

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09398

研究課題名(和文) 視床下部Aktの摂食と糖代謝における役割の解明

研究課題名(英文) Roles of Hypothalamic Akt on Food Intake and Glucose Metabolism

研究代表者

小野 啓 (Ono, Hiraku)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10570616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンは視床下部弓状核に作用してPI3キナーゼ経路を介し摂食抑制および間接的な肝糖産生抑制効果を来すことが知られている。インスリン情報伝達においてPI3キナーゼの下流の最も重要な分子はAktであるが、視床下部Aktの摂食や糖代謝における役割は不明である。そこで本研究では、視床下部弓状核特異的にAktを活性化あるいは非活性化した時に、摂食および糖代謝にどのような影響が見られるかを調査した。恒常活性化型Aktをラット視床下部弓状核に過剰発現させると、予想に反して摂食への影響は認められなかった。対照的に、高脂肪食負荷により惹起される肝臓のインスリン抵抗性は視床下部Akt活性化により解除された。

研究成果の概要(英文)：Insulin is known to function in the arcuate nucleus of the hypothalamus to suppress food intake as well as suppress hepatic glucose production indirectly, via PI 3-kinase pathway. The most important molecule downstream of PI 3-kinase is Akt, while its role in the hypothalamus is unclear. In this study we bidirectionally modified Akt activity specifically in the arcuate nucleus of rats and investigated effects on food intake and glucose metabolism. Overexpression of constitutively-active Akt or dominant-negative Akt in the arcuate nucleus unexpectedly did not significantly change food intake or body weight. On the other hand, hypothalamic constitutive activation of Akt ameliorated high fat diet-induced hepatic insulin resistance, suggesting a divergence of pathway toward regulation of food intake and that toward glucose metabolism exist downstream of PI 3-kinase, only latter of which is what Akt is responsible.

研究分野：代謝学

キーワード：Akt 視床下部 摂食 インスリン感受性

### 1. 研究開始当初の背景

過食と肥満に伴い、なぜインスリン抵抗性が生じ、それが増悪して2型糖尿病に至るのか、未だよく分かっていない。

視床下部弓状核においてインスリンが摂食を抑制すること、その経路にはPI3キナーゼの活性化が関与していることが報告されている。また、Akt基質であるFoxO1の抑制もまた摂食抑制に関与していることが報告されている。また、インスリンは同じ視床下部弓状核に作用して遠隔的に肝臓の糖産生を抑制すること、これにはPI3キナーゼ経路が関与していることも、代表者のグループをはじめとして複数の研究者らが報告している。

当研究代表者は、米国留学中、短期の過食によって視床下部のS6キナーゼという蛋白質が活性化され、視床下部のインスリン情報伝達を抑制することを介して、肝臓のインスリン抵抗性をもたらすことを発見し、*JCI*に報告した(Ono H, Pocai A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, Schwartz GJ, Rossetti L. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 118:2959-, 2008)。さらに帰国後、埼玉医科大学において関連した研究を継続し、視床下部内側基底底部においてPTENが摂食およびインスリン感受性を調節していることを示し、*AJP*誌に発表した(Mediobasal hypothalamic PTEN modulates hepatic insulin resistance independently of food intake in rats. Sumita T, Ono H, Suzuki T, Sakai G, Inukai K, Katagiri H, Asano T, Katayama S, Awata T. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 307(1):E47-60)。本研究はこれらの研究の継続課題である。

### 2. 研究の目的

AktはPTENで分解されるPIP3により活性化を受けるリン酸化酵素である。Aktの上流であるPI3キナーゼはその活性化が摂食抑制機能を持ち、またAktの基質でAktにより抑制を受けるFoxO1は摂食亢進に働くことが報告されている。しかしPI3キナーゼとFoxO1の間をつなぐAktの視床下部における役割はいまだ解明されていない。当研究では、ラット視床下部内側基底底部においてAktとその下流分子を活性化および非活性化し、その際に摂食と糖代謝にどのような効果が認められるかを、インスリンクランプ法などを用いて調べることにより、同部位でのAkt経路の役割を解明する。

### 3. 研究の方法

ラット視床下部弓状核に脳定位固定術を用いて、恒常活性化型Akt、競合阻害型Akt、Akt基質の恒常活性化型変異体を強制発現するアデノウイルスベクターのそれぞれを単独、あるいは組み合わせで注入し、毎日の摂食量

と体重変化を測定する。また、これらの脳手術を行ったラットの左頸動脈と右頸静脈にカテーテル植え込み術を行い、術後の回復の後、トリチウムラベルされたブドウ糖をトレーサーとして用いた高インスリン血症正常血糖クランプ法により、肝臓のインスリン感受性を測定する。この後、視床下部弓状核および肝臓を含む組織を摘出し、弓状核のインスリン情報伝達分子や肝臓の糖新生律速酵素などの定量と活性定量を、ウエスタンブロットおよび定量的PCRを用いて調べた。

