

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2020～2023
課題番号：20H03411
研究課題名(和文) 負荷で顕在化するホルモン分泌不全の謎：グラニン蛋白欠損マウスから生活習慣病に迫る

研究課題名(英文) Physiological significance of the granin protein family in the endocrine function, revealed by analyzing the phenotypes of newly established Sg2- and Sg3-deficient mice.

研究代表者
渡部 剛 (Watanabe, Tsuyoshi)
旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：80220903
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グラニン蛋白の一つSg2を欠損したSg2-K0マウスを新たに作出・確立して、Sg3-K0、Sg2/3-DK0および野生型マウスと表現形質を比較・解析した。その結果、どのグラニン欠損マウスも通常飼育時には野生型と変わらぬ発生・発達・成長を遂げ、運動/生殖機能も含め明らかな身体的異常は認められなかった。ただし、高脂肪/高糖質食の給餌や拘束ストレスの負荷に関連する活性型ホルモン産生が有意に低下したことから、グラニン蛋白の欠損は潜在的なペプチドホルモン産生・分泌異常をもたらすが、生命維持に不可欠なホルモン基礎分泌は複数のグラニン蛋白の存在という機能的冗長性により保証されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天的な遺伝的素因に不適切な生活習慣という後天的負荷が加わって起こる疾患群は生活習慣病と呼ばれ、中でも2型糖尿病は膵島からのインスリン分泌不全と末梢組織でのインスリン応答能の低下が複合的に絡み合い起こる病態でその医学的な解決は喫緊の課題である。本研究で新規に作出・確立したグラニン蛋白欠損マウスは、不適切な食餌による負荷にตอบสนองして症状が顕在化する点で2型糖尿病など実際の生活習慣病の病態を良く反映しており、今後、糖尿病研究・生活習慣病研究や治療薬の開発・評価などのモデル動物として活用されれば、将来的には国民の健康増進に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：A family of acidic secretory proteins designated granins are localized specifically to secretory granules in various peptide hormone-producing neuroendocrine cells, but the functional roles of the granins are still unclear. To clarify the physiological significance of secretogranin II (Sg2) and III (Sg3) of the protein family in vivo, we analyzed the phenotypes of newly established Sg2 knockout (Sg2-K0) and Sg2/Sg3 double knockout (Sg2/3-DK0) mice. A high-fat/high-sucrose diet caused pronounced obesity and impaired glucose tolerance both in Sg2-K0 and Sg2/3-DK0 mice as observed in the Sg3-K0 mice, but these K0 mice were viable and fertile and exhibited no overt abnormalities under ordinary rearing conditions. These findings suggest that the lack of Sg2 and Sg3 causes maladaptation of endocrine cells to an inadequate diet, but the basal secretion of peptide hormones under ordinary conditions are ensured by the compensative up-regulation of other residual granins such as CgA and CgB.

研究分野：解剖学

キーワード：グラニン蛋白 分泌顆粒 ホルモン分泌調節 プロセッシング 膵島 細胞 下垂体前葉 ストレス応答
生活習慣病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分泌顆粒へのペプチドホルモンの選択的な輸送・蓄積過程には、グラニン蛋白と総称される一群の可溶性酸性蛋白が関与しており、代表的な3種類のグラニン蛋白、クロモグラニンAおよびB (CgA、CgB)、セクレトグラニンII (Sg2) は、分泌顆粒の基質として分泌顆粒内でのペプチドホルモンやカテコールアミンなど可溶性の生理活性物質の凝集・選択的濃縮に寄与すると考えられている (Bartolomucci A, et al. (2011) *Endocr Rev.* 32:755-797)。

本研究開始時までには研究代表者・渡部と研究分担者・穂坂は協同して、やはりグラニン蛋白に分類されるセクレトグラニンIII (Sg3) がCgAを含むホルモン凝集塊とコレステロールに富む分泌顆粒膜の両方に特異的に結合し、分泌顆粒内容を選択的に顆粒内に繫留する役割を果たすことを明らかにした (Hosaka M, et al. (2002) *Mol Biol Cell.* 13:3388-3399; Hosaka M and Watanabe T (2010) *Endocr J.* 57:275-286)。さらに、ACTH産生培養細胞株AtT-20細胞でsiRNAを用いてSg3の発現を抑制するとCgAの分泌顆粒への輸送が選択的に阻害されTGNが著明に空胞化する (Sun KM, et al. (2013) *Traffic* 14: 205-218) ことから、Sg3が分泌顆粒形成や機能に必須であると考え、2015年頃よりSg3ノックアウト (Sg3-KO) マウス個体でSg3欠損の影響の解析に着手した。ところが予想に反して、通常の飼育条件ではSg3-KOマウスは病的な症状・症候を呈さず、発生・発達、成長、繁殖性、運動能などに関して野生型と変わらぬ表現型を示した。

そこで、ホルモン需要を増やす負荷を加えたら症状が顕在化するのではないかとの着想を得て、高脂肪/高糖質食 (HF/HS diet) で飼育したところ、Sg3-KOマウスは著しく肥満し、内分泌学的には明瞭な耐糖能低下が認められた。さらに形態学的・生化学的解析を進めたところ、Sg3-KOマウスの膵島β細胞では、前駆体プロインスリンから活性型インスリンへのプロセシング効率が低下しており、インスリン需要が高まる高脂肪/高糖質食飼育時には十分な量の活性型インスリンが分泌できず、耐糖能低下と肥満が顕在化することが明らかになった (Maeda Y, et al. (2018) *Endocrinology* 159:1213-1227)。これらのグラニン蛋白の機能的意義に関する我々の先行研究は、グラニン蛋白の欠損が糖尿病に代表される生活習慣病においてホルモン分泌不全の潜在的な危険因子となりうることを示唆しており、Sg3以外のグラニン蛋白の欠損でも同様のリスクの増大が生じるか、さらに解析を進める必要があると考え本研究を立案した。

2. 研究の目的

上述した研究開始当初の学術的背景を踏まえて、本研究期間内には、以下の研究目標を立てて検討した。

- (1) まず、膵島β細胞以外の内分泌細胞でも、ホルモン分泌需要が高まると活性型ホルモン分泌不全状態が顕在化するか解析し、これまでの先行研究で我々が明らかにしてきた Sg3-KO マウスの活性型ペプチドホルモン分泌予備能の低下が臓器横断的に普遍的であるのかを検証する。
- (2) 次に、Sg3/CgA系と並立し、Sg3欠損時にはホルモン輸送・蓄積機能を代償している可能性が高い Sg2 の遺伝子欠損マウスを確立することで、Sg3 以外のグラニン蛋白欠損も糖尿病などの生活習慣病の原因となりうるか検証する。
- (3) さらに、Sg3/Sg2 二重欠損マウスを作成し、その表現型や内分泌学的負荷に対する反応を解析することで、複数のグラニン蛋白が欠損した場合にホルモン分泌不全症状が顕在化・重篤化するか検証する。

このような解析を通して、本研究課題ではSg3を含むグラニン蛋白の欠損マウスの表現型解析を深化させ、2型糖尿病など遺伝的素因と後天的負荷の相乗作用で生じるホルモン分泌不全の機序を明らかにし、細胞生物学の立場から生活習慣病の病因解明を目指したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) Sg2欠損 (Sg2-KO) マウスおよびSg2/Sg3二重欠損 (Sg2/Sg3-DKO) マウスの作出

① Sg2-KOマウスの系統の確立

Sg2の遺伝子座を欠損させたSg2-KOファウンダーマウスは、2019年度に科研費・新学術領域「学術研究支援基盤形成・先端モデル動物支援プラットフォーム (JSPS科研費 JP16H06276 (AdAMS))」の助成・支援を受けて、がん研究会 がん研究所 細胞生物部 (八尾良司 部長) にてCRISPR-Cas9法によるゲノム編集技術で作製していただいた。

得られたSg2-KOファウンダーマウスは、分担研究者・穂坂が主宰する秋田県立大の研究施設で野生型C57BL/6マウスと交配し、生じた仔マウスのSg2遺伝子座の塩基配列解析により、第2エクソン上の1st methionine (366) 近傍からstop codon (2218) の直前までの配列が欠損した2系統のマウスを選択した。次に、これらのマウスと野生型C57BL/6マウスとの交配を繰り返して、Sg2の上記配列が欠損した遺伝子座を安定的に仔に伝搬させることができる2系統のヘテロ欠損マウス (Sg2^{+/−}; C57BL/6J-Scg21Hosa line 21 (欠損部位: chromosome 1: 79414723-79412892)、および line 27 (欠損部位: chromosome 1: 79414719-79412893))

を確立した。さらに、雌雄のSg2ヘテロ欠損マウス (Sg2^{+/−}) を交配することでSg2の発現が完全に欠損したホモ欠損マウス (Sg2^{−/−}; Sg2-KOマウス) の仔を得た。なお、後述する形態学的解析および生化学的解析で、上記の2つの系統間で実験結果に差異は認められなかった

② Sg2/3-DKOマウスの作出

上述したSg2ホモ欠損マウス (Sg2^{-/-}; Sg2-KOマウス) は、研究成果で詳述するように通常飼育条件で野生型と変わらず発達・成長し、生殖能も有していたため、同様に生殖能を有しているSg3ホモ欠損マウス (Sg3^{-/-}; Sg3-KOマウス) と交配し、まずSg2とSg3の遺伝子座が一つずつ欠損したSg2/3-ヘテロ二重欠損マウス (Sg2^{+/-}・Sg3^{+/-}) を作出した。このSg2/3-ヘテロ二重欠損マウス (Sg2^{+/-}・Sg3^{+/-}) は、やはり研究成果で詳述するように、通常飼育条件で野生型と変わらず発達・成長し、生殖能も有していたため、雌雄のSg2/3-ヘテロ二重欠損マウス (Sg2^{+/-}・Sg3^{+/-}) を交配し、Sg2/3-二重欠損マウス (Sg2^{-/-}・Sg3^{-/-}; Sg2/3-DKOマウス) を作出した。

(2) グラニン蛋白欠損マウス及び野生型マウスへの内分泌学的負荷実験

① 高脂肪・高糖質食での飼育による膵島インスリン産生細胞への負荷

4匹のマウスを独立して飼育できる四分画ケージの各分画に雄性Sg2-KOマウス、Sg3-KOマウス、Sg2/3-DKOマウスおよび野生型C57BL/6マウスをそれぞれ1匹ずつ配置したものを10ケージ (各系統10匹ずつ、計40匹) 用意し、通常飼料を給餌して生後10週齢まで飼育した。その後、10週齢になった時点からこれらのケージを2グループに分け、一方は通常食 (CRF-1 diet、オリエンタル酵母工業株式会社)、他方は高脂肪・高糖質食 (F2HFHSD diet; 脂肪30%、蔗糖20%含有) を与えて飼育し、16週齢になるまでの6週間、1週間毎に体重と摂食量を計測した。この後、16週齢で後述する耐糖能試験、インスリン耐性試験、膵島組織の単離と生化学的解析、および形態学的解析用組織標本作成に供した。

② 身体的拘束による視床下部-下垂体前葉ACTH産生細胞-副腎系へのストレス負荷

10週齢の雄性Sg2-KOマウス、Sg3-KOマウス、Sg2/3-DKOマウスおよび野生型C57BL/6マウス各6匹を用いて、まず強制水泳実験 (FST) によるストレス耐性評価を行った。FSTは、7:00~10:00の間に振動のない静かな場所で、2.5Lの1.5%NaCl (24°C) を満たしたアクリル製の水槽 (直径: 18cm、高さ: 22cm) にマウスを入れ、6分間の強制水泳を実施し、6分間の後半4分間に生じる不動状態の割合 (不動時間) でストレス耐性の程度を評価した。このストレス耐性評価の後、慢性的な拘束ストレスを負荷する実験群と拘束ストレスを加えない対照群の2群 (各系統3匹ずつ/群) に分け、拘束ストレス負荷実験群のマウスには、連続して3週間、毎日8時間ずつ (10:00~18:00) 50mLチューブに入れることで身体的拘束ストレスを負荷した。対照群およびこの拘束ストレスをかけていない間 (18:00~10:00) の実験群のマウスは、温度24±2°C、湿度50±10%、12時間 (7:00~19:00) 明暗サイクルの下で給水・給餌を自由にさせ飼育した。3週間に渡る拘束ストレス負荷処理の後、13週齢で、対照群および実験群のマウスから視床下部、下垂体、副腎組織と血漿を採取して後述する生化学的解析や形態学的解析用組織標本作成に供した。

(3) 膵島インスリン産生細胞の機能解析

耐糖能試験では、マウスを予め16時間 (17:00-9:00) 絶食させ空腹時血糖値およびインスリン分泌を安定させた後、5 ml/kg body weightの20%グルコース溶液を腹腔内投与した。その後、グルコース投与から0, 15, 30, 60, 120分時にマウス尾静脈から血液を1滴採取して、自己検査用グルコースキットGセンサーとグルコカード Gブラック (アークレイ株式会社) を用いて血糖値を計測した。また、同様にインスリン耐性試験では、マウスを予め6時間 (2:00-8:00) 絶食させ空腹時血糖値およびインスリン分泌を安定させた後、0.75 unit/kg body weightのヒト遺伝子組換えインスリン製剤 (ヒューマリン®) 溶液を腹腔内投与した。その後、インスリン投与から0, 30, 60, 120分時にマウス尾静脈から血液を1滴採取して、上述した方法で血糖値を計測した。さらに、高脂肪・高糖質食で飼育した実験群と通常食で飼育した対照群のマウスから膵臓組織を採取し、我々の先行研究 (Maeda Y, et al. (2018) Endocrinology 159:1213-1227) で詳述した方法で膵島を単離した後、ELISAキット (シバヤギ; AKRIN-011S) で膵島組織中の成熟インスリン量を測定した。

(4) 下垂体におけるペプチドホルモン前駆体の発現量とプロセッシング効率の評価

通常飼育した各グラニン欠損 (Sg2-KO、Sg3-KO、Sg2/3-DKO) および野生型マウス (無処置対照群) と上述した拘束ストレスを負荷した実験群のマウスから下垂体組織を採取し、我々の先行研究 (Maeda Y, et al. (2018) Endocrinology 159:1213-1227) で詳述した方法で細胞抽出液を作成しイムノブロット法によりACTH前駆体のPOMCと他のグラニン蛋白の発現量やプロセッシング効率の変化を比較・検討した。またPOMCがプロセッシングを受けて生成する活性型ペプチドホルモンACTHの量はEIAキット (PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.; EK-001-21) で測定した。

(5) 形態学的解析

① 固定組織標本の作成

光顕免疫組織化学用の組織標本は、同様にマウス個体を4%パラフォルムアルデヒドと3%スクロースを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) で灌流固定して作成した。灌流固定した動物から切り出した各組織 (視床下部、下垂体、膵臓、副腎) の半分は、氷晶防止処理を施した後、OCTコンパウンド中で凍結させ包埋した (凍結切片作成用標本)。また、固定した組織の残りの半分は、常法に従いエタノール系列で脱水し、QY-1を伸介剤としてEpon812樹脂を浸透させた後、樹脂を重合 (24時間、60°C) させ包埋した (連続準超薄切片による解析用標本)。

微細構造の解析を目的とした電顕観察用組織標本は、0.4%グルタルアルデヒドと2%パラフォルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) でマウス個体を灌流固定して作製し

た。灌流固定した動物から切り出した視床下部、下垂体、膵臓、副腎組織は1%OsO₄溶液で後固定(2時間、4°C)した後、常法に従いEpon812樹脂に包埋した。

② 免疫組織化学法による解析

本研究で用いた膵島や下垂体前葉のペプチドホルモンに対する抗体、グラニン蛋白に対する抗体、ゴルジ装置など細胞内小器官のマーカー蛋白に対する抗体の入手先や特異性・希釈倍率に関しては、先行研究(Sakai Y, et. al. (2003) J Histochem Cytochem 51:227-238; Sakai Y, et. al. (2004) Arch Histol Cytol 67:57-64; Watanabe T, et. al. (2012) J Histochem Cytochem 60:588-602)に詳細に記載した。蛍光抗体法による抗原局在部位の可視化には、AlexaFluor 488、594、647標識ロバ抗ウサギ、マウス、ヤギ、およびヒツジ-IgG抗体

(Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific)を用いた。免疫組織化学染色については、上述した先行研究(Watanabe T, et. al. (2012) J Histochem Cytochem 60:588-602)に詳細に記載した方法・手順で行った。凍結切片における核の局在は、DAPIによる対染色で可視化した。得られた染色切片は封入後、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス)で観察・記録した。

③ 走査型電子顕微鏡を用いた微細構造解析

本研究課題の分担研究者である甲賀が確立した反射電子像を用いた樹脂包埋切片のSEM観察法(BSE-SEM観察法; Koga et. al. (2015) Microscopy (Oxf) 64:387-394)で、Epon812樹脂に包埋した下垂体、膵臓、副腎の準超薄切片表面近傍の反射電子像(BSE像)を観察し、各実験群におけるこれらの組織のペプチドホルモン産生性内分泌細胞の微細構造変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 新規グラニン蛋白欠損マウスの作出結果

① Sg2-KOマウスの作出結果と発現形質の概要

野生型C57BL/6マウスとの交配を繰り返し新規に確立したSg2ヘテロ欠損マウス(Sg2^{+/-}; C57BL/6J-Sg2^{<em1Hosa>})の雌雄を交配させたところ、メンデルの法則に合致したほぼ1:2:1の出生比でSg2ホモ欠損マウス(Sg2^{-/-}; Sg2-KOマウス)、ヘテロ欠損マウス(Sg2^{+/-})、野生型マウス(Sg2^{+/+})が得られた。また雌雄比に偏りはなかった。この結果は、Sg2の欠損が胎児期の個体発生過程に致死的な影響を及ぼさないことを示している。このSg2-KOマウスは、出生時に明らかな外見・行動の異常は認められず、その後も通常飼育条件下では、形態的/機能的な明らかな異常を示すことなく野生型と変わらぬ体重増加曲線で正常に成長・発達した。成獣となった10週齢で、このSg2-KOマウスの内分泌組織(下垂体、単離した膵島、副腎)におけるSg2蛋白の発現の有無を、Sg2蛋白のC末端およびN末端に対する2種類の特異抗体を用いてイムノブロット法および蛍光免疫組織化学法により検討したところ、蛋白レベルでもこれらの内分泌組織でSg2が発現していないことを確認した。さらに、10週齢の雌雄のSg2-KOマウスを交配したところ、雌雄比の偏りなく正常に次世代の仔Sg2-KOマウスが出生した。以上の所見をまとめると、通常飼育条件下では、Sg2が欠損しても個体レベルでは明らかな構造上および機能上の異常や欠損をもたらさず、生殖機能にも影響しないことが示された。

② Sg2/3-DKOマウスの作出結果と発現形質の概要

共に生殖能を持つSg2ホモ欠損マウス(Sg2^{-/-}; Sg2-KOマウス)とSg3ホモ欠損マウス(Sg3^{-/-}; Sg3-KOマウス)とを交配してできた雌雄のSg2/3-ヘテロ二重欠損マウス(Sg2^{+/-}・Sg3^{+/-})を交配させたところ、メンデルの法則から計算した理論上の出生比通りにほぼ1:2:2:4:1:1:2:2:1の頻度で、遺伝子型がSg2^{-/-}・Sg3^{-/-}(Sg2/3-DKOマウス)、Sg2^{-/-}・Sg3^{+/-}、Sg2^{+/-}・Sg3^{-/-}、Sg2^{+/-}・Sg3^{+/-}(Sg2/3-ヘテロ二重欠損マウス)、Sg2^{-/-}・Sg3^{+/+}(Sg2-KOマウス)、Sg2^{+/-}・Sg3^{-/-}(Sg3-KOマウス)、Sg2^{+/-}・Sg3^{+/-}、Sg2^{+/+}・Sg3^{-/-}、Sg2^{+/+}・Sg3^{+/-}(野生型マウス)のマウスが得られた。また雌雄比に偏りはなかった。出生したSg2/3-DKOマウスは、出生時に明らかな外見・行動の異常は認められず、その後も通常飼育条件下では、形態的/機能的な明らかな異常を示すことなく野生型と変わらぬ体重増加曲線で正常に成長・発達した。成獣となった10週齢で、このSg2/3-DKOマウスの内分泌組織(下垂体、単離した膵島、副腎)におけるSg2およびSg3蛋白の発現の有無を、Sg2およびSg3に対する特異抗体を用いてイムノブロット法および蛍光免疫組織化学法により検討したところ、これらの内分泌組織でSg2とSg3の両者ともに欠損していることを確認した。さらに、10週齢の雌雄のSg2/3-DKOマウスを交配したところ、正常に次世代の仔Sg2/3-DKOマウスが出生した。以上の所見をまとめると、通常飼育条件下では、Sg2とSg3が共に欠損しても個体レベルでは構造上および機能上の異常や欠損をもたらさず、生殖機能にも影響しないことが明らかになった。

(2) グラニン蛋白欠損が膵島インスリン産生細胞に及ぼす影響

① 耐糖能に関する影響

体重増加率については、Sg2-KOマウス、Sg3-KOマウス、Sg2/3-DKOマウスのいずれにおいても、通常食飼育時には野生型マウスとの間で有意な差は見られなかった。一方で、高脂肪・高糖質食で飼育した実験群では、Sg2-KOマウス、Sg3-KOマウス、Sg2/3-DKOマウスのいずれにおいても野生型マウスと比較して有意な体重増加が認められた。この時、摂食量は、グラニン欠損マウスと野生型マウスで差はなかった。以上の所見から、グラニン蛋白の欠損は、摂食量の増加ではなく糖代謝の異常による潜在的な肥満傾向を惹起することが明らかになった。

そこで、高脂肪・高糖質食負荷実験後の16週齢でグルコース腹腔投与による耐糖能試験を行ったところ、高脂肪・高糖質食摂取群のSg2-KOマウス、Sg3-KOマウス、Sg2/3-DKOマウスの

いずれにおいても、グルコース腹腔投与後、30, 60, 120分後で血糖値が野生型マウスと比較して有意に高かった。また、Sg3-KOマウスとSg2/3-DKOマウスでは、通常食飼育群でもグルコース腹腔投与後、60, 120分後の時点では血糖値が野生型マウスと比較して有意に高かった。一方で、通常食飼育群と高脂肪・高糖質食飼育群のどちらにおいても、野生型マウスと同様にグラニン欠損マウスでもインスリン投与に反応して血糖値が低下した。以上の所見から、グラニン蛋白の欠損によって生じる潜在的な肥満傾向および耐糖能低下は、インスリン反応性とは無関係に膵島での活性型インスリン産生・分泌予備力不足によってもたらされることが示唆され、その程度はSg2よりもSg3の欠損でより強いことが明らかになった。

② 膵島における成熟型インスリン量に対する影響

通常食で飼育したグラニン欠損 (Sg2-KO、Sg3-KO、Sg2/3-DKO) マウスと野生型マウスの膵臓組織から単離した膵島中の成熟インスリン量を測定したところ、Sg2-KOマウスの膵島でやや低値となる傾向が認められたが、統計学的には各グラニン欠損マウスと野生型マウス間で有意な差は認められなかった。一方、野生型マウスを高脂肪・高糖質食で6週間飼育すると、高脂肪・高糖質食負荷に適応して膵島中の成熟型インスリン含量は約1.5倍に増加したが、Sg2-KO、Sg3-KO、Sg2/3-DKOマウスを同様に高脂肪・高糖質食で6週間飼育しても膵島中の成熟型インスリン含量はほとんど増加せず、通常食飼育時と高脂肪・高糖質食飼育時の膵島中の成熟型インスリン含量比に関しては、野生型とSg2-KO、Sg3-KO、Sg2/3-DKOマウス間で有意な差が認められた。以上の所見から、グラニン蛋白欠損マウスで高脂肪・高糖質食負荷によって顕在化する耐糖能の低下は、野生型マウスでは起こる高脂肪・高糖質食の負荷に適応した活性型インスリン産生増加が、グラニン欠損マウスでは起こらないために生じることが示された。

(3) グラニン蛋白欠損が視床下部-下垂体前葉-副腎系に及ぼす影響

拘束ストレス負荷前に行った強制水泳実験 (FST) によるストレス耐性評価では、野生型マウスに比べてグラニン蛋白欠損マウス (Sg2-KO、Sg3-KO、Sg2/3-DKO) で不動時間が有意に長く、ストレス耐性レベルが低下していることが示唆された。このストレス耐性レベルの低下は、先行研究から副腎皮質束状帯でのコルチゾールの産生・分泌低下に起因している可能性が高い。そこで、さらに、コルチゾール産生・分泌促進因子である下垂体前葉のACTHの産生・分泌について検討した。

まずイムノブロット法でACTHの前駆体であるPOMCの下垂体における発現量を野生型マウスとグラニン蛋白欠損マウス (Sg2-KO、Sg3-KO、Sg2/3-DKO) で比較したところ、無処置対照群では、野生型と比較してどのグラニン蛋白欠損マウスでもPOMC含量が低い傾向が認められたが、有意な差はなかった。ところが、拘束ストレスを3週間負荷すると、野生型では下垂体中のPOMC量が3倍近く有意に増加したのに対し、Sg2-KOマウスではほぼ変わらずストレスに反応したPOMC量の増加は認められなかった。一方、拘束ストレス負荷群のSg3-KOマウスでは、無処置対照群の6倍程度と野生型以上に有意に下垂体中のPOMC量が増加した。以上の所見をまとめると、拘束ストレス負荷に反応して起こる下垂体組織中のPOMC量の増加については、Sg2の欠損は阻害、Sg3の欠損は促進に働くことが明らかになった。

これに対して、POMCからプロセッシングにより生成する活性型ペプチドホルモンACTHの脳下垂体中の量については、無処置対照群では、Sg3-KOマウスでのみ野生型と比べて有意に低かった。また、拘束ストレス条件下では、野生型と比べて、すべてのグラニン蛋白欠損マウス (Sg2-KO、Sg3-KO、Sg2/3-DKO) で低い傾向が認められたが、統計的に有意な低下が認められたのはSg2/3-DKOマウスだけであった。また血漿中のACTH量は、通常飼育条件下では、野生型とグラニン蛋白欠損マウス間で有意な差は認められなかったが、拘束ストレス条件下では、野生型と比べてSg3-KO、Sg2/3-DKOマウスで低値を示した。以上の所見をまとめると、Sg2の欠損でもSg3の欠損でも拘束ストレス負荷でACTHの増加反応の程度が弱まるが、その前駆体であるPOMCの含量についてはSg2-KOでは低下、Sg3-KOではむしろ増加と相反する所見が得られた。

(4) 本研究の総括と今後の展望

本研究では、ペプチドホルモン産生内分泌細胞の分泌顆粒の基質であるグラニン蛋白の欠損が糖尿病など生活習慣病の潜在的な病因となる可能性を検証すべく、2系統の新たなグラニン欠損マウス (Sg2-KOとSg2/3-DKO) を作出・確立して、高脂肪・高糖質食負荷による膵島への内分泌学的ストレスや持続する身体拘束による視床下部-下垂体-副腎系への内分泌学的ストレスへの反応にどのような変化が生じるか検討した。2系統のグラニン欠損マウス (Sg2-KOとSg2/3-DKO) は当初の計画通り作出・確立でき、内分泌学的ストレスに対する予備力の低下も認められたが、当初の予想に反してSg2とSg3の両者をもとに欠損させたSg2/3-DKOマウスでも内分泌学的な障害の重篤化は起こらなかった。これは、Sg2とSg3の2つのグラニン蛋白が、ペプチドホルモンの凝集・濃縮および分泌顆粒への選別輸送からプロセッシングによる活性型ペプチドホルモンの生成までの異なる過程で役割を果たしている可能性を示している。また、今回のグラニン蛋白欠損マウスでも残存している他のグラニン蛋白CgAとCgBが生命維持に不可欠なペプチドホルモン産生・分泌機能を強く代償している可能性も高い。これらの可能性に関しては、今回の研究で得られた新規のグラニン蛋白欠損マウスを活用して、さらにCgAやCgBを欠損させた場合にどのような病態が顕在化するか、今後、検討を重ねていく必要がある。

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 1件）

1. 著者名 Daisuke Koga, Satoshi Kusumi, Tsuyoshi Watanabe	4. 巻 41
2. 論文標題 Optimizing the reaction temperature to facilitate an efficient osmium maceration procedure.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 161-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.41.161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 穂坂正博、五味浩司、渡部剛
2. 発表標題 分泌顆粒へのホルモン輸送機構が冗長性を持つ意義:生活習慣病の危険因子としてのグラニンタンパク質不全
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 河田秋音、平島優花、五味浩司、渡部剛、穂坂正博
2. 発表標題 セクレトグラニンが制御する下垂体前葉ホルモンの分泌/産生
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平島優花、河田秋音、五味浩司、渡部剛、穂坂正博
2. 発表標題 インスリン分泌でセクレトグラニンが果たす役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森永涼介、甲賀大輔、穂坂 正博、渡部 剛
2. 発表標題 コルヒチン脳室内投与ラットの視床下部神経分泌細胞におけるグラニン蛋白発現部位の同定
3. 学会等名 日本解剖学会 第68回 東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森永涼介、甲賀大輔、穂坂 正博、渡部 剛
2. 発表標題 視床下部-下垂体系におけるグラニン蛋白の発現パターンの差異
3. 学会等名 日本解剖学会 第67回 東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森永涼介、甲賀大輔、穂坂 正博、渡部 剛
2. 発表標題 視床下部下垂体系におけるグラニン蛋白の局在と機能的意義
3. 学会等名 日本解剖学会 第127回 総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部剛、甲賀大輔、森永涼介、穂坂正博
2. 発表標題 セクレトグラニンII欠損マウスにおいて高脂肪/高糖質食負荷時に顕在化する耐糖能異常
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会/第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森永涼介、渡部剛
2. 発表標題 視床下部-下垂体後葉系で発現するグラニン蛋白
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会/第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎拓美、五味浩司、渡部剛、穂坂正博
2. 発表標題 The role of secretogranin III in the endocrine cells of the adrenal gland.
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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
研究 分担者	甲賀 大輔 (Koga Daisuke) (30467071)	旭川医科大学・医学部・准教授 (10107)	
研究 分担者	穂坂 正博 (Hosaka Masahiro) (80311603)	秋田県立大学・生物資源科学部・教授 (21401)	

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
---------	---------