

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461347

研究課題名(和文) GLP-1による神経性インスリン分泌促進機構の解明と2型糖尿病治療への応用

研究課題名(英文) The role of neural mechanism generated by intraportal GLP-1 in the physiological insulin secretion

研究代表者

西澤 誠 (NISHIZAWA, Makoto)

金沢医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70278117

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)：門脈内のグルコースやglucagon-like peptide-1 (GLP-1)が肝迷走神経の求心性情報を惹起し、インスリン分泌や栄養摂取の制御に重要な役割を果たしている可能性が示されている。本研究では、この神経情報が摂食行動およびインスリン分泌能の賦活に果たす効果を明らかにする。ラットの肝迷走神経切断は摂食量に影響しなかったが、飲水量の減少をもたらした。頸静脈内糖負荷に対するインスリン分泌総量は同切断で約20%減少したが、門脈内負荷時との明らかな違いは認めなかった。持続的門脈内グルコースおよびGLP-1注入後、インスリン分泌は増加するが、肝迷走神経切断の有無で明らかな差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Glucagon-like peptide-1 and glucose in the portal vein have been known to generate neural information in the vagal nerve in rodents and shown to stimulate insulin secretion in the early phase. This study aimed to determine the role of the neural signal in the feeding and drinking behavior and insulinotropic effect in rats. Hepatic vagotomy reduced the amount of water drunk, but not food taken. The insulin secretion calculated as area under the curve following by glucose infusion (500 mg/kg) into the jugular vein was reduced around 20% in hepatic vagotomized rats. After the continuous infusion of glucose (10 mg/kg/min) and GLP-1 into the portal vein, the insulin secretions increased around 20% both in sham-operated and vagotomized rats and did not differ significantly between the groups with and without hepatic vagotomy.

研究分野：インスリン分泌

キーワード：GLP-1 インクレチン インスリン分泌 グルコース 迷走神経 食行動

1. 研究開始当初の背景

膵細胞からのインスリン分泌の調節に迷走神経の関与が知られているが、摂食時のインスリン分泌調節を中心とする栄養代謝制御機構における神経系の役割は未だ明らかではない。摂食時、吸収された栄養素は消化管から分泌される glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) などの消化管ホルモンと共に門脈血流を経て肝に流入するが、動物実験では肝門脈域には血中の栄養素や一部の消化管ホルモンを感受し中枢神経へ求心性神経情報を伝達する機構の存在が知られている。特に肝から中枢神経を経て膵への遠心性神経情報を惹起する GLP-1 については、迷走神経の求心路神経細胞のある節神経節に GLP-1 受容体遺伝子の発現が確認されるのに対し (Auton Neurosci 110:36-43, 2002)、GIP については神経活動に影響を与えず、同神経節での受容体遺伝子発現を認めず、インスリン分泌促進作用を有する 2 つの消化管ホルモンについて神経性作用の違いが見出されている。ラットで門脈内の GLP-1 による神経情報は、糖負荷時のインスリンの早期分泌に重要な役割を果たしている可能性が示されているが (Am J Physiol Endocrinol Metab 305:E376-E387, 2013)、恒常的なインスリン分泌能に対する効果は明らかではない。一方、GLP-1 の摂食抑制作用に迷走神経の求心性情報の関与が示唆されているが、これについても詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

門脈内栄養素 (グルコース) および消化管ホルモン (GLP-1) の肝迷走神経による感受機構を介する栄養代謝への作用を明らかにするために、本研究ではラットを用いて (1) 自由摂餌・飲水行動に対する同神経情報の役割、(2) 生体でのグルコースに対するインスリン分泌反応における同神経情報の役割、(3) 門脈内のグルコースおよび GLP-1 による持続的同神経情報惹起を介した膵細胞のインスリン分泌能に与える効果、を検証した。

