

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591307

研究課題名(和文) レプチン抵抗性における細胞内シグナル異常の解明及び抗肥満薬スクリーニング系の開発

研究課題名(英文) Analyses of the intracellular leptin signaling in leptin resistance and development of a screening system for anti-obese drugs

研究代表者

孫 徹 (Son, Cheol)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60572287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：レプチントランスジェニックマウスはわずか1週間の高脂肪食負荷で、体重が肥満の表現型を示していないにもかかわらず、レプチン抵抗性を示した。さらにこの時、脳内神経核でのレプチン反応性を神経活性化マーカーやレプチンの細胞内シグナル分子などの免疫組織染色で解析したところ、レプチンの主要な作用標的である弓状核においてはレプチン抵抗性が生じているが、海馬や延髄の孤束核では抵抗性が生じていないことを明らかにした。海馬は長期の高脂肪食負荷でレプチン抵抗性を来すことが報告されており、レプチン抵抗性の出現には神経核ごとの感受性、あるいは出現のタイムコースに違いがあると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Coexistence of obesity and leptin resistance makes it difficult to analyze the molecular mechanisms of leptin resistance. To create a new model of leptin resistance without obesity, we fed leptin transgenic (Lep Tg) mice that overexpress leptin in the liver on high fat diet (HFD) for 1 week. The body weight of Lep Tg mice fed on HFD was comparable to that of wild type (WT) littermates fed on standard chow diet (CD). Administration of leptin failed to suppress in Lep Tg mice fed on HFD while it decreased food intake in WT mice. Only in Lep Tg mice fed on HFD, leptin-stimulated immunostaining of phosphorylated STAT3 or c-fos was decreased in the arcuate nucleus whereas it was not decreased in the nucleus tractus solitarius and hippocampus. In conclusion, we created a new mouse model of leptin resistance without obesity. They exhibited leptin resistance in the region-specific manner. Further analyses would provide new insights into the molecular mechanism of leptin resistance.

研究分野：医歯薬学

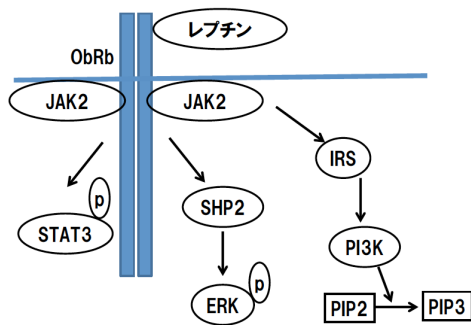
科研費の分科・細目：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：肥満 レプチン

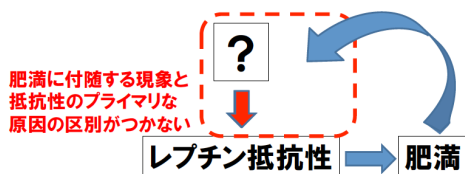
1. 研究開始当初の背景

近年メタボリック症候群など肥満を伴う疾患がますます注目されている。ヒトの肥満においてレプチン抵抗性が生じていることはよく知られているが、その分子機序ははまだ不明な点が多い。レプチンシグナルの細胞内の経路として JAK2-STAT3 経路、IRS-PI3K 経路、SHP2-ERK 経路の存在がこれまでに報告されており、それぞれのエネルギー代謝における重要性が報告されてきた (Nature 2003、JCI 2008)。

レプチンの細胞内シグナル



レプチン抵抗性状態において視床下部の STAT3 シグナルが障害を受けていることは多くの報告があるが、その他の経路に関する報告は少ない。その中でも ERK シグナルにおいては近年その上流の SHP2 も含めてレプチン作用における重要性が注目を浴びているが (PNAS 2004、JCI 2010)、レプチン抵抗性状態における ERK シグナルの意義を検討した研究は非常に少なかった。また多くのレプチン抵抗性モデルは肥満とレプチン抵抗性が共存しており、相互作用を及ぼしあうこの2者を分離して解析することは難しかった。



2. 研究の目的

著しいレプチン抵抗性をきたすモデルである高脂肪食負荷レプチントランスジェニックマウス (以下 Tg マウス) を用いて、神経核ごとにおけるレプチン反応性を、レプチンの細胞内シグナルのうち ERK 経路をはじめとするシグナル伝達経路を中心に解析し、神経核特異的なレプチン抵抗性の発症機序を明らかにし、それを利用して薬剤スクリーニング系の開発につなげる。

