

肥満関連遺伝子 obese 産物 (レプチン) の 肥満の病態生理への関与に関する研究

Investigation of the relationship between
the product of obese gene (leptin) and obesity.

代表研究者 徳島大学 医学部 臨床検査医学講座 助手 村上 尚
Instructor, Department of Laboratory Medicine,
School of Medicine, The University of Tokushima
Takashi MURAKAMI

Leptin, the product of obese (ob) gene, is a secreted protein primarily produced by adipocytes, which is thought to be involved in the control of body weight via the regulation of energy homeostasis. We found out several facts, concerning the leptin, for the first time in the world. For example, #1. Enhancement of the expression of ob gene by glucocorticoid. #2. Mutation in the leptin receptor gene from the Zucker fatty rat. #3. Capability of signal-transduction of short forms of leptin receptors. #4. Reduced capability of signal-transduction of leptin receptor from the Zucker fatty rat, even if it exists on the cell surface.

研究目的

肥満は糖尿病及び循環器疾患発症の大きな要因であることが知られている。1994年末、ポジショナルクローニングにより肥満関連遺伝子の一つであるobese (ob) 遺伝子がマウスとヒトで同定された。マウスにおいては、ob遺伝子産物 (レプチン) は脂肪組織から分泌され脳の視床下部に作用して摂食行動を抑制すると考えられている。我々は、新たにラットのob cDNAをクローニングし、肥満モデル動物でのob遺伝子異常の有無を同定するとともに、ラットにおいてもその発現が脂肪組織のみに限られていることを確認した。また、肥満モデルラットであるZucker fattyにおいて、その発現が非常に亢進していることを新たに見いだした。

本研究では、糖尿病及び循環器疾患発症の大きな要因である肥満の新しい予防法と

治療法の確立を目的として、主に以下のことを行う。

- ① ob遺伝子産物の測定系を確立し、モデル動物の糖尿病発症過程での本物質の血中濃度の変化を測定する。
- ② 脂肪細胞における本物質の分泌機構を解析する。
- ③ 遺伝子工学的手法を用いて発現、精製した本物質をラットに投与し摂食行動の変化を解析する。
- ④ 本物質の受容体をクローニングし、培養細胞に発現させ色々な化合物のアッセイ系として使うことにより肥満の予防および治療薬剤の開発をめざす。

研究計画・方法

本研究助成の申請書に記載した研究計画・方法は以下のことなどである。

1) ラットの副腎丸脂肪組織からコラゲナーゼ処理により脂肪細胞と非脂肪細胞を分画し、それぞれの分画よりRNAを調整しノザンプロット法によりどちらの分画の細胞からob mRNAが発現しているかを同定する。

2) 1) で分画した脂肪細胞を培養し、培養液にインスリン、デキサメサゾン、TNF- α 投与といった種々培養条件下でob mRNAの発現が変化するかを同定する。

3) ラット、ヒトのレプチンの成熟部分(シグナル配列を除いた残りの部分)を大腸菌と昆虫細胞中でN端にヒスチジン6残基のtagをつけて大量に発現させ、ヒスチジンのtagを目印として使い精製する。これを正常ラット及び過食により肥満するOLETF、Zucker fattyに投与し摂食行動がどのように変化するかを調べる。

4) 3) で精製したレプチンを使いポリクローナル、及びモノクローナル抗体を作製する。抗ラットレプチン抗体を用いラット血液中にレプチンが分泌されているか、モデル動物間で本物質の血中濃度に差はないか、糖尿病発症過程での変化はないか、またどの臓器に本物質が存在しているか、本物質の分泌された物の分子量はいくらか、などをウエスタンプロット法により検索する。また、ラット脂肪組織の凍結切片を免疫組織学的方法により染色しob遺伝子が脂肪組織のなかのどの種類の細胞において発現しているか、その遺伝子産物の局在はどこかを同定する。

5) 抗ヒトレプチン抗体を用いてRIAあるいはELISA法によるレプチンの測定系を確立する。本測定系を用い、正常人、肥満、糖尿病、摂食異常(神経性食餌不振症等)患者血中レプチン濃度を測定し、これら疾

患の病態生理の解明につとめる。

6) 抗ラットレプチン抗体を用い、ラット脂肪細胞の初代培養細胞を染色し、脂肪細胞中の本物質の局在、さらに種々条件下で培養液中の本物質の濃度を測定することにより、本物質の分泌機構を解明する。

7) レプチンの受容体がクローニングできれば培養細胞に発現させ、色々な化合物のアッセイ系として使うことにより肥満の予防および治療につながる薬の開発につながり、その結果、糖尿病および循環器疾患の新しい予防法と治療法の確立が可能となる。

研究成果

上に記載した、研究計画 1) に関して、我々は、ラット脂肪組織より脂肪細胞と非脂肪細胞を分画し、脂肪細胞のみからob mRNAが発現していることを同定した。また、マウス由来、脂肪前駆細胞の細胞株である3T3-L1細胞を分化させ、ob mRNAの発現を解析したところ、脂肪細胞に分化後でのみ、低いながらob mRNAの発現がみられた。(発表論文 2.)

研究計画 2), 6) に関し、脂肪細胞を各種因子存在下で培養したところ、デキサメサゾン存在下でob mRNAの発現が非常に亢進することが分かった(発表論文 2.)。また、同時に、分泌も上昇していた。我々は、既に、肥満モデルラットであるZucker fattyの脂肪組織において、ob mRNAの発現が非常に亢進していることを新たに見いだしている(発表論文 1.)。Zucker fattyにおいては、ラット血中の主要なグルココルチコイドであるコルチコステロン濃度が高いことが知られているが、この血中の高コルチコステロン値が、ob mRNAの発現の亢進に寄

与している考えられる。また、エストロゲンも弱いながらob mRNAの発現を亢進させた（発表論文2.）。以下に述べるように、女性（雌）では男性（雄）より有意に血中レプチン濃度が高いことが知られているが、このことに、女性ホルモンが寄与していると考えられる。

研究計画3）に関し、精製したラットレプチンを正常ラットの脳室に投与したところ摂食量が抑制された（日本医大第三内科との共同研究）。

研究計画4）に関し、ラット脂肪組織を免疫染色し、白色及び褐色脂肪細胞での発現を同定した（発表論文5.）。

研究計画5）に関し、RIA法によるヒト及びラットレプチンの測定系を確立した。本測定系を用い、血中レプチン濃度がBody Mass Index (BMI)と相関すること、女性が男性より高いこと、腎不全患者で高いことを示した（発表論文6.）。これにより、レプチンが腎臓で代謝される可能性を示唆した。

研究計画7）に関し、我々より先に、他のグループによりマウス、ヒトのレプチン受容体が、クローニングされた。これを参考にし、我々はラットレプチン受容体を新たにクローニングした。また、レプチン受容体における変異が想定されていた、Zucker fattyにおける変異を同定した（発表論文3.4.）。レプチン受容体はサイトカイン受容体と相同性が高く、mRNAのスプライシングの違いにより、細胞外領域は同じで、細胞内領域の異なる数種が存在することが明らかとなった。そのうち、細胞内領域の長い型のみが、情報伝達活性を持つと考えられている。また、Zucker fatty型の変異レプチン受容体では、細胞表面への局在

が低下しているために、情報伝達活性が低いと考えられている。しかし、我々は、細胞内領域の短い型も情報伝達活性を持つこと（発表論文7.）、Zucker fatty型の変異レプチン受容体では、正常型の受容体と同程度に細胞表面へ局在していても、情報伝達活性が低下していること（発表論文8.）を、レプチン受容体を培養細胞に発現させることによって、新たに示した。

このほか、臍帯血中のレプチン濃度と出生体重とが、相関することを示し、臍帯血中のレプチン濃度が胎盤機能の指標になる可能性を指摘した（発表論文9.）。また、レプチンの脳以外への直接作用として、膵β細胞に作用して、インスリンの分泌を抑制する可能性を示した（発表論文10.）。

今後の課題と発展

レプチンは脳の視床下部に作用して、摂食行動を抑制する以外に、交感神経の活性化や性ホルモンや成長ホルモン分泌への作用を持つことが分かってきた。このほか、脳以外への直接作用として、インスリン分泌、グルコース取り込みへの作用、骨髄細胞への作用などが想定されている。これらの解析には、in vitroのみではなく、in vivoの解析が必要であり、今後、そういった手段もとらねばならない。

レプチンに関する研究は、急速に進んでおり、我々のような小グループでは、間に合わなくなってきたが、今後は、独自のことを見つけて、解析していこうと思っている。レプチン受容体を発現した細胞を作製したので、今後、細胞内情報伝達の解析、アンタゴニスト、アゴニストの解析、探索にも使うことができると思われる。

発表論文リスト

1. Murakami, T. and Shima, K. (1995) Cloning of rat obese cDNA and its expression in obese rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:3, 944-952.

2. Murakami, T., Iida, M. and Shima, K. (1995) Dexamethasone regulates obese (ob) expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:3, 1260-1267.

3. Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A., Kuwajima, M. and Shima, K. (1996) Phenotype-linked amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker Fatty (fa/fa) rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222:1, 19-26.

4. Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A., Kuwajima, M. and Shima, K. (1996) Substitution at codon 269 (glutamine->proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker Fatty (fa/fa) rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:2, 597-604.

5. Tsuruo, Y., Sato, I., Iida, M., Murakami, T., Ishimura, K. and Shima, K. (1996) Immunohistochemical detection of the ob gene product (leptin) in rat white and brown adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 28, 753-755.

6. Iida, M., Murakami, T., Yamada, M., Sei, M., Kuwajima, M., Mizuno, A., Noma, Y., Aono, T and Shima, K. (1996) Hyperleptinemia in chronic renal failure. *Horm. Metab. Res.* 28, 724-727.

7. Murakami, T., Yamashita, T., Iida, M., Kuwajima, M., and Shima, K. (1997) A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231:1, 26-2.

8. Yamashita, T., Murakami, T., Iida, M., Kuwajima, M., and Shima, K. (1997) Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes* 46, 1077-1080.

9. Matsuda, J., Yokota, I., Iida, M, Murakami, T., Naito, E., Ito, M., Shima, K. and

Kuroda, Y. (1997) Serum leptin concentration in cord blood: Relationship to birth weight and gender. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1642-1644.

10. Ishida, K., Murakami, T., Mizuno, A., Iida, M., Kuwajima, M., and Shima, K. Leptin suppresses basal insulin secretion from rat pancreatic islets. *Regulatory Peptides* in press.