

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659385

研究課題名（和文）神経性食思不振症における新規摂食関連転写因子 AF5q31 の役割の解明

研究課題名（英文）Functional roles of AF5q31 and its relationship with anorexia nervosa.

研究代表者

森川 吉博（MORIKAWA YOSHIHIRO）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60230108

研究成果の概要（和文）：視床下部神経細胞株である GT1-7 細胞における AF5q31 の過剰発現、及びノックダウンの実験により、AF5q31 は AMPK $\alpha$ 2 の発現を転写レベルで増加させ、ACC $\alpha$  のリン酸化を誘導する分子であることが明らかとなった。また、神経性食思不振症で認められる HPA axis の異常や耐糖能異常が AF5q31 ヘテロ欠損マウスで認められた。これらのことから、AF5q31 ヘテロ欠損マウスは神経性食思不振症の患者類似の代謝・内分泌学的な異常を反映しており、従来のモデルマウスよりも神経性食思不振症のモデルマウスとしてより適切である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： In a hypothalamic neuronal cell line, GT1-7 cells, AF5q31 specifically increased the expression of AMPK $\alpha$ 2 subunit at the transcriptional level. In addition, AF5q31 activated AMPK signal pathway by a novel mechanism, which is independent of AMPK $\alpha$  phosphorylation. AF5q31<sup>+/-</sup> mice exhibited the disturbance of both HPA axis and glucose metabolism, which are observed in the patients with anorexia nervosa. Thus, AF5q31<sup>+/-</sup> mice provide a unique mouse model of anorexia nervosa.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：ストレス、絶食、転写因子、モデルマウス、神経性食思不振症

## 1. 研究開始当初の背景

神経性食思不振症は 10～30 歳の女性に好発し、極端な食物摂取量の低下とそれによる極度の痩せを特徴とする疾患である。発症要因としては、個人の性格（完全主義で脅迫的な性格）に家族の問題（精神的サポートを与えられない家庭事情など）や社会、文化的背景（痩せることを賞賛する社会）などが加わ

って起こる多元的モデルが一般的である。近年、神経性食思不振症の有病率は年々増加しているが、効果的な治療法はなく、その病態のメカニズムも不明な点が多いのが現状である。

## 2. 研究の目的

神経性食思不振症の病態解明を目的とし

て現在まで様々なモデル動物が用いられてきたが、ヒトの神経性食思不振症の症状を的確に再現できるモデルマウスはまだないのが現状である。申請者が今回着目した AF5q31 は、AFF ファミリーに属する転写因子である。2005 年に、申請者らが AF5q31 欠損マウスを作成し、ホモ欠損マウスの大部分が生後一週間以内に死亡することを報告している (Urano A, et al. Mol Cell Biol, 25: 6834-6845, 2005)。興味深いことに、従来の神経性食思不振症モデルマウスとは異なり、AF5q31 ヘテロ欠損マウスは通常自由摂餌下での摂餌量は野生型と差はないが、絶食後の再摂餌時の摂餌量が低下する。この結果は、AF5q31 ヘテロ欠損マウスは、ストレス負荷時にのみ摂餌量が低下するマウスであることを示しており、従来の神経性食思不振症のモデルマウスと比して、より適切なモデルマウスとなる可能性が考えられる。本研究の目的は、摂食調節における AF5q31 の機能を解析し、ストレス負荷後の AF5q31 ヘテロ欠損マウスの内分泌・代謝系のパラメーターを解析することにより、ヒトの神経性食思不振症のモデルとしてより適切かを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) AF5q31 が AMP キナーゼ (AMPK) シグナルに及ぼす影響について検討するために、視床下部神経細胞株である GT1-7 細胞に AF5q31 を過剰発現させ、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法、ウエスタンブロット法、ルシフェラーゼアッセイにより解析する。

(2) グレリンによる AMPK シグナル活性化に及ぼす AF5q31 の影響を、AF5q31 の siRNA により AF5q31 をノックダウンした GT1-7 細胞を用いて検討する。

(3) 野生型マウスの種々の臓器において、絶食による AF5q31 の発現変化をリアルタイム PCR 法にて検討する。

(4) 自由摂餌下の AF5q31 ヘテロ欠損マウスにおける血清の ACTH やコルチコステロンを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定し、耐糖能異常やインスリン抵抗性の有無を腹腔内糖負荷試験やインスリン負荷試験により検討する。

