

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19580347

研究課題名 (和文)

メタボリックシンドロームおよび精神疾患に対するアクチビン E の有用性

研究課題名 (英文)

The role of activin E in metabolic syndrome and mood disorder

研究代表者

橋本 統 (HASHIMOTO OSAMU)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：90317058

研究成果の概要：

細胞の分化・増殖因子であるアクチビン E の遺伝子改変マウスの表現型解析により、アクチビン E が中枢神経に作用し情動行動を調節することや脂肪細胞の分化を制御することでインスリン感受性を亢進させる機能を有することが示唆された。このことは、精神疾患やメタボリックシンドロームなどの治療薬としてのアクチビン E の可能性を示している。さらに、この遺伝子改変マウスは上記疾患のモデルとしても有用であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：インスリン感受性、糖／エネルギー代謝、TGF- β 、行動、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

アクチビンは TGF- β 、インヒビン、BMP、GDF、MIS などとともに細胞の分化・増殖因子である TGF- β スーパーファミリーに属する因子で、 β サブユニット (β A および β B) がジスルフィド結合で架橋したホモまたはヘテロダイマーであり、数種の分子種 (アクチビン A、AB、B) が存在する。当初、下垂体前葉からの FSH の分泌を促進する物質として分離されたが、その後の研究によりアクチビンは、

卵胞だけでなく全身の種々の組織に存在し、生体内で多彩な機能を有していることが知られるようになった。10 年ほど前に、新たに β E サブユニットすなわちアクチビン E が哺乳類でクローニングされた。アクチビン E は肝臓において特異的に mRNA の発現が認められる。そのため、オートクライン・パラクライン因子として肝臓において分化・増殖等の機能を有する事が推測されたが、アクチビン E のノックアウトマウスや、アクチビン E を過剰発現する、TgAct β E マウスでは、肝臓の

発生や発達に異常はみられなかった。そのため、肝臓の分化・増殖以外の機能を有している事が示唆されたが、その生物学的機能は未だ明らかでない。しかし、アクチビンファミリー因子の多彩な機能を鑑みると新規アクチビンの解析は種々の生命現象を理解する上で重要な手がかりを得る事が出来ると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、アクチビンEの中枢神経系への作用や血糖調節への影響を検討する事を目的に、アクチビンEを過剰発現したトランスジェニックマウス (TgAct β Eマウス) における行動解析および糖代謝に関連する表現型の解析を行った。さらに、精神疾患、高インスリン感受性および肥満のモデルマウスとしてTgAct β Eマウスの有用性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 行動解析

攻撃性を検討するために、レジデント・イントルーダー試験、情動異常の解析のために高架式十字迷路とオープン・フィールド試験を行った。また、視床下部室傍核 (PVN) におけるc-Fosの免疫組織学的検出を行った。

(2) インスリン感受性解析

体重および各臓器の重量測定、グルコース負荷試験 (GTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) を行った。また、各臓器の組織学的解析、体温、血糖値、各種血中ホルモン濃度測定を行った。

4. 研究成果

(1) 行動異常

攻撃性を検討するために、レジデント・イントルーダー試験を行ったところ、TgAct β Eマウスは、イントルーダーマウスに対してoffensive biting, sideways threat およびtail rattlingなどの攻撃的な行動を示した。また、この行動は野生型マウスでは見られなかったことから TgAct β Eマウスは高い攻撃性を有する事が確認された (Fig. 1)。

次に、TgAct β Eマウスでの情動異常の解析を行うため高架式十字迷路とオープン・フィールド試験を行った。高架式十字迷路において、雄の TgAct β Eマウスではストレス反応により惹起されるself-groomingが有意に減少していた。一方、雌の TgAct β Eマウスではオープンアームへ進入する割合が野生型マウスに比べ有意に増加していた。この事から雌の TgAct β Eマウスは野生型マウスに比



Fig. 1. Typical aggressive behavior in TgAct β E mice. A Transgenic mouse showed anogenital contact (left panel) first and then attacked with bites (right panel).

べ不安行動が減少している事が確認された。オープン・フィールド試験においてTgAct β E雄マウスでは探索行動の指標であるsniffingの回数が、雌マウスではsniffingの回数およびそれに費やした時間が野生型マウスと比較して有意に増加していた。また、TgAct β E雌マウスは中央領域に滞在した時間が有意に長かった。以上の結果よりオープン・フィールド試験では、TgAct β Eマウスの探索行動の亢進と不安様行動の減少が確認された。

急性ストレス時のTgAct β Eマウスの視床下部室傍核 (PVN) における細胞の活性化を神経の興奮マーカーであるc-Fosの発現を指標に検討した。拘束ストレスを負荷したPVNでのc-Fos蛋白の発現を免疫組織化学染色で確認した結果、野生型マウスではPVNに多数のc-Fos陽性細胞が見られたのに対し、TgAct β Eマウスではc-Fos陽性細胞が有意に減少しており、ストレス刺激に起因するCRH産生細胞の活性が低下していることが示唆された。このように、TgAct β Eマウスではストレスに対する感受性の低下によって攻撃性の亢進や、不安様行動の減少を示す事が明らかとなった。以上より、TgAct β Eマウスの行動解析からアクチビンEが中枢神経系に作用し情動行動に影響している可能性が示唆された。

(2) 高インスリン感受性と♀における肥満

次に、アクチビンEの血糖調節への影響を検討する事を目的に、TgAct β Eマウスの糖代謝に関連する表現型の解析を行った。TgAct β Eマウスにおける糖代謝に関連する表現型の解析において、TgAct β E雄マウスでは摂餌量や体重には変化がないにも関わらず血糖値が低下していた。また、グルコース負荷試験 (GTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) の両試験において負荷後すべての時間において野生型マウスに比べ有意に血糖値

