

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790947

研究課題名(和文)糖質コルチコイド過剰により惹起される過食・肥満形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of glucocorticoid-induced overeating and obesity

研究代表者

中山 修一 (NAKAYAMA, Shuichi)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20457394

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)：本研究では、糖質コルチコイド過剰による過食・肥満の機序を、AgRP、POMC、NPYといった視床下部の食欲関連遺伝子の検討により明らかにした。本研究では、レプチンノックアウトマウスであるob/obマウスと、レプチンおよびCRHをノックアウトしたダブルノックアウトマウス(DKOマウス、すなわち、グルココルチコイドが産生されない)を用いて検討した。

ob/obマウスと比較して、DKOマウスでは、過食・肥満が軽減しており、視床下部の検討では、AgRP mRNAの発現量が有意に低下していた。すなわち、グルココルチコイド惹起性過食・肥満は、視床下部AgRPが重要な役割を担っている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed the mechanism of glucocorticoid induced overeating and obesity by considering expression of AgRP, POMC and NPY gene known as appetite-related gene. We produced CRH-Leptin double knockout(DKO, glucocorticoid absence) mice and compared to ob/ob mice(leptin knockout mice) about food intake, fat weight and hypothalamus appetite-related gene.

In this study, the DKO mice showed less eating and obesity compared to ob/ob mice. And in hypothalamus, the expression of AgRP mRNA of DKO mice was significantly reduced compared to ob/ob mice. This study showed AgRP gene in hypothalamus has important role about glucocorticoid induced overeating and obesity.

研究分野：グルココルチコイドによる肥満・過食

キーワード：グルココルチコイド AgRP 肥満 過食

1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド過剰状態は、日常臨床で良く目にする病態である。クッシング症候群や、ステロイド投与時がそれにあたるが、しばしば患者の過食・肥満に悩まされる。我々は、グルココルチコイド過剰状態によって引き起こされる過食・肥満の詳細なメカニズムを検討するため、今回の研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、糖質コルチコイド過剰に伴う肥満・過食形成の分子機序を解明するために、レプチン・CRH-DKO マウスを用いた解析を実施、神経細胞株を用いた検討も追加する。

(1) 野生型マウス、ob/ob マウス、レプチン・CRH-DKO マウス、レプチン・CRH-DKO マウス + 糖質コルチコイド補充の 4 群を用いて、視床下部・脳幹部における糖質コルチコイド標的遺伝子の探索を行う (DNA マイクロアレイ)。

(2) 同 4 群を用いて、糖質コルチコイド標的候補遺伝子の組織における再現性確認、組織発現部位の同定を行う (リアルタイム PCR, in situ hybridization)。

(3) 神経細胞 (BE(2)C) を用いて、標的候補遺伝子に対する糖質コルチコイドの直接効果を明らかにする (Luciferase アッセイ、Western プロット)。

3. 研究の方法

(1) DKO マウスにおける摂食量、体重、脂肪重量の測定のため、8 週齢雄性の野生型マウス (n=12)、ob/ob マウス (n=12)、レプチン・CRH-DKO マウス (n=11)、レプチン・CRH-DKO マウス + 糖質コルチコイド補充 (コルチコステロンペレット植え込み, n=10) の 4 群間で下記項目につき比較検討を行う。

まず、週齢数ごとの摂食量・体重推移を記録。8 および 12 週齢において体幹部各領域の脂肪重量を測定する。

次いで、上記週齢において、グルコース、インスリン、コルチコステロン、レプチン、アディポネクチン血中濃度を測定する。

(2) DKO マウス視床下部・脳幹部における発現遺伝子の網羅的解析 (DNA マイクロアレイ) のため、上記同様の 4 群において、視床下部・脳幹部における発現遺伝子を網羅的に解析する。

凍結した脳組織より各領域 (視床下部 (Bregma 後方 0.0~3.0mm): 弓状核、室傍核、腹内側核、背内側核、外側野を含む 脳幹部 (Bregma 後方 5.3~8.0mm): 孤束核、青班核を含む) を含んだ 300 μm 冠状断切片をクライオスタットにて作成する。鋭利なメスを用いて、脳組織 (冠状断切片) より視床下部および脳幹部を正確に切離する。切離した

視床下部、脳幹部組織より RNA を抽出して、発現遺伝子を DNA マイクロアレイ (アジレント社受託解析) を用いて網羅的に解析する。

4. 研究成果

(1) レプチン・CRH-DKO マウスの作成

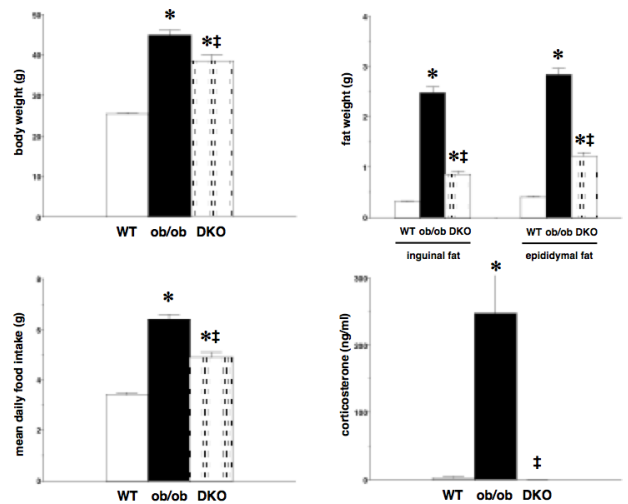
レプチン欠損した ob/ob マウスと CRH 欠損により糖質コルチコイド低下を来す CRH-KO マウスを交配し、レプチン・CRH-DKO マウスを作成した。

各表現型は下記の通りとなった。



左から野生型 (WT)、CRH-KO、ob/ob、DKO マウス

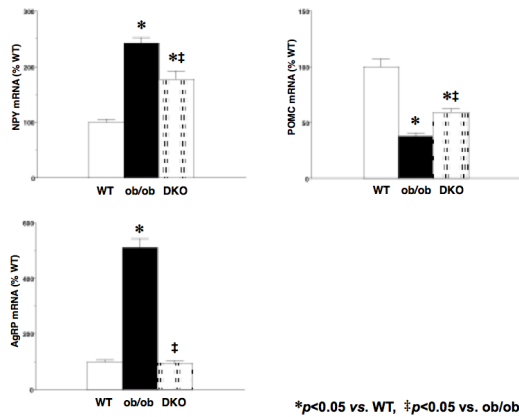
まず、WT、ob/ob、DKO 各群間の体重、脂肪量、血中コルチコステロン濃度を測定した。



*p<0.05 vs. WT, †p<0.05 vs. ob/ob

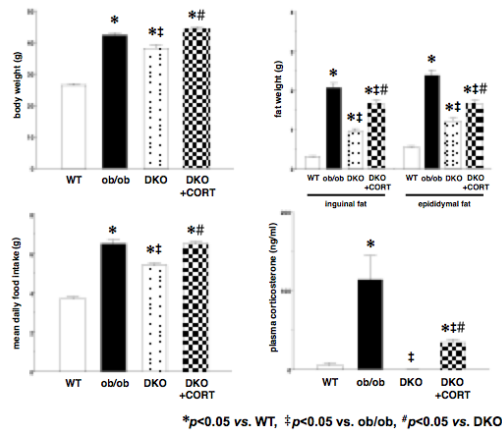
このように、DKO マウスでは、ob/ob マウスに比較して、肥満・過食の軽減が認められた。

さらに、これらのマウス大脳視床下部を採取。Total RNAを抽出した上で、リアルタイムPCRにより、摂食関連遺伝子である Neuropeptide Y (NPY)、Proopiomelanocortin (POMC)、Agouti-related protein (AgRP) mRNA を測定した結果を以下に示す。

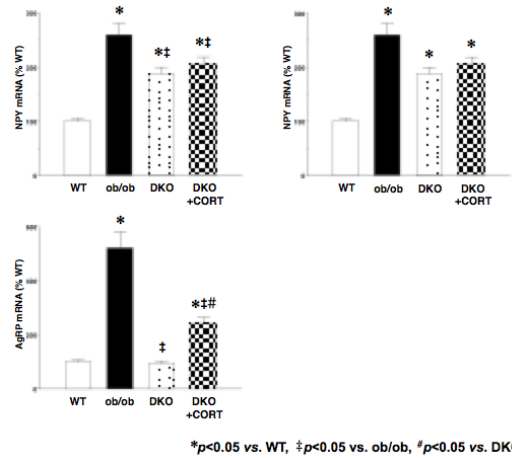


このように、ob/ob マウスで見られる視床下部 NPY、AgRP mRNA 増加や、POMC mRNA 減少などの変化が、DKO マウスでは有意に減弱していることが示された。すなわち、コルチコステロンの欠損により、NPY、AgRP の発現が低下、POMC の発現が増加し、結果として肥満・過食の軽減を引き起こしたと考えられた。この事をさらに証明するため、方法に記載したごとく、DKO マウスにコルチコステロンを補充した場合 (DKO+CORT) について検討を行った。

まず、各群の脂肪量、摂食量、血中コルチコステロン濃度について示す。



DKO マウスにて見られた肥満・過食の軽減が、DKO+CORT では増悪していることがわかる。さらに、前回の実験でも検討した、視床下部食欲関連遺伝子についても同様の検討を行い、以下の結果を得た。

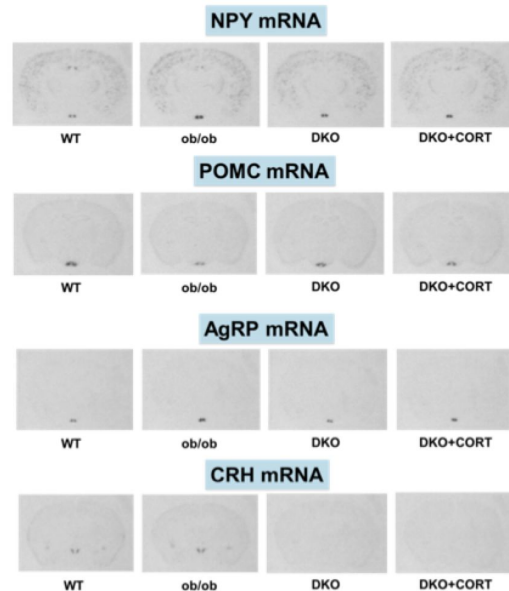


DKO と DKO+CORT を比較すると、NPY および POMC mRNA 発現量に関しては有意な差を認めなかったが、AgRP mRNA の発現量に関してのみ有意な差を認めた。すなわち、コルチコステロンの補充によって引き起こされる過食・肥満は、AgRP の発現量増加によってもたらされている可能性が示された。

(2) in situ hybridization

以上より、視床下部の AgRP mRNA が、グルココルチコイド過剰状態における過食・肥満に参与している事が示唆された。

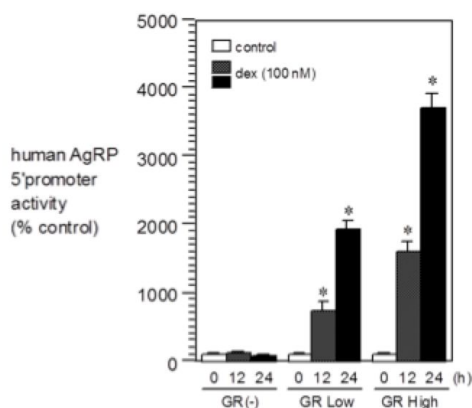
次いで我々は、方法(2)に記載した方法により、脳組織の薄切切片を作成し、in situ hybridization法にて視床下部 mRNA の発現量について検討を行った。



