

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07083

研究課題名（和文）視床下部神経の形成と摂食調節における分泌タンパク質Brorinの機能解明

研究課題名（英文）Role of brorin in hypothalamic feeding regulation

研究代表者

三宅 歩 (MIYAKE, Ayumi)

和歌山県立医科大学・薬学部・教授

研究者番号：40346044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Brorin遺伝子欠損マウスの視床下部では、摂食促進ペプチドのうちAgRPおよびNpyの発現量は増加していたが、Pmchの発現量には変化が認められないことを明らかにした。さらにBrorin遺伝子欠損マウスの白色脂肪組織では、脂質代謝関連遺伝子（Dgat2、Hsl、Plin1）およびアディポカイン（Adiponectin）の発現量が増加しており、脂質代謝の変化がアディポカインの発現に影響を与えていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

摂食量の増加が認められたBrorin遺伝子欠損マウスでは、摂食促進ペプチドのうちAgRPおよびNpyの発現量は増加していたが、Pmchの発現量には変化が認められなかった。このことより、BrorinはPmchの発現調節には関与しておらず、AgRPおよびNpyの発現を抑制することにより食欲抑制に関与していることが明らかになった。従って今回の研究成果は、摂食障害の原因解明および治療法の開発において有用な知見をもたらした。

研究成果の概要（英文）：In the hypothalamus of Brorin knockout mice, the expression levels of AgRP and Npy, among the feeding-promoting peptides, were increased, but the expression level of Pmch was not altered. Furthermore, the expression levels of lipid metabolism-related genes (Dgat2, Hsl, and Plin1) and adipokines (Adiponectin) were increased in the white adipose tissue of Brorin knockout mice, indicating that changes in lipid metabolism affect the expression of adipokines.

研究分野：神経発生

キーワード：視床下部 食欲調節 神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳をはじめとする組織形成の様々な過程において、分泌性タンパク質は重要な役割を担っている。申請者らは、ゲノム・遺伝子データベースから Bioinformatics の手法などを用いて 15 種類の新規ヒト分泌性タンパク質を発見した。そのうちの 1 つを Brorin と命名して、ヒト以外にマウスとゼブラフィッシュからも Brorin を単離・同定しており、Brorin は脊椎動物に共通した分泌性タンパク質であることも明らかにしている。

Bmp (bone morphogenetic protein) は、脳発生過程において神経系前駆細胞からニューロンおよびオリゴデンドロサイトへの分化を抑制し、アストロサイトへの分化を促進することが報告されている。また分泌性タンパク質である Bmp は、細胞表面の Bmp 受容体に結合して細胞内にシグナルを伝達するが、その活性はアンタゴニストなどの制御を受けている。これまでに申請者らは、Brorin が脳神経系特異的に発現しており、ゼブラフィッシュ Brorin は *in vivo* で Bmp アンタゴニスト活性を示すことと、GABA 作動性ニューロンおよびグリア細胞の発生に関与していることを明らかにしている。

また申請者らは、哺乳類における Brorin の生理的役割を解明するために、Brorin 遺伝子欠損マウスを作製してその表現型を解析しており、Brorin 遺伝子欠損マウスでは野生型に比べ体重が有意に増加し、白色脂肪組織重量も増加していることを明らかにしている。Brorin 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して摂食量も有意に増加していた。摂食量の増加が認められた Brorin 遺伝子欠損マウスでは、摂食促進ペプチドの発現量が有意に増加していたが、摂食抑制ペプチドの発現量も増加傾向を示した。さらに、Brorin 遺伝子欠損マウスの白色脂肪組織では野生型に比べ代謝調節遺伝子である *Leptin* の発現量の増加が認められた。これらの結果は、Brorin は食欲制御と代謝調節に重要な役割を担っていることを示唆している。

## 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュにおいて Brorin は脳形成過程初期から脳神経系特異的に発現しており、Bmp に対してはアンタゴニスト活性を示し、ニューロンおよびグリア細胞の分化に関与していることが明らかになっている。視床下部には摂食制御の神経回路において中心的役割をもつ神経核が存在しており、Bmp シグナルは視床下部弓状核の神経分化及びニューロンの軸索投射に関与していることが報告されている。Brorin は胎児期から特に視床下部の弓状核において高発現しており、Brorin 遺伝子欠損マウスでは、通常食飼育時の摂食量が野生型に比べ有意に増加しており、体重も野生型に比べ有意に増加していた。Brorin 遺伝子欠損マウスでは、摂食促進ペプチドである Agouti-related peptide (AgRP) と Neuropeptide Y (Npy) の発現量が有意に増加していたが、摂食抑制ペプチドである Pro-opiomelanocortin (POMC) の発現量も増加傾向を示した。これらの結果は、Brorin は食欲調節に重要な役割を担っている可能性があることを示唆している。

そこで本研究では、視床下部における摂食行動制御機構に Brorin がどのように関わっているのか分子レベルで明らかにすることを目的として、Brorin 遺伝子欠損マウスの弓状核における AgRP、Npy および POMC の発現細胞及び発現領域の変化の有無について明らかにする。さらに、Brorin と他の摂食制御関連遺伝子との関係についても明らかにする。Brorin 遺伝子欠損マウスの視床下部における摂食制御関連遺伝子の発現量の変化を調べ、摂食量増加の原因についても明らかにする。さらに、Brorin 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織において *Leptin* 以外のエネルギー代謝調節遺伝子の発現量の変化の有無を明らかにし、Brorin がエネルギー代謝にどのように関わっているのか分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Brorin 遺伝子欠損マウスの弓状核における摂食制御関連遺伝子の発現領域および発現細胞数の検討

16 週齢の雄マウスの脳を粉末状ドライアイスで凍結させ、クリオスタットにて 16  $\mu\text{m}$  厚の冠状切片を作製した。脳切片を 4% formalin/PBS に移して固定し、PBS で洗浄後、proteinase K 処理およびアセチル化処理を行った。マウス脳から抽出した cDNA を鋳型として作製した digoxigenin (DIG) 標識 RNA プローブを含むハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 20% dextran sulfate, 5  $\mu\text{M}$  EDTA [pH 8.0], 20 mM DTT, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tRNA, 2.5 $\times$ Denhardt, 4 $\times$ SSC, 1% salmon sperm DNA) で反応させた。2 $\times$ SSC で洗浄後、RNase A 処理を行った。2 $\times$ SSC/50% formamide 及び 2 $\times$ SSC で処理した後、抗 DIG 抗体を用いて抗体反応を行い、BM purple を用いて発色させた。Double *in situ* ハイブリダイゼーションでは DIG 標識及び fluorescein (FITC) 標識 RNA プローブを含むハイブリダイゼーション溶液で反応させ、DIG 抗体および FITC 抗体を用いて抗体反応を行い、FITC 標識を Roche fast red で、DIG 標識を BM purple で発色させた。Npy の発現解析には DIG 標識 RNA プローブを使用し、AgRP と POMC の発現解析には AgRP DIG 標識 RNA プローブ、POMC FITC 標識 RNA プローブを用いて発色させた。実験には WT 及び KO マウス

をそれぞれ3個体用いた。弓状核における *Npy* の発現解析は "The Mouse Brain" により定義されるブレグマ -1.46 ~ -1.58, -1.70 ~ -1.94 及び -2.18 ~ -2.46 の3領域で行い、*AgRP* 及び *POMC* の発現解析はブレグマ -1.70 ~ -1.94 で行った。細胞数と相対強度は各個体の代表的な3~4切片について計測した。細胞数は面積当たりの細胞数(neurons/mm<sup>2</sup>)として表し、相対強度の解析は ImageJ を用いて行った。統計的有意差は Student t-test を用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$  となったものを有意と判断した。

#### (2) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの視床下部における摂食制御に關与する遺伝子の発現量の検討

これまでの解析により、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの視床下部では、摂食促進ペプチドである *AgRP* と *Npy* の発現量が有意に増加し、摂食抑制ペプチドである *POMC* の発現量も増加傾向にあることを明らかにしている。そこでその他の摂食制御関連遺伝子の発現量についても解析した。22週齢の *Brorin* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの視床下部から RNA を抽出した後、逆転写反応により cDNA を作製し、リアルタイム PCR 法を用いて摂食促進ペプチドである *Pmch* および摂食抑制ペプチドである *Cartpt* の発現量を比較検討した。測定は、相対検量線法で行い *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* によって標準化した。統計的有意差は、Student t-test を用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$  となったものを有意と判断した。

#### (3) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織におけるエネルギー代謝調節に關与している遺伝子の発現量の検討

これまでの解析により、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織では、代謝調節遺伝子である *Leptin* の発現量が有意に増加していることを明らかにしている。そこでその他の代謝調節遺伝子の発現量についても解析した。22週齢の *Brorin* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの腸間膜白色脂肪組織から RNA を抽出した後、逆転写反応により cDNA を作製し、リアルタイム PCR 法を用いて *Adiponectin*、*Dgat*、*Hsl* および *Plin1* の発現量を比較検討した。測定は、相対検量線法で行い *18S rRNA* によって標準化した。統計的有意差は、Student t-test を用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$  となったものを有意と判断した。

### 4. 研究成果

#### (1) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの弓状核における摂食制御関連遺伝子の発現領域および発現細胞数の検討

22週齢の *Brorin* 遺伝子欠損マウスの視床下部について、摂食制御関連遺伝子の発現量を逆転写 qPCR 法により解析したところ、摂食促進ペプチドである *AgRP* と *Npy* の発現量が有意に増加し、摂食抑制ペプチドである *POMC* の発現量も増加傾向を示すことが分かっている。そこで、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの弓状核における *AgRP*、*Npy* および *POMC* の発現細胞及び発現領域の変化の有無について *in situ* hybridization 法を用いて解析した。16週齢の *Brorin* 遺伝子欠損マウスの弓状核の前後軸に沿って3領域を選んで調べたところ、いずれの領域においても *Npy* の発現領域に変化は見られなかったが、面積当たりの発現細胞数および相対発現強度が野生型マウスに比べて増加していた。また *Npy* と同様に、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの弓状核における *AgRP* および *POMC* の発現細胞数および相対発現強度についても解析したところ、どちらの遺伝子についても相対発現強度に差は認められなかったが、面積当たりの発現細胞の数は共に有意に増加していた。しかしながら、Nissl 染色を行ったところ、弓状核において総細胞数の変化は確認できなかったことより、*Brorin* は *AgRP*、*Npy* および *POMC* の発現調節に關与していることが示された。

#### (2) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの視床下部における摂食制御に關与する遺伝子の発現量の検討

*Brorin* 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比べて摂食量が増加しており、視床下部弓状核における *AgRP*、*Npy* および *POMC* の面積当たりの発現細胞の数が増加していることが明らかになった。そこで、*Brorin* と他の摂食制御関連遺伝子との関係についても検討した。22週齢の *Brorin* 遺伝子欠損マウスの視床下部について、摂食制御関連遺伝子の発現量を逆転写 qPCR 法により解析したところ、摂食促進ペプチドである *Pmch* の発現量は野生型マウスと比べて変化が認められなかった。一方、摂食抑制ペプチドである *Cartpt* の発現量の発現量は野生型マウスと比べて増加傾向を示した。

#### (3) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織におけるエネルギー代謝調節に關与し

## ている遺伝子の発現量の検討

*Brorin* は白色脂肪組織においても発現しており、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの白色脂肪組織では代謝調節遺伝子である *Leptin* の発現量が増加していることが分かっている。そこで、*Brorin* と脂質代謝関連遺伝子との関係についても検討した。*Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織における脂質代謝調節遺伝子の発現量を逆転写 qPCR 法により解析したところ、*Dgat2*、*Hsl* および *Plin1* の発現量が野生型マウスに比べて有意に増加していた。さらに *Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の発現量の変化がアディポカインの発現量に影響を与えるかについても検討した。*Brorin* 遺伝子欠損マウスの腸間膜白色脂肪組織では、*Leptin* だけでなく *Adiponectin* の発現量も増加していた。

摂食量の増加が認められた *Brorin* 遺伝子欠損マウスでは、摂食促進ペプチドのうち *AgRP* および *Npy* の発現量は増加していたが *Pmch* の発現量には変化が認められなかったことより、*Brorin* は *Pmch* ではなく *AgRP* および *Npy* の発現を抑制することにより食欲抑制に参与していることが明らかになった。従って今回の研究成果は、摂食障害の原因解明および治療法の開発において有用な知見をもたらした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Miyake Ayumi, Ohmori Takatoshi, Murakawa Yuka	4. 巻 681
2. 論文標題 Fgf22 and Fgfr2b are required for neurogenesis and gliogenesis in the zebrafish forebrain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 212 ~ 217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.09.070	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大森 貴俊、加藤 千智、三宅 歩
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトの分化過程におけるゼブラフィッシュfgf22の役割及びそのシグナル伝達経路の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮西 峻平、三宅 歩
2. 発表標題 エネルギー代謝調節におけるマウスVwc2の機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森 貴俊、中西 和也、加藤 千智、村川 由佳、三宅 歩
2. 発表標題 ゼブラフィッシュfgf22は前脳におけるオリゴデンドロサイトの分化を抑制する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮西 峻平、大沼 建斗、藤林 英徳、三宅 歩
2. 発表標題 摂食・エネルギー代謝におけるマウスVwc2の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 千智、大森 貴俊、中西 和也、村川 由佳、三宅 歩
2. 発表標題 前脳のオリゴデンドロサイト分化におけるゼブラフィッシュfgf22の役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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