を誘発することを明らかにした。MGAT2 阻害剤や DGAT 阻害剤の薬効と副作用発現の関係性を解明するには更なる研究が必要と考えられるが、本研究の成果は脂質吸収経路を標的とした新たな肥満症治療薬の開発に大きく貢献するものと考えられる。

第 5 章 実験方法

5.1 動物と薬物

6週齢の雄の C57BL/6 マウスを CLEA Japan (Tokyo, Japan) から入手し、制御された環境条件下 (室温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$; 湿度 $50\pm 20\%$; 12 時間明暗サイクル) で実験に使用するまで集団で飼育した。この研究を通して、特に明記しない限りマウスが食物と水道水を自由に摂取できるようにした。全ての動物研究は塩野義製薬株式会社の動物実験委員会によって承認されており、全ての実験操作を Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International によって認定された施設で実施した。

本研究で使用した MGAT2 阻害剤は、報告されている化学構造 (31) をもとに合成した。DGAT1 阻害剤 (PF-04620110) あるいは DGAT2 阻害剤 (PF-06424439) は、それぞれ MedChem Express (Monmouth Junction, NJ, USA)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。これらを 0.5% w/v ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液 (Shin-Etsu Chemical, Tokyo, Japan) に懸濁させ、10 mL/kg の容量でマウスに経口投与した。用量依存的な影響を評価する場合を除き、MGAT2 阻害剤や DGAT1 阻害剤の投与用量は、それぞれ最大の TAG 吸収阻害効果を発揮するように設定した。DGAT2 阻害剤が単独では TAG 吸収阻害効果を発揮しなかったため、DGAT2 阻害剤の投与用量は、薬理的 DGAT1 阻害条件下で同時投与による最大の TAG 吸収阻害効果を発揮するように設定した。

5.2 カプサイシン前処置

求心性迷走神経経路の機能を障害する目的で、わずかな変更を加えた既報の方法 (77) でマウスにカプサイシンを前処置した。マウスに 60%高脂肪餌 (58Y1; TestDiet, St. Louis, MO, USA) を 4 週間以上負荷した後、ペントバルビタール (30 mg/kg) 麻酔下でカプサイシン (20 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を皮下投与した。初回投与 2 日後、同一条件下でマウスにカプサイシン (40 mg/kg) を再度皮下投与した。2 回目投与 4 日後、マウスに覚醒条件下でカプサイシン (5 mg/kg) を腹腔内投与した。カプサイシンは、10% Tween 80 及び 10% エタノールを含む生理食塩水に溶解した。作製したカプサイシン前処置マウスにおいて、求心性迷走神経を介した食欲調節因子であるコレシストキニン-8 (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) の摂餌低下効果 (78) が消失することを確認することにより、カプサイシン前処置による求心性迷走神経機能障害が成功していると判断した。

5.3 摂餌量評価

一晩絶食させたマウスに溶媒あるいは MGAT2 阻害剤を投与し、その後に 60%高脂肪餌を再給餌した。高脂肪餌の摂取量は、再給餌開始後 2 時間及び 4 時間測定した。

5.4 C-fos 免疫反応性の解析

60%高脂肪餌の再給餌開始2時間後、マウスにイソフルラン麻酔下でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で調整した 4%パラホルムアルデヒド水溶液を経心的に灌流した。脳組織サンプルをマウスから採取し、4%パラホルムアルデヒド水溶液で後固定し、30%スクロース水溶液に移した後に OCT コンパウンドで包埋した。連続した厚さ 17 μm の脳冠状切片を切り出し、抗原賦活化のためにマイクロ波照射下において抗原賦活液緩衝液 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 中で 15 分間加熱した。切片をメタノールで調整した 0.3%過酸化水素水溶液中で 30 分間静置し、PBS で調整した 3%ウシ血清アルブミン溶液中で 60 分間静置した。その後、PBS で調整した 1%ウシ血清アルブミン溶液に 1:600 で希釈した抗 c-fos マウスモノクローナル抗体 (sc-271243; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) と共に 4°Cで一晩静置した。次に、切片を Histofine Simple Stain MAX-PO (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) と 30 分間反応させ、Histofine DAB substrate kit (Nichirei Biosciences) によって視覚化した。延髄の孤束核及び最後野領域 (bregma -7.32 to -7.76 mm)、視床下部の弓状核及び室傍核 (bregma -1.22 to -1.58 mm) の c-fos 陽性細胞数は、BZ-X700 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて測定した。

5.5 食欲調節因子と小腸組織中脂質含有量の解析

60%高脂肪餌の再給餌開始2時間後、マウスからイソフルラン麻酔下で血液サンプルを採取し、安楽死後に小腸組織サンプルを採取した。小腸組織中 OEA 及び 2-OG 含有量を測定する目的で、小腸組織サンプルを 10 mM ジブチルヒドロキシルエチルを含む約 10 倍量のメタノールでホモジナイズし、20,000×g で 5 分間遠心分離した。小腸組織から抽出した上清中の OEA 及び 2-OG 濃度は Nexera MP 及び LCMS-8060 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いた液体クロマトグラフィー質量分析計によって測定した。小腸組織中 TAG 及び FA 含有量を測定する目的で、小腸組織サンプルを 1 mL の氷冷した蒸留水中でホモジナイズし、ホモジネート液を 5 mL のクロロホルム/メタノール (3:2, v/v) 及び 1 mL の 1 M 塩化ナトリウム水溶液と激しく混合した。混合液を 840×g で 20 分間遠心分離して 2 相に分離し、上相を除去した後、脂質を含むクロロホルム相を窒素気流下で蒸発乾固させた。乾固残渣を 1 mL のイソプロパノールに溶解し、溶解液中の OEA 及び 2-OG 濃度は日立 7170 自動分析装置 (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いた酵素法 (Sekisui Medical, Tokyo, Japan) によって測定した。血液サンプルを 4°C、5,000×g で 10 分間遠心分離することにより、血漿を取得した。血漿中 PYY 及び total GLP-1 濃度は、それぞれ mouse/rat PYY enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 及び GLP-1 ELISA Kit Wako High

Sensitive (Wako Pure Chemical Industries) によって測定した。脂質ボラス投与試験において、一晩絶食させたマウスに溶媒あるいは MGAT2 阻害剤を投与し、その後 20% 脂質 (Intralipos Injection 20%; Otsuka Pharmaceutical Factory, Tokushima, Japan) を 10 mL/kg の容量で経口投与した。脂質の経口投与 1 時間後に血液サンプルと小腸組織サンプルを採取し、食欲調節因子や小腸組織中脂質含有量は上記と同様の方法で測定した。

5.6 トリアシルグリセロール吸収経路の解析

60%高脂肪餌を 4 週間負荷した後に一晩絶食させたマウスに対して、溶媒や、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤を単独あるいは同時に投与した。投与 15 分後に血中 TAG クリアランスの影響を取り除く目的で Pluronic F-127 (500 mg/kg, Sigma-Aldrich) を腹腔内注射し、その 15 分後に ¹⁴C 標識トリオレイン (50 μCi/kg, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) 含有の 20%脂質 (Intralipos Injection 20%) を約 10 mL/kg の容量で経口投与した。脂質経口投与 1 時間後、マウスからイソフルラン麻酔下で血液サンプルを採取し、安楽死後に十二指腸組織サンプルを採取した。血液サンプルを 20°C、5,000×g で 10 分間遠心分離することで血漿を取得し、血漿中放射能は MicroBeta TRILUX counter (PerkinElmer) を用いて測定した。また、十二指腸組織サンプルは 1 mL の氷冷した蒸留水中でホモジナイズし、ホ

モジネート液を 5 mL のクロロホルム/メタノール (3:2, v/v) 及び 1 mL の 1 M 塩化ナトリウム水溶液と激しく混合した。混合液を 840×g で 20 分間遠心分離して 2 相に分離し、上相を除去した後、脂質を含むクロロホルム相を窒素気流下で蒸発乾固させた。乾固残渣を 1 mL のヘキサンに溶解し、溶解物を TLC で分離した。TLC プレート上の TAG、FA 及び DAG 画分の放射能は、FLA-3000 imaging system (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

