

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500386

研究課題名（和文） 新しいメタボリックシンドロームモデルマウスの病態解析と
その分子機構研究課題名（英文） Analysis of a novel metabolic syndrome model mouse and its
molecular mechanism

研究代表者

石井 哲郎（ISHII TETSURO）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20111370

研究成果の概要（和文）：*sequestosome1* 遺伝子を欠損したマウス個体は、加齢とともに肥満症を呈する。これまで、この遺伝子欠損による肥満形成は、脂肪細胞の分化促進が原因であるといわれているが、我々は肥満の原因は、過食であることを示す結果を得た。さらに、中枢特異的に *sequestosome1* を欠損するマウスを作製し、その病態を解析した。その結果、全身で遺伝子を欠損したマウスとほぼ同様の体重増加を示すことが明らかになった。我々は、食欲を調節する視床下部の神経細胞において SQSTM1 が、食欲を抑制するペプチドホルモンであるレプチンのシグナル伝達に関与していると推測している。さらに興味深い発見は、女性ホルモンであるエストラジオールが SQSTM1 の欠損を補い摂食抑制効果を持つことである。

研究成果の概要（英文）： A mutant mouse defective in *sequestosome1* gene causes mature-onset obesity. A previous study suggested importance of *sequestosome1* (SQSTM1/p62) in regulation of adipocyte differentiation as a cause of obesity formation. However, our studies show overeating is the cause of the obesity formation. We constructed brain-specific SQSTM1 knock-down mouse. We found the conditional knock-down mouse exhibited similar body weight increase as the whole body gene knock-out mouse. We showed SQSTM1 is highly expressed in neurons of hypothalamus, suggesting a possibility that SQSTM1 is involved in the intracellular signaling of anorexic hormone leptin. Interesting finding is a female hormone estradiol compensates the lack of SQSTM1 in body weight control. It inhibits obesity formation through suppression of overeating of the mutant mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル、*sequestosome1*、レプチン、肥満、視床下部、過食

1. 研究開始当初の背景

1996年に酸化ストレスで誘導されるマウス遺伝子 A170 のクローン化を初めて報告したが、本タンパク質の生理機能については不明な点が多い。A170 は、今日では、sequestosome1 (SQSTM1)/p62 と呼ばれており、種々の細胞内タンパク質との相互作用が知られ、膜受容体経路のシグナル伝達や、ユビキチン化タンパク質の凝集やそれらのオートファジーによる分解に関与すると考えられている。SQSTM1 の生体内での機能を調べるため、遺伝子破壊マウスを作製しその病態解析を進めてきたが、肥満症を呈することを見出した。別のグループが我々に先立ち肥満症の解析を報告し、SQSTM1 遺伝子欠損では脂肪細胞の分化が促進されることが肥満の原因であるとした。我々の解析では、肥満を引き起こす主要因は過食によるエネルギーの過剰摂取であり、SQSTM1 は食欲の調節に関与すると考えた。

2. 研究の目的

SQSTM1 遺伝子破壊マウスが呈する過食、肥満症の原因とメタボリックシンドロームの病態を解析することを目的とする。具体的には、過食が中枢の SQSTM1 欠損に起因するのかどうかを明らかにし、本変異マウスのレプチン抵抗性の仕組みについて解析する。また、肥満症に性差が存在するが、雌マウスでは若年期に肥満症が抑制される仕組みについて解析する。さらに、肥満症と高血圧症の関連について血圧動態を野生型と比較する。

3. 研究の方法

コンディショナルノックアウトマウス (SQSTM1^{fllox/fllox}) を作成し、このマウスと Nestin-Cre トランスジェニックマウスと交配することにより、脳特異的に SQSTM1 を欠損したマウスを得る。このマウスの病態解析を行い、全身欠損マウスと比較する。レプチン抵抗性について解析するため、側脳室に微小カニューレを留置し、レプチンを脳室内に投与することで摂食行動の変化を解析する。中枢視床下部の NPY 神経細胞と POMC 神経細胞にそれぞれ GFP を発現するトランスジェニックマウスを用いて、それぞれの神経細胞におけるレプチンシグナルの違いを STAT3 の動態を指標として比較する。また、性差については女性ホルモンのエストロジンを分泌するカプセルを皮下に投与して、その効果を検証する。血圧動態については、体内埋め込み型のテレメトリーシステムを導入し、連続測定により比較検討する。

