

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17973

研究課題名(和文) 中枢、末梢組織におけるHPA系ネガティブフィードバック機構の分子学的機序の検討

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms of negative feedback system of HPA axis in central and peripheral tissues

研究代表者

綿貫 裕 (Watanuki, Yutaka)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60782795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体ACTH産生AtT20細胞を用いたin vitro の遺伝子導入手法と細胞生物学的手法により、視床下部-下垂体-副腎(HPA)系のネガティブフィードバック機構へ影響しうる要素とそのメカニズムを解析した。FKBP4は直接的にグルココルチコイド(GC)の抑制的フィードバックに関与し、FKBP5はGCのPOMC発現抑制作用の減弱に受容体輸送の阻害などを介して寄与すると考えられ、その機構を文献報告した(Int J Mol Sci. 2021 27;22:5724.)。GDF15はその転写活性、mRNA発現がGC投与で減弱され、GDF15のノックダウンによりGCのPOMC発現抑制作用は減弱された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FKBP4、FKBP5がGCのPOMC発現抑制作用において寄与するメカニズムを解明することができた。またその作用機序について、文献報告を行った(Int J Mol Sci. 2021 27;22:5724.)。加えてGDF15の転写活性機構の一部を確認し、下垂体由来ACTH産生AtT20細胞においてその受容体であるGFRALを同定した。これは同蛋白が下垂体ACTH産生細胞におけるフィードバック機構への重要な役割を果たすことを示唆するものと考えられた。これは生体のストレス応答や恒常性維持に重要な役割を果たしている、視床下部-下垂体-副腎(HPA)系の分子学的機構の解明の一助となる。

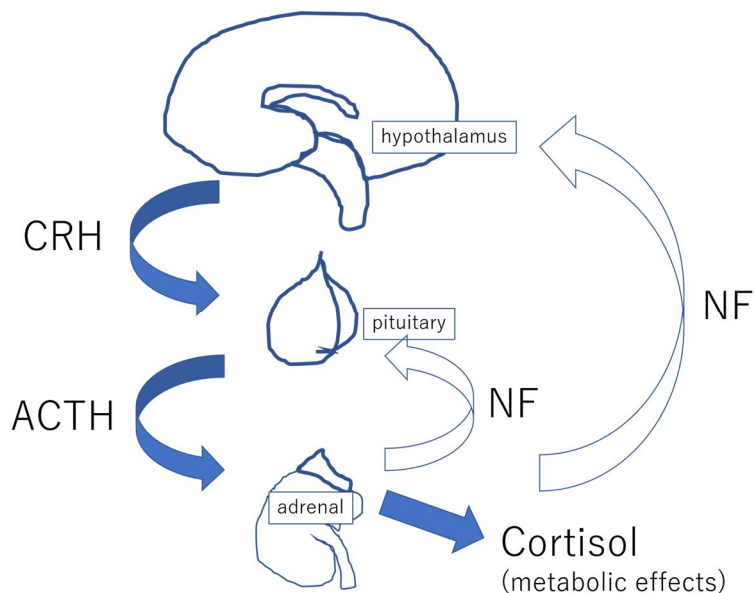
研究成果の概要(英文)：Using in vitro gene transfer and cell biological techniques with pituitary ACTH-producing AtT20 cells, we analyzed the factors and mechanisms that may influence the negative feedback mechanism of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) system. FKBP4 is directly involved in the negative feedback of glucocorticoids (GCs), and FKBP5 may contribute to the attenuation of the inhibitory effect of GCs on POMC expression via inhibition of the receptor transport. We reported the mechanism in the literature(Int J Mol Sci. 2021 27;22:5724.). GDF15, its transcriptional activity and mRNA expression were attenuated by GC treatment, and knockdown of GDF15 attenuated the inhibitory effect of GC on POMC expression.

研究分野：内分泌代謝内科学

キーワード：視床下部 下垂体 副腎 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

ヒトを始めとした高等動物は、精神的ストレスや代謝ストレス(飢餓、肥満)に拮抗して生体の恒常性を保つべくネガティブフィードバック(NF)調節機構を有しており、それは内分泌調節系における最も特徴的な制御系でもある(図)。しかしながらNF調節系は、その重要性にも関わらず詳細な分子機構が未だに明らかにされていない。



申請者らは下垂体、視床下部、或いは末梢組織の *in vitro* モデルでNF調節機構の解明を目的として研究を進めてきた。

生体のストレス応答、恒常性維持に極めて重要な役割を果たしているHPA軸ストレス応答系におけるNF調節については、本邦や世界的な研究動向をみても詳細な分子学的機構の解明は進んでいない。申請者らは下垂体POMC遺伝子及び視床下部CRH遺伝子発現に対する副腎コルチコステロイドの負の調節機序を解明すべく、下垂体及び神経細胞を用いた *in vitro* の実験系により検討を続けてきた。以下は過去に研究対象とした制御系である：