5.7 下痢、糞中脂質排泄、組織学及び炎症マーカー解析のためのサンプル処理

60%高脂肪餌を 4 週間負荷したマウスに、溶媒や、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤を単独あるいは同時に 1 日 2 回、下痢や糞中脂質排泄の解析時には 2 日間投与、組織学及び炎症マーカーの解析時には 3 日間投与した。投与期間中の全ての糞便サンプルを回収し、下痢や糞中脂質排泄の解析のために処理するか組織学及び炎症マーカー解析まで-80°Cで保存した。また、DGAT1 阻害剤や DGAT2 阻害剤の最終投与 4 時間後、安楽死させたマウスから十二指腸、空腸及び回腸組織サンプルを採取し、氷冷した生理食塩水で洗浄した後に組織学的解析まで 10%ホルマリンで後固定するか炎症マーカー解析まで-80°Cで保存した。

5.8 下痢の解析

下痢の重症度は既報 (79) の通りに、下記スケールに従って各糞便サンプルを採点することで評価した。

0 (下痢なし): 通常の糞便。

1 (非常に軽度の下痢): 便が湿っている、肛門周囲に汚れの兆候がない。

2 (軽度の下痢): 湿った軟らかい糞便、肛門周囲に汚れの兆候がある。

3 (下痢): 糞便が不定形、肛門周囲がかなり汚れている。

4 (重度の下痢): 液体糞便、肛門周囲がかなり汚れている。

糞便サンプルは湿重量測定後に凍結乾燥し、乾燥重量を測定した。糞中水分含有量は、糞便の湿重量から糞便の乾燥重量を引くことで算出した。

5.9 糞中脂質排泄の解析

糞中脂質を上述の十二指腸を用いた場合と同様の脂質抽出法によって糞便サンプルから抽出した。乾固残渣を 1mL のイソプロパノールに溶解し、溶解液中の FA 及び TAG 濃度は日立 7170 自動分析装置を用いた酵素法によって測定した。

5.10 組織学的解析

ホルマリン固定した各小腸組織サンプルを、パラフィンで包埋した。その後、

厚さ 3 μm の腸切片を切り出し、ヘマトキシリン・エオジン染色し、BZ-X700 (Keyence) によって観察した。

5.11 腸炎症マーカーの解析

各小腸組織サンプルを 100 mM リン酸バッファー (pH 7.4)、1 mM EDTA 及び 10 μM インドメタシンを含む約 10 倍量の氷冷緩衝液でホモジナイズし、4°C、8,000 \times g で 10 分間遠心分離した。各小腸組織から抽出した上清中の PGE₂ 濃度を PGE₂ ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) によって測定した。各サンプルのタンパク質含有量は BCATM Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) によって測定した。また、糞中カルプロテクチン濃度は S100A8/S100A9 ELISA kit (Immunodiagnostik, Bensheim, Germany) によって測定した。

5.12 腸バリア機能の解析

60%高脂肪餌を 4 週間負荷したマウスに、溶媒や、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤を単独あるいは同時に 1 日 2 回、2 日間投与した。DGAT1 阻害剤や DGAT2 阻害剤の最終投与直後、マウスにリン酸緩衝生理食塩水で 22 mg/mL に希釈した FD4 を 10 mL/kg の容量で経口投与した。FD4 投与 5 時間後、血液サンプルを

採取した。血液サンプルを 4°C、6000×g で 10 分間遠心分離することにより、血漿を取得した。血漿中 FD4 濃度は、VERSAmix microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて励起波長 490 nm 発光波長 535 nm の蛍光強度を測定することによって定量化した。

5.13 餌の脂質含有量依存的な影響の解析

12% kcal fat (CE-2)、32% kcal fat (D12266B, Research Diets)、45% kcal fat (D12451, Research Diets)、あるいは 60% kcal fat (58Y1) の実験動物用飼料を 4 週間以上負荷したマウスに、溶媒や、DGAT1 阻害剤と DGAT2 阻害剤を単独あるいは同時に 1 日 2 回、2 日間投与した。下痢は上述と同様のスケールに従って評価した。

5.14 統計解析

すべての結果は、平均±平均の標準誤差 (standard error of the mean: SEM) として表示した。データは SAS Version 9.4 for Windows (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて、two-tailed Welch's t-test、Dunnett's multiple comparison test あるいは Tukey's multiple comparison test によって分析した。P < 0.05 の結果を統計的に有意とした。

引用文献

1) World Health Organization. Obesity and overweight.

(<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>)

2) World Health Assembly. World obesity atlas 2022.

(<https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2022>)

3) Song YM, Sung J, Smith GD, et al. Body mass index and ischemic and hemorrhagic stroke: a prospective study in Korean men. *Stroke*. 2004; 35: 831-836.

4) Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 2005; 366: 1640-1649.

5) Global BMI Mortality Collaboration, Di Angelantonio E, Bhupathiraju SN, Wormser D, et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet*. 2016; 388: 776-786.

6) Examination Committee of Criteria for ‘Obesity Disease’ in Japan; Japan Society for the Study of Obesity. New Criteria for ‘Obesity Disease’ in Japan. *Circ J*. 2002; 66: 987-992.

7) National Institute of Health and Nutrition. The National Health and Nutrition Survey in Japan, 2019.

(<https://www.nibiohn.go.jp/eiken/kenkounippon21/en/eiyouchousa/>)

8) Schwartz MW, Seeley RJ, Zeltser LM, et al. Obesity pathogenesis: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev.* 2017; 38: 267-296.

9) Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, et al. Pharmacological management of obesity: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100: 342-362.

10) The American Society for Metabolic and Bariatric Surgery. Metabolic and Bariatric Surgery. (<https://asmbs.org/resources/metabolic-and-bariatric-surgery>)

11) Müller TD, Blüher M, Tschöp MH, et al. Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2022; 21: 201–223.

12) James WP, Caterson ID, Coutinho W, et al. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *N Engl J Med* 2010; 363: 905-917.

13) Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Després JP, McCarthy C, Scheen A. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 2008; 31: S229-240.

14) Greenway FL, Fujioka K, Plodkowski RA, et al. Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-I): a multicentre,

randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376: 595-605.

15) Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, et al. A randomized, controlled trial of 3.0 mg of liraglutide in weight management. *N Engl J Med* 2015; 373: 11-22.

16) Zhong P, Zeng H, Huang M, Fu W, Chen Z. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide in adults with overweight or obesity: a meta-analysis. *Endocrine* 2022; 75: 718-724.

17) Maffeis C, Schutz Y, Grezzani A, et al. Meal-induced thermogenesis and obesity: is a fat meal a risk factor for fat gain in children? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 214-219.

18) Kasper H. Faecal fat excretion, diarrhea, and subjective complaints with highly dosed oral fat intake. *Digestion*.1970; 3: 321-330.

19) Mattson FH, Volpenhein RA. The digestion and absorption of triglycerides. *J Biol Chem.* 1964; 239: 2772–2777.

20) Yen CE, Nelson DW, Yen MI. Intestinal triacylglycerol synthesis in fat absorption and systemic energy metabolism. *J Lipid Res* 2015; 56: 489–501.

21) Cao J, Lockwood J, Burn P, et al. Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2. *J Biol Chem* 2003; 278: 13860–13866.

- 22) Cases S, Smith SJ, Zheng YW, 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: 13018-13023.
- 23) Cases S, Stone SJ, Zhou P, et al. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem*. 2001; 276: 38870-38876.
- 24) Jingsong Cao, Long Cheng, Yuguang Shi. Catalytic properties of MGAT3, a putative triacylglycerol synthase. *J Lipid Res*. 2007; 48: 583-591.
- 25) Ryutaro Adachi, Tsuyoshi Ishii, Kazumasa Ogawa, et al. Pharmacological characterization of a series of aryl-sulfonamide derivatives that potently and selectively inhibit monoacylglycerol acyltransferase 2. *Eur J Pharmacol*. 2016; 791: 569-577.
- 26) Jingsong Cao, Yingjiang Zhou, Haibing Peng, et al. Targeting Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) with small molecule inhibitors for the treatment of metabolic diseases. *J Biol Chem*. 2011; 286: 41838-41851.
- 27) Yen CL, Cheong ML, Grueter C, 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: 442-446.
- 28) Nelson DW, Gao Y, Yen MI, Yen CL. Intestine-specific deletion of

acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) 2 protects mice from diet-induced obesity and glucose intolerance. *J Biol Chem*. 2014; 289: 17338–17349.

29) S J Smith, S Cases, D R Jensen, et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet*. 2000; 25: 87-90.

30) Okuma C, Ohta T, Tadaki H, et al. JTP-103237, a novel monoacylglycerol acyltransferase inhibitor, modulates fat absorption and prevents diet-induced obesity. *Eur J Pharmacol*. 2015; 758: 72–81.

31) Take K, Mochida T, Maki T, et al. Pharmacological inhibition of monoacylglycerol O-acyltransferase 2 improves hyperlipidemia, obesity, and diabetes by change in intestinal fat utilization. *PLoS One*. 2016; 11: e0150976.

32) Liu J, Gorski JN, Gold SJ, et al. Pharmacological inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1 reduces body weight and modulates gut peptide release--potential insight into mechanism of action. *Obesity (Silver Spring)*. 2013; 21: 1406-1415.

33) Okawa M, Fujii K, Ohbuchi K, et al. Role of MGAT2 and DGAT1 in the release of gut peptides after triglyceride ingestion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 390: 377-381.

34) Hansen KB, Rosenkilde MM, Knop FK, et al. 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:

E1409-E1417.

- 35) Cork SC. The role of the vagus nerve in appetite control: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neuroendocrinol.* 2018; 30: e12643.
- 36) Feinle C, O'Donovan D, Doran S, et al. Effects of fat digestion on appetite, APD motility, and gut hormones in response to duodenal fat infusion in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G798–G807.
- 37) Feinle-Bisset C, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR, Horowitz M. Fat digestion is required for suppression of ghrelin and stimulation of peptide YY and pancreatic polypeptide secretion by intraduodenal lipid. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 289: E948–E953.
- 38) Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, et al. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab.* 2008; 8: 281–288.
- 39) Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, et al. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 2001; 414: 209–212.
- 40) Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology.* 2004; 127: 546–558.
- 41) Blevins JE, Chelikani PK, Haver AC, et al. PYY(3–36) induces Fos in the arcuate

nucleus and in both catecholaminergic and non-catecholaminergic neurons in the nucleus tractus solitarius of rats. *Peptides*. 2008; 29: 112–119.

42) Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, 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: 127–131.

43) Overeem AW, Posovszky C, Rings EH, Giepmans BN, van IJzendoorn SC, The role of enterocyte defects in the pathogenesis of congenital diarrheal disorders, *Dis Model Mech*. 2016; 9: 1-12.

44) Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, et al. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr*. 2000; 20: 663-697.

45) Jones B, Jones EL, Bonney SA, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet*. 2003; 34: 29-31.

46) Haas JT, Winter HS, Lim E, et al. DGAT1 mutation is linked to a congenital diarrheal disorder. *J Clin Invest*. 2012; 122: 4680-4684.

47) Iqbal J, Parks JS, Hussain MM. Lipid absorption defects in intestine-specific microsomal triglyceride transfer protein and ATP-binding cassette transporter

A1-deficient mice. *J Biol Chem.* 2013; 288: 30432-30444.

48) Georges A, Bonneau J, Bonnefont-Rousselot D, et al. Molecular analysis and intestinal expression of SAR1 genes and proteins in Anderson's disease (Chylomicron retention disease), *Orphanet J Rare Dis.* 2011; 6: 1.

49) D'Aquila T, Hung YH, Carreiro A. Recent discoveries on absorption of dietary fat: Presence, synthesis, and metabolism of cytoplasmic lipid droplets within enterocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1861: 730-747.

50) Buhman KK, Smith SJ, Stone SJ, et al. DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem.* 2002; 277: 25474-25479.

51) Dow RL, Li JC, Pence MP, et al. Discovery of PF-04620110, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of DGAT-1. *ACS Med Chem Lett.* 2011; 2: 407-412.

52) Futatsugi K, Kung DW, Orr ST, et al. Discovery and optimization of imidazopyridine-based inhibitors of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2). *J Med Chem.* 2015; 58: 7173-7185.

53) Iwasaki Y, Maejima Y, Suyama S, et al. Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: a route for ameliorating hyperphagia and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015; 308:

R360–R369.

54) Mochida T, Take K, Maki T, et al. Inhibition of MGAT2 modulates fat-induced gut peptide release and fat intake in normal mice and ameliorates obesity and diabetes in ob/ob mice fed on a high-fat diet. *FEBS Open Bio*. 2020; 10: 316–326.

55) Eissele R, Göke R, Willemer S, et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*. 1992; 22: 283–291.

56) Anini Y, Fu-Cheng X, Cuber JC, Kervran A, Chariot J, Roz C. Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. *Pflugers Arch*. 1999; 438: 299–306.

57) Shah M, Simha V, Garg A. Review: long-term impact of bariatric surgery on body weight, comorbidities, and nutritional status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 4223–4231.

58) Miller GD, Norris A, Fernandez A. Changes in nutrients and food groups intake following laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). *Obes Surg*. 2014; 24: 1926–1932.

59) Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes–5-year outcomes. *N Engl J Med*. 2017; 376: 641–651.

- 60) Aliakbarian H, Bhutta HY, Heshmati K, et al. Pre-operative predictors of weight loss and weight regain following Roux-en-Y gastric bypass surgery: a prospective human study. *Obes Surg.* 2020; 30: 4852–4859.
- 61) Arterburn DE, Telem DA, Kushner RF, et al. Benefits and risks of bariatric surgery in adults: a review. *JAMA.* 2020; 324: 879–887.
- 62) Shin AC, Zheng H, Townsend RL, Set al. Meal-induced hormone responses in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Endocrinology.* 2010; 151: 1588–1597.
- 63) Hankir MK, Seyfried F, Hintschich CA, et al. Gastric bypass surgery recruits a gut PPAR- α -striatal D1R pathway to reduce fat appetite in obese rats. *Cell Metab.* 2017; 25: 335–344.
- 64) Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, et al. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem.* 2004; 279: 11767-11776.
- 65) Wiercińska-Drapała A, Flisiak R, Prokopowicz D. Plasma and mucosal prostaglandin E2 as a surrogate marker of ulcerative colitis activity. *Rocz Akad Med Białymst.* 2001; 46: 60-68.
- 66) Summerton CB, Longlands MG, Wiener K, et al. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 14: 841-845.

- 67) Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, et al. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1165: 294-300.
- 68) Williams JM, Duckworth CA, Watson AJ, et al. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide. *Dis Model Mech.* 2013; 6: 1388-1399.
- 69) Musch MW, Clarke LL, Mamah D, et al. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase. *J Clin Invest.* 2002; 110: 1739-1747.
- 70) Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 14890-14895.
- 71) Listenberger LL, Han X, Lewis SE, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 3077-3082.
- 72) IBD in EPIC Study Investigators, Tjonneland A, Overvad K, Bergmann MM, et al. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* 2009; 58: 1606-1611.
- 73) Shores DR, Binion DG, Freeman BA, et al. New insights into the role of fatty acids in the pathogenesis and resolution of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*

2011; 17: 2192-2204.

74) Poirier H, Degrace P, Niot I, et al. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem.* 1996; 238: 368-373.

75) Chen M, Yang Y, Braunstein E, et al. Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281: E916-E923.

76) Denison H, Nilsson C, Löfgren L, et al. Diacylglycerol acyltransferase 1 inhibition with AZD7687 alters lipid handling and hormone secretion in the gut with intolerable side effects: a randomized clinical trial. *Diabetes Obes Metab.* 2014; 16: 334-343.

77) Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, et al. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science.* 1981; 213: 1036–1037.

78) Zhang J, Ritter RC. Circulating GLP-1 and CCK-8 reduce food intake by capsaicin-insensitive, nonvagal mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 302: R264–R273.

79) Pearson JS, Giogha C, Ong SY, et al. A type III effector antagonizes death receptor signalling during bacterial gut infection. *Nature.* 2013; 501: 247–251.

謝辞

本論文の作成を進めるにあたり、終始御懇切なる御指導及び御助言を賜りました山口大学獣医薬理学研究室の佐藤晃一教授、大浜剛准教授、鹿児島大学獣医薬理学研究室の宮本篤教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、御協力いただきました雪岡日出男氏、東野賢一氏、善本亮氏、南部宏英氏、加藤秀昭氏、深坂郁美子氏並びに塩野義製薬創薬疾患研究所の皆様心より感謝いたします。

本論文の作成において温かい励ましをいただきました妻・竹本絵里氏に心より感謝いたします。

最後に、本研究で犠牲になった多くの動物たちに深く感謝すると共に、その霊が鎮められるよう心よりお祈り致します。