

氏名	海野 (松沼) 礼子		
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)		
学位記号番号	博理工乙第 169 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文題目	レプチンによるビタミン D 活性化酵素である 1α -水酸化酵素の調節機構に関する研究		
論文審査委員	委員長	教授	末光 隆志
	委員	教授	井上 金治
	委員	准教授	小林 哲也
	委員	教授	弥益 恭

論文の内容の要旨

肥満遺伝子産物であるレプチンは、食餌摂取量を抑制し、体内のエネルギー消費を増加させることにより体脂肪および体重を減少させる。近年、レプチンが骨代謝作用を有することが見出された。骨ミネラルの主要成分は、カルシウムおよびリン酸である。高等動物におけるカルシウムの恒常性は、カルシウム調節ホルモンによって厳格に保たれている。カルシウム調節ホルモンの一つである $1, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ [$1, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$] (活性型ビタミン D) は、骨代謝に重要な役割を演じていることが広く認められている。本研究では、カルシウム代謝にレプチンが影響を与えるかどうかに着目し研究を進めた。

まず、レプチンを欠損した肥満の *ob/ob* マウスと体格が正常なマウス (コントロールマウス) を用いて、カルシウム代謝に関連する物質について比較を行った。血清カルシウムおよびリン濃度は、コントロールマウスに比べ *ob/ob* マウスで高い値を示した。さらに、*ob/ob* マウスの血清 $1, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 濃度を測定したところ、顕著に増加していた。尿中のカルシウムおよびリン濃度は *ob/ob* マウスで高かった。骨密度を測定したところ、コントロールマウスに比べ *ob/ob* マウスでは骨密度の減少、骨長の短縮が見られた。また、組織学的解析を行ったところ、*ob/ob* マウスでは海綿骨の減少傾向がみられ、骨髄腔内に脂肪滴の形成が認められた。

ob/ob マウスへの高濃度のレプチン投与を行った。マウスレプチンを $4\text{mg/kg body weight}$ で 12 時間おきに 2 日間腹腔内投与したところ、*ob/ob* マウスの血清カルシウムおよびリン濃度は低下した。血清中の $1, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 濃度も、コントロール群と同程度の濃度まで低下した。ところで、ビタミン D は活性型になるために体内で代謝を受ける。ビタミン D は肝臓で 25 位が水酸化されたのち、腎臓に運ばれ、さらに水酸化を受けることになる。活性型ビタミン D の合成と分解は、腎臓の 1α -水酸化酵素 (ビタミン D 活性化酵素) および 24 -水酸化酵素 (ビタミン D 不活性化酵素) により行われている。腎臓での 1α -水酸化酵素の遺伝子発現および酵素活性は、コントロールマウスに比べ *ob/ob* マウスで顕著に高かった。この高い遺伝子発現および酵素活性は、*ob/ob* マウスへのレプチン投与によりコントロールマウスでの発現量とほぼ同程度にまで低下した。 24 -水酸化酵素の遺伝子発現量および酵素活性もコントロールマウスに比べて *ob/ob* マウスで高く、*ob/ob* マウスへのレプチン投与により有意に低下した。

次に、最も長い細胞内ドメインを持つ主要な活性型レプチン受容体 (Ob-Rb) を欠乏した *db/db* マウスへのレプチン投与を行った。レプチンの投与は、前述の *ob/ob* マウスに対する方法に準じた。*db/db* マウスにおいても、*ob/ob* マウスと同様、コントロールマウスに比べ血清カルシウムおよび $1, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度が高かった。しかし、*db/db* マウスへのレプチン投与では、血清カルシウムおよび $1, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度に変化は見られなかった。*db/db* マウスの血清リン濃度は、コントロールマウスとの差はなかった。*db/db* マウスへのレプチン投与で血清リン濃度の若干の上昇傾向がみられたが有意な差はなかった。また、腎臓での 1α -水酸化酵素遺伝子発現および酵素活性は、*ob/ob* マウスと同様に *db/db* マウスにおいてもコントロールマウスに比べ高かった。この発現は、*db/db* マウスへのレプチン投与では抑制されなかった。このことから、レプチンのカルシウム代謝に対する作用が Ob-Rb を介したものであることが示唆された。

各組織でのレプチン受容体 Ob-Rb の発現を確認したところ、野生型マウスと *ob/ob* マウスでは、腎臓、骨での Ob-Rb の発現が認められた。そこで、レプチンが直接組織に作用するかを調べるため、腎臓の尿細管細胞の初代培養系を確立し、レプチンの腎尿細管細胞への直接的作用の検討を行った。初代培養腎尿細管細胞へのレプチン処理では、 1α -水酸化酵素発現に変化は見られなかった。 1α -水酸化酵素の発現は主に cAMP の作用により調節されていることが報告されている。そこで、アデニル酸シクラーゼ系の活性化剤である forskolin 添加時におけるレプチンの効果を検討したが、 1α -水酸化酵素発現に変化は認められなかった。また、細胞内の cAMP 濃度にも変化はなかった。この培養系について、腎臓のマーカー遺伝子の発現を確認したところ、近位尿細管細胞のマーカーである 1α -水酸化酵素およびメガリンの発現、そして近位および遠位尿細管細胞で発現している副甲状腺ホルモン受容体 (PTH/PTHrP receptor) およびビタミン D 受容体 (VDR) の発現が認められた。主に遠位尿細管細胞で発現しているカルシトニン受容体 (CT receptor) の遺伝子発現はほとんどなかった。このことから、初代培養腎細胞は近位尿細管細胞由来であることが確認された。腎皮質と培養細胞は共に、細胞内ドメインが短いレプチン受容体 Ob-Ra mRNA を発現していた。しかし、Ob-Rb mRNA は培養細胞で検出されなかった。近位尿細管では、Ob-Rb の発現がないことが示唆された。

以上のことより、*ob/ob* マウスおよび *db/db* マウスにおける血清カルシウム濃度の増加はレプチンの欠乏に起因するものであると考えられる。レプチンの作用は腎臓の 1α -水酸化酵素発現抑制を介して $1, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の合成を抑制し、結果的に血清カルシウム濃度を低下させるものであることが示唆された。また、腎臓におけるレプチンの 1α -水酸化酵素発現抑制は、 1α -水酸化酵素を特異的に発現している腎近位尿細管細胞に直接作用しているものではなく、おそらく傍分泌を介しているものであることが示された。

論文の審査結果の要旨

海野（松沼）礼子氏の論文は、レプチンの骨代謝作用の詳細を検討し、その結果をまとめたものである。レプチンは肥満遺伝子の産物であるが、食餌摂取量を抑制し体内のエネルギー消費を増加させることにより体脂肪および体重を減少させる作用能力を持っている。近年、レプチンが体重減少作用だけでなく骨代謝作用を有することが見出された。骨ミネラルの主成分は、カルシウムおよびリン酸である。高等動物におけるカルシウムの恒常性は、カルシウム調節ホルモンによって厳格に保たれている。カルシウム調節ホルモンの一つである 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃]（活性型ビタミン D）は、骨代謝に重要な役割を演じていることが広く認められている。海野氏はこれらの所見から、カルシウム代謝にレプチンが影響を与えるかどうかに着目し研究をすすめている。

まず、レプチンを欠損した肥満の *ob/ob* マウスと体格が正常なコントロールマウスを用いて、カルシウム代謝に関連する物質について比較を行った。血清中のカルシウムおよびリン濃度は、コントロールマウスに比べ *ob/ob* マウスで高い値を示した。さらに、血清中の 1,25-(OH)₂D₃ 濃度を測定したところ、*ob/ob* マウスで顕著な増加が見られた。尿中のカルシウムおよびリン濃度は *ob/ob* マウスで高かった。骨密度を測定したところ、コントロールマウスに比べ、*ob/ob* マウスでは骨密度の減少や骨長の短縮が見られた。また、組織学的解析によって、*ob/ob* マウスでは海綿骨の減少傾向や骨髓腔内に脂肪滴の形成を確認した。レプチンを欠損している *ob/ob* マウスに高濃度のレプチン投与実験を行った。マウスレプチンを *ob/ob* マウスの腹腔内に投与したところ、*ob/ob* マウスの血清中のカルシウムおよびリン濃度は低下した。血清中の 1,25-(OH)₂D₃ 濃度も、コントロール群と同程度の濃度まで低下した。ところで、ビタミン D は活性型になるために体内で代謝を受ける。ビタミン D は肝臓で 25 位が水酸化された後、腎臓に運ばれ、さらに水酸化を受けることになる。活性型ビタミン D の合成と分解は、腎臓の 1 α -水酸化酵素（ビタミン D 活性化酵素）および 24-水酸化酵素（ビタミン D 不活性化酵素）により行われている。腎臓での 1 α -水酸化酵素の遺伝子発現および酵素活性は、コントロールマウスに比べ *ob/ob* マウスにおいて顕著に高かった。この高い遺伝子発現および酵素活性レベルは、*ob/ob* マウスへのレプチン投与によりコントロールマウスでのレベルまで低下した。

次に、最も長い細胞内ドメインを持つ主要な活性型レプチン受容体（Ob-Rb）を欠乏した *db/db* マウスへのレプチン投与を行っている。*db/db* マウスは *ob/ob* マウスと同じ表現形を示す。*db/db* マウスにおいても、コントロールマウスに比べ血清中のカルシウムおよび 1,25-(OH)₂D₃ 濃度が高かった。しかし、*db/db* マウスにレプチンを投与しても血清中のカルシウムおよび 1,25-(OH)₂D₃ 濃度に変化は見られなかった。また、腎臓での 1 α -水酸化酵素の遺伝子発現および酵素活性は *db/db* マウスにおいてコントロールマウスよりも高く、これらは *db/db* マウスへのレプチン投与によっては変化しなかった。これらのことから、レプチンのカルシウム代謝に対する作用が Ob-Rb を介したのものであると結論づけている。

さらに、レプチンが腎臓の組織に直接作用するかどうかを調べるために、腎臓の尿細管細胞の初代培養系を確立した。この培養系について、腎臓のマーカー遺伝子の発現を確認したところ、近位尿細管細胞のマーカーである 1 α -水酸化酵素およびメガリンの遺伝子発現が認められたが、遠位尿細管細胞マーカーであるカルシトニン受容体の遺伝子発現はほとんどなかった。これらのことから、初代培養腎尿細管細胞は主に近位尿細管細胞由来であると考えられた。そこで、レプチンの直接作用を検討するために、初代培養腎尿細管細胞をレプチン処理したが、1 α -水酸化酵素発現に変化は見られなかった。また、初代培養腎尿細管細胞には、レプチン受容体である Ob-Rb の発現が検出されなかった。

以上のことから、海野氏は、レプチンの作用が腎臓の 1 α -水酸化酵素遺伝子の発現抑制を介して 1,25-(OH)₂D₃ の合成を抑制し血清カルシウム濃度を低下させるものであると結論づけている。また、近位尿細

管細胞由来である初代培養腎尿細管細胞にレプチンが効果を持たず、Ob-Rb の発現も認められなかったことから、 1α -水酸化酵素を特異的に発現している近位尿細管細胞にレプチンが直接作用しているのではなく、腎臓の別の細胞からの傍分泌を介してレプチンが働いていると結論している。

以上のように、海野氏の論文は、レプチンの骨代謝作用についての重要な新知見を含み、今後の研究展開に新しい方向性を指し示すものであり、博士（理学）の授与にふさわしいものと考えられ、学位論文審査委員会は学位論文審査合格とした。なお、海野氏は本論文の内容を2編の査読付き英論文（ともに第一著者）として発表しており、参考論文として、査読付きの総説1編（第一著者）および5編の査読付き論文を発表している。