

2型糖尿病モデル動物 Goto-Kakizaki ラットにおける 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase の変動 ～肝臓における上昇および脂肪組織における低下～

伊藤 邦郎,^a 金田沙耶佳,^a 山口 聡,^a 鈴木 淑子,^a 市原 由子,^a 村田 亮,^b 田中 頼久^{*,a}

^a 東北薬科大学薬物動態学教室, ^b いわき明星大学薬学部

Increased Hepatic but Decreased Adipocytic 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Type 2 Diabetes Model Goto-Kakizaki Rats

Kunio ITOH,^a Sayaka KANEDA,^a Satoshi YAMAGUCHI,^a Hideko SUZUKI,^a

Yuko ICHIHARA,^a Ryo MURATA,^b and Yori-hisa TANAKA^{*,a}

(Received November 20, 2009)

By activating inert 11-dehydrocorticosterone, 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD1) is strongly considered to play a pivotal role in the development of insulin resistance in diabetes mellitus in rodents. However, it still remains unknown whether 11β -HSD1 activity fluctuates in the Goto-Kakizaki (GK) rat model of type 2 diabetes mellitus. Additionally, 11β -HSD1 has another important role in the reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds. Here, we investigated 11β -HSD1 activity as well as expression levels of protein and mRNA to understand the role of 11β -HSD1 in development of type 2 diabetes and its effects on the pharmacokinetics of carbonyl compounds in GK rats. 11β -HSD1 activities towards endogenous corticosterone and synthetic prednisolone as well as xenobiotic metyrapone were significantly increased in the liver of GK rats compared to those of control rats. Elevated expression levels of protein and mRNA were also observed. In contrast, those parameters were significantly decreased in the adipose tissues of GK rats than in control rats. The results suggest that expression of 11β -HSD1 is tissue-specific and increased hepatic 11β -HSD1 activity might be related to the development of insulin resistance in GK rats. The elevation of hepatic 11β -HSD1 activity might result in the rapid elimination of xenobiotic carbonyl compounds in GK rats.

Key words — 11β -HSD1; GK rat; diabetes; carbonyl reduction; adipose

緒 言

肝臓や脂肪組織のようなグルコルチコイド標的組織に豊富に存在する 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD1) は、生理的に不活性なグルコルチコイド（ヒトではコルチゾン、ラットやマウスでは 11-デヒドロコルチステロン）を活性なグルコルチコイド（ヒトではコルチゾール、ラットやマウスではコルチコステロン）に変換する。名前では脱水素（酸化）反応を触媒するように見えるが、*in vivo* では補酵素として NADPH を用いる還元酵素として働き、生成した活性なグルコルチコイドはインスリンに拮抗する。¹⁻³⁾ 最近、トランスジェニックマウス⁴⁾ あるいはノックアウトマウス⁵⁾ を用いた実験により、 11β -HSD1 は、グルコルチコイド濃度を調節することにより、内臓肥満、糖尿病、インスリン抵抗性、脂質異常症等の発

現と関連する鍵酵素であることが明らかにされた。さらに、Maser らにより、肝ミクロソームに局在する 11β -HSD1 は、膜に移行した多くの脂溶性のカルボニル化合物の還元的代謝に、細胞質上清画分のカルボニル還元酵素よりも重要な役割を担っていることが報告されている。⁶⁻⁹⁾ これらカルボニル化合物には薬物^{10,11)} のみならず、発がん性物質^{12,13)} や殺虫剤^{14,15)} 等も含まれる。

一般に、薬物代謝酵素の多くは、種々の内因性並びに外因性要因による変動を受けやすく、病態は遺伝子変異あるいは年齢等と共に主要な内因性要因の一つとされる。また、酵素誘導や阻害を起こす併用医薬品や食物は代表的な外因性要因として知られる。 11β -HSD1 に関しては、2 型糖尿病 db/db マウスの肝細胞^{16,17)} および肥満したげっ歯類やヒト¹⁸⁾ の脂肪細胞における活性増大が報告されている。ところで、Goto-Kakizaki (GK) ラットは、Wistar 系

