

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460302

研究課題名(和文) インスリンの求心性迷走神経を介した脳入力と摂食・全身代謝連関

研究課題名(英文) Insulin action on vagal afferents and its regulation in feeding and metabolisms

研究代表者

岩崎 有作 (Yusaku, Iwasaki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60528420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：求心性迷走神経は各臓器と脳を繋ぐ内臓感覚神経で、末梢情報を脳へ伝達して摂食や全身代謝を調節する重要な役割を担っている。食後ホルモンのインスリン、GLP-1、オキシトシン、グルカゴンは共通の求心性迷走神経サブクラスを活性化した。内因性GLP-1による求心性迷走神経活性化は、摂食を抑制し、耐糖能を向上させた。従って、インスリンも作用する求心性迷走神経サブクラスは摂食と糖代謝調節に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Vagal afferent nerves are one of visceral sensory nerves linking from the peripheral organ to the brain, and might regulate feeding and metabolisms. Some of postprandial hormones including pancreatic insulin and glucagon, intestinal GLP-1 (glucagon-like peptide-1) and pituitary oxytocin acted on the overlapping population of vagal afferent neurons (approximately 10%). Activation of vagal afferent subclass by the endogenous GLP-1 induced suppression of feeding and improving glucose tolerance. The present study demonstrates that the subclass of vagal afferent activated by postprandial hormones including insulin regulates feeding and glucose metabolism.

研究分野：生理学(脳・自律神経、摂食調節、代謝学)

キーワード：求心性迷走神経 インスリン GLP-1 オキシトシン グルカゴン 摂食 糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

求心性迷走神経は末梢臓器と脳とを繋ぐ内臓感覚神経であり、末梢情報(ホルモン・栄養素・代謝物など)を受容し、神経情報に変化して脳に伝達し、脳機能及び脳を介した全身機能を調節している。脳は血液脳関門により末梢血から脳への物質移行が厳しく制限されている。そこで、脳の末梢情報の受容に求心性迷走神経が重要な役割を担っていると考えられている。

食後に分泌亢進される膵ホルモンのインスリンは、筋肉や脂肪組織に作用してグルコースの取り込みを促進させる機能以外にも、脳に作用し、中枢性糖・脂質代謝調節や摂食調節、神経保護、記憶学習向上などの重要な機能がある。インスリンの循環血を介した脳への移行は 0.046%と極めて低い。研究代表者は、インスリンが一部の求心性迷走神経に直接作用して活性化することを見出した(Y. Iwasaki et al., PLOS ONE 2013)。従って、インスリンの脳作用の経路として、求心性迷走神経を介した経路が示唆された。しかし、インスリンは全身の様々な臓器に作用するため、インスリンを全身に投与した際、求心性迷走神経活性化を介した効果の特定が容易ではなかった。

食後には、インスリンの以外にも腸ホルモンの GLP-1 (glucagon-like peptide-1)、膵ホルモンのグルカゴン、下垂体後葉ホルモンのオキシトシンの分泌は亢進する。一方、食前には血中のグレリン(胃ホルモン)レベルは高値を示す。これらホルモンも血液脳関門通過率は低いが、脳作用が報告されている。従って、これら食後分泌ホルモンも求心性迷走神経、さらにはインスリンによって活性化される求心性迷走神経に作用し、脳機能を調節しているのかもしれない。

## 2. 研究の目的

本研究では、インスリンの求心性迷走神経活性化作用の生理的意義を解析するために、求心性迷走神経特異的にインスリン受容体、もしくは受容体下流のシグナル分子(insulin receptor substrate-2; IRS-2)をノックダウンさせた動物を作成し、摂食及び全身代謝調節機能の解析を試みた。

## 3. 研究の方法

(1)単一 nodose ganglion ニューロンを用いた細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 測定法

Nodose ganglion (NG)は左右の頸静脈孔直下にそれぞれ存在し、求心性迷走神経の細胞体が集合する。マウスから NG を単離し、酵素処理により単一 NG ニューロンを調製し、一晚培養した。Fura-2 蛍光画像解析法及びパッチクランプ法を用いて細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度と膜電位変化を測定した。マウスの視床下部弓状核を単離し、上記と同様単一ニューロンを調製し、実験に用いた。

