

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460310

研究課題名(和文) 視床下部Sirt1とFoxO1による全身エネルギーバランス制御機序の解析

研究課題名(英文) Hypothalamic Sirt1 and FoxO1 in energy balance regulation

研究代表者

佐々木 努 (Sasaki, Tsutomu)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：50466687

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)：視床下部には、末梢の栄養情報を統合し、摂食・エネルギー消費を制御する体重調節の中樞が存在する。体重調節中枢は若齢時には体重は一定範囲内に制御しているが、加齢に伴いこの制御機構が徐々に破綻して「中年太り」が起こる。この中枢性エネルギー恒常性破綻がメタボリックシンドロームや病気につながり、健康寿命が短縮される。

我々は、インスリン抵抗性の標的転写因子FoxO1変異体およびSIRT1を特定細胞集団のみに発現できる遺伝子組み換えマウスを用いて、視床下部でのインスリン抵抗性によって起きる肥満をSIRT1が是正できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The hypothalamus is the center for body weight regulation, and controls regulating appetite and energy expenditure by integrating energy information delivered from the peripheral tissues. The hypothalamus can maintain the body weight within a certain range while young, but the hypothalamic system gradually deteriorates with aging, leading to weight gain during middle age. The disruption of the central energy homeostasis leads to metabolic syndrome and diseases, ultimately shortening healthy lifespan.

By using the genetic model of central insulin resistance, we showed that SIRT1 can ameliorate the obesity caused by insulin-resistant FoxO1 in the hypothalamus. In principle it proved the concept that SIRT1 improves the function of the central energy homeostasis center by improving insulin sensitivity.

研究分野：生理学

キーワード：Sirt1 Foxo1 インスリンシグナル 視床下部 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

過食に伴う肥満はメタボリックシンドロームの一因である。メタボリックシンドロームとその予備軍は日本では2000万人ほどおり、大きな社会的な健康リスクである。メタボリックシンドロームではインスリン抵抗性という現象が引き起こされるが、インスリンは中枢神経系に作用して摂食を抑制することが知られている。すなわち、中枢性のインスリン抵抗性はさらなる過食を誘発し、肥満を助長する一因となる。

他方、摂取カロリー制限は多くの動物種で健康・長寿をもたらすことが知られており、その責任遺伝子としてサーチュイン遺伝子が注目されている。その中でも哺乳類ではSirt1が重要であると考えられている。

我々はこれまでに視床下部のインスリンシグナルおよびSirt1が摂食調節に果たす役割を定位脳手術によるアデノウイルスベクターの微小注入法で検討してきた。しかしながら、前述の定位脳手術による検討では短期間(2週間)の経過観察しかできない技術的な問題があり、長期的に見て「Sirt1は中枢性のインスリン抵抗性による過食・肥満を改善できるか」どうか未解決の課題として残った。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変マウスの交配を通して、以下の2点を解明することを目的とした。「

(1) Sirt1は中枢性のインスリン抵抗性による過食・肥満を改善するか？」

(2)「Sirt1による加齢性肥満の抑制にインスリンシグナルが貢献するか？」

3. 研究の方法

(1) 交配によるPomcニューロン特異的Foxo1/Sirt1ダブルノックインマウスの作成

Creリコンビナーゼ依存性にRosa26座位から発現が誘導される核内滞留型Foxo1と野生型Sirt1の遺伝子組換え動物と、Pomc-Creマウスを交配させ、目的とする遺伝子組換え動物を作成した。

(2) マウスの表現型解析

実験群のマウスの体重の経過観察を離乳後半年間(週1回)行った。また、25-26週齢で摂食量、28週齢で呼吸代謝・行動量解析を行い、組織のサンプリングを行った。

(3) POMCニューロン数の組織学的解析

視床下部組織切片を作成し、ダブルノックインマウスのPOMCニューロン数を検討した。本検討には、28週齢まで表現型解析に用いる群とは別の成獣(12週齢)のオスのダブルノックインマウスを用いた。

(4) 視床下部培養細胞N41を用いた検討

視床下部培養細胞N41に対して、核内滞留型Foxo1およびSirt1発現アデノウイルスを感染させ、Foxo1の細胞内局在とタンパク量への影響をウェスタンブロット法で検討した。

4. 研究成果

(1) 交配によるPomcニューロン特異的Foxo1/Sirt1ダブルノックインマウスの作成

マウスは胎生致死ではなく、雌雄差の問題なく生まれてきた。しかしながら、メスでのデータはばらつく傾向が認められたため、雄マウスを中心に以下の解析実験を行った。

(2) マウスの表現型解析

体重の経過観察により、13週令移行で認められるPomcニューロン特異的インスリン抵抗性核内滞留型Foxo1発現マウス(以下CN-Foxo1マウス)での体重と体長の増加は、Pomcニューロン特異的Foxo1/Sirt1ダブルノックインマウス(以下DKIマウス)では認められず、DKIマウスの体重・体長はWTと差がなかった。また、CN-Foxo1マウスで認められる脂肪組織重量の有意な増加もDKIマウスでは改善した(図1)。

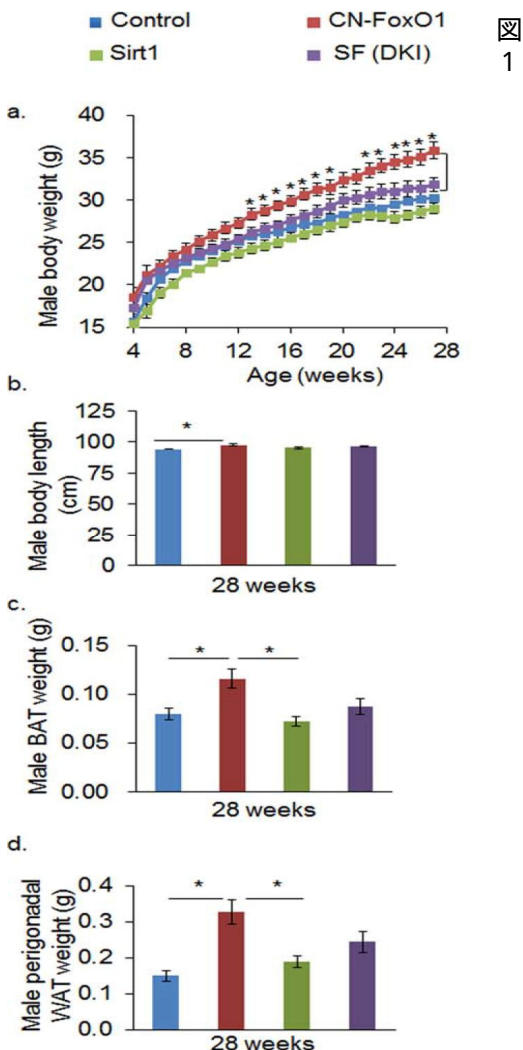


図 1

摂食量には差を認めなかったが、呼吸代謝・行動量解析の結果 CN-FoxO1 マウスで低下した代謝が DKI マウスでは回復することが分かった。即ち、DKI マウスでは CN-FoxO1 と共に SIRT1 の発現も増えることで、CN-FoxO1 によって起きる代謝の低下に伴う肥満が改善することが明らかとなった(図2)。

