

|           |                                                                                                                                                                                          |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | え び はら けん<br>海 老 原 健                                                                                                                                                                     |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2242 号                                                                                                                                                                             |
| 学位授与の日付   | 平 成 12 年 3 月 23 日                                                                                                                                                                        |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                                                                  |
| 研究科・専攻    | 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻                                                                                                                                                                      |
| 学位論文題目    | Involvement of Agouti-Related Protein, an Endogenous Antagonist of Hypothalamic Melanocortin Receptor, in Leptin Action<br>(内因性視床下部メラノコルチン受容体アンタゴニストである agouti 関連蛋白質のレプチン作用における意義に関する研究) |

論文調査委員 (主 査) 教 授 清 野 裕 教 授 北 徹 教 授 中 尾 一 和

## 論 文 内 容 の 要 旨

レプチンは、視床下部におけるプロオピオメラノコルチン (POMC) 及び POMC に由来する  $\alpha$ メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ MSH) の産生を亢進し、4 型メラノコルチン受容体 (MC4R) を活性化することにより、摂食抑制及びエネルギー消費亢進作用をもたらすと考えられている。最近、マウス視床下部よりクローニングされた agouti 関連蛋白質 (AGRP) は、MC4R に強力な拮抗作用を有する新しい蛋白質であり、エネルギー代謝調節に重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、レプチン作用における AGRP の意義を明らかにするために、ヒト AGRP リコンビナント蛋白質を作製し、レプチンの摂食量及び体重増加抑制作用における AGRP の影響を検討した。更に、レプチンの視床下部における AGRP 遺伝子発現調節作用を検討した。

### 1. ヒト AGRP リコンビナント蛋白質の作製とレプチン作用における意義

大腸菌発現系を用いて、132 アミノ酸から成るヒト AGRP リコンビナント蛋白質を作製した。ラット視床下部膜分画を用いてメラノコルチン受容体に対する結合親和性を検討したところ、得られたリコンビナント AGRP の 50% 阻害濃度は 190 nmol/l であり、内因性アゴニストである  $\alpha$ MSH に匹敵するものであった。AGRP 側脳室内投与により 8 週齢雄性 SD ラットの摂食量及び体重は用量依存的に増加し、 $\alpha$ MSH の摂食抑制及び体重減少作用を用量依存的に減弱した。以上より、AGRP は  $\alpha$ MSH とメラノコルチン受容体の結合を阻害することにより、 $\alpha$ MSH の摂食抑制及び体重減少作用を減弱し、摂食促進及び体重増加をもたらすことが明らかとなった。次に AGRP とレプチンを同時に側脳室内投与したところ、AGRP はレプチンの摂食抑制及び体重増加抑制作用を用量依存的に減弱した。以上より AGRP は、 $\alpha$ MSH を介するレプチンの摂食抑制及び体重増加抑制作用を減弱することが明らかとなった。

### 2. レプチンの視床下部における AGRP 遺伝子発現調節

レプチン欠損 *ob/ob* マウス、レプチン受容体欠損 *db/db* マウス、レプチン過剰発現トランスジェニックマウス (Tg マウス) の視床下部における AGRP 遺伝子発現をノーザンブロット法を用いて検討したところ、*ob/ob* 及び *db/db* マウスでは AGRP 遺伝子発現は著しく亢進していたが、Tg マウスでは低下していた。*ob/ob* マウスの AGRP 遺伝子発現はレプチンの側脳室内投与により低下したが、*db/db* マウスでは変化は認められなかった。以上より、レプチンはレプチン受容体を介して視床下部における AGRP 遺伝子発現を抑制的に制御していることが明らかになった。

対照マウスでは、絶食により血中レプチン濃度が低下するが、視床下部における AGRP 遺伝子発現は亢進した。レプチンの側脳室内投与により、対照マウスにおける絶食時の AGRP 遺伝子発現亢進は認められなかった。以上より、絶食時には少なくとも、レプチンが減少することにより、AGRP 遺伝子発現が亢進することが示唆された。

本研究により、AGRPは $\alpha$ MSHのMC4Rにおける結合を競合的に阻害することが明らかとなり、視床下部メラノコルチン系を抑制することによりレプチンの摂食抑制及び体重増加抑制作用を調節することが明らかとなった。またレプチンは、視床下部におけるAGRP遺伝子発現を抑制的に制御していることが明らかとなった。以上より、レプチンは相互に拮抗作用を有する $\alpha$ MSHとAGRPを同時に制御することにより、摂食量及び体重増加を制御すると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

レプチンは、視床下部において $\alpha$ メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ MSH) の産生を亢進させ、4型メラノコルチン受容体 (MC4R) を介して、摂食抑制及びエネルギー消費亢進をもたらすと考えられている。一方、視床下部において発現するagouti関連蛋白質 (AGRP) は、MC4Rに強力な拮抗作用を有する新しい蛋白質である。本研究では、ヒトリコンビナントAGRPを作製し、レプチンの摂食及び体重増加抑制作用におけるAGRPの影響を検討し、更に、レプチンの視床下部におけるAGRP遺伝子発現調節作用を検討した。AGRPの側脳室内投与によりラットの摂食量及び体重は増加した。またAGRPは $\alpha$ MSHあるいはレプチンの摂食及び体重抑制作用を用量依存的に減弱した。視床下部におけるAGRP遺伝子発現は、レプチン欠損 *ob/ob* 及びレプチン受容体欠損 *db/db* マウスで著しく亢進していた。レプチンの投与により *ob/ob* マウスのAGRP遺伝子発現は低下したが、*db/db* マウスは変化せず、レプチンはレプチン受容体を介して視床下部におけるAGRP遺伝子発現を抑制することが明らかになった。以上より、レプチンは相互に拮抗する $\alpha$ MSHとAGRPを同時に制御することにより、摂食及び体重を制御すると考えられた。

以上の研究はレプチン中枢作用の分子機構解明に貢献し、肥満の治療法及び予防法の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位申請者は、平成12年3月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。