

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591093

研究課題名(和文)

エネルギーバランスにおける弓状核 GABA_B システムの機能解析研究課題名(英文) Analysis of function of GABA_B systems in the arcuate nucleus in energy balance

研究代表者

有馬 寛 (ARIMA HIROSHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50422770

研究成果の概要(和文)：Cre-loxP システムを用いて POMC ニューロン特異的に GABA_B レセプターをノックアウトしたマウスを作成した。本マウスに高脂肪食を生後 4 週から 12 週間投与したところ、野生型マウスと比較して副腎丸周囲の白色脂肪が増加し、体重も有意に増加した。さらに血中インスリンおよびレプチンもノックアウトにおいて野生型マウスと比較して高値を示した。以上より POMC ニューロンの GABA_B レセプターを介したシグナルは肥満の発症・進展を抑制するのに重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have made mice in which GABA_B receptor gene is knocked out exclusively in the POMC neurons using Cre-loxP system. The weight of epididymal white adipose tissues as well as body weight was increased in the knock-out mice compared to wild-type mice when they were fed a high-fat diet for 12 weeks from the age of 4 weeks. In addition, the levels of blood insulin and leptin were increased in the knockout mice compared to wild-type mice. Thus, our data suggest that GABA_B receptors in the POMC neurons play an important role in preventing the onset and progress of obesity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究代表者の専門分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：肥満、視床下部。GABA_B レセプター

1. 研究開始当初の背景

エネルギーの貯蔵源と考えられていた脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインはエネルギーバランスや糖代謝において重要な役割を果たしていることが近年の研究から明らかとなったが、なかでもレプチンは

メタボリックシンドロームの発症およびその病態に深く関与していると考えられる。すなわちレプチンは視床下部弓状核に作用して摂食亢進作用のあるニューロペプチド Y (NPY) ニューロンを抑制するとともに摂食抑制作用のあるプロオピオメラノコルチン

(POMC)ニューロンを刺激することによりエネルギーバランスを負に調節する作用を有するが、メタボリックシンドロームにおいてはレプチンの血中濃度は逆説的に高値を示している。これは肥満状態においてはレプチンの脳内移行が低下するためであり、肥満患者を減量させるためには生理学的な血中レプチン濃度をはるかに越えるレプチンを投与しなければならないことからその病態が確認されている。こうしたレプチン抵抗性はエネルギー過剰状態を反映する末梢から視床下部へのシグナル伝達が障害された病態であり、肥満においてさらなる過食を引き起こすという悪循環を形成し、肥満症の治療を困難なものとしている。一方、レプチンと同様にインスリンも末梢のエネルギー状態を反映し、視床下部弓状核に作用してNPYニューロンを抑制するとともにPOMCニューロンを刺激することでエネルギーバランスを負に調節することが知られている。我々は *in vivo* の特性を有する視床下部器官培養を用いてインスリンの作用機序を詳細に検討した結果、インスリンは視床下部のGABA_Bシステムを介して間接的に弓状核のNPY発現を抑制することを明らかにし、GABA_Bシステムがインスリンのみならずレプチンの下流においても負のエネルギーバランスを伝える伝達系として機能している可能性を示唆している。

エネルギーバランスを反映する末梢の種々のシグナルが統合される視床下部弓状核は血流脳関門が乏しく、末梢投与した薬剤が比較的作用しやすい部位と考えられる。そこで我々は末梢投与したGABA_B アゴニストが視床下部弓状核に作用してレプチン下流のシグナルを活性化することにより抗肥満作用を示す可能性を考え、GABA_B アゴニストであるバクロフェンを末梢投与してエネルギーバランスに与える影響を検討した。その結果、バクロフェンは肥満を呈さないコントロールマウスのエネルギーバランスには有意な影響を与えないが、肥満マウスでは抗肥満作用を示すことが明らかとなった。さらにバクロフェンを投与した肥満マウスにおいてはNPYの発現が抑制されるとともにPOMCの発現が増強することよりバクロフェンの作用の少なくとも一部は視床下部弓状核を介している可能性が示唆された。GABA_Bアゴニストが肥満状態においてのみ体重減少効果を

示し、なおかつその作用が摂食の一次中枢である弓状核を介していることはGABA_Bアゴニストがレプチン抵抗性を改善する理想的な抗肥満薬となりうる可能性を示している(特許国際出願済み、出願番号:PCT/JP2007/064225)。一方で視床下部弓状核におけるPOMCニューロンおよびNPYニューロンのそれぞれにおけるGABA_Bレセプターの機能は十分には解明されていない。

