

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（S）
 研究期間：2004～2008
 課題番号：16109007
 研究課題名（和文） 脂肪内分泌代謝学を基盤としたメタボリック症候群のトランスレーショナルリサーチ
 研究課題名（英文） Translational research and development of novel diagnostic/therapeutic modalities for metabolic syndrome based on adipocyte endocrinology and adiposcience
 研究代表者
 中尾 一和（NAKAO KAZUWA）
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号：00172263

研究成果の概要：

脂肪萎縮症はメタボリック症候群の病態解明や新規治療法開発の足掛りとなる貴重なモデル疾患である。我々は脂肪萎縮症を対象とするレプチン補充療法の長期安全性と有用性を証明した。更に新しいマウス実験モデルを確立し、インスリン分泌不全・インスリン抵抗性・肥満を伴う2型糖尿病に対するレプチンの治療的有用性を実証した。または骨格筋 AMPK 活性を指標として用いることにより、レプチン抵抗性の分子メカニズムにおける視床下部メラノコルチン系の意義を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	36,900,000	11,070,000	47,970,000
2005年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2006年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2007年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2008年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
総計	88,000,000	26,400,000	114,400,000

研究分野：医薬歯学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：メタボリック症候群・脂肪細胞・トランスレーショナルリサーチ・レプチン・遺伝子操作マウス

1. 研究開始当初の背景

肥満を中心として糖尿病、高血圧症、高脂血症、脂肪肝などが重積する“メタボリック症候群”は心筋梗塞や脳卒中に代表される致死的心血管病発症の高リスク群である。メタボリック症候群は個々の疾患が偶然に合併した状態ではなく、病態を形成する共通の分子基盤が存在すると考えられる。従来、エネルギー貯蔵器官としてのみ位置付けられてきた脂肪細胞がホルモンやサイトカイン（アディポサイトカイン）を分泌してエネルギー代謝調節や循環器系調節に関与すること、脂

肪組織が生体内最大の内分泌臓器であることが明らかになり、生理作用の解明、内分泌代謝学的な分子基盤の研究、その成果を踏まえた臨床応用の展開や脂肪細胞関連臨床医学と呼ばれる展開医療の実践は21世紀における臨床研究の最重要課題の一つである。研究代表者らは20年間にわたり、メタボリック症候群の成因、病態に関して心血管内分泌代謝学と脂肪内分泌代謝学の観点から独創的且つ先駆的研究を推進してきた。心血管内分泌代謝学領域では、心臓血管ホルモンの prototype である ANP、BNP の臨床診断への応

用と心不全治療薬としてのトランスレシ
ョナルリサーチに成功してきた。また、脂肪
内分泌代謝学領域では脂肪細胞ホルモンの
prototype と位置づけされるレプチンのト
ランスレシショナルリサーチを展開してレプ
チンの臨床的意義を明らかにし、レプチンの
作用不全（レプチン抵抗性）の分子機構解明
の必要性を指摘してきた。レプチン過剰発現
トランスジェニックスキニーマウスを開発
することに世界で最初に成功し、肥満に伴う
糖・脂質代謝異常、高血圧、性腺機能異常に
おけるレプチンの病態生理学的意義を世界
に先駆けて報告した (*Nat Genet* 14: 130,
1996; *Nat Med* 3: 1029, 1997; *Diabetes* 48:
1822, 1999; *Diabetes* 48: 1615, 1999;
Diabetes 50: 1440, 2001; *J Clin Invest* 105:
1243, 2000; *J Clin Invest* 105: 749, 2000)。
2001年、研究代表者らは京都大学附属病
院において、全身の脂肪組織の消失と重度の
インスリン抵抗性、高脂血症、脂肪肝を伴い、
未だ有効な治療方法が確立していない脂肪
萎縮症（脂肪ディストロフィー）の患者に対
してレプチンを補充投与する展開医療を申
請し、2002年より我が国で唯一の臨床研
究機関として臨床応用を実践し、安全性が高
く極めて優れた治療効果を報告してきた。更
に、インスリン依存性糖尿病や2型糖尿病モ
デルマウスでの有効性 (*Diabetes* 48: 1615,
1999; *Diabetes* 46: 1329, 2003)、糖尿病性
腎症への有効性 (*FASEB J* 19: 127-129, 2005)
も確認している。これらの成績はレプチンが
メタボリック症候群に対する有用な治療薬
となる可能性を示すものである。

