

主論文の要旨

High-fat Feeding Causes Inflammation and Insulin Resistance in the Ventral Tegmental Area in Mice

高脂肪食の摂取によりマウス中脳腹側被蓋野に炎症が生じ
インスリン受容体シグナルの減弱をきたす

名古屋大学大学院医学系研究科 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：有馬 寛 教授)

溝口 暁

【緒言】

げっ歯類に高脂肪食(HFD)を投与すると、体重増加に先行してミクログリアの活性化を伴う視床下部炎症が起こり、視床下部ニューロンにおけるインスリン・レプチン受容体シグナルが減弱して肥満形成の起点となる事が報告されている。一方で、中脳腹側被蓋野(VTA)から線条体側坐核(NAc)へ投射するドーパミンニューロンにより形成される脳内報酬系も、食による肥満形成に重要な役割を果たすことが知られている。以前より、VTAにおけるインスリン・レプチン受容体シグナルはエネルギー代謝の恒常性に関係するとともに、その機能不全により肥満や食嗜好の変化を来すことが報告されている。また近年の報告では、HFDが投与された野生型マウスはNAcに炎症が生じると同時に、その炎症シグナルを選択的に阻害するとショ糖探索行動が抑制されることが示されている。しかしながら、VTAにおいても視床下部やNAcと同様にHFDの摂取で炎症が生じるか、またインスリン・レプチン受容体シグナルの変化が生じるのかを検討した報告は見られない。よって今回、HFD摂取下の野生型マウスにおいて、VTAに炎症所見が存在するかを検討すると同時に、インスリンまたはレプチンの脳室内投与を行い、各受容体シグナルに変化が生じるか検討を行った。

【対象及び方法】

普通食もしくはHFDをそれぞれ3日間、7日間、28日間投与した10週齢の雄性C57BL6マウスから1×PBSによる還流を行い、VTAを摘出した。組織よりRNAを抽出し、RT-PCR法にて炎症性サイトカイン(TNF α , IL1 β , IL6)およびミクログリアの活性化マーカー(Iba1, CD11b, Emr1, CD68)となるmRNAの発現を解析した。また同じ条件でのマウスについて、4%パラホルムアルデヒドによる還流を行って脳組織を摘出し、50 μ mの切片を作成してフリーフローティング法による免疫組織化学染色を行い、VTAにおける炎症所見およびミクログリアについて観察を行った。最後に、普通食もしくはHFDをそれぞれ7日間投与した10-12週齢の雄性マウスを、イソフルランによる十分に深い麻酔を行った上で脳定位固定装置を使用し、一晚絶食下にて10⁻⁵Mのインスリンまたは0.05 μ g/ μ Lのレプチンをそれぞれ2 μ L、ハミルトンシリンジを用いて脳室内投与を行った。インスリン投与群は投与後15分、レプチン投与群は投与後60分経過後にVTAを摘出し、組織よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法にてAktまたはSTAT3のリン酸化について解析を行った。

【結果】

普通食投与群と比較して、HFD投与群では投与3日目でIL1 β 、7日目でTNF α 、IL1 β およびIL6、28日目でTNF α およびIL1 β のmRNA発現がそれぞれ有意に上昇した(図1A, B, C)。ミクログリア活性化マーカーであるIba1、CD11b、Emr1およびCD68は、投与3日目ではいずれもmRNA発現の上昇を認めなかったのに対し、投与7日目および28日目ではIba1、CD11bにおいて上昇を認めた(図1D, E)。一方で、Emr1およびCD68は、いずれの群においても発現に有意差を認めなかった(図1F, G)。VTAにおけ

る免疫組織化学染色からは、HFD 投与群において普通食投与群に対し TNF α と共染するミクログリアが増加していることを確認した(図 2A)。実際に VTA 内の細胞数をカウントすると、HFD 投与 7 日目および 28 日目において共染細胞の比率が有意に上昇していたのに対し、ミクログリアの細胞数自体には有意差を認めなかった(図 2B, C)。これは図 1 の結果と矛盾しないものであった。最後に、HFD 投与 7 日目において、普通食投与群と比較し体重差のない HFD 投与群の個体を選別したのち、インスリンまたはレプチンの脳室内投与を行った。それぞれの受容体シグナル伝達における主要なマーカーである Akt または STAT3 のリン酸化を確認することで、HFD 投与が VTA でのシグナル伝達にどのように影響するかを検討した。インスリン投与下では普通食投与群と比較し HFD 投与群で Akt のリン酸化が有意に減弱していたのに対し、レプチン投与下では STAT3 のリン酸化は減弱しなかった(図 3A, B)。なお、これは両群の体重に有意差がある場合でも同様の結果であった(データ省略)。

【考察】

これまでも HFD の投与により視床下部、海馬、扁桃体、大脳皮質など脳内の様々な部位に炎症が生じることは報告されているが、炎症の出現に要する投与日数は各部位で異なっている。今回 VTA では HFD 投与 7 日目にミクログリア活性化マーカーの mRNA 発現の上昇に伴って TNF α といった複数の炎症マーカーが上昇していたのに対し、3 日目の時点では mRNA 発現の上昇は IL1 β のみであった。IL1 β は炎症誘導刺激によって活性化される NF- κ B などの転写因子により前駆型 IL1 β タンパク質が産生されたのち、インフラマソームの形成を介して活性化される caspase-1 によりプロセシングされ成熟型 IL1 β へ変換されるという 2 段階での制御を受けるため、HFD 投与 3 日では前者の段階を見ていたと考えられた。加えて免疫染色においても TNF α と共染するミクログリアの比率が有意に増加していたのも HFD 投与 7 日目以降であり、この時点で VTA においてミクログリアの活性化を伴った炎症が生じていたと結論付けた。HFD の投与に起因する脳内の炎症は、視床下部を始めとしてミクログリアの活性化が大きく関与することが報告されており、それは SOCS3 や PTP1B、TCPTP といったタンパク質の過剰発現を介してインスリンやレプチン受容体シグナルの減弱を来す。これにより HFD の摂餌増加やエネルギー代謝の低下を生じる結果、肥満形成の起点となる事が知られている。ところで VTA のインスリンやレプチン受容体シグナルにおいても、受容体を欠損させるなどして機能不全を生じさせた場合、摂餌量の増加を来し、嗜好性の高い HFD や砂糖への欲求が増強することが報告されており、肥満形成に重要な役割を果たすことが示唆されている。今回の実験では VTA での炎症を確認した HFD 投与 7 日目に VTA におけるインスリン受容体シグナルの減弱を確認しており、この時点で VTA のインスリン受容体シグナルに機能不全が生じていることが示唆される。更に、普通食投与群と HFD 投与群との間に体重差を認めない場合でもその事象が確認されたことから、この機能不全はマウスの体重変化とは独立して生じるものであり、肥満形成の起点となりうるという大変興味深い洞察が可能となる。なお今回の

報告ではレプチン受容体シグナルについては減弱を認めておらず、この理由は不明であるが、既報では 190 日間 HFD を投与したラットにレプチンを脳室内投与すると VTA において STAT3 のリン酸化が減弱したとされており、今回も HFD の投与を続けた場合にいずれかの時点でレプチン受容体シグナルの減弱が生じるものと考えられる。

【結語】

高脂肪食投与 7 日目という比較的早期の段階において、野生型マウスは脳内報酬系を司る腹側被蓋野にミクログリアの活性化を伴う炎症を生じ、インスリン受容体シグナルの減弱を生じる。高脂肪食の摂食により脳内報酬系が機能不全を来し肥満形成へ至る過程について、今回の報告はその病態生理を考察する上での新たな洞察を提供するものと考えられる。