

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 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：23591350

研究課題名(和文) NPYニューロンに発現するグルココルチコイドレセプターの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of function of glucocorticoid receptor expressed in NPY neurons

研究代表者

有馬 寛 (Arima, Hiroshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50422770

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)：AgRPニューロン特異的にグルココルチコイドレセプターをノックアウトしたマウスに高脂肪食を投与したところ、野生型マウスと比較して白色脂肪重量、体重とも有意に低値を示した。また、褐色脂肪細胞におけるUCP1 mRNAの発現が有意に増加した。一方、野生型マウスの視床下部器官培養において、小胞体ストレスを惹起するタプシガルギンはp65のリン酸化を増強するとともにデキサメサゾンによるAgRPおよびNPY mRNA発現増強作用を減弱させた。また、p65の阻害剤はタプシガルギンのAgRPおよびNPY mRNA発現に及ぼす効果をキャンセルすることが示された。

研究成果の概要(英文)：Body weight and white adipose tissues weight were significantly less in AgRP neuro n-specific knockout of glucocorticoid receptor mice compared to wild-type mice when they were subjected to a high fat diet. The expression levels of UCP1 mRNA in the brown adipose tissues were significantly higher in the knockout mice than in wild-type mice. On the other hand, thapsigargin, an ER stressor, increased phosphorylation of p65 and attenuated expression of AgRP and NPY mRNA stimulated by dexamethasone in hypothalamic cultures of wild-type mice. Furthermore, it is demonstrated that inhibitor of p65 cancelled the effects of thapsigargin on the AgRP and NPY mRNA expression stimulated by dexamethasone.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：グルココルチコイドレセプター 視床下部 肥満

1. 研究開始当初の背景

エネルギーバランスに関与する種々の因子は摂食の一次中枢である視床下部弓状核において統合される。弓状核にはエネルギーバランスを正に調節するニューロペプチド Y (NPY)ニューロンが存在し、各種のシグナルがNPYニューロンの活性に影響を及ぼすことが報告されている。一方、副腎皮質で合成され血中に分泌されるグルココルチコイドは摂食亢進作用を有し、その過剰により肥満が生じるとともにその欠乏により痩が生じることが臨床的にも広く知られている。またレプチン遺伝子の異常により遺伝的に著明な肥満が生じる *ob/ob* マウスにおいても副腎を摘出すると体重が減少することが報告されていることから、グルココルチコイドがエネルギーバランスにおいて重要な役割を果たすことは明らかである。しかしながらグルココルチコイドがどのように中枢に作用してレプチンやインスリンなどのシグナルと連携してエネルギーバランスを調節するかについては明らかではなかった。我々はこれまでに *in vivo* の特性を維持した視床下部器官培養を用いて(1)グルココルチコイドは弓状核の NPY 発現を増強すること (Sato et al., 2005 *J Neurosci* 25:8657)、(2) 摂食抑制作用を有するインスリンはグルココルチコイドの存在下においてのみ NPY 発現を抑制すること (Sato et al., 2005 *J Neurosci* 25:8657)、(3) 摂食亢進作用を有するグレリンはグルココルチコイドの存在下においてのみ NPY 発現を増強すること (Goto et al., 2006 *Endocrinology* 147:5102)、(4) グルココルチコイドは視床下部 AMPK シグナリングの活性あるいは mTOR シグナルの抑制を介して NPY 発現を増強すること (Shimizu et al., 2008 *Endocrinology* 149:4544; Shimizu et al., 2009 *Peptides* 31:145) を明らかにした。以上の結果はエネルギーバランスに関与する種々のシグナルが弓状核 NPY ニューロンに

おいて統合される際にグルココルチコイドが不可欠であることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では Cre-loxP システムを用いて視床下部弓状核 NPY ニューロン特異的に GR の発現が低下したマウスを作成し、摂食量、体重などの表現型を検討する。NPY ニューロンには NPY と同じく摂食亢進作用を示す Agouti-related peptide (AGRP) が発現しているが、NPY の発現が脳内に広く分布しているのに対し AGRP の発現は弓状核に限局している。そのため本研究では AGRP のプロモーターにより Cre の発現が制御されたトランスジェニックマウス (AGRP-Cre 発現トランスジェニックマウス) とグルココルチコイドレセプター (GR) 遺伝子が loxP 配列によりはさまれたノックインマウス (GR^{lox} マウス) を交配することにより、NPY ニューロン特異的に GR が欠損したマウスを作成する。一方、ノックアウトマウスでは発生期から GR が欠損するために何らかの代償機構が働く可能性がある。さらにマウスから視床下部切片を作成して *in vivo* の特性を維持したまま視床下部器官培養を行い、NPY ニューロンに発現する GR のエネルギーバランスにおける役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では GR 遺伝子のエクソン3が loxP 配列により挟まれたマウス (GR^{lox} マウス) は European Mouse Mutant Archive (EMMA; ID-Number 02124) より購入した。また AGRP のプロモーターによりその発現が制御された Cre 発現トランスジェニックマウス (AGRP-Cre 発現トランスジェニックマウス) を交配させることにより NPY ニューロン特異的 GR ノックアウトマウスを作製した。こうして得られたノックアウトマウスと野生型マウスに普通食 (CE-2) もしくは高脂肪食

