

2009/7/05 A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成 22 (2010) 年 3 月

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成 22(2010)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

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－	
中尾 一和	----- 1

II. 分担研究報告書

1. 脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ －Dunnigan 型家族性部分性脂肪萎縮症に対するレプチン補充療法の有用性に関する検討－	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 －レプチンによる肝 AMPK 活性化メカニズムの解明とレプチン作用における肝 AMPK の意義に関する検討－	平田 雅一	----- 10
3. 生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ －ヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症に対する脂肪組織再生に関する検討－	細田 公則	----- 12
4. 生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ －アミリンのレプチン抵抗性改善作用に関する検討 レプチン抵抗性高脂肪食負荷マウスにおける糖脂質代謝の改善－	日下部 徹	----- 16
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 19
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 内ocrine代謝内科 教授
分担研究者：海老原 建	京都大学医学部附属病院 探索医療センター 准教授
平田 雅一	京都大学大学院医学研究科 内ocrine代謝内科 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
日下部 徹	京都大学大学院医学研究科 内ocrine代謝内科 助教

研究要旨 本研究では医師主導治験等を実施し、脂肪萎縮症に対するレプチン治療の薬事承認を目指す。さらに、脂肪萎縮性糖尿病のみならず糖尿病領域における幅広い臨床応用を目指す。このためにはレプチン抵抗性の解決が重要課題であるが、本年度研究によりアミリン等の併用によりレプチン抵抗性の改善が可能であることが示された。また本年度はレプチンの作用メカニズムとして肝臓におけるAMPKについて解析を行い、世界で初めてレプチンが肝AMPKを制御していることを明らかにした。今後、肝疾患に対するレプチンの臨床応用が期待される。また本年度はiPS細胞を用いて、脂肪萎縮症の根治療法としての脂肪組織再生療法の可能性を示した。

A. 研究目的

我々は1994年以来、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, *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症例の全身性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的効果と安全性を証明した (*NEngl J Med* 351: 615, 2004, *J Clin Endocrinol Metab* 92: 532, 2007)。そこで本研究では医師主導治験等を実施し、

脂肪萎縮症に対するレプチン治療の薬事承認を目指す。

また我々はこれまでにマウスモデルを用いてレプチン治療が脂肪萎縮性糖尿病の他にもインスリン分泌低下型（1型）糖尿病や非肥満～軽度肥満2型糖尿病において有用であることを示してきた (*Diabetologia* 46: 1329-37, 2003, *Diabetologia* 52: 675-83, 2009)。一方、血中レプチン濃度は体脂肪量と正の相関関係にあり、肥満者では血中レプチン濃度が上昇しているにもかかわらず肥満が是正されないことからレプチン抵抗性の状態にあると考えられている。しかしながら2型糖尿病では肥満を合併するあるいは肥満に起因するものも多い。糖尿病領域におけるさらなるレプチンの臨床応用拡大にはレプチン抵抗性を改善する治療法の開発が重要である。また、これまでレプチンの糖脂質代謝改善作用について多くの報告があるにもかかわらず、その作用メカニズムについては不明な点も多い。そこで本研究ではレプチンの糖脂質代謝改善における作用メカニズムを検討するとともに、レプチン抵抗性改善薬の探索およびその有用性を検討する。

さらに、レプチンは脂肪萎縮そのものを改善するものではなく、現状では脂肪萎縮症における代謝異常のコントロールにはレプチン治療の半永久的な継続が必要であることから、脂肪萎縮症における脂肪組織再生療法の開発が強く望まれる。そこで本研究では、最近京都大学で開発されたヒト iPS 細胞の技術を用いて、脂肪萎縮症に対する脂肪組織再生に関する検討を行う。

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

GCP 基準に準拠した臨床試験として医師主導治験「脂肪萎縮症患者を対象としたレプチン補充療法についての第Ⅱ相試験」を実施する。また長期有効性および安全性試験として現在臨床研究においてレプチン治療継続中の症例を対象に高度医療評価制度下にて新たに「レプチン補充療法導入後の脂肪萎縮症患者を対象とした長期安全性臨床試験」を実施する。これら新たに開始する 2 つの臨床試験のデータにこれまでの臨床研究での治療成績および海外データを併せてレプチンの薬事承認を目指す。

2. レプチンによる肝 AMPK 活性化メカニズムの解明とレプチン作用における肝 AMPK の意義に関する検討

脂肪萎縮性糖尿病モデル動物 A-ZIP マウスを用い、レプチン投与、非投与時の肝臓および骨格筋の AMPK 活性を解析する。また、レプチンによる肝 AMPK 活性化作用のメカニズムを C57BL/6 マウスを用いて解析する。レプチンの肝臓への直接作用については初代培養ラット肝細胞を用いて検討する。肝臓 AMPK の病態生理的意義を検討するために AZIP マウスの肝臓における中性脂肪含量や代謝関連遺伝子の発現を検討する。

3. アミリンのレプチン抵抗性改善作用に関する検討

レプチン抵抗性高脂肪食負荷マウスに対してレプチン単独、アミリン単独あるいはレプチン+アミリンを肩甲骨間皮下に留置した浸透圧ミニポンプを用いて 2 週間、持続投与を行い、摂食量、体重の変化と同時に糖脂質代謝、骨格筋 AMPK 活性についても検討を行った。

4. ヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症に対する脂肪組織再生に関する検討

ヒト iPS 細胞をフィーダー細胞を用いず、胚様体形成を介する方法、介さない方法で脂肪細胞への分化誘導を行う。ト iPS 細胞に脂肪細胞への分化誘導後、分化細胞を回収しヌードマウスの皮下へ移植を行う。その後、移植細胞を摘出し、組織学的検討及び核酸を抽出し脂肪細胞関連遺伝子の発現解析を行う。

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

医師主導治験「脂肪萎縮症患者を対象としたレプチン補充療法についての第Ⅱ相試験」の試験デザインおよび開発ストラテジーについて 2010 年 1 月 22 日に医薬品医療機器総合機構と対面助言を実施し、症例数は脂肪萎縮症が稀少難病であることから約 2 年間の試験期間に最低 3 例以上、参加年齢の適格規準は脂肪萎縮症が先天性症例も多いことから日本の就学年齢である 6 歳以上、レプチンの用量・用法については被験者の正常血中レプチン濃度の 50%、100% および 200% に至と推定される用量を 1 日 1 回自己注射で皮下投与を行うこととした。治療期間は 5 か月に設定した。また治験終了後の症例については治療の観点からレプチンの継続投与が必要であるが、これを高度医療で実施することの了解を得た。高度医療評価で実施する「レプチン補充療法導入後の脂肪萎縮症患者を対象とした長期安全性臨床試験」については 2009 年 12 月 22 日厚生労働省医政局と試験デザインおよび開発ストラテジーについて事前相談を実施した。現在、医師主導治験については学内倫理委員会および IRB の審査中であり、平成 22 年度初めには治験届け提出予定である。高度医療に関してはすでに学内倫理委員会の承認を得て、現在厚生労働省に申請中であり、こちらも平成 22 年度初めには開始予定である。

2. レプチンによる肝 AMPK 活性化メカニズムの解明とレプチン作用における肝 AMPK の意義に関する検討

A-ZIP マウスの骨格筋では AMPK 活性に差が認められない一方で、肝臓では野生型の約半分に低下していた。AMPK 活性の減弱に相応し、A-ZIP マウスの肝臓では脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現の減少、脂質合成、糖新生に関わる遺伝子発現の亢進も認められた。A-ZIP マウスに対しレプチン投与したところ、骨格筋だけでは

なく、肝臓においても AMPK 活性の亢進が認められた。

迷走神経肝臓枝切断手術はレプチニンによる肝 AMPK 活性化作用に影響を及ぼさなかつたが、交感神経化学的除神経を行うとその作用は完全に抑制された。さらに、肝 AMPK 活性化作用は α 1 ブロッカーチの共投与により完全に抑制されたが、 β ブロッカーチの共投与による抑制は認められなかつた。また初代培養ラット肝細胞に対するレプチニン投与では AMPK 活性の上昇は認められなかつた。

3. アミリンのレプチニン抵抗性改善作用に関する検討

高脂肪食負荷マウスにレプチニンあるいはアミリンを持続皮下投与しても生食投与群と比べ明らかな摂食量および体重に明らかな変化を認めなかつた。一方、レプチニンとアミリンの共投与では、有意な摂食量の減少とともに明らかな体重の減少が観察された。またレプチニンおよびアミリンの単独投与では血糖値や血中インスリン濃度にも明らかな変化は認められず、脂肪肝の指標である肝臓中性脂肪含量や血中中性脂肪濃度、コレステロール濃度にも明らかな変化は認められなかつた。一方、レプチニンとアミリンの共投与では隨時血糖に明らかな差は認められないものの、血中インスリン濃度の明らかな低下が観察された。レプチニンとアミリンの共投与群に摂食量を合わせた Pair-fed 群にもおいても体重現象が観察されたが、インスリン感受性の改善や肝臓中性脂肪含量、血中中性脂肪濃度、コレステロール濃度の低下は認められなかつた。

4. ヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症に対する脂肪組織再生に関する検討

上記いずれの分化系においてもヒト iPS 細胞で脂肪細胞分化関連遺伝子の発現と脂肪蓄積を認めた。分化誘導後のヒト iPS 細胞をヌードマウスに移植した組織において HE 染色で菲薄化した細胞質と扁平な核を持つ脂肪細胞様組織構造を認めた。さらにヒト vimentin 特異的抗体にてヒト細胞由来であることを示し、Oil Red O 染色で脂肪滴が染色され、PCR にて脂肪細胞関連遺伝子群の遺伝子発現が確認された。

D. 考察

1. 脂肪萎縮症を対象としたレプチニンのトラン

スレーションナルリサーチ

脂肪萎縮症を対象としたレプチニンの開発ストラテジーは、医薬品医療機器総合機構および厚生労働省医政局との折衝により、GCP 基準に準拠した少数例での医師主導治験と高度医療評価制度を利用した長期有効性および安全性試験の 2 本立てで進めることとなつた。医師主導治験、高度医療ともに来年度（平成 22 年度）前半には開始予定であり、平成 24~25 年度での薬事承認を目指す。

2. レプチニンによる肝 AMPK 活性化メカニズムの解明とレプチニン作用における肝 AMPK の意義に関する検討

レプチニンは骨格筋 AMPK 活性化作用以外にも、肝 AMPK 活性化作用を有することが明らかになつた。またレプチニンは、初代培養ラット肝細胞を用いた検討から、肝臓に直接作用するのではなく、中枢神経および α 交感神経系を介して肝 AMPK を活性化するものと考えられた。また、脂肪萎縮性糖尿病では肝 AMPK 活性が低下しており、それが糖脂質代謝異常に関与していると考えられた。

3. アミリンのレプチニン抵抗性改善作用に関する検討

アミリンのレプチニン抵抗性改善作用は、レプチニンの摂食抑制作用や体重減少作用に対してだけではなく、レプチニンの糖脂質代謝改善作用に対しても存在することが明らかとなつた。糖脂質代謝改善作用におけるアミリンのレプチニン抵抗性改善作用は、Pair-fed 実験により、摂食量の減少とは独立した作用であることが示された。

4. ヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症に対する脂肪組織再生に関する検討

ヒト iPS 細胞が少なくともヒト ES 細胞に相当する脂肪細胞への分化能を持つことを明らかにした。胚様体形成を介する方法及び介さない方法でも共に脂肪蓄積と脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を認めた。また、今回、ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞が in vitro において分化誘導され、in vivo において生着することを初めて示した。

E. 結論

平成 20、21 年度の研究活動により、「脂肪萎縮症を対象としたレプチニン治療」については平成 22 年度中に薬事承認に向けた医師主導治験お

より高度医療の2つの試験が開始される予定となり、薬事承認が現実的なものとなった。

脂肪萎縮性糖尿病のみならず糖尿病領域における幅広いレプチンの臨床応用拡大にはレプチン抵抗性の解決が重要課題であるが、アミリンがレプチン抵抗性を改善することが示され、レプチン抵抗性解決の糸口が見いだされた。

また、これまで不明であったレプチンの肝臓におけるエネルギー代謝への作用メカニズムが、本年度のAMPKの解析により、少なくとも一部が解明された。今後、脂肪肝や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)などへのレプチンの臨床応用が期待される。

さらに今年度は脂肪萎縮症の根治療法としてiPS細胞を用いた脂肪組織再生医療の可能性について検討を行った。今後解決しなければならない点も多いが、iPS細胞により脂肪組織再生医療の可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Nakao, A. Yasoda, K. Ebihara, K. Hosoda, M. Mukoyama. Translational research of novel hormones: lessons from animal models and rare human diseases for common human diseases. *J Mol Med.* 87:1029-1039, 2009.
2. K. Miyashita, H. Itoh, H. Tsujimoto, N. Tamura, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, D. Taura, M. Inuzuka, T. Sonoyama, K. Nakao. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes.* 58: 2880-2892, 2009.
3. D. Taura, M. Sone, K. Homma, N. Oyamada, K. Takahashi, N. Tamura, S. Yamanaka, K. Nakao. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29: 1100-1103, 2009.
4. M Iwanishi, K Ebihara, T Kusakabe, W Chen, J Ito, H Masuzaki, K Hosoda, K

Nakao. Clinical characteristics and efficacy of pioglitazone in a Japanese diabetic patient with an unusual type of familial partial lipodystrophy. *Metabolism.* 58:1681-1687, 2009.

2. 学会発表

国際学会

1. Kazuwa Nakao. Translational Research in Endocrinology and Metabolism. The 8th Congress of Chinese Society of Endocrinology, in NanJing, September 5, 2009
2. Kazuwa Nakao. Translational Research -Lessons from Animal Models and Rare Human Diseases-, World Health Summit, in Berlin, October 2, 2009

国内学会

1. 中尾一和. 肥満症やメタボリックシンドロームに対する診断と治療法. 第2回肥満症治療学会学術集会、2009/7/10、東京
2. 中尾一和. 疾患モデル動物、稀少難病からCommon Diseaseへの展開. 第45回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2009/9/4、東京
3. 中尾一和. メタボリックシンドロームと高血圧-Adipotoxicityの概念と分子基盤-. 第32回日本高血圧学会総会、2009/10/2、大津

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：稻田洋一、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
—Dunnigan型家族性部分性脂肪萎縮症に対するレプチニン補充療法の有用性に関する検討—

分担研究者：海老原 健

京都大学医学部附属病院 探索医療センター 准教授

研究要旨 Dunnigan型家族性部分性脂肪萎縮症では内臓等に残存脂肪が認められ、血中レプチニン濃度も正常範囲であることが多いが、全身性脂肪萎縮症と同様にインスリン抵抗性糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝が認められる。しかしながら、これまで本邦においては部分性脂肪萎縮症に対するレプチニン治療の経験はなく、その有効性も明らかではない。今回、Dunnigan型家族性部分性脂肪萎縮症に対し、レプチニン補充療法を行い、糖脂質代謝異常に対する治療効果とともに、残存脂肪組織に対する影響についても評価した。レプチニン治療により糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝の明らかな改善が認められた。さらに、体重減少は軽度であるにもかかわらず腹部CT検査にて内臓脂肪の大幅な減少が観察された。以上より、今後レプチニンは全身性および部分性脂肪萎縮症はもとより2型糖尿病やメタボリックシンドローム治療薬としても期待される。

A. 研究目的

我々はこれまでに10例の全身性脂肪萎縮症に対しレプチニン補充療法を導入し、全身性脂肪萎縮症で認められるインスリン抵抗性糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝に対し、レプチニン治療の有用性を示してきた（*N Engl J Med* 351: 615-6, 2004、*J Clin Endocrinol Metab* 92: 532-41, 2007）。一方、Dunnigan型家族性部分性脂肪萎縮症では四肢や腹部の皮下脂肪は消失する一方で、頭頸部や背側上部の皮下や内臓には脂肪の蓄積が認められ、血中レプチニン濃度も低値であるものの正常下限であることが多い。しかしながら、Dunnigan型家族性部分性脂肪萎縮症においても全身性脂肪萎縮症と同様にインスリン抵抗性の糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝が認められる。これまでに本邦においては部分性脂肪萎縮症に対するレプチニン治療の経験はなく、その有効性も明らかではない。今回、Dunnigan型家族性部分性脂肪萎縮症に対し、レプチニン補充療法を行い、糖脂質代謝異常に対する治療効果とともに、残存脂肪組織に対する影響についても評価した。

B. 研究方法

症例は28歳女性。生下時には明らかな異常は認められなかった。5歳頃より四肢の皮下脂肪の現象が認められ、高校生の頃には頭頸部や腹部の脂肪蓄積を気にするようになった。20歳

時に糖尿病と高中性脂肪血症を指摘され、糖尿病治療薬および高脂血症治療薬が開始された。その後インスリン治療も開始されたが血糖コントロール不良の状態が持続していた。また、22歳時には肝生検により非アルコール性脂肪肝炎と診断された。28歳時に京都大学病院を受診。病歴および脂肪組織分布よりDunnigan型家族性部分性脂肪萎縮症を疑い原因遺伝子の検索を行ったところ、lamin A/C遺伝子にヘテロ変異が確認された。本症例に対し、1日2回皮下投与によるレプチニン補充治療を行い、糖脂質代謝について検討するとともに、DEXA法および腹部CT検査により全身の体脂肪分布および内臓脂肪の変化を検討した。

C. 研究結果

レプチニン治療開始前のHbA1c 6.7%はレプチニン治療開始3か月後には5.1%まで改善が認められた。このとき、中性脂肪濃度についても減少が認められ、それまで使用していたインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン、インスリンおよびベザフィブロートは中止可能となった。グルコースクランプ試験にてインスリン感受性を検討したところインスリン抵抗性の改善も認められた。また脂肪肝についても改善が観察され、腹部CT検査にて治療開始前に1.75Lであった肝臓容積は4か月後には1.25Lにまで縮小し、脂肪肝の指標であるL/S比（肝臓と脾臓のCT値の比）についても明らかな改善が認

められた。このとき、体重は4か月間で約2kgの減少であったが、腹部CT検査による内臓脂肪面積は60cm²から39cm²へと大幅な減少が観察された。またこれと一致して、DEXA法により体脂肪率の検討では、四肢の体脂肪率に明らかな変化は認められない一方、体幹部の体脂肪率の明らかな減少が認められた。

D. 考察

全身性脂肪萎縮症では全身の脂肪組織の消失に伴い著しい低レプチニン血症が認められ、レプチニン感受性についても良好であると考えられる。一方、部分性脂肪萎縮症では部位によっては代償性の脂肪蓄積も認められ、血中レプチニン濃度も正常範囲であることが多い。今回の検討から、レプチニン治療は全身性脂肪萎縮症のみならず部分性脂肪萎縮症に対しても有効であることが示された。さらに今回の症例ではレプチニン治療前には内臓脂肪の蓄積が認められたが、レプチニンは効果的に内臓脂肪を減少させることも示された。メタボリックシンドロームにおける内臓脂肪蓄積の意義については不明な点もあるが、メタボリックシンドロームにおけるレプチニン治療の有用性も示唆される。また、本邦では2型糖尿病に占めるBMI、血中レプチニン濃度ともに正常範囲である症例の割合が比較的多いとのデータもあり、今後、レプチニンは非肥満2型糖尿病治療薬としても期待される。

E. 結論

腹部等に残存脂肪を有し、正常範囲の血中レプチニン濃度を示す部分性脂肪萎縮症患者においてもレプチニン治療の糖脂質代謝異常における有用性が示され、今後、レプチニンは2型糖尿病やメタボリックシンドローム治療薬としても期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Okada, C. Kozuka, H. Masuzaki, S. Yasue, T. Ishii-Yonemoto, T. Tanaka, Y. Yamamoto, M. Noguchi, T. Kusakabe, T. Tomita, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, H. Sakaue, H. Kobori, M. Ham, Y.S. Lee, JB. Kim, Y. Saito, K. Nakao.

Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. *Metabolism*. in press, 2009.

2. X. Rong, Y. Li, K. Ebihara, M. Zhao, W. Aini, T. Kusakabe, M. Hirata, L. Miyamoto, M. Murray, K. Nakao. An adipose tissue-independent insulin-sensitizing action of telmisartan: a study in lipodystrophic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 331: 1096-1103, 2009.
3. H. Masuzaki, T. Tanaka, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao. Hypothalamic melanocortin signaling and leptin resistance-perspective of therapeutic application for obesity-diabetes syndrome. *Peptides*. 30: 1383-1386, 2009.
4. D. Taura, 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.
5. N. Yamada, G. Katsuura, I. Tatsuno, S. Kawahara, K. Ebihara, Y. Saito, K. Nakao. Orexins increase mRNA expressions of neurotrophin-3 in rat primary cortical neuron cultures. *Neurosci Lett*. 450:132-135, 2009.

2. 学会発表

国際学会

1. Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Daisuke Aotani, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Hiroaki Masuzaki, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Lipodystrophy and leptin-replacement therapy in Japan. The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, in Kagoshima, October 5-8, 2009
2. Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Megumi

- Aizawa-Abe, Takashi Miyazawa, Yuji Yamamoto, Lihito Miyamoto, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeru Sakai, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Lipodystrophy and leptin-replacement therapy in Japan. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
3. Takeru Sakai, Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Lihito Miyamoto, Daisuke Aotani, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Megumi Aizawa-Abe, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Amylin potentiates the leptin-induced enhancement of glucose and lipid metabolism in diet-induced obese mice. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
 4. Lihito Miyamoto, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Megumi Aizawa-Abe, Yuji Yamamoto, Tatsuya Hayashi, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Hepatic 5'AMP-activated protein kinase(AMPK) in lipoatrophic diabetes and leptin action. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
 5. Daisuke Aotani, Ken Ebihara, Nobukatsu Sawamoto, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Licht Miyamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeru Sakai, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Hidenao Fukuyama, Kazuwa Nakao. Leptin modulates brain activity associated with feeding behavior in patients with lipodystrophy. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
 6. Hitomi Iogawa, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Megumi Aizawa-Abe, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeru Sakai, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Leptin improved glycemic control with a dramatic reduction of visceral fat in a patient with Dunnigan variety of familial partial lipodystrophy. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
 7. Sachiko Kataoka-Yamamoto, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Licht Miyamoto, Daisuke Aotani, Takeru Sakai, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. The therapeutic possibility of leptin: The new remedy of fatty liver. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
 8. Daisuke Aotani, Ken Ebihara, Nobukatsu Sawamoto, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Licht Miyamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeru Sakai, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Hidenao Fukuyama and Kazuwa Nakao. Leptin modulates brain activity associated with feeding behavior in patients with lipodystrophy. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010

国内学会

1. 宮本理人、海老原健、日下部徹、髭 秀樹、青谷大介、平田雅一、勝浦五郎、益崎裕章、林 達也、細田公則、中尾一和. 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 (AZIP) における肝 5' AMP-activated protein kinase(AMPK) 情報伝達系の異常とレプチニン投与による AMPK の活性化. 第 46 回日本臨床分子医学会学術集会、2009/4/12-13、東京
2. 日下部徹、海老原健、平田雅一、宮本理人、青谷大介、髭 秀樹、山本祥子、益崎裕章、細田公則、中尾一和. 2 型糖尿病における レプチニ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、2009/4/12-13、東京
3. 宮本理人、海老原健、日下部徹、髭 秀樹、青谷大介、平田雅一、勝浦五郎、益崎裕章、林 達也、細田公則、中尾一和. 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ノン投与による肝 AMPK の活性化. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、
2009/4/23-25、群馬
4. 日下部徹、海老原健、青谷大介、宮本理人、
髭 秀樹、藤澤 武、山本祥子、益崎裕章、
細田公則、中尾一和. レプチノンの 2 型糖尿病治療薬としての有用性に関する検討. 第
82 回日本内分泌学会学術総会、
2009/4/23-25、群馬
 5. 海老原健、日下部徹、益崎裕章、細田公則、
中尾一和. 食欲制御とインスリン感受性を
基盤としたレプチノンのトランスレーショ
ナルリサーチ. 第 52 回日本糖尿病学会年
次学術集会、2009/5/21-24、大阪
 6. 宮本理人、海老原健、日下部徹、髭 秀樹、
青谷大介、山本祥子、山本祐二、益崎裕章、
林 達也、細田公則、中尾一和. 脂肪萎縮
性糖尿病モデル動物の病態とレプチノン作
用における AMPK の意義. 第 30 回日本肥満
学会、2009/10/9-10、静岡
 7. 五百川仁見、海老原健、青谷大介、日下部
徹、山本祥子、山本祐二、髭 秀樹、益崎
裕章、細田公則、中尾一和. 部分性脂肪萎
縮症におけるレプチノン補充療法. 第 30 回
日本肥満学会、2009/10/9-10、静岡

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
—レプチンによる肝 AMPK 活性化メカニズムの解明とレプチン作用における
肝 AMPK の意義に関する検討—**

分担研究者：平田 雅一

京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 非常勤講師

研究要旨 レプチン補充療法により脂肪萎縮症で認められる糖脂質代謝が著明に改善することを明らかにしてきたが、そのメカニズムは不明な点が多い。一方、AMPK は糖脂質代謝制御における重要な鍵分子であり、近年、レプチンが骨格筋で AMPK 活性化作用を示すことが報告されている。本研究では、脂肪萎縮性糖尿病における AMPK の意義を明らかにするとともに、今回確認されたレプチンによる肝 AMPK 活性化作用のメカニズムを検討した。レプチンは骨格筋 AMPK 活性化作用以外にも、肝 AMPK 活性化作用を有することが明らかになった。レプチンは肝臓に直接作用するのではなく、中枢神経および α 交感神経系を介して肝 AMPK を活性化するものと考えられた。また、脂肪萎縮性糖尿病では肝 AMPK 活性が低下しており、それが糖脂質代謝異常に関与していると考えられた。本研究により、脂肪萎縮性糖尿病の病態の成因およびレプチンの糖脂質代謝亢進作用における肝 AMPK 情報伝達系の意義が初めて示され、その治療標的としての可能性が明らかになった。

A. 研究目的

脂肪萎縮性糖尿病は脂肪組織が消失し、アディポサイトカインの低下を伴い、著しい糖脂質代謝異常を呈する疾患である。我々はレプチン補充療法により脂肪萎縮症で認められる糖脂質代謝が著明に改善することを動物モデルのみならず、ヒト症例においても明らかにしてきたが (*Diabetes* 50: 1440–8, 2001, *N Engl J Med* 351: 615–6, 2004, *J Clin Endocrinol Metab* 92: 532–41, 2007)、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。一方、AMPK は糖脂質代謝制御における重要な鍵分子である。近年、レプチンが骨格筋で AMPK 活性化作用を示すなど、アディポサイトカインに AMPK 活性化作用を有するものが複数見出されたことから、脂肪萎縮性糖尿病の病態に AMPK が関与する可能性が考えられる。そこで、本研究では、脂肪萎縮性糖尿病における AMPK の意義を明らかにするために脂肪萎縮性糖尿病モデル、A-ZIP トランスジェニックマウス (AZIP) における肝臓および骨格筋の AMPK 活性を解析した。またその結果、A-ZIP マウスの肝臓において AMPK 活性の低下を認め、レプチン投与によりその回復を認めたことから、レプチンによる肝 AMPK 活性化作用のメカニズムを検討するとともに、レプチン作用における肝 AMPK の意義についても検討を試

みた。

B. 研究方法

脂脂肪萎縮性糖尿病モデル動物、A-ZIP マウス (雄性, 15 週齢) を用い、肝臓および骨格筋の AMPK を触媒サブユニット $\alpha 1$, $\alpha 2$ のアイソフォーム特異的に解析した。さらに A-ZIP マウスに対し浸透圧ポンプを用いてレプチンを持続皮下投与し、骨格筋および肝臓における AMPK 活性を検討した。次にレプチンによる肝 AMPK 活性化作用のメカニズムを C57BL/6 マウスにて解析した。自律神経系の関与を迷走神経肝臓枝切断手術および guanethidine 持続投与による交感神経化学的除神経により検討した。さらに、レプチンによる肝 AMPK 活性化作用における交感神経系の関与について $\alpha 1$ ブロッカーおよび β ブロッcker を用いて検討した。またレプチンの肝臓への直接作用について初代培養ラット肝細胞を用いて検討した。肝臓 AMPK の病態生理的意義を検討するために AZIP マウスの肝臓における中性脂肪含量や代謝関連遺伝子の発現を検討した。

C. 研究結果

A-ZIP マウスの肝臓および骨格筋の $\alpha 1$, $\alpha 2$ アイソフォーム特異的 AMPK 活性の検討では、骨格筋では差が認められない一方で、肝臓では

α 1, α 2 いずれもの活性も野生型の約半分に低下していた。このとき、AMPK の遺伝子および蛋白発現量の低下は認められなかった。AMPK 活性の減弱に相応し、AZIP マウスの肝臓では脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現の減少、脂質合成、糖新生に関わる遺伝子発現の亢進も認められた。そこで A-ZIP マウスに対しレプチニンを浸透圧ポンプにて持続皮下投与したところ、骨格筋だけではなく、肝臓においても AMPK 活性の亢進が認められた。

次に、C57BL/6 マウスを用いた解析では、迷走神経肝臓枝切断手術はレプチニンによる肝 AMPK 活性化作用に影響を及ぼさなかつたが、guanethidine 持続投与による交感神経化学的除神経を行うとその作用は完全に抑制された。さらに、レプチニンによる肝 AMPK 活性化作用は α 1 ブロッカーの共投与により完全に抑制された。 β ブロッcker の共投与による抑制は認められなかつた。また、 α 1 アゴニスト投与時にも肝 AMPK 活性化は認められた。よって、レプチニンは交感神経系 α 作用を介して肝 AMPK 活性化作用を示すことが明らかとなつた。また初代培養ラット肝細胞に対するレプチニン投与では AMPK 活性の上昇は認められなかつた。

D. 考察

本研究により、レプチニンは骨格筋 AMPK 活性化作用以外にも、肝 AMPK 活性化作用を有することが明らかになつた。またレプチニンは、初代培養ラット肝細胞を用いた検討から、肝臓に直接作用するのではなく、中枢神経および α 交感神経系を介して肝 AMPK を活性化するものと考えられた。また、脂肪萎縮性糖尿病では肝 AMPK 活性が低下しており、それが糖脂質代謝異常に関与していると考えられた。さらに、レプチニンによる糖脂質代謝亢進作用には本研究で見出した肝 AMPK 活性化作用も関与すると考えられた。また、レプチニンの肝 AMPK 活性化作用の機序から、「脂肪組織—視床下部—肝臓」の新たな臓器連関を介した糖脂質代謝制御機構の存在が示唆された。

E. 結論

本研究により、脂肪萎縮性糖尿病の病態の成因およびレプチニンの糖脂質代謝亢進作用における肝 AMPK 情報伝達系の意義が初めて示され、その治療標的としての可能性が明らかになつ

た。

F. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1. 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の腹部脂肪蓄積測定と代謝パラメータ変化. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬

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
—ヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症に対する脂肪組織再生に関する検討—

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

研究要旨 レプチンは脂肪萎縮そのものを改善するものではなく、脂肪萎縮症における脂肪組織再生療法の開発が強く期待される。一方、ヒト iPS 細胞が樹立され、ヒト ES 細胞の抱える倫理的課題や免疫拒絶の壁を越えることができることから、これらの細胞を用いた再生医療の機運が高まっている。しかしヒト iPS 細胞の各細胞系譜への分化誘導法は十分に明らかにされていない。そこで本研究ではヒト iPS 細胞から脂肪細胞への分化誘導法の確立を試み、さらにヌードマウスを用いて *in vivo* におけるヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の分化及び生着に関する検討を行った。ヒト iPS 細胞が少なくともヒト ES 細胞に相当する脂肪細胞への分化能を持つことが明らかとなり、また、ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞が *in vitro* において分化誘導され、*in vivo* において生着することが初めて示された。今後より効率的な脂肪細胞への分化誘導法の開発を目指す。

A. 研究目的

我々はこれまでに脂肪萎縮症に対しレプチン補充療法を行い、レプチンが脂肪萎縮症で認められるインスリン抵抗性糖尿病や高中性脂肪血症、脂肪肝等の治療薬として有用であることを動物モデルのみならずヒト症例においても示してきた (*Diabetes* 50: 1440-8, 2001, *N Engl J Med* 351: 615-6, 2004, *J Clin Endocrinol Metab* 92: 532-41, 2007)。しかしながら、レプチンは脂肪萎縮そのものを改善するものではなく、現状では脂肪萎縮症における代謝異常のコントロールにはレプチン治療の半永久的な継続が必要であり、脂肪萎縮症における脂肪組織再生療法の開発が強く期待される。一方、ヒト iPS 細胞が樹立され、ヒト ES 細胞の抱える倫理的課題や免疫拒絶の壁を越えることができることから、これらの細胞を用いた再生医療の機運が高まっている。しかしヒト iPS 細胞の各細胞系譜への分化誘導法は十分に明らかにされていない。そこで、これまでのヒト、サル、マウスの ES 細胞からの血管構成細胞の誘導、移植研究の実績 (*Nature* 2000, *Blood* 2003, *Circulation* 2003, *ATVB* 2007, *PLoS One* 2008)、および歯髄由来幹細胞や申請者自身の胎児線維芽細胞などからの脂肪細胞分化研究の実績 (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, *J Biol Chem* 2007) に基づき、ヒト iPS 細胞から脂肪細胞への分化誘導法の確立を試みた。さらに、ヌード

マウスを用いて *in vivo* におけるヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の分化及び生着に関する検討を行った。

B. 研究方法

①ヒト iPS 細胞とヒト ES 細胞をフィーダー細胞を用いず、胚様体形成を介する方法で脂肪細胞への分化誘導を行う。
②ヒト iPS 細胞をフィーダー細胞を用いず、胚様体形成を介さない方法で脂肪細胞への分化誘導を行う。
③ヒト iPS 細胞に脂肪細胞への分化誘導を行い、分化細胞を回収しヌードマウスの皮下へ移植を行う。移植細胞を摘出し、組織学的検討及び核酸を抽出し脂肪細胞関連遺伝子の発現解析を行う。

C. 研究結果

上記①②のいずれの分化系においてもヒト iPS 細胞で脂肪細胞分化関連遺伝子の発現と脂肪蓄積を認めた。方法①では ES 細胞との比較を行った。脂肪細胞分化関連遺伝子である PPAR γ 2 及び Leptin の mRNA 発現と脂肪蓄積に関してヒト iPS 細胞は少なくともヒト ES 細胞に相当するレベルであった。方法②では分化関連遺伝子の経時的な解析を行った。分化誘導後 20 日目に PPAR γ 2 や C/EBP β , aP2, Leptin, Adiponectin の mRNA 発現を認めた。未分化マーカーである Nanog の mRNA 発現は経時に抑

制され、PPAR γ 2 及び Leptin の mRNA 発現は経時に増加した。また Oil Red O 染色により、20 日目ですべての iPS 細胞のクローンで脂肪蓄積を認めた。

分化誘導後のヒト iPS 細胞をヌードマウスに移植した組織において HE 染色で菲薄化した細胞質と扁平な核を持つ脂肪細胞様組織構造を認めた。さらにヒト vimentin 特異的抗体にてヒト細胞由来であることを示し、Oil Red O 染色で脂肪滴が染色され、PCR にて脂肪細胞関連遺伝子群の遺伝子発現が確認された。

D. 考察

ヒト iPS 細胞が少なくともヒト ES 細胞に相当する脂肪細胞への分化能を持つことを明らかにした。胚様体形成を介する方法及び介さない方法でも共に脂肪蓄積と脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を認めた。また、今回、ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞が *in vitro* において分化誘導され、*in vivo* において生着することを初めて示した。今後の課題としてより効率的な脂肪細胞への分化誘導法の開発を目指す。また移植細胞治療を目指すうえで脂肪細胞の純化・精製が必要であり、今後 FACS での未分化細胞の除去と脂肪細胞および前駆脂肪細胞の特異的な表面マーカー等を用いた単離を行い、効率的な分化誘導法の確立に取り組む予定である。

E. 結論

ヒト iPS 細胞が少なくともヒト ES 細胞に相当する脂肪細胞への分化能を持つことを明らかにした。また、ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞が *in vitro* において分化誘導され、*in vivo* において生着することを初めて示した。

F. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Ishii-Yonemoto, H. Masuzaki, S. Yasue, S. Okada, C. Kozuka, T. Tanaka, M. Noguchi, T. Tomita, J. Fujikura, Y. Yamamoto, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao. Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NF{ κ }B and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 298: E930-940, 2009.

2. H. Iwakura, H. Ariyasu, Y. Li, N. Kanamoto, M. Bando, G. Yamada, H. Hosoda, K. Hosoda, A. Shimatsu, K. Nakao, K. Kangawa, T. Akamizu. A mouse model of ghrelinoma exhibited activates growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297: E802-E811, 2009.
3. N. Kobayashi, H. Masuzaki, T. Tanaka, S. Yasue, T. Ishii, T. Tomita, T. Miyawaki, T. Komeda, Y. Fukuda, T. Kusakabe, M. Noguchi, J. Fujikura, K. Ebihara, M. Hirata, K. Hosoda, N. Satoh, M. Nakajima, Y. Okabayashi, T. S. Sato and K. Nakao. Index of the systemic balance of end products of glucocorticoid metabolism in fresh urine from humans. Its potential usefulness in the evaluation of obesity-related diseases. *Obesity Research and Clinical Practice.* 3:53-63. 2009

2. 学会発表

国際学会

1. Kiminori Hosoda, Ken Ebihara, Tsutomu Tomita, Toru Kusakabe, Shinji Odori, Junji Fujikura, Kazuwa Nakao. Adipotoxicity in insulin secretion and action. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
2. Masaki Naito, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Hiroshi Iwakura, Tsutomu Tomita, Michio Noguchi, Shinji Odori, Eisaku Mori, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Ken Ebihara, Hiroaki Masuzaki, Kazuwa Nakao. Leptin ameliorates hyperglycemia in diabetic, insulindeficient non-obese Akita mice. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
3. Shinji Odori, Kiminori Hosoda, Tsutomu Tomita, Junji Fujikura, Hiroshi Iwakura,

Michio Noguchi, Eisaku Mori, Masaki Naito, Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Hiroaki Masuzaki, Kazuwa Nakao. Clinical implication of a novel G protein-coupled receptor GPR119:GPR119 gene expression in humans. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010

4. Michio Noguchi, Kiminori Hosoda, Eisaku Mori, Kazuhiro Nakao, Daisuke Taura, Masakatsu Sone, Yuji Yamamoto, Junji Fujikura, Ken Ebihara, Kazuwa Nakao. Adipocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
5. Kiminori Hosoda, Michio Noguchi, Junji Fujikura, Muneya Fujimoto, Hiroshi Iwakura, Tsutomu Tomita, Takako Yonemoto, Naoki Arai, Masakazu Hirata, Ken Ebihara, Hiroaki masuzaki, Hiroshi Itoh, Shuh Narumiya, Kazuwa Nakao. Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase □ enhances adipogenesis. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
6. Tsutomu Tomita, Kiminori Hosoda, Shinji Odori, Junji Fujikura, Hiroshi Iwakura, Michio Noguchi, Eisaku Mori, Masaki Naito, Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Hiroaki Masuzaki, Kazuwa Nakao. Decreased gene expression of a G protein-coupled fatty acid receptor GPR40 in pancreatic islets of Koletsky rats. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, March 26- 30, 2010
7. Eisaku Mori, Kiminori Hosoda, Michio Noguchi, Junji Fujikura, Tsutomu Tomita, Shinji Odori, Masaki Naito, Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Kazuwa Nakao. Adipose tissue transplantation for lipodystrophy. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto,

March 26- 30, 2010

国内学会

1. 野口倫生、細田公則、曾根正勝、田浦大輔、森 栄作、本間康一郎、富田 努、藤倉純二、中尾一和. ヒト iPS 細胞における脂肪細胞分化誘導系の確立. 第 106 回日本内科学会、2009/4/10-12、東京
2. 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、内藤雅喜、海老原健、益崎裕章、中尾一和. 新規の G 蛋白共役型受容体 GPR119 の臨床的意義：ヒトにおける遺伝子発現の検討. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
3. 岩倉 浩、有安宏之、細田公則、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史. グレリン細胞腫瘍化トランスジェニックマウスの解析. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
4. 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、内藤雅喜、海老原健、益崎裕章、中尾一和. G 蛋白共役型受容体 40 (GPR40) の肥満・糖代謝異常における意義の検討. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
5. 野口倫生、細田公則、曾根正勝、森 栄作、田浦大輔、本間康一郎、富田 努、小鳥真司、内藤雅喜、藤倉純二、中尾一和. ヒト iPS 細胞からの脂肪細胞分化. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
6. 藤倉純二、細田公則、内藤雅喜、森 栄作、小鳥真司、野口倫生、富田 努、岩倉 浩、小塚智沙代、岡田定規、泰江慎太郎、石井崇子、宮本理人、田中智洋、日下部徹、山本祐二、平田雅一、海老原健、益崎裕章、中尾一和. Notch/Rbp-j シグナルと臍発生関連転写因子との相互作用. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
7. 森 栄作、細田公則、野口倫生、藤倉純二、富田 努、小鳥真司、内藤雅喜、海老原健、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の検討. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009/4/23-25、群馬
8. 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、内藤雅喜、海老原健、益崎裕章、中尾一和. 新規の G 蛋白共役型受容体 GPR119 の臨床的意義：ヒトにおける遺伝子発現の検討. 第 52 回日本糖

尿病学会年次学術集会、2009/5/21-24、大阪

9. 森 栄作、細田公則、野口倫生、藤倉純二、富田 努、小鳥真司、内藤雅喜、海老原健、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 52 回日本糖尿病学会年次学術集会、2009/5/21-24、大阪
10. 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、内藤雅喜、宮本理人、日下部徹、山本祐二、海老原健、益崎裕章、中尾一和. 新規の G 蛋白共役型受容体 GPR119 の臨床的意義: ヒトにおける遺伝子発現の検討. 第 30 回日本肥満学会、2009/10/9-10、静岡
11. 小鳥真司、富田 努、藤倉純二、岩倉 浩、野口倫生、森 栄作、内藤雅喜、日下部徹、海老原健、益崎裕章、細田公則、中尾一和. 新規の G 蛋白共役型-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義. 第 83 回日本内分泌学会、2010/3/25-28、京都
12. 森 栄作、野口倫生、中尾一泰、田浦大輔、曾根正勝、山本祐二、富田 努、藤倉純二、海老原健、細田公則、中尾一和. ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞を用いた脂肪萎縮症に対する細胞治療の開発. 第 83 回日本内分泌学会、2010/3/25-28、京都

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
アミリンのレプチン抵抗性改善作用に関する検討
—レプチン抵抗性高脂肪食負荷マウスにおける糖脂質代謝の改善—

分担研究者：日下部 徹

京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科 助教

研究要旨 レプチンの臨床応用拡大にはレプチン抵抗性を改善する治療法の開発が重要である。最近、膵 β 細胞より分泌されるホルモンであるアミリンがレプチンの体重減少作用においてレプチン抵抗性を改善することが報告された。そこで本研究ではアミリンがレプチンの糖脂質代謝改善作用においてもレプチン抵抗性を改善するかどうかを検討した。レプチン抵抗性高脂肪食マウスにレプチン単独、アミリン単独あるいはレプチン+アミリンを投与したところ、それ単独では体重や糖脂質代謝に変化は認められなかつたが、レプチンとアミリンの共投与では体重のみならず糖脂質代謝の明らかな改善が認められた。アミリンのレプチン抵抗性改善作用は、レプチンの体重減少作用に対してだけではなく、レプチンの糖脂質代謝改善作用に対しても存在することが明らかとなり、肥満に起因する2型糖尿病やメタボリックシンドロームにおいてもレプチンはアミリンと併用することにより治療薬として有用であると考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまでに脂肪萎縮性糖尿病、インスリーン分泌低下型（1型）糖尿病および非肥満2型糖尿病におけるレプチンの治療薬としての有用性を報告してきた（*Diabetes* 50: 1440-8, 2001、*Diabetologia* 46: 1329-37, 2003、*Diabetologia* 52: 675-83, 2009）。一方、レプチンは脂肪細胞より分泌されるホルモンであり、血中レプチン濃度は体脂肪量率に比例して上昇する。一般の肥満者では血中レプチン濃度が上昇しているにもかかわらず肥満状態が是正されず、レプチン抵抗性の状態にあると考えられる。2型糖尿病では肥満が原因で発症しているものも多く、糖尿病領域におけるさらなるレプチンの臨床応用拡大にはレプチン抵抗性を改善する治療法の開発が重要である。最近、膵 β 細胞より分泌されるホルモンであるアミリンが、レプチン抵抗性を示す高脂肪食負荷ラットおよびヒト肥満症例において、レプチンの体重減少作用においてレプチン作用を回復させることができた（*Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7257-62, 2008）。そこで本研究ではアミリンがレプチンの有する糖脂質代謝改善作用においてもレプチン抵抗性を改善するかどうかを検討することとした。

B. 研究方法

まず、本研究で用いるC57BL/6Jマウスにおいてもアミリンがレプチンの体重減少作用において高脂肪食負荷（45%高脂肪食、5週間）により誘導したレプチン抵抗性を改善するかを確認した。このマウスに対してレプチン単独、アミリン単独あるいはレプチン+アミリンを肩甲骨間皮下に留置した浸透圧ミニポンプを用いて2週間、持続投与を行い、摂食量、体重の変化と同時に糖脂質代謝についても検討を行った。さらに、レプチンは骨格筋AMPK活性を介して糖脂質代謝改善作用を発揮することが知られていることから、骨格筋AMPK活性についても検討を行った。なお、今回のレプチンおよびアミリンの用量はそれ単独では体重や摂食量に効果を示さない量とした。

C. 研究結果

5週間の高脂肪食負荷を行ったC57BL/6Jマウスにレプチン0.5mg/kg/dayあるいはアミリン0.1mg/kg/dayを2週間持続皮下投与しても生食投与群と比べ明らかな摂食量および体重に明らかな変化を認めなかつた。しかしながらレプチン0.5mg/kg/dayとアミリン0.1mg/kg/dayの共投与では、有意な摂食量の減少とともに明らかな体重の減少が観察された。このとき、レ

プチンおよびアミリンの単独投与では血糖値や血中インスリン濃度にも明らかな変化は認められず、脂肪肝の指標である肝臓中性脂肪含量や血中中性脂肪濃度、コレステロール濃度にも明らかな変化は認められなかった。一方、レプチンとアミリンの共投与では隨時血糖に明らかな差は認められないものの、血中インスリン濃度の明らかな低下が観察され、インスリン感受性が改善しているものと考えられた。実際、インスリン負荷試験においてレプチンとアミリンの共投与群においてのみインスリン感受性の増強が確認された。さらに、糖代謝だけではなくレプチンとアミリンの共投与群では肝臓中性脂肪含量や血中中性脂肪濃度、コレステロール濃度の低下も観察された。また骨格筋AMPK活性を測定したところ、レプチンとアミリンの共投与群においてのみ有意な上昇が観察された。次に、レプチンとアミリンの共投与による糖脂質代謝の改善が摂食量の減少によるものであるかどうかを検討するために、レプチンとアミリンの共投与群に摂食量を合わせるPair-fed実験を行った。Pair-fed群にもおいても体重現象が観察されたが、その程度はレプチンとアミリンの共投与群と比較して小さいものであった。さらにPair-fed群ではレプチンとアミリンの共投与群で認められたインスリン感受性の改善や肝臓中性脂肪含量、血中中性脂肪濃度、コレステロール濃度の低下は認められなかった。

D. 考察

今回の検討では、アミリンのレプチン抵抗性改善作用はマウスにおいても認められ、種族を超えた作用であることが確認された。また、アミリンのレプチン抵抗性改善作用は、レプチンの摂食抑制作用や体重減少作用に対してだけではなく、レプチンの糖脂質代謝改善作用に対しても存在することが明らかとなつた。糖脂質代謝改善作用におけるアミリンのレプチン抵抗性改善作用は、Pair-fed実験により、摂食量の減少とは独立した作用であることが示された。今回のレプチンあるいはアミリンの使用量はそれぞれ単独では効果を示さない量であったことから、アミリンがレプチン抵抗性を改善するだけではなく、レプチンがアミリン作用を増強する可能性も示唆された。

E. 結論

アミリンのレプチン抵抗性改善作用は、レプチンの摂食抑制作用や体重減少作用に対してだけではなく、レプチンの糖脂質代謝改善作用に対しても存在することが明らかとなり、肥満に起因する2型糖尿病やメタボリックシンドロームにおいてもレプチンはアミリンと併用することにより治療薬として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 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. 学会発表

国際学会

1. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Hideki Tanioka, Masakazu Hirata, Lichit Miyamoto, Fumiko Miyanaga, Hideki Hige, Daisuke Aotani, Takeshi Fujisawa, Hiroaki Masuzaki, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. 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. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting, in Washington, D.C, June 10- 13, 2009

2. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Takeru Sakai, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Yuji Yamamoto, Megumi Aizawa-Abe, Lichit Miyamoto, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Gene analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japan. 14th International Congress of Endocrinology, in Kyoto, Japan, March 26- 30, 2010