

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08468

研究課題名(和文) 嗅覚系による代謝調節機構の解明に基づいた糖尿病嗅覚療法の開発

研究課題名(英文) The finding of functional link between olfactory and metabolic system: a novel perspective on diabetes research

研究代表者

恒枝 宏史 (TSUNEKI, Hiroshi)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：20332661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚と代謝が機能的に連係するかを明らかにするため、空腹時の食餌の匂い刺激が食前と食後の糖・脂質代謝に及ぼす影響をマウスを用いて検証した。その結果、嗅覚刺激後、食前では脂肪動員が増加し、食後では脂質利用の促進を認めた。長期的には、肥満マウスにおける糖代謝異常の進展が嗅覚刺激によって防止され、嗅覚破壊によって増悪した。このように、嗅覚系と代謝系が連係し、糖・脂質代謝の最適化に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

五感のうち、特に嗅覚には未知の潜在能力が多く残されている。本研究では、内分泌代謝学的観点から嗅覚の超機能の解明に挑み、パブロフによる条件反射の概念提起の後、一世紀にわたり不明であった嗅覚と代謝の関係を実証した。さらにその活用法として、嗅覚が肥満に伴う代謝異常の防止に寄与する可能性を示した。嗅覚系を起点とした中枢性代謝調節の発見は、従来の肥満・糖尿病の治療法を発展させる新基盤になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate whether there is functional link between olfaction and metabolism, the impacts of food-odor stimulation before meal on glucose/lipid metabolism were investigated in mice. The olfactory stimulation promoted lipid mobilization during fasting and lipid utilization during refeeding. In obese mice, the development of glucose intolerance was prevented by the olfactory stimulation, whereas glucose intolerance was exacerbated by disruption of the olfactory system. These results indicate that the olfactory system plays a crucial role in the maintenance of glucose/lipid homeostasis.

研究分野：糖尿病・内分泌代謝学

キーワード：糖尿病 エネルギー・糖・脂質代謝異常 脳・神経・嗅覚 生体リズム 臓器連関 中枢性代謝調節

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

一世紀前に、有名な「パブロフの犬」の実験(1910年)が示した通り、視覚や聴覚など食餌に関する知覚情報は食前に消化や吸収機能に影響を及ぼす。これらの機構は脳で制御されることから「頭相応答」と呼ばれている。匂いも重要な知覚情報の一つである。また、嗅覚機能は空腹時に亢進することや、肥満および2型糖尿病患者が嗅覚障害を呈することが報告されている。しかし、嗅覚が糖・脂質代謝に及ぼす影響については少数の報告が散見されるのみであり、全体像は不明であった。

また近年、肝臓、骨格筋、脂肪組織などの代謝に関わる末梢組織において、空腹状態から摂食状態(またはその逆)に移行する過程で、代謝関連酵素の発現様式をダイナミックにシフトさせる転写機構などが次々に見出され、生体のエネルギー状態に合わせた代謝適応が糖尿病などの代謝疾患の防止に重要である点に注目が集まっている。さらに、摂食行動が起こる前に、代謝機能を空腹時型から摂食時型にシフトさせ、代謝効率を上げる機構として、脳による臓器連関調節機構が存在する。嗅覚情報は脳の嗅球で処理された後、視床下部などへ伝達される。視床下部は全身のエネルギー恒常性を維持する役割を果たす脳領域であるので、嗅覚系は視床下部を介して代謝適応を促進する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

今日、糖・脂質代謝機能の改善法や、糖尿病などの代謝疾患に対する治療法を発展させる鍵を握っているのが「脳」であるとの理解は広がっている。しかし、脳への薬物投与方法には技術的な難点が多く、実現に至っていない。この現状打破への糸口をつかむため、本研究では「嗅覚系」と「代謝系」の連係機構に焦点を当てた。嗅覚系は、代謝中枢である脳の視床下部と密接な連係を有するので、嗅覚刺激により視床下部機能を生体外から非侵襲性に制御することで末梢組織の代謝機能を調節できる可能性が考えられる。特に、食前の嗅覚刺激は脳-自律神経系を介して代謝機能を最適化し、その急性効果の積み重ねが長期的には糖尿病の防止に寄与する可能性もある。そこで本研究では、マウスを用いて、(1)嗅覚刺激が空腹時と再摂食時の糖・脂質代謝を変化させるか、(2)嗅覚系と代謝系はどのような機序で連係するのか、(3)嗅覚刺激が糖尿病の発症防止に寄与するか、を検証した。これらの研究を通じて、「嗅覚系は脳の視床下部による糖・脂質代謝調節を促進し、糖尿病を防止するか?」という学術的問いの解明を目指した。

3. 研究の方法

マウスに対する食餌性嗅覚刺激法として、多数の小孔を有する遮光チューブ内に餌を充填し、絶食マウスに視覚情報を与えることなく食餌の匂いを受容させた。本手法によるマウスへの嗅覚情報伝達の正確性を評価するため、通常食、高脂肪食、高スクロース食を充填したチューブ、または無充填チューブの計4本を密閉ケージ内の四隅に設置し、マウスの嗅覚識別能力に基づく探索行動をビデオ解析した。対照実験として、食餌探索行動における視覚情報の寄与を検証するために、無色透明の瓶に各食餌を充填して密閉ケージの四隅に設置し、マウスの視覚に基づく探索時間を計測した。

嗅覚情報伝達用遮光チューブ1本を設置した密閉ケージ内で絶食マウスを自由行動させ、餌の充填の有無により、嗅覚刺激群と非刺激群(対照群)を作製した。1時間の嗅覚刺激の後、3時間再摂食させ、空腹時の食餌の匂い刺激が食後の代謝機能に与える影響を次のように解析した。糖・脂質代謝の変化を評価するため、経口糖負荷試験、インスリン負荷試験、ビルビン酸負荷試験、血清パラメータ解析を行った。エネルギー消費量や自発運動量の変化は小動物用代謝測定システムで解析した。さらに、摘出組織を用いてウェスタンブロット解析、RT-PCR および RNA-Seq による遺伝子発現解析、ガスクロマトグラフィーによるメタボローム解析を行った。

一方、嗅覚機能の破綻が代謝機能に及ぼす影響を検証するため、マウスの嗅球を摘除し、1週間の回復期間の後、高脂肪食を負荷した。耐糖能の変化は糖負荷試験で解析した。エネルギー代謝等は小動物用代謝測定システムにより測定した。また、肝臓や脂肪組織を摘出し、嗅覚破壊に伴う遺伝子発現変化を RT-PCR および GeneChip 法で解析した。

4. 研究成果

本研究で開発した嗅覚刺激装置で C57BL/6J マウスの匂い探索行動を4択試験で評価した結果、通常食のみ摂食経験のあるマウスは、通常食充填チューブに最も高い嗜好性を示した。同マウスに高脂肪食の摂食を経験させると、その後は高脂肪食充填チューブに対し最も高い嗜好性を示した。一方、視覚に基づく食餌探索行動の解析では、嗜好性とは無関係な探索行動を示したことから、マウスは視覚を利用することなく嗅覚機能を用いて食餌の種類を判別することが示され

た。このように、本研究で開発した食餌性嗅覚刺激装置はマウスに対し的確に嗅覚情報を伝達できることが示された。そこで、本装置を活用して嗅覚系と代謝系の関係について解析し、以下の成績を得た。

(1) 嗅覚刺激が糖・脂質代謝に及ぼす影響の解析

絶食下での食餌性嗅覚刺激により、血中遊離脂肪酸濃度が増加した。また、糖負荷試験で評価した耐糖能には嗅覚刺激の影響は認められなかったが、ピルビン酸負荷試験で評価した肝糖新生の活性が抑制されることを見出した。このように、食前の食餌の匂い刺激は、エネルギー源を糖から脂肪酸に変換することが示唆された。

次に、空腹時嗅覚刺激後の再摂食時におけるエネルギー代謝の変化を代謝測定装置で解析した結果、脂質利用との関連を認めた。肥満マウスではこのエネルギー代謝のモード変換に異常を認めた。なお、空腹時の食餌性嗅覚刺激は再摂食後の摂食量や血糖値には影響しなかった。嗅覚刺激群と非刺激群の血清パラメータを比較した結果、血清インスリン濃度に差はなかったが、肝臓からの VLDL (コレステロールと中性脂肪) 分泌は嗅覚刺激群で増加した。また、肝臓の小胞体ストレスマーカーの発現量は嗅覚刺激で低下した。メタボローム解析の結果、臓器特異的な代謝活性の変動が嗅覚刺激で誘発されることを見出した。経口投与した脂質の吸収効率も嗅覚刺激群で増加した。これらの結果より、食前の食餌の匂い刺激は代謝適応を誘発し、再摂食時において糖利用型から脂質利用型にシフトさせることが示唆された。

(2) 嗅覚系と代謝系の関係機構の解析

嗅覚 - 代謝系の関係を誘導するメカニズムを解明するため、まず、マウスに対し空腹時に食餌性嗅覚刺激を行い、9つの末梢組織(肝臓、腎臓など)の遺伝子発現を RNAseq 法で網羅的に解析した。その結果、各組織に固有の発現変動が生じた。特に、代謝調節に関わる脂肪組織、膵臓および骨格筋における遺伝子発現変化の要因をバイオインフォマティクス手法で解析した結果、脂肪・蛋白の消化吸収との関連が示された。Western blot 法により脂肪分解マーカーであるホルモン感受性リパーゼのリン酸化の変動を解析した結果、嗅覚刺激に伴い内臓脂肪組織における脂肪分解が促進することが示された。さらに、空腹時において、食餌性嗅覚刺激が血中遊離脂肪酸を増加させる中枢機序を薬理遺伝学的手法(DREADD 法)により解析した結果、梨状皮質神経の抑制による嗅覚記憶の障害に伴い脂質動員が消失することを見出した。これらの結果より、食餌性嗅覚刺激に伴う嗅覚記憶の想起が、白色脂肪組織からの脂質動員を誘発することが示された。

(3) 長期的な嗅覚刺激および嗅覚破壊が肥満に伴う代謝異常に及ぼす影響の解析

高脂肪食負荷した C57BL/6J マウスに対し、食前の食餌性嗅覚刺激を長期的に与え、糖・脂質代謝の変化を解析した。その結果、非刺激群と比較し、嗅覚刺激群では随時血糖値の低下およびインスリン抵抗性の改善を認めた。

次に、高脂肪食負荷した C57BL/6J マウスにおいて、嗅覚消失が代謝機能に及ぼす影響を検証した。嗅球摘除による嗅覚消失マウスに長期間高脂肪食を負荷し、対照(偽手術)群と比較した結果、嗅覚消失により短期間の高脂肪食負荷時では耐糖能が改善したが、長期間の高脂肪食負荷時では逆に耐糖能異常とインスリン抵抗性が増悪した。したがって、嗅覚系は食餌性肥満により誘発される糖代謝異常を防止することが示された。なお、自発運動量やエネルギー消費量には差異を認めなかった。さらに、嗅球摘出マウスを用いて嗅覚消失が糖・脂質代謝に及ぼす影響を遺伝子発現網羅的解析法で検証した結果、高脂肪食負荷条件下での肝臓の遺伝子発現が糖尿病、非アルコール性脂肪性肝疾患、肝線維化などに関連することが示された。このように、長期的な嗅覚破壊が肥満に伴う耐糖能異常を増悪させることから、嗅覚系はエネルギー恒常性の維持に重要な役割を果たしており、その破壊は2型糖尿病などの代謝異常を誘発すると考えられる。

これらの結果より、肥満に伴う糖・脂質代謝異常を防止するために、嗅覚系が重要な役割を果たすことが示された。

以上、食前の食餌の匂い刺激は嗅覚記憶依存的に、エネルギー源として脂質を動員し、再摂食時には脂質利用の効率を高めて、糖・脂質恒常性の維持に寄与することが示された。しかも、肥満マウスにおける嗅覚系の刺激および破壊実験により、長期的には、嗅覚系の入力肥満に伴う糖・脂質代謝異常の進展を防止するために必要であることが示された。このように、嗅覚系と代謝系は密接に関連しており、その関係機構は肥満や糖尿病などの代謝疾患を防止するための重要な標的であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuneki H, Yoshida H, Okamoto K, Yamaguchi M, Endo K, Nakano A, Tsuda M, Toyooka N, Wada T, Sasaoka T	4. 巻 851
2. 論文標題 AS1949490, an inhibitor of 5'-lipid phosphatase SHIP2, promotes protein kinase C-dependent stabilization of brain-derived neurotrophic factor mRNA in cultured cortical neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 69-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2019.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kon K, Tsuneki H, Ito H, Takemura Y, Sato K, Yamazaki M, Ishii Y, Sasahara M, Rudich A, Maeda T, Wada T, Sasaoka T	4. 巻 243
2. 論文標題 Chronotherapeutic effect of orexin antagonists on glucose metabolism in diabetic mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Endocrinol	6. 最初と最後の頁 59-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-18-0708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 1件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 前田 貴大, 恒枝 宏史, 杉山 聖典, 石塚 日菜子, 和田 努, 笹岡 利安
2. 発表標題 視床下部オレキシンの自律神経を介した肝ERストレス制御による非アルコール性脂肪肝炎および肝細胞癌の進展防御機構.
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田貴大, 恒枝宏史, 杉山聖典, 高田慎治郎, 今 寛太, 大塚小由希, 小野木康弘, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 オレキシンの中枢作用による肝小胞体ストレスと慢性炎症の改善を介したNASH発症の防止効果.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 Olfactory regulation of lipid and glucose metabolism during fasting.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuneki H, Sato K, Kon K, Wada T, Sasaoka T
2. 発表標題 Lemborexant, a novel orexin receptor antagonist for insomnia, improves glucose metabolism in type 2 diabetic mice.
3. 学会等名 55th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maeda T, Tsuneki T, Kon K, Takata S, Otsuka K, Wada T, Sasaoka T
2. 発表標題 Hypothalamic orexin prevents NASH by improving hepatic ER homeostasis in obese mice.
3. 学会等名 The 18th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田貴大, 恒枝宏史, 今 寛太, 高田慎治郎, 大塚小由希, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 視床下部オレキシンによる肝小胞体ストレス応答の改善は非アルコール性脂肪肝炎の進展を防止する.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今 寛太, 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 2型糖尿病マウスにおけるオレキシン受容体サブタイプ選択的拮抗薬による時間依存的糖代謝改善効果.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 恒枝宏史, 吉田ひとみ, 山口実佐子, 岡本健太郎, 中野 歩, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 リビッドホスファターゼSHIP1, SHIP2およびPTENの薬物制御によるBDNF発現調節から見た糖尿病性認知機能障害の治療戦略.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤清史, 恒枝宏史, 今 寛太, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 オレキシン受容体拮抗薬レンボレキサントが肥満マウスの糖代謝異常に及ぼす影響の解析.
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田大樹, 恒枝宏史, 大西兼悟, 松岡幸奈, 湯舟香春, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 2型糖尿病防止に関わる中枢性代謝調節機構における嗅覚系の役割の解析.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤清史, 恒枝宏史, 今 寛太, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 2型糖尿病マウスにおける不眠症治療薬レンボレキサントの糖代謝改善効果.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 恒枝宏史, 前田貴大, 高田慎治郎, 今 寛太, 大塚小由希, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 視床下部オレキシンによる肝小胞体ストレスの改善を介したNASH進展防止機構.
3. 学会等名 第31回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 恒枝宏史, 前田貴大, 高田慎治郎, 大塚小由希, 今 寛太, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 肥満マウスの非アルコール性脂肪肝炎(NASH)進展防止における視床下部オレキシン系の役割.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kon K, Tsuneki H, Takata S, Maeda T, Wada T, Sasaoka T
2. 発表標題 Hypothalamic orexin is essential for estrogenic action on glucose and energy metabolism in diet-induced obese mice.
3. 学会等名 American Diabetes Association 78th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuneki H, Kon K, Takata S, Maeda T, Koshida C, Wada T, Sasaoka T
2. 発表標題 Hypothalamic orexin prevents obesity and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed high fat diet.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida H, Tsuneki H, Yamaguchi M, Okamoto K, Wada T, Sasaoka T
2. 発表標題 Analysis of regulatory mechanism of brain-derived neurotrophic factor BDNF function by lipid phosphatase SHIP2.
3. 学会等名 The third international symposium on Toyama-Asia-Africa pharmaceutical network (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuneki H, Kon K, Takata S, Maeda T, Otsuka K, Wada T, Sasaoka T
2. 発表標題 Hypothalamic orexin system prevents the development of non-alcoholic fatty liver disease in diet-induced obese mice.
3. 学会等名 54th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹岡利安, 今 寛太, 和田 努, 恒枝宏史
2. 発表標題 オレキシンによる睡眠・覚醒と糖代謝調節.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田ひとみ, 恒枝宏史, 山口実佐子, 岡本健太郎, 中野 歩, 遠藤宏祐, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 リビッドホスファターゼSHIP2による脳由来神経栄養因子BDNF機能の制御機構の解析.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今 寛太, 恒枝宏史, 高田慎治郎, 前田貴大, 大塚小由希, 越田千晶, 東海絵美, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 エストロゲンは視床下部オレキシン系を介して閉経肥満マウスの耐糖能異常を防御する.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 恒枝宏史, 大西兼悟, 前田貴大, 高月真由美, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 2型糖尿病マウスにおけるプロモクリプチンのドパミンD2受容体非依存的な耐糖能改善作用.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹岡利安, 恒枝宏史
2. 発表標題 オレキシンによる睡眠・覚醒と糖代謝調節.
3. 学会等名 日本睡眠学会第43回定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今 寛太, 恒枝宏史, 前田貴大, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 糖尿病防止における視床下部オレキシンによる代謝調節の意義.
3. 学会等名 第69回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田ひとみ, 恒枝宏史, 山口実佐子, 岡本健太郎, 遠藤宏祐, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 5'-リビッドホスファターゼSHIP2阻害剤による脳由来神経栄養因子BDNF発現の増強効果.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田慎治郎, 恒枝宏史, 今 寛太, 前田貴大, 大塚小由希, 関根崇洋, 高崎一郎, 和田 努, 笹岡利安
2. 発表標題 視床下部オレキシン系による肥満と非アルコール性脂肪肝炎の防御効果.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学薬学部 病態制御薬理学研究室 http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	笹岡 利安 (SASAOKA Toshiyasu) (00272906)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関