

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591048
 研究課題名 (和文) レプチンを用いた新しい糖尿病治療法の開発
 研究課題名 (英文) Development of a new approach to therapy for diabetes mellitus using leptin
 研究代表者
 海老原 健 (EBIHARA KEN)
 京都大学・医学研究科・産学官連携講師
 研究者番号：70362514

研究成果の概要：

2 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についてストレプトゾトシンと高脂肪食負荷による 2 型糖尿病モデルマウス (STZ/HFD マウス) を作製し検討した。またレプチンの糖脂質代謝改善における作用メカニズムについて脂肪萎縮症モデル A-ZIP マウスにおける骨格筋および肝臓における AMPK 活性を検討した。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有用性が示された。またレプチンは骨格筋のみならず肝臓 AMPK に対しても活性化作用を示し、作用メカニズムの一部を担っている者と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：レプチン・2 型糖尿病・ストレプトゾトシン・高脂肪食・レプチン抵抗性・AMPK・メラノコルチン

1. 研究開始当初の背景

レプチンは代表的なアディポカイン (脂肪組織より分泌される生理活性物質) の一つであり、体脂肪率に比例して血中濃度が上昇することが知られている。レプチンは当初、視床下部に作用して摂食抑制やエネルギー消費亢進をもたらす体重調節因子として発見されたが、他にも末梢のエネルギー状態を中枢に伝えるセンサーとして多彩な生理作用を有することが知られている。これまでに申請者らはレプチン過剰発現トランスジェニックマウスの作成と解析を通して、レプチンの性腺機能調節作用 (*J Clin Invest* 105: 749, 2000)、血圧調節作用 (*J Clin Invest* 105: 1243, 2000)、糖代謝調節作用 (*Diabetes* 48:

1822, 1999) を明らかにした。特にレプチンの糖代謝調節作用について申請者らはモデルマウスを用いて脂肪萎縮性糖尿病の糖脂質代謝異常は脂肪組織の消失に伴う血中レプチン濃度の低下によりもたられること、レプチンが脂肪萎縮性糖尿病治療薬として有用であることを明らかにし (*Diabetes* 50: 1440, 2001)、さらに、ヒト脂肪萎縮性糖尿病症例にレプチン補償療法を施行し糖尿病、高脂血症、脂肪肝が著明に改善することを報告した (*N Engl J Med* 351: 615, 2004, *J Clin Endocrinol Metab* in press)。すなわちレプチンはヒトの糖代謝調節において必要不可欠なホルモンであり、新しい糖尿病治療薬として非常に有望であると考えられる。

2. 研究の目的

近年、我が国においてもライフスタイルの欧米化にともない2型糖尿病患者は増加の一途を辿っている。一方、レプチンは血糖降下作用のみならず脂質代謝亢進作用、摂食抑制作用、エネルギー消費亢進作用などエネルギー状態のセンサーとして多彩な作用を有しており、また作用経路も主に中枢神経系（視床下部）を介していることから、これまでの糖尿病治療薬とは全く異なる新しいタイプの特性および作用メカニズムを有する薬剤としてその可能性が期待される。本研究では脂肪萎縮性糖尿病のみならず1型糖尿病や2型糖尿病などのより公範な糖尿病におけるレプチンの有用性の検討を行う。またレプチンによる糖代謝改善の作用メカニズムの解明を目指す。さらに、これら基礎検討の成果および脂肪萎縮性糖尿病におけるレプチン治療の実績を踏まえて、将来的には実際に1型糖尿病および2型糖尿病症例を対象にレプチンの臨床試験を実施し、新しい糖尿病治療薬としての確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 2型糖尿病における有用性の検討

2型糖尿病は一般にインスリン抵抗性とインスリン分泌の低下によりもたらされる。一方、インスリン抵抗性の重要な危険因子である肥満では、体脂肪率の上昇にともない血中レプチン濃度の上昇が認められるが、高レプチン血症であるにもかかわらず肥満が是正されない「レプチン抵抗性」の状態にあると考えられている。しかしながら2型糖尿病の発症過程は遺伝的背景の違いから欧米と我が国との間に違いのあることが知られている。すなわち欧米では肥満の進展とともにインスリン抵抗性が重症化し、その後インスリン分泌の低下が認められるのに対し、我が国では遺伝的にインスリン分泌能が低く、高度の肥満を呈する前に糖尿病を発症する例が多い。そこでSTZと高脂肪食負荷を用いて日本型の2型糖尿病モデルマウスを作成し、レプチンの糖代謝改善効果を検討する。これらのモデルマウスを用いて肥満や高脂肪食下におけるレプチン抵抗性とレプチンの糖代謝改善効果について解析し、我が国におけるレプチン治療の適応を検討する。

(2) レプチンの糖脂質代謝改善における作用メカニズムの解明

近年の多くの研究から、5' AMP-activated protein kinase (AMPK)が糖脂質代謝制御における重要な鍵分子の一つであるという考え方が広く受け入れられている。レプチンが骨格筋においてAMPKを活性化することが報告され、レプチンの糖脂質代謝亢進作用を説明しうる機序の一つとして注目されている

(*Nature* 2002)。しかし、これまで病態モデルにおける検討も殆どなされておらず、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。さらに、レプチンの単回投与および、浸透圧ミニポンプによる持続投与を行い、同様に検討した。

4. 研究成果

(1) 2型糖尿病における有用性の検討

2型糖尿病モデルマウスは、8週齢のC57BL/6J雄性マウスに、膵β細胞破壊によりインスリン分泌低下を来たすストレプトゾトシン(120μg/g)と肥満およびインスリン抵抗性を誘導する高脂肪食(45kcal%)を負荷して作製した。このモデルマウス(STZ/HFDマウス)に対して浸透圧ミニポンプを用いて2週間のレプチン持続皮下投与(20ng/g/hr)を行い、摂食量、体重、血中糖脂質代謝パラメータ(血糖、インスリン、中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール)、耐糖能試験、肝臓および骨格筋内中性脂肪含量、脂肪酸酸化に関わる酵素でレプチン感受性マーカーであるAMPKの骨格筋における活性に対するレプチンの効果を評価した。

STZ/HFDマウスでは、正常マウスと比較して摂食量は1.3倍、体脂肪量は1.8倍の増加が認められ、平均血中レプチン濃度は8.6ng/mlで正常マウスの約2倍であった。これはヒトでは日本肥満学会判定基準の肥満1度(BMI 25 kg/m²以上 30kg/m²未満)に相当する。また高脂肪食負荷によりインスリン抵抗性が誘導されたが、高脂肪食のみ負荷したマウスと比較して血中インスリン濃度は40-50%減少しており、自由摂食下での平均血糖値は490mg/dlにまで上昇した。さらに血中中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール濃度の上昇、肝臓および骨格筋内中性脂肪含量の増加が認められた。レプチン投与中のSTZ/HFDマウスの平均血中レプチン濃度は30.8ng/mlであり、既にヒト脂肪萎縮性糖尿病症例におけるレプチン治療において安全性が確認されている血中レプチン濃度範囲内であった。2週間のレプチン持続投与によりSTZ/HFDマウスの摂食量は抑制され、約5%の体重減少が認められた。さらに自由摂食下での平均血糖値は327mg/dlにまで改善した。レプチン投与中、耐糖能試験ではインスリン

分泌の増加はないがブドウ糖負荷後の血糖上昇が有意に抑制された。以上の所見より、レプチンがインスリン感受性を亢進させ耐糖能を改善したのと考えられた。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も有意な低下が認められた。さらにレプチン持続投与により肝臓および骨格筋内中性脂肪含量はそれぞれ35%、38%の低下が認められ、骨格筋 $\alpha 2$ -AMPK活性は1.8倍に上昇していた。レプチン持続投与による骨格筋における脂肪酸酸化亢進が組織内中性脂肪含量低下に関与した可能性が示唆された。Pair-feeding実験では、レプチン持続投与による摂食量の減少に加えて、摂食抑制作用とは独立したレプチンの糖脂質代謝改善作用が示めされた。

以上、ストレプトゾトシンおよび高脂肪食負荷により作製したインスリン抵抗性、インスリン分泌低下、肥満を伴う2型糖尿病モデルマウスを用いた検討により、2型糖尿病においてレプチンが抗糖尿病薬として有用である可能性が示された。今後、2型糖尿病におけるレプチンの新規抗糖尿病薬としての臨床応用が期待される。