皮膚における POMC 遺伝子発現調節：kelatinocyte や melanocyte で発現・作用し、メラニン合成調節を介した体色変化に関与

下垂体前葉コルチコトロフ細胞における POMC 遺伝子発現調節：CRH や AVP の制御下に、蛋白産物の ACTH がストレス制御系の中軸として機能

視床下部弓状核におけるPOMC遺伝子発現調節：蛋白産物の α MSHがMC4Rを介して摂食調節に関与

上記3つの制御系のうち、POMC遺伝子は、の2つの系で異なったNF調節系を形成していると仮説を立てている。すなわちにおいて、POMC遺伝子はACTHの前駆体として周知のごとくHPA軸ストレス応答系の要として非常に重要な役割を演じている。一方においてPOMC遺伝子はレプチンによる摂食抑制シグナルの伝達因子の一つとして機能する。しかし、生体制御に極めて重要なこれら2つの内分泌フィードバック機構が、どちらも調節がいかに行われているのか、その分子機序の詳細は未解明のまま残されているのが現状であった。

生体のストレス応答や恒常性維持に重要な役割を果たしている、視床下部-下垂体-副腎(HPA)系の分子学的機構の解明に向けて研究を進めた。当初 HPA 系のフィードバック機構におけるシグナル伝達タンパクの候補のうち特に FKBP4 と FKBP5、また GDF15 の作用機序について検討した。

FKBP2 種はいずれもグルココルチコイド(GC)受容体の核内輸送に関与することが知られており、特に FKBP5 は GC 受容体と複合体を成して細胞質内に存在していることが知られている。対して FKBP4 の場合、GC が活性化され、核内移行が促進されるとの報告があるため、このため、FKBP5/4 遺伝子発現のバランスの変化が、GC の作用自体に影響を及ぼす可能性があると考えている。

GDF15 は特に炎症性ストレスや細胞分化の制御機構において重要な役割を果たすことが知られているサイトカインである。GDF15 の詳細な分泌調節機構は不明であるが、我々は GC 過剰状態が GDF15 の分泌動態に及ぼす影響について *in vivo* で検討し、GC が GDF15 に対して促進的に作用する可能性について学術集会で報告した(第91回日本内分泌学会)。

2．研究の目的

今回の研究では上記分子生物学的手法を基にして、NF 調節機構に関与する可能性があるシグナル伝達関連因子の新たな候補に焦点を当て、これらの分子が下垂体-視床下部-副腎（HPA）系の NF を構成する要素の遺伝子発現に関与しているか否かを明らかにすることを目的とした。

3．研究の方法

本研究でまず FKBP4 の動態を確認した。また GDF15 に関しても HPA 系フィードバック機構への関与を検討した。

具体的には、従来より当実験室で使用している下垂体 ACTH 産生 AtT20 細胞、視床下部由来 4B 細胞及び肝組織由来の細胞である HepG2、HuH7 を用いた確立された実験系を用いて、上記蛋白のシグナル伝達が NF 調節に関与しているか否かを、主に *in vitro* の遺伝子導入の手法並びに細胞生物学的手法（RT-qPCR、western blot 法）により解析した。

4．研究成果

GC 投与により ACTH 前駆体である POMC の mRNA 発現が抑制された事と相同して FKBP4 mRNA も GC 用量依存的に発現量の減少が確認された。対して FKBP5 は mRNA、蛋白いずれも GC 投与による発現増加が見られた。POMC mRNA 発現抑制量は FKBP4 のノックダウンで低下し、FKBP5 ノックダウンでは増加が見られた。以上の結果から FKBP4 は直接的に GC の抑制的フィードバックに関与し、FKBP5 は GC の POMC 発現抑制作用の減弱に、受容体輸送の阻害などを介して寄与すると考えられた。

上記 FKBP5/4 の GC のネガティブフィードバック機構における作用機序について、文献報告を行った（*Int J Mol Sci.* 2021 27;22:5724）。

GDF15 の転写活性、mRNA は GC 投与で減弱され、GDF15 のノックダウンにより GC の POMC 発現抑制作用は減弱された。

また AtT20 細胞において GDF15 の受容体である GFRAL が同定されたことも、GDF15 が下垂体 ACTH 産生細胞におけるフィードバック機構への重要な役割を果たすことを示唆するものと考えられた。上記メカニズムについても文献報告予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kageyama Kazunori, Iwasaki Yasumasa, Watanuki Yutaka, Niioka Kanako, Daimon Makoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Differential Effects of FKBP4 and FKBP5 on Regulation of the Proopiomelanocortin Gene in Murine AtT-20 Corticotroph Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5724 ~ 5724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22115724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------