が低下していた。このように、TgAct β E マウスではインスリン感受性が亢進していることが認められた。

そこで、主なインスリン感受性臓器の組織重量を測定したところ、TgAct β E 雄マウスの肩甲骨間における褐色脂肪組織 (BAT) の重量は低下しており、その組織像を観察すると褐色脂肪細胞の断面積が有意に低下していた。また、褐色脂肪細胞のミトコンドリアに特異的に発現し、酸化リン酸化を脱共役してエネルギーを熱に変換する脱共役蛋白質 (UCP-1) の発現量を比較したところ、TgAct β E 雄マウスの UCP-1 は野生型マウスに比べ UCP-1 の発現量が有意に上昇していた。さらに腹腔内の腸管膜脂肪組織中に UCP-1 陽性細胞が観察された。TgAct β E マウスでは野生型マウスに比べ体温が上昇していることから、アクチビン E が褐色脂肪細胞の UCP-1 の発現、さらに白色脂肪の褐色脂肪細胞化を調節してエネルギー代謝を亢進させていることが示唆された。

一方、雌の TgAct β E マウスでは週齢を追うごとに体重が増加し、20 週齢以降から野生型マウスと比較して体重が有意に高い値を示した。しかし、GTT および ITT の結果、体重の増加した TgAct β E 雌マウスにおいてもインスリン感受性が亢進していた。

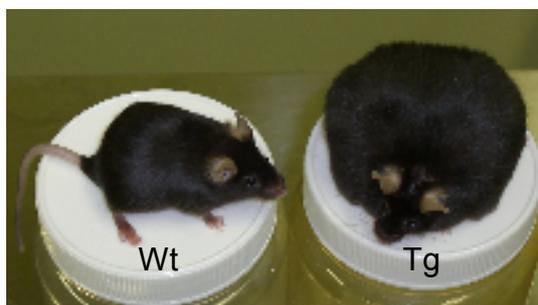


Fig. 2. TgAct β E female mice showed obesity. Wt, wild-type. Tg, transgenic mice

この TgAct β E 雌マウスでは、腹腔内脂肪量が有意に増加しており、その組織像を観察すると断面積の大きな白色脂肪細胞が増加していた。このことから、腹腔内脂肪量の増加は各白色脂肪細胞の脂肪蓄積量に起因することが示唆された。さらに、脂肪組織から分泌されるアディポカインであり、インスリン感受性や代謝活性を亢進させるアディポネクチンの TgAct β E 雌マウスにおける血清濃度は高い値を示した。

TgAct β E 雌マウスでも BAT における UCP-1 の発現上昇や腸間膜脂肪内で UCP-1 の発現が検出されたが、体温には変化がみられなかったことから、TgAct β E 雌マウスのインスリン感

受性の上昇の原因は褐色脂肪細胞におけるエネルギー代謝亢進ではなく腹腔内脂肪細胞における脂肪蓄積がその要因であると考えられた。

この TgAct β E 雌マウスに testosterone propionate を投与すると体重の増加すなわち脂肪の蓄積が抑えられることから、アクチビン E による褐色または白色脂肪細胞の分化に対する機能に性ホルモンが関与している事が推測された。

本研究において、TgAct β E マウスの精神疾患、高インスリン感受性および肥満のモデルマウスとしての有用性が示された。さらに、アクチビン E が中枢神経に作用し情動行動を調節する役割を有する事や脂肪細胞の分化を制御することでインスリン感受性を亢進させる機能を有することが示唆された。今後さらなる研究により、アクチビン E による中枢神経系や脂肪細胞への詳細な作用が解明され、アクチビン E が精神疾患やメタボリックシンドロームなどの治療薬として利用される事が期待される。

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 5 件)

1. Sekiyama K., Hashimoto O., Ushiro Y., Adachi C., Kikusui T., Tanemura K., Hasegawa Y. Abnormalities in Aggression and Anxiety in Transgenic Mice Overexpressing Activin E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* In press 査読有り
2. Nishino Y., Ooishi R., Kurokawa S., Fujino K., Murakami M., Madarame H., Hashimoto O., Sugiyama K., Funaba M. Gene expression of the TGF- β family in rat brain infected with Borna disease virus. *Microbes and Infection* In press 査読有り
3. McMahon H. E., Hashimoto O., Mellon P. L., Shimasaki S. Oocyte-specific over-expression of mouse BMP-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice. *Endocrinology* 149, 2807- 2815 (2008) 査読有り
4. Nakatani M, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K. Transgenic expression of a

myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *The FASEB Journal* 22, 477-487 (2008) 査読有り

5. Takehara-Kasamatsu Y, Tsuchida K, Nakatani M, Murakami T, Kurisaki A, Hashimoto O, Ohuchi H, Kurose H, Mori K, Kagami S, Noji S, Sugino H. Characterization of follistatin-related gene as a negative regulatory factor for activin family members during mouse heart development. *J Med Invest.* 54(3-4), 276-288 (2007) 査読有り

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 関山一成、橋本 統、長谷川喜久 肥満および高インスリン感受性を示すアクチビントランスジェニックマウスの解析 第 31 回日本分子生物学会年会／第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008.12.12 神戸
2. 橋本 統、関山一成、長谷川喜久 肥満および高インスリン感受性を示すアクチビン遺伝子改変マウスの解析 第 22 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2008.2.8 品川
3. 橋本 統、関山一成、宇城有紀、長谷川喜久 高インスリン感受性を示すアクチビン遺伝子改変マウスの解析 第 80 回日本生化学会大会合同大会 2007.12.12 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 統 (HASHIMOTO OSAMU)
北里大学・獣医学部・講師
研究者番号：90317058

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者