

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15182

研究課題名(和文) 視床下部神経による末梢ホルモンの超高感受受容の分子機構と脳機能恒常性

研究課題名(英文) Molecular mechanism for highly sensitive response to peripheral hormones in hypothalamic neurons and homeostatic role

研究代表者

矢田 俊彦 (Yada, TOSHIHIKO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60166527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスで、インスリンの末梢投与は、視床下部室傍核にc-Fosを発現させ、大型のオキシトシン神経を選択的に活性化した。血中オキシトシン濃度が著明に増加した。微量ピコモル域インスリンは、室傍核単離神経に細胞内Ca増加を起し、応答細胞は大型の神経内分泌性オキシトシン細胞であった。Cre-LoxP系で作出したオキシトシン細胞選択的PDK1欠損マウスにおいて、ピコモル域インスリンによる神経内分泌オキシトシン神経細胞の活性化が消失し、インスリン末梢投与による血中オキシトシン濃度増加が消失した。結論として、室傍核の神経内分泌オキシトシン神経は超微量インスリンを受容し、その機序にPDK1シグナルが関わる。

研究成果の概要(英文)：Peripheral injection of insulin induced c-Fos in hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) particularly in large-sized oxytocin neurons, and increased plasma oxytocin levels in mice. Very low levels of insulin at picomolar concentrations increased cytosolic free calcium in single neurons isolated from PVN mostly in large-sized neuroendocrine oxytocin neurons. In oxytocin neuron-specific PDK1 knockdown mice via Cre-LoxP system, picomolar insulin failed to activate neuroendocrine oxytocin neurons and peripheral insulin-induced rises in plasma oxytocin disappeared. These results indicate that large-sized neuroendocrine oxytocin neurons in PVN respond to very low levels of insulin via mechanisms involving PDK1.

研究分野：生理学

キーワード：インスリン 視床下部 室傍核 神経内分泌 オキシトシン神経 PDK1

1. 研究開始当初の背景

末梢ホルモンは血液脳関門 (BBB) を通過して視床下部に作用し、脳機能 (摂食、中枢性代謝・循環調節、情動、記憶) を制御しており、その変調が肥満などの疾患に関わると考えられる。末梢ホルモンは血中で 10^{-9}M (ナノモル) レベルで、BBB 通過の際に大きく低下し、脳内では 10^{-12}M (ピコモル) レベルとなり、この超微量ホルモンが脳で機能を発揮出来るのかは大きな疑問であった。申請者は、単離した視床下部ニューロンが 10^{-12}M レベルの微量のホルモンに応答する現象を見出している。しかしこの超高感受性応答のメカニズムは不明であり、その解明は、中枢ニューロンの超高感受性応答の概念の立証にもつながる。

2. 研究の目的

本研究では、視床下部神経における末梢ホルモンに対する超高感受性応答のメカニズムの解明を目指す。特に、感受性増強をもたらす受容体・シグナル伝達分子、複数ホルモンの相互作用を探索し、さらに、それにより誘導される機能を解析、考察する。

3. 研究の方法

(1) インスリンを末梢投与し、視床下部における神経活性化マーカー-c-Fos の発現を測定した。(2) 活性化される細胞が含有する神経ペプチドを二重免疫染色で調べた。(3) 血中オキシトシン濃度を ELISA を用いて測定した。(4) 室傍核から単離したニューロンの細胞内 Ca 濃度を Fura-2 蛍光画像解析により測定した。(5) Cre-LoxP 系を用いて、インスリンの情報伝達分子の 1 つである PDK1 をオキシトシン細胞選択的に欠損させたマウスを作成した。(6) オキシトシン細胞選択的な PDK1 欠損マウスにおいて、インスリンを末梢投与して上記の測定を行い、視床下部神経の活性化と血中インスリン濃度の変化がいかに影響されるかを調べた。

4. 研究成果

成果:

インスリンを末梢投与すると、視床下部室傍核に神経活性化マーカー-c-Fos の顕著な発現が見られた。活性化される細胞を二重免疫染色で調べると、大型のオキシトシン神経が選択的に活性化されていた。さらに、血中オキシトシン濃度が著明に増加した。室傍核から単離した神経細胞内 Ca 濃度を測定し、インスリンを添加すると超微量の $10^{-13}\text{M} \sim 10^{-11}\text{M}$ で Ca 増加を起こし、応答細胞は大型のオキシトシン陽性細胞であった。大型のオキシトシン陽性細胞は下垂体に投射し末梢血にホルモンを分泌する神経内分泌ニューロンと考えられている。従って、微量インスリンは室傍核の神経内分泌オキシトシン神経細胞を活性化した。

Cre-LoxP 系を用いて、インスリンの情報伝達分子の 1 つである PDK1 をオキシトシン細胞選択的に欠損させたマウスにおいて、*in vitro* で $10^{-13}\text{M} \sim 10^{-11}\text{M}$ インスリンによる神経内分泌オキシトシン神経細胞の活性化が消失し、*in vivo* でインスリン末梢投与による末梢血中オキシトシン濃度増加が消失した (Zhang B, Nakata M, Nakae J, Ogawa W and Yada T. Central insulin action induces activation of paraventricular oxytocin neurons to release oxytocin into circulation. Scientific Reports 2018, *in press*)。

以上の結果より、視床下部室傍核のオキシトシン神経のうち、神経内分泌機能を営む大型のオキシトシン神経が選択的に、ピコモル域の超微量インスリンを受容すること、その結果末梢血中にオキシトシンが放出されることが明らかとなった。さらに、室傍核の神経内分泌オキシトシン神経の超微量インスリン応答には、細胞内情報伝達分子の PDK1 が必須であることがわかった。PDK1 には微量ホルモンの受容体刺激により作られる微弱シグナルを大幅に増幅して細胞内に伝える役割

があることが示唆された。

成果の意義：

この現象の生理的・病態的意義は、現在のところ明らかではないが、以下の考察ができる。糖尿病患者において生殖、妊娠、出産に障害が見られる場合があることはよく知られている。しかし、これらの障害と糖尿病との関連の機序はわかっていなかった。糖尿病は、インスリン分泌低下またはインスリン作用低下が成因となっている。生殖・妊娠・出産に関わるホルモンの1つがオキシトシンである。したがって、糖尿病におけるインスリン分泌低下・作用低下による効果の減弱が、オキシトシン分泌低下につながるならば、生殖・妊娠・出産の障害の説明が可能である。しかし、インスリンは末梢の膵臓のみで作られるホルモンであり、血液脳関門の通過率は極めて低いので、脳のオキシトシン神経細胞に作用することが可能かどうかは不明であった。本研究は、血液脳関門の通過により低下するオキシトシンレベルを、室傍核の神経内分泌オキシトシンニューロンが選択的に感知し、神経活動が活性化され末梢血中にオキシトシンが放出されることを明らかにした。この「末梢インスリン-室傍核神経内分泌オキシトシンニューロン活性化-末梢オキシトシン放出」カスケードにより生殖・妊娠・出産が正常に機能していることが示唆される。糖尿病では、インスリン分泌・作用低下の結果オキシトシン系の活動が低下し、生殖・妊娠・出産機能の障害につながるものが示唆される。さらに本研究は、神経内分泌オキシトシン神経細胞による微量インスリンの受容に PDK1 が重要な役割を担うことを明らかにした。したがって、上記のインスリン分泌・作用の低下に加えて、PDK1 シグナル伝達系の障害も、糖尿病や生殖機能障害の成因として関与する可能性が考えられる。この点を明らかにするためには、今後のさらなる研究が必要である。

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 3 件)

(1) Sasanuma H, Nakata M, Kumari P, Nakae J, Yada T. PDK1-FoxO1 pathway in AgRP neurons of arcuate nucleus promotes bone formation via GHRH-GH-IGF1 Axis. *Molecular Metabolism* 10.1016/j.molmet.2017.02.003. eCollection 2017 May.

(2) Iwasaki Y, Goswami C, Yada T. Glucagon-like peptide-1 and insulin synergistically activate vagal afferent neurons. *Neuropeptides*. 10.1016/j.npep.2017.05.003. Epub 2017 May 25.

(3) Zhang B, Nakata M, Nakae J, Ogawa W and Yada T. Central insulin action induces activation of paraventricular oxytocin neurons to release oxytocin into circulation. *Scientific Reports* 2018, in press.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 岩崎有作, 矢田俊彦. GLP-1 とインスリンは相乗的に求心性迷走神経を活性化させる。第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会。2017 年 ~ 2018 年

(2) 中田正範, 中江淳, Parmila Kumari, 張博洋, 小川渉, 矢田俊彦. 弓状核 AgRP ニューロンの PDK1 シグナルを起点とした血圧調節経路。第 38 回日本肥満学会。2017 年 ~ 2018 年

(3) 張博洋, 中田正範, Parmila Kumari, 小川渉, 矢田俊彦. インスリンによる室傍核オキシトシン神経活性化と血中オキシトシン濃度増加。第 38 回日本肥満学会。2017 年 ~ 2018 年

(4) 岩崎有作, グッサミ チャヨン, 矢田俊彦。GLP-1 とインスリンの協働作用による求心性迷走神経活性化: 食後機能、治療効果の推定機序。第 38 回日本肥満学会。2017 年 ~ 2018 年。

〔図書〕(計 0 件)

〔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

矢田俊彦 (TOSHIHIKO Yada)
自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60166527

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

中田正範 (MASANORI Nakata)
自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10305120

出崎克也 (TATSUYA Dezaki) 自
治医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90337329

岩崎有作 (YUSAKU Iwasaki)
自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60528420

須山成朝 (SHIGETOMO Suyama)
自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80528414

(4) 研究協力者

なし