

減量時の食欲制御に関する研究と応用

竹 森 洋

独立行政法人 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

緒 言

肥満は他のメタボリック症候群の病態を悪化させる前病態状態と考えられている。肥満の療法として運動や食事制限が推奨されているが、実際の生活環境においては肥満の根本的療法は無に等しく、とくに食欲制御が困難である。高度肥満患者は食欲抑制の目的で外科的に胃を切除することで対処することもあり、肥満患者の食欲ストレスの制御は非常に重要な課題である。

我々は塩誘導性キナーゼ 1 (SIK1) を高塩食負荷したラットの副腎皮質から単離した¹⁾。SIK1 は副腎皮質においてステロイド合成酵素の発現を負に調節していた。また、腎臓においては Na^+ の代謝に重要な役割を演じていた²⁾。

ゲノムプロジェクトが終盤にさしかかったころ、SIK1 にはよく似た別の遺伝子が存在することが示唆された。そこでよく似たキナーゼを SIK2 と呼ぶことにして cDNA の単離を行った。SIK2 は脂肪組織に特に高い発現を示し、肥満・糖尿病モデルマウスの脂肪細胞では高いタンパクレベルの発現が観察された³⁾。そこで、

SIK2 を脂肪細胞で高発現するトランスジェニックマウス (SIK2-Tg) を作製した⁴⁾。理由は不明であるが、外因性の SIK2 は褐色脂肪組織にしか発現しなかった。このトランスジェニックマウスを高脂肪食で飼育すると肥満度が強まった。培養細胞を利用した解析から、インスリンは褐色脂肪細胞において熱産生に重要な因子 PGC-1a の発現を高めるが、SIK2 の強制発現は PGC-1a の誘導を阻害した。このことから、SIK2-Tg の高脂肪食依存的肥満はインスリン依存的熱産生の異常であると結論した。

次に、SIK2 の白色脂肪での役割を検討する目的で、ノックアウトマウスを作製した (SIK2-KO)。しかし、SIK2-KO は高脂肪食にほとんど反応しないばかりか、血液生化学指標も変動は無かった。奇妙なことに、高脂肪食 (高カロリー食) で肥満にした後に低脂肪食へ移行させると、野生型マウスは順調に体重が減少するにも関わらず、SIK2-KO マウスの体重減少は鈍かった (図 1)。その過程で、SIK2-KO マウスが肥満後に低カロリー食を与えると過食になり、体重コントロールが不全になるこ

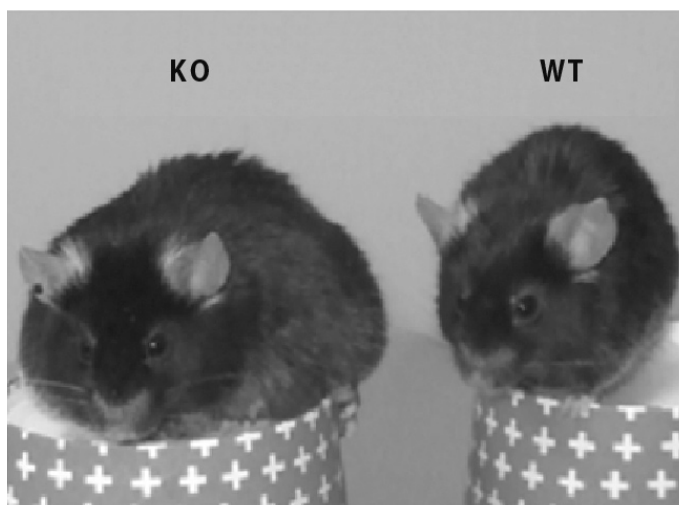
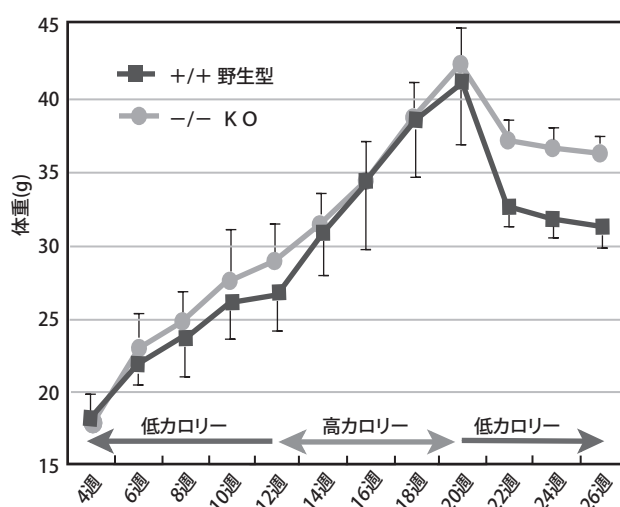


図 1 SIK2-KO マウスと野生型マウスの体重比較 (左) 26 週目でマウスを撮影 (右)

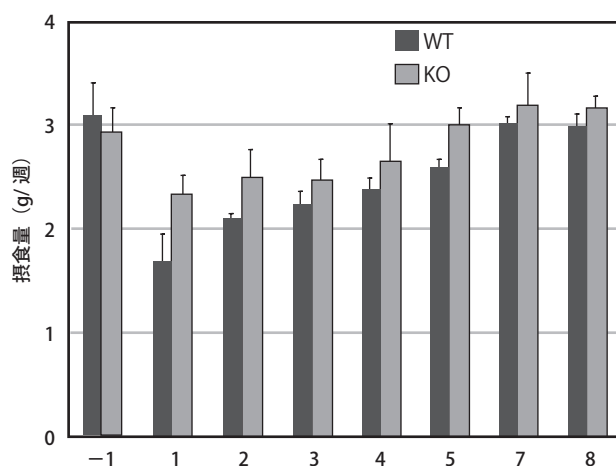


図2 高脂肪食（－1）から低脂肪食（1～8週）へ移行させた時の摂食量の計測

とを見いだした。体重減少における最大の原因は摂食量の違いと予想された（図2）。本研究では、SIK2-KOマウスが低脂肪食飼育下でより多くの餌を摂取する機構を解明し、ヒトにおける減量の根本的な治療法の開発に役立てることを目的とする。

実験方法

SIK2-KOマウスは（株）プロテインエクスプレス社と共同で作製した。現在は、医薬基盤研究所・実験動物研究資源バンクから配布されている。高脂肪食・低脂肪食はリサーチダイエツト社の60%脂肪食と10%脂肪食を利用した。レプチンELISA-kitはシバヤギ社から購入した。レポータープラスミドの細胞導入には

LipofectAMIN2000（Invitrogen社）を利用し、脂肪分化処理3日目で導入した。アッセイはPromega社のDual Luciferase Reporter Assay Kitを利用した。

結 果

SIK2-KOマウスの高脂肪食摂取による肥満後に低脂肪食へ戻した際の体重鈍化は摂食量の違いと思われる（図1、2）。マウスは低脂肪食よりも高脂肪食を好む傾向があり、高脂肪食を一端摂食させると高脂肪食を選択的に探索し、低脂肪食を摂食させても最低限の摂食量で止めることが示唆された。そのため、野生型マウスはヒトで言う減量効果が顕著に現れている。一方、SIK2-KOマウスは、やはり高脂肪食を好むことには差は無いが、食欲の制御が野生型ほどは顕著では無いため、低脂肪食もそれなりの量を摂食してしまうことが伺えた。

食欲に差が出る他の条件を検索した。その結果、24時間の絶食後に再摂食させると、SIK2-KOマウスは野生型マウスより摂食時間が長くなった（図3）。SIK2-KOマウスの血糖値は摂食量に応じて高めに推移した。また、インスリン値も高めであった。そのため、血糖やインスリンはSIK2経路を介した食欲抑制には積極的には関与していないと予想した。摂食抑制には脂肪組織から分泌されるレプチンが重要であることから血中のレプチン量を測定した。SIK2-KOマウスのレプチンは野生型マウスに比べて遅れて分泌されることが示唆された（図3）。

レプチンの合成・分泌は脂肪組織で起こり、SIK2は脂肪組織で高発現していることから、培養脂肪細胞を利

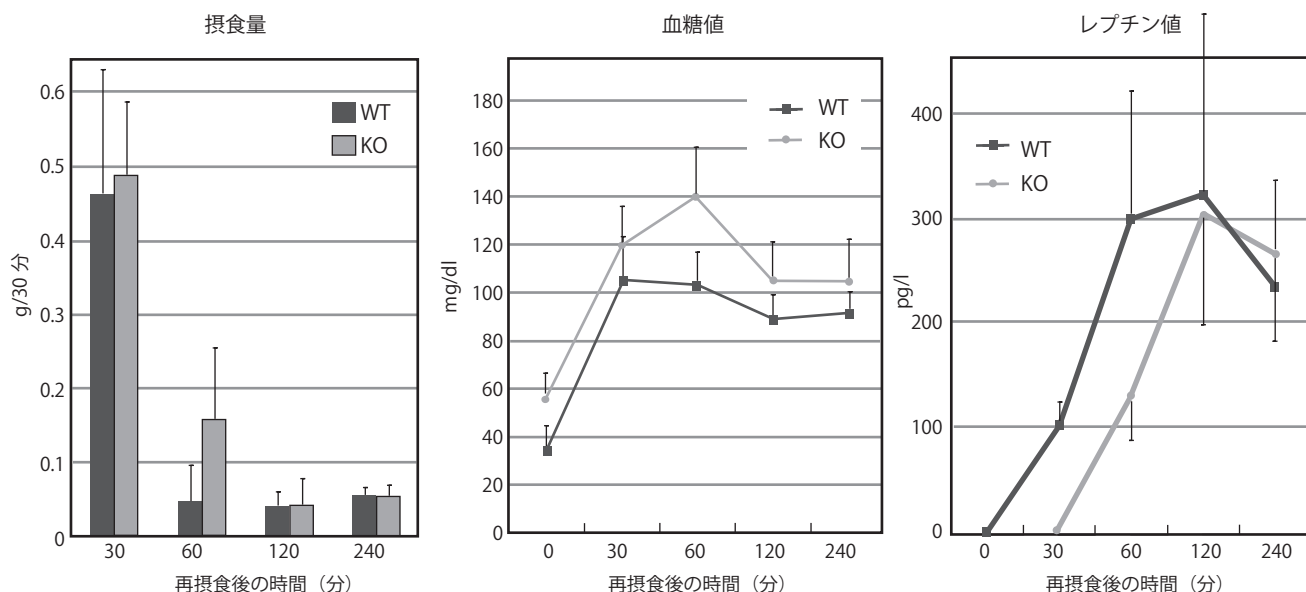


図3 マウスを24時間絶食させ、その後再摂食させた時の摂食量・血糖値・血中レプチン量の推移

用してレプチン遺伝子のプロモーターにおける SIK2 の影響を検討することにした。SIK2 の作用部位がレプチンプロモーターのいかなる部位に存在するかの予想が付かなかったため、ヒトレプチンプロモーターとマウスレプチンプロモーターの配列の差を上流 5kb までさかのぼり検討した。その結果、上流 250bp までさかのぼるとヒト・マウス間で保存度が殆ど観察されなくなるが、ヒト 1.8kb 上流の 500bp とマウス 3kb 上流の 500bp は非常に高い相同性を示していた。そこで、ヒトの 2kb のプロモーターと 1.5kb のプロモーターのレポーターを作製し、脂肪分化 3 日目の成熟中の脂肪細胞へ SIK2 の強制発現ベクターと共に導入することにした。

SIK2 強制発現はレプチンプロモーターの活性には大きくは影響しなかった。しかし、培地中のグルコース濃度を 1/5 に、そして脂肪分化誘導効果のあるインスリンを培地から除くとレプチンプロモーター活性が低下するが、その低下は SIK2 の高発現で減弱された。すなわち、SIK2-KO マウスを 24 時間絶食させて、血糖値とインスリンを下げた様な状況を培養細胞で構築すると、レプチンの発現量が SIK2 に依存することを再現できたことを示唆すると考えた。

これまでの解析から SIK ファミリーキナーゼは、TORC と呼ばれる転写共役因子をリン酸化し失活させることで、その標的転写因子 CREB の活性を低下させる⁵⁾。その他、ヒストンデアセチラーゼをリン酸化し、やはり、失活させることで、MEF-2c 等の転写因子は逆に活性化される⁶⁾。そこで、レプチンのプロモーター活性において TORC や HDAC の関与を検討した。その結果、これらの転写関連因子はレプチンの発現には関与していなかった。ちなみに、TORC や HDAC は肝臓において絶食時に活性化する因子である。そこで、別の絶食関連因子 FOXO に着目した。FOXO の強制発現はレプチンプロモーター活性を低下させ、SIK2 の強制発現での低下が弱められた。このことから、摂食や低血糖・低インスリンは FOXO を活性化することで、レプチンの発現を負に制御するが SIK2 は FOXO の活性を弱めるため、レプチンの極端な低下が起こらないものと予想される。

考 察

我々はいったん太るとなかなかやせることができない。一つの理由として、加齢に伴う筋肉（力）の低下による基礎代謝の低減が挙げられる。しかし、食欲をコントロールできない点もかなりな原因と予想される。食欲

の閾値を制御する分子の同定やそのシグナル経路の解明は、減量時の食欲ストレスを回避する方法の構築に役立つと期待される。その意味で、SIK2 シグナルは肥満に伴って上昇した食欲閾値を摂取カロリーによってリセットする役割を果たしているのではなかろうか。別の解析では、マウスの SIK2 の発現は加齢に伴って増加する。マウスもヒトも加齢にともなって基礎代謝は落ちるため、身全体が必要とするカロリーも加齢に伴って低くなるはずである。必要なカロリーが下がることにより発生する余剰な食欲を押さえ込むために SIK2 の発現が上昇し、レプチンの産生を増強させている可能性がある。

SIK2-KO マウスが高脂肪食摂取時にむしろ体重に差がつかなかった現象は、飽食時には SIK2 シグナルがもともと機能していないものと考えられる。先の SIK2-Tg は恒常的活性型 SIK2 を強制発現させた。そのため、高脂肪食摂取時に特に差が顕著であった。ただし、発現部位が白色脂肪ではなく、褐色脂肪であったため、熱産生の異常という表現型に行き着いたものと予想される。

ヒトを含め野生に生息する動物の食欲は季節に大きく左右されるものと考えられる。マウスは一定の環境で飼育されており、食餌が欠乏する危機も存在しない。野生動物が餌の不足する冬場でも収穫期の秋同様に高い食欲を維持していると、残っている餌を早期に食べ尽くし餓死してしまうと予想される。冬眠が体温を下げ活動量を低下されることで体内エネルギーの温存に繋がるように、食欲のコントロールも個々の動物種やその集団が過酷な冬場を生き抜くための重要かつ進化的に淘汰・確立された機能であってもおかしくはない。その視点から、飢餓ストレス応答転写因子 FOXO が食欲に関係した意義は大きいと思われる。しかし、実験用マウスにおいては自然環境から隔離され実験室内で飼育された期間があまりにも長い。その意味で、SIK2-KO の表現型が特定の条件下でしか現れなかったのはやむを得ないのかもしれない。今後は、ヒト遺伝子の多型解析や、野生マウス等へ KO された遺伝子を導入することで、本来の食欲調節機構への SIK2 の関与の解明を行ってみたい。

要 約

脂肪細胞に高発現するタンパクリン酸化酵素 SIK2 の KO マウスに観察される独特の摂食行動に関して検討をおこなった。SIK2-KO マウスは高カロリー（高脂肪）食を摂取した後に、低カロリー食へ移行させると野生型マウスに比べて食欲が亢進してしまう傾向にあった。また、

同様な傾向は 24 時間絶食の後の再摂食時にも観察された。この SIK2-KO マウスの食欲の差は脂肪組織から分泌される食欲抑制ホルモンレプチンの分泌が遅れることにあることが示唆された。また、FOXO がレプチンの発現に関与している可能性が示唆された。ヒトの減量時の食欲ストレスを軽減する方法の基盤構築に重要であると考えられる。

謝 辞

本研究は財団法人三島海雲記念財団の平成 21 年度学術研究奨励金によって行われたものです。助成していただきました財団法人三島海雲記念財団に深謝致します。

文 献

- 1) Wang Z et al.; *FEBS Lett*, **453**, 135-139, 1999
- 2) Sjöström M et al.; *PNAS*, **104**, 16922-16927, 2007
- 3) Horike N et al.; *J. Biol. Chem.*, **278**, 18440-18447, 2003
- 4) Muraoka M et al.; *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **296**, E1430-1439, 2009
- 5) Sreter R et al.; *Cell*, 119, 61-74 2004
- 6) Berdeaux R et al.; *Nat Med*, 13:597-603, 2007

成果発表

Uebi T, Tamura M, Horike N, Hashimoto YK, Takemori H
Phosphorylation of the CREB-specific coactivator TORC2 at Ser307 regulates its intracellular localization in COS-7 cells and in the mouse liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. (2010) in press