

学位論文題名

ニューロペプチドYの褐色脂肪組織機能におよぼす影響と
転写因子STAT3の活性化

学位論文内容の要旨

ニューロペプチドY (NPY) は脳に豊富に存在する生理活性ペプチドであり、主に大脳皮質、海馬、視床下部などに分布する。その作用は多岐に渡り、摂食促進、抗不安作用やてんかん発作の抑制などの作用のほか、概日リズムの形成、生殖機能などへの関与も報告されている。一方、NPYは末梢組織の交感神経終末の分泌小胞内にも存在し、ノルエピネフリン (NE) 分泌とともに放出され、NEと協同して持続性の血管収縮を起こす。またNPYは血管透過性の亢進や虚血性変性後の血管新生に関与する。

NPYにはY₁からY₅までの5種類の受容体サブタイプが存在する。未だ遺伝子が同定されていないY₃受容体を除く4つの受容体はいずれもGi/Goタンパク質結合型のGタンパク質共役型受容体 (GPCR) である。NPYはGi/Goタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを抑制し細胞内カルシウムイオンを上昇させ、さらにカリウムチャネルやホスホリパーゼA₂の活性を調節する。これらのシグナルに加え、NPYはMAPキナーゼであるERKやJNKを活性化することが報告されている。

NEは9種類の受容体サブタイプを活性する。上述の血管収縮ではNEは α 1アドレナリン受容体を介して細胞内カルシウムイオンを上昇させるため、NPYと協同して血管平滑筋を収縮させる。一方、 β 3アドレナリン受容体 (β 3AR) は脂肪組織によく発現し、Gsタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内cAMP濃度を上昇させる。交感神経の投射が密な褐色脂肪組織 (BAT) においてもNEは β 3ARを介してcAMP濃度を上昇させ、脂肪の分解及び酸化の促進と脱共役タンパク質UCP1遺伝子の発現増大により熱産生を増加させる。

NPYはBATに投射する交感神経終末においてもNEと共存することが報告されているが、各々の受容体はGi/GoあるいはGsタンパク質という作用の異なるアダプタータンパク質を用いることから、標的組織に対して相反して作用することが予想される。しかし、BATにおけるNPYの役割は解明されていない。このため本研究ではNPYのBATにおける生理的役割を明らかにすることを目的とした。

第1章では、まずBATの代表的な機能である熱産生作用に対してNPYがどのように影響するのかを調べた。マウス肩甲骨間BATを摘出し、コラゲナーゼ処理により褐色脂肪細胞（BA）を単離した。BAにおけるNPY受容体遺伝子の発現を調べたところ、Y1及びY5受容体の発現が確認された。BAをNEで刺激したところ、熱産生の指標である酸素消費速度を亢進させたが、NPY刺激は速度に影響を及ぼさなかった。またNEとNPYの共刺激をしたところ、NPYはNEによる酸素消費亢進作用にも影響を与えなかった。またNE刺激はcAMPの産生とERKのリン酸化を亢進させたが、NPYは単独あるいはNEとの共刺激においてもそれらに影響を与えなかった。

BATはBAのみならず、線維芽細胞、血管内皮細胞やBA前駆細胞などからなる間質血管細胞群（stromal vascular cells; SVC）で構成される。そこでSVCにおけるNPY受容体遺伝子の発現を調べたところ、Y1受容体の発現が確認されたので、次にSVCに対するNPYの作用を調べた。単離培養したSVCをNPYで単独刺激したところ、ERKのリン酸化が刺激濃度および時間依存性に亢進した。ERKの下流のシグナルとしてサイトカインシグナルに応答する転写制御因子STAT3に注目したところ、NPY刺激はSTAT3の活性化に関与する二カ所のリン酸化のうち727番目のセリン残基のリン酸化を刺激濃度及び時間依存性に亢進した。一方、STAT3の705番目のチロシン残基は刺激の有無に関わらず、恒常的にリン酸化されていた。さらにNPY刺激はSTAT3の標的遺伝子である*Egr-1* (early growth response 1) 遺伝子の発現を亢進させ、NPYによるSTAT3のセリンリン酸化と*Egr-1*遺伝子発現はERKキナーゼ阻害剤PD98059で抑制された。また細胞増殖アッセイを行ったところNPYは効果を示さなかった。

以上の結果よりBAにはNPY受容体遺伝子の発現が確認されたものの、NPYは基礎的およびNE誘導性の熱産生、cAMP産生とERKの活性化に影響を及ぼさなかったため、BAには機能的なNPY受容体が発現していないと考えられた。一方、NPYはSVCにおいてERK/STAT3経路を介して*Egr-1*をはじめとする遺伝子の発現を誘導することが示唆された。つまり、BATにおけるNPYの標的はBAではなくSVCあり、その遺伝子の発現を変えることで機能を発現することが推察された。

第1章で新たにNPYのシグナル伝達機構にSTAT3が関与することを示した。一方、いくつかのGi/Goタンパク質結合型GPCRにおけるMAPキナーゼ活性化、に受容体結合型チロシンキナーゼであるJAK2の関与が報告されている。また、SVCではSTAT3の705番目のチロシン残基は恒常的にリン酸化されていたため、その上流でJAK2あるいは非受容体型チロシンキナーゼであるSrcの活性化が示唆された。そこで第2章ではSVCと同様にY1受容体のみが発現しているマウス肺微小血管由来内皮細胞株（LE II）細胞を用いて、NPYによるERK/STAT3

経路へのJAK2とSrcの関与について調べた。

LE II 細胞をNPYで刺激したところ、刺激濃度及び時間依存性にJAK2のリン酸化が亢進した。同様にNPY刺激はERKのリン酸化およびSTAT3のセリンリン酸化を刺激濃度及び時間依存性に亢進させた。しかし、LE II 細胞においてもSTAT3のチロシン残基は恒常的にリン酸化されていた。JAK2阻害剤AG490はNPYによるJAK2の活性化を抑制したが、ERKのリン酸化、STAT3のセリン残基およびチロシン残基のリン酸化には影響しなかった。Src阻害剤PP2はNPYによるJAK2やERKのリン酸化、STAT3のセリン残基およびチロシン残基のリン酸化は影響しなかった。

LE II 細胞においてもNPYによるSTAT3のセリンリン酸化はERKキナーゼ阻害剤で抑制され、NPY刺激は*Egr-1*遺伝子発現を亢進させた。さらにSTAT3の細胞免疫染色を行ったところ、無刺激時のLE II 細胞でも核内にチロシンリン酸化STAT3が集積していた。一方、核内のセリンリン酸化STAT3はNPY刺激で増大した。

以上の結果より新たにNPYのシグナル伝達機構にJAK2が関与することを示した。しかし、その基質STAT3のチロシン残基はJAK2とSrc以外の酵素により恒常的にリン酸化され核内に移行していたため、残念ながら今回その役割を検証できなかった。またNPYによるERK/STAT3の活性化へのJAK2とSrcの関与はないと考えられるが、STAT3のセリン残基のリン酸化が核内で起っていたのでSTAT3のチロシンリン酸化による二量体の形成と核への移行がNPYシグナルによる遺伝子発現調節の前提条件である可能性がある。

本研究によりNPYがBATにおいてBAに対しては作用せず、SVCに対しERK/STAT経路を介して遺伝子の発現調節を行うこと、そのシグナルにJAK2が寄与する可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	木村和弘
副査	教授	稲波修
副査	准教授	乙黒兼一
副査	准教授	寺尾晶

学位論文題名

ニューロペプチドYの褐色脂肪組織機能におよぼす影響と 転写因子STAT3の活性化

ニューロペプチドY (NPY) は脳に豊富に存在し、その作用は多岐に渡る。一方、NPY は末梢の交感神経終末にも存在し、ノルエピネフリン (NE) とともに放出される。褐色脂肪組織 (BAT) において NE は褐色脂肪細胞 (BA) に作用し $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して cAMP 濃度を上昇させ、脂肪分解・酸化の促進と脱共役タンパク質 UCP1 遺伝子の発現増大により熱産生を増加させる。しかし、BAT における NPY の役割は解明されていなかった。

本博士論文では、まず単離した BA を用いて NPY と NE の作用を比較した。NE は cAMP の産生と extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化および熱産生の指標である酸素消費速度を亢進させた。しかし、NPY は基礎的および NE 誘導性の熱産生、cAMP 産生と ERK の活性化に影響を及ぼさなかった。

BAT は BA のみならず、線維芽細胞、血管内皮細胞や BA 前駆細胞などからなる間質血管細胞群 (stromal vascular cells; SVC) で構成される。次に単離培養した SVC を NPY で単独刺激したところ、ERK のリン酸化が刺激濃度および時間依存性に亢進した。ERK の下流の分子としてサイトカインシグナルに応答する転写制御因子 STAT3 に注目したところ、NPY 刺激は STAT3 の活性化に関与する二カ所のリン酸化のうち 727 番目のセリン残基のリン酸化を刺激濃度および時間依存性に亢進した。一方、STAT3 の 705 番目のチロシン残基は刺激の有無に関わらず、恒常的にリン酸化されていた。さらに NPY 刺激は STAT3 の標的遺伝子である Egr-1 (early growth response 1) 遺伝子の発現を亢進させ、NPY による STAT3 のセリンリン酸化と Egr-1 遺伝子発現は ERK キナーゼ阻害剤 PD98059 で抑制された。従って NPY は BAT において BA に対しては作用せず、SVC に対して ERK/STAT3 経路を介して Egr-1 をはじめとする遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

また NPY による ERK/STAT3 経路を介する Egr-1 発現亢進と STAT3 のチロシン残基の恒常的リン酸化はマウス肺微小血管由来内皮細胞株 LEII 細胞でも観察された。さらに LEII 細胞では NPY の刺激濃度および時間依存性に受容体結合型チロシンキナーゼである JAK2 の活性化が起こることが新規に見いだされた。

以上のように、本研究は、熱産生組織 BAT における NPY の標的細胞とその新たな細胞内シグナル経路を明らかにしたものであり、哺乳動物の生理学に貢献が大である。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者、島田光平氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。