ラットを用い経口ブドウ糖負荷試験を行い耐糖能低下を示す個体を繰り返し交配選別して得られた自然発症2型糖尿病モデルラットである。¹⁹⁾ 以前, 著者らはこのGKラットを用い, 免疫抑制薬シクロスポリン²⁰⁾ およびタクロリムス²¹⁾ の体内動態に及ぼす糖尿病態の影響を調べ, バイオアベイラビリティの低下につながる胃内容物排出速度の低下を報告した。Watanabeらは, mRNAの有意な増大はないもののペプチドトランスポーター1の上昇により β -ラクタム系抗生物質のセファレキシンの小腸吸収が高まることを示した。²²⁾ Tamuraらの最近の報告によれば, 糖尿病薬ナテグリニドの静脈内投与後の体内動態は, GKおよびコントロールラット群の間で差がないとされている。²³⁾ 以上がGKラットにおける薬物代謝に関する報告のほとんどすべてで, 詳細に研究されているGKラットの種々の病態生理学的特徴に比べ, 糖尿病態が薬物の体内動態に及ぼす影響についての情報は大変乏しく, 11β -HSD1活性自身の変動さえも不明である。本研究では, GKラットが糖尿病態を発症する過程で 11β -HSD1が果たす役割を明らかにし, 併せてカルボニル化合物の還元代謝に及ぼす糖尿病態の影響を知るため, GKラットの 11β -HSD1活性, タンパク質並びにmRNA発現量をコントロール群と比較検討した。

実験材料および方法

試薬類

プレドニゾロン, プレドニゾン, ベタメサゾン, アンドロステンジオンおよびメチラポンはSigmaから購入した。コルチコステロンはナカライテスクから, 11 -デヒドロコルチコステロンはSteraloidから入手した。アンピシリン, X-galは和光純薬から, β -NADP⁺, β -NADPHはオリエンタル酵母から, 抗ラット 11β -HSD1抗体はSanta Cruzバイオテクノロジーから, His-tag抗血清はMedical Biological Laboratoriesから購入した。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

ラット肝ミクロソームの調製

自然発症糖尿病GKラットおよびコントロール群として用いたWistar系ラットは, いずれも7週齢(雄性)のものを日本クレアから購入し, 東北薬科大学動物実験指針に従い飼育し実験を行った。ラットを断頭屠殺後, 直ちに開腹し氷冷生理食塩液で肝臓

を灌流し摘出した。重量測定後, 細切して4倍量の0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)-0.1 mM EDTAを加え, ポッター型テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。得られたホモジネートを $9,000\times g$ で20分間遠心分離後, さらにその上清を $105,000\times g$ で60分間遠心分離し, 得られた沈渣を再び上記緩衝液に懸濁後, $105,000\times g$ で20分間遠心分離することによりミクロソーム画分を得た。30%グリセロール含有10 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁し -80°C で保存した。タンパク質濃度はProtein Quantification Kit-Rapid(同仁堂)を用いて測定した。

血糖値の測定

血液は尾静脈から採取し, グルテストエースR(三和科学研究所)で血糖値を測定した。

11β -HSD1活性の測定

コルチコステロンおよびプレドニゾロン酸化活性: 11β -HSD1タンパク質量および安定な酸化活性を反映するとされているコルチコステロンの 11 -デヒドロコルチコステロンへの変換を指標に測定した。²⁴⁾ コルチコステロン($0.1\sim 10\mu\text{M}$)あるいはプレドニゾロン($2.5\sim 150\mu\text{M}$)を100 mMグリシン-苛性ソーダ緩衝液(pH 11.0), 7.5 mM NADP⁺および肝ミクロソームからなる反応液(1.0 ml)中, 37°C で10分間インキュベートした。反応は, 内部標準物質として 11 -デヒドロコルチコステロン測定にはアンドロステンジオンおよびプレドニゾロン測定にはベタメサゾンをそれぞれ $1.0\mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解した酢酸エチルを添加し停止した。10分間振盪抽出を行い, $5,000\times g$, 10分遠心で得られる有機層を2.0 ml取り, 窒素気流下に溜去した。残渣を50%メタノールに溶解し生成物をHPLCにて定量した。

メチラポン還元活性:メチラポン($50\sim 1500\mu\text{M}$)を100 mMリン酸緩衝液(pH 7.4), NADPH生成系(6 mMグルコース-6-リン酸, 0.8 mM NADP⁺, 3 mM MgCl₂, 0.35 Uグルコース 6-リン酸脱水素酵素)および肝ミクロソームからなる反応液(0.5 ml)中, 37°C で30分間インキュベートした。反応は, 内部標準物質としてヒドロコルチゾンを $20\mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解したアセトニトリルを0.5 ml添加し停止した。 $8,000\times g$, 10分間遠心で得られる上清25 μl をHPLCにて分析した:カラム Atlantis dC18, 移動相 15 mM 1-オクタンスルホン酸含有 25%アセトニトリル, 流速 0.5 ml/min, 検出 紫外吸収 240 nm。

SDS-PAGE/ウェスタンブロッティングによる解析

肝および脂肪ミクロソームを、装置として全自動電気泳動システム PhastSystem (GE Healthcare), ゲルに PhastGel Gradient 8-25 (GE Healthcare), 緩衝液に SDS Buffer Strips (GE Healthcare) を用いる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に付しタンパク質を分離した。泳動後, ブロッティング装置に Phast Transfer (GE Healthcare), transfer buffer (25 mM Tris および 192 mM glycine 含有 10% メタノー: pH 8.3) 中, PVDF メンブラン (MILLIPORE) に転写し, スキムミルクで 1 時間室温にてブロッッキングした。一次抗体 (1:1000) を室温で 1 時間, 二次抗体 (1:7500) を室温で 1 時間順次反応させた後, ECF substrate を室温で 20 分間反応させた。生成した反応物の蛍光を FLA-3000G (富士写真フイルム株式会社) を用い, 励起波長 473 nm, 受光フィルタ Y520 で測定した。検出されたバンドの濃さを発光量として数値化し, 比較した。ブロッッキングおよび抗体反应用緩衝液には, PBS-T (137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.68 mM KCl, 1.47 mM K₂HPO₄, 0.1 % Tween-20) を用いた。分子量マーカーとして, myosin (200,000), β -galactosidase (116,248), bovine serum albumin (66,267), aldolase (42,400), carbonicanhydrase (30,000), myoglobin (17,201) を含むタンパク質分子量マーカー「第一」・II を用いた。

リアルタイム PCR 法による解析

ラット肝臓および脂肪組織から SV Total RNA Isolation System (Promega Co.) を用い, 添付のプロトコルに従い total RNA を抽出した。Super Script II および Oligo (dT) 12-18 (Invitrogen) を使用し, 添付のプロトコルに従い, total RNA 5 μ g から cDNA の合成を行った。PCR は cDNA (1 μ g), AmpliTaq Gold (AmpliTaq DNA Polymerase), 11 β -HSD1 (forward primer 5'-cctggagatcatcaaaggcac-3', reverse primer 5'-aattccatgatcctccttctctg-3') あるいは GAPDH (forward primer 5'-cgacccttcattgacctca-3', reverse primer 5'-ttgactgtgccgttgaaacttg-3') のプライマーを用い以下のように行った: TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ) にて, 50℃ で 2 分, 95℃ で 10 分処理後, 1) 95℃, 30 秒, 2) 60℃, 30 秒, 3) 72℃, 30 秒のサイクルを 35 回。PCR 産物は, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用い, pCR2.1-TOPO ベクターにサブクローニングし, 組

換え体プラスミドは, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) で精製した。得られた組換え体プラスミドの塩基配列は, M13 sequence primer を用いて DTCS Quick Start Kit のプロトコルに従いサーマルサイクラーに付した後, CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc.) により確認した。

GAPDH および 11 β -HSD1 の検量線は, それぞれの 7 段階のプラスミド希釈系を調製し作成した。リアルタイム PCR は, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), cDNA (1 μ g) および上述のプライマーを用い, PE ABI 7700 PRISM Sequence Detection System (Perkin Elmer Life Science) で行った。PCR 条件は以下のとおりである: 50℃ で 2 分, 95℃ で 10 分処理後, 1) 95℃, 30 秒, 2) 60℃, 30 秒, 3) 72℃, 30 秒のサイクルを 35 回。すべての反応は再現性確認のため 3 回行い, またプライマーダイマーが生成しないことを確認するため template なしのネガティブコントロールを検討した。

統計処理

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的有意差は分散分布処理後, Student's t-test により行い, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

体重および血糖値

8 週齢時の GK ラット群の体重は 181 ± 2.4 g で, コントロール群の 220 ± 4.6 g の約 82% に低下した。GK ラット群の血糖値 (228 ± 12.3 mg/dl) は, コントロール群 (71.4 ± 1.8 mg/dl) に比べ約 3 倍高かった。これらの値は以前の結果と良く一致していた。²⁵⁾

肝ミクロソーム 11 β -HSD1 活性

コントロールおよび GK ラット両群の肝ミクロソーム中コルチコステロン, プレドニゾロンおよびメチラポンに対する 11 β -HSD1 活性を測定した。典型的な Michaelis-Menten プロットおよび Edie-Hofstee プロットから算出したキネティックパラメータをそれぞれ Fig. 1 並びに Table 1 に示す。いずれの基質でも, K_m 値に差は認められなかったが, V_{max} 値は GK ラット群の方がコントロール群に比較し有意に高い値を示した。半合成ステロイドのプレドニゾロンの K_m 値 (約 30 μ M) に対し, 生

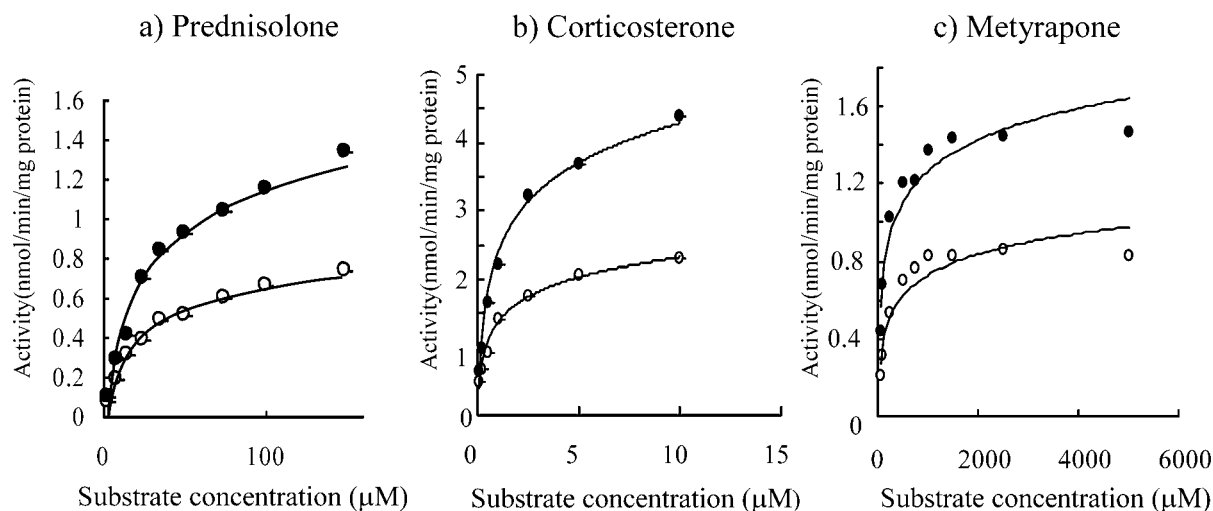


Fig. 1. Typical Michaelis-Menten Plots for 11 β -HSD1 Activity towards Corticosterone(a), Prednisolone(b), and Metyrapone (c) by Liver Microsomes of Control (○) and GK (●) Rats

Table 1. Kinetic Parameters for 11 β -HSD1 Activities towards Corticosterone, Prednisolone and Metyrapone by Liver Microsomes of GK and Control Rats

Substrates	Rat	K_m (μ M)	V_{max} (nmol/min/mg protein)
Corticosterone	Control	0.541 ± 0.096	2.63 ± 0.208
	GK	0.553 ± 0.068	$3.56 \pm 0.475^*$
Prednisolone	Control	25.7 ± 3.18	0.779 ± 0.077
	GK	30.5 ± 3.30	$1.18 \pm 0.158^*$
Metyrapone	Control	157 ± 24.4	0.98 ± 0.193
	GK	110 ± 7.82	$1.78 \pm 0.185^*$

Data are presented as the mean \pm S.E. of four rats. * $p < 0.05$ compared with control rats.

理活性物質のコルチコステロンの K_m 値は約 1/50 の $0.55 \mu\text{M}$ と小さく, コルチコステロンの酵素への高い親和性が示された. 同様のことが V_{max} 値にも認められ, コルチコステロンに対する V_{max} 値はプレドニゾロンの約 3 倍大きかった. メチラポンの還元活性においても, GK ラット群の方がコントロール群より約 50%高い値を示した.

肝臓中 11 β -HSD1 タンパク質および mRNA 発現量

肝臓中の 11 β -HSD1 タンパク質および mRNA の発現量を, それぞれウェスタンブロッティングおよびリアルタイム PCR 法により測定した. Fig. 2 に示すように, タンパク質および mRNA いずれにおいても, コントロール群に比べ GK ラット群の発現量が有意に増大していた.

脂肪組織中 11 β -HSD1 活性, タンパク質および mRNA 発現量

脂肪組織中のミクロソームは少量だったため, コルチコステロンは $2.5 \mu\text{M}$ およびプレドニゾロンは $150 \mu\text{M}$ の濃度で活性を測定し, pmol/min/mg protein で表した (Fig. 3). どちらの基質においても, コントロール群に比べ GK ラット群の活性は非常に低かった. 低い活性に対応し, タンパク質および mRNA 発現量は, GK ラット群がコントロール群より有意に低い値を示した (Fig. 4).

考 察

GK ラットはインスリン非依存性糖尿病のモデル動物である.¹⁹⁾ 肝臓および脂肪組織中 11 β -HSD1 は, グルココルチコイド局所作用を介し 2 型糖尿病や内臓

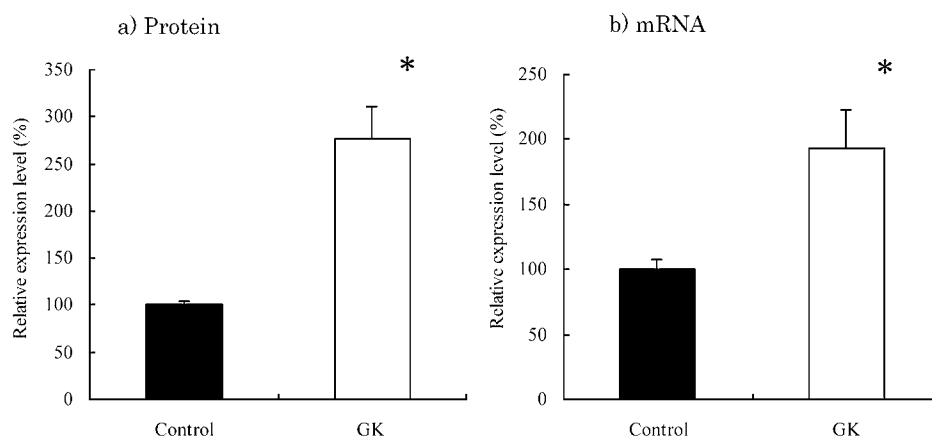


Fig. 2. Levels of Protein and mRNA Expression of 11 β -HSD1 in the Liver of Control and GK Rats. Data are presented as the mean \pm S.E. of four rats. * $p < 0.05$ compared to control rats.

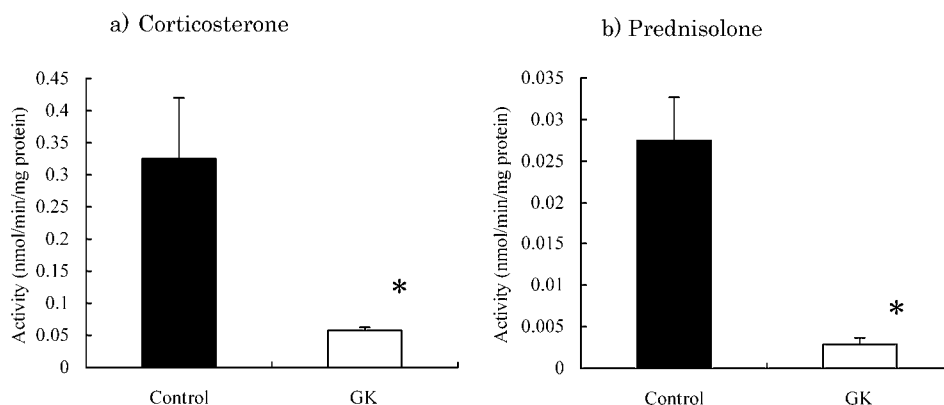


Fig. 3. 11 β -HSD1 Activity towards Corticosterone(a) and Prednisolone(b) by Adipose Tissue Microsomes of Control and GK Rats.

Activity was measured at a substrate concentration of 2.5 μ M for corticosterone and 150 μ M for prednisolone. Data are presented as the mean \pm S.E. of four rats. * $p < 0.05$ compared to control rats.

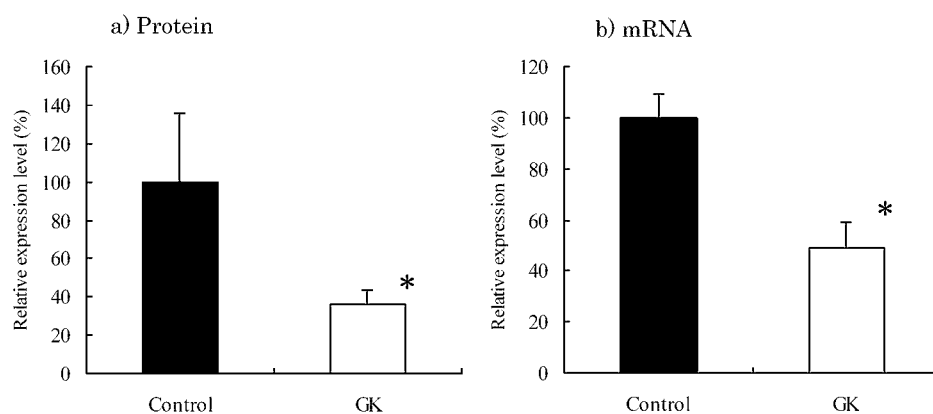


Fig. 4. Levels of Protein and mRNA Expression of 11 β -HSD1 in Adipose Tissues of Control and GK Rats. Data are presented as the mean \pm S.E. of four rats. * $p < 0.05$ compared to control rats.

肥満の発症と関連することが示唆されている。^{4,26,27)} それら生理的作用に加え 11β -HSD1 は、異物カルボニル化合物の還元という別の重要な役割を有する。¹¹⁻¹⁵⁾ しかし、 11β -HSD1 の GK ラットにおける変動についてはいまだ不明で、本研究では、その変動を活性、タンパク質および mRNA 発現量の観点からコントロール群と比較検討した。

コルチコステロンを基質にしたとき、肝臓における V_{\max} 値は GK ラット群の方がコントロール群より有意に大きく、その増大は 11β -HSD1 のタンパク質および mRNA 発現量と一致していた。しかし、 K_m 値は両群間に差は認められなかった。一方、脂肪組織においては、タンパク質および mRNA 発現量の低下と対応し活性はかなり低かった。Aoki らはインスリン抵抗性糖尿病モデル C57BL/KsJ-db/db マウスの肝 11β -HSD1 活性は、mRNA 発現量の有意な増大を伴いコントロールの db/+m マウスより約 30% 有意に増大し、脂肪組織の 11β -HSD1 活性については検討していないものの、この活性増大による強力なインスリン拮抗物質コルチコステロン²⁸⁾ 濃度の増大が db/db マウスにおけるインスリン抵抗性の要因であると考察している。¹⁶⁾ db/db マウス肝細胞を用いた検討から、同様の結果が Liu らにより報告されている。¹⁷⁾ 一方、肥満 Zucker ラットにおける 11β -HSD1 は肝臓では減少するのに対して脂肪組織では増大することが Livingstone らにより明らかにされている。²⁹⁾ 11β -HSD1 の発現は成長ホルモン、サイトカイン、グルココルチコイド等の様々な要因により制御されており、その制御はそれぞれの組織に特異的で複雑な機構の下にあると考えられているが、詳細はいまだ明らかでない。¹⁻³⁾

主に脂肪組織に存在するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) が、インスリン抵抗性に関わっていることが知られている。^{30,31)} PPAR γ のアゴニストは 11β -HSD1 の発現を転写レベルでダウンレギュレーションすることにより、不活性なコルチゾンの活性なコルチコステロンへの変換を抑制し、これが db/db マウスにロジグリタゾンを投与したとき見られる血漿中コルチコステロン濃度の低下と関連することが、すなわち PPAR γ アゴニストのマウスにおけるインスリン抵抗性改善作用の一部は少なくとも脂肪組織の 11β -HSD1 の阻害によることが報告されている。³²⁾ しかし、GK ラット脂肪組織の 11β -HSD1 はむしろ既に低下状態にあることから、本モデル動物のインスリン抵抗性には肝臓

の 11β -HSD1 活性の上昇が関わっているものと推察される。

内因性コルチコステロイドとの構造の違いは $\Delta 1$ -二重結合と 17-水酸基構造だけである半合成グルココルチコイドのプレドニゾロンで 11β -HSD1 活性を測定すると、コルチコステロンに比べ K_m 値は大きく V_{\max} 値が低いことが分り、 11β -HSD1 はステロイド骨格の微細構造を厳しく認識することが確認された。^{7,9)} ステロイド構造を全く持たないメチラポンの還元活性も、GK ラット群においてコントロール群より有意に高かった。肝臓は一般に薬物の全身クリアランスに極めて重要な役割を果たすので、この結果は、2 型糖尿病モデル GK ラットにおける異物カルボニル化合物の還元的代謝が、コントロール群より亢進している可能性を示唆する。

以上、2 型糖尿病モデル動物の GK ラットは、コントロール群に比べ肝臓中の 11β -HSD1 活性は有意に増大するが脂肪組織中の 11β -HSD1 は有意に低下し、それらはタンパク質および mRNA 発現量の変動と一致することが明らかになった。本結果は、GK ラットで認められるインスリン抵抗性発現における 11β -HSD1 の重要性を示唆するものと考ええる。また、GK ラットにおける 11β -HSD1 触媒異物カルボニル化合物の還元的代謝の亢進が示唆される。

REFERENCES

- 1) Monder C., White P. C., *Vit. Horm.*, **47**, 187-271 (1993).
- 2) Stewart P. M., Krozowski Z. S., *Vit. Horm.*, **57**, 249-324 (1999).
- 3) Seckl J. R., Walker B. R., *Endocrinology*, **142**, 1371-1376 (2001).
- 4) Masuzaki H., Paterson J., Sinyama H., Morton N. M., Mullins J. J., Seckl J. R., Flier J. S., *Science*, **294**, 2166-2170 (2001).
- 5) Kotelevtsev Y., Holmes M. C., Burchell A., Houston P. M., Schmoll D., Jamieson P., Best R., Brown R., Edwards C. R., Seckl J. R., Mullins J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 14924-14929 (1997).
- 6) Maser E., Oppermann U. C., *Eur. J. Biochem.*, **249**, 365-369 (1997).
- 7) Maser E., Wsol V., Martin H. J., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **27**, 34-37 (2006).
- 8) Maser E., Bannenberg G., *Biochem. Pharmacol.*, **47**,

- 1805–1812 (1994).
- 9) Hult M., Nobel C. S. I., Abrahmsen L., Nicoll-Griffith D. A., Jornvall H., Oppermann U. C. T., *Chem. Biol. Interact.*, **130**–**132**, 805–814 (2001).
- 10) Imamura Y., Iwamoto K., Yanachi Y., Higuchi T., Otagiri M., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **264**, 166–171 (1993).
- 11) Inaba T., Kovacs J., *Drug Metab. Dispos.*, **17**, 330–333 (1989).
- 12) Maser E., Richter E., Friebertshäuser J., *Eur. J. Biochem.*, **238**, 484–489 (1996).
- 13) Maser E., Friebertshäuser J., Völker B., *Chem. Biol. Interact.*, **143**–**144**, 435–448 (2003).
- 14) Rekká E. A., Soldan M., Belai I., Netter K. J., Maser E., *Xenobiotica*, **26**, 1221–1229 (1996).
- 15) Bannenberg G., Martin H. J., Belai I., Maser E., *Chem. Biol. Interact.*, **143**–**144**, 449–457 (2003).
- 16) Aoki K., Homma M., Hirano T., Oka K., Satoh S., Mukasa K., Ito S., Sekihara H., *Life Sci.*, **69**, 2543–2549 (2001).
- 17) Liu Y., Nakagawa Y., Wang Y., Sakurai R., Tripathi P. V., Lutfy K., Friedman T. C., *Diabetes*, **54**, 32–40 (2005).
- 18) Morton N. M., Seckl J. R., *Front. Horm. Res.*, **36**, 146–164 (2008).
- 19) Goto Y., Kakizaki M., Masaki N., *Proc. Jap. Acad.*, **51**, 80–85 (1975).
- 20) Ogata M., Uchimura T., Iizuka Y., Murata R., Suzuki S., Toyota T., Hikichi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1026–1029 (1997).
- 21) Sakurada K., Uchimura T., Ogata M., Maeda K., Murata R., Tanaka Y., *J. Tohoku Pharm. Univ.*, **47**, 145–149 (2000).
- 22) Watanabe K., Terada K., Sato J., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **19**, 91–98 (2003).
- 23) Tamura M., Shibata S., Kudo N., Kawashima Y., *Chirality*, **22**, 92–98 (2010).
- 24) Rask E., Olsson T., Söderberg S., Andrew R., Livingstone D. E., Johnson O., Walker B. R., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 1418–1421 (2001).
- 25) Yoshida T., Murata R., Suzuki S., Oka Y., Itoh K., Tanaka Y., *J. Tohoku Pharm. Univ.*, **51**, 107–115 (2004).
- 26) Whorwood C. B., Donovan S. J., Flanagan D., Phillips D. I., Byrne C. D., *Diabetes*, **51**, 1066–1075 (2002).
- 27) Johansson A., Andrew R., Forsberg H., Cederquist K., Walker B. R., Olsson T., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 4276–4283 (2001).
- 28) Plager J. E., Matsui N., *Endocrinology*, **78**, 1154–1158 (1966).
- 29) Livingstone D. E., Jones G. C., Smith K., Jamieson P. M., Andrew R., Kenyon C. J., Walker B. R., *Endocrinology*, **141**, 560–563 (2000).
- 30) Spiegelman B. M., *Diabetes*, **47**, 507–514 (1998).
- 31) Furnsinn C., Waldhausl W., *Diabetologia*, **45**, 1211–1223 (2002).
- 32) Berger J., Tanen M., Elbrecht A., Hermanowski-Vosatka A., Moller D. E., Wright S. D., Thieringer R., *J. Biol. Chem.*, **276**, 12629–12635 (2001).