

審査の結果の要旨

氏名 赤坂 ゆにけ

赤坂ゆにけは、「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」と題して、以下の研究を行った。

赤坂は、現行の肥満症治療薬には副作用や効果に問題があることから、肥満に対して有効で、かつ安全でQOLを損なわない肥満治療薬創製を目指そうと考えた。また、脳をターゲットとするリスクが問題視されている状況から、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を考え、生理活性物質であるレプチンに注目した。レプチンは、脂肪細胞から分泌され、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。しかしながら、肥満においては、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く、レプチン抵抗性を呈していると考えられている。レプチン抵抗性は骨格筋においても報告されており、赤坂は、骨格筋の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、興味を持った。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。

赤坂は、まず骨格筋細胞におけるレプチンの直接作用を検討した。マウス骨格筋由来 C_2C_{12} 細胞は、筋芽細胞を筋管細胞に分化させて使用した。 C_2C_{12} 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。顕著な作用はレプチン処理後6時間以降に認められた。RNA合成阻害剤であるActinomycinD処理により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を示した。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、レプチン処理24時間でそれぞれの発現が増加することを示した。

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が、骨格筋における JAK2/STAT3 経路の役割については不明である。そこでまず、レプチンによる JAK2 および STAT3 のリン酸化の上昇を検出した。つづいて、JAK2 阻害剤(10 μ M AG490)存在下でレプチン処理を行い、JAK2 の自己リン酸化がほぼ完全に抑制され

ること、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ることを示した。また、STAT3 siRNA 処理により脂肪酸酸化亢進作用が消失したことから、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を示した。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 活性で評価を行い、レプチン 100 nM にても ACC 活性に影響を与えなかったことから、本系において AMPK/ACC 経路の関与の可能性は低いことを示した。

次に、より生理的に近いと考えられるマウス後肢から摘出・調製した初代培養骨格筋細胞におけるレプチン作用とそのシグナルを検討し、脂肪酸酸化亢進および JAK2/STAT3 経路の関与を示した。さらに、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、レプチンを欠損している 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(血漿中レプチン濃度:10 nM)、骨格筋を摘出して脂肪酸酸化能を調べ、対照群と比較して 30%の脂肪酸酸化能亢進と、脂肪酸酸化関連遺伝子(MCAD, CPT-1, UCP-2)発現の上昇を示した。

レプチン受容体には、long-form と short-form 受容体が存在するが、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 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、赤坂は、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を予想し、今回検討した骨格筋細胞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指した。

レプチンは、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を初めて明らかにした。次に、レプチンによるシグナル伝達について検討した。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 のリン酸化を db/db 細胞においても捉えた。また、STAT3 siRNA により脂肪酸酸化が抑制されたことから、db/db 細胞におけるレプチン誘導性脂肪酸酸化への STAT3 の寄与を確認した。

Short-form 受容体のみを発現する細胞においてもレプチンによる STAT3 リン酸化が認められたことから、赤坂は 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を予想した。各種阻害剤を用いてレプチン作用に与える影響を調べ、MEK (20 μM U0126) および JNK 阻害剤 (100 μM SP600125) は無影響であったが、JAK2 (10 μM AG490) および p38 MAPK 阻害剤 (40 μM SB203580) はほぼ完全に脂肪酸酸化亢進を抑制することを示した。レプチンによる p38 MAPK リン酸化の上昇と、その上昇が JAK2 阻害剤 (10 μM AG490) により消失することを示した。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 経路を示唆した。加えて、p38 MAPK siRNA による脂肪酸酸化の抑制と、STAT3 リン酸化の抑制から、レプチン誘導性脂肪酸酸化に対する p38 MAPK の関与を確認した。

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) の発現がレプチン処理により増加すること、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を示した。

本研究では、①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、②short-form レプチン受容体は、long-form 受容体に加えて、JAK2/p38 MAPK/STAT3 経路を介してレプチンの骨格筋細胞における脂肪酸酸化亢進に寄与する可能性を示した。

骨格筋細胞におけるレプチンの直接作用およびシグナル伝達、short-form レプチン受容体の役割を解明した本研究は、末梢組織におけるレプチン作用を説明するのみならず、骨格筋におけるレプチン抵抗性の成因・メカニズム解明研究への手がかりを示すものである。以上から、本研究は、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと考えられた。