

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08473

研究課題名（和文）高脂肪食投与下の報酬系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 reward system under a high fat diet condition

研究代表者

坂野 僚一（Banno, Ryoichi）

名古屋大学・総合保健体育科学センター・准教授

研究者番号：80597865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脳内報酬系は食嗜好において重要な役割を担う。報酬系のニューロンはレプチン、インスリンおよび炎症による調節を受けている。これら3つの因子を制御するprotein tyrosine phosphatase-1B（PTP1B）が高脂肪食に対する嗜好性に与える影響を調べたところ、報酬系の中脳腹側被蓋野におけるドーパミンニューロンにおいて高脂肪食への嗜好形成に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファーストフードの過食は肥満となる。ファーストフードに代表される高脂肪食への食嗜好について脳内報酬系ニューロンに着目し解析したところ、少なくともドーパミンニューロンにおけるprotein tyrosine phosphatase-1B（PTP1B）というタンパク質が高脂肪食への嗜好形成に寄与することが示唆された。ファーストフードへの食嗜好性の解明は将来における抗肥満薬開発への一助となる。

研究成果の概要（英文）：The brain reward system plays an important role in hedonic values of food. The neurons in reward system are regulated by leptin, insulin and inflammation.

We investigated the effect of protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B), which regulates these three factors, on palatability for a high-fat diet.

Our data suggested that PTP1B in the dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the midbrain in the reward system contributes to the formation of preference for a high-fat diet.

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 食嗜好 高脂肪食 報酬系 インスリン レプチン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満は糖尿病、高血圧、脂質異常症、癌など様々な疾患の原因となる慢性疾患であるが病態は未だ不明な点が多く確立した内科治療法はない。肥満では中枢においてレプチンおよびインスリン抵抗性が生じており、抵抗性が生じる病理機序の解明や抵抗性を解除する薬剤の開発が進められている。高脂肪食 (HFD) の摂取は視床下部炎症性を惹起しレプチンおよびインスリン抵抗性をきたすことで肥満形成の起点となることが報告されている。これまでに我々もマウスの視床下部炎症の亢進が肥満症に繋がることを報告した (文献①)。

(2) インスリンおよびレプチンはチロシンリン酸化のリレーを介してシグナルを伝達するが、protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) はチロシンの脱リン酸化作用を介してこれらのシグナル伝達を阻害する代表的な酵素である。HFD 投与に伴い視床下部の PTP1B 発現は増強することが知られており、その機序として我々は視床下部器官培養法を用いて、炎症サイトカインである TNF $\alpha$  がそのシグナル下流にある NF $\kappa$ B を介して視床下部 PTP1B の発現および活性を増強することを報告した (文献②)。先行研究では 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 システムを用いて視床下部弓状核の POMC ニューロン特異的に PTP1B 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 (文献③)。また、PTP1B 欠損マウスでは視床下部のインスリン感受性亢進を介して AgRP mRNA 発現の減弱をきたすことを報告した (文献④)。近年、HFD 摂取に伴う視床下部炎症にはグリア細胞の関与が指摘されており、我々は、PTP1B 欠損下でミクログリアにおける TNF $\alpha$  発現が低下し視床下部炎症が減弱することを報告し (文献⑤)、アストロサイト特異的に PTP1B を欠損させると HFD 投与下で肥満抵抗性をきたすことを確認している (科研費課題番号 15K09381 基盤研究C、未発表データ)。以上の知見から、PTP1B はレプチンおよびインスリン受容体シグナルのみならず炎症シグナルの調節因子としての機能も兼ね備えており、肥満病理の解析や治療法の開発に大変有用な標的蛋白であることが示唆される。

### 2. 研究の目的

(1) 近年、高脂肪食をなぜ過剰に摂取してしまうのか、という問いに対し、高脂肪食への嗜癖が注目されている。すなわち、「動物性脂肪への依存」と「薬物依存」には類似性があり、「動物性脂肪への依存」からの脱却は麻薬よりも困難であることが報告されている。こうした依存形成は中脳皮質辺縁経路の報酬系によって制御されており、中脳腹側被蓋野 (VTA) から側坐核 (NAc) に投射するドーパミンニューロンが中心的な役割を果たしている。先行研究においてレプチンやインスリンは報酬系の調節因子であり、脳室内投与すると高脂肪食への嗜好性が減弱すること、薬物依存では報酬系に炎症が生じていることが報告されている。一方、報酬系における PTP1B の欠損は如何なる作用を示すのか未だ明らかではない。

