

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890034

研究課題名（和文） 脳 K_{ATP} チャンネルのエネルギー代謝制御における役割研究課題名（英文） Roles of brain K_{ATP} channels in the regulation of energy homeostasis

研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40343090

研究成果の概要（和文）：

脳 K_{ATP} チャンネルはエネルギー代謝制御に関与している。我々は K_{ATP} チャンネル欠損マウスの視床下部においても摂食・絶食時のニューロペプチド発現調節は正常に機能しており、脳 K_{ATP} チャンネルによるエネルギー代謝制御は視床下部のニューロペプチド発現制御以外のメカニズムで調節されていると考えられた。一方、グルコースによる BDNF の発現誘導は野生型マウスでも見られず、BDNF の発現誘導はグルコース欠乏による摂食応答には必須ではないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

K_{ATP} channels in the brain participate in the regulation of energy homeostasis. In the present study, we examined the changes of neuropeptide expressions in the hypothalamus in response to fasting and systemic glucose administration. Unexpectedly, the regulation of neuropeptides in K_{ATP} channel knockout mice does not differ from that of wild type, suggesting that the brain K_{ATP} channels regulates energy homeostasis through a mechanism other than that involving neuropeptide expression in the hypothalamus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：脳科学

科研費の分科・細目：環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：ATP 感受性 K⁺チャンネル、視床下部、インスリンシグナル

1. 研究開始当初の背景

ATP 感受性 K⁺チャンネル(K_{ATP} チャンネル)は生体の様々な電氣的興奮細胞に存在し、細胞内代謝の変化と細胞の電氣的興奮を結びつけることで様々な生体機能の制御に関わっている。K_{ATP} チャンネルは中枢神経系でも様々な部位に異なった強さで発現している。K_{ATP} チ

ャネルは細胞内 ATP の濃度により活性が制御されることから、発見当初から代謝センサーとして機能していることが予想されていた。K_{ATP} チャンネルの分子構造は 1995 年に明らかにされ、K_{ATP} チャンネル機能抑制マウス(Miki ら PNAS 1997)や K_{ATP} チャンネル欠損マウス(Miki ら PNAS 1998)を用いて、様々な K_{ATP} チャンネル

の生理機能が解明された。すなわち、 K_{ATP} チャネルは膵 β 細胞からのインスリン分泌、虚血時の心筋細胞の保護(Suzuki ら JCI 2002, Suzuki ら Circulation 2003)や血管平滑筋細胞での虚血の感知(Miki ら Nat Med 2002)に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、神経細胞においては、虚血時の細胞保護(Sun ら J Neurophysiol 2006)、神経毒に対する感受性の制御 (Liss ら Nat Neurosci 2005) などの細胞レベルの機能と、視床下部の低血糖感知(Miki ら Nat Neurosci 2001) 神経細胞の低酸素での痙攣予防 (Yamada ら Science 2002)などの個体レベルでの機能が明らかになっている。

しかしながら、個体の摂食・代謝制御の最高中枢である視床下部での K_{ATP} チャネルが豊富に発現しているにもかかわらず、視床下部 K_{ATP} チャネルが個体レベルの satiety センサーとして機能し、摂食やエネルギー代謝の調節にどのような役割を果たしているかはほとんど分かっていない。近年、視床下部の K_{ATP} チャネルが脳内のインスリンシグナルとのクロストークを介して、様々な末梢組織での糖・エネルギー代謝を調節していることが次第に明らかになってきた。

2. 研究の目的

本研究では K_{ATP} チャネル欠損マウスを用いて、脳 K_{ATP} チャネルのエネルギー代謝制御における生理的役割を明らかにすることを目的とした。特に、摂食やエネルギー消費を制御するニューロペプチドシグナルが脳 K_{ATP} チャネルによって制御されているかについてはまったく不明である。そこで、本研究では、絶食やグルコース投与時の視床下部におけるニューロペプチドの発現量の変化を解析し、脳 K_{ATP} チャネルがこれらの発現制御に関わっているのかどうかを解析した。

また、 K_{ATP} チャネル欠損マウスでは脂肪組織でのインスリンによる糖取込みが亢進していた。脂肪組織には K_{ATP} チャネルが発現していないことから、これらの変化は脳 K_{ATP} チャネル機能の破綻によって生じていると考えられる。そこで、 K_{ATP} チャネル欠損マウスの脂肪組織でのインスリンシグナルに焦点を当てて解析した。

3. 研究の方法

(1) 視床下部 K_{ATP} チャネルの役割

当研究室が作製した Kir6.2 欠損マウスでは、高脂肪食負荷時の肥満誘導が抑制されていたこと (Alekseev Cell Metab 2010)、絶食時の肝臓での糖新生が抑制されていたこと (Miki, Am J Physiol 2000) から、Kir6.2 と SUR1 が構成する K_{ATP} チャネルが

視床下部での糖・エネルギー代謝調節に関与していると考え、本研究では全身型 Kir6.2 欠損マウスを解析に用いた。

視床下部でのグルコース感知の分子メカニズムを解析する目的で、マウスの側脳室内にカニューレを挿入し、グルコース代謝を阻害する 2 デオキシグルコースを処置し、視床下部の代謝制御ホルモン (AgRP, POMC, NPY) の mRNA の発現変化を検討した。また、 K_{ATP} チャネル欠損マウスと野生型マウスで、自由摂食時と絶食時の視床下部におけるこれらのニューロペプチドの発現変化を検討した。これらの発現量は、TaqMan probe を用いた real time RT-PCR 法によって定量解析した。

(2) 視床下部の二次ニューロン以降の K_{ATP} チャネルの役割

視床下部の弓状核には POMC ニューロンや NPY/AgRP ニューロンが存在し、全身からの液性情報を受け取っている。この情報はさらに視床下部の二次ニューロンである視床下部室傍核や視床下部腹内側核に投射され、エネルギー代謝状況が伝えられる。中でも、視床下部腹内側核では絶食によって satiety 因子である BDNF の発現が低下し、全身的なグルコース投与によって BDNF の発現が増加することが報告されている。そこで、 K_{ATP} チャネル欠損マウスで全身的なグルコース投与により視床下部腹内側核での BDNF 発現が誘導されるかどうかを定量 RT-PCR 法で解析した。

(3) 脳 K_{ATP} チャネルの脂肪組織での役割

脂肪組織でのインスリンによるグルコース取り込みを詳細に解析する。メカニズムを明らかにするため、脂肪細胞内のインスリンシグナルを定量的に解析する。 K_{ATP} チャネル欠損マウスの脂肪組織でインスリンシグナルをインスリン受容体以下の基質のリン酸化でインスリン感受性を検討した。また、シグナルの強度が脳からの神経入力によって調節されているのかどうかを検証する目的で、片側の精巣傍脂肪組織を支配する交感神経を外科的に切断し、術後の回復を待って、インスリンシグナルがどのように変化するの

かも解析した。

4. 研究成果

本研究では K_{ATP} チャンネル欠損マウスを用いて、視床下部 K_{ATP} チャンネルの生理的役割を明らかにすることを旨とした。

(1) 視床下部 K_{ATP} チャンネルの役割

既報の研究では、脳室内に2デオキシグルコースを処置することにより、AgRPの発現が誘導されるとされている。しかしながら、申請者らが、投与によって明らかな摂食応答が生じる量の2デオキシグルコースを側脳室内に投与したにもかかわらず、 K_{ATP} チャンネル欠損マウスでも野生型マウスでも視床下部の代謝制御ホルモン(AgRP, POMC, NPY)のmRNAの発現変化は2DG投与により全く変化しなかった。

これまでは2デオキシグルコースによる細胞代謝阻害は、視床下部ニューロンに neuroglycopenia をきたし、AgRPの発現誘導を介して、摂食応答が引き起こされると考えられてきた。しかしながら、申請者らの結果から、視床下部のニューロペプチドの発現制御によって、低血糖時の摂食応答が惹起されるのではないことが明らかになった。

一方、長時間絶食時の視床下部のニューロペプチドの発現変化を検討したところ、 K_{ATP} チャンネル欠損マウスと野生型マウスで、同程度のPOMCの減少とAgRPおよびNPYの増加が認められ、絶食時の視床下部のニューロペプチドの発現調節に脳 K_{ATP} チャンネル機能は必須ではないことが示された。さらに、視床下部におけるPOMC、AgRP、NPYの発現量は、 K_{ATP} チャンネルの有無ではなく、各個体の体重と極めてきれいな相関がみられた。すなわち、POMCの発現量は体重と正の相関、AgRP、NPYの発現量体重と負の相関がみられ、この関係は K_{ATP} チャンネル欠損マウスでも保存されていた。これらの結果から、視床下部のニューロペプチドの発現は短時間(数時間以内)の栄養状態の変化ではなく、長期的な栄養状態と、比較的長期(48時間の絶食時など)の栄養状態の変化によって制御されていることが明らかになった。

(2) 視床下部の二次ニューロン以降の K_{ATP}

チャンネルの役割

K_{ATP} チャンネル欠損マウスと野生型マウスで全身的グルコース投与により視床下部腹内側核でのBDNF発現が誘導されるかどうかを定量RT-PCR法で解析した。

BDNFには現在、9種類のスプライシングイソフォームが存在し、各イソフォームは異なるプロモーターにより転写制御される5'非翻訳領域の多型であるが、産生されるBDNFのアミノ酸配列は同一である。特に、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって転写誘導されることが報告されているイソフォーム1,4は、グルコース応答性ニューロンでは、グルコース投与後、発現が増加することが期待された。しかしながら、様々な用量のグルコースを投与し、投与後様々な時間で視床下部を採取してBDNF発現量を測定してもグルコースによる発現量の変化は観察できなかった。

この原因をさらに解析する目的で、視床下部内でのBDNF発現領域を解析した。視床下部内でのBDNF発現領域に関しては既に詳細な解析がなされており、視床下部内でも発現量が大きく異なることが知られる。そしてグルコースにより発現量が増加するのは視床下部腹内側核に限られることが知られている。さらに視床下部腹内側核と比較的近接する弓状核にはBDNF発現がほとんどない。そこで、我々は視床下部腹内側核と弓状核を一塊にサンプリングし、BDNF発現量を測定していた。

しかしながら、BDNF発現が低いとされる弓状核でも定量RT-PCR法でBDNF発現が見られることが示された。従って、視床下部腹内側核でのBDNF発現を観察するためにはより選択的に視床下部内の神経核を採取することが必要と考えられた。そこで、我々は視床下部腹内側核のみを採取する実験系を確立した。

また、通常定量RT-PCR法ではこれらの各スプライシングイソフォームの相対的な量を比較検討できないこと、さらに *in situ* ハイブリダイゼーション法で視床下

部腹内側核における BDNF 発現を観察した実験は BDNF の各アイソフォームに共通なアミノ酸コード領域であることから、我々はあえて各アイソフォームに共通な部分に定量 RT-PCR のプライマーを設計し直し、野生型マウスの摂食時、絶食時、絶食後グルコース投与時の BDNF の発現変化を検討した。しかしながら、各データにバラつきがあり、評価不能であった。

そこで我々は、さらに、そのバラつきの原因を検証したところ、マウス視床下部視床下部腹内側核という極めて小さいサンプルを採取するため、サンプルによっては視床下部腹内側核の一部が失われていることが判明した。そこで、さらに採取したサンプル量を補正するために、通常は HPRT 発現と比較していたが、本研究では視床下部腹内側核に特異的に発現する転写因子である SF-1 の発現量で補正した。すると BDNF 発現の絶食による低下と、グルコースによる増加をようやく観察できるようになった。

以上の結果から、野生型マウスの視床下部腹内側核での BDNF 発現は絶食によって明らかに低下し、グルコース投与により増加傾向が観察された。今後はさらに実験精度を向上させるとともに、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法などより正確に視床下部腹内側核を採取する手法を確立することも検討する。今後これらの方法で、 K_{ATP} チャンネル欠損マウスでの発現変化を観察する予定である。

(3) 脳 K_{ATP} チャンネルの脂肪組織での役割
 K_{ATP} チャンネル欠損マウスでは、本来 K_{ATP} チャンネルが発現しない脂肪細胞でインスリン感受性が亢進しており、中枢性制御の関与が想定されている。そこで、 K_{ATP} チャンネル欠損マウスの脂肪組織でのインスリンシグナルについて解析を行った。この目的で、マウスにインスリンを処置し、インスリンシグナル分子のリン酸化抗体 (IRS1, Akt-1, Akt 基質抗体) を用いて検討した。その結果、 K_{ATP} チャンネル欠損マウスでは Akt-1 の標的分子のリン酸化が亢進

する傾向が認められた。また、これらの変化が、生体では神経性入力を介して制御されていることを示す目的で、 K_{ATP} チャンネル欠損マウスと野生型マウスの精巣上体脂肪組織への自律神経入力を遮断する目的で、同部への交感自律神経入力を片側のみ外科的に切断し、2 週間後にインスリンシグナルを検討した。すると、神経切断した側の脂肪組織は明らかに萎縮し、黄色～褐色の色調を示した。しかしながら、Akt-1, Akt 基質抗体などのシグナルは交感自律神経切断によっても明らかに変化を示さなかった。

以上の結果から、脳の K_{ATP} チャンネルは脂肪細胞でのインスリン感受性を規定しているが、2 デオキシグルコース投与時のニューロペプチドの発現調節や、絶食時のニューロペプチドの発現調節には必須の働きは果たしていないことが明らかになった。脳 K_{ATP} チャンネルによるエネルギー代謝制御には、視床下部における POMC, AgRP, NPY の発現制御とは異なるメカニズムでエネルギー代謝制御に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Nakamura A, Olson EB Jr, Terada J, Wenninger JM, Bisgard GE, Mitchell GS. Sleep state dependence of ventilatory long-term facilitation following acute intermittent hypoxia in Lewis rats. J Appl Physiol. 109(2):323-31, 2010.

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA AKIRA)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：4034309

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし