

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592277

研究課題名(和文) 視床下部弓状核を介した中枢性骨代謝調節とその破綻機序の解明

研究課題名(英文) The regulation of bone metabolism by arcuate nucleus in hypothalamus

研究代表者

中田 正範 (NAKATA, Masanori)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10305120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：中枢性骨代謝調節のメカニズムには不明な点が多い。本研究では、摂食中枢である視床下部弓状核のAgouti-related protein (AgRP)ニューロンのPDK1に着目し、Cre-loxPシステムを用いて各ニューロン特異的なPDK1ノックアウト(KO)マウスの骨代謝を解析した。AgRPニューロン特異的PDK1 KOマウスで低身長と骨密度の低下を認めた。PDK1の下流シグナル分子であるFoxO1の抑制型を発現させることで、ノックアウトマウスの表現型は是正された。これらの結果から、弓状核のAgRPニューロン内のPDK1-FoxO1シグナリングが骨代謝調節に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Bone metabolism is regulated substantially by the central nervous system. The agouti-related protein (AgRP) neurons in hypothalamic arcuate nucleus play an essential role in energy metabolism. Previously, we reported that the PDK1-FoxO1 pathway in AgRP neurons regulates the feeding. However, its relationship to bone metabolism remains unknown. This study aimed to explore the role of AgRP neuron's PDK1 and FoxO1 in bone metabolism by analyzing AgRP neuron-specific PDK1 knockout mice and those with additional expression of dominant negative (DN) FoxO1. In KO mice, as compared with AgRP Cre mice, the stature and femur length were shorter. The bone formation was delayed via the hyposecretion of GH and IGF-1. Moreover, these disorders of bone metabolism in KO mice were rescued by expression of DN FoxO1. These results indicate that FoxO1 regulates PDK1 in AgRP neurons and that this neuronal signaling is linked to regulation of bone metabolism.

研究分野：生理学

キーワード：骨代謝 弓状核 AgRP ニューロン PDK1 FoxO1 IGF-1 摂食調節 成長ホルモン

1. 研究開始当初の背景

小児期・成人期・老年期に亘り、骨代謝調節が健全に営まれることは重要である。しかし、現代社会の環境変化は、生活習慣病を惹起すると同時に健全な骨代謝調節を破綻させる要因を多く含んでいる。メタボリックシンドロームや糖尿病のメタ解析で、1型および2型糖尿病患者では大腿骨頸部骨折リスクが高いことが報告されている。さらに、後縦靭帯骨化症と肥満・インスリン抵抗性の関連も報告されている。しかし、メタボリックシンドロームや糖尿病における骨代謝異常の病態機序はほとんど解明されていない。

全身のエネルギー代謝調節には臓器間ネットワークを介した制御が必須であり、メタボリックシンドロームにおける骨代謝調節破綻は末梢組織での変調に加えて、中枢神経系および中枢・末梢連関の変調が一因であると考えられる。摂食抑制因子であるレプチンが視床下部を介して交感神経系を制御し骨量をコントロールするという報告がなされ、中枢神経と骨の臓器間クロストークは注目を集めている (Ducy P. et al. Cell 2000, Takeda S et al. Cell. 2002)。しかし、どの神経核が骨代謝調節の中枢であるかは未だ不明である。申請者は、摂食・エネルギー代謝の中枢である視床下部弓状核、特にそこに局在する Agouti-related protein (AgRP)ニューロンと、Proopiomelanocortin (POMC)ニューロンに注目した。申請者はこれまでに、(1) 弓状核の両ニューロンにおけるインスリン・レプチンシグナルには PI3-Kinase-3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDK1)経路が重要であることを明らかにし、さらに(2)AgRP 及び POMCニューロン特異的 PDK1 ノックアウトマウスを作成し、摂食・エネルギー代謝の解析を報告している (PLoS One 2011. Am J Physiol. 2010)。2つのニューロンは摂食・エネルギー代謝調節に重要であるが、骨代謝における役割は未知である。さらに、弓状核は交感神経の中枢である腹内側核と室傍核に神経投射している事より、インスリン・レプチンは弓状核を介して骨代謝調節を行うという仮説を立てた。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームや糖尿病では骨代謝調節異常が合併することが明らかとなっている。しかし、生活習慣病が骨代謝を破綻させる機序、特に中枢神経性成因の機序はほとんど解っていない。本研究では、エネルギー代謝調節の中枢である視床下部弓状核が骨代謝をも調節するとの仮説を立てこれを検証し、さらに弓状核の変調による骨代謝異常を調べた。

3. 研究の方法

(1) AgRPニューロンまたは POMCニューロン特異的 PDK1 ノックアウトマウスの骨代謝

を解析した。AgRP または POMC プロモーター制御で Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウス (AgRP Cre マウス, POMC Cre マウス) と PDK1^{flox/flox} マウスを交配させ 2 種類の AgRP ニューロンまたは POMC ニューロン特異的 PDK1 ノックアウト(KO)マウスを作成した。両 KO マウスに対して、全長・四肢・長管骨の骨格評価を 3 次元 CT 装置 (LaTheta) 等の生体イメージングにより解析した。CT 解析では、皮質骨と海綿骨の骨密度、二次極モーメントにより骨強度を定量した。対照には、AgRP Cre マウスと POMC Cre マウスを用いた。

