主論文の要旨

Expression of neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA stimulated by glucocorticoids is attenuated via NF-κB p65 under ER stress in mouse hypothalamic cultures

（マウス視床下部培養にて グルココルチコイドにより刺激される neuropeptide Y と agouti-related protein の mRNA 発現は ER ストレス下において NF-κB p65 を介して減弱される）

名古屋大学大学院医学系研究科　分子総合医学専攻
病態内科学講座　糖尿病・内分泌内科学分野
（指導：大磯 ユタカ　教授）
萩本 繁

【緒言】

摂食亢進性の神経ペプチドである neuropeptide Y (NPY) と agouti-related protein (AgRP) は 視床下部弓状核の同一ニューロンに共発現している。げっ歯類においてこれらのペプチドを中枢性に投与すると摂食亢進が観察される一方、AgRP ニューロン活性を急性に除去すると重度の食思不振と体重減少を来す。グルココルチコイドはエネルギーバランスに影響を及ぼす多くの神経内分泌・代謝シグナルに関与しており、ヒトにおいてグルココルチコイド過剰は肥満を、グルココルチコイド欠乏は顕著な食思不振をもたらす。げっ歯類では遺伝および食事に起因する肥満は副腎摘出術によって予防可能であるが、グルココルチコイド補充により再度体重が増加する。我々がこれまでに視床下部器官培養を用いて行った研究において、グルココルチコイドは NPY・AgRP 遺伝子発現亢進作用を持つだけでなく、グレリンやインスリンの NPY・AgRP 発現に対する作用において許可的な役割を持つことが判明している。

小胞体(ER)は蛋白質の合成・折り畳み・輸送が行われる細胞小器官である。これらの機能が障害されると、折り畳み障害のある蛋白質が ER 内腔に蓄積することで ER ストレスとなり、unfolded protein response (UPR) が誘発される。肝臓・脂肪組織・筋肉においては ER ストレス下でインスリンシグナルが障害されることが報告されている。肥満動物の視床下部においても UPR が生じており、視床下部におけるインスリンもしくはレプチンシグナルが ER ストレス下で減弱する可能性が示唆されている。エネルギーバランス制御におけるグルココルチコイドの許可的な役割を考慮すると、ER ストレスがグルココルチコイドシグナルに影響を及す可能性が考えられるが、この点を検討した報告はこれまで存在していなかった。

本研究ではマウス視床下部器官培養において ER ストレスがグルココルチコイドシグナルに与える影響を調べた。グルココルチコイドにより誘発される NPY・AgRP 発現量を ER ストレスの有無で比較検討した。

【対象及び方法】

第 16 日齢の C57BL6/J マウスを 13:00～17:00 の間に断頭し、弓状核を含む視床下部スライスを 3 枚作成し培養した。48 時間培養の後に、デキサメタゾン[DEX、10nM]、タプシガルギン[TG、10μM]、ツニカマイシン[TN、30μM]、NF-κB p65 阻害剤[p65i(529/536)、150μM; p65i (276)、150μM]、p38 MAPK 阻害剤[SB202190、100μM]を培養液に加えた。 NF-κB 活性化の際には NF-κB p65(p65) セリンリン酸化が生じるが、実験に用いた p65 阻害剤は p65 と同様のセリンリン酸化部位を持つ囮として作用し、結果的に p65 セリンリン酸化を抑制することが可能である。培養は 37℃、5%CO2 の清潔な環境で行われた。視床下部スライスからの総 RNA と総蛋白の抽出は培養 72 時間後に実施し、それぞれリアルタイム qRT-PCR やウエスタンブロット法で解析された。全ての手順は名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程に則り行われた。統計解析には 一元配置分散分析 と post-hoc 比較を用い、有意水準は 0.05 とした。

【結果】

視床下部培養にて NPY・AgRP mRNA は共に DEX 投与後 24 時間で有意に上昇した(図 1A、1B)。TG もしくは TN は別実験にて UPR を誘導していることが確認されたが、単独投与の場合には NPY・AgRP 発現量に影響を及ぼさなかった。一方、TG および TN は DEX 依存性 NPY・AgRP mRNA 発現を有意に減弱させた(図 1C、1D)。

TG は p65 のリン酸化を培養 12、24 時間後に有意に亢進させ(図 2A)、p38 MAPK (p38) のリン酸化を培養 6、12、24 時間後に有意に亢進させた(図 2B)。一方、ERK1/2、JNK、c-JUN のリン酸化はより早い時点で一過性に亢進した(図 2C-E)。

DEX 依存性 NPY・AgRP 発現と TG 処置下の p65/p38 リン酸化とのタイムコースが似ていたことを根拠として、TG の DEX 抑制作用が p65/p38 経路を介している可能性を考えた。TG による p65 のリン酸化亢進は p65i により有意に抑制された(図 3A)。TG の DEX 依存性 NPY・AgRP 発現に対する抑制作用は p65i により有意に抑制された(図 3B、3C)。一方、p38 阻害剤は TG による NPY・AgRP 発現抑制に影響を与えなかった。

【考察】

視床下部での ER ストレスがエネルギー恒常性に関わるシグナルに影響を与える可能性が近年報告されており、視床下部でのグルココルチコイドシグナルもまたエネルギーバランスに主要な役割を果たしていることを示す一連の根拠がある。本研究は ER ストレスが視床下部グルココルチコイドシグナルに影響を及ぼす可能性を提示した初めての論文である。

ER ストレスと炎症との間にクロストークがあるとの報告は数多くある。我々の研究にて同様の現象が視床下部にも生じていることが確認され、加えて ER ストレスが NF-κB 経路を介して DEX 依存性 NPY・AgRP 発現亢進を抑制することが示された。これらの結果から、視床下部における ER ストレスと炎症のクロストークがグルココルチコイドシグナルを介してエネルギーバランスに影響を与える可能性が示唆された。

グルココルチコイドや NPY・AgRP が肥満へ関与することは以前から広く知られており、近年では視床下部における慢性炎症と ER ストレスが肥満に関与しているとの報告も多い。ところが、本研究結果ではグルココルチコイドと ER ストレスの NPY・AgRP 発現に対する作用は逆であることが示された。この点に関して、先行研究の文献的考察も交えると、視床下部における炎症がエネルギーバランスに与える影響は、炎症の強さと期間に依存している可能性がある。我々の研究結果は、急性の ER ストレスおよび炎症が DEX 存在下での NPY・AgRP ニューロン活性を抑制し、摂食量を低下させる可能性を示唆している。

【結語】

マウス視床下部培養にてグルココルチコイドにより刺激される neuropeptide Y と agouti-related protein の mRNA 発現は ER ストレス下において NF-κB p65 を介して減弱されることが本研究にて示された。