

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業

脂肪細胞由来ホルモン、レプチンの  
トランスレーショナルリサーチの推進

平成20年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成21（2009）年3月

## 目 次

### I. 総括研究年度終了報告

脂肪細胞由来ホルモン、レプチンのトランスレーショナルリサーチ ー脂肪細胞由来ホルモン、レプチンのトランスレーショナルリサーチの推進ー 中尾 一和	----- 1
--	---------

### II. 分担研究年度終了報告

1. 脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ ー脂肪萎縮症を対象としたレプチンのトランスレーショナルリサーチー 海老原 健	----- 6
2. 脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ ー脂肪萎縮症に関する全国実態調査ー 平田 雅一	----- 9
3. 生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ ー脂肪萎縮性糖尿病モデル動物、A-ZIP トランスジェニックマウスにおける肝 AMPK 情報伝達系の異常とレプチン投与による肝 AMPK の活性化ー 細田 公則	----- 11
4. 生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ ー低用量ストレプトゾトシン／高脂肪食負荷マウスを用いた2型糖尿病におけるレプチンの治療薬としての有用性に関する検討ー 益崎 裕章	----- 14

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 18
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 21
-----------------	----------

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
総括研究年度終了報告書

脂肪細胞由来ホルモン、レプチンのトランスレーショナルリサーチ  
脂肪細胞由来ホルモン、レプチンのトランスレーショナルリサーチの推進  
主任研究者：中尾 一和（京都大学大学院医学研究科 教授）

レプチンは脂肪細胞由来の抗肥満ホルモンで、強力な摂食抑制作用、糖脂質代謝調節作用などを有する。申請者らは、レプチンの遺伝子操作マウスなどを開発して TR を実践し、難治性である脂肪萎縮症では脂肪組織の欠如によるレプチン欠乏が著しいインスリン抵抗性の主因であることを明らかにした。更に、脂肪萎縮症モデルマウスにレプチン補充治療が著効する研究成果を踏まえて、「京都大学医の倫理委員会」の承認を得て、脂肪萎縮症患者 10 症例にレプチンを補充する臨床試験を実施した。このレプチンの臨床試験は 3 年以上の長期間にわたる糖尿病、高中性脂肪血症、脂肪肝などに対する劇的改善効果と安全性を証明した (*N Engl J Med* 351: 615-616, 2004, *J Clin Endocrinol Metab* 92: 532-541, 2007)。この臨床試験の成果を踏まえて、本研究では脂肪萎縮症を対象としたレプチンの医師主導治験を実施する。これらのレプチンの TR は、申請者らによって独自に実施され、米国 NIH とは独立して同時進行したものである。また、日本人患者を対象として実施されたものであり、これまで有効な治療法がなく平均寿命が 30~40 歳と報告されている脂肪萎縮症の画期的な治療法の開発に発展するものと期待される。また、不充分であった我国の脂肪萎縮症の全国実態調査をあわせて実施することにより、その頻度や成因の把握が可能になり、レプチンの医師主導治験を加速するものと期待される。本研究では以上述べた「脂肪萎縮症を対象としたレプチンの TR」と併せて、「生活習慣病を対象としたレプチンの TR」を実施する。メタボリック症候群、糖尿病、脂質異常症、脂肪肝などの生活習慣病はエネルギー過剰蓄積による脂肪細胞機能異常の意義が注目されており、レプチン系を標的とした新規治療法の開発が期待される。

分担研究者

海老原健

（京都大学大学院医学研究科 講師）

平田雅一

（京都大学大学院医学研究科 非常勤講師）

細田公則

（京都大学大学院医学研究科・人間健康科学系専攻 教授）

益崎裕章

（京都大学大学院医学研究科 講師）

*Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3258, 2004, *J Clin Invest* 105: 749, 2000)。また脂肪萎縮症のモデルマウスでレプチン補充治療が著効することを明らかにした (*Diabetes* 50: 1440, 2001)。この結果を踏まえ京都大学「医の倫理委員会」の承認（第 331 番）のもと、ヒト組替えレプチンを用いて 10 症例の脂肪萎縮症を対象とした臨床試験を実施し、ヒトの脂肪萎縮症においてもレプチン補充治療の長期の劇的効果と安全性を証明した (*N Engl J Med* 351: 615, 2004, *J Clin Endocrinol Metab* 92: 532, 2007)。また既に 2003 年に脂肪萎縮症の全国実態調査を実施し、35 症例の脂肪萎縮症を確認したが、レプチン有効性に関する報告以来、問い合わせが増加し、再度、全国実態調査を実施する。

最近、レプチンとの併用によりレプチン感受性を亢進させるアミリンなどの薬剤が報告され、レプチン治療やレプチン系を標的とする新規治療法の対象を稀少疾患である脂肪萎縮症から common disease である生活習慣病に拡大

A. 研究目的

申請者らは 1994 年以來、レプチンの臨床応用を目指した TR を行ってきた (*Diabetes* 44: 855, 1995, *J Clin Invest* 96: 1647, 1995, *Nat Genet* 14: 130, 1996, *Nat Med* 3: 1029, 1997)。特にレプチン過剰発現トランスジェニックマウスを開発し、レプチンの糖脂質代謝調節作用、血圧、骨代謝、性腺機能調節作用を明らかにした (*Diabetes* 48: 1822, 1999, *Am J Physiol* 280: E334, 2001, *J Clin Invest* 105: 1243, 2000、

出来る可能性が高い。また、米国 NIH において脂肪萎縮症などを対象としたレプチンの臨床試験が同時進行しており、レプチンの有用性が証明されつつある。本研究では、生活習慣病を対象としたレプチンの TR を併せて実施する。

## B. 研究方法

### 1. 脂肪萎縮症を対象としたレプチンのトランスレーショナルリサーチ

年齢 11 歳から 34 歳までの先天性全身性脂肪萎縮症 8 例、後天性全身性脂肪萎縮症 2 例（男性 3 例、女性 7 例）を対象にレプチン治療を施行した。レプチン投与量は、女性で体脂肪率が 30%、男性で体脂肪率が 20% のときに通常認められる血中レプチン濃度に達すると推定される量を 100% とし、1 ヶ月毎に 50%、100% と増量、3 ヶ月目以降は 200% 量とした。この量を最初の 1 年間は 1 日 2 回に分け皮下注射、2 年目以降は同用量を 1 日 1 回皮下注射した。

### 2. 脂肪萎縮症に関する全国実態調査

日本内分泌学会内分泌専門医（1559 名）を対象に、郵送にてアンケート用紙を送付し、受け持ち症例および所属施設における脂肪萎縮症症例の有無をたずねた。また症例の病型についてもたずねた。

3. 低用量ストレプトゾトシン/高脂肪食負荷マウスを用いた 2 型糖尿病におけるレプチンの治療薬としての有用性に関する検討。2 型糖尿病モデルマウスは、8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスに、膵β細胞破壊によりインスリン分泌低下を来すストレプトゾトシン（120μg/g）と肥満およびインスリン抵抗性を誘導する高脂肪食（45kcal%）を負荷して作製した。このモデルマウス（STZ/HFD マウス）に対して浸透圧ミニポンプを用いて 2 週間のレプチン持続皮下投与（20ng/g/hr）を行い、摂食量、体重、血中糖脂質代謝パラメータに対するレプチンの効果を評価した。

4. 脂肪萎縮性糖尿病モデル動物、A-ZIP トランスジェニックマウスにおける肝 AMPK 情報伝達系の異常とレプチン投与による肝 AMPK の活性化。18 時間絶食後の AZIP の肝臓、骨格筋を抱水クロラル麻酔下で迅速に摘出し、AMPK の発現量、酵素活性並びに、AMPK の下流で発現が制御されると考えられている糖脂質代謝に関連する分子の遺伝子発現量を野生型（WT）と比較検討した。さらに、レプチンの単回投与

