

氏 名 Coutinho, Eulalia Annette

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1807 号

学位授与の日付 平成27年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Role of the ventromedial hypothalamic Steroidogenic Factor
1/ Adrenal 4 Binding Protein neurons in the regulation of
whole body energy and glucose metabolism in mice.

論文審査委員 主 査 教授 西田 基宏
教授 箕越 靖彦
教授 富永 真琴
教授 矢田 俊彦 自治医科大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

The hypothalamus is the brain center which communicates with the periphery to control autonomic pathways that regulate energy intake, expenditure and storage. The ventromedial hypothalamus (VMH) was the first region of the hypothalamus found to play a crucial role in body weight regulation and energy homeostasis and came to be known as the 'satiety center' because studies showed that VMH lesions resulted in hyperphagia and obesity. Electrical stimulation of the VMH suppressed feeding behavior and decreased food intake in rats. Researchers also found that electrical or chemical stimulation of the VMH increased glucose uptake in peripheral tissues like skeletal muscle and brown adipose tissue. The VMH consists of different neuron populations characterized by the expression of either steroidogenic factor-1 (SF-1), brain derived neurotrophic factor (BDNF), pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) or cerebellin 1 (Cbln1). SF-1 (also known as adrenal 4 binding protein) is a member of the nuclear hormone receptor family of transcriptional regulators. SF-1 expressing neurons are limited to the VMH in the hypothalamus and are required for the normal development of VMH structure.

In my research, I studied the effect of activation or inhibition of SF-1 neurons on energy and glucose metabolism. I used the Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) system. DREADD technology is a pharmacogenetic method to activate or inhibit specific neurons in the brain. Upon expression of the stimulatory DREADD 'hM3Dq' or inhibitory DREADD 'hM4Di', a small drug like molecule clozapine-N-oxide (CNO) is used to activate or inhibit neuronal activity, respectively. I implanted VMH-targeting bilateral steel cannulas in SF-1 cre recombinase transgenic (SF-1 Cre Tg) mice and injected double floxed DREADD adenoassociated virus (AAV) vectors through it.

Brain sections showed expression of DREADD-mCherry only in the VMH. CNO injection into hM3Dq expressing SF-1 Cre Tg (hM3Dq) mice activated SF-1 neurons, while CNO injection into hM4Di expressing SF-1 Cre Tg (hM4Di) mice inhibited SF-1 neurons. Activation of SF-1 neurons

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

decreased three hours food intake after overnight fasting and during the dark period while inhibition of SF-1 neurons had no effect on food intake. I found that activation of SF-1 neurons increased energy expenditure and decreased respiratory quotient (RQ). Activation of SF-1 neurons also increased fat oxidation, but didn't alter carbohydrate oxidation. CNO injection to hM3Dq mice didn't change the locomotor activity significantly. These results suggest that increased energy expenditure on activation of SF-1 neurons was due to increased fatty acid oxidation and independent of locomotor activity. On the other hand, CNO injection to hM4Di mice didn't alter energy expenditure or locomotor activity. In addition, activation of SF-1 neurons increased insulin sensitivity and improved insulin tolerance during insulin tolerance test (ITT). In contrast, injection of CNO into hM4Di mice impaired insulin tolerance during ITT. During hyperinsulinemic-euglycemic clamp, SF-1 neuronal activation significantly increased glucose infusion rate required to maintain euglycemia. In accordance, activation of SF-1 neurons also enhanced insulin-induced suppression of gene expression of rate-limiting gluconeogenic enzymes like glucose 6 phosphatase (G6Pase) and phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) in the liver significantly. Activation of SF-1 neurons showed a tendency to increase glucose uptake by the red type skeletal muscle under basal insulin levels. However under hyperinsulinemia, SF-1 neuronal activation greatly increased insulin-stimulated glucose uptake in red type skeletal muscle. I found an increase in phosphorylation of Akt (a key molecule in insulin signaling) in the soleus muscle of hM3Dq mice, further demonstrating an increase in insulin sensitivity in the muscle under hyperinsulinemia.

Overall, SF-1 neurons regulates insulin sensitivity especially in red type skeletal muscle and the liver. It also plays an important role in energy homeostasis by regulating energy expenditure and energy (food) intake. Thus, using the DREADD system, I was able to elucidate the role of VMH SF-1 neurons by altering its activity and have shown its importance in regulating energy and glucose metabolism. These results support the idea that SF-1 neurons in the VMH are a crucial neuronal population for whole-body metabolism and suggest that through its activity, it regulates energy balance and glucose homeostasis.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

末梢組織のエネルギー代謝は中枢神経系によって直接制御されており、その中でも視床下部腹内側核 (VMH) は、古くから、摂食及び末梢組織の代謝に調節作用を及ぼすことが知られている。VMHには、転写因子steroidogenic factor-1/adrenal 4 binding protein (SF-1/Ad4BP) を選択的に発現するニューロン (以下、SF-1ニューロン) が存在し、同ニューロンは脂肪細胞産生ホルモン、レプチンによる代謝調節作用に関わることが報告されている。しかし、これらの実験は、SF-1ニューロン選択的にレプチン受容体を欠損、またはレプチン受容体細胞内シグナル分子を欠損したマウスを用いることから、マウス発達過程におけるVMH内の神経ネットワーク形成にも影響を及ぼしている可能性がある。本論文は、全身のエネルギーおよび糖代謝に及ぼすVMH SF-1ニューロンの調節作用を、薬理遺伝学的手法、in vivoにおける代謝実験法を駆使し、成熟雄マウスを用いて明確に証明した研究である。

出願者は、VMHのSF-1ニューロン特異的にデザイナー受容体を発現する遺伝子改変マウスを作出し、SF-1ニューロンの神経活動を選択的に変化させることを可能とするDREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs)システムを構築した。具体的には、SF-1プロモーターの支配下でCre recombinaseを発現するトランスジェニックマウスのVMHに活性化DREADD (hM3Dq) または不活性化DREADD (hM4Di) 受容体をコードするアデノ随伴ウイルスを接種してこれらの受容体をSF-1ニューロンに発現させた後、特異的リガンドCNO (clozapine-N-oxide)をマウスに投与することで、VMHのSF-1ニューロンを選択的に活性化または不活性化させた。CNO投与によるVMHニューロンの活性化 (脱分極) および不活性化 (過分極) は、脳スライス標本におけるSF-1ニューロンの膜電位を電流固定 (カレントクランプ) により記録することで確認した。

hM3Dq発現マウスへのCNO投与によるSF-1ニューロンの活性化は、食餌摂取量の減少、全身エネルギー消費量の増加、呼吸商の減少、脂肪酸化の増加を引き起こした。一方、SF-1ニューロンの活性化は自発運動量に影響を与えなかった。このことから、エネルギー消費の増加は、運動による二次的な効果では無く、自律神経あるいはホルモンによる代謝量の増加によることが示唆された。これに対し、hM4Di発現マウスへのCNO投与によるSF-1ニューロンの不活性化は、食餌摂取量、全身エネルギー消費に影響しなかった。次に、SF-1ニューロンの神経活動をDREADD法により変化させた時の糖代謝への影響を調べた。インスリン負荷試験では、SF-1ニューロンの活性化によりインスリン感受性が増強し、逆にSF-1ニューロンの不活性化によりインスリン感受性が低下した。インスリンを持続的にマウスに投与しインスリン感受性を評価するグルコースクランプ試験では、SF-1ニューロンの活性化は、血糖値維持に必要なグルコース注入量を顕著に増加させた。これと一致して、SF-1ニューロンの活性化は、肝臓において糖新生律速酵素 (glucose-6-phosphatase と phosphoenol pyruvate carboxykinase) 遺伝子発現量を低下させると共に、赤筋タイプの骨格筋 (ヒラメ筋など) においてインスリン依存性糖取り込み (2-[¹⁴C] deoxyglucose取り込み量) を顕著に増大させた。さらに、ヒラメ筋においてインスリン受容体シグナリング

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

の重要仲介分子であるAktのリン酸化レベルが増加し、インスリン感受性の亢進が示唆された。

本研究は中枢神経系による末梢組織のエネルギー代謝調節の仕組みを明確に示した極めて優れた内容であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。