

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19533

研究課題名(和文) 視床下部 Agouti 関連蛋白のクッシング症候群における役割の解明

研究課題名(英文) The role of hypothalamic Agouti-related protein in Cushing syndrome

研究代表者

中山 修一 (Nakayama, Shuichi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：20457394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、クッシング症候群における肥満の発現に視床下部Agouti関連蛋白(AgRP)が必要か否かを解明すること、および視床下部AgRPの新規作用機構を明らかにすることである。AgRP欠損マウスに対するグルココルチコイド持続投与により、野生型マウスよりも高度の肥満が誘導された。一方、クッシング症候群患者に対する手術後は、コルチゾール低下とともに血中AgRP濃度の有意な低下が見られた。これらの結果より、クッシング症候群において血中AgRP上昇が見られるが、視床下部AgRPはクッシング症候群における肥満形成に必須ではないと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research are as follows: (1) to clarify the role of hypothalamic Agouti-related protein (AgRP) on obesity in Cushing syndrome, and (2) to elucidate unknown mechanisms of hypothalamic AgRP.

We examined the effect of continuous glucocorticoid administration on AgRP deficient mice (AgRP-KO), and observed that high degree obesity in AgRP-KO compared with wild-type mice. On the other hand, in Cushing syndrome patients, both cortisol and AgRP were significantly decreased after operation.

These results suggest that circulating AgRP is elevated in Cushing syndrome, but hypothalamic AgRP could not be necessary to develop obesity in Cushing syndrome.

研究分野：内分泌学

キーワード：AgRP クッシング症候群

1. 研究開始当初の背景

視床下部-下垂体-副腎系は視床下部 Corticotropin-releasing hormone (CRH) を最上位として制御されており、この系の最終産物である副腎糖質コルチコイドが過剰になると、クッシング症候群を呈する。クッシング症候群では過食や内臓脂肪型肥満が認められるが、その分子機構は明らかにされていない。糖質コルチコイド過剰状態では、食欲調節分子である Neuropeptide Y (NPY)、AgRP、Proopiomelanocortin (POMC)、AMP-activated protein kinase (AMPK) などの視床下部発現レベルの変化が見られ、これらの分子が糖質コルチコイド過剰による過食・肥満に関与する可能性が指摘されている (Makimura *et al.* Diabetes 2000; Christ-Crain *et al.* FASEB J 2008)。しかしながら、AgRP を含めて、これらの分子を内因性に欠損 (または減少) させた条件での検討は実施されていないため、糖質コルチコイド惹起性の過食・肥満への機能的な関与は不明である。

2. 研究の目的

申請者はクッシング症候群 (糖質コルチコイドの過剰状態) における過食・肥満形成機序につき研究しており、その分子機序として視床下部食欲促進ペプチドである Agouti 関連蛋白 (AgRP) を介した中枢神経経路の役割が重要との仮説を立てるに至った。本研究の目的は、クッシング症候群における過食・肥満の発現に視床下部 AgRP が必要か否かについて解明すること、および視床下部 AgRP による食欲促進作用の下流にどのような分子機構が関与するのかを明らかにすることである。これらの基礎的研究を通して、単純性肥満の病態解明・新規治療法開発に発展させることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) グルココルチコイドによる AgRP 遺伝子発現調節

BE(2)C 細胞を用いて、デキサメサゾン (DEX) の AgRP 遺伝子転写活性への効果をレポーターアッセイにて検討した。また AgRP 遺伝子の deletion mutant を作成して同様に DEX による効果を検討した。さらに GC 受容体 (GR) の AgRP 遺伝子プロモーター領域への結合につき Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) にて検討した。

(2) AgRP 欠損マウスに対するグルココルチコイド持続投与の検討

野生型 (WT) または AgRP 欠損マウス (AgRP-KO) に対してコルチコステロンまたはプラセボペレットを皮下に留置して、

摂食量・体重推移を観察、また間接熱量計を用いて基礎代謝率を評価する。各部位の脂肪重量および血中グルコース・インスリン・コルチコステロン濃度を測定する。また視床下部における摂食関連ペプチド発現量 (NPY, POMC, AgRP:リアルタイムPCR) および AMP 活性化プロテインキナーゼ経路 (p-AMPK/AMPK, p-ACC/ACC; ウェスタンブロット) につき解析する。

(3) クッシング症候群患者の手術前後における血中 AgRP 濃度の解析

クッシング症候群患者において過食・肥満の存在とともに AgRP が増加しているか否かについて臨床研究により検討する。高知大学医学部附属病院にて実施された副腎性クッシング症候群の手術前後 (術前、手術 1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後) において、食欲 (Visual analog scale)、体重、体脂肪率 (インピーダンス法)、血中 ACTH・コルチゾール・AgRP 濃度、尿中コルチゾール排泄量を測定する。対照群として非機能性副腎腺腫の手術前後にも同様の検討を実施する。

4. 研究成果

(1) グルココルチコイドによる AgRP 遺伝子発現調節

BE(2)C 細胞を用いた検討において、AgRP 転写活性はデキサメサゾンにより GC 受容体 (GR) 依存性に誘導された。この効果は GRE 様配列の除去により減弱した (下図)。

