

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19505

研究課題名(和文)モデル動物を用いた中枢におけるIRS-1の役割の解明

研究課題名(英文)IRS-1 in the CNS regulates growth in mice

研究代表者

林 高則(Hayashi, Takanori)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：50749257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳特異的にインスリン受容体基質(IRS)-1を欠損させたマウスは全長や体重、骨長、骨密度等が低値であり、血中IGF-1濃度や成長ホルモン濃度も低いことから成長障害を呈していると考えられた。さらに脳特異的IRS-1欠損マウスでは視床下部における成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)の発現レベルが低値であり、また視床下部神経細胞株を用いた検討ではIRS-1をノックダウンすることでIGF-1刺激を介したニューロンの増殖が一部抑制されることが明らかとなった。これらの結果から中枢においてIRS-1はGHRHニューロンの増殖に関与し、成長に重要な役割を担っていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Brain specific insulin receptor substrate (Irs)-1 knockout mice (Nlrs1KO mice) showed lower body weight, smaller body length, shorter bone length and lower bone mineral density than control mice. Additionally serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-1 and growth hormone (GH) were low, suggesting that Nlrs1KO mice displayed growth retardation. We also found that hypothalamic growth hormone releasing hormone (GHRH) RNA expression was decreased in Nlrs1KO mice and knockdown of Irs1 reduced IGF-1 mediated cell proliferation in hypothalamic neuronal cell line. These results strongly indicate that Irs1 in the CNS plays an important role in growth by regulating neural proliferation.

研究分野：糖尿病

キーワード：インスリン受容体基質 インスリン 成長

1. 研究開始当初の背景

(1)糖尿病の患者数は全世界的に急増しており、その制御は社会的にも重要な課題である。糖尿病の発症予防や治療において、適切な栄養管理が重要であることは言うまでもないが、近年中枢特に視床下部におけるインスリン作用が摂食亢進/抑制ペプチドの発現を調節することで個体での摂食調節に重要な役割を担っていることが明らかとなり、さらに中枢でのインスリン作用は摂食調節のみならず肝臓での糖産生を介して糖代謝に深く関わっていることも明らかとなってきた。このように中枢におけるインスリン作用は近年益々注目されておりその解明は新たな糖尿病治療につながる可能性を秘めているものの、インスリン受容体の下流のシグナルなどは十分に検討されていない部分も多い。

(2)インスリン受容体基質(Insulin receptor substrate: IRS)は、インスリンシグナルにおいてインスリン受容体の下流に位置する重要なシグナル分子として同定され、特に IRS-1,2 の糖代謝への関与は広く認識されており、各臓器におけるその働きが検討されてきた。これまでに我々は全身で IRS-1 を欠損したマウスを作成し解析を行い、全身の IRS-1 欠損マウスは主に骨格筋を主体とするインスリン抵抗性を示すと同時に成長障害に伴う低体重を認めることを明らかとした。このことはインスリンシグナルに重要な分子である IRS-1 が糖代謝のみならず成長に深く関与していることを示唆する重要な発見であった。

(3)その後我々の研究室を含め、肝臓や血管内皮・骨格筋などの臓器特異的 IRS-1 欠損マウスの解析により各臓器における IRS-1 の役割が検討されているがいずれのマウスにおいても成長障害は認められていない。また、これまでに脳特異的 IRS-1 欠損マウスの解析は報告されていない。

2. 研究の目的

1994年に世界で初めて当研究室で IRS-1 欠損マウスの解析がなされ、IRS-1 が糖代謝のみならず成長に重要な役割を担うことが明らかとなり、また一方で2000年代に入り臓器特異的遺伝子改変動物を用いた研究により中枢でのインスリン作用の重要性が徐々に解明されてきたが IRS-1 の中枢での役割は未だ不明である。そこで本研究は脳特異的な IRS-1 遺伝子欠損マウスの作成・解析を通じて、個体の成長などの観点から中枢での IRS-1 が担う役割を解明し、最終的にはヒトにおける糖尿病の病態への関与の解明と新規糖尿病治療薬開発への足がかりとなることを目指す。

3. 研究の方法

(1)我々は既に中枢神経(脳)に選択性の高い

発現を誘導する Nestin 遺伝子の制御下に Cre 蛋白を発現する Nestin Cre (Nes) マウスと、IRS-1 遺伝子領域を loxP 配列で挟んだ IRS-1 flox マウスから中枢で IRS-1 遺伝子の発現が欠損しているモデルマウス(脳特異的 IRS-1 欠損マウス: Nlrs1K0)を作成済みである。

(2)対照マウスとしては当初 IRS-1 flox マウスを用いて研究を進めていたが、近年 Nestin cre マウスそのものに成長障害を呈するなどの表現型を有することが報告された。そこで脳特異的 IRS-1 欠損マウスの表現型解析においても Nestin cre の off target な影響を除外するために、対照マウスとして Nestin cre マウスを用いることとした。

(3)個体の成長に対して中枢の IRS-1 が担う役割を明らかとするために、成長ホルモン(GH)、IGF-1 などの成長に関与するホルモンの検討を行った。また GH 分泌臓器である下垂体機能の検討、さらにはその上流である視床下部ホルモンの検討を行った。また視床下部神経細胞株を用い IRS-1 のニューロンの増殖や成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)産生に対する影響を in vitro で検討した。

4. 研究成果

(1)我々はまず、作成した脳特異的 IRS-1 欠損マウスにおいて大脳皮質・小脳・海馬・視床下部といった脳の各部位で IRS-1 蛋白の発現がほぼ消失していることを確認した。一方で IRS-2 の発現量に差は認められなかった。そこで次に、この脳特異的 IRS-1 欠損マウスの表現型の解析を行ったところ、我々は本マウスの体重が少なく、また全長や骨長が短く(図1)、さらに骨密度も低値であることを見出した。

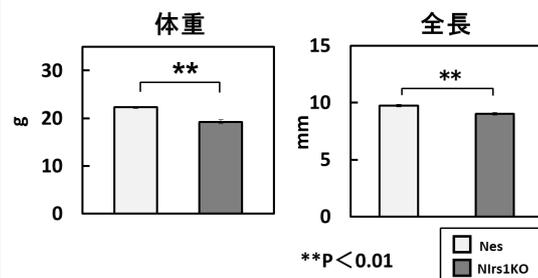


図1 Nlrs1K0 マウスの体重・全長

これまでの報告から脳特異的インスリン受容体欠損マウスや IRS-2 欠損マウスでは摂食量の亢進を伴うことが知られているが、本マウスでは摂食量は変わらず、視床下部における POMC、AgRP、NPY といった摂食関連ペプチドの発現量にも差を認めなかった。また、体温や活動量にも差を認めなかった。さらに各臓器の体重に対する重量比や脂肪量の割合などにも差を認めず、本マウスの低体重・低全長は成長障害によるものである可能性が考えられた。

(2)そこで次に、本マウスにおいて血中インスリン様成長因子(IGF)-1 濃度を測定したところ、本マウスでは血中 IGF-1 濃度が有意に低下しており(図 2)、さらに血中 GH 濃度や下垂体での GH の mRNA 発現も低値であった。これらの結果から脳特異的 IRS-1 欠損マウスは成長障害を呈していることが明らかとなった。

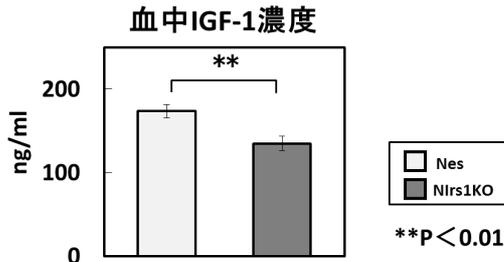


図 2 Nirs1KO マウスの血中 IGF-1 濃度

(3)脳特異的 IRS-1 欠損マウスで明らかとなった成長障害に関して、その詳細なメカニズムを明らかとするために、下垂体に関する検討を進めた。まず GH と同じく下垂体前葉ホルモンである副腎皮質刺激ホルモンやプロラクチンの血中濃度の測定を行ったが、脳特異的 IRS-1 欠損マウスと対照群で差を認めず、また下垂体での甲状腺刺激ホルモンや黄体形成ホルモンの mRNA 発現も差を認めなかった。さらに下垂体において GH などのホルモン産生細胞への発生分化に重要な転写因子である Pit-1 の発現にも差を認めなかった。次に下垂体機能を評価するために、本マウスに強力な GH 分泌刺激作用を有する GHRP-2 の投与を行い、その後の血中 GH 濃度を調べてみたところ脳特異的 IRS-1 欠損マウスとコントロールマウスで差を認めなかった。また、本マウスにおける下垂体での IRS-1 の蛋白発現は保たれていることも確認された(図 3)。これらの結果から脳特異的 IRS-1 欠損マウスの下垂体機能は正常であり、本マウスで認められた成長障害の原因は、ホルモン分泌において下垂体の上流にある視床下部である可能性が強く示唆された。

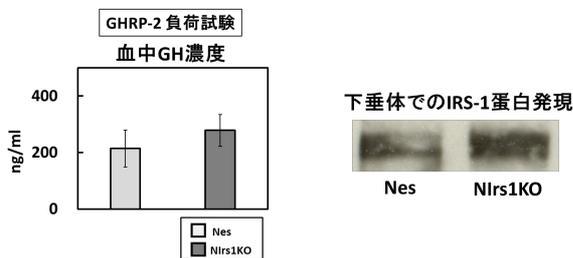


図 3 GHRP-2 負荷試験(左)
下垂体での IRS-1 蛋白発現(右)

(4)次に我々は、脳特異的 IRS-1 欠損マウスの成長障害の原因が視床下部にあるのでは

ないかと考え、視床下部の mRNA を採取しその検討を行った。視床下部において GHRH は下垂体での GH 分泌を正に制御し、またソマトスタチンは負に制御することが知られている。実際に本マウスにおいて両ホルモンの発現を比較すると、ソマトスタチンの発現レベルは変わらないものの GHRH の発現が有意に低下しており(図 4)、脳特異的 IRS-1 欠損マウスは視床下部での GHRH の発現が低下することで成長障害を来したことが明らかとなった。

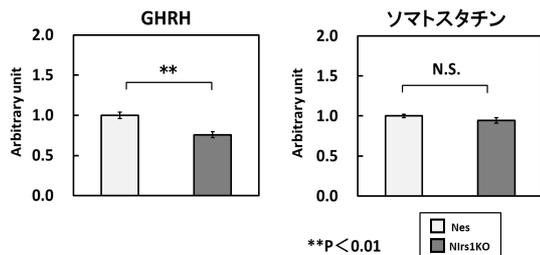


図 4 視床下部での mRNA 発現

(5)最後に我々は、脳特異的 IRS-1 欠損マウスで認められた視床下部での GHRH 発現低下のメカニズムの検討を in vitro で行った。これまでに IGF-1 刺激が視床下部 GHRH ニューロンの伸展に重要であるとの報告がある。そこで視床下部神経細胞株を用い、siRNA で IRS-1 をノックダウンした状況で IGF-1 刺激を行い、ニューロンの増殖を調べた。その結果 IGF-1 刺激で細胞増殖は亢進するが、IRS-1 をノックダウンした状況ではその増殖の一部がキャンセルされることが分かった(図 5)。一方 IRS-1 をノックダウンした状況でも細胞の GHRH 発現量(-actin の発現量で補正した量)自体には差を認めなかった。これらの結果から、視床下部において IRS-1 は GHRH 分泌メカニズムそのものではなく、ニューロンの増殖に関与し、成長に重要な役割を担っている可能性が強く示唆された。

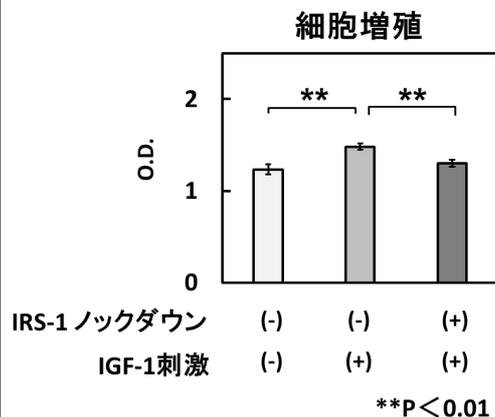


図 5 細胞増殖の検討

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)

〔学会発表〕(計5件)

林高則、インスリン受容体基質(IRS-1)の中枢における役割の解明、第31回日本糖尿病・肥満動物学会、2017年2月10~11日、はまぎんホール ヴィアマーレ(神奈川県・横浜市)

林高則、中枢におけるインスリン受容体基質(IRS-1)の役割の解明、第37回日本肥満学会、2016年10月7~8日、東京ファッショントウン(東京都・江東区)

林高則、中枢のIRS-1は成長に關与する、第59回日本糖尿病学会、2016年5月19~21日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

林高則、中枢におけるインスリン受容体基質(IRS-1)の役割の検討、第30回日本糖尿病・肥満動物学会、2016年3月11~12日、大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)

林高則、中枢のIRS-1は成長に關与する、第58回日本糖尿病学会、2015年5月21~24日、海峡メッセ下関(山口県・下関市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

林高則(HAYASHI, Takanori)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号: 50749257