

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11655

研究課題名(和文) 食物中の中性脂肪を感知し恒常性を維持する機構の解明 生活習慣病改善方法の探索

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism to detect neutral fat in food and maintain homeostasis-Search for lifestyle-related disease improvement method

研究代表者

金子 葉子 (KANEKO, Yoko)

岐阜医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：20319263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： type I TNF受容体欠損マウス(R1-KO)、type II TNF受容体欠損マウス(R2-KO)、両受容体欠損マウス(D-KO)およびC57BL/6(WT)を通常食またはHFDで8週間飼育し、各種パラメーターを測定した。HFD飼育により4群全てで体重増加が認められたが、R1-KOの増加率は優位に低かった。R2-KO、D-KO、WTはHFD飼育によりインスリン抵抗性を示したが、R1-KOは示さなかった。R2-KO、D-KOは通常食でも体重が増加し、D-KOはインスリン抵抗性を示した。これらのデータは、TNF受容体サブタイプに応じてインスリン抵抗性の発症に違いがあることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究ではR1-KOはHFD飼育で体重が増加しないと報告されていた。その理由として、type I TNF受容体が欠損していることによりTNF による炎症反応が起こらないことが挙げられる。一方、R2-KOをHFDで飼育すると炎症を抑制する経路が抑制されるため、体重が増加すると考えられていたが、D-KOについては既知の報告は認められなかった。D-KOは通常食でも体重が増加し、インスリン抵抗性を示したことから、D-KOの体重が増加するメカニズムを解明することにより、糖尿病の予防、治療法につなげられると考える。

研究成果の概要(英文)： Mice lacking type I TNF receptor (R1-KO), type II TNF receptor (R2-KO), mice lacking both receptors (D-KO), and C57BL/6 (WT) were fed with a normal diet (chow) or high fat diet (HFD) for 8 weeks, and various parameters were measured.

All four groups gained weight when they were fed with HFD, but the rate of weight gain was significantly lower in R1-KO. R2-KO, D-KO and WT showed insulin resistance when they were fed with HFD, but R1-KO did not. R2-KO and D-KO gained weight even with chow, and D-KO showed insulin resistance. These data suggest that there are differences in the development of insulin resistance depending on the TNF receptor subtype.

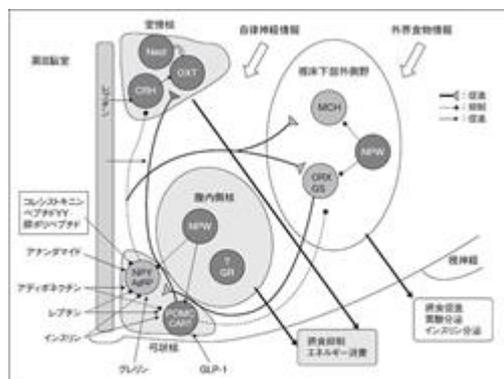
研究分野：神経生理学

キーワード：TNF受容体 2型糖尿病 インスリン インスリン受容体 HOMA-IRインデックス

### 1. 研究開始当初の背景

肥満が要因となり発症する疾患は、糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病である。さらに動脈硬化を引き起こし、心筋梗塞や脳卒中などの原因にもなる。

摂食行動は、視床下部を中心として大脳皮質から脊髄までの神経ネットワークによって制御されている。近年、視床下部の炎症反応が肥満の一原因であると報告されている。肥満者や高脂肪食飼育マウスの視床下部でミクログリアの恒常的な活性化が起こり、ミクログリアが産生する炎症性サイトカインによって神経細胞の小胞体ストレス、酸化ストレスが亢進し、アポトーシスを誘導すると報告されている。活性化ミクログリアがエネルギーの恒常性を調節しているという報告も認められる。さらに、グラム陰性桿菌の菌体毒素であるLPSにより炎症を惹起すると、体重増加しないにもかかわらず中枢性のインスリン抵抗性を引き起こすと報告された。



視床下部における摂食調節のネットワーク

また、第3脳室周囲に存在するタニサイトが体循環中のホルモンおよび栄養素の情報を正中隆起～視床下部内側基底部に伝達すると報告されている。

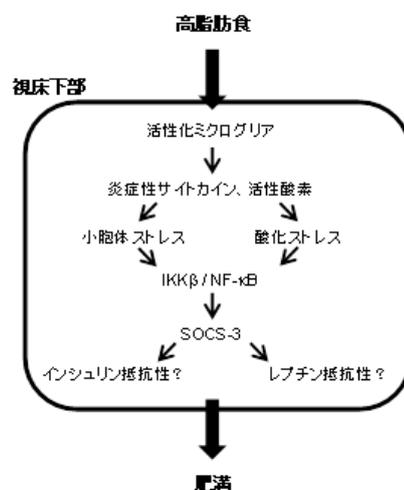
現在の視床下部の機能低下症に対する治療はホルモン補充療法が主流であるが、視床下部-下垂体の複雑で緻密な制御を再現するためには胚性幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を用いた神経難病治療法が望まれている。

視床下部におけるミクログリアの活性化が、どのような経路によって肥満に繋がるかという詳細なメカニズムについては不明であった。また、内分泌性肥満の治療に ES 細胞、iPS 細胞による治療法が可能であるかはまだ不明であった。

### 2. 研究の目的

摂食行動は、視床下部を中心とした神経ネットワークによって制御されている。近年の研究において、肥満者の視床下部において慢性炎症が生じていること、マウスを高脂肪食で飼育することにより視床下部におけるミクログリアの活性化が起こり、小胞体ストレス、酸化ストレスが亢進することが報告されている。それにより神経ネットワークが攪乱されて摂食行動が適切に制御されないことが、肥満の原因の一つであると考えられる。

そこで、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  に対する受容体を欠損したマウスに高脂肪食を投与して生化学的解析を行うとともに、視床下部におけるタニサイト、ミクログリアと神経細胞を形態学的に解析する。マウス ES 細胞を視床下部神経細胞に分化させ、移植することにより高脂肪食投与による肥満に影響を及ぼすかどうか検討する。



以上の実験により視床下部の炎症反応と肥満の関連性を解明し、視床下部性肥満の治療法を探索するのが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

1. TNFR1 欠損マウス (TNFR1-KO) と TNFR2 欠損マウス (TNFR2-KO)、両受容体を欠損しているマウス (D-KO)、C57BL/6 マウス (WT) に高脂肪食を投与し、経日的に食餌量 (摂取カロリー)、体重を計測した。血液、脂肪組織、脳をサンプリングした。
2. 血糖値、中性脂肪、インシュリン、レプチンを測定した。
3. 室傍核、弓状核におけるミクログリアを抗 Iba1 抗体、活性化ミクログリアの指標である抗 CD14 抗体で染色して解析した。
4. 室傍核、弓状核における食欲抑制あるいは促進に関与している神経細胞 (POMC 神経、NPY 神経) の数、ER ストレス、アポトーシス等について免疫組織染色、測定キットを用いて解析した。
5. 各マウスの皮下脂肪、内臓脂肪におけるアディポネクチンの発現量を real-time PCR、ウエスタンブロッティング法で解析した。
6. 各マウスを用いて、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行い、糖代謝能を解析した。
7. マウス ES 細胞を視床下部の各神経核に分化させ、高脂肪食で飼育したマウスの腎臓に移植した。ES 細胞の分化は各ステージにおける分化マーカーを免疫組織染色により解析した。炎症

で損傷した神経細胞が補填されるか免疫組織染色により解析した。

8. インスリン受容体、IRS-1 のリン酸化をウェスタンブロッティング法で解析した。

#### 4. 研究成果

TNF- $\alpha$  受容体には 2 つのサブタイプがある。この研究では type I TNF 受容体欠損マウス (R1-KO)、type II TNF 受容体欠損マウス (R2-KO)、両受容体欠損マウス (DKO) および C57BL/6 (WT) を通常食または HFD で飼育し、接種したカロリー、体重の変化を 8 週間測定した。血中のトリグリセリド、グルコース、インスリンの濃度を測定した。

HFD で飼育した R1-KO、R2-KO、D-KO、WT の体重増加率は、それぞれ 57.7%、75.3%、73.4%、73.4% であった。R2-KO と D-KO は通常食でも体重が増加し、それぞれ 13.2% と 19.6% であった (Fig. 1)。

HFD により、R2-KO、D-KO、WT の血糖値は約 1.5 倍に増加し、インスリン濃度は 5 倍以上増加した。R1-KO では血糖値、インスリン濃度ともに HFD と通常食での飼育において有意な差は認められなかった (Fig. 2 Fig. 3)。

インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR インデックスは、HFD で飼育された R2-KO で 35.2、D-KO で 40.0、WT で 21.0 であり、重度のインスリン抵抗性を示すことが明らかになった。D-KO は通常食の飼育においてもインデックスが 4.3 と、インスリン抵抗性状態にあることが判明した (Fig. 4)。

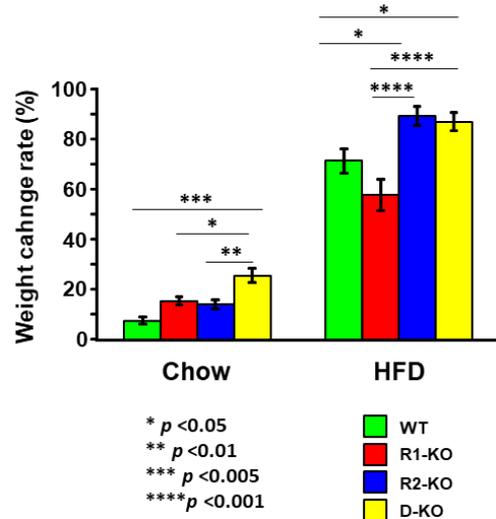


Figure 1 Weight change after 8 weeks

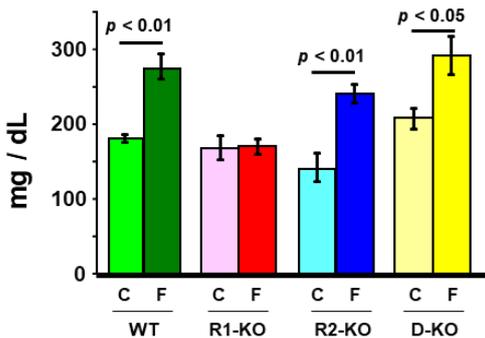


Figure 2 Blood sugar level after 8 weeks

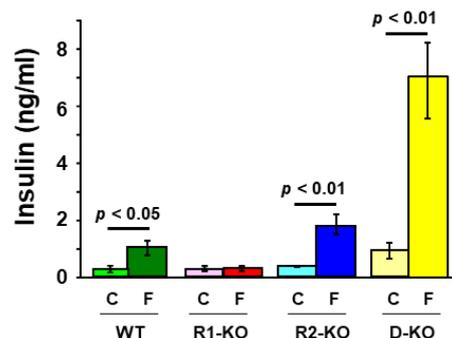


Figure 3 Insulin concentration after 8 weeks

室傍核、弓状核におけるミクログリア、活性化ミクログリアと、食欲抑制あるいは促進に関与している神経細胞 (POMC 神経、NPY 神経) を二重染色して解析したが、HFD で飼育した R1-KO と R2-KO、D-KO に明確な差は認められなかった。

各群のマウスの皮下脂肪、内臓脂肪におけるアディポネクチンの発現量を real-time PCR、ウェスタンブロッティング法で解析したところ、HFD 飼育の R2-KO において TNF- $\alpha$  の発現量が増加した。HFD 飼育の D-KO では IL-1 $\beta$  の発現量が増加した。R2-KO では TNF $\alpha$  による炎症、D-KO では IL-1 $\beta$  による炎症が肥満に関連していると考えられる。

各群のマウスを用いて、グルコース負荷試験を行い、糖代謝能を解析した。HFD 飼育群では R1-KO 以外、血糖値の低下が認められず、糖代謝に異常が認められた (Fig. 5)。

これらのデータは、TNF 受容体サブタイプに応じてインスリン抵抗性の発症に違いがあることを示唆している。そこで、インスリン受容体のシグナル伝達について解析した。

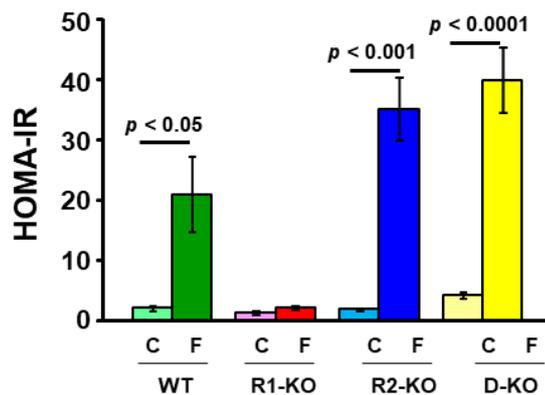


Figure 4 Insulin resistance after 8 weeks

インスリン受容体はインスリンとインスリン様成長因子によって活性化される膜貫通タンパク質受容体で、受容体型チロシンキナーゼである。自己リン酸化されるとともに、IRS や Shc などの基質タンパク質をリン酸化する。リン酸化された基質タンパク質は、PI3K-Akt 経路などの下流のシグナル伝達分子と結合することにより、インスリンの代謝作用や増殖作用などが発現される。IRS-1 の Tyr612、Ser307 のリン酸化を解析した。Tyr612 のリン酸化は正常、Ser307 のリン酸化はインスリン抵抗性を示す。R1-KO は HFD 飼育群でも Tyr612 のリン酸化が認められた。D-KO では、通常食でも Ser307 のリン酸化が認められ、インスリン受容体にインスリンが結合した際のシグナルが細胞内に伝えられていない可能性が示唆された。今後、詳細な検討が必要である。

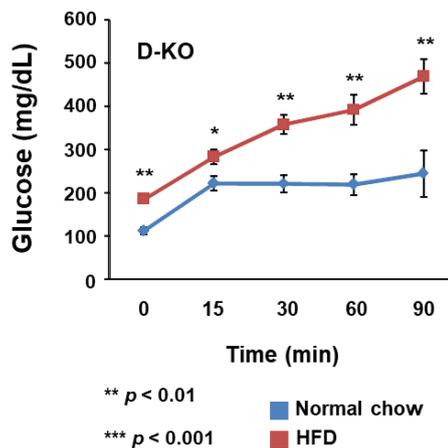


Figure 5 Glucose tolerance test

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawata M, Kodani Y, Ohkuma M, Miyachi E, Kaneko YS, Nakashima A, Suga H, Kameyama T, Saito K, Nagasaki H	4. 巻 17
2. 論文標題 Long-range axonal projectons of transplanted mouse embryonic stem cell-derived hypothalamic neurons into adult mouse brain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.137/journal.pone.0276694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kodani Y, Kawata M, Suga H, Kaneko YS, Nakashima A, Kameyama T, Saito K, Nagasaki H	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of hypothalamic MCH neuron development in a 3D differentiation system of mouse embrionic stem cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0442-21.2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima A, Yamaguchi H, Kondo M, Furumura T, Kodani Y, Kaneko YS, Kawata M, Nagasaki H, Ngatsu T, Ota A	4. 巻 127
2. 論文標題 NT5DC2 affects the phosphorylation of tyrosine hydroxylase regulating its catalytic activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 1631-1340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00702-020-02236-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima A, Yamaguchi H, Kodani Y, Kaneko YS, Kawata M, Nagasaki H, Nagatsu T, Ota A	4. 巻 516
2. 論文標題 Identification by nano-LC-MS/MS of NT5DC2 as a protein binding to tyrosine hydroxylase: Down-regulation of NT5DC2 by siRNA increases catecholamine synthesis in PC12D cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1060-1065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 0件）

1. 発表者名 金子葉子、小谷侑、河田美穂、中島昭、長崎弘
2. 発表標題 TNF受容体のサブタイプとインスリン抵抗性発症の関連性の解明
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河田美穂、小谷侑、金子葉子、中島昭、長崎弘
2. 発表標題 移植したマウスES細胞由来視床下部神経の長期生存と適切な軸索伸長
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷侑、金子葉子、河田美穂、中島昭、長崎弘
2. 発表標題 マウスES細胞を用いた視床下部タニサイト発生モデルの構築
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子葉子
2. 発表標題 TNF受容体のサブタイプとインスリン抵抗性発症の関連性
3. 学会等名 第144回日本薬学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本生理学会 監修 日本生理学会用語委員会 編	4. 発行年 2024年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 324
3. 書名 生理学用語ハンドブック	

〔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	長崎 弘 (NAGASAKI Hiroshi) (30420384)	藤田医科大学・医学部・教授  (33916)	
研究分担者	小谷 侑 (KODANI Yu) (60644622)	藤田医科大学・医学部・講師  (33916)	
研究分担者	河田 美穂 (KAWADA Miho) (90761601)	藤田医科大学・医学部・助教  (33916)	

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
---------	---------