

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09844

研究課題名(和文) AAA ATPase、VCPを標的とした新規肥満症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new anti-obesity therapy targeting hypothalamic AAA ATPase, VCP

研究代表者

海老原 健 (Ebihara, Ken)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70362514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部の小胞体(ER)ストレスがレプチン抵抗性の病因として報告されている。ERストレス下ではERストレス応答が促進され、大量のATPが必要となる。ケトン体は中枢神経系のATP濃度を上昇させる。そこで、1,3-ブタンジオール(BD)を用いて血中ケトン体および視床下部ATP濃度を上昇させた時の体重や摂食量、視床下部におけるERストレスやレプチン感受性を高脂肪食負荷マウスやob/obマウスを用いて検討した。その結果、血中ケトン体および視床下部ATP濃度を上昇させる1,3-BDは視床下部におけるERストレスおよびレプチン抵抗性を抑制することにより体重および摂食量を減少させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VCPのATPase活性阻害薬は小胞体(ER)ストレス時のATP不足を抑制し、ERストレスの軽減とレプチン感受性などの細胞機能維持に寄与するものと考えられる。この仮説を立証し、臨床応用に結びつけるために、1,3-ブタンジオール(BD)を用いて血中ケトン体および視床下部ATP濃度を上昇させた時の体重や摂食量、視床下部におけるERストレスやレプチン感受性をマウスで検討した。これまでに、視床下部におけるERストレスとレプチン抵抗性に対するケトン体の効果に関する報告はない。本研究によりケトン体あるいは視床下部ATPを標的とした新しい肥満治療薬の開発と臨床応用が実現する可能性は高い。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) stress in the hypothalamus plays a key role in the pathogenesis of leptin resistance. Since ATP treatment protects cells against ER stress, we investigated the therapeutic effects of oral 1,3-butanediol (BD) administration, which increases plasma 3-hydroxybutyrate and hypothalamic ATP concentrations, in diet induced obese (DIO) mice with leptin resistance. BD treatment effectively decreased food intake and body weight in DIO mice. In contrast, BD treatment had no effect in leptin deficient ob/ob mice. We also demonstrated that BD treatment decreases expressions of ER stress markers and increases phosphorylation of STAT3, a molecule of leptin signaling, in the hypothalamus. This is the first report to confirm the leptin sensitizing effect of BD treatment in leptin resistant DIO mice. The present study provides collateral evidence that the effect of BD treatment is mediated by the elevation of hypothalamic ATP concentration.

研究分野：肥満、糖尿病

キーワード：肥満 レプチン レプチン抵抗性 小胞体ストレス ATP ケトン体 視床下部

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

レプチン抵抗性の分子基盤として視床下部ニューロンにおける ER ストレスの関与が報告されている (*Cell Metab* 9: 35, 2009)。一方、AAA ATPase ファミリーに属する valosin-containing protein (VCP) は細胞内に最も豊富に存在する ATPase 活性を有するタンパク質で、VCP の ATPase 機能獲得型変異が神経変性疾患をもたらすことが知られている。この発症機序として、ER ストレス応答では ATP を消費するため、VCP の ATPase 活性亢進、すなわち ATP 濃度の低下は ER ストレスに繋がり神経変性疾患を発症させるものと考えられる (*Cell Death Differ* 8: 977, 2001)。申請者らのグループはこれまでに VCP の ATPase 活性を阻害する複数の化合物 (KUS 化合物) の合成に成功し (特許番号 2010-172467、発明の名称「ナフタレン誘導体」) KUS 化合物は視床下部ニューロンにおける ER ストレスを抑制することによりレプチン抵抗性を改善し抗肥満作用を発揮するのではないかと仮説を立て、高脂肪食負荷マウスに対する KUS 化合物の投与実験を実施し、KUS 化合物にはレプチン抵抗性改善作用および体重増加抑制作用を有することを明らかにした (特許番号 2014-073256、発明の名称「レプチン抵抗性を改善する医薬組成物」)。これらのことから KUS 化合物による VCP の ATPase 阻害は ER ストレス時の ATP 不足を抑制し、ER ストレスの軽減とレプチン感受性などの細胞機能維持に寄与するものと考えられる。

### 2. 研究の目的

KUS 化合物による VCP の ATPase 阻害は ER ストレス時の ATP 不足を抑制し、ER ストレスの軽減およびレプチン感受性を改善するという仮説を検証する。このために、VCP の ATPase 阻害以外の方法で視床下部 ATP 濃度を上昇させたときに、視床下部での ER ストレスが軽減され、レプチン感受性が改善するかどうかを検討する。

### 3. 研究の方法

ケトン体は中枢神経系の ATP 濃度を上昇させることが実証されている。そこで、ヒドロキシ酪酸の前駆体である 1,3-ブタンジオール (BD) を用いて血中ケトン体および視床下部 ATP 濃度を上昇させた時の体重や摂食量、視床下部における ER ストレスやレプチン感受性を高脂肪食負荷マウスや ob/ob マウスを用いて検討した。

### 4. 研究成果

1,3-BD 100  $\mu$ l の経口単回投与により野生型マウスの血中ケトン体濃度は 1 ~ 3 時間をピークに上昇し、8 時間後には前値に戻ることを確認した。また、視床下部 ATP 濃度は 4 ~ 6 時間をピークに上昇することを確認した。そこで 1,3-BD はマウスに対し 1 日 2 回経口投与することとした。

8 週齢から 8 週間、60%高脂肪食を負荷した 16 週齢の食餌誘導性肥満 (DIO: diet-induced obesity) マウスを 2 群に分け 100  $\mu$ l の水あるいは 1,3-BD の 1 日 2 回経口投与を 8 週間行った。また、対照として 16 週齢の普通食マウスに対して 100  $\mu$ l の水あるいは 1,3-BD の 1 日 2 回経口投与を 8 週間行った。1,3-BD の経口投与により DIO マウスの摂食量および体重は減少し、8 週目には普通食マウスと同程度にまで体重は減少した。一方、普通食マウスにおいては 1,3-BD の経口投与による有意な摂食量および体重の減少は認められなかった。

実験開始前の D10 マウスでは血中レプチン濃度が高値であることから、1,3-BD の摂食量および体重減少作用にはある程度のレプチンが必要である可能性が考えられた。そこで、1,3-BD の摂食量および体重減少作用がレプチン系を介した作用であることを検証するために、遺伝性レプチン欠損マウスである ob/ob マウスを 2 群に分け、1,3-BD の 1 日 2 回経口投与を 150  $\mu$ l の水あるいは 1,3-BD の 1 日 2 回経口投与を実施した。しかし、ob/ob マウスにおいては 1,3-BD の経口投与による有意な摂食量および体重の減少は認められなかった。以上より、1,3-BD はレプチンの作用増強を介して摂食量および体重を減少させているものと考えられた。

そこで次に、1,3-BD のレプチン感受性改善作用を検討するために、8 週齢から 8 週間、60%高脂肪食を負荷した 16 週齢の D10 マウスを 2 群に分け 100  $\mu$ l の水あるいは 1,3-BD の 1 日 2 回経口投与を 3 日間行った。さらにそれぞれの群を 2 群に分け生理食塩水あるいはレプチンの腹腔内単回投与を行い、6 時間および 24 時間の摂食量を検討した。3 日間の 1,3-BD 投与では有意な体重変化は認められなかった。この時、水投与群ではレプチンによる 6 時間および 24 時間の摂食抑制作用は認められず、レプチン抵抗性であることが確認された。一方、1,3-BD 投与群ではレプチンによる摂食抑制作用は 6 時間摂食量では有意ではなかったものの 24 時間摂食量では明らかな減少が認められた。以上より、D10 マウスにおいて 1,3-BD 投与によりレプチン感受性が改善することが示された。

さらに、1,3-BD の視床下部レベルでのレプチン感受性改善作用を検討するために、16 週齢の D10 マウスを 2 群に分け 100  $\mu$ l の水あるいは 1,3-BD の 1 日 2 回経口投与を 3 日間行い、さらにそれぞれの群を 2 群に分け生理食塩水あるいはレプチンの腹腔内単回投与を行い、30 分後に視床下部を採取し、レプチン受容体の下流シグナルであるリン酸化 STAT3 の視床下部における発現を検討した。水投与群ではレプチンによる視床下部 STAT3 のリン酸化の増加は認められず、レプチン抵抗性であることが視床下部レベルでも確認された。一方、1,3-BD 投与群ではレプチンによる視床下部 STAT3 のリン酸化の増加が認められ、1,3-BD 投与によりレプチン感受性が改善することを視床下部レベルでも確認した。

最後に、1,3-BD が視床下部での ER ストレスを抑制するかどうかを検討するために、16 週齢の D10 マウスを 2 群に分け 100  $\mu$ l の水あるいは 1,3-BD の 1 日 2 回経口投与を 3 日間行った。また、対照として普通食マウスに 100  $\mu$ l の水 1 日 2 回経口投与を 3 日間行った。最終日に視床下部を採取し、ER ストレスマーカーである CHOP やリン酸化 PERK の視床下部における発現を検討した。普通食マウスと比較し、D10 マウス水投与群では視床下部における CHOP やリン酸化 PERK の発現が亢進し、ER ストレスが生じているものと考えられた。一方、D10 マウス 1,3-BD 投与群では視床下部における CHOP やリン酸化 PERK の発現が減弱しており、1,3-BD 投与により視床下部における ER ストレスが抑制されることが明らかとなった。

以上より、血中ケトン体および視床下部 ATP 濃度を上昇させる 1,3-BD は視床下部における ER ストレスおよびレプチン抵抗性を抑制することにより体重および摂食量を減少させるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Goto Tsuyoshi, Hirata Mariko, Aoki Yumeko, Iwase Mari, Takahashi Haruya, Kim Minji, Li Yongjia, Jheng Huei-Fen, Nomura Wataru, Takahashi Nobuyuki, Kim Chu-Sook, Yu Rina, Seno Shigeto, Matsuda Hideo, Aizawa-Abe Megumi, Ebihara Ken, Itoh Nobuyuki, Kawada Teruo	4. 巻 292
2. 論文標題 The hepatokine FGF21 is crucial for peroxisome proliferator-activated receptor- agonist-induced amelioration of metabolic disorders in obese mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9175 ~ 9190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.767590	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 磯田雅代、海老原健、海老原千尋、村上明子、武井暁一、武井祥子、高橋学、永島秀一、石橋俊
2. 発表標題 視床下部ATPを標的としたレプチン抵抗性改善薬の開発
3. 学会等名 日本内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Masayo Isoda, Akiko Murakami, Daisuke Yamamuro, Manabu Takahashi, Shuichi Nagashima, Shun Ishibashi
2. 発表標題 Hypothalamic ATP has a crucial role in the pathogenesis of leptin resistance: a potential mechanism for the amelioration of leptin resistance by celastrol and withaferin A
3. 学会等名 北米内分泌学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Masayo Isoda, Akiko Murakami, Daisuke Yamamuro, Manabu Takahashi, Shuichi Nagashima, Shun Ishibashi
2. 発表標題 Hypothalamic ATP up-regulation is the mechanism for the amelioration of leptin resistance by celastrol and withaferin A
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	海老原 千尋  (Ebihara Chihiro)  (90790915)	自治医科大学・医学部・客員研究員   (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------