

## 論文の内容の要旨

論文題目 骨格筋細胞における  
レプチン誘導性脂肪酸酸化とシグナル伝達

氏 名 赤坂 ゆにけ

肥満症は、肥満とは異なり、生活習慣病などの病気を合併している場合、あるいは起こしやすい状態を指し、治療が必要である。肥満症治療の基本となるのは、食事療法・運動療法であるが、減量や減量後の体重維持は困難である。一方、薬物療法に関しては、日本で現在認可されている肥満治療薬はマジンドールしかなく、また FDA の認可を受けた長期投与可能な肥満治療薬は 2 剤であるが、副作用や効果に問題があり、十分とはいえない。近年、脳をターゲットとした食欲抑制薬の開発も盛んであるが、うつなどの副作用から、脳をターゲットとするリスクが問題視されている。このような状況から、肥満に対して効果があり、かつ安全で QOL を損なわない肥満治療薬創製が望まれている。そのアプローチの一つとして、私は末梢組織のエネルギー代謝を調節することによる肥満治療の可能性に着目している。

末梢組織のエネルギー代謝に影響を与える生理活性物質の一つとして、レプチンに注目した。レプチンは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一種であり、主に中枢神経系を介した食欲抑制作用や、交感神経系の興奮を介したエネルギー消費促進作用により体重を減少させ、肥満や体重の制御に関与している。一方、レプチンは食欲抑制作用とは別に、骨格筋に対して直接的なエネルギー消費増加作用も有することが示されている。肥満においては、脂肪組織の増大に伴い、高レプチン血症になっているにもかかわらず、体重が減少しにくいことから、レプチン抵抗性を呈していると考えられている。レプチン抵抗性は、中枢神経系のみならず、骨格筋においても報告されており、骨格筋におけるレプチン抵抗性解除が肥満治療の一つの解決策になり得るかどうか、興味深い。しかしながら、レプチン抵抗性の成因やメカニズムについては不明である。そこで、骨格筋におけるレプチン作用やシグナル伝達を解明することにより、レプチン抵抗性の成因・メカニズム解明、さらにはレプチン抵抗性解除の治療ターゲット探索に繋がるものと考えた。

本研究では、骨格筋におけるレプチン作用、すなわち脂肪酸酸化とシグナル伝達について検討した。また、レプチン受容体のうち、機能のよく知られていない short-form レプチン受容体の役割についてもあわせて検討した。

## 第一章 骨格筋細胞におけるレプチン誘導性脂肪酸酸化

### 【背景および目的】

骨格筋におけるレプチン作用として、脂肪酸酸化亢進作用が知られており、そのメカニズムの一つとして AMPK/ACC 経路を介するという説明もあるが、それ以外のメカニズムを示唆する報告もあり、不明な点が多い。レプチンシグナルとしてよく知られている JAK2/STAT3 経路と、骨格筋におけるレプチン作用との関係については、これまでに検討されておらず、よくわかっていない。本研究では、レプチンを骨格筋細胞に作用させた場合の脂肪酸酸化亢進作用とそのシグナル伝達、特に JAK2/STAT3 経路の関与を明らかにすることを目的とした。

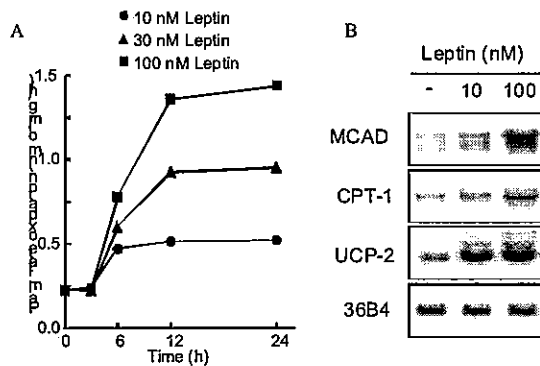
### 【方法】

マウス骨格筋由来 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞は、筋芽細胞を筋管細胞に分化させて使用した。初代骨格筋細胞は、C57BL/6J マウス後肢から採取し、分化させて使用した。脂肪酸酸化は[1-<sup>14</sup>C]パルミチン酸からの <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 産生を測定することにより、評価した。

### 【結果】

レプチン受容体には、STAT3 結合領域を有する long-form 受容体と、STAT3 結合領域を欠く short-form 受容体が存在する。C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞においては、long-form (Ob-Rb)、short-form 受容体 (Ob-Ra) 両者が発現していることが確認された。C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 細胞にレプチンを添加したところ、濃度依存的 (10-100 nM)、時間依存的な脂肪酸酸化亢進作用を検出した (図 1A)。顕著な作用はレプチン処理後 6 時間以降に認められ、12 時間でピークに達した。RNA 合成阻害剤である ActinomycinD 処理による影響を調べたところ、脂肪酸酸化反応が消失したことから、レプチンによる脂肪酸酸化は転写を介するものであることが示唆された。脂肪酸酸化に関与する遺伝子群、中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ (MCAD)、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT-1)、脱共役タンパク 2 (UCP2) の発現変動を調べたところ、レプチン処理 24 時間でそれぞれの発現が増加することが示された (図 1B)。

図1. C2C12細胞におけるレプチン誘導性脂肪酸酸化



レプチンシグナルとして JAK2/STAT3 経路が知られており、中枢神経系における役割の重要性については研究されている。一方、骨格筋における JAK2/STAT3 経路の役割については不明である。そこで、このシグナル経路と脂肪酸酸化の関連を検討した。レプチンを添加し、JAK2 および STAT3 のリン酸化を Western Blot にて調べたところ、リン酸化の上昇が認められた。JAK2 阻害剤 (10 μM AG490) 存在下でレプチン処理を行ったところ、JAK2 の自己リン酸化がほぼ完全に抑制され、脂肪酸酸化亢進作用も JAK2 阻害剤 10 μM 以上で完全に抑制された (図 2A)。また、siRNA 処理により STAT3 発現を抑制したところ、脂肪酸酸化亢進作用が消失した (図 2B)。したがって、レプチンによる脂肪酸酸化は JAK2/STAT3 経路を介していることが示唆された。一方、AMPK/ACC 経路の関与について、レプチン処理後 24 時間の ACC 活性で評価した。ACC 阻害剤である TOFA (5-(Tetradecyloxy)-2-furoic acid) による ACC 活性の阻害は認められたが、レプチンは 100 nM にても ACC 活性に影響を与えなかった。このことから、本系において AMPK/ACC 経路の関与の可能性は低いと考えられた。

次に、より生理的に近いと考えられるマウス後肢から抽出・調製した初代培養骨格筋細胞において、レプチン作用とそのシグナルを検討した。脂肪酸酸化亢進はレプチン処理 6 時間では認められず、24 時間後に顕著に認められた。また、C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞と同様に JAK2/STAT3 経路の関与が示された。

生体の骨格筋にても、レプチンによる脂肪酸酸化、遺伝子発現変化が起こるかどうか、レプチンを欠損する ob/ob マウスへのレプチン投与により検討した。皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプにて、4 mg/kg/day の用量でレプチンを 3 日間投与したところ、血漿中レプチン濃度は 10 nM であった。骨格筋を抽出して脂肪酸酸化能を調べたところ、対照群と比較して 30%の脂肪酸酸化能亢進が認められ、C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞と同様の脂肪酸酸化関連遺伝子 (MCAD, CPT-1, UCP-2) の発現が上昇していた。

## 第二章 レプチン誘導性脂肪酸酸化におけるレプチン受容体の関与

### 【背景および目的】

レプチン受容体には、long-form と short-form 受容体が存在し、骨格筋には両者が発現している。Short-form 受容体には STAT3 結合領域が存在しないことから、一般的には long-form 受容体のみが機能的であるとされている。しかしながら、db/db マウス (long-form 受容体ホモ欠損) にレプチンを投与した場合、レプチン作用が認められることから、short-form 受容体もエネルギー代謝に対して何らかの役割があることが予想された。そこで、第一章で検討した骨格筋におけるレプチン作用に対する short-form レプチン受容体の役割とシグナル伝達を明らかにすることを目的とし、db/db マウス由来初代培養骨格筋細胞を用いて、レプチン作用とそのシグナル伝達を検討した。

### 【方法】

初代培養骨格筋細胞は、db/db マウス、m/m マウス (misty/misty、db/db マウスの同腹個体) の後肢より採取し、筋管細胞に分化させて使用した。

### 【結果】

Short-form 受容体 (Ob-Ra, Ob-Rc) の発現は、m/m, db/db 細胞間でそれぞれ比較すると同程度であった。今回、レプチンは m/m のみならず、予想に反して、db/db 細胞においても脂肪酸酸化亢進作用を示すことが明らかとなった。次に、レプチンによるシグナル伝達について検討した。レプチンは、long-form 受容体に結合すると、JAK2 が活性化して自己リン酸化が起こり、レプチン受容体をリン酸化する。

図2. レプチン誘導性脂肪酸酸化のJAK2/STAT3シグナルの関与

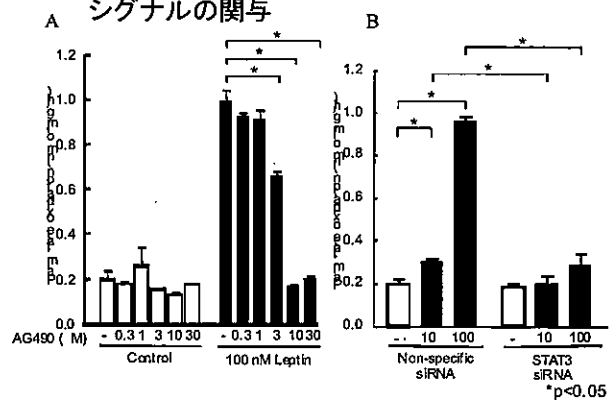
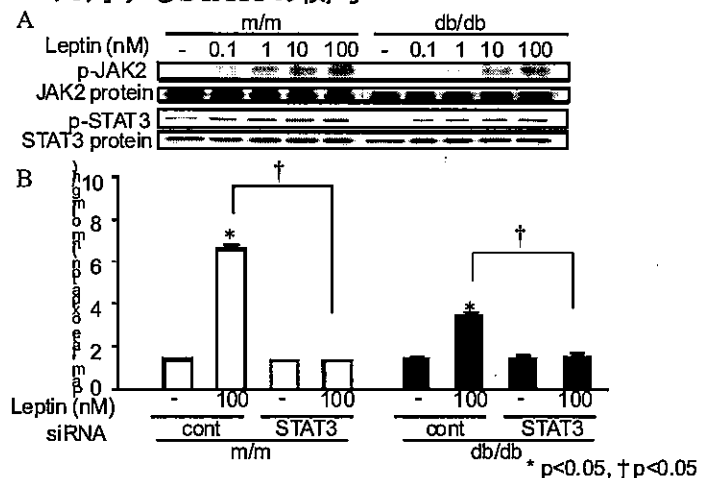


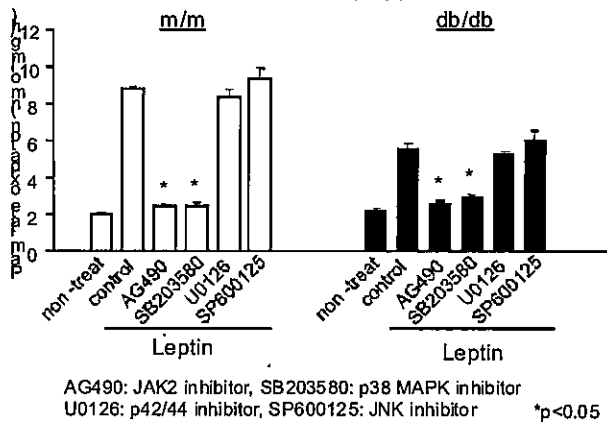
図3. m/m, db/dbマウス骨格筋における脂肪酸酸化に対するSTAT3の関与



リン酸化された Tyr1138 が STAT3 をリクルートし、STAT3 は JAK2 にリン酸化されて核内に移行し、制御遺伝子を発現させる。Db/db 細胞では、STAT3 を結合する Tyr1138 が存在しない short-form 受容体の発現のみであることから、JAK2 のリン酸化は起こるが、STAT3 のリン酸化が起こることは予想し得ない。しかしながら、今回、JAK2 および STAT3 のリン酸化が m/m のみならず、db/db 細胞においても捉えられた(図 3A)。また、STAT3 siRNA により両細胞における脂肪酸酸化が抑制された(図 3B)。したがって、db/db 細胞におけるレプチン誘導性脂肪酸酸化にも STAT3 が寄与していることが確認された。

Short-form 受容体みの細胞においても STAT3 リン酸化が認められたことから、JAK2 から STAT3 リン酸化に至る間に何らかのシグナル分子の存在が予想された。各種阻害剤を用いてレプチン作用に与える影響を調べたところ、いずれの細胞にても MEK (20  $\mu$ M U0126) および JNK 阻害剤 (100  $\mu$ M SP600125) は無影響であったが、JAK2 (10  $\mu$ M AG490) および p38 MAPK 阻害剤 (40  $\mu$ M SB203580) はほぼ完全に脂肪酸酸化亢進を抑制した(図 4)。両細胞において、レプチンによる p38 MAPK リン酸化

図4. m/m, db/dbマウス骨格筋における脂肪酸酸化に対するkinase阻害剤の影響



の上昇と、JAK2 阻害剤による消失が示された。p38 MAPK 阻害剤は JAK2 リン酸化に影響を与えず、STAT3 リン酸化のみを抑制したことから、JAK2/p38 MAPK/STAT3 経路が示唆された。加えて、p38 MAPK siRNA を用いて、レプチンによる脂肪酸酸化亢進ならびに STAT3 リン酸化に対する影響を確認した。いずれの細胞においても、p38 MAPK siRNA により、脂肪酸酸化が抑制され、また、STAT3 リン酸化についても同様に抑制されたことから、レプチン誘導性脂肪酸酸化に対する p38 MAPK の関与が確認された。

れた。

m/m および db/db 細胞において、脂肪酸酸化に関与する遺伝子群 (MCAD、CPT-1、UCP2) の発現変動を調べたところ、レプチン処理により増加することが示された。また、STAT3 siRNA 処理により各遺伝子発現の抑制がみられたことから、脂肪酸酸化に関与する遺伝子群は STAT3 により発現制御される可能性が示された。

#### 【結論】

本研究では、レプチンは骨格筋細胞において、JAK2/STAT3 経路および遺伝子発現を介して、6-24 時間後に脂肪酸酸化を亢進することを示した。また、short-form レプチン受容体は、long-form 受容体に加えて、レプチンの骨格筋における脂肪酸酸化亢進に寄与する可能性を示した。そのシグナル伝達として、p38 MAPK の関与、すなわち JAK2/p38 MAPK/STAT3 経路が示唆された。

骨格筋細胞におけるレプチン作用・シグナルを解明した本研究は、骨格筋におけるレプチン抵抗性の成因・メカニズム解明や、レプチン抵抗性解除をターゲットとした肥満治療薬創製の一助となるものと考えられる。