

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460336

研究課題名(和文) 脳幹におけるGLP-1分泌機序に関する 修飾因子および神経 ネットワークの同定

研究課題名(英文) Neuromodulatory effects of feeding signals in GLP-1 releasing neurons of the brainstem

研究代表者

久留 和成 (Hisadome, Kazunari)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00592081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は食後小腸より分泌され、中枢神経系に作用し食欲抑制作用を示す内因性ペプチドとして知られている。また、脳幹の一部の神経細胞がGLP-1分泌能を有しているとの報告もあるが、GLP-1分泌神経細胞の修飾因子・分泌機序に関しては、未だ不明な点が多い。GLP-1は血中半減期が極めて短く、中枢神経における摂食抑制作用に関しては、抹消臓器由来のGLP-1よりも神経細胞由来のGLP-1が重要な役割を担っている可能性が高い。本申請研究では、GLP-1分泌神経細胞に対する修飾因子・分泌機序の解明を目的とし、電気生理学的手法を用いて実験・解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is one of gut hormones act as a satiety signal in the brain. However, circulating GLP-1 is unlikely to reach receptors in the brain because of its rapid metabolism in the blood. GLP-1 is also produced in a small population of cells in the brainstem. We propose that the GLP-1 releasing neurons play an important role in satiety and have started to characterize the relationship between satiety molecules (e.g. orexin, serotonin, and glucose), and the GLP-1 releasing neurons in the brainstem.

研究分野：神経生理学

キーワード：摂食調節 内分泌

1. 研究開始当初の背景

Glucagon-like peptide-1(GLP-1)は、腸管上皮や脳幹の一部の細胞から限局的に生成され、高血糖時のみのインスリン分泌促進、肝臓における糖新生抑制および摂食抑制等の代謝調節に関わる様々な作用を有する内因性ペプチドとして知られている。これらの作用の中で、食欲抑制作用は、脳室内への GLP-1 直接投与および中枢神経系に生理作用を有する GLP-1 作動薬においてのみ観察されることから GLP-1 の中枢作用と考えられている。

この GLP-1 の中枢作用に関しては、GLP-1 の血中半減期が極めて短いこと(およそ 2 分) GLP-1 の血液脳関門に対する透過性が明らかにされていないことから中枢神経内すなわち脳幹部の GLP-1 分泌神経細胞からの GLP-1 供給が重要な役割を果たしていると考えられているが、GLP-1 分泌神経細胞を生細胞の状態と同定することが困難なため、中枢神経由来の GLP-1 分泌に関わる修飾因子は未だほとんど明らかにされていない。

一方で、末梢臓器由来の GLP-1 は、GLP-1 血中濃度が食後に上昇することから、摂食に伴う刺激(グルコースや脂肪酸等)が腸管上皮からの GLP-1 分泌に深く関わる修飾因子との報告がなされているが、末梢臓器における GLP-1 分泌と中枢神経内における GLP-1 の分泌に同様の機序が存在しているのか、末梢臓器の GLP-1 分泌と中枢神経内の GLP-1 の分泌に何らかの相関があるのか否かは明らかにされていない。近年、GLP-1 分泌能を有する細胞のみに yellow fluorescent protein (YFP) が発現するトランスジェニックマウスが作成され、生細胞の状態での GLP-1 分泌能を有する細胞の同定が可能となり、GLP-1 の分泌機序の解明が急速に進みつつある。

2. 研究の目的

中枢神経内の GLP-1 分泌神経細胞の修飾因子を(1)他の食欲調節因子との関連性(2)末梢臓器における GLP-1 分泌機序との比較という観点から電気生理学および分子生物学的手法を用いて同定し、これまで明らかにされている摂食調節因子の制御機構と GLP-1 の食欲抑制作用との共通点や相違点を明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経系における摂食調節作用を有する物質として報告のあるオレキシン、セロトニン、およびニューロペプチド Y を微量投与し、いずれの物質にて YFP 陽性神経細胞が修飾されるかをスライスパッチクランプ法にて解析し GLP-1 の引き起こす食欲抑制作用がどのような食欲調節因子と関連性を有するののかについて電気生理学的手法を用

いて解析した。

(2) 末梢臓器における GLP-1 分泌機序との比較を目的として、YFP 陽性神経細胞に対して穿孔パッチクランプ法または膜電位固定法の適用し、様々な濃度の細胞外グルコース刺激を行い、YFP 陽性神経細胞のグルコースに対する神経応答を電気生理学的に解析した。また、電気生理学の実験終了後、記録電極を介して細胞質を吸引し単一細胞 RT-PCR 法を用いて遺伝子レベルでの解析も行った。

(3) YFP 陽性神経細胞のグルコースに対する応答と概日リズムとの関連性を解析する目的で、飼育環境下における明期(マウスにとっては休息時間帯)または暗期(マウスにとっては活動時間帯かつ摂餌時間帯)のそれぞれの時間帯に作成した脳スライス標本に対してスライスパッチクランプ法を適用し、細胞外グルコース刺激に対する応答性の違いを解析した。

4. 研究成果

(1) 穿孔パッチクランプ法を用いて YFP 陽性神経細胞から電気記録を行い、中枢神経内にて食欲制御に関連するとされる食欲調節因子オレキシン、セロトニンおよびニューロペプチド Y を細胞外微量投与した際の、膜電位、活動電位発火頻度および膜電位の変化を無刺激時の記録と比較解析を行ったが、いずれの値も有意を示さないことから、YFP 陽性神経細胞上には、前述の3種類の食欲調節因子の受容体は発現しておらず、これらの食欲調節因子にて YFP 陽性細胞は直接修飾されないことが示唆された。また、シナプス入力を介した神経ネットワークによる間接的な修飾の可能性を調べるために、膜電位固定法を用いた同様の実験を行い興奮性シナプス電流 EPSC の解析を行ったが、オレキシン、セロトニンおよびニューロペプチド Y のいずれの細胞外微量投与を行っても、無刺激時と比較し EPSC の発生頻度、振幅において有意な差は観察されなかった。加えて電気生理学の実験終了後、記録電極より YFP 陽性細胞の細胞質を吸引し単一細胞 RT-PCR 法を適用したが、遺伝子レベルのでもこれら食欲調節因子の受容体に関する mRNA は観察されなかったことから、オレキシン、セロトニンおよびニューロペプチド Y は中枢神経内 GLP-1 の分泌に関与していないことが示唆された。

(2) 腸管における GLP-1 分泌には、細胞外高グルコース刺激が関与していることが報告されていることから、脳スライス標本の灌流液中のグルコース濃度を変化させ、YFP 陽性細胞からのパッチクランプ記録における神経応答を解析した。パッチクランプ記録に用いた全 YFP 陽性神経細胞(n=23)のうちおよそ 48%(n=11)は高グルコース刺激により活動電位の発火頻度が有意に抑制されるグルコース感受性(glucose-inhibited; GI)ニューロンに分類された、また発火頻度上昇時に膜電

位、膜抵抗に有意な差は観察されなかった（図1を御参照下さい）。また、同数にあたる YFP 陽性神経細胞が細胞外高グルコース刺激にて何ら神経応答は観察されず、高グルコース細胞外刺激にて電氣的興奮の観察されたグルコース受容（glucose-excited; GE）ニューロンはわずかに1細胞のみであった。また、電気生理学的実験終了後、記録電極より YFP 陽性細胞の細胞質を吸引し単一細胞 RT-PCR 法を適用した結果、全ての YFP 陽性神経細胞から GLP-1 の前駆物質であるプレプログルカゴンの mRNA は観察され、実験に使用した YFP 陽性神経細胞に GLP-1 分泌能が備わっていることは確認できたが、多くの細胞にてグルコース応答に参与しているとされるグルコキナーゼの発現は確認できなかった。

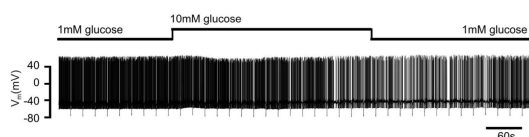


図1 YFP 陽性神経細胞における細胞外高グルコース刺激に対する神経活動抑制の様子
 明期環境下のマウスから作成した脳スライス標本を用いた YFP 陽性細胞からのカレントクランプ法による電気記録。細胞外高グルコース刺激にて活動電位の発火頻度が抑制される GI ニューロンの特徴が観察された。

(3) 前述(2)の実験に使用した脳スライス標本は飼育環境下における明期時間帯のマウスから作成した標本で有り、この時間帯はマウスにおける安息時間帯に当たるため、暗期(マウスにおける活動時間帯かつ摂餌時間帯)の状態のマウスから脳スライス標本を複製し、YFP 陽性神経細胞の細胞外高グルコース刺激に対する神経応答を解析する目的で(2)同様の実験を行った。明期時間帯の YFP 陽性神経細胞とはことなり、パッチクランプ記録に用いた全細胞(n=29)のうち、およそ69%(n=20)にあたる細胞が細胞外高グルコース刺激にて興奮性応答を示す GE ニューロンに分類され、抑制応答を示す GI ニューロンはわずかに1細胞のみであり、残りの8細胞は神経応答が観察されず、YFP 陽性細胞の細胞外グルコースに対する応答が明期・暗期により変化していることがあきらかになった。また、細胞外高グルコース刺激にて生じる神経応答(活動電位の発火頻度の上昇)は、ナトリウム・グルコース共役輸送体の阻害薬であるフロリジン存在下で有意に抑制された(図2をご参照ください)。

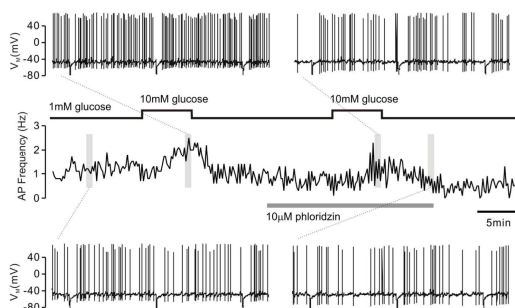


図2 暗期環境下のマウスから作成した脳スライス標本を用いた YFP 陽性細胞における細胞外高グルコース刺激に対する神経活動活性化の様子

中央は縦軸に発火頻度、横軸に記録時間の経過を表したグラフ、上下のトレースは波線にて指し示している灰色の四角で表された部位の実際のカレントクランプ法による電気記録。細胞外高グルコース刺激にて引き起こされる活動電位の発火頻度が、フロリジン存在下では優位に抑制されている様子が観察できる。

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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

久留 和成, The role of GLP-1 releasing neurons in appetite regulation: application possibility in obesity drug. 第93回日本生理学会大会, 2016. 03.22-24, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

久留 和成, Neuromodulatory effects of appetite-related factors in GLP-1 releasing neurons of mouse brainstem. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015.09.11-13, 朱鷺メッセ(新潟・新潟市)

久留 和成, マウス脳幹部における GLP-1 分泌細胞の電気生理学的特性, 第95回日本生理学会北海道地方会, 2015. 09.05, 旭川医科大学(北海道・旭川市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
 出願状況(計 0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 0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

久留 和成 (HISADOME KAZUNARI)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00592081

(2)研究分担者

該当者無し