

201015001A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成23（2011）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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成 23(2011)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 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 ー薬事承認を目指した医師主導治験および高度医療（第3項先進医療）の実施ー 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f-MRIを用いた脂肪萎縮症における食欲異常と脳神経活動の解析ー 平田 雅一	----- 11
3. 生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ ー非アルコール性脂肪肝モデルマウスを用いたレプチンの脂肪肝治療薬としての有用性の検討ー 細田 公則	----- 13
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GLP-1製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性の検討 2型糖尿病モデル、STZ/HFDマウスにおけるレプチン抵抗性および糖代謝改善作用ー 日下部 徹	----- 17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 20
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 22
-----------------	----------

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）
平成 22 年度 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 内分泌代謝内科	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 内分泌代謝内科	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 内分泌代謝内科	助教

研究要旨 本研究では新規の脂肪萎縮症患者に対するレプチン補充療法の治療効果および安全性を評価する医師主導治験「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」と、既にレプチン治療が導入されている脂肪萎縮症患者において長期有効性と安全性を評価する高度医療（第3項先進医療）「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」を並行して実施し、脂肪萎縮症に対するレプチン補充療法の薬事承認を目指す。また本年度は脂肪萎縮症における過食のメカニズムを解明することを目的に、機能的磁気共鳴画像法（f-MRI）を用いて、脂肪萎縮症を対象とした脳神経活動の解析を行った。さらに、脂肪萎縮性糖尿病のみならず生活習慣病領域における幅広い臨床応用を目指しているが、このためにはレプチン抵抗性の解決が重要課題である。本年度はGLP-1製剤の併用による糖尿病領域でのレプチン治療の有用性を示した。また本年度は糖尿病領域以外にも脂肪肝に対するレプチンの治療薬としての有用性を検討し、レプチンには肝臓特異的に脂肪蓄積を改善する作用があることを示した。

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、*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)。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。

一方、脂肪萎縮症ではしばしば著しい過食が認められ、脂肪萎縮症の予後を左右する代謝合併症を悪化させる要因となっている。したがって、脂肪萎縮症において脳の摂食関連領域における神経活動を評価することは、病態解明や治療法および診断法の開発に結びつくものと期待される。そこで今回、脂肪萎縮症における過食のメカニズムを解明することを目的に、機能的磁気共鳴画像法（f-MRI）を用いて、脂肪萎縮症を対象とした脳神経活動の解析を行った。

さらに我々は生活習慣病領域におけるレプチンの臨床応用の拡大を目指しているが、一般の肥満者では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、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。近年、GLP-1製剤をはじめとするインクレチン製

剤が我が国でも承認され、広く臨床の現場で糖尿病治療における有用性が認識されるようになった。特に GLP-1 は膵β細胞における末梢作用のみならず、食欲抑制や体重抑制などの中枢作用が注目されている。そこで本研究では GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性を検討した。

また我々は脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法において脂肪肝が著明に改善することを報告してきた。またレプチンは主に中枢神経系およびα交感神経を介して、脂肪酸酸化亢進に働く AMP キナーゼを肝臓において活性化することを見いだしてきた。近年、肝硬変や肝癌の成因として非アルコール性脂肪肝が注目されているが、脂肪肝の治療は食事療法や運動療法などの減量治療に限られており、脂肪肝特異的な治療薬はこれまでのところ存在しない。そこで本研究ではレプチン臨床応用の対象疾患として脂肪肝に着目し、レプチンの治療薬としての有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 薬事承認を目指した医師主導治験および高度医療（第3項先進医療）の実施

新規の脂肪萎縮症患者に対するレプチン補充療法の治療効果および安全性を評価する医師主導治験「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」と、既にレプチン治療が導入されている脂肪萎縮症患者において長期有効性と安全性を評価する高度医療（第3項先進医療）「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」を並行して実施し、脂肪萎縮症に対するレプチン補充療法の薬事承認を目指す。

2. f-MRI を用いた脂肪萎縮症における食欲異常と脳神経活動の解析

脂肪萎縮症患者および非肥満健常者を対象に、Visual Analogue Scale (VAS) と食物画像刺激に対する食欲スコア化を用いて空腹時および食後の食欲を評価した。また、食欲の評価と同時に f-MRI を用いて食物画像刺激下での脳神経活動を解析した。

3. GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性の検討

GLP-1 製剤として exendin-4 を用い、exendin-4 がレプチンの体重減少作用において高脂肪食負荷により誘導したレプチン抵抗性を改善する作用があるかどうかを検討した。次に、レプチン抵

抗性とインスリン分泌低下を併せ持つ2型糖尿病モデル、STZ/HFD マウスを用いて、レプチンと exendin-4 共投与のインスリン分泌に及ぼす影響を検討した。

4. 非アルコール性脂肪肝モデルマウスを用いたレプチンの脂肪肝治療薬としての有用性の検討

レプチンの脂肪肝治療薬としての有用性の検討には、単なる抗肥満薬や抗糖尿病薬には認められない肝臓特異的な作用を明らかにすることが必要である。そこで本研究では明らかな過食や肥満を認めない非アルコール性脂肪肝モデル、FLS マウスおよび、インスリン感受性が良好で治療前より血中インスリン濃度が低値である非アルコール性脂肪肝モデル、Alb-Cre Ptenflox/flox マウスを用いて検討を行った。これらのマウスに浸透圧ミニポンプを用いて2週間のレプチン持続投与を行い、脂肪肝に対する治療効果を検討した。

C. 研究結果

1. 薬事承認を目指した医師主導治験および高度医療（第3項先進医療）の実施

医師主導治験については平成22年4月に医薬品医療機器総合機構と対面助言を実施し、実施計画を策定した。平成22年6月に治験届けを行い、30日調査後の7月治験届けが完了した。同年11月に第1例目の症例登録およびレプチン治療を開始し、その後も順調に症例数を増やしている。

一方、脂肪萎縮症は慢性疾患であるためレプチン治療においてはその長期有効性と安全性が求められる。しかし全国にちらばる症例に対し長期試験を医師主導治験で実施することは経済的にもマンパワー的にも困難であるため、長期有効性および安全性試験を高度医療の制度を利用して実施することとした。平成22年5月高度医療を申請し、同月高度医療評価会議承認、同7月先進医療専門家会議および中央社会保険医療協議会承認をそれぞれ得た。同年11月より第1例目の症例登録およびレプチン治療を開始し、その後も順調に症例数を増やしている。

2. f-MRI を用いた脂肪萎縮症における食欲異常と脳神経活動の解析

脂肪萎縮症と健常者の食欲を VAS および食物画像に対する食欲スコアで評価した結果、食前の空腹感に両者で大きな差は認められなかったが、食後の満足感については健常者と比較し脂肪萎縮症で有意な低下が認められた。食欲刺激に対す

る脳神経活動を f-MRI により解析した結果、空腹時には健常者、脂肪萎縮症ともに前頭前野眼窩部、扁桃体、島、尾状核、被殻、淡蒼球などの多くの摂食関連領域で共通して反応が認められた。これらの領域の多くは、食後に、健常者では反応が消失したが、脂肪萎縮症ではこれらの領域の多くで反応の残存が確認された。脂肪萎縮症と健常者を直接比較した解析においても、両者の差は空腹時よりも食後に扁桃体、島、尾状核、被殻、淡蒼球などの領域で認められた。

3. GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性の検討

高脂肪食負荷マウスにレプチン 500ng/g/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った。一方、exendin-4 20ng/g/day の2週間持続皮下投与では、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。さらにレプチンと exendin-4 の共投与では、exendin-4 単独よりさらに有意な摂食量と体重の減少が観察された一方、exendin-4 は膵β細胞に発現するGLP-1 受容体に作用することによりグルコース応答性インスリン分泌を増強することが知られている。そこで次に、STZ/HFD マウスを用いて膵β細胞機能に対するレプチンと exendin-4 共投与の治療効果を検討した。2週間のレプチン単独投与によりインスリン分泌能の改善が認められたが、レプチンと exendin-4 の共投与によりさらなるインスリン分泌能の増強が観察された。

4. 非アルコール性脂肪肝モデルマウスを用いたレプチンの脂肪肝治療薬としての有用性の検討

2週間のレプチン持続投与により FLS マウスの摂食量および体重増加は抑制が認められ、脂肪肝は著明な改善が認められた。そこで生食投与群の摂食量をレプチン投与群に合わせる Pair-feeding 実験を行ったところ、Pair-fed 群でも脂肪肝の改善は認められるものの、レプチン投与群と比較し、その改善程度は明らかに弱いものであった。レプチン投与群では有意なインスリン感受性の亢進と血中インスリン濃度の低下が認められ、レプチンによる脂肪肝改善作用の一部は血中インスリン濃度の低下によるものと考えられた。一方、インスリン感受性が良好で治療前より血中インスリン濃度が低値である Alb-Cre Ptenflox/flox マウスにおいてもレプチン投与により脂肪肝は著明な改善が認められ、この時、血

中インスリン濃度の低下は観察されず、この脂肪肝の改善はインスリンを介さない作用であるものと考えられた。一方、レプチン投与により肝臓 AMP キナーゼの活性化および脂肪酸酸化関連分子 CPT1 の遺伝子発現上昇が観察された。

D. 考察

1. 薬事承認を目指した医師主導治験および高度医療（第3項先進医療）の実施

薬事承認を目指して、医師主導治験を実施することとしたが、治験の計画段階で、脂肪萎縮症は慢性疾患であることから長期有効性および安全性確認のための長期試験が問題として浮上した。全国にちらばる症例に対し長期間、治験を維持することは医師主導では困難であることから、今回は高度医療の制度を利用することとした。高度医療においても承認申請に繋がる科学的評価可能なデータの収集を目的としており、また保健医療の併用が可能であり、補償保険も存在することから今回の目的に適した制度であると言える。

2. f-MRI を用いた脂肪萎縮症における食欲異常と脳神経活動の解析

脂肪萎縮症における過食の主な原因は血中レプチン濃度の低下であると考えられる。今回の検討で、空腹時の食欲は脂肪萎縮症と健常者で明らかな差が無く、食後の満足感に差が認められたが、このことはレプチンの食欲抑制作用は空腹感の軽減よりも食後の満足感に強く作用することを示唆している。f-MRI の解析においては食後に脂肪萎縮症で、扁桃体、島、尾状核、被殻、淡蒼球において神経活動の亢進が認められ、視床下部における有意な神経活動の変化は検出されなかった。レプチンの視床下部以外での作用は不明な点が多いが、今回の検討により、レプチン作用において扁桃体、島、尾状核、被殻、淡蒼球が何らかの役割を有していることが示唆された。

3. GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性の検討

レプチン単独では摂食抑制や体重減少が認められない高脂肪食負荷マウスにおいて、GLP-1 製剤との共投与により摂食抑制および体重減少が増強されたことから、GLP-1 製剤にはレプチン抵抗性改善作用があることが示唆された。またインスリン分泌能についてもレプチンと GLP-1 製剤の共投与でさらなる増強効果が認められ、糖尿病治療におけるレプチンと GLP-1 製剤共投与の有用性が示された。今後、膵β細胞におけるレプチン

ンと GLP-1 製剤の相互作用についてさらなる検討が望まれる。

4. 非アルコール性脂肪肝モデルマウスを用いたレプチンの脂肪肝治療薬としての有用性の検討

レプチンの脂肪肝治療薬としての有用性の検討には、単なる抗肥満薬や抗糖尿病薬には認められない肝臓特異的な作用を明らかにすることが必要である。そこで本研究では明らかな過食や肥満を認めない非アルコール性脂肪肝モデル、FLS マウスおよび、インスリン感受性が良好で治療前より血中インスリン濃度が低値である非アルコール性脂肪肝モデル、Alb-Cre Ptenflox/flox マウスを用いて検討を行った。FLS マウスおよび Pair-feeding を用いた検討から、レプチンには摂食抑制や体重抑制を介さない脂肪肝改善作用を有していることが明らかとなった。さらに、Alb-Cre Ptenflox/flox マウスを用いた検討からはインスリンの作用変化を介さない脂肪肝改善作用を有していることも明らかとなった。以上より、レプチンには肝臓特異的に脂肪蓄積を改善する作用があることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. G. Yamada, H. Ariyasu, H. Iwakura, H. Hosoda, T. Akamizu, K. Nakao, K. Kangawa. Generation of Transgenic Mice Overexpressing a Ghrelin Analog. *Endocrinology*. 151:5935-5940, 2010.
2. X. Rong, Y. Li, K. Ebihara, M. Zhao, T. Kusakabe, T. Tomita, M. Murray, K. Nakao. Irbesartan treatment up-regulates hepatic expression of PPARalpha and its target genes in obese Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats: a link to amelioration of hypertriglyceridaemia. *Br J Pharmacol*. 160:1796-807, 2010.
3. M. Inuzuka, N. Tamura, N. Yamada, G. Katsuura, N. Oyamada, D. Taura, T. Sonoyama, Y. Fukunaga, K. Ohinata, M. Sone, K. Nakao. C-type natriuretic peptide as a new regulator of food intake and energy expenditure. *Endocrinology*. 151:3633-3642, 2010.
4. X. Rong, Y. Li, K. Ebihara, M. Zhao, J. Naowaboot, T. Kusakabe, K. Kuwahara, M. Murray, K. Nakao. Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia*. in press, 2010.
5. K. Nakao, M. Hirata, K. Oba, S. Yasuno, K. Ueshima, A. Fujimoto, T. Ogihara, T. Saruta; CASE-J Trial Group. Role of diabetes and obesity in outcomes of the candesartan antihypertensive survival evaluation in Japan (CASE-J) trial. *Hypertens Res*. 33:600-606, 2010.
6. H. Iwakura, Y. Li, H. Ariyasu, H. Hosoda, N. Kanamoto, M. Bando, G. Yamada, K. Hosoda, K. Nakao, K. Kangawa, T. Akamizu. Establishment of a novel ghrelin-producing cell line. *Endocrinology*. 151:2940-2945, 2010.
7. H. Ariyasu, H. Iwakura, G. Yamada, N. Kanamoto, M. Bando, K. Kohno, T. Sato, M. Kojima, K. Nakao, K. Kangawa, T. Akamizu. A postweaning reduction in circulating ghrelin temporarily alters growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone in male mice but does not affect somatic growth. *Endocrinology*. 151:1743-1750, 2010.
8. S. Yasue, H. Masuzaki, S. Okada, T. Ishii, C. Kozuka, T. Tanaka, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, A. Katsurada, N. Ohashi, M. Urushihara, H. Kobori, N. Morimoto, T. Kawazoe, M. Naitoh, M. Okada, H. Sakaue, S. Suzuki, K. Nakao. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. *Am J Hypertens*. 23:425-431, 2010.
9. 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, YS. Lee, JB. Kim, Y. Saito, K. Nakao. Adipose tissue-specific dysregulation of

angiotensinogen by oxidative stress in obesity. *Metabolism*. 59:1241-1251, 2010.

2. 学会発表

国際学会

1. Kazuwa Nakao. Translational Research in Cardiovascular Endocrinology and Metabolism(CVEM) – Breakthroughs for common human diseases using excellent animal models and rare human diseases— International Symposium CVEM, in Japan, April 1, 2010
2. Kazuwa Nakao. Translational Research and Animal Disease Models. The XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat, in Japan, November 30, 2010
3. Kazuwa Nakao. Translational Research of Novel Hormones. International Symposium Frontiers in Biologically Active Peptide Research, in Japan, December 7, 2010

国内学会

なし

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
ー薬事承認を目指した医師主導治験および高度医療（第3項先進医療）の実施ー

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 脂肪萎縮症は難治性疾患であるが、これまでに有効な治療法は確立されておらず、早急な原因究明と治療法の確立が切望される。これまでに脂肪萎縮症の糖脂質代謝異常は低レプチン血症が主因であり、レプチン治療が著効することを報告してきた。そこで本研究では脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法の薬事承認を目指して、新規症例を対象とした医師主導治験および長期有効性と安全性を評価する高度医療（第3項先進医療）を実施する。平成22年度内に医師主導治験については対面助言、治験届けを完了し、試験を開始した。高度医療についても高度医療評価会議、先進医療専門家会議および中央社会保険医療協議会の承認を得て、試験を開始した。今後、治験終了後には治験および高度医療の臨床データを取りまとめ、承認申請を行う予定である。

A. 研究目的

脂肪萎縮症には原因や消失する脂肪組織の部位により様々なタイプが存在するが、脂肪組織の消失により血中レプチン濃度が低下し種々の代謝異常を合併することは共通している。脂肪萎縮症はその合併症により平均寿命 30~40 歳とも言われる難治性疾患であるが、これまでに有効な治療法は確立されておらず、早急な原因究明と治療法の確立が切望される。これまでに脂肪萎縮症の糖脂質代謝異常は低レプチン血症が主因であり、レプチン治療が著効することを報告し（*Diabetes* 2001）、2002 年より脂肪萎縮症を対象にレプチン補充療法を開始し、糖尿病、高中性脂肪血症、脂肪肝に対する劇的改善効果と安全性を8年間の長期にわたって証明してきた（*NEngl J Med* 2004、*J Clin Endocrinol Metab* 2007）。そこで本研究では脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法の薬事承認を目指して、新規症例を対象とした医師主導治験および長期有効性と安全性を評価する高度医療（第3項先進医療）（高度医療評価会議、先進医療専門家会議および中央社会保険医療協議会承認済）を実施する。

B. 研究方法

本研究では、新規の脂肪萎縮症患者に対するレプチン補充療法の治療効果および安全性を評価する医師主導治験「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」と、既にレ

プチン治療が導入されている脂肪萎縮症患者において長期有効性と安全性を評価する高度医療（第3項先進医療）「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」を並行して実施し、脂肪萎縮症に対するレプチン補充療法の薬事承認を目指す。

C. 研究結果

【医師主導治験】

平成22年4月に医薬品医療機器総合機構と対面助言を実施し、以下のように実施計画を決定した。

対象：低レプチン血症を伴い、糖尿病または高インスリン血症と診断されている6歳以上の脂肪萎縮症患者。

治験プロトコル：レプチン補充療法は、レプチンは体脂肪率の正常上限である男性で20%、女性で30%のときに通常認められる血中レプチン濃度に達すると考えられる量を100%量とし、安全性を考慮して50%量から投与を開始し、4週毎に100%量、200%量と用量を増量する。また本治験では、200%量の有効性および安全性を評価することを考慮し、200%量での投与を12週間行い、治験薬投与開始20週目に主要評価項目の評価を行う。

（目標症例数：3例以上）

投与方法：これまでに申請者らが実施してきた臨床試験では、当初、1日量を2回に分割して皮下投与していたが、途中から1日量1回の連日投与で長期にわたり安定した効果が得られているこ

とを確認している (Ebihara et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2007)。そこで利便性なども考慮して本試験では治療開始時より1日1回連日の皮下投与とすることとする。

エンドポイント：脂肪萎縮症患者の大部分は糖尿病を合併し、糖尿病合併症が重要な予後決定因子であることから、適切な血糖コントロールが目標となる。従って、本試験では血糖コントロールの安定した信頼性の高い指標である HbA1c を主要エンドポイントとして評価することとした。また糖尿病コントロールの別の指標である血糖および血中インスリン濃度は副次エンドポイントとした。また、これまでの臨床試験からレプチン投与により高中性脂肪血症の改善も期待されることから、血中中性脂肪濃度も副次エンドポイントとした。さらに、試験薬の安全性については主要エンドポイントとして有害事象および副作用の発生を評価することとした。

試験デザイン：脂肪萎縮症は稀少疾患であるだけでなく、急性膵炎や肝硬変、重度の糖尿病合併症を高頻度に認める予後不良な難治疾患である。したがって、症例数からも倫理上の観点からも、本試験においてプラセボ対照の設定には無理がある。このため、本試験は対照群を設定しない非盲検試験とした。

以上をもって平成22年6月に試験届けを行い、30日調査後の7月試験届けが完了した。同年11月に第1例目の症例登録およびレプチン治療を開始し、その後も順調に症例数を増やしている。

【高度医療（第3項先進医療）】

脂肪萎縮症は慢性疾患であるためレプチン治療においてはその長期有効性と安全性が求められる。しかし全国にちらばる症例に対し長期試験を医師主導試験で実施することは経済的にもマンパワ-的にも困難であるため、長期有効性および安全性試験を高度医療の制度を利用して実施することとした。

対象：糖脂質代謝異常（糖尿病、高インスリン血症、高中性脂肪血症のいずれか1つ以上）を伴う脂肪萎縮症患者であり、レプチン補充療法を2か月以上実施した患者。本試験は、レプチン導入療法後の長期安全性および有効性を確認することが目的であるため、既にレプチン補充療法が導入され、糖脂質代謝異常に対する効果が安定すると考えられる2か月以上、レプチン補充療法が実施

されている6歳以上の被験者。（目標症例数：12例）

試験プロトコル：本試験が長期投与の安全性と有効性を確認することを目的とすることから、まずは前試験で継続されていた用量をそのまま用いることとする。最初の2年間は2か月毎に通院し、6か月毎に主要評価項目の評価を行う。3年目以降は12か月毎に主要評価項目の評価を行う。

投与方法：長期投与となる本試験でも1日1回を基本とすることとした。ただし、長期間安定して治療が継続できることも重要であるため、副作用や患者の希望等により、米国同様の1日2回投与に変更することも可能なように計画した。

エンドポイント：主要エンドポイントは長期の有害事象および副作用とした。また、副次エンドポイントに有効性の評価として、糖尿病に対する有効性評価の指標として血糖コントロールの安定した信頼性の高い指標である HbA1c と空腹時血漿血糖を設定し、高インスリン血症と高中性脂肪血症の有効性評価の指標として空腹時血中中性脂肪濃度、空腹時血中インスリン濃度を設定した。

試験デザイン：脂肪萎縮症は標準治療も確立していない予後不良な難治性疾患であり、対象者はレプチン補充療法を継続して受けていることから、プラセボ対照の設定は患者の直接的な不利益となり、倫理的に問題がある。このため、本試験は単群で比較対照を設けない試験デザインとした。

以上の実施計画をもって平成22年5月高度医療を申請し、同月高度医療評価会議承認、同7月先進医療専門家会議および中央社会保険医療協議会承認をそれぞれ得た。同年11月より第1例目の症例登録およびレプチン治療を開始し、その後も順調に症例数を増やしている。今後、全国にちらばる症例のために実施協力施設として福岡大学病院、慶応大学病院の追加申請を予定している。

D. 考察

これまでの臨床研究での成果を踏まえ、「脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法」の薬事承認を目指して、医師主導試験を実施することとした。しかし試験の計画段階で、脂肪萎縮症は慢性疾患であることから長期有効性および安全性の確認が必要であることから、どのような形で長期試験を実施するかが問題として浮上した。全国にちらばる症例に対し長期間、試験を維持することは医師主導では困難であることから、今回は高度医療

の制度を利用することとした。高度医療においても承認申請に繋がる科学的評価可能なデータの収集を目的としており、また保健医療の併用が可能であり、補償保険も存在することから今回の目的に適した制度であると言える。

E. 結論

これまでの臨床研究での成果を踏まえ、「脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法」の薬事承認を目指して、新規症例を対象とした医師主導治験および長期有効性と安全性を評価する高度医療（第3項先進医療）を開始した。今後、治験終了後には治験および高度医療の臨床データを取りまとめ、承認申請を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. X. Rong, Y. Li, K. Ebihara, M. Zhao, T. Kusakabe, T. Tomita, M. Murray, K. Nakao. Irbesartan treatment up-regulates hepatic expression of PPAR α and its target genes in obese Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats: a link to amelioration of hypertriglyceridaemia. *Br J Pharmacol.* 160:1796-807, 2010
2. X. Rong, Y. Li, K. Ebihara, M. Zhao, J. Naowaboot, T. Kusakabe, K. Kuwahara, M. Murray, K. Nakao. Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia.* in press, 2010.
3. S. Yasue, H. Masuzaki, S. Okada, T. Ishii, C. Kozuka, T. Tanaka, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, A. Katsurada, N. Ohashi, M. Urushihara, H. Kobori, N. Morimoto, T. Kawazoe, M. Naitoh, M. Okada, H. Sakaue, S. Suzuki, K. Nakao. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. *Am J Hypertens.* 23:425-31, 2010
4. 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, YS. Lee, JB. Kim, Y. Saito, K. Nakao. Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. *Metabolism.* 59: 1241-51, 2010

2. 学会発表

国際学会

1. Chihiro Ebihara, Ken Ebihara, Megumi Aizawa-Abe, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Species difference of leptin effect between mouse and rat—Generation and analysis of ob/ob rat—40th Keystone Symposia, Colorado in USA, January 12-17, 2011.
2. Nobuko Yamada, Goro Katsuura, Yukari Ochi, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Noriko Satoh, Kiminori Hosoda and Kazuwa Nakao. Depression in obesity: implication for pathophysiological role of endogenous leptin. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11-15, 2010.
3. Shintaro Yasue, Hiroaki Masuzaki, Tomohiro Tanaka, Junji Fujikura, Ken Ebihara, Kiminori Hosoda, Hiroyuki Kobori and Kazuwa Nakao. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11-15, 2010.
4. Megumi Aizawa-Abe, Ken Ebihara, Takashi Miyazawa, Tsutomu Tomita, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Licht Miyamoto, Tomoji Mashimo, Kiminori Hosoda, Tadao Serikawa and Kazuwa Nakao. Generation of a genetically obese leptin deficient rat. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11-15, 2010.
5. Licht Miyamoto, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeru Sakai, Megumi Aizawa-Abe, Yuji Yamamoto,

Junji Fujikura, Tatsuya Hayashi, Kiminori Hosoda and Kazuwa Nakao. Mechanism of hepatic 5'AMP-activated protein kinase(AMPK) activation by leptin and pathophysiological significance of hepatic AMPK in lipotrophic diabetes. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.

6. Hitomi Iogawa, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeru Sakai, Yuji Yamamoto, Megumi Aizawa-Abe, Kiminori Hosoda and Kazuwa Nakao. Leptin improved metabolic abnormalities with a dramatic reduction of visceral fat in a patient with Dunnigan type of familial partial lipodystrophy. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
7. Takeru Sakai, Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Daisuke Aotani, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Takeshi Fujisawa, Yuji Yamamoto, Megumi Aizawa-Abe, Licht Miyamoto, Takashi Miyazawa, Kiminori Hosoda and Kazuwa Nakao. Gene analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japan. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
8. Daisuke Aotani. Leptin modulates brain activity associated with feeding behavior in patients with lipodystrophy. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
9. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Licht Miyamoto, Takeru Sakai, Daisuke Aotani, Yuji Yamamoto, Sachiko Yamamoto-Kataoka, Megumi Aizawa-Abe, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Amylin enhances the effect of leptin on AMPK activity and energy metabolism in diet-induced obese mice. KEYSTONE SYMPOSIA, Whistler in Canada, April 12- 17, 2010.
10. Licht Miyamoto, Ken Ebihara, Toru Kusakabe, Daisuke Aotani, Sachiko

Yamamoto-Kataoka, Takeru Sakai, Yuji Yamamoto, Megumi Aizawa-Abe, Tatsuya Hayashi, Kiminori Hosoda, and Kazuwa Nakao. Hepatic 5'AMP-Activated Protein Kinase in Lipotrophic Diabetes and Leptin Action. KEYSTONE SYMPOSIA, Whistler in Canada, April 12- 17, 2010.

国内学会

1. 宮本理人、海老原健、日下部徹、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、小塚智沙代、阿部 恵、山本祐二、藤倉純二、林 達也、細田公則、中尾一和。脂肪萎縮性糖尿病における肝 AMPK の意義とレプチンによる肝 AMPK 活性化のメカニズム。第 47 回日本臨床分子医学会学術集会、2010/4/10-11、東京
2. 青谷大介、海老原健、澤本伸克、日下部徹、山本祐二、阿部 恵、片岡祥子、酒井 建、藤倉純二、細田公則、福山秀直、中尾一和。脂肪萎縮症における食行動および脳内摂食関連領域神経活動へのレプチン補充療法の効果。第 47 回日本臨床分子医学会学術集会、2010/4/10-11、東京
3. 酒井 建、日下部徹、海老原健、宮本理人、青谷大介、片岡祥子、山本祐二、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和。アミリンによるレプチンの糖脂質代謝亢進作用の増強効果に関する検討。第 53 日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
4. 日下部徹、海老原健、五百川仁見、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、山本祐二、阿部 恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和。LMNA 遺伝子異常を伴った部分性脂肪萎縮症に対するレプチン治療の効果。第 53 日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
5. 宮本理人、海老原健、日下部徹、青谷大介、片岡祥子、酒井 建、山本祐二、林 達也、細田公則、中尾一和。脂肪萎縮性糖尿病およびレプチン作用における肝 5'AMP-Activated Protein Kinase。第 53 日本糖尿病学会年次学術集会、2010/5/27-29、岡山
6. 阿部 恵、片岡祥子、青谷大介、日下部徹、宮澤 崇、酒井 建、山本祐二、海老原健、細田公則、中尾一和。先天性全身性脂肪萎縮症に肝硬変を背景とする胆管細胞癌を認めた症例。第 53 日本糖尿病学会年次学術集会、

なし

2010/5/27-29、岡山

7. 日下部徹、海老原健、中尾一和. レプチンと
膵β細胞由来ホルモン、アミリンの共投与に
よる肥満治療の検討. 第31回日本肥満学
会、2010/10/1-2、群馬
8. Ken Ebihara. The role of leptin in the
energy metabolism-lessons from the
treatment of lipodystrophy-. 第31回日本
肥満学会、2010/10/1-2、群馬
9. 阿部 恵、海老原健、宮澤 崇、富田 努、
日下部徹、山本祐二、宮本理人、真下知士、
細田公則、芹川忠夫、中尾一和. 新規遺伝子
変異動物作成技術を用いたレプチン遺伝子
変異ラットの開発. 第31回日本肥満学会、
2010/10/1-2、群馬
10. 青谷大介、海老原健、澤本伸克、日下部徹、
山本祐二、阿部 恵、片岡祥子、酒井 建、
藤倉純二、細田公則、福山秀直、中尾一和. 脂
肪萎縮症における食欲異常およびfMRIを用
いた脳の神経活動の解析. 第31回日本肥満
学会、2010/10/1-2、群馬
11. 日下部徹、海老原健、酒井 建、宮本理人、
青谷大介、片岡祥子、山本祐二、阿部 恵、
藤倉純二、細田公則、中尾一和. 膵β細胞由
来ホルモン、アミリンの糖脂質代謝における
レプチン抵抗性改善作用の検討. 第31回日
本肥満学会、2010/10/1-2、群馬
12. 山田伸子、勝浦五郎、越智ゆかり、海老原健、
日下部徹、細田公則、中尾一和. 高脂肪食
誘発肥満モデルマウス脳内の神経可塑性に
関わる因子の発現変化. 第31回日本肥満学
会、2010/10/1-2、群馬
13. Megumi Aizawa-Abe, Ken Ebihara, Chihiro
Ebihara, Tomoji Mashimo, Takashi
Miyazawa, Kiminori Hosoda, Tadao
Serikawa, Kazuwa Nakao. Investigation of
Physiological Role of Leptin in Obesity
Induced Hypertension Using a New Rat
Model. 第33回日本高血圧学会総会、
2010/10/15-17、福岡
14. 海老原健、向山政志. 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.
第7回宮崎サイエンスキャンプ、2011/2/25-27、
宮崎

E. 知的財産権の出願・登録状況

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
— f-MRI を用いた脂肪萎縮症における食欲異常と脳神経活動の解析 —

