

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16210

研究課題名（和文）視床下部食欲中枢特異的遺伝子Serpina3の機能の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of Serpin gene in hypothalamic satiety regulation

研究代表者

大口 英臣（Ohguchi, Hideomi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：50646825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではわれわれが独自の視床下部神経核マイクロダイセクション法とRNA-Seqによる網羅的遺伝子発現解析により同定したSerpina3分子が肥満症病態におけるレプチン抵抗性の発症に及ぼす影響とそのメカニズムを解析した。本研究によりSerpina3が弓状核のPOMCニューロン特異的に発現し、高脂肪食により発現誘導されることでニューロンにおけるレプチン応答性の障害やマイクログリアの活性化を惹起すること、個体レベルでレプチン作用障害をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満症は糖尿病や脂質異常症はもとより数多くの代謝合併症の上流因子であることから、その新たな治療戦略の提唱は社会医学的、医療経済学的にも大きなインパクトを有する。本研究の成果として、肥満症発症の原因となりうる視床下部の新たな分子メカニズムを発見することができたことから、医学・医療はもとより、わが国の科学技術文化の発展に幅広い影響を与えるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have shown that SerpinA3, a serine protease inhibitor is expressed specifically in appetite regulating neurons of the arcuate nucleus and play a role in suppressing leptin signaling through its action of neurons and through the activation of microglial cells. Manipulation of SerpinA3-mediated development of leptin resistance may be a novel strategy to combat against obesity epidemic.

研究分野：内分泌代謝内科学

キーワード：肥満症 食欲 メタボリック症候群 レプチン プロテアーゼインヒビター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国における肥満関連疾患は増加の一途をたどり、糖尿病、脂質異常症、肝疾患をはじめとする多様な生活習慣病の基盤病態としての肥満の重要性は増す一方である。われわれは、特に視床下部食欲中枢に着目したマルチオミクス解析を行い、神経核特異的遺伝子の同定を目指してきた。その中で、脳内で視床下部弓状核に局限して発現し、高脂肪食による肥満病態で発現が増加する内在性セリンプロテアーゼ阻害分子、Serpina3 の同定に成功していた。

Serpina3 分子についてはこれまで、アルツハイマー病や皮膚創傷、動脈硬化症との関連が報告されていたが、肥満や代謝疾患との関連は全く知られていなかった。また Serpina3 のセリンプロテアーゼ阻害活性の変化が、上記疾病の発症にどう関与するのかもほとんど分かっていなかった。

Serpina3 は Cathepsin G などのセリンプロテアーゼに結合し 1 : 1 の stoichiometry でプロテアーゼ活性を阻害するタンパク質である。われわれのデータでは Serpina3 は高脂肪食による肥満病態で発現が増加する一方、同じ肥満でも遺伝性肥満 *ob/ob* マウスにおいて Serpina3 の弓状核での発現は低下を示すことから、Serpina3 は食餌性肥満に特徴的な遺伝子と考えられた。

脂肪組織由来のホルモン、レプチンは食欲抑制と基礎代謝の上昇により哺乳類個体をやせさせる作用をもつ液性因子であり、主に視床下部弓状核に存在するエネルギー代謝調節ニューロンに発現するレプチン受容体を介して作用を発揮する。しかし、高脂肪食による食餌性肥満の病態では、レプチンによる食欲抑制作用が消失し、レプチンによるやせ作用が見られなくなるレプチン抵抗性の発症が知られている。われわれは、薬理的、分子遺伝学的研究により、レプチン抵抗性の実態が、視床下部弓状核レプチン受容体発現 POMC (Proopiomelanocortin) ニューロンのレプチン応答性障害にあることを突き止め (Tanaka et al. *Cell Metab*, 2007)、このニューロンの分子病態の解明と克服がレプチン抵抗性の解除と肥満症病態の改善に寄与する可能性を提唱してきた。

レプチン抵抗性を示す高脂肪食性の肥満マウスとは対照的に *ob/ob* マウスはレプチン欠損マウスであり、レプチン投与により速やかに顕著なやせ作用が観察される。同じ高度の肥満を呈していてもレプチン感受性の観点で全く逆の表現型を示す高脂肪食給餌マウスと *ob/ob* マウスで発現変化の方向性が反対向きとなる Serpina3 は、レプチン抵抗性の病態解明のために重要なカギとなる可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

今回われわれは、独自の視床下部トランスクリプトームデータから視床下部弓状核の Serpina3 と肥満が関連する可能性を見出した。本研究では、視床下部弓状核に特異的に発現し、かつ高脂肪食によっても弓状核特異的な発現増加を示す内在性セリンプロテアーゼ阻害タンパク質、Serpina3 がどの細胞種に発現しており、如何なるメカニズムにより、弓状核でのレプチン作用を障害するのか? の解明を目的とした。

