

トピックス

グレリン, レプチンの弓状核NPYニューロンに対する直接作用, シグナル伝達と相互作用

河野 大輔, 矢田 俊彦

自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門

背景・目的

視床下部弓状核ニューロペプチドY (NPY)ニューロンは, 摂食亢進に重要な役割を果たしている. 空腹時においてNPYの分泌は増加¹⁾, また, NPYの脳室内投与は強い摂食亢進を引き起こす²⁾. 摂食亢進物質グレリンは食前に血中濃度が上昇³⁾, グレリンの脳室内投与により摂食が亢進する^{4,5)}. グレリンの受容体は, NPYニューロンの94%に発現しており⁶⁾, グレリンによる摂食亢進はNPY受容体拮抗薬によって阻害されることから^{7,8)}, グレリンはNPYニューロンを介して摂食を亢進させると考えられる. 一方, 脂肪細胞から産生される摂食抑制物質レプチンは, 脳を介して摂食抑制を起こし⁹⁾, レプチン受容体はNPYニューロンに豊富に発現している¹⁰⁾. レプチン受容体欠損マウスの弓状核にレプチン受容体を発現させると, 摂食と体重が減少することから¹¹⁾, 弓状核におけるレプチンの作用が摂食と体重の調節に重要であると考えられる. このように, グレリンとレプチンは, NPYニューロンへの作用を介して生理的な摂食調節に関与していると考えられるが, NPYニューロンにおける各々の作用機序および両ホルモンの相互作用は十分に解明されていない. そこで我々は, グレリン,

レプチンのNPYニューロンに対する直接作用とシグナル伝達機構, および, グレリン, レプチンの相互作用の解析を行った^{12,13)}.

方法

多種類のニューロンが混在する脳よりNPYニューロンを純粹に観察するため, 以下の「ニューロン同定—機能解析法」を用いた. 成熟ラットより弓状核ニューロンを単離し, Ca^{2+} 感受性蛍光色素fura-2を用いた蛍光画像解析により細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$)の測定を行って細胞活性をモニターし, 灌流下にホルモンを添加してその作用を調べた. $[Ca^{2+}]_i$ の測定後, 抗NPY抗体を用いた免疫染色を行ってNPYニューロンを同定し, ホルモン反応性細胞に占めるNPYニューロンの割合を調べ, さらにNPYニューロンのホルモンに対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答を解析した.

NPYニューロンにおけるレプチン投与によるSTAT3の活性化を, STAT3のリン酸化により調べた. レプチン ($20 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ 生食/ラット, $2 \mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ /マウス)を脳室内投与し20分後に固定した. リン酸化STAT3 (pSTAT3)の免疫染色とNPY mRNAの*in situ*ハイブリダイゼーションを同一切片で行った.

*in vivo*摂食調節における, グレリン, レプチンとホスホジエステラーゼ3

(PDE3)の関与を調べるため, グレリン (150pmol), または, グレリンおよびレプチン (125pmol)を $3.5 \mu\text{l}$ の生食に溶かし, 暗期の始めの時刻 (19時30分)にラットの側脳室に投与した. その後, 一晚 (14時間)の摂食量を測定した. その際, PDE3の関与を調べる実験においては, その阻害剤cilostamide ($2 \mu\text{g}/3 \mu\text{l}$ 生食)をグレリン, レプチン ($3.5 \mu\text{l}$)と共に投与した.

結果

グレリン (10^{-12}M – 10^{-8}M)は濃度依存性に弓状核ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を増加させ, 10^{-10}M において35%の弓状核ニューロンを活性化した¹²⁾. グレリン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加が観察された弓状核ニューロンの約80%はNPY免疫陽性であった¹²⁾. グレリンによる弓状核ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ 増加は, アデニル酸シクラーゼ阻害剤, プロテインキナーゼA (PKA)阻害剤, ホスホリパーゼC (PLC)阻害剤によって抑制されたが, プロテインキナーゼC阻害剤には影響されず^{12,13)}, また, 細胞外 Ca^{2+} -free条件下およびN型 Ca^{2+} チャネルの阻害剤によって抑制されたが, 小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害剤には影響されなかった¹²⁾.

NPYニューロンにおけるグレリン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は, レプチン (10^{-12}M)の共添加により抑制された (図1A, B). グレリン 10^{-12}M に応答したNPYニューロンの約45%がレプチン 10^{-12}M により抑制された (図1C). グレリン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加のレプチン (10^{-12}M)による抑制が観察された細胞の83%はNPYニューロンであった (図1D).

レプチンによるグレリン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制は, PI3キナーゼ (PI3K)阻害剤; LY294002, wortmanninとPDE3阻害剤; milrinone, cilostamideによって阻害さ

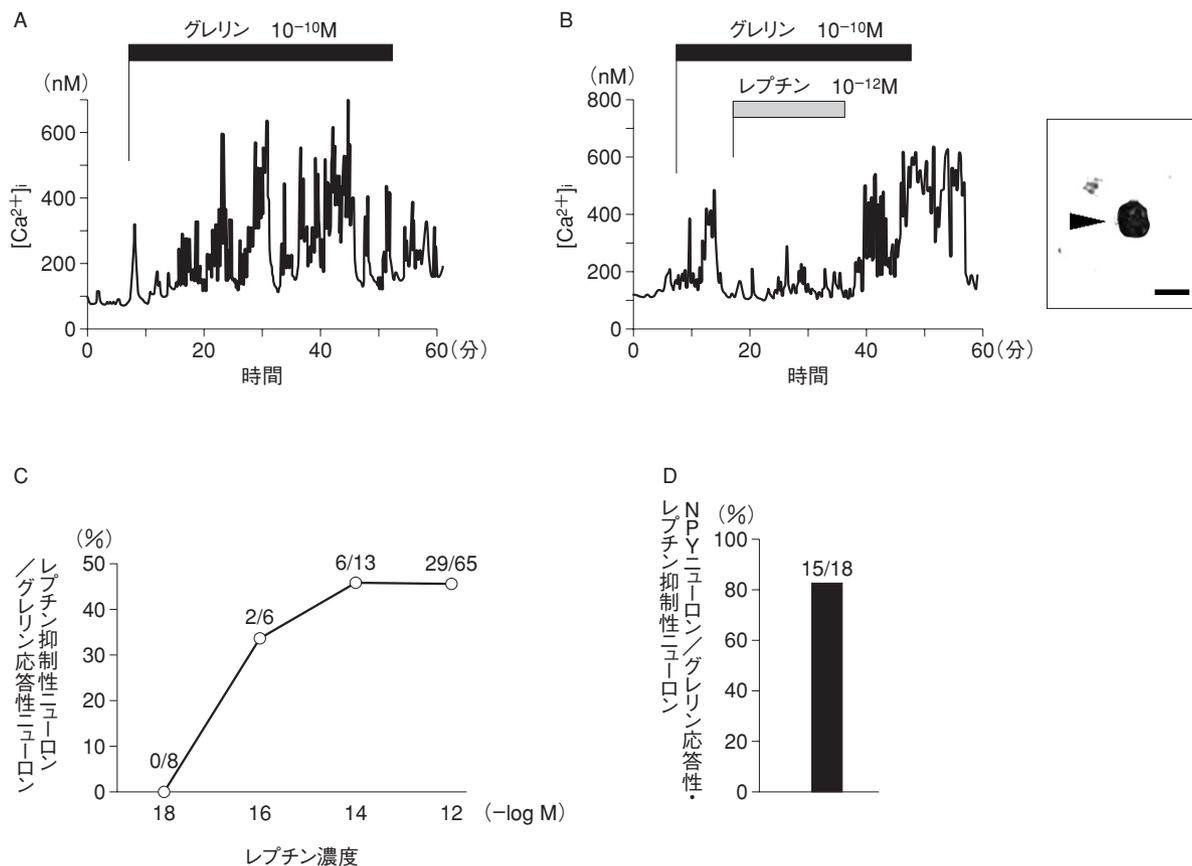


図1 グレリンによる弓状核NPYニューロンの細胞内Ca²⁺増加とそのレプチンによる抑制

A: グレリン10⁻¹⁰Mは弓状核ニューロンの[Ca²⁺]_iを増加させた。B: レプチン(10⁻¹²M)は、グレリンによる[Ca²⁺]_iの増加を抑制した(左図)。そして、そのニューロンはNPY免疫陽性ニューロンであった(右図)。スケールバーは10μmを示す。C: グレリン応答性ニューロンのうちレプチンにより抑制されたニューロンの割合(%)。D: グレリンによる[Ca²⁺]_i増加のレプチンによる抑制を示した弓状核ニューロンにおけるNPYニューロンの割合(%)。(文献13より一部改変して引用)

れた(図2)。一方、MAPキナーゼ阻害剤; U0126, K_{ATP}チャネル阻害剤; glibenclamide, tolbutamideはレプチンによる抑制作用を変化させなかった(図2)¹³。

弓状核におけるレプチンによるグレリン作用の抑制におけるSTAT3の関与を調べた。レプチンによるNPYニューロンのSTAT3の活性化の有無を調べた。レプチンの脳室内投与によりpSTAT3免疫陽性反応は、NPY mRNA発現ニューロンの27%にみられた¹³。そこでレプチンによるSTAT3活性化が[Ca²⁺]_iの抑制に関与するか否かについて調べた。STAT3阻害ペプチドは、レプチンによるグレリン誘導性

[Ca²⁺]_i増加の抑制を変化させなかった¹³。また、神経特異的STAT3 KOマウスの弓状核ニューロンにおいても、レプチンによるグレリン誘導性[Ca²⁺]_i増加の抑制はwildマウスと同程度に観察された¹³。

グレリン、レプチンによる*in vivo*摂食調節と、PDE3の関与について調べた。グレリン(150pmol)単独投与後の摂食量(19.68±0.53, n=13)は生食(コントロール)投与後の摂食量(17.20±0.93, n=11)に比べ有意(p<0.01)に増加したが、レプチン(125pmol)単独投与後の摂食量(13.13±1.08, n=7)はコントロールに比べ有意(p<0.01)に減少した(図3A)。グレリン(150pmol)

とレプチン(125mol)の共投与後の摂食量(18.16±0.45, n=7)は、グレリン単独投与と比べて、有意(p<0.05)に減少した(図3A)。グレリン誘導性摂食亢進のレプチンによる抑制にPDE3が関与しているか調べるため、PDE3阻害剤のcilostamide(2μg)を共投与したところ、グレリン投与後の摂食量(23.72±1.30, n=8)と、グレリンおよびレプチン投与後の摂食量(23.93±0.98, n=10)は有意な違いはみられなくなった(図3B)。

考察・結論

グレリンは、弓状核NPYニューロンを直接活性化し、そのシグナル伝達機

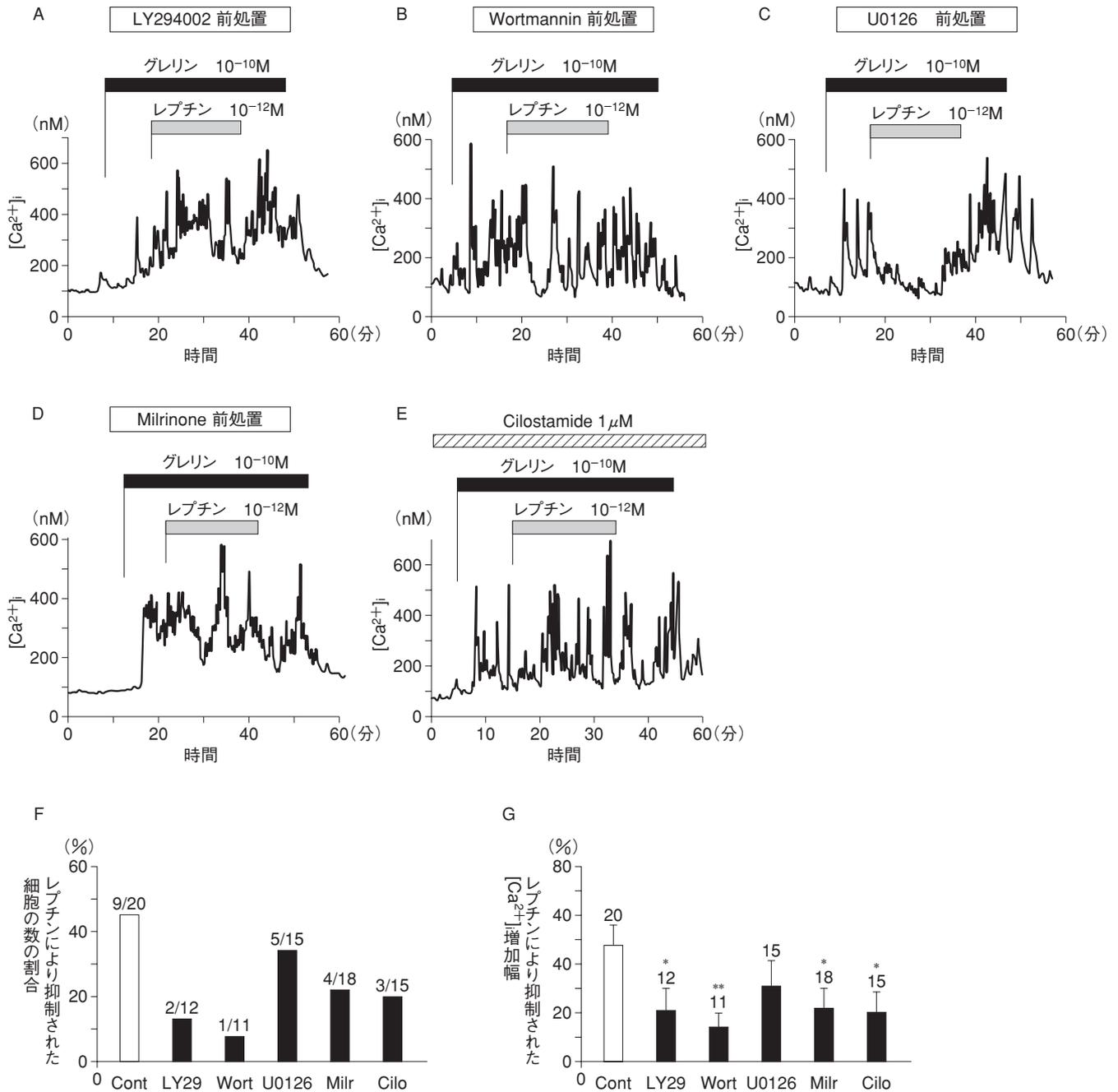


図2 レプチンによるグレリン応答の抑制はPI3キナーゼ、PDE3に依存する

A, B: PI3キナーゼ阻害剤のLY294002 (50 μ M) (A) または wortmannin (100nM) (B) の1時間前処置により、レプチンによるグレリン応答の抑制はみられなくなった。C: MAPキナーゼ阻害剤U0126 (10 μ M) の30分間前処置では、レプチンの抑制は変化しなかった。D, E: PDE3阻害剤である milrinone (10 μ M) の30分間前処置 (D) および cilostamide (1 μ M) の30分間前処置と共添加 (E) により、レプチンによるグレリン応答性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制が消失した。F: グレリン応答性細胞に占める、レプチン抑制性細胞の数の割合 (%). G: グレリンによる $[Ca^{2+}]_i$ 増加の振幅に対する、レプチンによる $[Ca^{2+}]_i$ 低下の振幅の割合 (%) で表した $[Ca^{2+}]_i$ 抑制率。 $[Ca^{2+}]_i$ 抑制率は、コントロールと比較して LY294002 (* $p < 0.05$), wortmannin (** $p < 0.01$), milrinone (* $p < 0.05$) と cilostamide (* $P < 0.05$) の前処置により有意に低下したが、U0126前処置では有意な違いはみられなかった。Cont: コントロール, LY29: LY294002, Wort: wortmannin, Milr: milrinone, Cilo: cilostamide. (文献13より一部改変して引用)

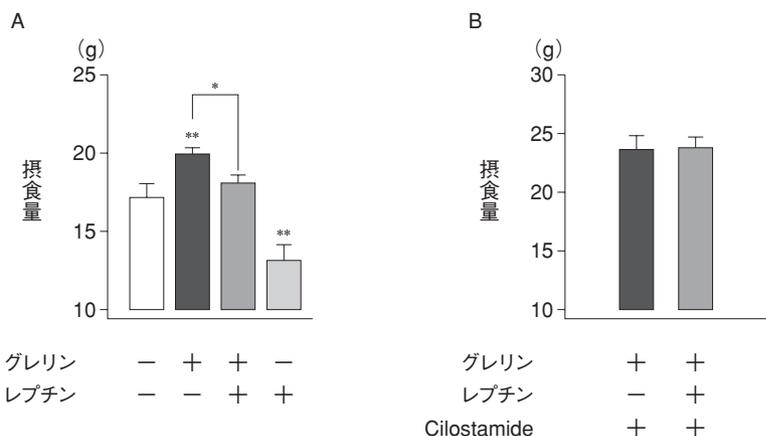


図3 *in vivo* グレリン誘導性摂食亢進作用のレプチンによる抑制は、PDE3阻害剤によって阻害された

A: 生食, グレリン(150pmol), レプチン(125pmol)の単独投与およびグレリンとレプチンの共投与の一晩(14時間)の摂食量に対する作用。グレリンによる摂食亢進作用はレプチンの共投与により抑制された。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 生食投与群。B: グレリン, または, グレリンおよびレプチンとともにcilostamide(2 μ g)を共投与した。レプチンによるグレリン誘導性摂食亢進の抑制は, cilostamideの共投与により阻害された。(文献13より一部改変して引用)

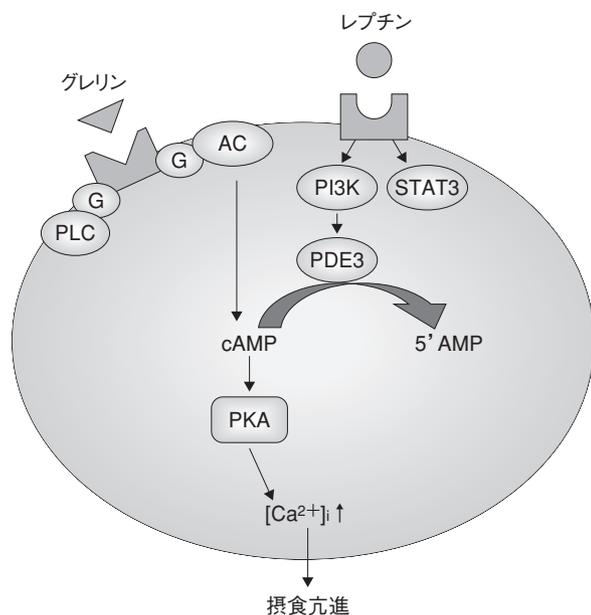


図4 弓状核NPYニューロンにおけるグレリンとレプチンの細胞内シグナル伝達のクロストークのモデル

グレリンによる $[Ca^{2+}]_i$ 増加にはアデニル酸シクラーゼ-cAMP-PKA, PLCが関与している。レプチンによるグレリン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制にはPI3K-PDE3が関係している。この相互関係がNPYニューロンの活性調節に重要であり, 摂食調節に関与すると考えられる。AC: アデニル酸シクラーゼ。(文献13より一部改変して引用)

構としてアデニル酸シクラーゼ, PKA, PLC, N型 Ca^{2+} チャネルが関与している。一方, レプチンは, グレリンによるNPYニューロンの活性化を抑

制し, その機序にはPI3KおよびPDE3が関与している(図4)。STAT3はレプチンによってNPYニューロンで活性化されるが, レプチンによる $[Ca^{2+}]_i$ の

抑制には関与していない。*in vivo* グレリン誘導性摂食亢進のレプチンによる抑制にPDE3が関与している。

グレリン, レプチンによるNPYニューロンの正, 負の制御と, それらに関わるシグナル伝達機序は, 摂食・代謝調節に重要な役割を果たしていると示唆される。中枢性のレプチン慢性投与によるレプチン抵抗性に視床下部のPDE3活性の低下が関与しているという報告があり¹⁴⁾, 本研究で明らかにしたシグナル伝達機構がレプチン抵抗性に関与する可能性が示唆される。本研究は, 今後, 摂食行動異常, 肥満の成因の解明の手がかりを与えるものである。

文献

- 1) Kalra SP, Dube MG, Sahu A, et al.: Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. Proc Natl Acad Sci USA 1991, **88**: 10931-10935.
- 2) Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, et al.: Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. Peptides 1986, **7**: 1189-1192.
- 3) Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, et al.: A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes 2001, **50**: 1714-1719.
- 4) Tschop M, Smiley DL, Heiman ML: Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature 2000, **407**: 908-913.
- 5) Wren AM, Small CJ, Ward HL, et al.: The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. Endocrinology 2000, **141**: 4325-4328.
- 6) Willesen MG, Kristensen P, Romer J: Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. Neuroendocrinology 1999,

- 70 : 306-316.
- 7) Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. : A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001, **409** : 194-198.
- 8) Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, et al. : Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001, **50** : 227-232.
- 9) Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, et al. : Recombinant mouse OB protein : evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995, **269** : 546-549.
- 10) Funahashi H, Yada T, Suzuki R, et al. : Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int Rev Cytol* 2003, **224** : 1-27.
- 11) Coppari R, Ichinose M, Lee CE, et al. : The hypothalamic arcuate nucleus : a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab* 2005, **1** : 63-72.
- 12) Kohno D, Gao HZ, Muroya S, et al. : Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus : Ca^{2+} signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 2003, **52** : 948-956.
- 13) Kohno D, Nakata M, Maekawa F, et al. : Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology* 2007, **148** : 2251-2263.
- 14) Sahu A, Metlakunta AS : Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway of leptin signalling is impaired following chronic central leptin infusion. *J Neuroendocrinol*, 2005, **17** : 720-726.

*本論文の内容は2006年度日本肥満学会若手研究奨励賞(YIA)の受賞対象となったものである