

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬 に関する基礎研究

所属 独立行政法人
国立健康・栄養研究所
研究者 大坂 寿雅

研究要旨 オレキシンは弓状核に特異的に作用してエネルギー消費を誘起した。視床下部腹内側(VMH)核破壊肥満ラットは絶食時に褐色脂肪組織中の脱共役タンパク質の遺伝子発現を伴って酸素消費率が増加していた。小腸陰窩部でサイクロオキシゲナーゼ1発現を伴って細胞増殖がおきていた。ビッグアナイド剤とジペプチジルペプチダーゼIV阻害剤を併用すると、摂食抑制、体重増加抑制、インスリン抵抗性低下、耐糖能改善が得られた。

分担研究者

エーザイ株式会社、創薬研究本部、フロンティア研究所 田中 勲

A. 研究目的

エネルギー摂取が消費を上回ることが肥満の原因であり、糖尿病・高血圧・高脂血症などの生活習慣病の多くは肥満が誘因であり憎悪因子であることは一般に良く認識されている。とりわけ、成人においてはエネルギー消費の低下が肥満の原因として重要な意味を持つ。そこで、エネルギー消費の生理機構を明らかにし、肥満症およびこれに起因する生活習慣病の治療および予防薬開発に関する基礎的知見を得ることを目的とし、その脳・自律神経系・分子レベルでの機構の解明をめざした。

摂食行動の調節には様々な内因性因子が作用する。オレキシンは摂食中枢とされる脳の視床下部外側野に産生細胞が特異的に存在し、オレキシンを脳内投与すると摂食行動が誘起されることが知られている。一般に摂食促進作用を有する生理活性物質は同時にエネルギー消費を抑制して体内にエネルギーを蓄える作用がある。しかしながら、オレキシンを脳室内投与するとエネルギー消費が高まり、この一般則に一致しない唯一の生理活性物質であることを見いだしている。そこでオレキシンのエネルギー消費促進作用の脳機構を解明をめざして作用部位と受容機構を明らかにするために、エネルギー消費調節に重要である視床下部腹内側核や弓状核へ

オレキシンを局所注入してエネルギー消費に対する影響を調べた。その結果、視床下部弓状核に注入したときにのみ反応が誘起されることが分かったので、次にこの部位を電気破壊したラットの側脳室にオレキシンを注入したときの反応を調べた。

また、従来より食事摂取の刺激により小腸から分泌されるインクレチンといわれるペプチドホルモン群の摂食行動やインスリン分泌動態に与える影響が重要であるという認識はあった。近年、GLP-1（グルカゴン様ペプチド1）やグレリンなどのインクレチン作用を治療に応用できないかという試みが幾つか行われるようになってきた。特にGLP-1はインスリン分泌増強作用、摂食抑制作用、膵β細胞の増殖刺激作用を持つといわれており、抗肥満薬や糖尿病治療薬としての臨床試験が行われている。一方、GLP-1の生体内半減期は1分以内であることや注射剤であることが欠点であると認識されている。また、生理的なGLP-1分解酵素であるDPP IVの阻害剤投与でGLP-1投与と同様な薬効が得られないかという試験も行われている。この作用機序ならば、経口投与も可能であり、多くの患者さんに安全に適用できる可能性が広がる。我々は、DPP IV阻害剤とメトフォルミンの併用により、それぞれ単独では得られない活性型GLP-1の持続的血中濃度上昇を見出している（昨年度報告）。このGLP-1上昇作用はDPP IV阻害剤単独では得られないものであり、DPP IV阻害剤やGLP-1製剤を越える薬効が期待された。今回の実験の目的は、肥満糖尿病モデルラットのZucker *fa/fa*を用い、2週間連続併用投与

を行い、摂食、体重、血糖値、インスリン抵抗性などに与える影響を解析し、連続投与による併用療法の効果を確認する事である。

褐色脂肪組織は食事誘導性熱産生誘起に重要であり、少なくとも齧歯類では体重調節において機能していると考えられている。脱共役タンパク質(UCP)1 は褐色脂肪組織において熱産生をおこすのに直接関わる分子である。視床下部腹内側核(VMH)破壊により肥満が誘起されるが、このときエネルギー消費調節異常が報告されている。また絶食によってエネルギー消費が減少することも知られているが、VMH 破壊肥満ラットにおいて長期の絶食が褐色脂肪組織の機能にどのように影響するか否かについては分かっていない。そこで、UCP 遺伝子発現ならびにエネルギー消費に VMH 破壊肥満ラットを用いて検討した。