(2) PDK1 の下流のシグナル分子として転写因子 Forkhead box protein O1 (FoxO1) の関与を検討した。PDK1 の下流シグナル分子の一つは FoxO1 である。そこで、dominant negative (DN) FoxO1 を Cre recombinase により発現するマウスを作製し、両 KO マウスと交配することで、ニューロン特異的 DN FoxO1 発現ノックアウトマウスを作製し、ノックアウトマウスの骨代謝異常が FoxO1 依存性であるかを検討した。

(3) 骨代謝異常を呈する KO マウスにおける血液および骨組織の生理活性物質の測定を行った。骨代謝関連ホルモン等の測定と骨組織形態解析による膜性骨化、軟骨骨化の障害程度の評価を行った。

(4) 骨代謝異常を呈する KO マウスにおける弓状核の下流神経核と標的神経ペプチドの発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 作製した 2 系統の KO マウスの骨代謝を解析した結果、AgRP ニューロン特異的 PDK1 ノックアウトマウスで有意な体長および大腿骨長の短縮を認めた(下図)。この表現型は雌マウスで顕著であったため、以後は雌マウスを用いて解析を行った。大腿骨の骨密度は AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスで有意に低下していた。(この結果を日本肥満学会で報告した。)



図マウスの単純 X 線の画像

(2) AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスの体長および大腿骨長の短縮は、DN FoxO1 発現では正された。また大腿骨の骨密度も対照の Cre マウスと同程度に改善した。これらの結果から、弓状核の AgRP ニューロン内の PDK1-FoxO1 シグナリングが骨代謝調節に重要であることが明らかになった。

(3) AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスの骨組織形態解析による膜性骨化、軟骨骨化の障害程度の評価により、AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスでは骨形成速度の遅延が認められた。一方、骨組織の遺伝子発現では、有意な変化を認めなかった。血中骨代謝マーカーではオステオカルシンが AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスで有意に低下していた。さらに血中の IGF-1 も AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスで低下していた。これらの結果から、AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスでの骨代謝異常は IGF-1 の低下による骨形成の遅延が病因であると考えられた。

(4) AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスで、IGF-1 の発現低下を認めたので、次に Growth hormone (GH) の血中の濃度の測定を行なった。AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスでは IGF-1 と同様に GH の血中濃度が低下していた。この AgRP ニューロン特異的 PDK1 KO マウスにおける GH の低下は、DN FoxO1 発現により改善した。

(5) 本研究では、AgRP ニューロンによる GH 分泌調節のメカニズムの詳細な解析は行えなかったが、AgRP ニューロンに共局在する NPY が Y2 受容体を介して GH 分泌を調節する事が本研究期間中に他施設から報告されている(Huang LJ Neurosci. 2014)。これらの他施設の研究報告と合わせて総合的に考察すると、本研究は弓状核 AgRP ニューロンの PDK1-FOXO1 シグナリングは GH - IGF-1 系を介して骨成長を調節することを初めてが明らかにした研究である。当初の研究目標である、「弓状核が骨代謝中枢である」との仮説の実証はし得たと言える。

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 13 件)

Nakata M, Gantulga D, Santoso P, Zhang B, Masuda C, Mori M, Okada T, Yada T. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 supports oxytocin and vasopressin neurons to control feeding behavior and fluid balance in male mice. *Endocrinology* 2016 Jun;157(6):2322-32. doi: 10.1210/en.2015-2082. 査読有

Nakata M, Yamamoto S, Okada T, Gantulga D, Okano H, Ozawa K, Yada T. IL-10 gene transfer upregulates arcuate POMC and ameliorates hyperphagia, obesity and diabetes by substituting for leptin. *Int J Obes*

(Lond). 2016;40:425-433.

doi: 10.1038/ijo.2015.201. 査読有

Suyama S, Kodaira-Hirano M, Otgon-Uul Z, Ueta Y, Nakata M, Yada T. Fasted/fed states regulate postsynaptic hub protein DYNLL2 and glutamatergic transmission in oxytocin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuropeptides*. 2015;56:115-123.

doi: 10.1016/j.npep.2015.08.008. 査読有

Darambazar G, Nakata M, Okada T, Wang L, Li E, Shinozaki A, Motoshima M, Mori M, Yada T. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochem Biophys Res Commun*. 456:913-918, 2015.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.065. 査読有

Kurita H, Xu KY, Maejima Y, Nakata M, Dezaki K, Santoso P, Yang Y, Arai T, Gantulga D, Muroya S, Lefor AK, Kakei M, Watanabe E, Yada T. Arcuate Na^+ , K^+ -ATPase senses systemic energy states and regulates feeding behavior through glucose-inhibited neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;309:E320-333.

doi: 10.1152/ajpendo.00446.2014. 査読有

Kozuka C, Sunagawa S, Ueda R, Higa M, Ohshiro Y, Tanaka H, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Matsushita M, Tsutsui M, Ishiuchi S, Nakata M, Yada T, Miyazaki JI, Oyadomari S, Shimabukuro M, Masuzaki H. A novel insulinotropic mechanism of whole grain-derived γ -oryzanol via the suppression of local dopamine D2 receptor signaling in mouse islet Br J Pharmacol. 2015;172: 4519-4534

doi: 10.1111/bph.13236. 査読有

Katsurada K, Maejima Y, Nakata M, Kodaira M, Suyama S, Iwasaki Y, Kario K, Yada T. Endogenous GLP-1 acts on paraventricular nucleus to suppress feeding: projection from nucleus tractus solitarius and activation of corticotropin-releasing hormone, nesfatin-1 and oxytocin neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 451:276-281,2014.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.116. 査読有

Aoki H, Nakata M, Dezaki K, Lu M, Gantulga D, Yamamoto K, Shimada K, Kario K, Yada T: Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. *Endocr J* 60(5): 571-581, 2013.

doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0371 査読有

Sedbazar U, Maejima Y, Nakata M, Mori M, Yada T.: Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 rises in synchrony with feeding suppression during early light phase in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 434(3):434-438, 2013.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.090. 査読有

Yang Y, Shimomura K, Sakuma K, Maejima Y, Iwasaki Y, Galvanovskis J, Dezaki K, Nakata M, Yada T.: Bupropion can close KATP channel and induce insulin secretion. *J Pediatr Endocrinol*

Metab 26(3-4): 343-346, 2013.

doi: 10.1515/jpem-2012-0295. 査読有

Iwasaki Y, Shimomura K, Kohno D, Dezaki K, Ayush EA, Nakabayashi H, Kubota N, Kadowaki T, Kakei M, Nakata M, Yada T.: Insulin activates vagal afferent neurons including those innervating pancreas via insulin cascade and Ca²⁺ influx: its dysfunction in IRS2-KO mice with hyperphagic obesity. PLoS ONE 8(6):e67198, 2013.

doi: 10.1371/journal.pone.0067198. 査読有

Manaka K, Nakata M, Shimomura K, Rita RS, Maejima Y, Yoshida M, Dezaki K, Kakei M, Yada T.: Chronic exposure to valproic acid promotes insulin release, reduces KATP channel current and does not affect Ca²⁺ signaling in mouse islets. J Physiol Sci 64(1):77-83, 2013.

doi: 10.1007/s12576-013-0294-3. 査読有

Gantulga D, Maejima Y, Nakata M, Yada T.: Glucose and insulin induce Ca²⁺ signaling in nesfatin-1 neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. Biochem Biophys Res Commun 420(4): 811-815, 2012.

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.079. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

Nakata M, Santoso P, Wang L, Yada T.: Paraventricular nucleus NUCB2/nesfatin-1 neurons regulate feeding and glucose metabolism. Keystone Symposia Conference, Kyoto, Japan, October 25-29, 2015

中田正範, 矢田俊彦: インクレチン PACAP による肝臓インスリン感受性と糖新生の調節. 第2回肝臓と糖尿病・代謝研究会, 2015. 5.23, 下関

中田正範, Darambazar Gantulga, 王磊, 矢田俊彦: 室傍核 NUCB2/nesfatin-1 ニューロンによる摂食調節. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会第92回日本生理学会大会合同大会, 2015. 3.21-23, 神戸

中田正範, 小平美里, 王磊, 李恩旭, 矢田俊彦: 低血糖に対する糖代謝応答における Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide の意義. 第35回日本肥満学会, 2014. 10.24-25, 宮崎

中田正範, Gantulga Darambazar, 小平美里, 李恩旭, 矢田俊彦: 視床下部室傍核を介した代謝・食欲・血圧調節. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014. 5.22-24, 大阪

中田正範, Gantulga Darambazar, 小平美里, 矢田俊彦: 室傍核 Nesfatin-1/NUCB2 ニューロンによる代謝・循環調節. 第34回日本肥満学会, 2013. 10.11-12, 東京

中田正範, 森昌朋, 矢田俊彦: 膵島内 Nesfatin-1/NUCB2 による膵β細胞機能調節機構の多面性. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013. 5.16-18, 熊本

中田正範, 笹沼秀幸, 中江淳, 矢田俊彦: 弓状核 AgRP ニューロン特異的 PDK1 欠損マウスの骨代謝異常. 第33回日本肥満学会,

2012. 10.11-12, 京都

中田正範, 矢田俊彦: DPP-4 阻害剤の標的としての膵島内 PACAP. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012. 5.17-19, 横浜

〔図書〕(計2件)

中田正範, 矢田俊彦: 摂食概日リズムと視床下部. アンチ・エイジング医学, 10(2), 46-51, 2014

中田正範, 矢田俊彦: 摂食調節機構と神経ペプチド. 医学のあゆみ, 250(9), 785-789, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

www.jichi.ac.jp/physio2/physiol_new_HP2008/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 正範 (NAKATA, Masanori)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10305120

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: