

Autumn Report

誘導ラマン散乱顕微鏡を用いた脂肪トリグリセリドリパーゼ阻害下における中鎖脂肪酸による中性脂肪分解効果の評価

山作 百々香

2024年9月13日

1 Introduction

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy; TGCV) は 2008 年に平野らによって発見された疾患であり [1]、心筋や冠動脈の細胞内に中性脂肪 (triglyceride; TG) が過剰に蓄積することで、重度の心不全や動脈硬化をもたらす予後の悪い疾患である。TG が蓄積する原因は、長鎖脂肪酸 (Long-chain fatty acid; LCFA) の細胞内代謝異常と考えられている。図 1 に正常な細胞と TGCV 患者の細胞における脂質代謝の様子を示す。通常、細胞内に取り込まれた LCFA は TG として蓄積するか、ミトコンドリアに取り込まれ β 酸化を介してエネルギー産生に利用される。細胞内に蓄積した TG はエネルギー源となり、必要に応じて脂肪トリグリセリドリパーゼ (adipose triglyceride lipase; ATGL) をはじめとする細胞内のリパーゼによって加水分解され、LCFA となって β 酸化に用いられる。これに対し、TGCV 患者の細胞では LCFA の代謝異常により、TG が分解されず過剰に蓄積する。その結果、エネルギー不全や TG の蓄積による脂肪毒性が生じる。LCFA の代謝異常の原因の一つとして、ATGL をコードする PNPLA2 遺伝子の変異が報告されている。しかしながら、多くの症例において遺伝的原因が明らかとなっていない。また、TGCV 患者の細胞では、LCFA の受容体およびトランスポーターである CD36 の発現が増加し、LCFA の取り込みが増えることで TG の蓄積がさらに増えることが報告されている [2]。

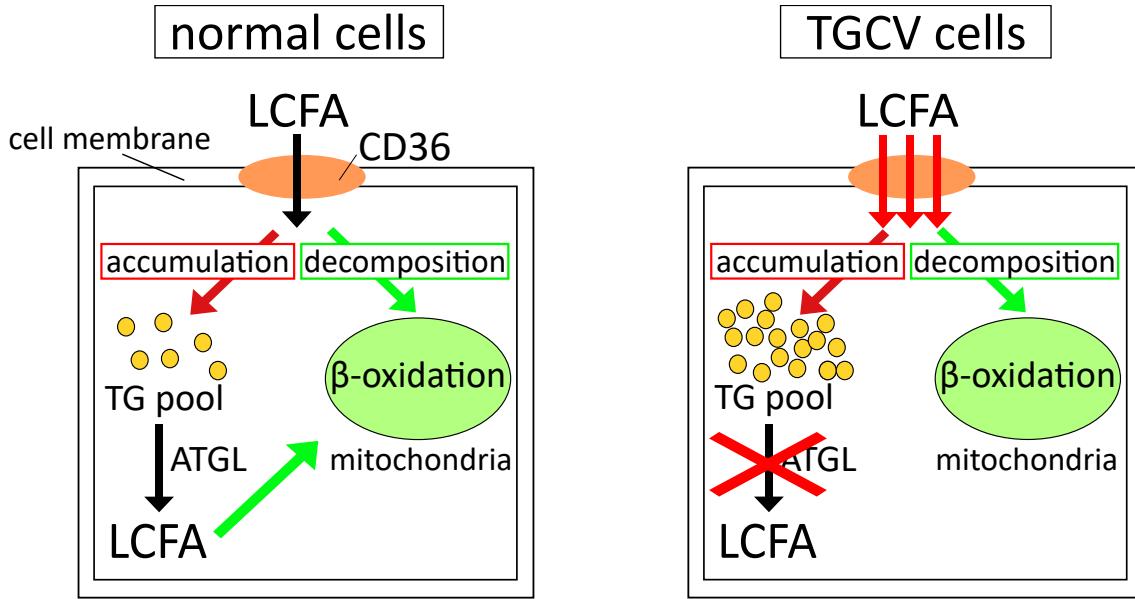


図 1: 正常細胞と TGCV 患者の細胞における脂質代謝

LCFA: Long-chain fatty acid、TG: Triglyceride、ATGL: Adipose triglyceride lipase

TGCV の治療には中鎖脂肪酸 (medium-chain fatty acid; MCFA) の利用が有効である。鈴木らは、TGCV を模擬した ATGL ノックアウトマウスに MCFA を与えることで LCFA の代謝が促進され、心筋細胞内の脂肪の蓄積が減少することを発見した [3]。しかしながら、MCFA が LCFA の代謝を促進するメカニズムはわかつていっていない。

そこで本研究では、MCFA による脂質代謝促進効果を TGCV 模擬細胞で評価することを目的とする。評価方法としては、MCFA と重水素置換した LCFA を与えた細胞において、ATGL を阻害して TGCV の状態を模擬した後に脂肪動員を誘導し、LCFA 由来の TG の分解の様子を評価する。ここで観察には誘導ラマン散乱 (stimulated Raman scattering; SRS) 顕微鏡を用いる。SRS 顕微鏡を用いることで、重水素置換した LCFA の分布を特異的に観察し、LCFA の脂質量を測定することができる。

SRS は非線形光学効果のひとつであり、周波数 ω_p のポンプ光と周波数 ω_s のストークス光を分子に照射した際に、2つの光の周波数差 $\omega_p - \omega_s$ が分子振動の共鳴周波数と一致するとエネルギー遷移が生じ、ポンプ光が減衰しストークス光が增幅する現象である。SRS 顕微鏡では、SRS 信号の強度が分子密度に比例することから分子密度を定量的に測定することができる。本研究では重水素置換した LCFA を SRS 顕微鏡で観察することで MCFA と LCFA を識別し、LCFA の脂質量を測定する。炭素-重水素結合 (C-D) の分子振動 2100 cm^{-1} は生体分子由来の分子振動がほとんど存在しないサイレント領域 ($1800\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) に含まれる。したがって重水素置換 LCFA 由来の信号を特異的に検出することができる。

本報告期間では、脂肪動員の透過タイムラプス観察および脂肪細胞の SRS イメージングを行った。前者では、脂肪動員誘導剤による脂肪動員誘導効果、ATGL 阻害試薬による脂肪動員阻害効果、MCFA による脂肪動員促進効果についてそれぞれ評価した。後者では、

2 Materials & Methods

2.1 サンプル調製

2.1.1 3T3-L1 脂肪細胞への脂肪酸ロード

サンプルには 3T3-L1 細胞を使用し、これを脂肪細胞に分化させた後、パルミチン酸 (C16:0) およびオクタノン酸 (C8:0) を脂肪細胞にロードした。脂肪動員誘導効果および ATGL 阻害効果の確認にはパルミチン酸のみ

を与えた脂肪細胞を使用し、MCFA による脂肪動員促進効果の確認にはパルミチン酸とオクタン酸を両方与えた脂肪細胞を用いた。細胞培養、分化、脂肪酸ロードの手順を以下に示す。図 2 には手順の概念図を示す。

1. 3T3-L1 細胞 5.0×10^4 cells/mL をガラスボトムディッシュ (D11531H、松浪硝子工業株式会社) に 200 μL 播種した。1 日後、培地を 2 mL 加えて培養した。培地は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Low; 041-29775、和光純薬) に 10 % neonatal bovine serum (NBGS; 1601067、Gibco) と 1 % Penicillin-Streptomycin-amphotericin B suspension (Anti; 161-23181、和光純薬) を加えて作製した。培地は 2 日に 1 回交換した。
2. 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させた。1 で培養した 3T3L1 細胞が 80 % コンフルエントに達したら、培地を分化誘導培地に交換して 2 日間培養した。分化誘導培地は、DMEM-Low に 10 % fetal bovine serum (FBS; 092910154、MP Biomedicals)、1 % Anti、分化培地用添加試薬 (MK429、TKR; $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ insulin、 $2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ dexamethasone、 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)) を加えて作製した。2 日間培養した後、維持培地に交換し、3 日おきに培地を交換して培養した。維持培地は DMEM-Low に 10 % FBS、1 % Anti、 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ insulin (MK429、TKR) を添加して作製した。
3. 分化した細胞にパルミチン酸およびオクタン酸をロードした。まず、パルミチン酸 $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ 、またはパルミチン酸 $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ とオクタン酸 $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ を含む培地を作製した。パルミチン酸とオクタン酸をそれぞれ無水アルコールで 40 mM になるように調整した後、さらに 10 % bovine serum albumin (BSA; 30 % BSA (017-22231、和光純薬) を 3 倍希釈して使用) で 8 倍または 16 倍希釈し 5 mM または 2.5 mM とした。この脂肪酸溶液を 37°C の恒温槽で 30 分間攪拌した後、維持培地でさらに 20 倍希釈することで、最終濃度 $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ または $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ に調整した。次にディッシュから培地を除去し、ハンクス平衡塩類溶液 (HBSS; H8264-500ML、Sigma-Aldrich) で 3 回洗浄した。3 回目の HBSS を除去した後、脂肪酸を含む培地を 2 mL 添加して培養した。培地は 3 日に 1 回交換した。

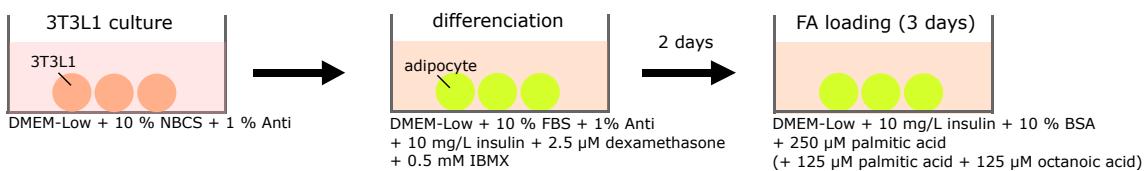


図 2: 脂肪酸ロードの手順

2.1.2 脂肪トリグリセリドリバーゼの阻害

TGCV の細胞を模擬するために、ATGL の活性を阻害した。ATGL 阻害剤として、Atglistatin (HY-15859、MedChemExpress) を使用した。Atglistatin は ATGL に特異的に作用して脂肪動員を阻害する [4]。ATGL 阻害の手順としては、まずディッシュ内の培地を除去し、HBSS で 2 回洗浄した後、ATGL 阻害剤含有培地を加え、2 時間インキュベートした。ATGL 阻害剤含有培地は DMEM-Low に 2 % BSA、Atglistatin $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ または $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ を加えて作製した。なお、HBSS および ATGL 阻害剤含有培地は使用前に 37°C に加温した。

2.1.3 脂肪滴の蛍光染色

脂肪滴の観察のため、脂肪滴を蛍光染色した。蛍光染色には Lipi-Green (LD02、DOJINDO) または BODIPY 493/503 (HY-W090090、MedChemExpress) を用いた。まずディッシュ内の培地を除去し、37°C に加温した HBSS で 2 回洗浄した。次に Lipi-green を $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 含む培地を与え、37°C、5%CO₂ 環境下で 30 分インキュベートした。ここで培地は DMEM-Low に 10% FBS、1% Anti、 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ を添加して作製した。以降、この培地を基本培地と呼ぶ。BODIPY 493/503 を用いた場合は、ディッシュを洗浄した後、HBSS で $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ に希釈した BODIPY 493/503 を添加し、室温で 15 分間インキュベートした。

2.1.4 脂肪動員の誘導

脂肪細胞に脂肪動員誘導剤を与え、脂肪動員を誘起した。ディッシュ内の染色液を除去し、HBSS で 2 回洗浄した後、脂肪動員誘導剤を 2 mL 加えて観察した。脂肪動員誘導剤は DMEM-Low に 10%FBS、25 mM HEPES、0.5 mM IBMX、 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ isoproterenol (Tocris bioscience、Ellisivelle、MO、USA) を加えて作製した [5]。誘導剤に BSA を添加する場合は、10%FBS の代わりに 2%BSA を添加した [5]。ATGL 阻害を行う場合は、BSA を添加した誘導剤に Atglistatin を $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ または $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ 加えた。HBSS および脂肪動員誘導剤は使用前に 37°C に加温した。

