

201015001B

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～22年度 総合研究報告書

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 20 年度～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 中 尾 一 和

平成 23(2011)年 3 月

## 目 次

### I. 総合研究報告書

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 －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－ 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 －脂肪萎縮症の糖脂質代謝異常およびレプチンの治療効果における肝 AMPK の意義 に関する検討－ 平田 雅一	13
3. 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－ 細田 公則	15
4. 生活習慣病におけるトランスレーショナルリサーチ －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－ 日下部 徹	20
5. 脂肪萎縮症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－ 益崎 裕章	23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	31
-----------------	----

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 20～22 年度 総合研究報告書

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** 脂肪萎縮症は難治性疾患であるが、未だ有効な治療法は確立されていない。また、脂肪萎縮症は極めて稀であるために全国規模での十分な研究もなされていない。本研究では全国実態調査を実施し、我が国の脂肪萎縮症に関する現状を把握するとともに、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）を実施し、「脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法」の薬事承認を目指す。今後、治験終了後に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。また本研究により、レプチンの2型糖尿病治療薬および非アルコール性脂肪肝治療薬としての有用性が明らかとなり、広く生活習慣病領域におけるレプチンの臨床応用が期待される。その一方で、生活習慣病領域における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であるが、本研究により、レプチンとアミリンあるいはGLP-1製剤との併用治療がレプチン抵抗性のある病態で有用であることが示され、今後、肥満に起因する生活習慣病領域における臨床応用が期待される。

#### A. 研究目的

脂肪萎縮症は難治性疾患であるが、未だ有効な治療法は確立されていない。また、脂肪萎縮症は極めて稀であるために全国規模での十分な研究もなされていない。これまでに我々は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（*N Engl J Med* 2004、*J Clin Endocrinol Metab* 2007）。そこで、本研究では全国実態調査を実施し、我が国の脂肪萎縮症に関する現状を把握するとともに、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）を実施し、「脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法」の薬事承認を目指す。

一方、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は明らかであるが、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。

さらに、生活習慣病では肥満が原因で発症しているものも多く、生活習慣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のレプチン抵抗性改善作用が注目されている。また、近年GLP-1製剤が糖尿病治療薬として我が国でも承認され、膵β細胞への作用のみならず、食欲抑制や体重抑制などの中枢作用が注目されている。そこで本研究ではレプチン治療に

におけるアミリンおよび GLP-1 製剤の併用治療の有用性について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ

我が国における脂肪萎縮症の現状を把握することを目的に日本内分泌学会内分泌専門医（1559名）を対象にアンケート調査を実施した。また、「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）を並行して実施する。

### 2. 脂肪萎縮症の病態およびレプチン治療における肝 AMPK の意義に関する検討

脂脂肪萎縮性糖尿病モデル動物、A-ZIP マウスを用い、肝臓および骨格筋の AMPK を解析した。さらに A-ZIP マウスに対しレプチンを投与し、骨格筋および肝臓の AMPK 活性を検討した。さらにレプチンによる肝 AMPK 活性化のメカニズムを C57BL/6 マウスおよび初代培養ラット肝細胞を用いて解析した。肝臓 AMPK の病態生理的意義を検討するために A-ZIP 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。

### 3. 生活習慣病領域におけるレプチンのトランスレーショナルリサーチ

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、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、検討した。また、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。

### 4. レプチン抵抗性改善作用を有する薬剤に関する研究

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についても検討を行った。GLP-1 製剤として exendin-4 を用い、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、持続投与を行い同様の検討を行った。

## C. 研究結果

### 1. 脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ

日本内分泌学会内分泌専門医（1559名）を対象にアンケート調査を行い、合計 31 例の脂肪萎縮症患者に関する情報が寄せられた。医師主導治験についてはこれまでに対面助言、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。

### 2. 脂肪萎縮症の病態およびレプチン治療における肝 AMPK の意義に関する検討

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  $\alpha$  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. 生活習慣病領域におけるレプチンのトランスレーショナルリサーチ

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 ( $487 \pm 21$ mg/dl vs.  $327 \pm 24$ 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。Fatty Liver Shionogi (FLS) マウスおよび Alb-Cre Ptenflox/flox マウスを用いた検討により、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った。

### 4. レプチン抵抗性改善作用を有する薬剤に関する研究

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った。また GLP-1 製剤にも摂食抑制作用や体重減少作用、

糖脂質代謝改善作用におけるレプチン抵抗性改善作用あるいはレプチン作用増強作用があることが示された。

#### D. 考察

##### 1. 脂肪萎縮症におけるトランスレーショナルリサーチ

今回の実態調査で確認された脂肪萎縮症患者は合計31例であった。京都大学では2002年より脂肪萎縮症に対するレプチン治療を行っており、これまでにレプチン治療を導入した症例は合計12例である。この12例のうち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100例前後であると考えられた。一方、レプチンの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、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。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。

##### 2. 脂肪萎縮症の病態およびレプチン治療における肝 AMPK の意義に関する検討

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。また、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 $\alpha$ 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。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. 生活習慣病領域におけるレプチンのトランスレーショナルリサーチ

今回の検討では血中レプチン濃度が2倍程度の肥満、すなわち BMI 25~30 程度の肥満を伴う2型糖尿病ではレプチン治療が効果を発揮することが明らかとなった。日本人2型糖尿病の大多数は BMI 30 未満であり、新しい糖尿病治療薬として期待される。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。

##### 4. レプチン抵抗性改善作用を有する薬剤に関

##### する研究

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、摂食抑制や体重減少作用に対してだけではなく、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った。また、exendin-4 にも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 exendin-4 共投与の有用性も示された。

#### E. 結論

「脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法」については、今後、治験終了後に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。また本研究により、レプチンの2型糖尿病治療薬および非アルコール性脂肪肝治療薬としての有用性が明らかとなり、広く生活習慣病領域におけるレプチンの臨床応用が期待される。その一方で、生活習慣病領域における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であるが、本研究により、レプチンとアミリンあるいは GLP-1 製剤との併用治療がレプチン抵抗性のある病態で有用であることが示され、今後、肥満に起因する生活習慣病領域における臨床応用が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
  4. 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.
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.

