

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790892

研究課題名 (和文) レプチン抵抗性の分子メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Elucidation of molecular mechanisms of the leptin resistance

研究代表者

日下部 徹 (KUSAKABE TORU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60452356

研究成果の概要 (和文)：レプチン抵抗性を有する高脂肪食誘導性肥満マウスを用いて、膵 β 細胞由来ホルモンであるアミリンが、レプチンの抗肥満作用だけではなく抗糖尿病作用をも改善することを示した。その改善メカニズムとして、肝臓・骨格筋内における脂質蓄積の減少、骨格筋 AMPK の活性化が関与する可能性を示した。今回得られた結果は、レプチン・アミリンが肥満2型糖尿病に対して有用な治療薬になりうることを意味する。

研究成果の概要 (英文) : Leptin (L)/amylin (A) co-administration significantly reduced food intake and body weight in leptin-resistant diet-induced obesity mice, while administration of L or A alone had no effects. L/A co-administration enhanced insulin sensitivity associated with decreased tissue triglyceride content and increased $\alpha 2$ AMP-activated protein kinase (AMPK) activity in skeletal muscle. This study demonstrates the beneficial effect of L/A co-administration on glucose and lipid metabolism in DIO mice, indicating the possible clinical usefulness of L/A co-administration as a new anti-diabetic treatment in obesity-associated diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：レプチン・糖尿病・メタボリックシンドローム・肥満・アミリン

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンは、主に視床下部にある受容体を介して、体重減少作用、インスリン感受性亢進作用、糖脂質代謝亢進作用など多彩な生理作用を有することが知られている。

脂肪萎縮性糖尿病のような低レプチン血症を呈する疾患では、低レプチン血症が病態発症に関与しており、レプチン投与が摂食抑制、糖脂質代謝改善をもたらす、レプチンの治療薬としての有用性が既にヒトにおいて

証明されている。また正常レベルの血中レプチン濃度を有する糖尿病においても、レプチン投与が摂食抑制、糖脂質代謝改善をもたらす、レプチンの糖尿病治療薬としての有用性が確認されている。しかしながら、肥満者のような高レプチン血症を呈する疾患では、「レプチン抵抗性」のために、レプチン投与による体重減少作用、糖脂質代謝改善作用は認められず、レプチン単独での肥満者への臨床応用は困難と考えられてきた。

最近、膵 β 細胞由来ホルモンであるアミリ

ンが、レプチンの抗肥満作用を改善させる可能性が報告され、再びレプチン系を用いた肥満・糖尿病治療の可能性が示された。レプチン抵抗性のメカニズムを明らかにすること、またレプチン抵抗性改善薬を探索することは、今後、肥満、糖尿病、高脂血症を有するメタボリックシンドロームの包括的治療を考えるにあたり重要な治験をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

レプチン抵抗性の発症および改善メカニズムを明らかにし、レプチンのメタボリックシンドローム治療薬としての可能性を検討する。さらにレプチン抵抗性改善薬あるいは改善条件を探索する。

3. 研究の方法

(1) レプチン抵抗性を有する高脂肪食誘導性肥満マウスを用いたレプチン・アミリン共投与の摂食、体重、糖脂質代謝に及ぼす効果の検討：

最近、肥満したヒト、ラットにおいて、膵β細胞から分泌されるアミリンが、レプチンの体重減少作用を回復させることが報告された。しかしながら、アミリンによるレプチンの糖脂質代謝亢進作用の回復効果については十分に検討されていない。そこで高脂肪食で誘導したレプチン抵抗性肥満マウス（DIOマウス）において、レプチン、アミリンの単独投与、あるいはレプチン・アミリンの共投与を、浸透圧ミニポンプを用いて14日間行い、レプチン・アミリン共投与が糖脂質代謝におよぼす影響を検討した。さらにその作用メカニズムについても検討を加えた。

(2) レプチン過剰発現トランスジェニックマウスを用いたレプチン抵抗性改善薬および改善条件の探索：

これまでに我々は、生体におけるレプチン作用の解析を目的として、肝臓特異的レプチン過剰発現トランスジェニックマウス（LepTg）を作製した。LepTgは、通常食飼育下ではレプチン抵抗性が認められず、レプチンの抗肥満作用、抗糖尿病作用のため、对照マウスと比較して、やせ、良好な糖脂質代謝を示している。しかしながら、LepTgを高脂肪食下で飼育するとレプチン抵抗性が誘導され、その表現型が消失し、肥満、インスリン抵抗性をはじめとする糖脂質代謝異常を呈する。このLepTg/HFDマウスは、DIOマウスとは異なり、肝臓より高濃度のレプチンを分泌しつづけるため、レプチン抵抗性が回復し脂肪重量が減った後も高い血中レプチン濃度を維持できるため、レプチン抵抗性を改善させる薬剤や条件を検討しやすいと考え

られる。そこで我々は、LepTg/HFDマウスを用いて、レプチン抵抗性を改善させる種々の薬剤および条件について検討した。

4. 研究成果

(1) レプチン抵抗性を有する高脂肪食誘導性肥満マウスを用いたレプチン・アミリン共投与の摂食、体重、糖脂質代謝に及ぼす効果の検討：

我々は8週齢の野生型C57Bl/6Jマウスを5週間45%高脂肪食下で飼育することで、DIOマウスを作成した。このマウスに対して、レプチン（L, 500 μg/kg/day）、アミリン（A, 100 μg/kg/day）を14日間持続皮下投与し、摂食・体重、糖脂質代謝におよぼす影響を検討した。

・摂食量、体重に及ぼす効果

DIOマウスにおいて、L単独では有意な摂食量減少も体重減少も認められず、このマウスはレプチン抵抗性状態にあると考えられた。しかしながら、A単独では効果を示さない用量のAと共投与することで、对照マウスと比較して有意な摂食量減少（図1）および体重減少作用（図2）が得られた。

図1：レプチン・アミリン共投与の摂食量に対する効果

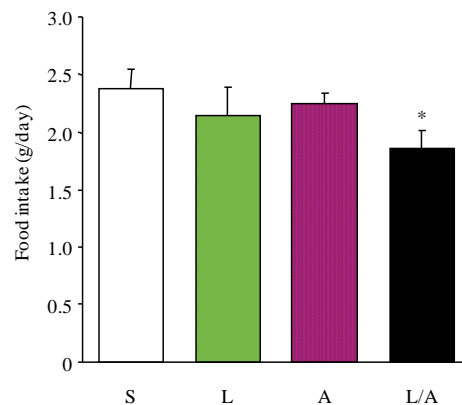
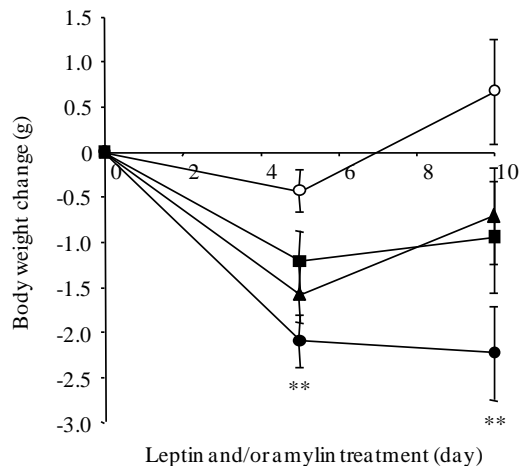


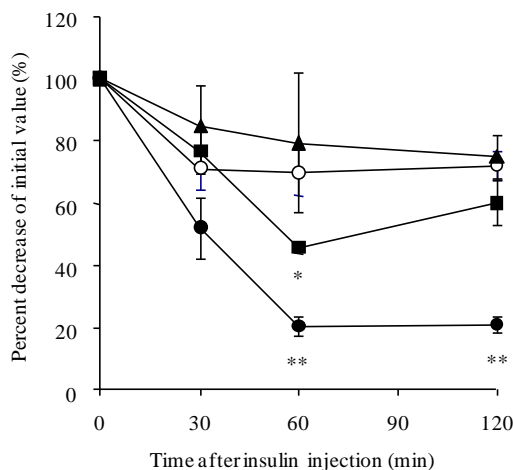
図2：レプチン・アミリン共投与の体重に対する効果



・糖代謝、インスリン感受性に及ぼす効果

L/A 共投与群では、L、A 単独投与群と比較して、随時血糖値は全群で正常のままであったが、血中インスリン濃度は L+A 群においてのみ対照群と比較して 48%の低下 ($p < 0.05$) が認められ、インスリン感受性の亢進が示唆された。実際、インスリン投与試験において、L+A 群においてのみ対照群と比較して有意な血糖降下が認められた (図 3)。

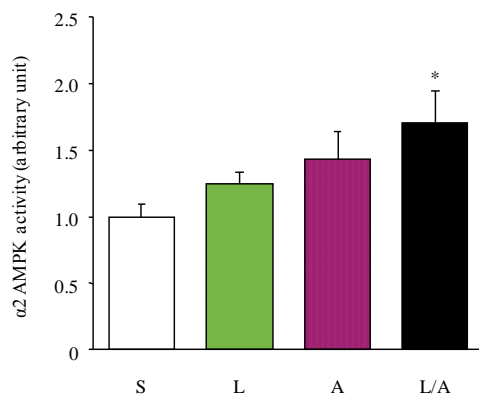
図 3：レプチン・アミリン共投与のインスリン感受性に対する効果



・異所性脂肪蓄積および骨格筋 AMPK 活性に及ぼす効果

脂肪組織以外の肝臓や骨格筋における脂肪蓄積 (異所性脂肪蓄積) はインスリン抵抗性を惹起することが知られている。そこで、本実験系において、インスリン感受性改善のメカニズムを検討する目的で、異所性脂肪蓄積を評価したところ、L/A 共投与群においてのみ、肝臓内中性脂肪含量は対照群と比較して 42%低下 ($p < 0.05$) し、骨格筋内中性脂肪含量は対照群と比較して 46%低下 ($p < 0.05$) していた。

図 4：レプチン・アミリン共投与の骨格筋 $\alpha 2$ -AMPK 活性に対する効果



近年、レプチンは骨格筋 AMPK 活性の活性化を介して、異所性脂肪蓄積を減少させるという報告がなされている。そこで、本実験系においても、骨格筋 AMPK 活性を評価したところ、L、A 単独投与群では骨格筋 AMPK の活性化は認められなかったが、L/A 共投与群において、骨格筋 AMPK 活性は 1.7 倍に増強 ($p < 0.05$) が認められた (図 4)。

以上、高脂肪食で誘導したレプチン抵抗性肥満マウスを用いて、アミリンはレプチンの抗肥満作用のみならず、抗糖尿病作用も改善することが示された (論文投稿中)。

(2) レプチン過剰発現トランスジェニックマウスを用いたレプチン抵抗性改善薬および改善条件の探索：

肝臓でレプチンを過剰発現するトランスジェニックマウスを高脂肪食下で飼育して得られた肥満マウス (LepTg/HFD マウス) を用いて、アミリンとは別に、レプチンシグナルを賦活化させる条件や薬剤を in vivo のレベルで探索した。

現在、アミリン以外に Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) についても、摂食、体重調節、糖脂質代謝調節においてレプチンとの共作用が観察されており、その詳細な解析を行っている。

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 K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Nakao. (8 人中 5 番目) Irbesartan treatment up-regulates hepatic expression of PPARalpha and its target genes in obese Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats: a link to amelioration of hypertriglyceridaemia. *Br J Pharmacol.* 160:1796-1807, 2010. 査読有
- ② K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Nakao. (9 人中 6 番目) Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia.* 2010. in press 査読有
- ③ T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Nakao. (20 人中 9 番目) Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. *Metabolism.* 59: 1241-1251, 2010. 査読有
- ④ M. Iwanishi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Nakao. (8 人中 3 番目) Clinical characteristics and efficacy of pioglitazone in a Japanese diabetic patient with an

unusual type of familial partial lipodystrophy. *Metabolism*. 58:1681-1687, 2009. 査読有

- ⑤ K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Nakao. (10人中6番目) An adipose tissue-independent insulin-sensitizing action of telmisartan: a study in lipodystrophic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 331: 1096-103, 2009. 査読有
- ⑥ T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Nakao. (12人中1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
- ⑦ T. Kuwabara, T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Nakao. (17人中10番目) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int*. 75:285-941, 2009.

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 日下部徹, レプチンと膵β細胞由来ホルモン、アミリンの共投与による肥満治療の検討, 第31回日本肥満学会, 2010年10月1日-2日, 群馬
- ② 日下部徹, 膵β細胞由来ホルモン、アミリンの糖脂質代謝におけるレプチン抵抗性改善作用の検討, 第31回日本肥満学会, 2010年10月1日-2日, 群馬
- ③ 日下部徹, LMNA 遺伝子異常を伴った部分性脂肪萎縮症に対するレプチン治療の効果, 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010年5月27日-29日, 岡山
- ④ Toru Kusakabe, Amylin enhances the effect of leptin on AMPK activity and energy metabolism in diet-induced obese mice, Keystone Symposia, 2010年4月12日-16日, ウィスラー
- ⑤ Toru Kusakabe, Gene analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japan, 14th International Congress of Endocrinology, 2010年3月26日-30日, 京都
- ⑥ 日下部徹, 2型糖尿病におけるレプチン治療の有用性に関する検討, 第17回臨床医科学フォーラム, 2009年9月12日, 京都
- ⑦ Toru Kusakabe, Translational Research of Leptin in Type 2 diabetes, 第14回アディポサイエンス研究会シンポジウム, 2009年8月22日, 大阪
- ⑧ 日下部徹, 2型糖尿病とレプチン治療の意義, 第10回糖尿病と生活習慣病治療研究会, 2009年6月27日, 京都
- ⑨ Toru Kusakabe, Beneficial effects of leptin on glycemic and lipid control in a mouse

model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet, ENDO2009, 2009年6月10日-13日, ワシントン

- ⑩ 日下部徹, レプチンの2型糖尿病治療薬としての有用性に関する検討, 第80回日本内分泌学会学術総会, 2009年4月23日-25日, 群馬
- ⑪ 日下部徹, 2型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての可能性に関する検討, 第46回日本臨床分子医学会学術集会, 2009年4月12日-13日, 東京

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下部 徹 (KUSAKABE TORU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 60452356