

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791395

研究課題名（和文） 視床下部弓状核による骨代謝の解明

研究課題名（英文） The investigation of the bone metabolism in hypothalamus arcuate nucleus

研究代表者

笹沼 秀幸 (SASANUMA HIDEYUKI)

自治医科大学 医学部 ・ 研究員

研究者番号：50528651

研究成果の概要（和文）：視床下部弓状核に存在する AgRP ニューロンの骨代謝への影響を検討するために、ニューロン内転写因子として重要な PI3K 系の PDK1 に注目した。AgRP ニューロン特異的 PDK1 ノックアウトマウスを作成し、その骨代謝解析を行った。同マウスは骨量減少を示した。そのシグナル経路として AgRP ニューロンが GHRH-GH-IGF1 経路を介して骨代謝を制御することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the bone metabolism of AgRP neurons in the hypothalamus arcuate nucleus, we focused PDK1 which was a important neurotransmitter in PI3K pathway. We generated AGRP neuron-specific PDK1 knockout (AGRPPdk1<sup>-/-</sup>) mice and analyzed the bone metabolism of AGRPPdk1<sup>-/-</sup> mice. These mice showed osteopenia. This signaling by AgRP neuron might control the GHRH-GH-IGF1 axis in the skeleton.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームにも骨代謝異常が合併することが注目されてきている。骨

量とBMIは密接に関係しており、その要因としては荷重によるメカニカルストレスも一つではあるが、その他の要因の関与も考えら

れる。骨代謝とエネルギー代謝は双方向性の関連性が存在することが明らかになりつつあり、中枢神経系を介した骨代謝調節機構も存在する。しかし、中枢神経系を介した骨代謝調節の責任神経核は不明である。そこで、エネルギー・摂食機能の一次中枢であり、メタボリックシンドロームの責任神経核である視床下部弓状核に着目した。

弓状核内側部にはAgouti-Related Protein (AgRP) ニューロンが存在し、強い摂食亢進作用とエネルギー代謝作用を有する。しかし、AgRPニューロンによる骨代謝調節は不明である。

## 2. 研究の目的

弓状核AgRPニューロンが骨代謝に関連するかを明らかにすること、及びAgRPニューロンから骨への出力経路を同定することである。

そこで、我々はAgRPニューロンにおけるレプチンとインスリンの細胞内情報伝達系において重要な役割を担っており、下流シグナルを介して多彩な生理機能を調節している 3-phosphoinositide-dependent protein kinase1 (PDK1) に注目して、AgRPニューロン特異的PDK1欠損機構について検討した。

また、このマウスからPDK1の下流に存在する転写因子 forkhead box transcription factor (FoxO1)をドミナントネガティブ化した( $\Delta 256FoxO1^{AGRP} pdk1^{-/-}$ )マウスを作成し、骨代謝変化を解析した。

## 3. 研究の方法

①AgRP-CreマウスとPDK1-floxマウスを交配し $AGRPpdk1^{-/-}$ マウスを作成した。対照にはAgRP-Cre (Cre)マウスを用いた。全て雌性を用いた。②生後6週齢と12週齢の大腿骨・頭尾長の全長計測をレントゲンで行った。③同週齢で体重・摂食量を測定した。pQCTによる骨密度・骨強度を測定した。④大腿骨遠位部の海綿骨形態解析を行った。以下の実験は全て6週齢雌を用いた。⑤骨代謝マーカーとしてBAP・TARCP5bを測定した。⑥尿・血液生化学検査では骨代謝関連ホルモン・血中カルシウム・エネルギー代謝関連物質を測定した。⑦大腿骨骨髓から骨髓間葉系幹細胞を単離し、骨芽細胞への分化能を検討した。⑧下垂体のACTH、TSH細胞を免疫組織染色で観察した。⑨GHRH-GH-IGF1 axisの変化を解析するために、視床下部GHRH免疫染色と下垂体のGH免疫染色を施行した。リアルタイムRT-PCRでGHRHとGHのmRNA発現を解析した。⑩ $\Delta 256Foxo1$ マウスとAgRP

*PDK1*<sup>-/-</sup> マウスとの交配を繰り返し、  
*Δ256FoxO1<sup>AGRP</sup> pdk1*<sup>-/-</sup> マウスを作成した。同  
マウスの摂食量、体重、骨代謝変化を解析し  
た。

#### 4. 研究成果

①6週齢と15週齢の *AGRPpdk1*<sup>-/-</sup> マウスは  
頭尾長および大腿骨長が短縮していた。②  
QCTによる大腿骨骨密度は、*AGRPpdk1*<sup>-/-</sup> マ  
ウスで皮質骨、海綿骨ともに減少していた。  
最小断面2次モーメントならびに断面2次極  
モーメントは *AGRPpdk1*<sup>-/-</sup> マウスで低下し  
ていた。③海綿骨形態解析で、*AGRPpdk1*<sup>-/-</sup>  
マウスで骨量が低下し、骨形成パラメーター  
の低下、骨吸収パラメーターの亢進を認めた。  
④骨代謝マーカーは *TRACP5b* と *RANKL* が  
高値を示し、高回転型の骨量減少パターンを  
示した。⑤骨代謝関連ホルモンでは、血中GH  
濃度とIGF-1濃度が有意に低値であった。ま  
た、尿中アドレナリン排泄量が高値であり、  
GH-IGF1 axisの低下と交感神経系の亢進を  
認めた。⑥In vitroで評価した骨芽細胞自体  
の分化・増殖能には変化がなかった。⑦免疫  
染色による下垂体のACTH、TSH細胞数には  
両群間に有意差はなかった。⑧また、下垂体  
の免疫染色によるGH細胞数も変化はなかつ  
たが、*AGRPpdk1*<sup>-/-</sup> マウスで下垂体のGHの

mRNA発現量及び、弓状核のGHRHの  
mRNA発現量が低下していた。

⑧6週齢の *Δ256FoxO1<sup>AGRP</sup> pdk1*<sup>-/-</sup> マウスは、  
*AGRPpdk1*<sup>-/-</sup> マウスに比較して摂食量と体  
重に有意差はなかった。しかし、大腿骨長は  
有意に長く、骨密度も増加していた。また、  
血清IGF1濃度が上昇していた。

上記の結果より、*AGRPpdk1*<sup>-/-</sup> マウスは低  
身長、四肢短縮と骨量減少を示すことが明ら  
かとなった。骨量減少は骨リモデリングの変  
化を示しており、骨密度が減少していた。骨  
量減少は高回転型であった。脳と骨をつなぐ  
シグナルとして、GHRH-GH-IGF1 axisの低  
下と交感神経系の亢進が骨芽細胞の活性を  
低下させたと推察された。

また、AgRPニューロン内のPDK1とその下  
流に存在するFoxO1はGHRH遺伝子発現に  
関与しGH-IGF1 axisを調節することが示唆  
された。

#### 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

笹沼秀幸 AgRP ニューロンによる骨代謝.

日本整形外科基礎学術集会, 2010年10月

笹沼秀幸 AgRP ニューロンによる骨代謝.

日本骨代謝学会, 2011年7月

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笹沼 秀幸 (SASANUMA HIDEYUKI)

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50528651

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：