(4) 絶食ストレス負荷後の血清の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) やコルチコステロンを ELISA 法によりの測定し、野生型マウスと AF5q31 ヘテロ欠損マウスの異同について検討する。

### 4. 研究成果

(1) 視床下部神経細胞における AF5q31 の詳細な機能解析

AF5q31 ヘテロ欠損マウスと神経性食思不振症の関連性を検討する上で、AF5q31 の分子機能の解明が重要である。これまでに、我々は AF5q31 が視床下部神経細胞においてグレリンにより発現誘導を受けること、AF5q31 が AMPK $\alpha$  の発現を誘導することを発見した。そこでまず、AF5q31 の視床下部神経細胞における機能をより詳細に解析した。

①AMPK $\alpha$  は AMPK $\alpha$ 1 と AMPK $\alpha$ 2 という 2 種類のサブタイプが存在するため、いずれのサブタイプが AF5q31 により発現誘導を受けるのかを検討した。GT1-7 細胞に AF5q31 を過剰発現させ、AMPK $\alpha$ 1 と AMPK $\alpha$ 2 の発現を検討したところ、コントロール細胞と比較して AF5q31 過剰発現細胞において、AMPK $\alpha$ 2 の mRNA (図 1 A)、及びタンパク質 (図 1 B、D) の発現増加が認められた。しかし、AMPK $\alpha$ 1 の発現は mRNA レベル (図 1 A)、タンパク質レベル (図 1 B、C) でともに変化は認められなかった。

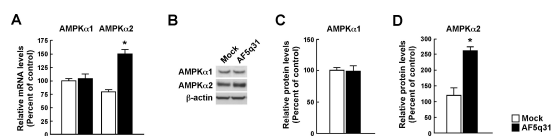


図 1 AF5q31 過剰発現による AMPK $\alpha$ 1 と AMPK $\alpha$ 2 の mRNA (A) とタンパク質 (B-D) の発現変化の検討

②AF5q31 は転写因子として働くことが知られているため、AF5q31 の AMPK $\alpha$ 2 遺伝子の転写活性に対する影響を検討した。AMPK $\alpha$ 2 遺伝子のプロモーター活性に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにより検討したところ、コントロール細胞と比較して、AF5q31 過剰発現細胞において AMPK $\alpha$ 2 遺伝子のプロモーター活性の上昇が認められた (図 2)。

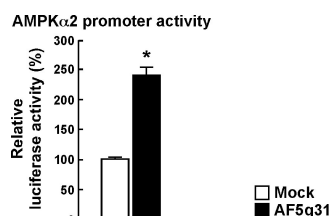


図 2 AF5q31 過剰発現による AMPK $\alpha$ 2 遺伝子のプロモーター活性の上昇

③AMPK $\alpha$  以外の AMPK サブタイプ ( $\beta$ ,  $\gamma$ ) の

AF5q31 の過剰発現による発現変化をリアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法を用いて検討した。AMPK  $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\gamma$ 1、 $\gamma$ 2、 $\gamma$ 3 の mRNA (図 3 A、B) 及びタンパク質 (図 3 C-F) の発現は AF5q31 の過剰発現により誘導されなかった。

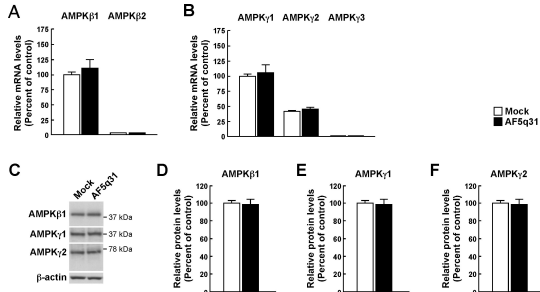


図 3 AF5q31 過剰発現細胞における AMPK $\alpha$ 以外の AMPK サブユニットの mRNA (A、B) とタンパク質 (C-F) の発現の検討

④AMPK の上流にあるカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ 2 (CaMKK2) や肝臓キナーゼ B1 (LKB1) のタンパク質の AF5q31 による発現変化を検討した。CaMKK2 や LKB1 の発現は、AF5q31 過剰発現細胞とコントロール細胞の間に差は認められなかった (図 4)。

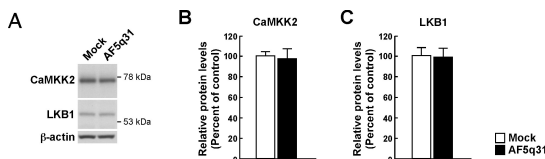


図 4 AF5q31 過剰発現による CaMKK2 と LKB1 の発現誘導の検討

⑤GT1-7 細胞にグレリンを処置すると、処置後 15 分をピークとする AMPK $\alpha$  と ACC $\alpha$  のリン酸化が認められた (図 5 A-C)。また、AMPK $\alpha$  のリン酸化は処置後 30 分で基礎値に戻っており、その後 2 時間目まで基礎値のままであった (図 5 D、E)。しかし、ACC $\alpha$  のリン酸化はグレリン処置後 30 分から 1 時間の間でやや低下するものの、再度処置後 2 時間をピークとするリン酸化の増加が認められ、4 時間目まで高値を保持していた (図 5 D、F)。

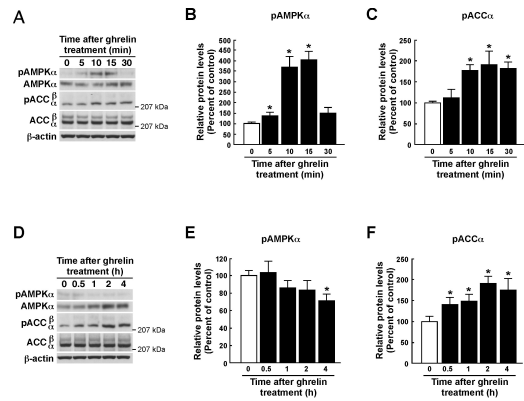


図 5 グレリンによる AMPK シグナルの活性化の経時的変化の検討

⑥グレリン処置後の ACC $\alpha$  のリン酸化が AMPK $\alpha$  のリン酸化によるものなのかを検討するために、AMPK $\alpha$  のリン酸化阻害剤である Compound C を GT1-7 細胞に処置することにより、グレリンにより誘導される ACC $\alpha$  のリン酸化の変化をウェスタンブロット法により解析した。グレリン処置後 15 分の AMPK $\alpha$  のリン酸化と ACC $\alpha$  のリン酸化は AMPK $\alpha$  のリン酸化阻害剤である Compound C によって阻害された (図 6 A-C)。しかし、グレリン処置後 2 時間の ACC $\alpha$  のリン酸化は Compound C によって阻害されなかった (図 6 D-F)。これらのことより、グレリン処置後 2 時間をピークとする ACC $\alpha$  のリン酸化は AMPK $\alpha$  のリン酸化非依存的であることが明らかとなった。

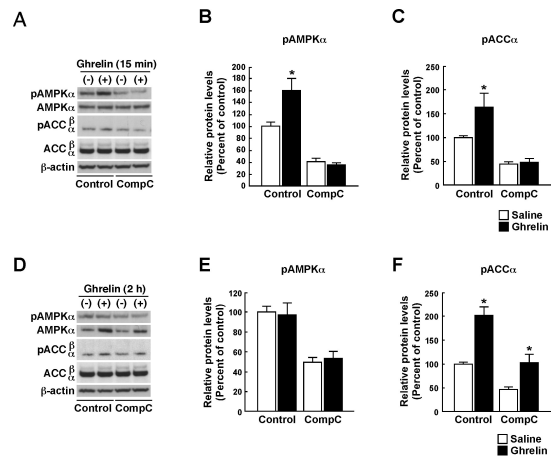


図 6 グレリンによる AMPK シグナル活性化における AMPK $\alpha$  のリン酸化に非依存的な ACC $\alpha$  の活性化

⑦GT1-7 細胞において、AF5q31 の過剰発現により AMPK の下流の分子である ACC $\alpha$  のリン酸化が認められた (図 7 A、C)。またその時、AMPK $\alpha$  のリン酸化は認められず (図 7 A、B)、Compound C を前処置しても AF5q31 過剰発現による ACC $\alpha$  のリン酸化は保持されていた (図

7A, C)。これらのことより、AF5q31 は AMPK $\alpha$  のリン酸化を介することなく ACC $\alpha$  をリン酸化させることが示唆された。

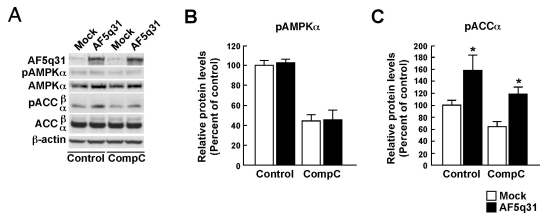


図7 AF5q31 過剰発現による AMPK $\alpha$  のリン酸化非依存的な ACC $\alpha$  の活性化

(2) グレリンによる AMPK シグナル活性化に及ぼす AF5q31 の影響の検討

AF5q31 に対する siRNA を用いて GT1-7 細胞における内因性の AF5q31 をノックダウンした後、グレリン処置による AMPK シグナル活性化を検討した。グレリン処置後 15 分において、グレリン処置による AMPK $\alpha$  や ACC $\alpha$  のリン酸化は AF5q31 のノックダウンによる影響を受けなかった (図 8A-C)。しかし、グレリン処置後 2 時間において、コントロール細胞では ACC $\alpha$  のリン酸化が認められたが、AF5q31 をノックダウンした細胞では ACC $\alpha$  のリン酸化が認められなかった (図 8D, F)。この時、AMPK $\alpha$  のリン酸化に変化は認められなかった (図 8D, E)。これらのことより、AF5q31 はグレリン処置後 2 時間をピークとする ACC $\alpha$  の活性化を AMPK $\alpha$  のリン酸化非依存的に誘導していることが示された。

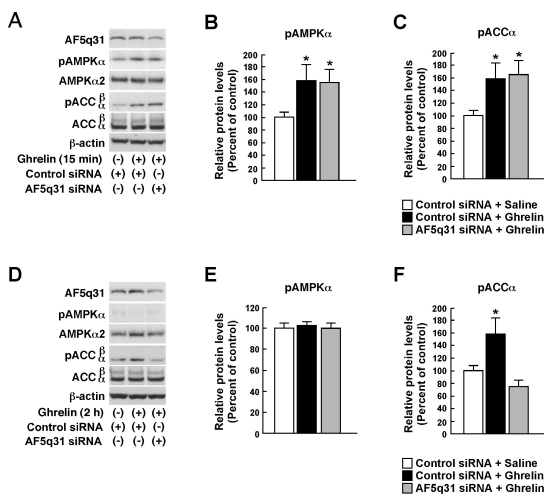


図8 AF5q31 ノックダウンがグレリンによる AMPK シグナル活性化に及ぼす影響

(3) 絶食後の野生型マウスの種々の臓器における AF5q31 の発現変化の検討

AF5q31 の神経性食思不振症に対する役割を検討する上で、AF5q31 が絶食時にいかなる

発現動態をとるのが重要である。そこで我々は、絶食時の視床下部、下垂体、肝臓、骨格筋、膵臓における AF5q31 の発現変化について検討した。絶食により、視床下部と肝臓における AF5q31 の発現増加が認められたが、下垂体では絶食により減少した。骨格筋と膵臓においては自由摂餌群と絶食群の間で AF5q31 の発現に差は認められなかった (図 9)。

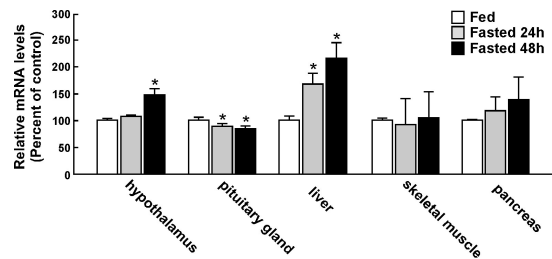


図9 野生型マウスの種々の臓器における AF5q31 の絶食による発現変化の検討

(4) AF5q31 ヘテロ欠損マウスにおける絶食ストレス負荷後の表現型の検討

①神経性食思不振症の患者は、HPA axis に異常を来し、ACTH やコルチゾールの値が異常を示していることが多い (Sauro CL, et al. Neuropsychobiology, 57: 95-115, 2008)。そこで、絶食ストレス負荷後の AF5q31 ヘテロ欠損マウスにおける HPA axis 異常について検討した。血清 ACTH とコルチコステロンの自由摂餌下における値は、野生型と AF5q31 ヘテロ欠損マウスの間で差は認められなかった (図 10A, B)。しかしながら、野生型マウスでは絶食により血清 ACTH の濃度が上昇するが、AF5q31 ヘテロ欠損マウスではそれらの上昇が認められなかった (図 10A)。また、野生型で認められる絶食による血清コルチコステロンの上昇が AF5q31 ヘテロ欠損マウスでは減弱していた (図 10B)。以上のことより、AF5q31 ヘテロ欠損マウスではストレス負荷時の HPA axis の反応性が低下していることが示唆された。

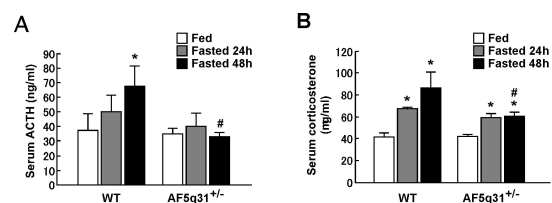


図10 自由摂餌下、及び絶食下における野生型マウスと AF5q31 ヘテロ欠損マウスの血清 ACTH とコルチコステロンの検討

②神経性食思不振症の患者では、耐糖能異常が認められるため (Scheen AJ, et al. Diabetes Metab Rev, 4: 681-690, 1988)、AF5q31 ヘテロ欠損マウスにおける糖代謝異常について検討した。腹腔内糖負荷試験を行ったところ、野生型マウスに比べて、AF5q31 ヘテロ欠損マウスで糖負荷後の血糖値が高く、耐糖能の低下がみられた (図 1 1 A)。また、インスリン負荷試験を行ったところ、インスリン負荷後の AF5q31 ヘテロ欠損マウスの血糖値は野生型マウスに比べて高く、インスリン抵抗性が認められた (図 1 1 B)。

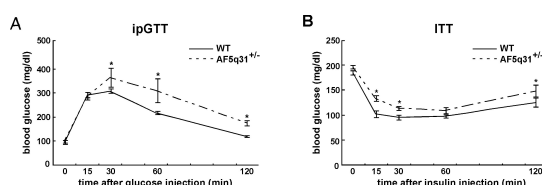


図 1 1 AF5q31 ヘテロ欠損マウスにおける耐糖能異常(A)とインスリン抵抗性(B)の検討

以上の結果より、AF5q31 ヘテロ欠損マウスは、神経性食思不振症の患者の代謝、内分泌学的な異常を反映しており、従来のモデルマウスよりも神経性食思不振症のモデルマウスとしてより適切である可能性が示唆された。

## 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 1 件)

(1) Komori T, Doi A, Nosaka T, Furuta H, Akamizu T, Kitamura T, Senba E, Morikawa Y. Regulation of AMP-activated protein kinase signaling by AFF4 protein, member of AF4 (ALL1-fused gene from chromosome 4) family of transcription factors, in hypothalamic neurons. J Biol Chem, 査読有 287: 19985-19996, 2012.

DOI:10.1074/jbc.M112.367854.

[学会発表] (計 3 件)

①小森忠祐、土井麻子、古田浩人、赤水尚史、森川吉博: 視床下部神経細胞での AMPK シグナル活性化における転写因子 AFF4 の役割. 第 24 回分子糖尿病学シンポジウム 2012.12.8 東京

②Komori T, Doi A, Nosaka T, Furuta H, Akamizu T, Kitamura T, Senba E, Morikawa Y. Regulation of AMP-activated protein

kinase alpha 2 expression by a fasting/ghrelin-induced transcription factor, AF5q31, in the hypothalamic neurons. The 48th EASD Annual Meeting 2012.10.2. Berlin, Germany

③小森忠祐、仙波恵美子、森川吉博: 絶食により視床下部において誘導される新規転写因子の検討. 第 80 回和歌山医学会総会 2012.7.8. 和歌山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森川 吉博 (MORIKAWA YOSHIHIRO)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60230108

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

小森 忠祐 (KOMORI TADASUKE)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90433359

古田 浩人 (FURUTA HIROTO)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90238684