

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591317

研究課題名(和文) 糖尿病の新規時間治療開発に向けた視床下部オレキシンによる体内時計の同調機構の解明

研究課題名(英文) Daily rhythmic regulation of glucose metabolism by hypothalamic orexin system: a chronotherapeutic target for type 2 diabetes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：体内リズムの維持が糖尿病を防止する機序を解明するため、睡眠・覚醒リズムを調節する視床下部オレキシン系の意義を検証した。その結果、マウスにおいてオレキシンが自律神経系を介して肝糖新生を二方向性に調節し、覚醒期のエネルギー供給と休息期の血糖降下の両者に寄与することを見出した。また肥満病態において、オレキシンは投与時刻依存的に高血糖を改善した。したがって、オレキシンは糖尿病に対する時間治療の標的と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Entrainment of daily rhythms in biological clock, sleep/wake, and metabolism is required for maintaining glucose homeostasis. The present study was conducted to elucidate how these different rhythmic systems are coordinated in mice. The observed results demonstrated that hypothalamic orexin system bidirectionally regulated hepatic gluconeogenesis, thereby generating daily rhythm of blood glucose levels according to the circadian clock rhythm and sleep/wake cycles. The daily glucose oscillation contributed not only to supply of energy at the awake period but also to reduction of blood glucose levels during the sleep period, thereby preventing insulin resistance. Administration of orexin at awake but not sleep period improved hyperglycemia in type 2 diabetic mice. Thus, hypothalamic orexin system is considered to be a novel chronotherapeutic target for type 2 diabetes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 エネルギー・糖質代謝異常 生物時計 インスリン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

全身のグルコース恒常性を維持する機構として、インスリンやグルカゴンなどのホルモンによる末梢組織の糖代謝調節だけでなく、視床下部および自律神経系による中枢性の糖代謝調節機構の重要性が明らかになった。さらにその機構として、視床下部でのインスリンやレプチンなどのホルモン作用が交感神経系または副交感神経系のいずれかを介して末梢臓器に影響を与える神経機構が多数提唱された。一方、実際の生体においては、ほとんどの臓器は交感神経系と副交感神経系の二重支配を受け、そのバランスにより機能が調節されている。しかも自律神経のバランスには日内リズムがあり、時刻によって発現する遺伝子も異なる。しかし研究開始当時は、これらの点を重視した研究はほとんど行われておらず、糖代謝の日内リズムを体内時計、睡眠・覚醒、あるいは摂食のリズムと同調させる機構は不明であった。

## 2. 研究の目的

体内時計に基づく概日リズムは生理機能の維持に必須であり、睡眠障害などによる体内時計の攪乱は肥満や2型糖尿病のリスクを増加させることが報告されている。視床下部オレキシン神経系は、生体の「主時計」である脳の視交叉上核の支配下で日周性に活性化され、覚醒レベルを増加させることに加え、自律神経を介してエネルギー恒常性を維持する。また我々は、オレキシンを欠損したマウスにおいてインスリン抵抗性が加齢依存的に増加することを報告した。そこで本研究では、体内リズムの維持が糖尿病を防止する機序を解明するため、体内時計、睡眠・覚醒リズム、および糖代謝の日内リズムを統合する機構における視床下部オレキシン系の役割を検証した。さらに、肥満・2型糖尿病病態におけるオレキシンの時間薬理学特性を解析し、糖尿病の新たな治療戦略としてオレキシンを標的とした時間治療の基盤確立を目指した。

## 3. 研究の方法

視床下部ペプチドのオレキシンが糖代謝リズムを調節する機序を明らかにするため、オレキシン欠損マウスおよびオレキシン受容体欠損マウスを用いた下記の検討を行った。まず、オレキシン欠損が血糖値の日内変動や末梢組織の時計遺伝子による日周リズム形成に及ぼす影響を、血糖測定および摘出臓器を用いた RT-PCR 法により検討した。また、日周性のオレキシン作用が慢性的に欠如することにより肝臓のインスリン抵抗性が増加するメカニズムを、細胞内小器官(小胞体)の機能変化を指標に解析した。さらに、オレキシン発現の低下が認められる2型糖

尿病 db/db マウスにオレキシンを覚醒期または休息期に投与し、投与時刻依存的な糖代謝改善作用が得られるかを、血糖値、血清ホルモン値、肝糖新生制御因子の発現量などを指標に検証した。

## 4. 研究成果

(1) オレキシン欠損に伴う血糖値および肝臓の遺伝子発現の日内変動の変化

中枢性の糖代謝調節における視床下部オレキシン神経系の生理的意義を明らかにするため、まず、6ヶ月齢の野生型(WT)マウスとオレキシン欠損マウスの血糖値の日内変動を解析した。その結果、WTマウスの血糖値は暗期(覚醒期)で増加し明期(休息期)で低下する日内リズムを示したが、オレキシン欠損マウスでは血糖値の日内変動が消失した。しかも明期において、オレキシン欠損マウスは高血糖を呈した。このとき血清インスリン値の低下やグルカゴン値の上昇は認められず、これらのホルモン作用の異常がオレキシン欠損マウスの高血糖の原因ではないと考えられた。また、小動物代謝測定システムを用いてオレキシン欠損マウスの摂食量、自発運動量、および酸素消費量の日内変動を解析した結果、これらの日内変動の振幅はWTマウスよりも低下したが、日内リズムの周期には異常は認められなかった。したがって、オレキシン欠損マウスで認められた高血糖は、過食や食事リズムの変化とは独立した機序で生じたと考えられた。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の低下や肝糖新生活性の増加が認められるので、肝臓の糖代謝に関わる遺伝子発現の日内変動がオレキシン欠損により変化するかを検証した。その結果、オレキシン欠損マウスの肝臓では時計遺伝子の *Period 2 (Per2)* の mRNA 発現量が明期において増加し、*nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt)* の発現が暗期において増加することを認めた。また明期では、肝糖新生を誘発する *phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pepck)*, *glucose-6-phosphatase (G6Pase)* および *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ )* の発現増加(または増加傾向)が認められた。したがって、内因性のオレキシンは日周性に睡眠・覚醒リズムと同期した肝糖新生を誘発し、その結果、血糖値の日内リズムが形成されることが示された(図1)。

次に、オレキシン欠損に伴う血糖値の日内変動の異常と肝インスリン抵抗性の増大の関連を明らかにするため、若齢(3ヶ月齢)のオレキシン欠損マウスを用いて上記と同様の検討を行った。その結果、3ヶ月齢ではオレキシン欠損による肝インスリン

抵抗性は認められないにも関わらず、血糖値の日内変動の振幅が減少した。また、肝臓における時計制御遺伝子 (Rev-erba, ROR $\alpha$ ) および糖新生律速酵素 (PGC1 $\alpha$ , G6Pase) の発現量の日内変動が異常を呈した。なお、代謝測定システムを用いた検討では、3 か月齢のオレキシン欠損マウスの摂食、自発運動、およびエネルギー消費の日周リズムには異常は認められなかった。また血清インスリン、グルカゴンおよびコルチコステロン値にも血糖リズムを破綻させる異常は認められなかった。したがって、内因性のオレキシン作用が欠損すると、まず肝糖新生の日内リズムが破綻し、その後、肝インスリン抵抗性が増大することが示された。

### (2) オレキシン欠損に伴う肝インスリン抵抗性の増大機序

6 か月齢のオレキシン欠損マウスでは血糖値の日内リズムの消失と肝インスリン抵抗性の増大が誘発されるので、これらの異常の因果関係を検討した。まず、オレキシン欠損マウスの肝臓における遺伝子発現の変化を GeneChip により網羅的に解析しパスウェイ解析を行った結果、内分泌系異常や代謝異常 (特に糖尿病および糖代謝異常) などとの関連が示唆された。また、肝インスリン抵抗性の主要なメカニズムの一つである小胞体ストレスマーカーの増加が認められた。そこで、マウスを 24 時間絶食後、1 時間再摂食させ、肝臓の小胞体ストレスを誘発した結果、野生型マウスに比べ、オレキシン欠損マウスの肝臓では過度の小胞体ストレスのマーカー (IRE1 $\alpha$  のリン酸化、JNK のリン酸化、CHOP mRNA の発現) が増加した。オレキシン 1 型受容体欠損マウスおよびオレキシン 2 受容体欠損マウスの肝臓においても同様に、過剰な小胞体ストレスの誘発が認められた。さらに電子顕微鏡解析においても、絶食後に再摂食させたオレキシン欠損マウスの肝臓では小胞体の異常な膨潤を認め、過剰な小胞体ストレスの出現が形態学的にも裏付けられた。したがって、日周性のオレキシン作用は肝臓の小胞体機能の“よどみ”をなくし“ながれ”を良くして、2 型糖尿病の基盤であるインスリン抵抗性を防止すると考えられる (図 1)。

### (3) 2 型糖尿病マウスに対するオレキシンの時間治療効果

2 型糖尿病 db/db マウスの脳室内にオレキシン A を 1 日 1 回日周性に投与し、その時間薬理学的特性を解析した。まず、生理的分泌様式に即して暗期 (覚醒期) にオレキシンを投与すると、血糖値の日内リズム

が増幅され、特に明期 (休息期) において著明な血糖降下作用が認められた。この作用は、肝臓のインスリン抵抗性促進因子 (JNK のリン酸化など) の抑制や糖新生律速酵素 (Pepck, G6Pase, および PGC1 $\alpha$ ) の低下を伴った。一方、オレキシンを逆に明期 (休息期) に投与すると、血糖降下作用はほぼ消失した。したがって、オレキシン A による中枢性の糖代謝調節作用は投与時刻依存的であることが示された。

正常マウスおよび副交感神経肝臓枝切除マウスを用いて、覚醒期に投与したオレキシン A による糖代謝改善作用の機序をピルビン酸負荷試験 (肝糖新生活性評価法) で検討した。その結果、正常マウスでは覚醒期のオレキシン投与により休息期の肝糖新生が抑制されたが、副交感神経肝臓枝切除マウスではその作用は消失した。したがって、オレキシンは自律神経バランスの日周性調節を介して肝糖新生を制御し、血糖リズムの形成や休息期の過剰な糖新生の防止に寄与することが示された (図 1)。

以上のように、視床下部オレキシン神経系の作用をタイミングよく増幅することで糖代謝機能を改善できることが初めて明らかになった。しかも、このオレキシン作用はインスリン抵抗性病態においても有効であった。したがって、糖尿病の新しい治療法として期待される時間治療法においてオレキシンは重要な標的と考えられる。

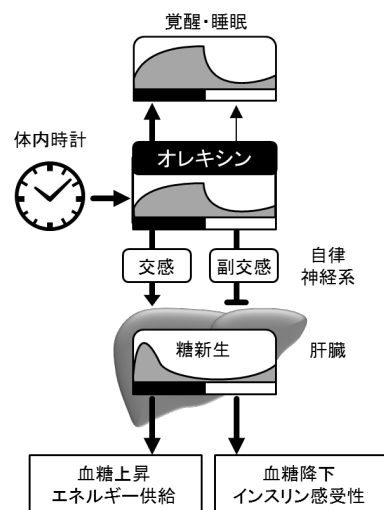


図 1. 体内リズムに同期した視床下部オレキシンによる肝糖新生の二方向性調節の意義

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Tsuneki H, Tokai E, Nakamura Y, Takahashi K, Fujita M, Asaoka T, Kon K, Anzawa Y, Wada T, Takasaki I, Kimura K, Inoue H,

Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance via daily bidirectional regulation of autonomic nervous system in mice.

*Diabetes*. 2015;64:459-70.

doi: 10.2337/db14-0695. 査読有 .

- (2) Tsuneki H, Tokai E, Sugawara C, Wada T, Sakurai T, Sasaoka T. Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance induced by social defeat stress in mice. *Neuropeptides*. 2013;47:213-9. doi: 10.1016/j.npep.2013.02.002. 査読有 .

〔学会発表〕(計 19 件)

- (1) 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシン系の動的血糖制御による抗糖尿病作用. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25-28 日, 神戸 .
- (2) 恒枝宏史, 永田貴嗣, 藤田樹生, 和田 努, 笹岡利安. ニコチン作用から見た視床下部オレキシン神経系を介する糖代謝リズム制御の意義. 第 26 回分子糖尿病学シンポジウム, 2014 年 12 月 6 日, 高知 .
- (3) Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Nicotinic regulation of glucose metabolism via hypothalamic orexin system. International Society of Addiction Medicine (ISAM) World Congress in 2014; 2014 Oct 2-6; Yokohama.
- (4) Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Orexin regulates glucose metabolism under the control of circadian system. Tokyo Translational Therapeutics Meeting: Homeodynamics in Clocks, Sleep and Metabolism, 2014 年 9 月 24 日, 東京 .
- (5) 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンによる糖代謝リズム調節を介したインスリン抵抗性の治療戦略. 生体機能と創薬シンポジウム 2014, 2014 年 8 月 28-29 日, 大阪 .
- (6) Sasaoka T, Tokai E, Takahashi K, Asaoka T, Wada T, Tsuneki H. Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance via bidirectional regulation of autonomic nervous system in mice. American Diabetes Association (ADA) 74th Scientific Sessions, 2014 年 6 月 13-17 日, サンフランシスコ (アメリカ合衆国).
- (7) 浅岡健広, 恒枝宏史, 東海絵美, 高橋佳佑, 中村優也, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンによるマウス肝糖新生の概日リズムの調節機構の解析. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014 年 5 月 22-24 日, 大阪 .
- (8) 永田貴嗣, 恒枝宏史, 東海絵美, 藤田樹生, 山口 薫, 和田 努, 笹岡利安. ニコチンは視床下部オレキシン神経系を介してマウス肝糖新生を抑制する. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014 年 5 月 22-24 日, 大阪 .
- (9) 恒枝宏史, 東海絵美, 菅原千恵子, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンによるうつに伴う糖代謝異常の防御機構の解明. 第 25 回分子糖尿病学シンポジウム, 2013 年 12 月 7 日, 大阪 .
- (10) 高橋佳佑, 恒枝宏史, 東海絵美, 藤田樹生, 浅岡健広, 和田 努, 笹岡利安. オレキシン欠損マウスにおいて血糖値の日内リズムの調節が破綻する機序の解析. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会, 2013 年 11 月 17 日, 金沢 .
- (11) Sasaoka T, Tokai E, Sugawara C, Wada T, Tsuneki H. Hypothalamic orexin system protects against hepatic insulin resistance induced by chronic social defeat stress in mice. The 36th Naito Conference on Molecular Aspects of Energy Balance and Feeding Behavior, 2013 年 9 月 10-13 日, 札幌 .
- (12) Tsuneki H, Tokai E, Wada T, Sasaoka T. Hypothalamic orexin generates the circadian metabolic rhythm for maintaining glucose homeostasis in mice. The 36th Naito Conference on Molecular Aspects of Energy Balance and Feeding Behavior, 2013 年 9 月 10-13 日, 札幌 .
- (13) 笹岡利安, 菅原千恵子, 東海絵美, 和田 努, 恒枝宏史. 慢性的なうつに伴う糖代謝異常に対する視床下部オレキシン系の役割の解析. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 5 月 16-18 日, 熊本 .
- (14) 恒枝宏史, 東海絵美, 高橋佳佑, 浅岡健広, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンの日内リズム制御による 2 型糖尿病マウスの肝糖代謝の改善効果. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 5 月 16-18 日, 熊本 .
- (15) 恒枝宏史, 東海絵美, 高橋佳佑, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンの糖代謝リズム制御による 2 型糖尿病マウスの高血糖改善効果. 第 24 回分子糖尿病学シンポジウム, 2012 年 12 月 8 日, 東京 .
- (16) Tsuneki H, Tokai E, Takahashi K, Nakamura Y, Wada T, Sasaoka T. Hypothalamic orexin system regulates daily rhythm of glucose metabolism in the liver of mice. Keystone Symposia: Aging and Diseases of Aging, 2012 年 10 月 22-27 日, 東京 .
- (17) Sasaoka T, Tokai E, Nakamura Y, Fujita M, Wada T, Tsuneki H. Hypothalamic orexin deficiency causes age-related insulin resistance via enhancement of ER stress in

the liver of mice. American Diabetes Association (ADA) 72th Scientific Sessions, 2012年6月8-12日,フィラデルフィア(アメリカ合衆国).

- (18) 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次学術集会, 2012年5月17-19日, 横浜.
- (19) 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次学術集会 2012年5月17-19日, 横浜.

〔その他〕

- (1) 富山大学ホームページ. プレスリリース. 「体内リズムが糖尿病を防ぐ機構解明」  
<http://www.u-toyama.ac.jp/outline/publicity/pdf/2014/32.pdf>

## 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