2.2 落射蛍光観察システム

脂肪滴の落射蛍光観察は倒立型光学顕微鏡 (ECLIPSE Ti、Nikon) を用いて行い、光源には水銀ランプ (INTENSILIGHT C-HGFI、Nikon) を使用した。Lipi-Green および BODIPY 493/503 の蛍光観察のために蛍光フィルターキューブ (FITC、Nikon) を用いた。キューブの励起フィルターは 480/30 バンドパスフィルター、蛍光フィルターは 535/45 バンドパスフィルター、ダイクロイックミラーは 505 nm ロングパスフィルターである。顕微鏡の操作には画像統合ソフトウェア NIS-Elements (Nikon) を用いた。細胞へのダメージを抑えるために撮影をしない間は水銀ランプ後のシャッターを閉じた。タイムラプス観察は 5 分おきに撮影し、2 時間撮影した。タイムラプス観察の各撮影タイミングでステージを移動させ、ディッシュ内の複数箇所を観察した。

温度による脂肪動員への影響を調べるためにあたり、観察中に培地を温めるために、ヒーターを用いてステージを加温した。図 3 に温度制御システムの構成を示す。ステージの二か所にヒーターをガムテープで貼り付けて加熱した。培地の温度が 37°C となるようにヒーターに電圧を加えた。培地の温度は熱電対を用いて測定し、温度調節器 (AKT4R112100、Panasonic) と半導体リレー (AQA211VL、Panasonic) を用いて電圧の出力を制御した。電圧は交流電圧調整器 (RSA-1、東京理工舎) を用いて印加した。

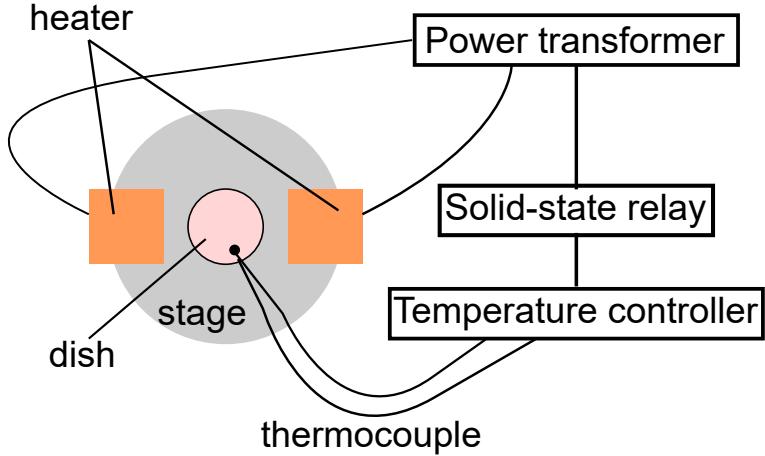


図 3: 温度制御システムの構成

2.3 脂肪滴の体積の算出

取得した蛍光像から脂肪滴の領域を抽出する際は ImageJ を使用した。図 4 に脂肪滴抽出の流れの概念図を示す。脂肪滴抽出の手順としては、まず取得した画像のコントラストを調整した ([Image]>[Adjust]>[Brightness/Contrast])。次に画像を白黒 8 bit 画像に変換 ([Image]>[Type]>[8-bit]) してから二値化 ([Image]>[Adjust]>[Threshold]) し、ノイズを除去し目的の脂肪滴を取り出すことができるよう二値化の閾値を調整した。次に粒子解析ツール ([Analyze]>[Analyze Particles]) を用いて面積 $50 \mu\text{m}^2$ 以上、楕円率 0.5 以上の楕円を抽出し、抽出した領域の面積を算出した。図 4 に脂肪滴を含む細胞の透過像および脂肪滴の蛍光像、蛍光像から二値化した画像と抽出した領域を示す。ImageJ を用いて算出した面積から、脂肪滴を球形と仮定して、脂肪滴の半径および体積を計算した。脂肪滴の半径は円の面積の公式 (式 (1)) から算出し、体積は球の体積の公式 (式 (2)) から算出した。式 (1)、式 (2) において、 S 、 r 、 V はそれぞれ、脂肪滴の面積、半径、体積を表す。さらに、観察終了時間における脂肪滴の体積 (V_{end}) と観察開始時間における体積 (V_0) の比 $\frac{V_{\text{end}}}{V_0}$ を求め、脂肪滴の体積変化を評価した。

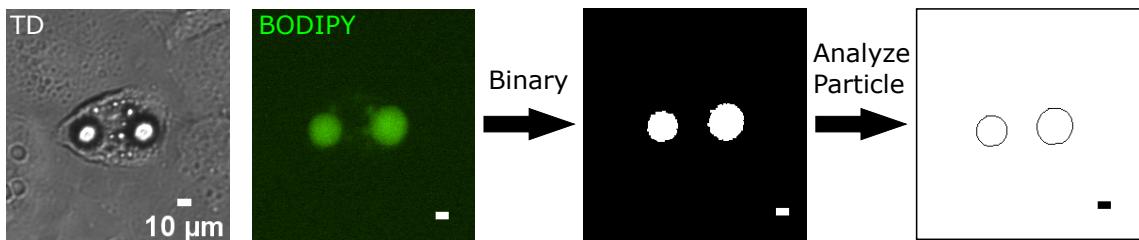


図 4: 蛍光像からの脂肪滴抽出

$$S = \pi r^2 \quad (1)$$

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (2)$$

2.4 SRS 検出器の動作確認

以前修理した SRS 検出器の動作確認を行った。図 5 に検出器の回路図を示す。回路には 3 つの LC 回路で構成される、中心周波数 20 MHz のバンドパスフィルターと中心周波数 80 MHz の RLC バンドストップフィ

ルターが含まれる。20 MHz バンドパスフィルターにより入力信号に含まれるノイズを除去し、80 MHz バンドストップフィルターによりレーザーの繰り返し周波数に由来するノイズを除去して V_{AC} に SRS 信号を出力する。また、DC 出力 V_{DC} は透過観察に用いられる。オペアンプは非反転増幅回路であるため、式(3)より、DC 出力のゲインの理論値は $V_{out}/V_{in} = 6.1$ である。

$$V_{out} = (1 + 5100/1000) V_{in} = 6.1 V_{in} \quad (3)$$

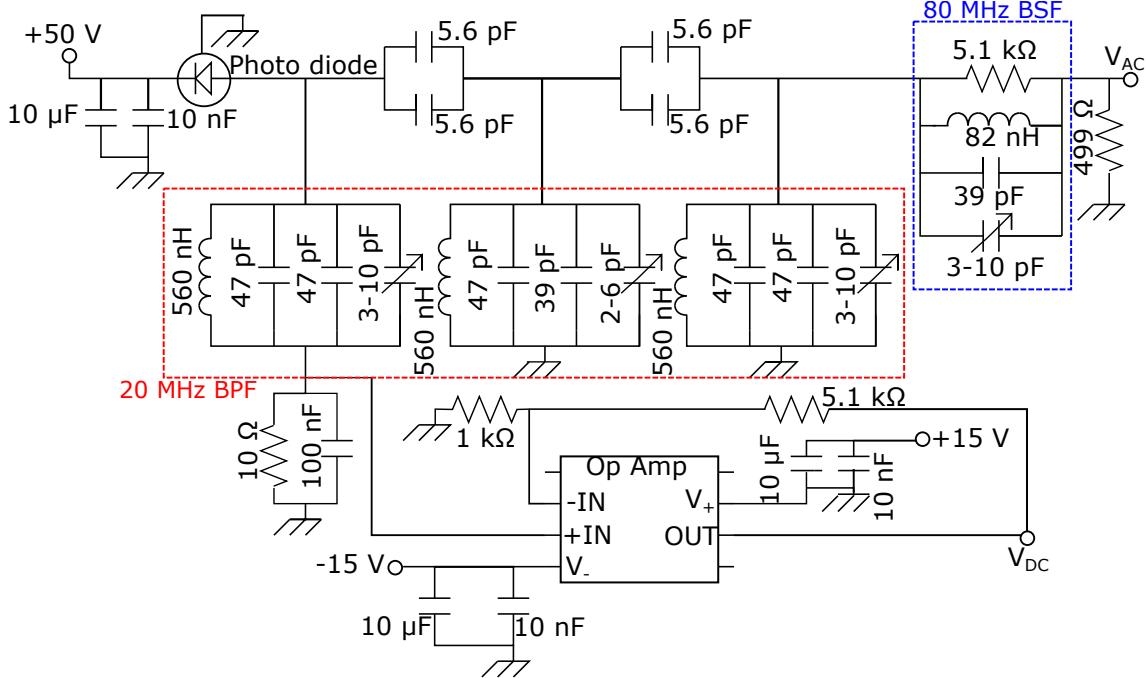


図 5: SRS 検出器の回路構成

BPF: Band pass filter、BSF: Band stop filter

まず、検出器に LED 光を入力して動作確認を行った。動作確認に用いたシステムの構成を図 6 に示す。赤色 LED にファンクションジェネレータ (33600A, KEYSIGHT) から $3 V_{p-p}$ の正弦波信号を入力し、LED の光を検出器で検出した。検出器の AC 出力はプリアンプ (SA-220F5, NF) で増幅した後、オシロスコープ (TBS1064, Tektronix) で測定した。ファンクションジェネレータからの入力信号の周波数を変化させ、検出器の周波数特性を確認した。プリアンプおよびオペアンプの電源には $\pm 15 V$ 直流電源 (SA-915D1, NF) を用いた。また、直流電源 (PMX70-1A, KIKUSUI) を用いてフォトダイオードに 50 V の逆電圧を与えた。

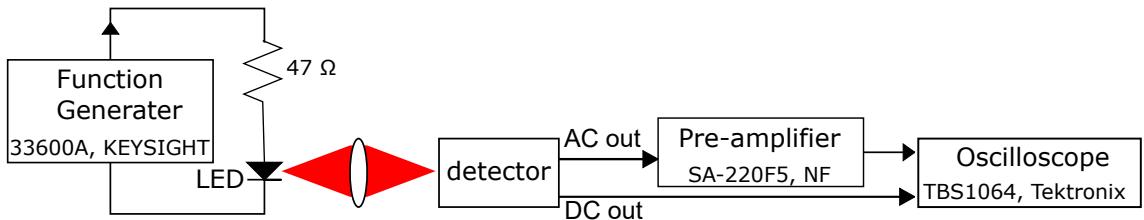


図 6: LED を用いた検出器動作確認のシステム構成

続いて、検出器にレーザー光を入力して動作確認を行った。動作確認に用いた光学系を図 7 に示す。光源にはピコ秒モード同期レーザーに acoustic optictunable filter (AOTF) を適用したものを使用し、電気光学変調器 (electro-optic modulator; EOM) を用いて強度変調をかけた。EOM にはファンクションジェネレータ

(WF1948、NF) を用いて周波数 20 MHz、振幅 1 V_{p-p} の正弦波信号を印加した正確には、FG のアンプされた信号が EOM に与えられています。変調をかけた信号を倒立型顕微鏡 (ECLIPSE Ti-U、Nikon) に入射し、透過光を検出器にいれた。検出器に入射する信号の強度が 71.5 μ W および 235 μ W になるように、ND フィルター (ND10、ND03) で強度を調整した。信号の検出にはロックインアンプを使用した。検出器で検出した信号をプリアンプで増幅した後にミキサー (ZLW-6+、Mini-Circuits) に入力した。さらに、参照信号として 20 MHz の正弦波信号をファンクションジェネレータからミキサーに供給した。ミキサーを用いて入力信号に参照信号をかけた信号を出力し、この信号を差動増幅器 (5307、NF) を用いて増幅した。なお、ミキサーから差動増幅器への信号入力は 50 Ω ターミネーターを介して行った。最後に差動増幅器の出力をオシロスコープで測定した。

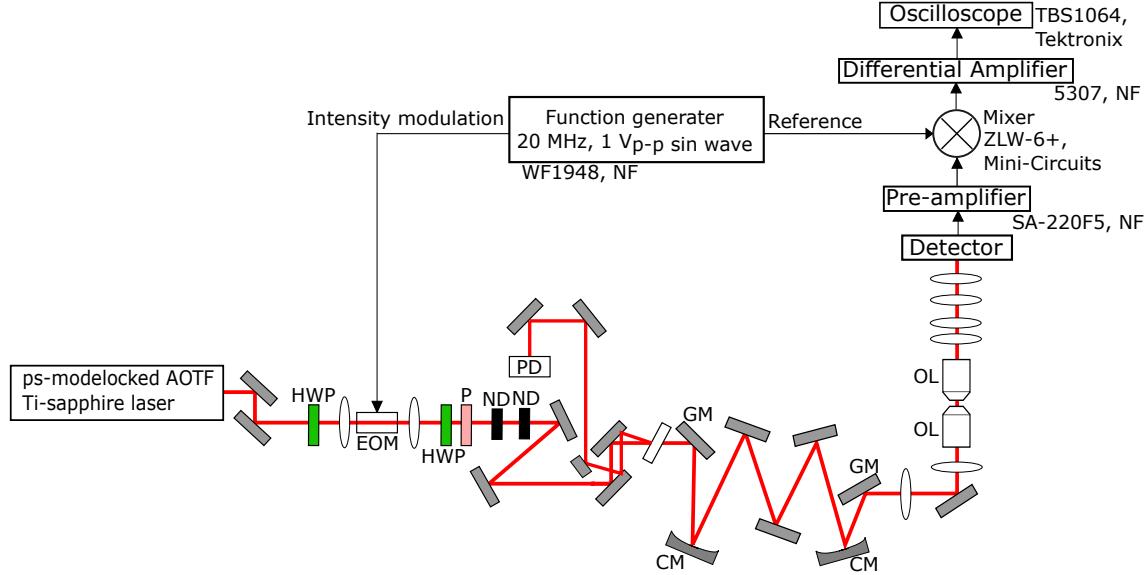


図 7: 検出器動作確認に用いた光学系

HWP: Half wave plate、P: Polarizer、ND: ND filter、BS: Beam sampler,
GM: Galvanometric mirror、CM: Concave mirror、OL: Objective lens

検出器故障の原因を調べる際には、図 5 に示すフォトダイオードを電圧源に置き換え、電気信号を入力し、出力を確認した。入力にはファンクションジェネレータ (33600A、KEYSIGHT) を使用し、AC 出力の確認の際は 100 mV_{p-p} の正弦波信号を入力し、DC 出力の確認の際には 100 mV の直流信号を入力した。ここで AC 出力は 19.2-23.6 MHz バンドパスフィルター (SBP-21.4+、Mini-Circuits) を通してオシロスコープで測定した。

3 Results

3.1 温度制御の有効性の評価

観察時の培地の温度が脂肪動員におよぼす影響について検討した。図 8 には、温度制御を行った状態と行っていない状態でそれぞれ脂肪滴のタイムラプス観察を行った結果を示す。図 9 には、観察結果から求めた体積変化率を示す。図 9 より、温度制御の有無に関わらず、脂肪動員誘導剤を与えることで脂肪滴の体積が有意に減少することが確認されたどういう検定使ったのか？有意水準は？。温度制御の有無に関する結論は？

