

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

トランスジェニックマウス・スキニーマウスにおける糖代謝解析
—レプチンの新しい糖尿病治療薬としての可能性—

主任研究者 中尾一和 京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科 教授
益崎裕章、小川佳宏、細田公則、海老原健、阿部 恵、林 達也、井上 元、吉政康直
京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科

《KEYWORD; レプチン、糖代謝、インスリン感受性、トランスジェニックマウス (skinny mice)、KKA^y マウス》

【研究要旨】

レプチンは、脂肪組織に由来するホルモンであり、視床下部を介して、摂食量やエネルギー代謝調節に関与することが知られている。我々はレプチン過剰発現トランスジェニックマウス (Tg/+) を作製し、糖代謝とインスリン感受性の亢進を認めている。II型糖尿病モデル動物であるKKA^y マウス (A^y/+) と Tg/+ を交配することにより4種類のF1マウス (Tg/+, A^y/+, Tg/+ : A^y/+, +/+) を得たところ、6週齢のTg/+ : A^y/+ と A^y/+ は共に正常体重であったが、Tg/+ : A^y/+ では、血中レプチン濃度が約8倍に上昇し、糖代謝の亢進が認められた。A^y/+ では既にインスリン感受性の低下が認められた。一方、12週齢のTg/+ : A^y/+ は A^y/+ と同程度の高レプチン血症であるにもかかわらず、A^y/+ 同様の重症の肥満と糖尿病を発症した。摂取カロリー制限により、Tg/+ : A^y/+ と A^y/+ の体重は同程度に減少したが、A^y/+ の血中レプチン濃度が著しく低下したのに対して、Tg/+ : A^y/+ では高レプチン血症が持続して認められ、A^y/+ や +/+ に比較してインスリン感受性の亢進が認められた。以上より、レプチンがKKA^y マウスにおける糖尿病の発症を遅延させること、減量療法における糖代謝改善作用を有することが証明され、肥満に伴う糖尿病におけるレプチンの治療薬としての可能性が示された。

【本文】

我々は、肝臓においてレプチンを過剰産生させることにより、重症肥満者に匹敵する血中レプチン濃度を有し、長期間にわたる全身脂肪組織の消失と糖代謝・交感神経活動の亢進を示すレプチン過剰発現トランスジェニックマウス (Transgenic Skinny Mice) を開発し、解析を進めてきた。最近、脂肪組織が著しく減少した遺伝子操作マウス (Fatless Mice) があいついで報告されたが、これらの血中レプチン濃度は極低値であり、いずれも重症の糖尿病である。一方、Skinny Mice は脂肪組織の消失にも拘わらず正常マウス以上の耐糖能と優れたインスリン感受性を示すことからレプチンが本来、脂肪細胞由来の糖代謝活性化因子であ

る可能性が示唆される。中枢へのレプチン投与により正常マウスの糖代謝が急性に活性化されることから、レプチンの糖代謝亢進作用のかなりの部分は中枢を介するものと考えられている。

Skinny Mice における持続的な高レプチン血症が糖尿病を改善する可能性を明らかにする目的で、II型糖尿病モデルとして遺伝性肥満・糖尿病KKA^y マウスとSkinny Mice の交配モデルを用い、その糖代謝を解析した。1.STZ投与により内因性インスリン分泌を廃絶させてSkinny Mice と対照マウス (非トランスジェニック同胞) を共に重症糖尿病とし、両群マウスの糖尿病治療を試みた。STZにより対照も痩せと顕著な低レプチン血症をきたしたが、中間型インスリンをg体

重あたり0.2mU/日から1.6MU/日まで増量しても高血糖はまったく是正されなかった。一方、高レプチン血症が持続するSkinny Miceでは投与後20日目までにすべて正常血糖に回復した。2.KKAYマウス (A^y/+)とSkinny Mice (Tg/+)を交配させることにより4種類の遺伝子型を持つF1マウスを作成した。A^y遺伝子とレプチン導入遺伝子の両方を有するTg/+ : A^y/+マウスに注目すると、6週齢の血中レプチン濃度は+/+の10倍に達しており、Tg/+と同様の高インスリン感受性を認めた。しかし、同胞のA^y/+では正常体重ながら既に明らかなインスリン抵抗性が観察された。一方、12週齢のTg/+ : A^y/+はレプチン濃度の顕著な上昇にも拘わらず、A^y/+に匹敵する重症の肥満と糖尿病を発症していた。そこで、Tg/+ : A^y/+とA^y/+に対して60%のカロリー制限を行い、代謝変化を解析した。カロリー制限を3週間続けることにより、A^y/+とTg/+ : A^y/+両者の肥満は正常体重にまで減量されたが、著しく上昇していたA^y/+の血中レプチン濃度が劇的に低下したのに対して、Tg/+ : A^y/+の血中濃度は肝臓における恒常的なレプチン過剰発現により減量後も対照の10倍以上の高値を維持した。減量後、A^y/+、Tg/+ : A^y/+両者の血糖値は正常化したかA^y/+は依然として明らかなインスリン抵抗性を示した。一方、Tg/+ : A^y/+ではTg/+に匹敵する優れた高インスリン感受性を回復していた。

以上の結果から、高レプチン血症は肥満のない若齢A^y/+の糖尿病の発症を遅延させ、カロリー制限による肥満の解除に伴ってインスリン抵抗性を強力に改善することが明らかとなった。Transgenic Skinny Miceを用いた今回の研究により、レプチンは糖尿病に対して有用な治療薬となる可能性が示唆され、今後の発展が大いに期待される。

[参考文献]

1. K. Chin, K. Shimizu, T. Nakamura, N. Narai, H. Masuzaki, Y. Ogawa, M. Mishima, T. Nakamura, K. Nakao, and M. Ohi: Changes in intra-abdominal visceral fat and serum leptin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome following nasal continuous positive airway pressure therapy. *Circulation* 1999; 100: 706-712.
2. H. Masuzaki, Y. Ogawa, M. Aizawa-Abe, K. Hosoda, J. Suga, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal yellow agouti mutation: Usefulness of leptin for the treatment of obesity-associated diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1615-1622.
3. N. Satoh, Y. Ogawa, G. Katsuura, Y. Numata, T. Tsuji, M. Hayase, K. Ebihara, H. Masuzaki, K. Hosoda, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: Leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes* 1999; 48: 1787-1793.
4. Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Hosoda, M. Aizawa-Abe, J. Suga, M. Suda, K. Ebihara, H. Iwai, N. Matsuoka, N. Satoh, H. Odaka, H. Kasuga, Y. Fujisawa, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Diabetes* 1999; 48: 1822-1829.
5. K. Ebihara, Y. Ogawa, G. Katsuura, Y. Numata, H. Masuzaki, N. Satoh, M. Tamaki, T. Yoshioka, M. Hayase, N. Matsuoka, M. Aizawa-Abe, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* 1999; 48: 2028-2033.
6. M. Shintani, H. Nishimura, T. Akamizu, S. Yonemitsu, H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Thyrotropin decreases leptin production in rat adipocytes. *Metabolism* 1999; 48: 1570-1574.
7. K. Nakao, Y. Ogawa, H. Masuzaki, M. Aizawa-Abe, K. Ebihara, N. Matsuoka, N. Satoh, T. Hayashi, K. Hosoda, G. Inoue, and Y. Yoshimasa: Potential usefulness of leptin for the treatment of diabetes. In 'Common Diseases: Genetic and Pathogenic Aspects of

- Multifactorial Diseases' , edited by H. Imura, M. Kasuga, and K. Nakao, *Elsevier Science B.V.* pp. 21-30, 1999.
8. M. Shintani, H. Nishimura, S. Yonemitsu, H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Down-regulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: Effects of triacsin C, palmitate and 2-bromopalmitate. *Metabolism* 2000; 49: 326-330.
 9. Y. Yamamoto, Y. Yoshimasa, M. Koh, J. Suga, H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda, H. Nishimura, Y. Watanabe, G. Inoue, and K. Nakao: Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase increases GLUT1 expression and recruits both GLUT1 and GLUT4 at the cell surface in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2000; 49: 332-339.

GLUCOSE METABOLISM IN TRANSGENIC SKINNY MMICE OVEREXPRESSING LEPTIN; POTENTIAL USEFULNESS OF LEPTIN AS AN ANTIDIABETIC AGENT.

Kazuwa Nakao, Hiroaki Masuzaki, Yoshihiro Ogawa, Kiminori Hosoda,
Ken Ebihara, Megumi Abe, Tatuya Hayasi, Gen Inoue, Yasunao Yoshimasa

Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine

Leptin acts as an adipocyte-derived blood-borne satiety factor that can increase glucose metabolism. To elucidate the therapeutic implications of leptin for obesity-associated diabetes, we crossed transgenic skinny mice overexpressing leptin (Tg/+), which we have developed recently, and lethal yellow KKA^Y mice (A^Y/+), a genetic model for obesity-diabetes syndrome, and examined the metabolic phenotypes of F1 animals. At 6 weeks of age, plasma leptin concentrations in Tg/+ mice with the A^Y allele (Tg/+; A^Y/+) were significantly higher than those in A^Y/+ mice. Although no significant differences in body weight were noted among Tg/+; A^Y/+ mice, A^Y/+ mice, and their wild-type lean littermates (+/+), glucose and insulin tolerance tests revealed increased glucose tolerance and insulin sensitivity in Tg/+; A^Y/+ compared with A^Y/+ mice. However, at 12 weeks of age, when plasma leptin concentrations in A^Y/+ mice were comparable to those in Tg/+; A^Y/+ mice, Tg/+; A^Y/+ mice developed obesity-diabetes syndrome similar to that of A^Y/+ mice. Body weights of 12-week-old Tg/+; A^Y/+ and A^Y/+ mice were reduced to those of +/+ mice by a 3-week food restriction; when plasma leptin concentrations remained high in Tg/+; A^Y/+ mice but were markedly reduced in A^Y/+ and +/+ mice, glucose tolerance and insulin sensitivity in Tg/+; A^Y/+ mice were markedly improved as compared with A^Y/+ and +/+ mice. The present study demonstrates that hyperleptinemia can delay the onset of impaired glucose metabolism and accelerate the recovery from diabetes during caloric restriction in Tg/+; A^Y/+ mice, thereby suggesting the potential usefulness of leptin in combination with a long-term caloric restriction for the treatment of obesity-associated diabetes.

Fig. 1

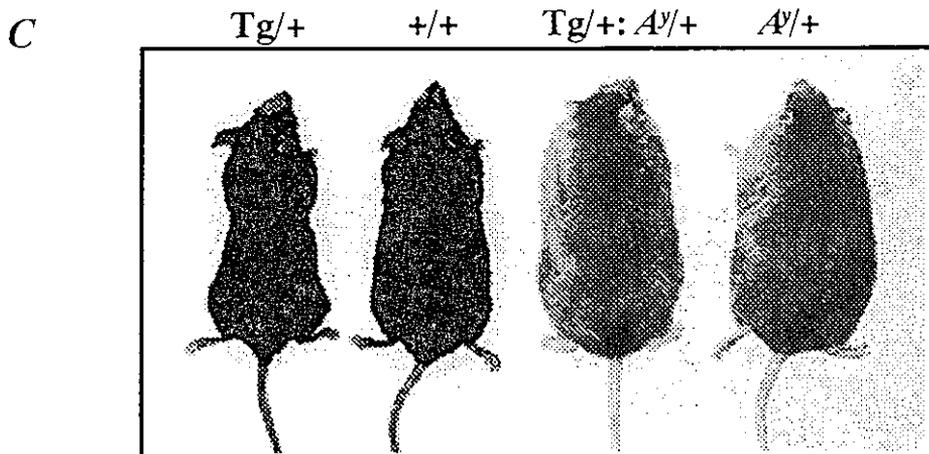
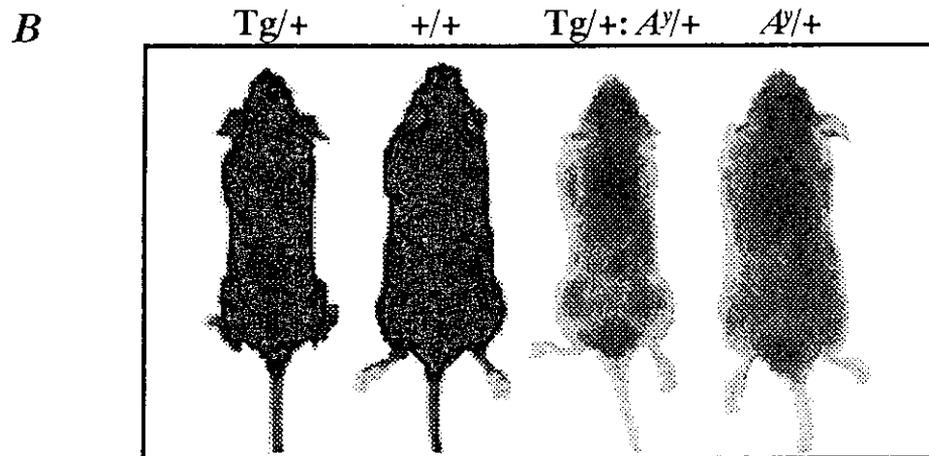
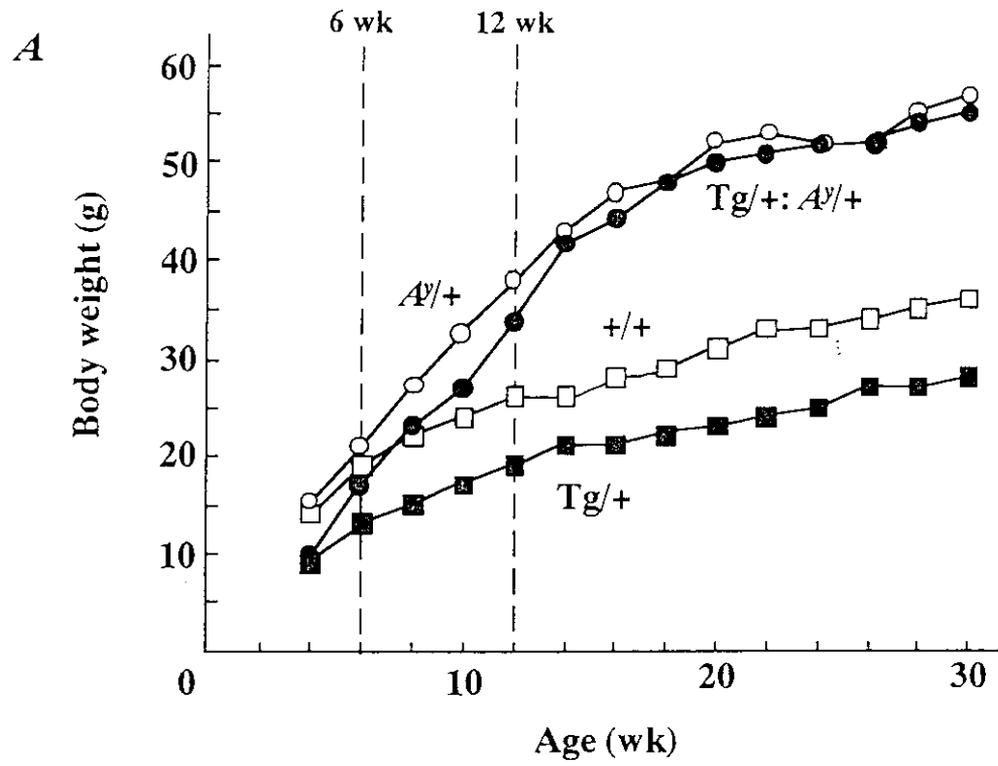


Fig. 2

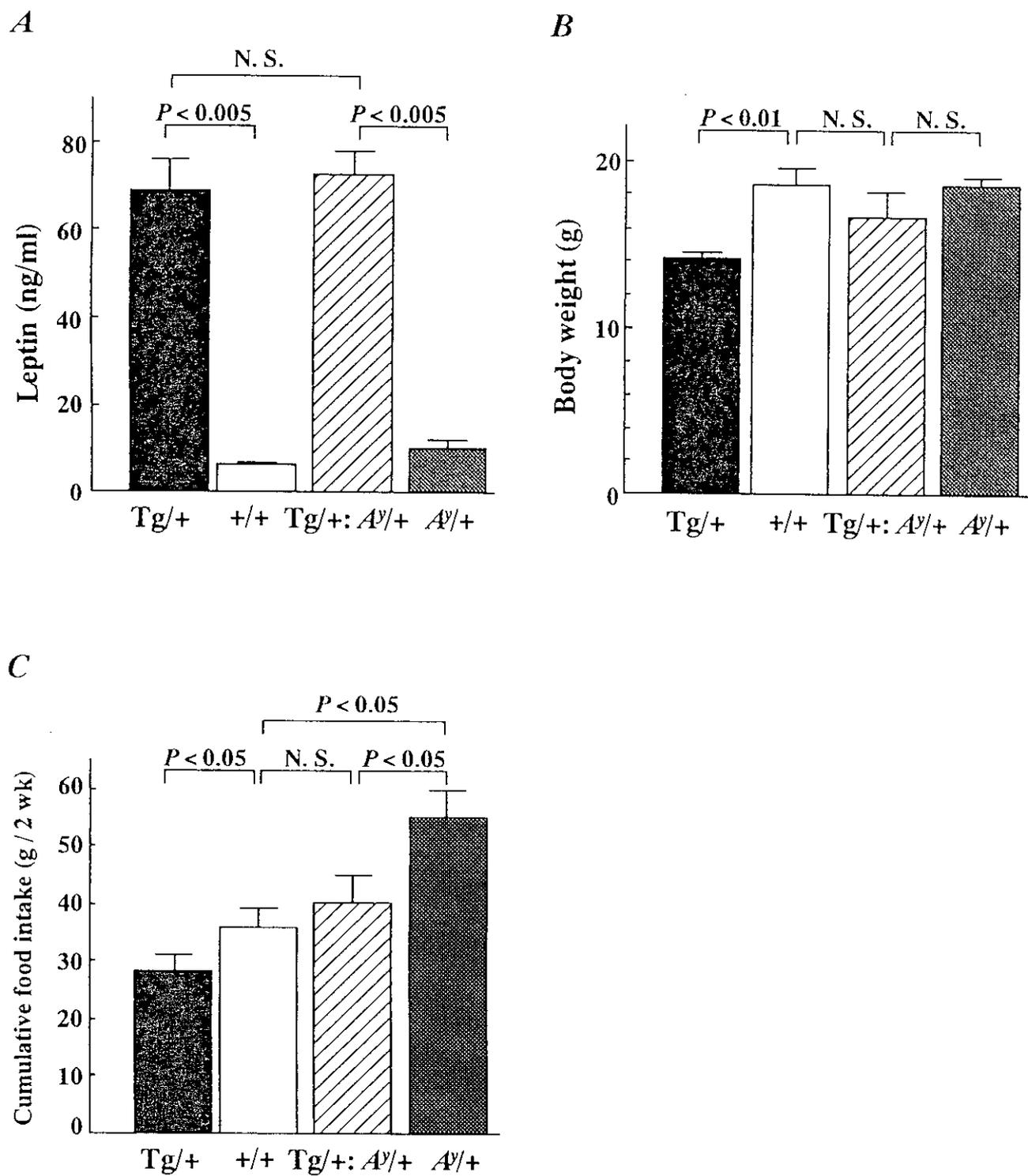
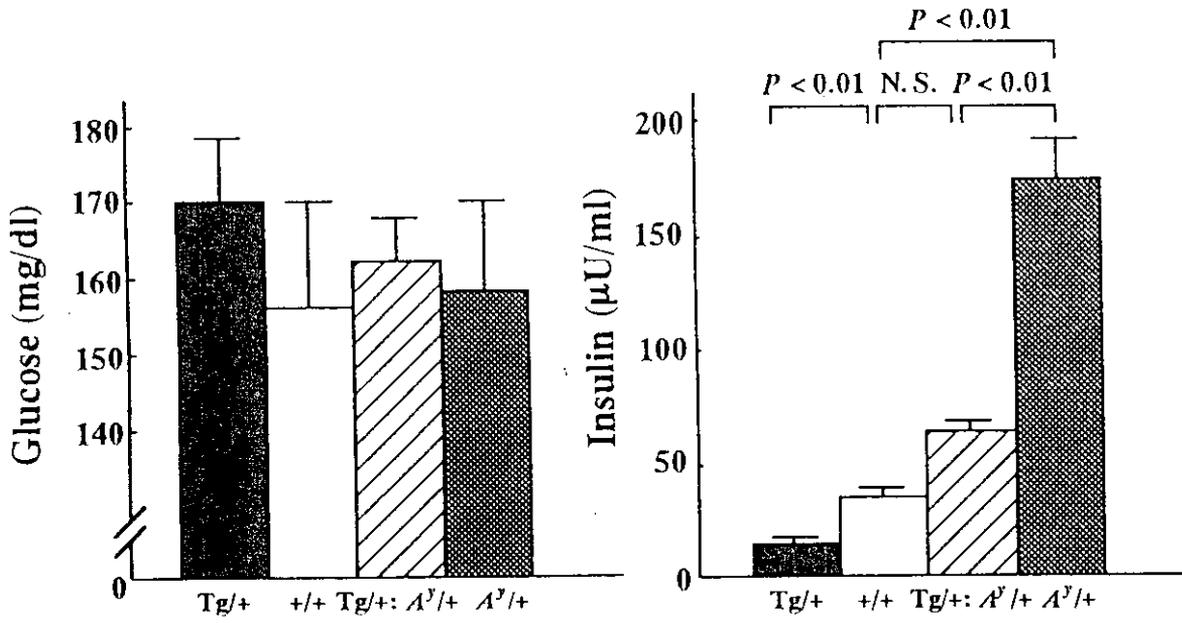
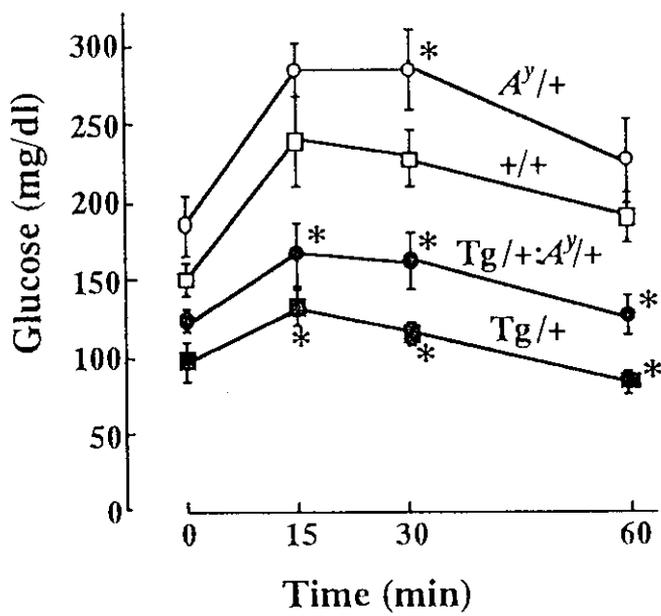