## (2)摂食行動解析

マウスに試験サンプルを投与(腹腔内、経口)し、その後の摂食量を解析した。

## (3)Nodose ganglion 及び延髄孤束核での c-Fos 及び pERK1/2 発現解析

マウスに試験サンプルを投与し、その後 30~90 分に心灌流固定し、免疫染色解析用の nodose ganglion と脳サンプルを調製した。神経活性化マーカーである c-Fos 及び pERK1/2 の発現を免疫染色法にて解析した。

## (4)迷走神経機能障害モデルマウスの作成(迷走神経切断術、カプサイシン処理)

麻酔下において、マウスの横隔膜下の両側迷走神経、もしくは腹側の共通肝臓枝を切断した。術後は液体食にて飼育し、1 週間の回復期間をとり、実験(摂食実験・免疫染色)に用いた。

麻酔下マウスにカプサイシンを皮下に投与し、カプサイシン感受性感覚神経の除神経を行った。

## (5)アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた求心性迷走神経特異的 GLP-1 受容体ノックダウンラットの作成

GLP-1 受容体の shRNA を発現する AAV ベクターを、麻酔下のラットの nodose ganglion に局所投与する。2 週間の回復期間をとり、摂食行動を解析した。実験終了後、GLP-1 受容体の発現する nodose ganglion と脳の GLP-1 受容体 mRNA 量を real-time PCR にて定量した結果、nodose ganglion の GLP-1 受容体 mRNA 発現量のみ 40%まで減少しており、求心性迷走神経特異的な発現減少が確認された。

## 4. 研究成果

(1)食後分泌ホルモン(GLP-1、オキシトシン、グルカゴン)の求心性迷走神経への直接作用と摂食調節

食後には、インスリン以外にも GLP-1、オキシトシン、グルカゴンといったホルモンが分泌亢進され、これらホルモンは摂食抑制を誘導する。そこで、GLP-1、オキシトシン、グルカゴンの求心性迷走神経への直接作用、及び、インスリンが活性化する一部の求心性迷走神経への直接作用を、単一求心性迷走神経(nodose ganglion neuron; NG ニューロン)の  $[Ca^{2+}]_i$  を測定した。

GLP-1 ( $10^{-8}$  M)、オキシトシン ( $10^{-7}$  M)、グルカゴン ( $10^{-8}$  M) は、それぞれ、8~15%の単一 NG ニューロンの  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。最大活性を誘導する  $10^{-7}$  M インスリンは、約 10%の NG ニューロンの  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。このインスリン応答 NG ニューロンの 2/3 以上は GLP-1、オキシトシン、グルカゴンによって  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が誘導され、活性化された。従って、インスリンによって活性化される求心性迷走神経サブクラスは、その他食後ホル

モンの GLP-1、オキシトシン、グルカゴンによっても活性化されることが分かった(雑誌論文 )。

GLP-1、オキシトシン、グルカゴンの腹腔内投与による摂食抑制は、迷走神経切断によって消失することが、研究代表者(雑誌論文 )を含め明らかとしている。従って、インスリンの求心性迷走神経への作用も摂食抑制を誘導していることが示唆された。

(2) インスリンの求心性迷走神経への直接作用を修飾する胃腸ホルモンの GLP-1 とグレリン

食前後で分泌変動する GLP-1 とグレリンは、インスリン分泌を調節している。食後分泌される GLP-1 はインスリン分泌を促進させ、反対に、食前に分泌されるグレリンはインスリン分泌を抑制する。従って、インスリン、GLP-1、グレリンの分泌は相互に関連し合っている。そこで、インスリンの求心性迷走神経への作用に関して、GLP-1 とグレリンも修飾することがあるのか、検証した。

求心性迷走神経を活性化する閾値濃度の  $10^{-9}$  M インスリンと  $10^{-9}$  M GLP-1 を同時に NG ニューロンに添加すると、それぞれの単独添加では  $[Ca^{2+}]_i$  上昇されない NG ニューロンが活性化された(相乗作用)。加えて、インスリン、GLP-1、単独添加による  $[Ca^{2+}]_i$  応答より同時添加で  $[Ca^{2+}]_i$  応答が有意に増大する NG ニューロンも存在した(相加効果)。従って、食後は、同時期に分泌されるインスリンと GLP-1 が協働して求心性迷走神経を活性化することが分かった(雑誌論文 )。

