

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591125

研究課題名（和文） 視床下部ペプチドによるうつの制御機構の破綻がインスリン抵抗性を惹起する機序の解明

研究課題名（英文） Involvement of hypothalamic orexin in the development of insulin resistance associated with depression

研究代表者

恒枝 宏史 (TSUNEKI HIROSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・准教授

研究者番号：20332661

研究成果の概要（和文）：うつ状態においてインスリン抵抗性が増大し、糖尿病の発症リスクが増加するメカニズムを解明するため、社会性敗北ストレス負荷マウスの糖代謝機能の変化を解析し、慢性的なうつが耐糖能障害およびインスリン抵抗性を誘発することを実証した。さらにその機序に視床下部オレキシン神経系が関与することを見出し、うつと関連した 2 型糖尿病の発症に対し、オレキシン神経系が重要な治療標的である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Depression is known to be associated with an increased risk of type 2 diabetes. To reveal its pathophysiological mechanism, we investigated the changes in glucose metabolism in a mouse model of depression, and found that chronic social defeat stress caused depressive symptoms, the impairment of glucose tolerance and insulin resistance, probably through abnormal function of hypothalamic orexin system. Thus, hypothalamic orexin may be a novel target to treat type 2 diabetes associated with depression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣の欧米化やストレス社会の拡大に伴い、2 型糖尿病やうつ病の罹患率が増加している。しかもこれら 2 つの疾患の発症には関連性が認められており、最近のメタ解析では、うつにより糖尿病の発症リスクが増大する可能性が指摘されている (Diabetes Care 31: 2383, 2008)。しかし、現在、その

機序は不明である。

うつは、主に脳内のモノアミン系神経伝達の異常と位置付けられているが、最近、視床下部ペプチドのオレキシンがうつに関与することが報告され、うつ病態における視床下部機能の重要性が注目されている。その根拠として、うつ患者の脳脊髄液中でオレキシン A 濃度が低下していること (Eur Neuro-psychopharmacol, 9: 573, 2007)、慢性的な

ストレス刺激を受けたマウスでは、視床下部外側野のオレキシン神経の数が減少し、ストレスへの対応が困難になること、さらにストレス刺激後でも、摂食カロリー制限を行うとオレキシン神経が活性化し、ストレス適応が可能になることが報告されている(Nat Neurosci, 7: 752, 2008; J Neurosci, 28: 3071, 2008)。

視床下部は生体のエネルギーバランス調節の統合中枢であり、その中でもオレキシンは個体の生存に必須の因子として中心的な役割を果たしている。すなわち、オレキシンは血糖値が低下した際に視床下部外側野で発現し、覚醒レベルや自発運動量(探索行動)を増加させ、摂食行動を導く役割を果たしている(Nat Rev Neurosci, 8:171, 2007)。また我々は、オレキシンが糖代謝調節においても重要な役割を果たしており(Eur J Pharmacol, 448: 245, 2002)、オレキシン欠損マウスでは加齢に伴い耐糖能異常およびインスリン抵抗性が誘発されることを見出した(Diabetologia, 51: 657, 2008)。実際、オレキシンを欠損したヒトではナルコレプシー症状(睡眠障害)が認められ、しかもその多くは肥満となり、2型糖尿病のリスクが増大する(Lancet, 355:1274, 2000)。したがって、慢性的な心理的ストレスに曝露された場合、視床下部オレキシン神経系の機能異常を契機に、うつとグルコース恒常性の破綻が誘発されると考えられる。哺乳類の進化の過程では「飢餓」は最大のストレスであったことから、オレキシンはストレスに対する精神面および身体面での防御の要として機能している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

うつ状態では精神運動機能の低下のために行動量が減少し、全身のエネルギー消費が減少することで、二次的にインスリン抵抗性や耐糖能障害が生じると考えられてきた。これに対して本研究では、うつとインスリン抵抗性の接点に視床下部オレキシン神経が存在し、うつによるオレキシンの機能異常が、糖代謝異常を誘発する可能性を追究する。そのため、マウスを用いた *in vivo* 実験により、まずオレキシンの欠損がインスリン抵抗性を引き起こす機序を詳細に検討する。次に、マウスに心理的ストレスを負荷した後のインスリン感受性や耐糖能の変化を検討し、その異常がオレキシンに依存していることを明らかにする。本研究により、慢性的なうつ状態による視床下部神経ペプチドの作用強度の変化がインスリン抵抗性を直接的に誘発することを明らかにすることで、うつと関連した2型糖尿病の発症に対し、より効果的な治療戦略を創出することを目的とする。

3. 研究の方法

慢性的なうつモデルマウスを作製するため、野生型マウスまたはオレキシン欠損マウスに社会性敗北(social defeat)ストレス負荷した(Psychopharmacology, 133: 249, 1997, 参照)。具体的には、これらのマウスを攻撃性の高いICRマウスと同居させ、10日間連続で心理的ストレスを負荷し、Social Interaction Testにおいて社会的相互作用の低下を指標に、うつの誘発を評価した。その後さらに10日間、通常食または70%カロリー制限食を摂取させ、うつの評価を再度行った後に、糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。また6時間絶食したマウスの血清インスリン値をELISA法により測定した。

4. 研究成果

(1) オレキシンによる糖代謝調節のメカニズムの検討

うつ病患者の脳脊髄液中では、エネルギー代謝に関わる視床下部ペプチドのオレキシンAの濃度が低下しているため、うつがオレキシンの作用不全を介してインスリン抵抗性の増大を誘発する可能性が考えられる。そこでまず、オレキシン欠損マウスにおけるインスリン感受性の変化を解析した。その結果、6ヶ月齢のオレキシン欠損マウスでは、肝臓のインスリンシグナル(インスリン投与に伴うAktリン酸化)が低下したが、骨格筋のインスリンシグナルには異常が認められなかった。しかし9ヶ月齢のオレキシン欠損マウスでは、肝臓と骨格筋の両組織でインスリンシグナルが低下したため、オレキシン欠損マウスでは、加齢に伴い、肝臓→骨格筋の順にインスリン抵抗性が進展することを明らかにした。なお、血清検査では肝機能の異常を認めなかった。そこでオレキシン欠損マウスの肝臓における糖新生活性をピルビン酸負荷試験により検討したところ、3ヶ月齢では異常は認められなかったが、6ヶ月齢および9ヶ月齢のオレキシン欠損マウスではピルビン酸負荷により血糖値が異常に上昇した。したがって、オレキシン欠損により肝糖新生の調節機構が加齢依存的に破綻することを突き止めた。

さらに、肝臓の糖新生の制御におけるオレキシンの役割を明らかにするため、比較的少量のオレキシンAを3系統のマウス(C57BL/6J, ddY, ICR)に静脈内投与し、ピルビン酸負荷試験を行った結果、血糖上昇が有意に抑制され、肝糖新生が抑制されることを明らかにした。高脂肪食を負荷したマウスでは、さらに顕著なオレキシンAによる抑制効果が認められた。そこで、これらの作用がオレキシンの中枢作用であることを明らかに

するため、マウスの脳室内に低濃度のオレキシン A を投与したところ、血清インスリン濃度に変化しないにもかかわらず、空腹時血糖が有意に低下した。また、低用量オレキシン A の脳室内投与後では、肝臓の糖新生律速酵素 PEPCK および G6Pase の発現が減少し、その減少効果はアトロピンの前処置で消失したことから、オレキシン A は迷走神経を介して糖新生を抑制することが示された。

一方、交感神経優位となる摂食条件下では低用量オレキシン A の脳室内投与による血糖降下作用は認められず、高用量オレキシン A を脳室内投与すると血糖上昇作用が認められた。そこで、マウスの自律神経バランスが迷走神経優位となる長時間の絶食条件下で低用量と高用量のオレキシン A を脳室内投与した結果、血糖値が二相性に变化（低用量で低下、高用量で上昇）することを見出した。また、インスリンをマウスの脳室内に投与すると肝臓での糖新生の抑制に重要な STAT3 のリン酸化を誘発するが、高用量のオレキシン A を投与するとさらに強力な STAT3 のリン酸化を認めた。しかし、オレキシン A が二相性の作用特性を示す生理的意義は、今後の課題として残された。

このように、オレキシンは視床下部と肝臓の臓器連関を介して肝の糖新生を制御する役割を果たしており、オレキシンの欠損により本制御機構が破綻することを明らかにした。

(2) うつによる糖代謝異常の進展におけるオレキシンの関与の検討

慢性的うつ状態がオレキシンによる糖代謝調節にどのような影響を与えるかを検討するため、野生型マウスおよびオレキシン欠損マウスを攻撃性の高い ICR マウスと 10 日間同居させ、社会性敗北ストレスを与えた。その結果、両群とも体重や摂食量の変化を伴うことなく、少なくとも 4 週間にわたりうつ症状を呈した。さらにオレキシン神経の賦活化を目的としてカロリー摂取制限を行った結果、野生型マウスおよびオレキシン欠損マウスは同程度の体重変化を示したが、野生型マウスにおいてのみ、うつ様行動の減少が認められ、オレキシン欠損マウスは依然としてうつ様症状を呈した。したがって、カロリー制限による抗うつ効果にはオレキシン作用の介在が必須であることが示された。このように、オレキシンは脳-肝連関を介して糖新生を制御するとともに精神機能の維持にも寄与すると考えられ、オレキシンの作用強度の変化はうつと糖代謝異常の共役因子である可能性が示唆された。なお、ストレス刺激のないコントロール条件下では、オレキシン欠損マウスはうつ様行動を示さなかったことから、オレキシンの欠損はうつの誘発には

直結しないことが確認された。

次に、社会性敗北ストレスを負荷したマウスにおける血糖調節機構の変化を検討した。まず、随時血糖値を測定したところ、野生型マウスにおいて軽度ではあるが血糖上昇が認められ、慢性的なうつにより血糖調節に異常を来す可能性を見出した。またオレキシン欠損マウスは、ストレス負荷がない条件下において、野生型マウスよりも高い随時血糖値を示したが、ストレス負荷に伴うさらなる増加は認められず、オレキシン欠損とストレス刺激が同一のメカニズムで高血糖を誘発する可能性が考えられた。

そこで、グルコース負荷試験により、社会性敗北ストレスが耐糖能に及ぼす影響を検討した結果、野生型マウスにおいて著明な血糖上昇が認められ、慢性的ストレス負荷により耐糖能異常が誘発されることを実証した。しかも、ストレスを負荷していないオレキシン欠損マウスが同程度の異常を示すこと、またオレキシン欠損マウスにストレスを負荷してもさらなる悪化が認められないことから、本検討においても、オレキシン欠損とストレス刺激が同一のメカニズムで耐糖能障害を誘発すると考えられた。

なお、6 時間絶食後の血清インスリン値は、野生型マウスではストレス負荷によって変化しなかった。また、オレキシン欠損マウスは高インスリン血症を呈しており、ストレス負荷によりさらに血清インスリン値が増加した。

最後に、インスリン負荷試験により全身のインスリン感受性を評価した結果、ストレス負荷しないコントロール条件下では、オレキシン欠損マウスと野生型マウスの間に差は見られなかった。しかし、社会性敗北ストレスを負荷すると、オレキシン欠損マウスは野生型マウスよりも低いインスリン感受性を示した。同様に、カロリー制限を行った場合でも、ストレス負荷したオレキシン欠損マウスは野生型マウスに比べインスリン抵抗性を示した。したがって、オレキシンは慢性的なストレスによるインスリン抵抗性の増大を防御する役割を果たしていると考えられる。

以上の結果から、オレキシンの欠損のみではうつは誘発されないが、慢性的なストレスが負荷されると視床下部オレキシン神経系の機能が異常を来し、うつが誘発されると考えられる。しかし同時に、視床下部オレキシン神経はストレスに対する適応行動をサポートするために、交感神経刺激による肝臓の糖放出などを介して血糖値を上昇させ、その一方で骨格筋や脂肪組織などのインスリン標的臓器のインスリン感受性を高め、グルコース利用を促進することが示唆された。ただ

し、このようなストレス状態が遷延化すると、オレキシンの機能異常に伴う高血糖状態が持続し、糖尿病を誘発すると考えられる。一方、カロリー制限下では、オレキシン神経を含む抗ストレス経路が適切に活性化され、うつ形成自体を抑制することでストレスによる糖代謝異常を防止すると考えられる（図1）。したがって、糖尿病の進展過程において高血糖のためにオレキシンが欠乏するとうつのリスクが増大し、悪循環が形成される可能性が考えられる。このように、うつと糖代謝異常が連動して進展する機序に視床下部オレキシン神経系が関与しており、うつと関連した2型糖尿病の発症に対し、オレキシン神経系が重要な標的因子であることを明らかにした。

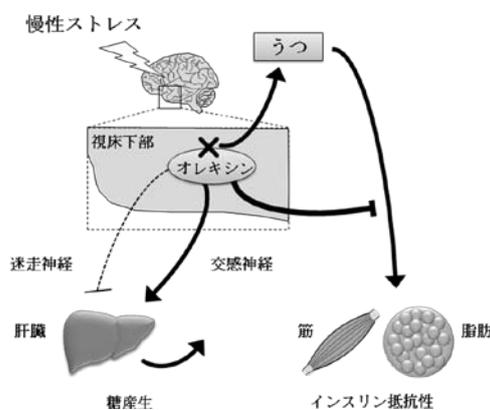


図1. うつと糖代謝異常が連動して増悪する機序における視床下部オレキシン神経系の関与

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Role of orexin in the central regulation of glucose and energy homeostasis. *Endocr J*, 59: 365-374, 2012. 査読有.
2. Tokai E, Tsuneki H, Nakamura Y, Takahashi K, Fujita M, Wada T, Sasaoka T. Involvement of impaired endoplasmic reticulum stress response in the development of hepatic insulin resistance in orexin knockout mice. *J Pharmacol Sci*, 118, Suppl. 1: 72P, 2012. 査読無.
3. Tsuneki H, Fujita M, Tokai E, Yamaguchi K, Wada T, Sasaoka T. Involvement of hypothalamic orexin system in the nicotine-induced modulation of hepatic glucose production in mice. *J Pharmacol Sci*, 118, Suppl. 1: 103P, 2012. 査読無.

4. Tsuneki H, Tokai E, Nakamura Y, Fujita M, Wada T, Sasaoka T. Dual action of hypothalamic orexin on hepatic glucose production through the brain-liver neural network in mice. *J Pharmacol Sci*, 115, Suppl. 1: 119P, 2011. 査読無.
5. Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)*, 198: 335-348, 2010. 査読有.

[学会発表] (計 14 件)

1. 恒枝宏史, 菅原千恵子, 東海絵美, 藤田樹生, 和田 努, 笹岡利安. うつによるインスリン抵抗性に対する防御機構としての視床下部オレキシンの役割. 第55回日本糖尿病学会年会学術集会, 2012年5月17-19日, 横浜.
2. 東海絵美, 恒枝宏史, 中村優也, 藤田樹生, 高橋佳佑, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンの欠損によるマウス肝臓の小胞体ストレス応答機構の障害を介した糖産生調節の異常. 第55回日本糖尿病学会年会学術集会, 2012年5月17-19日, 横浜.
3. 東海絵美, 恒枝宏史, 中村優也, 高橋佳佑, 藤田樹生, 和田 努, 笹岡利安. オレキシン欠損マウスの肝臓における小胞体ストレス応答機構の破綻による糖代謝調節の異常. 第85回日本薬理学会年会, 2012年3月14-16日, 京都.
4. 恒枝宏史, 藤田樹生, 東海絵美, 山口薫, 和田 努, 笹岡利安. ニコチンによる視床下部オレキシン神経を介するマウス肝糖新生の修飾作用. 第85回日本薬理学会年会, 2012年3月14-16日, 京都.
5. 恒枝宏史, 東海絵美, 中村優也, 藤田樹生, 高橋佳佑, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンによる自律神経系を介する糖代謝恒常性の維持機構の解明. 第23回分子糖尿病学シンポジウム, 2011年11月26日, 熊本.
6. 中村優也, 恒枝宏史, 東海絵美, 藤田樹生, 山口 薫, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部ペプチドのオレキシンによるマウス肝糖新生の調節作用に対する自律神経遮断薬の効果の解析. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011年5月19-21日, 札幌.
7. 東海絵美, 恒枝宏史, 中村優也, 藤田樹生, 山口 薫, 和田 努, 笹岡利安. 長期的な視床下部オレキシンの欠損がマウス肝臓の糖新生機能を障害するメカニズムの解析. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011年5月19-21日, 札幌.
8. 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシン神経系による肝糖新生律速酵素の発現調節機構. 第84回日本内分泌学会学術総会 (シンポジウム), 2011年4月21-23日, 神戸.

9. 恒枝宏史, 東海絵美, 中村優也, 藤田樹生, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンによる臓器連関を介した二相性の肝糖産生の調節作用. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22-24 日, 横浜 (誌上開催).
10. 東海絵美, 恒枝宏史, 中村優也, 山口 薫, 藤田樹生, 安澤雄生, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンがマウス肝臓での STAT3 を介した糖新生制御に与える影響の解析. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010 年 5 月 27-29 日, 岡山.
11. 恒枝宏史, 山口 薫, 藤田樹生, 東海絵美, 中村優也, 安澤雄生, 和田 努, 笹岡利安. 臓器連関を介した視床下部オレキシンによる末梢インスリン感受性の増強機構の解析. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010 年 5 月 27-29 日, 岡山.
12. 恒枝宏史, 東海絵美, 中村優也, 山口 薫, 藤田樹生, 安澤雄生, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンの血糖調節作用に関わる臓器連関機構の解析. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16-18 日, 大阪.
13. Tsuneki H, Anzawa Y, Soeda Y, Tokai E, Wada T, Sasaoka T. Central role of orexin in the regulation of hepatic glucose production in mice. American Diabetes Association (ADA) 69th Scientific Sessions, 2009 年 6 月 5-9 日, ニューオリンズ (アメリカ合衆国).
14. 恒枝宏史, 安澤雄生, 添田義行, 東海絵美, 高崎一朗, 田淵圭章, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシン神経系の異常が肝臓の糖産生調節を破綻させるメカニズムの解析. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009 年 5 月 21-24 日, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恒枝 宏史 (TSUNEKI HIROSHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
准教授
研究者番号 : 20332661

(2) 研究分担者

笹岡 利安 (SASAOKA TOSHIYASU)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・
教授
研究者番号 : 00272906