

氏名	張 博 洋
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 636 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	食塩感受性高血圧の中樞性成因の解析
論文審査委員	(委員長) 石橋 俊 教授 (委員) 尾仲 達史 教授 原 一雄 教授

論文内容の要旨

1 研究目的

摂食・エネルギー代謝の中樞は視床下部にあり、特に弓状核は、全身の栄養・代謝状態を感知する一次中樞である。弓状核には摂食亢進系の Agouti-related peptide (AgRP)ニューロンと摂食抑制系の Proopiomelanocortin (POMC)ニューロンが存在しており、両ニューロンの神経活動のバランスが摂食行動とエネルギー代謝の恒常性を維持している。メタボリックシンドロームの中樞性病因として両ニューロンのインスリン抵抗性が注目されている。近年、AgRP ニューロンは血圧調節にも関与する事が報告されている。そこで、本研究では AgRP ニューロンのインスリン抵抗性が、高血圧に関連するかを検討した。

2 研究方法

実験動物

PDK1 はインスリンの主要なシグナル伝達分子であり、Foxo1 はその下流の転写因子である。そこで AgRP Cre マウスと PDK1^{flox/flox} マウスを交配し AgRP Cre / PDK1^{flox/flox} マウス(AgRP PDK1^{ff} マウス)を作成し、実験に用いた。FoxO1 は PDK1 により抑制される転写因子であることから、ドミナントネガティブ FoxO1 を発現する AgRP Δ256Foxo1 マウスと AgRP PDK1^{ff} マウスと交配し AgRP PDK1^{ff} Δ256Foxo1 マウスを作成し、実験に用いた。さらに、C57BL/6 マウスと Trpv1-null (Trpv1 KO) マウスを実験に用いた。実験には全て雄性マウスを用い、自治医科大学と和歌山県立医科大学の動物実験委員会と遺伝子組換え実験委員会で承認され、動物実験指針に従って実験を行った。

血圧と脈拍の測定

AgRP Cre マウスと AgRP PDK1^{ff} マウスは、低食塩食一週間の摂餌後に高食塩食一週間の摂餌し、テールカフ法により麻酔なしで収縮期血圧の測定を行った。

循環関連ホルモンとカテコールアミンの測定

血中アルドステロン、ANPとAVPの濃度は酵素免疫測定法で測定された。マウス代謝ケージで一日蓄尿後、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で測定を行った。

NUCB2 shRNA AAVウイルスベクターの室傍核への局所投与

マウスAAV-NUCB2-shRNA AAVウイルスベクターのターゲット配列は5'-GGATCATCCAAGT

ACAGTA-3'を、対照のスクランブル配列は5'-CAACACTAGTTGACATGTA-3'を用い作製した。AAVウイルスベクターはAgRP PDK1^{fl} マウスの両側室傍核に局所投与を行った。

Real-time RT-PCR分析

高食塩食一週間の摂餌後、AgRP CreとAgRP PDK1^{fl}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を用いtotal RNAの抽出を行った。RQ1-DNaseで処理後にFirst-strand cDNAの合成を行った。mRNA発現レベルはGAPDHを用い $\Delta\Delta$ CT法にて定量を行った。

免疫組織染色

4%PFAで灌流固定後、30 μ mの凍結脳冠状断スライス切片の作成を行った。TRPV1の免疫染色は、TRPV1をウサギ抗TRPV1抗体とAlexa488標識ヤギ抗ウサギ抗体で染色を行った。

蛍光画像解析による細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)の測定

5週齢マウスの弓状核ニューロンを単離し、Ca²⁺感受性蛍光色素はFura-2/AM用い Aquacosmos システムを用いて解析を行った。[Ca²⁺]_i測定後、ウサギ抗 AgRP 抗体または POMC 抗体を用い細胞免疫染色を行った。染色によりニューロンの同定を行った

3 研究成果

高食塩食一週間の摂餌後、AgRP PDK1^{fl}マウスは AgRP Cre マウスに比べ収縮期血圧が有意に上昇した。一方、両マウス間の食物摂取量と水分摂取量は有意差がなかった。

高食塩食一週間の摂餌後、AgRP PDK1^{fl}マウスと AgRP Cre マウスの血中アルドステロン、ANP と AVP 濃度は有意差がなかった。一方、AgRP PDK1^{fl}マウスのノルアドレナリンとアドレナリン排泄量が有意に増加した。

高食塩食一週間の摂餌後、AgRP PDK1^{fl}マウスにおける NUCB2 の mRNA 発現が有意に増加していた。AAV-NUCB2-shRNA を室傍核へ投与により、高食塩食一週間の摂餌後の AgRP PDK1^{fl}マウスの収縮期血圧の上昇とノルアドレナリン排泄量の上昇が抑制された。

高食塩食一週間の摂餌後、AgRP PDK1^{fl} Δ 256Foxo1 マウスの収縮期血圧は AgRP PDK1^{fl}マウスと同様に上昇し、ノルアドレナリン排泄量は抑制されなかった。

高食塩食三週間の摂餌後のマウスの弓状核では AgRP の mRNA 発現が有意に増加していた。細胞外 Na⁺濃度の増加により、AgRP ニューロンおよび POMC ニューロンの一群が活性化された。両ニューロン間で、[Ca²⁺]_iの増加量は有意差がなかった。

TRPV1 陽性ニューロンが弓状核で観察された。さらに、TRPV1 受容体アゴニスト添加は、AgRP ニューロンと POMC ニューロンの[Ca²⁺]_iを増加させた。

細胞外 Na⁺濃度の増加は、TRPV1 KO マウスの AgRP ニューロンの[Ca²⁺]_iを増加させた。一方、細胞外 Na⁺濃度の増加に応答する POMC ニューロンは観察されなかった。

4 考察

本研究では AgRP PDK1^{fl}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。さらに、AgRP PDK1^{fl}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 AgRP PDK1^{fl}マウスの血圧上昇は抑制された。このことから、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。

当研究室の前の研究で、AgRPニューロンのPDK1はFoxO1依存性経路を介して、摂食および骨代謝を調節している事が分かっている。しかしながら、AgRP PDK1^{fl}マウスの高食塩食摂餌による血圧の上昇は、ドミナントネガティブ FoxO1 の発現で低減されることはなかった。つまり、AgRPニューロンのPDK1はFoxO1非依存性経路により血圧を調節していることを示唆しており、PDK1の下流シグナル伝達経路の解明が必要である。

本研究では、細胞外 Na⁺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⁺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⁺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⁺感受性機構へのTRPV1の関与は否定的である。しかし、本研究で、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たことから、AgRPニューロンの Na⁺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、さらなる研究が必要である。

5 結論

本研究では、AgRPニューロンは細胞外 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 Na⁺濃度応答のメカニズムの解明には更なる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

インスリン抵抗性に高血圧は合併しやすいが、相互の関連性の機序は不明である。栄養代謝摂食を制御する視床下部のインスリン抵抗性が血圧上昇に寄与する可能性がある。そこで、弓状核に豊富に存在する AgRPニューロンのインスリン抵抗性モデルである AgRPニューロン特異的な PDK1欠損マウス(PDK1^{AgRP-/AgRP-})を Cre-loxP 技術を用いて作成し、高食塩食投与時の血圧を検討した。

1週間の高食塩食(8%)摂餌後に PDK1^{AgRP-/AgRP-}の収縮期血圧は AgRPCre マウスに比して有意に上昇した。この時、血中アルドステロン、ANP、AVP 濃度には差を認めなかったが、ノルアドレナリンとアドレナリンの尿中排泄量は有意に増加した。NUCB2 mRNA 発現が有意に増加し、AAV-NUCB2-shRNA で NUCB2 をノックダウンすると、血圧上昇、カテコラミンの尿中排泄量の上昇は抑制された。PDK1^{AgRP-/AgRP-}Δ256Foxo1 マウスの血圧とカテコラミンの尿中排泄量は PDK1^{AgRP-/AgRP-}と同様であり、Foxo1 の関与は否定的である。3週間の高食塩食によって弓状核の AgRP の mRNA 発現が増加した。細胞外 Na⁺濃度を 134 mEq から 144 mEq に増加させると、AgRPニューロンの 13%、POMCニューロンの 4%の[Ca²⁺]_iが増加した。2種類のニューロン間で[Ca²⁺]_i増加幅に差はなかった。

10 mM マニトールで AgRPニューロンの[Ca²⁺]_iが増加した。

弓状核には TRPV1陽性細胞が存在した。TRPV1受容体アゴニスト OLDA 添加で AgRPニューロンと POMCニューロンの[Ca²⁺]_iが増加した。細胞外 Na⁺濃度を 134 mEq から 144 mEq に増加させると TRPV1KO マウス由来の AgRPニューロンでは[Ca²⁺]_iが増加したが、POMCニューロンでは増加しなかつ

た。

以上の結果から申請者は、細胞外 Na^+ 濃度増加に対して AgRP ニューロンは反応し、室傍核の Nesfatin-1 ニューロンの活性化を介して交感神経活性化をきたし、収縮期血圧を上昇されると考えた。細胞外 Na^+ 濃度増加のセンサーとして TRPV1 を仮定したが、TRPV1KO では POMC ニューロンの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加しか低下しせず、AgRP ニューロンの細胞外 Na^+ 濃度増加のセンサーは TRPV1 以外の分子が想定された。

AgRP ニューロンのインスリンシグナルと食塩感受性血圧との関係や、細胞外 Na^+ 濃度増加センサーとしての POMC ニューロンの TRPV1 の意義は新規性の高い知見である。

委員から以下の指摘があった： 1) 高食塩食負荷後の血中・脳脊髄液中の Na^+ 濃度、 2) 遺伝型データが未提示、 3) AgRP ニューロンの活動性、 4) 研究背景の丁寧な記載、 5) その他の表現上の問題。

以上の指摘に対し適正に改訂がなされたため、博士論文として合格であると評価した。

最終試験の結果の要旨

- ・申請者の発表は研究の背景・目的・方法・結果・考察について必要十分な説明があった。
- ・食塩感受性高血圧における AgRP ニューロンのインスリンシグナルの意義、細胞外 Na^+ 濃度増加センサーとしての POMC ニューロン TRPV1 の意義等の命題は継続して探求されるべき重要な課題であり、今回の論文で不足したデータ採取等についても明確に示された。
- ・審査員からの質疑についてその内容を正しく理解し、適切に応答できた。
- ・研究に関連する周辺領域の知識は十分である。
- ・以上から、申請者の研究能力及び科学的素養・態度は学位に値するものと全員一致で評価した。