### 4. 研究成果

Aktの恒常活性化型変異体であるN端にミリスチル基を付加したAkt(myr-Akt)、および競合阻害型との報告のあるK179M変異を導入したAkt(K179M-Akt)を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、濃縮生成を行った。これらを通常食および高脂肪食を摂餌したSprague-Dawleyラットの視床下部弓状核に脳定位固定術を用いて微量注入し、同部位に過剰発現されていることを確認した。コントロールであるLacZウイルス、myr-Aktウイルス、およびK179M-Aktウイルスを同タイトルで微量注入した3群において、脳定位固定術と同時に左頸動脈と右頸静脈にカテーテル留置術を行い、1週間の回復期間における体重の変化を連日で測定した。1週間後に無麻酔非拘束条件下において2.5mU/kg.minの生理的高インスリン血症正常血糖クランプ法を用いてインスリン感受性を調査した。

3群において体重の変化量に有意な差は認められなかった。高脂肪食の摂餌によって通常食と比較し、コントロール群においてはインスリン刺激時による肝糖産生の抑制が鈍化した(肝インスリン抵抗性)が、視床下部弓状核myr-Aktの発現によってこの肝インスリン抵抗性は解除された。このことから、視床下部弓状核においてPI3キナーゼは摂食と糖代謝の双方に関与するものの、その下流であるAktは摂食調節には無関係で、糖代謝のみに関与する可能性が示唆された。

恒常活性化の逆の実験として、視床下部弓状核におけるAktを抑制した場合に逆の効果が認められるか否かの実験を継続している。視床下部弓状核への競合阻害型変異体であるK179M-Aktの発現によって通常食、高脂肪食摂餌ラットのいずれにおいても有意な影響は認められていない。この原因として、K179M-Aktが内因性のAktを有効に抑制していない可能性が考えられる現在Akt阻害薬を第3脳室に注入しつつ上記クランプ実験を行っている。また、Aktの基質であるFoxO1、GSK3βおよびPGC1αの恒常活性化型変異体を同部位に過剰発現させた際のインスリン感受性についても解析を行っている。

一方で、肝臓におけるAkt下流分子の中でインスリンによる糖産生抑制効果に最も寄与している基質はどれであるかという疑問を解明するため3種のAkt基質であるFoxO1、

GSK3 および PGC-1 を比較したところ, FoxO1 が最も重要な分子であることを解明し, 論文報告した(下記論文)。この論文は発行月の *Endocrinology* 誌において解説論文 (Smith G et al, FOXO1 Is the Headline Akt Regulating Hepatic Glucose Metabolism. *Endocrinology*, 158;1:2436–2438, 2017) 付の Editor's Choice に選ばれた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 11 件)

Okubo H, Nakatsu Y, Kushiyama A, Yamamotoya T, Matsunaga Y, Inoue MK, Fujishiro M, Sakoda H, Ohno H, Yoneda M, Ono H, Asano T. Gut Microbiota as a Therapeutic Target for Metabolic Disorders. *Curr Med Chem*. 2018;25(9):984-1001. doi: 10.2174/0929867324666171009121702. 査読有

Yamamotoya T, Nakatsu Y, Kushiyama A, Matsunaga Y, Ueda K, Inoue Y, Inoue MK, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kiyonari H, Ishihara H, Asano T. Trk-fused gene(TFG) regulates pancreatic  $\beta$  cell mass and insulin secretory activity. *Sci Rep*. 2017 Oct 12;7(1):13026. doi: 10.1038/s41598-017-13432-x. 査読有

Nakatsu Y, Kokubo H, Bumdelger B, Yoshizumi M, Yamamotoya T, Matsunaga Y, Ueda K, Inoue Y, Inoue MK, Fujishiro M, Kushiyama A, Ono H, Sakoda H, Asano T. The SGLT2 Inhibitor Luseogliflozin Rapidly Normalizes Aortic mRNA Levels of Inflammation-Related but Not Lipid-Metabolism-Related Genes and Suppresses Atherosclerosis in Diabetic ApoE KO Mice. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 4;18(8). pii: E1704. doi: 10.3390/ijms18081704. 査読有

Sakai G, Inoue I, Suzuki T, Sumita T, Inukai K, Katayama S, Awata T, Yamada T, Asano T, Katagiri H, Noda M, Shimada A, Ono H. Effects of the Activation of Three Major Hepatic Akt Substrates on Glucose Metabolism in Male Mice. *Endocrinology*. 2017 Aug 1;158(8):2659-2671. doi: 10.1210/en.2016-1969. 査読有

Nakatsu Y, Mori K, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue Y, Mitsuzaki-Miyoshi K, Sakoda H, Fujishiro M, Yamaguchi S, Kushiyama A, Ono H, Ishihara H, Asano T. The prolyl isomerase

Pin1 increases  $\beta$ -cell proliferation and enhances insulin secretion. *J Biol Chem*. 2017 Jul 14;292(28):11886-11895. doi: 10.1074/jbc.M117.780726. Epub 2017 May 31. 査読有

Kushiyama A, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Mori K, Ueda K, Inoue Y, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Asano T. Role of Uric Acid Metabolism-Related Inflammation in the Pathogenesis of Metabolic Syndrome Components Such as Atherosclerosis and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:8603164. doi: 10.1155/2016/8603164. 査読有

Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue Y, Mori K, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kushiyama A, Asano T. Physiological and Pathogenic Roles of Prolyl Isomerase Pin1 in Metabolic Regulations via Multiple Signal Transduction Pathway Modulations. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 7;17(9). pii: E1495. doi: 10.3390/ijms17091495. 査読有

Nakano T, Inoue I, Takenaka Y, Ono H, Katayama S, Awata T, Murakoshi T. Ezetimibe Promotes Brush Border Membrane-to-Lumen Cholesterol Efflux in the Small Intestine. *PLoS One*. 2016 Mar 29;11(3):e0152207. doi: 10.1371/journal.pone.0152207. 査読有

Nakatsu Y, Iwashita M, Sakoda H, Ono H, Nagata K, Matsunaga Y, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiyama A, Kamata H, Takahashi S, Katagiri H, Honda H, Kiyonari H, Uchida T, Asano T. Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates AMP-activated protein kinase (AMPK) by associating with the CBS domain in the  $\gamma$  subunit. *J Biol Chem*. 2015 Oct 2;290(40):24255-66. doi: 10.1074/jbc.M115.658559. 査読有

Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, Kaneko K, Ono H, Asano T, Oka Y, Katagiri H. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signaling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nat Commun*. 2015 Aug 13;6:7940. doi: 10.1038/ncomms8940. 査読有

Iuchi T, Hosaka T, Shiroishi M, Ono H, Inukai K, Sumita T, Sakai G, Katayama S,

Awata T. Influence of Treatment with Extracts of *Hypsizygus marmoreus* Mushroom on Body Composition during Obesity Development in KK-A(y) Mice. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo). 2015;61(1):96-100. doi: 10.3177/jnsv.61.96. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

— 小野啓, 横手幸太郎. 視床下部弓状核の Akt は摂食調節とは独立してインスリン感受性を調節する. 第38回日本肥満学会, 2017

— 酒井豪太, 小野啓, 鈴木徳子, 犬飼浩一, 住田崇, 片山茂裕, 粟田卓也, 井上郁夫, 野田光彦, 島田朗. 肝 Foxo1 は糖新生律速酵素と独立してインスリンによる糖代謝を制御する. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会, 2017

— 酒井豪太, 小野啓, 鈴木徳子, 住田崇, 井上郁夫, 片山茂裕, 粟田卓也, 野田光彦, 島田朗. 3種の Akt 基質と迷走神経肝臓枝の糖代謝における役割. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016

— 小野啓, 栗原進, 松田昌文, 加計正文, 豊島秀男, 犬飼敏彦, 麻生好正, 粟田卓也, 片山茂裕, 3S 研究グループ. DPP-4 阻害薬/少量 SU 薬併用および SU 薬増量の膵β細胞機能に及ぼす影響:3S(Saitama Sitagliptin Study)無作為化比較試験. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016

— 小野啓. 3種の Akt 基質の糖代謝における役割. 第30回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(招待講演), 2016

— Gota Sakai, Hiraku Ono, Tokuko Suzuki, Takashi Sumita, Kouichi Inukai, Shigehiro Katayama, Takuya Awata, Ikuo Inoue. Differential roles of three Akt substrates in the liver and vagal hepatic branch on insulin sensitivity. Keystone Symposia's Third Conference in Japan (国際学会), 2015

— 小野啓. インスリンの血糖低下機序と最新の糖尿病治療. 第19回日本適応医学会, 2015

— 小野啓, 酒井豪太, 住田崇, 犬飼浩一, 片山茂裕, 粟田卓也, 井上郁夫. Akt 基質と迷走神経肝臓枝の肝糖代謝における役割. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015

〔図書〕(計1件)

小野啓(分担執筆)これが知りたかった!糖尿病診療・療養指導 Q&A 「インスリン分泌能とインスリン抵抗性はどのように評価し,どのように活用するのですか?」中山書店, 全299ページ, 16-18, 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
小野 啓 (Ono, Hiraku)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号: 10570616

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号:

(4)研究協力者 ( )