および、浸透圧ミニポンプによる持続投与を行い、同様に検討した。

（倫理面への配慮）

レプチンの臨床試験に関しては京都大学「医の倫理委員会」の承認を得、その指針にそって京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部、臨床部および医療開発管理部の監督、指導のもと実施する。対象者に対しては不利益や危険性について十分な説明をし、インフォームドコンセントを取得する。また対象者の人権を最大限尊重するよう配慮する。

動物実験については「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、また京都大学が定める「動物実験の実施に関する規定」に準拠して実施し、動物に与える苦痛を最小限に留めるように最善を尽くす。

## C. 研究結果

### 1. 脂肪萎縮症を対象としたレプチンのトランスレーショナルリサーチ

10 例の全身性脂肪萎縮症に対しレプチン治療を施行した。いずれの症例においてもレプチン治療によりインスリン感受性の改善を伴う糖、脂質代謝の改善が認められた。またレプチン治療によりインスリン標的臓器である肝臓および骨格筋における脂質含量の低下が認められた。これらの作用は 5 年以上の長期にわたり安定して認められ、試験期間中にレプチン治療によると考えられる明らかな副作用も認められなかった。

### 2. 脂肪萎縮症に関する全国実態調査

1559 名中、846 名の医師より回答が得られ、回収率は 54.3% であった。そのうち 21 名の医師から合計 31 例の脂肪萎縮症患者に関する情報が寄せられた。

3. 低用量ストレプトゾトシン/高脂肪食負荷マウスを用いた 2 型糖尿病におけるレプチンの治療薬としての有用性に関する検討。2 週間のレプチン持続投与により STZ/HFD マウスの摂食量は抑制され、約 5% の体重減少が認められた。さらに自由摂食下での平均血糖値は 327mg/dl にまで改善した。レプチン投与中、耐糖能試験ではインスリン分泌の増加はないがブドウ糖負荷後の血糖上昇が有意に抑制された。以上の所見より、レプチンがインスリン感受性を亢進させ耐糖能を改善したものと考えられた。また血中中性脂肪、遊離脂肪酸濃度

は正常マウスと同等レベルにまで改善し、総コレステロール濃度も有意な低下が認められた。さらにレプチン持続投与により肝臓および骨格筋内中性脂肪含量はそれぞれ 35%、38%の低下が認められ、骨格筋 $\alpha$ 2-AMPK 活性は 1.8 倍に上昇していた。

4. 脂肪萎縮性糖尿病モデル動物、A-ZIP トランスジェニックマウスにおける肝 AMPK 情報伝達系の異常とレプチン投与による肝 AMPK の活性化。(1) AZIP の骨格筋における AMPK 遺伝子発現量は  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 いずれも WT と差がなく、活性にも大きな差が認められなかった。(2) AZIP の肝臓において AMPK  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 の遺伝子発現量増大が認められたが、活性は WT に比べ低下していた。(3) 肝 AMPK 活性の低下と相応し、PPAR $\alpha$  等の脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現の低下と、PGC1 $\alpha$  等の糖新生に関わる遺伝子発現の上昇が認められた。さらに、レプチン投与により、(4) 骨格筋 AMPK の活性化のみならず、肝 AMPK の活性化が認められた。(5) 肝 AMPK の活性上昇に相応する糖脂質代謝関連遺伝子の発現量変化が認められた。

#### D. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. T. Ogihara, K. Nakao, T. Fukui, K. Fukiyama, K. Ueshima, K. Oba, T. Sato, T. Saruta, for the CASE-J Trial Group. Effects of candesartan compared with amlodipine for treatment of hypertensive patients with high cardiovascular risks in CASE-J trial. *Hypertension* 51: 393-398, 2008
2. H. Yokoi, M. Mukoyama, K. Mori, M. Kasahara, T. Suganami, K. Sawai, T. Yoshioka, Y. Saito, Y. Ogawa, T. Kuwabara, A. Sugawara, and K. Nakao. Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int.* 73: 446-455, 2008.
3. K. Hotta, Y. Nakata, T. Matsuo, S. Komohara, K. Kotani, R. Komatsu, N. Itoh, I. Mineo, J. Wada, H. Masuzaki, M. Yoneda, A. Nakajima, S. Miyazaki, K. Tokunaga, M. Kawamoto, T. Funahashi, K. Hamaguchi, K. Yamada, T. Hanafusa, S. Oikawa, H. Yoshimatsu, K. Nakao, T. Sakata, Y. Matsuzawa, K. Tanaka, N. Kamatani, and Y. Nakamura. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J. Hum. Genet.* 53: 546-553, 2008.
4. S. Usami, I. Kishimoto, Y. Saito, M. Harada, K. Kuwahara, Y. Nakagawa, M. Nakanishi, S. Yasuno, K. Kangawa, and K. Nakao. Association of CT dinucleotide repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the guanylyl cyclase (GC)-A gene with essential hypertension in the Japanese. *Hypertens. Res.* 31: 89-96, 2008.
5. H. Ariyasu, H. Iwakura, G. Yamada, K. Nakao, K. Kangawa, and T. Akamizu. Efficacy of ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiological changes. *Endocrinology.* 149: 3722-3728, 2008.
6. H. Arai, N. Kobayashi, Y. Nakatsuru, H. Masuzaki, T. Nambu, K. Tanaka, Y. Yamanaka, E. Kondo, G. Yamada, T. Fujii, M. Miura, Y. Komatsu, N. Kanemoto, H. Ariyasu, K. Moriyama, A. Yasoda, and K. Nakao. A case of cortisol producing adrenal adenoma without phenotype of Cushing's syndrome due to impaired 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 activity. *Endocr. J.* 55: 709-715, 2008.
7. T. Tokudome, I. Kishimoto, T. Horio, Y. Arai, D-O Schwenke, J. Hino, I. Okano, Y. Kawano, M. Kohno, M. Miyazato, K. Nakao, and K. Kangawa. Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation.* 17: 2329-2339, 2008.
8. K. Hotta, M. Kanamura, Y. Nakata, T. Matsuo, S. Kamohara, K. Kotani, R. Komatsu, N. Itoh, I. Mineo, J. Wada, H. Masuzaki, M. Yoneda, A. Nakajima, S.

- Miyazaki, K. Tokunaga, M. Kawamoto, T. Funahashi, K. Hamaguchi, K. Yamada, T. Hanafusa, S. Oikawa, H. Yoshimatsu, K. Nakao, T. Sakata, Y. Matsuzawa, K. Tanaka, N. Kamatani, and Y. Nakamura. INSIG2 gene rs7566605 polymorphism is associated with severe obesity in Japanese. *J. Hum. Genet.* 53:0857-862, 2008.
9. T. Ogihara, K. Nakao, T. Fukui, K. Fukiyama, A. Fujimoto, K. Ueshima, K. Oba, K. Shimamoto, H. Matsuoka, and T. Saruta, for the CASE-J Traial Group. The optimal target blood pressure for antihypertensive treatment in Japanese elderly patients with high-risk hypertension: a subanalysis of the Candesartan Antihypertensive Survival Evaluation in Japan (CASE-J) Trial. *Hypertens. Res.* 31: 1595-1601, 2008.
  10. T. Kuwabara, K. Mori, M. Mukoyama, M. Kasahara, H. Yokoi, Y. Saito, T. Yoshioka, Y. Ogawa, H. Imamaki, T. Kusakabe, K. Ebihara, M. Omata, N. Satoh, A. Sugawara, J. Barasch, and K. Nakao. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage in glomeruli, proximal and distal nephrons. *Kidney Int.* 75: 285-294, 2008.
  11. M. Yamamuro, M. Yoshimura, M. Nakayama, K. Abe, H. Sumida, S. Sugiyama, Y. Saito, K. Nakao, H. Yasue, and H. Ogawa. Aldosterone, but not angiotensin II, reduces angiotensin converting enzyme 2 gene expression levels in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. J.* 72: 1346-1350, 2008.
  12. T. Nagae, K. Mori, M. Mukoyama, M. Kasahara, H. Yokoi, T. Sukanami, K. Sawai, T. Yoshioka, M. Koshikawa, Y. Saito, Y. Ogawa, T. Kuwabara, I. Tanaka, A. Sugawara, T. Kuwahara, and K. Nakao. Adrenomedullin inhibits connective tissue growth factor expression, extracellular signal-regulated kinase activation and renal fibrosis. *Kidney Int.* 74: 70-80, 2008.
  13. N. Oyamada, M. Sone, K. Miyashita, K. Park, D. Taura, M. Inuzuka, T. Sonoyama, H. Tsujimoto, Y. Fukunaga, N. Tamura, H. Itoh, and K. Nakao. The role of mineralocorticoid receptor expression in brain remodeling after cerebral ischemia. *Endocrinology.* 149: 3764-3777, 2008.
  14. Y. Hotta, S. Sasaki, M. Konishi, H. Kinoshita, K. Kuwahara, K. Nakao, and N. Itoh. Fgf16 is required for cardiomyocyte proliferation in the mouse embryonic heart. *Dev Dyn.* 237:2947-2954, 2008.
  15. K. Park, H. Itoh, K. Yamahara, M. Sone, K. Miyashita, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, M. Inuzuka, T. Sonoyama, H. Tsujimoto, Y. Fukunaga, N. Tamura, and K. Nakao. Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. *Endocrinology.* 149: 483-491, 2008.
  16. K. Yamahara, M. Sone, H. Itoh, J. K. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, K. Homma, T.-H. Chao, K. Miyashita, K. Park, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, Y. Fukunaga, N. Tamura, and K. Nakao. Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS ONE* 3: e1666, 2008.
  17. N. Oyamada, H. Itoh, M. Sone, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, D. Taura, M. Inuzuka, T. Sonoyama, H. Tsujimoto, Y. Fukunaga, N. Tamura, and K. Nakao. Transplantation of vascular cells derived from human embryonic stem cells contributes to vascular regeneration after stroke in mice. *J Transl Med.* 6: 54, 2008.
  18. M. Sone, H. Shibata, K. Homma, N. Tamura, J. Akahira, S. Hamada, M. Yahata, N. Fukui, H. Itoh, H. Sasano, and K. Nakao. Close examination of

steroidogenesis disorders in a DOC- and progesterone-producing adrenocortical carcinoma. *Endocrine* 35: 25-33, 2009.

## 2. 学会発表

中尾一和. メタボリック症候群の臨床的意義. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京

## F. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許 2006-140350

レプチン測定による疾患のスクリーニング方法. 発明者: 中尾一和. 出願日: 平成 18 年 5 月 19 日

### 2. 特許 2005-30326

メタボリックシンドローム予防又は治療薬. 発明者: 稲田洋一、中野茂、益崎裕章、田中智洋、中尾一和. 出願日: 平成 17 年 10 月 18 日

### 3. 特許 2004-184138

霊長類動物胚性幹細胞から発生初期血管内皮細胞の製造方法及びその細胞の使用. 発明者: 中尾一和、伊藤裕、曾根正勝、山下潤、山原研一、近藤靖、鈴木豊. 出願日: 平成 16 年 6 月 22 日

### 4. 特許 2004-025631

内皮細胞分化増殖方法. 発明者: 中尾一和、伊藤 裕、山下 潤、小林 貴美. 出願日: 平成 16 年 2 月 2 日

### 5. 特許 2001-301586

軟骨無形成症治療剤. 発明者名: 中尾一和. 出願日: 平成 13 年 9 月 28 日

### 6. 特許 平 08-079916

ラット肥満遺伝子、その遺伝子産物およびその製造法. 発明者名: 中尾一和、小川佳宏、藤沢幸夫. 出願日: 平成 8 年 4 月 2 日

### 7. 特許 平 08-248025

肥満遺伝子産物に対するモノクローナル抗体、その製造法および用途. 発明者名: 藤沢幸夫、菅家 太、中尾一和. 出願日: 平成 8 年 9 月 19 日

### 8. 特許第 2676114

hBNP を認識するモノクローナル抗体および該抗体を用いる hBNP の免疫測定法. 発明者: 井村裕夫、中尾一和. 出願日: 平成 2 年 4 月 16 日

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究年度終了報告書

脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ  
脂肪萎縮症を対象としたレプチンのトランスレーショナルリサーチ  
分担研究者：海老原 健（京都大学大学院医学研究科 講師）

脂肪萎縮症は体脂肪量の減少に伴い強いインスリン抵抗性が出現し、高血糖や高インスリン血症、高中性脂肪血症、脂肪肝などの代謝異常を呈する難治性疾患であるが、未だ有効な治療法も確立していない。我々は脂肪萎縮症モデルマウスを用いて、脂肪萎縮症ではレプチン欠乏がインスリン抵抗性の主因であり、レプチン補充治療が著効することを明らかにした (*Diabetes* 50: 1440-1448, 2001)。さらに、我が国で初めて脂肪萎縮症患者にレプチン補充治療を実施し、糖尿病、高中性脂肪血症、脂肪肝などに対する劇的改善効果を証明した (*N Engl J Med* 351: 615-616, 2004)。これまでに10例の全身性脂肪萎縮症に対しレプチン治療を施行し、いずれの症例においてもインスリン感受性の改善を伴う糖、脂質代謝の改善が認められ、インスリン標的臓器である肝臓および骨格筋における脂質含量の低下が認められた。これらの作用は5年以上の長期にわたり安定して認められ、試験期間中にレプチン治療によると考えられる明らかな副作用も認められなかった。以上より、脂肪萎縮症におけるレプチン補充治療の有用性が示された。

#### A. 研究目的

脂肪萎縮症では体脂肪量の減少に伴い強いインスリン抵抗性が出現し、高血糖や高インスリン血症、高中性脂肪血症、脂肪肝などの代謝異常を呈する。さらに脂肪萎縮症では高インスリン血症によると考えられる黒色表皮種や肥大型心筋症などの臓器腫大が高頻度に認められる。しかし、その強いインスリン抵抗性から従来の経口薬は無効であることが多く、インスリンも大量投与が必要である。このため脂肪萎縮症では重度の代謝異常およびその合併症、肝硬変や肥大型心筋症により平均寿命は30～40歳とされている。しかしながら脂肪萎縮症は未だ有効な治療法も確立していない。一方、レプチンは脂肪細胞由来の抗肥満ホルモンで、強力な摂食抑制作用、糖脂質代謝調節作用などを有する。我々は、脂肪萎縮症では脂肪組織の欠如によるレプチン欠乏が著しいインスリン抵抗性の主因であることを明らかにし、更に、脂肪萎縮症モデルマウスにレプチン補充治療が著効することを明らかにした (*Diabetes* 50: 1440-1448, 2001)。これらの研究成果を踏まえ、我が国で初めて脂肪萎縮症患者にレプチン補充治療を実施し、糖尿病、高中性脂肪血症、脂肪肝などに対する劇的改善効果を証明した (*N Engl J Med* 351: 615-616, 2004)。本研究ではこれまでに我々がレプチン治療を導入した全

身性脂肪萎縮症10例の治療成績をまとめ、最長6年にわたるレプチン治療の長期効果と安全性を明らかにする。

#### B. 研究方法

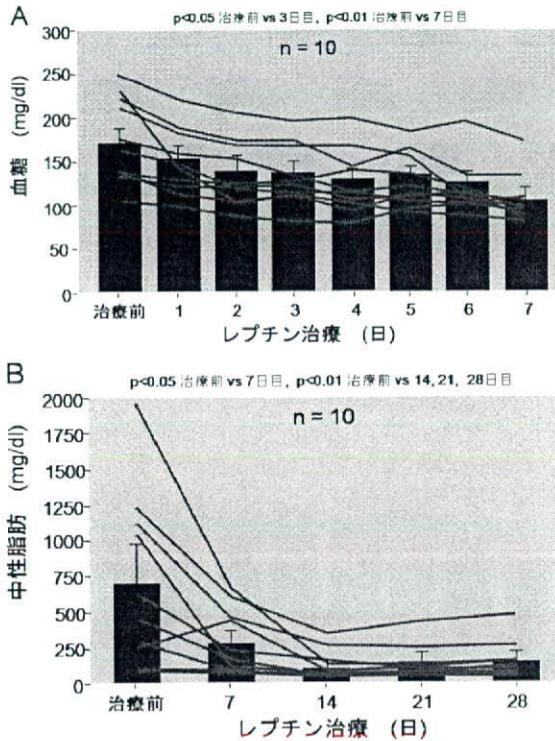
年齢11歳から34歳までの先天性全身性脂肪萎縮症8例、後天性全身性脂肪萎縮症2例（男性3例、女性7例）を対象にレプチン治療を施行した。レプチン投与量は、女性で体脂肪率が30%、男性で体脂肪率が20%のときに通常認められる血中レプチン濃度に達すると推定される量を100%とし、1ヶ月毎に50%、100%と増量、3ヶ月目以降は200%量とした。この量を最初の1年間は1日2回に分けて皮下注射、2年目以降は同用量を1日1回皮下注射した。  
(倫理面への配慮)

レプチンの臨床試験に関しては京都大学「医の倫理委員会」の承認を得、その指針にそって京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部、臨床部および医療開発管理部の監督、指導のもと実施する。対象者に対しては不利益や危険性について十分な説明をし、インフォームドコンセントを取得する。また対象者の人権を最大限尊重するよう配慮する。

#### C. 研究結果

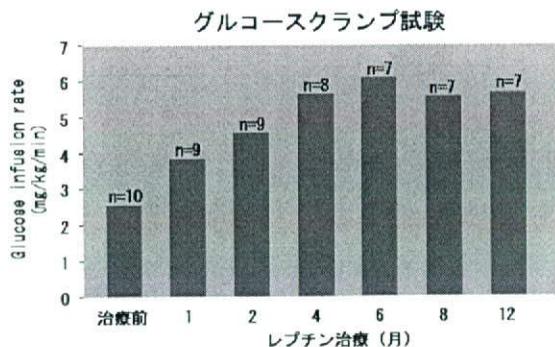
レプチン治療開始後いずれの症例においても

翌日より早朝空腹時血糖の低下が認められ、3日目には統計的有意差をもった低下が認められた(図1A)。血中中性脂肪濃度についても全症例において速やかな低下が認められ、7日目には統計的有意差をもった低下が認められた(図1B)。



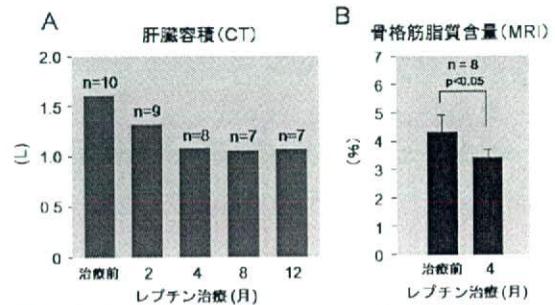
【図1 A、B】全身性脂肪萎縮症における早朝空腹時血糖(A)および血中中性脂肪濃度(B)に対するレプチン補充治療の効果

これらの症例に対しインスリン感受性を評価する目的で正常血糖高インスリンクランプ試験を施行したところ、いずれの症例においても1ヶ月目よりグルコース注入速度(GIR)の上昇が認められ、その後も6ヶ月にわたり緩やかな上昇が認められた(図2)。



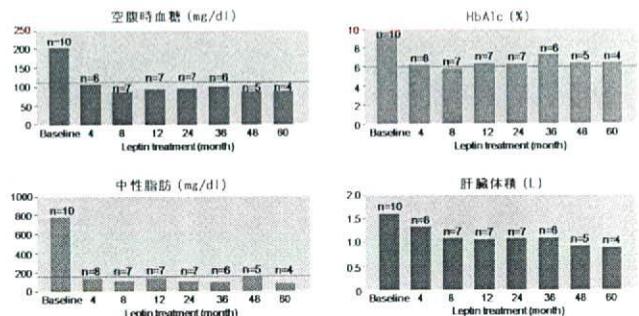
【図2】全身性脂肪萎縮症におけるインスリン感受性に対するレプチン補充治療の効果

インスリン分泌能については75g経口ぶどう糖負荷試験で評価した。糖尿病罹病期間の長い先天性症例ではインスリン分泌の改善は認められなかったが、罹病期間の短い後天性症例においてはインスリン分泌能の改善が認められた。次に脂肪肝を腹部CTにて、骨格筋脂質含量をMRIにて評価した(図3)。



【図3】全身性脂肪萎縮症における肝臓容積(A)および骨格筋脂質含量(B)に対するレプチン補充治療の効果

レプチン治療によりいずれの症例においても肝臓容積の減少および骨格筋脂質含量の低下が認められた。これらの治療効果は5年以上にわたり安定して認められ、試験期間中にレプチン治療によると考えられる明らかな副作用も認められなかった(図4)。



【図4】脂肪萎縮症におけるレプチン補充治療の長期効果

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kusakabe T, Tanioka H, Ebihara K, Hirata M, Miyamoto L, Miyanaga F, Hige H, Aotani D, Fujisawa T, Masuzaki H, Hosoda K, Nakao K. 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.

2. Yamada N, Katsuura G, Tatsuno I, Kawahara S, Ebihara K, Saito Y, Nakao K. Orexins increase mRNA expressions of neurotrophin-3 in rat primary cortical neuron cultures. *Neurosci Lett*. 30:132-135, 2009.
3. Yamada N, Katsuura G, Tatsuno I, Asaki T, Kawahara S, Ebihara K, Saito Y, Nakao K. Orexin decreases mRNA expressions of NMDA and AMPA receptor subunits in rat primary neuron cultures. *Peptides*.: 1582- 1587, 2008.

## 2. 学会発表

### 国際学会

1. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Masakazu Hirata, Fumiko Miyanaga, Daisuke Aotani, Hideki Hige, Takeshi Fujisawa, Hiroaki Masuzaki, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Leptin treatment Enhances Insulin Sensitivity and Improves Glucose and Lipid Metabolism in a Mouse Model of Type2 Diabetes. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting, in San Francisco, June 15- 18, 2008
2. Daisuke Aotani, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Masakazu Hirata, Hideki Hige, Takeshi Fujisawa, Junji Fujikura, Hiroaki Masuzaki, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Outcome from leptin therapy for five years in Japanese patients with generalized lipodystrophy. 13th International congress of Endocrinology, in Rio, November 8- 12, 2008

### 国内学会

1. 山田伸子、勝浦五郎、越智ゆかり、海老原健、龍野一郎、齋藤 康、中尾一和. 高脂肪誘発肥満モデルマウスにおける認知障害の解析. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
2. 青谷大介、海老原健、日下部徹、平田雅一、髭 秀樹、藤澤 武、藤倉純二、益崎裕

章、細田公則、中尾一和. 肥満を伴った糖尿病モデルマウスにおけるレプチンの治療効果. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森

3. 陳 文、巖西真規、海老原健、日下部徹、中尾一和. もやもや病を合併した部分型脂肪萎縮性糖尿病の 1 例. 日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
4. 海老原健. 脂肪細胞由来ホルモン、レプチンの脂肪萎縮性糖尿病におけるトランスレーショナル・リサーチ. 第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
5. 海老原健、日下部徹、平田雅一、髭 秀樹、青谷大介、益崎裕章、細田公則、中尾一和. Dunnigan 型家族性部分性脂肪萎縮症日本人症例における LMNA 遺伝子変異の同定. 第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
6. 青谷大介、海老原健、日下部徹、平田雅一、髭 秀樹、藤澤 武、藤倉純二、益崎裕章、細田公則、中尾一和. 肥満を伴った糖尿病モデルマウスにおけるレプチンの治療効果. 第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分

