

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659101

研究課題名(和文) Na⁺ Kポンプによるグルコース感受性NPY神経・摂食行動の制御と過食・肥満の成因

研究課題名(英文) Regulation by Na-K pump of glucose-sensitive NPY neurons and feeding behavior, and its dysfunction in hyperphagia and obesity

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部弓状核グルコース感受性ニューロン(GSN)において、グルコース濃度低下は細胞内Na⁺濃度([Na⁺])を増加させ、これがNa,K-ATPase(NKA)活性化剤SSA412により阻害されたことから、GSNの低グルコース応答にはNKA抑制が関与する。NKA抑制は細胞内エネルギー(ATP)の低下による。NKA抑制は、おそらく脱分極を起して、電位依存性Caチャンネルを活性化し[Ca²⁺]を増加させる。薬理的なNKA抑制はNPYmRNA発現と摂食を亢進する。GSNでは低グルコース ATP低下 NKA抑制 NPY神経活性化経路が作動し、これが摂食亢進に繋がる。

研究成果の概要(英文)：In the glucose-sensitive neurons (GSNs) in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC), lowering glucose concentration increases cytosolic Na⁺ concentration ([Na⁺]) that is inhibited by activation of Na,K-ATPase (NKA), SSA412. The results indicate that suppression of NKA is implicated in the response to lowering glucose. The NKA suppression is mediated by decrease in intracellular ATP. The NKA suppression, possibly by inducing depolarization, activates voltage-dependent Ca channels and increases [Ca²⁺]. Pharmacologic inhibition of NKA increases neuropeptide Y (NPY) mRNA expression and food intake. In ARC GSNs, lowering glucose, via intracellular ATP reduction, causes NKA suppression, which activates NPY neurons to promote feeding.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：弓状核 グルコース Na,K-ATPase Neuropeptide Y 摂食 ATP

1. 研究開始当初の背景

グルコースは全身の細胞活動のエネルギー基質であり、一般的にグルコース濃度の増加が細胞活動を高める。その逆説的例外はグルコース感受性 (GS) ニューロン (GSN) であり、その活動はグルコース濃度低下に応じて増加する。GSN は、視床下部外側野 (LHA) で発見された (Oomura et al. *Nature* 222, 1969)。申請者は、末梢情報を感知する摂食一次中枢の視床下部弓状核 (ARC; Arcuate Nucleus) に GS ニューロンを発見し (Muroya, Yada et al. *Neurosci Lett* 264, 1999)、摂食促進性の Neuropeptide Y (NPY) を含有することから、空腹時の食欲亢進に参与することを示唆した。GS ニューロン活性化を仲介する候補分子として、 Na^+ , K^+ -ATPase (NKA), Cl channel, K^+ channel が提唱されているが、十分な証拠は提出されていなかった (Levin et al. *Diabetes* 53, 2004)。申請者は、単一 GSN で NKA 活動を計測する方法を開発し、NKA の選択的活性化剤 (Xu *BBRC* 338, 2005) を導入することにより、NKA 抑制が GSN 活性化に参与することを示す予備的データを得ていた。そこで本研究では、NKA 活性低下が、低グルコースによる GSN 活性化を仲介するか、また、また、NKA 活性低下が NPY 亢進、摂食行動亢進に繋がるかを検討する研究を計画した。さらに、 \langle グルコース-NKA-GSN \rangle 系の変調が、過食・内臓肥満の成因となりうるかを検討した。

2. 研究の目的

(1) 視床下部摂食中枢は血糖値をはじめ全身代謝情報を感知し、摂食行動を制御している。空腹時にグルコース濃度低下により活性化されるグルコース感受性ニューロン (GSN) による摂食亢進が示唆されている。しかし逆説的な“低グルコース 神経活性化”の仲介分子機構及びその摂食行動連関は未解明である。本研究では、 Na , K -ATPase (NKA) が、低グルコースによる GSN 活性化を仲介するかを明らかにする。
(2) 次に、 Na , K -ATPase (NKA) が摂食行動を制御するかを明らかにする。
(3) さらに、この系の変調が過食・肥満の成因となるか、治療標的となるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 低グルコースによる GSN 活性化の Na , K -ATPase (NKA) 抑制による仲介: 単離弓状核ニューロン $[\text{Na}^+]$ 増加とその NKA 活性化剤による阻害により検討。
(2) グルコース濃度変化はグルコース代謝を介してエネルギー状態に変換されるか: グルコース代謝酵素の阻害剤の効果、NAD(P)H 測定により検討。
(3) 脳内の低グルコース・NKA 抑制の環境が NPY 依存性摂食行動を促進するか: 脳室内グルコース代謝阻害剤が摂食を亢進し、それが

NKA 活性化剤により抑制されるか検討。NKA 阻害剤投与により摂食・NPY 発現が亢進するかを検討。

(4) 弓状核 NKA の発現・局在と制御: 絶食が弓状核 NKA 活性を選択的に低下させるか、それがリン酸化などの生化学的修飾によるか検討。弓状核の $\text{NKA}\alpha$ サブユニット発現の特徴を解析。

(5) \langle グルコース-NKA-GSN \rangle 系の変調が過食・内臓肥満の成因となり、治療標的となるか: 正常体重域で過食と内臓肥満を示す GK ラットを用いて解析。

4. 研究成果

(1) 低グルコースによる弓状核 GSN 活性化は Na , K -ATPase (NKA) により仲介されるか
弓状核から単離したニューロンの細胞内 $[\text{Na}^+]$ を蛍光指示薬 SBF1 を用いて測定した。灌流液のグルコース濃度低下は $[\text{Na}^+]$ を増加させた。本研究では、この低グルコース応答ニューロンを GSN とした。この $[\text{Na}^+]$ 増加は NKA 活性化剤 SSA412 により阻害された。この結果は、GSN の低グルコース応答には NKA 抑制が参与することを示している。

(2) 低グルコースによる NKA 抑制のグルコース・エネルギー代謝依存性

グルコース代謝低下の関与を検討するため、高グルコース存在下でも、グルコース代謝阻害剤 Mannoheptulose の添加により $[\text{Na}^+]$ 増加、 $[\text{Ca}^{2+}]$ 増加が起った。さらに、NAD(P)H 自家蛍光測定により、低グルコースが細胞内 NAD(P)H を低下させることが解かった。これらの結果は、GSN の低グルコース応答には細胞内エネルギー状態の低下が参与することを示している。

(3) 低グルコース・NKA 抑制による $[\text{Ca}^{2+}]$ 増加の機序

低グルコースおよび NKA 阻害剤ウワバインによる $[\text{Ca}^{2+}]$ 増加は電位依存性 L 型、N 型 Ca チャネル阻害剤により部分的に抑制された。

(4) 脳内の NKA 抑制の環境が摂食行動を促進するか

脳室内 NKA 阻害剤 (ウワバイン、 K^+ -free 溶液) 投与により、摂食が亢進することを明らかにした。

(5) NKA 低下は摂食亢進性 NPY 亢進を介して摂食行動を促進するか

NKA 阻害剤ウワバインにより $[\text{Ca}^{2+}]$ 増加を示すニューロンの大部分は、免疫組織化学的に NPY を含有していた。さらに脳室内ウワバイン投与により NPY mRNA 発現が亢進した。

(6) 弓状核 NKA の発現・局在と制御

免疫組織化学的に、視床下部弓状核には $\text{NKA}\alpha$ サブユニットのアイソフォーム $\alpha 3$ が豊富に局在していた。過ぎに、絶食下 vs. 自由摂食下のラットから摂食調節神経核を単離し、ATP 加水分解反応により NKA 活性を測定し、絶食の NKA 活性への影響を調べた。絶食が NKA 活性を顕著に低下させること、低下の程度は弓状核で最も大きいことを明らかにした。こ

これらの結果は、絶食が弓状核の NKA アイソフォーム活性を特に強く抑制することを示している。さらに、 $\alpha 3$ の重要な役割が示唆される。

(7) グルコース代謝-NKA-GSN 制御系の変調が、過食の成因となるか

正常体重域で過食と内臓脂肪蓄積を示す GK ラット弓状核 GSN の $[Ca^{2+}]$ 測定を行い、高グルコースによる抑制が减弱していた。またグルコース輸送担体 GLUT2 の発現が著明に低下していた(論文発表; Maekawa et al. Front Synaptic Neurosci 5(7):1-13, 2013)。これらの結果は、GK ラットでは、GLUT2 の低下するために、高グルコースによる NKA 活性化が减弱し、その結果過食が起こる可能性を示している。

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 7 件)

Nakata M, Yada T.: Role of NUBC2/Nesfatin-1 In glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain. Curr Pharm Des 19(39)6960-6965, 2013. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537085>

Yang Y, Shimomura K, Sakuma K, Maejima Y, Iwasaki Y, Galvanovskis J, Dezaki K, Nakata M, Yada T.: Bupropion can close KATP channel and induce insulin secretion. J Pediatr Endocrinol Metab 26(3-4): 343-346, 2013. 査読有
doi: 10.1515/jpem-2012-0295.

Aoki H, Nakata M, Dezaki K, Lu M, Gantulga D, Yamamoto K, Shimada K, Kario K, Yada T.: Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. Endocr J 60(5): 571-581, 2013. 査読有
doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0371.

Iwasaki Y, Kakei M, Nakabayashi H, Ayush EA, Hirano-Kodaira M, Maejima Y, Yada T.: Pancreatic polypeptide and peptide YY3-36 induce Ca^{2+} signaling in nodose ganglion neurons. Neuropeptides 47(1): 19-23, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.npep.2012.07.006.

Damdindorj B, Dezaki K, Kurashina T, Sone H, Rita R, Kakei M, Yada T.: Exogenous and endogenous ghrelin counteracts GLP-1 action to stimulate cAMP signaling and insulin secretion in islet β -cells. FEBS Lett 586(16): 2555-2562, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.034.

Gantulga D, Maejima Y, Nakata M, Yada T.: Glucose and insulin induce Ca^{2+} signaling

in nesfatin-1 neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. Biochem Biophys Res Commun 420(4): 811-815, 2012. 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.079.

Maekawa F, Fujiwara K, Toriya M, Maejima Y, Nishio T, Toyoda Y, Nohara K, Yashiro T, Yada T.: Brain-derived neurotrophic factor in VMH as the causal factor for and therapeutic tool to treat visceral adiposity and hyperleptinemia in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Front Synaptic Neurosci 5(7):1-13, 2013. doi: 10.3389/fnsyn.2013.00007.

〔学会発表〕(計 8 件)

岩崎有作、矢田俊彦: 臍ホルモンは求心性迷走神経を介して脳に作用し、食欲を調節する。第 91 回日本生理学会大会、2014. 3.16-18、鹿児島

前島裕子、佐久間和哉、下村健寿、矢田俊彦: 室傍核オキシトシンの弓状核 POMC ニューロンを介した新規摂食抑制神経経路。第 91 回日本生理学会大会、2014. 3.16-18、鹿児島

下村健寿、前島裕子、アシュクロフト フランシス、矢田俊彦: 出生後高インスリン血症を呈し、後に耐糖能異常を示す K_{ATP} チャネル変異。第 91 回日本生理学会大会、2014. 3.16-18、鹿児島

矢田俊彦、ポルトバーターダムディンドルジェ、倉科智行、曾根英行、リタラウザ、加計正文、出崎克也: GLP-1 による臍島 β 細胞 cAMP シグナリングとインスリン分泌促進はグレリンにより抑制される。第 90 回日本生理学会大会、2013. 3.27-29、東京

〔図書〕(計 3 件)

栗田英治、矢田俊彦、メディカルレビュー社、Diabetes Frontier、2014、40-45

高野英介、荒井健、矢田俊彦、先端医学社、分子精神医学、2013、40-44

川上正舒、野田泰子、矢田俊彦、In からだと病気のしくみ図鑑、監修、法研、2012、107-161

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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 (YADA, Toshihiko)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：60166527

(2) 研究分担者

中田 正範 (NAKATA, Masanori)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10305120

前島 裕子 (MAEJIMA, Yuko)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：40438669