

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09428

研究課題名(和文) 視床下部弓状核における局所糖質コルチコイド作用増強の代謝制御への影響の検討

研究課題名(英文) Role of glucocorticoid conversion within the hypothalamus in metabolic regulation

研究代表者

園山 拓洋 (Sonoyama, Takuhiro)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70582112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、11-HSD1あるいは2による視床下部局所でのグルココルチコイドの活性化や不活性化が摂食調節ホルモンの作用強度に及ぼす影響を明らかにし、哺乳類個体の代謝制御における意義の解明を目指した。マウス視床下部のトランスクリプトーム解析と、レプチン応答性細胞株を用いた解析により、特に11-HSD2によるグルココルチコイドの不活性化はグルココルチコイドによるレプチン感受性増強作用に拮抗することが示された。本研究により、視床下部におけるレプチン感受性のモデュレーターとしての細胞内グルココルチコイド活性化・不活性化の意義が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to address whether glucocorticoid reactivation or inactivation by hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 within the hypothalamus affect leptin sensitivity and thus metabolic regulation of a mammal. The study result using leptin-sensitive cell line has demonstrated that glucocorticoid-mediated augmentation of leptin sensitivity is potentially attenuated by the activity of hydroxysteroid dehydrogenase type 2, which converts active cortisol to inactive cortisone. The result suggests that local glucocorticoid conversion in leptin receptor-expressing cells modulate the effect of satiety-regulating hormone.

研究分野：内分泌学

キーワード：グルココルチコイド レプチン 肥満症 視床下部 酵素

## 1. 研究開始当初の背景

糖質コルチコイドは、全身の糖・脂質・タンパク質代謝、免疫・炎症の制御、循環血漿量や血圧のコントロールなど、広範な作用を有するホルモンである。ヒトをはじめとする霊長類では、この糖質コルチコイド作用はコルチゾールが担い、げっ歯類ではコルチコステロンが担っているが、これらの過剰は種差を超えて過食をもたらす、肥満の原因となることが知られている。一方、ヒト、げっ歯類いずれにおいても食餌性肥満の病態は血中の糖質コルチコイド濃度の上昇を伴わない。

11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type1(11 HSD1)は細胞内ミクロソーム分画に存在し、生物学的に非活性型のコルチゾン、11-デヒドロコルチコステロンを、NADPH の存在下に活性型のコルチゾール、コルチコステロンに変換することで、細胞内糖質コルチコイド作用を増強する。一方、11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type2(11 HSD2)は生物学的に活性型糖質コルチコイドを非活性型に変換する。これらの2つの酵素はグルココルチコイド受容体(GR)の上流で pre-receptor gateway として糖質コルチコイド作用の調整に関与している。

肥満患者では、脂肪細胞における 11 HSD1 の活性が上昇していること(J Clin Endocrinol Metab. 86:1418-21, 2001)、11 HSD1 を脂肪細胞において過剰発現させたマウスでは、糖質コルチコイド作用の増強により、内臓肥満やインスリン抵抗性などを含むメタリックシンドローム様の病態を示すこと (Science.294:2166-70, 2001) が報告されている。これらの事実は、末梢組織における 11 HSD1 の活性上昇が、局所での糖質コルチコイド作用の増強を介して肥満・メタリックシンドロームの病態に関与していることを示す。

一方、11 HSD1 は中枢神経系においても発現が知られる。高脂肪食(HFD)負荷を2日間行ったマウスにおいて、食欲制御中枢である視床下部弓状核(ARC)で、11 HSD1 をコードする Hsd11b1 遺伝子の発現が上昇することが報告されている (Endocrinology. 147:4486-95, 2007)。我々は、HFD により ARC に生じる分子病理学的変化を網羅的に解明する目的で、RNAseq により HFD 負荷マウスの ARC の経時的トランスクリプトーム解析を行ってきた。これによると、HFD を3日間負荷したマウスの ARC で Hsd11b1 mRNA の発現上昇が見られ、この傾向は HFD 負荷2週間、6週間でも持続していた(図1(a)、Sonoyama et al. unpublished data)。さらに、HFD により ARC で発現が変動する遺伝子群を上流で制御する因子を、データベースとバイオインフォマティクスの方法論により検索する Upstream Regulator Analysis (IPA®) により解析すると、制御因子の1つとして糖質コルチコイドが同定さ

れた ( $P < 0.001$ )。一方、同じ視床下部の室傍核ではこのような Hsd11b1 の発現上昇は認められなかった(図1(b)、unpublished data)。また、ARC では 11 HSD2 をコードする Hsd11b2 の遺伝子発現は見られなかった。以上より高脂肪食負荷の ARC では、11 HSD1 の発現上昇により糖質コルチコイド作用が増幅されている可能性が高い。実際、GR の下流で制御されることが知られる数個の代表的標的分子の発現からも糖質コルチコイド作用の増強が裏付けられている。

動物実験において一般的に使用されている HFD は、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸など複数の脂肪酸を通常食より多く含有しているが、HFD 負荷によるエネルギーバランスの破綻がいずれか1つないし少数の脂肪酸種に起因するのか、またそうだとするとどの脂肪酸に起因するのかについては現在不明である。食事の脂肪酸成分の構成を変えることで、脂肪組織における 11 HSD1 の発現に変化が生じることは既に報告されており (Am J Physiol Endocrinol Metab. 300:E1076-84, 2011)、エネルギー代謝中枢である視床下部においてもこのような脂肪酸種に応答性の 11 HSD1 の発現変化が起こる可能性が示唆される。我々は独自のリポミクス解析により、HFD 負荷マウスの ARC で、高脂肪食開始早期からアラキドン酸およびアラキドン酸を含むリン脂質が増加していることを、最近発見した(unpublished data)。アラキドン酸はプロスタグランジン、ロイコトリエンなどに代謝され炎症の発生に強く関与していることが知られており(アラキドン酸カスケード)、また一方で、炎症が末梢炎症細胞において 11 HSD1 の発現上昇を誘導することもよく知られている。

これらの事実から、HFD の経口摂取は、アラキドン酸カスケードのフラックスの増加、炎症惹起を介して ARC での 11 HSD1 の発現を上昇させ、これが細胞内での糖質コルチコイド作用の増強を通じて食欲制御やエネルギーホメオスタシスの破綻につながっているとの仮説を立てることが可能と考えられる。

以上のように、視床下部エネルギー代謝中枢における炎症応答やこれのモデレーターとしてのグルココルチコイドの作用が、食欲やエネルギー消費の恒常性維持・破綻に関与する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、11 HSD1 あるいは2による視床下部局所でのグルココルチコイドの活性化や不活性化が摂食調節ホルモンの作用強度や体重調節に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、第一に、マウス視床下部とマウス視床下部機能の一部としてのレプチン応答性が保たれていることが知られるヒト神経芽細胞株 SHSy5y 細胞を試料として、11 HSD1 および 2、グルココルチコイド受容体、グルココルチコイド受容体の下流で駆動することが既に知られている遺伝子群についてその発現変化を検討した。

第二に、高脂肪食給餌マウスの視床下部神経核におけるグルココルチコイド関連分子の発現変動を検討した。

レプチンは脂肪細胞から分泌されて視床下部弓状核のレプチン受容体に作用することで食欲を抑制しエネルギー消費を亢進させることで哺乳類個体をやせさせるホルモンである。一方、高脂肪食により肥満を発症したマウスやヒト肥満症患者においては、レプチンの視床下部における作用障害（レプチン抵抗性）を生じ、レプチンによる“やせ”効果が消失することが知られている。レプチン受容体を安定発現する SHSy5y 細胞をリコンビナントレプチンで刺激するとマウスにレプチンを投与した際に視床下部弓状核に生じるのと同様に、Stat3 のリン酸化が促進される。哺乳類個体においては、弓状核での Stat3 のリン酸化がレプチンの食欲抑制・エネルギー消費亢進作用を伝達することが知られている。

そこで本研究では第三に、レプチン応答性の SHSy5y 細胞を用いてグルココルチコイドがレプチン受容体シグナル伝達に及ぼす影響を解析した。

さらに第四には、SHSy5y 細胞において HSD1 および 2 の遺伝子操作による過剰発現やノックダウン実験、HSD 阻害薬を用いた実験を行い、レプチン感受性に及ぼす影響を検討した。

### 4. 研究成果

- (1) RNA-Seq を用いたマウス視床下部発現遺伝子の網羅的解析により、視床下部の中でも特にレプチン受容体が発現する弓状核に 11 HSD1 と 2 の発現が確認され、マウスにおいては 11 HSD1 が 11 HSD2 よりも発現レベルが高いことが明らかとなった。一方、レプチン応答性を示す SHSy5y 細胞を用いた定量 PCR 解析では、11 HSD1 よりも 11 HSD2 の方が mRNA 発現レベルがより高いことが明らかとなった。
- (2) マウスの視床下部弓状核ではグルココルチコイド受容体 (GR) の発現が確認でき、高脂肪食給餌により GR の下流で発現変化を示す遺伝子群の一部の発現増加が確認され、肥満における視床下部病態にグルココルチコイド作用の亢進が寄与して

いる可能性が考えられた。

- (3) レプチン感受性細胞株にグルココルチコイドとしてデキサメタゾンないしはヒドロコルチゾンを追加して前処理をした上でレプチンで刺激したところ、いずれの薬剤でも、濃度依存的にレプチン感受性が増強されることが示された。
- (4) レプチン感受性の SHSy5y 細胞では、11 HSD1 の内因性発現レベルが低く、11 HSD2 の発現レベルが高かった。この細胞に 11 HSD1 を過剰発現し、またノックダウンしたが、レプチン感受性に及ぼす影響は必ずしも一定せず、有意な変化を示さなかった。一方で、同細胞に 11 HSD2 を過剰発現すると、ウシ血清存在下のレプチン感受性は減弱し、また siRNA を用いて 11 HSD2 をノックダウンするとレプチン感受性が亢進した。加えて 11 HSD2 をノックダウンした上でヒドロコルチゾンで前処理すると、遺伝子操作を行わずにヒドロコルチゾンを加えた場合よりも低濃度のヒドロコルチゾンでレプチン感受性亢進作用が検出された。さらに、11 HSD1 と 2 の非特異的阻害薬であるカルベノキソロンを追加すると、11 HSD2 のノックダウン実験と同様、レプチン感受性の亢進が観察された。
- (5) 以上より、視床下部におけるレプチン感受性のモデュレーターとしての細胞内グルココルチコイド活性化・不活性化の意義が明らかとなった。今後は肥満症の病態における意義について、疾病モデルを用いた研究で明らかにしてゆきたい。

### 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)

Matsuo K, Sone M, Honda-Kohmo K, Toyohara T, Sonoyama T, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Ohno Y, Inoue M, Ohta A, Osafune K, Nakao K, Inagaki N. Significance of dopamine D1 receptor signalling for steroidogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. Sci Rep. 2017 Nov 9;7(1):15120.

[学会発表](計 29 件)

T Sonoyama, T Tanaka, H Sawada, M Inoue, Y Ogino, T Guo, K Nakao. Dynamism of the hypothalamic transcriptome uncovers “stages” during the development of diet-induced obesity in mice. Kyoto Conference of Young Lions in Obesity

Research, Kyoto, 2015/10/5  
T Tanaka, T Sonoyama, H.Sawada, M.Inoue, Y Ogino, T Guo, K Nakao. Dynamism of the Hypothalamic Transcriptome Uncovers "Stages" during the Development of Diet-Induced Obesity in Mice. European Obesity Summit, Gothenburg (Sweden), 2016/06/03  
T Sonoyama, T Tanaka, H Sawada, M Inoue, Y Ogino, T Guo, K Nakao. Dynamism of the Hypothalamic Transcriptome Uncovers "Stages" During the Development of Diet-Induced Obesity in Mice. 33rd Annual Scientific Meeting of The Obesity Society, Los Angeles, 2015/11/04  
T. Tanaka, T. Sonoyama, K.Kaneko, T. Unzai, Y.Ogino, T. Guo, K.Kobayashi, H. Koyama, D. Aotani, K. Imaeda, K.Nakao. Spatio-Temporal Signatures of Hypothalamic Transcriptome / Metabolome in Obesity. Ovesity week 2017, Maryland, 2017.11.1  
T Tanaka, M Inoue, T Sonoyama, Y Ogino, T Guo, H Koyama, K Nakao. Role of Dietary Linoleic Acid in the Development of Obesity--A Multiomics Analysis. 34th Annual Scientific Meeting of The Obesity Society, New Orleans, 2016/11/03  
T Tanaka, M Inoue, T Sonoyama, Y Ogino, T Guo. H Koyama, K Nakao. Dietary linoleic acid excess plays a key role in the development of obesity - a multiomics-based analysis. LIPID MAPS Annual Meeting 2016, 2016/5/17-18  
T Tanaka, T Sonoyama, M Inoue, Y Ogino, T Guo, K Nakao. Diet-Induced Obesity is Amenable to Leptin in Conditions of Relative Leptin Deficiency in Mice 33rd Annual Scientific Meeting of The Obesity Society, Los Angeles, 2015/11/05  
T Tanaka, M Inoue, T Sonoyama, M Hirayama, Y Satomi, Y Ogino, T Guo, K Nakao. Hypothalamic lipidome reveals a role of dietary linoleic acid and n-6 fatty acylester accumulation in the development of obesity and leptin resistance. 33rd Annual Scientific Meeting of The Obesity Society, Los Angeles, 2015/11/04  
T Tanaka, T Sonoyama, M Inoue, H Sawada, Y Satomi, Y Ogino, T Guo, K Nakao. Omics-based molecular pathology of the hypothalamus in murine models of obesity. Keystone Symposia (T2, Diabetes : New Insight into Molecular Mechanisms and Therapeutic

Strategies), Kyoto, 2015/10/28  
T Sonoyama, T Tanaka, H Sawada, M Inoue, Y Ogino, T Guo, K Nakao. Dynamism of the Hypothalamic transcriptome uncovers "stages" during the development of diet-induced obesity in mice. Keystone Symposia (T2, Diabetes : New Insight into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies), Kyoto, 2015/10/28  
T Tanaka, T Sonoyama, M Inoue, Y Ogino, T Guo, K Nakao. Metabolomic changes of the hypothalamus associated with high fat diet-induced obesity in mice. The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity, Nagoya, 2015/10/2-4  
田中智洋、園山拓洋、金子賢太郎、雲財知、小林加奈子、小山博之、青谷大介、荻野陽平、Tingting Guo、今枝憲郎、中尾一和. 比較トランスクリプトーム解析による視床下部摂食関連神経核の機能的特徴抽出のこころみ. 第 38 回日本肥満学会 大阪 2017/10/7-8  
雲財知、田中智洋、金子賢太郎、園山拓洋、荻野陽平、Tingting Guo、小山博之、青谷大介、中尾一和. 弓状核特異的遺伝子としてのセリンプロテアーゼ阻害分子の同定と発現解析. 第 38 回日本肥満学会 大阪 2017/10/7-8  
荻野陽平、田中智洋、金子賢太郎、園山拓洋、Tingting Guo、雲財知、小山博之、青谷大介、今枝憲郎、細井徹、小澤光一郎、中尾一和. 脂肪酸によるレプチン応答性変化の系統的解析. 第 38 回日本肥満学会 大阪 2017/10/7-8  
田中智洋、井上雅文、園山拓洋、荻野陽平、Tingting Guo、小山博之、今枝憲郎、中尾一和. 高脂肪食による視床下部リポドーム変化の病態生理的意義. 第 37 回日本肥満学会 東京 2016/10/7  
井上雅文、田中智洋、園山拓洋、里見佳典、荻野陽平、Tingting Guo、中尾一和. 食事誘導性肥満の発症におけるリノール酸の効果 - 代謝パラメータとリポドームの解析 -. 第 36 回日本肥満学会 名古屋 2015/10/3  
園山拓洋、田中智洋、井上雅文、里見佳典、荻野陽平、Tingting Guo、中尾一和. 高脂肪食による肥満発症過程におけるマウス脳脂質プロファイルの変化の検討. 第 36 回日本肥満学会 名古屋 2015/10/2  
田中智洋、園山拓洋、井上雅文、里見佳典、荻野陽平、Tingting Guo、中尾一和. 遺伝性肥満 ob/ob マウスと高脂肪食による肥満マウスの視床下部リポドームの比較. 第 36 回日本肥満学会 名古屋 2015/10/2  
田中智洋、園山拓洋、荻野陽平、郭 婷婷、雲財 知、小林加奈子、金子賢太郎、

- 小山博之、今枝憲郎、中尾一和. 視床下部マルチオミクスパタンに基づく肥満症の病期分類の試み. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 名古屋 2017/5/18  
田中智洋、井上雅文、園山拓洋、荻野陽平、Guo Tingting、雲財 知、小林加奈子、小山博之、今枝憲郎、中尾一和. 食物由来脂質による視床下部リモデリングの分子実態と病態生理的意義 - リピドーム変化の分析から. 第 90 回日本内分泌学会学術総会 京都 2016/4/21
- 21 田中智洋、井上雅文、園山拓洋、荻野陽平、Guo Tingting、小山博之、中尾一和. 肥満発症におけるリノール酸過剰摂取の意義. 第 34 回内分泌代謝学サマーセミナー 福岡・長崎 2016/7/15
- 22 Guo Tingting、田中智洋、荻野陽平、井上雅文、園山拓洋、中尾一和. 視床下部における新規レプチン応答性シグナル伝達分子の探索. 第 34 回内分泌代謝学サマーセミナー 福岡・長崎 2016/7/15
- 23 荻野陽平、田中智洋、園山拓洋、沢田 啓、井上雅文、郭 婷婷、小山博之、中尾一和. 視床下部神経核トランスクリプトーム解析によるレプチン抵抗性の新規原因遺伝子の探索. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 京都 2016/5/19
- 24 田中智洋、園山拓洋、沢田 啓、井上雅文、荻野陽平、Guo Tingting、中尾一和. 視床下部トランスクリプトーム解析から明らかとなった肥満発症の[ステージ]. 第 89 回日本内分泌学会学術総会 京都 2016/4/22
- 25 田中智洋、園山拓洋、沢田啓、井上雅文、荻野陽平、郭婷婷、中尾一和. 視床下部トランスクリプトーム解析から明らかとなった肥満発症の「ステージ」. 第 93 回日本生理学会大会 札幌 2016/3/24
- 26 田中智洋、園山拓洋、沢田啓、井上雅文、荻野陽平、郭婷婷、中尾一和. 視床下部トランスクリプトームから明らかとなる肥満の病態と病期. BMB2015 神戸 2015/12/3
- 27 井上雅文、田中智洋、園山拓洋、里見佳典、平山愛、Mark Christian C. Manio、荻野陽平、Tingting Guo、井上和生、中尾一和. 食事誘導性肥満の発症におけるリノール酸の効果. BMB2015 神戸 2015/12/2
- 28 田中智洋、園山拓洋、井上雅文、荻野陽平、Guo Tingting、中尾一和. 高脂肪食性肥満の病態における視床下部のメタボローム変化. 第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー 福岡 2015/7/10
- 29 園山拓洋、田中智洋、沢田 啓、井上雅文、荻野陽平、Guo Tingting、中尾一和. 高脂肪食負荷マウス視床下部神経核におけるトランスクリプトームの継時的変化の解析. 第 88 回日本内分泌学会学術総会 東京 2015/4/23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

園山拓洋 (SONOYAMA, Takuhiro)  
京都大学・大学院医学研究科・客員研究員  
研究者番号：70582112

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )