

学位論文要約

視床下部オレキシン系が加齢、肥満およびうつに伴う
肝糖代謝の調節異常を防御する機序の解明

2013年6月

富山大学大学院医学薬学教育部
博士課程生命薬科学専攻
病態制御薬理学研究室

東海 絵美

第1章 研究背景

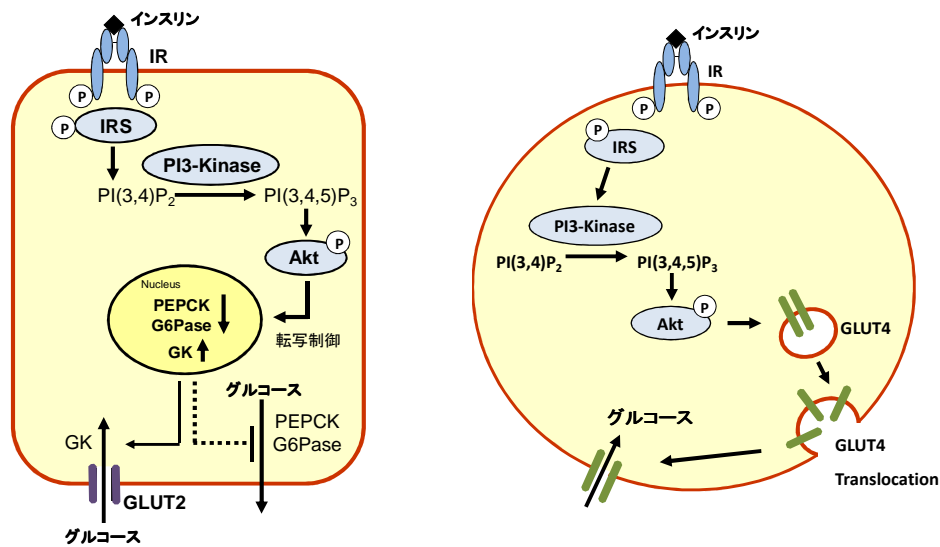
第1節 糖尿病の罹患率の増加とその社会的背景

厚生労働省による平成19年国民健康・栄養調査では、本邦において糖尿病が強く疑われる人が約890万人、さらに糖尿病の可能性を否定できない人を併せると約2210万人に達し、成人の5人に1人が糖尿病かその予備軍であると言われている。糖尿病の治療は、食事療法および運動療法を主とするが、コントロールが不十分な場合には経口血糖降下薬やインスリンを使用する。実際、現在の日本において治療コントロールの指標あるHbA1c(NGSP)が6.9%未満である患者は、経口血糖降下薬のみで治療された患者では38.7%、インスリンと経口薬を併用している患者では19.4%に過ぎず、血糖コントロール不良である患者が多く存在するのが現状である(金塚東 他, 糖尿病, 2010; 53: 737-744)。

糖尿病の罹患率が増加する社会的背景として、第二次世界大戦後から急速に増加した高齢化、食生活の欧米化、24時間社会化によるストレスの増加などが関与すると考えられている。実際に、社会構造の変化に伴う高齢者の人口、肥満患者の人口およびうつ病患者の人口の増加は糖尿病人口の増加と同じ推移を示している(内閣府「平成23年版高齢社会白書：高齢化の状況」; 厚生労働省「患者調査」)。このように、高齢化、食生活の欧米化、過剰なストレスの増加は、加齢、肥満およびうつによるインスリン抵抗性疾患を増加させ、糖尿病の増加の一因となっている。

第2節 加齢・肥満・うつによるインスリン抵抗性の発症メカニズム

インスリンは、肝臓、骨格筋および脂肪細胞などの末梢組織に作用し、糖代謝を制御している。肝臓のインスリン受容体(IR)にインスリンが作用すると、インスリン受容体基質(insulin receptor substrate, IRS)のチロシンリン酸化、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)の活性化、およびAktのリン酸化を経由して、糖新生律速酵素の発現を誘導するforkhead box O1 (FOXO1)やforkhead box A2 (FOXO2)をリン酸化し、転写活性を抑制する。その結果、糖新生律速酵素であるphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)やglucose 6-phosphatase (G6Pase)の発現が減少し、糖新生が抑制される(Puigserver et al., 2003)。骨格筋および脂肪細胞では、インスリンはIR/IRS/PI3K/Akt経路を介して糖輸送担体であるglucose transporter 4 (GLUT4)のトランスロケーションを促進し、血中からの糖取り込みを増加させる(Scheme 1)。加齢・肥満およびうつでは、これらのインスリンシグナルが障害され、インスリン抵抗性が増大する。これらの要因によるインスリンシグナルの障害には、小胞体ストレスや酸化ストレスが関与することが報告されている。



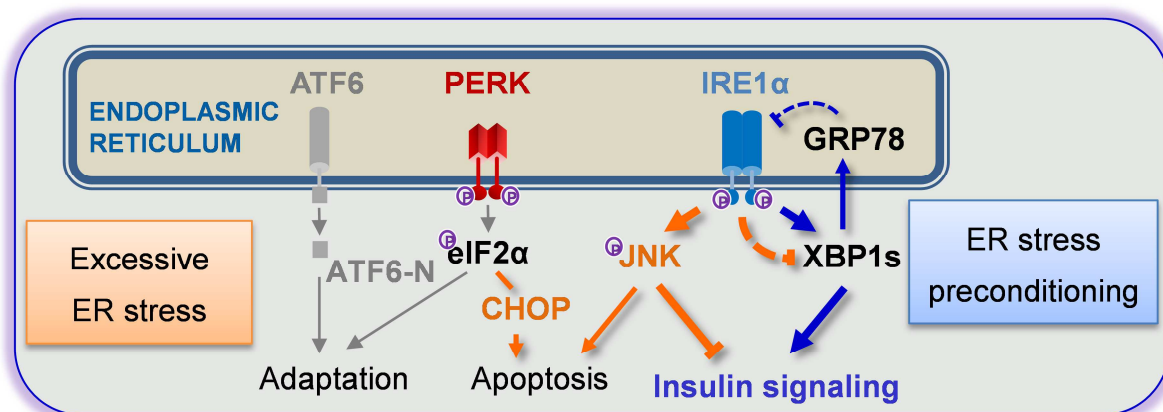
Scheme 1. 肝臓、骨格筋および脂肪のインスリンシグナルによる糖代謝制御

左図：肝臓のインスリン受容体にインスリンが作用すると、PI3K/Akt 経路を介して糖新生律速酵素(PEPCK および G6Pase)発現を減少させることで糖新生を抑制し、さらに glucokinase (GK) の発現を増加させることで糖放出を抑制する。

右図：骨格筋および脂肪細胞において、インスリンがインスリン受容体に結合すると、PI3K/Akt 経路を介して糖輸送担体である GLUT4 のトランスロケーションを促進し、血中からの糖取り込みを亢進させる。

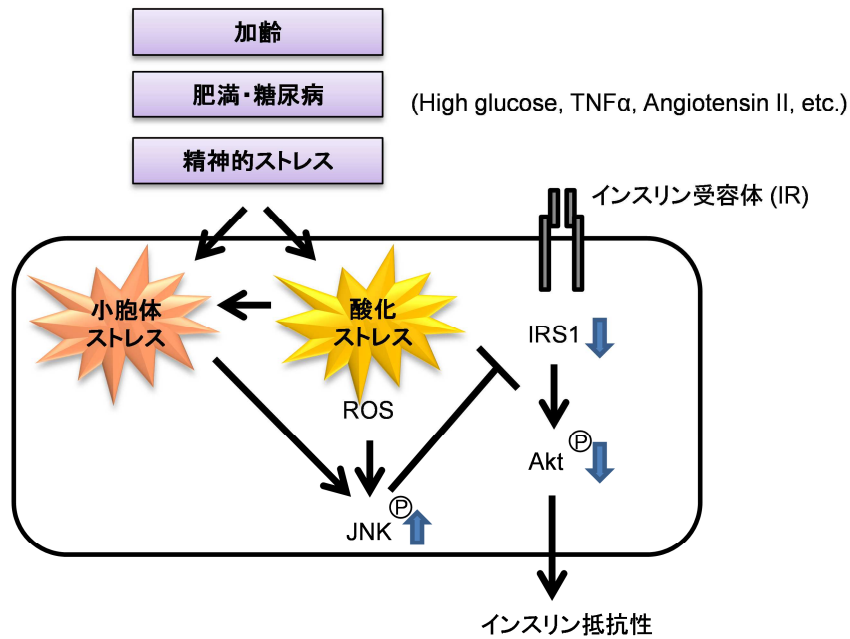
加齢、肥満およびうつなどの影響で細胞内小器官の小胞体内に異常なタンパクが蓄積し、小胞体ストレスが引き起こされると、小胞体ストレス応答が生じる。その機構には小胞体タンパクの inositol requiring element-1 (IRE1)、PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) および activating transcription factor 6 (ATF6) による3種の主要なシグナルが存在する。小胞体ストレス応答には二面性があり、軽度な小胞体ストレス刺激に対しては化学シャペロンの産生などを介して異常タンパクの蓄積を抑制する。これに対し、強度または慢性的な小胞体ストレス刺激に対してはアポトーシス経路による細胞死を誘導することが知られている(Rutkowski and kaufman, 2007)。また、IRE1 経路はインスリン感受性に直接的な影響を与えることが報告されている。その機構として、IRE1 の軽度な活性化（リン酸化）に伴う un-spliced 型 *Xbp1* (*Xbp1u*) mRNA の spliced 型 *Xbp1* (*Xbp1s*) mRNA へのスプライシングにより XBP1s タンパクが発現し核内へ移行すると、糖新生律速酵素の発現を誘導する転写因子である FOXO1 と相互作用して、FOXO1 の核外への移行とプロテアソームでの分解を促進するため、インスリン感受性が増加する(Zhou et al., 2011)。しかし過度の小胞体ストレスが持続すると、IRE1 は c-jun NH₂-terminal kinase (JNK) シグナルを活性化し、IRS-1 の Ser307 残基のリン酸化による IRS1 のプロ

テアソームへの移行と分解を促進する。この機構によりインスリンシグナルが抑制され、インスリン抵抗性が亢進する (Scheme. 2)。加齢に伴い IRE1/XBP1 経路と IRE1/JNK 経路のバランスが破綻して過剰な小胞体ストレスが誘発される (Brown and Naidoo, 2012)。また肥満により、インスリン標的組織である肝臓、骨格筋および脂肪細胞において慢性的な小胞体ストレスが誘導される (Cnop et al., 2012)。そのため、過度の小胞体ストレスはこれらの臓器におけるインスリン抵抗性の一因であると考えられている。



Scheme 2. 小胞体ストレス応答によるインスリンシグナルの調節

摂食や細胞内の環境変化に伴い小胞体内に異常なタンパクが蓄積すると、小胞体膜上に存在する inositol requiring element-1 (IRE1)、PKR like endoplasmic reticulum kinase (PERK) および activating transcription factor 6 (ATF6) の3種の主要な小胞体ストレス応答シグナルが活性化する。これらのシグナルは化学シャペロンの産生などにより異常タンパクを蓄積を抑制するか、またはアポトーシス経路による細胞死を誘導する。また、軽度な IRE1/XBP1s シグナルはインスリンシグナルの維持に直接寄与する。一方、過剰な小胞体ストレスが加わると、IRE1/JNK シグナルの活性化によりインスリン抵抗性が惹起される。IRE1/JNK シグナルの活性化はアポトーシスの誘導にも関与する。慢性的な小胞体ストレス状態では、PERK 経路を介してアポトーシスに関与する CHOP の発現が増加する (図: Hotamisligil, 2010 より一部改変)。



Scheme 3. 酸化ストレスと小胞体ストレスによるインスリン抵抗性の増大メカニズム

加齢、肥満・糖尿病、および精神的ストレスにより全身性に活性酸素種(ROS)産生が増加し、酸化ストレスが増大すると、JNK のリン酸化（活性化）に伴うインスリン受容体基質 1 (IRS1) のセリン残基のリン酸化が増加し、インスリンシグナルが負に制御され、インスリン抵抗性が惹起される。また、酸化ストレスは小胞体ストレスを増加させることで JNK シグナルを亢進させ、インスリン抵抗性を誘発する。

小胞体ストレスが生じる原因として、酸化ストレスによる誘導が知られている。酸化ストレスは活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の増加に伴う細胞機能障害である。加齢、肥満 (糖尿病)、精神的ストレス (うつ) などの影響により、細胞膜上での NADPH oxidase (NOX) による ROS 産生やミトコンドリアにおける ROS 産生がフィードバックやクロストークを介して悪循環に陥ると、ROS 産生の増加が引き起こされる (Dikalov, 2011)。その原因として、老化の過程では angiotensin II による NOX 系の異常亢進やミトコンドリアの機能障害、糖尿病病態では高濃度グルコース、遊離脂肪酸、angiotensin II、炎症性サイトカインである TNF α などの酸化ストレス誘導因子の増加、精神的ストレスが増加した場合では angiotensin II-NOX 系の異常亢進やミトコンドリアの ROS 消去系の破綻などが関与すること知られている (Dikalov, 2011; Zlatković and Filipović, 2011; Colaianna et al., 2013)。インスリン標的組織で ROS が増加すると、小胞体ストレスと同様に、JNK が活性化してインスリンシグナルを抑制する (Kaneto et al., 2005; Nishikawa et al., 2007; Gao et al., 2010)。現在、ROS が小胞体ストレスを誘発する機序は不明であるが、加齢や肥満により酸化ストレスが増加すると、タンパク質過酸化物の増加や小胞体ストレスを軽減する化学シャペロン分子の酸化などの影響で小胞体ストレスが誘導される (Zhou et al., 2010; Brown and Naidoo, 2012)。また、ラット心筋細胞において、angiotensin

II は ROS 産生を介して小胞体ストレスを誘導する (Zou et al., 2012)。したがって、酸化ストレスによるインスリン抵抗性の増加には小胞体ストレスも関与すると考えられる (Scheme 3)。

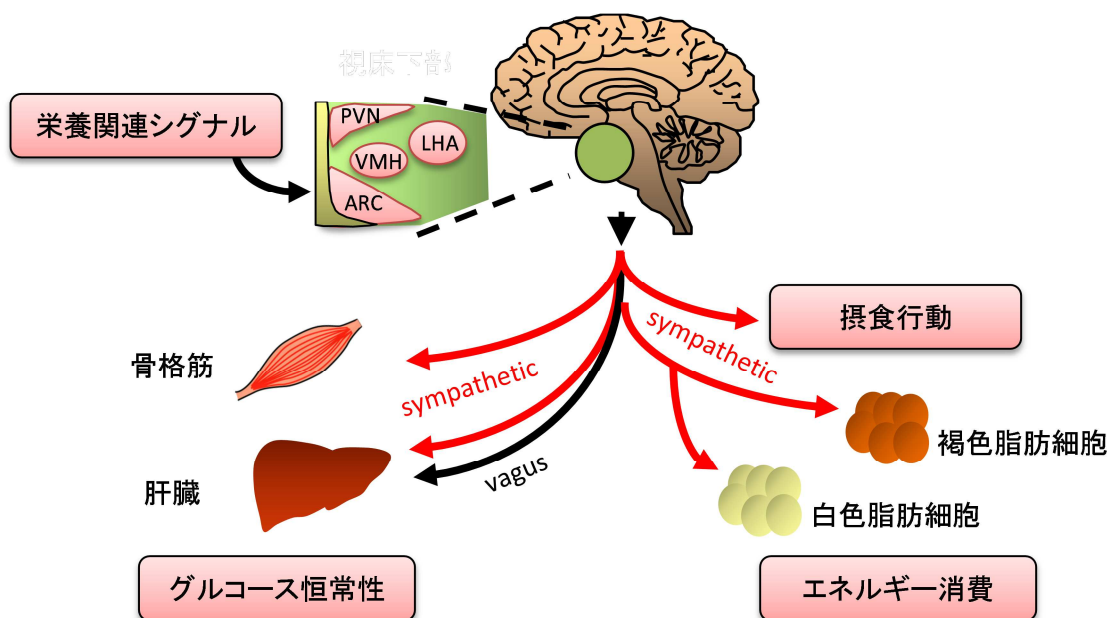
生体内の酸化ストレスを防御するためには、内因性抗酸化物質の coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) が重要な役割を果たしている。CoQ₁₀ は全身の細胞で産生され、ミトコンドリアの電子伝達系を調節することで ATP 産生に寄与している他、細胞膜上において唯一の脂質溶解性の内因性抗酸化物質としての役割を果たしている (Villalba et al., 2010)。しかし、加齢により CoQ₁₀ の生合成は低下し、組織中の CoQ₁₀ 含量が低下する (Beyer et al., 1985; Bentinger et al., 2010)。また 2 型糖尿病患者では、血漿中の total CoQ₁₀/total cholesterol の濃度比が低下し、酸化型 CoQ₁₀/還元型 CoQ₁₀ (抗酸化作用を発揮する型) の濃度比も増加する (Lim et al., 2006)。さらに、うつ病患者の血漿中 CoQ₁₀ 濃度は健常者よりも低値を示すと報告されている (Maes et al., 2009)。したがって、加齢、肥満 (糖尿病) およびうつによる CoQ₁₀ の低下がこれらの病態における酸化ストレスの一因であると考えられる。

第 3 節 中枢性の糖代謝調節機構

上述した末梢の糖代謝調節機構に加え、最近、視床下部と末梢組織の臓器連関を介した糖代謝調節作用が注目されている。末梢の各臓器は交感神経と副交感神経の二重支配を受けており、視床下部はそのバランスを調節することで各臓器の代謝活性を調節し、グルコースの恒常性を維持している (Blouet and Schwartz, 2010) (Scheme 4)。例えば、肝臓の糖産生は交感神経系によって促進され、副交感神経系によって抑制される (Nonogaki, 2000; Marino et al., 2011)。脂肪組織では交感神経系の入力为主体であり、交感神経系の活性化により白色脂肪細胞における脂肪分解や褐色脂肪細胞における熱産生が促進される。また骨格筋においても、交感神経系の活性化によりグルコースの取り込み活性が増加することが知られている (Marino et al., 2011)。そのため、交感神経の活性は骨格筋や褐色脂肪細胞でのエネルギー消費を亢進し、肥満や糖脂質代謝異常の進展の防止に寄与する (Lambert et al., 2010)。さらに、糖脂質代謝に関わる末梢の各臓器は代謝機能を最適化するために明暗サイクルや食事リズムに合わせて代謝活性を変化させるが (Bass and Takahashi, 2010)、自律神経は中枢の体内時計の信号を末梢臓器に伝達することでこの代謝様式の変化を促進する役割を担っている (Huang et al., 2011)。

一方、交感神経の興奮はインスリン抵抗性を誘発する要因でもあり (Lambert et al., 2010)、交感神経の活性の亢進がメタボリックシンドロームや 2 型糖尿病の発症を誘発することが知られている (Straznicki et al., 2012; Licht et al., 2013)。肥満型 2 型糖尿病モデル *db/db* マウスにおいても、恒常的な交感神経系緊張度の増加とそれに伴う迷走神経緊張度の低下が認められ、自律神経のバランスが交感神経側にシフトしていることが報告されている (Su et al., 2008; Goncalves et al., 2009)。このように、グルコースおよびエ

エネルギー代謝調節において交感神経系は二面性を示すため、中枢性の糖代謝調節機構における交感神経系の生理的意義は不明である。



Scheme 4. 自律神経系を介した中枢性代謝調節機構

肝臓、骨格筋、脂肪細胞などの末梢組織は交感神経と副交感神経の二重支配を受けており、視床下部はそのバランスを調節することで各臓器の代謝活性を調節している。肝臓の糖産生は交感神経系によって促進され、副交感神経系によって抑制される。脂肪組織では交感神経系の入力为主体であり、交感神経系の活性化により白色脂肪細胞における脂肪分解や褐色脂肪細胞における熱産生が促進される。また骨格筋においても、交感神経系の活性化によりグルコースの取り込み活性が増加する（図：Blouet and Schwartz, 2010 より一部改変）。

第4節 視床下部神経ペプチドオレキシンの構造および生理機能

オレキシンは視床下部神経ペプチドであり、オレキシン A およびオレキシン B が存在する (Scheme 5)。これらは、共通の前駆体プレプロオレキシンから生成される。オレキシン A は 33 個のアミノ酸残基からなるペプチドで、分子内のジスルフィド結合により構造的に安定である。一方、オレキシン B は 28 個のアミノ酸残基からなる直鎖状ペプチドであるため構造的に不安定であり、生体内で急速に分解される (Yoshida et al., 2003)。そのため、内因性のオレキシン系の作用は主にオレキシン A に依存すると考えられる。

オレキシンは視床下部外側野、脳弓周囲および背内側核に特異的に発現しており、オレキシン神経の投射は小脳を除く脳の広範囲に分布する (Sakurai, 2007)。オレキシンの生理機能は睡眠・覚醒の調節や摂食の亢進であることが報告されている (Yamanaka et al.,

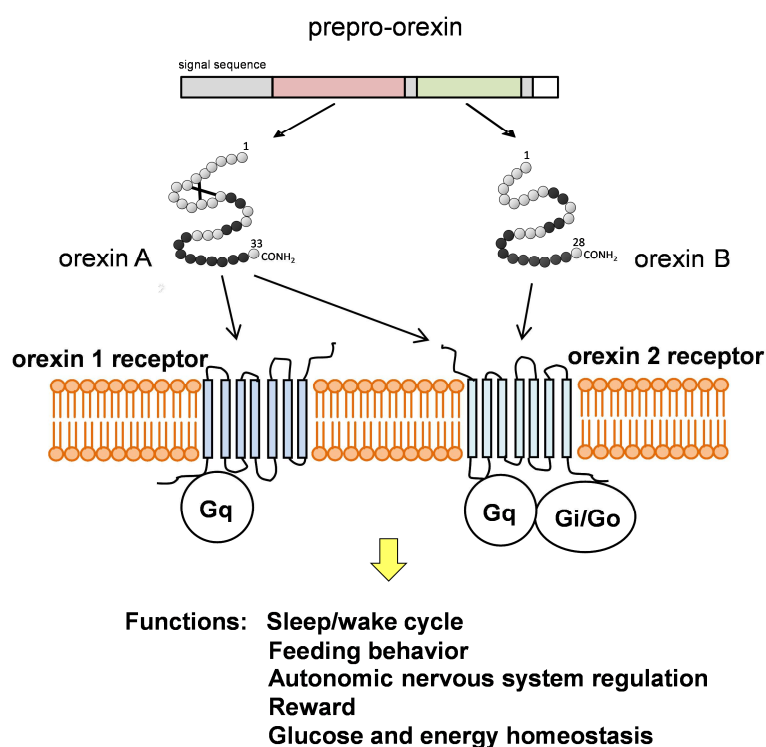
2000; Chemelli et al., 1999; Sakurai, 2002)。オレキシンの発現やオレキシン神経の活性は覚醒期に増加し、休息期（睡眠時）に減少する日周性のリズムを示す。例えば、夜行性のラットの脳脊髄液中では暗期にオレキシンが増加し、明期に減少する (Desarnaud et al., 2004, Yoshida et al., 2001)。一方、昼行性動物である glass rat (*Arbicanthbis niloticus*; glass rat) やチョウセンシマリス (*Tamias sibiricus barberi*) の視床下部外側野におけるオレキシン神経の活性は明期に増加し、暗期に低下する (Martinez et al., 2002)。ヒトやサルにおいても同様に、脳脊髄液中のオレキシンは明期に増加し、暗期に低下する日内リズムを示す (Salomon et al., 2003, Zeitzer et al., 2003)。夜行性および昼行性を決定する詳細な機序は不明であるが、視床下部内の神経支配の相違の影響であることが示唆されている (Kalsbeek et al., 2011)。

生体リズムの調節においては、視交叉上核 (SCN) が体内時計の中核の役割を果たしており、明暗サイクルに同調した概日リズムを形成する。また体内には、この光同調性機構とは独立に、食事のリズムに同調して覚醒や自発運動を誘発する概日リズムの形成機構が存在し、その制御部位は視床下部背内側核 (DMH) であると考えられている (Gooley et al., 2006)。オレキシン神経には SCN から DMH を経由する密な神経投射が認められ (Chou et al., 2003; Yoshida et al., 2006)、SCN を破壊したラットの脳脊髄液中ではオレキシン濃度の日内変動の振幅が減少する (Zhang et al., 2004)。また、夜行性のマウスに明期の一定時間のみ食餌を与えると、その給餌時間に同期したオレキシン神経の活性化と覚醒レベルおよび活動量の増加が誘発されるが、オレキシン欠損マウスでは給餌時間の変化に対する適応能力が低下する (Mieda et al., 2004; Kaur et al., 2008)。したがって、オレキシンは食事性の日内リズムに合わせて覚醒量や行動量を増加させる役割を果たしていると考えられている。ただし、視床下部オレキシン神経系は日内リズムの形成自体には関与しておらず、自由摂食条件下ではオレキシン神経除去マウスの睡眠・覚醒リズムやエネルギー消費の日内リズムは野生型マウスと同様である (Zhang et al., 2007)。なお、オレキシンは腹側被蓋野に投射しドパミン神経を活性化するため、オレキシンの摂食亢進作用には報酬系の関与も示唆されている (Nakamura et al., 2000)。

オレキシン系の活性化は、上述の日内リズム制御以外に、血糖値によっても調節されている。その機序として、オレキシン神経の興奮はグルコース濃度の上昇とともに低下することが知られている。そのため、慢性的な高血糖状態を呈した2型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスの視床下部ではオレキシンの mRNA 発現量が低下する (Yamamoto et al., 1999)。また、ラット脳脊髄液中のオレキシン濃度は短時間 (24 時間) の絶食では変化しないが、長時間 (72 時間) の絶食後に増加する (Fujiki et al., 2001)。オレキシン神経除去マウスでは絶食後の覚醒や運動量の増加が消失することから (Yamanaka et al., 2003)、オレキシンはエネルギーの欠乏状態において個体の生存に必須な適応反応を誘導する役割を果たしていると考えられている。

オレキシンは自律神経のバランス調節においても重要な役割を果たしている。オレキ

シン神経は交感神経節前線維の起始核である脊髄中間外側核 (IML) と迷走神経の起始核である延髄の迷走神経背側運動核 (DMNV) に投射し、これらの核内の神経を活性化させる(Hwang et al., 2001; van den Top et al., 2003)。特に、オレキシンによる交感神経系の活性化作用は顕著であり、オレキシン欠損マウスでは血圧の低下が認められる (Kayaba et al., 2003)。血糖値の制御に関しても、オレキシンをラット脳室内に投与すると交感神経系を介して肝臓の糖新生が増加することや (Yi et al., 2009)、オレキシンをマウスおよびラットの視床下部腹内側核 (VMH) に投与すると交感神経系を介して骨格筋のインスリン感受性と糖取り込み能が増加することが報告されている (Shiuchi et al., 2009)。しかし、オレキシンがマウスの空腹時血糖を低下させるとの報告もあり (Tsuneki et al., 2002)、グルコースの恒常性の維持におけるオレキシンの生理的意義は不明である。また、2 型糖尿病の進展に伴う高血糖に対するオレキシンの作用も不明である。なお、ラットの肝臓および骨格筋にはオレキシン受容体の mRNA が発現しておらず、循環血液中のオレキシン濃度も低濃度 (10 pg/mL 程度) であることから (Jhoren et al., 2010)、オレキシンによる血糖調節は末梢性ではなく中枢性であると考えられる。



Scheme 5. 視床下部ペプチドのオレキシンの構造と機能

視床下部ペプチドの orexin A および orexin B は前駆体のプレプロオレキシンの切断により生成される。オレキシンの作用は G 蛋白共役型受容体であるオレキシン 1 受容体またはオレキシン 2 受容体を介して発揮され、睡眠・覚醒、摂食行動、自律神経系、報酬系、糖・エネルギー代謝の調節に寄与する (図: Sakurai et al., 2009 より一部改変)。

第5節 加齢・肥満・うつによるオレキシンの低下とインスリン抵抗性の増加

5.1 加齢に伴うインスリン抵抗性の増加に対するオレキシン低下の影響

インスリン抵抗性は加齢に伴って増加することが知られている (Barbieri et al., 2001)。私の所属する研究室では以前、加齢したオレキシン欠損マウスはインスリン抵抗性を呈することを報告した (Tsuneki et al., 2008)。また、加齢したラットにおいて、視床下部でのオレキシン発現量や脳脊髄液中のオレキシン濃度が若齢ラットよりも低下することが報告されている (Desarnaud et al., 2004; Sawai et al., 2010)。したがって、加齢により誘導されるインスリン抵抗性の進展には、オレキシンの低下が関与する可能性が考えられる。

5.2 肥満に伴うインスリン抵抗性の増加に対するオレキシン低下の影響

オレキシンの発現は高血糖状態において低下する (Sakurai et al., 2007)。例えば、ストレプトゾシン誘発性糖尿病モデルマウスおよび2型糖尿病モデル (*db/db*) マウスでは、高血糖のために視床下部におけるプレプロオレキシン mRNA の発現が低下する (Yamamoto et al., 1999)。また、オレキシン欠損マウスやオレキシン神経除去マウスでは、加齢に伴い肥満を呈することが報告されている (Hara et al., 2005)。また、ヒトのナルコレプシー患者では、患者の約90%に髄液中のオレキシン濃度の著しい低下がみられる (Mignot et al., 2002)、肥満や2型糖尿病の発症リスクの増大が認められている (Dahmen et al., 2001; Kotagal et al., 2004)。さらに、オレキシン過剰発現マウスでは、高脂肪食負荷による肥満や耐糖能異常が改善されることが報告されている (Funato et al., 2009)。以上のことから、オレキシンの低下は肥満および糖尿病と密接に関連すると考えられる。

5.3 うつに伴うインスリン抵抗性の増加に対するオレキシン低下の影響

最近、うつと肥満および2型糖尿病の密接な関連が明らかとなっている。メタ解析による検討では、糖尿病によるうつの発症リスクは軽度であるが、うつにより糖尿病の発症リスクが著しく増大することが報告されている (Mezuk et al., 2008)。また、うつはインスリン抵抗性の進展に関与する (Silva et al., 2012)。さらにフィンランドにおける若年男性を対象としたコホート試験では、インスリン抵抗性がうつの重症度と関連することが報告された (Timonen et al., 2006)。一方、うつ病患者の脳脊髄液中においてオレキシンの発現が低下することや (Brundin et al., 2007)、オレキシン濃度の日内変動の振幅が減少することが報告されている (Salomon et al., 2003)。また慢性的なストレスを受けたマウスでは、オレキシン神経の数が減少し、ストレス適応が破綻することが報告されている (Lutter et al., 2008)。したがって、うつに伴うインスリン抵抗性の増加には、オレキシンの低下が関与する可能性が考えられる。

第6節 本研究の目的

今日、本邦をはじめ多くの先進諸国では、社会構造の急速な変化に伴う高齢化、食生活の欧米化および過剰なストレスにより、加齢、肥満およびうつが誘発され、糖尿病などのインスリン抵抗性疾患の罹患率が増加する要因となっている。しかし加齢、肥満およびうつにより、必ずしも急速にインスリン抵抗性が誘導されるとは限らないため、生体内においてインスリン抵抗性を防御する何らかの因子が機能していると考えられる。そこで本研究では、睡眠、摂食およびエネルギーバランスの制御に関与する視床下部ペプチドのオレキシンの作用に着目した。特に本研究では、加齢、肥満またはうつモデルマウスにおいて、オレキシンの脳室内投与、オレキシン神経の活性化およびオレキシンの欠損の影響を検討し、オレキシンがこれらの要因を基盤とした代謝異常を防御する可能性について検討した。また、酸化ストレスがインスリン抵抗性を誘導する要因であることから、酸化ストレスを除去するため、内因性の抗酸化物質である **coenzyme Q₁₀** の作用に着目し、オレキシンなどの中枢性糖代謝に関与する因子の作用を補助する可能性について検討した。

第2章 実験結果

加齢に伴う肝インスリン抵抗性に対する視床下部オレキシン系の防御機構の検討

空腹時血糖は肝臓の糖新生により調節されており、その機構はインスリンにより負に制御されている。本機構は加齢に伴う肝インスリン抵抗性の増大により異常を来すが、この異常の急速な進展を防御する生体機構は不明である。オレキシン神経系は自律神経を介して肝糖新生の調節に重要な役割を果たしていることが知られているので、本研究では、オレキシン欠損 (*Orexin*^{-/-}) マウスを用いて、加齢時の肝インスリン感受性の維持におけるオレキシンの存在意義を検討した。野生型 (WT) マウスでは血糖値に日内変動が認められるのに対し、*Orexin*^{-/-} マウスではその変動が消失し、特に明期において高血糖と高レプチン血症が認められた。また、ピルビン酸負荷試験により肝臓の糖新生活性を評価したところ、*Orexin*^{-/-} マウスは6ヶ月齢以上に加齢すると、異常な糖新生活性の亢進を呈した。その機序を検討した結果、6ヶ月齢の *Orexin*^{-/-} マウスの肝臓では IRS1 および IRS2 のタンパク発現が低下し、インスリンによる Akt リン酸化が肝特異的に低下した。また、糖新生律速酵素である *Pepck* の mRNA 発現の増加が認められた。さらに、オレキシンの欠損が加齢に伴うインスリン抵抗性を増大させる機序を明らかにするため、肝臓の小胞体ストレスの関与を検討した。その結果、6ヶ月齢の *Orexin*^{-/-} マウスでは、小胞体ストレスの軽減に関わる X-box binding protein 1s (*Xbp1s*) の mRNA 発現の低下を認めた。また、24 h 絶食後に 1 h 再摂食させることで小胞体ストレスを負荷したところ、*Orexin*^{-/-} マウスの肝臓において小胞体タンパク inositol-requiring enzyme 1 α (*IRE1 α*) の過剰な活性亢進と、それに伴うインスリン抵抗性促進因子の JNK の過剰なリン酸化 (活性化) を認めた。このように、オレキシンが欠損すると、加齢に伴い肝臓における小胞体の恒常性が破綻し、インスリン抵抗性が増大することで、糖新生活性の異常亢進が誘発されることが示された。

肥満に伴う肝臓の糖代謝調節異常に対するオレキシンの防御機構の検討

2型糖尿病患者や2型糖尿病モデル *db/db* マウスでは、交感神経が恒常的かつ過剰に活性化しており、自律神経のバランスの異常が認められる。また、*db/db* マウスの視床下部ではオレキシンの発現が低下していることが報告されている。そこで、*db/db* マウスに対するオレキシンの投与が中枢性に肝臓の糖新生制御機構を改善する可能性を検討した。正常マウスの脳脊髄液中でオレキシン濃度が増加する暗期において、オレキシン A を *db/db* マウスの脳室内に3日間連続投与したところ、明期において肝臓の糖新生律速酵素である *Pepck* および *glucose-6-phosphatase* の mRNA 発現の低下や血糖値の著明な低下が認められた。また、高脂肪食負荷した *C57BL/6J* マウスに対し同様に処置した場合でも、これらの糖新生律速酵素の発現減少と血糖値の低下が認められた。高脂肪食

を負荷した **Orexin**^{-/-}マウスでは、体重の著明な増加と耐糖能異常およびインスリン抵抗性の悪化が認められた。したがって、オレキシンは自律神経のバランス調節を介して糖尿病病態下での肝糖新生の異常を軽減し、高血糖を改善することが示された。

交感神経が異常に亢進する原因の一つとして、脳内の **angiotensin II** による活性酸素種 (ROS) 産生が関与しており、糖尿病病態においてオレキシンの生理作用の低下に寄与している可能性がある。しかし、**angiotensin II** による酸化ストレスを防御する生理機構は不明である。そこで本研究では、酸化ストレスモデルとして **angiotensin II** 処置した培養ヒト内皮細胞を用い、視床下部に比較的多く存在する **coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀)** の抗酸化作用を検討した。その結果、**angiotensin II** による ROS 産生の増加は **CoQ₁₀** の前処置および後処置により抑制された。したがって、**CoQ₁₀** による過剰な ROS 産生の抑制は、オレキシンによる中枢性の糖新生改善作用を補助できる可能性が示唆された。

慢性的なうつに伴う肝インスリン抵抗性に対するオレキシンの防御機構の検討

うつ病患者の脳脊髄液中ではオレキシン濃度が減少していることが報告されている。また、うつはインスリン抵抗性を増大させる要因であることが示唆されている。しかし、うつ状態においてオレキシンの糖代謝調節作用がどのように変化するかは不明である。そこで、本研究では **WT** および **Orexin**^{-/-}マウスを攻撃性の高い **ICR** マウスと同居させることで社会性敗北ストレスを負荷して慢性的なうつ状態とし、うつとインスリン抵抗性が連関して増悪するメカニズムにオレキシンが関与する可能性を追究した。その結果、ストレス負荷した **Orexin**^{-/-}マウスでは **WT** マウスと比較して、空腹時の血糖値、血清インスリン濃度およびインスリン抵抗性の指標である **HOMA-IR** の増加を認めた。また、ピルビン酸負荷試験により肝臓の糖新生活を評価したところ、ストレス負荷した **Orexin**^{-/-}マウスは **WT** マウスに比べ糖新生活を異常な亢進を認めた。さらに、肝臓のインスリンシグナルを解析した結果、**WT** マウスではインスリンによる **Akt** リン酸化の増加はストレス負荷により変化しなかったが、**Orexin**^{-/-}マウスではストレス負荷群でインスリン反応性が消失した。したがって、通常食餌下では社会性敗北ストレスによりうつが誘発されるが、内因性のオレキシンが存在することにより肝臓の糖新生調節機能が正常に維持されることが示された。一方、オレキシン系の活性化を誘発するカロリー制限を行うと、**WT** マウスにおいてうつと耐糖能異常の両者が改善するのに対し、**Orexin**^{-/-}マウスではこれらの効果は認められなかった。したがって、カロリー制限によりオレキシン神経の活性化を促進することでうつ形成自体が抑制され、ストレス下でもインスリン感受性が維持されることが示された。

第3章 総合考察

生体のグルコース恒常性は、従来、膵臓から分泌されるインスリンなどのホルモンによって肝臓、骨格筋、脂肪などの末梢インスリン標的組織で調節されると考えられていた。しかし最近、各臓器の糖代謝活性の調和を保つためには視床下部を中枢とする統合機構の存在が必須であることが明らかにされた(Prodi and Obici, 2006)。特に、各臓器の連係には、視床下部による自律神経のバランス調節が不可欠であり、加齢、肥満、うつなどの影響で自律神経のバランスが崩れて交感神経系が恒常的に優位になるとインスリン抵抗性が惹起され(Lautt et al., 2008; Lambert et al., 2010; Silva et al., 2012)、メタボリックシンドロームや2型糖尿病の発症リスクを増加させる(Straznicky et al., 2012; Licht et al., 2013)。本研究では、エネルギー恒常性の維持に関わり、かつ、加齢、肥満およびうつにより機能が低下する視床下部オレキシン系に焦点を当て、末梢組織のインスリン抵抗性を防御する機構を検討した結果、オレキシン系が肝臓のインスリン感受性の維持に重要な役割を果たしていることを見出した。実際、オレキシンが欠損すると、マウスの血糖値の日内変動が消失して肝糖新生に依存度の高い明期(休息期)の血糖値が増加することや、加齢、肥満およびうつによる肝糖新生調節の異常が野生型マウスよりも顕著に増大することを明らかにした。さらにその機構を検討した結果、オレキシンは、覚醒期初期の摂食開始時に交感神経を介して肝臓での糖新生を一過性に亢進させ、小胞体ストレス応答を軽減させることにより加齢や肥満に伴うインスリン抵抗性を防御することを見出した。オレキシンによる交感神経の活性化は、摂食後の迷走神経の反射的な活性化を促進することで肝糖新生を抑制し、食後の血糖値を効果的に低下させる可能性も考えられた。また、うつ病態では、オレキシンが完全に欠損した場合にのみ肝インスリン抵抗性が認められたことから、野生型マウスではうつ病態においてオレキシン系は障害されるにもかかわらず、中枢性の肝糖新生調節を維持するための機能は保持していることが示唆された。さらに、カロリー制限により視床下部オレキシン系を活性化させると、ストレスによるうつの発症自体が抑制され、糖代謝異常が防止されることを明らかにした。このように、加齢、肥満、およびうつ状態における *Orexin*^{-/-}マウスの肝インスリン抵抗性が、同一条件下のWTマウスの肝インスリン抵抗性よりも著しく増大することから、これらの病態において内因性のオレキシンが自律神経系を介して肝臓のインスリン感受性の維持に寄与していると考えられる(Fig. 1)。

以上のように本研究では、視床下部オレキシン系が肝臓の糖新生を中枢性に制御する役割を果たしており、加齢、肥満およびうつに伴う肝インスリン抵抗性に対する重要な防御因子であることを明らかにした。肝臓のインスリン抵抗性に伴う肝糖産生の異常な増加は、2型糖尿病における食後高血糖の主要な原因である(DeFronzo, 2009)。したがって、今後、時間治療の概念を取り入れた糖尿病の新しい治療法を開発する上で、オレキシン神経系は重要な作用標的であると考えられる。

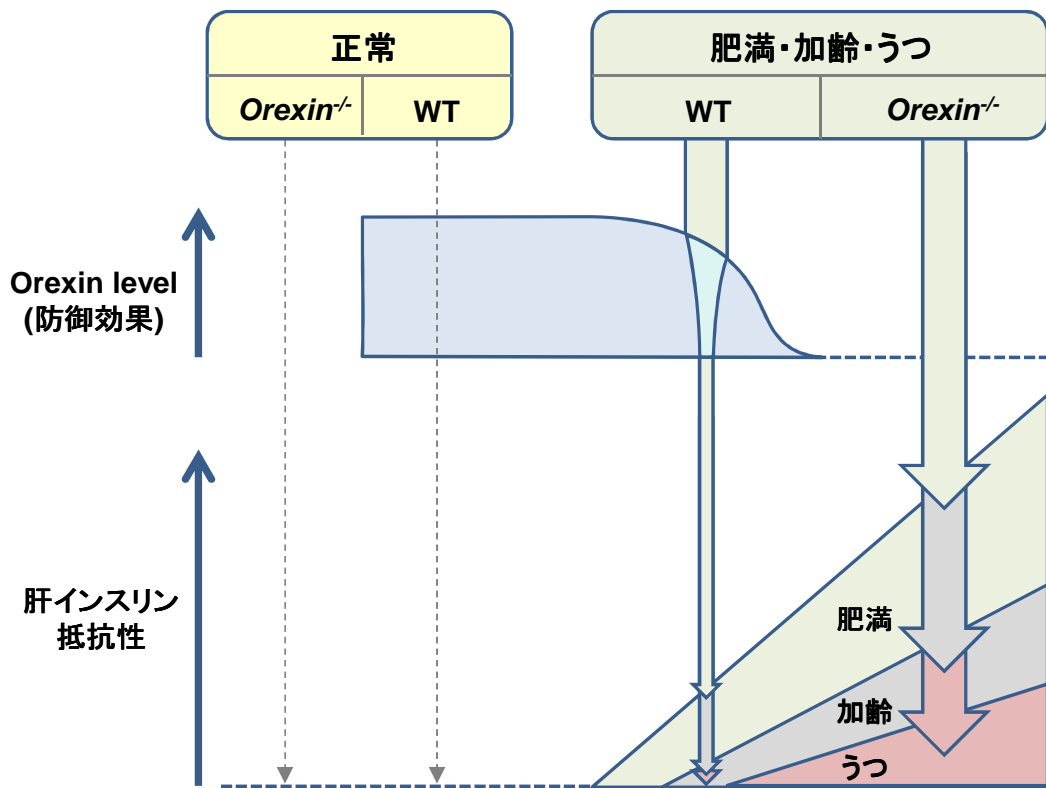


Figure 1. 加齢、肥満、およびうつに伴う肝インスリン抵抗性の進展に対する視床下部オレキシン系の防御作用。

視床下部オレキシン系は正常状態では自律神経を介して肝臓におけるインスリン抵抗性を防御する。ただし、加齢、肥満、およびうつの影響がなければオレキシンが欠損しても直ちに肝インスリン抵抗性が惹起されることはない。一方、加齢、肥満、およびうつ病態では、これらの要因によりオレキシンの防御作用が部分的に低下すると肝インスリン抵抗性に少なくとも一部寄与する（うつ病態での寄与は相対的に小さい）が、オレキシンが完全に欠損すると著しい肝インスリン抵抗性の増大が引き起こされる。

参考文献

- Barbieri M, Rizzo MR, Manzella D, Paolisso G. Age-related insulin resistance: is it an obligatory finding? The lesson from healthy centenarians. *Diabetes Metab Res Rev*, 2001; 17: 19-26.
- Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, 2010; 330: 1349-1354.
- Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q-biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 396: 74-79.
- Beyer RE, Burnett BA, Cartwright KJ, Edington DW, Falzon MJ, Kreitman KR, Kuhn TW, Ramp BJ, Rhee SY, Rosenwasser MJ, Stein M, An LC. Tissue coenzyme Q (ubiquinone) and protein concentrations over the life span of the laboratory rat. *Mech Ageing Dev*, 1985; 32: 267-281.
- Blouet C, Schwartz GJ. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res*, 2010; 209: 1-12.
- Brown MK, Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front Physiol*, 2012; 3: 263.
- Brundin L, Björkqvist M, Petersén A, Träskman-Bendz L. Reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of suicidal patients with major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2007; 17: 573-579.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 1999; 98: 437-451.
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci*, 2003; 23: 10691-10702.
- Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*, 2012; 18: 59-68.
- Colaïanna M, Schiavone S, Zotti M, Tucci P, Morgese MG, Bäckdahl L, Holmdahl R, Krause KH, Cuomo V, Trabace L. Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2013; 18: 1385-1399.
- Dahmen N, Bierbrauer J, Kasten M. Increased prevalence of obesity in narcoleptic patients and relatives. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2001; 251: 85-89.
- DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for

- the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 2009; 58: 773-795.
- Desarnaud F, Murillo-Rodriguez E, Lin L, Xu M, Gerashchenko D, Shiromani SN, Nishino S, Mignot E, Shiromani PJ. The diurnal rhythm of hypocretin in young and old F344 rats. *Sleep*, 2004; 27: 851-856.
- Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*, 2011; 51: 1289-1301.
- Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S. Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport*, 2001; 12: 993-997.
- Funato H, Tsai AL, Willie JT, Kisanuki Y, Williams SC, Sakurai T, Yanagisawa M. Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell Metab*, 2009; 9: 64-76.
- Gao D, Nong S, Huang X, Lu Y, Zhao H, Lin Y, Man Y, Wang S, Yang J, Li J. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem*, 2010; 285: 29965-29973.
- Goncalves AC, Tank J, Diedrich A, Hilzendeger A, Plehm R, Bader M, Luft FC, Jordan J, Gross V. Diabetic hypertensive leptin receptor-deficient *db/db* mice develop cardioregulatory autonomic dysfunction. *Hypertension*, 2009; 53: 387-392.
- Gooley JJ, Schomer A, Saper CB. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci*, 2006; 9: 398-407.
- Hara J, Yanagisawa M, Sakurai T. Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions. *Neurosci Lett*, 2005; 380: 239-242.
- Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 2010; 140: 900-917.
- Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest*, 2011; 121: 2133-2141.
- Hwang LL, Chen CT, Dun NJ. Mechanisms of orexin-induced depolarizations in rat dorsal motor nucleus of vagus neurones *in vitro*. *J Physiol*, 2001; 537: 511-520.
- Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology*, 2001; 142: 3324-3331.
- Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Oxidative stress and the JNK pathway in diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 2005; 1: 65-72.
- Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y, Kuwaki T.

- Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003; 285: R581-R593.
- Kotagal S, Krahn LE, Slocumb N. A putative link between childhood narcolepsy and obesity. *Sleep Med*, 2004; 5: 147-150.
- Lambert GW, Straznicky NE, Lambert EA, Dixon JB, Schlaich MP. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome--causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*, 2010; 126: 159-172.
- Lautt WW, Ming Z, Macedo MP, Legare DJ. HISS-dependent insulin resistance (HDIR) in aged rats is associated with adiposity, progresses to syndrome X, and is attenuated by a unique antioxidant cocktail. *Exp Gerontol*, 2008; 43: 790-800.
- Licht CM, de Geus EJ, Penninx BW. Dysregulation of the autonomic nervous system predicts the development of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, in press.
- Lim SC, Tan HH, Goh SK, Subramaniam T, Sum CF, Tan IK, Lee BL, Ong CN. Oxidative burden in prediabetic and diabetic individuals: evidence from plasma coenzyme Q₁₀. *Diabet Med*, 2006; 23: 1344-1349.
- Lutter M, Krishnan V, Russo SJ, Jung S, McClung CA, Nestler EJ. Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. *J Neurosci*, 2008; 28: 3071-3075.
- Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Lower plasma Coenzyme Q₁₀ in depression: a marker for treatment resistance and chronic fatigue in depression and a risk factor to cardiovascular disorder in that illness. *Neuro Endocrinol Lett*, 2009; 30: 462-469.
- Marino JS, Xu Y, Hill JW. Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, 2011; 22: 275-285.
- Martínez GS, Smale L, Nunez AA. Diurnal and nocturnal rodents show rhythms in orexinergic neurons. *Brain Res*, 2002; 955: 1-7.
- Mezuk B, Eaton WW, Albrecht S, Golden SH. Depression and type 2 diabetes over the lifespan: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 2008; 31: 2383-2390.
- Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, Vankova J, Black J, Harsh J, Bassetti C, Schrader H, Nishino S. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol*, 2002; 59: 1553-1562.
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res*, 2000; 873:181-187.
- Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance.

- Diabetes Res Clin Pract, 2007; 77 Suppl 1: S161-S164.
- Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, 2000; 43: 533-549.
- Prodi E, Obici S. Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. *Endocrinology*, 2006;147: 2664-2669.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*, 2003; 423: 550-555.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci*, 2007; 32: 469-476.
- Sakurai T. Roles of orexins in regulation of feeding and wakefulness. *Neuroreport*, 2002; 13: 987-995.
- Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*, 2007; 8:171-181.
- Salomon RM, Ripley B, Kennedy JS, Johnson B, Schmidt D, Zeitzer JM, Nishino S, Mignot E. Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol Psychiatry*, 2003; 54: 96-104.
- Sawai N, Ueta Y, Nakazato M, Ozawa H Developmental and aging change of orexin-A and -B immunoreactive neurons in the male rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, 2010; 468: 51-55.
- Shiuchi T, Haque MS, Okamoto S, Inoue T, Kageyama H, Lee S, Toda C, Suzuki A, Bachman ES, Kim YB, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S, Imoto K, Minokoshi Y. Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab*, 2009;10: 466-480.
- Silva N, Atlantis E, Ismail K. A review of the association between depression and insulin resistance: pitfalls of secondary analyses or a promising new approach to prevention of type 2 diabetes? *Curr Psychiatry Rep*, 2012; 14: 8-14.
- Su W, Guo Z, Randall DC, Cassis L, Brown DR, Gong MC. Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in type 2 diabetic db/db mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 295: H1634-H1641.
- Straznicky NE, Grima MT, Sari CI, Eikelis N, Lambert EA, Nestel PJ, Esler MD, Dixon JB, Chopra R, Tilbrook AJ, Schlaich MP, Lambert GW. Neuroadrenergic dysfunction along the diabetes continuum: a comparative study in obese metabolic syndrome subjects. *Diabetes*, 2012; 61: 2506-2516.
- Timonen M, Rajala U, Jokelainen J, Keinänen-Kiukaanniemi S, Meyer-Rochow VB, Räsänen P. Depressive symptoms and insulin resistance in young adult males: results from the Northern Finland 1966 birth cohort. *Mol Psychiatry*, 2006; 11: 929-933.

- Tsuneki H, Murata S, Anzawa Y, Soeda Y, Tokai E, Wada T, Kimura I, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice. *Diabetologia*, 2008; 51: 657-667.
- Tsuneki H, Sugihara Y, Honda R, Wada T, Sasaoka T, Kimura I. Reduction of blood glucose level by orexins in fasting normal and streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol*, 2002; 448: 245-252.
- van den Top M, Nolan MF, Lee K, Richardson PJ, Buijs RM, Davies CH, Spanswick D. Orexins induce increased excitability and synchronisation of rat sympathetic preganglionic neurones. *J Physiol*, 2003; 549: 809-821.
- Villalba JM, Parrado C, Santos-Gonzalez M, Alcain FJ. Therapeutic use of coenzyme Q₁₀ and coenzyme Q₁₀-related compounds and formulations. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010; 19: 535-554.
- Yamamoto Y, Ueta Y, Date Y, Nakazato M, Hara Y, Serino R, Nomura M, Shibuya I, Matsukura S, Yamashita H. Down regulation of the *prepro-orexin* gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999; 65: 14-22.
- Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, Miwa Y, Goto K, Sakurai T. Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res*, 2000; 859: 404-409.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami Ki, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 2003; 38: 701-713.
- Yi CX, Serlie MJ, Ackermans MT, Foppen E, Buijs RM, Sauerwein HP, Fliers E, Kalsbeek A. A major role for perifornical orexin neurons in the control of glucose metabolism in rats. *Diabetes*, 2009; 58: 1998-2005.
- Yoshida K, McCormack S, España RA, Crocker A, Scammell TE. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol*, 2006; 494: 845-861.
- Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, Mignot E, Nishino S. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci*, 2001; 14: 1075-1081.
- Zhang S, Zeitzer JM, Sakurai T, Nishino S, Mignot E. Sleep/wake fragmentation disrupts metabolism in a mouse model of narcolepsy. *J Physiol*, 2007; 581: 649-663.
- Zhang S, Zeitzer JM, Yoshida Y, Wisor JP, Nishino S, Edgar DM, Mignot E. Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. *Sleep*, 2004; 27: 619-627.
- Zhou QG, Zhou M, Lou AJ, Xie D, Hou FF. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response and insulin resistance in cultured adipocytes via induction of

endoplasmic reticulum stress. *Cell Physiol Biochem*, 2010; 26: 775-786.

Zlatković J, Filipović D. Stress-induced alternations in CuZnSOD and MnSOD activity in cellular compartments of rat liver. *Mol Cell Biochem*, 2011; 357: 143-150.

Zou XJ, Yang L, Yao SL. Endoplasmic reticulum stress and C/EBP homologous protein-induced Bax translocation are involved in angiotensin II-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012; 237: 1341-1349.