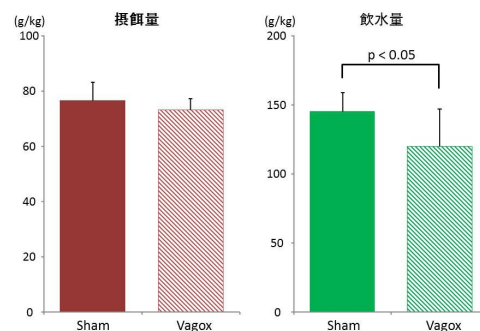
3. 研究の方法

12 週齢の雄性ウイスターラットを用いて、麻酔下で開腹し肝迷走神経切断 (Vx)、非切断 (Sh) を行い、門脈内および頸静脈にそれぞれ注入用、頸動脈に採血用カテーテルを留置し閉腹した。無拘束状態で、術前の摂餌量に回復した術後 5 日目から (1) 3 日間の摂餌量、飲水量を測定し Sh 群 (7 匹) と Vx 群 (7 匹) とで比較した。次いで術前体重に回復した術後 8 日目に以下の実験を行なった。(2) 10 時間絶食とした後、グルコース 500mg/kg を門脈内 (pvGTT) および頸静脈内 (jvGTT) へ 30 秒間で注入し、頸動脈から注入前、注入終了後 1 分、3 分、5 分、10 分、15 分、30 分で採血した。pvGTT と jvGTT は順不同で両実験は 1 週間の間隔で実施した。さらに別のラットで

同様の手術を施行し体重が回復した術後 8 日目に、(3) jvGTT を行った後、自由摂餌下でグルコース 10mg/kg/min および GLP-1 1pmol/kg/min を 7 日間門脈内持続注入し、その後で jvGTT を実施し、同様に検体を採取した。実験 (2)、(3) で採取した検体について血中グルコースおよびインスリン濃度を測定した。インスリン分泌総量は時間 - 濃度図を作成し曲線化面積 (AUC; Area under the curve) を計算し求めた。各測定で得られた結果は平均 ± 標準偏差 (SD) で示し、統計学的検定を行ない、 $p < 0.05$ で有意差を判定した。

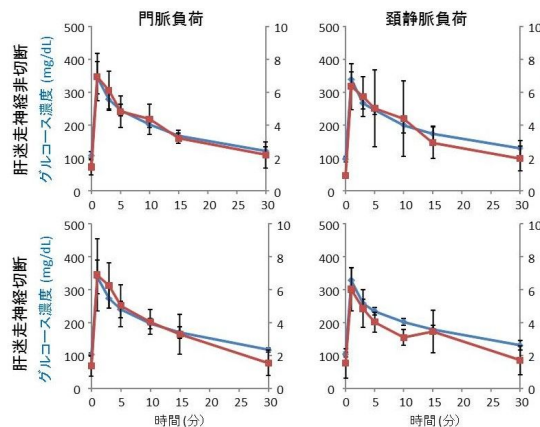
4. 研究成果

(1) 術後回復した時点の 3 日間の平均摂餌量 (g/kg/day) は、Sh 群で 76.5 ± 6.7 、Vx 群で 73.1 ± 4.2 で有意差は認めなかった。また、この間の体重変動に両群で差はなかった。平均飲水量 (g/kg/day) は、Sh 群 145.3 ± 13.7 、Vx 群で 119.8 ± 27.0 で、Sh 群に比べ Vx 群で有意に飲水量が少なかった ($p < 0.05$)。この結果は、自由摂餌行動に対し迷走神経肝枝を介する求心性神経情報の影響は少ないことを示唆している。GLP-1 は食欲抑制および胃排泄抑制作用を有しており、その作用に迷走神経求心性情報の関与を示唆する報告がある。本実験では、個々の栄養素や消化管ホルモンの作用については判断できないので、詳細については今後さらなる検討が必要である。一方、水摂取は迷走神経切断ラットで有意に減少したことから、肝門脈からの神経情報が飲水行動制御に重要であることが示唆された。この効果が、直接中枢神経に作用したものであるのか、あるいは尿量調節を介し作用したものであるかは、明らかではない。また、様々な門脈内物質あるいは浸透圧など因子のうち、どれが飲水行動制御に重要であるか興味深い。



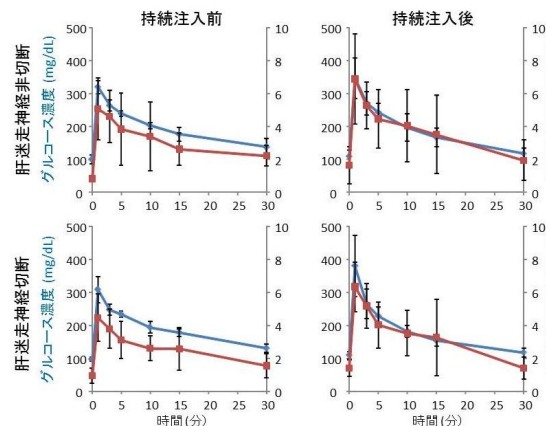
(2) pvGTT および jvGTT の両負荷検査を行えたのは Sh 群 5 匹、Vx 群 5 匹であった。10 時間絶食後、負荷前の血中グルコースおよびインスリン濃度は Sh 群と Vx 群で同等であった。グルコース負荷に対するグルコース濃度 (mg/dL) の頂値は、Sh 群で pvGTT 1 分後 344.7 ± 49.0 、jvGTT 1 分後 338.4 ± 22.9 、Vx 群で pvGTT 1 分後 337.9 ± 51.3 、jvGTT 1 分後 327.6

±38.4 と投与経路で差はなく、肝迷走神経切断の有無でも差は認めなかった。また、血糖値の推移についても投与経路、神経切断の有無で有意差は認めなかった。インスリン濃度 (ng/mL) について、頂値は Sh 群で pvGTT 1 分後 6.9 ± 1.4 、jvGTT 1 分後 6.3 ± 1.1 、Vx 群で pvGTT 1 分後 6.9 ± 2.2 、jvGTT 1 分後 6.0 ± 1.3 と投与経路で差はなく、肝迷走神経切断の有無でも有意差は認めなかった。負荷後のインスリン濃度変動は、それぞれの群について負荷した経路による違いは認めなかった。また、インスリン分泌総量についても、負荷経路による違い、肝迷走神経切断の有無による有意な違いは認めなかった。このことから、門脈内グルコースによる迷走神経シグナルのインスリン分泌に与える影響は少ないことが示唆された。我々が以前に行った門脈内への GLP-1 およびグルコース同時投与を行った場合、早期のインスリン分泌は Vx 群で有意に低下したことから、迷走神経シグナルには GLP-1 の存在が必要であると考えられる。一方、GLP-1 のみを門脈内に注入しても血中インスリン濃度は上昇しなかったことから、同神経シグナルがインスリン分泌刺激作用を発揮するには GLP-1 とグルコースの両者の存在が必要であると考えられる。一方、これらの注入実験では、腓循環のグルコース濃度も上昇しているため、門脈内のグルコースと腓循環血中のグルコースのどちらが重要であるのかは今後明らかにされるべき課題である。



(3)7日間のグルコースおよびGLP-1の門脈内持続注入後、10時間絶食後のグルコース濃度 (mg/dL) は Sh 群で持続注入前の 101.1 ± 13.3 から 109.1 ± 18.8 ($p=0.06$)、Vx 群で 97.0 ± 5.7 から 109.5 ± 11.5 ($p<0.05$) に上昇した。一方、インスリン濃度 (ng/mL) は、Sh 群で 0.83 ± 0.15 から 1.66 ± 1.13 ($p=0.06$)、Vx 群で 0.94 ± 0.45 から 1.39 ± 0.51 ($p=0.08$) へ上昇したが、Sh 群と Vx 群との間に有意差は認めなかった。また、グルコース濃度とインスリン濃度を乗じて求めたインスリン抵抗性の代替指数は、Sh 群で持続注入前の 2.3 倍 ($p=0.07$)、Vx 群で 1.7 倍 ($p<0.05$) へ増加していた。

頸静脈へのグルコース負荷後 (jvGTT) のグルコース濃度は持続注入前で Sh 群と Vx 群との間で有意差は認めず、持続注入後の jvGTT 時の濃度変動も両群とも持続注入前との違いは認めなかった。一方、インスリン濃度 (ng/mL) の頂値は、Sh 群で持続中前の jvGTT 1 分後 5.1 ± 1.9 から持続注入後の 1 分後 6.9 ± 2.7 ($p<0.05$)、Vx 群で持続中前の jvGTT 1 分後 4.5 ± 1.4 から持続注入後の 1 分後 6.3 ± 1.5 ($p<0.05$) へ両群とも有意に上昇したが、肝迷走神経切断の有無で差は認めなかった。また、持続注入後のインスリン濃度の推移についても両群に明らかな差はなかった。インスリン分泌総量は持続注入前で Sh 群は Vx 群より 19% 多かったが有意差は認めず ($p=0.35$)、持続注入後のインスリン分泌総量は注入前と比べ Sh 群で 18% ($p=0.20$)、Vx 群で 26% 増加したが ($p=0.13$)、両群間で有意差は認めなかった。



肝迷走神経切断ラットにおけるインスリン分泌は非切断ラットに比較し低下している傾向を認めた。一方、グルコースおよび GLP-1 の門脈内持続注入によりインスリン分泌能は両群とも増加傾向を示したが、肝迷走神経切断の有無で有意な差は認めず神経シグナルの明らかな効果は観察されなかった。しかし、この結果から同神経シグナルのインスリン分泌への関与が少ないとの結論を導くにはいくつかの検証が必要と考える。本実験では、門脈内へのグルコースおよび GLP-1 の定量注入を 7 日間持続的に行ったが、神経性インスリン分泌が明瞭に観察された実験では、門脈内へのグルコースおよび GLP-1 の注入を 10 分間で行っており、特にその注入初期に明瞭な神経性分泌促進効果を見出している (Am J Physiol Endocrinol Metab 305:E376-E387, 2013)。生理的条件下では摂食行動は断続的に行われるので、門脈内のグルコースおよび GLP-1 の濃度は上昇下降を繰り返しており、そうした変動が神経性分泌を強く惹起する可能性が考えられる。

持続的な高血糖は膵細胞のインスリン分泌低下をもたらすことが知られている (糖尿病性)。本実験で行ったグルコース 10

mg/kg/min 持続注入時、循環血中のグルコース濃度は 1~2 時間後を頂値として下降し始め、24 時間後にはほぼ注入開始時に近い濃度となる。しかし、門脈内は末梢血よりグルコース濃度は持続的に高くなっており、慢性的な上昇に対しては神経シグナルも感受性が低下してしまう、いわゆる神経性糖毒性が生じる可能性があると思われる。一方、GLP-1 については慢性的血中濃度の上昇に対するインスリン分泌刺激作用の低下は知られていないが、本来、血中半減期が短く、最も変動が大きいと考えられる門脈内濃度を持続的に高めることは、同様に GLP-1 に対する迷走神経の感受性を低下させる可能性は十分あり得ると思われる。これらの課題に取り組むことは、糖尿病で生じる糖毒性を含めたインスリン分泌障害における神経性分泌促進機構の障害の関与、および GLP-1 によるインスリン分泌促進機構の生体における役割の詳細を明らかにすることとなり、糖尿病病態解明および新しい治療法の発見につながる意義がある。

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 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西澤 誠 (NISHIZAWA, Makoto)
金沢医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70278117

(2)研究分担者

中川 淳 (NAKAGAWA, Atsushi)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70262574

古家 大祐 (KOYA, Daisuke)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：70242980