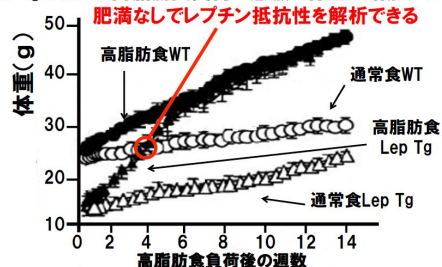
3. 研究の方法

以下の図に示すとおり、高脂肪食負荷後に著しい体重増加を呈し、強いレプチン抵抗性を示すと考えられる高脂肪食負荷レプチン Tg

マウスを用いて、図中の赤丸で示す時点で、肥満のない状態でレプチン抵抗性をおこし各神経核におけるレプチン抵抗性を神経活性化マーカーである c-fos の免疫組織染色を用いて検討する。

高脂肪食負荷レプチンTgマウスの体重変化

レプチンTgマウスは高脂肪食負荷で急激に体重が増加する

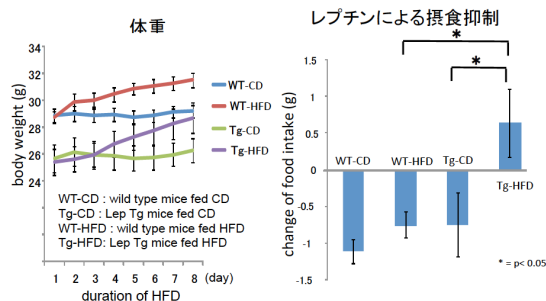


田中(連携研究者)ら Diabetes 2005 より引用

さらに、レプチンの細胞内シグナル伝達経路である ERK 経路、STAT3 経路についても解析し、レプチン抵抗性状態における神経核ごとの障害の差異、細胞内シグナル伝達障害の分子機序を解明する。

4. 研究成果

高脂肪食負荷1週間のLep Tgマウスはレプチン抵抗性を呈する



上図に示したように、レプチン Tg マウスはわずか1週間の高脂肪食負荷で、体重が肥満の表現型を示していないにもかかわらず、外因性レプチンに対する摂食抑制作用が減弱していた。この時通常食負荷の野生型マウス、1週間の高脂肪食負荷の野生型マウス、通常食負荷のレプチン Tg マウスはいずれも外因性レプチン投与による摂食抑制作用を同程度に認めており、高脂肪食と高レプチン血症が摂食におけるレプチン抵抗性の誘導に協同して作用している可能性が示唆された。

図 1

1週間の高脂肪食負荷後のLepTgマウス弓状核でのc-fos反応性

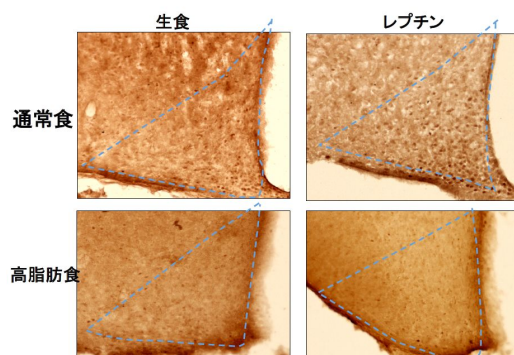


図 2

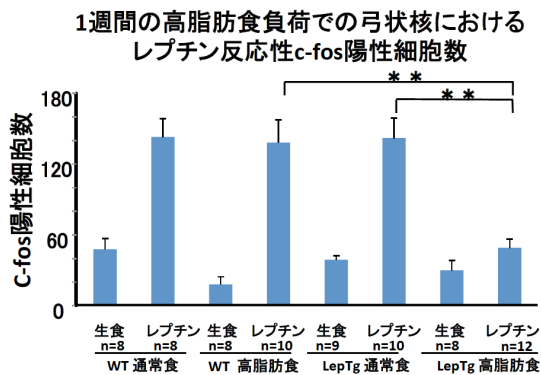
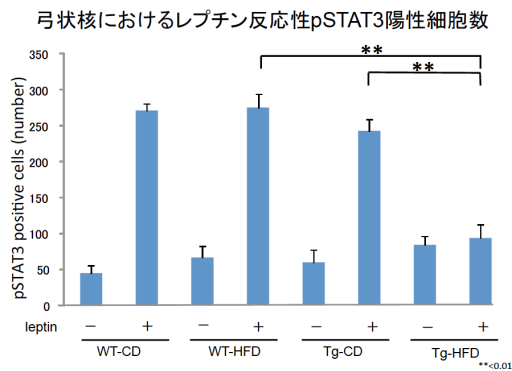


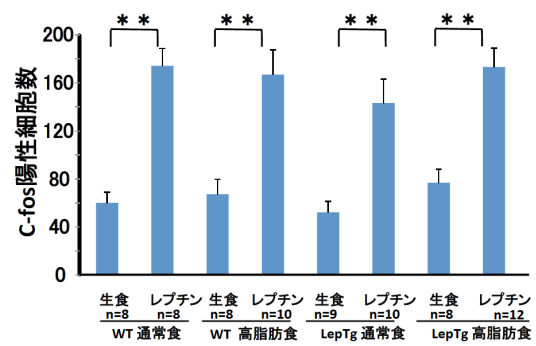
図 3



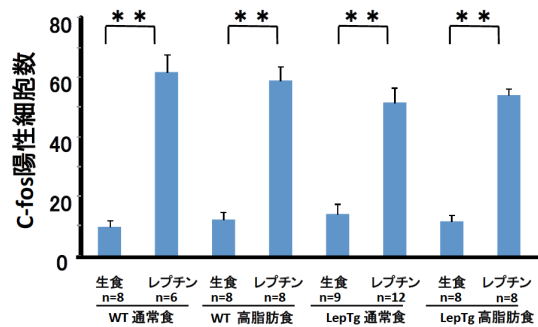
この時、免疫組織学的検討において、主要神経核において、神経活性化マーカーである c-fos のレプチン誘導性発現、レプチンシグナルの主要経路である Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), ERK のリン酸化が減弱しており、このマウスでは肥満がないにもかかわらずレプチン抵抗性を呈していることを明らかにした(上図 1-3 に代表的な視床下部の摂食調節に参与する神経核である弓状核におけるレプチン反応性をしめす。図 1 は 1 週間の高脂肪食負荷レプチン Tg マウスの弓状核における神経活性化マーカーである c-fos 免疫組織染色の代表的な写真。図 2 はその時の c-fos 陽性細胞数のグラフ。図 3 はその時の pSTAT3 陽性細胞数のグラフ)。

このように 1 週間の高脂肪食負荷レプチン Tg マウスでは、レプチンの主要な作用標的である弓状核においてはレプチン抵抗性が生じているが、我々はさらなる検討で、この時、海馬や延髄の孤束核では抵抗性が生じていないことを明らかにした(以下のグラフ参照)。

海馬



孤束核



海馬はレプチンの抗うつ作用に重要と考えられており、海馬においては野生型マウスに対する 16 週間の高脂肪食負荷でレプチン抵抗性が生じるとの既報が連携研究者の勝浦らによってなされている (Endocrinology 2011)。また、孤束核は末梢からの迷走神経入力統合点と考えられており、孤束核でのレプチン受容体のノックダウンが肥満の表現型を示すとの他施設の既報などと合わせて考慮すると、この神経核もレプチンの作用に重要な役割を果たしていることが示唆される。

本研究で示されたとおり、視床下部弓状核、海馬、延髄孤束核におけるレプチン抵抗性の出現には神経核ごとの感受性、あるいは出現のタイムコースに違いがあると考えられる。このような神経核ごとの反応性の違いは肥満やそれに伴う疾患に関連するレプチン抵抗性の出現、並びにその発生の分子機序を考えるうえで非常に興味深いと思われた。

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)

〔学会発表〕(計 3 件うち招請講演 1 件)
野村英生、孫徹ら「レプチン抵抗性早期誘導モデルマウスの腹内側核におけるレプチン反応性の検討」
2012 年 10 月 11 日~12 日
第 33 回日本肥満学会 口演

野村英生、孫徹ら 「高脂肪食負荷レプチントランスジェニック (Lep Tg) マウスにおけるレプチン感受性の検討」
2013年10月11日～12日
第34回日本肥満学会 ポスター発表
野村英生、孫徹ら Leptin Transgenic Mice on Short-Term High Fat Diet Show Leptin Resistance without Obesity.
2013年11月11日～16日
OBESITY 2013 31th Annual Scientific Meeting of The Obesity Society
ポスター発表
孫徹ら 「レプチン作用と報酬系」2013年8月24日 第18回アディポサイエンスシンポジウム 招請講演

〔図書〕(計2件)

孫徹ら. 「心の病・体の病をつなぐ基盤分子 細胞内シグナルからみた心と体 PI3K-Akt 経路、ERK 経路.」
実験医学. 2012;30(13):2052-2056.
孫徹ら 「レプチンの臨床応用.」
カレントセラピー. 2012;30(6):499-502.

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.tk.med.kyoto-u.ac.jp/obesitygroup/research.html>

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

孫徹 (Son Cheol)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号：60572287

(3)連携研究者

箕越靖彦 (Minokoshi Yasuhiko)
生理学研究所・発達生理学系・教授
研究者番号：10200099

桜井武 (Sakurai Takeshi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：60251055

海老原健 (Ebihara Ken)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70362514

勝浦五郎 (Katsuura Goro)
京都大学・医学研究科・非常勤講師
研究者番号：20401226

田中智洋 (Tanaka Tomohiro)
京都大学・医学研究科・特定准教授