2. 研究の目的

本研究ではNPYニューロンおよびPOMCニューロン特異的なGABA_Bレセプターノックアウトマウスを作成し、その体重、内臓脂肪、糖代謝、レプチンに対する反応性などの表現型を解析することでエネルギーバランスにおける視床下部弓状核GABA_Bレセプターの機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではCre-loxPシステムを用いて、POMCニューロン特異的なGABA_Bレセプターノックアウトマウスを作成した。loxP配列によりはさまれたGABA_Bレセプターのノックインマウス(GABA_B^{loxP}マウス)はスイスのバーゼル大学のBettler博士から移譲してもらい、POMCニューロン特異的にCreレコンビナーゼ(Cre)が発現するトランスジェニックマウス(POMC-Cre トランスジェニックマウス)はJackson laboratoryより購入した。GABA_B^{loxP}マウスとPOMC-Cre トランスジェニックマウスは野生型マウスであるC57BL/6Jマウスと5世代までbackcrossを行った。その後GABA_B^{loxP}マウスとPOMC-Cre トランスジェニックマウスを交配することにより得られたPOMCニューロン特異的なGABA_Bレセプターノックアウトマウスホモ接合型、ヘテロ接合型および野生型マウスを用いて以下の検討を行った。

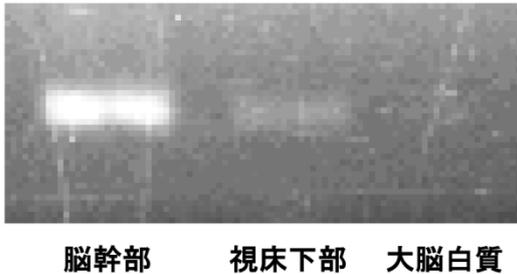
4. 研究成果

POMCニューロン特異的なGABA_Bレセプターノックアウトマウスの作成

GABA_B^{fllox}マウスとPOMC-Creマウスとの交配から生まれたマウスに関しては、各臓器から抽出したDNAを用いて目的とするPOMCニューロン特異的にGABA_Bレセプター遺伝子がノックアウトされているか否かを検討した。その結果POMCが発現する視床下部、下垂体お

よび脳幹部においてのみGABA_B レセプター遺伝子がノックアウトされていることを確認された。図1には特異的なプライマーを用いて行ったPCRにてGABA_B レセプター遺伝子がノックアウトされた時のみに生じるPCRバンドが脳幹部と視床下部から抽出したDNAを用いた場合には認められ、大脳白質のDNAでは認められないことを示す。

図1



また GABA_B^{flox} マウスと POMC-Cre マウスとの交配において、germ line の段階で recombination が生じて POMC ニューロンのみではなく全身の GABA_B レセプターノックアウトマウスが産まれてしまうことは稀であることも確認された。

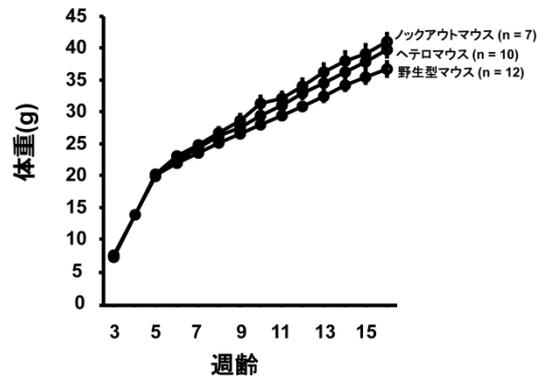
高脂肪食が POMC ニューロン特異的な GABA_B レセプターノックアウトマウスの体重、内臓脂肪、糖代謝および血中レプチンレベルに与える影響

高脂肪食 (60.1% の脂肪および 15.6% の炭水化物) を野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型マウスの雄、雌ともにそれぞれに weaning 後の生後 4 週から 16 週齢まで合計 12 週間投与した。8 週齢の時点で採血を行い、血糖値およびインスリン値を測定した。いずれのマウスも 16 週齢で断頭屠殺し、副睾丸周囲の白色脂肪と褐色脂肪を取り出してその重量を測定するとともに血中レプチンレベルを測定した。

体重の変化

雄ではホモ接合型マウスの体重が野生型マウスに比較して 8 週齢以降 16 週齢まで有意に高値を示した (図 2)。一方雌では野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型マウスのいずれの群間においても体重に有意な差を認めなかった。

図 2

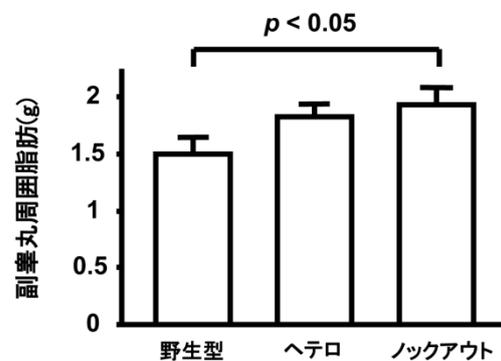


内臓白色脂肪重量

16 週齢の雄ではホモ接合型マウスの副睾丸周囲の白色脂肪重量が野生型マウスに比較して有意に高値を示した (図 3)。

一方、雌では野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型マウスのいずれの群間においても副睾丸周囲の白色脂肪重量に有意な差を認めなかった。

図 3



褐色脂肪重量

雌雄とも野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型マウスのいずれの群間においても褐色脂肪重量に有意な差を認めなかった。

血糖・インスリン値

8 週齢の雄において午前 9 時に採血した随時血糖値は各群間で有意な差を認めなかった (図 4)、ホモ接合型マウスの血中インスリン値が野生型マウスに比較して有意に高値を示した (図 5)。一方、雌では野生型、ヘテロ

接合型およびホモ接合型マウスのいずれの群間においても血糖値、インスリン値に有意な差を認めなかった。

図 4

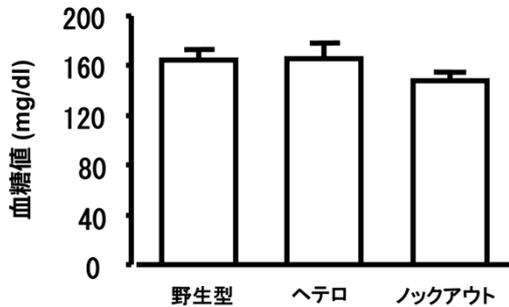
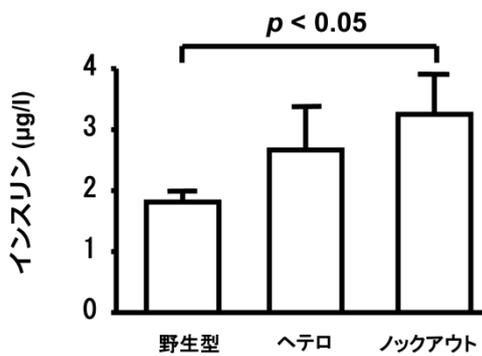


図 5



血中レプチン

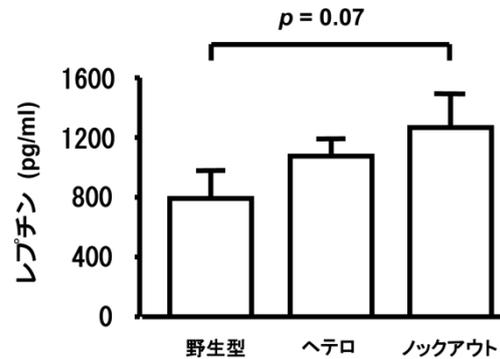
16 週齢雄のホモ接合型マウスの血中レプチン値が野生型マウスに比較して高値の傾向を示した (図 6)。

一方雌では野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型マウスのいずれの群間においても血中レプチン値に有意な差を認めなかった。

以上の結果から POMC ニューロン特異的に GABA_B レセプターをノックアウトした雄のマウスは高脂肪食下で内臓脂肪が増加して肥満を呈すること、インスリン抵抗性およびレプチン抵抗性になることが明らかとなった。GABA_B レセプターをニューロン特異的にノックアウトするに成功したのは我々が最初であり、今回の研究より POMC ニューロンの GABA_B レセプターを介したシグナルは肥満の

発症・進展を抑制するのに重要な役割を果たしていることが示唆された。

図 6



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)
なし

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

有馬 寛 (ARIMA HIROSHI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50422770

(2) 研究分担者

大磯 ユタカ (OOISO YUTAKA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40203707

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：