

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成 19 年度～20 年度
 課題番号：19500689
 研究課題名（和文）女性の肥満の特性解明
 -性ホルモンのレプチン受容体情報伝達に及ぼす影響-
 研究課題名（英文）Analysis of the characteristics in female obesity
 - Effects of sex hormones on signal transduction of leptin receptor -
 研究代表者 山口 義彦
 長崎県立大学・看護栄養学部・教授
 研究者番号：70253656

研究成果の概要：

女性の肥満の原因を明らかにするために、女性ホルモン(エストロゲン)が、重要な食欲抑制ホルモンである「レプチン」の働きにどのような影響を及ぼすか調べました。レプチンの働きがよくわかるように、レプチン受容体(レプチンを受け取るタンパク)の遺伝子を組み入れた細胞を用いました。その結果、女性ホルモンは、レプチンの働きを強める、すなわち、女性ホルモンが食欲を抑制することが推測されました。

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
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食行動

キーワード：レプチン、性ホルモン、エストロゲン、食欲、肥満、生活習慣病、メタボリックシンドローム、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

レプチン受容体発現細胞とラットを用いた研究により、インスリン、グルコース、ステロイドなどのレプチン情報伝達抑制効果とその機序および肥満との関係を研究してきた。その結果、インスリン、グルコース、ス

テロイド、エタノールが視床下部でのレプチンのシグナル伝達を抑制することを証明した。現在までに、我々は一過性発現細胞株を用いた実験でプロゲステロンがレプチン依存性 STAT3 リン酸化に影響することを見いだ

している。また、HEK293 細胞でのレプチン受容体安定発現細胞株の樹立に成功し、その細胞株はレプチン依存性 STAT3 リン酸化能を有することを確認している。一過性過剰発現細胞株に比べレプチン受容体発現量の安定性に優れたこの安定細胞株を用いさらに詳細な女性ホルモン（性ホルモン）のレプチン受容体情報伝達に及ぼす影響を検討していくことが可能となっている。

2. 研究の目的

動脈硬化が原因で起こる心臓病（虚血性心疾患・心筋梗塞）および脳血管障害（脳梗塞・脳出血）は、日本人の三大死因であり、健康寿命を短縮している。これらの疾患の発症を予防することは、医療における最重要課題の一つである。一方、肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧などの生活習慣病は1個体に集積することが多く、いわゆるメタボリックシンドロームを形成し、その重要な基盤が肥満である。肥満においては、血中のインスリンは高値でありながら、その作用が十分発揮されない、いわゆるインスリン抵抗性が高率にみられ、このインスリン抵抗性によって糖尿病、脂質異常症、高血圧が惹起され、メタボリックシンドロームが形成されると考えられる。さらに、肥満においては、脂肪細胞から分泌される最強の食欲抑制ホルモン＝レプチンも高値であり、インスリンと同様にその作用が十分発揮されない＝レプチン抵抗性の状態にある。すなわち、肥満にはインスリン抵抗性およびレプチン抵抗性の両者が共存し、これらがメタボリックシンドロームの発症・進展、悪循環形成の原因と考えられる。よって、肥満におけるインスリン抵抗性およびレプチン抵抗性の機序解明は、動脈硬化の原因解明に直結し、その予防にとっても非常

に重要なことである。本研究では、最強の食欲抑制ホルモンであるレプチンの中枢神経における摂食調節機構とレプチン抵抗性のメカニズムを分子生物学的に解析し、生活習慣病の重要な基盤である肥満の原因を解明することが主要な目的である。とくに、日本人における肥満の男女差は著明であり、男性に比較し女性における肥満の頻度は低い。しかしながら、閉経以降は女性においても肥満が増加し、心血管疾患が増加する。よって、今回は、性ホルモンと肥満の関係に着目し、性ホルモンがレプチン受容体情報伝達に及ぼす影響について研究を実施する。

3. 研究の方法

（1）一過性遺伝子導入

ヒト肝癌細胞株 Huh7 細胞に、レプチン受容体のアイソフォームのうちすべてのレプチンシグナルを有するロングフォームレプチン受容体発現ベクターをリポフェクション法で一過性遺伝子導入をする。なお、上記細胞はウエスタンブロッティングで検出可能な内因性 JAK2 蛋白量が不足している。そのため JAK2 の活性化を検討する際には JAK2 発現ベクターをレプチン受容体発現ベクターと共に同時に一過性遺伝子導入をする。

（2）安定細胞株の樹立

HEK293 細胞に、ロングフォームレプチン受容体発現ベクターをリポフェクション法で遺伝子導入する。同ベクターは Zeocin 抵抗性遺伝子を含んでおり、遺伝子導入後の HEK293 細胞は Zeocin 含有培地で2週間培養しレプチン受容体安定発現細胞株を選択する。安定細胞株のレプチン受容体発現量は^{125-I} 標識レプチンとの特異的結合能で、また機能はレプチン依存性 STAT3 チロシンリン酸化で評価す

る。

(3) 細胞処理、サンプル調整

(1)(2) で作成したレプチン受容体もしくは JAK2 の発現細胞を種々の濃度の性ホルモン (エストロゲン、プロゲステロン) を含む培地で 0-48 時間培養し前処置する。その後マウスレコンビナントレプチンで 15 分間刺激し細胞を可溶化、遠心し集めた細胞上清に SDS サンプルバッファーを加える。

(4) ウェスタンブロッティング

サンプルを SDS-PAGE で展開、ニトロセルロースメンブレンへ転写。一次抗体として抗ホスホ-STAT3, -JAK2, -STAT3, -JAK2 を用いウェスタンブロッティングを行う。目的とする蛋白は chemiluminescent 法で同定する。

(5) 結果の検討

各種性ホルモンがレプチン受容体シグナルにおよぼす影響はレプチン依存性 JAK2 および STAT3 チロシンリン酸化で評価する。これまで我々は同様の方法でチロシンフォスファターゼ阻害剤オルソバナデートがレプチン受容体シグナルを増強、インスリン、グルコース、ステロイドは減弱させる事を見だし報告してきた。これらの効果をコントロールとして各種性ホルモンでの結果を比較検討する。また、糖質コルチコイド (デキサメサゾン) が、一部 MAPK カスケードを介してレプチン受容体シグナルを抑制することを MAPK カスケードの阻害剤 (MEK inhibitor) を用いて証明した。レプチン受容体シグナルに有意な影響をおよぼす性ホルモンに関しては同様のアプローチでその作用機序を検討する。

4. 研究成果

女性ホルモン「エストロゲン」がレプチン受容体に及ぼす影響について、レプチン受容体安定発現細胞株を用いて検討した。ヒト腎細胞株 HEK293 とマウスの long-form レプチン受容体遺伝子を組み込んだ pcDNA3.1/Zeo を用いて、リポフェクタミン法にてレプチン受容体安定発現細胞株 (以下、HEK2930bRb) を作成した。HEK2930bRb を、エストロゲンで前処置し、100nM レプチンで 15 分間刺激した。エストロゲンは、1、2、4、8、16、24、48 時間の前処置を行い、その濃度は 1、10、100nM 前後で変化させた。細胞を可溶化後、上清を SDS-PAGE に展開した。レプチン受容体細胞内情報伝達の中軸は、Janus kinase 2 (JAK2) と signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) であり、レプチンが結合すると JAK2 および STAT3 がリン酸化される。JAK2 のリン酸化は、ヒト肝癌細胞株 Huh 7 に ObRb および JAK2 をライポフェクタミン法にて遺伝子導入し検討した。細胞可溶化上清を用いて、抗リン酸化 STAT3、抗リン酸化 JAK2 を一次抗体としウェスタンブロッティングを行った。4~24 時間のエストロゲン前処置で STAT3 のリン酸化が増強し、その濃度は 100nM が至適濃度であった (Fig1、Fig2)。エストロゲン前処置にて、Huh 7 においては JAK2 のリン酸化の増強は認めなかった。さらに、エストロゲンのレプチンの情報伝達増強作用が MAP (mitogen activated protein) kinase カスケード介するか否かを、その阻害剤を用いて検討したが、MAP kinase カスケードの関与は明確ではなかった。この結果は、女性ホルモンの代表である「エストロゲン」が摂食中枢において抑制的に作用するという重要な事実を示唆した。

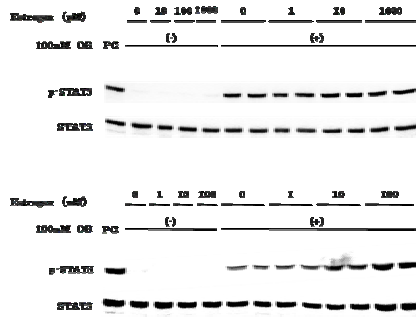


Fig.1 HEK293^{ObRb} におけるエストロゲン前処置濃度と STAT3 リン酸化との関連

HEK293^{ObRb} に、0、10、100pM および 1、10、100nM のエストロゲンにて 4 時間前処置し、100nM レプチンで刺激した時の STAT3 リン酸化 (phospho-STAT3 : p-STAT3) および STAT3 全体 (STAT3) を示したものである。OB : レプチン PC : Positive Control

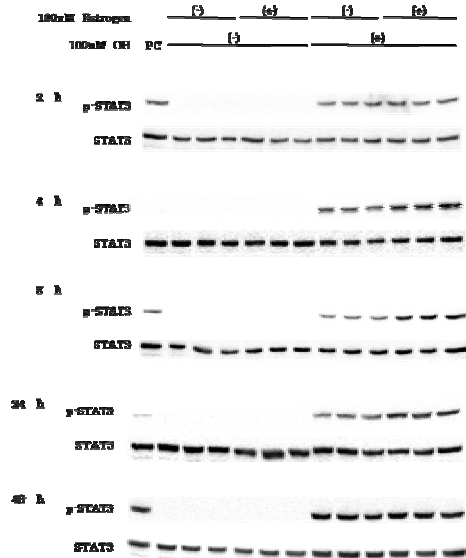


Fig.2 HEK293^{ObRb} におけるエストロゲン前処置時間と STAT3 リン酸化との関連

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 1 件)

奥恒行、中村まり子、石黒美知留、
田辺賢一、山口義彦、中村禎子
ヒトにおける糖アルコール含有チューインガムの緩下性および安全性の検討
日本食物繊維学会誌、11、2007、67-74、
査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

奥恒行、中村禎子、石黒美知留、
山口義彦
2 型糖尿病患者における桑葉抽出物の二糖類水解酵素阻害作用を利用した血糖上昇抑制ゼリーの効果検証
第 29 回日本臨床栄養学会総会・第 28 回日本臨床栄養協会総会 第 回大連合大会、平成 18 年 11 月 16 日～18 日、京都市

〔図書〕(計 1 件)

山口義彦 (分担執筆)
医師薬出版株式会社、疾病の成因・病態・診断・治療 (竹中優編)、2007、327

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 義彦 (YAMAGUCHI YOSHIHIKO)
長崎県立大学・看護栄養学部・教授
研究者番号 : 70253656

(2)研究分担者

(3)連携研究者