

# 培養脂肪細胞を用いたレプチンの脂肪分解への影響

Effect of Leptin on Lipolysis in Cultured Adipocytes

丸山 智美\* 牛込 恵子\*\* 戸谷 誠之\*\*

Satomi MARUYAMA Keiko USHIGOME Masayuki TOTANI

\*金城学院大学 生活環境学部 食環境栄養学科

\*Department of Food and Nutritional Environment, College of Human Life and Environment, Kinjo Gakuin University

\*\*昭和女子大学大学院 生活機構研究科

\*\*Graduate School of Human Life Science, Showa Women's University

## 抄録 Summary

レプチンは脂肪細胞で作られる16キロダルトンのホルモンである。このたんぱく質は食事摂取と体重を調節する視床下部を通じて体組成をコントロールする。レプチン受容体は中枢神経システムのなかで結合し脂肪を含む末梢組織で広く存在する。中枢神経活動については多くの報告がある。しかし、レプチンの末梢神経的役割はあまりよく知られていない。ヒトや動物では、血清レプチンと体脂肪とのあいだには正の相関がみられる。レプチンは末梢組織に対して直接的な影響があるのかもしれない。この論文では、レプチンはアドレナリンの脂肪分解反応促進作用による遊離脂肪酸上昇に対し、直接的な作用があるかについて、新鮮な分離ラット脂肪細胞を用い検討した。分離脂肪細胞は4グループに分けて、37°Cで2時間培養した。蒸留水添加のコントロール、アドレナリン添加、レプチン添加、そしてレプチンとアドレナリン添加の4グループである。アドレナリン添加グループでは、遊離脂肪酸量は $0.281 \mu\text{Eq/L}$ であり、レプチンとアドレナリン添加グループでは $0.128 \mu\text{Eq/L}$ であり、コントロールと比較して有意に低い値であった。しかし、アドレナリン

による遊離脂肪酸上昇がないレプチン添加のみのグループでは有意に変化しなかった。この結果は、レプチンはアドレナリン添加により動員された遊離脂肪酸に対して、直接的な分解作用があることを示唆した。

我々は、レプチンは、インビトロ培養脂肪組織での脂肪分解において直接的な作用の可能性があると結論付けた。

*Key words* : レプチン, アドレナリン, 遊離脂肪酸, 脂肪分解

## 緒言

レプチンは白色脂肪細胞で作られる16-kDのホルモンである。このたんぱく質はエネルギーのホメオスタシスと飽食を支配していると考えられている<sup>1,2)</sup>。インビボの実験では、レプチンはエネルギー摂取と体重を減らすことができることが確認されている<sup>3)</sup>。ヒトと動物では循環レプチンと総体脂肪との間には正相関が確認されている<sup>4,5)</sup>。レプチン受容体は中枢神経システムの中で結合し、脂肪を含む末梢組織に広く存在する<sup>3)</sup>。非経口では脳室内に与えたとき効果があったことが証明されている<sup>6)</sup>。レプチンの中枢神経における作用は多くの報告がある<sup>3,6)</sup>が、レプチンの

末梢神経の役割はあまりよく知られていない。脂肪組織におけるレプチンの潜在的代謝活動の報告<sup>10)</sup>により、レプチンには末梢組織での付加的直接的反応の可能性が考えられている。外因性レプチンは、ノルエピネフリン・ターンオーバーを増加する<sup>8,9)</sup>。しかし他の調査では24時間直接的な影響はないと報告されている<sup>10)</sup>。レプチンによる脂肪分解のメカニズムについては報告により内容が異なり、明らかにされていない。そこで、この論文では、新鮮な分離ラット脂肪細胞を用い脂肪細胞分解に対するレプチンの直接的作用を検討し、レプチンはアドレナリンによる脂肪分解反応促進作用による遊離脂肪酸(FFA)上昇を抑制するか否か、白色脂肪組織切片を調整した遊離脂肪細胞を用い、細胞培養実験により考察した。

### 対象と方法

#### 使用動物

7週齢、SD系雄ラット体重(200–230g)を日本チャールズリバー社(横浜)より購入した。先行研究<sup>10)</sup>をもとに、本研究における動物の週齢を決定した。動物は、12時間ごとの明暗サイクル、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の動物飼育室にて個別ケージで飼育した。飼料はAIN-93構成成分<sup>11)</sup>を基本としたMF固形試料(オリエンタル酵母工業)とした。飼育期間中は飼料及び飲料水は自由摂取させ、3日間制御された条件下で飼育された。3日目、ラットはAM9時から10時に安楽死させた。すべての動物は「実験動物の飼養および保管に関する基準」(昭和55年3月総理府告示6号)に従い取り扱った。

#### 材料

ウシ血清アルブミン、コラゲナーゼ、グルコース、クレブスリンガーリン酸緩衝(バッファー)液(pH7.4)など試薬と遊離脂肪酸測定用のNEFAキットは和光純薬工業(大阪)、

リコンビナントヒトレプチンはシグマ社(アメリカ、ミズーリ)から購入した。

#### 分離脂肪の準備

分離脂肪細胞はロッドベルの方法<sup>12)</sup>で副睾丸脂肪から調整した。

#### 脂肪細胞の培養

調整した遊離脂肪細胞切片200mgを作り、2mLクレブスリンガーリン酸緩衝液(pH7.4)を含む共栓つき試験管へ入れ、①蒸留水0.2mgを加えたもの、②L-アドレナリン $20 \mu\text{g}$ を加えたもの、③レプチン $10 \mu\text{g}$ を加えたもの、④L-アドレナリン $20 \mu\text{g}$ とレプチン $10 \mu\text{g}$ を加えたもの、の4群を、各々6匹から6片を作成した。脂肪細胞は $37^\circ\text{C}$ で培養された。培養時間の検討を事前に行った。その結果を図1に示した。2時間、2.5時間、3時間で有意な差はなかったため、我々は培養時間を $37^\circ\text{C}$ 、2時間と決定した。脂肪細胞は $37^\circ\text{C}$ で2時間培養された。アドレナリン<sup>12)</sup>とレプチン<sup>10)</sup>の添加量は、先行研究に従った。インキュベーション終了後、クロロホルム500 $\mu\text{L}$ で洗浄し、分散しないで残った組織片を、ピンセットで除いた後、上層の0.2mLを測定した。測定は先行研究<sup>13)</sup>に従い、NEFAキット(和光純薬工業、大阪)で遊離脂肪酸濃度は、日立101形分光光度計(日立)を使用し測定した。

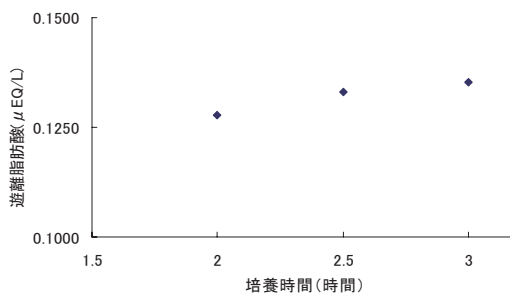


図1 培養時間の検討結果

コントロール群において培養時間の検討を行った。2時間、2.5時間、3時間において有意差は認められなかった。

表1 ラット脂肪細胞における遊離脂肪酸に対するレプチン効果

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4
	コントロール	アドレナリン添加	レプチン添加	アドレナリン+ レプチン添加
遊離脂肪酸 ( $\mu$ Eq/L)	0.091 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.281 $\pm$ 0.019 <sup>ab</sup>	0.055 $\pm$ 0.004	0.128 $\pm$ 0.022 <sup>b</sup>

値を平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

<sup>a</sup> グループ1とグループ2との比較をした場合、有意差を認めた(p<0.05)

<sup>b</sup> グループ2とグループ4との比較をした場合、有意差を認めた(p<0.05)

### 統計的分析

分析結果は、AVOVAを用いて4グループの比較を行った。繰り返しのある分散分析で有意差があったときには、t-検定により統計処理を行った。有意水準を5%未満とした。統計ソフトはSPSSウィンドウズ版(11.1Jバージョン, SPSS (株), アメリカ, シカゴ)を用いた。

### 結果

脂肪細胞における脂肪分解は、放出されたFFA量により測定した。結果を表1に示した。グループ1では0.0091 $\pm$ 0.009  $\mu$ Eq/L, グループ2では0.281 $\pm$ 0.019  $\mu$ Eq/L, グループ3では0.055 $\pm$ 0.004  $\mu$ Eq/L, 0.128 $\pm$ 0.022  $\mu$ Eq/Lであった。グループ2におけるFFA量はグループ1より有意に高かった。グループ4のFFA量はグループ2より有意に低かった。

### 考察

我々はこの論文で、新鮮な分離ラット脂肪細胞を用い脂肪細胞分解に対するレプチンの直接的な作用について、アドレナリンによる脂肪分解反応促進作用による遊離脂肪酸上昇を抑制するか否かを検討した。その結果、レプチンは、アドレナリンにより脂肪分解が促進されたものに対しては、有意に遊離脂肪酸を低下させた。つまりレプチンはFFA放出を低下させた結論付けることができたが、ア

ドレナリンがない状態では放出効果は確認されなかった。

レプチンの細胞での脂肪分解作用については多くの報告がある。高レプチン血症の脂肪細胞での脂肪減少効果は中枢神経を介したものであるのではないこと<sup>7)</sup>, グリセロールの増加はあるが遊離脂肪酸上昇のみられない脂肪分解に参与している可能性が報告されている<sup>14)</sup>。また、白色脂肪組織でオートクライン・パラクラインによって脂肪を分解することも示されている<sup>15,16)</sup>。高レプチン血症の脂肪減少効果は血清中のFFAの上昇によるという報告もある<sup>17)</sup>。これらから脂肪分解においてレプチンの直接的影響の可能性はある。しかしレプチンによる脂肪分解のメカニズムは明らかではない。

脂肪細胞における脂肪分解にはアドレナリンのような脂肪分解促進作用がある物質を用いると、FFA放出が起きることは周知の事実である<sup>18)</sup>。本実験では、レプチンはアドレナリンによる脂肪分解によるFFA促進作用を抑制した。アドレナリン刺激によるFFA放出は、アデニルシクラーゼを活動的にし、その結果cAMP結合を増強しcAMPプロテインキナーゼと二次的リン酸化とHSL活動に依存する、その結果、蓄積された中性脂肪のモノアシルグリセロールとFFAの加水分解になると考えられている<sup>19)</sup>。一方、HSL様態小滴におけるホスファチジルコリンの存在に

より脂肪細胞中の脂肪分解メカニズムであるとの報告もある<sup>20)</sup>。リン脂質がアデニルシクラーゼ活性に関与して起こるといふ報告もある<sup>21)</sup>。さらにアドレナリンによる分解促進作用は、脂肪分解作用において重要なイベントはHSLの触媒活動で増加するのではなく、脂肪細胞の脂肪滴の暴露で器質へのHSLトランスロケーションであると報告されている<sup>22)</sup>。

レプチンの脂肪分解作用は、酸化による分解であると報告されている<sup>23)</sup>。インビトロでは、レプチンは $\beta$ -アドレナリン作用受容体、アデニルシクラーゼ、プロテインキナーゼAパスウェイ変換シグナルに作用しないため、カテコールアミンによる脂肪分解には影響を与えないと報告している<sup>24)</sup>。

今回の実験結果では、レプチンはアドレナリンによるFFA促進作用を抑制した。レプチンの細胞での直接的脂肪分解はアデニルシクラーゼ、ホスファジエステラーゼなどの酵素刺激反応ではなく、脂肪細胞の脂肪滴の暴露で基質へのHSLトランスロケーションによる脂肪分解作用を抑制している可能性が示唆された。

本実験で我々は、レプチンは中枢神経を介することなく、インビトロ培養脂肪組織での脂肪分解において直接的な作用の可能性があると結論付けた。

#### 参考文献

- 1) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 327: 425-432, 1994
- 2) Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-252, 1996
- 3) Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effect of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-542, 1995
- 4) Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1: 1155-1161, 1995
- 5) Considine RV, Shinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N Engl J Med*; 334: 292-295, 1996
- 6) Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y. Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269: 546-549, 1995
- 7) Wang MY, Lee Y, Unger RH. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem* 274: 17541-17544, 1999
- 8) Collins S, Kuhn CM, Petro AE, Swick AG, Chrnyk BA, Surwit WI. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 380: 677-677, 1996
- 9) Haynes EG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 100: 270-278, 1997
- 10) Mick G, Vanderbloomer T, Fu CL, McCormick K. Leptin does not affect adipocyte glucose metabolism: studies in fresh and cultured adipocytes. *Metabolism* 47: 1360-1365. 1998
- 11) Peeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
- 12) Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. *J Boil Chem* 239: 375-380. 1964
- 13) Duncombe W.G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in

- plasma. *Clin.Chim. Acta* 9: 122-125,1964
- 14) Wang ZW, Zhou YT, Lee Y, Higa M, Kalra SP, Unger RH. Hyperleptinemia depletes fat from denervated fat tissue. *Biochemi Biophys Res Commun* 14 : 653-657, 1999
  - 15) Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* 100 : 2858-2864, 1997
  - 16) Frubeck G, Aguado M, Gomez-Ambrosi J, Martinez JA. Lipolytic effects of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochemi Biophys Res Commun* 250: 99-102, 1998
  - 17) Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acsd Sci USA* 94: 4637-4641, 1997
  - 18) Okuda H, Fujii S. Preparation of adrenaline-sensitive lipid micelles from rat epididymal adipose tissue. *Biochemi Biophys Res Commun* 51: 680-685, 1973
  - 19) Belfrage P, Fredrikson G, Olsson H, Stralfors P. Molecular mechanisms for hormonal control of adipose tissue lipolysis. *Int J Obes* 9: 129-135, 1985
  - 20) Okuda H, Morimoto C, Ysujita T. Role of endogenous lipid droplets in lipolysis in rat adipocytes. *J Lipid Res* 35: 36-44, 1994
  - 21) Okuda H, Saito Y, Matsuoka N, Takeda E, Kumagai A. Role of Phospholipid in adrenaline-induced lipolysis and cyclic AMP production. *J Biochem* 83 : 887-892, 1978
  - 22) Morimoto C, Kameda K, Tsujita T, Okuda H . Relationship between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J lipid Res* 42: 120-127, 2001
  - 23) Muoiu DM, Dohm GL, Fiedorek FT Jr, Tapscott EB, Coleman RA, Dohn GL. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46 1360-1363, 1997
  - 24) Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J. Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *Cell Sign* 13: 827-833, 2001