15. 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 Endocrinology and Metabolism. The 8<sup>th</sup> 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
3. 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
4. Kazuwa Nakao. Translational Research and Animal Disease Models. The XVIII<sup>th</sup> International Workshop on Genetic Systems in the Rat, in Japan, November 30, 2010
5. Kazuwa Nakao. Translational Research of Novel Hormones. International Symposium Frontiers in Biologically Active Peptide Research, in Japan, December 7, 2010

## 国内学会

1. 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
2. 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

3. 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
4. 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、滋賀

## 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）  
平成 20～22 年度 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  
－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。また、脂肪萎縮症は極めて稀であるために全国規模での十分な研究もなされていない。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。そこで本研究では全国実態調査を実施し、我が国の脂肪萎縮症に関する現状を把握するとともに、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。日本内分泌学会内分泌専門医（1559名）を対象にアンケート調査を行い、合計31例の脂肪萎縮症患者に関する情報が寄せられた。医師主導治験についてはこれまでに対面助言、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は確立されていない。また、脂肪萎縮症は極めて稀であるために全国規模での十分な研究もなされていない。これまでに我々は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（*N Engl J Med* 2004、*J Clin Endocrinol Metab* 2007）。そこで、本研究では全国実態調査を実施し、我が国の脂肪萎縮症に関する現状を把握するとともに、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）を実施し、「脂肪萎縮症を対象としたレプチン補充療法」の薬事承認を目指す。

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。また、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」を並行して実施する。

## C. 研究結果

### 【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、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。

### 【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、実施計画を決定した。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。

### 【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。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

今回の実態調査で確認された脂肪萎縮症患者は合計31例であった。京都大学では2002年より脂肪萎縮症に対するレプチン治療を行っており、これまでにレプチン治療を導入した症例は合計12例である。この12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る。この12例のうち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100例前後であると考えられた。一方、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、医師主導治験を実施することとした。しかし治験の計画段階で、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、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。

## 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. N. Yamada, G. Katsuura, I. Tatsuno, T. Asaki, S. Kawahara, K. Ebihara, Y. Saito, K. Nakao. Orexin decreases mRNA expressions of NMDA and AMPA receptor subunits in rat primary neuron cultures. *Peptides*. 29: 1582-1587, 2008.
2. 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*. 30:132-135, 2009.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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. 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.
  3. 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
  4. 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
  5. 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
6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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.
  12. 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 Lipoatrophic Diabetes and Leptin Action. KEYSTONE SYMPOSIA, Whistler in Canada, April 12- 17, 2010.
  13. 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. 11<sup>th</sup> International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
  14. 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. 11<sup>th</sup> International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
15. 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. 11<sup>th</sup> International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
  16. 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. 11<sup>th</sup> International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
  17. 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. 11<sup>th</sup> International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
  18. 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. 11<sup>th</sup> International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.
  19. Daisuke Aotani. Leptin modulates brain

activity associated with feeding behavior in patients with lipodystrophy. 11<sup>th</sup> International Congress on Obesity, Stockholm in Sweden, July 11- 15, 2010.

20. 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- 40<sup>th</sup> Keystone Symposia, Colorado in USA, January 12- 17, 2011.

#### 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
7. 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
8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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ン補充療法. 第 30 回日本肥満学会、2009/10/9-10、静岡
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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
  19. 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、2010/5/27-29、岡山
  20. 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
  21. 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
  22. 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

23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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

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）  
平成 20～22 年度 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  
—脂肪萎縮症の糖脂質代謝異常およびレプチンの治療効果における肝 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 $\alpha$ 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  $\beta$  ブロッカーを用いて検討した。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  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  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ンによる肝 AMPK 活性化作用に影響を及ぼさなかったが、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、レプチンによる肝 AMPK 活性化作用は  $\alpha 1$  ブロッカーの共投与により完全に抑制された。 $\beta$  ブロッカーの共投与による抑制は認められなかった。また、 $\alpha 1$  アゴニスト投与時にも肝 AMPK 活性化は認められた。よって、レプチンは交感神経系  $\alpha$  作用を介して肝 AMPK 活性化作用を示すことが明らかとなった。また初代培養ラット肝細胞に対するレプチン投与では AMPK 活性の上昇は認められなかった。

#### D. 考察

本研究により、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。またレプチンは、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  $\alpha$  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。今後、脂肪萎縮症のみならず、生活習慣病領域におけるレプチンの肝 AMPK 活性化作用の臨床応用が期待される。

#### 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

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
5. 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）  
平成 20～22 年度 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 $\alpha$ 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. 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. 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 $\kappa$ B and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298: E930-940, 2009.
3. 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.
4. 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, insulin-deficient 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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.
  11. 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. 森 栄作、井田みどり、平田雅一、近藤絵里、