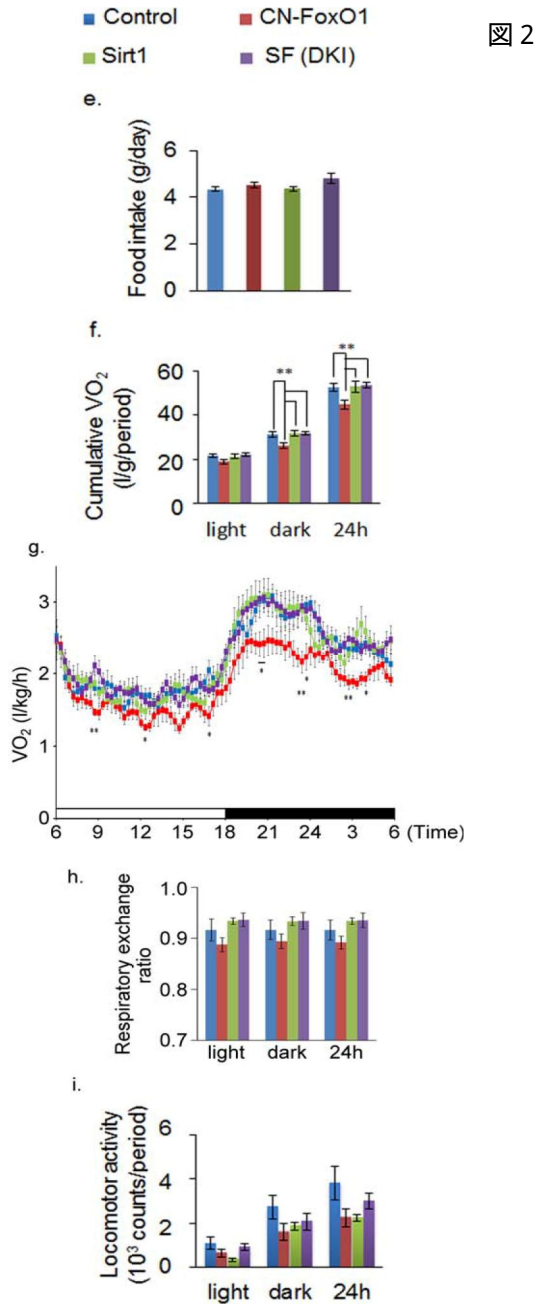


図 2

(3) POMC ニューロン数の組織学的解析

POMC ニューロン特異的な Foxo1 ノックアウトマウスでは POMC ニューロン数が野生型マウスに比べて 23%減少していたと他研究者から報告されている(Plum L *et al.*, *PLoS One*, 2012)。他方、POMC ニューロン特異的な Sirt1 ノックインマウスでは、POMC ニューロン数への影響はなかった(Sasaki T *et al.*,

Diabetologia, 2014)。

本研究では、我々の既報通り POMC ニューロン特異的 Sirt1 過剰発現マウス(以下 Sirt1 マウス)では、POMC ニューロンの数に対する影響は認められなかった。他方、CN-FoxO1 マウスでは既報の POMC ニューロン特異的 Foxo1 ノックアウトマウス同様に、POMC ニューロンの数が減少した。CN-FoxO1 発現は FoxO1 機能亢進のモデルであり、ノックアウトマウス(機能欠損モデル)と逆の結果を呈することが予想されたが、逆の結果が得られた。DKI マウスでは、CN-FoxO1 で認められた POMC ニューロン数の有意な減少の表現型が消失したため、Sirt1 は CN-Foxo1 の POMC ニューロン数に対する影響も是正できることが明らかとなった(図3)。

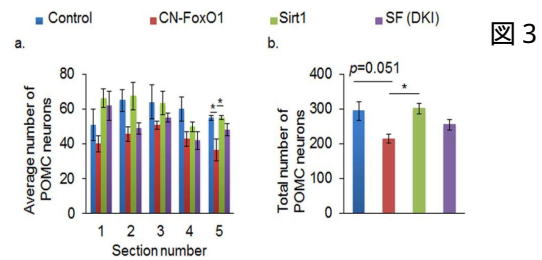


図 3

(4) 視床下部培養細胞 N41 を用いた検討

これまでの実験から、SIRT1 による CN-Foxo1 マウスの表現型の是正は、単なる相加的な効果ではなく、CN-FoxO1 機能の是正によることが示唆された。そこで、「CN-Foxo1 発現による核内 Foxo1 タンパク量の増加を SIRT1 が是正する」という仮説を立て、視床下部培養細胞 N41 と、遺伝子組み換えマウスの胎生繊維芽細胞を用いた検討を行った。

既報通り、SIRT1 の過剰発現は FoxO1 タンパクの脱アセチル化を引き起こした。さらに、核内滞留型 FoxO1 (HA タグ付きの CN-FOXO1) の総タンパク量も SIRT1 過剰発現により減少した。また、核内と細胞質に分画した検討においても、核内滞留型 CN-FoxO1 のタンパク量が SIRT1 用量依存性に核内で減少することを確認した(図4)。

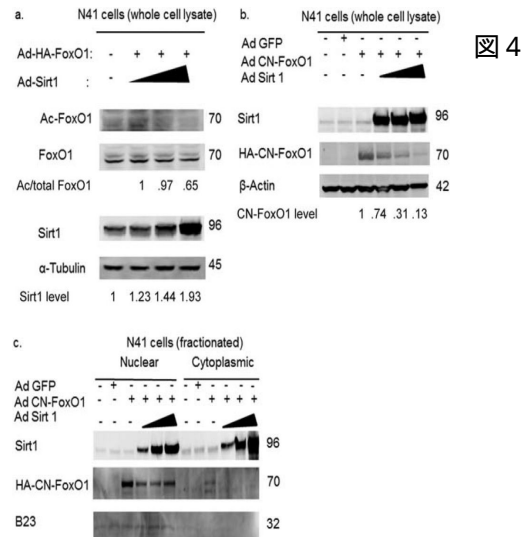
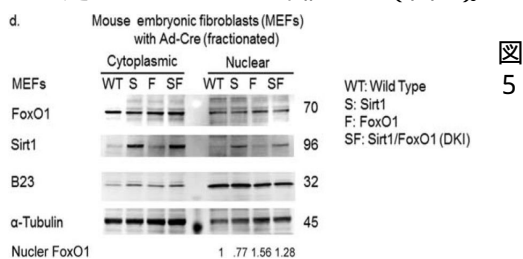


図 4

しかしながら、これらの視床下部培養細胞株の実験は SIRT1 の過剰発現系を用いており、過剰発現の程度が、DKI マウスで起きている SIRT1 過剰発現のレベルよりもずっと高いために起こっている可能性がぬぐえなかった。

そこで、Cre 陰性の Foxo1 マウス、Sirt1 マウス、Foxo1/Sirt1 マウス、および野生型マウスのマウス胎生繊維芽細胞 (MEF) を作成し、MEF へのアデノウイルスベクターによる Cre リコンビナーゼ発現系を用いて、in vivo と同等の SIRT1 過剰発現により核内の Foxo1 タンパク量が減少するか検証し、MEF での SIRT1 過剰発現の程度でも、CN-Foxo1 によって増えた核内の Foxo1 タンパク量が SIRT1 により是正されることを確認した (図 5)。



以上の実験から、遺伝的な部分インスリン抵抗性モデルを用いて、視床下部 SIRT1 は中枢性のインスリン抵抗性を改善して肥満を是正できることが明らかとなった。また、一部の表現型は SIRT1 の過剰発現による体重減少効果と相加的ではないことを考慮すると、既に報告した中枢性レプチン抵抗性改善効果とは別に、インスリン抵抗性改善が、Sirt1 による加齢性肥満の抑制の一部を担う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2件)

Sasaki T* Age-associated weight gain, leptin, and SIRT1: a possible role for hypothalamic SIRT1 in the prevention of weight gain and aging through modulation of leptin sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 査読有、6:109 (2015)

Susanti VY, Sasaki T*, Yokota-Hashimoto H, Matsui S, Lee YS, Kikuchi O, Shimpuku M, Kim HY, Kobayashi M, Kitamura T.* Sirt1 rescues the obesity induced by insulin-resistant constitutively-nuclear FoxO1 in POMC neurons of male mice. *Obesity*, 査読有、22(10):2115-9 (2014)

[学会発表](計8件)

佐々木努:「中枢神経系の SIRT1 による体重調節」日本薬学会第 136 年会、

2016/3/28、パシフィコ横浜

佐々木努:「中枢神経系の SIRT1 による体重調節 なぜ中年太りするのか?」第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、2015/5/22、下関市民会館

Sasaki T, Susanti VY, Yokota-Hashimoto H, Sho Matusi, Kikuchi O, Kobayashi M, Kitamura T: Sirt1 overexpression in POMC neurons rescues the obese phenotype induced by constitutively-nuclear FoxO1 in male mice. 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2014/9/12、Pacifico Yokohama

佐々木努、ヴィナヤンティ スサンティ、橋本博美、小林雅樹、北村忠弘:「POMC ニューロン特異的核内滞留型 FoxO1・Sirt1 ダブルノックインマウスの解析」第 19 回アディポサイエンス・シンポジウム、2014/8/23、大阪府 千里ライフサイエンスセンター

佐々木努、スサンティヴィナヤンティ、橋本博美、小林雅樹、北村忠弘:「POMC ニューロン特異的核内滞留型・Sirt1 ダブルノックインマウスの解析」第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014/4/26、福岡国際会議場

Sasaki T, Kitamura T: Hypothalamic Sirt1 and energy balance regulation. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2014/3/16、鹿児島大学郡元キャンパス

Sasaki T, Susanti VY, Kitamura T: POMC neuron-specific constitutively nuclear FoxO1 and Sirt1 double knock-in mice is rescued from obesity induced by FoxO1. Keystone Symposium "Obesity: A Multisystems Perspective", 2014/1/15、Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, British Columbia, Canada

ヴィナヤンティスサンティ、**佐々木努**、
橋本博美、小林雅樹、北村忠弘：「POMC
ニューロン特異的核内滞留型 FoxO1・Sirt1
ダブルロックインマウスの解析」第34回日
本肥満学会、2013/10/11、東京国際フォー
ラム（東京）

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 努 (SASAKI, Tsutomu)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号：50466687