

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09381

研究課題名(和文) 高脂肪食誘発性の視床下部炎症におけるプロテインフォスファターゼ1Bの作用解析

研究課題名(英文) The role of protein tyrosine phosphatase-1B in the hypothalamic inflammation induced by a high fat diet

研究代表者

坂野 僚一 (Banno, Ryoichi)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80597865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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。高脂肪食を摂取すると早期より視床下部で炎症が生じ肥満形成の起点となることが知られている。レプチン、インスリンおよび炎症の調節因子であるprotein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B)の高脂肪食摂取に伴う炎症における役割を調べたところ、ミクログリアにおいて炎症を増強すること、アストロサイトにおいて体重増加に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypothalamus plays an important role in the regulation of energy balance. A high fat diet induces hypothalamic inflammation, which is known to play a causal role in obesity. We investigated the role of protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B), a regulator of leptin, insulin and inflammatory signaling, in the hypothalamic inflammation induced by a high fat diet. Our results suggest that PTP1B in the microglia enhances hypothalamic inflammation, and PTP1B in the astrocyte increases body weight under a high fat diet conditions.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学・代謝学

キーワード：肥満 炎症 グリア細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満症はパンデミックレベルで増加している慢性疾患で、2 型糖尿病、動脈硬化および悪性腫瘍等様々な疾患の危険因子であり、ウエスタンダイエットに代表される高脂肪食 (HFD) 投与が肥満をきたすことは良く知られている。近年、HFD を投与すると早期より視床下部で炎症が生じることが報告されており、我々もマウスの視床下部炎症の亢進が肥満症やインスリン抵抗性に繋がることを報告した ( )。また、視床下部炎症による神経障害を保護すべくグリア細胞が活性化することや、HFD から普通食へ食事内容を変更すると体重減少と伴に視床下部におけるグリア細胞の活性化は解消されることが報告されており、グリア細胞は高脂肪食投与に伴う視床下部炎症において基盤的な役割を果たすことが明らかとなってきたが、その分子病態学的機序については未だ明らかではない。

(2) 肥満の分子機構に重要な役割を果たすレプチンは脂肪細胞から分泌されるポリペプチドで、視床下部弓状核に存在する pro-opiomelanocortin (POMC) ニューロンに直接作用して摂食量の減少およびエネルギー消費の増加をきたし体重を減少させる。レプチンシグナルはチロシンリン酸化カスケードである Jak2-stat3 経路を介して下流へ伝達され、protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) による脱リン酸化作用を介して阻害される。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きたすことが報告されており、我々は Cre-loxP システムを用いて POMC ニューロン特異的に PTP1B 発現を欠損したマウスを作成し、HFD 投与下で肥満抵抗性をきたすことを報告した ( )。PTP1B 欠損による肥満抵抗性の機序としてレプチンシグナルの亢進が想定されているが、高脂肪食投与に伴う視床下部炎症に対して PTP1B の欠損が如何なる作用を示すかは未だ不明である。

## 2. 研究の目的

(1) PTP1B はレプチンシグナルのみならず炎症の調節因子であることが明らかとなりつつある。これは炎症関連サイトカインの TNF $\alpha$  や IL-10 受容体シグナルの下流に PTP1B の基質である Jak1,2-stat3 系や TYK2-stat3 経路が存在することに起因する。PTP1B 欠損に伴う stat3 リン酸化の亢進は、stat3 の dimer 形成から核内移行を促進し、エネルギー調節関連ペプチドの転写活性を調節するのみならず、炎症性サイトカインの転写活性も同時に調節することが報告されている。本研究では HFD 投与に伴う視床下部炎症において PTP1B の欠損が Glia 細胞において Jak2-stat3 経路の活性化を介して視床下部炎症の進展阻止に寄与するか否かを明らかにする。

(2) Glia 細胞の一つである astrocyte は PTP1B 欠損下で活性化し分化が誘導され、astrocyte 特異的にレプチン受容体を欠損させるとレプチン投与による摂食抑制作用が減弱するとの既報があり、高脂肪食投与に伴う視床下部炎症から肥満形成に至る過程で astrocyte における PTP1B の役割の重要性が示唆されている。本研究では Cre-LoxP system を用いて astrocyte 特異的に PTP1B が欠損したマウスを作成し、HFD 投与に伴う視床下部炎症、glia 細胞の活性化、体重および糖代謝に与える影響について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 全身性 PTP1B 欠損雄性マウス (KO) および野生型マウス (WT) に離乳後から普通食 (chow) もしくは高脂肪食 (HFD) を投与し体重差のない 7 週齢で屠殺し、血中の TNF $\alpha$  濃度、体重、副睾丸周囲脂肪組織重量、視床下部弓状核における TNF $\alpha$  および IL-10 の mRNA 発現を測定し比較検討する。また視床下部弓状核における TNF $\alpha$  の蛋白発現を免疫染色法で評価する。さらに、視床下部弓状核においてミクログリアと stat3 リン酸化を共染色し両 genotype 間で比較検討する。

