

論文の内容の要旨

論文題目 レプチンの糖脂質代謝改善効果における脂肪分解の役割と
そのメカニズムの探求

氏名 平（荒井） 美乃

<背景・目的>

レプチンは主に脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、中枢神経系では摂食を抑制し、末梢組織ではエネルギー消費を促進する。またレプチンには血糖低下作用や脂質代謝改善作用がある。レプチンの血糖低下作用については、インスリン依存性およびインスリン非依存性のメカニズムが提唱されている。脂肪分解作用については、中枢神経系から交感神経を介するメカニズムや、脂肪細胞へ直接作用するメカニズムが提唱されている。

しかし、レプチンの血糖低下作用に脂肪細胞の脂肪分解が関与しているのか、またレプチンによる血糖低下作用のメカニズムは何か、について完全には解明されていない。よってこれらを明らかにするため研究を行った。

<方法>

当研究室では脂肪細胞における中性脂肪分解活性が約 50%に減弱しているホルモン感受性リパーゼ (Hormone sensitive lipase; HSL) の欠損マウス (Knockout; KO) をすでに樹立している。このマウスと野生型マウス (Wild type; WT) にレプチンを投与し、摂食量、体重、血糖の推移、絶食時の血糖の推移とその直後の臓器重量を検討した。レプチンまたはコントロールの PBS は浸透圧ポンプを用いて皮下持続投与した。

次に WT にレプチン過剰発現アデノウイルスを投与し、摂食量、体重、血糖の推移と絶食時の血糖の推移、その直後の臓器重量を検討した。さらに、血糖低下の原因となりうる以下 3 つについて検討した。(i) 摂食量減少、(ii) インスリンやカウンターホルモン異常、(iii) 肝糖新生の障害

<結果>

WT と HSLKO に浸透圧ポンプを用いて、レプチンもしくは PBS を 3 日間持続皮下投与した。レプチン群は WT、HSLKO とともに摂食量の減少と体重の減少傾向がみられたが WT、HSLKO 間で差は見られなかった。また、経日的に測定した血糖値も、投与 3 日目に 7 時間絶食とし 1 時間おきに測定した血糖値でも、各群いずれもほぼ変動なく群間差も認められなかった。絶食 7 時間後の解剖時、皮下脂肪重量や内臓脂肪重量は WT、HSLKO とともにレプチン群で減少傾向であり、褐色脂肪重量は HSLKO のレプチン群で減少がみられたが、WT と HSLKO 間で有意差は認められなかった。

次に同様の方法で 7 日間持続皮下投与した。その結果、WT、HSLKO とともにレプチン群で摂食量、体重が経日的に減少したが血糖値は各群で差はみられなかった。また、投与 7 日目に 7 時間絶食とした際の血糖値は、各群ともほぼ変動なく推移した。ただ、WT と HSLKO とともにレプチン群は PBS 群と比較し、有意差はないものの低値で推移した。絶食 7 時間後の皮下脂肪重量、内臓脂肪重量、褐色脂肪重量は WT、HSLKO とともに PBS 群と比較しレプチン群で有意に減少が認められた。しかし WT レプチン群と、HSLKO レプチン群の間で有意差はみられなかった。

以上から、浸透圧ポンプモデルでは摂食量、体重、血糖値の推移で WT と HSLKO とともにレプチン群で PBS 群と比較し摂食量、体重は減少したが、血糖値の低下は見られなかった。また、WT、HSLKO との間で表現型の差はみられなかった。

そこでさらに高濃度のレプチンを作用させるため、レプチン過剰発現アデノウィルスを投与し検討することとした。まず WT にレプチン過剰発現または LacZ 発現のアデノウィルスを経頸静脈的に投与した。その結果レプチン群では LacZ 群と比較し経日的な摂食量と体重の減少、血糖値の低下が認められた。またアデノウィルス投与 6 日目に 5 時間絶食としたところレプチン群では経時的に血糖値が低下し、絶食 5 時間以内に重症低血糖をきたした。

重症低血糖となるメカニズムとして、(i) 摂食量減少、(ii) インスリン過多やカウンターホルモン抑制、(iii) 肝糖新生の障害、を考えこれらを検討した。

(i) 摂食量減少が低血糖の原因かを明らかにするため、WT をレプチン群、Pairfed 群、LacZ 群に分けて検討した。Pairfed 群は LacZ 発現アデノウィルスを投与したうえで摂食量をレプチン群と同一にした群である。レプチン群の摂食量を翌日 Pairfed 群に投与した。その結果、Pairfed 群はレプチン群と同程度に体重が有意に減少したが、アデノウィルス投与 6 日目に 5 時間の絶食とした際の血糖値はレプチン群のような重度の低血糖をきたさず推移した。絶食 5 時間後に解剖した結果、脂肪重量はレプチン群では肉眼的に消失するほど著明に減少し、Pairfed 群では LacZ と比較すると減少していたが残存がみられた。

(ii) インスリン過多やカウンターホルモン抑制がないかを明らかにするため、レプチン群、Pairfed 群、LacZ 群の 3 群で、アデノウィルス投与 6 日目の絶食時における 0、2、5 時間後の血漿ホルモン濃度を測定した。その結果、絶食下で低血糖となったレプチン群は、インスリン濃度は感度以下で、グルカゴン濃度は高値であり、成長ホルモン、コルチコステロン、t-グレリン濃度は抑制されていなかった。よって、レプチン過剰発現の WT で絶食時低血糖の原因は、インス

リン過分泌やカウンターホルモンの抑制ではないことが示唆された。

(iii) 肝糖新生の障害の可能性について、まず肝糖新生系酵素発現を qPCR で検討した。その結果、糖新生の不可逆的段階の酵素であるグルコース-6-ホスファターゼ (G6P) はレプチン群で上昇しホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ (PEPCK) では上昇傾向であった。しかしピルビン酸カルボキシラーゼ (PCX) は低下を認めた。よって、低血糖の原因が PCX 発現の抑制の可能性は否定できなかった。

次に糖新生基質濃度の低下の可能性について、乳酸、ピルビン酸、糖原性アミノ酸濃度を測定し検討した。乳酸、ピルビン酸はレプチン群で低値であった。一方代表的糖新生アミノ酸であるアラニンは、レプチン群で高値であった。そのほかの糖原性アミノ酸濃度は LacZ 群や Pairfed 群と比較し同程度から高値であった。よって低血糖の原因として基質濃度の低下もしくは上昇不十分による可能性を否定はできなかった。

そこで、糖新生基質やエネルギー源を補給して低血糖がレスキューできるか検証するため、これらの物質の補給実験を行った。糖新生基質としてアラニン、ピルビン酸、乳酸、アスパラギン酸を、エネルギー源としてオクタン酸とオリーブオイルを選択し、基質やエネルギー源を単独、もしくは組み合わせて投与した。しかしいずれの物質を投与しても低血糖はレスキューされなかった。

次に糖新生経路が酵素活性レベルで障害されている可能性を考えた。そこで障害部位の特定のためメタボローム解析を行った。その結果、レプチン群では糖新生基質である 3-ホスホグリセリン酸 (3PG) が蓄積しグリセルアルデヒド-3-リン酸以降が著明低値であり、糖新生が 3PG 以降障害されていることが示唆された。なお、グリセルアルデヒド-3-リン酸はレプチン群、Pairfed 群、LacZ とともに検出されず、1,3-ビスホスホグリセリン酸は標品入手不可で検討していない。3PG からグリセルアルデヒド-3-リン酸までを触媒する酵素は 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) とグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) である。PGK には ATP が、GAPDH には NADH が必要であるが、ATP 濃度はレプチン群で低値であった。また、アセチル CoA や CoA 濃度の低値もみられた。

<考察>

今回用いた浸透圧ポンプモデルでは、WT、HSLKO とともにレプチン群で摂食量や体重の減少はみられたが血糖値の低下はみられず WT と HSLKO の群間差もみられなかった。ただ、7日モデルの絶食時の血糖値について、WT、HSLKO とともにレプチン群が PBS 群より低値の傾向がみられ、脂肪重量は有意な減少を認めた。次に検討した WT のレプチン過剰発現モデルでは、レプチンにより脂肪重量が肉眼的に消失するほど著明に減少し、絶食時には重症低血糖をきたした。このことから、レプチン投与時に脂肪が減少した場合にはレプチンの血糖低下作用に影響がある可能性が示唆された。

さらに、レプチン過剰発現下の WT で絶食時に重症低血糖をきたすメカニズムとして、糖新生の酵素活性レベルでの障害が示唆された。レプチン過剰発現 WT で低血糖時、インスリン過多

は否定的で、各カウンターホルモン濃度は上昇している、もしくは抑制は認められなかった。また、糖新生酵素遺伝子発現について、G6P は上昇し PEPCK は阻害されていなかった。レプチン群で PCX の発現は低下を認めたため低血糖の原因として否定はできなかったが、メタボローム解析で 3PG まで糖新生が進行していたことから、このことが低血糖の直接的原因とは考えにくい。さらに、糖新生の基質不足は、補充により低血糖がレスキューできなかったことから低血糖の原因としては説明がつかなかった。メタボローム解析では、3-PG が蓄積しそれ以降の基質濃度の低下がみられた。つまり、3-PG 以降糖新生が障害されていた可能性が示唆された。また、糖新生経路で 3PG 以降に進めるための酵素である PGK 活性には ATP が必要である。今回、ATP の低下やさらに CoA、アセチル CoA の低下も認められた。以上からレプチン過剰発現下の WT ではこれらの因子の不足により糖新生酵素の活性がアロステリックに阻害されている可能性が考えられた。アセチル CoA や CoA や ATP の低下から、レプチン過剰発現で絶食時の低血糖では、WT の生体内においてエネルギーが極度に低下状態にあったことが示唆された。

現在、レプチンは血糖低下作用や脂質代謝改善作用から、脂肪萎縮症患者や T1DM 患者への補充療法が期待されている。しかし、治療に際し今回の実験で得られたような低血糖についても注意していく必要があり、その際に血糖低下作用についてメカニズムの検討は非常に重要である。また今回の実験から、レプチンの血糖低下作用には、投与される側の脂肪分解活性が重要である可能性も示唆された。