2. 研究の目的

本研究ではこの知見を更に発展させるた
めに、レプチンによる代謝改善の分子機構、
視床下部を中心にレプチンのシグナル伝達機
構とレプチン抵抗性の分子メカニズムを解
明し、メタボリック症候群を標的としたレ
プチンによるトランスレシショナルメディ
ンを展開する。更にレプチン感受性増強剤、
視床下部におけるレプチンシグナリングを
担うメラノコルチン4型受容体アゴニスト
など、レプチン情報伝達系をベースとした
レプチン関連メタボリック症候群治療薬の
開発に直結する基盤研究を推進していく。更
に、分担研究者の益崎はハーバード大学留
学中にメタボリック症候群のもうひとつの
脂肪内分泌代謝学の分子基盤として、脂肪
細胞におけるグルココルチコイド（アディ
ポステロイド）活性化機構の重要性を明ら
かにしてきた (*Science* 294: 2166, 2001; *J Clin Invest*
112: 83, 2003)。帰国後は研究代表者と共
に、この分子機構を解明する新規遺伝子操
作動物モデルの開発や新しい臨床検査法の開
発を試み、メタボリック症候群の分子基盤と

ての意義を検討すると共に、グルココルチ
コイド活性化不全に基づくクッシング徴候の
全く欠如した副腎腺腫症例を発見して、本
活性化機構の臨床的意義に関するトランス
レシショナルリサーチを展開している。本
プロジェクトでは、メタボリック症候群病態
におけるグルココルチコイド活性化の機能
異常に注目し、メタボリック症候群の病態
や血管病リスク評価に有用な新しい診断マ
ーカーや診断方法の開発や脂肪細胞機能関
連遺伝子の解析によるメタボリック症候群
の遺伝的背景の解明を目指し、細胞内グル
ココルチコイド活性化酵素を標的とした関
連薬剤の開発を目指した基盤研究を推進す
る。本研究では更に、レプチンシステムと
グルココルチコイド活性化機構との機能
的関連 (*J Clin Endocrinol Metab* 82: 2542,
1997) を明らかにすることにより、当該分
野のトランスレシショナルリサーチの更なる
発展を目指す。本研究実施にあたっては、
国際的に高い評価を受けたレプチン過剰
発現トランスジェニックマウスやメタボリ
ック症候群モデルマウスを開発と解析の
豊富な実績、レプチンを用いた我が国唯
一のトランスレシショナルメディンの実
施実績が大きなアドヴァンテージとなる。

3. 研究の方法

- (1) 症例を対象としたレプチンの臨床試験
- (2) 脂肪萎縮症を対象としたレプチンのト
ランスレシショナルリサーチ
- (3) 脂肪萎縮症におけるレプチンによる糖
脂質代謝改善作用のメカニズムの解明 -脂
肪萎縮性糖尿病モデル動物、A-ZIP トラン
スジェニックマウスにおける肝 AMPK 情報伝
達系の異常とレプチン投与による肝 AMPK の
活性化-
- (4) メタボリックシンドロームに対するレ
プチンのトランスレシショナルリサーチ -
低用量ストレプトゾトシン/高脂肪食負
荷マウスを用いた2型糖尿病におけるレプ
チンの治療薬としての有用性に関する検
討
- (5) 培養細胞を用いたアドレノメデュリン
および11 β -HSD1の脂肪細胞機能にお
ける意義の検討

4. 研究成果

- (1) 脂肪萎縮症を対象としたレプチンのト
ランスレシショナルリサーチ
脂肪萎縮症は体脂肪量の減少に伴い強い
インスリン抵抗性が出現し、高血糖や高
インスリン血症、高中性脂肪血症、脂肪
肝などの代謝異常を呈する難治性疾患で
あるが、未だ有効な治療法も確立して
いない。我々は脂肪萎縮症モデルマウ
スを用いて、脂肪萎縮症ではレプチン
欠乏がインスリン抵抗性の主因であり、
レプチン補充治療が著効

することを明らかにした (*Diabetes* 50: 1440-1448, 2001)。さらに、我が国で初めて脂肪萎縮症患者にレプチン補充治療を実施し、糖尿病、高中性脂肪血症、脂肪肝などに対する劇的改善効果を証明した (*N Engl J Med* 351: 615-616, 2004)。これまでに10例の全身性脂肪萎縮症に対しレプチン治療を施行し、いずれの症例においてもインスリン感受性の改善を伴う糖、脂質代謝の改善が認められ、インスリン標的臓器である肝臓および骨格筋における脂質含量の低下が認められた (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 532-541, 2007)。これらの作用は5年以上の長期にわたり安定して認められ、試験期間中にレプチン治療によると考えられる明らかな副作用も認められなかった。以上より、脂肪萎縮症におけるレプチン補充治療の有用性が示された。

(2) 脂肪萎縮症におけるレプチンによる糖脂質代謝改善作用のメカニズムの解明-脂肪萎縮性糖尿病モデル動物、A-ZIP トランスジェニックマウスにおける肝 AMPK 情報伝達系の異常とレプチン投与による肝 AMPK の活性化

AMPK は糖脂質代謝制御における重要な鍵分子であり、レプチンの作用を媒介する可能性も示されている。しかし、レプチンの糖脂質代謝亢進作用における AMPK の意義は未だ不明な点が多い。そこで、レプチン投与により著明な糖脂質代謝の改善が認められる脂肪萎縮性糖尿病に着目し、そのモデル動物、A-ZIP トランスジェニックマウス (AZIP) における解析を実施した。18 時間絶食後の AZIP の肝臓、骨格筋を抱水クロラル麻酔下で迅速に摘出し、AMPK の発現量、酵素活性並びに、AMPK の下流で発現が制御されると考えられている糖脂質代謝に関連する分子の遺伝子発現量を野生型 (WT) と比較検討した。その結果、①AZIP の骨格筋における AMPK 発現量は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ いずれも WT と差がなく、活性にも大きな差が認められなかった。②AZIP の肝臓において AMPK $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ の発現量の増大が認められたが、活性は WT に比べ低下していた。③AZIP の肝 AMPK 活性の低下と相応し、PPAR α 等の脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現の低下と、PGC1 α 等の糖新生に関わる遺伝子発現の上昇が認められた。さらに、④レプチン投与により、肝 AMPK の活性化とそれに相応する糖脂質代謝関連遺伝子の発現量変化が認められた。以上より、脂肪萎縮性糖尿病における糖脂質代謝異常に肝 AMPK 情報伝達系の異常が関与し、レプチンによる肝 AMPK 情報伝達系の活性化が糖脂質代謝亢進作用に関与する可能性が示唆された (投稿準備中)。

(3) メタボリックシンドロームに対するレ

プチンのトランスレショナルリサーチ-低用量ストレプトゾトシン/高脂肪食負荷マウスを用いた2型糖尿病におけるレプチンの治療薬としての有用性に関する検討
これまでに我々は脂肪萎縮性糖尿病やインスリン分泌低下型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての有用性を報告してきた。本研究では、2型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての可能性について検討した。

8 週齢 C57BL/6J 雄性マウスにストレプトゾトシンと高脂肪食を負荷して 2 型糖尿病モデルマウス (STZ/HFD マウス) を作製し、レプチンの治療効果を検討した。STZ/HFD マウスでは、体脂肪量の増加、インスリン抵抗性およびインスリン分泌低下を伴う高血糖、脂質代謝異常、肝臓および骨格筋中性脂肪含量の増加が認められた。2 週間のレプチン持続皮下投与 (20ng/g/hr) により、STZ/HFD マウスにおいて摂食抑制、約 5% の体重減少、インスリン感受性の改善を伴う血糖値の低下 ($487 \pm 21 \text{mg/dl}$ vs. $327 \pm 24 \text{mg/dl}$ 、 $P < 0.01$) が認められた。また血中中性脂肪、遊離脂肪酸濃度は正常マウスと同等レベルにまで改善し、総コレステロール濃度の有意な低下が認められた。さらに脂肪酸酸化に関わる骨格筋 $\alpha 2$ -AMPK の活性上昇とともに肝臓および骨格筋中性脂肪含量の低下が認められた。今回の投与量で得られた血中レプチン濃度 (30.8ng/ml) は、レプチンの臨床試験においても認められる濃度であることから、今回の検討により、2 型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての可能性が示された (*Diabetologia* 52: 675-683, 2009)。

(4) レプチン抵抗性の分子メカニズムの解明

遺伝子操作モデル動物を用いてレプチン抵抗性の分子メカニズムの解明を進めた。レプチン過剰発現トランスジェニックマウスの骨格筋における AMPK リン酸化 (活性化) が持続的に亢進していること、高脂肪食によって誘導されたレプチン抵抗性に伴い、AMPK 活性化の亢進が完全に遮断されること、さらに通常食への交換によりレプチン抵抗性が解除されると再び AMPK 活性化の亢進が回復することが明らかとなり、骨格筋における AMPK の活性化が中枢神経系におけるレプチン抵抗性の評価系として有用であることが示唆された (*Diabetes* 54: 2365-2374, 2005)。また、マウス側脳室内レプチン投与実験により、視床下部における STAT3 活性化やインスリンシグナル伝達とのクロストークが検出された。長鎖脂肪酸の脳内投与によりレプチン受容体欠損や視床下部メラノコルチン系シグナルが阻害された遺伝性モデルマウスにおいても視床下部 STAT3 の

著明な活性化が生じ、顕著な体重の減少、摂食量の減少がもたらされることが明らかとなり、視床下部摂食シグナル経路におけるレプチン非依存性回路の同定に寄与する治験が得られた。

さらに、肥満におけるレプチンの作用不全（レプチン抵抗性）の分子メカニズムを明らかにする目的で視床下部メラノコルチンシグナルの薬理的活性化が遺伝子操作マウスや遺伝性肥満モデルマウスの骨格筋脂肪酸酸化能に及ぼす効果を解析した。メラノコルチン受容体のアンタゴニスト、アゴニストのマウス脳室内投与がそれぞれ骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化の減弱・亢進を惹起すること、高脂肪食によってレプチン抵抗性を獲得したレプチン過剰発現トランスジェニックマウスに対するメラノコルチン受容体アゴニストの脳室内投与が減弱していた骨格筋 AMPK の再活性化をもたらした。糖脂質代謝を改善することが明らかとなった (*Cell Metab* 5: 395-402, 2007)。メラノコルチンアゴニストがレプチン抵抗性を克服できる可能性を示唆するものであり、肥満を上流に持つメタボリックシンドロームにおけるレプチンの臨床応用が視野に入ってきた。

(5) メタボリックシンドロームの基盤病態としての脂肪細胞機能異常の分子機構の解明

培養脂肪細胞を用いた脂肪細胞分化の転写制御カスケードのメカニズムの解明やアドレノメジュリンの脂肪組織における分泌調節のメカニズムを解明した。また、新規の遺伝子操作マウスの確立（強力な脂肪細胞特異的遺伝子プロモーター支配下に 11β -HSD1 を過剰発現させる新しい遺伝子操作マウス）や 11β -HSD1 遺伝子 antisense-oligonucleotide を用いたメタボリック症候群に対する治療的意義の探索を行うと共に、グルココルチコイド活性化に関するマーカーとメタボリック症候群の病勢、血管病リスク、治療効果との相関性、種々の代謝パラメーターとの関連性を検討した。その結果、種々の炎症性サイトカインが 11β -HSD1 遺伝子発現を著明に増加させること、ヒト脂肪組織バイオプシーによる遺伝子発現プロファイリングにより、肥満者の 11β -HSD1 遺伝子発現が著明に亢進していることを明らかにした。また、メタボリック症候群の表現型と連鎖する 11β -HSD1 遺伝子多型を検索し、新規な多型の発現も含め我が国の遺伝的背景のスクリーニングを終了した。少量の尿試料を検体として全身の細胞内グルココルチコイド活性化を評価する新しい臨床指標の開発を行い、肥満や痩せの病態把握、薬剤介入や原料治療における効果判定に有用である可能性を確認した。

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 7 件)

- ① T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Nakao (12 人中 12 番目) . Beneficial effects of leptin on glycaemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet. *Diabetologia*. 52: 675-683, 2009. 査読有
- ② K. Park, K. Nakao (14 人中 14 番目) . Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. *Endocrinology*. 149: 483-491, 2008. 査読有
- ③ T. Nagae, K. Nakao (16 人中 16 番目) . Adrenomedullin inhibits connective tissue growth factor expression, extracellular signal-regulated kinase activation and renal fibrosis. *Kidney Int*. 74: 70-80, 2008. 査読有
- ④ K. Ebihara, K. Nakao (15 人中 15 番目) . Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 92:532- 541, 2007. 査読有
- ⑤ T. Tanaka, K. Nakao (13 人中 13 番目) . Central melanocortin signaling restores skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab*. 55:395-402, 2007. 査読有
- ⑥ T. Tanaka, K. Nakao (21 人中 21 番目) . Skeletal muscle AMPK phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. *Diabetes*. 54: 2365-2374, 2005. 査読有
- ⑦ K. Ebihara, K. Nakao (3 人中 3 番目) . Efficacy of long-term leptin-replacement therapy for lipoatrophic diabetes in Japan. *N Engl J Med*. 351: 615-616, 2004. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 青谷 大介、肥満を伴った糖尿病モデルマウスにおけるレプチンの治療効果、第 29 回日本肥満学会、2008 年 10 月 17 日-18

- 日、大分
- ② 石井崇子、マクロファージや未分化脂肪細胞における 11β -HSD1 の向炎症的役割と病態的意義、第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008 年 5 月 22 日-24 日、東京
- ③ 髭 秀樹、全身性脂肪萎縮症に対するレプチン補償療法の食欲抑制効果、第 28 回日本肥満学会、2007 年 10 月 19 日-20 日、東京
- ④ 日下部徹、2 型糖尿病におけるレプチンの糖脂質代謝改善作用の検討、第 80 回日本内分泌学会学術総会、2007 年 6 月 14 日-16 日、東京
- ⑤ 田中智洋、レプチン-骨格筋 AMPK システムのメディエーターとしての中樞メラノコルチンシグナル-レプチン抵抗性病態の治療標的としての意義一、第 80 回日本内分泌学会学術総会、2007 年 6 月 14 日-16 日、東京
- ⑥ 宮永史子、レプチンの抗糖尿病作用、第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会、2006 年 5 月 25 日-27 日、東京

〔産業財産権〕

- 取得状況 (計 4 件)
- ① 名称：レプチン測定による疾患のスクリーニング方法
発明者：中尾一和
権利者：同上
種類：測定・試験
番号：2006-140350
出願日：平成 18 年 5 月 19 日
国内外の別：国内
- ② 名称：メタボリックシンドローム予防又は治療薬
発明者：稲田洋一、中野茂、益崎裕章、田中智洋、中尾一和
権利者：同上
種類：医学
番号：2005-303264
出願日：平成 17 年 10 月 18 日
国内外の別：国内
- ③ 名称：霊長類動物胚性幹細胞から発生初期血管内皮細胞の製造方法及びその細胞の使用
発明者：中尾一和、伊藤裕、曾根正勝、山下潤、山原研一、近藤靖、鈴木豊
権利者：同上
種類：医学
番号：2004-184138
出願日：平成 16 年 6 月 22 日
国内外の別：国外
- ④ 名称：内皮細胞分化増殖方法
発明者：中尾一和、伊藤 裕、山下 潤、小林 貴美
権利者：同上

種類：生化学

番号：2004-025631

出願日：平成 16 年 2 月 2 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページなど

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 一和 (NAKAO KAZUWA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：00172263

(2) 研究分担者

① 益崎 裕章 (MASUZAKI HIROAKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00291899

② 荒井 宏司 (ARAI KOUJI)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：00263088

③ 細田 公則 (HOSODA KIMINORI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40271598

④ 海老原 健 (EBIHARA KEN)

京都大学・医学研究科・特任講師

研究者番号：70362514

(3) 連携研究者

なし