

学位論文題名

抗肥満薬リモナバンのインスリン抵抗性改善作用における
アディポネクチンの役割に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

抗肥満薬であるカンナビノイド拮抗薬・リモナバンは摂食量を低下させ、体重を減少させるのみならず、血清アディポネクチンを上昇させることが知られている。アディポネクチンは主要なインスリン感受性アディポカインのひとつであるため、この血清アディポネクチンの上昇がリモナバンを投与した際に認められるインスリン抵抗性の改善に寄与しているという仮説が以前より立てられている。しかし、これまでこの仮説を実験的に証明したものはない。そこで本研究では、リモナバンのインスリン抵抗性を主とする代謝改善作用におけるアディポネクチンの役割について検討を行った。

【方法】

アディポネクチン欠損 ob/ob マウスを作成し、ob/ob マウスとアディポネクチン欠損 ob/ob マウスに、それぞれ 30mg/kg のリモナバンあるいはその溶媒を 1 日 1 回 3 週間投与した。投与中、摂餌量と体重を観察し、投与期間終了後に脂肪組織重量、直腸温、酸素消費量、血清の脂質やアディポネクチン等を測定し、高インスリングルコースクランプ法やインスリン投与実験等によってインスリン抵抗性について解析を行った。肝臓中性脂肪含量については Oil Red O 染色法によって評価した。また 3T3L1 培養脂肪細胞を用いてリモナバンのアディポネクチンの発現と分泌に対する効果の解析を行った。

【結果】

リモナバンによって ob/ob マウス、アディポネクチン欠損 ob/ob マウスいずれにおいても体重、摂餌量、脂肪組織重量の同程度の減少を認めた。また体温、酸素消費量は、両マウスともにリモナバンによって上昇を認めたが、リモナバン投与群間では差を認めなかった。血中の中性脂肪や遊離脂肪酸もリモナバンによっていずれのマウスも有意な低下を認めたが、リモナバン投与群間には差を認めなかった。

ob/ob マウスでは、血清アディポネクチン、中でも AMP キナーゼ (AMPK) の活性化を介して脂肪酸燃焼を増加してインスリン感受性作用を発揮することで知られる高分子多量体の上昇を認めた。そこでリモナバンのアディポネクチンに対する直接効果を培養脂肪細胞で調べた結果、リモナバンはアディポネクチンの発現、および培養液中への分泌を上昇させた。

次にリモナバンの肝臓および骨格筋におけるインスリン抵抗性に対する効果についてクランプ法を用いて調べた。リモナバン非投与では両マウスで糖注入率は差がなかった。リモナバン投与によって、いずれのマウスにおいても糖注入率は有意に上昇を認めたが、その効果は有意にアディポネクチン欠損 ob/ob マウスで減弱していた。またリモナバンはいずれのマウスにおいても肝臓の糖産生を有意に抑制していたが、その効果は有意にアディポネクチン欠損 ob/ob マウスで減弱していた。一方、筋肉の糖取り込み率については 4 群間で差を認めなかった。そこで肝臓におけるインスリンシグナルについてインスリンによる Akt のリン酸化について検討したところ、ob/ob マウスではインスリンによる Akt のリン酸化はリモナバンの投与によって有意に上昇していたが、アディポネクチン欠損 ob/ob マウスでは傾向を認めたのみであった。

肝臓の糖産生系酵素である PEPCK の発現も、リモナバン非投与群では両マウスでは差がなく、リモナバン投与によっていずれのマウスにおいても低下を認めたが、その効果は有意にアディポネクチン欠損 ob/ob マウスで減弱していた。

そこで肝臓でのインスリン抵抗性改善のメカニズムを調べるために、肝臓 AMPK のリン酸化について解析を行った。その結果、リモナバン投与によりいずれのマウスにおいても有意な AMPK のリン酸化の増強を認めたが、その効果はアディポネクチン欠損 ob/ob マウスで有意に減弱していた。しかしアディポネクチンがなくても軽度ではあるが有意な AMPK のリン酸化の増強を認めたことから、リモナバンにはアディポネクチン非依存的にも AMPK リン酸化の増強作用があることがわかった。AMPK の下流に位置し、脂肪酸 β 酸化の律速酵素である CPT-1 の発現も AMPK のリン酸化と同様に、リモナバン非投与群では差がなく、リモナバン投与によっていずれのマウスにおいても有意に上昇を認めたが、その効果は有意にアディポネクチン欠損 ob/ob マウスで減弱していた。その結果と考えられるが、肝臓の中性脂肪含量を解析した結果、リモナバン非投与群では両マウスで差がなく、リモナバン投与によっていずれのマウスにおいても減少を認めたが、その効果は有意にアディポネクチン欠損 ob/ob マウスで減弱していた。また筋肉の AMPK の活性化は 4 群間で差を認めなかった。

【考察】

リモナバンは ob/ob マウス、アディポネクチン欠損 ob/ob マウスの摂餌量や体重を同程度に減少させ、エネルギー消費を増加させたので、これらの効果はアディポネクチンとは独立に作用していると考えられた。

リモナバンによる肝臓のインスリン抵抗性の改善の程度がアディポネクチンの欠損によって有意に減弱していたことから、リモナバンのインスリン抵抗性改善作用の少なくとも一部は、アディポネクチンを介していると考えられた。一方、アディポネクチンが欠損していても、肝臓で有意なインスリン抵抗性改善作用が認められた。この機序としては体重減少が一部寄与していると考えられたほか、血清アディポネクチンに差のない肝臓特異的 CB-1 欠損マウスで肝臓 AMPK 活性が上昇しているという報告から、リモナバンに直接的な肝臓 AMPK の活性化作用があることも示唆された。

また、肝臓特異的 CB-1 受容体欠損マウスでは肝臓 CPT-1 活性の上昇と肝臓中性脂肪含量の減少を認めたという報告等から、CB-1 受容体阻害薬は CPT-1 活性を刺激し、脂肪酸燃焼を増加させ、肝臓中性脂肪含量を減少させることが示唆される。実際リモナバンはいずれのマウスでも肝臓の CPT-1 活性を上昇させ、肝臓中性脂肪含量を低下させた。しかしその効果は *adipo(-/-)ob/ob* マウスで有意に低下していたことから、リモナバンによる CPT-1 の発現上昇や肝臓中性脂肪含量の低下にはアディポネクチンと独立した経路と依存した経路が存在していることが示唆された。

本研究の結果からリモナバンがインスリン抵抗性を改善する機序には明らかに 2 つの経路が存在しており、そのひとつはアディポネクチンに依存している経路であり、もうひとつはアディポネクチンとは独立している経路であることがわかった。リモナバンは血清アディポネクチン、特に高分子多量体アディポネクチンを上昇させ、それが肝臓で AMPK を活性化させ、糖産生を抑制し、インスリン抵抗性を改善させる。一方でリモナバンはアディポネクチンとは独立して、直接作用として肝臓の AMPK を活性化させ、肝臓糖産生を抑制し、インスリン抵抗性の改善に寄与する。加えて、リモナバンは摂餌量を減少、エネルギー消費を増加させ、体重を減少させる。この体重減少もまたアディポネクチンに依存した、またアディポネクチンとは独立した経路によってインスリン抵抗性の改善に寄与することが考えられる。

【結語】

リモナバンはアディポネクチン依存的にも、またアディポネクチン非依存的にもインスリン抵抗性を改善する

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

抗肥満薬リモナバンのインスリン抵抗性改善作用における アディポネクチンの役割に関する研究

抗肥満薬であるカンナビノイド受容体拮抗薬・リモナバンは摂食量を低下させ、体重を減少させるのみならず、インスリン感受性に誘導する血清アディポネクチンを上昇させ、これがリモナバンによるインスリン抵抗性改善作用に寄与しているという仮説が以前より立てられている。そこで本研究では、リモナバンのインスリン抵抗性改善作用におけるアディポネクチンの役割について検討を行った。

まずアディポネクチン欠損 *ob/ob* マウス(*adipo(-/-)ob/ob*)を作成し、*ob/ob* マウスと *adipo(-/-)ob/ob* に、リモナバンあるいはその溶媒を1日1回3週間投与した。リモナバンによりいずれにマウスにおいても、体重、摂餌量の減少と、体温、酸素消費量の上昇を認めたが、その程度はいずれのマウスでも同程度であった。これらの結果から、リモナバンの体重・摂餌量の抑制作用、エネルギー消費の亢進作用はアディポネクチンとは独立した作用と考えられた。

ob/ob マウスではリモナバンにより血清アディポネクチンの上昇を認めた。そこでリモナバンで3T3L1 脂肪細胞を刺激した結果、アディポネクチンの発現と分泌が上昇したことから、リモナバンには脂肪細胞に対して直接的にアディポネクチンを上昇させる作用があると考えられた。

次にリモナバンのインスリン抵抗性に対する効果についてクランプ法を用いて調べた。リモナバンにより、いずれのマウスでも糖注入率の上昇と肝臓の糖産生の抑制を認めたが、その効果は *adipo(-/-)ob/ob* で有意に減弱していた。筋肉の糖取り込みについては差がなかった。さらに肝臓 AMPK は、リモナバンによりいずれのマウスでもリン酸化の増強を認めたが、その効果は *adipo(-/-)ob/ob* で有意に減弱していた。その結果と考えられるが、肝臓の中性脂肪含量はリモナバンによりいずれのマウスでも減少を認めたが、その効果は有意に *adipo(-/-)ob/ob* で減弱していた。

以上より、リモナバンによるインスリン抵抗性改善作用にはアディポネクチンに依存した経路と独立した経路があることがわかった。

アディポネクチンとは独立した作用としては、体重減少に伴う作用のほか、リモナバンによる肝臓 AMPK の直接的な活性化作用が考えられた。これに関しては、体重と血清アディポネクチンに差のない肝臓特異的 CB1 欠損マウスで肝臓 AMPK 活性が上昇しているという報告から、リモナバンに直接的な肝臓 AMPK の活性化作用があることも示唆されている。

つまり、リモナバンがインスリン抵抗性を改善するメカニズムとして、リモナバンは血清アディポネクチンを上昇させ、それが肝臓で AMPK を活性化し、糖産生を抑制し、インスリン抵抗性を改善させる一方、アディポネクチンとは独立して、肝臓 AMPK を直接活性化

し、インスリン抵抗性を改善させ、さらに、摂餌量を減少、エネルギー消費を亢進させて、体重を減少させ、この体重減少もまたアディポネクチンに依存した経路と、アディポネクチンとは独立した経路によってインスリン抵抗性を改善させることが考えられた。

以上の発表内容に対して、副査・吉岡教授から、肥満時の末梢臓器における CB1 受容体の発現変化について、リモナバンがアディポネクチンを上昇させるメカニズムについてなどの質問があった。次いで副査・小池教授からリモナバンの副作用について、また培養脂肪細胞に対してのアゴニストとしての作用についてなどの質問が、さらに主査から、本研究の意義について質問があった。

吉岡教授の質問に対しては、肥満時には肝臓・脂肪組織などで CB1 受容体の発現が上昇するという既報があること、リモナバンがアディポネクチンを上昇させるメカニズムには自験例では PPAR γ の活性化作用による可能性があることを回答した。次いで小池教授の質問に対しては、実際にリモナバンはうつ病や自殺企図などのために欧州では一旦販売されたが販売中止となったこと、脂肪細胞に対してもアゴニストとしての作用ではなく、脂肪細胞から分泌されたリガンドがオートクライン・パラクラインに作用するのを阻害した結果だと考えられることを回答した。主査・西村教授からの本論文の意義に関する質問に対しては、中枢に移行しない末梢型 CB1 受容体拮抗薬が開発されたことを発表した論文のデータをスライドに示しながら、今後肥満やメタボリックシンドロームに効果の期待される薬剤であることを紹介した。

この論文は、医学雑誌 Journal of Biological Chemistry で高く評価され、本研究の内容は今後の CB1 受容体拮抗薬の臨床への応用に役立てられることが期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。