

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22126012

研究課題名（和文）脂肪蓄積による臓器機能破綻の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular Basis and Disorders of Control of Appetite and Fat Accumulation

研究代表者

細田 公則（HOSODA, KIMINORI）

京都大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：40271598

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 115,900,000 円

研究成果の概要（和文）：レプチン受容体遺伝子欠損肥満ラット膵臓で中性脂肪蓄積の増加と、GPR40遺伝子発現の低下を明らかにした。GPR40遺伝子欠損ラットを作製し、その糖脂質代謝異常を現在、解析中である。新たなレプチン研究の動物モデルとして、レプチン遺伝子欠損ラットの作製に成功した。ヒトiPS細胞からの脂肪細胞分化誘導系を世界に先駆けて、確立し、ヒト脂肪萎縮症で疾患特異的iPS細胞を確立し、その成因解明と病態解明の為のなツールを確立にした。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that the increase of triglyceride accumulation and the decrease of GPR40 gene expression in the pancreas of genetically obese rats deficient in leptin receptor gene. We created GPR40 KO rat and now investigate the abnormalities in glucose and lipid metabolism. We established leptin gene deficient rats as a new genetically obese animal model. We succeeded in differentiation of human iPS cells into adipocyte for the first time in the world. We also established iPS cell lines from congenital lipodystrophy patients, and established a tool for the elucidation of pathogenesis and pathophysiology.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：GPR40 脂質異常症 インスリン抵抗性 GPCR インスリン分泌

1. 研究開始当初の背景

肥満に伴う合併症、メタボリック症候群、糖尿病などにおいて異所性脂肪蓄積に伴う臓器機能障害(脂肪毒性)の分子機構の解明、治療法の開発は遅れている。細田はレプチン系の分子機構の解明と臨床応用、脂肪細胞治療法の開発の研究を行っており、京大病院探索医療センター「レプチン脂肪細胞プロジェクト」のリーダーとして脂肪萎縮症、糖尿病、肥満症に対するレプチンと脂肪細胞治療の臨床応用を研究している。従来、異所性脂肪蓄積は主に膵臓、肝臓、骨格筋などの代謝臓器で研究されてきたが、代謝臓器以外の臓器における異所性脂肪蓄積の意義は明らかではない。連携研究者の森は腎臓における異所性脂肪蓄積、及び脂肪毒性としての蛋白尿を来す動物モデルを既に2種類作製している。

糖尿病はインスリン分泌障害とインスリン抵抗性から成るインスリン作用不足により発症し、特にインスリン分泌障害が発症の誘因となる。インスリン分泌障害の成因として膵細胞の異所性脂肪蓄積、インスリン抵抗性の成因としてインスリン作用臓器の肝臓、骨格筋などにおける異所性脂肪蓄積が注目される。細田は膵細胞のmassと機能の研究で実績を挙げ、特にヒトインスリン分泌障害における細胞のG蛋白共役型受容体(GPCR)の発現低下を指摘し、GPCRを介した治療法の可能性を研究してきた。

2. 研究の目的

細田はレプチン系及び脂肪細胞の異所性脂肪蓄積調節への関与を指摘しており、本研究はそれを解明し、治療法の開発を目指す。

本研究ではGPCRを手掛かりに膵の脂肪毒性によりインスリン分泌障害が生じる分子機構の全貌を解明し、その治療法の開発を目指す。本研究では腎臓における異所性脂肪蓄積の調節、その脂肪毒性を解明する。

レプチン、脂肪細胞による異所性脂肪蓄積調節に関して本領域で新規に同定される因子との関連の解明(寒川、児島)、臓器間神経ネットワークの意義(片桐)、エネルギー感受機構と食餌嗜好性調節機構の意義(箕越)、摂食調節ニューロンの意義(塩田)、アディポサイトカインの意義(山内)、内臓脂肪の意義(船橋)、中枢-末梢間エネルギー代謝ペプチドの意義(中里)、異所性脂肪蓄積による脂肪毒性における転写調節機構の解明(小川)、異所性脂肪蓄積が視床下部血液脳血管関門と神経情報伝達機構に及ぼす意義の解明(清水)、インスリン分泌調節に関与し、異所性脂肪蓄積における機能低下の可能性があるGPR40とGPR119について内因性リガンドの探索の検討(寒川、児島)などの点から、領域内で連携して研究を進める。

3. 研究の方法

本研究の計画の第一は、異所性脂肪蓄積の

調節におけるレプチン及び脂肪細胞の意義の解明と治療法の開発である。新規の異所性脂肪蓄積及び脂肪毒性のモデルとしてレプチン遺伝子欠損ob/obラットを開発し、解析する。ラットはマウスより大型で詳細な実験が可能であること、及び代謝に關与する分子の組織分布がマウスよりヒトに近いことなどの長所がある。ob/obラットへレプチン持続皮下投与を行い、異所性脂肪蓄積と脂肪毒性に対するレプチンの慢性作用を検討する。異所性脂肪蓄積を伴う高脂肪食肥満ラットに対してレプチン抵抗性改善薬のアミリンの単独投与やレプチン・アミリン共投与を行い、異所性脂肪蓄積改善作用を解析する。将来的な臨床応用の可能性を考えて、ヒトiPS細胞由来脂肪細胞に着目して、脂肪萎縮症ヌードマウスへ移植し異所性脂肪蓄積と脂肪毒性に対する改善作用を解明する。2種類の腎異所性脂肪蓄積モデルを開発し、腎での脂肪蓄積の局在を解析し、腎機能障害を検討する。ヒト肥満者の腎生検所見と対比し、腎異所性脂肪蓄積モデルマウスの臨床的意義を解明する。レプチン持続皮下投与を行い、腎異所性脂肪蓄積と脂肪毒性の改善作用を評価する。

本研究の計画の第二は、膵ラ氏島及び腎臓における異所性脂肪蓄積に伴う機能障害の分子機構の解明、及びそれに基づく治療法の開発である。遺伝性肥満コレツキーラットを用いて、膵異所性脂肪蓄積、及び脂肪毒性としてのインスリン分泌障害を解析し、グルコース応答性インスリン分泌の増強に關与する膵細胞のGPCRを手掛かりに、分泌障害を引き起こす分子機構の全貌を解明する。遺伝性肥満コレツキーラットの異所性脂肪蓄積のある膵ラ氏島、摂取カロリー制限により異所性脂肪蓄積が改善した膵ラ氏島、コレツキーラットの対照ラットの膵ラ氏島の遺伝子発現プロファイルと比較し、またob/obラットでも膵異所性脂肪蓄積、インスリン分泌障害、遺伝子発現プロファイルを検討し、レプチン治療による改善について解析し、膵異所性脂肪蓄積がインスリン分泌障害を来す分子機構を解明する。

4. 研究成果

既にGPR40のヒト膵β細胞での高発現(Biochem Biophys Res Commun 338:1788-1790, 2005)およびヒトでのインスリン分泌調節への関与の可能性を報告してきた(Diabetologia 49:962-968, 2006)。しかし、GPR40の膵外作用については不明な点が多く、その生理的な意義はほとんど分かっていない。最近、研究代表者らは、不明な点の多いGPR40の生理的意義の解明を目的として、従来作成の難しかったラットにおいて新規手法にてGPR40KO動物を作成した。GPR40はインスリン分泌増強に關与することから、GPR40KOラットはインスリン分泌不全モデルとなることが予

想され、実際にその通りであった(投稿準備中)。一方、GPR40KO ラットは非肥満でありながら、大変意外なことに、高週齢でインスリン抵抗性・脂質異常症を示した。現在、GPR40-BAC トランスジェニックラットを作成して、過剰発現での表現型をGPR40KO ラットと比較して、研究を継続中である。本研究で GPR40 の脂質代謝異常改善のメカニズムの詳細が明らかとなることで、脂質異常症の新規治療薬の開発に繋がることが予測される。GPR40 は G 蛋白共役型受容体 (GPCR) としては比較的小さい Class A グループに属し、経口可能なアゴニストの開発が容易であるとされている。実際、先行していた GPR40 アゴニストの fasiglifam は経口可能である。本研究の成果から、脂質異常症でこれまで全くなかった新規の内服薬の開発が容易となる事が期待される。

ヒト iPS 細胞からの脂肪細胞分化誘導系を世界に先駆けて、確立し、この系を用いて、ヒト脂肪萎縮症で疾患特異的 iPS 細胞を確立し、その成因解明と病態解明の為に貴重なツールの確立に貢献した。

脂肪萎縮症、健常人において、レプチン投与前、レプチン投与後において、脳 fMRI 解析を行い、脂肪萎縮症において脳内報酬系において神経活動が亢進し、レプチン投与により亢進が改善する事を明らかにした。更に高脂肪食に対する Conditioned Place Preference (CPP) test で高脂肪食に対する依存性が、レプチン欠損 ob/ob マウスで亢進していて、レプチン投与により改善する事を見いだした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 20 件)

T. Tomita, K. Hosoda(5人中2番目), The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism, *Front Endocrinol (Lausanne)*.2014, 5:152 1-3, 査読有, 10.3389/fendo.2014.00152

T. Sakai, K. Hosoda(15人中13番目), Leptin restores the insulinotropic effect of exenatide in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and high-fat diet, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014, 307 E712-9, 査読有, 10.1152/ajpendo.00272.2014

J. Fujikura, K. Hosoda, K. Nakao, Cell transplantation therapy for diabetes mellitus: endocrine pancreas and adipocyte, *Endocr J.* 2013, 60(6)697-708, 査読有, <http://doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0162>

M. Aizawa-Abe, K. Hosoda(14人中12番目), Generation of leptin-deficient Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin-responsive genes in the liver, *Physiol Genomics.* 2013, 45(17) 786-93, 査読有, 10.1152/physiolgenomics.00040.2013

S. H. Chew, K. Hosoda(13人中10番目), Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. *Carcinogenesis*, 2013 35(1) 164-172, 査読有, 10.1093/carcin/bgt267

M. Noguchi, K. Hosoda(13人中2番目), In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 2013, 22(21) 2895-2905, 査読有, 10.1089/scd.2013.0113

M. Ida, K. Hosoda(10人中9番目), Early Changes of Abdominal Adiposity Detected with Weekly Dual Bioelectrical Impedance Analysis During Calorie Restriction. *Obesity*, 2013, 21(9) E350-E353, 査読有, 10.1002/oby.20300

N. Yamada-Goto, K. Hosoda (12人中11番目), Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice. *Diabetes*, 2013, 62(5) 1500-1504, 査読有, 10.2337/db12-0718

T. Kuwabara, *K. Mori(15人中2番目) Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. *Diabetologia*. 55(8):2256-66, 2012, 査読有, 10.1007/s00125-012-2578-1

J. Fujikura, K. Hosoda(13人中12番目) Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia*. 55(6):1689-98, 2012, 査読有, 10.1007/s00125-012-2508-2

L. Miyamoto, K. Hosoda(12人中11番目) Leptin activates hepatic 5' AMP-Activated Protein Kinase through sympathetic nervous system and α 1 adrenergic receptor: A potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin. *J Biol Chem.* 287(48):40441-7, 2012, 査読有, 10.1074/jbc.M112.384545

D. Aotani, K. Hosoda(13人中11番目) Functional magnetic resonance

imaging analysis of food-related brain activity in patients with lipodystrophy undergoing leptin-replacement therapy. **J Clin Endocrinol Metab.** 97(10):3663-71,2012, 査読有, 10.1210/jc.2012-1872

N. Yamada-Goto, K. Hosoda(7人中6番目) Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice. **Journal of Neuroendocrinology** 24(8):1120-5, 2012, 査読有, 10.1111/j.1365-2826.2012.02327.x.

T. Kusakabe, K. Hosoda(11人中10番目) Amylin improves the effect of leptin on insulin sensitivity in leptin-resistant diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**15:302(8):E924-31, 2012, 査読有, 10.1152/ajpendo.00198.2011

M. Bando, K. Hosoda(10人中6番目) Transgenic overexpression of intraislet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**302(4):E403-8, 2012, 査読有, 10.1152/ajpendo.00341.2011

S. Odori, *K. Hosoda(12人中2番目) GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors : evidence for its islet-gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function. **Metabolism.** 62(1):70-8, 2012, 査読有, 10.1016/j.metabol.2012.06.010

YM. Nakao, K. Hosoda(11人中9番目) Intra-abdominal fat area is a predictor for new onset of individual components of metabolic syndrome: METabolic syndRome and abdominal ObesiTy(MERLOT study). **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.** 88(8):454-61, 2012, 査読有, 10.2183/pjab.88.454

M. Naito, K. Hosoda(11人中10番目), Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice. **Diabetes** 60(9):2265-73, 2011, 査読有, 10.2337/db10-1795

H. Iwakura, K. Hosoda(8人中5番目) Oxytocin and Dopamine Stimulate Ghrelin Secretion by the Ghrelin-Producing Cell Line, MGN3-1 in Vitro. **Endocrinology.** 152 (7): 2619-2625, 2011, 査読有, 10.1210/en.2010-1455

N. Yamada, K. Hosoda(7人中6番目) Impaired CNS leptin action is

implicated in depression associated with obesity. **Endocrinology.** 152(7), 2634-2643, 2011, 査読有, 10.1210/en.2011-0004

[学会発表](計18件)

吉良友里 他, 遺伝性肥満モデル mkyo/mkyo ラット腓島での脂質受容体 GPR40 の遺伝子発現調節, 第89回日本内分泌学会学術総会, 2016年04月21日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

吉良友里 他, 新規の遺伝性肥満モデル mkyo/mkyo ラット腓島における脂肪酸受容体 GPR40 の遺伝子発現調節, 第36回日本肥満学会, 2015年10月02日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

吉良友里 他, 新規の遺伝性肥満モデル mkyo/mkyo ラット腓島における脂質受容体の GPR40 の遺伝子発現調節, 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015年05月23日, 海峡メッセ下関(山口県下関市)

畠田努 他, GPR40 の分子構造および GPR40 作動薬, 第12回GPCR研究会, 2015年05月15日, 日本科学未来館(東京都江東区)

畠田努 他, GPR40 の遺伝子肥満・耐糖能異常モデル Koletsky ラット腓島における発現調節の検討, 第88回日本内分泌学会学術総会, 2015年04月23日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

畠田努 他, GPR40 の遺伝性肥満・耐糖能異常モデル Koletsky ラット腓島における発現調節の検討, 第35回日本肥満学会, 2014年10月24日, シーガイアコンベンションセンター(宮崎市)

畠田努 他, G 蛋白共役型-脂肪酸受容体 GPR40 の肥満糖尿病における発現調節と意義, 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014年05月23日, 大阪国際会議場(大阪市)

D. Aotani, et al, The Role of Neuromedin U in Glucose Homeostasis, OBESITY 2013 31th Annual Scientific Meeting of The Obesity Society, 2013年11月15日, Atlanta, Georgia(USA)

H. Nomura, et al, Leptin Transgenic Mice on Short-Term High Fat Diet Show Leptin Resistance without Obesity, OBESITY 2013 31th Annual Scientific Meeting of The Obesity Society, 2013年11月15日, Atlanta, Georgia(USA)

青谷大介 他, ニューロメジン U のインスリン抵抗性における意義, 第34回日本肥満学会, 2013年10月11日, 東京国際フォーラム(東京都)

野村英生 他, 高脂肪食負荷レプチントランスジェニック(LepTg)マウスにおけるレプチン感受性の検討, 第34回日本肥満学会, 2013年10月11日, 東京国際

フォーラム(東京都)

富田 努 他, 膜型脂質受容体 GPR40 の遺伝性肥満 Koletsky ラット豚島での発現調節とその意義, 第 34 回日本肥満学会, 2013 年 10 月 11 日, 東京国際フォーラム(東京都)

富田 努 他, G 蛋白共役型 - 脂肪酸受容体 GPR40 の糖尿病における発現調節と意義, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 05 月 16 日, テトリア熊本ビル(熊本県熊本市)

青谷 大介 他, 部分性脂肪萎縮症に対するレプチン補充療法の有効性, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 05 月 18 日, ホテル日航熊本(熊本県熊本市)

富田 努 他, 膜型脂質受容体 GPR40 の遺伝性肥満 Koletsky ラット豚島での発現調節とその意義, 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013 年 04 月 25 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

富田 努 他, 新規のインスリン分泌促進因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルの発現調節と機能的意義, 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012 年 04 月 19 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

野口 倫生 他, ヒト ips 細胞由来の脂肪細胞の脂肪細胞機能解析と細胞移植, 第 109 回日本内科学会, 2012 年 04 月 14 日, みやこめっせ(京都府京都市)

富田 努 他, 新規のインスリン分泌調節因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルでの発現調節, 第 84 回日本内分泌学会学術総会, 2011 年 4 月 21 日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: Mitochondrial Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells, Method of Producing Same and Use Thereof

発明者: 中尾一和, 藤倉純二, 細田公則, 曾根正勝, 中尾一泰

権利者: 同上

種類: 特許

番号: No.61/503,283

出願年月日: 2011 年 06 月 30 日

国内外の別: 外国

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/jpn/appetite-fat/plan/index.html>

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/index-jp.html>

<http://www.ncvc.go.jp/hospital/section/ld/endocrinology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 公則 (HOSODA, Kiminori)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 40271598

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

森 潔 (MORI, Kiyoshi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 60343232

富田 努 (TOMITA, Tsutomu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 50402897