(2) KO および WT に  $10^{-12}$  M の TNF $\alpha$  を脳室内投与し stat3 のリン酸化をミクログリア、アストロサイトおよびニューロンにおいて両群間で比較検討する。

(3) 10 週齢雄性の KO および WT にレプチンを  $1 \mu\text{g/g}$  body weight 腹腔内投与し視床下部における stat3 のリン酸化をミクログリア、アストロサイトおよびニューロンにおいて両群間で比較検討する。

(4) 生後 16 日齢の KO および WT から視床下部を取り出し McIlwain tissue chopper を用いて厚さ  $350 \mu\text{m}$  の弓状核を含む切片を作成し視床下部器官培養を行い、TNF $\alpha$  刺激による PTP1B および炎症関連サイトカインの mRNA 発現およびシグナル蛋白のリン酸化を評価する。また、stat3 のリン酸化阻害剤を使用し TNF $\alpha$  刺激によるサイトカインの mRNA 発現およびシグナル蛋白のリン酸化を同様に評価する。

(5) (4)において liposomal clodronate を用いてミクログリアを除去し、TNF $\alpha$  刺激に伴う TNF $\alpha$  の mRNA 発現がどのように変化するのか両群間で比較検討した。

(6) (4)において leptin の投与が、TNF $\alpha$  刺激に伴う TNF $\alpha$  の mRNA 発現に影響を与えるか否かを両群間で比較検討した。

(7) GFAP Cre マウスと PTP1B flox マウスを交配してアストロサイト特異的 PTP1B 欠損マウス (G-KO) を作成し HFD 投与下にお

ける体重変化を測定し野生型マウス(G-WT)と比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 血中 TNF $\alpha$  濃度は WT において chow 投与群および HFD 投与群間で有意差を認めず、genotype 間においても有意差を認めなかった。一方、視床下部弓状核における TNF $\alpha$  の mRNA 発現は WT で HFD 投与群において chow 投与群と比較して有意な発現の上昇を認めるも KO では有意な上昇を認めなかった。また、IL-10 の mRNA 発現については HFD 投与群が chow 投与群と比較して KO および WT ともに有意な発現上昇を認め、さらに、高脂肪食投与群において KO は WT と比較して有意な発現の上昇を認めた。免疫染色法による評価において、高脂肪食投与で TNF $\alpha$  の発現は WT において上昇するも KO では認められなかった(図 1)。また、ミクログリアと stat3 リン酸化の共染色では高脂肪食投与群において WT と比較して KO ではミクログリアにおける stat3 リン酸化の有意な増強を認めた。

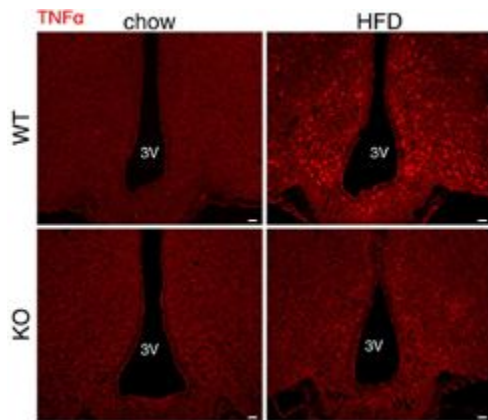


図 1 高脂肪食投与に伴う TNF $\alpha$  の発現

(2) 低濃度の TNF $\alpha$  の脳室内投与に対し、WT では stat3 のリン酸化亢進を認めなかったが、KO では stat3 のリン酸化亢進を認めた。この stat3 リン酸化亢進はミクログリアでのみ確認され、アストロサイトとニューロンにおいては両群間で有意差を認めなかった(図 2)。

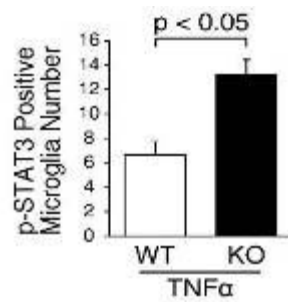
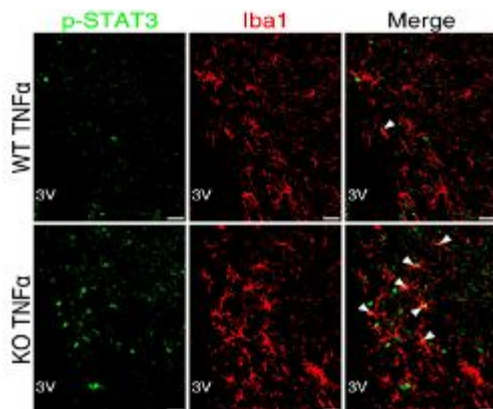


図 2 TNF $\alpha$  脳室内投与によりミクログリアにおいて stat3 のリン酸化が亢進する

(3) レプチンの腹腔内投与に対し、KO の視床下部において WT と比較して stat3 のリン酸化は有意に亢進した。KO のアストロサイトおよびニューロンにおいて stat3 のリン酸化亢進を認めたが、ミクログリアでは認めなかった(図 3)。

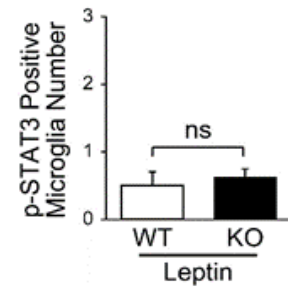


図 3 レプチンを腹腔内投与してもミクログリアの stat3 リン酸化は亢進しない

(4) TNF $\alpha$  刺激により、両群で TNF $\alpha$  の mRNA 発現が増強した。しかし KO では TNF $\alpha$  刺激による TNF $\alpha$  の mRNA 発現が WT と比較して有意に減弱した。一方 IL-10 の mRNA 発現は KO で有意に増加した(図 4)。

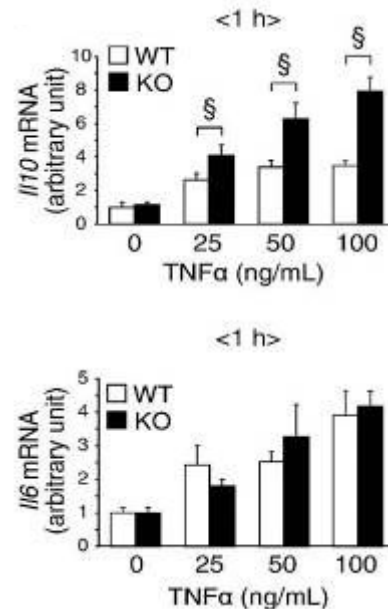


図 4 TNF $\alpha$  刺激による TNF $\alpha$  および IL-10 の mRNA 発現

また、TNF $\alpha$  刺激により Jak2 および stat3 のリン酸化が KO で有意な亢進を認めたが NF $\kappa$ Bp65,p38,JNK および ERK のリン酸化については両群間で有意差を認めなかった。一方、stat3 のリン酸化阻害剤を投与すると両群間で認められた TNF $\alpha$  刺激による TNF $\alpha$  および IL-10 の mRNA 発現の差が消失した (図 5)

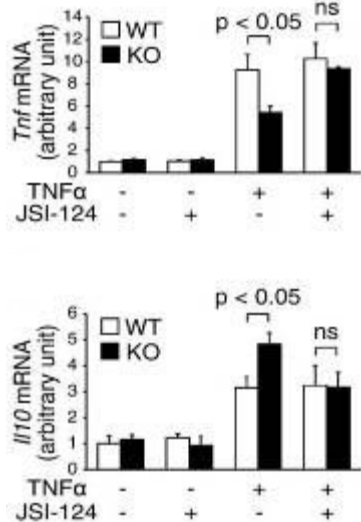


図 5 Stat3 のリン酸化阻害剤投与により両群間における TNF $\alpha$  刺激に伴う TNF $\alpha$  および IL-10 の mRNA 発現差が消失

(5) ミクログリアの除去により、TNF $\alpha$  刺激による TNF $\alpha$  および IL-10 の mRNA 発現増強が両群とも消失した (図 6)

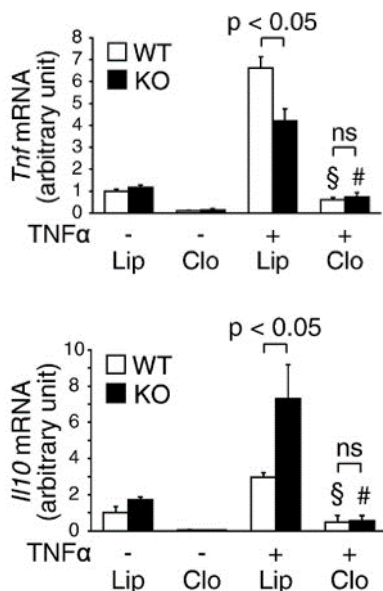


図 6 ミクログリアの除去により両群間における TNF $\alpha$  刺激に伴う TNF $\alpha$  および IL-10 の mRNA 発現が消失した

(6) Leptin 投与に伴う stat3 のリン酸化亢進は TNF $\alpha$  刺激に伴う TNF $\alpha$  および IL-10 の mRNA 発現に影響を与えなかった。

(7) 高脂肪食投与群において雄性マウスの G-KO は G-WT と比較して 15 週齢以降有意な体重の減少を認めた。一方、雌性マウスの G-KO は G-WT と比較して 18 週齢以降有意な体重の減少を認めた。

<引用文献>

Ito Y, Banno R et al., J Neurosci. 2013 33(43):17166-73  
Banno R et al., J Clin Invest. 2010 120(3):720-34

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. Deficiency of PTP1B Attenuates Hypothalamic Inflammation via Activation of the JAK2-STAT3 Pathway in Microglia.  
Tsunekawa T, Banno R, Mizoguchi A, Sugiyama M, Tominaga T, Onoue T, Hagiwara D, Ito Y, Iwama S, Goto M, Suga H, Sugimura Y, Arima H. EBioMedicine. 2017 16:172-183. (査読あり)

(学会発表)(計 9 件)

1. 第 91 回日本内分泌学会学術総会 (2018 年 4 月 26-28 日、フェニックス・シーガイアリゾート、宮崎市) アストロサイト特異的 PTP1B 欠損マウスは高脂肪食投与下で肥満抵抗性を呈する  
杉山摩利子、坂野僚一、滝 啓吾、溝口 暁、恒川 卓、高木博史、伊藤禎浩、山中宏二、有馬 寛

2. Obesity Week 2016 (2016 年 10 月 31-11 月 4 日、Morial Convention Center, New Orleans) Deficiency of PTP1B attenuates hypothalamic inflammation induced by high fat diet via the activation of JAK2-STAT3 signaling pathway in the microglial cells  
Tsunekawa T, Banno R, Mizoguchi A, Sugiyama M, Tominaga T, Onoue T, Ito Y, Goto M, Arima H

3. 第 43 回日本神経内分泌学会 (2016 年 10 月 14-15 日、アクトシティ浜松コンgresセンター、浜松市) 高脂肪食摂取に伴う肥満症の基盤となる視床下部炎症  
坂野僚一

4. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2016 年 5 月 19-21 日、国立京都国際会

館、京都市)  
ミクログリアの PTP1B は視床下部炎症  
を増強する  
恒川 卓、坂野僚一、杉山摩利子、  
富永隆史、尾上剛史、後藤資実、有馬 寛

5. CREST international symposium  
(2015年12月26日、National Institute  
for Physiological Sciences、Okazaki  
city)  
PTP1B deficiency activates Jak2-Stat3  
signaling pathway downstream of  
TNF $\alpha$  receptor in the microglial cells  
resulting in the attenuation of  
hypothalamic inflammation under  
HFD conditions  
Ryoichi Banno

6. Keystone Symposia  
(2015年10月25-29日、Westin Miyako  
Kyoto、Kyoto city)  
Deficiency of PTP1B attenuates  
hypothalamic inflammation via the  
activation of Jak2-Stat3 signaling  
pathway in the microglial cells under  
high fat diet conditions.  
Banno R, Sugiyama M, Tominaga T,  
Tsunekawa T, Onoue T, Goto M, Arima  
H

7. The 46th NIPS International  
Symposium (2015年10月2-3日、名古  
屋国際会議場、名古屋市)  
Deficiency of PTP1B attenuates  
hypothalamic inflammation via the  
activation of Jak2-Stat3 signaling  
pathway in the microglial cells under  
high fat diet conditions.  
Ryoichi Banno

8. 第36回日本肥満学会  
(2015年10月2-3日、名古屋国際会議  
場、名古屋市)  
PTP1B の欠損はミクログリアの  
JAK2-STAT3 経路を活性化して視床下  
部炎症を減弱する  
恒川 卓、坂野僚一、杉山摩利子、富永隆  
史、尾上剛史、後藤資実、有馬 寛

9. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会  
(2015年5月21-24日、海峡メッセ下関、  
下関市)  
視床下部 PTP1B は JAK2-STAT3 の脱リ  
ン酸化を介して視床下部炎症を増強する  
恒川 卓、坂野僚一、富永隆史、尾上 剛  
史、柴田みゆき、後藤資実、大磯ユタカ、  
有馬 寛

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
坂野 僚一 (BANNO RYOICHI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80597865

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

(3) 連携研究者  
なし