(2)レプチンの糖脂質代謝改善における作用メカニズムの解明

①AZIPの骨格筋におけるAMPK遺伝子発現量は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 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 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ の遺伝子発現量増大が認められたが、活性はWTに比べ低下していた。③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、レプチン投与により、④骨格筋AMPKの活性化のみならず、肝AMPKの活性化が認められた。⑤肝AMPKの活性上昇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。

肝AMPKはアディポサイトカインの一つである、アディポネクチンにより活性化されることが知られている。しかし、脂肪萎縮性糖尿病のモデル動物において、その活性低下が生じていることを見だし、脂肪萎縮性糖尿病による糖脂質代謝異常に肝AMPK情報伝達系の異常が関与する可能性について示唆する報告は初めてである。さらに、レプチンが肝AMPKに対し作用を示すことを示唆する報告はあるが(*FASEB J.* 2005, *Endocrinology* 2006)、in vivoにてレプチンの肝AMPK活性化作用を明らかにした報告は初めてであり、レプチンの糖脂質代謝亢進作用を明らかにする上で極めて重要な発見である。

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3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 N. Yamada, K. Ebihara, K. Nakao (7人中5番目). Orexins increase mRNA expressions of neurotrophin-3 in rat primary cortical neuron cultures. *Neurosci Lett*. 30:132-135, 2009. 査読有
- ③ N. Yamada, K. Ebihara, K. Nakao (8人中6番目). Orexin decreases mRNA expressions of NMDA and AMPA receptor subunits in rat primary neuron cultures. *Peptides*. 29: 1582-1587, 2008. 査読有
- ④ S. Tanaka, K. Ebihara, K. Nakao (11人中7番目). High-fat diet impairs the effects of a single bout of endurance exercise on glucose transport and insulin sensitivity in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 56:1719-1728, 2007. 査読有
- ⑤ T. Tanaka, K. Ebihara, K. Nakao (13人中4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 L. Miyamoto, K. Ebihara, K. Nakao (13人中7番目). Effect of acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 102:1007-1013, 2007. 査読有
- ⑦ K. Ebihara, K. Nakao (15人中1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

[学会発表] (計15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 海老原 健、Dunnigan型家族性部分性脂肪萎縮症日本人症例におけるLMNA遺伝子変

- 異の同定、第 29 回日本肥満学会、2008 年 10 月 17 日-18 日、大分
- ③ 平田雅一、メタボリックシンドロームにおける改良 Dual VF-BIA 法による経時的内臓脂肪蓄積測定 of 臨床的意義、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
 - ④ 陳 文、もやもや病を合併した部分型脂肪萎縮性糖尿病の 1 例、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
 - ⑤ 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 81 回日本内分泌学会学術総会、2008 年 5 月 16 日-18 日、青森
 - ⑥ 海老原健、レプチンと脂肪毒性、第 28 回日本肥満学会、2007 年 10 月 19 日-20 日、東京
 - ⑦ 平田雅一、メタボリックシンドロームにおける改良 Dual VF-BIA 法による経時的内臓脂肪蓄積測定 of 臨床的意義、第 28 回日本肥満学会、2007 年 10 月 19 日-20 日、東京
 - ⑧ 日下部徹、2 型糖尿病モデルマウスにおけるレプチンの摂食・体重調節、糖脂質代謝改善作用、第 28 回日本肥満学会、2007 年 10 月 19 日-20 日、東京
 - ⑨ 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
 - ⑩ 青谷大介、脂肪萎縮症における組織内中性脂肪含有量に対するレプチンの治療効果、第 80 回日本内分泌学会学術総会、2007 年 6 月 14 日-16 日、東京
 - ⑪ 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
 - ⑫ 海老原健、ヒトにおけるレプチンの生理的意義、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 24 日-26 日、仙台
 - ⑬ 平田雅一、内臓脂肪蓄積に基づく腹部肥満判定基準の IDF および AHA/NHBI メタリックシンドローム診断基準での利用の妥当性の検討、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 24 日-26 日、仙台
 - ⑭ 髭 秀樹、先天性全身性脂肪萎縮症における原因遺伝子の検討、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 24 日-26 日、仙台
 - ⑮ 日下部徹、2 型糖尿病に対するレプチンの糖尿病治療薬としての有用性の検討、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 24 日-26 日、仙台

[その他]

ホームページなど

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 健 (EBIHARA KEN)

京都大学・医学研究科・産学官連携講師

研究者番号：70362514

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし