

氏名	いま がわ けい いち 今 川 敬 一
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 636 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ヒトレプチンの臨床生化学的研究

論文調査委員 (主 査)
教授 市川 厚 教授 佐藤 公道 教授 中川 照 眞

論 文 内 容 の 要 旨

肥満は体脂肪量を一定に保つ調節機構の破綻により発症し、糖尿病、高血圧症、動脈硬化症、虚血性心疾患等の成人病の危険因子となりうる。生体の脂肪量調節メカニズムの解明はこれら疾病の予防及び治療上極めて重要である。脂肪量調節のフィードバックループにおいて求心的に働く因子として同定された肥満遺伝子産物(レプチン)は分子量 16 kD のペプチドホルモンであり、その構造上の特徴として Cys⁹⁵ と C 末端の Cys¹⁴⁵ の間にジスルフィド結合を有している。今までにレプチンは脂肪細胞から分泌され、血流を介して大脳視床下部の食欲中枢に作用し、節食量抑制及びエネルギー代謝を調節することにより体脂肪量を調節することが示されているが、レプチンの機能発現過程、生理的役割については解明するべき部分が多く残されている。著者はすでにラットにおいて視床下部内でのレプチンの作用部位を詳細に検討し、弓状核への投与が最もレプチンの作用が強く現れることを明らかにし、その情報伝達経路解明に示唆を与えたが、著者はさらにこれらの問題に対するアプローチとして、二つの方向から検討を加えた。一つは高感度酵素免疫測定法によるヒトレプチンの体液中濃度測定であり、一つはレプチンの構造活性相関の検討である。

第一章 ヒトレプチンの高感度酵素免疫測定法の確立及び生体試料中濃度の検討

今まで幾つかのグループによりヒトレプチン濃度の体液中濃度の検討が主にラジオイムノアッセイ法(RIA法)を用いて行なわれて来たが、RIA法は感度が十分ではなく、脳脊髄液等のレプチン濃度の低い検体の測定を行うためには、抽出、濃縮という煩雑な操作に加えて長時間の免疫反応を必要とした。これらの問題を克服するため、著者はマウス抗ヒトレプチンモノクローナル抗体を作製し、高感度で簡便なサンドイッチ酵素免疫測定法(ELISA法)を確立した。2種類のモノクローナル抗体を用いて確立したELISA法はヒトレプチン7.8~500 pg/mLの濃度範囲が測定可能であり、RIA法に比べて20倍以上高感度であった。測定値の再現性も良好で、ヒト体液中に含まれる干渉物質の影響も少なく、精度よく測定できる事が示された。

次に高感度な新規ELISA法を用いてヒト体液中のレプチン濃度の測定を行なった。ヒト血漿中のレプチン濃度は体脂肪率との間に正の相関を示した。血漿中のレプチン濃度が極端に低下する神経性食思不振症患者では今までのRIA法では正確に測定が出来なかったが、今回ELISA法で測定を行い、健常者と同様に血漿中レプチン濃度は体脂肪率と正相関を示す事を初めて見出した。また脳脊髄液中のレプチン濃度の測定を行なったところ、RIA法では全て感度以下であったが、高感度なELISA法は57~273 pg/mLという低濃度の脳脊髄液中レプチンを精度良く測定できることが示された。また、ゲルろ過法により脳脊髄液中のレプチンの存在様式についても検討を行ない、脳脊髄液中のレプチンは主に遊離型で存在する事を初めて明らかにした。

今回確立したELISA法及びこれを用いた新たな知見は、今後のヒトにおけるレプチンの生理的意義、病態における役割の解明に大きく寄与すると考えられる。

第二章 ヒトレプチンの構造活性相関の検討

レプチンの構造活性相関に関して、今までにペプチド断片を用いた報告が複数なされているが、何れもレプチン分子全体

を網羅したものではなく、またそれらの検討結果からは一致した結論が得られていない。著者は今回、遺伝子組換え技術により分子内ジスルフィド結合、N-末端領域、C-末端領域を欠損するレプチン誘導体を作製し、それら構造の生物活性及び受容体結合活性における寄与について検討した。

レプチン誘導体はそれぞれ可溶性の蛋白として精製し、アミノ酸組成分析で確認、定量を行った。受容体結合活性は ob/ob マウス的大脑切片を用いてオートラジオグラフィーで確認した。生物活性は ob/ob マウスに各レプチンを脳内投与し、投与後24時間の摂食量、体重変動等を測定した。変異型レプチンは野生型同等の受容体結合活性を示し、その生物活性も野生型に比べるとほぼ同等の、15 pmole の投与で有意な体重増加の抑制、摂食量の抑制が認められた。C-末端欠損型レプチンは野生型と比較すると活性は弱いものの、90 pmole の投与で有意な摂食抑制が認められた。一方、N-末端領域欠損型レプチンは受容体結合活性、生物活性ともに検出されなかった。これらの結果より、レプチンの生物活性及び受容体結合活性発現にはN-末端部分が必須であり、C-末端環状構造は活性を増強させる事が示唆された。

これらの知見はレプチンの病態解析及び関連する医薬品の開発に寄与する事が期待される。

論文審査の結果の要旨

肥満遺伝子産物（レプチン）は脳視床下部の食欲中枢に作用し、摂食量およびエネルギー代謝量を調節することにより体脂肪量を調節することが知られている。肥満は体脂肪量の調節機構の破綻により発症し、糖尿病、高血圧、動脈硬化症等の成人病の危険因子となりうる。そこで、これら疾病の予防および治療にはレプチンの機能発現や生理的意義を明らかにすることが極めて重要である。著者はレプチンの機能発現に関する研究を行い、二つの大きな研究成果を得ている。その第一は、レプチンの機能発現過程を検索するのに必須の高感度レプチン測定法を確立し、脳視床下部や脳脊髄液中にある微量のレプチンを測定したことである。レプチンの測定法に関して、従来のラジオイムノアッセイ法では感度・精度の低さに加え、測定操作の煩雑性と長時間を要する点に問題があった。著者は高感度・高精度で簡便なサンドイッチ酵素免疫法を確立し、これらの問題点を克服した。更に、この測定法を用いて、健常者と神経性食思不振症（拒食症）患者の血漿中の微量のレプチン濃度を正確に測定することに初めて成功し、レプチン濃度と体脂肪率との間に正の相関があることを明らかにした。著者の確立した測定法は、レプチンの生理的意義や病態における役割の解明に大きく寄与すると考えられる。第二には、ヒトレプチンの構造活性相関について、遺伝子組み換え技術を用いて研究し、レプチンの生物活性および受容体結合活性発現に必要なドメインの存在部位を明らかにしたことである。著者はレプチンの構造上の特徴から、分子内ジスルフィド結合、N-末端領域、C-末端領域にドメインを予想し、各ドメインについて組み換え体を作製し、それらの生物活性（摂食量、体重変動など）と受容体結合活性（ob/ob マウスを用いたオートラジオグラフィー）を測定した。その結果、レプチンの生物活性と受容体結合活性の発現にはN-末端領域のドメインが必須であり、C-末端領域ドメインは活性を増強させる作用のあることを明らかにした。これらの成果はレプチン誘導体の医薬品開発に必要な基礎知見として非常に重要である。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成12年9月18日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。