

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07954

研究課題名(和文)糖鎖による視床下部-下垂体軸の新規調節機構の解明

研究課題名(英文)The novel roles of O-glycans in hypothalamus-pituitary axis

研究代表者

中山 喜明(Nakayama, Yoshiaki)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40512455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：成長ホルモンやプロラクチンなどの下垂体前葉ホルモンの分泌は、視床下部からの内分泌シグナルにより厳密に制御される。この視床下部による下垂体制御機構の解明は、下垂体前葉ホルモンの分泌異常により発症する難治性疾患の成因解明や治療法の開発へと繋がるため、医学薬学的に重要な課題である。本研究ではGalnt17変異体マウスなどの解析を通じて、Galnt17が中脳腹側から線条体に投射するドーパミン神経の機能維持に重要な役割を果たしていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The secretion of the anterior pituitary hormone such as growth hormone and prolactin is strictly controlled by the endocrine signal from the hypothalamus. The elucidation of the pituitary control mechanisms is an important medical interest because it leads to the elucidation of the cause of intractable diseases caused by abnormal secretion of the pituitary anterior lobe hormone and the development of therapeutic methods. In this study, we found that Galnt17 plays an important role in maintaining the function of dopamine nerve projecting from the midbrain ventral to the striatum through analysis of Galnt17 mutant mice and others.

研究分野：分子生物学

キーワード：プロラクチン ドーパミン 成長ホルモン 下垂体

1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉ホルモンのうち身体の成長を司る成長ホルモンと、乳汁産生や養育行動を司るプロラクチンとは、単一の遺伝子から機能が分化した相同遺伝子であり、それぞれの分泌細胞は共通の幹細胞から分化する。これらのホルモンの合成や分泌は視床下部や末梢組織からの多様な因子により制御を受けるが、その中でも視床下部弓状核の神経細胞から正中隆起の血管網に放出される視床下部ホルモンは中心的な役割を果たす(図1)。すなわち、平常時では成長ホルモン放出ホルモンが成長ホルモン分泌を促進的に制御し、一方で、ドーパミンはプロラクチン分泌を抑制的に制御する。これらの視床下部ホルモンの制御の下に、循環血中に放出された下垂体前葉ホルモンは標的の末梢組織に作用するのに加え、上位器官である視床下部にも作用し、視床下部ホルモンの合成や分泌を調節することで、それぞれが負のフィードバックループを形成する。このような制御機構の監視のもと、循環血中の下垂体前葉ホルモンは適切な濃度を維持しているが、脳・下垂体領域の腫瘍や炎症性疾患などの器質的疾患、一部の遺伝性異常、薬物の副作用などにより、制御機構の一部に破綻が生じると、下垂体前葉ホルモンの分泌異常を来し、低伸長症や末端肥大症、無月経や不妊症を発症する。

申請者らのグループではこれまでに成体脳の実験室で視床下部、小脳の神経細胞に特異的に発現する新規糖転移酵素様遺伝子 Galnt17 を単離・同定し、一部の腫瘍細胞では Galnt17 がマクロピノサイトーシスを制御することを明らかにしてきた(Nakamura, et al., Biol. Pharm. Bull. 2005, Nakayama, et al., J. Biol. Chem. 2012)。この遺伝子がコードするタンパクは、タンパク質中のセリンやスレオニン残基に N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を転移する GalNAc 転移酵素(GalNAc-T)と非常に高い相同性を有することから、ヒトで 20 種類から成る GalNAc-T ファミリーに分類される。しかしながら、Galnt17 は Galnt8, 9, 18 と共に特徴的なアミノ酸配列を持つサブファミリーを形成しており、他のアイソザイムが示すような典型的な GalNAc 転移活性を殆ど有しないことから、独自の酵素活性や基質特異性を有している可能性が推測される。一方でいくつかのゲノミクス解析の結果から、Galnt17 が高次脳機能を調節している可能性が示唆される(Merla, et al., Hum. Genet. 2002, vonHoldt, et al., Nature, 2010)が、これまで脳神経系における Galnt17 の機能についての知見は得られていない。