本研究は以下の3つの独創的な点を有した。すなわち、1) “プロテアーゼ学” の進歩への貢献: Serpina3 という1分子に留まらず、これまで中枢神経系における役割が不明であった、プロテアーゼ・プロテアーゼ阻害タンパク質の役割に迫る。2) Neuro-inflammation の分子機序理解への貢献: 視床下部の炎症病態としての肥満症の機序の解明を通し、Neuro-inflammation の新しい側面を詳らかにする。3) ホルモン作用の新規制御機構の発見: Serpina3 はレプチンシグナルの内因性モジュレーターと捉えることができる。プロテアーゼ阻害によるホルモン作用修飾の意義と機序に迫る。

本研究により、視床下部代謝中枢の機能異常としての食餌性肥満の病態の理解が深化し、

プロテアーゼ抑制活性と Neuro-inflammation の関連性の発見、 中枢神経系のプロテアーゼ活性・阻害活性を標的とした全く新しい肥満症の診断・治療戦略の提唱に繋がることが期待される。

3．研究の方法

(1) マウス弓状核の蛍光二重染色による SerpinA3 発現細胞の同定

野生型 C57BL/6 マウスの脳切片を用いて、抗 SerpinA3 抗体と、各細胞のマーカー分子に対する抗体による二重染色を行う。第一段階として、NeuN(ニューロン)、GFAP(アストロサイト)、Iba1(ミクログリア)、CD31(血管内皮細胞)との共染色を行った。

(2) 遺伝子改変マウスの作製

A) SerpinA3 過剰発現マウスの作製

CAG(全身)プロモーターと、細胞種特異的プロモーター((1)の結果を踏まえて)の下流に SerpinA3 全長 cDNA 遺伝子を導入したコンストラクトにより作製した。トランスジェニックマウスの作製を目指した。

B) SerpinA3 ノックアウトマウスの作製

申請者は既に、CRISPR/Cas9 技術による SerpinA3 flox マウスの作製に成功している。本研究では種々のプロモーター-Cre マウスとの交配により、細胞特異的ノックアウトマウスを作製した。プロモーターとしては、Ella(全身)、Albumin(肝細胞)、Sim1(視床下部ニューロン)、GFAP(アストロサイト)、LyM(ミクログリア)、POMC(POMC ニューロン)、AgRP(AgRP ニューロン)の準備を行っていた。(1)の結果では、POMC ニューロンにおける発現がドミナントであったことから、と対照実験として について成体を作製し、SerpinA3 flox マウスと交配した。

4．研究成果

本研究では SerpinA3 発現細胞を明らかにし、SerpinA3 がエネルギー代謝恒常性において果たす生理的、病態生理的意義を解明することを目指して解析に取り組んできた。脳切片を用いた免疫染色実験での SerpinA3 発現細胞の分布解析に加えて、視床下部神経核マイクロダイセクション法を用いて採取した微細脳領域を用いた、定量質量分析解析により、SerpinA3 タンパク質の存在分布が弓状核に局限していること、高脂肪食で弓状核領域特異的に増加することを実証できた。

SerpinA3 発現細胞はニューロンマーカーと共染色性を認め、また SerpinA3 抗原は視床下部弓状核のエネルギー代謝関連ニューロンの中では POMC ニューロン特異的な エンドルフィンと共局在が認められた。

以上の結果に基づき、CRE リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスや対照群としての、AGRP ニューロン特異的な CRE リコンビナーゼ発現ノックインマウスと SerpinA3 flox マウスの交配により、これらニューロン特異的なノックアウトマウスの作出に成功した。

一方、培養細胞を用いた検討では、SerpinA3 リコンビナントタンパク質によるレプチン応答性障害と、ミクログリアの活性化に対する促進作用が認められた。さらには薬理的解析によるメカニズムの探索を実施し、SerpinA3 がセリンプロテアーゼ阻害活性とは独立したミクログリア活性化能を有する可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山博之、田中智洋、三品春佳、梶昭太、清水優希、長谷川千恵、早川暁子、堀田明沙美、安田聡史、伊藤峻介、小川健人、大口秀臣、八木崇志、今枝憲郎
2. 発表標題 酵素補充療法により筋力低下や易疲労感が劇的に改善した成人低ホスファターゼ症の一例
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤峻介、三品春佳、梶昭太、清水優希、長谷川千恵、早川暁子、堀田明沙美、安田聡史、小川健人、大口秀臣、八木崇志、小山博之、田中智洋、今枝憲郎
2. 発表標題 当科で経験した低ナトリウム血症26例の臨床的検討
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤春佳、小山博之、梶昭太、安田聡史、大口英臣、堀田明沙美、伊藤峻介、八木崇志、田中智洋
2. 発表標題 中毒作用が遷延し治療に難渋したコントロール不良2型糖尿病合併カフェイン大量服薬の一例
3. 学会等名 日本内科学会総会 医学生・研修医の日本内科学会ことはじめ
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----