(2) 本研究では、報酬系における PTP1B の役割を明らかにする目的で、VTA もしくは NAc で特異的に PTP1B を欠損させたマウスを作成し、報酬系に与える影響を検討することで高脂肪食投与に伴う肥満発症の病態生理に迫ることを目的として実験を行う。

### 3. 研究の方法

(1) ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスの繁殖と作成  
Cre-loxP システムを用いて組織特異的 PTP1B 欠損マウスを作成する。ドーパミンニューロン特異的に Cre が発現する Dopamine transporter Cre マウス (Jack stock #006660 購入済) マウスもしくは側坐核を含む線条体ニューロン特異的に Cre を発現する Gpr88 Cre マウス (理化学研究所 Hisatsune C et al., 2013 Transgenic Res 入手済) と PTP1B fl/fl マウス (米国ペンシルバニア大学 元教授 Kendra Bence 博士より移譲済) を交配させて野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型マウスを作成する。次に、VTA もしくは NAc を含む脳切片を作成し、PTP1B の発現について組織学的手法を用いて野生型とホモ接合型の両群間で比較検討しホモ接合型において組織特異的に PTP1B が欠損していることを確認する。更に VTA もしくは NAc を含む領域から DNA を抽出し、所定のプライマーを使用して PCR 法にて loxP 配列の組み換えが生じていることを確認する。

(2) 組織特異的 PTP1B 欠損マウスにおけるエネルギーバランスおよび糖代謝の検討  
普通食または高脂肪食を離乳時よりマウスに投与し、摂食量、体重、エネルギー消費の変化を各群間で比較検討する。

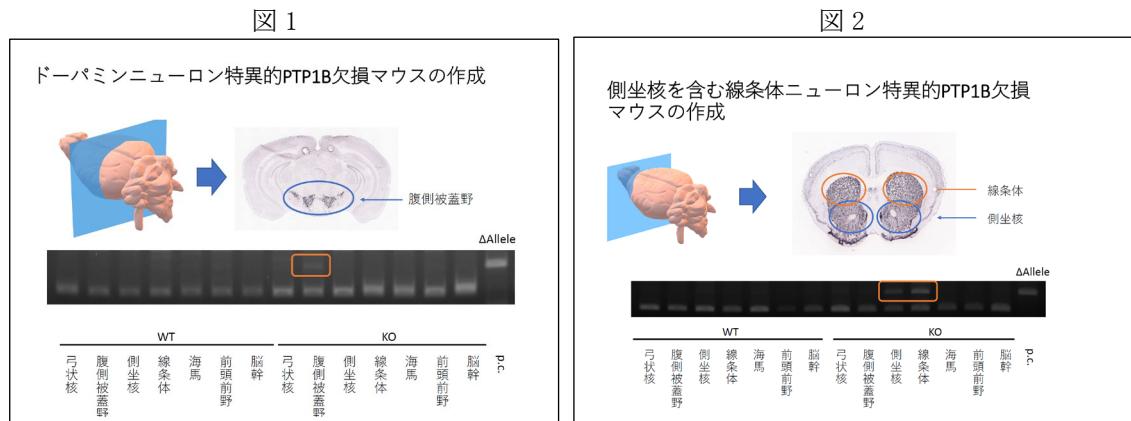
(3) 組織特異的 PTP1B 欠損マウスにおける「高脂肪食への嗜癖」の検討  
高脂肪食を用いて条件付け位置嗜好性試験 (CPP) を行い、野生型マウスと組織特異的 PTP1B 欠損マウスで CPP score を測定して両群間における高脂肪食への嗜好性の違いを評価する。

#### (4) 報酬系におけるグリア細胞の検討

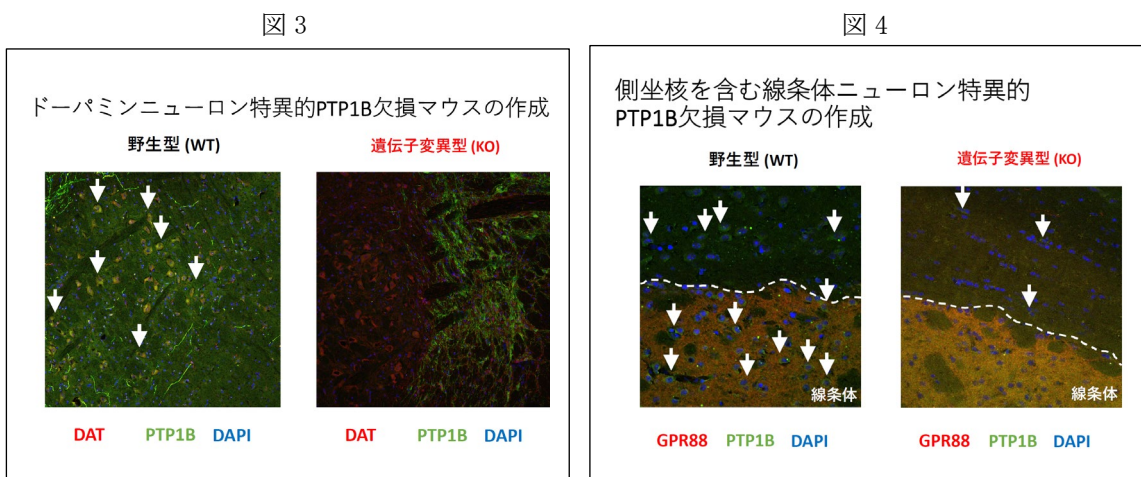
高脂肪食投与に伴い VTA もしくは NAc で炎症が生じるかを否か検討し、ミクログリアおよびアストロサイトの活性を評価する。また、インスリンもしくはレプチンを脳室内投与し、それぞれ Akt もしくは STAT3 のリン酸化をウエスタンブロット法で評価し、VTA もしくは NAc においてインスリンもしくはレプチン抵抗性が生じるかを否かを評価し、PTP1B 欠損モデルでこれらの抵抗性が改善するかを否かを評価する。

#### 4. 研究成果

(1) ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスの繁殖と作成  
 図 1 および図 2 に示すように、脳内の各部位から DNA を抽出し、Cre-lox recombination が生じたときのみ陽性となる Δ バンドの発現を調べたところ、DAT-Cre PTP1B flox マウスでは中脳腹側被蓋野、GPR88-Cre PTP1B flox マウスでは線条体および側坐核のみで Δ バンドを認めた。



更に、免疫染色法を用いた評価したところ、図 3 (DAT-Cre PTP1B flox) に示すように野生型では中脳腹側被蓋野において DAT と PTP1B の共染色を認めるが PTP1B 欠損マウスでは認めなかった。同様に、図 4 (GPR88-Cre PTP1B flox) に示すように野生型では側坐核を含む線条体において GPR88 と PTP1B の共染色を認めるが PTP1B 欠損マウスでは認めなかった。以上の結果から、ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスの作成に成功した。



#### (2) 組織特異的 PTP1B 欠損マウスにおけるエネルギーバランスおよび糖代謝の検討

ドーパミンニューロン特異的に PTP1B 欠損させたマウスと野生型マウスに生後 3 週齢より高脂肪食を投与し、野生型と PTP1B 欠損マウスでそれぞれの体重変化を比較検討したところ雌雄ともに野生型と PTP1B 欠損型の間で体重差を認めなかった (図 5、図 6)。また、16 週齢における血糖値、褐色脂肪重量および白色脂肪重量を測定したところ、雌雄ともに両群間で有意差を認めなかった。

次に、線条体ニューロン特異的に PTP1B を欠損させたマウスにおいて同様の検討を行ったところ、雌雄ともに野生型と PTP1B 欠損型の間で体重差を認めなかった。また、16 週齢における血糖値、褐色脂肪重量および白色脂肪重量を測定したところ、雌雄ともに両群間で有意差を認めなかった。

以上の結果から、報酬系ニューロンにおいて PTP1B の有無はエネルギーバランスに影響を与えないことが確認された。

図 5

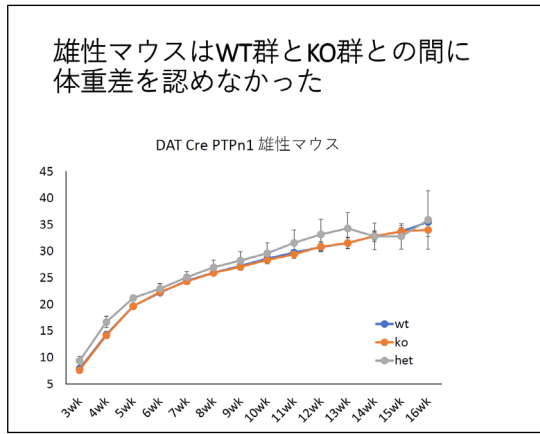
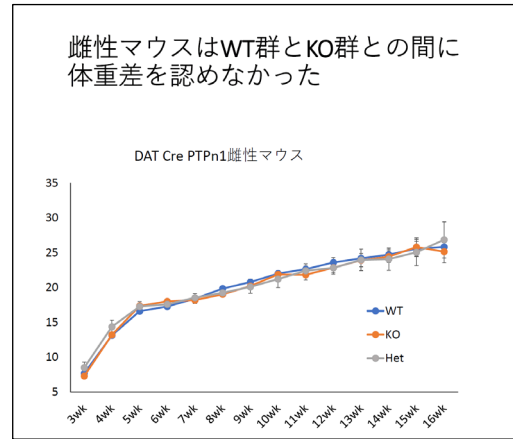


図 6



(3) 組織特異的 PTP1B 欠損マウスにおける「高脂肪食への嗜癖」の検討

ドーパミンニューロン特異的に PTP1B 欠損させたマウスと野生型マウスに CPP (Conditioned Place Preference) を行い、高脂肪食への嗜癖を検討したところ、雌雄ともに野生型では高脂肪食に対する志向性を認めたが、PTP1B 欠損マウスでは高脂肪食に対する志向性が減少した(図 7、図 8)。一方、線条体ニューロン特異的に PTP1B を欠損させたマウスにおいて同様の検討を行ったところ、雌雄ともに野生型と PTP1B 欠損型の間で CPP score に差を認めなかった。

図 7

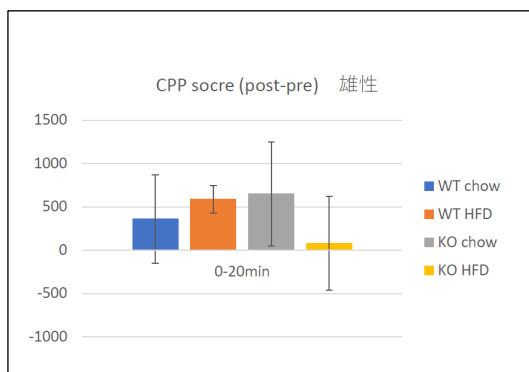
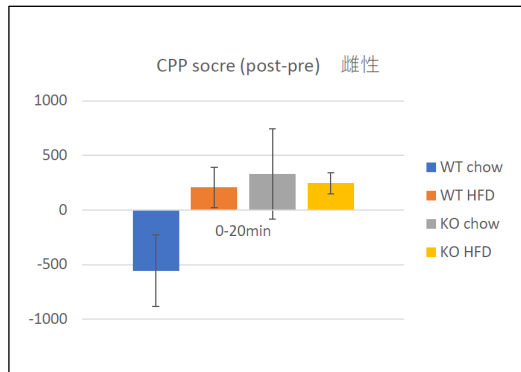


図 8



(4) 報酬系におけるグリア細胞の検討

野生型マウスに普通食、もしくは高脂肪食を与えたところ、中脳腹側被蓋野において高脂肪食投与 7日目から炎症性サイトカインおよびミクログリア活性化マーカーの mRNA 発現の有意な増強を認めた(図 9)。また免疫染色においてミクログリアと TNF $\alpha$  の共染色を確認した(図 10)。

図 9

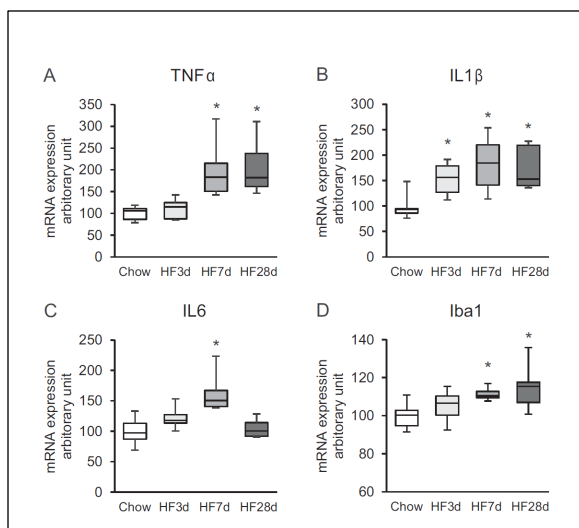
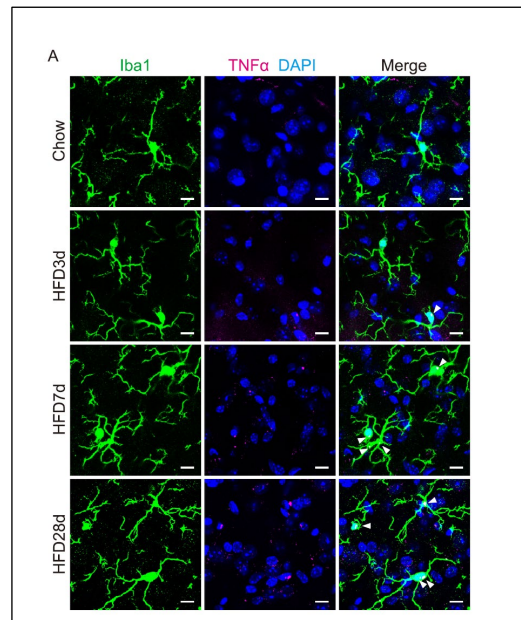


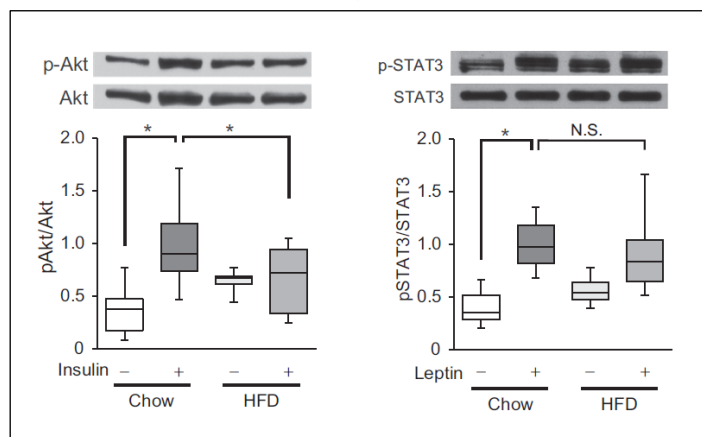
図 10



次に、インスリンもしくはレプチンを脳室内投与し、高脂肪食投与7日目でインスリンもしくはレプチン抵抗性が生じているか否かを評価した。

図 11

その結果、高脂肪食投与群では普通食投与群と比較してAktのリン酸化が有意に減弱しており高脂肪食投与に伴い中脳腹側被蓋野においてインスリン抵抗性が生じていることが確認された。一方、STAT3のリン酸化については高脂肪食投与群と普通食投与群の間で有意差が生じなかったことから、高脂肪食投与7日という比較的短期間においてはレプチン抵抗性が生じないことが確認された。



これらの研究知見をまとめて報告した (Neuroscience. 2021 461:72-79.)。

中脳腹側被蓋野では高脂肪食投与に伴う PTP1B の発現増強も認めており、高脂肪食に対する嗜好はドーパミンニューロンにおけるインスリン受容体シグナルが関与する可能性が示唆された。

<引用文献>

- ① Ito Y, Banno R et al., *J Neurosci.* 33:17166-73 査読有
- ② Ito Y, Banno R et al., *Regul Pept.* 174:58-64 査読有
- ③ Banno R et al., *J Clin Invest.* 120:720-34 査読有
- ④ Sugiyama M, Banno R et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 488:116-121 査読有
- ⑤ Tsunekawa T, Banno R et al., *EBioMedicine.* 16:172-183 査読有

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akira Mizoguchi, Ryoichi Banno, Runan Sun, Hiroshi Yaginuma, Keigo Taki, Tomoko Kobayashi, Mariko Sugiyama, Taku Tsunekawa, Takeshi Onoue, Hiroshi Takagi, Daisuke Hagiwara, Yoshihiro Ito, Shintaro Iwama, Hidetaka Suga, Hiroshi Arima	4. 巻 461
2. 論文標題 High-fat Feeding Causes Inflammation and Insulin Resistance in the Ventral Tegmental Area in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 72, 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2021.02.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 溝口 暁 坂野 僚一 柳沼 裕史 滝 啓吾 杉山 摩利子 高木 博史 伊藤 禎浩 有馬 寛
2. 発表標題 中脳腹側被蓋野ドーパミンニューロンにおけるグルココルチコイド受容体シグナルは ストレス下において高脂肪食への嗜好形成を増強する
3. 学会等名 第92回 日本内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizoguchi A, Banno R, Sun R, Yaginuma H, Taki K, Sugiyama M, Tsunekawa T, Takagi H, Ito Y, Arima H
2. 発表標題 High-fat feeding causes inflammation and insulin resistance in ventral tegmental area in mice.
3. 学会等名 2019 Obesityweek (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口 暁、坂野 僚一、滝 啓吾、杉山 摩利子、恒川 卓、高木 博史、伊藤 禎浩、有馬 寛
2. 発表標題 高脂肪食の摂取により中脳腹側被蓋野に炎症が生じる
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizoguchi A, Banno R, Yaginuma H, Taki K, Sugiyama M, Tsunekawa T, Takagi H, Ito Y, Arima H
2. 発表標題 High-fat feeding causes microglial activation and inflammation in ventral tegmental area in mice.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	有馬 寛  (Arima Hiroshi)  (50422770)	名古屋大学・医学系研究科・教授    (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------