そこで申請者らは脳神経系における Galnt17 の機能を解明するため Galnt17 遺伝子欠損(KO)マウスを作製したところ、この変異体マウスは、雄雌問わず軽度の成長不全を示し、さらに雌マウスでは分娩異常により繁殖能力を殆ど有していなかった。さらにこれ

らの表現型に関する血中ホルモンの測定を行い、Galnt17KO マウスでは下垂体前葉ホルモンである成長ホルモンの分泌低下とプロラクチンの分泌亢進が起きていること、このうちプロラクチンの分泌亢進については、視床下部弓状核からのドーパミンシグナルの低下に起因していることを現在までに見出している。また予備的な実験ではあるが、Galnt17 を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスは、野生型マウスと比較して体重の増加がみられ、雌マウスの育児行動に異常がみられるといった知見も得ている。Galnt17 は下垂体には殆ど発現せず、下垂体前葉を調節する視床下部弓状核に強く発現することから、Galnt17 が視床下部弓状核からの下垂体前葉ホルモン分泌制御機構に関与している可能性が予想された。

2. 研究の目的

上述した研究背景をふまえ、本申請研究では Galnt17KO マウスと Tg マウスの解析を中心に行い、Galnt17 による視床下部-下垂体軸の制御機構とその生理的役割を解明した。これまでの解析の結果から視床下部弓状核に発現する Galnt17 が視床下部-下垂体軸において機能している可能性が考えられるが、これは(i)視床下部から下垂体へのシグナル伝達に関与する可能性、(ii)ネガティブフィードバック制御のための視床下部での下垂体ホルモンの受容に関与する可能性、(iii)ネガティブフィードバックループから外れた神経回路や性ホルモンによる弓状核の制御に関わる可能性などに大別される。これらの可能性について検討することにより多様な神経細胞が局在する視床下部弓状核における Galnt17 によるホルモン分泌制御の分子メカニズムを明らかにする。また、成長段階や妊娠・授乳、拘束ストレス、個別飼育ストレスにより、成長ホルモンとプロラクチンとの分泌バランスが変動することが報告されていることから、これら各種条件下における Galnt17 の生理的役割を明らかにする。さらには Galnt17 タンパクが生体内で作用する標的分子を同定し、培養細胞や組換え精製タンパクを用いた解析手法により Galnt17 の生化学的性質を明らかにする。

3. 研究の方法

Galnt17 による下垂体前葉ホルモンの制御機構を解明するため、各種ホルモンの測定や、身体成長、代謝、繁殖能について生化学検査や行動解析により野生型マウスと Galnt17KO, Tg マウスとを比較検討した。さらに、視床下部弓状核における Galnt17 発現細胞の神経細胞種の同定や、ドーパミンシグナルを中心とした視床下部-下垂体軸の制御機構における Galnt17 の作用点の同定を行った。また、Galnt17 の生理的役割を明らかにするため、各種ストレス刺激時や妊娠時における視床下部-下垂体軸ホルモンや Galnt17 の発現変

化を測定し、各種刺激に対する Galnt17KO, Tg マウスの反応性を解析した。さらに、Galnt17 タンパクの生化学的性質を明らかにするため、それまでの解析の中で得られた知見とプロテオミクス解析により Galnt17 タンパクが作用する標的分子を探索し、候補分子に対して培養細胞や組換えタンパクを用いて活性測定を行った。

4. 研究成果

Galnt17 によるエネルギー代謝能への影響を評価するため、Galnt17 遺伝子欠損マウスと全身で Galnt17 を過剰に発現する Galnt17 過剰発現マウスに対し、脂肪組織や肝臓、筋組織の組織重量測定や骨長測定などの身体測定、血糖値や血中ホルモンの測定などの生化学検査、摂食ケージを用いた概日リズムと摂食量の測定を行った。その結果、Galnt17 遺伝子欠損マウスでは同腹の野生型マウスと比較して、血中プロラクチン濃度の上昇や血中の IGF-1 の低下を伴う成長の遅延が確認されたのに対し、Galnt17 過剰発現マウスでは、同腹の野生型マウスと比較して、いずれの検査項目についても大きな差は認められなかった。また、繁殖能についても上記のマウスを用いて解析を行ったところ、Galnt17 雌マウスでは、出産後 1 週までに仔マウスの育児放棄などの異常がみられたのに対し、Galnt17 過剰発現マウスでは野生型マウスと同等の生殖能を有していた。これらの結果は、Galnt17 による視床下部-下垂体軸の調節機能は正常な下垂体機能に必須であるものの、補助的な役割を果たしている可能性が示唆された。Galnt17 が視床下部弓状核からのドーパミンシグナルの低下に起因していることを明らかにしていたことから、Galnt17 遺伝子欠損マウスでは視床下部や線条体におけるドーパミン含量が減少していることを確認し、Galnt17 が視床下部のみならず、中脳腹側から線条体に投射するドーパミン神経の機能維持に重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、Galnt17 によるドーパミン神経調節機構を解析するため、視床下部における Galnt17 発現細胞の同定を行ったところ、視床下部腹内側核の神経細胞や第三脳室の 1 伸長上皮細胞に発現していることを明らかにした。これらの結果から、Galnt17 が視床下部において脳脊髄液中の IGF-1 の取り込みなどに関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

Yuan X., Tsujimoto K., Hashimoto K., Kawahori K., Hanzawa N., Hamaguchi M., Seki T., Nawa M., Ehara T., Kitamura Y., Hatada I., Konishi M., Itoh N., Nakagawa

Y., Shimano H., Takai-Igarashi T., Kamei Y., Ogawa Y.. (2018) Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. *Nat Commun.* 12;9(1):636. doi: 10.1038/s41467-018-03038-w.

Kuroda M., Muramatsu R., Maedera N., Koyama Y., Hamaguchi M., Fujimura H., Yoshida M., Konishi M., Itoh N, Mochizuki H, Yamashita T. (2017) Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. *J Clin Invest.* 127(9):3496-3509. doi: 10.1172/JCI94337.

Yamaki K., Ikeda K., Ueda K., Habu Y., Nakayama Y., Takeda N., Moriwaki K., Wada A., Koyama J., Kodama N., Kitagawa S. (2017) Enhancing Study Motivation and Efficacy among First-Year Students Using Minute Papers in the Interdisciplinary Subject of Yakugaku Nyumon. *Yakugaku Zasshi.* 137(10):1285-1299. doi: 10.1248/yakushi.17-00035.

Kasubuchi M., Watanabe K., Hirano K., Inoue D., Li X., Terasawa K., Konishi M., Itoh N., and Kimura I. (2017) Membrane progesterone receptor beta (mPR /Paqr8) promotes progesterone-dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling. *Sci Rep.* 12;7(1):5168. doi: 10.1038/s41598-017-05423-9.

Miyake A., Mekata Y., Fujibayashi H., Nakanishi K., Konishi M., Itoh N. (2017) Brorin is required for neurogenesis, gliogenesis, and commissural axon guidance in the zebrafish forebrain. *PLoS One.* 12(4):e0176036. doi: 10.1371/journal.pone.0176036.

Nakayama Y., Masuda Y., Ohta H., Tanaka T., Washida M., Nabeshima Y.I., Miyake A., Itoh N., Konishi M. (2017) Fgf21 regulates T-cell development in the neonatal and juvenile thymus. *Sci. Rep.* 23:7(1):330. doi: 10.1038/s41598-017-00349-8.

Masuda Y., Nakayama Y., Tanaka A., Naito K., Konishi M. (2017) Antitumor activity of orally administered maitake -glucan by stimulating antitumor immune response in murine tumor. *PLoS One.* 12(3):e0173621. doi: 10.1371/journal.pone.0173621.

Itoh N., Nakayama Y., Konishi M. (2016) Roles of FGFs As Paracrine or Endocrine

Signals in Liver Development, Health, and Disease Front. Cell Dev. Biol. 4:30. doi: 10.3389/fcell.2016.00030.

Konishi M., Nakayama Y., Masuda Y. (2016) Secreted factor, FGF21, regulates diverse biological processes. Seikagaku. 88(1):86-93.

Yamaki K., Ueda M., Ueda K., Emoto N., Mizutani N., Ikeda K., Yagi K., Tanaka M., Habu Y., Nakayama Y., Takeda N., Moriwaki K., Kitagawa S. (2016) Interdisciplinary Subject "YakugakuNyumon" for First-Year Students Constructed with Lectures and Problem-Based Learning. Yakugaku Zasshi. 136(7):1051-64. doi: 10.1248/yakushi.15-00255.

Ozaki Y., Saito K., Nakazawa K., Konishi M., Itoh N., Hakuno F., Takahashi S., Kato H., Takenaka A. (2015) Rapid increase of fibroblast growth factor 21 under protein malnutrition and its impact on growth and lipid metabolism. Br J Nutr. 10;116:101-4. doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.028.

Masuda Y., Nawa D., Nakayama Y., Konishi M., Nanba H. (2015) Soluble -glucan from Grifola frondosa induces tumor regression in synergy with TLR9 agonist via dendritic cell-mediated immunity. J Leukoc Biol. 98(6):1015-25. doi: 10.1189/jlb.1A0814-415RR.

Ohta H., Kimura I., Konishi M., Itoh N. (2015) Neudesin as a unique secreted protein with multi-functional roles in neural functions, energy metabolism, and tumorigenesis. Front Mol Biosci. 19;2:24. doi: 10.3389/fmolb.2015.00024.

Kato S., Masuda Y., Konishi M., Oikawa T. (2015) Enantioselective analysis of D- and L-amino acids from mouse macrophages using high performance liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal. 116:101-4. doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.028.

Ohta H., Konishi M., Kobayashi Y., Kashio A., Mochiyama T., Matsumura S., Inoue K., Fushiki T., Nakao K., Kimura I., Itoh N. (2015) Deletion of the Neurotrophic Factor neudesin Prevents Diet-induced Obesity by Increased Sympathetic Activity. Sci Rep. 5:10049. doi: 10.1038/srep10049.

Masuda Y., Ohta Y., Morita Y., Nakayama Y., Miyake A., Itoh N., Konishi M. (2015) Expression of Fgf23 in activated dendritic cells and macrophages in response to immunological stimuli in mice. Biol Pharm Bull. 38(5):687-93

Kim S.H., Kim K.H., Kim H.K., Kim M.J., Back S.H., Konishi M., Itoh N., Lee M.S. (2015) Fibroblast growth factor 21 participates in adaptation to endoplasmic reticulum stress and attenuates obesity-induced hepatic metabolic stress. Diabetologia 58(4):809-18

Itoh N., Ohta H., Konishi M. (2015) Endocrine FGFs: Evolution, Physiology, Pathophysiology, and Pharmacotherapy. Front Endocrinol. 6:154. doi: 10.3389/fendo.2015.00154.

〔学会発表〕(計5件)

中山 喜明, 土居 晃平, 榎林 桃子, 岩崎 駿, 迎 武紘, 増田 有紀, 伊藤 信行, 小西 守周 “分泌型ヘムタンパク質 Neudesin による赤血球恒常性維持機構の解析” 日本薬学会第 138 回年会, 金沢, 2018.3.25-28 (ポスター発表)

中山 喜明, 増田 有紀, 田中 智洋, 鷺田 美和, 鍋島 陽一, 伊藤 信行, 小西 守周 “FGF21 は胸腺細胞の成熟を促進する” 第 6 3 回日本生化学会 近畿支部例会, 神戸, 2016.5.21 (口頭発表)

藤岡 広大, 松家 京介, 伊藤 信行, 中山 喜明, 小西 守周 “不飽和脂肪酸負荷より誘導される Fgf21 の脂質代謝調節機構の解析” 第 6 3 回日本生化学会 近畿支部例会, 神戸, 2016.5.21 (ポスター発表)

増田 有紀, 中山 喜明, 伊藤 信行, 小西 守周 “Physiological roles of Fgf21 in the thymus” BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸, 2015.12.1-4 (ポスター発表)

Yoshiaki Nakayama, Keiko Kato, Naosuke Nakamura, Morichika Konishi, Akira Kurosaka “Galnt17/Wbscr17 knockout mice

shows decreased growth and hyperprolactinemia” Glyco23, スプリト(ク
ロアチア), 2015.9.15-20 (ポスター発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 喜明 (NAKAYAMA, Yoshiaki)
神戸薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：40512455

(2) 研究分担者

小西 守周 (KONISHI, Morichika)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00322165

黒坂 光 (KUROSAKA, Akira)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：90186536

加藤 啓子 (KATO, Keiko)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：90252684