

平成21年6月2日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008年
 課題番号：19790059
 研究課題名（和文）レプチン抵抗性によるメタボリックシンドロームの病態解明～小胞体ストレスの関与～
 研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of metabolic syndrome caused by leptin resistance～the role of endoplasmic reticulum stress～
 研究代表者
 細井 徹（HOSOI TORU）
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
 研究者番号：40379889

研究成果の概要：

肥満は生活習慣病の主要な危険因子であり、その発症・進展機構の解明と有力な治療法の開発は臨床医学の見地からも重要な課題である。本研究の結果、肥満に関わるとされる「レプチン抵抗性」の原因として小胞体ストレスの関与を新たに見出した。さらにその原因物質としてホモシステイン、またその分子機構として、protein tyrosine phosphatase 1B（PTP1B）というタンパク質が関与している可能性を見出した。以上、本研究の結果、肥満の新しいメカニズムが明らかになり、さらに、小胞体ストレスを標的とした薬物が今までにない新しいタイプの治療薬になる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：中枢神経薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：レプチン、肥満、STAT3、小胞体ストレス、PTP1B

1. 研究開始当初の背景

肥満は糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症といった生活習慣病すなわちメタボリックシンドロームの主要な危険因子である。ライフスタイルの欧米化に伴い、わが国の肥満者数は増加の一途をたどっており、肥満の発症・進展機構の解明と有力な治療法の開発は臨床医学の見地からもきわめて重要かつ急務の課題である。

肥満遺伝子（ob 遺伝子）産物であるレプチ

ンは、脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、主に脳に作用し、強力な食欲の抑制とエネルギー消費の増大により体重を減少させる。したがってレプチン発見当時は、痩せ薬になると期待されていた。しかし、肥満患者にレプチンを投与しても効果が認められないことが明らかになり、最近ではレプチン抵抗性が肥満の原因として考えられるようになってきている。したがって、レプチン抵抗性改善薬は、肥満及びそれにともなう生活習慣病

の治療に有効であると考えられ、現在世界の様々な研究機関で势力的に研究が行われている。しかしながら、レプチン抵抗性のメカニズムおよびそれを標的とした有効な治療薬については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、新たに、小胞体ストレスがレプチン抵抗性に関わっているのではないかと考え研究を進めた。

2. 研究の目的

小胞体にはタンパク質の立体構造を整える働きがあるが、小胞体ストレスとは細胞内外の刺激により小胞体でのタンパク質の折りたたみに問題が起これ、その結果小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積する状態を指す。近年小胞体ストレスが病態形成に関与していることが次々と明らかされている。そこで、本研究では、肥満のメカニズムを明らかにする目的で、「レプチン抵抗性は小胞体ストレスが原因である」との仮説を設定し、それを実証すべく検討を進めた。

3. 研究の方法

レプチン受容体を恒常的に発現させた細胞株 HEK293-Ob-Rb 細胞、SH-SY5Y-Ob-Rb 神経芽細胞腫の構築済みである。この細胞株を用いてレプチンのシグナルに重要とされる STAT3 の活性化の検出にも成功している (*Eur J Pharm.* (2006) 553:61-6.)。in vivo 解析においては、レプチンシグナルの活性化をマウス個体レベルで検出することにも成功している (*Endocrinology* (2002) 143:3498-3504)。この実験系により、以下に示す実験を行った。

1) レプチンシグナルに対する小胞体ストレスの影響

レプチンによる STAT3 および各種シグナル伝達系の活性化および遺伝子誘導に対する小胞体ストレスの影響について、上記細胞モデルを用いて検討した。小胞体ストレス誘発試薬としては、ツニカマイシン、タブシガルジン、ジチオスレイトール、プレフェルジン A を使用した。タンパク質および遺伝子レベルでの解析には、Western blotting 法、RT-PCR 法を用いた。

2) 小胞体ストレスによるレプチン抵抗性の誘発機構の検討

今回、小胞体ストレスによるレプチン抵抗性に関与するタンパク質として protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) の関与の可能性について検討した。実験には、PTP1B

の特異的な阻害薬および PTP1B の siRNA を用いたノックダウン実験により検討を試みた。

3) Homocysteine によるレプチン抵抗性の誘導についての検討

メチオニンが代謝されて作られる homocysteine の血中濃度が高いと、糖尿病、動脈硬化・心筋梗塞・脳卒中、アルツハイマー病のリスクが高くなることが報告されている。また homocysteine が小胞体ストレスを誘発することが報告されている (*Blood* (1999) 94: 959-967, *J Clin Invest* (2001) 107 :1263-1273)。そこで、homocysteine によってレプチン抵抗性が惹起される可能性について、レプチンによる STAT3 の活性化を指標に、上記細胞モデル及びマウス個体レベルでの検討を試みた。マウス個体レベルでの検討では、レプチンおよび homocysteine を末梢投与後、視床下部を摘出し、Western blotting 法により STAT3 の活性化の検出を試みた。

4. 研究成果

本研究の検討の結果、小胞体ストレスを惹起させた条件下で、レプチンシグナルである STAT3 のリン酸化が抑制され、それはケミカルシャペロン処理により改善されることを見出した。そこで次にそのメカニズム解明のため、レプチン抵抗性関連因子として知られている suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS3) と PTP1B に着目して検討を行った。その結果、小胞体ストレス誘発下において、SOCS3 の発現量には変化はみられなかった。一方で、PTP1B の活性を阻害することで、小胞体ストレスによるレプチン抵抗性の改善がみられた。以上の結果から、小胞体ストレスによるレプチン抵抗性には、SOCS3 は関与しておらず、PTP1B が関与していることが示唆された。したがって、小胞体ストレスがレプチン抵抗性 (肥満) の発症に関与している可能性が示唆された (図 1)。

さらに、homocysteine が、in vitro および in vivo 実験系において、レプチン抵抗性を惹起する可能性が明らかになった。従って、homocysteine が、肥満の危険因子となる可能性も考えられ、今後のさらなる詳細な検討が必要と考えられた (図 1)。

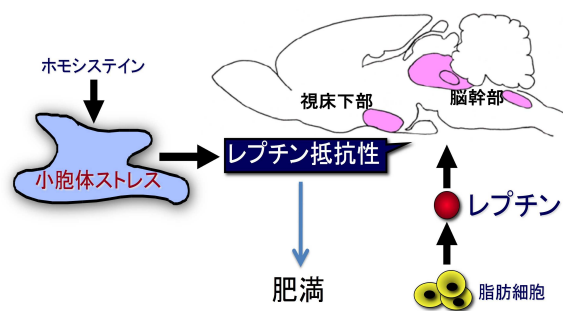


図1 本研究で明らかにした、肥満(レプチン抵抗性)のメカニズム

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6件)

1. Hosoi T., Sasaki M. Baba S. & Ozawa K. (2009) Effect of pranoprofen on endoplasmic reticulum stress in the primary cultured glial cells *Neurochemistry International* 54 (1) :1-6. (査読有り)

2. Hosoi T., Sasaki M., Miyahara T., Hashimoto C., Matsuo S., Yoshii M. & Ozawa K. (2008) Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Molecular Pharmacology* 74 (6) :1610-1619. (査読有り)

3. Hosoi T., Saito A., Kume A., Okuma Y., Nomura Y. & Ozawa K. (2008) Vanadate inhibits endoplasmic reticulum stress responses. *European Journal of Pharmacology* 594 (1-3) :44-8. (査読有り)

4. Hosoi T., Hyoda K., Okuma Y., Nomura Y. & Ozawa K. (2007) Inhibitory effect of 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor, on PI3K inhibitor-induced CHOP expression. *European Journal of Pharmacology* 554 (1) :8-11. (査読有り)

5. Hosoi T., Hyoda K., Okuma Y., Nomura Y. & Ozawa K. (2007) Akt up- and down-regulation in response to endoplasmic reticulum stress. *Brain Research* 1152:27-31. (査読有り)

6. Hosoi T., Hyoda K., Okuma Y., Nomura Y. & Ozawa K. (2007) Geldanamycin induces CHOP expression through a 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride-responsive serine protease. *Cell Research* 17 (2) :184-186. (査読有り)

[学会発表] (計7件)

1. 細井 徹, 佐々木 珠也子, 橋本 千恵, 宮原 強, 松尾俊, 吉井 美智子, 小澤 光一郎 レプチンシグナルにおよぼす小胞体ストレスの影響 第47回 中国四国支部学術大会 (2008年11月9日、岡山市)

2. 細井 徹 肥満とレプチン (2) 第63回広島医療情報研究会 (2008年8月2日、広島市)

3. 細井 徹 肥満とレプチン (1) 第62回広島医療情報研究会 (2008年5月30日、広島市)

4. 細井 徹, 佐々木 珠也子, 橋本 千恵, 宮原 強, 松尾 俊, 吉井 美智子, 小澤 光一郎 小胞体ストレスによるレプチンシグナルへの影響~SOCS3 および PTP1B の関与の検討~ 日本薬学会第128年会 (2008年3月26-28日、横浜市)

5. 細井 徹, 佐々木 珠也子, 橋本 千恵, 宮原 強, 松尾 俊, 吉井 美智子, 小澤 光一郎 小胞体ストレスによるレプチン抵抗性のメカニズムの解明 第81回日本薬理学会年会 (2008年3月17-19日、横浜市)

シンポジウム発表:

6. 細井 徹, 小澤 光一郎 小胞体ストレスのレプチン抵抗性への関与の可能性 日本薬学会第127年会 (2007年3月28日-3月30日、富山市)

7. 細井 徹, 橋本 千恵, 宮原 強, 吉井 美智子, 小澤 光一郎 レプチンシグナルにおよぼす小胞体ストレスの影響 第80回日本薬理学会年会 (2007年3月14-16日、名古屋市)

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/tiryou/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細井 徹 (HOSOI TORU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：40379889

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者