4. 研究成果

1) 脳特異的に SQSTM1 を欠損したマウスを作製し、C57BL 株と交配を繰り返して遺伝子バックグラウンドをそろえた。継時的に体重の増加を計測したところ、野生型との差が始めるのが 25 週以降であるが、加齢とともに肥満となり全身欠損マウスと似たような体重増加を示した。この結果は、中枢 SQSTM1 が、体重調節に主要な役割を果たしていることを示しており、我々の考えを支持する。2) マウスを 16 時間飢餓状態に置き、レプチンを脳室内に投与しその後の摂餌量を野生型マウスと比較したところ、まだ若齢の SQSTM1-KO マウスでもレプチンの抑制効果が著しく減少していた。脳切片の組織染色で、中枢 POMC 神経細胞において STAT3 の核への移行が抑制されており、レプチン抵抗性の実態が明らかになった。3) 8 週齢雌マウスの卵巣を除去し、エストロジンを分泌するカプセルを皮下に投与して、体重の変化と摂餌量の変化を比較した。その結果、KO マウスでは卵巣の切除により体重増加が見られ、エストロジンの投与によりそれが抑制された。すなわち、10-25 週令の雌 KO マウスにおける体重増加抑制はエストロジンによることが推測された。また、コントロールとして、オスマウスにエストロジンを投与すると野生型では変化がないが、KO マウスにおいては摂餌量と体重増加が明確に抑制された。これらの結果は、生体内物質であるエストロジンが SQSTM1 の欠損を補うことを示している。4) テレメトリーシステムにより 10-20 週令オスマウスの血圧変化を連続的に計測したところ、KO マウスは活動期（夜間）には野生型と差がないが、休息期（昼間）に血圧の低下が少ない、non-dipper 型の高血圧症を示すことが明らかになった。この結果は、高レプチン血漿により交感神経が休息期も活性化されて血圧の低下が起こりにくい可能性を示唆している。

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 5 件)

全て査読有

1. Tabuchi K, Oikawa K, Hoshino T,

Nishimura B, Hayashi K, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Tanaka S, Hara A. Cochlear protection from acoustic injury by inhibitors of p38 MAP kinase and sequestosome 1 stress protein. *Neuroscience* 2010; 166: 665-670.

2. Sugimoto R, Warabi E, Katayanagi S, Sakai S, Uwayama J, Yanagawa T, Watanabe A, Harada H, Kitamura K, Noguchi N, Yoshida H, Siow RCM, Mann GE, Ishii T. Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodeling in sequestosome 1 deficient mice. *J Cell Mol Med* 2010;14(6B): 1546-1554.

3. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, Mimuro H, Nakagawa I, Yanagawa T, Ishii T, Kakizuka A, Sztul E, Chakraborty T, Sasakawa C. Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nature Cell Biol.* 2009;11:1233-1240.

4. Kirkin V., Lamark T., Sou Y-S, Bjorkoy G., Nunn J.L., Bruun J-A., Shvets E., McEwan D.G., Clausen T.H., Wild P., Bilusic I., Theurillat J-P., Overvatn A., Ishii T, Elazar Z., Komatsu M., Dikic I., Johansen T. A role of NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Molecular Cell* 2009; 33:1-12.

5. Okada K., Yanagawa T., Warabi E., Yamatsu K., Uwayama J., Takeda K., Utsunomiya H., Yoshida H., Shoda J., Ishii T. The α -glucosidase inhibitor acarbose

prevents obesity and simple steatosis in sequestosome 1/A170/p62 deficient mice. *Hepatology Research* 2009; 39: 490-500.

[学会発表] (計 7 件)

1. Eiji Warabi 他
Non-dipper-like hypertension in sequestosome1/p62/A170 deficient mice in early phase of obesity
英国生理学会
2011年7月13日、英国Oxford市、Oxford大学

2. Warabi E. 他
Deficiency of sequestosome1/p62/A170 in mice is associated with metabolic syndrome: (III) Non-dipper type hypertension
Internal symposium on the pathophysiology of reactive oxygen and nitrogen species
2010年5月21日スペインサラマンカ市、サラマンカ大学

3. Ishii T. 他
Deficiency of sequestosome1/p62/A170 in mice is associated with metabolic syndrome: (II) Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodeling
2010年5月21日スペインサラマンカ市、サラマンカ大学

4. Harada H. 他
Deficiency of sequestosome1/p62/A170 in mice is associated with metabolic syndrome: (I) Obesity formation by hyperphagia
Internal symposium on the pathophysiology of reactive oxygen and nitrogen species
2010年5月21日スペインサラマンカ市、サラマンカ大学

5. Harada Harumi 他
A novel mechanism of leptin resistance in sequestosome1-deficient mice
The 4th international congress on stress responses in biology and medicine
2009年10月8日札幌市、ガトーキングダム

札幌ホテル

6. 原田春美 他

レプチンによる摂食調節機構における
SQSTM1 の機能
アディポサイエンス研究会シンポジウム
2009年8月22日大阪府、千里阪急ホテル

7. 蕨 栄治 他

Sequestosome1 欠損マウスにおけるメタボリ
ックシンドローム発症メカニズム
れどつくす生命科学第170委員会第22回研
究会
2009年3月19日大阪府、千里ライフサイエ
ンスセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 哲郎 (ISHII TETSURO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：20111370

(2) 研究分担者

蕨 栄治 (WARABI EIJI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：70396612

(3) 連携研究者

なし