一方、グレリンは、インスリンによる NG ニューロンの  $[Ca^{2+}]_i$  上昇応答を強く抑制することが分かった。この抑制作用は、グレリン受容体アンタゴニストにより解除された。従って、食前では、血中レベルが上昇したグレリンがインスリンの求心性迷走神経の作用を抑制していることが示唆された(雑誌論文 )。

(3) 希少糖アルロースによる GLP-1 分泌と求心性迷走神経を介した摂食抑制、耐糖能向上、肥満・糖尿病改善作用

インスリンの求心性迷走神経を介した脳機能(摂食・全身代謝調節)を明らかにしたい一方、インスリンを全身投与(腹腔内)すると様々な臓器に作用したり、インスリンの血糖低下作用から複数の血糖上昇ホルモンが分泌されたりするため、解析が困難であった。

インスリン及び GLP-1 が作用する求心性迷走神経サブクラスはほぼ重複すること、インスリンと GLP-1 は協働して求心性迷走神経を活性化することから、GLP-1 の求心性迷走神経活性化を介した脳・全身作用はインスリンによるものと重複すると考えられた。しかし、GLP-1 は血中半減期が 1-2 分と極めて短く、迷走神経を活性化させるための局所高濃度に達する GLP-1 を全身へ投与にすると、薬理

的な用量となり、求心性迷走神経活性化以外の副作用(脳への移行など)も予測された。以上のことから、インスリン、GLP-1、いずれの投与にせよ問題があり、本課題を解明することは容易では無かった。

その中、研究代表者は、天然にわずかにしか存在しない希少糖の 1 種、アルロースに強力な GLP-1 分泌促進作用があることを見出した(雑誌論文 )。アルロースは生体に吸収はされても代謝されず、尿中への排泄される特徴がある。従って、アルロースは生体へ強い影響を与えることがなく、GLP-1 分泌のみ誘導すると考えられた。そこで、インスリン応答求心性迷走神経の生体機能を解明すべく、アルロースの GLP-1 分泌を用いて解析をした。

アルロースは腹腔投与でなく、経口投与により GLP-1 のみ選択的に分泌が誘導され、その他消化管ホルモンには影響を与えなかった(コレシストキニン;CCK、ペプチド YY;PYY、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド;GIP)。アルロースの経口投与は、摂食を抑制し、耐糖能を向上させた。耐糖能向上作用については、インスリン初期分泌の亢進に加えて、インスリン感受性亢進と肝糖産生抑制の関与が示された。アルロースの摂食抑制作用及び耐糖能向上作用は、GLP-1 受容体阻害剤、及び、GLP-1 受容体全身ノックアウトマウス、迷走神経切断により消失した。さらに、AAV を用いて求心性迷走神経特異的に GLP-1 受容体をノックダウンさせると、アルロースによる摂食抑制作用が完全に消失した。以上の結果より、アルロースによる内因性 GLP-1 は、求心性迷走神経の活性化を介して摂食を抑制し、インスリン分泌促進・インスリン作用増強・肝糖産生抑制を介して耐糖能を向上させていることが分かった(雑誌論文 )。加えて、アルロースの長期投与は、高脂肪肥満マウスの過食、食リズム障害、肥満、糖尿病、インスリン感受性を改善し、GLP-1 による求心性迷走神経の活性化が、過食・肥満・糖尿病改善に有効であることが示された。

以上の結果より、インスリンによる求心性迷走神経の活性化を介した生理作用も、GLP-1 によるものと類似することが推察される。今後は、AAV の nodose ganglion への局所投与技術を用いて、求心性迷走神経レベルでのインスリン受容体ノックダウンを試み、摂食や全身代謝への作用を解析する必要がある。

(4) 短鎖脂肪酸

食物繊維は、そのエネルギーが極めて少ないにもかかわらず満腹感が誘導されることが知られている。この満腹感には、食物繊維が腸内で発酵され作られる短鎖脂肪酸の関与が指摘されていた。本研究では、短鎖脂肪酸の酢酸、プロピオン酸、酪酸に短期的な摂食抑制作用があること、この摂食抑制作用に

求心性迷走神経への直接作用が関与していることを明らかとした(雑誌論文)

#### 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6件)

C. Goswami, Y. Iwasaki<sup>†</sup>, T. Yada<sup>†</sup>, (<sup>†</sup>Corresponding author): Short chain fatty acids suppress food intake by activating vagal afferent neurons. *J Nutr Biochem*, 査読有, 57, 130-135 (2018) doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.009.

Y. Iwasaki et al. (18名中1番): GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat Commun* 9, 査読有, 113 (2018) doi: 10.1038/s41467-017-02488-y.

Y. Iwasaki et al. (3名中1番): Glucagon-like peptide-1 and insulin synergistically activate vagal afferent neurons. *Neuropeptide*, 査読有, 65, 77-82 (2017) doi: 10.1016/j.npep.2017.05.003.

Y. Iwasaki et al. (5名中1番): Ghrelin counteracts insulin-induced activation of vagal afferent neurons via growth hormone secretagogue receptor. *Neuropeptide*, 査読有, 52, 55-60 (2015) doi: 10.1016/j.npep.2015.06.003.

Y. Iwasaki et al. (10名中1番): Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: A route for ameliorating hyperphagia and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 査読有, 308, R360-R369 (2015) doi: 10.1152/ajpregu.00344.2014.

E. Ayush\*, Y. Iwasaki\*, et al. (6名中2番)(\*Equally contributed): Glucagon directly interacts with vagal afferent nodose ganglion neurons to induce Ca<sup>2+</sup> signaling via glucagon receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 456, 727-732 (2015) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.031.

##### [学会発表](計26件)

岩崎有作、矢田俊彦、Rare sugar D-allulose ameliorates arrhythmic overeating, obesity and diabetes via GLP-1 and vagal afferent, 第95回日本生理学会大会(高松市、シンポジウム)、2018年

岩崎有作、矢田俊彦、食後分泌される胃腸ホルモンによる求心性迷走神経を介

した摂食・代謝調節、第44回日本神経内分泌学会(相模原市、シンポジウム)2018年

岩崎有作 他(6名中1番)、希少糖によるGLP-1分泌放出、求心性迷走神経を介した摂食抑制と耐糖能向上、第20回日本病態栄養学会年次学術集会(京都市、シンポジウム)2017年

Y. Iwasaki et al. (6名中1番) Peripherally injected oxytocin activates vagal afferents to suppress food intake and ameliorates hyperphagic obesity in db/db mice, Society for Neuroscience (San Diego), 2016年

岩崎有作 他(4名中1番)、グルカゴンによる求心性迷走神経の活性化: 中枢作用を仲介する伝達経路、第36回日本肥満学会(名古屋市)2015年

岩崎有作 他(11名中1番)、インスリンによる求心性迷走神経の活性化と過食・肥満・糖尿病を呈するIRS2欠損マウスにおけるその障害、第57回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪市)2014年

岩崎有作 (9名中1番)、オキシトシン末梢投与は求心性迷走神経を活性化し、摂食量を抑制する、平成26年度自然科学研究機構生理学研究所研究会(岡崎市)2014年

##### [図書](計1件)

Y. Iwasaki et al. (4名中1番): Nova Science Publishers, *Advances in Medicine and Biology* Volume 109, 2016年, 29

##### [産業財産権]

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

##### [その他]

###### 報道関連情報

毎日新聞、2018年1月10日、希少糖「アルロース」過食など改善に効果

日本経済新聞、2018年1月10日、希少糖の1種に肥満を防ぐ機能

朝日新聞、2018年1月10日、希少糖使い肥満・糖尿病改善に

読売新聞、2018年1月10日、希少糖肥満改善仕組み解明

南日本新聞、2018年1月10日、希少糖D-アルロース糖尿病に有効

下野新聞、2018年1月10日、希少糖作用の仕組みを解明

NHK宇都宮、2018年1月10日、希少糖についてニュースで報道

栃木テレビ、2018年1月9日、希少糖についてニュースで報道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 有作 ( IWASAKI, Yusaku )

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60528420

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし