

令和元年6月11日現在

機関番号：12301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：17K16139
研究課題名(和文) Sirt1によるシヨ糖嗜好性制御機構の解明

研究課題名(英文) Sirt1 regulates sucrose preference

研究代表者

松居 翔 (Matsui, Sho)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：80739673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖質は食行動の引き金として強力に作用する。そのため糖質摂取の制御機構の解明は、肥満やメタボリックシンドロームなどの健康問題の解決に重要である。本研究では以下のことを明らかにした。(1) FGF21の作用標的の一つにOxytocinニューロンがある。(2) SIRT1はNRF2を介してOxytocinの遺伝子発現を制御している。(3) SIRT1は Klothoの発現を増加させることで、FGF21シグナルを増強する。これらの研究結果から、OxytocinニューロンにおけるSIRT1は、FGF21-NRF2-Oxytocinシグナルを介して糖質嗜好性を制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の抗肥満のための摂食調節研究は、エネルギー恒常性の観点(どれだけ食べるのか)からのものが大半であり、食嗜好の観点(何を食べるのか)からのアプローチが不足している。本研究の特色は、エネルギー恒常性の観点からの摂食調節研究の知見を発展させて、食嗜好の問題に取り組む点にある。また、本研究の成果は、炭水化物過剰摂取により誘発される糖尿病をはじめとする生活習慣病に対する新たな治療法の開発に繋げる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Diet affects health as calorie and macronutrients once ingested. Macronutrient balance of ingested food affects health span, yet the mechanisms that regulate macronutrient-based diet selection are poorly understood. The health-promoting effects of a dietary regimen caloric restriction are partly mediated by SIRT1, which promotes fat utilization in peripheral tissues. We showed that SIRT1-mediated suppression of simple sugar preference required oxytocin signaling, and SIRT1 in oxytocin neurons was sufficient for the effect. The hepatokine FGF21 acted as an endocrine signal of simple sugar ingestion to oxytocin neurons; it promoted neuronal activation and oxytocin transcription, and it suppressed the simple sugar preference. Moreover, SIRT1 promoted FGF21 signaling in oxytocin neurons, and stimulated oxytocin transcription through NRF2. Therefore, neuronal SIRT1 regulate simple sugar preference via FGF21-oxytocin signaling.

研究分野：分子栄養学

キーワード：糖質嗜好性 SIRT1 FGF21 Oxytocin

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関が各種の疾病負荷の指標として採用する障害調整生命年によれば、2013年の危険因子トップ25のうち13項目が食や肥満に関連する項目である (Forouzanfar MH *et al. Lancet*. 2015)。また、2015年の疫学調査によれば、世界の健康リスクトップ10のうち、肥満は4番目の危険因子にあげられる (GBD 2015 Risk Factors Collaborators. *Lancet*. 2016)。肥満症治療に食事療法と運動療法は欠かせないが、患者のアドヒアランスが低いことが課題である。食餌療法を必要とする患者のアドヒアランスを下げる要因の一つが糖質である。糖質は、高嗜好性かつ行動強化力が高く、肥満症患者の多くの特徴であるエネルギーの過剰摂取や間食の習慣化などの食行動の乱れを引き起こす。そこで、糖質嗜好性メカニズムの解明をとおし、患者が遵守できる食事療法の開発につなげることを目指す。

長寿遺伝子 SIRT1 は、NAD⁺依存性の脱アセチル化酵素で、カロリー制限という食餌療法の健康長寿効果を担う分子の一つである。これまでに当研究室では、恒常的摂食調節機構における SIRT1 の役割を解明してきた。他方、恒常的エネルギーバランス調節における SIRT1 の役割は解明できたが、食嗜好における SIRT1 の役割が未解明の課題として残った。そこで中枢神経系の SIRT1 が食嗜好に關与するかどうか検討した。

申請者は、神経特異的 SIRT1 過剰発現 (NS-KI) およびノックアウト (NS-KO) マウスを用いて高シヨ糖食への嗜好性解析と脳内遺伝子発現解析、および視床下部細胞株を用いた遺伝子発現解析より、以下の事を見出した。(1) 中枢性 SIRT1 は、シヨ糖嗜好性を抑制する。(2) 視床下部 SIRT1 は、オキシトシン (Oxt) の遺伝子発現を正に制御する。(3) SIRT1 による Oxt 遺伝子発現制御の責任領域は、Oxt プロモーターの-3.2~-2.1kb の間に存在する。Oxt は視床下部の室傍核と視索上核の神経分泌細胞で主に合成される。下垂体後葉から分泌されるのみならず、神経伝達物質として脳内に分泌され Oxt 受容体発現ニューロンに作用し摂食抑制を示す (Verbalis *et al. Science*. 1986; Leng G *et al. Prog Brain Res*. 2008)。加えて、中枢の Oxt はシヨ糖嗜好性を抑制する (Amico J *et al. Am J Physiol*. 2005; Olszewski PK *et al. Endocrinology*. 2010; Mullis K 2013)。これまでに申請者が見出した結果と、上記の報告から、Oxt ニューロンにおける SIRT1 がシヨ糖嗜好性の制御に重要であることが示唆される。そこで、Oxt ニューロン特異的 SIRT1 過剰発現 (Oxt-KI) およびノックアウト (Oxt-KO) マウスを作成し、Oxt ニューロンにおける SIRT1 の高シヨ糖食嗜好への影響を検討し、以下の事を見出している。(4) Oxt ニューロンにおける SIRT1 は、シヨ糖嗜好性を抑制する。(5) SIRT1 によるシヨ糖嗜好性抑制には、Oxt シグナルが必要である。また最近、Fibroblast growth factor (FGF21) が視床下部室傍核に作用しシヨ糖嗜好性を抑制することが報告された (von Holstein-Rathlou S *et al. Cell Metab*. 2016)。FGF21 は、飢餓や高炭水化物食で主に肝臓で合成され、FGF21 受容体 (-Klotho / FGFR1) 発現組織に作用し、MEK/ERK のリン酸化を引き起こす (Kharitonov A1 and Larsen P. *Trends Endocrinol Metab*. 2011)。上記の報告とこれまでの結果から、申請者は、FGF21 のシヨ糖嗜好性抑制機構の一つに Oxt シグナルが關与する可能性を考え、視床下部細胞株を用いた遺伝子発現解析より、以下の事を見出した。(6) FGF21 は、Oxt の遺伝子発現を正に制御する。(7) SIRT1 は、FGF21 受容体を構築する -Klotho の遺伝子発現を正に制御する。

これらの事から、SIRT1 は FGF21-Oxt シグナルを増強することでシヨ糖嗜好性を制御している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、以下に示すことを明らかにする。

(1) FGF21 による Oxt 制御機構を明らかにする。

(2) SIRT1 による Oxt 制御機構を明らかにする。

そして、Oxt ニューロンにおける SIRT1 による糖質嗜好性制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) Oxt ニューロンは、FGF21 の作用標的か？

中枢における Oxt ニューロンは、視床下部の室傍核と視索上角に存在する。既報では、FGF21 投与後に視床下部室傍核の神経の活性化が確認されている (von Holstein-Rathlou S *et al. Cell Metab*. 2016)。しかし、室傍核のどのニューロンが活性化したのかは明らかになっていない。また、FGF21 と Oxt の関係についての既報は皆無である。そこで、まず FGF21 受容体を構築するのに必要な -Klotho が Oxt ニューロンに存在するかどうかを *in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫染色法による二重染色で確認する。加えて、マウスに FGF21 を IP 投与し、神経活性化マーカーの一つである cFos の発現が Oxt ニューロンで増加するのかが検討する。

(2) SIRT1 による Oxt 遺伝子発現制御機構の解明

() SIRT1 は、転写因子と相互作用を示し Oxt の遺伝子発現を制御するのか？

申請者は、Oxt プロモーターの-3.2~-2.1kb の間に SIRT1 による Oxt 遺伝子発現責任領域が存在することを明らかにしている。他方、同領域で Oxt の転写調節を行う転写因子は不明

であり、また、その転写因子が SIRT1 と相互作用を示すのかも不明である。そこで、クロマチン免疫沈降や共免疫沈降法を用い、転写因子の探索を行う。加えて、同定した転写因子の結合配列に変異を加え、同配列が本当に重要なのかを明らかにする。

() SIRT1 は、FGF21-0xt シグナルを増強するのか？

申請者はこれまでに、視床下部細胞株に FGF21 を添加すると 0xt の遺伝子発現が増加することを見出している。そこで、FGF21 シグナルによる 0xt の遺伝子発現調節への SIRT1 の関与を検討する。

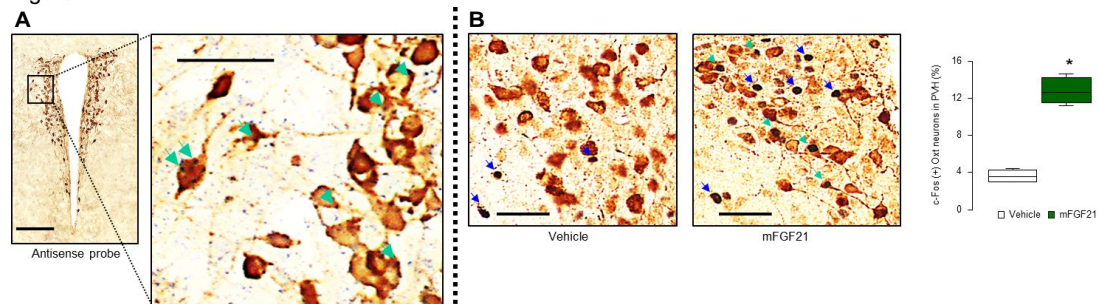
FGF21 は、-Klotho/FGFR1c 発現組織に作用し、ERK のリン酸化を引き起こす。そこで、-Klotho/FGFR の発現する視床下部細胞株に FGF21 を添加し、その効果により増加した ERK、Akt のリン酸化が、SIRT1 の増減で変化を示すのかを検討する。

4. 研究成果

(1) FGF21 の作用標的の一つに 0xt ニューロンがある

in situ ハイブリダイゼーション法と免疫染色の結果、視床下部室傍核 0xt ニューロン上に -Klotho の発現を確認した (Figure1 A; 緑色の矢印: -Klotho)。また、10 週齢雄 C57BL/6 マウスに FGF21 を IP 投与したところ、0xt ニューロン上の cFos 発現量が増加することを確認した (Figure1 B; 緑色矢印: 0xt ニューロン上の cFos, 青色矢印: cFos)。これらの結果から、FGF21 の脳内の作用標的の一つに 0xt ニューロンがあることが明らかになった。

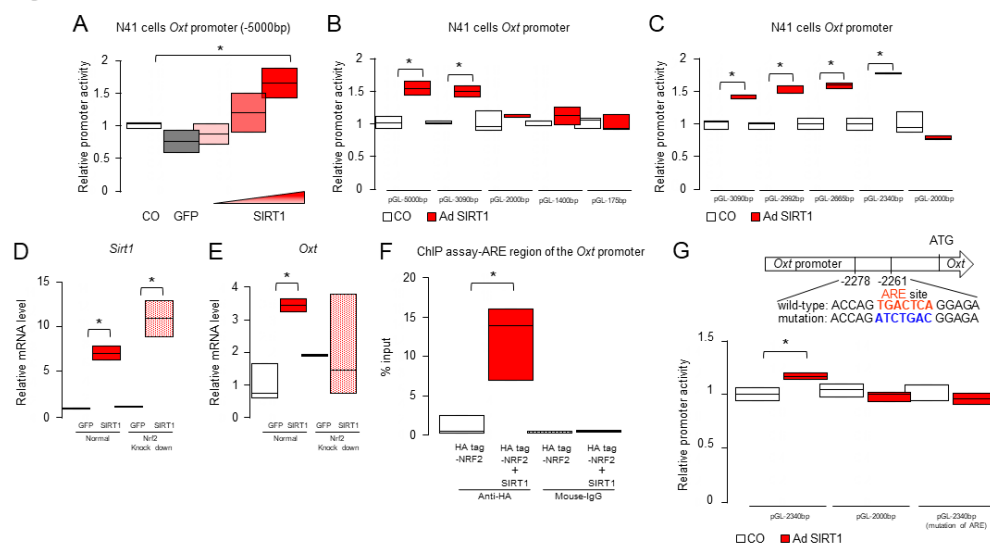
Figure 1.



(2) SIRT1 は NRF2 を介して 0xytocin の遺伝子発現を制御する

視床下部 N41 細胞における 0xt プロモーター-3090bp ~ 2000bp のルシフェラーゼアッセイの結果、2340-2000bp の間に SIRT1 による 0xt 遺伝子発現制御に関わる責任領域が存在することが明らかになった (Figure2 A-C)。また、N41 細胞で NRF2 をノックダウンすると、SIRT1 による 0xt 遺伝子発現増加作用がキャンセルされた (Figure2 D, E)。次に ChIP assay を行ったところ、SIRT1 過剰発現で NRF2 が 0xt プロモーターに結合することが明らかになった (Figure2 F)。さらに、2340-2000bp 領域に存在する NRF2 結合サイトにミューテーションを加えると、SIRT1 過剰発現で認められるプロモーター活性がキャンセルされることが明らかになった (Figure 2 G)。これらの結果から、SIRT1 による 0xt 遺伝子発現制御には NRF2 が必要であることが明らかになった。

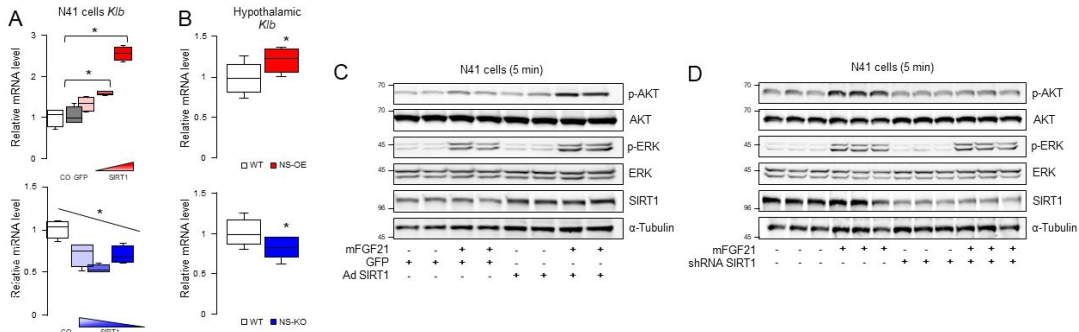
Figure 2



(3) SIRT1は -Klothoの発現を増加させることで、FGF21シグナルを増強する

視床下部不死化細胞N41においてSIRT1を過剰発現すると、-Klothoの発現が増加し、SIRT1をノックダウンすると -Klothoの発現は減少した (Figure3 A)。また、神経特異的SIRT1遺伝子改変マウスの視床下部においてSIRT1を過剰発現すると -Klothoの発現が増加し、SIRT1をノックアウトすると -Klothoの発現が減少を示した (Figure3 B)。さらに、FGF21の下流シグナルであるERKとAKTのリン酸化は、N41細胞においてSIRT1の過剰発現で増強され、ノックダウンで減弱することが明らかになった (Figure3 C, D)。この結果から、SIRT1は、-Klothoの発現を制御し、FGF21シグナルを調節することが明らかになった。

Figure 3



これらの実験結果から、OxtニューロンにおけるSIRT1は、FGF21-NRF2-Oxtシグナルを介して糖質嗜好性を制御していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)(すべて査読あり)

1. Suga T, Kikuchi O, Kobayashi M, **Matsui S**, Yokota-Hashimoto H, Wada E, Kohno D, Sasaki T, Takeuchi K, Kakizaki S, Yamada M, Kitamura T. SGLT1 in pancreatic cells regulates glucagon secretion in mice, possibly explaining the distinct effects of SGLT2 inhibitors on plasma glucagon levels. *Mol Metab.* 19:1-12. 2019.
2. **Matsui S**, Sasaki T, Kohno D, Yaku K, Inutsuka A, Yokota-Hashimoto H, Kikuchi O, Suga T, Kobayashi M, Yamanaka A, Harada A, Nakagawa T, Onaka T, Kitamura T. Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice. *Nat Commun.* 2;9(1):4604. 2018.
3. Sasaki T, Numano R, Yokota-Hashimoto H, **Matsui S**, Kimura N, Takeuchi H, Kitamura T. A central-acting connexin inhibitor, INI-0602, prevents high-fat diet-induced feeding pattern disturbances and obesity in mice. *Mol Brain.* 24;11(1):28. 2018.
4. Sasaki T, Yasoshima Y, **Matsui S**, Yokota-Hashimoto H, Kobayashi M, Kitamura T. Intraperitoneal injection of d-serine inhibits high-fat diet intake and preference in male mice. *Appetite.* 1;118:120-128. 2017.

[学会発表](計4件)

国際会議における発表 (すべて査読あり)

1. **Matsui S**, Sasaki T, Kohno D, Yokota-Hashimoto H, Kobayashi M, Kitamura T. Oxytocin neuron in the paraventricular nucleus of the hypothalamus regulates FGF21- and SIRT1-based simple sugar preference in mice. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Functional Neurocircuitry of Feeding and Feeding Disorders) (Canada), 2019年2月
2. Sasaki T, **Matsui S**, Kohno D, Kitamura T. Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Functional Neurocircuitry of Feeding and Feeding Disorders) (Canada), 2019年2月
3. Sasaki T, **Matsui S**, Kohno D, Yokota-Hashimoto H, Kobayashi M, Kitamura T. SIRT1 suppresses simple sugar preference by regulating oxytocin through NRF2. (ポスター) Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease) (横浜), 2017年5月
4. **Matsui S**, Sasaki T, Kohno D, Yokota-Hashimoto H, Kobayashi M, Kitamura T. Sirt1 regulates simple sugar selection through FGF21 and oxytocin. (ポスター) Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Neuronal Control of Appetite, Metabolism and Weight) (Copenhagen, Denmark), 2017年5月

国内学会・シンポジウム等における発表 (すべて査読あり)

1. **松居 翔**、佐々木 努、河野 大輔、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘、視床下部室傍核オキシトシンニューロンの SIRT1 がシヨ糖嗜好性を制御する、第 39 回日本肥満学会、2018 年 10 月 (兵庫)
2. **松居 翔**、佐々木 努、河野 大輔、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘、SIRT1 はシヨ糖摂食選択行動を制御する、日本栄養・食糧学会 (岡山)、2018 年 5 月
3. **松居 翔**、佐々木 努、河野 大輔、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘、SIRT1 は FGF21-NRF2-oxytocin シグナルを介してシヨ糖嗜好性を制御する、第 91 回日本内分泌学会学術総会、2018 年 5 月 (宮崎)
4. **松居 翔**、佐々木 努、河野 大輔、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘、SIRT1 はシヨ糖摂食選択行動を制御する、2018 年度日本農芸化学大会、2018 年 3 月 (愛知)
5. **松居 翔**、佐々木 努、河野 大輔、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘、SIRT1 は FGF21-NRF2-oxytocin シグナルを介してシヨ糖嗜好性を制御する、第 38 回日本肥満学会、2017 年 10 月 (大阪)
6. **Matsui S**, Sasaki T, Kohno D, Yokota-Hashimoto H, Kobayashi M, Kitamura T. Sirt1 regulates simple sugar selection through FGF21 and oxytocin. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (千葉)、2017 年 7 月
7. **松居 翔**、佐々木 努、河野 大輔、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘、「FGF21 によるオキシトシン発現制御機構の解析」、第 90 回日本内分泌学会学術総会 (京都)、2017 年 4 月
8. **Matsui S**, Sasaki T, Kohno D, Yokota-Hashimoto H, Kobayashi M, Kitamura T. Sirt1 regulates sucrose diet selection behavior. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (浜松)、2017 年 3 月

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。