

表 題 食塩感受性高血圧の中樞性成因の解析

論文の区分 博士課程

著 者 名 張 博洋

担当指導教員氏名 苅尾 七臣 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
専攻 人間生物学系  
専攻分野 生体制御医学  
専攻科 臓器・システム関連生理学

2021年1月8日申請の学位論文

## 目次

1. はじめに	2
2. 材料と方法	5
3. 結果	11
4. 考察	23
5. おわりに	26
6. 謝辞	27
7. 参考文献	28

## 1. はじめに

生体の恒常性維持は内分泌系と神経系が重要な役割を果たしており、視床下部はその制御に重大な働きをしている。視床下部は摂食・エネルギー代謝の中枢でもある。視床下部の中で弓状核は、全身の栄養・代謝状態を感知する一次中枢であり、弓状核からの神経情報は二次中枢の神経核に室傍核に伝達される。弓状核には摂食亢進系の Agouti-related peptide (AgRP)/ Neuropeptide Y (NPY)ニューロンと摂食抑制系の Proopiomelanocortin (POMC)ニューロンが存在している。POMC ニューロンの神経伝達物質は $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)であり、Melanocortin 3/4 receptor (MC3/4R)を介して作用する。一方、AgRP は $\alpha$ -MSH を拮抗阻害する神経伝達物質である(1)。さらに、AgRP ニューロンは神経伝達物質として $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)を放出し、POMC ニューロンの活性を抑制している(2)。この二つのニューロンの神経活動のバランスにより摂食行動とエネルギー代謝の恒常性が維持されている(3,4)。

近年、メタボリックシンドロームの増加は深刻な健康問題になっており、その病態はインスリン抵抗性である。インスリン抵抗性は交感神経系、RAS 系を亢進し、血圧の上昇につながり(5-8)、塩分感受性高血圧に関連している(9)。弓状核ニューロンのインスリン抵抗性も肥満・糖尿病・高脂血症を増悪させる事が明らかにされつつあり、メタボリックシンドロームの中枢性病因として弓状核のニューロンの機能異常が注目されている(10-15)。しかしながら、メタボリックシンドロームの高血圧の病態への弓状核ニューロンの関与は明らかでない点が多い。AgRP ニューロンが血圧調節にも関与する事が報告されたが、AgRP ニューロンのインスリン抵抗性が高血圧を増悪させる機序は不明である

(16,17)。

インスリンのシグナリングには Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3k)が重要であり、PI3K によって生成された Phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP3) は、3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)の活性化を介して Protein kinase B (PKB, Akt としても知られている)を活性化し、さらに下流のシグナル分子を介して細胞の生理機能を制御する。下流シグナルの一つは転写因子 Forkhead box O (FoxO)であり Akt のリン酸化により活性が抑制される。PI3k には数種類のアイソフォームが存在するが、PDK1 は一種類だけである。当研究室では AgRP ニューロン特異的 PDK1 ノックアウトマウス (PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウス)を解析してきた。PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスは、AgRP と NPY の発現は変化しないが、AgRP / NPY ニューロンのグレリン応答性が低下しており、摂食量、体長、および体重の減少を示す(18)。PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスは大腿骨の皮質骨塩密度と海綿骨塩密度が減少し、骨形成が遅れる(19)。しかし、ドミナントネガティブ FoxO1 発現 PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスでは、グレリン応答性と大腿骨の骨塩密度が回復する。したがって、AgRP ニューロンにおける PDK1-FoxO1 経路はエネルギー恒常性の制御や骨代謝において重要な役割を果たしている(18,19)。本研究では、AgRP ニューロンの PDK1-FoxO1 経路の血圧調節における役割を検討する。

脳脊髄液は、脳内の間質液の電解質の恒常性を調節している。高血圧患者では 25 g/日の食塩摂取で、脳脊髄液中の Na<sup>+</sup> 濃度は約 7.5 mmol/L (144.0 mmol/L から 151.5 mmol/L)増加する。一方、3 g/日の食塩摂取では脳脊髄液中の Na<sup>+</sup> 濃度は変化は認められない(147.8 mmol/L から 149.2 mmol/L)(20)。動物実験でも、

野生型ラットでは低食塩食摂餌時に比べ、高食塩食摂餌時は脳脊髄液中の  $\text{Na}^+$  濃度が約 9 mmol/L を上昇し、147 mmol/L に達する(21)。さらに、食塩感受性 Dahl ラットや自然発症高血圧 SHR ラット等の高血圧モデル動物でも、血圧の増加に先行して高食塩食摂餌時は脳脊髄液中の  $\text{Na}^+$  濃度は 148 mmol/L から 154mmol/L に上昇する(22)。このように塩分の過剰摂取が脳脊髄液中の  $\text{Na}^+$  濃度の増加を起こすことは明らかであるが、 $\text{Na}^+$  濃度の増加を直接弓状核ニューロンが感知し得るかは不明である。 $\text{Na}^+$  濃度の増加は浸透圧の増加でもあり、浸透圧の感知分子の一つとして温度受容体である Transient receptor potential (TRP)ファミリーが知られている(23)。特に、Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)の活性化は交感神経活動を介して、食塩感受性高血圧による腎障害を軽減することが報告されている(24-26)。TRPV1 陽性ニューロンは、弓状核にも局在している。本研究では、弓状核ニューロンの  $\text{Na}^+$  感知機構における TRPV1 の役割も検討する。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 動物

AgRP Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウス (AgRP Cre マウス)と、PDK1 の exon3 と exon4 が loxP で挟まれている PDK1<sup>lox/lox</sup> マウスを交配し(27,28)、AgRP Cre / PDK1<sup>lox/lox</sup> マウス (PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウス)を作成した(18,19)。ドミナントネガティブ型 FoxO1 発現 R26<sup>loxneoΔ256Foxo1</sup> マウス(29)と PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスを交配し、Δ256FoxO1 発現 PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウス (PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>Δ256Foxo1 マウス)を作成した(18,19)。実験にはジェノタイプリングした雄性マウスを用いた。動物は 24 °C、湿度 40~60 % 、12 時間明暗 (7:30~ 19:30)の条件で飼育した。CE-2 餌 (Japan SLC, Tokyo, Japan)と水は自由摂取させた。この実験は、自治医科大学実験医学センター運営委員会及び遺伝子組換え実験委員会で承認され、自治医科大学動物実験指針に従った。

Trpv1-null (Trpv1 KO) マウスは和歌山県立医科大学眼科学講座から供与を受けた(30)。C57BL/6 マウスと Trpv1 KO は和歌山県立医科大学動物センターで繁殖し、実験には全て雄性マウスを用いた。動物は 24°C、湿度 40~60% 、12 時間明暗 (8:00~ 20:00)の条件で飼育した。CE-2 餌 (Japan SLC, Tokyo, Japan)と水は自由摂取させた。この実験は、和歌山県立医科大学実験医動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会で承認され、和歌山県立医科大学動物実験指針に従った。

### 2.2. 血圧と脈拍の測定

16 週齢の AgRP Cre マウスおよび PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスに、0.3% NaCl の低

食塩食 (Oriental Yeast Co, Tokyo, Japan)を一週間摂餌させた。その後、8.0 % NaCl の高食塩食 (Oriental Yeast Co)を一週間摂餌させた。明期 (10:00-12:00) の収縮期血圧は、テールカフ法により麻酔なしで毎週測定した (Model MK-2000, Muromachi Co.,Tokyo, Japan)。

### 2.3.循環関連ホルモンおよびカテコールアミンの測定

血中アルドステロンの濃度、Atrial natriuretic peptide (ANP)およびArginine vasopressin (AVP)は酵素免疫測定法 (BioVendor Lab., Brno, Czech Republic, Phoenix Pharmaceutical Inc. and CUSABIO)で測定した。マウス代謝ケージCM-10S (CLEA Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan) で一日蓄尿後、カテコールアミン排泄量は高速液体クロマトグラフィー (SRL Inc., Tokyo, Japan) で測定した。

### 2.4. Nucleobindin-2 (NUCB2) shRNA AAVウイルスベクターの室傍核への局所投与

shRNAの設計は、マウスNUCB2のターゲット配列は5'-GGATCATCCAAGT ACAGTA-3' (Accession No. NM 016773の: 298 ~ 316残基)を、対照のスクランブル配列は5'-CAACACTAGTTGACATGTA-3'を用いた(31,32)。shRNAコンストラクトをpAAVにサブクローニング後、HEK293細胞にアデノウイルスヘルパープラスミドpAdenoおよびキメラヘルパーpAAV2rep / AAV9capとトリプルトランスフェクションしてAAVウイルスベクターを作製した。14 週齢の PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスに、10<sup>9</sup> vgのrAAV-NUCB2-shRNAまたはrAAV-scrambled-shRNAを両側室傍核に局所投与した。室傍核の座標はbregmaより後方=0.82 mm、外側=±0.15 mm、腹側= 5.0 mmの位置とした。

### 2.5. Real-time RT-PCR 分析

高食塩食一週間の摂餌後、AgRP Cre と PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスから両側室傍核を、高食塩食または低食塩食三週間の摂餌後の C57BL/6 マウスから両側弓状核を摘出し、TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用い total RNA の抽出を行った。RQ1-DNase (Promega, Madison, WI)で処理後、ReverTra Ace kit (Takara bio Inc., Tokyo, Japan)により First-strand cDNA の合成を行った。SYBR Premix Ex Taq II を用い、Thermal Cycler Dice (Takara bio, Shiga, Japan)により  $\Delta\Delta$ CT 法にて定量し、対照には glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。以下にプライマー配列を示す。

#### AVP

Forward 5'-CATCTCTGACATGGAGCTGAGA-3'

Reverse 5'-GGCAGGTAGTTCTCCTCCTG-3'

#### CRH

Forward 5'-TCTCTCTGGATCTCACCTTCCACC-3'

Reverse 5'-AGCTTGCTGAGCTAACTGCTCTGC-3'

#### NUCB2

Forward 5'-GTCACAAAGTGAGGACGAGACTG-3'

Reverse 5'-TGGTTCAGGTGTTCAAAGCTGCTTC-3'

#### Oxytocin

Forward 5'-TGTGCTGGACCTGGATATGCGCA-3'

Reverse 5'-GGCAGGTAGTTCTCCTCCTG-3'

#### TRH

Forward 5'-TGTGACTCCTGACCTTCCA-3'



Reverse 5'-GGATGCTGGCGTTTTGTG-3'

AgRP

Forward 5'-GGTGCTAGATCCACAGAACCG-3'

Reverse 5'-CCAAGCAGGACTCGTGCAG-3'

NPY

Forward 5'-TGGCCAGATACTACTCCGCTC-3'

Reverse 5'-ATGGAAGGGTCTTCAAGCCT-3'

POMC

Forward 5'-CATTAGGCTTGGAGCAGGTC-3'

Reverse 5'-TCTTGATGATGGCGTTCTTG-3'

GAPDH

Forward 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'

Reverse 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'

## 2.6. 蛍光画像解析による細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の測定

5 週齢マウスから脳を摘出し、実体顕微鏡下で弓状核摘出した。摘出した弓状核は20 units Papain/0.4 units DNase /5 mM Glucose/ HEPES-buffered Krebs-Ringer bicarbonate buffer (HKRB)を用いて36 °Cで15 分間の酵素処理後、ピペッティングにより分散し、700 rpmで5 分間遠心を行った。沈殿の細胞懸濁液をカバーガラス上に乗せて湿潤箱に入れ、35 °Cで30 分~2 時間で静置した。 $Ca^{2+}$ 感受性蛍光素Fura-2/AM (2  $\mu$ M)を、2.5 % Bovine serum albumin (BSA)/HKRBで溶解後、単離弓状核ニューロンに添加し、30 分間インキュベーションを行った。Fura-2負荷後、蛍光顕微鏡ステージ上のチャンバーに設

置して、36 °Cで流速1 ml/minで灌流を行った。蛍光の測定は、340 nmおよび380 nmの励起光を照射し放出される510 nmの蛍光を、Aquacosmosシステム(浜松ホトニクス)を用いて解析を行った。 $[Ca^{2+}]_i$ は、340 nmおよび380 nm励起による510 nm蛍光強度比 (F340/F380)で代用した。 $[Ca^{2+}]_i$ 測定後、カバーガラス上の細胞を4 % Paraformaldehyde (PFA) /0.1 M Phosphate-buffer (PB)で一晩浸して固定を行った。Phosphate buffered saline (PBS)で洗浄した後、3 %  $H_2O_2$ 溶液で10 分間反応させ内在性ペルオキシダーゼを失活させた。PBSで洗浄後、2 % BSA/ 2 % Normal goat serum (NGS) / 0.1 % TritonX-100 / PBS溶液で30分間ブロッキングを行った。その後、ウサギ抗AgRP抗体 (Cloud-Clone Corp. 1:500)またはウサギ抗POMC抗体 (1:1000)(33)を添加し、4 °Cで一晩反応させた。PBSで洗浄後、ビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (Vector Laboratories, 1:500) に30 分間反応させた。PBSで洗浄後、VECTASTAIN Elite ABC kit peroxidase (HRP)(Vector Laboratories) のABC reagentで30 分間反応させた。PBSで洗浄後、FAST DAB PEROXIDASE SUBSTRATE TABLET SET (Sigma-Aldrich) により発色した。 $[Ca^{2+}]_i$  測定時の写真は免疫染色後の写真と照合する事により、AgRPニューロンまたはPOMCニューロンの同定を行った。

## 2.7. 免疫組織染色

C57BL/6 マウスを深麻酔後、左心室よりヘパリン添加 0.9 %生理食塩水で7分間灌流を行い、その後、4% PFA /0.1 M PB で 10 分間灌流固定を行った。灌流固定後、脳を取り出し、4 % PFA /15 %スクロース/ 0.1 M PB により一晩 4 °C で固定後、30 %スクロース/0.1M PB で 1 日間置換を行った。凍結後、冷却機能付き滑走式マイクロトーム (REM710,YAMATO) で厚さ 30  $\mu$ m の脳冠状

断スライス切片の製作を行った。切片は PBS で洗浄した後、0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS に 10 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼブロック処理を行った。PBS 洗浄後、2 % BSA/2 % NGS /0.1 % TritonX-100 /PBS で 30 分間ブロッキングを行った。その後、ブロッキング液に希釈したウサギ抗 TRPV1 抗体 (Neuromics, 1:500) を添加し、4 °C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、Alexa488 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (Invitrogen, 1:500)で 40 分間反応させた。PBS で洗浄後、スライドガラスに貼り付け後、fluorescent mounting medium (Dako)で封入し、観察を行った。

## 2.8. データの表示と統計

全ての結果は平均値と標準誤差で示した。有意差の検定には、一元配置分散分析を行った後、多重比較検定として、Bonferroni 検定を行った。p<0.05 を有意差ありとして評価した。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の測定の解析は、F 検定による分散の検定後、Welch の t 検定を用いた。

### 3. 結果

#### 3.1. PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの塩分誘発性高血圧

PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>および AgRP Cre マウスに高食塩食 (8 %NaCl) 一週間の摂餌後、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの収縮期血圧は AgRP Cre マウスに比べ有意に上昇した (図 1.A)。この間の食物摂取量と水分摂取量は両マウス間で有意差がなかった (図 1.B-C)。

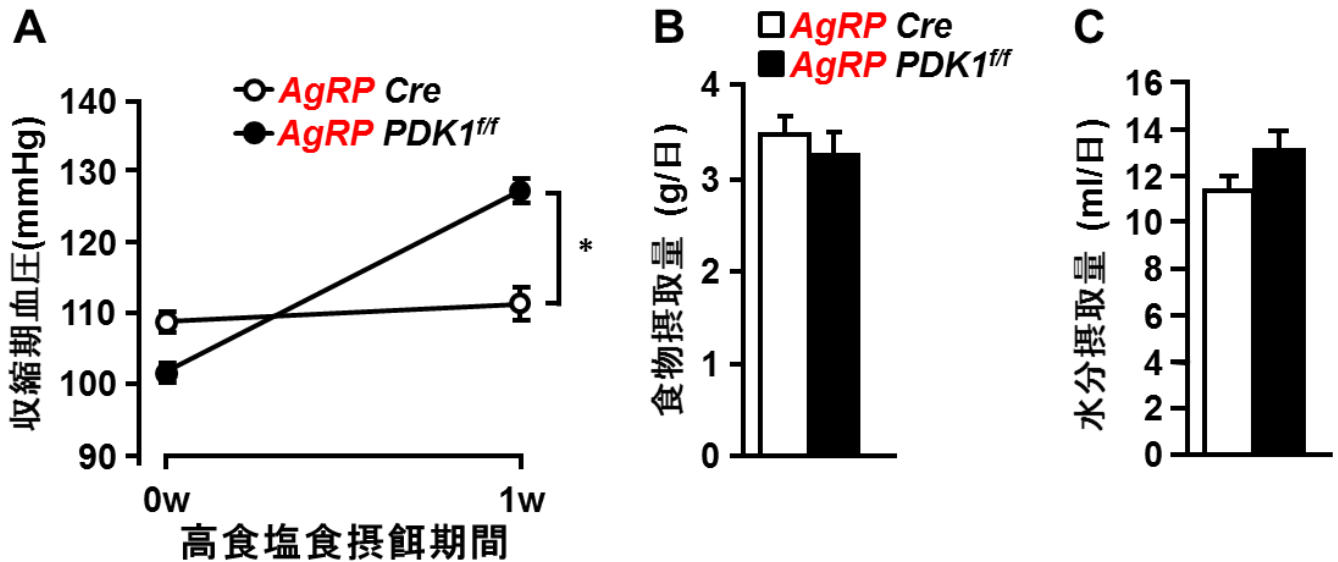


図 1. A, 高食塩食一週間の摂餌前後の AgRP Cre マウスと PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの収縮期血圧。B-C, 高食塩食一週間の摂餌後の AgRP Cre マウスと PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの食物摂取量 (B)と水分摂取量 (C)。n=7,\*p < 0.05。

### 3.2. PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの交感神経活動

高食塩食一週間の摂餌後、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスと AgRP<sup>Cre</sup> マウスの尿量は有意差がなく (図 2.A)、利尿調節に関与する血中アルドステロン、ANP および AVP 濃度も有意差がなかった (図 2.B-D)。一方、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスのノルアドレナリンおよびアドレナリン排泄量は有意に増加し (図 2.E-F)、ドーパミン排泄量は有意差がなかった (図 2.G)。この結果から、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスでは交感神経活動が血圧上昇に関与している可能性が示唆された。

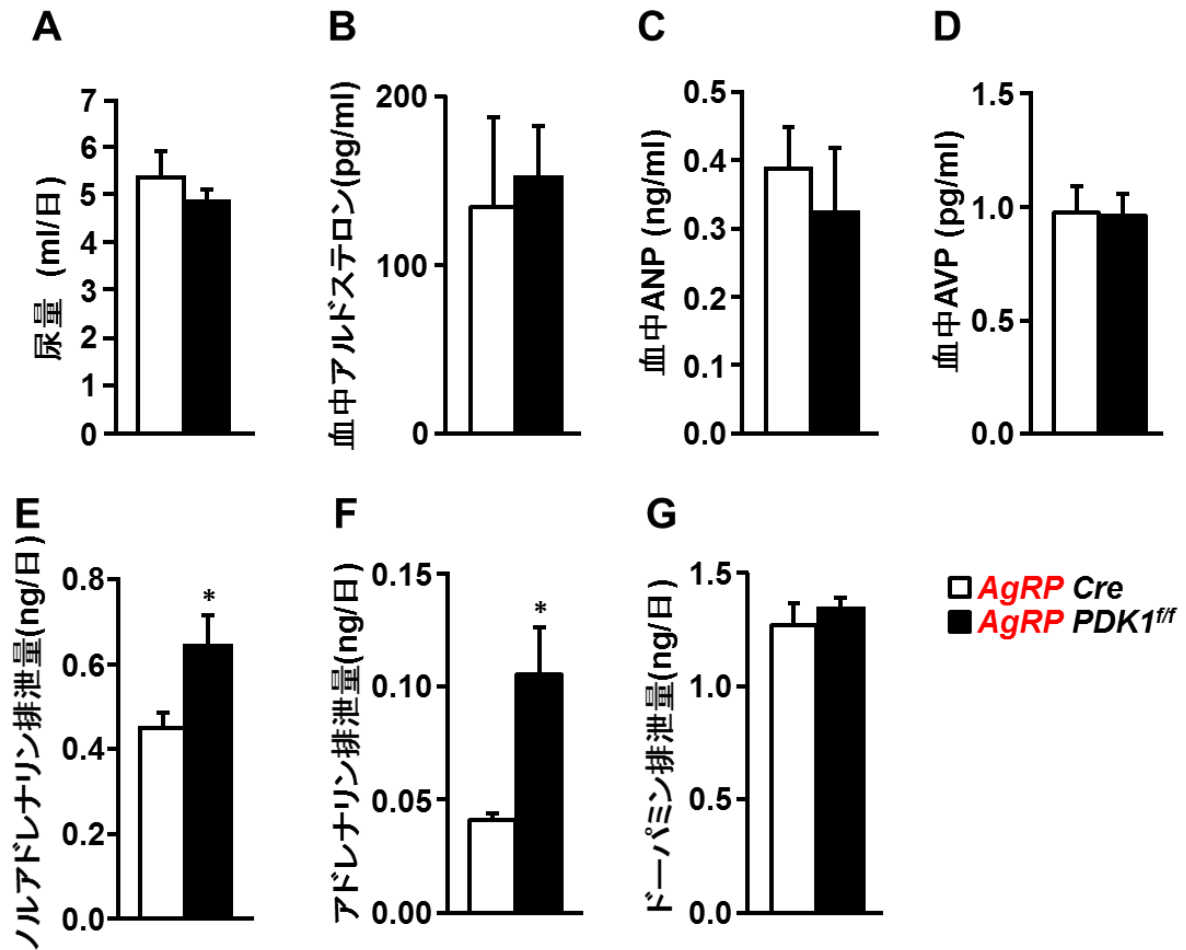


図 2. A-D,高食塩食一週間の摂餌後の AgRP Cre マウスと PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup> マウスの一日尿量 (A)、血中アルドステロン (B)、ANP (C)、AVP (D)濃度。n=6-7。  
 E-G, 高食塩食一週間の摂餌後の AgRP Cre マウスと PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup> マウスのノルアドレナリン (E)、アドレナリン (F)とドーパミン (G)の一日排泄量。n=7,  
 \*p < 0.05。

### 3.3. 弓状核 AgRP から室傍核 NUCB2/Nesfatin-1 ニューロンへの血圧調節回路

最近、弓状核 AgRP ニューロンは室傍核を介して、交感神経活動と血圧を抑制することが報告された(34,35)。そこで、高食塩食一週間の摂餌後の室傍核の神経ペプチドの mRNA 発現を解析した。PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスでは、NUCB2 と Corticotrophin releasing hormone (CRH)の mRNA 発現が有意に増加していた (図 3.A)。NUCB2 のプロセシング産物である Nesfatin-1 は摂食行動、エネルギー代謝、血圧調節関係することが知られている(36,37)。次に、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの室傍核の NUCB2 発現を shRNA で抑制した。AAV-NUCB2-shRNA 投与により室傍核の NUCB2 mRNA 発現が 62%抑制された (図 3.B)。AAV-NUCB2-shRNA を投与した PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスでは高食塩食一週間の摂餌による収縮期血圧の上昇が有意に抑制された (図 3.C)。さらに、AAV-NUCB2-shRNA を投与した PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスではノルアドレナリン排泄量の上昇も有意に抑制された (図 3.D)。AAV-NUCB2-shRNA 投与により室傍核 CRH mRNA 発現が 76% 抑制された (図 3.E)。この結果から、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの高食塩食一週間の摂餌による高血圧は、室傍核の NUCB2/Nesfatin-1 ニューロンの活性化を介していることが示唆された。

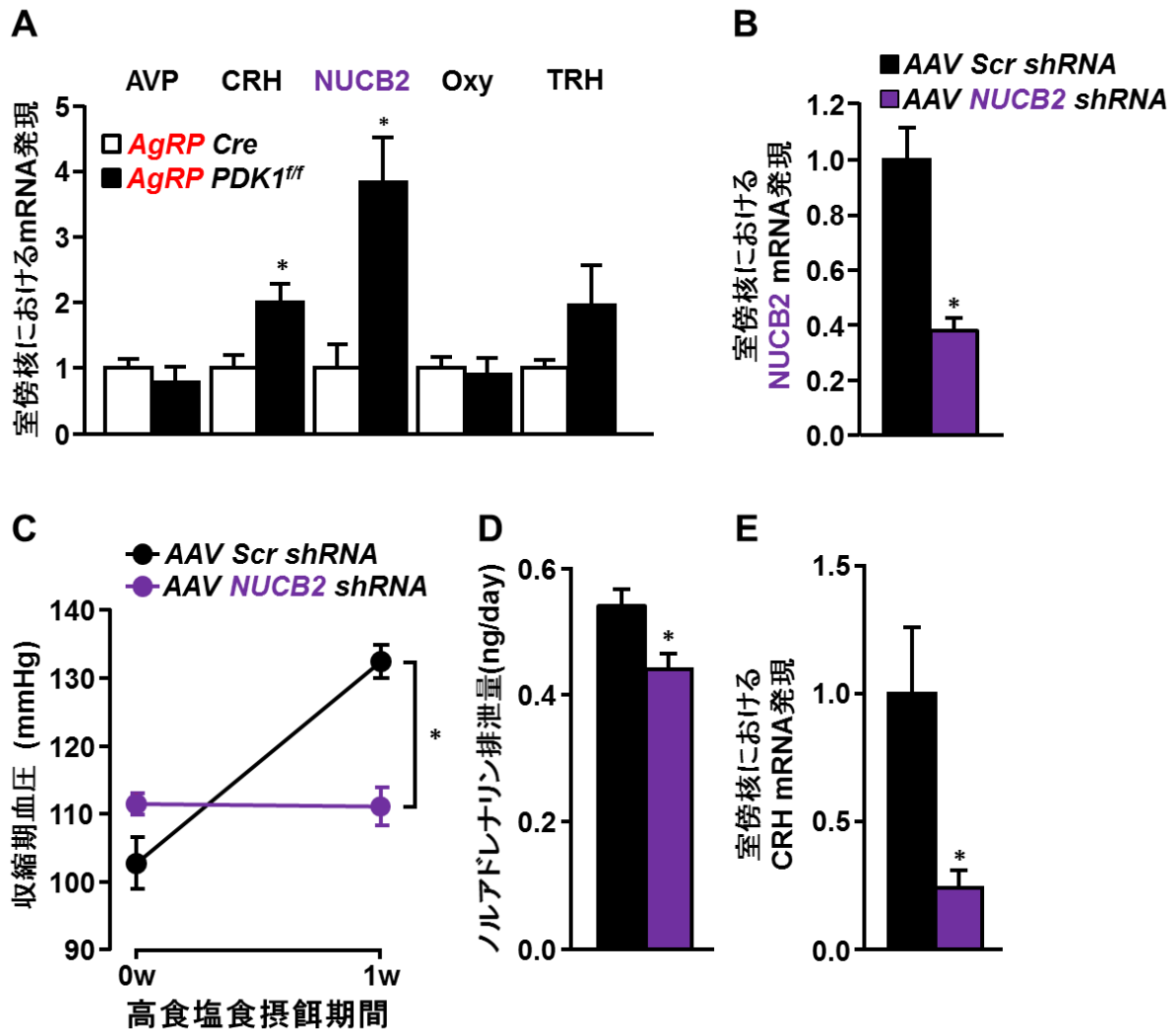


図 3.A, 高食塩食一週間の摂餌後の AgRP Cre マウスと PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの室傍核における AVP、CRH、NUCB2、Oxytocin (Oxy)と TRH の相対的な mRNA 発現レベル。B,高食塩食一週間の摂餌後の AAV-Scr-shRNA マウスと AAV-NUCB2-shRNA マウスの室傍核における NUCB2 の相対的な mRNA 発現レベル。C-D,高食塩食一週間の摂餌後の AAV-Scr-shRNA マウスと AAV-NUCB2-shRNA マウスの収縮期血圧 (C)とノルアドレナリン排泄量 (D)の変化。E,高食塩食一週間の摂餌後の AAV-Scr-shRNA マウスと AAV-NUCB2-shRNA マウスの室傍核 CRH の相対的な mRNA 発現レベル。n=5-6,\*p < 0.05。



### 3.4. FoxO1 の血圧への関与の検討

PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスの高血圧に、PDK1の下流シグナルであるFoxO1が関与しているかを調べるために、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>  $\Delta$ 256Foxo1マウスを用いて検討した。高食塩食一週間の摂餌後、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>  $\Delta$ 256Foxo1マウスの収縮期血圧はPDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスと同様に上昇した(図4.A)。さらに、PDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>  $\Delta$ 256Foxo1マウスのノルアドレナリン排泄量は抑制されなかった(図4.B)。この結果から、FoxO1は収縮期血圧の調節と関与していないと考えられる。

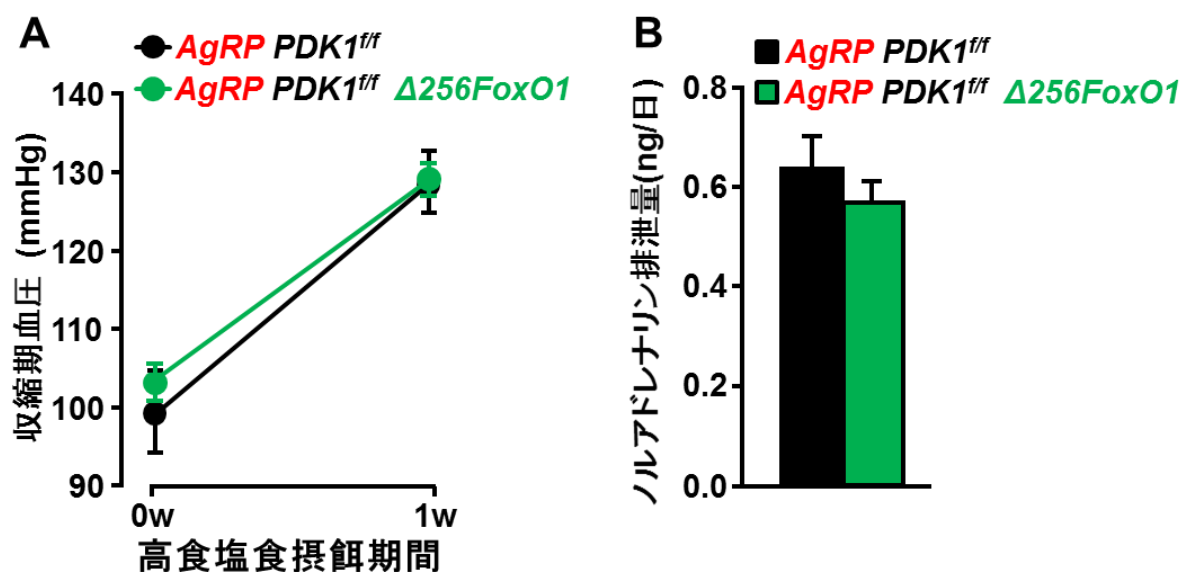


図4.A-B, 高食塩食摂一週間の摂餌後のPDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>マウスとPDK1<sup>AgRP-/AgRP-</sup>  $\Delta$ 256Foxo1マウスの収縮期血圧(A)とノルアドレナリン排泄量(B)。n=6-7。

### 3.5. 弓状核における Na<sup>+</sup>感受性ニューロンの解析

高食塩食摂餌後の弓状核ニューロンへの影響を解析した。高食塩食三週間の摂餌後、C57BL/6 マウスの弓状核では AgRP の発現が有意に増加していた (図 5.A)。一方、POMC の発現は有意差がなかった。次に、弓状核ニューロンの Na<sup>+</sup> 直接感知を解析するために、単離弓状核ニューロンの細胞外 Na<sup>+</sup>濃度に対する [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 応答性を検討した。5 mM グルコース-HKRB 灌流下で、10mM 細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加は、弓状核ニューロンの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を増加させた。AgRP ニューロンおよび POMC ニューロンは細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加より [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が増加した (図 5.B-C)。細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加により、AgRP ニューロンの約 13%、POMC ニューロンの約 4% が活性化された。両ニューロン間で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の増加量は有意差がなかった (図 5.D)。

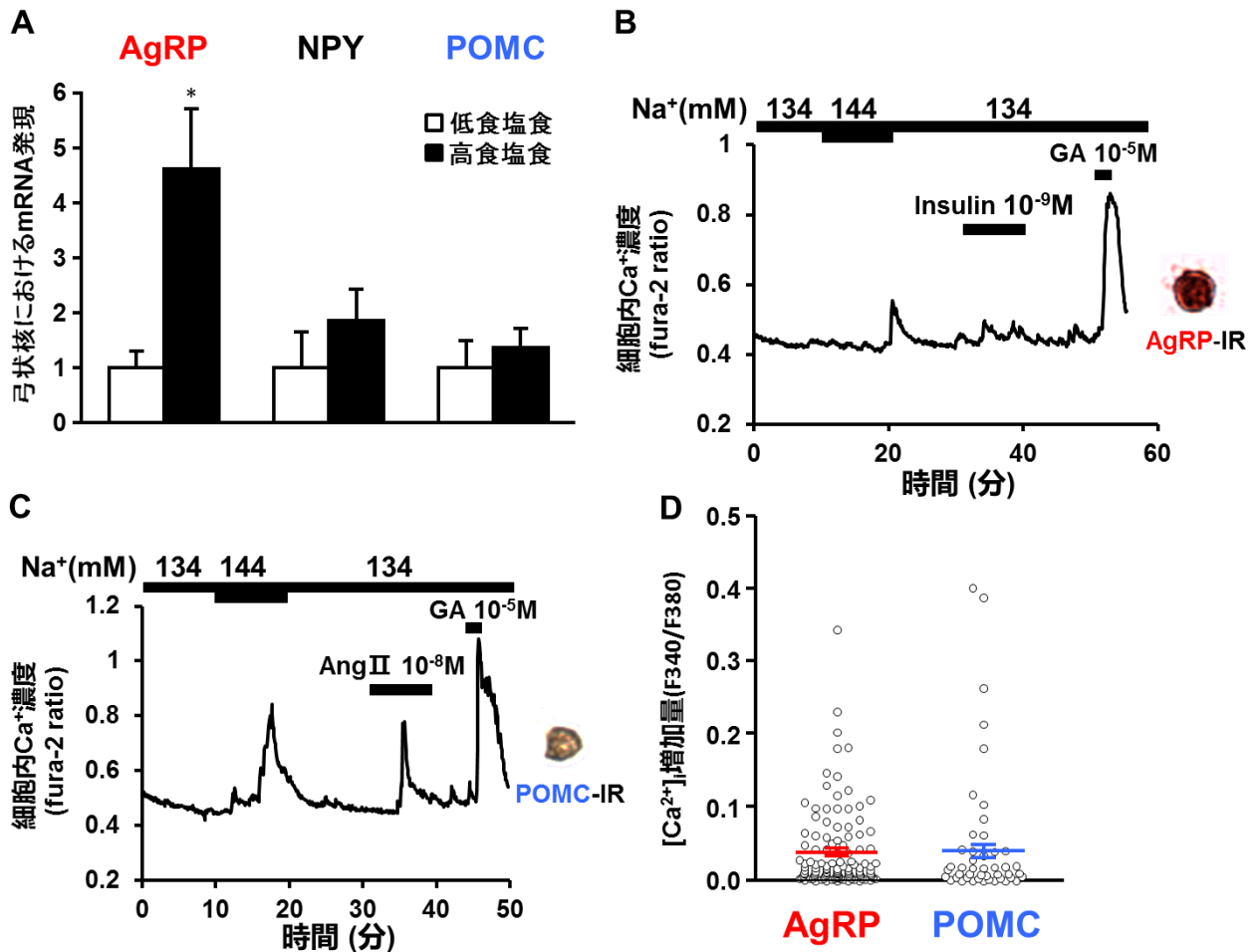


図 5.A, 低食塩食と高食塩食三週間の摂餌後、C57BL/6 の弓状核の AgRP、NPY と POMC の mRNA 発現。n=5,\*p<0.05。B-C,単離弓状核ニューロンの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定の典型例。そのニューロンは (右パネル)免疫細胞染色により、AgRP (B)と POMC (C)免疫陽性細胞を同定された。D, 全 AgRP ニューロン(赤)と POMC ニューロン (青)の細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 増加量の平均値。

### 3.6. 弓状核ニューロンの Na<sup>+</sup>感受性分子メカニズムの検討

10 mM マニトールの添加による浸透圧の増加は、約 17% の AgRP ニューロンの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を増加させた (図 6.A-B)。そこで、浸透圧感知に関連する TRPV1 の局在を蛍光免疫組織染色で解析したところ、TRPV1 陽性ニューロンが弓状核で観察された (図 6.C)。さらに、TRPV1 受容体アゴニストの *N*-Oleoyldopamine (OLDA) 添加は、AgRP ニューロンおよび POMC ニューロンの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を増加させた (図 6.D-E)。

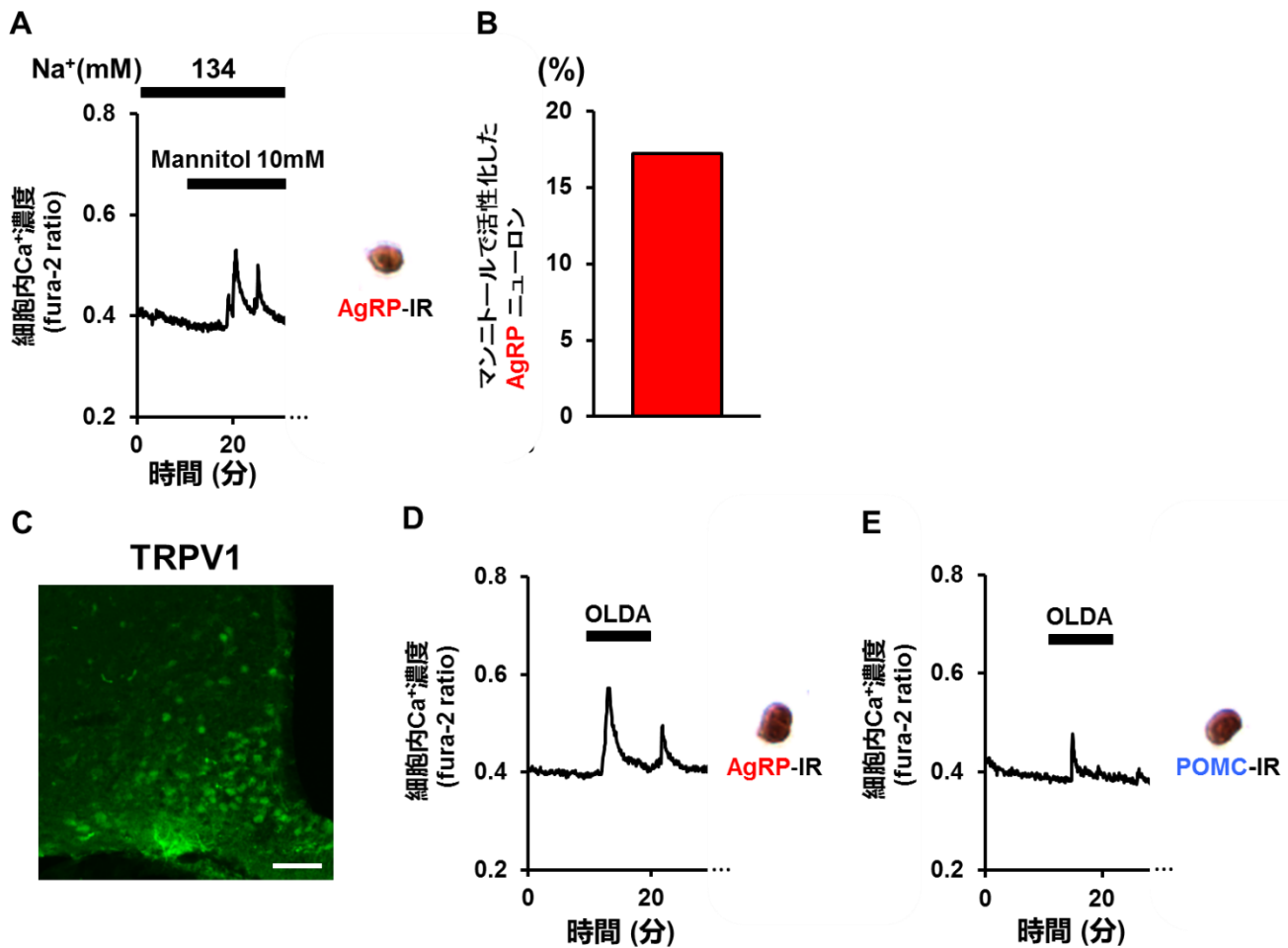


図 6.A, C57BL6/J マウスから単離した弓状核ニューロンの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定の典型例。測定ニューロンは (右パネル)免疫細胞染色により、AgRP 免疫陽性細胞と同定された。B, マニトールの添加で活性化した AgRP ニューロンの割合。C, C57BL6/J マウスの TRPV1 蛍光免疫組織染色。スケールバー;100 μm。D-E, 単離弓状核ニューロンの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定の典型例。そのニューロンは (右パネル)免疫細胞染色により、AgRP (D)と POMC (E)免疫陽性細胞を同定された。

### 3.7. TRPV1 KO マウスで弓状核ニューロンの Na<sup>+</sup>感受性の解析

次に、細胞外 Na<sup>+</sup>濃度増加による AgRP ニューロンおよび POMC ニューロンの活性化への TRPV1 チャンネルの関与を検討するために、TRPV1 KO マウスを用いて検討した。10mM 細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加は、TRPV1 KO マウスで約 6% の AgRP ニューロンの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を増加させた (図 7.A,C)。一方、TRPV1 KO マウスの POMC ニューロンは細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加に応答を示さなかった (図 7.B,D)。この結果から、POMC ニューロンの細胞外 Na<sup>+</sup>濃度応答は TRPV1 を介することが示唆された。

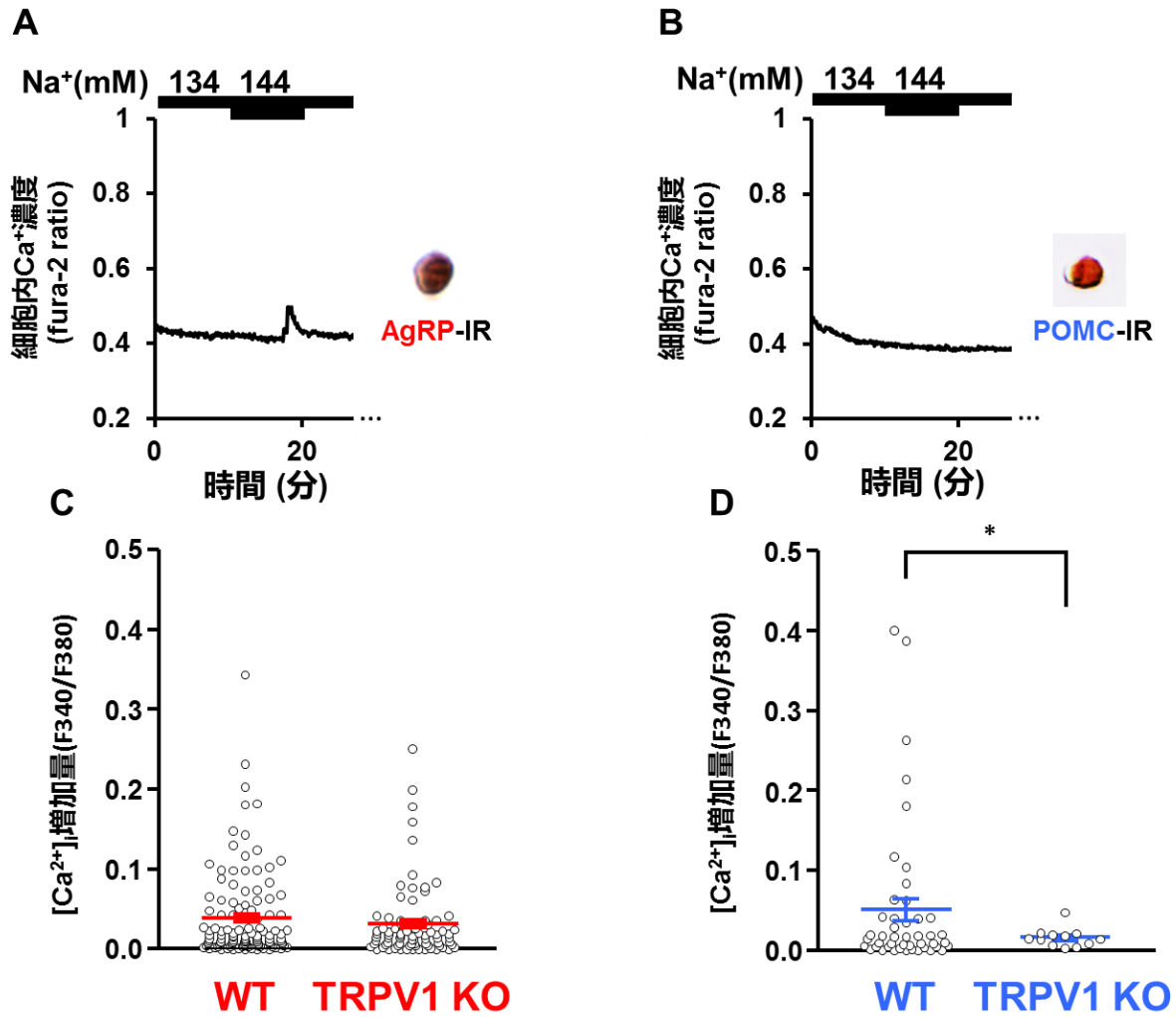


図 7.A-B, TRPV1 KO マウスから単離弓状核ニューロンの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定の典型例。そのニューロンは (右パネル)免疫細胞染色により、AgRP (A)または POMC (B)免疫陽性細胞を同定された。C-D, 野生マウスと TRPV1 KO マウスで全 AgRP (C)と POMC (D)ニューロンの細胞外 Na<sup>+</sup>濃度の増加による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加量の平均値。\*p < 0.05。

#### 4. 考察

近年、視床下部ニューロンは血圧を制御し(38)、交感神経活動の増加は肥満合併の高血圧を促進することが示唆されている(39,40)。本研究では  $PDK1^{AgRP-/-AgRP-/-}$  マウスは高食塩食摂餌により、交感神経系の亢進を伴い収縮期血圧が有意に上昇した。このことから、**AgRP** ニューロンの機能障害が交感神経系を介して高血圧を促進する可能性が示唆される。

$PDK1^{AgRP-/-AgRP-/-}$  マウスの室傍核では **NUCB2** の発現が有意に増加し、室傍核の **NUCB2** 発現をノックダウンすることで  $PDK1^{AgRP-/-AgRP-/-}$  マウスの **CRH** の mRNA 発現、ノルアドレナリン排泄量、収縮期血圧の上昇が抑制された。**Nesfatin-1** には摂食抑制作用に加え昇圧作用が報告されている(37,41-45)。**Nesfatin-1** の摂食抑制作用と昇圧作用は室傍核の **CRH** ニューロンを一部介すること、**Nesfatin-1** は **CRH** ニューロンを介して交感神経系を活性化すること報告されている(46-48)。**Nesfatin-1** ニューロンの神経活動はメラノコルチンシステムによって活性化され、**NPY** によって抑制される(36,49-50)。したがって、**AgRP** ニューロンは **Nesfatin-1** ニューロンを介し、交感神経系の活性調節とそれに引き続く血圧調節に関与していると示唆される。

**FoxO1** は細胞の成長、分化、代謝および寿命に関与する転写因子であり、**PDK1** によりリン酸化で転写活性が抑制される(51,52)。当研究室の前の研究で、 $PDK1^{AgRP-/-AgRP-/-}$  マウスの摂食および骨代謝異常は、ドミナントネガティブ **FoxO1** の発現で改善されることが報告されている(18,19)。しかしながら、 $PDK1^{AgRP-/-AgRP-/-}$  マウスの高食塩食摂餌による交感神経系の亢進および収縮期血圧の上昇は、ドミナントネガティブ **FoxO1** の発現で低減されることがなかつ



た。この結果は、AgRPニューロンのPDK1はFoxO1非依存性経路を介して、交感神経活動と収縮期血圧を調節していることを示唆している。今後、AgRPニューロンにおけるPDK1の下流シグナル伝達経路の解明が必要とされる。

本研究では、細胞外Na<sup>+</sup>濃度の増加はAgRPニューロンおよびPOMCニューロンを活性化することを観察した。一方、高食塩食摂餌では、弓状核でAgRPの発現が有意に増加したが、POMCの発現は変化しなかった。AgRPニューロンはPOMCニューロンをGABAやNPYを介して抑制することが報告されている(53-56)。つまり、生体では脳内の浸透圧上昇はAgRPニューロンおよびPOMCニューロンを同時に活性化するが、AgRPニューロンは昇圧作用を有するPOMCニューロンの活性化を抑制し、その結果として血圧上昇を抑制していると推察される。しかし、AgRPニューロンのPDK1の機能障害が起こると、POMCニューロンに対する抑制が解除され血圧が上昇すると推測される。

本研究では、細胞外Na<sup>+</sup>濃度の増加は、AgRPニューロンとPOMCニューロンを活性化した。しかしながら、TRPV1ノックアウトマウスではPOMCニューロンの細胞外Na<sup>+</sup>濃度応答だけが消失していた。この結果は、POMCニューロンのTRPV1は細胞外Na<sup>+</sup>濃度のセンサー分子であることが示唆している。一方、AgRPニューロンのNa<sup>+</sup>感受性機構へのTRPV1の関与は否定的である。AgRPニューロンは、過剰塩分摂取時の血圧の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されることから、AgRPニューロンのNa<sup>+</sup>感受性機構の解明は、メタボリックシンドロームにおける高血圧の病因解明の可能性につながると考えられ、今後さらなる研究が必要である。

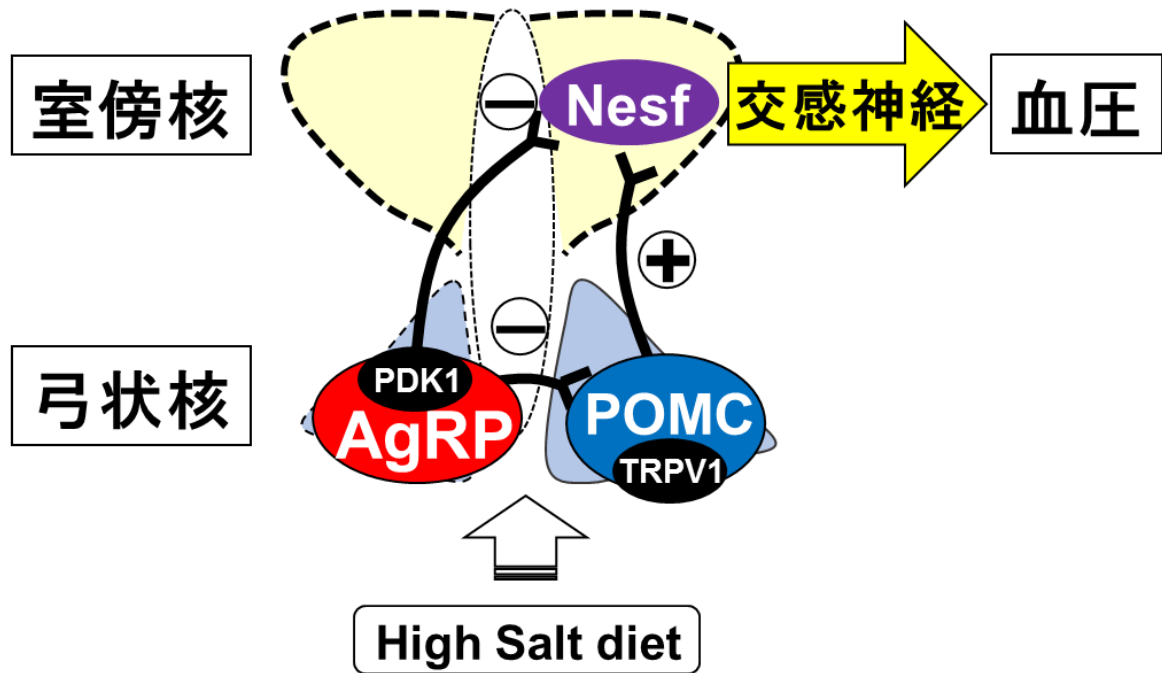


図 8. 食塩感受性高血圧の中樞のメカニズム。

脳内高濃度  $\text{Na}^+$  - AgRP ニューロン(PDK1) - Nesfatin-1 ニューロン - 交感神経、  
 脳内高濃度  $\text{Na}^+$  - POMC ニューロン(TRPV1) - Nesfatin-1 ニューロン - 交感神経  
 と脳内  $\text{Na}^+$  感受 - AgRP ニューロン - POMC ニューロンの神経回路は血圧に  
 調節作用である。

## 5. おわりに

本研究では、AgRPニューロンは細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度増加を応答することを示した。AgRPニューロンは室傍核 Nesfatin-1ニューロンを活性化による交感神経活性化を介して収縮期血圧を調節することが明らかになった。この成果は、弓状核ニューロンによる血圧調節の研究に寄与するものである。しかし、AgRPニューロンの細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度応答のメカニズムの解明には更なる研究の進展が必要である。

## 6. 謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、ご指導を賜りました循環器内科教授苅尾七臣先生，生理講座統合生理学部門前教授矢田俊彦に深く感謝致します。また、研究全般にわたりご指導を頂きました和歌山県立医科大学第二生理学講座の教授中田正範先生に深く感謝致します。最後に、終始支えて頂きました同教室の皆様のおかげ様で、本論文を書き終える事が出来た。この場を借りて、深く感謝致します。

## 8. 参考文献

1. Michael M. Ollmann, Brent D. Wilson, Ying-Kui Yang, Julie A. Kerns, Yanru Chen, Ira Gantz, Gregory S. Barsh.  
Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein.  
*Science*. 278(5335):135-138. 1997
2. Andrew R. Rau, Shane T. Hentges.  
The Relevance of AgRP Neuron-Derived GABA Inputs to POMC Neurons Differs for Spontaneous and Evoked Release.  
*J Neurosci*. 37(31):7362-7372. 2017
3. Michael A. Cowley, Nina Pronchuk, Wei Fan, Daniela M. Dinulescu, William F. Colmers, Roger D. Cone.  
Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat.  
*Neuron*. 24(1):155-163. 1999
4. Michael A. Cowley, James L. Smart, Marcelo Rubinstein, Marcelo G. Cerdán, Sabrina Diano, Tamas L. Horvath, Roger D. Cone, Malcolm J. Low.  
Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus.  
*Nature*. 411(6836):480-484. 2001
5. Giuseppe Mancina, Pascal Bousquet, Jean Luc Elghozi, Murray Esler, Guido Grassi, Stevo Julius, John Reid, Peter A Van Zwieten.  
The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome.  
*J Hypertens*. 25(5):909-920. 2007;
6. Georg Nickenig, Jörg Röling, Kerstin Strehlow, Petra Schnabel, Michael Böhm.  
Insulin induces upregulation of vascular receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms.  
*Circulation*. 98(22):2453-2460. 1998
7. G Andronico, M Mangano, L Ferrara, D Lamanna, G Mulé, G Cerasola.  
In vivo relationship between insulin and endothelin role of insulin-resistance.  
*J Hum Hypertens*. 11(1):63-66. 1997
8. K Tziomalos, V G Athyros, A Karagiannis, D P Mikhailidis.  
Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: Prevalence, pathogenesis and management.  
*Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 20(2): 140-146. 2010
9. Takehide Ogihara, Tomoichiro Asano, Toshiro Fujita.

- Contribution of salt intake to insulin resistance associated with hypertension.  
*Life Sci.* 73(5):509-523. 2003
10. Christian K. Roberts, Andrea L. Hevener, R. James Barnard.  
Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training.  
*Compr Physiol.* 3(1): 1–58. 2013
11. Silvana Obici, Zhaohui Feng, George Karkaniyas, Denis G Baskin, Luciano Rossetti.  
Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats.  
*Nat Neurosci.* 5(6):566-572. 2002
12. Qing Shu, Li Chen, Song Wu, Jia Li, Jianmin Liu, Ling Xiao, Rui Chen, Fengxia Liang.  
Acupuncture Targeting SIRT1 in the Hypothalamic Arcuate Nucleus Can Improve Obesity in High-Fat-Diet-Induced Rats with Insulin Resistance via an Anorectic Effect.  
*Obes Facts.* 13(1):40-57. 2020
13. Hiraku Ono.  
Molecular Mechanisms of Hypothalamic Insulin Resistance.  
*Int J Mol Sci.* 20(6):1317. 2019
14. Ellen L. Air, Mathias Z. Strowski, Stephen C. Benoit, Stacey L. Conarello, Gino M. Salituro, Xiao-Ming Guan, Kun Liu, Stephen C. Woods, Bei B. Zhang.  
Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity.  
*Nat Med.* 8(2):179-183. 2002
15. Hideyuki Sasanuma, Masanori Nakata, Kumari Parmila, Jun Nakae, Toshihiko Yada.  
PDK1-FoxO1 pathway in AgRP neurons of arcuate nucleus promotes bone formation via GHRH-GH-IGF1 axis.  
*Mol Metab.* 6(5): 428–439. 2017
16. Priscila A. Cassaglia, Sam M. Hermes, Sue A. Aicher, Virginia L. Brooks.  
Insulin acts in the arcuate nucleus to increase lumbar sympathetic nerve activity and baroreflex function in rats.  
*J Physiol.* 589(Pt 7):1643-1662. 2011
17. Jingwei Jiang, Donald A Morgan, Huxing Cui, Kamal Rahmouni.  
Activation of hypothalamic AgRP and POMC neurons evokes disparate sympathetic and cardiovascular responses.

18. Yongheng Cao, Masanori Nakata, Shiki Okamoto, Eisuke Takano, Toshihiko Yada, Yasuhiko Minokoshi, Yukio Hirata, Kazunori Nakajima, Kristy Iskandar, Yoshitake Hayashi, Wataru Ogawa, Gregory S Barsh, Hiroshi Hosoda, Kenji Kangawa, Hiroshi Itoh, Tetsuo Noda, Masato Kasuga, Jun Nakae.  
PDK1-Foxo1 in agouti-related peptide neurons regulates energy homeostasis by modulating food intake and energy expenditure.  
*PLoS One.* 6(4):e18324. 2011

19. Hideyuki Sasanuma, Masanori Nakata, Kumari Parmila, Jun Nakae, Toshihiko Yada.  
PDK1-FoxO1 pathway in AgRP neurons of arcuate nucleus promotes bone formation via GHRH-GH-IGF1 axis.  
*Mol Metab.* 6(5):428-439. 2017

20. 後藤 英司  
本態性高血圧患者における脳脊髄液ナトリウム濃度と血圧食塩依存群と非依存群の比較。  
*日本内科学会雑誌*. 71 巻 11 号 p.1528-1533.1982 年

21. Paula Magalhães Gomes, Renato Willian Martins Sá, Giovana Lopes Aguiar, Milede Hanner Saraiva Paes, Andréia Carvalho Alzamora, Wanderson Geraldo Lima, Lisandra Brandino de Oliveira, Sean David Stocker, Vagner Roberto Antunes, Leonardo M. Cardosocorresponding author.  
Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats.  
*Sci Rep.* 7: 5655. 2017

22. Bing S Huang, Bruce N Van Vliet, Frans H H Leenen.  
Increases in CSF [Na<sup>+</sup>] precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet.  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(3):H1160-1166. 2004

23. Masaharu Noda, Hiraki Sakuta.  
Central regulation of body-fluid homeostasis.  
*Trends Neurosci.* 36(11):661-673. 2013

24. Michael J. Caterina, Abba Leffler, Annika B. Malmberg, Martin William J, Jodie A. Trafton, Petersen-Zeitz Karla R, Martin Koltzenburg, Allan I. Basbaum, David Julius.  
Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.  
*Science.* 288(5464):306-313. 2000

25. Shuang-Quan Yu, Shuangtao Ma, Donna H Wang.  
TRPV1 Activation Prevents Renal Ischemia-Reperfusion Injury-Induced Increase in Salt Sensitivity by Suppressing Renal Sympathetic Nerve Activity.  
*Curr Hypertens Rev.* 16(2):148–155. 2019
26. Shuang-Quan Yu, Shuangtao Ma, Donna H Wang.  
Selective ablation of TRPV1 by intrathecal injection of resiniferatoxin in rats increases renal sympathoexcitatory responses and salt sensitivity.  
*Hypertens Res.* 41(9):679-690. 2018
27. Allison Wanting Xu, Christopher B. Kaelin, Gregory J. Morton, Kayoko Ogimoto, Kimber Stanhope, James Graham, Denis G. Baskin, Peter Havel, Michael W. Schwartz, Gregory S. Barsh.  
Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance.  
*PLoS Biol.* 3(12):e415. 2005
28. Hiroshi Inoue, Wataru Ogawa, Akihiro Asakawa, Yasuo Okamoto, Akihiko Nishizawa, Michihiro Matsumoto, Kiyoshi Teshigawara, Yasushi Matsuki, Eijiro Watanabe, Ryuji Hiramatsu, Kenji Notohara, Koji Katayose, Hitoshi Okamura, C Ronald Kahn, Tetsuo Noda, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Akio Inui, Masato Kasuga  
Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production.  
*Cell Metab.* 3(4):267-275. 2006
29. Kristy Iskandar, Yongheng Cao, Yoshitake Hayashi, Masanori Nakata, Eisuke Takano, Toshihiko Yada, Changliang Zhang, Wataru Ogawa, Miyo Oki, Streamson Chua Jr, Hiroshi Itoh, Tetsuo Noda, Masato Kasuga, Jun Nakae.  
PDK-1/Foxo1 pathway in POMC neurons regulates Pomc expression and food intake.  
*Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(4):E787-798.2010
30. Yuka Nidegawa-Saitoh, Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Peter S. Reinach, Kathleen C. Flanders, Chia-Yang Liu, Osamu Yamanaka, Winston Whei-Yang Kao, Shizuya Saika.  
Impaired healing of cornea incision injury in a TRPV1-deficient mouse.  
*Cell Tissue Res.* 374(2):329-338. 2018
31. Gantulga Darambazar, Masanori Nakata, Takashi Okada, Lei Wang, EnXu Li, Atsumi Shinozaki, Megumi Motoshima, Masatomo Mori, Toshihiko Yada.  
Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 456 (4): 913-918.2015
32. Masanori Nakata, Darambazar Gantulga, Putra Santoso, Boyang Zhang, Chiaki Masuda, Masatomo Mori, Takashi Okada, Toshihiko Yada.  
Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 supports oxytocin and vasopressin neurons to



control feeding behavior and fluid balance in male mice.

*Endocrinology*. 157 (6):2322-2332.2016

33. Shigeyasu Tanaka, Kazumasa Kurosumi.

A certain step of proteolytic processing of proopiomelanocortin occurs during the transition between two distinct stages of secretory granule maturation in rat anterior pituitary corticotrophs.

*Endocrinology*. 131(2):779-786. 1992

34. Zhigang Shi, Christopher J Madden, Virginia L Brooks.

Arcuate neuropeptide Y inhibits sympathetic nerve activity via multiple neuropathways.

*J Clin Invest*. 127(7):2868-2880.2017

35. Li P, Cui BP, Zhang LL, Sun HJ, Liu TY, Zhu GQ.

Melanocortin 3/4 receptors in paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow and blood pressure.

*Exp Physiol*. 98(2):435-443. 2013

36. Shinsuke Oh-I, Hiroyuki Shimizu, Tetsuro Satoh, Shuichi Okada, Sachika Adachi, Kinji Inoue, Hiroshi Eguchi, Masanori Yamamoto, Toshihiro Imaki, Koushi Hashimoto, Takafumi Tsuchiya, Tsuyoshi Monden, Kazuhiko Horiguchi, Masanobu Yamada, Masatomo Mori.

Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus.

*Nature*. 443(7112):709-712. 2006

37. Gina L. C. Yosten, Willis K. Samson.

Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system.

*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 297(2):R330-336. 2009

38. Hugh E. De Wardener.

The hypothalamus and hypertension.

*Physiol Rev*. 81(4):1599-1658.2001

39. John E. Hall, Drew A. Hildebrandt, Jay Kuo.

Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system.

*Am J Hypertens*. 14(6 Pt 2):103S-115S.2001

40. Kamal Rahmouni, William G Haynes.

Leptin and the central neural mechanisms of obesity hypertension.

*Drugs Today (Barc)*. 38(12):807-817. 2002

41. Natsu Yoshida, Yuko Maejima, Udval Sedbazar, Akihiko Ando, Hideharu

Kurita, Boldbaatar Damdindorj, Eisuke Takano, Darambazar Gantulga, Yusaku Iwasaki, Tomoyuki Kurashina, Tatsushi Onaka, Katsuya Dezaki, Masanori Nakata, Masatomo Mori, Toshihiko Yada.  
Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis.  
*Aging (Albany NY)*. 2(11):775-784. 2010

42. Yuko Maejima, Udval Sedbazar, Shigetomo Suyama, Daisuke Kohno, Tatsushi Onaka, Eisuke Takano, Natsu Yoshida, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Ken Fujiwara, Takashi Yashiro, Tamas L Horvath, Marcelo O Dietrich, Shigeyasu Tanaka, Katsuya Dezaki, Shinsuke Oh-I, Koushi Hashimoto, Hiroyuki Shimizu, Masanori Nakata, Masatomo Mori, Toshihiko Yada.  
Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway.  
*Cell Metabol*. 10(5):355-365. 2009

43. Gina L. C. Yosten, Willis K Samson.  
The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 298(6):R1642-1647. 2010

44. Andreas Stengel, Miriam Goebel, Lixin Wang, Jean Rivier, Peter Kobelt, Hubert Mönnikes, Nils W G Lambrecht, Yvette Taché.  
Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor.  
*Endocrinology*. 150(11):4911-4919. 2009

45. Koro Gotoh, Takayuki Masaki, Seiichi Chiba, Hisae Ando, Takanobu Shimasaki, Kimihiko Mitsutomi, Kansuke Fujiwara, Isao Katsuragi, Tetsuya Kakuma, Toshiie Sakata, Hironobu Yoshimatsu.  
Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior  
*J Neurochem*. 124(1):90-99.2013

46. Gina L. C. Yosten, Willis K Samson.  
Neural circuitry underlying the central hypertensive action of nesfatin-1: melanocortins, corticotropin-releasing hormone, and oxytocin.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 306(10):R722-727.2014

47. Mamoru Tanida, Hitoshi Gotoh, Naoki Yamamoto, Mofei Wang, Yuhichi Kuda, Yasutaka Kurata, Masatomo Mori, Toshishige Shibamoto.  
Hypothalamic Nesfatin-1 stimulates sympathetic nerve activity via hypothalamic ERK signaling.  
*Diabetes*. 64(11):3725-3736.2015

48. Mustafa Sertac Yilmaz, Burcin Altinbas, Gokcen Guvenc, Leman Gizem Erkan, Ozge Avsar, Vahide Savci, Duygu Udum Kucuksen, Ilker Arican, Murat Yalcin  
The role of centrally injected nesfatin-1 on cardiovascular regulation in normotensive and hypotensive rats.  
*Auton Neurosci.* 193:63-68.2015
49. Huxing Cui, Jong-Woo Sohn, Laurent Gautron, Hisayuki Funahashi, Kevin W Williams, Joel K Elmquist, Michael Lutter.  
Neuroanatomy of melanocortin-4 receptor pathway in the lateral hypothalamic area.  
*J Comp Neurol.* 520(18):4168-4183. 2012
50. Udval Sedbazar, Enkh-Amar Ayush, Yuko Maejima, Toshihiko Yada.  
Neuropeptide Y and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone reciprocally regulate nesfatin-1 neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.  
*Neuroreport.* 25(18):1453-1458.2014
51. Domenico Accili, Karen C. Arden.  
FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation.  
*Cell.* 117(4):421-426. 2004
52. Xiaocheng C Dong, Kyle D. Copps, Shaodong Guo, Yedan Li, Ramya Kollipara, Ronald A DePinho, Morris F White.  
Inactivation of hepatic FoxO1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation.  
*Cell Metabol.* 8(1):65-76.2008
53. Roger D. Cone.  
Anatomy and regulation of the central melanocortin system.  
*Nat Neurosci.* 8(5):571-578. 2005
54. Qingchun Tong, Chian-Ping Ye, Juli E Jones, Joel K. Elmquist, Bradford B. Lowell.  
Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance.  
*Nat Neurosci.* 11(9):998-1000. 2008
55. Lori M. Zeltser, Randy J. Seeley, Matthias H. Tschöp.  
Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance.  
*Nat Neurosci.* 15(10):1336-1342. 2012
56. Danaé Nuzzaci, Amélie Laderrière, Aleth Lemoine, Emmanuelle Nédélec, Luc Pénicaud, Caroline Rigault, Alexandre Benani.  
Plasticity of the Melanocortin System: Determinants and Possible Consequences on Food Intake.