前述の Total RNA によるリアルタイム PCR の結果に即した形で、AgRP mRNA の発現が変化していることが視覚的に理解できる。

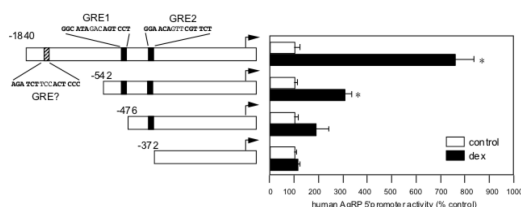
(3)神経細胞株を用いての検討

以上、グルココルチコイドによる肥満・過食に関しては、AgRP 発現量が重要な役割を担っている事が明らかになった。また、AgRP 遺伝子 5' 側転写調節領域には、グルココルチコイドレセプターエレメント (GRE) が存在しており、グルココルチコイドによる AgRP 発現量増加は、直接的な作用によるものが示唆されている。このため、ヒト BE2C 細胞を用いて、デキサメサゾン添加による AgRP 遺伝子転写活性に与える影響を、レポーターアッセイにて解析した。また、AgRP 遺伝子の deletion mutant を作成し、同様にデキサメサゾン添加による効果を解析した。



GR を添加しない状態では、AgRP 転写活性は増加しないが、GR の添加に伴い、AgRP の転写活性が上昇している事が分かる。

下記に deletion mutant を用いての検討を示す。



このように、GRE 様の配列を Deletion することにより、その効果が消失している事がわかる。

以上のことをまとめると、DKO のグルココルチコイド補充により、過食・体重増加に伴い、AgRP mRNA の増加も見られたことから、糖質コルチコイド過剰に伴う肥満・過食形成には、視床下部 AgRP 増加の関与が示された。また、神経細胞株を用いた検討により、グルココルチコイドによる AgRP 転写活性促進が確認された。

一方、レドックス制御に関わるチオレドキシシン相互作用蛋白 (TXNIP) が、食欲や耐糖能異常に関与することが近年報告されている。TXNIP はグルココルチコイドにより発現誘導

されるとの報告もあり、グルココルチコイド過剰による肥満・耐糖能障害の惹起に關与する可能性も考えられた。

本来であれば、視床下部・脳幹部をもちいた、マイクロアレイによるグルココルチコイド標的遺伝子の網羅的検索を行う予定であったが、TXNIP も標的遺伝子の可能性があるため、予定を変更し、TXNIP の関与を明らかにするための実験を追加した。

雄性 8 週齢 C57/BL6 マウスにグルココルチコイドを持続投与し肥満を誘導した上で、視床下部 TXNIP mRNA の発現量を検討した。結果、視床下部 TXNIP 発現量の有意な増加が認められた (TXNIP/GAPDH: placebo 100.0 ± 9.9, CORT 133.2 ± 8.4, P < 0.05)。この事より、視床下部 TXNIP はグルココルチコイド惹起性肥満の発症に關与する可能性が示唆された。

なお、研究代表者は「視床下部 Agouti 関連蛋白のクッシング症候群における役割の解明」の題目で、平成 27 年度より科研費 (若手研究 B) を取得している。今後は、AgRP ノックアウトマウスを用いて、クッシング症候群における AgRP の役割および糖質コルチコイドの視床下部標的遺伝子についての検討を、引き続き行っていきたい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

西山 充、中山修一ほか、グルココルチコイドによるチオレドキシシン相互作用蛋白 (TXNIP) の発現調節、第 88 回日本内分泌学会学術総会、2015 年 4 月 23 日~4 月 25 日、東京都、ホテルニューオータニ

西山 充、中山修一ほか、グルココルチコイド過剰状態における視床下部チオレドキシシン相互作用蛋白 (TXNIP) 発現の検討、第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日~4 月 26 日、福岡、福岡国際会議場

中山修一、西山 充ほか、グルココルチコイド惹起性肥満における視床下部 Agouti 関連蛋白の役割、第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日~4 月 27 日、仙台、仙台国際センター

中山修一、西山 充ほか、グルココルチコイド惹起性肥満における視床下部 Agouti 関連蛋白の役割、第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 11 日~10 月 12 日、京都、ホテルグランヴィア京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 修一 (NAKAYAMA, Shuichi)
高知大学 教育研究部医療学系 助教
研究者番号: 20457394