VMH 破壊肥満ラットでは腹部臓器(肝、脾、胃、小腸および大腸)組織での DNA 合成が促進され、細胞増殖がおきる。そこでこれら組織中のどの部位の細胞が増殖するのか、また増殖促進因子は何であるのかについて検討した。

B. 研究方法

熱産生量測定のための急性実験においてはウレタン(1.2 g/kg)麻酔下でウィスター系雄ラットを脳定位固定装置に取り付け、開放型呼気ガス分析装置により酸素消費率を経時的に求めた。同時に、深部体温の代表である結腸温度および皮膚温度の代表である尾部皮膚温度を記録した。また、四肢より導出した心電図より算出した心拍数を連続記録した。

マニピュレータに取りつけた 30G のステンレススチール管を脳内に刺入し、脳実質内投与の場合には 1-10 pmol オレキシンを 200 μ l 注入した。脳室内投与の場合には 100 pmol オレキシンを 2 μ l 側脳室に注入した。弓状核電気破壊には対照として電極を刺入したが通電しなかったラットを用いた。

実験後には注入部位はポンタミン色素を投与してマークし、ホルマリン固定の後に前額断切片を作成し、中性赤またはクレシル紫で背景染色して組織学的に注入・破壊部位を調べた。

GLP-1 に関する研究には、5 週齢の Zucker *fa/fa* を購入し、実験に供するまで通常食(MF, オリエンタル酵母工業)で通常飼育した。2 週間連続併用投与実験は、ラットを 4 群(メトフォルミン 300 mg/kg 群、バリンピロリジン 30 mg/kg 群、併用群、投与溶媒(蒸留水)群、n=10

匹)に分け、一日 2 回(10:00, 17:00)経口投与した。薬物投与は 13 週齢から 15 週齢までの 14 日間行った。投与初日(1 日目)と 15 日目に経口耐糖能試験(2 g/kg グルコース)を行い、グルコース投与前後の血糖値、インスリン値、活性型 GLP-1 値を測定した。また、摂餌量は毎日(17:00)、体重は 4, 7, 11, 14 日目の 17:00 に自由摂餌下に測定した。また、0 日目(投与開始前日)と 15 日目は絶食下の体重を測定した(10:00)。

VMH 破壊には SD 系雌ラットを用い、イソフルレンまたはネンプタール麻酔下に両側 VMH にステンレススチール単極電極を刺入し、2 mA の直流通電を 2 分間行った。急性期の反応を調べるときには手術後 6, 12, 24 時間後にネンプタール麻酔をして、組織を取り出し UCP 遺伝子発現を調べた。また VMH 破壊による肥満ラットの解析には破壊後 1 または 2 週間に行った。細胞増殖の指標として臭化デオキシウリジン(BrdU)を 30 mg/kg 腹腔内投与し、2 時間後にネンプタール麻酔下で 4%パラフォルムアルデヒドを用いて固定し臓器を取り出し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織学法により取り込み細胞を明らかにした。

なお、研究に当たっては国立健康・栄養研究所動物実験指針および総理府告示による実験動物の飼養および保管等に関する基準を遵守し、実験時においてはラットの取扱いには十分注意して、無意味な苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究成果

オレキシンを 1 pmol または 10 pmol 弓状核に注入すると溶媒である生理食塩水を注入した場合に比べて有意に酸素消費率と心拍数が増加した。結腸温度は 10 pmol 投与の時のみ有意に増加した。オレキシンを視床下部の視索前野、室傍核、背内側核、腹内側核、外側野に注入した場合には反応がなかった。視床下部以外にオレキシン神経終末が多く存在することが知られている橋の青斑核や視床の室傍核に注入した場合にも反応はなかった。次にあらかじめ弓状核を破壊したラットの脳室にオレキシンを 100 pmol 注入すると誘起された酸素消費率や心拍数の増加反応の大きさは、偽破壊対照群に注入した場合に比べて有意に小さかった。

メトフォルミン(300 mg/kg)、バリンピロリジン(30 mg/kg)併用投与群の摂餌量は投与初日から減少が観察された。この摂餌量低下は投与期間を通じて維持された。摂餌量積算値は、

メトフォルミン群：484.4±13.3 g、バリロピロリジン群：491.8±11.1 g、併用投与群：417.3±11.1 g、溶媒群：478.1±14.8 g となり、併用投与群のみが著しい摂餌量低下を示した。活性型 GLP-1 の摂食抑制作用が強力に発揮された結果と考えられた。体重増加の推移は併用投与群では顕著に抑制された。投与期間における体重増加は、メトフォルミン群：62.6±3.7 g、バリロピロリジン群：60.9±4.4 g、併用投与群：39.5±4.7 g、溶媒群：66.0±4.2 g となり、併用投与群は他群の 60-70%の増加に留まった。併用投与の摂食量や体重増加に与える顕著な効果が確認できた。また、14 日連投後の絶食時の血糖値は、メトフォルミン群：107.4±1.9 mg/dl、バリロピロリジン群：105.4±1.7 mg/dl、併用投与群：97.3±3.8 mg/dl、溶媒群：116.9±4.3 mg/dl となり、併用群、単独投与群、溶媒群の三者で有意な差が確認され、併用群では顕著な血糖値正常化をもたらした。このとき同時に測定した絶食時のインスリン値は、メトフォルミン群：10.7±1.1 ng/ml、バリロピロリジン群：16.0±1.6 ng/ml、併用投与群：8.4±0.7 ng/ml、溶媒群：17.9±1.6 ng/ml であり、併用群とメトフォルミン投与群は明らかなインスリン値の低下を示した。よって、併用群とメトフォルミン投与群においてインスリン抵抗性が低下したものと考えられた。一方、活性型 GLP-1 の絶食時の血中濃度は、メトフォルミン群：5.0±0.3 pM、バリロピロリジン群：5.8±0.8 pM、併用投与群：7.4±2.5 pM、溶媒群：4.7±0.1 pM であり、明らかな差は観察されなかった。耐糖能試験結果は、投与初日のものと併用投与後とに大差は無かった。グルコース負荷後の血糖値の推移は溶媒群が 1 時間後で 230-250 mg/dl に達するのに対し、メトフォルミン群、バリロピロリジン群では 170-180 mg/dl に抑制されていた。併用群では 120-130 mg/dl と、正常値に近い濃度域まで血糖値の上昇が押さえられていた。インスリン値の濃度推移はバリロピロリジン群で最も高い一過性のインスリン分泌（ピークは 0.5 時間で 1 日目：30-35 ng/ml、15 日目：50-60 ng/dl）が観察された。メトフォルミン群と併用群ではピークを与える負荷後 30 分で 1 日目：20-25 ng/ml、15 日目：35-40 ng/ml とやや低い、溶媒群に比較してインスリン分泌の持続が観察された。併用群でインスリン分泌ピークがバリロピロリジン群より低いのは血糖値の上昇が抑制されていたためと考えられた。活性型 GLP-1 の濃度推移は、バリロピロリジン群で一

過性の上昇（グルコース負荷後 30 分で最大値 10-12 pM、2 時間値は 7-8 pM、このまま推移すると 3 時間程度でグルコース負荷前の値 5 pM 前後に戻る）がみられた。これに対し併用群では、GLP-1 分泌の上昇はグルコース負荷前から始まり、負荷後 30 分で 20 pM 前後に達した。薬剤投与前値からの増分はバリロピロリジン投与群の 2 倍程度まで増加していた。また、特徴的なことは、GLP-1 分泌が持続的なことであり、グルコース負荷後 2 時間の値も 10pM を上まわりバリロピロリジン群のピーク値相当もしくはそれ以上であった。なお、メトフォルミン群と溶媒群では顕著な GLP-1 分泌の誘導は観察されなかった。メトフォルミンとバリロピロリジンの併用投与は、摂餌量の低下、体重増加の抑制、グルコース負荷後の血糖値上昇の顕著な抑制を示した。

非絶食状態では UCP1,2,3 すべての遺伝子発現は VMH 破壊肥満ラットと対照ラットとで有意な差はなかった。しかし 48 時間の絶食により UCP1,2,3 遺伝子発現は VMH 破壊肥満ラットで有意に増加した。安静覚醒時の酸素消費率も非絶食状態では両群に差はなく、絶食に伴って両群とも有意に減少した。しかしながら、減少の程度は VMH 破壊群の方が有意に少なかった。

VMH 破壊ラットでは小腸絨毛部の長さが顕著に増大していた。また陰窩部の細胞における増殖の指標である BrdU 陽性細胞も VMH 破壊ラットで顕著に多かった。細胞増殖因子候補のうちでサイクロオキシゲナーゼ (COX)-1 の mRNA は破壊手術後 6,12,24 時間後すべて増加していた。COX-2 mRNA は 6, 12 時間後には減少していたが、24 時間後には増加していた。腸の細胞増殖に関与していることが報告されている epidermal growth factor や transforming growth factor の mRNA 発現は対照ラットと差がなかった。

D. 考 察

オレキシン注入によって酸素消費率増加反応がおきたのは弓状核のみであり、この部位を破壊した場合には脳室内にオレキシンを投与したときの反応が減弱した。これらの結果から、オレキシンによるエネルギー消費誘起作用の、少なくとも一部は、弓状核を介していたと考えられる。オレキシンによる摂食促進作用の作用部位は視床下部の室傍核、背内側核、外側野が報告されているが、エネルギー消費促進の作用部

位とは異なっていることが分かった。弓状核のどのような細胞にオレキシンが作用し、どのような脳機構を介してエネルギー消費に至るかについて明らかにすることは今後の課題である。

メトフォルミンとバリンピロリジンの併用投与は、摂餌量の低下、体重増加の抑制、グルコース負荷後の血糖値上昇の顕著な抑制を示した。これら併用投与の効果は、GLP-1の持続的上昇に基づくものと考えられた。特に投与初日から摂餌量が低下し、投与期間を通してその低下が維持されたことが今回の試験成績に大きく寄与していると推測された。しかし、今回得られた体重増加の顕著な抑制は、摂餌量の低下だけで解釈してよいものかどうか現在のところ不明である。活性型 GLP-1 のエネルギー代謝に与える影響を解析する必要があると考えられた。

VMH 破壊ラットでは絶食時に褐色脂肪組織において UCP-1 mRNA が増加し、対照群に比べて酸素消費率も高かった。これは絶食時における体温低下を軽減する作用があると考えられる。

VMH 破壊により COX-1 mRNA 増加を伴って小腸絨毛部が増長した。COX-1 により産生されるプロスタグランジンが細胞増殖に関わっていることが示唆された。

E. 結 論

肥満はエネルギー消費と摂食のバランスによって一次的には規定されるが、体内の様々な因子が調節に関わっている。摂食誘起因子であるオレキシンにはエネルギー消費誘起作用があり、その作用部位は視床下部弓状核であり、摂食誘起作用をおこす脳部位とは異なっていたことが分かった。

ビグアナイド剤とジペプチルアミノペプチダーゼ IV 阻害剤を肥満・糖尿病モデル Zucker *fa/fa* ラットに2週間連続投与し、併用療法の有用性を示した。これら2剤の併用により、それぞれの単独投与では得られない摂餌量の減少、体重増加の抑制、耐糖能の正常化、インスリン分泌動態の改善、等が得られることを示した。これらの作用は、活性型 GLP-1 の血中濃度が持続的に上昇し、GLP-1 の摂食行動やインスリン分泌動態に対する作用が増強されたためと考えられた。肥満や体重の制御は生活習慣病予防の

重要課題であるため、活性型 GLP-1 のエネルギー代謝に及ぼす作用を解析しなければならないという新たな課題が明らかとなった。

VMH 破壊肥満ラットでは肥満において脂肪の蓄積ばかりでなく細胞増殖がおきていること、その形成に COX-1 が小腸における細胞増殖因子として重要であることが分かった。絶食時に VMH 破壊肥満ラットでは体温低下を軽減するために褐色脂肪組織 UCP1 発現を介してエネルギー消費を促進していることが示唆された。

F. 研究発表

- 1) Wang, J., Osaka, T. and Inoue, S. Orexin-A-sensitive site for energy expenditure localized in the arcuate nucleus of the hypothalamus, *Brain Research*, **971**: 128-134, 2003.
- 2) Kageyama, H., Osaka, T., Kageyama, A., Kawada, T., Hirano, T., Oka, J., Miura, M., Namba, Y., Ricquier, D., Shioda, S. and Inoue, S. Fasting increases gene expressions of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor- γ in brown adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats, *Life Sciences*, **72**: 3035-3046, 2003.
- 3) Kageyama, H., Kageyama, A., Endo, Y., Osaka, T., Nemoto, K., Hirano, T., Namba, Y., Shioda, S. and Inoue, S. Ventromedial hypothalamus lesions induce jejunal epithelial cell hyperplasia through an increase in gene expression of cyclooxygenase, *International Journal of Obesity*, **27**: 1006-1013, 2003.
- 4) Kobayashi, A. and Osaka, T. Involvement of the parabrachial nucleus in thermogenesis induced by environmental cooling in the rat, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, **446**: 760-765, 2003.

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社