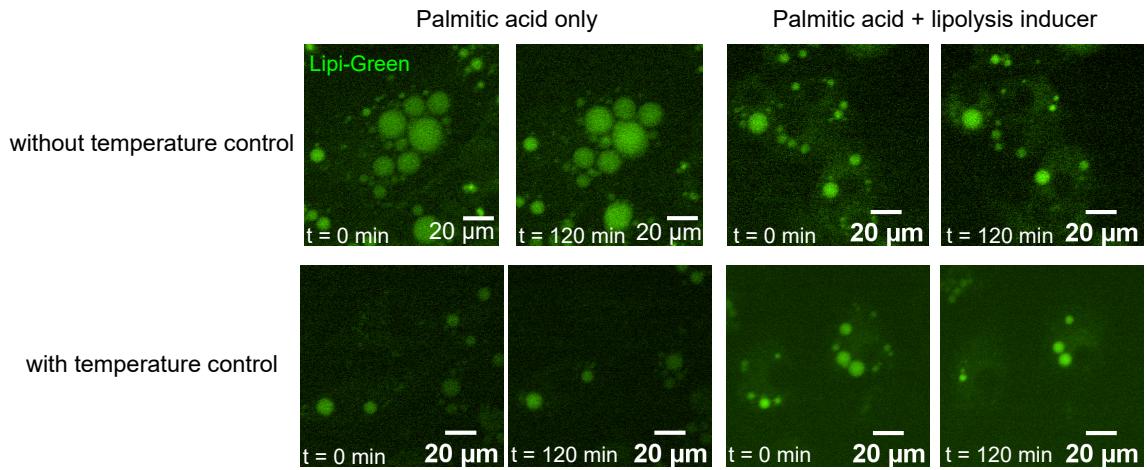


図 8: 温度制御下での脂肪動員の観察結果

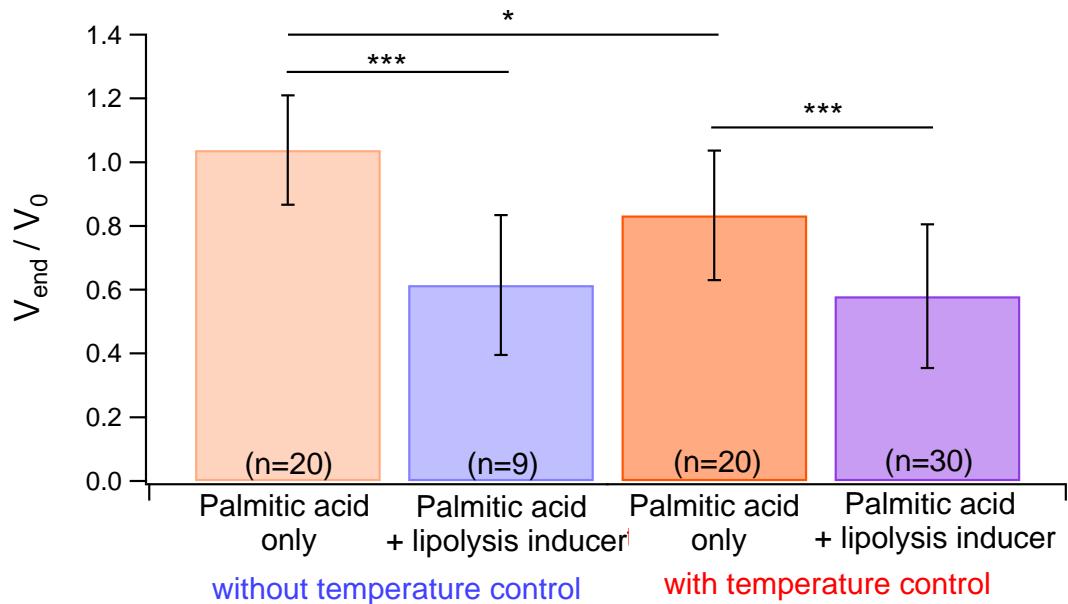


図 9: 温度制御を行った場合と行っていない場合の脂肪滴の体積変化

3.2 アルブミンの有効性の評価

脂肪動員誘導剤に BSA を含む場合 (BSA(+)) と含まない場合 (BSA(-)) について、それぞれ脂肪動員の様子をタイムラプス観察した。観察結果を図 10 に示す。図 10 より、BSA の有無による脂肪滴の体積変化の違いは小さいと考えられる。**なんでアルブミンの有効性を確認する必要があると考えているのかが書かれていない**

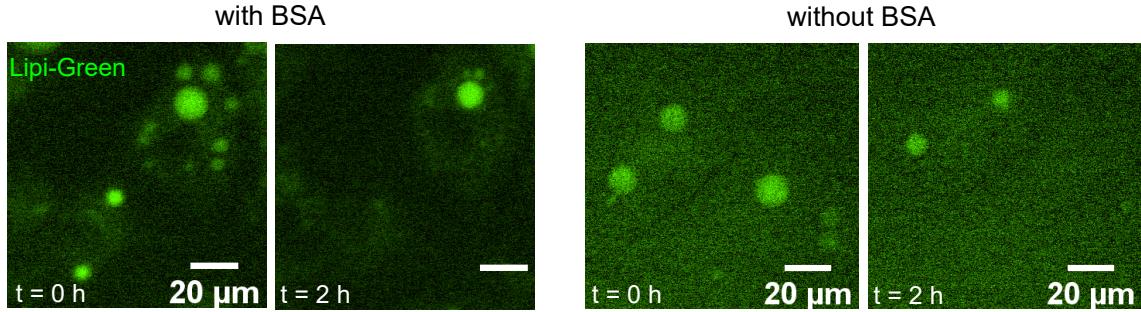


図 10: BSA を与えた場合と与えていない場合の脂肪動員の観察結果

3.3 ATGL 阻害剤による脂肪動員阻害効果の確認

ATGL 阻害剤を与えた場合と与えていない場合でそれぞれ脂肪動員を誘導し、脂肪動員の観察を行った。観察結果を図 11 に示す。図 11 より、ATGL 阻害剤を与えずに脂肪動員を誘導した場合には脂肪滴の体積が顕著に減少するのに対して、ATGL 阻害剤を投与した場合には脂肪滴の体積がほとんど変化していない。この結果から、ATGL 阻害剤によって脂肪動員が阻害されることを確認できた定量的な評価は？。

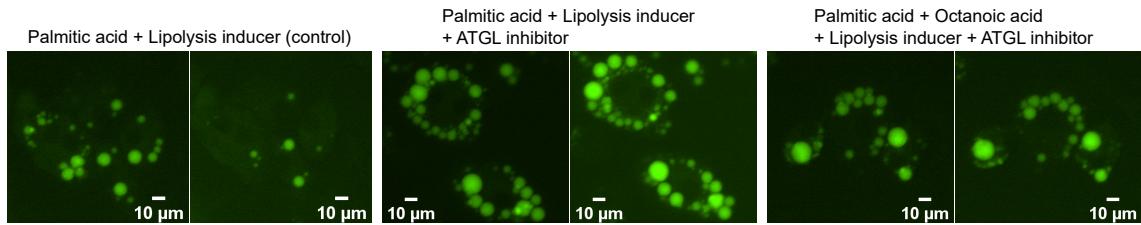


図 11: 脂肪動員誘導剤、ATGL 阻害剤、中鎖脂肪酸を与えた際の脂肪動員の観察結果

3.4 中鎖脂肪酸による脂肪動員促進効果の検証

パルミチン酸とともにオクタン酸をロードした脂肪細胞において、ATGL 阻害下で脂肪動員を誘導した際の脂肪滴の体積変化を観察した。図 11 に観察結果を示す。オクタン酸を与えた場合と与えていない場合で、脂肪滴の体積変化の様子に違いは見られず、いずれも体積がほとんど変化していなかった定量的な評価は？。

3.5 SRS 検出器の動作確認

まず、LED を用いて SRS 検出器の動作確認を行った。図 12 に LED への入力信号の周波数 f_{in} を 10 MHz から 100 MHz まで変化させた際の検出器の AC 出力の測定結果を示す。この結果から、検出器が 20 MHz 付近の信号を特異的に検出し、他の周波数の信号をカットしていることを確認できた。しかしながら、 $f_{in} = 20\text{MHz}$ のときよりも $f_{in} = 21\text{MHz}$ のときの方が出力が大きくなっていた。

