

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16358

研究課題名（和文）外因性ケトン体生成物によるレプチン抵抗性改善メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism of improvement of leptin resistance by exogenous ketone supplements

研究代表者

磯田 雅代 (Isoda, Masayo)

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20743173

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）：1,3-ブタンジオール(BD)経口投与により血中ケトン体濃度を上昇させると視床下部ATP濃度上昇を介して食餌誘導性肥満(DIO)マウスの視床下部におけるERストレスおよびレプチン抵抗性が改善することを明らかにした(Sci Rep 2021)。一方、血中ケトン体濃度が上昇する機能性食品MCTオイルの経口投与ではDIOマウスの視床下部ATP濃度は上昇し、ERストレスとレプチン抵抗性も改善したが、摂食量や体重は変化しなかった。MCT投与でアシル化グレリンの有意な上昇が認められたことから、MCTはレプチン抵抗性を改善する一方でグレリンを活性化する結果、摂食量および体重は変化しないものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満による健康障害は重大な医学的課題であるにもかかわらず、肥満は増え続けている。レプチンは摂食抑制とエネルギー消費亢進をもたらす抗肥満ホルモンとして知られているが、一般の肥満者では「レプチン抵抗性」の状態にあり、レプチン抵抗性の分子基盤の解明は、新しい肥満治療法の開発に結びつくことが期待される。本研究により血中ケトン体濃度を上昇させると視床下部ATP濃度の上昇を介して視床下部における小胞体ストレスおよびレプチン抵抗性が改善することが明らかとなった。今後、血中ケトン体濃度を上昇させる臨床応用可能な方法を探ることにより新しい肥満治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Oral administration of 1,3-butanediol (BD) increased plasma ketone bodies and hypothalamic ATP concentrations, and improved ER stress and leptin resistance in the hypothalamus in diet-induced obese (DIO) mice (Sci Rep 2021). On the other hand, oral administration of MCT oil, a functional health food also increased plasma ketone bodies and hypothalamic ATP concentrations, and improved ER stress and leptin resistance in DIO mice, but did not alter food intake or body weight. The significant increase in acylated ghrelin observed with MCT administration suggests that MCT improved leptin resistance while activating ghrelin, resulting in unaltered food intake and body weight.

研究分野：代謝学

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

1. 研究開始当初の背景

肥満は、欧米はもとよりアジア諸国においても増加の一途をたどり、肥満に起因する糖尿病や脂質異常症、メタボリックシンドロームは重大な医学的課題となっている。レプチンは脂肪細胞より分泌され、主に視床下部に作用することにより強力な摂食抑制とエネルギー消費亢進をもたらす抗肥満ホルモンとして知られている。しかしながら、一般の肥満者では体脂肪量の増加とともに血中レプチン濃度が上昇する一方、高レプチン血症であるにもかかわらず肥満が是正されず、「レプチン抵抗性」の状態にある。したがって、レプチン抵抗性の分子基盤の解明は、新しい肥満治療法の開発に結びつくことが期待される。

レプチン抵抗性発症の分子基盤の詳細については未だ不明であるが、視床下部における小胞体(ER)ストレスがレプチン抵抗性の発症に重要な役割を果たしていることが報告されている。ER ストレス下では、誤って折りたたまれたタンパク質の蓄積により、小胞体ストレス応答(UPR)が促進され、相当量の ATP が消費される。実際に、ATP が不足した細胞では ER ストレスに対して脆弱であり、ATP の供給により ER ストレスから細胞が保護される。これらの理由により、視床下部 ATP 濃度の上昇は視床下部における ER ストレスとレプチン抵抗性に対して改善効果をもつ可能性がある。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た。

そこで ER ストレス時の ATP 不足を解消する方法としてケトン体に着目した。ケトン体は中枢神経系における ATP 濃度を上昇させることが実証されている。しかし、ケトジェニックダイエットの体重と摂食量に対する効果については一定した見解が得られていない。ケトジェニックダイエットによりもたらされるケトーシスは動物実験において、食欲促進と食欲抑制の両方に作用することが報告されている。ケトジェニックダイエットに相反する 2 つの作用がある理由の 1 つとして、ケトン生成食が高脂肪であると同時に低炭水化物であることが挙げられる。さらに、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。

2. 研究の目的

本研究では、低炭水化物状態を伴うことなく血中ケトン体濃度を上昇させるために外因性ケトン体生成物として 1,3-ブタンジオール(BD)を使用し、ケトン体のレプチン抵抗性改善作用を明らかにする。既に予備実験において食事誘導性肥満(DIO)マウスにおいて BD 投与により摂食量および体重増加が抑制されることを確認している。本研究では、マウスに BD を投与して視床下部 ATP 濃度が上昇した時のマウス視床下部ニューロンにおける ER ストレスやレプチン感受性の変化について検討する。さらに、臨床応用を考え既に健康食品として市販されている外因性ケトン体生成物である中鎖脂肪酸(MCT)についてもレプチン抵抗性改善効果を検討し、ケトン体あるいは視床下部 ATP を標的とした肥満治療法の臨床応用への可能性を探索する。

3. 研究の方法

1) 食事誘導性肥満(DIO)マウス視床下部における BD 投与の ER ストレスおよびレプチン感受性に及ぼす影響の検討: DIO マウスにおいて BD 投与により摂食量および体重増加が抑制されることを確認している。そこで DIO マウスに BD を投与した時の視床下部における ER ストレスの変化を CHOP や XBP-1 などの ER ストレスマーカーの遺伝子発現や蛋白発現を解析することにより検討する。DIO マウスにレプチン投与を行い、BD 投与の有無によるレプチンの摂食抑制効果や視床下部におけるレプチン受容体のシグナル分子である STAT3 のリン酸化を解析することによりレプチン感受性を検討する。

2) 遺伝性レプチン欠損肥満(ob/ob)マウスにおける BD 投与の摂食量および体重増加に及ぼす影響の検討: DIO マウスにおける BD 投与の摂食および体重増加抑制作用がレプチン系を介した作用であることを直接的に証明するために、レプチン欠損マウスである ob/ob マウスにおいて BD 投与の摂食量および体重増加に及ぼす影響を検討する。BD 投与の摂食および体重増加抑制作用がレプチン系を介した作用である場合には、その作用が ob/ob マウスでは見られないことが

予想される。

3) 食事誘導性肥満 (DIO) マウスにおける BD 投与の Pair-feeding 実験: レプチンは視床下部に作用することにより食欲抑制のみならず交感神経活動亢進を介したエネルギー消費亢進により抗肥満作用をもたらすことが知られている。したがって、BD 投与による体重増加抑制作用がレプチン系を介した作用であるならば、BD 投与は摂食抑制のみならずエネルギー消費亢進をもたらすと考えられる。そこで、DIO マウスにおいて BD 投与群と摂食量を BD 投与群に合わせた Pair-fed 群の体重変化を比較検討する。BD がエネルギー消費亢進作用を有する場合には BD 投与群の体重増加は Pair-fed 群より抑制されることが予想される。

4) 食事誘導性肥満 (DIO) マウスにおける MCT 投与の摂食量、体重増加、視床下部 ER ストレスおよびレプチン感受性に及ぼす影響の検討: 将来の臨床応用への可能性を考え、より一般的な外因性ケトン体生成物である MCT についても BD と同様の検討を実施する。MCT は既に経口投与により血中ケトン体濃度が増加することが実証されている。そこでまず、マウスにおいて MCT 投与により視床下部 ATP 濃度が上昇することを確認した上で、DIO マウスにおける摂食量、体重増加、視床下部 ER ストレスおよびレプチン感受性に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

食事誘導性肥満 (DIO) マウスにおいて 1,3-ブタンジオール (BD) 投与により摂食量および体重増加が抑制されることを確認した。そこで DIO マウスに BD を投与した際の視床下部における ER ストレスの変化を検討した。CHOP や XBP-1 などの ER ストレスマーカーの発現は普通食で飼育したマウスと比較して DIO マウスで上昇していたが、BD 投与により抑制された。さらに、BD を投与した際のレプチン感受性の変化を検討した。普通食で飼育したマウスと比較して DIO マウスではレプチン投与による摂食量減少作用は減弱していたが、BD 投与により摂食量減少作用の増強が認められた。また、普通食で飼育したマウスと比較して DIO マウスではレプチン投与による視床下部 STAT3 のリン酸化は減弱していたが、BD 投与によりレプチン投与による視床下部 STAT3 のリン酸化増強が認められた。そこでこの BD 投与による摂食量および体重増加の抑制がレプチン作用の改善を介したものであるかを確認するためにレプチン欠損肥満モデルである *ob/ob* マウスに対して BD 投与を行った。*ob/ob* マウスにおいても BD 投与により血中ケトン体濃度および視床下部 ATP 濃度の上昇は確認されたが、摂食量および体重増加の抑制は認められなかった。その一方で *ob/ob* マウスにおいても BD 投与により視床下部における ER ストレスマーカーの発現は抑制され、外因性レプチンに対する反応性も増強が認められた。以上より、BD 投与による摂食量および体重増加の抑制にはレプチンが必要であることが確認された。BD による血中ケトン体濃度の上昇は視床下部 ATP 濃度の上昇および ER ストレスの抑制をもたらすレプチン感受性の改善を介して摂食量および体重増加を抑制するものと考えられた (Sci Rep 11: 17691, 2021)。

そこで次に BD と同様に経口投与で血中ケトン体濃度および中枢神経系における ATP 濃度が上昇することが知られている中鎖脂肪酸オイル (MCT) を用いて同様の検討を行った。MCT 投与により DIO マウスの血中ケトン体濃度および視床下部 ATP 濃度が上昇することを確認した。しかし、BD とは異なり MCT 投与による摂食量および体重増加の抑制は認められなかった。一方、MCT 投与により DIO マウスの視床下部における ER ストレスマーカーの発現抑制や STAT3 のリン酸化増強は認められた。MCT はグレリンの活性化すなわちアシル化を促進することが報告されていることからアシル化グレリン濃度を測定したところ、MCT 投与で上昇していた。さらに視床下部において摂食促進ペプチドである NPY の発現が亢進していた。以上より MCT は血中ケトン体及び視床下部 ATP 濃度を上昇させ視床下部における ER ストレス及びレプチン抵抗性を改善する一方でアシル基の基質としてグレリンの活性化を促進し視床下部 NPY 発現を増強することが明らかとなった。DIO マウスにおける MCT 投与は、レプチンとグレリンの作用が拮抗する結果、摂食量及び体重が変化しなかったと考えられ、MCT による減量効果は限定的であると考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Isoda Masayo, Ebihara Ken, Sawayama Nagisa, Murakami Akiko, Ebihara Chihiro, Shibuya Koji, Takei Akihito, Takei Shoko, Wakabayashi Tetsuji, Yamamuro Daisuke, Takahashi Manabu, Nagashima Shuichi, Ishibashi Shun	4. 巻 11
2. 論文標題 Leptin sensitizing effect of 1,3-butanediol and its potential mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-96460-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海老原千尋、海老原健、野本 渚、磯田雅代、岡崎啓明、矢作直也
2. 発表標題 MCTオイルのレプチン抵抗性改善作用とグレリン活性化作用
3. 学会等名 第97回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 海老原千尋、海老原健、野本 渚、磯田雅代、岡崎啓明、矢作直也
2. 発表標題 MCTオイルのマウス視床下部摂食調節機構に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第45回日本肥満学会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------