Thesis

# ラットの視床下部内側基底部 PTENは 摂食とは独立して肝インスリン抵抗性を調節する

## 臨床医学研究系 内科学 内分泌内科・糖尿病内科

住田 崇

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10) はホスファチジルイノシ トール3, 4, 5-三リン酸を脱リン酸化しPI3キナーゼに拮抗する. インスリンは視床下部内側基底部 に作用し, 摂食抑制や体重増加を抑制するだけではなく, PI3キナーゼの活性化を介して糖代謝 を改善する作用もある. そのため, 視床下部 PTENを抑制することは肥満および糖尿病の治療に つながる可能性がある. しかし, 視床下部内側基底部のニューロン特異的に PTENを欠損させた研究 からは予想とは逆の結果が報告されており, また出生後に視床下部 PTENに介入した報告はない. 当研究では, 視床下部 PTENの出生後の修飾が摂食および糖代謝にどのように影響するのかを明らか にするため, ラットの視床下部内側基底部のPTEN活性を外来性ベクターにより変化させた.

視床下部内側基底部 PTENを抑制すると摂食量と体重が減った.一方,同部位で恒常的に PTENを 活性化すると逆の結果が得られた.興味深いことに,視床下部内側基底部 PTENに介入したときの この作用は高脂肪食負荷により無くなってしまった.しかし,視床下部内側基底部 PTENの抑制を することで,高脂肪食負荷の条件でも肝インスリン感受性は改善した.他方で,視床下部内側基底部 PTENの恒常活性化でインスリン抵抗性が惹起された.視床下部内側基底部 PTENの介入により肝 Akt リン酸化とG6Pase 発現量は双方向に変化した.

これらの結果は視床下部内側基底部のPTENは摂食や体重増加の作用とは独立して, 肝インスリン 感受性を調節することを示す. そのため視床下部 PTENは過栄養状態の下でもインスリン抵抗性治療 の標的として期待できる.

## 緒言

肥満や2型糖尿病で苦しんでいる人々の数は世 界中で増加している. これらの病態はインスリン 抵抗性と密接に結びついている. 末梢のインス リン感受性組織でインスリンは主にPI3キナーゼ の活性化を介して糖代謝を調節している<sup>1)</sup>. イン スリンにより刺激されると, PI3キナーゼは ホスファチジルイノシトール3, 4, 5-三リン酸 (PIP3) を細胞膜で産生する. 次いでPIP3は下流シグナ ルカスケードを起動し, 最終的に筋肉や脂肪組織 でのブドウ糖取り込みを増強し, 肝糖産生を抑制 する. Phosphatase and tensin homolog deleted on choromosome 10 (PTEN) はPIP3を脱リン酸化しPI3 キナーゼに拮抗することで知られている脱リン酸化 酵素である<sup>2)</sup>. 従って, PTENの阻害によりインスリン

医学博士 甲第1262号 平成26年3月28日(埼玉医科大学) ○著者は本学位論文の研究内容について他者との利害関係を有しません. 抵抗性と糖尿病が改善する可能性があるため, PTEN は治療の標的になることが示唆される. 実際, 生後 と同様に遺伝的にPTENを阻害しても筋肉<sup>3)</sup>, 脂肪 組織<sup>4,5</sup>, 肝臓<sup>5,6)</sup>でインスリン感受性が増強している と報告されている.

最近,脳はエネルギー代謝と糖代謝の調節を行う 新しいインスリンの標的として注目されている.イン スリンの脳室内注入は摂食を抑制することが示さ れている<sup>7)</sup>.マウスのニューロンのインスリン受容 体欠損は肥満やインスリン抵抗性になる<sup>8)</sup>.さらに, 中枢神経系でインスリンは迷走神経を介して肝臓の糖 新生を抑制するなどのいくつかの機序を経て末梢の インスリン感受性を間接的に改善する<sup>9-11)</sup>.脳定位固 定術や神経プロモーター特異的遺伝子マウスモデル などを使用した多数の研究の結果,弓状核をその大部 分に含む視床下部内側基底部が,インスリンがエネル ギー代謝や糖代謝を介在するための脳内の最も重要な 部位の一つであると明らかにされた<sup>10,12-15</sup>. 末梢のインスリン感受性組織と同様,PI3キナーゼ は視床下部でも主要な役割をしているとの報告が ある.インスリンのみならずレプチンも視床下部で PI3キナーゼを活性化しPIP3を増加させることが報告 された<sup>16</sup>.PI3キナーゼの遺伝子組み換え実験<sup>17)</sup>や脳 室内にPI3キナーゼ阻害薬を注入した研究<sup>18,19</sup>により, 視床下部PI3キナーゼ活性は摂食や体重増加を抑制 することが明らかにされた.従って主要なPI3キナー ゼのアンタゴニストであるPTENは中枢神経系におい ても肥満やインスリン抵抗性の治療の標的になりうる ことが推測される.

しかしながら、視床下部PTENのCre-loxP系を 使った遺伝的介入によると、必ずしもこの仮説に一致 しない<sup>20)</sup>.最も予想外なことに,視床下部内側基底 部の弓状核にあり、インスリンやレプチンの情報を 受け取って摂食抑制を司ると考えられているプロピ オメラノコルチン (POMC) 陽性ニューロンでPTEN を欠損させると, 逆説的に過食と肥満, インスリン 抵抗性を誘導した<sup>21)</sup>. レプチン受容体発現ニューロン でPTENを欠損させると有意な摂取量の変化なしで脂 肪分化転換による痩せを誘導した<sup>22)</sup>.他方では、レプ チン受容体発現ニューロンで野生型 PTENを胎生期 から過剰発現させた実験では、肥満や肝インスリン シグナルへの影響なしに脂肪肝を誘導し、やや摂食 を減少させた<sup>23)</sup>. プロモーター特異的遺伝子組み換え PTENを使ったこれらの研究はニューロン集団特異的 に PTENの役割を研究するのには優れているが、それ らの表現型は胎生期の影響が否定できない. 実際,他 の報告で視床下部でのPTENの遺伝的欠損は発育異 常を来すこと<sup>24, 25)</sup>, PTENは神経発生に主要な役割を 果たすこと<sup>26)</sup>が報告されている.さらに、視床下部 はいろいろな種類の細胞から構成されているため, 薬物治療によってPTENを調節した場合の総合的な 効果はニューロンのサブポピュレーション特異的欠損 モデルを使用することでは評価出来ない.

視床下部 PTENが肥満や糖尿病の治療標的になり 得るかを解明するため,生後の成熟した個体における 視床下部 PTENへの介入がエネルギー代謝や糖代謝に どのように影響するかを研究することが重要である. 私の知る限りでは今まで成熟個体で視床下部 PTENを 標的にした実験は報告されていない.成熟したラット で双方向に PTENの活性を変化させるために,視床下 部内側基底部に競合阻害型もしくは恒常活性型 PTEN を発現するベクターを注入し,この重要な脳の部位に おける PTENの機能を研究した.

## 方 法

#### 動物実験

体重270-320 gのオスのSprague-Dawleyラット (Tokyo Laboratory Animals Science Co., Ltd., Japan)

を使用した. ラットは個々のケージにおいて標準の明 暗周期の中で飼育し,通常食(3.59 kcal/g, Oriental Yeast Co., Ltd., Japan) を与えた. 高脂肪食の実験では, 通常食はベクター注入後に中止し,高脂肪食(通常食 に10%ラードを加えたもの, 4.85 kcal/g) に置換した. 摂食量と体重はベクター注入前3日からベクター投与 後14日まで測定した. 恒常活性型 PTEN (myr-PTEN; CA-PTEN), 競合阻害型PTEN (myr-C124S-PTEN; DN-PTEN) もしくはコントロールのLacZを発現する pAdxCAwt内のCAGプロモーター下流に外来性発 現蛋白のcDNAを組み込んだ発現ベクターを、5.4× 10<sup>8</sup> pfuの濃度でカニューレガイド下で視床下部内側基 底部に左右対照に注入した. すべての動物実験は埼玉 医科大学およびアルバートアインシュタイン医科大学 の組み換えDNA実験委員会および動物実験委員会の 承認を得た.

#### インスリン測定とインスリン負荷試験

血漿インスリン濃度は摂食試験ではMercodia Ultrasensitive Rat Insulin ELISA (Mercodia, Sweden) を用いて,高インスリン血症正常血糖クランプでは Mercodia Rat/Human Insulin ELISA kitを用いて製造 元のプロトコールに従い測定した.インスリン感受性 試験は5時間絶食後にインスリン負荷試験を行い測定 した.この実験はベクター投与後8日後に施行した. インスリン(ノボリンR, Novo Nordisk, Denmark)の 腹腔内注射を行い0,15,30,45分後の血糖値を簡易血 糖測定器 (Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., Japan) を用いて測定した.

#### 組織処理とウエスタンブロット分析

視床下部内側基底部にベクターが注入されてい るか確認するために, LacZのベクターを注入した 脳ブロックをLacZ 染色キット(InvivoGen, CA, USA) を使用して製造元の説明に従いLacZを特異的に 染色した. ウエスタンブロット分析をするために, 楔状型の視床下部内側基底部と肝臓を50 mMトリス, 110 mM 塩化ナトリウム, 40 mM フッ化ナトリウム, 20 mM β-グリセロリン酸, 10 mM ピロリン酸ナ トリウム, 1%トリトンX, 1mM EDTA, 200 mM PMSF, complete phosphatase inhibitor cocktail 1+2(Sigma-Aldrich, MO, USA), Complete Mini (Roche Diagnostics, IN, USA)を混ぜた溶液の中で均質にした. そしてタンパク濃度をBCA Protein Assey Kit (Pierce Biotechnology, IL, USA) を用いて測定した. Flag-tag 免疫沈降は製造元の説明に従いFlagタグ親和性ゲル (Sigma-Aldrich Japan) を20 µL 使用し施行した. タン パクを抽出し免疫沈降したものは10% SDS-ポリア クリルアミドゲルに流し、その後ニトロセルロース 膜に電気泳動転写した. 室温で1時間ブロッキング した後、免疫ブロットはPTEN、Akt、セリン473リン 酸化Akt, STAT3, チロシン705リン酸化STAT3 (Cell

Signaling Technology) に対する1次抗体の中に4℃で 一晩漬けておいた. そして,室温で1時間2次抗体に 漬け,タンパクを化学発光法 (ECL, GE Healthcare, Japan)を用いて検出した.バンドの強度はImageJを 用いて測定した.血清非エステル型遊離脂肪酸と中性 脂肪は比色分析法 (Wako, Japan)を用いて測定した. 血清コルチコステロンはELISAキット (Assaypro, MO, USA)を使用して測定した. 肝中性脂肪はFolch法を 使い抽出し,比色分析法で測定した.

#### RNA 作製とreal time PCR

組織の総RNAは冷凍された肝臓と楔状の視床 下 部 内 側 基 底 部 よ り RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を製造元の説明に従い分離した.抽出したRNAは NanoDrop 1000 (NanoDrop Products, DE, USA) を 使用して定量化した. DNase Iで処理した後に精製 されたRNAをSuperScript III (Life Technologies, Japan)を用いてfirst-strand cDNA 合成の鋳型として 使用した. 定量RT-PCRはABI PRISM Model 7000 (Applied Biosystems, CA, USA) を製造元の説明に 従い行った.ラットのGAPDH (Rn99999916\_s1), glucose 6-phosphatase (G6Pase) (Rn00565347\_m1), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Rn01529009\_g1), fatty acid synthase (FAS) (Rn01463550\_m1), acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Rn00573474\_m1)のTaqmanプローブはApplied Biosystemsより購入した. Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1  $\alpha$ )(5'-AAAGGGCCAAGCAGAGAGA and 5'-GTAAATCACACGGCGCTCTT) & glucokinase (GK) (5'-TATGAAGACCGCCAATGTGA and 5'-TTCCCACCGATGATCTTCTC)のプライマーで SYBR Greenを使用して定量 PCRを行った.

#### 高インスリン血症正常血糖クランプ

脳定位固定術から回復1週間後(図4A),イソフル レン吸入剤のガス麻酔下でラットの左頸動脈にサン プリング用の,右頸静脈に注入用のポリウレタンカ テーテル (MRE025; Braintree Scientific, MA, USA) を植え込んだ.カテーテルは皮下に通し、首の後ろ から体外に出した. クランプ実験は以前の報告と 同様<sup>27)</sup>,カテーテル植え込み1週間後に無麻酔非拘束 の条件下で行った(図4A,4B). [3-<sup>3</sup>H]-グルコース (40 µCiボーラスの後 0.4 µCi/分持続投与; Muromachi Pharmaceutical, Japan)の持続注入はbasal periodとし て2時間同じ注入速度を続けた. そして2.5 mU/kg/分 のインスリンと3 µg/kg/分のソマトスタチンの持 続注入によるインスリンクランプは0分から開始し 2時間継続した.このクランプの間,血中グルコース 濃度をおよそ80-100 mg/dLの範囲内に保つように 20%ブドウ糖溶液の注入速度を変更した. [3-<sup>3</sup>H]-グル コースは代謝されるとトリチウム水になるため、代謝 されていない残存したトリチウムグルコースを 測定することが出来る. [3-<sup>3</sup>H]-グルコース特異的 活性を検出するための検体はclamp period 開始から - 30, - 15, 0, 80, 90, 100, 110, 120 分で採取し,水酸化 バリウムと硫酸亜鉛で脱蛋白し最終的に乾燥させた. ホルモン測定のための検体は0, 100, 120 分に採取した. クランプ実験終了時にラットはペントバルビター ルで安楽死させ,液体窒素で事前に冷やしておいた スチール製ハサミで組織検体を液体窒素内で急速凍結 した.全ての組織検体はその後の分析の為に-80℃で 保存した.

#### 統計解析

統計解析はGraphpad Prism ver. 6とS-Plus ver. 8を 使用し行った.体重変化と摂食量に関しては,動物の IDを変量効果,視床下部内側基底部介入と術後日数 を固定効果とみなした混合効果モデルを使用し解析 した.その他のデータは分散解析を行い,その後Holm-Sidak 事後解析を使用し多重比較をした.LacZ群は多 重比較で対照として使用した.クランプ実験の多重比 較は3群で行った(視床下部内側基底部にLacZを発現 し通常食を与えた群(LacZ-NC)対恒常活性化PTENを 発現し通常食を与えた群(CA-PTEN-NC),LacZ-NC対 LacZを発現し高脂肪食を与えた群(LacZ-HF),LacZ-HF対競合阻害型PTENを発現し高脂肪食を与えた群 (DN-PTEN-HF)).グラフとエラーバーを平均値±標 準誤差で表しているということ,およびP値が0.05未満 であった場合をもって有意差ありと判断した.

## 結 果

## ラットの視床下部内側基底部でPTENを阻害すると摂 食と体重増加を抑制した

視床下部内側基底部でのPTENの機能を研究す るため,恒常活性型PTEN (myr-PTEN; CA-PTEN), 競合阻害型PTEN (myr-C124S-PTEN; DN-PTEN) もしくはコントロールのLacZを発現するCAGプロ モーターを有する発現ベクターを脳定位固定術により 注入した(図1A).目標部位に注入出来ているかを確認 するため,LacZ発現ベクター注入2週間後に,LacZの 特異的染色によりβ-ガラクトシダーゼの存在を確認 した.図1Bに示すように,β-ガラクトシダーゼは視 床下部内側基底部に部位特異的にその発現が認めら れた.さらにLacZベクター注入3日後のラットの脳の 冠状断面をLacZ染色した.図1Cに示すように,LacZ 染色に反応している青色は視床下部内側基底部に注入 出来ていることを示している.

ベクター注入による外来タンパク質がどのタイプ の細胞に強制発現するかを断定するため、細胞特異 的マーカーとLacZ抗体を使って脳切片を染色した. 図1Dに示すように、LacZの免疫蛍光はその大部分 がニューロンのマーカーであるNeuroTrace 640/660、 POMCおよびAgouti 関連ペプチド (AGRP) と共局在化 していた.一方,星状膠細胞のマーカーであるGFAP もしくは小膠細胞のマーカーであるIba1とLacZはほ とんど共局在化していなかった.従って,ベクターに より強制発現を受ける細胞の種類は主に視床下部内側 基底部のPOMCやAGRPの発現を含んだニューロンで あり,膠細胞ではないと考えられた. 以前に同教室よりN末端ミリストイル化シグナル ペプチドを含む,myr-PTENとmyr-C124S-PTENの PTEN変異体によって,インスリン刺激された3T3-L1 脂肪細胞のPIP3量がそれぞれ,減少あるいは増加 する効果があったことが報告されている<sup>28</sup>(図2A). また,酵素活性部位に点変異を導入したC124S-PTENは,内因性PTENに有する脂肪脱リン酸化酵素



図1. 視床下部内側基底部への介入. A: 5.4×10<sup>8</sup> pfuのpAxCAwt 発現ベクターをカニューレガイド下で視床下部内側 基底部 (MBH) に左右対照に注入した. B: MBHでのLacZ 発現は脳の標本をLacZ 染色することで確認した. C: MBHのLacZ 染色は厚さ40 µmの脳切片で確認した. D: LacZが発現した細胞タイプはLacZ (第1列) には免疫蛍光 と Neurotrace 640/660で二重染色を行い, POMC, AGRP, GFAP, Iba1 (第2列) に対しては抗体によって確認した. 融合させた画像を第3列に示す.

だけではなくタンパク脱リン酸化酵素<sup>29)</sup>およびアク チン再構築<sup>30)</sup>としての役割に関しても,競合阻害作用 を持つことが他の研究者から報告されている.ラット を安楽死させた後,視床下部内側基底部を弓状核が 主に含まれるように楔状に摘出し,免疫ブロットに よって恒常活性型および競合阻害型 PTENの発現を 確認した(図2B).これらの変異体は変異体が ミリストイルシグナルペプチドの分だけ内因性 PTENよりも大きいために上方のバンドで示され ている.今回の研究でPTENの活性を測定するという 実験は行っていない.今後 ELISA 法などでの測定を 検討する.また,抗 PIP3 抗体により PIP3の定量を試 みたが,信頼性のある結果が得られなかった.

強制発現されるタンパク質の発現期間を調べ るために,恒常活性型PTENを注入したラットの視床 下部内側基底部の切片を注入後0(注入直後),1,3,7, 14,21日後に採取し,Flagタグ親和性ゲルを用いて 免疫沈降した.恒常活性型PTENの発現量は1~3日 後でピークに達し,その後減少した(注入1日後と 比較して3,7,14,21日後の相対発現量は105±3%, 86±4%,43±2%,7±2%であった;図2C).

発現ベクター注入前後の摂食量と体重増加を測定 した.その結果、1~3日後に競合阻害型 PTEN 群が その他の群と比較して有意に摂食が抑制されていた (LacZ:13.7±1.9g,恒常活性化 PTEN:14.7±2.0, 競合阻害型 PTEN:8.5±1.8,LacZ対競合阻害型 PTEN P=0.049;図2D).

注入前日からの体重増加は競合阻害型 PTEN 群で 有意に低下していた(術後1~6日目の平均値土標 準誤差はLacZ: - 22.6±2.4g, 恒常活性型PTEN: - 17.1 ± 1.9, 競合阻害型 PTEN: - 42.1 ± 1.4, LacZ 対競合阻害型 PTEN は P = 0.022 であった; 図 2E). 競 合阻害型 PTENによる摂食と体重変化の効果は注入後 1日目, すなわちベクター注入による急激なタンパク 発現と同時に観察された (図 2C). LacZ 群と競合阻害 型 PTEN 群の体重増加の違いは、ベクター注入7日後 より小さくなった. この時期はタンパク発現も減少 していた (図 2C). 一方, 視床下部内側基底部で恒常 活性化 PTENが発現すると、ラットはコントロール 群よりも有意に体重増加をした(術後7~10日目の平 均値±標準誤差はLacZ:-9.7±2.7g, 恒常活性化 PTEN: 0.9 ± 2.5, 競合阻害型 PTEN: - 25.0 ± 2.3, LacZ対恒常活性化PTENはP=0.048, LacZ対競合 阻害型 PTENはP = 0.021;図 2E).競合阻害型 PTEN 群の摂取量はLacZ 群よりも多くなる傾向であった (術後4日目, P=0.09, 図2D). 体重増加で恒常活性 化 PTEN 効果の相対的に遅い出現は、全ての群でベク ターの注入により誘導された非特異的体重減少で術後 1~6日目まで恒常活性化 PTEN と LacZ は差が縮小さ れていたことに起因するかもしれない.

## 視床下部内側基底部 PTEN 介入による摂食抑制効果は 高脂肪食により鈍化した

過食はインスリン抵抗性およびレプチン抵抗性を 惹起することが報告されている<sup>31)</sup>. そこで, 視床下 部内側基底部でPTEN 介入の効果が過食により変化 するかどうかを調べた. 視床下部内側基底部に発現 ベクター注入後、ラットに高脂肪食(通常食に10% ラードを混ぜたもの)を与えた.その結果, 競合阻害 型 PTENによって起きる摂食量に対する効果は縮小 され(図3A),介入後の体重増加はコントロールと 比較して有意差がなかった(図3B).いくつかの報告 によると、視床下部においてインスリンおよびレプ チンは摂食量や体重に対する影響とは独立して糖代 謝を調節している可能性が示唆されている<sup>13, 32-34)</sup>. そこで、インスリン感受性を評価するために3つの群 に対して、ラットの体重が95%以上回復した術後8日 目にインスリン負荷試験を施行した. 高脂肪食に変 更後の体重増加は各群間で差はなかったが、インス リン投与15分後に競合阻害型PTEN 群で有意に血糖 低下が認められた(LacZ:0分の血糖値の90±3%,恒 常活性化 PTEN: 92 ± 6, 競合阻害型 PTEN: 73 ± 6, 競合阻害型 PTEN 対 LacZはP < 0.05;図3C). 恒常 活性化 PTEN 群の空腹時の血漿インスリン量はコン トロール群よりも高値であった(LacZ:0.29±0.02 ng/mL, 恒常活性化 PTEN: 0.59 ± 0.14, 競合阻害型 PTEN: 0.30 ± 0.04, 恒常活性化 PTEN 対 LacZは P < 0.05; 図3D). これらの結果より、視床下部内側基底 部 PTENの抑制はインスリン感受性を増強し、視床下 部内側基底部 PTENの過剰活性化はインスリン抵抗性 を惹起する可能性が示唆された.

レプチン受容体陽性ニューロンでPTENを胎生期 から過剰発現させたマウスでは肝臓の脂肪合成が増強 されていることが最近報告された<sup>23</sup>.そのため肝脂肪 合成遺伝子は視床下部内側基底部でのPTENの介入に 影響されるかどうかを調べた.高脂肪食摂取状態では 2つの主要な脂肪合成遺伝子であるFASとACCの肝臓 での発現は恒常活性化 PTEN 群で有意に増加していた (それぞれ3.3 ± 1.2 倍と1.7 ± 0.4 倍であり,それぞれ P < 0.05であった;図3Eと3F).この結果は以前の 報告と一致している<sup>23)</sup>.肝臓中性脂肪量は3 群間で 有意差はなかった(図3G).

## 視床下部内側基底部 PTENの双方向の介入で内因性糖 産生に対する役割を明らかにする

インスリン負荷試験の結果より,視床下部内側 基底部の競合阻害型PTENがインスリン感受性を 増強させ,空腹時血漿インスリン量が増加した ことより恒常活性化PTENがインスリン感受性を 低下させていることが示唆された.そのため,イン スリン感受性に対する視床下部内側基底部PTEN の介入の影響を詳細に調べるために無麻酔非 拘束状態下のラットで高インスリン血症正常血糖 クランプ実験を行った.低血糖による拮抗ホルモンの 分泌,および内因性インスリンとグルカゴンの影響 を除外するために、クランプ中はソマトスタチンを 持続的に注入し、グルコース注入速度を正常血糖 を維持するように調節した.ラットは,LZ-NC, CA-PTEN-NC, LZ-HF, DN-PTEN-HFの4つの群に振り 分けた.前述の通り、通常食の場合恒常活性化 PTEN 群の摂食量はLacZ 群と比べ増加する傾向であった. したがって、視床下部内側基底部の恒常活性化 PTEN 発現に関与する摂食の増加傾向のインスリン感受性 への影響を除外するためにLacZ 群の摂食量を術後 1-7日目まで測定し,恒常活性化 PTEN 群に同一の 量の餌を供給した.血管手術後は餌の量は制限しな かった.LZ-NC 群とCA-PTEN-NC 群,LZ-HF 群とDN-PTEN-HF 群で有意な体重差は認めなかった(表1). 非エステル型遊離脂肪酸,インスリン,コルチコステ ロン,中性脂肪などの体液因子は,恒常活性化 PTEN 群のクランプ中の血清中性脂肪量の高値を除き,各 群間で有意な差はなかった(表1).インスリン負荷 試験時のインスリン濃度(図3D),クランプ実験時 のbasal periodのインスリン濃度(表1)は,それぞれ



図2. ラットMBHでのPTEN阻害は摂食と体重増加を抑制した.A:ベクターのコンストラクト.恒常活性型である CA-PTENはミリストイル化シグナル配列とFLAG tagをN末端に加えた野生型PTENである.競合阻害型である DN-PTENは酵素活性部位を失活させる変異として知られる124番目のシステインをセリンに置換し,N端のミリスト イル化シグナルとFLAG tagを付加したものである.B:MBHでのCA-PTENとDN-PTENの発現を抗PTEN抗体使用 による免疫ブロットで確認した.結果は代表的なバンドによって示す.C:MBHでの外因性PTEN発現の時間経過. MBH溶解物をM2-Flag親和性ゲルを使用し免疫沈降させ,PTEN抗体を用いて免疫ブロットした.結果は代表的な バンドをパネルで表示し,全てのバンドを定量化して示した.多重比較(第1日目の定量化の結果をHolm-Sidak試験の コントロールとした)を一元配置分散分析の後に行った.D:通常食でのLacZ,CA-PTEN, MD-PTENラットの平均 摂食量.E:平均体重.MBH手術日からの変化として表わす.白丸=LacZ,黒三角=CA-PTEN,黒四角=DN-PTEN; それぞれn=7,8,6.統計解析はMBH介入と術後日数による固定効果と、LacZ群をコントロールとした動物IDに よる変量効果での混合効果モデルを使用し行った.データは平均値±標準誤差で表した.\*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

インスリン負荷試験の0分のインスリン濃度(絶食5時 間後)と,絶食開始から4時間30分後,4時間45分後, 5時間後の3点のインスリンの平均濃度である.イン スリン値が異なる明確な理由は分からない.しかし 可能性として,インスリン負荷試験は脳定位固定術 後8日目で施行しカテーテル手術を施行していないの に対して,クランプ実験は14日目にクランプを施行 するが,その前に脳定位固定術後7日目の段階で頸動 静脈にカテーテル挿入術を施行していることが考え られる.また,インスリン測定キットが異なることも 濃度が違う理由として考えられる.インスリン負荷試 験時に使用したキットはMercodia Ultrasensitive Rat Insulin ELISA (Mercodia, Sweden)を用いたが,クラン プ実験時ではMercodia Rat/Human Insulin ELISA kit を使用した.採血の手技もインスリン濃度を変えて しまう一つの要因である.インスリン負荷試験では



図3. 高脂肪食は視床下部内側基底部におけるPTEN 介入による摂食への効果を乏しくさせたが、インスリン感受性と肝脂肪合成に対する影響は認められた. ラットへの給餌は脳定位固定術直後に常食から高脂肪食に変更した (それぞれの 群でn=6). A:平均摂食量. B:体重変化. C:術後8日目のインスリン負荷試験. ラットを5時間絶食にし、インス リン(1.5 U/kg)を腹腔内に注射した. D:術後9日目の5時間絶食後の血漿インスリン濃度. E,F:肝FASと肝ACC発現はreal time PCRで測定した. mRNA量はGAPDHで標準化した. グラフはLacZ 群と比較し何倍かで表す. G:肝中性脂肪含有量. データは平均値±標準誤差で表す. 多重比較(LacZ 群はHolm-Sidak 試験のコントロールとした)は一元 配置分散分析の後に行った. 群間で\*P < 0.05.

採血は尾静脈からであるのに対して,クランプ実験 ではカテーテルからの採血でありストレスが少ない. 実験の開始時間はインスリン負荷試験は午前8時に 絶食を開始したのに対して,クランプ実験の際は午 前7時30分から絶食を開始した.実験開始時間の差も 結果に影響しているのかもしれない.

クランプ前のbasal periodの最後の30分間, DN-PTEN-HF 群の血糖は低値であった(図4C). 実験 によるバイアスを除外するために、全ての群で clamp periodの開始30分間はグルコース注入割合を 固定し、その後は正常血糖を維持するために注入量 を調節した. Clamp period 開始 30 分後, 血糖はLZ-NC群とDN-PTEN-HF群が残りの2つの群よりも 低値であった(図4C). これは前者の2つの群が後者 2つの群よりもインスリン感受性がより高いことを 示唆した. グルコース注入速度(GIR)はLZ-NC群 (10.8±1.6 mg/kg/分)と比較してCA-PTEN-NC 群と LZ-HF 群で有意に低かった (それぞれ3.7±2.1, P < 0.05と2.4±1.0, P<0.01;図4D).反対にDN-PTEN-HF 群のGIRはLZ-HF 群よりも有意に高かった(10± 2.0, P < 0.05). トレーサー分析では clamp period で内 因性糖産生(EGP)はコントロール群(4.8±0.7)と比 較してCA-PTEN 群とLZ-HF 群が有意に増加していた (それぞれ9.2±1.7, 9.0±1.1, P<0.05) ことが明 らかになった (図 4E). 一方, clamp period 中のEGP はDN-PTEN 群はLZ-HF 群と比較して有意に減少し ていた (3.5±1.5 mg/kg/分, P < 0.05;図4E). 以前 に報告されている様に<sup>31)</sup>,高脂肪食はEGPを増加させ (図4E) 糖取り込みを低下させた (LZ-NC:15.5±0.9, LZ-HF:10.8±0.7, P < 0.01;図4F). 視床下部内側 基底部 PTEN の介入は末梢糖取り込みには有意な変化 はなかった (図4F).

## 双方向の視床下部内側基底部 PTENの介入は肝 Aktの リン酸化反応とG 6 Paseの発現を変化した

最後に、<br />
クランプ実験終了直後に凍結保存した 肝臓の検体を解析した. Ser473のAktリン酸化はLZ-HF 群およびCA-PTEN 群でLZ-NC 群に比較して低下 していた(それぞれ0.57±0.07倍, 0.50±0.09倍; 図 5A). 逆に, DN-PTEN 群では高脂肪食摂取による Aktリン酸化の鈍化が回復していた(0.57±0.07倍対 1.02±0.18倍;図5A). 肝糖産生のための中枢神 経系のインスリンの潜在的なシグナル情報伝達<sup>35)</sup> であるSTAT3のTyr705リン酸化については、CA-PTEN 群で減少傾向であったが他の群と有意な差は なかった (図 5B). 肝 G6Pase 発現は通常食を与えた CA-PTEN 群で有意に増加し(3.0±0.3倍),高脂肪食 を与えたDN-PTEN 群で有意に減少していた (LZ-HF 群ではLZ-NC 群の1.9±0.6倍, DN-PTEN-HF 群では LZ-NC 群 の $0.7 \pm 0.2$  倍, P < 0.05; 図 5C). PEPCK は各群間で有意差はなかった(図5D). PGC1αは

表 1	L. /	フラ.	ンフ	『実験の	ラッ	トの体	重と	体液因子
-----	------	-----	----	------	----	-----	----	------

	LacZ-NC	CA-PTEN-NC	LacZ-HF	DN-PTEN-HF		
数	5	5	5	5		
体重(-14日)(g)	312±9	310±16	314±8	317±10		
体重(0日)(g)	347±24	340±13	355±8	363±16		
インスリン (basal) (ng/mL)	0.91±0.17	1.27±0.34	1.11±0.28	$0.64 \pm 0.11$		
インスリン (clamp) (ng/mL)	2.44±0.22	2.66±0.16	2.75±0.18	2.54±0.21		
遊離脂肪酸 (basal)(mEq/L)	0.60±0.07	0.72±0.16	0.68±0.18	$1.10\pm0.44$		
遊離脂肪酸 (clamp)(mEq/L)	0.81±0.08	$1.00 \pm 0.24$	0.89±0.32	$0.70 \pm 0.14$		
コルチコステロン (basal) (ng/mL)	341±111	227±29	248±55	230±83		
コルチコステロン (clamp) (ng/mL)	371±105	283±93	204±17	434±220		
中性脂肪 (basal)(mg/dL)	78±21	92±26	84±22	80±40		
中性脂肪 (clamp) (mg/dL)	66±17	112±18*	98±23	65±25		
			*P < 0.05  \$thacZ-NC			

インスリン抵抗性群,言い換えるとCA-PTEN-NC 群 とLZ-HF 群でコントロール群と比較し有意に減少し ていた(CA-PTEN-NC:  $0.60 \pm 0.12$  倍,LZ-HF:  $0.44 \pm$ 0.05, それぞれP < 0.05 とP < 0.01;図 5E). これは 肝インスリン抵抗性による二次性のPGC1  $\alpha$  の代償 性変化かもしれない.肝GK発現は高脂肪食摂取群と 同様にCA-PTEN 群で著しく減少していた(CA-PTEN-NC: LZ-NC 00.18 ± 0.03 倍,LZ-HF:  $0.25 \pm 0.14$ ,P < 0.05; 図 5F). しかしながら, DN-PTEN 群は高脂肪食 による肝 GK 発現は戻らなかった (図 5F). 脂質合成に ついては, FASの発現が CA-PTEN 群で有意に増加し ていた (1.9±0.4倍)が, 高脂肪食を負荷した群では 有意な FASの変化は認めなかった (図 5G). ACC 発現 は各群間で変化なかった (図 5H). 高インスリン血症 クランプ実験後の肝 ACC 量の変化がなかったことは, インスリン自体が肝 ACC 遺伝子の上方制御すること



 図4. 視床下部内側基底部 PTENの双方向の修飾を施したラットでの高インスリン血症正常血糖クランプ実験. A: 脳定 位固定術,カテーテル手術およびインスリンクランプ実験の手順. B:クランプ手順. C:basalとclamp period 中の 血漿グルコース量. 白四角= chow-fed LacZ;白三角= chow-fed CA-PTEN;黒四角= HF-fed LacZ;黒三角= HF-fed DN-PTEN;それぞれn=5. D: clamp period 中に正常血糖を維持するための必要グルコース注入速度. バーは clamp periodの残り40分間の平均 GIRを示す. E:basalと clamp period 中の内因性グルコース産生量. F: clamp period 中の 末梢グルコース取り込み. データは平均値±標準誤差で表す. 多重比較は3 組 (LacZ-NC 対 CA-PTEN-NC, LacZ-NC 対 LacZ-HF, LacZ-HF 対 DN-PTEN-HF)で一元配置分散分析後にHolm-Sidak 試験を用いて行った. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.</li>

が知られており、図3Fにある高脂肪食摂取のCA-PTEN群でACCの高値は、高インスリン血症による 二次性変化なのかもしれない(図3D). 肝中性脂肪は 高脂肪食を与えたLZ-HFで有意に増加していたが (LZ-NC:8.7±2.1 mg/g, LZ-HF:16.8±2.9, P<0.05), PTENを介入した群では変化がなかった (図 5I).



図 5. 高インスリン血症正常血糖クランプ実験後の肝臓標本の解析. A, B: Ser473での肝 Akt リン酸化反応 (A) とTyr705で の肝 STAT3 リン酸化反応 (B) の定量化. 上のパネルはそれぞれの群の代表的なバンドを示す. 下のグラフは全タンパ クに対するリン酸化タンパクの割合を示す. C-H: 肝臓のG6Pase (C), PEPCK (D), PGC1 a (E), GK (F), FAS (G), ACC (H) の発現は real time PCRで測定した. mRNA 量は GAPDHで標準化した. グラフは通常食摂餌 LacZ 群と比較し て何倍かで表す. I: クランプ実験後の肝中性脂肪含有量. データは平均値±標準誤差で表す. 多重比較は3組(LacZ-NC 対 CA-PTEN-NC, LacZ-NC 対 LacZ-HF, LacZ-HF 対 DN-PTEN-HF) で一元配置分散分析の後に Holm-Sidak 試験を用い て行った. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

#### 考察

PTENが末梢のインスリン標的組織で阻害 されると、インスリン感受性の増強が認められたこと が報告されている<sup>3-6)</sup>.しかし,視床下部ニューロン での遺伝的 PTEN 介入はより複雑な結果が示され ている. RIP-Creを用いた視床下部の部分的なPTEN の欠損は体全体の発育遅延を起した<sup>24,25)</sup>. POMC 発現ニューロンでのPTEN 欠損は逆に過食とそれに 伴う肥満を呈した<sup>21)</sup>. 驚くべきことに, PTENとは 逆反応をつかさどる酵素であるPI3キナーゼを同じ POMCニューロンで欠損させたときにも体重が増加 したとの報告がある<sup>17,36)</sup>. レプチン受容体発現細胞 でのPTENの欠損は摂食抑制には変化がないがエネル ギー消費が増えることで痩せが誘導された<sup>22)</sup>.同じレ プチン受容体発現細胞のPTENの過剰発現は摂食に 対する影響はほとんど認められないものの脂肪肝を 呈した<sup>23)</sup>. さらに,視床下部腹内側核 SF-1 陽性ニュー ロンでのPTEN 欠損<sup>37)</sup>とPI3キナーゼ欠損<sup>38)</sup>により 摂食による肥満が引き起こされた. これらは一見した ところ矛盾する結果であり, 逆の機能をもつさまざま なタイプのニューロンが近接して存在する視床下部の 複雑さを反映しているのかもしれない. 一つのニュー ロンに転写制御や電気生理学的活性のような複数の アウトプットが併存することが出来ることも複雑な 効果の結果を生むのかもしれない. さらに, これらの 一見矛盾したような結果は、少なくとも一部分に おいて、出生前期中のPTEN欠損の発生効果に起因 する. PTEN は特に神経系の発達に重要であると実証 されており<sup>6,39)</sup>, POMCは妊娠期間中の未熟な視床 下部ニューロンに幅広く発現している<sup>40,41)</sup>. 興味深い ことに、筆者の知るところによると、PI3キナーゼと PIP3が摂食の負の調節因子という理論に基づき期待 される結果であるところの, 視床下部においてPTEN 阻害により摂食を抑制するという報告がなく、また 逆に, PTENを活性化させたときに摂食が増加した という報告もない.

当研究において,成熟動物の視床下部内側基 底部での双方向の出生後PTEN介入が,摂食や 体重増加,インスリン感受性にどう影響するかに ついて調べた.解剖学的に特に弓状核が位置する 視床下部内側基底部に介入して実験を行った.用い られた発現ベクターは,視床下部内側基底部の星状 膠細胞や小膠細胞にほとんどもしくは全く強制発現 をさせず,主にニューロンで構成タンパク質の 発現が示されている.これはベクターによる遺伝子 導入の特徴と思われる.しかし,ベクターは視床下 部内側基底部の神経群には特異性がない.従って その結果は視床下部内側基底部の全てのタイプの ニューロンのPTENへの介入の効果を表している

と推測される.ニューロン特異的に後天的に遺伝子 導入するためには、ベクターにPOMC、AGRPなどの 特異的なプロモーターを組み込む手法が考えられる ので、今後の課題としたい、今回の研究においては、 POMC, AGRPニューロンを含む様々な種類のニュー ロンに非特異的にPTEN 介入をした総和の結果と してどのような現象が認められるかを解析したと 考えられ、薬物治療によって何が起こるかということ の予測には非特異的な介入がかえって役立つと考え ている. そのため、プロモーター特異的遺伝子マウス モデルより得られた結果に比較して、成熟した個体 でのより臨床的な薬剤による治療を模倣したもので あるということができる. はじめに、視床下部内側 基底部のPTEN 阻害は摂食と体重増加の両方を有意 に抑制させた. そして視床下部内側基底部のPTENの 活性化はそれとは逆の効果を及ぼす傾向を認めた. これらの結果はPIP3が弓状核でインスリンやレプ チンのセカンドメッセンジャーの働きをもち、内因性 PTENが視床下部 PIP3の分解作用を通じて摂食や 体重増加の促進をする機能を持っていることを示し ている. 当研究の結果はPOMCニューロンでPI3キ ナーゼによって得られた結果や17,36),中枢神経系での PI3キナーゼの薬理学的阻害<sup>18,19</sup>や視床下部内側基底 部でのインスリン/レプチンシグナリングをアデノ ウイルスで介入した研究<sup>13,42)</sup>の結果と一致している. しかし一方で当研究の結果はPOMCニューロンでの 遺伝的にPTENを欠損させた報告と矛盾している<sup>21)</sup>. この矛盾の理由は明らかではない.しかし.前述 の報告の著者による説明<sup>21)</sup>にあるように, 摂食の PTENの影響の大部分は視床下部内側基底部にある POMCニューロン以外の細胞集団で起きていると 考える.あるいは遺伝的 PTENの欠損は PIP3を単純に 増加させることに加えて他の効果を誘導する可能性 も考えられる200.また、エピジェネティック効果 により親が過食であった場合DNAメチル化などが 起こり、胎児の視床下部 POMCニューロンにおける PTENの発現量が減少する. するとノックアウト マウスのようになり、その子供が肥満やインスリン抵抗 性になりやすくなる、ということがあるかも知れない.

予想外に、ラットに適度な高脂肪食(通常食に 10%ラードを加えたもの)を与えると、摂食と体重 に及ぼす視床下部PTENの影響は乏しくなった. 高脂肪食はレプチンの摂食抑制効果を乏しくする ことが知られている(レプチン抵抗性).食事による インスリンやレプチンの抵抗性は受容体や受容体基 質レベルで起こると報告されており<sup>43</sup>、本研究の筆者 の見解では高脂肪食は摂食や体重へのPTENの効果を 乏しくさせたことはこれらの報告とは矛盾している. 摂食を抑制するインスリンとレプチンのシグナリング カスケードでPIP3から下流は明確に分かっていない. 一方, PIP3-KATPチャネルの相互作用<sup>44</sup>, Foxo1<sup>45</sup>や PDE3B-cAMP経路<sup>46)</sup>のようないくつかの経路の関係 は報告されている.高脂肪食が視床下部内側基底部 PTEN介入による摂食や体重の効果を乏しくしたメカ ニズムを解明することは困難であるが,今回の研究 で得られた結果だけに基づくと,高脂肪食によって 生じる視床下部内側基底部のインスリン/レプチン 抵抗性は,PTENより下流で部分的に起こっている と考えることは不合理ではない.一方,高脂肪食摂 取状態でありながら肝インスリン感受性の改善が 維持されたことは視床下部インスリン抵抗性がPTEN よりも上流でおこったことを示唆する.これは視床 下部のインスリン抵抗性はインスリン受容体基質 レベルで起きているという以前の報告に一致する<sup>27)</sup>.

インスリンは視床下部インスリン情報伝達を介して 間接的に肝糖産生を抑制し、それに加えて直接的 にも肝臓に効果がある<sup>10, 11, 47)</sup>. 当研究において, 視床 下部 PTEN がこの間接的な経路を増強し、高脂肪食 摂取による肝インスリン感受性の低下を修復するかも しれないということを初めて明らかにした. これは PI3キナーゼ阻害薬の脳室内注射はインスリンの肝糖 産生抑制能力を乏しくしたという以前の報告と一致 している<sup>11)</sup>. 遺伝的に視床下部 PTENを操作された 齧歯類モデルでは、レプチン受容体特異的 PTEN-KO マウスでインスリン感受性を評価したところ肝糖産生 の変化なしで糖取り込みが増強されたことが唯一報告 されている<sup>22)</sup>. 一方, POMCニューロンでPI3キナー ゼの調節領域の欠損によるPI3キナーゼの増強は体重 と関係なく,肝糖産生の抑制を誘導する<sup>17)</sup>.ホルモン 受容体レベルでは、POMCニューロンでインスリン とレプチンの受容体の欠損はAGRPニューロンのイン スリン受容体の欠損と同様に, 肝インスリン抵抗性 を誘導した<sup>34,48)</sup>. AGRPニューロンでのインスリン 受容体の再構成により、POMCニューロンでのレプ チン受容体の再構成と同様に、肝インスリン感受性が 修復した<sup>33,49)</sup>. これらの報告を考えると, 今回の研究 結果は、視床下部内側基底部でのPOMCニューロンや AGRPニューロンを含む様々なニューロンのPTENを 非活性化したときの総合的な効果により、過食に伴う 肝インスリン抵抗性を解除できることを示している. 視床下部内側基底部は血液脳関門が他の脳の部位 よりも疎であり<sup>50)</sup>, 視床下部内側基底部でPTEN を薬物により阻害すると肝臓のインスリン抵抗 性や2型糖尿病の潜在的な治療になる可能性を 示唆している. PTENの機能低下型変異はcancer predisposition syndromeの原因になり、その症候群の ーつが Cowden 病である. Cowden 病の表現型は肥満 であるがインスリン感受性が亢進している. PTEN にはPI3キナーゼ-Aktシグナル伝達を促進することで 増殖と代謝を抑制する働きがあると考えられており,

これはCowden 病の表現型の原因の一つと考えら れている<sup>51,52)</sup>. これらは全身でのPTENヘテロ欠損 による表現型であり, 視床下部だけでPTENを介入 した場合とは異なった表現型になる可能性が高いと 考える. 今回の研究で、インスリン負荷試験ではイン スリン投与15分後に競合阻害型PTEN群で有意に血 糖低下を認めた(図3C). またクランプ実験でのクラン プ開始後30分間はグルコース注入量は一定であり, インスリン負荷試験をしている条件と同等と考えら れる. クランプ開始 30 分の血糖値は LacZ-NC 群と DN-PTEN-HF 群がその他の群と比較して有意な差はない ものの低下傾向であった (図 4C). 以前の報告でPTEN ヘテロ欠損ではそうでないものと比較しインスリン 感受性が亢進していると報告されている<sup>51)</sup>. インス リン感受性が亢進することは合致していると考える. しかし、視床下部 PTENの阻害により摂食抑制が認め られており、この現象については全身のPTENへテロ 欠損で認められる表現系とは逆であった. これらの 原因は不明であるが,長期的にPTENの欠損が続いた 場合、PTEN 欠損による摂食抑制の効果が、過食の時 と同様に消失するという現象が起きる可能性がある と考える. インスリン感受性に対する影響は、長期に PTENを欠損したり、過食になったりしても消失せず 残るのではないかと考えた. 今回の研究は成熟個体 の視床下部 PTENのみの急性期の介入であり、全身性 に起きているPTENヘテロ欠損とは比較し難いが, 視床下部のPTENは肝インスリン感受性に大きく 関わっているのかもしれない.また、PTENは癌抑 制遺伝子としても知られており、PTENの欠損に より発癌し易いと言われている<sup>51-53)</sup>.もしPTENを 視床下部で抑制するような薬を作った場合, 癌の 発症や進展を促進してしまう副作用が生じるかも しれない. 肝臓での中枢神経系シグナル受信と肝 インスリン感受性調節の分子メカニズムは、インス リンが視床下部の摂食中枢である弓状核に作用し. 迷走神経を介して肝臓に作用し, IL6-STAT3の現在 もっとも信じられている経路により糖新生を抑制 すると考えられているが、今のところ十分に実証 されていない<sup>8, 35, 47)</sup>. 当研究において, 高脂肪食負荷, および視床下部内側基底部 PTENの恒常活性化により 肝Aktリン酸化の低下を認めた.また逆に、視床下部 内側基底部PTENの阻害によりこの高脂肪食負荷に よるAktリン酸化の鈍化を回復させた. 中枢神経系 の入力に伴う肝Aktリン酸化の変化はPOMC特異的 PI3キナーゼ欠損マウス<sup>17)</sup>と視床下部内側基底部レプ チン受容体再構成ラット<sup>54)</sup>により以前に報告された. G6Paseの発現はAktリン酸化とは反対方向に増減 したことからは、視床下部内側基底部 PTEN 介入が 肝Akt活性を調節し、その結果G6Paseの発現調節 を介して、最終的に肝インスリン感受性を調節する

ことが示唆された. STAT3のリン酸化はCA-PTEN の発現により減少する傾向であったが、リン酸化 STAT3のばらつきは相対的に大きく、その群間差は 有意ではなかった. 既報から考えると, インスリン 刺激の3時間後よりも早い時点だと、比較的緩除に 起きるSTAT3リン酸化においてばらつきがより現れ てしまうことが原因かもしれない<sup>35)</sup>. 視床下部内側 基底部 CA-PTENの発現によって引き起こされる他 の因子としては、クランプ終了時の血清中性脂肪と FAS発現がCA-PTEN 群で有意に高値であった. FAS の増加はPOMC 特異的 PTEN 遺伝子過剰発現マウス で肝中性脂肪量が有意に増加した<sup>23)</sup>との報告がされ ていたことと合致する. CA-PTEN ラットにおいて肝 中性脂肪だけが増加傾向になった理由は遺伝子組み換 えモデルと比較して、短い時間経過(2週間)であった せいかもしれない. 高中性脂肪血症はインスリン抵抗 性と関係することが知られているため、血清中性脂肪 の増加は視床下部内側基底部のCA-PTEN 発現による インスリン抵抗性の誘導が原因かもしれない. そして 中枢神経系のインスリンは最近, 白色脂肪組織で脂 肪分解や脂肪合成を調節していると報告された<sup>10</sup>. 今後、血清中性脂肪は根本的なメカニズムと関係が あるかどうかさらに究明する必要がある.この研究の もう一つの興味深い結果は視床下部内側基底部 PTEN 活性によるGKの著しい低下である. 肝GKのmRNA は犬の脳動脈インスリン注入により増加した報告が ある<sup>9</sup>. インスリンはGK転写を増強することが知られ ているため, GKの減少は肝インスリン抵抗性の結果 によるものかもしれない. 肝GKの減少は高血糖状態 の時にだけグルコースの変動に作用することが示さ れているため<sup>55,56)</sup>, EGP 抑制の鈍化の原因かどうかは 定かではない.一方, DN-PTEN 発現による視床下部 内側基底部 PTEN の抑制は血清中性脂肪や肝 FAS, 肝 GKには有意に作用しなかった. 視床下部内側基底部 のPTEN 抑制は高脂肪食による肝インスリン抵抗性を 回復していることから考えると、FASやGKは主要な メディエーターであることは考えにくい.

遺伝的にマウスの肝臓特異的にPTENを欠損した 場合体重に対する肝臓の重量が増え,また肝中性 脂肪含量が増加し脂肪肝を呈することが報告され ている<sup>57-59</sup>.さらに,遺伝的な肝臓特異的PTEN 欠損によりインスリン感受性が亢進したとの報告も ある<sup>57</sup>.今回の実験で視床下部PTENを活性化した 場合,肝臓重量や肝中性脂肪含量は変化無かったが肝 脂肪合成遺伝子のFASやACCが有意に増加していた. また視床下部PTENを阻害した場合は肝臓のインス リン感受性が亢進していたことから,脂肪肝に対する 影響は視床下部と肝臓は反対の現象が起こき,肝臓 のインスリン感受性亢進に関しては両者は合致し ていた. 要約すると、今回の研究で出生後の視床下部内 側基底部のPTEN 阻害が摂食と体重増加を抑制する ことを示した.しかしこれらの作用は過栄養の条件 では認められなかった.視床下部内側基底部のPTEN 阻害は摂食や体重に対する作用とは独立して、過食 によって生じた肝インスリン抵抗性を改善した.この ことから、視床下部 PTEN がインスリン抵抗性や2型 糖尿病治療の潜在的な治療標的になり得ることが 示された.

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり,研究および論文作成の 御指導をいただいた埼玉医科大学内分泌内科・ 糖尿病内科教授の粟田卓也先生,片山茂裕先生,講師 の小野啓先生,実験に協力いただいた実験助手の 鈴木徳子様,大学院生の酒井豪太君,アルバートア インシュタイン医科大学のクレメンス・ブルエ先生, 杏林大学の犬飼浩一先生,広島大学の浅野知一郎先生 および東北大学の片桐秀樹先生に深謝いたします.

#### 引用文献

- 1) Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:85-96.
- Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem 1998;273:13375-8.
- Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, Jefferies C, Liadis N, Giacca A, et al. Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. Mol Cell Biol 2005;25:1135-45.
- 4) Kurlawalla-Martinez C, Stiles B, Wang Y, Devaskar SU, Kahn BB, Wu H. Insulin hypersensitivity and resistance to streptozotocininduced diabetes in mice lacking PTEN in adipose tissue. Mol Cell Biol 2005;25:2498-510.
- Butler M, McKay RA, Popoff IJ, Gaarde WA, Witchell D, Murray SF, et al. Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice. Diabetes 2002;51:1028-34.
- 6) Stiles B, Groszer M, Wang S, Jiao J, Wu H. PTENless means more. Dev Biol 2004;273:175-84.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. Nature 1979;282:503-5.
- 8) Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction.

Science (New York, NY) 2000;289:2122-5.

- 9) Ramnanan CJ, Saraswathi V, Smith MS, Donahue EP, Farmer B, Farmer TD, et al. Brain insulin action augments hepatic glycogen synthesis without suppressing glucose production or gluconeogenesis in dogs. J Clin Invest 2011;121:3713-23.
- 10) Scherer T, O'Hare J, Diggs-Andrews K, Schweiger M, Cheng B, Lindtner C, et al. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. Cell Metab 2011;13:183-94.
- 11)Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. Nat Med 2002;8:1376-82.
- 12)Belgardt BF, Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. Ann N Y Acad Sci 2010;1212:97-113.
- 13)Gelling RW, Morton GJ, Morrison CD, Niswender KD, Myers MG Jr, Rhodes CJ, et al. Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. Cell Metab 2006;3:67-73.
- 14)Porte D Jr, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from C. elegans to humans. Diabetes 2005;54:1264-76.
- 15) Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature 2000;404:661-71.
- 16)Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. J Clin Invest 2005;115:951-8.
- 17) Hill JW, Xu Y, Preitner F, Fukuda M, Cho YR, Luo J, et al. Phosphatidyl inositol 3-kinase signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons contributes to the regulation of glucose homeostasis. Endocrinology 2009;150:4874-82.
- 18) Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr, et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. Diabetes 2003;52:227-31.
- 19) Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. Nature 2001;413:794-5.
- 20)Tsou RC, Bence KK. Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. Front Neurosci 2013;6:192.

- 21) Plum L, Ma X, Hampel B, Balthasar N, Coppari R, Munzberg H, et al. Enhanced PIP3 signaling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity. J Clin Invest 2006;116:1886-901.
- 22) Plum L, Rother E, Munzberg H, Wunderlich FT, Morgan DA, Hampel B, et al. Enhanced leptinstimulated Pi3k activation in the CNS promotes white adipose tissue transdifferentiation. Cell Metab 2007;6:431-45.
- 23) Warne JP, Alemi F, Reed AS, Varonin JM, Chan H, Piper ML, et al. Impairment of central leptin-mediated PI3K signaling manifested as hepatic steatosis independent of hyperphagia and obesity. Cell Metab 2011;14:791-803.
- 24) Nguyen KT, Tajmir P, Lin CH, Liadis N, Zhu XD, Eweida M, et al. Essential role of Pten in body size determination and pancreatic beta-cell homeostasis in vivo. Mol Cell Biol 2006;26:4511-8.
- 25) Choi D, Nguyen KT, Wang L, Schroer SA, Suzuki A, Mak TW, et al. Partial deletion of Pten in the hypothalamus leads to growth defects that cannot be rescued by exogenous growth hormone. Endocrinology 2008;149:4382-6.
- 26) Li L, Liu F, Ross AH. PTEN regulation of neural development and CNS stem cells. J Cell Biochem 2003;88:24-8.
- 27) Ono H, Pocai A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, et al. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. J Clin Invest 2008;118:2959-68.
- 28) Ono H, Katagiri H, Funaki M, Anai M, Inukai K, Fukushima Y, et al. Regulation of phosphoinositide metabolism, Akt phosphorylation, and glucose transport by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol 2001;15:1411-22.
- 29) Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:13513-8.
- 30)Ning K, Miller LC, Laidlaw HA, Burgess LA, Perera NM, Downes CP, et al. A novel leptin signalling pathway via PTEN inhibition in hypothalamic cell lines and pancreatic beta-cells. Embo J 2006;25:2377-87.
- 31) Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z, Rossetti L. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. Diabetes 2001;50:2786-91.

- 32)Banno R, Zimmer D, De Jonghe BC, Atienza M, Rak K, Yang W, et al. PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. J Clin Invest 2010;120:720-34.
- 33)Berglund ED, Vianna CR, Donato J Jr, Kim MH, Chuang JC, Lee CE, et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. J Clin Invest 2012;122:1000-9.
- 34) Konner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, et al. Insulin action in AgRPexpressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. Cell Metab 2007;5:438-49.
- 35)Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y, Nishizawa A, Matsumoto M, et al. Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. Cell Metab 2006;3:267-75.
- 36)Al-Qassab H, Smith MA, Irvine EE, Guillermet-Guibert J, Claret M, Choudhury AI, et al. Dominant role of the p110beta isoform of PI3K over p110alpha in energy homeostasis regulation by POMC and AgRP neurons. Cell Metab 2009;10:343-54.
- 37)Xu Y, Hill JW, Fukuda M, Gautron L, Sohn JW, Kim KW, et al. PI3K signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis. Cell Metab 2010;12:88-95.
- 38) Klockener T, Hess S, Belgardt BF, Paeger L, Verhagen LA, Husch A, et al. High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3Kdependent inhibition of SF-1 VMH neurons. Nat Neurosci 2011;14:911-8.
- 39) Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, et al. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. Science (New York, NY) 2001;294:2186-9.
- 40)Padilla SL, Carmody JS, Zeltser LM. Pomcexpressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. Nat Med 2010;16:403-5.
- 41)Padilla SL, Reef D, Zeltser LM. Defining POMC neurons using transgenic reagents: impact of transient Pomc expression in diverse immature neuronal populations. Endocrinology 2012;153:1219-31.
- 42)Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Rhodes CJ, Schwartz MW. Leptin regulates insulin sensitivity via

phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. Cell Metab 2005;2:411-20.

- 43) Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. Endocrinology 2010;151:4109-15.
- 44) Mirshamsi S, Laidlaw HA, Ning K, Anderson E, Burgess LA, Gray A, et al. Leptin and insulin stimulation of signalling pathways in arcuate nucleus neurones: PI3K dependent actin reorganization and KATP channel activation. BMC Neurosci 2004;5:54.
- 45) Kitamura T, Feng Y, Kitamura YI, Chua SC Jr, Xu AW, Barsh GS, et al. Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. Nat Med 2006;12:534-40.
- 46) Sahu A, Koshinaka K, Sahu M. Phosphatidylinositol 3-kinase is an upstream regulator of the phosphodiesterase 3B pathway of leptin signalling that may not involve activation of Akt in the rat hypothalamus. J Neuroendocrinol 2013;25:168-79.
- 47) Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, et al. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. Nature 2005;434:1026-31.
- 48) Hill JW, Elias CF, Fukuda M, Williams KW, Berglund ED, Holland WL, et al. Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. Cell Metab 2010;11:286-97.
- 49)Lin HV, Plum L, Ono H, Gutierrez-Juarez R, Shanabrough M, Borok E, et al. Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agoutirelated protein and POMC neurons. Diabetes 2010;59:337-46.
- 50) Rodriguez EM, Blazquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. Peptides 2010;31:757-76.
- 51)Pal A, Barber TM, Van de Bunt M, Rudge SA, Zhang Q, Lachlan KL, et al. PTEN mutations as a cause of constitutive insulin sensitivity and obesity. The New England journal of medicine 2012;367:1002-11.
- 52) Smith U. PTEN Linking Metabolism, Cell Growth, and Cancer. New England Journal of Medicine 2012;367:1061-3.
- 53) Cohen DH, LeRoith D. Obesity, type 2 diabetes, and

cancer: the insulin and IGF connection. Endocrine-related cancer 2012;19:F27-45.

- 54)German J, Kim F, Schwartz GJ, Havel PJ, Rhodes CJ, Schwartz MW, et al. Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. Endocrinology 2009;150:4502-11.
- 55)Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. J Biol Chem 1999;274:305-15.
- 56)Barzilai N, Rossetti L. Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. J Biol

Chem 1993;268:25019-25.

- 57) Stiles B, Wang Y, Stahl A, Bassilian S, Lee WP, Kim YJ, et al. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected]. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:2082-7.
- 58) Ishii H, Horie Y, Ohshima S, Anezaki Y, Kinoshita N, Dohmen T, et al. Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice. Journal of hepatology 2009;50:562-71.
- 59) He L, Hou X, Kanel G, Zeng N, Galicia V, Wang Y, et al. The critical role of AKT2 in hepatic steatosis induced by PTEN loss. The American journal of pathology 2010;176:2302-8.