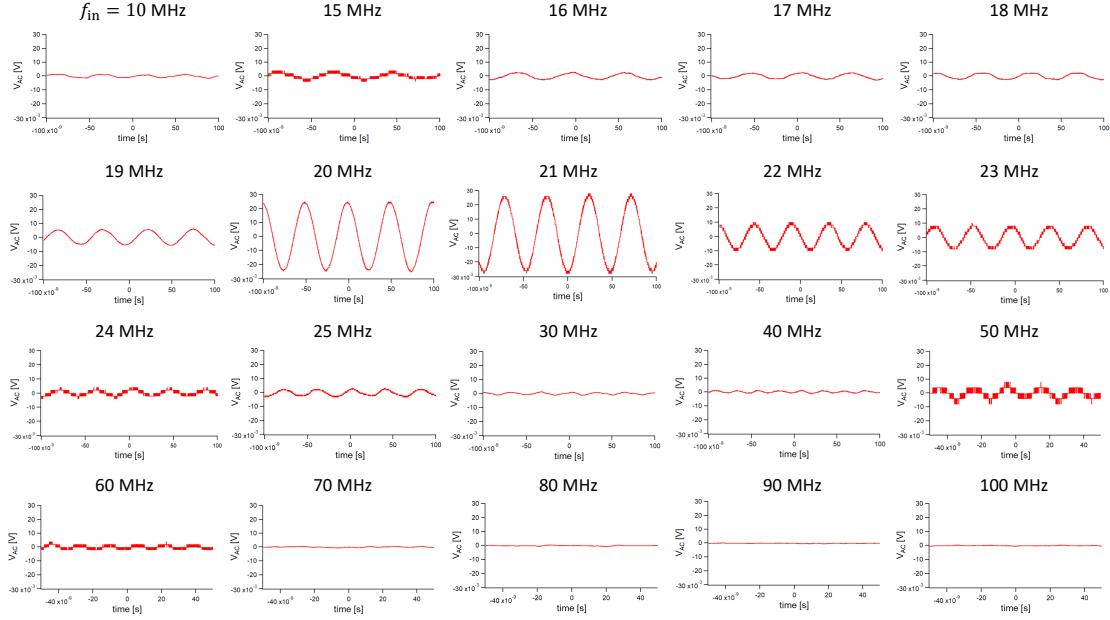


図 12: SRS 検出器に LED 光を入力した際の AC 出力測定結果

図 13 には検出器にレーザー光を入力した際の AC 出力の測定結果を示す。図 13 左のグラフは入射した変調光の波形を示す。中央と右のグラフはそれぞれ、ND10、ND03 のフィルターを用いて検出器前での変調光のパワーを調整した際の AC 出力測定結果を示す。図 13 より、検出器によるレーザー光の検出は確認できなかった。

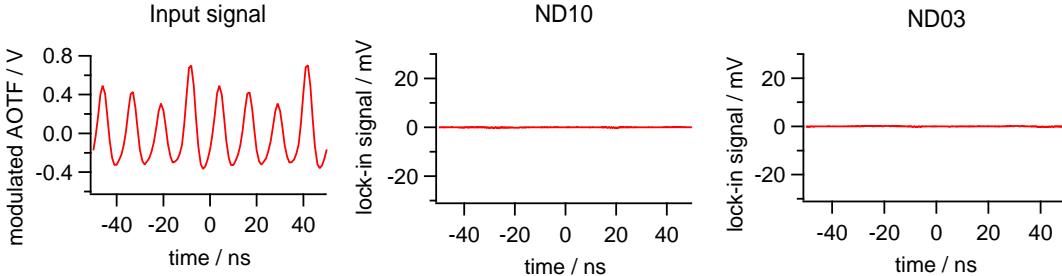


図 13: SRS 検出器にレーザー光を入力した際の AC 出力測定結果

検出器のフォトダイオードを取り外し、電気信号を入力し、AC 出力を測定した結果を図 14 に示す。図 14 より、 $f_{in} = 20 \text{ MHz}$ の時に検出器の出力が最大となっており、検出した周波数帯域は約 10 MHz であった。
帯域はどうやって計算したのですか？

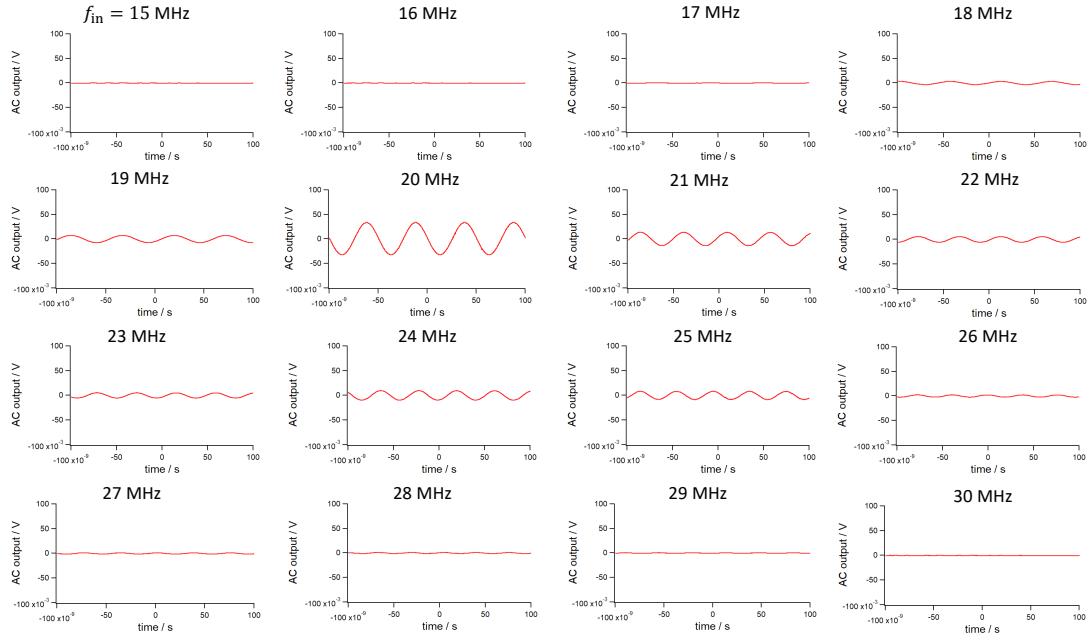


図 14: SRS 検出器に電気信号を入力した際の AC 出力測定結果

4 Discussion

脂肪動員の蛍光タイムラプス観察の結果より、脂肪動員誘導剤による脂肪動員誘導効果および ATGL 阻害剤による脂肪動員阻害効果が確認された。観察時に培地の温度制御を行った結果より、脂肪動員の様子を 2 時間観察するうえで、培地の温度の変化が脂肪動員におよぼす影響は少ないと考えられる。また、誘導剤にアルブミンを添加した場合の観察結果より、アルブミンの添加による脂肪動員誘導効果の変化も小さいと考えられる。ATGL 阻害剤を与えて脂肪動員を誘導した結果より、ATGL 阻害剤による脂肪動員阻害効果を確認した。したがって、本レポートで示した条件で ATGL 阻害による脂肪動員阻害、すなわち TGCV の模擬が可能であると考えられる。一方で、中鎖脂肪酸による脂肪動員促進効果を確認することはできなかった。この原因としては、中鎖脂肪酸を与えるタイミングや時間、脂肪酸の濃度が不適切であったことが考えられる**どのように不適切だと考えているのか？**なお本報告期間では、アルブミン添加による脂肪動員誘導への影響および ATGL 阻害剤による脂肪動員阻害効果、中鎖脂肪酸による脂肪動員促進効果に関して、定量的な評価は行っていない。したがって、脂肪滴の体積変化の算出および解析を行い、それぞれの効果について検討する必要がある。

SRS 検出器の動作確認を行った結果、検出器は変調をかけたレーザー光を検出できなかった。これは入射したレーザー光のパワーが強かったことに起因すると考えられる。検出器のフォトダイオードを取り外し、電気信号を入力して動作確認を行った結果より、検出器の LC バンドパスフィルタ、RLC バンドストップフィルタは正常に動作していると考えられる。このことから、フォトダイオードが破損していたと考える。

5 Conclusion

本報告期間では、脂肪動員のタイムラプス観察および SRS 検出器の動作確認を行った。脂肪動員の観察では、観察時の培地の温度および誘導剤へのアルブミンの添加が観察結果に与える影響が少ないことを示した**影響が少ないけど、温度制御がいい影響を与えるのなら常に温度制御したほうが良いのでは？**また、ATGL 阻害剤によって脂肪動員阻害が十分に行われていることを確認した。しかしながら、中鎖脂肪酸による脂肪動員促進効果は得られなかった。SRS 検出器の動作確認においては、LED 光を用いて、周波数 20 MHz 付近の光を特異的に検出することを確認した。一方で、レーザー光の検出は確認できなかった。

今後は、中鎖脂肪酸による脂肪動員促進効果が得られる条件の検討およびSRS 検出器の修理を行い、SRS 顕微鏡を用いた脂肪動員の観察を目指す。中鎖脂肪酸による脂肪動員促進効果が得られる条件を調べるために、中鎖脂肪酸を与える時間やタイミング、脂肪酸の濃度を変えて様々な条件で脂肪動員の観察を行う予定である。SRS 検出器に関しては、まずフォトダイオードを新たに取り付け、再度動作確認を行い、波損の原因を調べる。その上で、修理を行い、レーザー光を用いて動作確認を行う。検出器の修理が完了し次第、SRS 顕微鏡を用いた脂肪細胞の観察および脂肪動員のタイムラプス観察に着手したい。

参考文献

- [1] Ken-ichi Hirano, Yoshihiko Ikeda, Nobuhiro Zaima, Yasuhiko Sakata, and Goro Matsumiya. Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. *New England Journal of Medicine*, Vol. 359, No. 22, pp. 2396–2398, 2008.
- [2] Ken ichi Hirano, Tatsuya Tanaka, Yoshihiko Ikeda, Satoshi Yamaguchi, Nobuhiro Zaima, Kazuhiro Kobayashi, Akira Suzuki, Yasuhiko Sakata, Yasushi Sakata, Kunihisa Kobayashi, Tatsushi Toda, Norihide Fukushima, Hatsue Ishibashi-Ueda, Daniela Tavian, Hironori Nagasaka, Shu-Ping Hui, Hitoshi Chiba, Yoshiki Sawa, and Masatsugu Hori. Genetic mutations in adipose triglyceride lipase and myocardial up-regulation of peroxisome proliferated activated receptor- γ in patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 443, No. 2, pp. 574–579, 2014.
- [3] Akira Suzuki, Satoshi Yamaguchi, Ming Li, Yasuhiro Hara, Hideyuki Miyauchi, Yoshihiko Ikeda, Bo Zhang, Masahiro Higashi, Yasuyuki Ikeda, Atsuko Takagi, Hironori Nagasaka, Kunihisa Kobayashi, Yasuhiro Magata, Toshiaki Aoyama, and Ken ichi Hirano. Tricaprin rescues myocardial abnormality in a mouse model of triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. *Journal of Oleo Science*, Vol. 67, No. 8, pp. 983–989, 2018.
- [4] Nicole Mayer, Martina Schweiger, Matthias Romauch, Gernot F Grabner, Thomas O Eichmann, Elisabeth Fuchs, Jakov Ivkovic, Christoph Heier, Irina Mrak, Achim Lass, Gerald Höfler, Christian Fledelius, Rudolf Zechner, Robert Zimmermann, and Rolf Breinbauer. Development of small-molecule inhibitors targeting adipose triglyceride lipase. *Nature Chemical Biology*, Vol. 9, pp. 785–787, 2013.
- [5] Takeshi Hashimoto, Hiroki Segawa, Masanari Okuno, Hideaki Kano, Hiro-o Hamaguchi, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Shiho Hasui, Tomohiro Yamaguchi, Fumiko Hirose, and Takashi Osumi. Active involvement of micro-lipid droplets and lipid-droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes. *Journal of Cell Science*, Vol. 125, No. 24, pp. 6127–6136, 12 2012.