Fig. 3

A



B



C

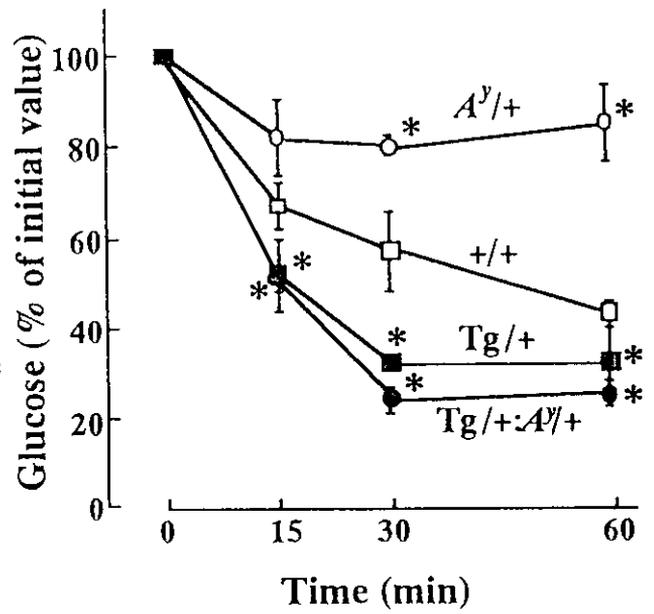
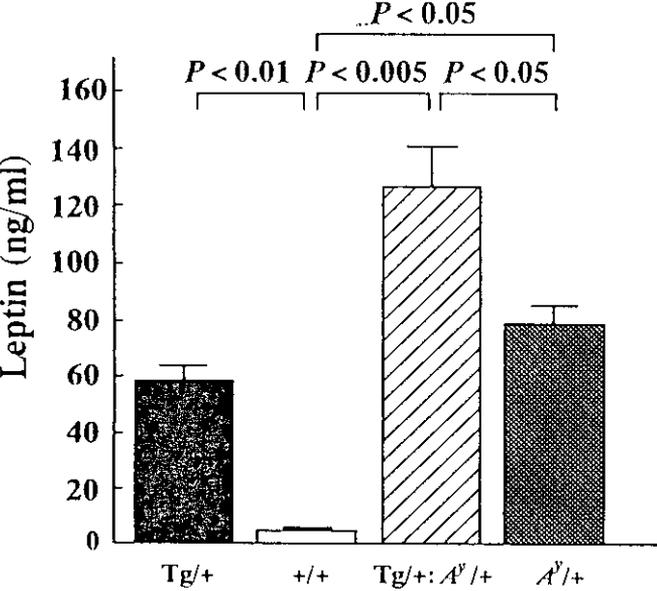
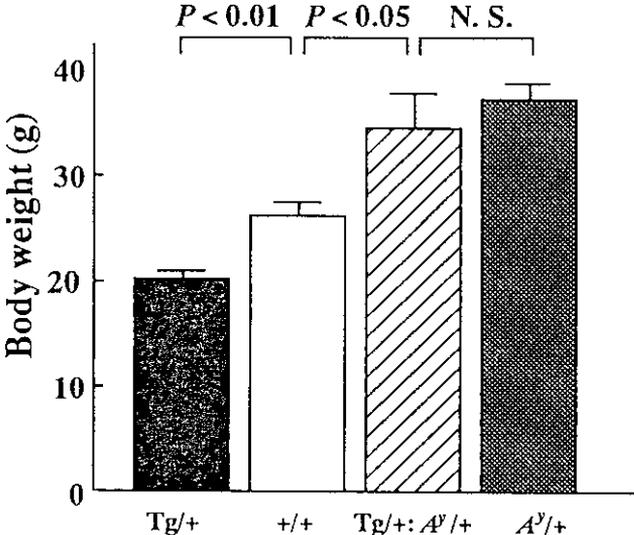


Fig. 4

A



B



C

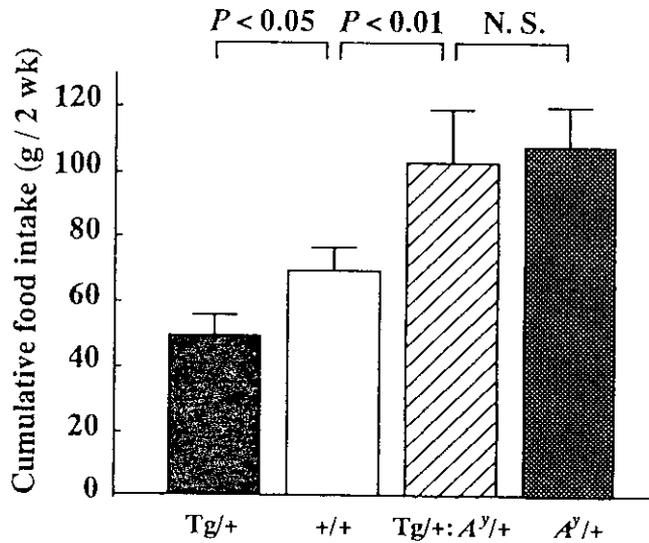
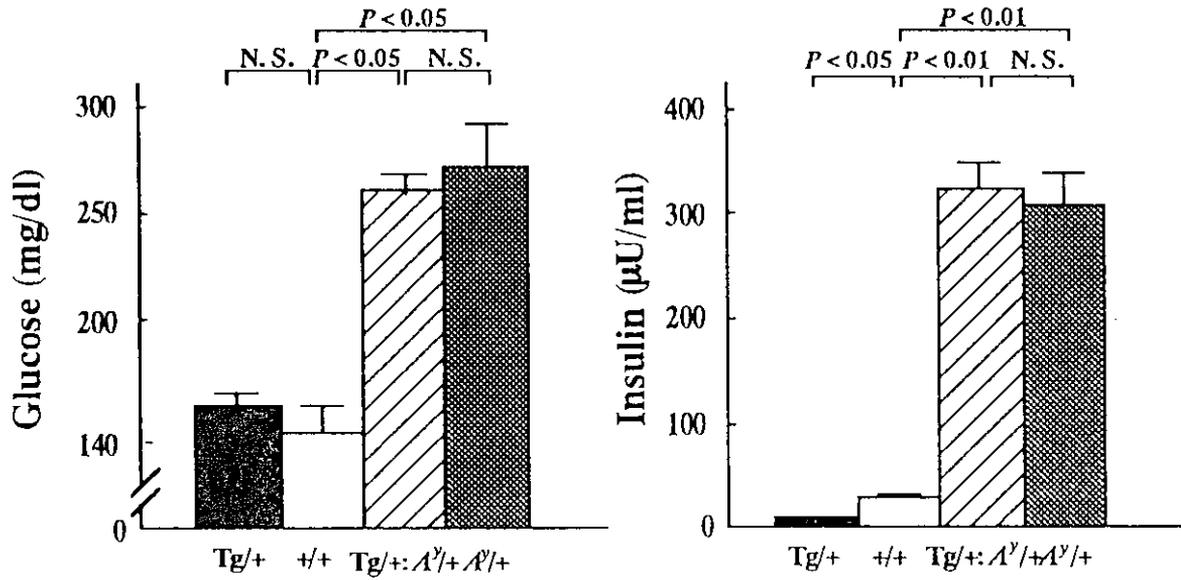
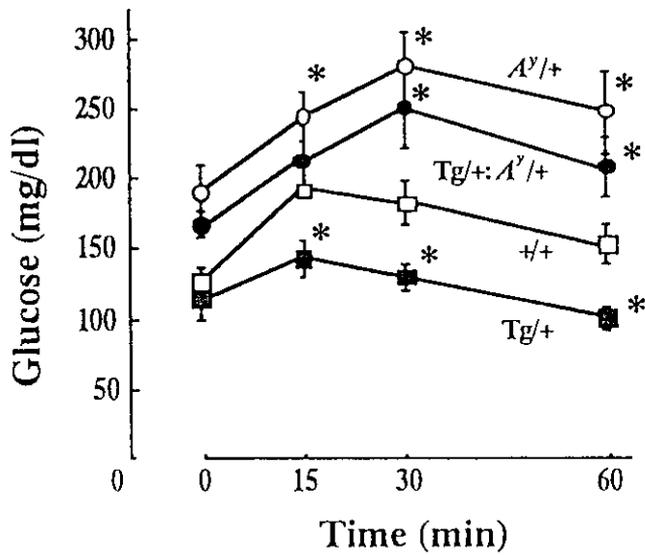


Fig. 5

A



B



C

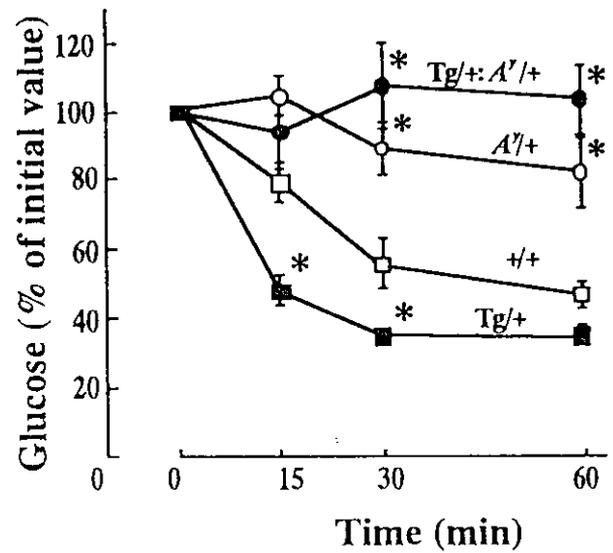
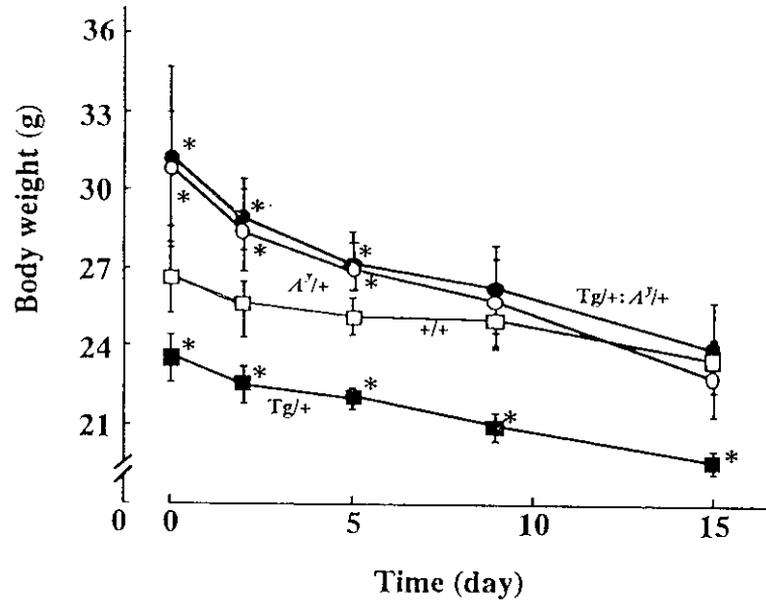
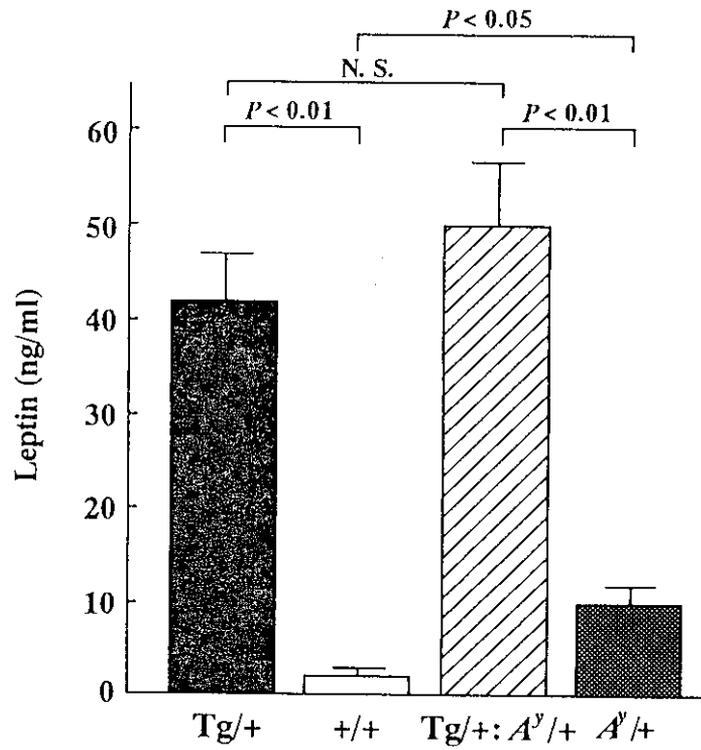


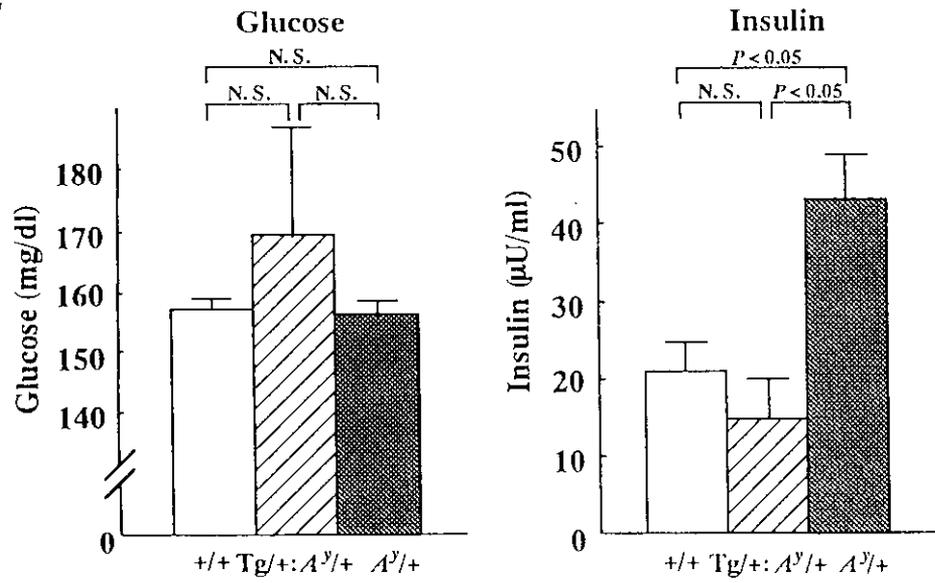
Fig. 6
A



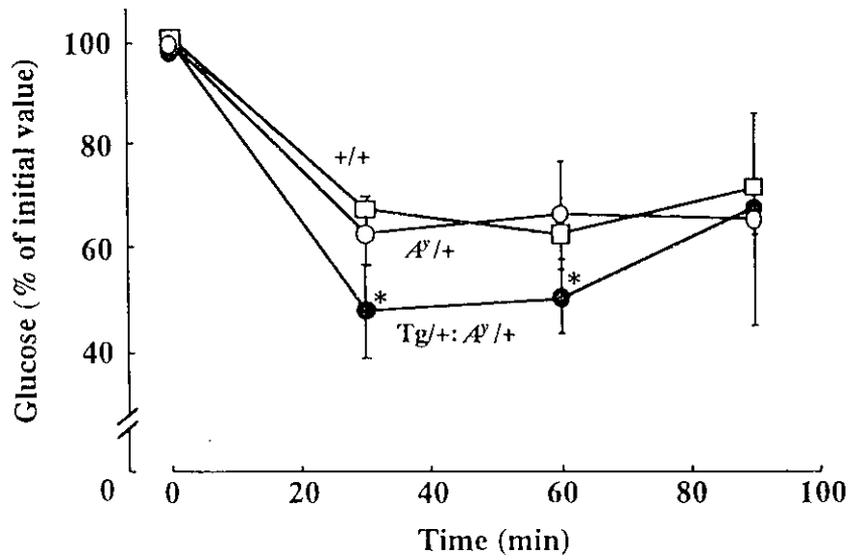
B



C



D



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

中枢性摂食異常症における神経ヒスタミン機能の H₁受容体欠損動物による解析

分担研究者 坂田 利家 大分医科大学医学部第一内科 教授
吉松 博信、正木 孝幸 大分医科大学医学部第一内科

《KEYWORD; 神経ヒスタミン、H₁-受容体、肥満、摂食行動、レプチン、uncoupling protein、食餌誘導性肥満、*db/db* mice》

[研究要旨]

[目的・方法] 中枢性摂食異常症における脳内摂食調節物質の機能異常を明らかにする目的で、histamine H₁-receptor knockout (H1KO) miceを用い、神経ヒスタミン機能について以下の解析を行った。

1) H1KO miceの定常状態における体重、体脂肪量と摂食量の変化、脳内摂食行動調節物質および末梢組織エネルギー調節物質の動態変化を解析した。2) 高脂肪食負荷によるH1KO miceの体重、体脂肪量変化、白色脂肪組織ob gene発現変化を解析した。3) レプチン脳室内投与による摂食抑制作用、体脂肪減少作用およびUCPs mRNA発現亢進作用をH1KO miceで検討した。4) 食餌誘導性肥満マウス、*db/db* miceの脳室内にヒスタミンを投与し、摂食行動変化、体重変化、体脂肪量変化、UCP発現量変化を解析した。これらの肥満動物のH1KOモデルを作製し、ヒスタミンの効果を検討した。

[結果] 1) H1KO miceの摂食量、体脂肪量および体重増加曲線はwild対照群との間に差を認めなかった。H1KO miceでは視床下部におけるneuropeptide Y、pre-opiomelanocortineのmRNA発現量、脂肪組織におけるob、UCP familyのmRNA発現量も対照群との間に差を認めなかった。2) H1KO miceでは高脂肪食負荷による体脂肪量の増加が対照群より大きかった。H1KO miceでは白色脂肪組織ob gene発現量が対照群より増加していた。3) H1KO miceではレプチン投与による摂食抑制作用、体脂肪の減少作用、UCP family mRNAの発現亢進作用が、いずれも減弱した。4) 食事誘導性肥満マウス、*db/db* miceなどのレプチン抵抗性肥満動物でも、ヒスタミンの脳室内注入によって摂食行動抑制、体脂肪の減少およびUCP family mRNAの発現亢進が観察された。それらのヒスタミン作用は同肥満動物のH1KOモデルでは減弱した。

[考察] H1KO miceは定常状態においては、対照群との間で摂食行動や体重に差を認めないが、高脂肪食負荷時には脂肪蓄積が増加する。すなわち神経ヒスタミンがH₁受容体を介して高脂肪食負荷による脂肪蓄積に抑制的に働いていることが示唆される。レプチンによる摂食抑制作用と末梢エネルギー消費亢進作用がH1KO miceで減弱することから、ヒスタミン神経系はレプチンの下流で作動し、食欲調節系と共にエネルギー消費系の制御にH₁受容体を介して関与していることが、明らかになった。また神経ヒスタミンによる抗肥満作用は、レプチン抵抗性肥満動物においても有効であることが確認された。

[本文]

[研究目的]

視床下部神経ヒスタミンは満腹中枢である視床下部腹内側核(VMH)や室傍核(PVN)に存在するH₁受容体を介して摂食行動を抑制的に調節している¹⁾。最近、この神経ヒスタミンが脂肪組織から分泌されるレプチンによって駆動され、その摂食抑制作用に関与していることが判明した²⁾。レプチンは摂食行動を調節するとともに末梢エネルギー代謝を調節することによって過剰な脂肪蓄積を防止する働きを担っている。神経ヒスタミンも摂食抑制作用以外に脂肪分解作用、糖代謝調節作用、体温調節作用など種々の生理機能に関与している^{3,4)}。したがってレプチン-神経ヒスタミンの機能的連動は摂食行動調節だけでなく、広く生体のエネルギー代謝の恒常性維持に寄与していることが考えられる。本年度研究の目的は、レプチンによって駆動される神経ヒスタミンのエネルギー代謝調節作用をヒスタミンH₁-receptor knockout(H1KO) miceを用いて明らかにすることにある。また同時に、レプチン抵抗性肥満動物モデルにおけるヒスタミンの抗肥満作用の有効性について検討する。

[方法]

maleおよびfemaleH1KO miceの定常状態における体重を毎週測定し、その成長曲線を対照群との間で比較した。12週令および30週令のH1KO miceの一日摂食量についても同様に比較検討した。脳内摂食行動調節物質であるneuropeptide Y(NPY)およびpre-opiomelanocortin(POMC) mRNAの視床下部レベルでの発現変化、白色脂肪組織(white adipose tissue, WAT)におけるob gene発現変化、エネルギー消費に関与する褐色脂肪組織(brown adipose tissue, BAT)のuncoupling protein(UCP) 1、WAT UCP2およびUCP3 mRNA発現変化について^{5,6)}、H1KO miceと対照群で比較検討した。

2)高脂肪食負荷(fat 45%、carbohydrate 20%、protein 20%、4.73kcal/g)、低脂肪食負荷(fat 10%、carbohydrate 70%、protein 20%、3.85kcal/g)を8週間行い、それによるH1KO miceの体重変化、負荷後(16週令)での体脂肪量、WAT ob gene 発現変化を測定し、対照群と比較検討した。

3)レプチン側脳室内投与(0.5 μg/mouse/day、3日間)による1日摂食量の変化をH1KO miceで検討した。

同様に、レプチン投与による蓄積脂肪量、BAT UCP1 UCP3、WAT UCP3 mRNA発現変化をpaired H1KO miceを用いて解析した。対照群にはPBSの脳室内投与をおこなった。

4)高脂肪食負荷による食餌誘導性肥満(diet-induced obese, DIO)マウス、*db/db* miceの側脳室内にヒスタミン(0.05 μmol/body weight g/day、7日間)を投与し、摂食行動変化、体重変化、脂肪蓄積量変化、BAT UCP1、WAT UCP3 mRNA発現量変化を解析した。これらの肥満動物のH1KOモデルを作製し、ヒスタミンの効果を検討した。

[結果および考察]

1. H1KO miceの定常状態における体重増加曲線、体脂肪量、摂食量変化と視床下部NPY、POMC mRNA、WAT ob gene、BAT UCP1、WAT UCP2 UCP3 mRNA 発現変化H1KO miceは雌雄ともに定常状態において対照群と同様の成長曲線を示した(図1A,B)。摂食量(図1C,D)、体重、体脂肪量についても12週令および30週令において対照群との間に差を認めなかった。H1KO miceでは視床下部におけるNPY、POMCのmRNA発現量が12週令と30週令ともに対照群と差がなかった(図2A,B)。WAT ob gene、BAT UCP1、WAT UCP2 UCP3の各mRNA発現量も対照群との間に差を認めなかった(図2A,B)。

神経ヒスタミンはH₁受容体を介して摂食行動を抑制的に調節している¹⁾。したがってHKO miceにおいては神経ヒスタミンの脱抑制の結果、摂食量が増加し、それにともない体重および体脂肪量が増加することが予想される。しかし本実験結果が示すように、定常状態のH1KO miceにおいて特異的な表現型の変化を認めない。それを裏付けるように視床下部の摂食調節物質であるNPYやPOMCなどの神経ペプチドにも変化がなく、末梢のob gene発現やUCP familyにも変化がない。このことはH1KO miceを用いて神経ヒスタミンの機能異常を解析するにあたって、ヒスタミン系を駆動させるような刺激負荷が必要であることを示唆している。事実、後述するように、高脂肪食負荷においてH₁受容体欠損の影響が表面化してくる。

2. 高脂肪食および低脂肪食負荷時の体重、体脂肪量、WAT ob gene 発現変化に対するH₁受容体欠損の影響

高脂肪食負荷は低脂肪食負荷に比べ、H1KO mice

と対照群の両者でその体重を有意に増加させたが($p < 0.01$ for each)、HIKO miceと対照群の間では体重増加に差を認めなかった。高脂肪食負荷によって、HIKO mice および対照群の体脂肪量と体脂肪率が増加した($p < 0.01$ for each vs low fat diet)。高脂肪食による体脂肪量と体脂肪率の増加は、対照群に比べHIKO miceでより顕著であった($p < 0.05$ vs wild type controls)。WAT ob gene 発現はHIKO miceと対照群ともに高脂肪食負荷によって増強されたが($p < 0.01$ for each vs low fat diet)、その変化はHIKO miceにおいてより著明であった($p < 0.05$ vs controls)。

高脂肪食負荷による体重増加に対して H_1 受容体欠損の影響は明らかではなかったが、体脂肪量の増加がHIKO miceでより著しいことが判明した。すなわち、神経ヒスタミンが高脂肪食という刺激負荷によって駆動され、 H_1 受容体を介して脂肪蓄積に抑制的に作用していたことになる。神経ヒスタミンには摂食行動抑制作用の他にも、交感神経系を介した中枢性の脂肪分解作用³⁾、さらに後述する末梢UCPfamily発現調節によるエネルギー消費亢進作用がある。したがって H_1 受容体欠損による脂肪蓄積の増加については、神経ヒスタミンの機能脱落による摂食抑制作用の減弱以外にも脂肪分解能の低下やエネルギー消費の低下といった末梢要因の関与が考えられる。現在のところ、高脂肪食負荷時のHIKO miceの摂食量が対照群に比べ差がないことから、後者の末梢要因が重要であると考えられる。今回、高脂肪食負荷時にWAT ob gene 発現がHIKO miceで増強されることも明らかになった。HIKO miceでの体脂肪量の増加がより著明であることから、この減少は末梢脂肪蓄積を反映したものであると考えることもできる。しかし、神経ヒスタミンには交感神経系を介すると考えられるob gene 発現抑制作用がある。したがってHIKO miceにおけるob geneの発現増強には、 H_1 受容体欠損による神経ヒスタミンの作用不全によって生じる交感神経活動の低下が関与していることも考えられる。高脂肪食負荷時に神経ヒスタミンを駆動する物質としては、肥満にもなって増加するglucoseやinsulinの影響が考えられるが、両者の可能性は低い。神経ヒスタミンは、むしろ低血糖によって活性化されること、またinsulinそのものの影響は受けないことが立証されているからである。したがって高脂肪食負荷時の神経ヒスタミンへの信号は脂肪組織から分泌されるレプチンが担っている可能

性が高い。

3. レプチン中枢投与による摂食行動、体脂肪、UCP family発現の変化に対する H_1 受容体欠損の影響
レプチンの脳室内投与はHIKO miceおよび対照マウスの1日摂食量を有意に減少させた($p < 0.01$ for each) (図4)。このレプチンによる摂食抑制作用は対照群に比べ、HIKO miceにおいて有意に減弱していた($p < 0.05$) (図4)。レプチンの脳室内投与によってpair-fed対照群の体脂肪率が有意に減少した($p < 0.05$) (図5A)。レプチンによる体脂肪減少作用はpair-fed対照群に比べ、pair-fed HIKO miceでは減弱していた($p < 0.05$) (図5A)。BAT UCP1、UCP3、WAT UCP3の各mRNA発現はレプチンの脳室内投与により有意に増加した($p < 0.01$ for each) (図5B,C,D)。レプチンによるUCP familyの発現亢進作用はpair-fed HIKO miceでは減弱していた(図5B,C,D)。

我々は最近、神経ヒスタミンがレプチンの中枢作用において、そのtarget物質の一つとして重要な役割を果たしていることを明らかにした³⁾。レプチンの中枢投与により神経ヒスタミンの代謝回転が亢進する。またレプチンの摂食抑制作用は、神経ヒスタミンの合成酵素であるhistidine decarboxylaseの阻害薬である α -fluoromethylhistidine(FMH)の前処置でヒスタミンを枯渇化させると、有意に減弱される。すなわち、レプチンは神経ヒスタミンを介して摂食抑制作用を発揮していると考えられる。今回のHIKO miceを用いた実験でも、レプチンの摂食抑制作用は H_1 受容体の欠損によって減弱しており、FMHを用いた神経ヒスタミンの枯渇化による影響と同様である。それらに加え今回は、レプチンによる体脂肪の減少作用にも神経ヒスタミンが介在物質として関与している可能性が示唆された。体脂肪の減少にはレプチンによる摂食抑制作用が影響する。したがって、HIKO miceにおけるレプチンの摂食抑制作用の減弱は体脂肪の蓄積に促進的に働くことになる。そこで、これら摂食量の変化が体脂肪蓄積に与える影響を排除する目的で、pair-fed群を用いて実験を行った。その結果、レプチンはその摂食抑制作用とは独立して、体脂肪量を減少させること、 H_1 受容体欠損の影響も摂食量の変化とは独立して認められることが判明した。神経ヒスタミンおよび H_1 受容体を介するレプチンの体脂肪減少作用には、神経ヒスタミンによる脂肪分解作用の関与が考えられる。我々はin vivo microdialysis法を用いた実験に

より、視床下部の神経ヒスタミンの活性化が、交感神経系を介して脂肪組織から放出されるグルセロール量を増加させることを報告した³⁾。すなわち、レプチン-神経ヒスタミン-H₁受容体-交感神経-脂肪組織という経路で中枢性脂肪分解機構が存在しており、この脂肪分解機能がH₁受容体欠損により阻害された結果、レプチンの体脂肪減少作用は減弱すると考えられる。また今回の実験結果が示すように、H1KO miceではレプチンによるBATおよびWATのUCP familyの発現亢進作用が減少している。このことは、レプチン-神経ヒスタミン-H₁受容体が末梢のUCP familyによるエネルギー消費系にも促進性に作用していることを示している。H1KO miceにおけるレプチン誘導性UCP発現亢進作用の減弱はエネルギー消費の低下につながり、これもレプチンの体脂肪減少作用を弱めることになる。

4. 肥満モデル動物におけるヒスタミン作用

以上の研究により、神経ヒスタミンがレプチンの下流として、その摂食抑制作用、体脂肪減少作用、エネルギー消費亢進作用などに関与していることが判明した。そこで、この神経ヒスタミン機能がレプチン抵抗性を示す肥満動物においても有効に作動するかどうかについて解析した。

DIOマウスでは、ヒスタミンの脳室内投与によって1日摂食量がPBS投与対照群の25.5%減少し、体重も18.8%減少した($p < 0.01$ for each) (図6A,C)。正常体重マウスでは、ヒスタミン投与による摂食量減少は11.2% ($p < 0.01$ vs PBS controls)で、体重減少は7.1% ($p < 0.05$ vs PBS controls)であった(図6A,C)。*db/db* miceでは、ヒスタミン投与により31.7%の摂食量減少 ($p < 0.01$ vs PBS controls) (図6B)と13.3%の体重減少 ($p < 0.01$ vs PBS controls) (図6D)が観察された。対照のC57Ksj miceではヒスタミン投与により、16.8%の摂食量減少 ($p < 0.05$ vs PBS controls) (図6B)と6.1%の体重減少 ($p < 0.05$ vs PBS controls) (図6D)が認められた。図7に示すようにヒスタミンの脳室内投与はDIOマウスや*db/db* miceの蓄積脂肪の減少にも有効であった。特にmesenteric fat、retroperitoneal fat、epididymal fatなど内臓脂肪の蓄積を有意に抑制した ($p < 0.05$ for each)。またその効果はDIOマウスおよび*db/db* miceのpair-fed群と比較しても有意に認められた ($p < 0.05$ for each)。ヒスタミン投与は皮下脂肪の蓄積には影響を与えなかった。DIOマウスおよび

db/db miceにおいて、ヒスタミン投与はBAT UCP1およびWAT UCP3 mRNAの発現を増加させた ($p < 0.01$ for each) (図8 A,B)。このヒスタミンによるUCP発現亢進作用はH₁受容体を欠損させたDIOマウス、または*db/db* miceとH1KO miceのdouble mutant miceでは減弱していた ($p < 0.05$ for each) (図9A,B)。

DIOマウスは肥満にともなうレプチン抵抗性により、また*db/db* miceはレプチン受容体異常により、ともにレプチン作用が阻害される肥満動物モデルである。特に*db/db* miceにおいてはレプチン作用不全の結果、視床下部の神経ヒスタミンレベルが低下していることも明らかになっている³⁾。このような動物ではその肥満の是正にレプチンは無効であり、レプチンの下流に存在する神経ヒスタミンやCRHの機能に肥満治療薬としての可能性が求められる。今回の実験結果より、ヒスタミンはこれらレプチン作用不全を有する肥満動物の摂食抑制、内臓脂肪減少、UCP family発現亢進にいずれも有効であることが判明した。特に脂肪蓄積の減少やUCP発現亢進は摂食抑制作用とは独立して発揮されており、前述した神経ヒスタミンによる交感神経系活動促進作用の関与が示唆される。また、ヒスタミンの体脂肪減少作用が皮下脂肪ではなく、内臓脂肪において著しいことは、ヒスタミンが内臓脂肪蓄積にともなう肥満合併症の防止に有効である可能性を示唆しており、今後の重要な研究課題である。

[結論]

H1KO miceは定常状態においては、対照群との間で摂食行動や体重に差を認めないが、高脂肪食負荷時には脂肪蓄積が増加する。すなわち神経ヒスタミンがH₁受容体を介して高脂肪食負荷による脂肪蓄積に抑制的に働いていることが示唆される。レプチンによる摂食抑制作用、体脂肪減少作用と末梢エネルギー消費亢進作用がH1KO miceで減弱することから、ヒスタミン神経系はレプチンの下流で作動し、食欲調節系とともに脂肪分解やエネルギー消費系の制御にH₁受容体を介して関与していることが、明らかになった。また神経ヒスタミンによる抗肥満作用は、レプチン抵抗性肥満動物においても有効であり、特に内臓脂肪の蓄積を抑制することが判明した。

[参考文献]

1. Sakata T, Yoshimatsu H, Kurokawa M:

- Hypothalamic neuronal histamine: Implications of its homeostatic control of energy metabolism. *Nutrition* 1997;13: 403-411.
2. Yoshimatsu H, Itateyama E, Kondou S, Tajima D, Himeno K, Hidaka S, Kurokawa M, Sakata T: Hypothalamic neuronal histamine as a target of leptin in feeding behavior. *Diabetes* 1999; 48: 2286-2291.
 3. Tsuda K, Yoshimatsu H, Nijima A, Hidaka S, Kurokawa M, Chiba S, Okeda T, Sakata T: Hypothalamic neuronal histamine activates lipolysis in rat adipose tissue. *Diabetes* submitted.
 4. Kang M, Yoshimatsu H, Kurokawa M, Ogawa R, Sakata T : Prostaglandin E2 mediates activation of hypothalamic histamine by interleukin-1b in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 220: 88-93.
 5. Masaki T, Yoshimatsu H, Chiba S, Hidaka S, Tajima D, Kakuma T, Kurokawa M, Sakata T: Tumor necrosis factor- α regulates in vivo expression of the rat UCP family differentially. *BBA* 1999; 1436: 585-592.
 6. Hidaka S, Kakuma T, Yoshimatsu H, Sakino H, Fukuchi S, Sakata T: Streptozotocin treatment upregulates uncoupling protein 3 expression in the rat heart. *Diabetes* 1999; 48: 430-435.

TARGETED DISRUPTION OF HISTAMINE H₁-RECEPTOR ATTENUATES REGULATORY EFFECTS OF LEPTIN ON FEEDING, ADIPOSITY AND ENERGY EXPENDITURE IN MICE.

Toshiie Sakata, Hironobu Yoshimatsu, Takayuki Masaki.

Department of Internal Medicine 1, School of Medicine, Oita Medical University.

Hypothalamic neuronal histamine has been shown to suppress food intake through H₁-receptor in the ventromedial hypothalamic nucleus and the paraventricular nucleus. Recently, it has been identified that hypothalamic neuronal histamine is one of the targets for leptin action in the brain. To examine the role of histamine neurons in leptin signaling pathways, H₁-receptor knockout (HIKO) mice was produced to investigate effects of HIKO on leptin-regulated feeding, adiposity and energy expenditure. HIKO mice showed no change in daily food intake, growth curve, body weight or adiposity compared with those parameters in their wild type controls. Reflecting no specific alteration of those parameters, HIKO mice induced no basal changes in mRNA expressions of neuropeptide Y, proopiomelanocortin in the hypothalamus, ob gene or uncoupling protein (UCP) family in peripheral tissues. Loading HIKO mice with high fat diet accelerated more fat deposition and ob gene expression than loading controls with high fat diet. Leptin-induced feeding suppression was attenuated in HIKO mice, indicating involvement of histamine neurons in feeding control as a down-stream signal of leptin. Up-regulation of fat UCPs mRNA and reduction of body fat induced by central infusion of leptin were at least in part abolished in the HIKO mice. Central infusion of histamine during successive 7 days decreased food intake, body weight and body fat weight not only in diet-induced obese (DIO) mice but in *db/db* mice. In agreement with these results, gene expressions of UCP1 in brown adipose tissue and UCP3 in white adipose tissue were both up-regulated by the histamine infusion compared with those in the pair-fed controls of histamine. These suppressive effects of histamine on feeding behavior, body weight and fat deposition and the accelerating effects on UCPs gene expression were attenuated by targeted disruption of H₁-receptor in DIO and *db/db* mice. The present findings provide insights into control of energy homeostasis, i.e., an H₁-receptor plays a key role in maintenance of homeostatic regulation of feeding, fat deposition and UCPs mRNA expression driven as a down-stream of leptin action in the brain. In view of this, HIKO mouse is a novel leptin resistant model.

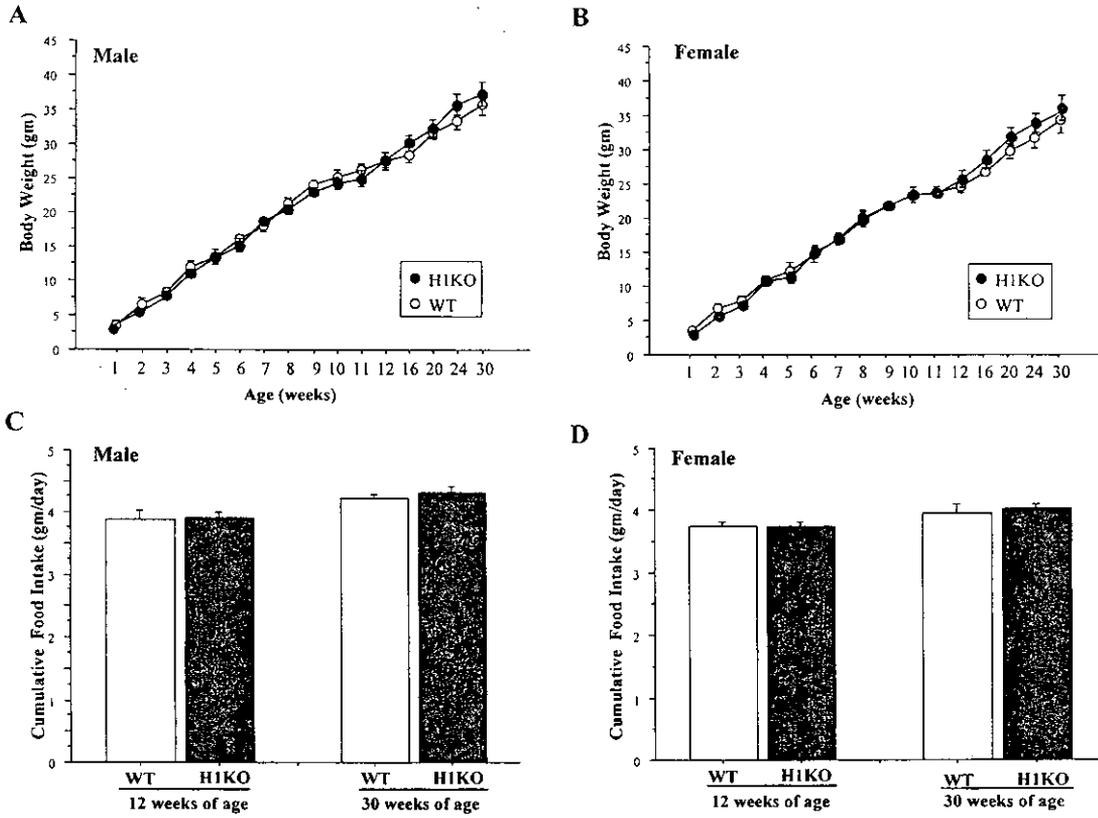


図1 H₁受容体欠損マウスの成長曲線と摂食量

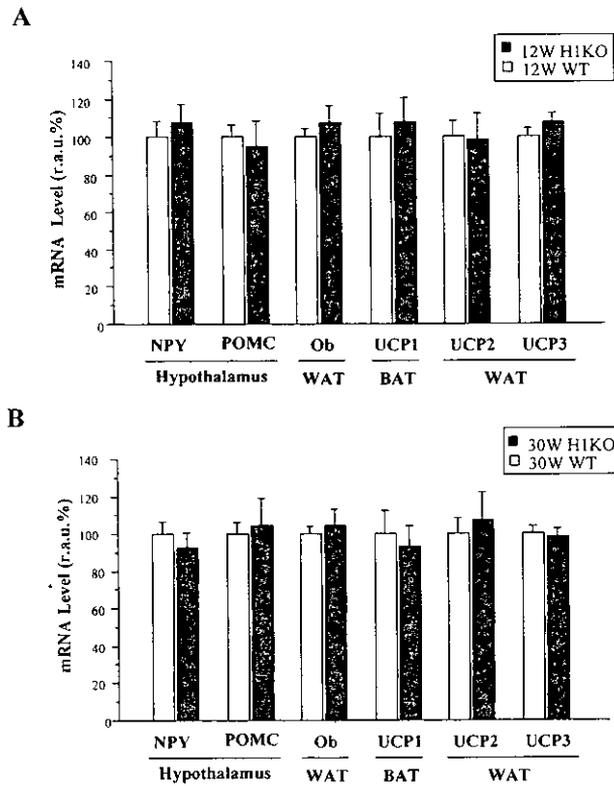


図2 H₁受容体欠損マウスの視床下部NPY, POMC, 脂肪組織 ob, UCP familyのmRNA発現

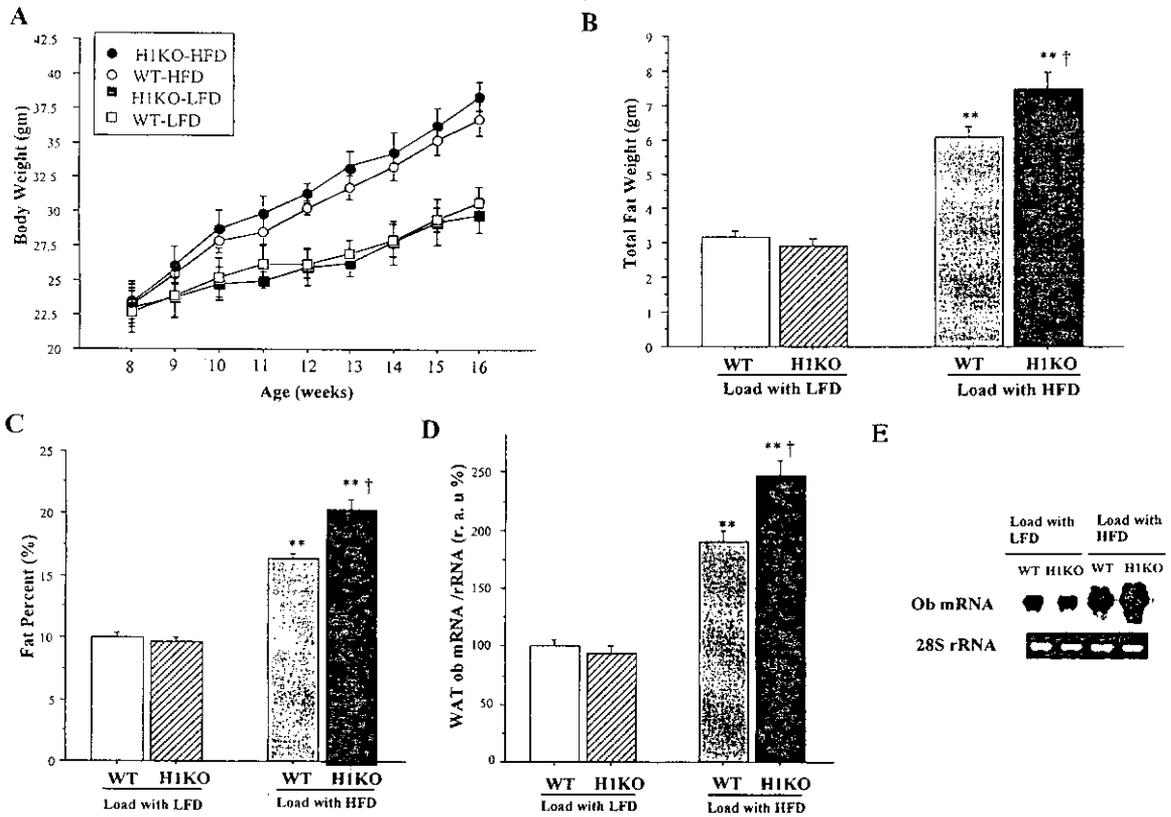


図3 高脂肪食負荷時のH₁受容体欠損マウスの体重、脂肪蓄積量の変化と脂肪組織ob geneの発現量の変化

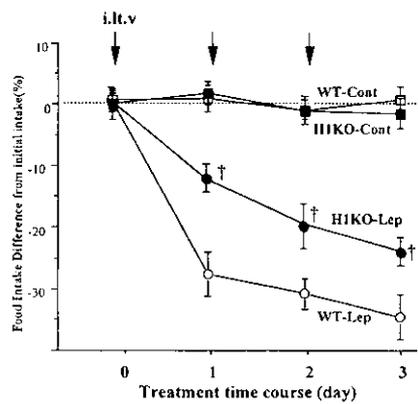


図4 レプチン脳室内投与による摂食量変化とH₁受容体欠損の影響

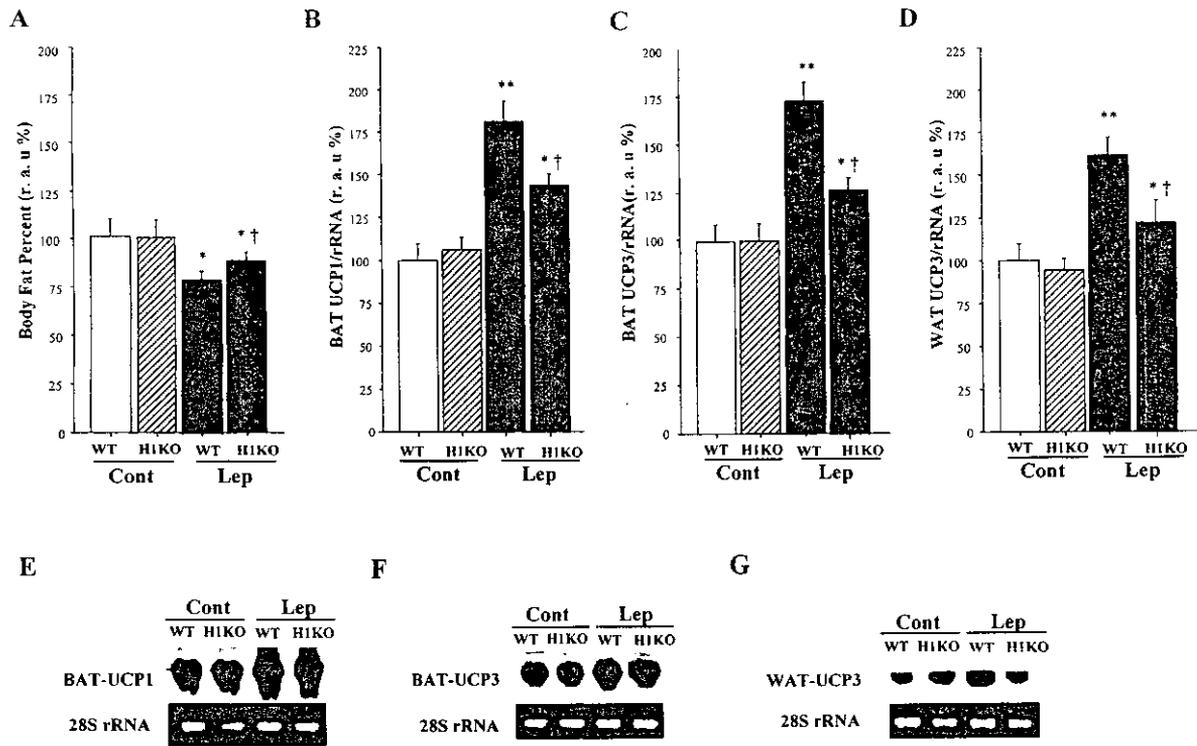


図5 レプチン脳室内投与による脂肪蓄積量、脂肪組織UCP family発現量変化とH₁受容体欠損の影響

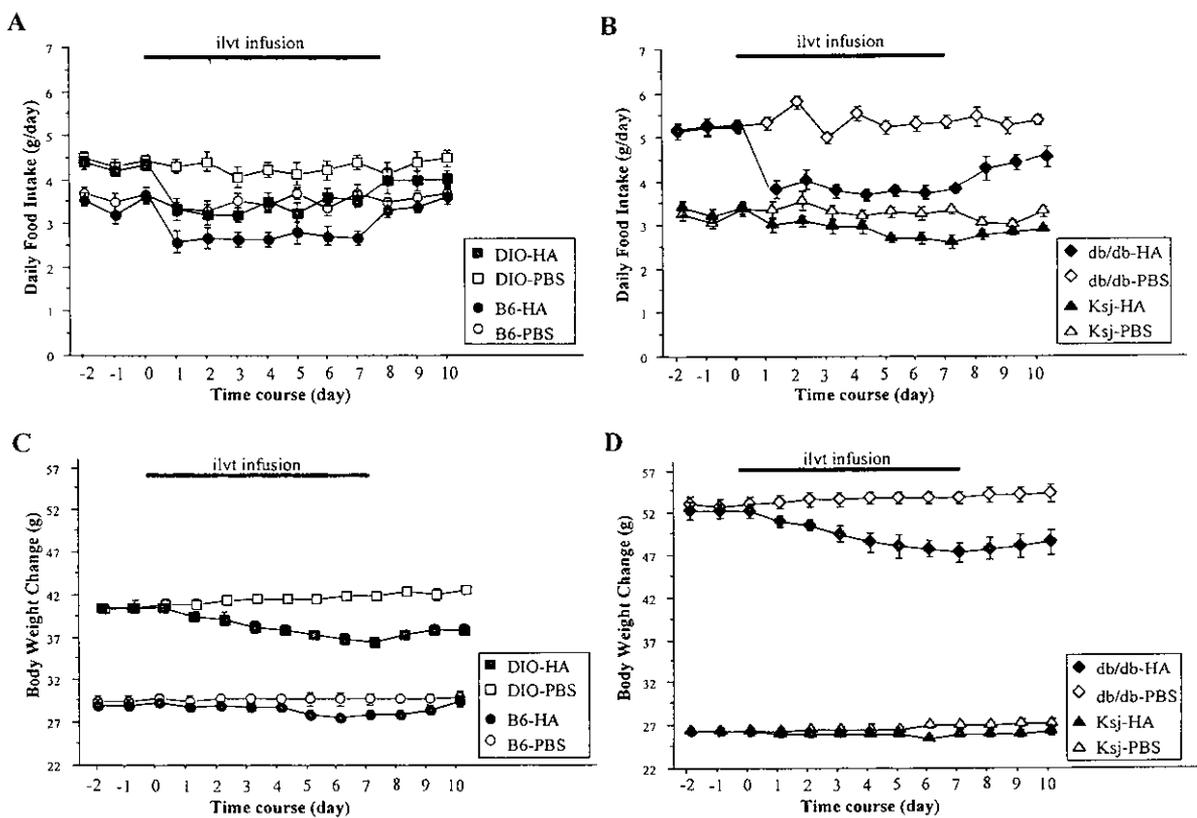


図6 食餌誘導性肥満(DIO)マウスおよびdb/dbマウスにおけるヒスタミン脳室内投与による摂食量および体重変化

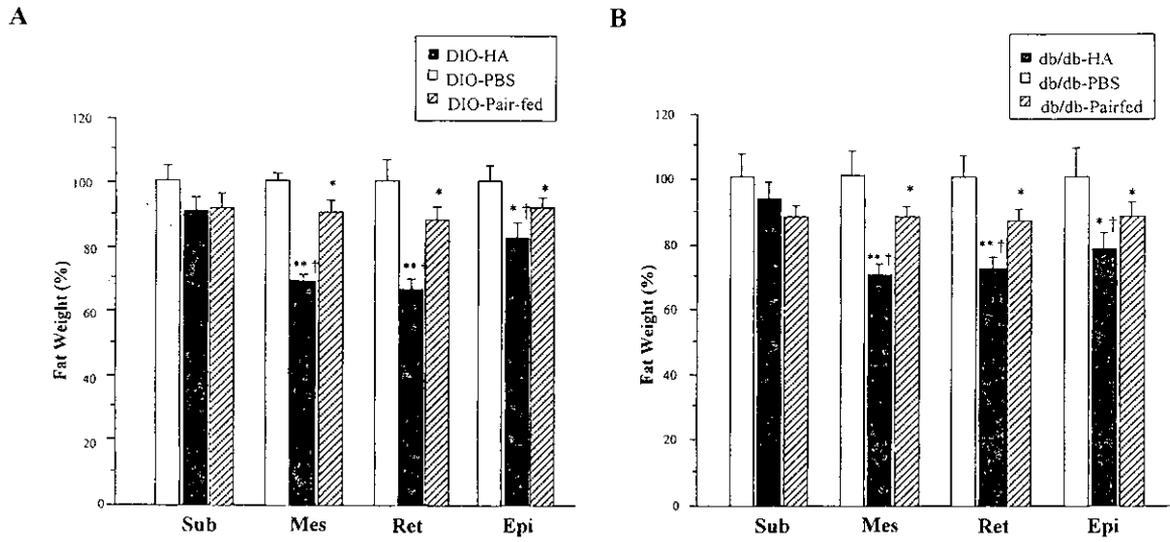


図7 食餌誘導性肥満(DIO)マウスおよびdb/dbマウスにおけるヒスタミン脳室内投与による脂肪蓄積量の変化

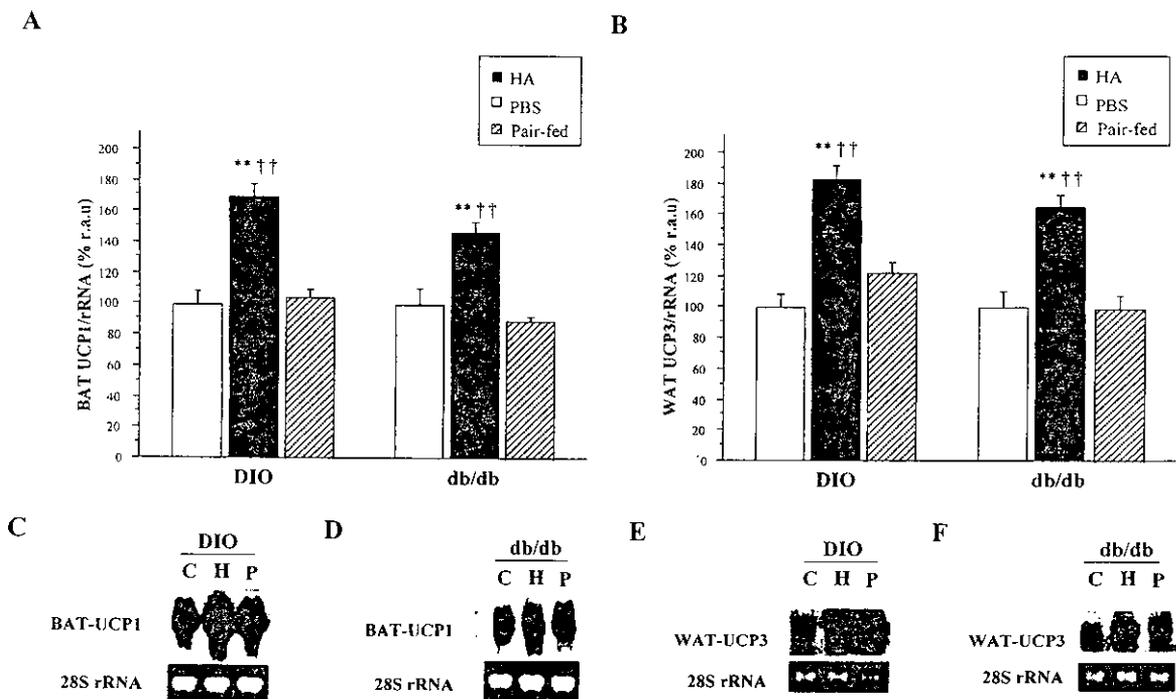


図8 食餌誘導性肥満(DIO)マウスおよびdb/dbマウスにおけるヒスタミン脳室内投与による脂肪組成UCP familyの発現変化

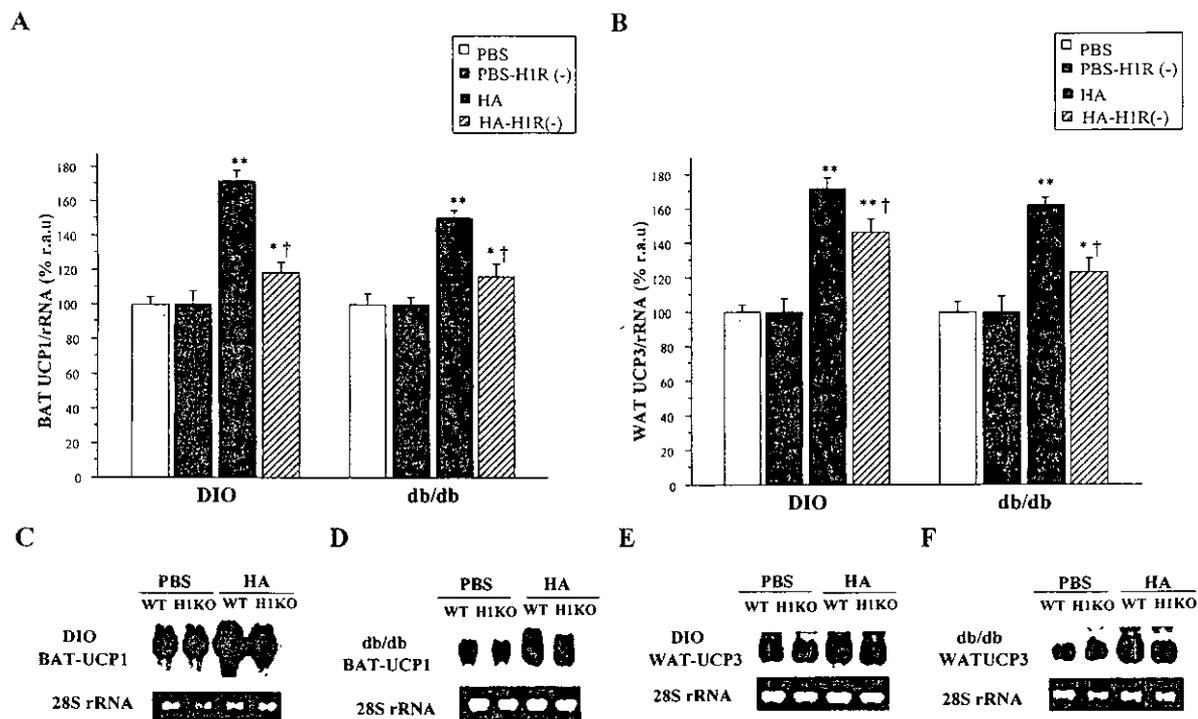


図9 食餌誘導性(DIO)肥満マウスおよびdb/dbマウスにおけるヒスタミン脳室内投与による脂肪組成UCP family発現変化とH₁受容体欠損の影響