## E. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究年度終了報告書

脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ  
脂肪萎縮症に関する全国実態調査

分担研究者：平田 雅一（京都大学大学院医学研究科 非常勤講師）

脂肪萎縮症は稀少疾患であり、これまで全国規模での十分な研究がなされておらず、難病（特定疾患）にも指定されていない。今回、日本内分泌学会内分泌専門医（1559名）を対象に、郵送にてアンケート用紙を送付し、受け持ち症例および所属施設における脂肪萎縮症症例について調査した。846名の医師より回答が得られ（回収率は54.3%）、そのうち21名の医師から合計31例の脂肪萎縮症患者に関する情報が寄せられた。我々がこれまでにレプチン治療を導入した10例は、今回の調査対象であった内分泌専門医だけでなく、小児科医や糖尿病専門医など全国の幅広い医師から紹介された症例であり、10例中4例が今回行った調査結果に含まれていた。この比率から考えると、我が国における脂肪萎縮症の患者数は少なくとも80例以上にのぼるものと考えられ、人口100～200万人に1人の発症頻度と考えられた。

A. 研究目的

脂肪萎縮症は確立した治療法が無く、病状も慢性に経過し、合併症などから予後も悪く、経済的にも精神的にも負担の大きな疾患でありながら、全国規模での十分な研究がなされておらず、難病（特定疾患）にも指定されていないのが現状である。そこで申請者らは情報発信、実態調査、患者や医療関係者との交流などを目的に2003年に特定非営利活動法人「脂肪萎縮症・脂肪萎縮性糖尿病センター」を設立し、2003年度に日本内分泌学会専門医を対象に脂肪萎縮症の調査を実施した。しかしながら我が国の実態を把握するには十分ではなく、より精度の高い最新の情報を得るために、本研究において再度全国実態調査を実施した。

B. 研究方法

脂肪萎縮症は糖尿病や脂質異常症、性腺機能低下症などを伴う内分泌代謝疾患であることから、日本内分泌学会内分泌専門医（1559名）を対象に、郵送にてアンケート用紙を送付し、受け持ち症例および所属施設における脂肪萎縮症症例の有無をたずねた。また症例の病型についても全身の脂肪組織が消失する全身性脂肪萎縮症か、四肢あるいは上半身など部分的に脂肪組織が消失する部分性脂肪萎縮症かをたずねた。

（倫理面への配慮）

レプチンの臨床試験に関しては京都大学「医の倫理委員会」の承認を得、その指針にそって京

都大学医学部附属病院探索医療センター検証部、臨床部および医療開発管理部の監督、指導のもと実施する。対象者に対しては不利益や危険性について十分な説明をし、インフォームドコンセントを取得する。また対象者の人権を最大限尊重するよう配慮する。

C. 研究結果

1559名中、846名の医師より回答が得られ、回収率は54.3%であった。そのうち21名の医師から合計31例の脂肪萎縮症患者に関する情報が寄せられた。病型別内訳を表1に、都道府県別内訳を表2に示す。

【表1】病型別内訳

病型	(人)
全身性	21
部分性	7
不明	3

合計 31 人

【表2】都道府県別内訳

都道府県	(人)	都道府県	(人)
北海道	1	静岡	1
宮城	1	岐阜	1
栃木	1	石川	1
埼玉	3	大阪	10
東京	2	徳島	2
千葉	2	福岡	2
神奈川	3	熊本	1

合計 31 人

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. 大島秀武、志賀利一、細田公則、平田雅一、中尾一和. Dual Impedance 法による内臓脂肪測定装置の開発-計測方法の改良による効果-. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
2. 志賀利一、大島秀武、細田公則、平田雅一、中尾一和. Dual Impedance 法による内臓脂肪測定装置の開発-計測方法の改良による効果-. 日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
3. 平田雅一、森 栄作、井田みどり、海老原健、益崎裕章、細田公則、奥正次郎、大島秀武、志賀利一、中尾一和. メタボリックシンドロームにおける改良 Dual VF-BIA 法による経時的内臓脂肪蓄積測定の臨床的意義. 日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
4. 井田みどり、森 栄作、小鳥真司、近藤絵里、平田雅一、海老原健、益崎裕章、細田公則、大島秀武、志賀利一、中尾一和. Dual Impedance 生体インピーダンス法による減量経過の経時的腹部脂肪蓄積と代謝パラメータ. 第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究年度終了報告書

生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ  
脂肪萎縮性糖尿病モデル動物、A-ZIP トランスジェニックマウスにおける肝 AMPK 情報伝達系の異常  
とレプチン投与による肝 AMPK の活性化  
分担研究者：細田 公則（京都大学大学院医学研究科・人間健康科学系専攻 教授）

AMPK は糖脂質代謝制御における重要な鍵分子であり、レプチンの作用を媒介する可能性も示されている。しかし、レプチンの糖脂質代謝亢進作用における AMPK の意義は未だ不明な点が多い。そこで、レプチン投与により著明な糖脂質代謝の改善が認められる脂肪萎縮性糖尿病に着目し、そのモデル動物、A-ZIP トランスジェニックマウス(AZIP)における解析を実施した。18時間絶食後の AZIP の肝臓、骨格筋を抱水クロラル麻酔下で迅速に摘出し、AMPK の発現量、酵素活性並びに、AMPK の下流で発現が制御されると考えられている糖脂質代謝に関連する分子の遺伝子発現量を野生型(WT)と比較検討した。その結果、1. AZIP の骨格筋における AMPK 発現量は  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  いずれも WT と差がなく、活性にも大きな差が認められなかった。2. AZIP の肝臓において AMPK  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  の発現量の増大が認められたが、活性は WT に比べ低下していた。3. AZIP の肝 AMPK 活性の低下と相応し、PPAR  $\alpha$  等の脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現の低下と、PGC1  $\alpha$  等の糖新生に関わる遺伝子発現の上昇が認められた。さらに、4. レプチン投与により、肝 AMPK の活性化とそれに相応する糖脂質代謝関連遺伝子の発現量変化が認められた。以上より、脂肪萎縮性糖尿病における糖脂質代謝異常に肝 AMPK 情報伝達系の異常が関与し、レプチンによる肝 AMPK 情報伝達系の活性化が糖脂質代謝亢進作用に関与する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

近年の多くの研究から、5' AMP-activated protein kinase (AMPK) が糖脂質代謝制御における重要な鍵分子の一つであるという考え方が広く受け入れられている。レプチンが骨格筋において AMPK を活性化することが報告され、レプチンの糖脂質代謝亢進作用を説明する機序の一つとして注目されている (*Nature* 2002)。しかし、これまで病態モデルにおける検討も殆どなされておらず、レプチンの糖脂質代謝亢進作用における AMPK の意義は未だ不明な点が多い。そこで、レプチン投与により著明な糖脂質代謝の改善が認められる脂肪萎縮性糖尿病に着目し、そのモデル動物、A-ZIP トランスジェニックマウス(AZIP)における解析を実施した。

#### B. 研究方法

18時間絶食後の AZIP の肝臓、骨格筋を抱水クロラル麻酔下で迅速に摘出し、AMPK の発現量、酵素活性並びに、AMPK の下流で発現が制御されると考えられている糖脂質代謝に関連する分子の遺伝子発現量を野生型(WT)と比較検討した。さらに、レプチンの単回投与および、

浸透圧ミニポンプによる持続投与を行い、同様に検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、また京都大学が定める「動物実験の実施に関する規定」に準拠して実施し、動物に与える苦痛を最小限に留めるように最善を尽くす。

#### C. 研究結果

その結果、1. AZIP の骨格筋における AMPK 遺伝子発現量は  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  いずれも WT と差がなく、活性にも大きな差が認められなかった。2. AZIP の肝臓において AMPK  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  の遺伝子発現量増大が認められたが、活性は WT に比べ低下していた。3. 肝 AMPK 活性の低下と相応し、PPAR  $\alpha$  等の脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現の低下と、PGC1  $\alpha$  等の糖新生に関わる遺伝子発現の上昇が認められた。さらに、レプチン投与により、4. 骨格筋 AMPK の活性化のみならず、肝 AMPK の活性化が認められた。5. 肝 AMPK の活性上昇に相応する糖脂質代謝関連遺伝子の発現量変化が認められた。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

D. Taura, M.D., M. Noguchi, M. Sone, K. Hosoda, E. Mori, Y. Okada, K. Takahashi, K. Homma, N. Oyamada, M. Inuzuka, T. Sonoyama, K. Ebihara, N. Tamura, H. Itoh, H. Suemori, N. Nakatsuji, H. Okano, S. Yamanaka, K. Nakao Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 583:1029-1033, 2009

### 2. 学会発表

#### 国内学会

1. 南部拓央、荒井宏司、泰江慎太郎、益崎裕章、森本尚樹、宮脇尚志、三浦晶子、金本巨哲、八十田明宏、細田公則、中尾一和. 肥満症における脂肪組織由来アドレノメデュリンの意義. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
2. 野口倫生、細田公則、藤倉純二、富田 努、小鳥真司、森 栄作、泰江慎太郎、石井崇子、岡田定規、海老原 健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和. 脂肪細胞分化および糖代謝における ROCK-II の意義. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
3. 藤倉純二、細田公則、川口義弥、野口倫生、岩倉 浩、富田 努、小鳥真司、森 栄作、泰江慎太郎、石井崇子、岡田定規、日下部 徹、平田雅一、海老原 健、益崎裕章、谷垣健二、矢部大介、中尾一和. 腓特異的 Rbp-j ノックアウトマウスの検討. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
4. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、海老原 健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和. 肥満を基盤とする耐糖能異常の発症・進展における G 蛋白共役型脂肪酸受容体 GPR40 の意義の検討-遺伝性肥満 Koletsy ラットの腓島での GPR40 遺伝子発現-. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
5. 岩倉 浩、有安宏之、五十字大雅、細田公則、中尾一和、寒川健治、赤水尚史. NOD マウスへのグレリン長期投与の検討. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
6. 森 栄作、井田みどり、平田雅一、近藤絵里、小鳥真司、海老原 健、益崎裕章、奥 正次郎、大島秀武、志賀利一、細田公則、中尾一和. 改良 Dual VF-BIA 法による経時的内臓脂肪蓄積測定メタボリックシンドローム診療における臨床的意義. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
7. 小鳥真司、細田公則、富田 努、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、海老原 健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和. G 蛋白共役型中・長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の糖尿病でのインスリン分泌調整異常における病態生理的意義の検討. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
8. 野口倫生、細田公則、藤倉純二、富田 努、小鳥真司、森 栄作、泰江慎太郎、石井崇子、岡田定規、益崎裕章、中尾一和. 脂肪細胞分化、糖代謝における ROCK-II の意義. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
9. 藤倉純二、細田公則、川口義弥、野口倫生、岩倉 浩、富田 努、小鳥真司、森 栄作、泰江慎太郎、石井崇子、岡田定規、日下部 徹、平田雅一、海老原 健、益崎裕章、谷垣健二、矢部大介、中尾一和. 腓特異的 Rbp-j ノックアウトマウスの検討. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
10. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、海老原 健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和. G 蛋白共役型一脂肪酸受容体 GPR40 の糖尿病でのインスリン分泌調整異常における病態生理的意義の検討. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
11. 小鳥真司、細田公則、富田 努、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、海老原 健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和. 膜型中・長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデル Koletsy ラットの腓島での遺伝子発現-インスリン分泌調節異常との関連-. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
12. 岩倉 浩、有安宏之、五十字大雅、細田公則、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史. ラット腓部分切除モデルに対するグレリン投与による効果の検討. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
13. 野口倫生、細田公則、藤倉純二、富田 努、

- 小鳥真司、森 栄作、泰江慎太郎、石井崇子、海老原 健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和. 脂肪細胞分化および糖代謝におけるROCK-IIの意義. 第45回日本臨床分子医学会学術集会、2008/7/24-25、神戸
14. 榊田出、葛谷英嗣、井垣俊郎、藤永有理子、吉岡徹朗、近藤絵里、細田公則、中尾一和. 医療機関における生活習慣改善支援プログラムホームウエルサポートの有用性. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  15. 富田 努、細田公則、小鳥真司、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、森 栄作、海老原健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和. G 蛋白共役型受容体 40(GPR40)の肥満・糖代謝異常の発症・進展における意義の検討. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  16. 小鳥真司、細田公則、富田 努、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、森 栄作、海老原健、平田雅一、益崎裕章、土井隆一郎、中尾一和. 新規 G 蛋白共役型受容体 GPR119 のヒト臍臓および臍島細胞腫での遺伝子発現. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  17. 森 栄作、細田公則、野口倫生、小鳥真司、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、益崎裕章、中尾一和. 脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植治療に関する検討. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  18. 野口倫生、細田公則、藤倉純二、富田 努、小鳥真司、森 栄作、平田雅一、海老原健、益崎裕章、中尾一和. 脂肪細胞分化における Rho-ROCK pathway の意義. 第29回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  19. 藤倉純二、林 達也、富田 努、海老原健、益崎裕章、多森繁喜、花井拓美、宇佐美一政、細田公則、中尾一和. 糖尿病性腎症腎不全期および透析療法期でのミチグリニドの有用性. 第19回臨床内分泌学会 Update、2009/3/13-14、東京
  20. 藤倉純二、細田公則、富田 努、野口倫生、小鳥真司、森 栄作、内藤雅喜、平田雅一、海老原健、益崎裕章、中尾一和. 当科糖尿病患者における CS II 導入 8 症例の検討. 第19回臨床内分泌学会 Update、2009/3/13-14、東京

E. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究年度終了報告書

生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ  
低用量ストレプトゾトシン／高脂肪食負荷マウスを用いた2型糖尿病におけるレプチンの治療薬  
としての有用性に関する検討  
分担研究者：益崎 裕章（京都大学大学院医学研究科 講師）

これまでに我々は脂肪萎縮性糖尿病やインスリン分泌低下型糖尿病におけるレプチンの抗糖尿病薬としての有用性を報告してきた。本研究では、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ついて検討した。

8週齢C57BL/6J雄性マウスにストレプトゾトシンと高脂肪食を負荷して2型糖尿病モデルマウス（STZ/HFD マウス）を作製し、レプチンの治療効果を検討した。STZ/HFD マウスでは、体脂肪量の増加、インスリン抵抗性およびインスリン分泌低下を伴う高血糖、脂質代謝異常、肝臓および骨格筋中性脂肪含量の増加が認められた。2週間のレプチン持続皮下投与（20ng/g/hr）により、STZ/HFD マウスにおいて摂食抑制、約5%の体重減少、インスリン感受性の改善を伴う血糖値の低下（ $487 \pm 21 \text{mg/dl}$  vs.  $327 \pm 24 \text{mg/dl}$ ,  $P < 0.01$ ）が認められた。また血中中性脂肪、遊離脂肪酸濃度は正常マウスと同等レベルにまで改善し、総コレステロール濃度の有意な低下が認められた。さらに脂肪酸酸化に関わる骨格筋 $\alpha$ 2-AMPKの活性上昇とともに肝臓および骨格筋中性脂肪含量の低下が認められた。今回の投与量で得られた血中レプチン濃度（30.8ng/ml）は、レプチンの臨床試験においても認められる濃度であることから、今回の検討により、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が示された。

#### A. 研究目的

脂肪細胞から分泌されるレプチンは、摂食抑制およびエネルギー消費亢進による体重減少作用やインスリン感受性亢進を伴う糖脂質代謝亢進作用など多彩な生理作用を有する。これまでレプチンの糖脂質代謝亢進作用に着目してモデル動物を用いた検討を行い、脂肪萎縮性糖尿病やインスリン分泌低下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を報告し、さらにこれらの成果を踏まえて、ヒトの脂肪萎縮性糖尿病症例において長期のレプチン治療の有用性および安全性を証明した。本研究では、レプチンの抗糖尿病薬としての更なる臨床応用を目指して、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を2型糖尿病モデルマウスを用いて検討した。

#### B. 研究方法

2型糖尿病モデルマウスは、8週齢のC57BL/6J雄性マウスに、膵 $\beta$ 細胞破壊によりインスリン分泌低下を来すストレプトゾトシン（120 $\mu\text{g/g}$ ）と肥満およびインスリン抵抗性を誘導する高脂肪食（45kcal%）を負荷して作製した。このモデルマウス（STZ/HFD マウス）に

対して浸透圧ミニポンプを用いて2週間のレプチン持続皮下投与（20ng/g/hr）を行い、摂食量、体重、血中糖脂質代謝パラメータ（血糖、インスリン、中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール）、耐糖能試験、肝臓および骨格筋内中性脂肪含量、脂肪酸酸化に関わる酵素でレプチン感受性マーカーであるAMPKの骨格筋における活性に対するレプチンの効果を評価した。（倫理面への配慮）

動物実験については「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、また京都大学が定める「動物実験の実施に関する規定」に準拠して実施し、動物に与える苦痛を最小限に留めるように最善を尽くす。

#### C. 研究結果

STZ/HFD マウスでは、正常マウスと比較して摂食量は1.3倍、体脂肪量は1.8倍の増加が認められ、平均血中レプチン濃度は8.6ng/mlで正常マウスの約2倍であった。これはヒトでは日本肥満学会判定基準の肥満1度（BMI 25 kg/m<sup>2</sup>以上30kg/m<sup>2</sup>未満）に相当する。また高脂肪食負荷によりインスリン抵抗性が誘導されたが、

高脂肪食のみ負荷したマウスと比較して血中インスリン濃度は40-50%減少しており、自由摂食下での平均血糖値は490mg/dlにまで上昇した。さらに血中中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール濃度の上昇、肝臓および骨格筋内中性脂肪含量の増加が認められた。レプチン投与中のSTZ/HFDマウスの平均血中レプチン濃度は30.8ng/mlであり、既にヒト脂肪萎縮性糖尿病症例におけるレプチン治療において安全性が確認されている血中レプチン濃度範囲内であった。2週間のレプチン持続投与によりSTZ/HFDマウスの摂食量は抑制され、約5%の体重減少が認められた。さらに自由摂食下での平均血糖値は327mg/dlにまで改善した。レプチン投与中、耐糖能試験ではインスリン分泌の増加はないがブドウ糖負荷後の血糖上昇が有意に抑制された。以上の所見より、レプチンがインスリン感受性を亢進させ耐糖能を改善したものと考えられた。また血中中性脂肪、遊離脂肪酸濃度は正常マウスと同等レベルにまで改善し、総コレステロール濃度も有意な低下が認められた。さらにレプチン持続投与により肝臓および骨格筋内中性脂肪含量はそれぞれ35%、38%の低下が認められ、骨格筋 $\alpha$ 2-AMPK活性は1.8倍に上昇していた。レプチン持続投与による骨格筋における脂肪酸酸化亢進が組織内中性脂肪含量低下に関与した可能性が示唆された。Pair-feeding実験では、レプチン持続投与による摂食量の減少に加えて、摂食抑制作用とは独立したレプチンの糖脂質代謝改善作用が示めされた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Y. Miyamoto, H. Morisaki, I. Yamanaka, Y. Kokubo, H. Masuzaki, H. Tomoike, Y. Yoshimasa, K. Nakao, T. Morisaki. Association Study of 11  $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Gene Polymorphisms and Metabolic Syndrome in Urban Japanese Cohort. *Diabetes Res Clin Pract. in press*, 2009
2. K. Hotta, M. Nakamura, J. Takasaki, H. Takahashi, A. Takahashi, Y. Nakata, S. kamohara, K. Kotani, R. Komatsu, N. Itoh, I. Mineo, J. Wada, H. Masuzaki, M. Yoneda, A. Nakajima, T. Funhashi, S.

Miyazaki, K. Tokunaga, K. Hamaguchi, K. Tanaka, K. Yamada, T. Hanafusa, S. Oikawa, H. Yoshimatsu, K. Nakao, T. Sakata, Y. Matsuzawa, N. Kamatani, Y. Nakamura. Screening of 336 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in 85 Obesity-Related Genes Revealed McKusick-Kaufman Syndrome (MKKS) Gene Variants are Associated with Metabolic Syndrome. *J Hum Genet. in press*, 2009

3. N. Kobayashi, H. Masuzaki, T. Tanaka, S. Yasue, T. Ishii, N. Arai, T. Tomita, T. Miyawaki, T. Komeda, Y. Fukuda, N. Satoh, T. Kusakabe, M. Noguchi, J. Fujikura, F. Miyanaga, K. Ebihara, M. Hirata, K. Hosoda, H. Miyata, TS. Sato, K. Nakao. Index of Systemic Balance of End Products of Glucocorticoid Metabolism in Fresh Urine from Humans: Its Potential Usefulness in the Evaluation of Obesity-Related Diseases. *Obes Res Clin Pract in press*, 2009
4. T. Inokuchi, Z. Tsutsumi, S. Takahashi, T. Ka, A. Yamamoto, Y. Moriwaki, H. Masuzaki, T. Yamamoto. Effects of Benzbromarone and Allopurinol on Adiponectin in vivo and in vitro. *Horm Metab Res.* 41: 327-32, 2009
5. S. Yura, H. Itoh, N. Sagawa, H. Yamamoto, H. Masuzaki, K. Nakao, M. Kawamura, H. Mogami, Y. Ogawa, S. Fujii. Neonatal Exposure to Leptin Augments Diet-induced Obesity in Leptin-deficient *ob/ob* Mice. *Obesity.* 16:1289-1295, 2008
6. Y.S. Lee, A.Y. Kim, J. W. Choi, M. Kim, S. Yasue, H. J. Son, H. Masuzaki, K.S. Park, J.B. Kim. Dysregulation of Adipose GPx3 in Obesity Contributes to Local and Systemic Oxidative Stress. *Mol Endocrinol.* 9:2176-2189, 2008

##### 2. 学会発表

##### 国際学会

1. H. Masuzaki, K. Nakao. Adiposcience-Based Approach toward

Novel Therapies of the Metabolic Syndrome. The 65th KSBMB Annual Meeting Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology. in Seoul, Korea, May 8, 2008

2. H. Masuzaki, K. Nakao. Central Melanocortin Signaling and Leptin Resistance. The First Meeting of the Japan Branch of the International Neuropeptide Society, in Tokyo, Japan 31st of August, 2008

#### 国内学会

1. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、野口倫生、富田 努、田中智洋、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. マクロファージや未分化脂肪細胞における  $11\beta$ -HSD1 の向炎症的役割と病態的意義. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
2. 泰江慎太郎、益崎裕章、岡田定規、石井崇子、藤倉純二、平田雅一、海老原健、森本尚樹、細田公則、鈴木茂彦、中尾一和. 脂肪細胞組織由来レニン・アンジオテンシン系のメタボリックシンドロームにおける病態. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
3. 田中智洋、益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. 高脂肪食下ニコチン投与は視床下部摂食調節神経核のエンドカナビノイド受容体発現を増加させる. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
4. 岡田定規、益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、野口倫生、日下部徹、髭 秀樹、青谷大介、小鳥真司、森 栄作、富田 努、田中智洋、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. ヒト、マウス培養脂肪細胞を用いたアンジオテンシノジェン発現調節へのアプローチと脂肪組織 RAS の意義. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
5. 益崎裕章、中尾一和. レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 と糖尿病・肥満症：最近の知見. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
6. 益崎裕章. 肥満と RA 系の関係を探る. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008/5/16-18、青森
7. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、森 栄作、小鳥真司、髭 秀樹、青谷大介、日下部徹、野口倫生、富田 努、田中智洋、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. マクロファージや未分化脂肪細胞における  $11\beta$ -HSD1 の向炎症的役割と病態的意義. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
8. 泰江慎太郎、益崎裕章、岡田定規、石井崇子、日下部徹、髭 秀樹、青谷大介、小鳥真司、海老原健、平田雅一、藤倉純二、森本尚樹、内藤素子、細田公則、鈴木茂彦、中尾一和. 脂肪組織由来レニン・アンジオテンシン系のメタボリックシンドローム病態における意義. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
9. 岡田定規、益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、野口倫生、日下部徹、髭 秀樹、青谷大介、小鳥真司、森 栄作、富田 努、田中智洋、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. ヒト、マウス培養脂肪細胞系を用いたアンジオテンシノジェン発現調節機構の解析. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008/5/22-24、東京
10. 益崎裕章、中尾一和. 脂肪組織 endocrine, intracrine system と全身の糖脂質代謝調節. 第 26 回 日本内分泌代謝学サマーセミナー、2008/7/11-12、愛知
11. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. NF $\kappa$ B や MAPK 活性化を介した細胞内グルココルチコイド活性化酵素の向炎症作用. 第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、2008/7/24-25、神戸
12. 泰江慎太郎、益崎裕章、岡田定規、石井崇子、海老原健、平田雅一、藤倉純二、森本尚樹、小堀浩幸、細田公則、鈴木茂彦、中尾一和. 肥満における脂肪細胞由来アンジオテンシノジェン分泌 (A-AGT-S) の病態的意義. 第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、2008/7/24-25、神戸
13. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、田中智洋、山本祐二、日下部徹、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、

- 平田雅一、細田公則、中尾一和. NF・B・MAPK 活性化を介した肥満脂肪組織における細胞内グルココルチコイド活性化酵素の向炎症作用のメカニズム. アディポサイエンス研究会シンポジウム、2008/8/22、大阪
14. 益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、岡田定規、田中智洋、野口倫生、日下部徹、山本祐二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. ヒト脂肪組織バイオプシーによるメタボリックシンドロームの病態解析. アディポサイエンス研究会シンポジウム、2008/8/22、大阪
  15. 益崎裕章、田中智洋、中尾一和. Central Melanocortin Signaling and Leptin Resistance. 第 35 回日本神経内分泌学会、2008/8/31、東京都
  16. 益崎裕章、田中智洋、泰江慎太郎、海老原健、石井崇子、岡田定規、小塚智沙代、野口倫生、日下部徹、富田 努、山本祐二、藤倉純二、平田雅一、細田公則、中尾一和. 中枢神経系と脂肪組織のコミュニケーション機構: 病態解明と創薬の展望. 千里ライフサイエンスセミナー、208/10/3、大阪
  17. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. 肥満・脂肪細胞 NF $\kappa$ B, MAPK シグナル活性化を介する脂肪細胞グルココルチコイド活性化酵素の pro-inflammatory な作用機構の解明. 第 23 回日本糖尿病合併症学会、2008/10/3-4、東京
  18. 泰江慎太郎、益崎裕章、岡田定規、石井崇子、山本祐二、藤倉純二、平田雅一、海老原健、森本尚樹、小堀浩幸、細田公則、鈴木茂彦、中尾一和. 肥満症における脂肪組織レニン・アンジオテンシン系の臨床的意義. 第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  19. 岡田定規、益崎裕章、泰江慎太郎、石井崇子、小塚智沙代、田中智洋、山本祐二、日下部徹、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. ミネラルコルチコイド受容体を介した新規の脂肪細胞アンジオテンシノジェン発現調節機構. 第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  20. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、田中智洋、山本祐二、日下部徹、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. NF $\kappa$ B, MAPK 活性化を介する脂肪細胞グルココルチコイド活性化酵素の proinflammatory な作用機構. 第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  21. 益崎裕章、海老原健、田中智洋、平田雅一、日下部徹、野口倫生、富田 努、藤倉純二、細田公則、中尾一和. メタボリックシンドローム克服へのアプローチ 脂肪細胞ホルモン作用の賦活化によるメタボリックシンドローム克服の展望. 第 29 回日本肥満学会、2008/10/17-18、大分
  22. 益崎裕章、泰江慎太郎、野口倫生、田中智洋、日下部徹、富田 努、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. Adiposcience-Based Approach toward Novel Therapies of the Metabolic Syndrome. 第 29 回日本肥満学会、第 4 回日韓合同シンポジウム、2008/10/17-18、大分
  23. 石井崇子、益崎裕章、泰江慎太郎、岡田定規、小塚智沙代、田中智洋、山本祐二、日下部徹、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. NF・B・MAPK 活性化を介した肥満脂肪組織における細胞内グルココルチコイド活性化酵素の向炎症作用. 第 45 回日本糖尿病学会近畿地方会、2008/11/22、神戸
  24. 益崎裕章、泰江慎太郎、田中智洋、石井崇子、岡田定規、小塚智沙代、日下部徹、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. 脂肪組織における細胞内グルココルチコイド活性化酵素の病態的役割とメタボリックシンドローム治療標的としての可能性. 第 16 回日本ステロイドホルモン学会学術総会、2008/11/22、福井
  25. 益崎裕章、泰江慎太郎、田中智洋、石井崇子、岡田定規、小塚智沙代、日下部徹、野口倫生、富田 努、藤倉純二、海老原健、平田雅一、細田公則、中尾一和. アディポサイエンスからメタボリックシンドローム治療を考える. 第 12 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2008/11/29、熊本
- E. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (中尾一和)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Ogihara, K. Nakao, T. Fukui, K. Fukiyama, K. Ueshima, K. Oba, T. Sato, T. Saruta, for the CASE-J Trial Group.	Effects of candesartan compared with amlodipine for treatment of hypertensive patients with high cardiovascular risks in CASE-J trial.	Hypertension	51	393-398	2008
H. Yokoi, M. Mukoyama, K. Mori, M. Kasahara, T. Suganami, K. Sawai, T. Yoshioka, Y. Saito, Y. Ogawa, T. Kuwabara, A. Sugawara, and K. Nakao.	Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice.	Kidney Int	73	446-455	2008
K. Hotta, Y. Nakata, T. Matsuo, S. Komohara, K. Kotani, R. Komatsu, N. Itoh, I. Mineo, J. Wada, H. Masuzaki, M. Yoneda, A. Nakajima, S. Miyazaki, K. Tokunaga, M. Kawamoto, T. Funahashi, K. Hamaguchi, K. Yamada, T. Hanafusa, S. Oikawa, H. Yoshimatsu, K. Nakao, T. Sakata, Y. Matsuzawa, K. Tanaka, N. Kamatani, and Y. Nakamura.	Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese.	J. Hum. Genet	53	546-553	2008
H. Ariyasu, H. Iwakura, G. Yamada, K. Nakao, K. Kangawa, and T. Akamizu.	Efficacy of ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiological changes.	Endocrinology	149	3722-3728	2008
H. Arai, N. Kobayashi, Y. Nakatsuru, H. Masuzaki, T. Nambu, K. Tanaka, Y. Yamanaka, E. Kontodo, G. Yamada, T. Fujii, M. Miura, Y. Komatsu, N. Kanemoto, H. Ariyasu, K. Moriyama, A. Yasoda, and K. Nakao.	A case of cortisol producing adrenal adenoma without phenotype of Cushing's syndrome due to impaired 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 activity.	Endocr. J	55	709-715	2008
T. Tokudome, I. Kishimoto, T. Horio, Y. Arai, D-O Schwenke, J. Hino, I. Okano, Y. Kawano, M. Kohno, M. Miyazato, K. Nakao, and K. Kangawa.	Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart.	Circulation	17	2329-2339	2008
K. Hotta, M. Kanamura, Y. Nakata, T. Matsuo, S. Komohara, K. Kotani, R. Komatsu, N. Itoh, I. Mineo, J. Wada, H. Masuzaki, M. Yoneda, A. Nakajima, S. Miyazaki, K. Tokunaga, M. Kawamoto, T. Funahashi, K. Hamaguchi, K. Yamada, T. Hanafusa, S. Oikawa, H. Yoshimatsu, K. Nakao, T. Sakata, Y. Matsuzawa, K. Tanaka, N. Kamatani, and Y. Nakamura.	INSIG2 gene rs7566605 polymorphism is associated with severe obesity in Japanese.	J. Hum. Genet	53	857-862	2008