

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域内分泌代謝内科学教育研究分野 4 年 氏名 山形 聡
<p>(論文題目)</p> <p>Regulation of corticotropin-releasing factor and urocortin 2/3 mRNA by leptin in hypothalamic N39 cells</p> <p>(視床下部 N39 細胞におけるレプチンによる CRF 及び urocortin 2/3 遺伝子発現の調節作用)</p>	
<p>【背景・目的】</p> <p>Corticotropin-releasing factor (CRF) やそのファミリーペプチドである urocortin (Ucn) 1-3 は、生体内でストレス反応、摂食抑制及びエネルギー代謝に関与している。これらホルモンの受容体は、CRF 受容体 1 型 (CRFR₁) 及び 2 型 (CRFR₂) に分類される。CRF は主として CRFR₁ に結合し、Ucn1 は CRFR₁ と CRFR₂ の両者に、また、Ucn2 と Ucn3 は CRFR₂ に強い親和性を有する。レプチンは白色脂肪細胞から分泌されるホルモンで、レプチン受容体 (Ob-R) に結合した後、細胞内の Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 経路を介して、摂食抑制やエネルギー消費作用を発揮する。これまでに、ラット視床下部では、レプチンによる CRF 分泌の増加が報告されている。更に、レプチンによる Ucn1 遺伝子発現増加作用の報告もある。しかし、視床下部におけるレプチンのはたらきは未だ明らかでないことが多く、レプチンの視床下部における CRF や Ucn2/3 遺伝子発現への直接作用は不明である。そのため、本研究では、不死化されたマウス視床下部細胞でレプチン受容体の発現を確認し、更に、同細胞においてレプチンによる CRF、Ucn2/3 及び Ob-Rb 遺伝子発現への影響について検討した。</p> <p>【対象・方法】</p> <p>マウス視床下部 N39 細胞を DMEM 培地で継代培養した。Ob-R とそのサブタイプの発現について RT-PCR 法で確認した。同細胞へのレプチン (1 nM) 添加後 0、2、6 及び 24 時間の各時点において、CRF、Ucn2/3 及び Ob-Rb mRNA レベルの変化を real-time PCR 法により評価した。次に、レプチン 0.01-1 nM の濃度依存性による CRF、Ucn2/3 及び Ob-Rb mRNA レベルの変化について、real-time PCR 法により評価した。レプチンによる STAT3 リン酸化を Western blot 法によって調べ、次に、JAK 阻害剤で JAK 経路阻害による STAT3 リン酸化への影響を検討した。更に、同 JAK 阻害剤をレプチン添加 30 分前に前投与することで、CRF、Ucn2/3 及び Ob-Rb mRNA レベルの変化に与える影響を検討した。統計学的処理は ANOVA を用い、Fisher's post-hoc test を行った。P < 0.05 の危険率をもって有意とした。</p> <p>【結果】</p> <p>N39 細胞において、Ob-R とそのサブタイプ (Ob-Ra 及び Ob-Rb) mRNA の発現を認めた。レプチンは添加後 15 分から 1 時間にかけて STAT3 リン酸化を促進させた。JAK 阻害剤前投与によって同効果は抑制された。更に、レプチンは、添加後 6 時間で CRF mRNA レベルを約 2 倍まで増加させ、Ucn2/3 mRNA レベルをそれぞれ 2 時間で約 1.5 倍、1.4 倍まで増加させた。Ob-Rb mRNA は、レプチン添加後 6 時間で約 1.5 倍に増加した。これらの mRNA 増加作用は、0.01-1 nM のうち、いずれもレプチン 1 nM で最大反応を示した。更にレプチンによる Ob-Rb、CRF 及び Ucn2/3 mRNA レベルの増加は、JAK 阻害剤の前投与によってその効果が抑制された。</p>	

【考察】

生体内では、Ob-RのサブタイプであるOb-Rbが、視床下部弓状核、室傍核及び腹内側核に豊富に存在している。レプチンはOb-Rbに結合した後、細胞内JAK2-STAT3経路を介して、摂食抑制やエネルギー亢進作用を発揮する(1)。視床下部N39細胞では、ロングフォームのOb-Rbが発現していて、レプチンの作用発現に寄与すると考えられた。同様に強力な摂食抑制作用を持つCRF及びUcn2/3は視床下部で産生されており、CRFR₁とCRFR₂は共に視床下部腹内側核に存在している(2)。これまでも、レプチンによるCRF遺伝子発現や分泌の増加が視床下部組織の検討で示され(3,4)、レプチンとCRFとの互いに緊密な関与が考えられてきている。今回の研究により、視床下部細胞でレプチンによるCRF及びUcn2/3 mRNAレベルの増加を認めた。JAK阻害剤は、レプチンによるSTAT3リン酸化を阻害し、レプチンによるCRF及びUcn2/3 mRNAレベルの増加を抑制したことから、レプチンは、Ob-Rb結合以降、細胞内JAK2-STAT3経路を介して、CRF及びUcn2/3遺伝子発現を増加させると考えられた。一方、レプチンによるOb-Rb mRNAレベルの増加を認めた。これまで、レプチンによる視床下部弓状核ではOb-Rb遺伝子発現の増加が報告されているが、細胞の種類や視床下部の部位によってその反応は異なるとされる(5)。今回の検討による視床下部細胞でのレプチンによるOb-Rb mRNAレベルの増加は、リガンドの感受性を高めて、その作用を増強する可能性を示唆する。

【結論】

視床下部 N39 細胞において、Ob-R サブタイプ (Ob-Ra、Ob-Rb) mRNA の発現を確認した。レプチンは STAT3 のリン酸化を促進させて、CRF 及び Ucn2/3 mRNA レベルを視床下部細胞で直接増加させた。レプチンはまた、自身の受容体である Ob-Rb mRNA レベルを増加させた。以上のことから、レプチンは、視床下部において、CRF 及び Ucn2/3 の調節を介して、ストレス応答や摂食制御機構に関わっている可能性がある。

【参考文献】

- [1] Vaisse C et al. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 1996; 14: 95-7.
- [2] Chen P et al. Central urocortin 3 and type 2 corticotropin-releasing factor receptor in the regulation of energy homeostasis: critical involvement of the ventromedial hypothalamus. *Front Endocrinol* 2012; 3: 180.
- [3] Costa A et al. Stimulation of corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. *Neuroreport* 1997; 8: 1131-4.
- [4] Huang Q et al. Regulation of corticotropin-releasing factor and its types 1 and 2 receptors by leptin in rats subjected to treadmill running-induced stress. *J Endocrinol* 2006; 191: 179-88.
- [5] Mitchell SE et al. Leptin receptor gene expression and number in the brain are regulated by leptin level and nutritional status. *J Physiol* 2009; 587: 3573-85.