

201439006A

厚生労働科学研究委託費

循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業

インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 垣 塚 彰

平成27(2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人京都大学が実施した平成26年度「インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発」の成果をとりまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発-----	1
垣塚 彰	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発-----	11
垣塚 彰	
III. 学会等発表実績-----	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	27

I. 委託業務成果報告（総括）

インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発
業務主任者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科教授

研究要旨

本研究では、我々が神経保護作用を指標に開発した化合物を用い、中枢性にインスリン抵抗性を改善する可能性の検証を行った。本化合物は、いろいろなストレス条件下で神経細胞の ER ストレスを軽減させる作用を持つ。近年になって、高脂肪食で誘導される「レプチン抵抗性」が視床下部での ER ストレスによって励起される可能性が示唆された。そこで、本化合物に「レプチン抵抗性」を解消する効果を持つ可能性を想定し、その結果として「インスリン抵抗性」が解消されるかどうかを検証した。結果、本化合物の投与によって、高脂肪食で飼育した野生型マウスの摂餌量、体重、空腹時の血糖値、インスリン値、総コレステロール値、中性脂肪値、脂肪酸値が劇的に改善した。同様もしくはより強い効果が、レプチンを高発現させたトランスジェニックマウスにおいて観察された。一方、レプチンが欠失した ob/ob マウスに於いてはそのような効果は得られなかった。さらに、本化合物の投与によって、高脂肪食で誘導される視床下部の ER ストレスマーカーの上昇が軽減された。以上の結果から、本化合物には、高脂肪食によってもたらされる肥満、脂質代謝異常のみならず「インスリン抵抗性」を劇的に改善する効果があること、さらに、このようなメタボリックシンドロームの主要なパラメーターを改善させる上で「レプチン抵抗性」を解消することが極めて有用であることが示唆された。

垣塚 彰 京都大学大学院生命科学
研究科教授

A. 研究目的

肥満時にインスリン抵抗性が起こり、それが糖尿病の大部分を占める2型糖尿病の原因となっていることは周知の事実である。しかしながら、肥満時にインスリン抵抗性が引き起こされることの生物学的意義やメカニズムはよく解っておらず、その事が決定的な治療法が見つからない要因と

なっている。我々は、インスリン抵抗性の根幹は、「レプチン抵抗性」にあると考えている。レプチンは、脂肪から分泌されるペプチドホルモンで、視床下部のレプチン受容体に作用し、食欲の抑制および交感神経の活性化によるエネルギーの消費の亢進を引き起こし、抗肥満ホルモンとしての作用を持つ。しかしながら、高脂肪食下では、たとえ高い血中濃度のレプチンが存在してもその視床下部でのレプチン受容体を介するシグナル伝達が抑

制され、レプチンの本来の作用が引き起こされない。この状態を「レプチン抵抗性」と呼ぶ。この「レプチン抵抗性」は、脂肪が豊富に摂取出来る時（秋）には、糖に優先して脂肪をできる限り利用するために、生物が飢餓に対抗する手段として獲得した形質の1つである。従って、「レプチン抵抗性」を改善することができれば、肥満状態が改善することのみならず、今度は糖が使われるようになり、糖尿病状態（インスリン抵抗性）も改善できるであろうと考えた。

我々は、神経変性疾患の治療を目指して、神経保護作用を持つ薬剤の開発を行い、いろいろな新規化合物を合成してきた。その内の幾つかは、細胞毒性を示さず、培養細胞での低グルコース、血清除去、ツニカマイシン処理などによるERストレスを抑制し、さらに、*in vivo*において、マウスの脳、網膜でのERストレスを緩和する作用を示した。近年、高脂肪食下の「レプチン抵抗性」に視床下部でのERストレスが関与することが示されるようになった。このような背景のもと、本研究では、我々が開発した新規化合物によって「レプチン抵抗性」が改善され、その結果インスリン抵抗性が改善できる可能性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. レプチンと新規化合物の併用投与による高脂肪食下での摂餌量の抑制効果の検証：

レプチンは、脂肪細胞から分泌され

る内分泌物質であり、視床下部の摂食中枢に作用し、食欲抑制作用を示す。しかしながら、高脂肪食下では、たとえ大量のレプチンが存在していても視床下部でのレプチン受容体を介するシグナルが減弱することが知られており、この状態は「レプチン抵抗性」と呼ばれている。本実験では、大腸菌で作らせたレコンビナントレプチンによって誘導される食欲抑制が高脂肪食下で見られなくなるかどうか？さらに、この時の「レプチン抵抗性」が、我々の新規化合物によって解除されるかどうか？を検証した。具体的には、通常食もしくは高脂肪食で飼育した野生型マウスに対し、レプチンを腹腔内投与した群と非投与群で、レプチン投与後4時間の摂餌量の測定を行った。

また、レプチンと新規化合物A（以下化合物A）もしくは新規化合物B（以下化合物B）を同時に投与した群においても、投与後4時間の摂餌量の測定を行った。

2. 新規化合物投与による高脂肪食誘導性の肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

野生型マウスを通常食から高脂肪食へ切り替えるのと同時に化合物Aもしくは化合物Bを一日一回腹腔内に投与した。4週間この条件で飼育し、摂餌量、体重、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値の測定を行った。

同様の実験をレプチンをアルブミンのプロモーター下で肝臓で強発現

させたレプチントランスジェニックマウスでも行った。

3. 新規化合物投与による高脂肪食誘導性の肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常からの回復効果の検証：

野生型マウスを高脂肪食下で4週間飼育後、非治療群、化合物 A、化合物 B 投与群の3群に分け、さらに高脂肪食下で4週間飼育を行い、体重、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値の測定を行った。

同様の実験をレプチントランスジェニックマウスでも行った。

4. 新規化合物投与による ob/ob マウスに対する肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

上記で認められた新規化合物の効果が、実際にレプチンに依存しているかどうかを検討するために、レプチンが欠失した ob/ob マウスを非投与群と化合物投与群に分け、投与群には化合物 B を一日一回腹腔内投与し、4週間後、各マウスの摂餌量、体重、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値の測定を行った。

5. レプチン抵抗性と視床下部での ER ストレスマーカーの相関関係の解析：

レプチントランスジェニックマウスを通常食から高脂肪食へ切り替えるのと同時に化合物 A を一日一回腹腔内投与した。4週間この条件で飼育

した後、安楽死させ、視床下部を切り出し、全 RNA の抽出を行った。抽出した全 RNA に対し、ER ストレスマーカーである CHOP mRNA 及び成熟型 XBP1 mRNA を RT/PCR 法で検出し、非投与群と化合物 A 投与群で発現量の比較を行った。

倫理面への配慮

動物実験は、京都大学における動物実験の実施に関する基本指針に従い実施した。具体的には、実験を行う研究者、大学院生は、全員京都大学の「動物実験講習会」を受講し、京都大学内で動物実験を行うために必要な教育受講を終えたのちに実験を行った。その他の実験に関しては、倫理的な問題が関わる実験は含まれていない。

レプチントランスジェニックマウスの実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて学内で作製されたレプチントランスジェニックマウス(Tanaka et al. Diabetes 54:2365-2374, 2005)を用いた。また、同マウスの飼育も同法律に基づいて行った。

C. 研究結果

1. レプチンと新規化合物の併用投与による高脂肪食下での摂餌量の抑制効果の検証：

通常食で飼育した野生型マウスでは、レプチンを腹腔内投与した群は非投与群に比べ、摂餌量に有意な減少を認めた。しかしながら、高脂肪食で飼育した野生型マウスでは、レプチンを

腹腔内投与した群と非投与群で、摂餌量に有意な差は認められなかった。一方、レプチンと化合物 A もしくは化合物 B を同時に投与した群では、化合物投与群で摂餌量の有意な減少が認められた。

本結果により、新規化合物をマウスに投与することによって、高脂肪食下で誘導される「レプチン抵抗性」が解除されることが強く示唆された。

2. 新規化合物投与による高脂肪食誘導性の肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

野生型マウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 A を投与した群では、非投与群と比べて、摂餌量、体重増加が有意に抑制され、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値も有意に低く、正常値を維持した。

同様に、野生型マウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 B を投与した群では、非投与群と比べて、摂餌量、体重増加が有意に抑制され、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値も有意に低く、正常値を維持した。

レプチントランスジェニックマウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 A を投与した群では、非投与群と比べて、摂餌量、体重増加が有意に抑制され、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値も有意に低く、正常値を維持した。

同様に、レプチントランスジェニッ

クマウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 B を投与した群では、非投与群と比べて、摂餌量、体重増加が有意に抑制され、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値も有意に低く、正常値を維持した。

本結果により、新規化合物を投与することによって、高脂肪食による体重の増加を完全に抑制することのみならず、高脂肪食によって誘導される耐糖能の異常および脂質代謝異常も完全に抑制できる可能性が示された。

3. 新規化合物投与による高脂肪食誘導性の肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

高脂肪食下で4週間飼育した野生型マウスで、さらに高脂肪食下で化合物 A もしくは化合物 B を投与した群では、非投与群と比して有意な摂餌量の減少と体重減少が観察された。また、有意な空腹時の血糖値の低下、血中インスリン値の低下、脂肪酸値の低下、総コレステロール値の低下、中性脂肪値の低下が観察された。

高脂肪食下で4週間飼育したレプチントランスジェニックマウスで、さらに脂肪食下で化合物 A もしくは化合物 B を投与した群では、非投与群と比して有意な体重減少、空腹時の血糖値の低下が観察された。

本結果により、高脂肪食によって誘導された肥満に対して新規化合物を投与することによって、高脂肪食を取り続けたままでも、体重の減少を誘導できること、さらに、高脂肪食によつ

て誘導された耐糖能の異常および脂質代謝異常を改善できる可能性が示された。

4. 新規化合物投与による ob/ob マウスに対する肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

野生型マウスに対する効果と異なり、ob/ob マウスでは、一日一回の化合物 B の腹腔内投与によって、体重の有意な減少は観察されなかった。また、摂餌量も維持され、有意な減少は観察されなかった。さらに、化合物 B の投与によって、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値も非投与群に比して、有意な減少は観察されなかった。

本結果により、新規化合物によって改善される肥満、摂餌量、耐糖能異常、脂質代謝異常は、レプチンに依存していることが強く示唆された。

5. レプチン抵抗性と視床下部での ER ストレスマーカーの相関関係の解析：

レプチントランスジェニックマウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 A を 4 週間投与した群では、非投与群と比べて、視床下部での ER ストレスマーカーである CHOP mRNA と成熟 Xbp1 mRNA の発現が有意に低下していた。

D. 考察

我が国の厚生労働行政において、肥満・糖尿病に代表されるメタボリックシンドロームを抑制する方策を作り

出すことは、国民の健康を守る上で、極めて重要な施策課題である。現在、スタチンに代表される高コレステロール血症を改善する薬剤は存在するが、体重、血中インスリン値、血中レプチン値に関しては、個々にさえ有効に制御できる薬剤は無いといえる。特に、国民医療費を圧迫している 2 型糖尿病の原因となるインスリン抵抗性に対する治療法の開発は急務であるが、どのようにすればこのインスリン抵抗性を改善できるかに関しては、基本的な概念すらないというのが現状である。

本研究では、インスリン抵抗性の根幹は、動物が飢餓から逃れるために獲得した「レプチン抵抗性」にあるという我々独自の考えを検証した。結果、我々が開発した新規薬剤を高脂肪食下で飼育したマウスに投与することで、たとえ高脂肪食下であっても摂餌量が減少すること、すなわち、「レプチン抵抗性」を改善できることを見いだした。この時、高脂肪食を与え続けても、肥満したマウスの体重のみならず、血糖値、血中インスリン値、総コレステロール値、中性脂肪値等を軽減・正常化させるという驚くべき効果が観察された。このことは、我々が当初予測した「レプチン抵抗性」を改善させることがインスリン抵抗性を改善させるであろうとの予測を超え、メタボリックシンドロームのほぼ全ての主要パラメーターを改善させるという驚くべき有効性を示している。

今後、さらに効果を増強させた薬剤を開発し、マウスのみならずラットやさらに大型の哺乳動物での抗メタボ

リックシンドローム効果を検証していくこと、さらにそれらの薬剤の安全性の確認を経て、ヒトに対する画期的な抗メタボリックシンドローム薬の開発に繋がっていくことを期待している。

E. 結論

我々が、神経細胞死を防ぐ目的で開発した新規化合物は、マウスに高脂肪食を与えた時に誘導される肥満、インスリン抵抗性、脂質代謝異常を抑制する作用を持つことが判明した。さらに、これらの作用は、視床下部での「レプチン抵抗性」を解消することで得られている可能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikeda H, Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, Yoshimura N, & Kakizuka A. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. **Scientific Reports** 4:5970, 2014. doi: 10.1038/srep05970.

Yaginuma H, Kawaie S, Kazuhito V, Tabata KV, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, Hiroyuki Noji H, & Imamura H. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative

single-cell imaging. **Scientific Reports** 4:6522, 2014. doi: 10.1038/srep06522.

Ohnuma Y, Takata T, Kawawaki J, Yasuda K, Tanaka K, Kimura Y, & Kakizuka A. VCP/Cdc48 rescues the growth defect of a GPI10 mutant in yeast. **FEBS Letters** 589:576-580, 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.017.

垣塚 彰「神経変性疾患と細胞死」細胞死 Update-基礎から臨床までを俯瞰して (別冊・医学のあゆみ) 97-102, 2014.

笹岡紀男、垣塚 彰「ホップ抽出物のアルツハイマー病発症抑制効果」**BIO INDUSTRY** 31:34-39, 2014.

2. 学会発表

Hasegawa T, Hanako O, Ikeda-Ohashi H, Muraoka Y, Kakizuka A, & Yoshimura N. "Neuroprotective effect of a valosin-containing-protein ATPase inhibitor on late-stage retinal degeneration in a mouse model." World Ophthalmology Congress. Imperial Hotel (Tokyo). April 5, 2014.

Hata M, Ikeda-Ohashi H, Hasegawa T, Nakano N, Muraoka Y, Kakizuka A, & Yoshimura N. "Neuroprotective effects of a VCP modulator on rat models of ischemia and reperfusion-induced retinal degeneration." ARVO2014. Orland FL (USA). May 4-8, 2014.

垣塚 彰「神経細胞が死ぬ病気はなぜおこるの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 京都大学(京都) 平成 26 年 5 月 23 日。

Kakizuka A. “VCP, a Major ATPase in the Cells, as a Novel Drug Target for Currently Incurable Disorders” Innovative Medicine: Basic Research and Drug Development. (The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014. Hyatt Regency Tokyo (Japan). June 15, 2014.

垣塚彰「ATP 制御による難治性疾患の新規治療戦略」第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会 東京医科歯科大学鈴木章夫記念講堂 平成 26 年 7 月 18 日。

垣塚 彰「新規創薬標的としての細胞内主要 ATPase, VCP」ニューロサイエンスセミナー 金沢大学医学部 (金沢) 平成 26 年 9 月 11 日。

垣塚彰「難病への挑戦」京都大学春秋講義 (一般向け) 京都大学時計台ホール 平成 26 年 9 月 13 日。

Kakizuka A. “VCP, a major ATPase in the cells, as a novel drug target for currently incurable disorders.” 7th Asian Aging Core for Longevity conference in Jeju. Jeju Haevichi Hotel, Jeju (South Korea). Sept. 22, 2014.

垣塚 彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学 (東京)

平成 26 年 10 月 28 日。

畑匡侑、池田華子、飯田悠人、吉川宗光、長谷川智子、村岡勇貴、垣塚彰、吉村長久 「網膜虚血再灌流ラットモデルにおける valosin-containing protein modifier の神経保護効果の検討」 53 回日本網膜硝子体学会総会 大阪国際会議場 (大阪) 平成 26 年 11 月 28-30 日。

垣塚 彰「ATP 制御による加齢関連疾患克服への挑戦」日本抗加齢医学会大手町サンケイホール (東京) 平成 26 年 12 月 14 日。

垣塚 彰「インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発」厚生労働科学研究平成 26 年度研究成果発表会 (研究者向け)。世界貿易センタービル (東京) 平成 27 年 1 月 20 日。

Kakizuka A. “Challenges for currently incurable disorders.” The Liaison Laboratory regular seminar/ HIGO Program cutting-edge research seminar. Kumamoto University (Kumamoto) Jan. 21, 2015.

垣塚 彰「加齢に伴う難治性疾患の克服に向けた挑戦」高等研プロジェクト「老いを考える」研究会。国際高等研究所 (京都府木津川市) 平成 27 年 1 月 23 日。

Hasegawa T, Hanako O Ikeda-Ohhashi H, Hata M, Muraoka Y,

Kakizuka A, & Yoshimura N. “Protective effect of B101, a mixture of nutrients, in a retinal degeneration mouse model. Asia ARVO 2015. Pacifico Yokohama (Japan) February 16, 2015.

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

II. 委託業務成果報告（業務項目）

インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発
担当責任者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科教授

研究要旨

本研究では、我々が神経保護作用を指標に開発した化合物を用い、中枢性にインスリン抵抗性を改善する可能性の検証を行った。結果、本化合物の投与によって、高脂肪食で飼育した野生型マウスの摂餌量、体重、空腹時の血糖値、インスリン値、総コレステロール値、中性脂肪値、脂肪酸値が劇的に改善した。同様もしくはより強い効果が、レプチンを高発現させたトランスジェニックマウスにおいて観察された。一方、レプチンが欠失した ob/ob マウスに於いてはそのような効果は得られなかった。さらに、本化合物の投与によって、高脂肪食で誘導される視床下部の ER ストレスマーカーの上昇が軽減された。以上の結果から、本化合物には、高脂肪食によってもたらされる肥満、脂質代謝異常のみならずインスリン抵抗性を改善する効果があること、さらに、このようなメタボリックシンドロームの主要なパラメーターを改善させる上でレプチン抵抗性を解消することが極めて有用であることが示唆された。

A. 研究目的

肥満時にインスリン抵抗性が起こり、それが糖尿病の大部分を占める2型糖尿病の原因となっていることは周知の事実である。しかしながら、肥満時にインスリン抵抗性が引き起こされることの生物学的意義やメカニズムはよく解っておらず、その事が決定的な治療法が見つからない要因となっている。我々は、インスリン抵抗性の根幹は、レプチン抵抗性にあると考えている。レプチンは、脂肪から分泌されるペプチドホルモンで、視床下部のレプチン受容体に作用し、食欲の抑制および交感神経の活性化によるエネルギーの消費の亢進を引き起こし、抗肥満ホルモンとしての作用を持

つ。しかしながら、高脂肪食下では、たとえ高い血中濃度のレプチンが存在してもその視床下部でのレプチン受容体を介するシグナル伝達が抑制され、レプチンの本来の作用が引き起こされない。この状態をレプチン抵抗性と呼ぶ。このレプチン抵抗性は、脂肪が豊富に摂取出来る時（秋）には、糖に優先して脂肪をできる限り利用するために、生物が飢餓に対抗する手段として獲得した形質の1つである。従って、レプチン抵抗性を改善することができれば、肥満状態が改善することのみならず、今度は糖が使われるようになり、糖尿病状態（インスリン抵抗性）も改善できるであろうと考えた。我々は、神経変性疾患の治療を目指

して、神経保護作用を持つ薬剤の開発を行い、いろいろな新規化合物を合成してきた。その内の幾つかは、細胞毒性を示さず、培養細胞での低グルコース、血清除去、ツニカマイシン処理などによる ER ストレスを抑制し、さらに、in vivo において、マウスの脳、網膜での ER ストレスを緩和する作用を示した。近年、高脂肪食下のレプチン抵抗性に視床下部での ER ストレスが関与することが示されるようになった。このような背景のもと、本研究では、我々が開発した新規化合物によってレプチン抵抗性が改善され、その結果インスリン抵抗性が改善できる可能性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. レプチンと新規化合物の併用投与による高脂肪食下での摂餌量の抑制効果の検証：

レプチンは、脂肪細胞から分泌される内分泌物質であり、視床下部の摂食中枢に作用し、食欲抑制作用を示す。しかしながら、高脂肪食下では、たとえ大量のレプチンが存在していても視床下部でのレプチン受容体を介するシグナルが減弱することが知られており、この状態はレプチン抵抗性と呼ばれている。本実験では、大腸菌で作らせたレコンビナントレプチンによって誘導される食欲抑制が高脂肪食下で見られなくなるかどうか？さらに、この時のレプチン抵抗性が、我々の新規化合物によって解除されるかどうか？を検証した。具体的には、通常食もしくは高脂肪食で飼育した

野生型マウスに対し、100 μ g のレプチンを腹腔内投与した群と非投与群で、レプチン投与後 4 時間の摂餌量の測定を行った。

また、100 μ g のレプチンと新規化合物 A（以下化合物 A）もしくは新規化合物 B（以下化合物 B）（それぞれ 50mg/kg）を同時に投与した群においても、投与後 4 時間の摂餌量の測定を行った。

2. 新規化合物投与による高脂肪食誘導性の肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

野生型マウスを通常食から高脂肪食へ切り替えるのと同時に化合物 A もしくは化合物 B（それぞれ 50mg/kg）を一日一回腹腔内に投与した。4 週間この条件で飼育し、摂餌量、体重、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値の測定を行った。

同様の実験をレプチントランスジェニックマウスでも行った。

3. 新規化合物投与による高脂肪食誘導性の肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常からの回復効果の検証：

野生型マウスを高脂肪食下で 4 週間飼育後、非治療群、化合物 A もしくは化合物 B 投与群（それぞれ 50mg/kg/day）の 3 群に分け、さらに高脂肪食下で 4 週間飼育を行い、体重、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値の測定を行った。

同様の実験をレプチントランスジ

ジェニックマウスでも行った。

4. 新規化合物投与による ob/ob マウスに対する肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

上記で認められた新規化合物の効果が、実際にレプチンに依存しているかどうかを検討するために、レプチンが欠失した ob/ob マウスを非投与群と化合物投与群に分け、投与群には化合物 B を一日一回腹腔内投与し (50mg/kg/day)、4 週間後、各マウスの摂餌量、体重、空腹時の血糖値、血中インスリン値、脂肪酸値、総コレステロール値、中性脂肪値の測定を行った。

5. レプチン抵抗性と視床下部での ER ストレスマーカーの相関関係の解析：

レプチントランスジェニックマウスを通常食から高脂肪食へ切り替えるのと同時に化合物 A を一日一回腹腔内投与した(50mg/kg)。4 週間この条件で飼育した後、安楽死させ、視床下部を切り出し、全 RNA の抽出を行った。抽出した全 RNA に対し、ER ストレスマーカーである CHOP mRNA 及び成熟型 XBP1 mRNA を RT/PCR 法で検出し、非投与群と化合物 A 投与群で発現量の比較を行った。

倫理面への配慮

動物実験は、京都大学における動物実験の実施に関する基本指針に従い実施した。具体的には、実験を行う研究者、大学院生は、全員京都大学の「動物実験講習会」を受講し、京都大学内

で動物実験を行うために必要な教育受講を終えたのちに実験を行った。その他の実験に関しては、倫理的な問題が関わる実験は含まれていない。

レプチントランスジェニックマウスの実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて学内で作製されたレプチントランスジェニックマウス(Tanaka et al. Diabetes 54:2365-2374, 2005)を用いた。また、同マウスの飼育も同法律に基づいて行った。

C. 研究結果

1. レプチンと新規化合物の併用投与による高脂肪食下での摂餌量の抑制効果の検証：

通常食で飼育した野生型マウスでは、100 μ g のレプチンを腹腔内投与した群 (約 5kcal/4 時間) は、非投与群 (約 7kcal/4 時間) に比べ、摂餌量に有意な減少を認めた ($p<0.05$)。しかしながら、高脂肪食で飼育した野生型マウスでは、100 μ g のレプチンを腹腔内投与した群と非投与群で、摂餌量に有意な差は認められなかった (両群とも約 11kcal/4 時間)。一方、100 μ g のレプチンと化合物 A もしくは化合物 B (それぞれ 50mg/kg) を同時に投与した群では、化合物投与群で摂餌量の有意な減少が認められた (化合物 A 同時投与群:約 4kcal/4 時間、 $p<0.01$; 化合物 B 同時投与群:約 5kcal/4 時間、 $p<0.01$)。

本結果により、新規化合物をマウスに投与することによって、高脂肪食下で誘導されるレプチン抵抗性が解除

されることが強く示唆された。

2. 新規化合物投与による高脂肪食誘導性の肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

野生型マウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 A を投与した群では、非投与群と比べて、摂餌量 ($p<0.05$)、体重増加が抑制され ($p<0.01$)、空腹時の血糖値 ($p<0.05$)、血中インスリン値 ($p<0.05$)、脂肪酸値 ($p<0.05$)、総コレステロール値 ($p<0.05$)、中性脂肪値 ($p<0.05$) も有意に低く、正常値を維持した。

同様に、野生型マウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 B を投与した群では、非投与群と比べて、摂餌量 ($p<0.05$)、体重増加が抑制され ($p<0.05$)、空腹時の血糖値 ($p<0.05$)、血中インスリン値 ($p<0.05$)、脂肪酸値 ($p<0.05$)、総コレステロール値 ($p<0.05$)、中性脂肪値 ($p<0.05$) も有意に低く、正常値を維持した。

レプチントランスジェニックマウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 A を投与した群では、非投与群と比べて、摂餌量 ($p<0.05$)、体重増加が抑制され ($p<0.01$)、空腹時の血糖値 ($p<0.05$)、血中インスリン値 ($p<0.05$)、脂肪酸値 ($p<0.05$)、総コレステロール値 ($p<0.05$)、中性脂肪値 ($p<0.05$) も有意に低く、正常値を維持した。

同様に、レプチントランスジェニックマウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 B を投与した群では、非投与群と比べて、摂餌量 ($p<0.05$)、体重増加が抑制され ($p<0.05$)、空腹時の

血糖値 ($p<0.05$)、血中インスリン値 ($p<0.05$)、脂肪酸値 ($p<0.05$)、総コレステロール値 ($p<0.05$)、中性脂肪値 ($p<0.05$) も有意に低く、正常値を維持した。

本結果により、新規化合物を投与することによって、高脂肪食による体重の増加を完全に抑制することのみならず、高脂肪食によって誘導される耐糖能の異常および脂質代謝異常も完全に抑制できる可能性が示された。

3. 新規化合物投与による高脂肪食誘導性の肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

高脂肪食下で4週間飼育した野生型マウスで、さらに高脂肪食下で化合物 A もしくは化合物 B を投与した群では、非投与群と比して有意な摂餌量の減少 ($p<0.05$) と体重減少 (化合物 A; $p<0.01$ 、化合物 B; $p<0.05$) が観察された。また、有意な空腹時の血糖値の低下 ($p<0.05$)、血中インスリン値の低下 (化合物 A; $p<0.01$ 、化合物 B; $p<0.05$)、脂肪酸値の低下 ($p<0.05$)、総コレステロール値の低下 ($p<0.05$)、中性脂肪値の低下 ($p<0.05$) が観察された。

高脂肪食下で4週間飼育したレプチントランスジェニックマウスで、さらに脂肪食下で化合物 A もしくは化合物 B を投与した群では、非投与群と比して有意な体重減少 (化合物 A; $p<0.01$ 、化合物 B; $p<0.05$)、空腹時の血糖値の低下 (化合物 A; $p<0.01$ 、化合物 B; $p<0.05$) が観察された。

本結果により、高脂肪食によって誘導された肥満に対して新規化合物を

投与することによって、高脂肪食を取り続けたままでも、体重の減少を誘導できること、さらに、高脂肪食によって誘導された耐糖能の異常および脂質代謝異常を改善できる可能性が示された。

4. 新規化合物投与による ob/ob マウスに対する肥満、糖代謝異常、脂質代謝異常の抑制効果の検証：

野生型マウスに対する効果と異なり、ob/ob マウスでは、一日一回の化合物 B の腹腔内投与によって、体重は約 50g のままで有意な減少は観察されなかった。また、摂餌量も 18~20 kcal/day で維持され、有意な減少は観察されなかった。さらに、化合物 B の投与によって、空腹時血糖値(約 300mg/dl)、空腹時血中インスリン値(約 20ng/dl)、脂肪酸値(0.6mg/dl)、総コレステロール値(220mg/dl)、中性脂肪値(約 210mg/dl)も非投与群に比して、有意な減少は観察されなかった。

本結果により、新規化合物によって改善される肥満、摂餌量、耐糖能異常、脂質代謝異常は、レプチンに依存していることが強く示唆された。

5. レプチン抵抗性と視床下部での ER ストレスマーカーの相関関係の解析：

レプチントランスジェニックマウスで、高脂肪食での飼育開始と同時に化合物 A を 4 週間投与した群では、非投与群と比べて、視床下部での ER ストレスマーカーである CHOP mRNA と成熟 Xbp1 mRNA の発現が有意に低

下していた($p<0.01$)。

D. 考察

我が国の厚生労働行政において、肥満・糖尿病に代表されるメタボリックシンドロームを抑制する方策を作り出すことは、国民の健康を守る上で、極めて重要な施策課題である。現在、スタチンに代表される高コレステロール血症を改善する薬剤は存在するが、体重、血中インスリン値、血中レプチン値に関しては、個々にさえ有効に制御できる薬剤は無いといえる。特に、国民医療費を圧迫している 2 型糖尿病の原因となるインスリン抵抗性に対する治療法の開発は急務であるが、どのようにすればこのインスリン抵抗性を改善できるかに関しては、基本的な概念すら無いというのが現状である。

本研究では、インスリン抵抗性の根幹は、動物が飢餓から逃れるために獲得したレプチン抵抗性にあるという我々独自の考えを検証した。結果、我々が開発した新規薬剤を高脂肪食下で飼育したマウスに投与することで、たとえ高脂肪食下であっても摂餌量が減少すること、すなわち、レプチン抵抗性を改善できることを見いだした。この時、高脂肪食を与え続けても、肥満したマウスの体重のみならず、血糖値、血中インスリン値、総コレステロール値、中性脂肪値等を軽減・正常化させるという驚くべき効果が観察された。このことは、我々が当初予測したレプチン抵抗性を改善させることがインスリン抵抗性を改善させるであろうとの予測を超え、メタボリックシンドロームのほぼ

全ての主要パラメーターを改善させるという驚くべき有効性を示している。

今後、さらに効果を増強させた薬剤を開発し、マウスのみならずラットやさらに大型の哺乳動物での抗メタボリックシンドローム効果を検証していくこと、さらにそれらの薬剤の安全性の確認を経て、ヒトに対する画期的な抗メタボリックシンドローム薬の開発に繋がっていくことを期待している。

E. 結論

我々が、神経細胞死を防ぐ目的で開発した新規化合物は、マウスに高脂肪食を与えた時に誘導される肥満、インスリン抵抗性、脂質代謝異常を抑制する作用を持つことが判明した。さらに、これらの作用は、視床下部でのレプチン抵抗性を解消することで得られている可能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

1. 論文発表

Ikeda H, Sasaoka N, Koike M, Nakano N, Muraoka Y, Toda Y, Fuchigami T, Shudo T, Iwata A, Hori S, Yoshimura N, & Kakizuka A. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. **Scientific Reports** 4:5970, 2014. doi: 10.1038/srep05970.

Yaginuma H, Kawaie S, Kazuhito V.

Tabata KV, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, Hiroyuki Noji H, & Imamura H. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. **Scientific Reports** 4:6522, 2014. doi: 10.1038/srep06522.

Ohnuma Y, Takata T, Kawawaki J, Yasuda K, Tanaka K, Kimura Y, & Kakizuka A. VCP/Cdc48 rescues the growth defect of a GPI10 mutant in yeast. **FEBS Letters** 589:576-580, 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.017.

垣塚 彰「神経変性疾患と細胞死」細胞死 Update-基礎から臨床までを俯瞰して (別冊・医学のあゆみ) 97-102, 2014.

笹岡紀男、垣塚 彰「ホップ抽出物のアルツハイマー病発症抑制効果」**BIO INDUSTRY** 31:34-39, 2014.

2. 学会発表

Hasegawa T, Hanako O, Ikeda-Ohashi H, Muraoka Y, Kakizuka A, & Yoshimura N. “Neuroprotective effect of a valosin-containing-protein ATPase inhibitor on late-stage retinal degeneration in a mouse model.” World Ophthalmology Congress. Imperial Hotel (Tokyo). April 5, 2014.

Hata M, Ikeda-Ohashi H, Hasegawa T, Nakano N, Muraoka Y, Kakizuka A, & Yoshimura N. “Neuroprotective effects

of a VCP modulator on rat models of ischemia and reperfusion-induced retinal degeneration.” ARVO2014. Orland FL (USA). May 4-8, 2014.

垣塚 彰「神経細胞が死ぬ病気はなぜおこるの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 京都大学(京都) 平成 26 年 5 月 23 日。

Kakizuka A. “VCP, a Major ATPase in the Cells, as a Novel Drug Target for Currently Incurable Disorders” Innovative Medicine: Basic Research and Drug Development. (The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014. Hyatt Regency Tokyo (Japan). June 15, 2014.

垣塚彰「ATP 制御による難治性疾患の新規治療戦略」第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会 東京医科歯科大学鈴木章夫記念講堂 平成 26 年 7 月 18 日。

垣塚 彰「新規創薬標的としての細胞内主要 ATPase, VCP」ニューロサイエンスセミナー 金沢大学医学部 (金沢) 平成 26 年 9 月 11 日。

垣塚彰「難病への挑戦」京都大学春秋講義 (一般向け) 京都大学時計台ホール 平成 26 年 9 月 13 日。

Kakizuka A. “VCP, a major ATPase in the cells, as a novel drug target for currently incurable disorders.” 7th Asian Aging Core for Longevity conference in

Jeju. Jeju Haevichi Hotel, Jeju (South Korea). Sept. 22, 2014.

垣塚 彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学 (東京) 平成 26 年 10 月 28 日。

畑匡侑、池田華子、飯田悠人、吉川宗光、長谷川智子、村岡勇貴、垣塚彰、吉村長久 「網膜虚血再灌流ラットモデルにおける valosin-containing protein modifier の神経保護効果の検討」 5 3 回日本網膜硝子体学会総会 大阪国際会議場 (大阪) 平成 26 年 11 月 28-30 日。

垣塚 彰「ATP 制御による加齢関連疾患克服への挑戦」日本抗加齢医学会大手町サンケイホール (東京) 平成 26 年 12 月 14 日。

垣塚 彰「インスリン抵抗性を改善する新規薬剤の開発」厚生労働科学研究平成 26 年度研究成果発表会 (研究者向け)。世界貿易センタービル (東京) 平成 27 年 1 月 20 日。

Kakizuka A. “Challenges for currently incurable disorders.” The Liaison Laboratory regular seminar/ HIGO Program cutting-edge research seminar. Kumamoto University (Kumamoto) Jan. 21, 2015.

垣塚 彰「加齢に伴う難治性疾患の克服に向けた挑戦」高等研プロジェクト「老いを考える」研究会。国際高等研