EMSA により GR の AgRP 遺伝子転写調節領域 (GRE 様配列) への結合が確認された (下図)。

これらの結果より、グルココルチコイドは直接 AgRP 遺伝子を正に発現調節していると考えられた。

(2) AgRP 欠損マウスに対する糖質コルチコイド持続投与の検討

8 週齢雄性の WT (n=20) および AgRP-KO (n=20) を用いて検討を行った。ペレット留置前の WT および AgRP-KO の体重は同等であった。 (Body weight: WT 21.5±0.3, AgRP-KO 21.9±0.5 g)。両群を 2 群に分けて、プラセボまたはコルチコステロン (CORT) ペレットを皮下留置して、2 週間後に解析を行った。

WT に対する CORT 投与により、体重変化は見られなかったが (BW in WT: Placebo 25.2±0.7, CORT 24.9±0.6 g)、精巣周囲脂肪の増加が認められた (Epididymal fat in WT: Placebo 271±22, CORT 486±42 mg)。一方、AgRP-KO に対する CORT 投与では、体重 (BW in AgRP-KO: Placebo 25.2±0.4, CORT

29.4±0.5 g)および精巣周囲脂肪の増加が認められた (Epididymal fat in AgRP-KO : Placebo 310±20, CORT 727±63 mg)。

当初は AgRP-KO ではグルココルチコイド投与による体重増加作用の減弱が見られることを予想していたが、逆に AgRP-KO ではグルココルチコイドによる体重増加作用が増強するとの結果が得られた。AgRP-KO では摂食中枢に何らかの代償機構があり、このような結果が得られた可能性を考えて、各種視床下部神経ペプチドの変化について検査中であるが、現時点では AgRP-KO におけるグルココルチコイド感受性増強の機序は不明である。

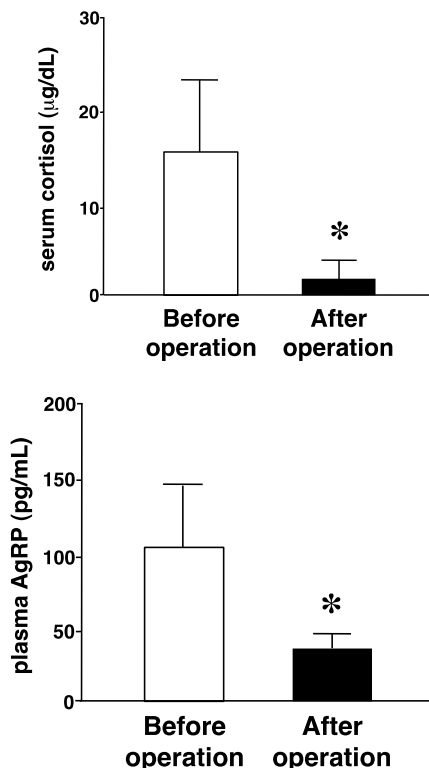
視床下部 AgRP の新規作用機序解明も含めて、今後の研究継続により明らかにしていきたいと考えている。

(3)クッシング症候群患者の手術前後における血中 AgRP 濃度の解析

当院にて手術療法を実施されたコルチゾール産生副腎腺腫 7 症例 (男性 1 例、女性 6 例、年齢 54.6±11.5 歳) について、術前および手術 3 ヶ月後に血中 AgRP 濃度を測定した。

血中コルチゾールの低下 (下図) とともに血中 AgRP の有意な減少が認められた (下図: AgRP: 術前 111.0±37.0, 術後 3 ヶ月 43.6±9.7pg/mL, P<0.05)。

今回の検討結果より、ヒトにおいてもグルココルチコイド過剰状態では血中 AgRP 濃度が上昇することが示された。クッシング症候群では血中 AgRP の上昇により、過食・肥満をきたす可能性が示された。



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 0 件)
該当なし

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 綿貫 裕、西山 充、岩崎泰正、中山修一、岡崎瑞穂、田口崇文、藤本新平、寺田典生: クッシング症候群における GDF15 分泌動態の解析. 第 91 回日本内分泌学会学術総会. 4, 26-28, 2018, 宮崎

(2) Mitsuru Nishiyama, Shuichi Nakayama, Yasumasa Iwasaki, Shinpei Fujimoto, Yoshio Terada: Glucocorticoid positively regulate Agouti-related gene. 20th European Congress of Endocrinology. 19-22 May 2018, Barcelona.

(3) 西山 充、中山修一、岡崎瑞穂、田口崇文、岩崎泰正、藤本新平、寺田典生: クッシング症候群における FGF21 分泌動態の解析. 第 90 回日本内分泌学会学術総会 4, 20-22, 2017. 京都.

(4) 西山 充、中山修一、岡崎瑞穂、次田 誠、田口崇文、岩崎泰正、藤本新平、寺田典生: グルココルチコイドによる Agouti 関連蛋白の発現調節. 第 89 回日本内分泌学会学術総会 4, 21-23, 2016. 京都.

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 修一 (NAKAYAMA, Shuichi)

高知大学 教育研究部医療学系

臨床医学部門

研究者番号：20457394

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし