

バナジウムはラット脂肪細胞からのレプチン分泌を促進する

河内 浩行, 美馬 康史, 松井 徹, 河田 照雄, 矢野 秀雄
(京都大学大学院農学研究科*)

Vanadium stimulates leptin secretion from rat adipocytes

Hiroyuki Kawachi, Yasushi Mima, Tohru Matsui, Teruo Kawada and Hideo Yano
Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Leptin is a peptide hormone that is secreted primarily from adipocytes, and acts as a key signaling factor for regulating appetite and energy balance. Several studies have demonstrated that insulin increases leptin protein secretion probably through the change of glucose metabolism. Vanadium has been reported to possess insulin-mimetic activity and stimulate glucose uptake on various types of cells. The purpose of this study was to examine the effect of vanadium on leptin secretion from rat adipocytes. Insulin and vanadyl sulfate stimulated leptin secretion from rat adipocytes after 2 h of treatment. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, LY294002 decreased both insulin- and vanadyl sulfate-stimulated leptin secretion. On the other hands, mRNA levels for leptin were decreased by vanadyl sulfate, though insulin treatment did not significantly affect leptin mRNA synthesis. These findings suggest that vanadium decreases leptin gene synthesis, but stimulates leptin protein secretion through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway.

序

ラットにおいて給餌後にレプチン分泌は亢進することが知られている¹⁾。また多くの動物において給餌後血中インスリン濃度は増加することならびにインスリンは*in vitro*でレプチン分泌を促進することが報告されており、この給餌後のレプチン分泌亢進はインスリンにより生じると考えられる。しかし、インスリンのレプチン分泌促進作用の詳細は明らかになっていない。

バナジウムはインスリン様作用を有することが多く報告されている²⁾。さまざまなバナジウム化合物はインスリン依存性糖尿病やインスリン非依存性糖尿病の動物モデルや、一部の肥満者におけるグルコース代謝の異常等を改善する³⁾。このことからバナジウム化合物は抗糖尿病の作用があると考えられる。

インスリンはレプチン分泌を促進することから、インスリン様作用を示すバナジウムも同様にレプチン分泌を促進する可能性が考えられる。そこで本実験ではラットの培養脂肪細胞を用いて、バナジウムのレプチン分泌に及ぼす影響を検討した。

レプチン分泌は遺伝子発現に呼応して増減するものと考えられていた。実際、インスリン添加24時間⁴⁾または48時間⁵⁾培養した脂肪細胞において、レプチン遺伝子発現ならびにレプチン分泌が促進することが報告されている。しかし短時間のインスリン処理ではレプチンmRNA発現には影響を及ぼさずにその分泌のみを促進し⁶⁾、必ずしもそれらは呼応しないことが最近の研究から分かってきた。そこで今回バナジウムのレプチン遺伝子発現に対する影響についても併せて検討した。

*所在地：京都市左京区北白川追分町（〒606-8502）

実験方法

供試細胞として雄のSprague-Dawleyラットの副睪丸組織から単離した脂肪細胞を用いた。培地はDMEM : HamF12 = 1 : 1を用い、そこにインスリンを0.001から1 μ M、硫酸バナジルを0.1から2mMの範囲で添加し37℃5%CO₂環境下で2時間培養した。培養終了後脂肪細胞の培地を回収、培地中レプチン濃度をRat Leptin ELISAキット（免疫生物研究所）により測定した。また回収した脂肪細胞から全RNAを抽出し、インスリンと硫酸バナジルがレプチン遺伝子発現に及ぼす影響をRT-PCRにより検討した。

結果と考察

インスリン添加によるレプチン分泌促進はこれまでに多く報告されているが、本試験においても濃度依存的にレプチン分泌は促進された (Fig. 1)。特に0.1 μ M, 1 μ Mではコントロールに対して有意に増加した。

一方、硫酸バナジル添加においてもレプチン分泌は増加した (Fig. 2)。特に0.5, 1.0, 2.0mMの硫酸バナジルはレプチンを有意に分泌促進した。高濃度の硫酸バナジルは細胞毒性を有するが、Swiss3T3細胞株に硫酸バナジルを5mM添

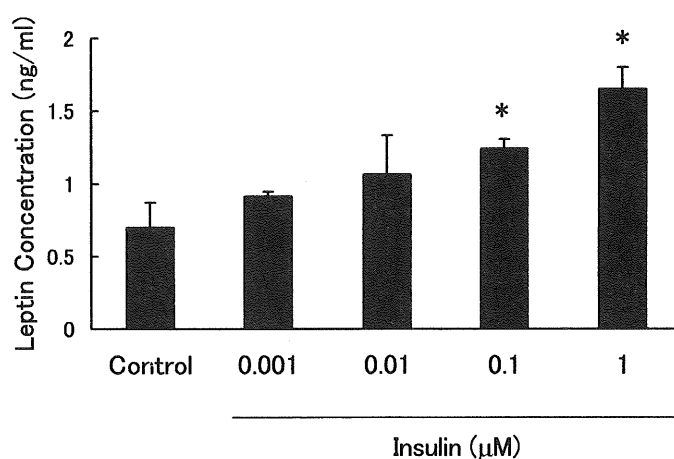


Fig. 1 Effect of insulin on leptin secretion from rat adipocytes.

Values are means $\pm$ S.D. for triplicated cultures. Values with asterisk are significantly different from the control. : $P < 0.05$.

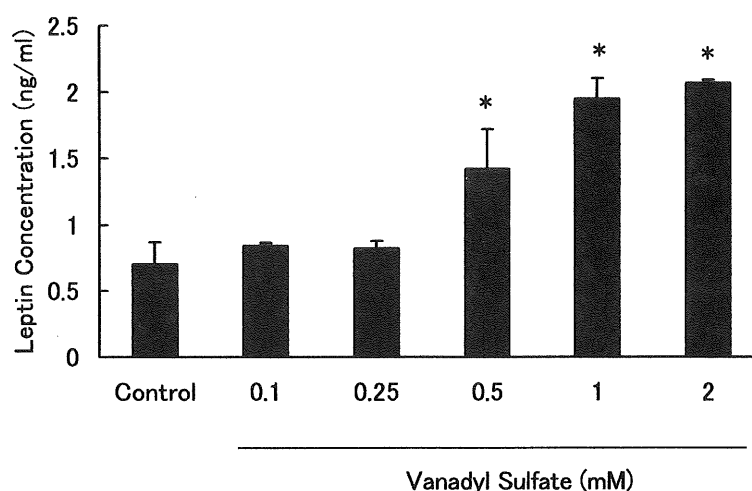


Fig. 2 Effect of vanadyl sulfate on leptin secretion from rat adipocytes.

Values are means $\pm$ S.D. for triplicated cultures. Values with asterisk are significantly different from the control. : $P < 0.05$.

加しても細胞毒性は見られなかったことが報告されており⁷⁾、本実験での濃度の硫酸バナジルによるレプチン分泌促進作用はその細胞毒性とは無関係であると考えられる。

さらにインスリンと硫酸バナジルの相互作用について検討したところ、1 μ Mのインスリンも0.5mMの硫酸バナジルもFig. 1, 2の結果と同様にレプチン分泌を有意に促進した (Fig. 3)。しかしその交互作用は有意ではなく、これらの効果は相加的であることが分かった。この結果から、硫酸バナジルはインスリン作用と協調してレプチン分泌を促進していることが示唆された。

インスリンの生理作用にはグルコースの取り込みやグリコーゲンの合成などの代謝作用と細胞増殖作用がある。このうちの代謝に関する経路に対し非常に重要な働きを示すホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3-K) の阻害剤であるLY294002がインスリン、硫酸バナジルによるレプチン分泌促進作用にどのように影響するか検討した (Fig. 4)。インスリン、硫酸バナジルを加えていない無添加区にLY294002のみを添加すると、レプチン分泌は有意に抑制された。またLY294002はインスリンのレプチン分泌促進作用を有意に抑制した。この結果からインスリンはPI3-K経路を介してレプチン分泌を促進することが明らかとなった。

インスリンはPI3-K活性化を介して脂肪細胞へのグルコース取り込みを促進することが報告されている⁸⁾。インスリンのレプチン分泌促進作用には、脂肪細胞におけるグルコース取り込み促進による細胞内グルコース濃度の上昇、それに続く細胞内グルコース代謝の変化が関与していることが示唆されている⁵⁾。したがって、インスリン誘導性のレプチン分泌促進をPI3-Kの阻害剤が抑制する機序としてインスリンによるグルコース取り込み促進が抑制されたことが考えられる。

さらにLY294002はバナジウムにより誘導されるレプチン分泌を著しく抑制した (Fig. 4)。バナジウムはラット脂肪細胞においてグルコース取り込みを促進することが報告されている⁹⁾。またこの作用にはPI3-Kの活性化が関与している。バナジウムにより誘導されるレプチン分泌がPI3-Kの阻害剤によって消失したことから、バナジウムもPI3-Kの活性化を介してレプチン分泌を促進すること、さらにバナジウムがPI3-Kの活性化より上流のインスリン伝達経路に作用していることが示唆された。

以上の結果からインスリンおよび硫酸バナジルはレプチン分泌を促進することが分かった。そこでそれらがレプチン遺伝子の発現に及ぼす影響についても検討した。各々のサンプルについてRT-PCRを行い、レプチン遺伝子および内

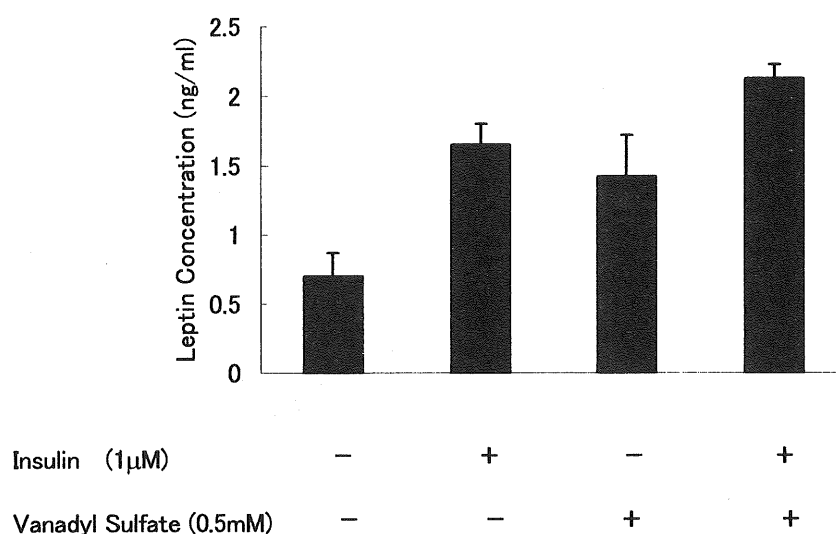


Fig. 3 Synergistic effect of insulin and vanadyl sulfate on leptin secretion from rat adipocytes. Values are means $\pm$ S.D. for duplicated cultures (simultaneous addition of insulin and vanadyl sulfate), or triplicated cultures (others). Effect of insulin : $P=0.009$; Effect of vanadyl sulfate : $P=0.005$; Interaction : $P>0.05$.

部標準として用いる β -アクチン遺伝子が指数関数的に増幅されるPCRサイクル数を決定した。そのサイクルでのPCRの結果をFig. 5に示した。これによると無添加区とインスリン添加区でレプチンmRNAの発現に違いは見られなかった。このことから2時間のインスリン処理はレプチン遺伝子の発現に影響を及ぼさず、その分泌のみを促進することが明らかとなった。これらはBradleyらの結果⁶⁾と一致する。これに対し硫酸バナジルの添加は無添加の時と比較しレプチン遺伝子の発現が減少していることが分かった。このことから硫酸バナジルはレプチン分泌については促進するが、その遺伝子発現は抑制することが分かった。今後は、2時間ではなくもっと長期的な時間軸で見たバナジウム製のレプチン分泌に対する影響を検討していく必要があると考えられる。

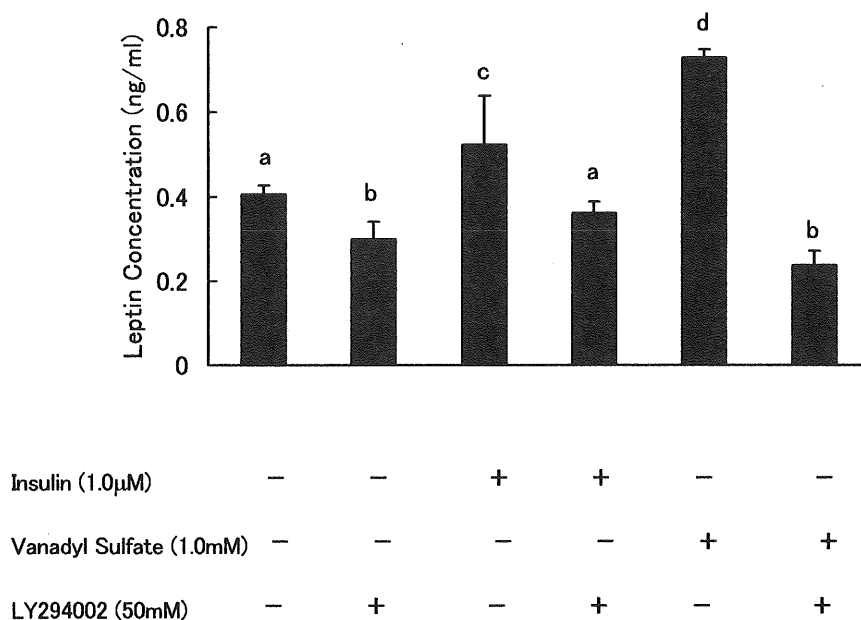


Fig. 4 Effect of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, LY294002 on insulin- or vanadyl sulfate-stimulated leptin secretion from rat adipocytes. Values are means $\pm$ S.D. for triplicated cultures. Values with different letters are significantly different. : $P < 0.05$.

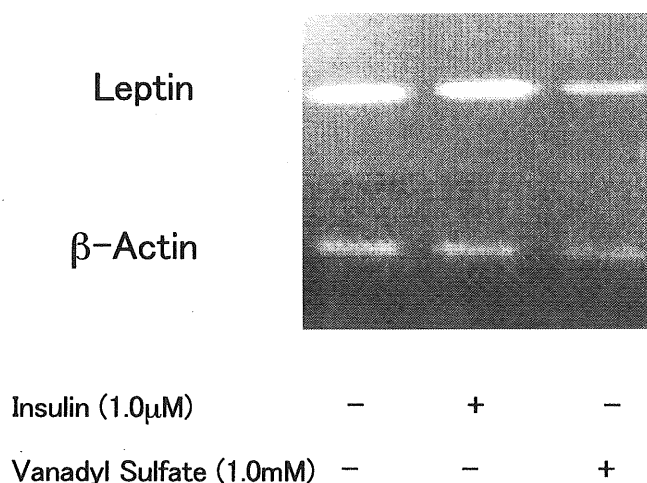


Fig. 5 Semi-quantitative RT-PCR analysis of leptin and β -actin mRNA expression of rat adipocytes.

参考文献

- 1) Saladin R., P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels, and J. Auwerx (1995) *Nature* 377 : 527.
- 2) Fantus I. G. and E. Tsiani (1998) *Mol. Cell. Biochem.* 182 : 109.
- 3) Srivastava A. K. (2000) *Mol. Cell. Biochem.* 206 : 177.
- 4) Yoshida T, M. Hayashi, T. Monkawa, and T. Saruta (1996) *Eur. J. Endocrinol.* 135 : 619.
- 5) Mueller W. M., F. M. Gregoire, K. L. Stanhope, C. V. Mobbs, T. M. Mizuno, C. H. Warden, J. S. Stern and P. J. Havel (1998) *Endocrinology* 139 : 551.
- 6) Bradley R. L. and B. Cheatham (1999) *Diabetes* 48 : 272.
- 7) Cortizo A. M., V. C. Salice, C. M. Vescina, and S. B. Etcheverry (1997) *Biometals* 10 : 127.
- 8) Cheatham B., C. J. Vlahos, L. Cheatham, L. Wang, J. Blenis and C. R. Kahn (1994) *Mol. Cell. Biochem.* 14 : 4902.
- 9) Dubyak G. R. and A. Kleinzeller (1980) *J. Biol. Chem.* 255 : 5306.