

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591302

研究課題名(和文) 視床下部におけるプロテインタイロシンフォスターゼ1B発現調節機構の解析

研究課題名(英文) Modulation in the expression of hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B

研究代表者

坂野 僚一 (Banno, Ryoichi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80597865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部は体重調節において重要な役割を担う。高脂肪食に伴う肥満では視床下部のProtein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)発現が増強し、逆に視床下部PTP1Bの発現を欠損させると肥満抵抗性を示す。視床下部PTP1Bの発現調節因子は不明であるが、高脂肪食摂取に伴い視床下部において炎症およびER stressを生じることから、これらの因子が視床下部PTP1Bの発現調節候補となる可能性を考え実験を行った結果、炎症性サイトカインのTNFがPTP1B発現を増強する因子であることが明らかとなり、その発現はTNFシグナル下流のNF- κ Bリン酸化を介した機序であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Hypothalamus is well known to play an important role in the regulation of energy balance. High-fat diet (HFD) increases hypothalamic Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) expression levels, and hypothalamic PTP1B deficient models protect against diet induced obesity. While PTP1B has therefore been implicated as a key regulator of energy homeostasis, the factors regulating PTP1B expression in the hypothalamus, particularly under obese conditions, remain to be fully elucidated. Since several lines of evidence have suggested that HFD induces hypothalamic inflammation accompanied by increasing levels of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL6, in addition to ER stress, we examined whether these factors could regulate PTP1B expression and activity by using hypothalamic organotypic cultures. Our data show that TNF- α significantly increases PTP1B expression and activity in the hypothalamus, and that these effects are mediated via TNF- α induced NF- κ B activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：肥満 視床下部炎症

1. 研究開始当初の背景

肥満症は環境因子と遺伝素因の相互作用によって生じる慢性疾患であり、2 型糖尿病、動脈硬化、悪性腫瘍の危険因子である。肥満症は既にパンデミックレベルで蔓延しているにも関わらず有効な内科的治療法は未だ確立しておらず、発症機序の解明および治療法の確立が期待される。エネルギーバランスは視床下部で調節されており、エネルギー摂取量と支出量の総和が体重を規定する。脂肪細胞と膵臓からそれぞれ分泌されるレプチンとインスリンは視床下部弓状核に存在する pro-opiomelanocortin (POMC) neuron および neuropeptide Y neuron に直接作用し、エネルギー摂取の減少およびエネルギー支出の増加を来し体重を減少させる。中枢特異的にレプチンもしくはインスリンの受容体を欠損させると著明な肥満を来し、肥満モデル動物では視床下部における両ホルモンのシグナルに抵抗性を来す。シグナル伝達において、両ホルモンともにチロシン蛋白質リン酸化カスケードの存在は必須であり protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) によって阻害される。これまでに PTP1B を全身性もしくは脳特異的に欠損 (KO) させると体重減少を来すことが報告されている。筆者らは PTP1B の役割を視床下部の神経核レベルで明らかにする目的で Cre-LoxP システムを用いて PTP1B conditional KO マウスを作成しフェノタイプ解析を施行したところ、体重および糖代謝調節を担うことが知られている POMC neuron 特異的に、PTP1B 発現を欠損させると高脂肪食投与下で肥満抵抗性を来すことを報告した (J Clin Invest 120:720, 2010)。逆に、視床下部 PTP1B 発現を増加させると体重増加を来し、高脂肪食投与に伴う食事誘導性肥満動物モデルでは視床下部 PTP1B 発現の増加を来すことが報告されている。このように視床下部における PTP1B 発現量の多寡がエネルギーバランスを規定することが明らかとなりつつある一方で、視床下部における PTP1B の発現調節機構については未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、高脂肪食投与に伴う肥満における、視床下部 PTP1B の発現調節機構を分子病的に解析し、肥満症の機序解明に迫る。高脂肪食を投与すると、炎症性サイトカインである TNF、IL6 および IL1 の発現が視床下部で上昇し、小胞体ストレス (ER stress) も惹起される。これらの因子が PTP1B の発現や活性に与える影響を検討する。また、PTP1B 欠損モデルマウスは高脂肪食投与に対し肥満抵抗性を示すが、視床下部炎症および ER stress が野生型マウス (WT) と PTP1B 欠損マウス (KO) でどのように異なるのか比較検討し、肥満抵抗性に寄与する機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 雄性 C57BL6 マウスを使用して、普通食あるいは高脂肪食を 1 日、3 日、28 日間投与し 9 週齢で屠殺した。採取した視床下部から mRNA を抽出し、TNF、IL6、IL1、Bip および PTP1B の mRNA 発現を RT-PCR 法で評価した。

(2) ラットを用いた視床下部器官培養を行い炎症性サイトカインおよび ER stressor による PTP1B 発現を評価した。炎症性サイトカインは既報で PTP1B 発現調節と関連のある TNF および IL6 を使用し、ER stressor には Thapsigargin (TG) および Tunicamycin (TM) を使用した。生後 16 日齢のラットより視床下部を取り出しクライオスタットを用いて 350 μ m の切片を作製し無血清培地で 48 時間培養した。続いてメディウム中に TNF 100 ng/ml、IL6 100 ng/ml、TG 100 nM、もしくは TM 300 nM を加えて 24 時間培養した後に視床下部切片から RNA を抽出し、PTP1B の mRNA 発現を RT-PCR 法で評価した。

(3) TNF による視床下部 PTP1B 発現および活性調節機構をラットの視床下部器官培養法を用いて調べた。メディウム中に TNF (25, 50, 100 ng/ml) を加えて所定の時間 (6, 12, 24 時間) 培養した後に視床下部切片から RNA および蛋白を抽出し、PTP1B の mRNA および蛋白発現をそれぞれ RT-PCR およびウエスタンブロット法で評価した。さらに Biomol green assay を用いて PTP1B の活性を評価した。次に TNF シグナル下流の NF κ B リン酸化が TNF によって増加するか否かをウエスタンブロット法で評価後、NF κ B に対する阻害剤としてサリチル酸 10 mM もしくは NF κ B のサブユニットである p65 の選択的阻害剤 (P65i) 150 μ M を使用し、100 ng/ml TNF の 24 時間培養下による NF κ B のリン酸化および PTP1B の蛋白発現がサリチル酸もしくは P65i 投与下でどのように変化するかウエスタンブロット法で評価した。

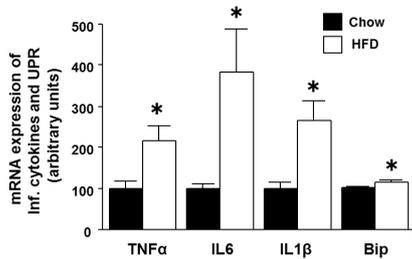
(4) PTP1B KO および WT マウス由来の視床下部器官培養を行い TNF 刺激による視床下部 TNF の mRNA 発現を RT-PCR 法で評価した。

(5) PTP1B KO および WT マウスに高脂肪食を投与し視床下部における抗炎症性サイトカインおよび gliosis 関連遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法で評価した。

4. 研究成果

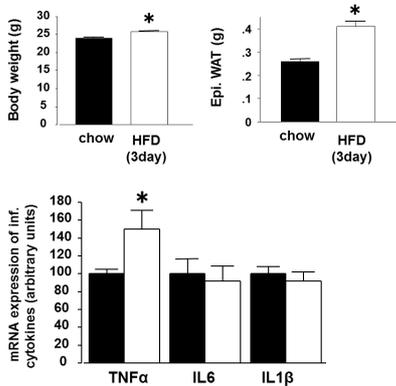
(1) 高脂肪食 28 日投与で体重および内臓脂肪は普通食と比較して有意に増加し、視床下部において炎症性サイトカインである TNF、IL6 および IL1 に加え、ER stress マーカーである Bip の mRNA 発現が有意に上昇した (図 1)。

図 1. 高脂肪食投与は視床下部炎症および ER stress を増強する



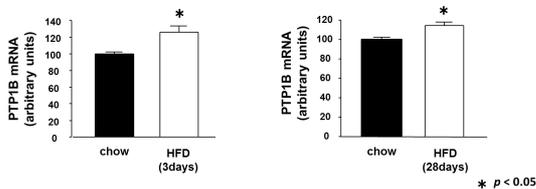
高脂肪食 3 日投与で体重および内臓脂肪は普通食と比較して有意に増加し、視床下部において炎症性サイトカインである TNF の mRNA 発現が有意に上昇するも、IL6、IL1 および Bip の mRNA 発現は有意差を認めなかった(図 2)。一方、高脂肪食 1 日投与では体重および各種マーカーにおいて 2 群間で有意差を認めなかった。

図 2. 3 日間の高脂肪食投与で視床下部の TNF mRNA 発現は増強する



また、高脂肪食 3 日および 28 日投与のいずれも視床下部 PTP1B mRNA 発現は普通食と比較して有意に増加した(図 3)。

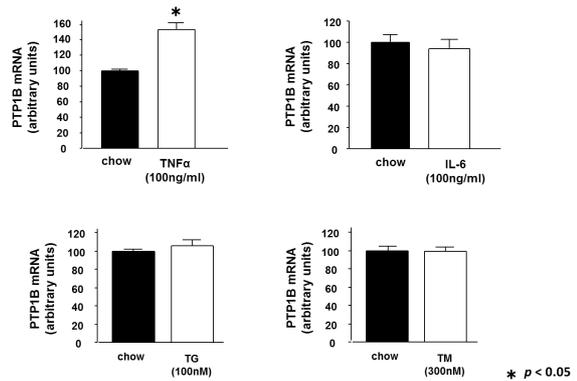
図 3. 高脂肪食投与は視床下部 PTP1B の mRNA 発現を増強する



以上の結果から、高脂肪食投与により視床下部炎症および ER stress が生じることが確認された。特に、炎症性サイトカインの TNF については高脂肪食投与早期から視床下部における mRNA 発現が増強することが確認された。また、PTP1B についても、TNF と同様に高脂肪食投与早期から視床下部における発現が増強することが確認された。

(2)高脂肪食投与により視床下部レベルでの発現が増強した炎症性サイトカイン(TNF および IL6)や ER stress は、少なくとも末梢レベルで PTP1B 発現に影響を与えることがこれまでに報告されていることから、中枢においても同様の関係が維持されているかを確認する目的で、ラットの視床下部器官培養法を用いて、TNF、IL6 および ER stressor 刺激による PTP1B の mRNA 発現を検討した。

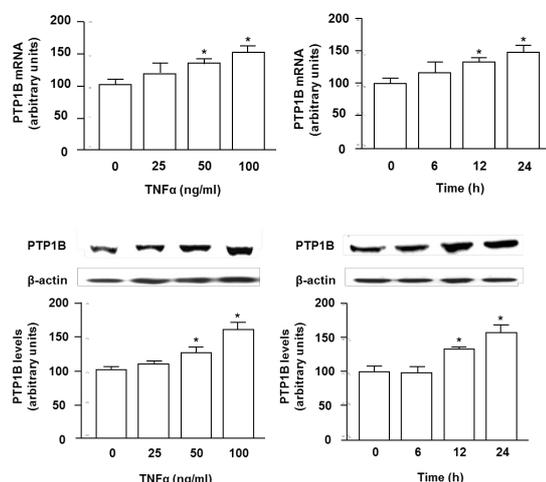
図 4. 炎症性サイトカイン TNF は視床下部の PTP1B 発現を増強する

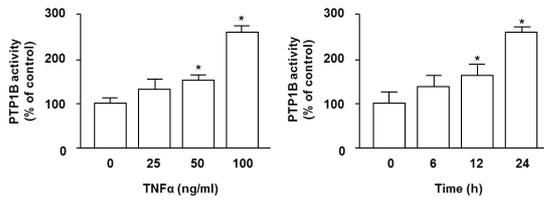


その結果、TNF は視床下部 PTP1B mRNA 発現を増強したが、IL6 および ER stressor である Thapsigargin (TG) および Tunicamycin (TM) は視床下部 PTP1B mRNA 発現に影響を与えなかった(図 4)。

(3)TNF の濃度や培養時間が PTP1B の発現や酵素活性に与える影響をラットの視床下部器官培養において検討したところ、TNF は濃度および時間依存性に視床下部 PTP1B mRNA、蛋白発現および活性を増強した(図 5)。

図 5. TNF は濃度および時間依存性に視床下部 PTP1B の発現および活性を増強する

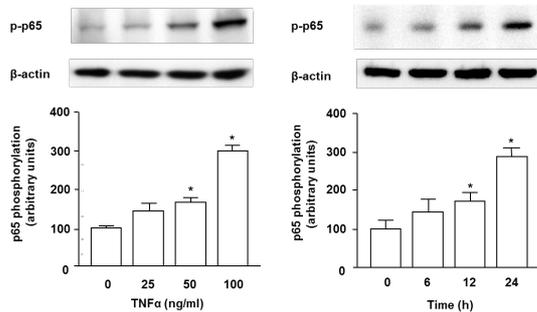




次に、TNF 刺激による PTP1B 発現および活性増強の機序を検討した。TNF 受容体以降には様々なシグナルの存在が知られているが、既報において、末梢レベルで TNF は NFκB を介して PTP1B 発現を増強したとの報告があることから NFκB pathway に着目した。

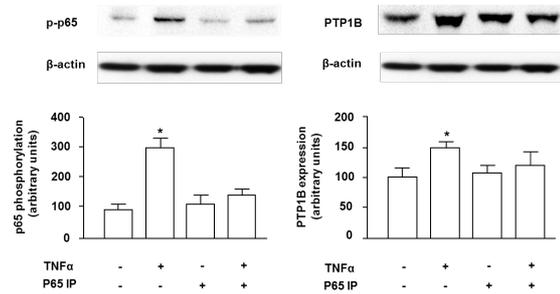
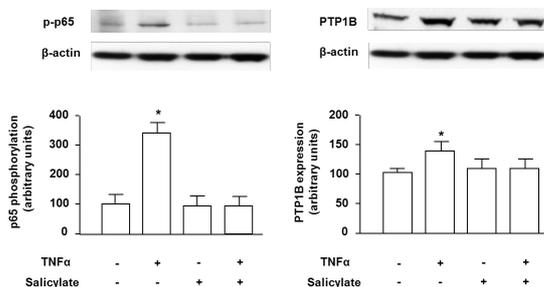
ラットの視床下部器官培養において TNF が NFκB pathway に与える影響を p65 のリン酸化で評価したところ、TNF は濃度依存性かつ時間依存的に p65 のリン酸化を増強した (図 6)。

図 6. TNF は濃度および時間依存性に p65 のリン酸化を増強する



ラットの視床下部器官培養において、TNF による PTP1B 発現の増強が NFκB pathway を介したものであるか否かを確認する目的で、NFκB 活性を阻害するサリチル酸もしくは、p65 リン酸化阻害剤である P65I を投与して検討した。

図 7. サリチル酸もしくは P65I 投与が TNF 投与による NFκB のリン酸化および PTP1B 発現に与える影響

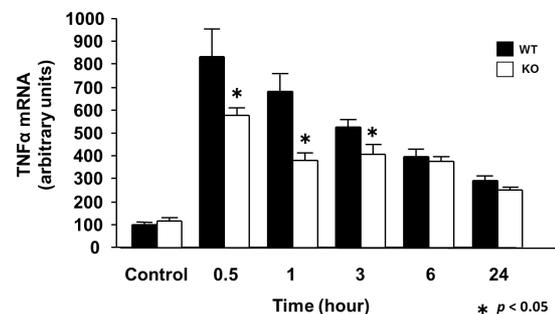


TNF 投与による NFκB のリン酸化の増加はサリチル酸投与により抑制され、TNF 投与による PTP1B 発現の増加はサリチル酸投与によりコントロールレベルまで抑制された。また、サリチル酸と同様に、TNF 投与による NFκB のリン酸化の増加は P65I 投与により抑制され、TNF 投与による PTP1B 発現の増加は P65I 投与によりコントロールレベルまで抑制された。サリチル酸もしくは P65I の単独投与は、p65 のリン酸化および PTP1B の蛋白発現に影響を与えなかった (図 7)。

以上の結果から、TNF は視床下部に直接作用し、NFκB pathway を介して視床下部 PTP1B の発現および活性を増強することが示された。また、これらの機序は、高脂肪食投与に伴い視床下部で生じるレプチンおよびインスリン抵抗性の一因である可能性が示唆された。

(4) TNF は、TNF 刺激によりその発現が増強することが知られている。そこで、PTP1B の存在の有無が TNF 刺激による TNF の発現にどのような影響を与えるかを調べる目的で、PTP1B KO および WT マウス由来の視床下部器官培養を行って視床下部 TNF の mRNA 発現を検討した。

図 8. TNF 刺激による視床下部 TNF の mRNA 発現は PTP1B KO マウスで減弱する

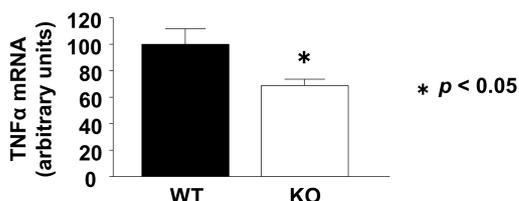


TNF 刺激による視床下部 TNF の mRNA 発現は、WT および KO 共にコントロール群と比較して有意に増加したが、その上昇は WT と比較して KO で有意に減弱した (図 8)。この結果から、肥満抵抗性モデル動物である PTP1B KO マウスでは、WT と比較して高脂肪食投与

に伴う視床下部炎症が拡大しにくい可能性が示唆された。

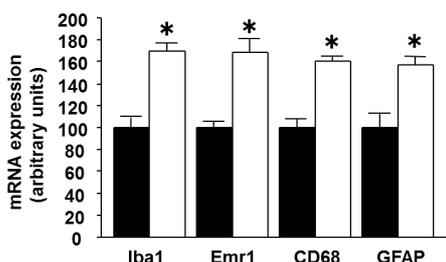
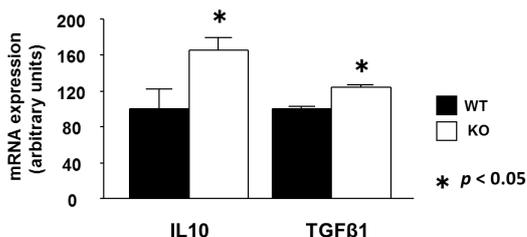
(5) PTP1B KO および WT マウスを用いた *in vivo* の系において、高脂肪食投与下で、両群間の体重差が無い7週齢の雄性マウスの視床下部における TNF mRNA 発現を検討したところ、WT と比較して KO マウスで有意な発現低下を認めた(図9)。

図9. 高脂肪食に伴う視床下部 TNF 発現は PTP1B KO マウスで減弱する



また、高脂肪食投与下で、視床下部における抗炎症性サイトカイン(IL10 および TGFβ1) および gliosis 関連遺伝子(Iba1, Emr1, CD68 および GFAP)の mRNA 発現を7週齢の雄性マウスの視床下部で検討したところ、抗炎症性サイトカインおよび gliosis 関連遺伝子の mRNA 発現は WT と比較して KO で有意な増加を認めた(図10)。

図10. PTP1B KO マウスにおける視床下部の抗炎症性サイトカインおよび gliosis 関連遺伝子の mRNA 発現



以上、図1~図10の結果から、高脂肪食投与に伴い発現が増加する視床下部 TNF が NFκB のリン酸化を介して視床下部 PTP1B の発現や活性を増強し、中枢におけるレプチンおよびインスリン抵抗性の一因となる可能性が示唆された。また、視床下部 PTP1B は TNF 刺激による視床下部 TNF の発現を増強する因子の一つである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

1. TNF increases hypothalamic PTP1B activity via the NF B pathway in rat hypothalamic organotypic cultures.
Ito Y, Banno R, Hagimoto S, Ozawa Y, Arima H, Oiso Y.
Regul Pept. 2012 Feb 10;174(1-3): 58-64. (査読あり)

[学会発表](計 6件)

1. The Endocrine Society 93rd Annual Meeting (June 4-7, 2011; Boston, USA)
TNF increases hypothalamic PTP1B expression via the NF B pathway in rat hypothalamic organotypic cultures.
Yoshihiro Ito, Ryoichi Banno, Shigeru Hagimoto, Yoshiharu Ozawa, Hiroshi Arima and Yutaka Oiso.
2. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (2011年5月19-21日、札幌プリンスホテル国際館パミール、札幌市)
TNF は NFκB を介して PTP1B の発現を増強する
伊藤 禎浩、坂野 僚一、萩本 繁、小澤由治、有馬 寛、大磯 ユタカ
3. 第37回日本神経内分泌学会学術集会 (2010年10月22-23日、京都大学医学部創立百周年記念施設 芝蘭会館、京都府京都市)
TNF による視床下部 PTP1B の発現および活性調節
伊藤 禎浩、坂野 僚一、萩本 繁、萩原大輔、小澤由治、森下啓明、有馬 寛、大磯 ユタカ
4. 第31回日本肥満学会 (2010年10月1-2日、前橋テルサ、前橋市)
TNF は視床下部においてレプチンシグナルを阻害する PTP1B の活性を増強する
伊藤 禎浩、坂野 僚一、萩本 繁、小澤由治、有馬 寛、大磯 ユタカ
5. The Endocrine Society 92nd Annual Meeting (June 19-22, 2010; San Diego,

USA)

Tumor Necrosis Factor- increases
Protein Tyrosine Phosphatase 1B
activity in rat hypothalamic
organotypic cultures.

Yoshihiro Ito, Ryoichi Banno,
Yoshiharu Ozawa, Hiroshi Arima and
Yutaka Oiso.

6. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会
(2010 年 5 月 27-29 日、岡山市デジタルミ
ュージウム、岡山市)

TNF は視床下部においてレプチンシグ
ナルを阻害する PTP1B の活性を増強する
伊藤禎浩、坂野僚一、萩本 繁、小澤由
治、有馬 寛、大磯ユタカ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂野 僚一 (BANNO RYOICHI)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80597865

(2)研究分担者

大磯 ユタカ (OISO YUTAKA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40203707

有馬 寛 (ARIMA HIROSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50422770

(3)連携研究者

なし