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 脂肪萎縮症ではしばしば著しい過食が認められ、脂肪萎縮症の予後を左右する代謝合併症を悪化させる要因となっている。したがって、脂肪萎縮症において脳の摂食関連領域における神経活動を評価することは、病態解明や治療法および診断法の開発に結びつくものと期待される。近年、機能的磁気共鳴画像法(f-MRI)を用いた脳神経活動の解析が報告されている。今回、脂肪萎縮症を対象に f-MRI を用いて食欲刺激に対する脳神経活動を解析した。空腹時には健常者、脂肪萎縮症ともに多くの摂食関連領域で反応が認められた。これらの反応は、健常者では食後に消失したが、脂肪萎縮症では残存が認められた。脂肪萎縮症と健常者の食後の神経活動の差は扁桃核、島、尾状核、被殻、淡蒼球などにあることが明らかとなった。f-MRI を用いた脳神経活動の解析は、脂肪萎縮症のみならずヒトの食欲制御機構の解明に有用であると考えられた。

A. 研究目的

ヒトにおける摂食行動制御には摂食中枢である視床下部のみならず、視床下部と他の脳機能中枢の密接な関わりが重要であると考えられている。しばしば著しい過食を認める脂肪萎縮症において脳の摂食関連領域における神経活動を評価することは、病態メカニズムの解明だけではなく、脂肪萎縮症の新しい治療法や診断法の開発に結びつくものと期待される。これまで、ヒトの食欲制御機構を非侵襲的に解析する事は困難であった。近年、ヒトの食欲制御機構に関する解析手法の一つとして、機能的磁気共鳴画像法(functional MRI ; f-MRI)を用いた脳神経活動の測定が報告されている。脂肪萎縮症では、脂肪組織の減少・消失に伴い、低レプチン血症および過食が認められる。今回、脂肪萎縮症における過食のメカニズムを解明することを目的に、機能的磁気共鳴画像法(f-MRI)を用いて、脂肪萎縮症を対象とした脳神経活動の解析を行った。

B. 研究方法

脂肪萎縮症患者 8 人（先天性全身性 5 人、後天性全身性 2 人、家族性部分性 1 人）および非肥満健常者 10 人を対象に、Visual Analogue Scale (VAS) と食物画像刺激に対する食欲スコア化を用いて空腹時および食後の食欲を評価

した。また、食欲の評価と同時に f-MRI を用いて食物画像刺激下での脳神経活動を解析した。f-MRI では、食物画像刺激に対する神経活動と非食物画像刺激に対する神経活動を測定し、両者の差を食欲刺激特異的な神経活動とした。今回は解析領域を絞った ROI (region of interest) 解析を行い、t-value $p < 0.005$ (uncorrected) を統計的に有意とした。また今回は、複数の先行研究において食行動との関連が報告されている、視床下部、前頭前野眼窩部、扁桃核、海馬、島、側坐核、尾状核、被殻、淡蒼球を ROI 領域とした。

C. 研究結果

脂肪萎縮症と健常者の食欲を VAS および食物画像に対する食欲スコアで評価した結果、食前の空腹感に両者で大きな差は認められなかったが、食後の満足感については健常者と比較し脂肪萎縮症で有意な低下が認められた。食欲刺激に対する脳神経活動を f-MRI により解析した結果、空腹時には健常者、脂肪萎縮症ともに前頭前野眼窩部、扁桃核、島、尾状核、被殻、淡蒼球などの多くの摂食関連領域で共通して反応が認められた。これらの領域の多くは、食後に、健常者では反応が消失したが、脂肪萎縮症ではこれらの領域の多くで反応の残存が確認された。脂肪萎縮症と健常者を直接比較した

解析においても、両者の差は空腹時よりも食後に扁桃体、島、尾状核、被殻、淡蒼球などの領域で認められた。

D. 考察

マウスやラットを用いた検討では、レプチンは主に視床下部に作用することにより食欲を抑制することが証明されている。今回対象とした脂肪萎縮症では血中レプチン濃度が低下していること、高頻度に過食を認めることが知られている。我々はこれまでに脂肪萎縮症を対象にレプチン補充療法を行い、脂肪萎縮症患者の食欲がレプチンにより抑えられることを経験してきた。これらのことから脂肪萎縮症における過食の主な原因は血中レプチン濃度の低下であると考えられる。今回の検討で、空腹時の食欲は脂肪萎縮症と健常者で明らかな差が無く、食後の満足感に差が認められたが、このことはレプチンの食欲抑制作用は空腹感の軽減よりも食後の満足感に強く作用することを示唆している。f-MRI の解析においては食後に脂肪萎縮症で、扁桃体、島、尾状核、被殻、淡蒼球において神経活動の亢進が認められ、視床下部における有意な神経活動の変化は検出されなかった。レプチンの視床下部以外での作用は不明な点が多いが、今回の検討により、レプチン作用において扁桃体、島、尾状核、被殻、淡蒼球が何らかの役割を有していることが示唆された。今後、脂肪萎縮症患者におけるレプチン治療前後での検討を進めていく予定である。

E. 結論

機能的磁気共鳴画像法 (f-MRI) を用いた脳神経活動の解析は、脂肪萎縮症のみならずヒトの食欲制御機構を解析する手法として有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表

K. Nakao, M. Hirata, K. Oba, S. Yasuno, K. Ueshima, A. Fujimoto, T. Ogihara, T. Saruta; CASE-J Trial Group. Role of diabetes and obesity in outcomes of the candesartan antihypertensive survival evaluation in Japan (CASE-J) trial.

Hypertens Res. 33:600-606, 2010.

2. 学会発表

なし

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
—非アルコール性脂肪肝モデルマウスを用いたレプチンの脂肪肝治療薬としての有用性の検討—

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 近年、肝硬変や肝癌の成因として非アルコール性脂肪肝が注目されているが、脂肪肝の治療は食事療法や運動療法などの減量治療に限られており、脂肪肝特異的な治療薬はこれまでのところ存在しない。そこで本研究では非アルコール性脂肪肝モデル、Fatty Liver Shionogi (FLS) マウスおよびAlb-Cre Ptenflox/flox マウスを用いてレプチンの脂肪肝治療薬としての有用性を検討した。本研究により、レプチンには摂食抑制や体重減少、インスリン感受性改善や血中インスリン濃度の低下を介さない脂肪肝改善作用のあることが明らかとなり、レプチンは、単なる抗肥満薬や抗糖尿病薬とは異なる、脂肪肝治療薬として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

我々は脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法において脂肪肝が著明に改善することを報告してきた (*J Clin Endocrinol Metab* 2007)。またレプチンは主に中枢神経系および α 交感神経を介して、脂肪酸酸化亢進に働く AMP キナーゼを肝臓において活性化することを見いだしてきた。非アルコール性脂肪肝は従来、肝硬変や肝癌に進展することは稀であるとされてきたが、近年、肥満の増加に伴い重度の非アルコール性脂肪肝あるいは脂肪肝炎も増加し、肝硬変や肝癌に進展する症例の増加が注目されている。一方、脂肪肝の治療は食事療法や運動療法などの減量治療に限られており、脂肪肝特異的な治療薬はこれまでのところ存在しない。そこで本研究では非アルコール性脂肪肝モデルマウスを用いてレプチンの脂肪肝治療薬としての有用性を検討した。

B. 研究方法

レプチンは摂食抑制作用や糖代謝改善作用を有していることから、肝臓特異的な作用を検討するために、明らかな過食や肥満、糖代謝異常を示さない非アルコール性脂肪肝モデル、Fatty Liver Shionogi (FLS) マウスを対象に浸透圧ミニポンプを用いて2週間のレプチン持続投与を行い、脂肪肝に対する治療効果を検討した。FLS マウスを用いた検討において、血糖値に明らかな変化は認められなかったものの、脂肪肝増悪因子であるインスリンの血中濃度の低下が認められたため、次

にインスリン感受性が良好で治療前より血中インスリン濃度が低値である非アルコール性脂肪肝モデル、Alb-Cre Ptenflox/flox マウスを対象に浸透圧ミニポンプを用いて2週間のレプチン持続投与を行い、脂肪肝に対する治療効果を検討した。Alb-Cre Ptenflox/flox マウスはアルブミンプロモーターによりインスリンの細胞内シグナル阻害分子である Pten を肝臓特異的にノックダウンすることにより肝臓におけるインスリン感受性の亢進と著しい脂肪肝を呈するマウスである。

C. 研究結果

2週間のレプチン持続投与により FLS マウスの摂食量および体重増加は、生食投与群と比較し、抑制が認められ、脂肪肝は著明な改善が認められた。そこで生食投与群の摂食量をレプチン投与群に合わせる Pair-feeding 実験を行ったところ、Pair-fed 群でも脂肪肝の改善は認められるものの、レプチン投与群と比較し、その改善程度は明らかに弱いものであった。レプチン投与群では有意なインスリン感受性の亢進と血中インスリン濃度の低下が認められ、レプチンによる脂肪肝改善作用の一部は血中インスリン濃度の低下によるものと考えられた。そこで、次にインスリン感受性が良好で治療前より血中インスリン濃度が低値である非アルコール性脂肪肝モデル、Alb-Cre Ptenflox/flox マウスを用いて同様の検討を行った。レプチン投与により Alb-Cre Ptenflox/flox マウスの脂肪肝は著明な改善が認

められた。この時、血中インスリン濃度の低下は観察されず、Alb-Cre Ptenflox/flox マウスにおけるレプチンによる脂肪肝の改善はインスリンの作用変化を介さない作用であるものと考えられた。一方、レプチン投与により肝臓 AMP キナーゼの活性化および脂肪酸酸化関連分子 CPT1 の遺伝子発現上昇が観察され、レプチンによる脂肪肝改善作用におけるこれらの分子の関与が示唆された。

D. 考察

これまでの検討からレプチンの脂肪肝改善作用のメカニズムとしては摂食抑制や体重増加抑制を介した作用、インスリン感受性亢進による血中インスリン濃度の低下を介した作用、あるいは肝臓 AMP キナーゼ活性化を介した作用などが想定される。しかしこれまでの検討は過食やインスリン抵抗性を伴う肥満モデルマウスや脂肪萎縮症モデルマウスを用いたものばかりであり、これらの作用を明確に分けることは困難であった。レプチンの脂肪肝治療薬としての有用性の検討には、単なる抗肥満薬や抗糖尿病薬には認められない肝臓特異的な作用を明らかにすることが必要である。そこで本研究では明らかな過食や肥満を認めない非アルコール性脂肪肝モデル、FLS マウスおよび、インスリン感受性が良好で治療前より血中インスリン濃度が低値である非アルコール性脂肪肝モデル、Alb-Cre Ptenflox/flox マウスを用いて検討を行った。FLS マウスおよび Pair-feeding を用いた検討から、レプチンには摂食抑制や体重抑制を介さない脂肪肝改善作用を有していることが明らかとなった。さらに、Alb-Cre Ptenflox/flox マウスを用いた検討からはインスリンの作用変化を介さない脂肪肝改善作用を有していることも明らかとなった。以上より、レプチンには肝臓特異的に脂肪蓄積を改善する作用があることが示唆され、今後、さらなるメカニズムの解明が期待される。

E. 結論

レプチンには摂食抑制や体重減少、インスリン感受性改善や血中インスリン濃度の低下を介さない脂肪肝改善作用のあることが明らかとなり、レプチンは、単なる抗肥満薬や抗糖尿病薬とは異なる、脂肪肝治療薬として有用である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

D. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Iwakura, Y. Li, H. Ariyasu, H. Hosoda, N. Kanamoto, M. Bando, G. Yamada, K. Hosoda, K. Nakao, K. Kangawa, T. Akamizu. Establishment of a Novel Ghrelin-Producing Cell Line. *Endocrinology*, 151: 695-705, 2010
2. K. Tomiyama, R. Maeda, I. Urakawa, Y. Yamazaki, T. Tanaka, S. Ito, Y. Nabeshima, T. Tomita, S. Odori, K. Hosoda, K. Nakao, A. Imura, Y. Nabeshima Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:1666-71, 2010
3. S. Yasue, H. Masuzaki, S. Okada, T. Ishii, C. Kozuka, T. Tanaka, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, A. Katsurada, N. Ohashi, M. Urushihara, H. Kobori, N. Morimoto, T. Kawazoe, M. Naitoh, M. Okada, H. Sakaue, S. Suzuki, K. Nakao. Adipose Tissue-Specific Regulation of Angiotensinogen in Obese Humans and Mice: Impact of Nutritional Status and Adipocyte Hypertrophy. *Am J Hypertens*. 23: 425-31, 2010
4. 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, YS. Lee, JB. Kim, Y. Saito, K. Nakao. Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. *Metabolism*. 59: 1241-51, 2010
5. 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 NFB and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 299: E142, 2010

2. 学会発表

国際学会

1. Junji Fujikura, Masaki Naito, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Licht Miyamoto, Megumi Abe, Ken Ebihara, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Leptin improves diabetes, diabetic complications and longevity in non-obese, insulin-deficient Akita mice. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010
2. Tsutomu Tomita, Kiminori Hosoda, Shinji Odori, Junji Fujikura, Kazuwa Nakao. Gene expression of a G protein-coupled receptor, GPR119, in humans. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010
3. Shintaro Yasue, Hiroaki Masuzaki, Tomohiro Tanaka, Junji Fujikura, Ken Ebihara, Kiminori Hosoda, Hiroyuki Kodori, Kazuwa Nakao. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice. 11th International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
4. Masaki Naito, Junji Fujikura, Toru Kusakabe, Yuji Yamamoto, Licht Miyamoto, Megumi Abe, Ken Ebihara, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Leptin improves diabetes, diabetic complications and longevity in non-obese, insulin-deficient Akita mice. KEYSTONE SYMPOSIA, Whistler in Canada, April 12- 17, 2010.

国内学会

1. 小鳥真二, 富田 努, 藤倉純二, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和. 新規のG蛋白共役方-脂質受容体 GPR119 の臨床的意義. 第7回 GPCR 研究会, 2010/5/7-8, 東京
2. 小鳥真司, 富田 努, 藤倉純二, 岩倉 浩, 野口倫生, 内藤雅喜, 日下部徹, 海老原健, 細田公則, 中尾一和. 摂食抑制作用を有する脂質, オレオイルエタノールアミドをリガンドとするG蛋白共役型受容体 GPR119 のインスリン分泌調節での意義. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010/5/27-29, 岡山
3. 富田 努, 細田公則, 小鳥真司, 藤倉純二,

岩倉 浩, 野口倫生, 日下部徹, 海老原健, 益崎裕章, 中尾一和. 膵β細胞に高発現し, 中・長鎖の遊離脂肪酸をリガンドとするG蛋白共役型-脂質受容体 GPR40 の遺伝性肥満モデルの膵島での発現調節. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010/5/27-29, 岡山

4. 野口倫生, 細田公則, 森 栄作, 曾根正勝, 藤倉純二, 海老原健, 中尾一和. ヒト iPS/ES細胞からの脂肪細胞分化とヒト iPS/ES細胞由来脂肪細胞の移植に関する検討. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010/5/27-29, 岡山
5. 内藤雅喜, 藤倉純二, 野口倫生, 富田 努, 森 栄作, 小鳥真司, 日下部徹, 山本祐二, 宮本理人, 海老原健, 益崎裕章, 細田公則, 中尾一和. インスリン分泌低下型糖尿病を来すAkitaマウスにおけるレプチンの治療効果の検討. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010/5/27-29, 岡山
6. 野口倫生, 細田公則, 森 栄作, 中根舞子, 中尾一和, 山本祐二, 曾根正勝, 藤倉純二, 海老原健, 中尾一和. ヒト iPS・ES細胞由来脂肪細胞の分化と移植に関する検討. 第31回日本肥満学会, 2010/10/1-2, 群馬
7. 富田 努, 細田公則, 小鳥真司, 藤倉純二, 岩倉 浩, 野口倫生, 日下部徹, 海老原健, 益崎裕章, 中尾一和. 新規のG蛋白共役型-脂質受容体 GPR40 の遺伝子肥満モデルの膵島での発現調節. 第31回日本肥満学会, 2010/10/1-2, 群馬
8. 内藤雅喜, 藤倉純二, 海老原健, 宮永史子, 日下部徹, 宮本理人, 山本祐二, 野口倫生, 富田 努, 孫 徹, 細田公則, 中尾一和. Leptin Transgenic Akita mouse を用いたインスリン分泌低下型糖尿病に対するレプチン治療. 第31回日本肥満学会, 2010/10/1-2, 群馬
9. 田中智洋, 益崎裕章, 泰江慎太郎, 米本崇子, 荒井直樹, 富田 努, 藤倉純二, 海老原健, 箕越靖彦, 細田公則, 中尾一和. マウス視床下部CB1受容体発現調節に及ぼす高脂肪食とニコチンの影響. 第31回日本肥満学会, 2010/10/1-2, 群馬
10. 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, 山本祐二, 日下部徹, 海老原健, 中尾一和. 脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植の治療効果に関する検討. 第31回日本肥満学会, 2010/10/1-2, 群馬

11. 小鳥真司、富田 努、藤倉純二、野口倫生、森
栄作、内藤雅喜、日下部徹、海老原健、細田公
則、中尾一和. 新規の G 蛋白共役型一脂質受容
体 GPR119 の臨床的意義. 第 31 回日本肥満学会、
2010/10/1-2、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
GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性の検討
— 2 型糖尿病モデル、STZ/HFD マウスにおけるレプチン抵抗性および糖代謝改善作用 —

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 一般の肥満者では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、レプチンの臨床応用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。近年、GLP-1 製剤をはじめとするインクレチン製剤が我が国でも承認され、広く臨床の現場で糖尿病治療における有用性が認識されるようになった。特に GLP-1 は膵β細胞における末梢作用のみならず、食欲抑制や体重抑制などの中枢作用が注目されている。そこで本研究では GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性を、レプチン抵抗性モデル、高脂肪食負荷マウスおよび 2 型糖尿病モデル、ストレプトゾトシン (STZ) /高脂肪食 (HFD) 負荷マウスを用いて検討した。レプチン単独では摂食抑制や体重減少が認められない高脂肪食負荷マウスにおいて、exendin-4 との共投与により摂食抑制および体重減少が増強されたことから、exendin-4 にはレプチン抵抗性改善作用があることが示唆された。またインスリン分泌能についてもレプチンと exendin-4 の共投与でさらなる増強効果が認められ、糖尿病治療におけるレプチンと GLP-1 製剤の共投与の有用性が示された。

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。近年、GLP-1 製剤をはじめとするインクレチン製剤が我が国でも承認され、広く臨床の現場で糖尿病治療における有用性が認識されるようになった。特に GLP-1 は膵β細胞における末梢作用のみならず、食欲抑制や体重抑制などの中枢作用が注目されている。そこで本研究では GLP-1 製剤とレプチン共投与の糖尿病治療における有用性を、レプチン抵抗性モデル、高脂肪食負荷マウス

および 2 型糖尿病モデル、ストレプトゾトシン (STZ) /高脂肪食 (HFD) 負荷マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

GLP-1 製剤として DPP-4 による分解を受けない GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 を用いて検討した。まず、exendin-4 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作用があるかどうかを検討した。高脂肪食負荷マウスに対してレプチン単独、exendin-4 単独あるいはレプチン+exendin-4 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。次に、我々はこれまでにインスリン分泌低下型 2 型糖尿病モデル、Akita マウスにおいてレプチンが膵β細胞保護作用を有することを報告してきたことから、レプチン抵抗性とインスリン分泌低下を併せ持つ 2 型糖尿病モデル、STZ/HFD マウスを用いて、レプチンと exendin-4 共投与のインスリン分泌に及ぼす影響を検討した。