

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18005

研究課題名(和文) AgRPニューロン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 AgRP neurons

研究代表者

杉山 摩利子 (Sugiyama, Mariko)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70823540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病モデル(IDDM)マウスにおいてレプチンによる血糖降下作用の機序解明の目的で、AgRPもしくはPOMCニューロン特異的にProtein Tyrosine Phosphatase 1Bを欠損させたマウスを作成し、ストレプトゾトシンを腹腔内投与してIDDMマウスを作成後、レプチンを末梢投与して糖代謝に与える影響を検討した。AgRP KOマウスではレプチンによる血糖降下作用は野生型と比較してわずかに認められたのみであったが、POMC KOマウスにおいては血糖降下作用が野生型と比較して有意であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗PTP1B薬はインスリン、レプチンシグナルを改善する薬剤として糖尿病治療薬として臨床試験中である。本研究ではIDDMモデルマウスにおいて、中枢において糖代謝を司るPOMCおよびAgRPニューロン特異的にPTP1Bを欠損させたモデルマウスを用いて糖代謝を評価した。本研究の結果は抗PTP1B薬の作用機序の解明に寄与し、また治療選択肢の乏しいIDDM患者において新たな治療戦略の提示につながり社会的な貢献は大きい。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of elucidating the mechanisms of the hypoglycemic effect of leptin in type 1 diabetes model (IDDM) mice, we generated mice lacking Protein Tyrosine Phosphatase 1B specifically in AgRP or POMC neurons, and administered streptozotocin intraperitoneally to generate IDDM mice. After the mice were prepared, the effect of peripheral administration of leptin on glucose metabolism was examined. In AgRP KO mice, the hypoglycemic effect of leptin was only slightly observed compared to the wild type, but in POMC KO mice, the hypoglycemic effect was confirmed to be significant compared to the wild type.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学・代謝学

キーワード：PTP1B AgRP POMC レプチン

1. 研究開始当初の背景

現在、世界における肥満人口は急速に増加している。肥満は2型糖尿病、動脈硬化症、悪性腫瘍など多くの慢性疾患の原因であるにも関わらず未だ効果的な解決策は見出せていない。

エネルギーバランスは視床下部で調節されており、脂肪細胞と膵臓からそれぞれ分泌されるレプチンとインスリンは視床下部弓状核に存在する pro-opiomelanocortin (POMC) neuron および agouti-related protein (AgRP) neuron に直接作用し体重を減少させる。高脂肪食 (HFD) の摂取は視床下部炎症性を惹起し両ニューロンにおける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。両ホルモンともに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、視床下部で PTP1B の発現を増強させると体重増加を来すことが報告されている。

逆に、PTP1B を全身性、脳特異的もしくは POMC ニューロン特異的に欠損させると肥満抵抗性を来すことが報告されている。また、PTP1B は炎症の調節因子でもあり、筆者らは PTP1B 欠損下においてミクログリアにおける TNF α 発現は低下し視床下部炎症が減弱することを報告している (Tsunekawa T, Sugiyama M et al., 2017 EBioMedicine)。

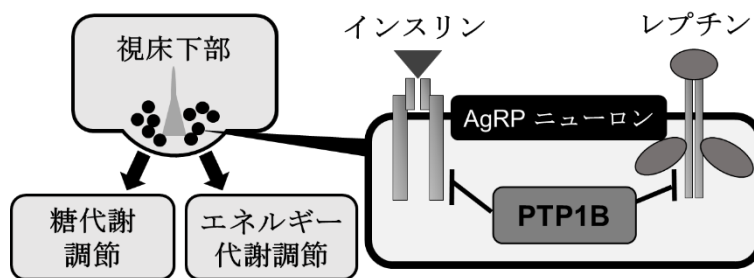


図1 本研究の概略図

2. 研究の目的

肥満症の発症機序を考える上で重要な2つの要素として視床下部ニューロンによるホメオスタシス系と中脳皮質辺縁経路による報酬系が知られているが、他の先行研究において報酬系が肥満のフェノタイプに与える影響については限定的な報告が多い。

PTP1B 欠損部位		体重	エネルギー消費量	摂餌量	糖代謝
全身		↓	↑	→	改善
脳		↓	↑	↓	改善
視床下部	POMC ニューロン	↓	↑	→	改善
	AgRP ニューロン	本課題で明らかにする			

表1 エネルギー代謝におけるPTP1Bの役割

一方、2018年の報告で AgRP ニューロン特異的にレプチン受容体を欠損させると、レプチン欠損モデルである ob/ob マウスのフェノタイプをほぼ再現できることから、改めて視床下部の AgRP ニューロンに注目が集まっている。本研究ではレプチンおよびインスリン受容体シグナルの調節因子である PTP1B に着目し、AgRP ニューロンにおける PTP1B の有無が糖およびエネルギー代謝に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AgRP 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 AgRP ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスを作成する。AgRP ニューロン特異的に Cre が発現する AgRP Cre マウスと PTP1B flox/flox マウス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。

(2) AgRP ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスにおけるエネルギーバランスの検討

普通食または高脂肪食を野生型マウスおよび AgRP ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスのヘテロ接合型あるいはホモ接合型のそれぞれに投与し、摂食量、体重、エネルギー消費の変化を比較検討する。エネルギー消費の検討では運動量測定装置およびマウス代謝計測システムを用いる。抗肥満の表現型が確認されたなら、野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型における内臓脂肪、皮下脂肪の重量、脂肪細胞のサイズを測定する。

(3) AgRP ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスにおける糖代謝の検討

1型糖尿病モデルマウス (IDDM マウス) においてレプチンが血糖降下作用を発揮する機序を検討する目的で、AgRP ニューロン特異的に PTP1B を欠損させたマウス (AgRP KO) および POMC ニューロン特異的に PTP1B を欠損させたマウス (POMC KO) にストレプトゾトシン 150mg/kg を腹腔内投与して IDDM モデルマウスを作成後、浸透圧ポンプを用いてレプチンを 20 μ g/日末梢投与して糖代謝に与える影響を検討する。

4. 研究成果

(1) AgRP ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスの繁殖と作成

図 1 に示すように、全身の各部位から 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、AgRP-Cre PTP1B flox マウスでは視床下部でのみ 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 2 (AgRP-Cre PTP1B flox) に示すように野生型では視床下部弓状核において AgRP 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、AgRP ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスの作成に成功した。

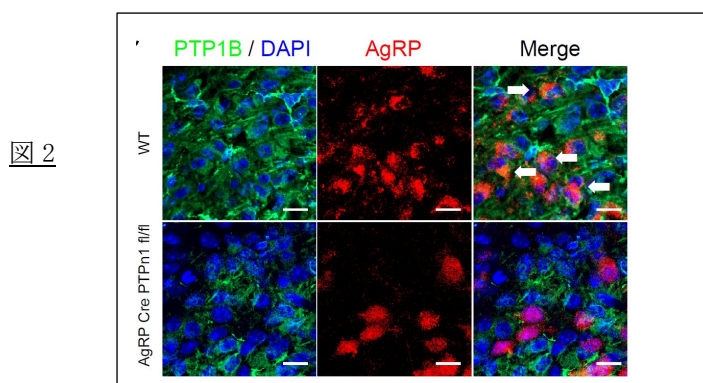
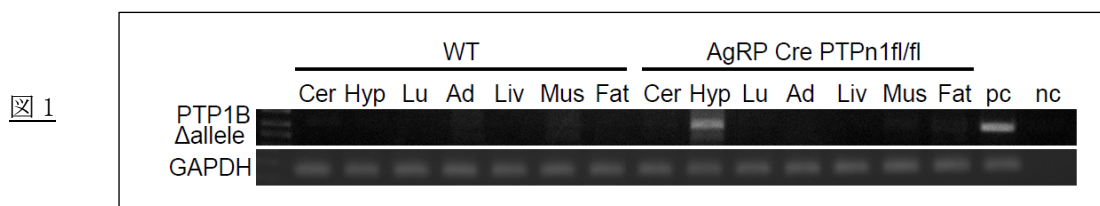


図 1 略語
 Cer : 大脳皮質
 Hyp : 視床下部
 Lu : 肺
 Ad : 副腎
 Liv : 肝臓
 Mus : 筋肉
 Fat : 脂肪

(2) AgRP ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスにおけるエネルギーバランスの検討

AgRP 特異的 PTP1B 欠損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両群間で体重差を認めなかった (図 3、図 4)。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。

図 3

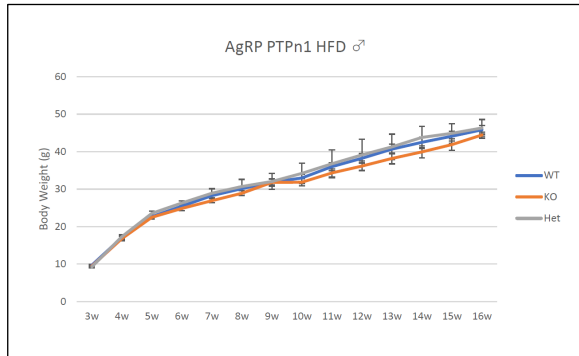
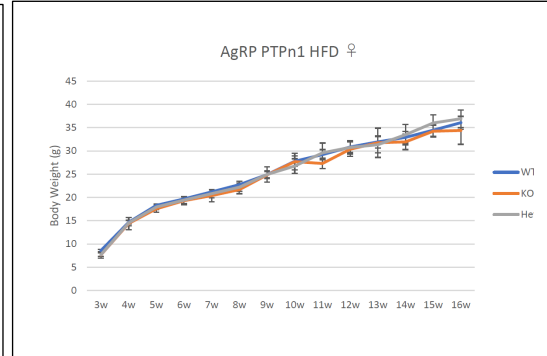


図 4



(3) AgRP ニューロン特異的 PTP1B 欠損マウスにおける糖代謝の検討

AgRP ニューロン特異的に PTP1B を欠損させたマウス (AgRP KO) および POMC ニューロン特異的に PTP1B を欠損させたマウス (POMC KO) にストレプトゾトシン 150mg/kg を腹腔内投与して IDDM モデルマウスを作成後、浸透圧ポンプを用いてレプチンを 20 μ g/日末梢投与し、ブドウ糖負荷試験を行ったところ、AgRP KO マウスでは野生型マウスと比較してわずかではあるが有意な糖代謝の改善を認めた。一方、POMC KO マウスにおいては野生型マウスと比較して有意な糖代謝改善を認めた。以上から、レプチンは視床下部の AgRP および POMC ニューロンを介して糖代謝調節を担うことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳沼 裕史、坂野 僚一、滝 啓吾、溝口 暁、杉山 摩利子、恒川 卓、高木 博史、伊藤 禎浩、有馬 寛
2. 発表標題 レプチンおよびSGLT2阻害剤の併用投与はインスリン依存性糖尿病モデルマウスの糖代謝を改善する
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito Y, Banno R, Sun R, Yaginuma H, Taki K, Sugiyama M, Takagi H, Arima H
2. 発表標題 Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency enhances leptin action to improve glucose homeostasis in IDDM treatment with leptin
3. 学会等名 EASD2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坂野僚一、杉山摩利子、恒川卓、伊藤禎浩、有馬寛	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 糖・エネルギー代謝調節におけるPTP1Bの役割について	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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