(60.1%の脂肪および15.6%の炭水化物)を投与して摂体重の変化を16週まで比較検討した。また野生型マウスから視床下部切片を作成して視床下部器官培養を行い、グルココルチコイドによるNPYおよびAgRPの遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

NPY ニューロン特異的なグルココルチコイドレセプターノックアウトマウスの作成

GR^{flox} マウスと AgRP-Cre 発現トランスジェニックマウスとの交配において、germ line の段階で recombination が生じて AgRP ニューロンのみではなく全身のグルココルチコイドレセプターノックアウトマウスを genotyping により除外し、NPY ニューロン特異的なグルココルチコイドレセプターノックアウトマウスのみを実験に使用した。

高脂肪食が AgRP 特異的なグルココルチコイドレセプターノックアウトマウスの体重、内臓脂肪に与える影響

高脂肪食(60.1%の脂肪および15.6%の炭水化物)を野生型、ノックアウトマウスの雄、雌ともにそれぞれに weaning 後の生後4週から16週齢まで合計12週間投与したところ、雌ではノックアウトマウスの体重が野生型マウスに比較して有意に低値を示した(図1)。

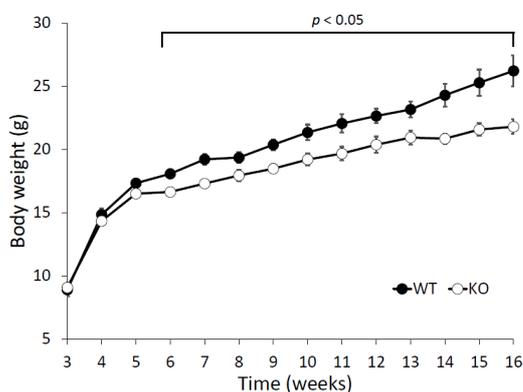


図1. 高脂肪食投与下でのノックアウトマウスと野生型マウスの体重の変化

一方雄でも減少の程度は雌ほどではないものの、ノックアウトマウスの体重には野生型マウスよりも低値を示した。

内臓白色脂肪重量

16週齢の雌ではノックアウトマウスの内臓白色脂肪重量が野生型マウスに比較して有意に低値を示した。

褐色脂肪におけるUCP1 mRNAの発現

16週齢の雌ではノックアウトマウスの褐色脂肪細胞におけるUCP1 mRNAの発現が野生型マウスに比較して有意に高値を示した(図2)。

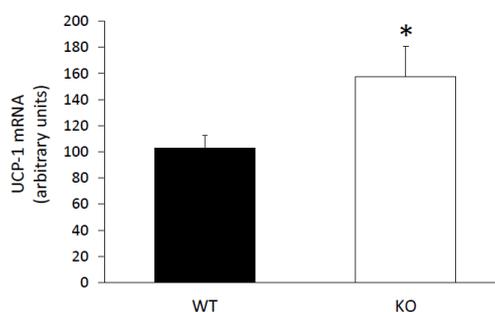


図2. ノックアウトマウスと野生型マウスの褐色脂肪細胞におけるUCP1 mRNAの発現

視床下部器官培養におけるグルココルチコイドによるNPY、AgRP mRNAの発現

視床下部器官培養においてデキサメサゾン(NPYおよびAgRP mRNAの発現を有意に増強した。一方、小胞体ストレスを惹起するトニカマイシンはデキサメサゾンによるNPYおよびAgRP mRNAの発現を有意に減弱させた(図3)。

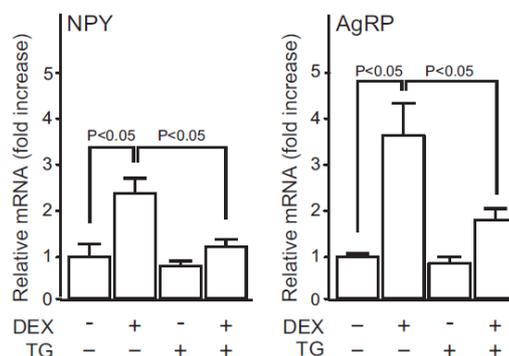


図 3. 小胞体ストレスがグルココルチコイドによる NPY および AgRP mRNA の発現に及ぼす影響

小胞体ストレスが視床下部の p65 発現に及ぼす影響

トニカマイシンは視床下部における p65 のリン酸化を有意に増加させた (図 4)。

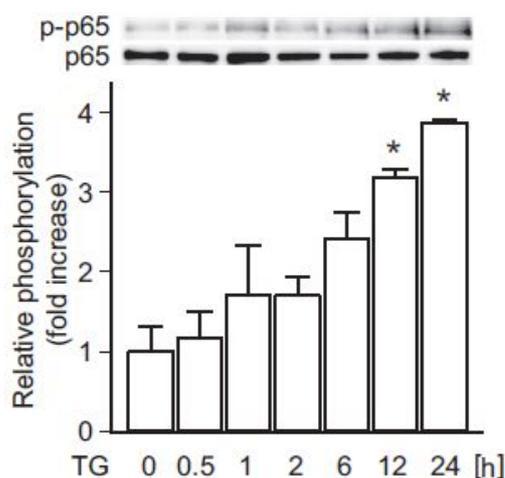


図 4. 小胞体ストレスが p65 のリン酸化に及ぼす影響

p65 を介したシグナルがのグルココルチコイドによる NPY、AgRP mRNA の発現に及ぼす影響

p65 シグナルの抑制は小胞体ストレスによる NPY、AgRP 発現の抑制を有意にキャンセルした (図 5)。

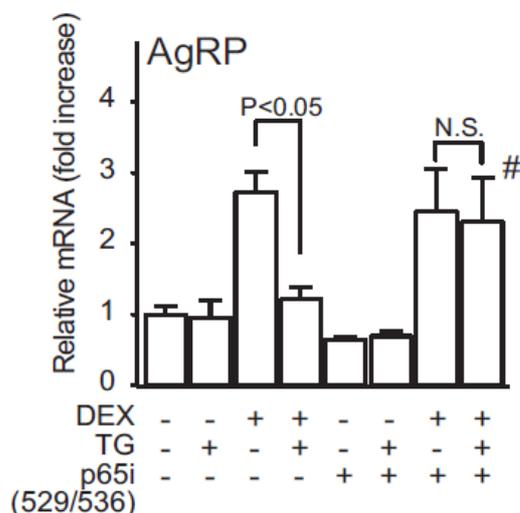


図 5. p65 シグナルの抑制が小胞体ストレスによる AgRP 発現に及ぼす影響

以上の結果から NPY ニューロン特異的にグルココルチコイドレセプターをノックアウトしたマウスは野生型マウスに比較して高脂肪食下で内臓脂肪および体重が有意に低値を示すこと、および褐色脂肪における UCP1 mRNA の発現が増強することが明らかとなった。すなわち、AgRP ニューロンのグルココルチコイドレセプターを介したシグナルは高脂肪食による肥満の発症・進展に関与していることが示唆された。また、視床下部器官培養の検討からは小胞体ストレスが視床下部の p65 シグナルを介してグルココルチコイドによる NPY、AgRP 発現を抑制することが明らかとなった。

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. Expression of neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA stimulated by glucocorticoids is attenuated via NF- κ B p65 under ER stress in mouse hypothalamic cultures. Hagimoto S, Arima H, Adachi K, Ito Y, Suga H, Sugimura Y, Goto M, Banno R, Oiso Y. *Neurosci Lett*. 2013 Oct 11;553:165-9. (査読有)

[学会発表](計3件)

1. 第 87 回日本内分泌学会学術総会 (2014 年 4 月 24-26 日、福岡国際会議場、福岡) AgRP ニューロン特異的グルココルチコイド受容体ノックアウトマウスは高脂肪食下で肥満抵抗性を示す 柴田みゆき、坂野 僚一、恒川卓、尾上剛史、足立 浩一、

伊藤 禎浩、後藤 資実、有馬 寛、大磯 ユ
タカ

2. The 36th Naito Conference on Molecular Aspects of Energy Balance and Feeding Behavior (シャトレーゼガトーキングダムサッポロ、札幌) 2013, September 10-13. Mechanisms underlying glucocorticoid-induced changes in feeding behavior. Arima H
3. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2013年5月16-18日、ホテル日航熊本、熊本) マウス視床下部器官培養において小胞体ストレスはグルココルチコイドシグナルを減弱させる 萩本 繁、有馬 寛、柴田みゆき、足立 浩一、伊藤 禎浩、森下 啓明、後藤 資実、坂野 僚一、大磯 ユ
タカ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(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

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

(3)連携研究者

なし